

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

ŠTÚDIUM SKLADANIA A PUČANIA ČASTÍC VÍRUSU
MYŠIEHO TUMORU PRSNEJ ŽLAZY

Peter Hoboth

Praha 2009

Vedúci diplomovej práce:

Aleš Zábranský, PhD.

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracoval samostatne, s použitím citovanej literatúry a pod vedením školiteľa Aleša Zábranského, PhD.

V Prahe, dňa 2. 5. 2009

.....

Táto diplomová práca bola vypracovaná na Ústave organickej chémie a biochémie AV ČR, v. v. i., v období október 2007 až máj 2009 ako súčasť grantu č. KJB400550517 od Grantovej agentúry AV ČR a výskumného centra 1M0508 od MŠMT ČR.

Na tomto mieste by som rád poďakoval Ive Pichovej, PhD. za to, že mi umožnila pracovať na zaujímavej téme a získať užitočné skúsenosti a taktiež za jej podnetné pripomienky k tejto práci.

Veľkú vďaku si zaslúži Aleš Zábranský, PhD. za jeho vedenie tejto práce a obzvlášť za prejavenu trpezlivosť a pomoc pri zdolávaní úskalí vedeckej práce.

Vďaka patrí aj Jitke Štokrovej, PhD. a Ing. Romane Hadravovej za excelentné spracovanie elektrón mikroskopických analýz.

Všetkým, ktorí tvoria skupinu vírusových a mikrobiálnych proteínov ÚOCHB AV ČR, by som sa chcel poďakovať za ich ochotu a ústretivosť.

Jarke Kalaninovej ďakujem za prejavenu ústretivosť.

Veľká vďaka patrí v neposlednej rade Bohu, mojej rodine, hlavne mame a babke, a taktiež priateľom za ich podporu a pochopenie.

Study of the assembly and budding of mouse mammary tumor virus MMTV

Abstract

Mouse mammary tumor virus (MMTV) is a prototypical member of the *Betaretrovirus* genus characterized by the ability to preassemble viral particles in the cytoplasm of the host cells. Intracellularly preassembled particles are subsequently transported to the plasma membrane being enveloped by a lipid bilayer and released from the cell in the process referred to as budding. Retrovirus particle assembly is driven by the Gag polyprotein precursor, which is cleaved in the maturation process by virus-encoded protease to liberate multiple structural proteins. The matrix (MA), capsid (CA) and nucleocapsid (NC) protein domains that are common to all retroviruses and in the case of MMTV, also the noncanonical domains, pp21, p3, p8 and „n“, located between MA and CA domain are present. The role of these specific domains remains undefined.

The retroviral budding is stimulated by short peptide motifs, so-called late (L) domains, located within Gag sequence. These L domains mediate interactions with cellular proteins normally involved in the biogenesis of the multivesicular bodies and protein sorting. Three types of the L domains have been identified to date, with the consensus of the amino acid sequences (i) P(T/S)AP, (ii) YP(x)nL (where x represents any amino acid and $n \leq 3$) and (iii) PPxY. Disruption of the L domain sequence prevents viral particle release at the late stages. No L domain has been described for MMTV yet.

The aim of this study was to characterize the process of the mouse mammary tumor virus particle assembly and release. Therefore this thesis focused on the noncanonical domains presented within Gag polyprotein, as well as on selected amino acid sequences located within Gag molecule. Results described here provide the first glimpse into the role of unique protein domains of MMTV Gag polyprotein precursor and the importance of specific amino acid residues.

Key words: Mouse mammary tumor virus MMTV, Gag polyprotein precursor, Assembly, Budding, Mutational analysis, Yeast two-hybrid assay

Kľúčové slová: Vírus myšieho tumoru prsnej žľazy MMTV, Gag polyproteínový prekursor, Skladanie, Pučanie, Mutačná analýza, Kvasinkový dvojhybridový systém

Zoznam použitých skratiek

AD - aktivačná doména
ALV - vírus vtácej leukémie (z angl. avian leukosis virus)
BD - väzbová doména
BLV vírus leukémie hovädzieho dobytku (z angl. bovine leukemia virus)
CA kapsidový proteín
CTD - karboxyterminálna doména (z angl. C-terminal domain)
CypA - cyklofilín A
DNA - deoxyribonukleová kyselina
dsDNA - dvojláknová
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)
gag - retrovírusový gén kódujúci štruktúrne proteíny
Gag - štruktúrny polyproteín (a angl. group specific antigen)
GDP - guanozín difosfát
SFV - penový vírus opíc (z angl. simian foamy virus)
HIV - vírus ľudskej imunodeficiencie (z angl. human immunodeficiency virus)
HTLV - vírus ľudskej T leukémie (z angl. human T leukemia virus)
IAP - vnútrocytové 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)
MA - matrixový proteín
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 lúnia vírusu myšej leukémie
M-PMV - 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 viažúce miesto (z angl. primer binding site)
PM - plazmatická membrána
pol - retrovírusový gén kódujúci reverznú transkriptázu a integrázu
Pol - polyproteín so sekvenciou reverznej transkriptázy a integrázy
PR - proteáza
pro - retrovírusový gén kódujúci proteázu
R - repetícia
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
SIV - vírus opičej imunodeficiencie (z angl. simian immunodeficiency virus)
ssRNA - jednovláknová ribonukleová kyselina
SU - povrchový proteín (z angl. surface)
TM - transmembránový proteín
tRNA - transférová ribonukleová kyselina
U3 resp. U5 - unikátna sekvencia na 3' resp. 5' konci
Ub - ubiquitín
UBC - ubiquitín konjugujúci enzým (z angl. ubiquitin conjugating enzyme)
VLPs - vírusom podobné častice (z angl. virus-like particles)

1	Úvod.....	9
2	Literárny prehľad.....	10
2.1	Retrovírusy	10
2.2	Klasifikácia retrovírusov	10
2.3	Genóm retrovírusov	11
2.4	Produkty retrovírusových génov.	12
2.5	Štruktúrne proteíny retrovírusov	13
2.5.1	Matrixový proteín	13
2.5.2	Kapsidový proteín	14
2.5.3	Nukleokapsidový proteín	14
2.6	Životný cyklus retrovírusov	15
2.7	Morfogenéza	16
2.8	Maturácia retrovírusových častíc.....	19
2.9	Retrovírusové L domény	20
2.9.1	L doména P(T/S)AP	22
2.9.2	L doména YP(x) _n L	23
2.9.3	L doména PPxY	23
2.9.4	Retrovírusy s viacerými L doménovými motívmi	24
2.9.5	Pozícia L domén a ich funkčná zameniteľnosť.....	25
2.9.6	Pôsobenie vírusovej proteázy verus L doménová funkcia	26
2.9.7	Interakcie L domén s bunecnými proteínmi.....	26
2.9.8	Ubiquitín	27
2.9.9	Ubiquitylácia molekúl Gag	28
2.9.10	Vzťah proteazómov k uvoľňovaniu retrovírusov z buniek	28
2.9.11	Triedenie proteínov a formovanie vačkov v MVB	29
2.9.12	TSG101 a pučanie retrovírusov	31
2.9.13	ALIX/AIP1 a pučanie retrovírusov	32
2.9.14	Ubiquitín ligázy rodiny NEDD4 a pučanie retrovírusov.....	33
2.10	Vírus myšieho tumoru prsnej žľazy MMTV	35
2.10.1	Genóm MMTV	35
2.10.2	Štruktúrne proteíny MMTV	36
2.10.3	Molekulárny klon MMTV.....	37
2.10.4	Ľudský betaretrovírus.....	38
3	Materiál a Metodika	39
3.1	Materiálové a prístrojové vybavenie	39
3.1.1	Chemikálie	39
3.1.2	Roztoky a médiá.....	40
3.1.3	Enzými	43
3.1.4	Komerčné kity pre izoláciu a purifikáciu DNA	43
3.1.5	Bunecný materiál	43
3.1.6	Oligonukleotidy	44
3.1.7	Plazmidová DNA	45
3.1.8	Prístrojové vybavenie.....	48

3.2	Metodická časť	49
3.2.1	Manipulácia s DNA.....	49
3.2.1.1	Polymerázová reťazová reakcia	49
3.2.1.2	Elektroforetické delenie molekúl DNA v agarózovom gély	50
3.2.1.3	Izolácia fragmentov DNA z agarózového gély	50
3.2.1.4	Restriktčné štiepenie DNA.....	50
3.2.1.5	Ligácia fragmentov DNA.....	50
3.2.1.6	Príprava kompetentných buniek <i>E.coli</i> DH5 α za použitia roztoku CaCl $_2$	51
3.2.1.7	Transformácia kompetentných buniek <i>E.coli</i> DH5 α metódou tepelného šoku.....	51
3.2.1.8	Preparácia plazmidovej DNA	52
3.2.1.9	Sekvenačná analýza DNA.....	52
3.2.2	Práca s tkanivovými kultúrami.....	52
3.2.2.1	Kultivácia ľudských endoteliálnych ľadvinových buniek 293T	52
3.2.2.2	Transfekcia buniek v tkanivovej kultúre.....	52
3.2.2.3	Metabolické značenie tkanivovej kultúry	53
3.2.2.4	Imunoprecipitácia MMTV proteínov	53
3.2.2.5	Preparácia vírusových častíc uvoľnených z buniek do inkubačného média	54
3.2.2.6	Vertikálna elektroforéza v denaturujúcom polyakrylamidovom gély.....	54
3.2.2.7	Kvantifikácia.....	54
3.2.2.8	Fixácia buniek pre elektrón mikroskopickú analýzu.....	55
3.2.2.9	Modely proteínových štruktúr.....	55
4	<u>Výsledky.....</u>	56
4.1	Charakterizácia parentálnych konštruktov pSMt-HYB a pSMt-HYB/D26A.....	56
4.1.1	Kvantifikácia.....	58
4.1.2	Elektrónová mikroskopia	59
4.2	Nekanonické domény MMTV Gag polyproteínu.....	60
4.2.1	Fosfoproteín pp21	60
4.2.1.1	Príprava expresného vektoru pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21	61
4.2.1.2	Vplyv delécie pp21 na tvorbu a uvoľňovanie častíc MMTV z buniek	61
4.2.1.3	Kvantifikácia.....	62
4.2.1.4	Elektrónová mikroskopia	63
4.2.2	Proteínové domény p3-p8-n.....	64
4.2.2.1	Príprava expresného vektoru pSMt-HYB/D26A/ Δ (p3-n).....	65
4.2.2.2	Vplyv delécie p3-p8-n na uvoľňovanie častíc MMTV	65
4.2.2.3	Kvantifikácia.....	67
4.2.2.4	Elektrónová mikroskopia	68
4.2.3	Minimálny MMTV Gag polyproteínový prekurzor	69
4.2.3.1	Príprava expresných vektorov pSMt-HYB/ Δ (pp21-n) a pSMt-HYB/D26A/ Δ (pp21-n)	69
4.2.3.2	Minimálny Gag v procese tvorby a uvoľňovania MMTV častíc	70

4.2.3.3	Elektrónová mikroskopia	73
4.3	Identifikácia a testovanie motívov s potenciálnou L doménovou funkciou	74
4.3.1	Motív PSAP a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek	74
4.3.1.1	Príprava expresných vektorov pSMt-HYB/ASAA a pSMt-HYB/D26A/ASAA	75
4.3.1.2	Vplyv P36A-P39A substitúcie v sekvencii CA proteínu na tvorbu a uvoľňovanie častíc MMTV	76
4.3.1.3	Kvantifikácia.....	77
4.3.1.4	Elektrónová mikroskopia	78
4.3.2	Motív YPIWL a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek	79
4.3.2.1	Príprava expresných vektorov pSMt-HYB/AIWL a pSMt-HYB/D26A/AIWL	80
4.3.2.2	Vplyv Y81A-P82A mutácie na tvorbu a uvoľňovanie častíc MMTV	80
4.3.2.3	Elektrónová mikroskopia	81
4.4	Interakcia Gag polyproteínov s bunecnými proteínmi.....	84
4.4.1	Ľudský betaretrovírus HBRV	84
4.4.2	Kvasinkový dvojhybridový systém.....	84
4.4.2.1	Príprava expresných konštruktov pre dvojhybridový systém	85
4.4.2.2	Homotypická interakcia medzi HBRV Gag polyproteínmi a HBRV Gag polyproteínmi skrátеныmi o MA a pp21 doménu	87
4.4.2.3	Testovanie potenciálnej interakcie polyproteínu Gag s bunecnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4	88
<u>5</u>	<u>Diskusia</u>	<u>90</u>
<u>6</u>	<u>Súhrn.....</u>	<u>96</u>
<u>7</u>	<u>Zoznam použitej literatúry.....</u>	<u>98</u>

1 Úvod

Vírus myšieho tumoru prsnej žľazy MMTV je infekčným agens spôsobujúcim špecifické epiteliálne neoplázie a je prototypickým zástupcom rodu *Betaretrovirus*. Tento rod je charakterizovaný tvorbou nezrelých kapsíd v cytoplazme infikovaných buniek, odkiaľ sú transportované k cytoplazmatickej membráne, kde v procese pučania získavajú obal a sú uvoľňované z buniek. Hlavnou štruktúrnou komponentou retrovírusov je polyproteínový prekurzor Gag, ktorého súčasťou sú tzv. L (z angl. late) domény, esenciálne v neskorých fázach uvoľňovania vírusových častíc z povrchu buniek. Súčasne s procesom pučania, alebo následne po uvoľnení nezrelých vírusových častíc z buniek dochádza k aktivácii vírusom kódovanej proteázy a v procese maturácie dochádza k proteolytickému štiepeniu prekurzoru Gag. Napriek tomu, že aminokyselinová sekvencia Gag polyproteínu je medzi rôznymi druhmi retrovírusov málo konzervovaná, v ekvivalentnej pozícii sa u všetkých retrovírusov nachádzajú matrixová (MA), kapsidová (CA) a nukleokapsidová (NC) doména. V závislosti na konkrétnom druhu sú prítomné špecifické, tzv. nekanonické domény. V prípade MMTV sú v primárnej štruktúre polyproteínu Gag lokalizované medzi MA a CA doménou a jedná sa o fosfoproteín pp21 a proteíny p3, p8 a „n“. Na rozdiel od príbuzného Masonovho-Pfizerovho opičieho vírusu (M-PMV) nebol proces tvorby a uvoľňovania MMTV častíc dostatočne charakterizovaný, nebola popísaná úloha nekanonických domén MMTV Gag polyproteínu, ani identifikovaná L doménová sekvencia.

Táto diplomová práca sa zaoberá mutačnou analýzou nekanonických domén MMTV Gag polyproteínu a sekvencií, ktoré splňajú konsenzus s doposiaľ definovanými L doménami. Taktiež sa venuje potenciálnym interakciám medzi Gag polyproteínmi a bunecnými proteínmi o ktorých je známe, že sa podieľajú na uvoľňovaní retrovírusových častíc z buniek.

Ciele, ktoré boli vytýčené a podarilo sa ich dosiahnuť, boli viaceré. Jednalo sa o prípravu mutovaných druhov MMTV s deléciami nekanonických domén, u ktorých bola testovaná schopnosť vytvárať a uvoľňovať vírusové častice z buniek. Ďalej boli zavedené bodové mutácie do sekvencií, ktoré by bolo možné považovať za potenciálnych kandidátov na L doménovú funkciu a testovaný bol vplyv týchto mutácií na tvorbu a uvoľňovanie vírusových častíc z buniek. Okrem toho boli pripravené konštrukty pre testovanie proteín - proteínových interakcií v kvasinkovom dvojhybridovom systéme a preskúmaná bola interakcia s Gag polyproteínu s vybranými bunecnými proteínmi.

2 Literárny prehľad

2.1 Retrovírusy

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). Význam retrovírusov bol vyzdvihnutý už pred vyše 20 rokmi a to z nasledujúcich dôvodov. Životný cyklus retrovírusov zahŕňa mnoho krokov, ktorých štúdium významne prispieva k pochopeniu biológie eukaryotických buniek a ich vírusov. Patria sem reverzná transkripcia vírusovej RNA do provírusovej DNA, integrácia provírusovej DNA do hostiteľského genómu (chromozómu) a expresia vírusových génov hostiteľskými mechanizmami na základe signálov pochádzajúcich od vírusu. Obzvlášť významným bol objav reverznej transkripcie, ktorý v roku 1970 nezávisle vykonali Howard Temin a David Baltimore. Za tento objav boli spolu s Renaatom Dulbeccom v roku 1975 ocenení Nobelovou cenou za fyziológiu a medicínu. Ďalšou významnou vlastnosťou retrovírusov je ich onkogénny potenciál, ktorý prispel k objasneniu mnohých aspektov kontroly bunecného cyklu a vzniku nádorového bujnenia buniek. Retrovírusy sú významnými ľudskými a veterinárnymi patogénmi a sú prirodzenými genetickými vektormi, ktoré môžu byť modifikované za experimentálnymi alebo terapeutickými účelmi (VARMUS, 1988; SVOBODA et al., 2003).

2.2 Klasifikácia retrovírusov

Čeľaď *Retroviridae* sa z fylogenetického hľadiska delí do nasledujúcich rodov (BÜCHEN-OSMOND, 2006):

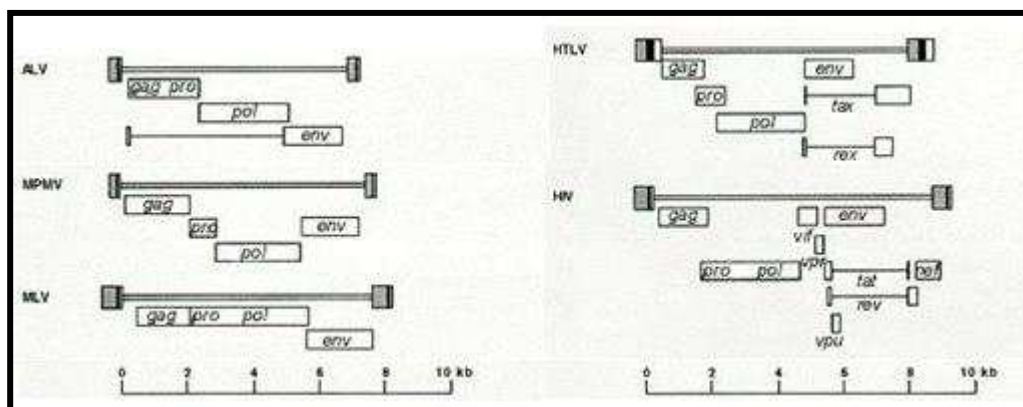
- *Alpharetrovirus*. Jedná sa o exogénne i endogénne vtáče vírusy. Z morfofenetického hľadiska sa radia k typu C (viz kapitolu 1.7). Medzi predstaviteľov tohto rodu patria vírus vtácej leukémie (ALV), alebo vírus Rousovho sarkómu (RSV).
- *Betaretrovirus*. Tento rod zahŕňa exogénne a endogénne vírusy myší, oviec a primátov, ktoré patria k morfofenetickému typu B (viz kapitolu 1.7), ako napr. vírus myšieho tumoru prsnej žľazy (MMTV), alebo D (viz kapitolu 1.7), ako napr. Masonov-Pfizerov opičí vírus (M-PMV).
- *Gammaretrovirus*. Patria sem exogénne i endogénne vírusy cicavcov morfofenetického typu C, ako napr. vírus myšej leukémie (MLV).

- *Deltaretrovirus*. Rovnako ako v predchádzajúcom prípade sa jedná o vírus morfogenetického typu C, spôsobujúce neurologické poruchy alebo leukémiu a patrí sem napr. vírus leukémie hovädzieho dobytku (BLV).
- *Epsilonretrovirus*. Všetci zástupcovia tohto rodu sú exogénne vírusy s morfogenézou typu C a patrí sem napr. WDSW (Walley dermal sarcoma virus).
- *Lentivirus*. Lentis znamená pomalý a do tejto skupiny patrí dobre známy vírus ľudskej imunodeficiencie typu 1 alebo 2 (HIV-1, resp. 2) a taktiež vírus imunodeficiencie opíc (SIV). Z morfogenetického hľadiska sa jedná o typ C.
- *Spumavirus*. Spuma znamená pena a tento názov vychádza z penovitého vzhľadu buniek infikovaných spumavírusmi, ktorý je spôsobený vakuolizáciou. Z morfogenetického hľadiska boli zaradené medzi typ B, resp. D a patrí sem napr. SFV (Simian foamy virus).

2.3 Genóm retrovírusov

Genóm retrovírusov je tvorený dimérom identických, lineárnych ssRNA vlákien o veľkosti 7-11 kb. Dimérizácia je kritickým krokom v životnom cykle retrovírusov a sprostredkujú ju vodíkové mostíky medzi 5'-proximálnou oblasťou RNA molekúl, ktorá zaujíma konformáciu stonka-slučka (z angl. stem-loop) (GREATOREX J. S. et al., 1996; HADDRICK M. et al., 1996). 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. Replikačne kompetentné, infekčné retrovírusy majú štyri hlavné gény 5'-*gag-pro-pol-env*-3', kódujúce štruktúrne a enzýmové komponenty vírusu. Genóm 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. V 5'-proximálnej oblasti génu *gag* sa nachádza sekvencia esenciálna pre inkorporáciu molekúl genómovej RNA do vznikajúcich viriónov, označovaná gréckym písmenom ψ , alebo pomenovaním enkapsidačný signál. Jednoduché retrovírusy, medzi ktoré patria napríklad vírus myšej leukémie (MLV), Mason-Pfizerov opičí vírus (MPMV) alebo vírus vtácej leukémie (ALV) nesú len tieto štyri gény (obr. 1 vľavo). Vírus ľudskej imunodeficiencie (HIV)

alebo vírus ľudskej T leukémie (HTLV) majú navyše gény *tat* a *rev*, resp. *tax* a *rex* (obr. 1 vpravo) a patria medzi tzv. komplexné retrovírusy.



Obr. 1. Genetická organizácia vybraných retrovírusov. Obdĺžniky s označením génov *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *tax*, *rex*, *tat*, *rev*, *vpu*, *vif* a *nef* 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; MPMV – Mason-Pfizerov opičí vírus; HTLV – vírus ľudskej T leukémie; HIV – vírus ľudskej imunodeficiencie, typ 1. Úsečka dole slúži ako mierka veľkosti genómu v kb (Prevzaté zo Swanstrom a Wills, 1997).

2.4 Produkty retrovírusových génov.

Produktom génu *gag* je polyproteínový prekurzor Gag, z ktorého pri proteolytickom štiepení v procese zvanom maturácia vznikajú hlavné štruktúrne komponenty retrovírusov. Všeobecne sú pre všetky retrovírusy spoločné matrixový (MA), kapsidový (CA) a nukleokapsidový (NC) proteín a v závislosti na druhu retrovírusu sú prítomné tzv. nekanonické proteíny. Gén *pro* kóduje retrovírusovú aspartátovú proteázu (PR) uplatňujúcu sa v neskorých štádiách pučania retrovírusov pri proteolytickom spracovaní polyproteínových prekurzorov v procese maturácie (viz kapitolu 2.8). 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 sprostredkávajú 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.

Produkt génu *gag*, Gag polyproteínový prekurzor, je prekladaný na voľných polyzómoch v cytoplazme hostiteľskej bunky z nezostrihutej genómovej mRNA. Sekvencie kódujúce retrovírusové enzýmy protázu (PR), reverznú transkriptázu (RT) a integrázu (IN) sú lokalizované uprostred genómu, pričom promótor sa nachádza v provírusovej DNA 5' proximálne pred genómom *gag*. Ich translácia prebieha

z nezostrihnutej genómovej mRNA a jej produktom je fúzny polyproteínový prekurzor na C-konci predĺžený o sekvenciu Pro, resp. Pol a N-koncovo začínajúci sekvenciou Gag, zabezpečujúcou intracelulárny transport týchto produktov na miesto tvorby viriónov. U HIV-1 sú gény *pro* a *pol* v rovnakom čítacom rámci a na rozhraní génov *gag* a *pro* dochádza k ribozomálnemu posunu čítacieho rámca o -1 nukleotid. Vznikajú polyproteínové prekurzory Gag a Gag-Pro-Pol. V prípade vírusu Rousovho sarkómu (RSV) sú v rovnakom čítacom rámci gény *gag* a *pro* a k ribozomálnemu posunu čítacieho rámca o (-1) nukleotid dochádza na rozhraní génov *pro* a *pol*. Vznikajú fúzne produkty Gag-Pro a Gag-Pro-Pol. U MMTV, MPMV, HTLV sú gény *gag*, *pro* a *pol* v odlišných čítacích rámcoch. Pre vytvorenie Gag-Pro, resp. 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. 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).

2.5 Štruktúrne proteíny retrovírusov

2.5.1 Matrixový proteín

Matrixový proteín (MA) je lokalizovaný na N-konci molekuly Gag polyproteínového prekurzoru u všetkých retrovírusov. Jedná sa o periférny membránový proteín, pričom za interakciu MA proteínu s lipidmi vírusového obalu je zodpovedná N-terminálna oblasť molekuly. Matrixový proteín väčšiny retrovírusov je v závislosti na signálnej sekvencii Met-Gly-X-X-Ser/Thr kotranslačne modifikovaný naviazaním zvyšku kyseliny myristrylovej [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$] na N-terminálny glycín, vznikajúci po odštiepení metionínového zvyšku. Táto modifikácia, udeľujúca proteínu značnú hydrofobicitu, je spoločným znakom cicavčích retrovírusov, u vtáčích retrovírusov objavená nebola (Henderson et al., 1983; Schultz a Oroszlan, 1983). Popísaná modifikácia spoločne s kladne nabitými aminokyselinovými zvyškami vytvára tzv. bipartitný, s membránou asociujúci signál (Conte et al., 1997). Okrem interakcie s cytoplazmatickou membránou sa MA proteínová doména zúčastňuje vnútrobunečného transportu nezrelých kapsíd v prípade retrovírusov s intracytoplazmatickou morfogenezou a podieľa sa na stabilizácii molekuly Gag (RHEE a HUNTER, 1991). MA proteín sa ďalej zúčastňuje inkurporácie Env glykoproteínov do viriónu (HILL et

al., 1996; YASUDA a HUNTER, 2000) a podieľa sa na vzniku a stabilizácii tzv. preintegračného komplexu, tvoreného novo vznikajúcou provírusovou DNA, enzýmami RT a IN, ktorý dopravuje provírusovú DNA do bunčného jadra (KIERNAN et al., 1998).

2.5.2 Kapsidový proteín

Kapsidový (CA) proteín je najväčším retrovírusovým proteínom vznikajúcim proteolytickým štiepením Gag prekurzoru. V maturovanom virióne vytvára vnútorný proteínový plášť (angl. shell) obklopujúci vírusový RNA genóm spolu s asociovanými proteínmi. Kapsidový plášť spolu s komponentami v jeho vnútri vytvára vírusové jadro (angl. core). Je tvorený dvoma doménami spojenými slučkou: aminoterminálnou (NTD) vytvárajúcou spomínaný plášť a karboxyterminálnou (CTD), ktorej hlavnou funkciou je sprostredkovať homodimerizáciu Gag molekúl pri tvorbe nezrelých vírusových častíc vo vnútri hostiteľskej bunky. Aminoterminálna doména HIV-1 CA viaže ľudskú peptidyl prolyl *cis-trans* izomerázu cyklofilín A. Aj keď je tento bunčný proteín inkorporovaný do viriónov počas ich vzniku, úlohu má pravdepodobne v skorých fázach replikačného cyklu. V kryštálovej mriežke sú CA molekuly zostavené v súvislých rovinných pásoch. Postranným spojením týchto pásov by mohol byť tvorený povrch vírusového jadra. Cyklofilín A by potom mohol zoslabovať tieto spoje a umožniť tak rozvolnenie jadra po vstupe vírusu do hostiteľskej bunky (Gambille et al., 1996). V primárnej štruktúre CTD sa nachádza tzv. oblasť významnej homológie (MHR, z angl. major homology region). Tento segment je konzervovaný u všetkých retrovírusov, s výnimkou spumaretrovírusov a je nepostrádateľný pre zbaľovanie, maturáciu a infektivitu retrovírusov. Konzervované aminokyselinové zvyšky MHR vytvárajú v kryštálovej štruktúre sieť vodíkových väzieb, ktorá stabilizuje konformáciu CTD (Gambille et al., 1997) a zdá sa, 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 (CRAVEN et al., 1995).

2.5.3 Nukleokapsidový proteín

Nukleokapsidový (NC) proteín je malý bázický proteín lokalizovaný v karboxyterminálnej časti retrovírusových Gag polyproteínov a hraje dôležitú úlohu pri skladaní retrovírusových častíc. U všetkých retrovírusov s výnimkou spumaretrovírusov obsahuje vysoko konzervovaný motív zložený s cysteínových a histidínových zvyškov. Tento motív má štruktúru Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys (X značí ľubovoľnú

aminokyselínu s výnimkou, 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, ktorý sa vyskytuje i u iných proteínov a je schopný koordinačne viazať zinočnatý kation. Retrovírusové NC proteíny môžu obsahovať jeden alebo dve takéto motívy (Bess et al., 1992; Bowzard et al., 1998). NC proteín má dôležitú funkciu pri rozpoznávaní a enkapsidácii genómovej RNA na základe tzv. enkapsidačného signálu lokalizovaného vo vedúcej oblasti (5' proximálna časť kódujúcej oblasti). Asociácia nukleovej kyseliny s NC 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).

2.6 Životný cyklus retrovírusov

Životný cyklus retrovírusov je možné rozdeliť na skorú a neskorú fázu. Skorá fáza začína adsorpciou vírusovej častice na povrch permissívnej bunky. Po prichytení povrchových glykoproteínov na špecifický receptor na bunčnom povrchu dochádza k fúzii vírusového obalu s plazmatickou membránou hostiteľskej bunky. Fúzia je navodená konformačnou zmenou glykoproteínov na povrchu viriónu. Po uvoľnení obsahu vírusovej častice do cytoplazmy začne RT, ktorá je jej súčasťou, v procese zvanom reverzná transkripcia prepisovať vírusovú genómovú (+)ssRNA do provírusovej dsDNA. Ako primér 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). Reverzná transkripcia začína syntézou (-)DNA vlákna od 3'-konca tRNA a pokračuje po 5'-koniec templátovej RNA. Vlákno RNA je v heteroduplexe RNA/DNA degradované aktivitou RNázy H. Na 5'-konci templátovej RNA dochádza k prvému prenosu vznikajúceho (-)DNA vlákna na 3'-koniec templátovej RNA, kde pokračuje syntéza (-)DNA a odbúravanie templátovej RNA. K aktivite RNázy H je rezistentné krátke miesto bohaté na purínové bázy, tzv. PPT (z angl. poly purine tract), ktoré následne slúži ako primer pre syntézu komplementárneho (+)DNA vlákna. Syntéza tohto vlákna pokračuje smerom k 5'-koncu (-)DNA vlákna, kde je stále naviazaná tRNA slúžiaca ako primer.

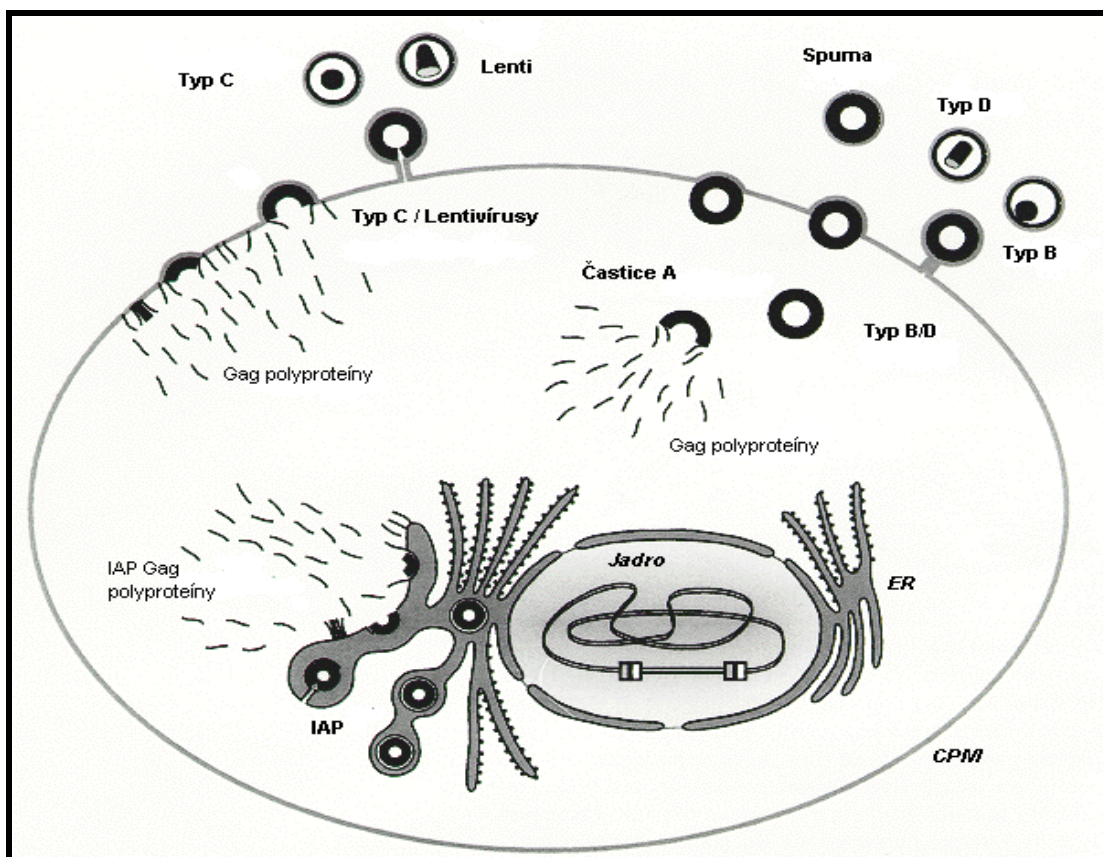
Po vytvorení PBS prepísaním prvých báz primeru je molekula tRNA odštiepená RNázovou H aktivitou. Nasleduje druhý prenos vlákna zabezpečený vzájomnou komplementaritou sekvencií PBS mínus a plus vlákna provírusovej DNA a syntéza (+)DNA je dokončená. Výsledná provírusová DNA je teda vďaka koncovým oblastiam tvoreným úsekmi U3, R a U5 dlhšia ako jej vírusová RNA predloha. V priebehu reverznej transkripcie je v cytoplazme vytvorený tzv. preintegračný komplex, ktorý transportuje provírusovú DNA do bunecného jadra. Vo všeobecnosti je tvorený novo syntetizovanou provírusovou DNA, NC proteínom, IN a niekoľkými molekulami MA proteínu. Vírusová integráza katalyzuje integráciu lineárnej provírusovej dsDNA do hostiteľského chromozómu. Tím končí skorá fáza retrovírusovej replikácie. Integrácia nie je sekvenčne špecifická, ale *in vivo* bývajú integrované provírusové sekvencie detegované v miestach aktívnej transkripcie (CERESETO a GIACCA, 2004). V neskorej fáze 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 na 5' konci, na 3' konci polyadenylátovým úsekom. Oblasť *gag-pro-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). Subgenómové env-mRNA nemôžu byť enkapsidované, nakoľko sa enkapsidačný signál nachádza v 5'-proximálnej oblasti génu *gag*.

2.7 Morfogenéza

Na základe pozorovaní transmisnou elektrónovou mikroskopiou boli retrovírusy rozdelené do nasledujúcich morfogenetických skupín, pričom určujúcimi znakmi boli tvar a poloha nukleokapsidového jadra (core) a miesto tvorby nezrelých kapsíd (obr. 2).

- Vnútrobučné častice typu A predstavujú nezrelé sférické kapsidy s elektrón denzným okrajom a svetlým vnútrom. Označujú sa ako ICAPs (z angl. Intracytoplasmic type A particles). V minulosti sa termínom IAPs (intracisternal type A particles) označovali vnútrobučné častice s tenkým plášťom a jasným jadrom, primárne pučiace na vnútrobučných membránach (KUFF a LAUDERS, 1988).

- Retrovírusy typu B sú charakteristické sférickým, excentricky uloženým vnútorným jadrom. Zbaľujú sa v cytoplazme cez intermediáty typu A. Preformované kapsidy sú následne transportované na cytoplazmatickú membránu, kde pučia z bunky.
- Retrovírusy typu C obsahujú centrálnu, symetricky uloženú časť a ich častice sa formujú na membráne. Makromolekulárne agregáty Gag molekúl a polyproteínov asociovaných s Gag sa spočiatku javia ako elektródenzné 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.



Obr. 2. Tri cesty zbaľovania retrovírusov. Retrovírusy typu C vytvárajú častice súčasne s ich obalovaním a pučaním na membráne. Podobne sa chovajú IAPs ale s tým rozdielom, že pučia výlučne cez vnútrobunecnú membránu. 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.)

Za priame smerovanie Gag proteínov k vnútornej strane cytoplazmatickej membrány je zodpovedný bipartitný signál, pozostávajúci z bázičných

aminokyselinových zvyškov a myristylácie MA domény (ZHOU et al., 1994). Tento signál je prítomný u retrovírusov morfogenetického typu B, C aj D ale u morfogenetických skupín B a D podlieha dominantnému účinku tzv. CTRS (z angl. cytoplasmic targeting/retention signal) sekvencie zodpovednej za intracytoplazmatickú tvorbu kapsíd. Sekvencia CTRS predstavuje vysoko konzervovaný aminokyselinový úsek MA proteínu u M-PMV a MMTV (morfogenetický typ D, resp. B). Nukleárnou magnetickou rezonanciou bola popísaná slučka exponovaná na povrchu MA proteínu M-PMV, tvorená práve týmito aminokyselinovými zvyškami (CONTE et al., 1997). U Mo-MLV (Moloneyho MLV, morfogenetický typ C) je táto konzervovaná oblasť kratšia o 5 aminokyselín ekvivalentných k zvyškom 50-55 u M-PMV a MMTV. Zámena jedinej aminokyseliny, ktorá je súčasťou tejto sekvencie, arginínu v pozícii 55 za tryptofan (R55W mutant), vedie u M-PMV ku zmene z morfogenetického typu D na typ C (RHEE a HUNTER, 1990). Substitúcia M-PMV CTRS za 11 aminokyselín v ekvivalentnej pozícii u Mo-MLV má za následok intracytoplazmatickú tvorbu Mo-MLV kapsíd (CHOI et al., 1999). Sekvencia CTRS predstavuje dominantný signál smerujúci retrovírusové Gag polyproteíny dovnútra cytoplazmy a brániaci predčasnému transportu prekurzorových molekúl z miesta ich biosyntézy na cytoplazmatickú membránu. Po dosiahnutí dostatočnej koncentrácie prekurzorových molekúl na konkrétnom mieste dochádza k tvorbe nezrelých kapsíd. Podľa tohto modelu sa rôzne morfogenetické dráhy popísané u retrovírusov sa líšia iba v lokalite, do ktorej sú vo vnútri bunky smerované prekurzorové polyproteíny. Miestom tvorby nezrelých kapsíd M-PMV je pericentriolárna oblasť. Do tejto subcelulárnej lokality sú prekurzorové Gag polyproteíny kotranslačne smerované pozdĺž mikrotubúl, v závislosti na interakcii CTRS s Tctex-1 komponentom dyneínového motorového komplexu (SFAKIANOS et al., 2003; VLACH et al., 2008).

Kritickú úlohu v transporte vzniknutých nezrelých kapsíd z pericentriolárnej oblasti na cytoplazmatickú membránu má Env komplex. Pre interakciu cytoplazmatickej časti transmembránového Env komplexu je esenciálny motív bohatý na tyrozín, ktorý sprostredkúva interakciu s molekulami Gag (SONG et al., 2002). Napriek tomu, že vakuoly obsahujúce Env komplex sprostredkujú export nezrelých kapsíd z miesta ich tvorby, tento proces pravdepodobne nezahŕňa exocytotické bunečné dráhy. Naopak, existujú dôkazy o Rab11⁺ pericentriolárnych recyklujúcich endozómoch zapojených v transporte M-PMV kapsíd z miesta ich na cytoplazmatickú membránu, kde sú v procese pučania uvoľnené z buniek (SFAKIANOS a HUNTER, 2003).

Cytoplazmatická membrána zastáva v morfogetickej dráhe typu C funkciu podpornej platformy pre tvorbu nezrelých retrovírusových kapsíd. V procese intracytoplazmatickej tvorby nezrelých kapsíd M-PMV hrá úlohu sekvencia p12 domény bohatá na aminokyselinové zvyšky kyslej povahy, označovaná ako ISD (z angl. internal scaffold domain). Sekvencia ISD nie je esenciálnou pre tvorbu nezrelých kapsíd ale zvyšuje účinnosť tohto procesu, pretože nadexprimované molekuly Gag s odstránenou ISD sekvenciou si zachovávajú schopnosť vytvárať nezrelé častice aj bez podpory cytoplazmatickej membrány. Táto skutočnosť svedčí aj v prospech hypotézy, že ISD je zapojená v samotnom procese tvorby častíc a nie v intracelulárnom transporte Gag molekúl na miesto, kde tento proces prebieha (SOMMERFELT et al., 1992; SAKALIAN a HUNTER, 1999). Úloha ISD je ekvivalentná s funkciou cytoplazmatickej membrány, nakoľko je plazmatická membrána schopná substituovať ISD ak sú Gag molekuly smerované prednostne na toto miesto a nie do cytoplazmy (SAKALIAN a RAPP, 2006).

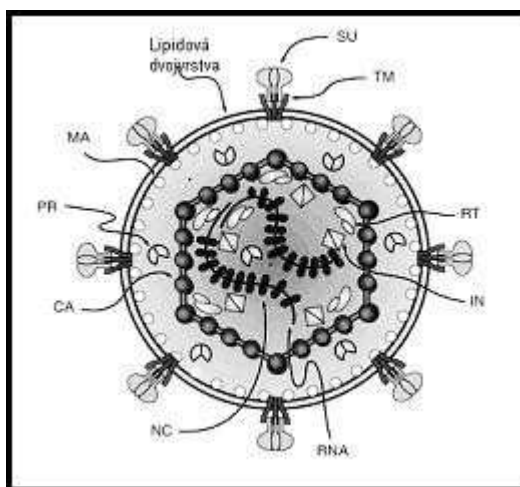
2.8 Maturácia retrovírusových častíc

Po uvoľnení z bunky dochádza v nezrelých viriónoch k dramatickej reorganizácii, ktorá je následkom proteolytického štiepenia prekursorových polyproteínov vírusovou proteázou. Význam maturácie retrovírusových častíc vychádza z odlišných požiadaviek kladených na Gag polyproteín v kontraste s jednotlivými proteínmi obsiahnutých v Gag prekurzore. Interakcie medzi molekulami Gag vedú v procese morfogenézy k tvorbe nezrelých vírusových častíc, ktoré sú v procese pučania uvoľnené z buniek. Naopak, po vstupe retrovírusu do hostiteľskej bunky sa musia proteíny tvoriace zrelú časticu (obr. 3), pôvodne obsiahnuté v sekvencii nezrelého Gag polyproteínového prekurzoru rozvoľniť a smerovať od membrány do vnútra bunky.

Polyproteínová stratégia pri syntéze štruktúrnych i neštruktúrnych proteínov je všeobecne známym faktom charakteristickým pre retrovírusy a prináša im viaceré výhody. Za prvé, minimalizuje sa počet komponent, ktoré je potrebné individuálne smerovať na určité miesto. Za druhé, proteolytické štiepenie prekursorových molekúl poskytuje možnosť regulácie funkcií potrebných v rôznych štádiách replikačného cyklu, pretože proteolýza má za následok zmeny v aktivitách proteínov. Za tretie, konzervované usporiadanie proteínových domén interagujúcich v rámci polyproteínového prekurzoru korešponduje s polohou diskretných domén tvoriacich retrovírusovú časticu (SWANSTROM a WILLS, 1997).

Vzťah medzi aktiváciou retrovírusovej proteázy a interakciou nezrelej vírusovej častice s bunecnou membránou nebol uspokojivo vysvetlený, i keď tieto procesy bývajú často spájané. V prípadoch, kedy nedochádzalo k interakcii HIV-1 (BRYANT a RATNER, 1990), Mo-MLV (SCHULTZ a REIN, 1989) alebo RSV (CALLAHAN a WILLS, 2000) Gag polyproteínov s bunecnou membránou a tým pádom ani k tvorbe a uvoľňovaniu vírusových častíc z buniek, intracelulárne Gag polyproteíny zostávali stabilné. Je potrebné dodať, že v prípade experimentov s HIV-1 za použitia iného bunecného typu ako v predchádzajúcom uvedenom prípade (BRYANT a RATNER, 1990), bola pozorovaná určitá hladina intracelulárneho proteolytického štiepenia polyproteínu Gag (GÖTTLINGER et al., 1989). Pozorovania predčasnej aktivácie proteázy kolidujúcej s tvorbou retrovírusových častíc sa už dávnejšie objavili aj u RSV (WILLS et al., 1994).

Najnovšie bola aktivácia proteázy s vylúčením membránovej interakcie popísaná u MMTV. K intracelulárnej proteolyze Gag prekurzoru vírusovou proteázou dochádzalo aj v prípade, kedy bola deléciou myristylácie zablokovaná interakcia vírusových častíc s cytoplazmatickou membránou (ZÁBRANSKÝ et al., 2009).



Obr. 3. Schématický nákres zrelej retrovírusovej častice. Virión je obalený fosfolipidovou dvojvrstvou odvodenou 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.)

2.9 Retrovírusové L domény

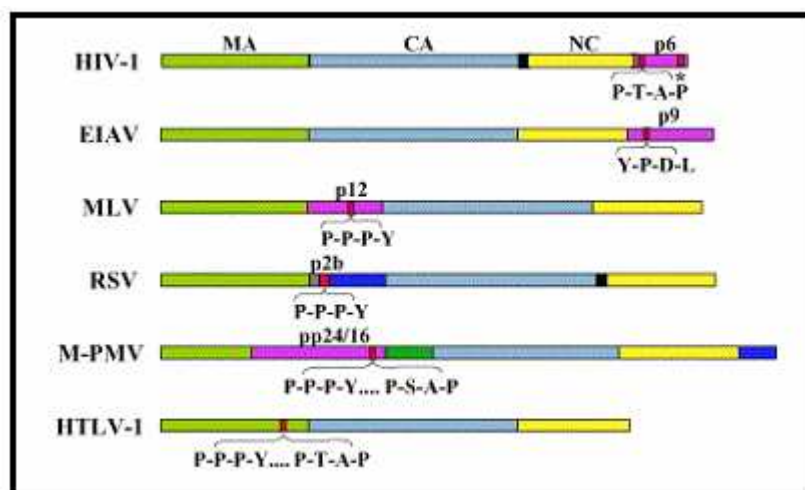
Vírusové L (z angl. late) domény sú vysoko konzervované, krátke peptidové motívy, identifikované v Gag polyproteínoch mnohých retrovírusov (obr. 4) a v matrixových proteínoch rhabdovírusov, u filovírusov i u arenavírusov (zhrnuté vo FREED 2002; PORNILLOS et al., 2002; MORITA a SUNDQUIST, 2004; DEMIROV a FREED, 2004; BIENIASZ, 2006). Pomenovanie L domén vychádza z ich

esenciálnej úlohy v neskorých fázach životného cyklu (retro)vírusov, pri uvoľňovaní pučiacich viriónov z bunečného povrchu. Ich charakteristickou vlastnosťou je schopnosť sprostredkovať interakcie vírusových proteínov s proteínmi hostiteľských buniek.

Mnoho proteín – proteínových interakcií v bunke sa uskutočňuje prostredníctvom oblastí často kratších ako 10 aminokyselín, so špecifickou účasťou prolínu (zhrnuté v KAY et al., 2000). Prolín je frekventovane zastúpenou aminokyselinou aj v primárnej štruktúre L domén a prítomnosť prolínu je pre funkciu L domén rovnako esenciálna ako pri mnohých iných proteín - proteínových interakciách v bunke.

Pretože sú L domény krátkymi motívmi, pôvodne sa predpokladalo, že aj ich konformácia bude jednoduchá. Nemalo sa jednať o rigidne štruktúry a za predpoklad pre správnu funkciu L domén bola považovaná práve absencia rigidity (PARENT et al., 1995). Neskôr bola vyriešená kryštálová štruktúra peptidov s L doménovou sekvenciou a ako pravdepodobnejší sa ukázal opak. Peptidy so sekvenciou L domén sú organizované štruktúry vytvárajúce povrch prístupný buď rozpúšťadlu alebo interagujúci s inými proteínmi (ZHAI et al., 2008).

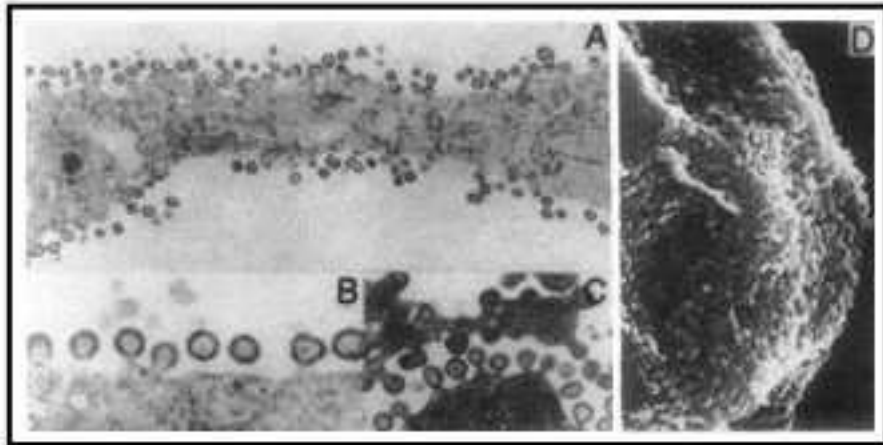
U známych retrovírusov boli doposiaľ identifikované tri typy L domén s konzenzom sekvencie P(T/S)AP, PPxY a YP(x)_nL (kde x značí ľubovoľnú aminokyselinu a $n \leq 3$). Zásahy do primárnej štruktúry týchto domén spôsobujú blok v uvoľňovaní (retro)vírusových častíc z vonkajšieho povrchu cytoplazmatickej membrány hostiteľských buniek. To má za následok pozoruhodný vírusový fenotyp charakteristický akumuláciou defektných viriónov na povrchu bunky (obr. 5) (zhrnuté vo FREED 2002; MORITA a SUNDQUIST, 2004; DEMIROV a FREED, 2004). U niektorých retrovírusov, ako napríklad HIV-1 alebo u vírusu infekčnej anémie koní(EIAV), je L doménová sekvencia lokalizovaná na C-konci molekuly Gag, u iných retrovírusov, ako napr. RSV, M-PMV alebo u vírusu leukémie hovädzieho dobytku (BLV) sa motív s L doménovou funkciou nachádza medzi MA a CA doménou molekuly Gag a u HTLV-I dokonca v primárnej štruktúre C-konca MA domény. Bolo dokázané, že funkcie neskorých domén sú často zameniteľné medzi rôznymi druhmi retrovírusov a navyše sú často nezávislé na polohe v molekule Gag.



Obr. 4. Schématické znázornenie retrovírusových Gag polyproteínov a lokalizácia L domén. Matrixový (MA), kapsidový (CA) a nukleokapsidový (NC) proteín sú zobrazené zelenou, modrou, resp. žltou farbou. Špecifické proteíny obsahujúce L doménovú sekvenciu sú znázornené fialovou farbou, s výnimkou HTLV-1, kde je L doména lokalizovaná v MA proteíne. L domény sú zobrazené červenou farbou a hviezda označuje miesto väzby bunecného proteínu ALIX/AIP1 u HIV-1. HIV-1 – vírus ľudskej imunodeficiencie typu 1; EIAV - vírus infekčnej anémie koní; MLV – vírus myšej leukémie; RSV – vírus Rousovho sarkómu; M-PMV – Masonov-Pfizerov opičí vírus; HTLV-1 - vírus ľudskej T leukémie typu 1 (prevzaté z Demirov a Freed, 2004).

2.9.1 L doména P(T/S)AP

Historicky prvá zmapovaná L doména bola popísaná u HIV-1. Mutačná analýza zasahujúca HIV-1 p6^{Gag} N-terminálnu doménu v kontexte kompletného provírusového klonu, viedla k objaveniu defektných viriónov HIV-1 s predominantne nematurovanou morfológiou, akumulovaných na bunecnom povrchu (obr. 5) (GÖTTLINGER et al., 1991). Podrobným mapovaním tejto domény bol identifikovaný PTAP motív, lokalizovaný medzi 7. - 10. aminokyselinovým zvyškom, ktorý zohráva kritickú úlohu pri uvoľňovaní viriónov HIV-1 z buniek. Substitúcia všetkých štyroch ale i jedinej z aminokyselín tvoriacich tento motív má za následok dramatické zníženie množstva vírusových častíc uvoľnených z buniek transfekovaných kompletným molekulárnym klonom HIV-1. 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). HIV-1 p6^{Gag} doména i jej samotná N-terminálna oblasť obsahujúca PTAP motív je schopná suplovať L doménové funkcie u iných retrovírusov. Táto skutočnosť bola preukázaná na modeloch rekombinantných klonov EIAV a RSV s deléciou pôvodnej L domény (PARENT et al., 1995; PUFFER et al., 1997).



Obr. 5. Membránová asociácia vírusových častíc HIV-1 s L doménovou mutáciou. Transmisný (A-C) a skenovací (D) elektromikrograf COS-7 buniek transfekovaných mutantným provírusom. Zväčšenie: (A) 14800x ; (B) 31900x ; (C) 19500x ; (D) 6600x . (Prevzaté z GÖTTLINGER et al., 1991).

2.9.2 L doména YP(x)_nL

Prvým retrovírusom, u ktorého bola popísaná L doménová sekvencia s primárnou štruktúrou YP(x)_nL je lentivírus EIAV. Sekvencia YPDL je lokalizovaná v p9 doméne EIAV Gag polyproteínu (PUFFER et al., 1997). K jej objaveniu viedli práce zaoberajúce sa funkčnou homológiou RSV p2b^{Gag} a HIV-1 p6^{Gag} s p9^{Gag} peptidom EIAV. Napriek odlišnej primárnej sekvencii na prolín bohatých RSV p2b^{Gag} a HIV-1 p6^{Gag} od EIAV p9^{Gag}, bola táto sekvencia schopná suplovať L doménové funkcie u delečných mutantov RSV a HIV-1, a naopak (PARENT et al., 1995). Delečná analýza C-terminálneho EIAV p9^{Gag} spolu s metódou alanínového skenovania definovala L doménovú úlohu aminokyselinových zvyškov Tyr23, Pro24 a Leu26 u tranzientne exprimovaných molekúl EIAV Gag (PUFFER et al., 1997). EIAV však nie je jediným (retro)vírusom, u ktorého nachádzame konsenzus sekvencie YP(x)_nL. Objavuje sa aj u iného lentivírusu. V sekvencii HIV-1 p6^{Gag} sa medzi aminokyselinovými zvyškami 36 až 41 rozprestiera motív YPLASL, pre ktorý bolo dokázané, že synergizuje s primárnou L doménou PTAP (STRACK et al., 2003). Vyššie uvádzané zistenia pramenili z experimentov s vírusom podobnými časticami (VLPs, z angl. virus-like particles) EIAV, ale význam p9^{Gag} v neskorých fázach životného cyklu EIAV bol potvrdený aj v kontexte kompletného molekulárneho klonu EIAV (CHEN et al., 2001).

2.9.3 L doména PPxY

Pionierske výskumy zaoberajúce sa zbaľovaním a uvoľňovaním RSV ukázali, že u tohto vtáčieho alfaretrovírusu môžu byť odstránené rozsiahle oblasti molekuly Gag bez negatívneho dopadu na uvoľňovanie VLPs z buniek. tento proces bol narušený až po odstránení jedenásť aminokyselín krátkej peptidovej domény p2b^{Gag} unikátnej pre

RSV, lokalizovanej medzi MA a CA doménou (WILLS et al., 1994). Detailným mapovaním molekuly RSV Gag a jej p2b domény bola L doménová úloha prisúdená sekvencii PPPY nájdenej u mnohých retrovírusov. Výnimku tvoria lentivírusy (PARENT et al., 1995; XIANG et al., 1996). Motív PPPY nachádzame u viacerých retrovírusov a ďalšie práce zaoberajúce sa jeho úlohou v neskorých fázach životného cyklu mnohých retrovírusov na seba nenechali dlho čakať. Nasledoval popis L doménovej funkcie PPPY motívu u M-PMV. V tomto prípade je sekvencia s L doménovou funkciou súčasťou pp16^{Gag} domény, C-terminálneho štiepneho produktu domény pp24^{Gag}, lokalizovaného obdobne ako u RSV, medzi MA a CA doménou molekuly Gag. Na modely M-PMV bolo dokázané, že motív PPPY nie je nevyhnutný pre tvorbu nezrelých vírusových častíc, ale má esenciálnu úlohu pri uvoľňovaní viriónov z buniek. Svoju úlohu plní rovnako u rekombinantného vírusu s deléciou pp16^{Gag} a spätnou introdukciou samotného PPPY motívu (YASUDA a HUNTER, 1998). Ďalším retrovírusom u ktorého Gag polyproteínového prekursoru nachádzame PPPY motív, je BLV. Tento motív je prítomný v C-terminálnom úseku MA domény. Aj v tomto prípade majú mutačné zásahy za následok redukciu v uvoľňovaní VLPs z tranzientne transfekovaných buniek (WANG et al., 2002).

2.9.4 Retrovírusy s viacerými L doménovými motívmi

V sekvencii Gag polyproteínov niektorých retrovírusov, vrátane M-PMV a HTLV-1, nachádzame motívy PPPY aj PSAP, resp. PTAP. U M-PMV je PSAP motív, obdobne ako PPPY motív, lokalizovaný v pp16^{Gag}. Oddelené sú sekvenciou štyroch aminokyselín, pričom PPPY motív je N-proximálny a PSAP motív je C-proximálny. Oba tieto motívy sa zúčastňujú uvoľňovania viriónov M-PMV z buniek. Motív PSAP má prídavnú L doménovú funkciu a vyžaduje intaktný motív PPPY. Mutačné zásahy do motívu PPPY majú za následok dramatické zníženie v uvoľňovaní častíc MPMV, zásahy do motívu PSAP znižujú účinnosť uvoľňovania len čiastočne (GOTTWEIN et al., 2003).

U HTLV-1 nachádzame PTAP motív súčasne s PPPY motívom v C-terminálnej oblasti MA domény. Oddelené sú dvomi aminokyselinami, pričom PTAP motív je lokalizovaný bližšie k C-koncu MA domény. Mutácie oboch motívov blokujú uvoľňovanie viriónov z povrchu hostiteľských buniek. Substitúcia PTAP motívu sekvenciou PPPY alebo YPDL nemá vplyv na produkciu vírusových častíc, ale substitúcia PPPY motívu PTAP alebo YPDL motívom eliminuje produkciu HTLV-1 častíc. Podobne ako u vyššie zmieňovaného M-PMV, má motív PPPY u HTLV-1

dominantnú úlohu, ale v procese pučanie participuje spoločne s motívom PTAP (WANG et al., 2004).

V sekvencii MLV p12^{Gag} domény je lokalizovaný esenciálny PPPY motív s primárnou L doménovou funkciou. Ďalej u MLV nachádzame PSAP motív v MA doméne a do tretice aj LYPAL motív, spĺňajúci konsenzus L doménovej sekvencie YP(x)_nL, ležiaci na rozhraní MA a p12^{Gag} domény. Tieto dva motívy zvyšujú účinnosť uvoľňovania častíc MLV z buniek (SEGURA-MORALES et al., 2005).

2.9.5 Pozícia L domén a ich funkčná zameniteľnosť.

Napriek odlišnej primárnej štruktúre a relatívnej pozícii v molekule Gag existujú prípady funkčnej zameniteľnosti L domén medzi rôznymi druhmi retrovírusov a aj doklady o nezávislosti L doménovej funkcie na lokalizácii v molekulách Gag. Neplatí to však všeobecne. Dokázané bolo, že N-terminálny HIV-1 p6^{Gag} je schopný nahradiť L doménovú funkciu RSV p2b^{Gag} jednak na pôvodnom mieste p2b^{Gag}, medzi MA a CA oblasťou, ale i na C-konci molekuly RSV Gag. Rovnako je možné nahradiť L doménovú funkciu RSV p2b^{Gag} použitím N-terminálneho EIAV p9^{Gag} (PARENT et al., 1995). Naopak, L doménová funkcia EIAV p9^{Gag} môže byť nahradená nielen ekvivalentne lokalizovaným HIV-1 p6^{Gag}, ale aj RSV p2b^{Gag} (PUFFER et al., 1997). Defekt v uvoľňovaní častíc EIAV spôsobený deléciou YPDL motívu z p9^{Gag} bol odstránený aj zavedením PPPY alebo PTAP motívu na miesto pôvodnej L domény (SHEHU-XHILAGA et al., 2004). Z uvedených skutočností vyplýva, že sekvenčne a lokalizačne odlišné L domény RSV p2b^{Gag} a HIV-1 p6^{Gag} sú funkčne ekvivalentné a substituovateľné s EIAV p9^{Gag}.

Napriek dôkazom o zameniteľnosti a pozičnej nezávislosti L domén, je potrebné chápať ich funkcie v širšom kontexte. Odhalenie zaujímavých súvislostí priniesli nasledujúce zistenia. N-terminálna oblasť HIV-1 p6^{Gag}, nesúca PTAP motív je postačujúca pre L doménovú funkciu v kontexte kompletného molekulárneho klonu (GÖTTLINGER et al., 1991). V usporiadaní s tzv. minimálnym Gag konštruktom s rozsiahlymi deléciami, ale stále schopným vytvárať vírusom podobné častice, nie je samotná N-terminálna oblasť HIV-1 p6^{Gag}, nesúca PTAP motív, schopná vykonávať L doménovú funkciu (ACCOLA et al., 2000).

Stimulovať uvoľňovanie vírusom podobných častíc HIV-1, tvorených vyššie uvedeným minimálnym Gag konštruktom, je schopný peptid nesúci L doménu Ebola vírusu. U Ebola vírusu je L doména tvorená aminokyselinovými zvyškami PTAPPEY a jedná sa o prienik dvoch L domén, P(T/S)AP a PPxY. Sekvencia PTAPP je prítomná

i u HIV-1, ale nasleduje Glu namiesto Tyr. Substitúcia Y/G v motíve PTAPPEY spôsobuje redukciu v uvoľňovaní rekombinantných HIV-1 VLPs tvorených minimálnym Gag konštruktom s peptidom nesúcim L doménovú sekvenciu Ebola vírusu (STRACK et al., 2000).

U HTLV-1 s L doménami PTAP i PPPY (viz vyššie), eliminuje vzájomná zámena týchto dvoch L domén uvoľňovanie vírusových častíc z buniek (WANG et al., 2004).

V prípade MLV, u ktorého nachádzame všetky tri L doménové sekvencie, sa prídavný L doménový motív PSAP nachádza v MA doméne. Na rozdiel od HIV-1, kde je PTAP motív esenciálny a lokalizovaný C-terminálne (viz vyššie). Mutácia všetkých troch L doménových motívov u MLV a následné zavedenie PSAP motívu na C-koniec Gag sekvencie, umožňuje uvoľňovanie rekombinantných častíc MLV z buniek, ale s omnoho nižšou efektivitou ako u divokého typu. Pre MLV to znamená, že poloha L domény v rámci molekuly Gag ovplyvňuje jej funkcie, ale nie je limitujúcim determinantom (SEGURA-MORALES et al., 2005).

2.9.6 Pôsobenie vírusovej proteázy verzus L doménová funkcia.

Porovnania výsledkov získaných v systémoch líšiacich sa aktivitou proteázy evidujú vplyv aktivity retrovírusovej proteázy na funkciu L domén, resp. na správanie sa systémov s mutantnými L doménami. V kontexte kompletného molekulárneho klonu HIV-1 bolo pozorované nápadné zmiernenie negatívneho efektu mutácie L doménového PTAP na uvoľňovanie vírusových častíc z tranzientne transfekovaných buniek, ak nebola prítomná proteázová aktivita (HUANG et al., 1995). V systéme s tranzientnou expresiou molekúl Gag a proteázy BLV bol taktiež potvrdený dramatickejší defektu v uvoľňovaní VLPs po mutácii L doménového motívu PPPY v kontexte s aktívnou proteázou (WANG et al., 1997).

Stručne povedané, pozoruhodný fenotyp spôsobený mutáciou L domén je do istej miery podmienený prítomnosťou aktívnej vírusovej proteázy. Naopak, ak nie je prítomná proteázová aktivita, defekt spôsobený mutáciou L domén je do určitej miery prekonaný (HUANG et al., 1995).

2.9.7 Interakcie L domén s bunečnými proteínmi.

Priame interakcie (retro)vírusových L domén s viacerými bunečnými proteínmi poukazujú na potenciálnu úlohu bunečných partnerov v procese pučania. Blokácia týchto bunečných partnerov má mnohokrát za následok blokáciu uvoľňovania retrovírusových častíc z hostiteľských buniek. Najnovšie zistenia naznačujú, že

retrovírusy uzurpujú komponenty dráh vakuolárneho triedenia proteínov (zhrnuté v MORITA a SUNDQUIST, 2004; DEMIROV a FREED 2004) a experimenty s viacerými retrovírusmi dokázali interakciu Gag proteínov s ubiquitylačnou mašinériou a potrebu aktívnych proteazómov pre účinné uvoľňovanie retrovírusov (zhrnuté vo VOGT, 2000). Napriek týmto poznatkom je presný mechanizmus a dráhy využívané retrovírusmi v procese pučania stále zahalené tajomstvom.

2.9.8 Ubiquitín

Ubiquitín (Ub) je vysoko konzervovaný bunecný proteín s molekulovou hmotnosťou 5 kDa, pozostávajúci zo 76 aminokyselinových zvyškov. Kovalentné naviazanie jednej, alebo viacerých molekúl ubiquitínu slúži ako post-translačná modifikácia smerujúca bunecné proteíny do viacerých metabolických dráh. Zatiaľ čo polyubiquitylácia (reťazec najmenej štyroch molekúl Ub) smeruje proteíny k degradácii v 26S proteazóme, monoubiquitylácia slúži ako signál pre internalizáciu proteínov z cytoplazmatickej membrány alebo ako signál smerujúci proteíny do endocytotických dráh v MVB a neskorých endozómoch.

Proces ubiquitylácie začína ATP-dependentnou aktiváciou kovalentným pripojením C-terminálneho Gly zvyšku 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 účinkom E1 na Cys zvyšok v aktívnom mieste Ub-konjugačného enzýmu, označovaného E2 alebo UBC (z angl. *ubiquitin conjugating*) enzým. Konečný prenos Ub z E2 na cieľový proteín je katalyzovaný Ub-ligázou (E3). Ub je kovalentnou, izopeptidovou väzbou pripojený k ϵ -amino skupine postranného reťazca Lys zvyšku cieľového proteínu. Pri polyubiquitylácii sú ďalšie molekuly Ub pripojené k Lys zvyšku predchádzajúcej molekuly Ub za vzniku reťazca Ub molekúl. Po degradácii polyubikvitylovaného proteínu sú molekuly Ub recyklované pre ďalšie použitie (zhrnuté v HERSHKO a CIECHANOVER, 1998).

Cicavčie bunky exprimujú jediný E1, ale početnú rodinu E2 a E3, ktoré sa líšia svojou špecifitou pri rozpoznávaní cieľových proteínov. V bunkách je prítomná aj rodina proteínov zdieľajúca vysoký stupeň sekvenčnej i predikovanej štruktúrnej podobnosti s E2. Členovia tejto rodiny, napr. proteín TSG101, resp. určité proteínové domény sa nazývajú ako E2-podobné, UBC-podobné, alebo UEV (z angl. *ubiquitin E2 variant*) proteíny, resp. domény. Nemajú Cys v katalytickom mieste a preto nie sú schopné kovalentnej väzby s Ub. Úloha týchto enzymaticky neaktívnych proteínov je

zrejme pri modulácii ubiquitinylačných reakcií a taktiež sú významne zapojené v procese pučania retrovírusov.

2.9.9 Ubiquitylácia molekúl Gag

V súčasnosti vieme o mnohých prípadoch kovalentného pripojenia molekúl Ub k molekulám Gag a táto skutočnosť je vo funkčnom vzťahu k L doménam (VOGT, 2000). Na počiatku výskumov zaoberajúcich sa úlohou Ub v životnom cykle retrovírusov bolo objavenie voľných molekúl Ub vo viriónoch ALV v päťnásobne vyššej koncentrácii ako je koncentrácia voľného Ub v cytosole buniek. Táto práca poukazovala na špecifickú inkorporáciu molekúl Ub do viriónov ALV, ale nepredpokladala kovalentné pripojenie Ub k molekulám Gag (PUTTERMAN et al., 1990). Neskoršie zistenia dokumentujú inkorporáciu Ub do viriónov HIV-1, SIV, Mo-MLV a EIAV v molárnom pomere 1:10 k molekulám Gag. Ďalej bola potvrdená monoubiquitylácia 2% molekúl p6^{Gag} u HIV-1 a SIV, p12^{Gag} u Mo-MLV a p9^{Gag} u EIAV, čo predstavuje kovalentnú väzbu u asi 30% inkorporovaných molekúl Ub (OTT et al., 1998, 2002). Ubiquitylácia Gag molekúl RSV vyžaduje intaktnú L doménu. V tomto zmysle je funkčnou nielen pôvodná L doména RSV, ale aj sekvenčnodlišné L domény HIV-1, HTLV-1 a Ebola vírusu (STRACK et al., 2000). Ubiquitylácia chimerických molekúl, pozostávajúcich z minimálneho HIV-1 Gag konštruktú s peptidom nesúcim L doménovú sekvenciu Ebola vírusu (STRACK et al., 2000), redukuje Y/G substitúcia v PTAPPEY motíve. Takto spôsobená redukcia ubiquitylácie Gag molekúl implikuje blok v uvoľňovaní (rekombinantných) vírusom podobných častíc (STRACK et al., 2002). Ubiquitylácia bola popísaná aj u NC proteínu MMTV a proteolytického medziproduktu p3-p8. U MMTV NC proteínu sa udáva konjugácia dvoch molekúl Ub, ale nebolo určené, či sa jedná o diubiquityláciu, alebo pripojenie dvoch nezávislých molekúl Ub (OTT et al., 2003). Tieto údaje spájajú retrovírusy, ktorých častice sú vytvárané či už v cytoplazme (betaretrovírus MMTV) alebo na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány (lentivírusy HIV-1, SIV, EIAV a gamaretrovírus Mo-MLV) a taktiež využívajúce všetky tri typy známych L domén (P[T/S]AP u HIV-1 a SIV, PPxY u Mo-MLV a YP(x)_nL u EIAV), s bunecnou ubiquitylačnou mašinériou. Presné pôsobenie Ub vo vzťahu k retrovírusom však nebolo dodnes spoľahlivo objasnené.

2.9.10 Vzťah proteazómov k uvoľňovaniu retrovírusov z buniek

Látky inhibujúce funkciu proteazómov spôsobujú nahromadenie (poly)ubiquitylovaných proteínov, čím je depletovaná zásoba voľného Ub v bunkách.

Inhibícia proteazómov mala za následok akumuláciu viriónov RSV na bunčnom povrchu, fenotyp nápadne pripomínajúci L doménové mutácie (PATNAIK et al., 2000). Ponúkajú sa dve alternatívne vysvetlenia. Za prvé, defektné Gag molekuly, ktoré by za fyziologických podmienok boli degradované v proteazómoch, sú akumulované v bunkách ošetrovaných inhibítormi proteazómov a interferujú s tvorbou a uvoľňovaním retrovírusových častíc. Za druhé, Ub sa aktívne zúčastňuje procesu tvorby a uvoľňovania retrovírusových častíc z buniek, či už ako súčasť molekúl Gag alebo hostiteľských proteínov tiež zapojených v tomto procese. V prospech druhej hypotézy svedčí fakt, že uvoľňovanie RSV z infikovaných buniek je zablokované pôsobením inhibítorov proteazómov. Nadexpresia Ub v týchto bunkách, alebo fúzia Ub s Gag molekulami, prekonáva tento defekt (PATNAIK et al., 2000). K podobným záverom dospel aj výskum uvoľňovania HIV-1 VLPs (STRACK et al., 2000) Paradoxne, uvoľňovanie EIAV z buniek nie je výrazne ovplyvnené inhibíciou proteazómov (PATNAIK et al., 2002) V porovnaní s vyššie uvedenými vírusmi, dochádza len k miernemu zníženiu účinnosti uvoľňovania častíc EIAV (OTT et al., 2002). Komplexný prieskum pôsobenia proteazómových inhibítorov na uvoľňovanie retrovírusov priniesol nasledujúce zistenia. Pučanie MLV a M-PMV je citlivé na inhibíciu proteazómov, rovnako ako HIV-1 a RSV. Naopak, pučanie MMTV, tak ako EIAV, nevyžaduje aktivitu proteazómov (OTT et al., 2003).

Vyššie uvádzané skutočnosti by sa dali zhrnúť nasledovne. Uvoľňovanie retrovírusov nesúcich L domény P(T/S)AP (HIV-1) a PPxY (RSV, MLV, M-PMV), vytvárajúcich svoje častice či už v cytoplazme (betaretrovírus M-PMV), alebo na cytoplazmatickej membráne (lentivírus HIV-1, alfaretrovírus RSV, gamaretrovírus MLV) vyžaduje aktívne proteazómy. Neplatí to však pre EIAV (L doména YP(x)_nL, skladanie častíc na plazmatickej membráne) ani pre MMTV s intacytoplazmatickou tvorbou častíc a neznámou L doménou.

2.9.11 Triedenie proteínov a formovanie váčkov v MVB

Internalizácia membránových proteínov z bunčného povrchu a ich degradácia v lyzozómoch predstavuje, z topologického hľadiska, analogický problém ako pučanie (retro)vírusov. Riešenie predstavuje formácia endozmálnych štruktúr označovaných MVB (z angl. *multivesicular bodies*). Vznikajú invagináciou membrán ohraničujúcich endozómi a pučaním váčkov smerom z cytoplazmy do lumen týchto kompartmentov. Signálom smerujúcim vybrané proteíny do váčkov MVB je monoubiquitylácia. Triedenie proteínov a formovanie váčkov MVB je závislé na skupine najmenej 18

proteínov, pôvodne identifikovaných genetickým mapovaním u *Saccharomyces cerevisiae*. Súhrnne sa označujú ako Vps (z angl. vacuolar protein sorting) proteíny triedy E. Ich delécia je charakterizovaná akumuláciou aberantných endozomálnych kompartmentov priliehajúcich k vakuole, čo je organela analogická s lyzozómami. U cicavcov, vrátane človeka, je známych 25 ortológov kvasinkových Vps proteínov triedy E. Proteíny Vps triedy E sú komponentmi komplexov ESCRT (z angl. Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Z cytoplazmy sú prechodne regrutované na endozomálnu membránu, kde sprostredkovávajú kaskádu dejov, smerujúcu od triedenia proteínov až po formovanie vačkov MVB.

Prvým komplexom triedy E, rozpoznávajúcim ubiquitylované proteíny, je HRS (z angl. hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) komplex (ľudský ortológ kvasinkového Vps27). Rozpustný HRS proteín je regrutovaný na membránu skorých endozómov. Dôkazy spájajúce HRS komplex konkrétne s pučaním retrovírusov neexistujú. Úlohou HRS komplexu je regrutovať ESCRT-I, triediaci receptor rozpoznávajúci ubiquitylované proteíny a iniciujúci ich správne smerovanie cestou ESCRT mašinérie. Komponent ESCRT-I, proteín TSG101 (z angl. tumor susceptibility gene, ľudský ortológ kvasinkového Vps23), priamo interaguje s HRS komplexom. Kvasinkovým dvojhybridovým systémom bola dokázaná priama interakcia TSG101 (komponent ESCRT-I) s EAP45 a EAP30 (podjednotky ESCRT-II). ESCRT-II však môže translokovať na endozomálnu membránu aj v neprítomnosti ESCRT-I, čo naznačuje potenciálnu prítomnosť ďalších signálov. Priama účasť ESCRT-II pri pučaní retrovírusov potvrdená nebola (LANGELIER et al., 2006). ESCRT-II je prostredníkom medzi ESCRT-I a ESCRT-III a týmto prepája dráhu, do ktorej vstupujú retrovírusové Gag proteíny interagujúce s TSG101. Podjednotky tvoriace kvasinkový ESCRT-III komplex majú u človeka ortológy označované ako CHMP (*charged multivesicular body protein*), ktoré interagujú s ďalším proteínom triedy E, ALIX/AIP1 (z angl. ALG-2-interacting protein X / apoptosis-linked gene 2-interacting protein 1, ľudský ortológ kvasinkového Bro1/Vps31). ALIX, predominantne lokalizovaný cytoplazmaticky a na endozomálnu membránu regrutovaný interakciou s CHMP, následne regrutuje deubiquitylačný enzým Doa4, ktorý odstraňuje ubiquitín z označených proteínov. Finálnym krokom v triedení proteínov a prerekvizitou pre formovanie vačkov je disociácia komplexu ESCRT-III katalyzovaná ATPázou triedy AAA označovanou VPS4 (zhrnuté v MORITA a SUNDQUIST, 2004; BABST 2005).

2.9.12 TSG101 a pučanie retrovírusov

Proteín TSG101 je enzymaticky inaktívnym homológom Ub-konjugačného enzýmu E2. Na N-konci molekuly sa nachádza enzymaticky inaktívna UEV doména, strádajúca Cys v aktívnom mieste, ale schopná viazať Ub. Molekula TSG101 je súčasťou supramolekulárneho komplexu ESCRT-I. ESCRT-I je regrutovaný priamou interakciou TSG101 s HRS komplexom prostredníctvom dvoch diskretných oblastí. Zatiaľ čo prvá z nich primárne regrutuje TSG101, centrálny PSAP motív viaže a aktivuje TSG101 pre nasledujúcu interakciu s ďalšími faktormi. Tento model predpokladá prítomnosť solubilného TSG101 v autoinhibovanom stave. V tejto uzavretej konformácii je N-terminálna UEV doména intramolekulárne naviazaná na PSAP sekvenciu prítomnú bližšie k C-koncu molekuly TSG101. K aktivácii TSG101 dochádza *trans*-interakciou UEV domény TSG101 s PSAP motívom HRS komplexu (zhrnuté v MORITA a SUNDQUIST, 2004).

Tak ako PSAP motív HRS komplexu alebo PSAP motív vlastný TSG101, špecifickým väzbovým partnerom pre UEV doménu TSG101 je aj PTAP motív HIV-1 p6^{Gag} (GARRUS et al, 2001; VERPLANK et al., 2001). Mutácie v tomto motíve, prejavujúce sa defektom v uvoľňovaní vírusových častíc z buniek (HUANG et al., 1995), rušia väzbu TSG101 a HIV-1 p6^{Gag}, ktorej sa zúčastňuje prvých 13 aminokyselinových zvyškov HIV-1 p6^{Gag}. Pre účinnú interakciu je taktiež esenciálnou intaktná UEV doména TSG101. Ubiquitylácia HIV-1 p6^{Gag} kooperatívne stimuluje väzbu TSG101 (GARRUS et al., 2001; VERPLANK et al., 2001). Nadexpresia N-koncovkej oblasti molekuly TSG101 (TSG-5') nesúcej UEV doménu, inhibuje uvoľňovanie HIV-1 z buniek v *trans*-negatívnom zmysle, väzbou PTAP motívu. Následkom je špecifická blokácia L doménovej funkcie.

Podobný efekt však nebol zaznamenaný u MLV ani u M-PMV. Tieto retrovírusy využívajú L doménu PPxY, i keď u M-PMV nachádzame aj prídavný PSAP motív. Nadexpresia kompletnej molekuly TSG101 (TSG-F) taktiež blokuje uvoľňovanie HIV-1 z buniek, ale mechanizmus nesúvisí s väzbou p6^{Gag}. Nadexpresia C-koncovkej oblasti molekuly TSG101 (TSG-3'), ktorá interaguje s proteínom VPS28 (komponent ESCRT-I, viz vyššie), blokuje uvoľňovanie nielen u HIV-1 ale aj u MLV. Zatiaľ čo TSG101-5' suprimuje uvoľňovanie HIV-1 blokáciou L doménových funkcií PTAP motívu, mechanizmus pôsobenia vysokých hladín TSG101-F alebo TSG101-3' je odlišný. Dôsledkom je bunecný fenotyp charakteristický aberantnými endozomálnymi štruktúrami. Efekt TSG101-F a TSG101-3' je teda všeobecnejšieho charakteru,

spôsobený rozrušením bunecnej mašinerie endozomálneho triedenia proteínov (DEMIROV et al., 2002; GOILA-GAUR et al., 2003).

Súhrnom, replikácia HIV-1, podmienená nielen intaktným L doménovým motívom, ale aj bunecným faktorom TSG101, vyžaduje funkčnú Vps dráhu rovnako ako replikácia MLV, u ktorého hrá TSG101 vedľajšiu úlohu (SEGURA-MORALES et al., 2005). Uvedené skutočnosti ohľadne pôsobenia TSG-5' by mohli slúžiť ako základ pre dizajnovanie inhibítorov zamierených proti HIV-1, ale nenarúšajúcich endozomálne triedenie proteínov (GOILA-GAUR et al., 2003).

2.9.13 ALIX/AIP1 a pučanie retrovírusov

Bunecný proteín ALIX, označovaný aj AIP1, je zapojený vo viacerých bunecných procesoch vrátane apoptotickej bunecnej smrti, výstavby aktínového cytoskeletu a triedenia proteínov do endozomálnych a lyzozomálnych dráh. Jeho kvasinkový ortológ, označovaný ako Vps31 alebo Bro1, patrí medzi Vps proteíny triedy E. Kryštálová štruktúra molekuly ALIX je rozdelená do troch oblastí. Doména Bro1 tvoriaca N-koncovú oblasť molekuly má konzervovanú štruktúru tvarom pripomínajúcu bumerang alebo banán a interaguje s ESCRT-III komplexom. Na C-konci molekuly sa nachádza oblasť bohatá na prolín a predpokladá sa, že je neštruktúrovaná. Jej súčasťou je aj PTAP motív sprostredkujúci interakciu s proteínom TSG101 (súčasť ESCRT-I, viz vyššie). Centrálna V doména je tvorená dvomi ramenami, ktoré zaujímajú konformáciu v tvare písmena „V“, čím priestorovo približujú Bro1 doménu s oblasťou buhatou na prolín (FISHER et al., 2007; LEE et al., 2007).

Proteín ALIX bol objavený inkorporovaný vo viriónoch primátich lentivírusov (HIV-1, SIV) a to v závislosti na $p6^{Gag}$. Presnejšie sa jedná o C-terminálnych 12 aminokyselinových zvyškov, kde nie je zahrnutý motív PTAP (STRACK et al., 2003). Pre interakciu medzi HIV-1 $p6^{Gag}$ a proteínom ALIX je nevyhnutný motív LYP(x)_nLxxL, lokalizovaný C-proximálne (LEE et al., 2007; ZHAI et al., 2008). Tento motív nachádzame aj u EIAV, pričom Y a P zvyšky sú ako súčasť L domény nevyhnutné pre uvoľňovanie častíc EIAV (PUFFER et al., 1997) a L doménový motív EIAV $p9^{Gag}$ tiež interaguje s ALIX (STRACK et al., 2003).

Miestom interakcie medzi LYP(x)_nLxxL sekvenciou a molekulou ALIX je rozsiahly hydrofóbny žliabok V domény, ktorého súčasťou je konzervovaný Phe. U konsenzu sekvencie YP(x)_nL je pre HIV-1 motív YPLTSL n=3 a pre EIAV motív YPDL n=1. Oba tieto peptidy zaujímajú mierne odlišnú konformáciu, ktorá im napriek malej sekvenčnej odlišnosti dovoľuje vytvárať ekvivalentné kontakty s V doménou

ALIX. Motív YPDL ako jediná L doména u EIAV p9^{Gag} vykazuje vyššiu väzbovú afinitu pre ALIX v porovnaní s HIV-1 p6^{Gag}, u ktorého je primárnou L doménou PTAP motív. Pre L doménovú funkciu HIV-1 p6^{Gag} YP(x)_nL motívu v kooperácii s ALIX je esenciálny Tyr zvyšok. Substitúcia Phe za Tyr nie je schopná suplovať túto funkciu, i keď sa tieto aromatické aminokyseliny líšia iba v karboxylovej skupine (LEE et al., 2007; ZHAI et al., 2008).

Nadexpresia V domény ALIX inhibuje uvoľňovanie HIV-1 a má za následok produkciu viriónov s defektnou morfológiou. Táto inhibícia je prekonaná mutáciou v HIV-1 p6^{Gag} YP(x)_nL motíve, ktorá blokuje rozpoznávanie ALIX. a naopak aj mutáciou konzervovaného Phe v hydrofóbnom žliabku V domény ALIX. Centrálny V doménový fragment proteínu ALIX teda funguje ako negatívne dominantný inhibítor uvoľňovania HIV-1 z buniek a procesovania Gag polyproteínového prekurzoru (MUNSHI et al., 2007; LEE et al., 2008). Nedávno bolo publikované zistenie, že YP(x)_nL motív sa síce podieľa na väzbe proteínu ALIX, ale nie je esenciálny. Inkorporácie do viriónov HIV-1 i *in vitro* väzby ALIX molekuly sú schopné aj motívy zinkových prstov NC domény Gag (POPOV et al., 2008).

2.9.14 Ubiquitín ligázy rodiny NEDD4 a pučanie retrovírusov.

Vyššie uvádzané príklady dokumentujú priamu interakciu L domén P(T/S)AP a YP(x)_nL s Vps proteínmi triedy E. Správne fungovanie L domény PPxY je rovnako závislé na dráhach formovaných Vps proteínmi triedy E, ale motív PPxY nesprostredkováva vstup do týchto dráh priamou interakciou s niektorým z faktorov Vps triedy E. Sekvencia PPxY je rozpoznávaný tzv. WW doménami. Tieto domény, označované aj WWP, sú proteín-proteínovými interakčnými modulmi tvorenými asi 35-40 aminokyselinovými zvyškami. Ich súčasťou sú dva konzervované Trp zvyšky oddelené asi 20-22 zvyškami, od ktorých je pomenovanie odvodené. Štruktúra WW domén je tvorená antiparalelným, trojvláknovým β-listom formujúcim väzbové miesto pre ligand bohatý na Pro (zhrnuté v KAY et al., 2000; SUDOL a HUNTER, 2000).

Viacero kópií WW domén je prítomných u tzv. HECT (z angl. *homologous to E6-AP C-terminus*) E3 ubiquitín ligáz rodiny NEDD4 (z angl. *neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated-4*). WW domény sa nachádzajú v centrálnej časti cicavčích NEDD4 molekúl i u ich ortológov označovaných popísaných u *S. cerevisiae*. N-koniec molekúl NEDD4 je tvorený tzv. C2 doménou interagujúcou s Ca²⁺ a fosfolipidmi, ktorá ovplyvňuje funkciu proteínov reguláciou ich translokácie k membránam v závislosti na fluktuácii cytosolickej koncentrácie Ca²⁺. Na C-konci

molekúl NEDD4 nachádzame vlastnú HECT doménu s ubiquitín ligázovou funkciou. Je tvorená asi 350 aminokyselinovými zvyškami a jej pomenovanie je založené na podobnosti s onkoproteínom E6-AP (z angl. E6-associated protein) ľudského papilomavírusu (zhrnuté v HARVEY a KUMAR, 1999).

E3 ubiquitín ligázy rodiny NEDD4 s WW doménami nachádzame i u vtáčích buniek. Prieskumom cDNA knižnice kuracieho embrya bol identifikovaný interakčný partner pre L doménu RSV s konsenzom sekvencie PPxY, lokalizovanú v sekvencii p2b^{Gag} (viz vyššie). Je ním proteín rodiny NEDD4, pomenovaný LDI-1 (z angl. L-domain interacting protein 1). Táto špecifická interakcia bola potvrdená *in vivo* aj *in vitro* a zároveň bola vylúčená interakcia LDI-1 s PTAP sekvenciou HIV-1 alebo YPDL sekvenciou EIAV. Expresia samotnej WW domény LDI-1 interferuje s uvoľňovaním RSV dominantne negatívnym spôsobom (KIKONYOGO et al., 2001).

V prípade M-PMV s dominantným L doménovým motívom PPPY a sekundárnym motívom PSAP bola popísaná E3 ubiquitín ligáza rodiny NEDD4, špecificky interagujúca so sekvenciou PPxY. Mutácia jej WW domén inhibuje uvoľňovanie častíc M-PMV, ale intaktná C2 doména ani ubiquitín ligázová aktivita HECT domény nie sú podmienkou účinnosti tohto procesu (YASUDA et al., 2002). Spoločne s proteínom TSG101 bola E3 ubiquitín ligáza rodiny NEDD4 objavená inkorporovaná vo viriónoch M-PMV. Na inkorporáciu NEDD4 nemá vplyv mutácia PSAP motívu, ktorá ale inhibuje interakciu s TSG101 (GOTTWEIN et al., 2003).

MLV s tromi L doménami interaguje nielen s NEDD4, ale i s TSG101 a ALIX (SEGURA-MORALES et al., 2005). Tak, ako je pre MLV primárnou L doménou PPPY motív, tak je pre uvoľňovanie vírusom podobných častíc MLV z buniek nevyhnutná interakcia s NEDD4 ubiquitín ligázami. Faktory TSG101 a ALIX hrajú vedľajšiu úlohu a esenciálna rola NEDD4 ubiquitín ligáz nemôže byť nahradená pôsobením molekúl TSG101 alebo ALIX. Interakcie s NEDD4, TSG101 a ALIX sú zároveň determinantami vnútrobunečnej lokalizácie MLV Gag molekúl. Za fyziologických podmienok a v závislosti na bunečnom type je Gag lokalizovaný buď na endozomálnej membráne alebo na membráne plazmatickej. Zatiaľ čo priama interakcia Gag molekúl s TSG101 a ALIX implikuje lokalizáciu Gag molekúl na plazmatickej membráne, za endozomálnu lokalizáciu zodpovedá interakcia s NEDD4 ubiquitín ligázami. Mutantné formy Gag molekúl neschopné väzby s TSG101 a ALIX sa koncentrujú na endozomálnej membráne a sú citlivé k dominantne negatívnym formám NEDD4 nekonjugujúcim ubiquitín. Znamená to, že priamou interakciou medzi molekulami Gag a TSG101

alebo ALIX je požiadavka ubiquitylácie Gag molekúl pôsobením NEDD4 potlačená (SEGURA-MORALES et al., 2005).

2.10 Vírus myšieho tumoru prsnej žľazy MMTV

V tridsiatych rokoch minulého storočia bol vírus myšieho tumoru prsnej žľazy MMTV (z angl. *mouse mammary tumor virus*) popísaný ako infekčné agens spôsobujúce karcinóm prsnej žľazy u myší. Prenáša sa buď horizontálne ako endogénny provírus, alebo vertikálne ako exogénne infekčné virióny. Exogénny vírus sa prenáša z laktujúcej myšej samice cez materské mlieko na sajúce potomstvo (BITTNER 1936, prebraté z INDÍK et al. 2005). Vírus u nového hostiteľa napáda najprv bunky B lymfocytov lokalizované v tzv. Peyerových plakoch gastrointestinálneho traktu, v ktorých sa replikuje. Následne je transportovaný k epiteliálnym bunkám prsnej žľazy, kde dokončuje svoj životný cyklus. Pre úspešné pomnoženie MMTV sú potrebné proliferujúce B lymfocyty. Na povrchu infikovaných B lymfocytov je exprimovaný vírusom kódovaný superantigén, produkt génu *sag*, ktorý je schopný nešpecificky stimulovať veľké množstvo CD4⁺ T lymfocytov. Takto stimulované CD4⁺ T lymfocyty produkujú interleukín 4 (IL-4) a CD40 ligand, molekuly stimulujúce proliferáciu B lymfocytov (zhrnuté v JANEWAY 2001).

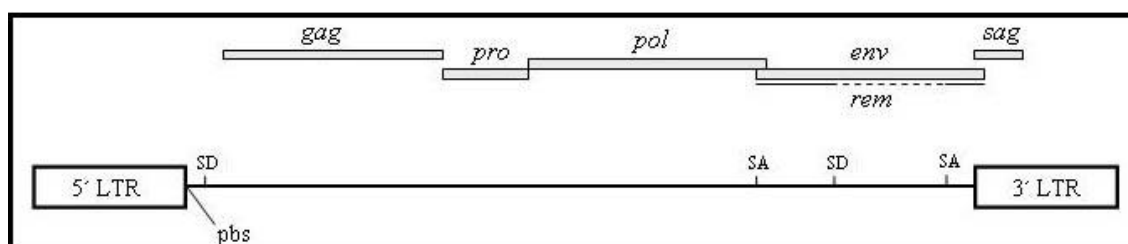
2.10.1 Genóm MMTV

Genóm MMTV je tvorený génmi *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *rem* a *sag* (obr. 6). Nezostrihnutý transkript genómovej dĺžky tvorí mRNA génov *gag*, *pro* a *pol*. Gén *gag* kóduje hlavné štruktúrne komponenty viriónu exprimované vo forme Gag polyproteínového prekursoru (Pr77^{Gag}). Génom *pro* je kódovaná vírusová aspartátová proteáza (PR) uplatňujúca sa v neskorých štádiách životného cyklu retrovírusov pri proteolytickom spracovaní polyproteínových prekursorov v procese maturácie. Gén *pol* kóduje vírusovú reverznú transkriptázu (RT), teda RNA dependentnú DNA polymerázu s aktivitou RNázy H, a vírusovú integrázu (IN). Produkty uvedených génov sú kódované v odlišných čítacích rámcoch a syntetizované na voľných polyzómoch v cytoplazme hostiteľských buniek vo forme polyproteínových prekursorov Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol}. K syntéze fúzných produktov Pr110^{Gag-Pro}, resp. Pr160^{Gag-Pro-Pol} dochádza posunom čítacieho rámca o -1, resp. -2 nukleotidy, v dôsledku supresie terminačného kodónu na konci Pr77^{Gag}, resp. Pr110^{Gag-Pro-Pol} (MOORE et al., 1987; HIZI et al., 1987). Gén *env* kóduje obalové glykoproteíny TM a SU, ktoré sú syntetizované zo zostrihutej, subgenómovej mRNA, vo forme polyproteínového prekursoru Env, na drsnom endoplazmatickom retikule, ktorý je následne štiepený

bunečnou proteázou v lumen endoplazmatického retikula. Zostrihom *env* mRNA dochádza k odstráneniu enkapsidačného signálu, ktorý je lokalizovaný v 5'-koncovej oblasti *gag*, a tým pádom nie sú mRNA subgenómovej veľkosti zbalené do viriónov.

Gén *sag* je lokalizovaný v U3 oblasti MMTV LTR a kóduje vírusový superantigén (SAg), glykosylovaný, membránový proteín typu II. Ten je štiepený bunečnou proteázou za vzniku aktívnej formy, ktorá na povrchu infikovaných B lymfocytov vytvára komplex s MHC glykoproteínmi II. triedy. Tento komplex je schopný nešpecificky stimulovať veľké množstvo CD4⁺ T lymfocytov interakciou s V β reťazcom T bunečného receptora. V porovnaní s konvenčnými antigénmi, ktoré sú schopné stimulovať asi 0,01-0,001% T bunečnej populácie, SAg je schopný nešpecificky stimulovať až 10% populácie T buniek (ROSENBERG a JOLICOEUR, 1997).

Až do roku 2005 bol MMTV považovaný za jednoduchý retrovírus s génmi *gag* a *env*, kódujúcimi štruktúrne komponenty viriónu, génmi *pro* a *pol* pre proteíny s enzymatickou funkciou a s prídavným génom *sag* kódujúcim vírusový superantigén. V roku 2005 bol publikovaný objav doposiaľ neznámeho, 39 kDa proteínového produktu exprimovaného z dvojnásobne zostrihnutého transkriptu. Prvým zostrihom vzniká mRNA pre Env proteíny a druhým zostrihom vzniká mRNA pre autoregulačný, RNA exportný proteín, pomenovaný Rem (z angl. *regulator of export of MMTV mRNA*). Jeho prítomnosť činí z MMTV prvý zdokumentovaný komplexný myšší retrovírus (INDÍK et al., 2005; MERTZ et al., 2005).

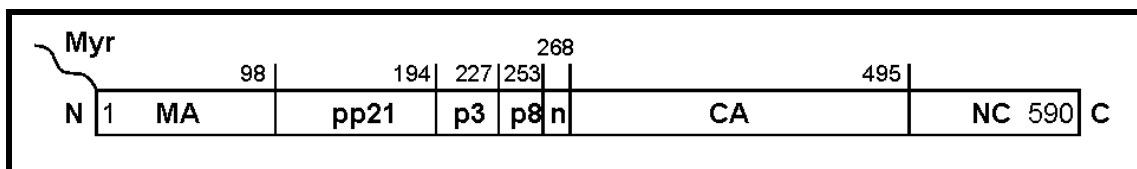


Obr. 6. Schématické znázornenie génov (hore) a provírusovej sekvencie MMTV (dole). Obdĺžniky s označením génov *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *sag*, resp. v prípade *rem* úsečka, značia otvorené čítacie rámce a prerušovaná čiara značí fakultatívny exón. Vertikálny posun obdĺžnikov značí odlišné čítacie rámce. SA – akceptorové miesto splicingu, SD – donorové miesto splicingu, pbs – primér viažúce miesto (z angl. primer binding site), 5', resp. 3' LTR – dlhé koncové repetície (z angl. long terminal repeat) na 5', resp. 3' konci.

2.10.2 Štruktúrne proteíny MMTV

Päť majoritných a sedem minoritných polypeptidov izolovaných z viriónov MMTV bolo popísaných už v roku 1974 (TERAMOTO et al.). Neskôr boli podrobne charakterizované štruktúrne proteíny viriónov MMTV (HIZI et al., 1989; MENÉNDEZ-ARIAS, RISCO et al., 1992) a ich lokalizácia v rámci polyproteínového prekursoru Pr77^{Gag} bola určená použitím syntetických peptidov ako substrátov pre purifikovanú

vírusovú proteázu (MENÉNDEZ-ARIAS, YOUNG a OROSZLAN, 1992). Jedná sa o matrixový proteín p10 (MA), kapsidový proteín p27 (CA), nukleokapsidový proteín p14 (NC) a proteíny s doposiaľ neznámou funkciou, fosfoproteín pp21 a proteíny p3 a p8. Vnútrotná organizácia domén Gag polyproteínového prekursoru je NH₂-MA-pp21-p3-p8-n-CA-NC-COOH (obr. 7). Ako „n“ sa označuje sedemnást' aminokyselinových zvyškov, ktoré doposiaľ neboli izolované ale sú kódované v nukleotidovej sekvencii *gag* génu.



Obr. 7. Schématické znázornenie molekuly MMTV Gag polyproteínového prekursoru. vertikálne úsečky oddeľujúce jednotlivé proteínové domény vyznačujú štiepne miesta vírusovej proteázy a čísla udávajú poradie aminokyselinových zvyškov v smere od amino (N) po karboxylový (C) koniec. Myr - zvyšok kyseliny myristylovej, MA - matrixová, CA - kapsidová a NC - nukleokapsidová doména, pp21 - fosfoproteínová doména a krátke domény p3, p8, n.

Virión MMTV je na povrchu pokrytý obalom odvodeným od cytoplazmatickej membrány hostiteľskej bunky. Obal obsahuje glykoproteíny SU a TM, ktoré sprostredkujú špecifickú interakciu s povrchovými bunecnými receptormi a fúziu vírusového obalu s cytoplazmatickou membránou pri vstupe vírusu do bunky. Glykoproteíny tvoria na povrchu viriónov pozorovaných metódou cryoEM výstupky s trojpočetnou osou symetrie čo naznačuje, že sa jedná o triméry (BRIGGS et al., 2004).

2.10.3 Molekulárny klon MMTV

Problémy na poli molekulárneho klonovania MMTV provírusového vektoru boli prekonané pred dvomi desiatkami rokov a skonštruovaný bol kompletný molekulárny klon plne kompetentného MMTV provírusu, použiteľný pri genetických manipuláciách a produkujúci vírus s kompletnou biologickou aktivitou. Pod dovtedajšie neúspešné pokusy sa podpísali sekvencie lokalizované v *gag* génoch niektorých línií MMTV, extrémne rezistentné voči propagácii v *E.coli* klonovacích vektoroch. Úspech spočíval vo vytvorení hybridného klonu MMTV. Jeho 5' oblasti, vrátane *gag* sekvencie, sú odvodené z endogénneho *Mtv-1* provírusu izolovaného z myšej línie C3H. Sekvencie 3' oblasti pochádzajú z exogénnej MMTV(C3H) línie tohto vírusu, izolovanej z materského mlieka laktujúcich samíc myšej línie C3H. Prirodzene je expresia génov MMTV stimulovaná glukokortikoidnými hormónmi počas laktácie samíc. V laboratórnych podmienkach a pri práci s hybridným klonom MMTV je možné použitie dexametazonu ako stimulantu génovej expresie (SHACKLEFORD a VARMUS 1988).

2.10.4 Ľudský betaretrovírus

Koncom minulého storočia sa v USA začali množiť dohady o tom, že ľudský homológ MMTV by mohol byť etiologickým agens spôsobujúcim rakovinu prsníka u žien. Tieto domnienky potvrdzujú dôkazy o prítomnosti sekvencií homologických k určitým sekvenciám MMTV u prsných tumorov (HOLLAND a POGO 2004). Konečne v roku 2007 boli izolované a charakterizované betaretrovírusových častice z primárnych bunčných kultúr odvodených od prsných karcinómov u človeka. Replikačne kompetentný provírus objavený v týchto bunkách a zdieľajúci homológiu v 95% sekvencie so sekvenciou MMTV bol označený ako HMTV (z angl. *human mammary tumor virus*) (MELANA et al., 2007). Tieto zistenia sú v súlade s predchádzajúcimi dôkazmi o tom, že MMTV je schopný infikovať ľudské bunky *in vitro* (INDÍK et al., 2005; INDÍK et al., 2007).

Paralelne s prácami zaoberajúcimi sa vzťahom ľudských homológov MMTV k rakovine prsníka sa objavujú dôkazy o infekčnej etiológii pri chronickom cholestatickom ochorení pečene. Toto ochorenie postihuje predovšetkým ženy v strednom veku. Je spôsobené deštrukciou malých intrahepatálnych duktov zápalovým procesom, ktorý je sprostredkovaný imunitným systémom. Vede k cirhóze a následnému zlyhaniu pečene a označuje sa ako PBC (z angl. *Primary Biliary Cirrhosis*) (VERGANI et al. 2004). Použitím protilátok proti CA proteínu MMTV boli detegované vírusové proteíny v periférnych lymfatických uzlinách pacientov s PBC ochorením, nie však v samotnom tkanive tvorenom hepatocytmi (XU et al. 2004). Toto korešponduje s dôkazmi o konverzii v tropizme MMTV na leukemogénnu variantu pomenovanú akronymom TBLV (z angl. *type B leukemogenic virus*), spôsobujúcu lymfómy týmusu u myší (BHADRA et al. 2005). Použitím DNA izolovanej z lymfatických uzlín pacientov trpiacich PBC ochorením bol klonovaný provírusový genóm ľudského betaretrovírusu (HBRV, z angl. *human betaretrovirus*). Z porovnania aminokyselinových sekvencií HBRV s MMTV a betaretrovírusom spôsobujúcim rakovinu prsníka u človeka vychádza 93%-99% identita pre kapsidové (CA) proteíny p27, 93%-97% identita v obalových (Env) proteínoch a 76%-85% identita u variabilnejších superantigénov (XU et al. 2004).

3 Materiál a Metodika

3.1 Materiálové a prístrojové vybavenie

3.1.1 Chemikálie

Adenín	Sigma
Agar	HiMedia
Agaróza	Serva
Akrylamid	Sigma
Aminokyseliny (uvedené v texte)	Sigma
Ampicilín	Léčivá a. s.
APS (persíran amónny)	Sigma
Bromfenolová modrá	Sigma
BSA (hovädzí sérový albumín)	New England Biolabs
Deoxycholát sodný	Fluka
EDTA	Sigma
DMEM	PAA
DMEM bez Met a Cys	Sigma
Etanol	Penta
Extrakt z kvasníc	HiMedia
FBS (fetálne hovädzie sérum)	Sigma
GelRed	Biotium
Glycerol	Sigma
Hydrogénfosforečnan sodný	Sigma
Chlorid draselný	Penta
Chlorid sodný	Penta
Chlorid vápenatý	Sigma
Kakodylátový roztok	Sigma
Kyselina chlorovodíková	Penta
Kyselina octová	Penta
LB médium	HiMedia
L-glutamín	PAA
Merkaptoetanol	Sigma
Minimálne syntetické médium	Clontech
N,N'-metylénbisakrylamid	Sigma

PIPES	Sigma
Sacharóza	Sigma
SDS (dodecylsulfát sodný)	Sigma
Štandardy molekulových hmotností:	
pre DNA:	
1 kb DNA ladder	New England Biolabs
100 bp DNA ladder	New England Biolabs
pre proteíny:	
Benchmark Prestained	Invitrogen
TEMED	Sigma
Tran ³⁵ S-Label	MP Biomedicals, Inc.
Tris base	Sigma
Trypsín (0,25% v roztoku s EDTA)	Sigma
Xylénová modrá	Sigma
Zymed (rec-Protein A Seph. 4B)	Invitrogen
Králičie polyklonálne anti-CA antisérum poskytol Dr. Michael Sakalian	

3.1.2 Roztoky a médiá

PBS (1 x konc.)

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 2 mM KH₂PO₄
- pH 7,4

Tris - glycínový roztok (1 x konc.)

- 25 mM Tris-Cl
- 0,25 mM glycín
- 0,1% SDS

DNA vzorkový roztok (6 x konc.)

- 0,25% bromfenolová modrá
- 0,25% xylénová modrá
- 40% sacharóza

30% zmes akrylamidov

- 29% akrylamid
- 1% N,N'-metylénbisakrylamid

Fixačný roztok

- 10% kyselina octová
- 40% metanol

TAE (50 x konc.)

- 2 M Tris base
- 1 M kyselina octová
- 0,5 M EDTA
- pH 8.0

Proteínový vzorkový roztok (PLB) (2 x konc.)

- 50 mM Tris-Cl, pH 6.8
- 100 mM merkaptoetanol
- 2% SDS
- 0,1% brómfenolová modrá
- 10% glycerol

Roztoky pre kultiváciu a prípravu buniek *E.coli*

Tekuté LB médium

- 25 g LB média, doplniť H₂O do 1 l

LB agar (2%)

- 25 g LB média
- 20 agaru, doplniť H₂O do 1 l

Roztok CaCl₂ pre prípravu kompetentných buniek *E.coli* DH5α

- 60 mM CaCl₂
- 15% glycerol
- 10 mM PIPES
- pH 7,5

Roztoky pre kultiváciu a prípravu buniek *S.cerevisiae*

Nutričný doplnok bez tryptofanu, leucínu, adenínu a histidínu (10 x konc.)

- 150 mg izoleucínu
- 750 mg valínu
- 100 mg arginínu
- 150 mg lyzínu
- 100 mg metionínu
- 250 mg fenylalanínu
- 100 mg treonínu
- doplniť ddH₂O do 500 ml

Nutričný doplnok bez tryptofanu a leucínu (10 x konc.)

- 150 mg izoleucínu
- 750 mg valínu
- 100 mg adenínu
- 100 mg arginínu
- 100 mg histidínu
- 150 mg lyzínu
- 100 mg metionínu
- 250 mg fenylalanínu
- 100 mg treonínu
- doplniť ddH₂O do 500 ml

Tekuté médium YPDA

- 10 g extraktu z kvasníc
- 20 g peptonu
- doplniť H₂O do 935 ml
- upraviť pH na hodnotu 6,5
- sterilizovať autoklávaním a potom pridať 50 ml 40% roztoku glukózy a 15 ml 0,2 % roztoku adenínu

YPDA agar

- 10 g extraktu z kvasníc
- 20 g peptonu
- 20 g agaru
- doplniť H₂O do 935 ml
- sterilizovať autoklávaním a potom pridať 50 ml 40% roztoku glukózy a 15 ml 0,2 % roztoku adenínu
- pred pridaním agaru a sterilizáciou upraviť pH na hodnotu 6,5

Minimálne agarové médium bez tryptofanu a leucínu

- 26,7 g minimálny syntetický základ s agarom
- doplniť H₂O do 850 ml
- upraviť pH na hodnotu 5,8
- sterilizovať autoklávaním a následne pridať 50 ml 40% roztoku glukózy
- 100 ml 10x konc. nutričného doplnku bez Trp a Leu

Minimálne agarové médium bez tryptofanu, leucínu, adenínu a histidínu

- 26,7 g minimálny syntetický základ s agarom
- doplniť H₂O do 850 ml
- upraviť pH na hodnotu 5,8
- sterilizovať autoklávaním a následne pridať 50 ml 40% roztoku glukózy
- 100 ml 10x konc. nutričného doplnku bez Trp, Leu, Ade a His

Roztoky pre imunoprecipitáciu proteínov z bunčných lyzátov

Lyzačný roztok A

- 1% triton X-100
- 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 50 mM NaCl
- 1% deoxycholát sodný
- H₂O

Lyzačný roztok B

- lyzačný roztok A s 0,1% SDS

Fixačný roztok pre elektrón mikroskopickú analýzu

- 3% glutaraldehyd v 0,1 M kakodylátovom roztoku, pH 7.5

3.1.3 Enzými

- Restričné endonukleázy New England Biolabs
- T4 DNA ligáza New England Biolabs
- Phusion™ DNA polymeráza Finnzymes

3.1.4 Komerčné kity pre izoláciu a purifikáciu DNA

- QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN
- QIAGEN Plasmid Midi Kit QIAGEN
- Zyppy Plasmid Miniprep Kit II™ Zymo Research

3.1.5 Bunečný materiál

- *E.coli* DH5a Invitrogene
- *S.cerevisiae* AH109 Clontech
- bunky HEK 293T ATCC

3.1.6 Oligonukleotidy

Názov	Sekvencia	Použitie
Mt-dpp-n-R	5'-ATA ACG CTA CAG GCA AAA CCA AGT CTG ATT GCT CTG TC -3'	Delécia nekanonických domén MMTV Gag polyproteínu
Mt-Kas-F	5'-ACA GTT GGC GCC CGA ACA GG-3'	Delécia nekanonických domén MMTV Gag polyproteínu Mutagenéza MA Tyr81 Pro82
HBRVgag-XmaI- p3-F	5'-GCC TTT CCC GGG TTT AGC CAC AGA TTG GAA CG -3'	delécia MA a pp21 domén HBRV Gag polyproteínu
HBRVgag-R	5'-AAA CGG GCC CTC TAG ACT CG- 3'	Delécia MA a pp21 domén HBRV Gag polyproteínu
F-Nco-ASAA	5'-AAG ACC ATG GGA GCA TCT GCA TCT GCT GCA TAC ACC TTG CAG-3'	Mutagenéza CA Pro36 Pro39
Mt-2433-R	5'-GAG GAT CAA ATC CTT CTG TG- 3'	Mutagenéza CA Pro36 Pro39
YP/AA-Pst-F	5'-CCA AAA CAG GCT GCA GCC ATT TGG CTT CAG TTG CC-3'	Mutagenéza MA Tyr81 Pro82
YP/AA-Pst-R	5'-GGC AAC TGA AGC CAA ATG GCT GCA GCC TGT TTT GG-3'	Mutagenéza MA Tyr81 Pro82
pSMt-Xho-R	5'-AGG GGT GCC TCG AGG CAA ATC-3'	Mutagenéza MA Tyr81 Pro82

3.1.7 Plazmidová DNA

Názov	Príprava / Pôvod	Popis	Použité primery
pSMtv	Pripravil Dr. Aleš Zábranský.	Kódoval MMTV Gag polyproteín pod kontrolou M-PMV 5'-LTR.	-
pSMt-HYB	Pripravil Dr. Aleš Zábranský (ZÁBRANSKÝ et al., 2009).	Niesol MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR.	-
pSMt-HYB/D26A	Pripravil Dr. Aleš Zábranský (ZÁBRANSKÝ et al., 2009).	Niesol MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR a bodovú mutáciu v géne <i>pro</i> spôsobujúcu inaktiváciu vírusovej proteázy.	-
pSMt-HYB/ Δ pp21	Pripravil Dr. Aleš Zábranský.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou pp21 doménu.	-
pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMt-HYB/ Δ pp21 do pSMt-HYB/D26A.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou pp21 doménu a bodovú mutáciu v géne <i>pro</i> spôsobujúcu inaktiváciu vírusovej proteázy.	-
pSMt-HYB/ Δ (p3-n)	Pripravil Dr. Aleš Zábranský.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou domény p3-p8-n.	-
pSMt-HYB/D26A/ Δ (p3-n)	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMt-HYB/ Δ (p3-n) do pSMt-HYB/D26A.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou domény p3-p8-n a bodovú mutáciu v géne <i>pro</i> spôsobujúcu inaktiváciu vírusovej proteázy.	-
pSMtv Δ (pp21-n)	PCR pripraveným mutovaným fragmentom s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou domény pp21-p3-p8-n nahradená pôvodná sekvencia <i>gag</i> génu v pSMtv.	Obsahoval sekvenciu MMTV <i>gag</i> génu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou domény pp21-p3-p8-n.	Mt-dpp-n-R Mt-Kas-F
pSMt-HYB/ Δ (pp21-n)	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMtv Δ (pp21-n) do pSMt-HYB.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou domény pp21-p3-p8-n.	-

Plazmidová DNA (pokračovanie)

pSMt-HYB/D26A/ Δ (pp21-n)	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMtv Δ (pp21-n) do pSMt-HYB/D26A.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s deléciou oblasti <i>gag</i> génu kódujúcou domény pp21-p3-p8-n a bodovú mutáciu v géne <i>pro</i> spôsobujúcu inaktiváciu vírusovej proteázy.	-
pSMtv/ASAA	PCR zavedené mutácie meniace kodóny pre Pro36 a Pro39 v CA doméne MMTV Gag polyproteínu na kodóny pre alanín.	Obsahoval sekvenciu MMTV <i>gag</i> génu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s mutáciou zavádzajúcou P36A a P39A substitúciu v CA proteíne.	F-Nco-ASAA Mt-2433-R
pSMt-HYB/ASAA	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMtv/ASAA do pSMt-HYB.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s mutáciou zavádzajúcou P36A a P39A substitúciu v CA proteíne.	-
pSMt-HYB/D26A/ASAA	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMtv/ASAA do pSMt-HYB/D26A.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s mutáciou zavádzajúcou P36A a P39A substitúciu v CA proteíne a bodovú mutáciu v géne <i>pro</i> spôsobujúcu inaktiváciu vírusovej proteázy.	-
pSMtv/AIWL	PCR zavedené mutácie meniace kodóny pre Tyr81 a Pro82 v MA doméne MMTV Gag polyproteínu na kodóny pre alanín.	Obsahoval sekvenciu MMTV <i>gag</i> génu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s mutáciou zavádzajúcou Y81A a P82A substitúciu v MA proteíne.	YP/AA-Pst-F YP/AA-Pst-R pSMt-Xho-R
pSMt-HYB/AIWL	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMtv/AIWL do pSMt-HYB.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s mutáciou zavádzajúcou Y81A a P82A substitúciu v MA proteíne.	-
pSMt-HYB/D26A/AIWL	Preklonovanie KasI-XbaI fragmentu z pSMtv/AIWL do pSMt-HYB/D26A.	Obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou M-PMV 5'-LTR s mutáciou zavádzajúcou Y81A a P82A substitúciu v MA proteíne a bodovú mutáciu v géne <i>pro</i> spôsobujúcu inaktiváciu vírusovej proteázy.	-
pGADT7	Komerčne dostupný (Clontech)	Kódoval Gal4 aktivačnú doménu (AD).	-
pGBKT7	Komerčne dostupný (Clontech)	Kódoval Gal4 DNA väzbovú doménu (BD).	-
pcDNA3.1Zeo(+)+HBRVgag	Dar od Dr. Andrewa Masona.	Kódoval sekvenciu Gag polyproteínu HBRV.	-

Plazmidová DNA (pokračovanie)

pGADT7+HBRVgag	Sekvencia HBRV <i>gag</i> génu bola preklonovaná do pGADT7 tak, aby bol exprimovaný HBRV Gag polyproteín N-koncovo fúzovaný s Gal4 AD.	Kódoval HBRV Gag polyproteín N-koncovo fúzovaný s Gal4 AD.	-
pGBKT7+HBRVgag	Sekvencia HBRV <i>gag</i> génu bola preklonovaná do pGBKT7 tak, aby bol exprimovaný HBRV Gag polyproteín N-koncovo fúzovaný s Gal4 BD.	Kódoval HBRV Gag polyproteín N-koncovo fúzovaný s Gal4 BD.	-
pGADT7+HBRVp3-NC	PCR bola odstránená sekvencia <i>gag</i> génu kódujúca MA a pp21 doménu a fragment kódujúci p3-p8-n-CA-NC domény HBRV Gag polyproteínu bol ligovaný do pGADT7.	Kódoval p3-p8-n-CA-NC domény HBRV Gag polyproteínu N-koncovo fúzované s Gal4 AD.	HBRVgag-XmaI-p3-F HBRVgag-R
pGBKT7+HBRVp3-NC	PCR bola odstránená sekvencia <i>gag</i> génu kódujúca MA a pp21 doménu a fragment kódujúci p3-p8-n-CA-NC domény HBRV Gag polyproteínu bol ligovaný do pGBKT7.	Kódoval p3-p8-n-CA-NC domény HBRV Gag polyproteínu N-koncovo fúzované s Gal4 BD.	HBRVgag-XmaI-p3-F HBRVgag-R
pGBKT7+ALIX	Dar od Prof. Stephena Goffa	Kódoval ľudský proteín ALIX N-koncovo fúzovaný s Gal4 BD.	-
pGADT7+TSG101	Dar od Prof. Stephena Goffa	Kódoval ľudský proteín TSG101 N-koncovo fúzovaný s Gal4 AD.	-
pGBKT7+NEDD4	Dar od Prof. Stephena Goffa	Kódoval ľudský proteín NEDD4 N-koncovo fúzovaný s Gal4 BD.	-

3.1.8 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy Adventurer™ Pro	Ohaus
Centrifuga Evolution RC	Sorval
Fosfoimager Typhoon 9410	Amersham Biosci.
Fotoaparát DC 290 Zoom	Kodak
Horizontálna agarózová alektroforéza model B1A	OWL
Inkubátor pre tekuté kultúry Inova 4300	New Brunswick Sci
Inkubátor na petriho misky	Memert
Inkubátor s CO ₂ atmosférou	Sanyo
Invertovaný mikroskop Eclipse TS100	Nikon
PCR termocyklér TC3000	Techne
pH meter pH510	Eutech
Spektrofotometer NanoDrop-1000	
Stolná centrifuga chaldená model 5415R	Eppendorf
Stolná centrifuga MiniSpin Plus	Eppendorf
Storage Fosfor Screen	Amersham Biosci.
Sušička na gély model 583	Bio-Rad
Termoblok Bio TDB-100	Biosan
Ultracentrifuga Optima™ L-100XP	Beckman Coulter
Vertikálna elektroforéza Mini-Protean 3	Bio-Rad
Vodný termostat model TW8	Julabo
Výkyvný ultracentrifugačný rotor SW41Ti	Beckman Coulter
Zdroj napätia Power Pac 300	Bio-Rad
Zdroj napätia Power Pac Basic	Bio-Rad
Počítačové programy:	
Typhoon Scanner Control 4.0	
ImageQuant TL v2003.03	
NanoDrop-1000 3.3.0	
PyMOL 0.99rc6	

3.2 Metodická časť

3.2.1 Manipulácia s DNA

3.2.1.1 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) bola použitá pri amplifikácii fragmentov DNA a zavádzaní miestne špecifických mutácií, či už bodových alebo delečných, pomocou mutagénnych oligonukleotidov. Reakcie prebiehali štandardne v objeme 50 μ l a zloženie zmesí sa riadilo nasledujúcou schémou:

▪ HF tlmivý roztok (5x konc.)	10 μ l
▪ zmes dNTPs (10 mM každý)	1 μ l
▪ priamy primer (20 pM)	3 μ l
▪ reverzný primer (20 pM)	3 μ l
▪ MgCl ₂ (50 mM)	5 μ l
▪ templátová DNA (10 ng/ μ l)	10 μ l
▪ ddH ₂ O	17,5 μ l
▪ DNA polymeráza Phusion™	0,5 μ l

Použitá DNA polymeráza Phusion™ syntetizovala úsek DNA dlhý 1 kbp za 15 - 30 s (informácia výrobcu), podľa toho bol upravený čas polymerácie „t“ pri 72°C, viz nasledujúca schéma teplotného profilu PCR:

▪ <u>počiatočná denaturácia</u>	98°C	30 s	
▪ denaturácia	98°C	10 s	
▪ nasadnutie primerov	65°C	60 s	7x
▪ <u>syntéza</u>	72°C	„t“	
▪ denaturácia	98°C	10 s	
▪ nasadnutie primerov	60°C	60 s	7x
▪ <u>syntéza</u>	72°C	„t“	
▪ denaturácia	98°C	10 s	
▪ nasadnutie primerov	55°C	60 s	7x
▪ <u>syntéza</u>	72°C	„t“	
▪ denaturácia	98°C	10 s	
▪ nasadnutie primerov	50°C	60 s	7x
▪ <u>syntéza</u>	72°C	„t“	
▪ konečná polymerácia	72°C	80 s	

Nakoľko pri mutagénnych primeroch nebolo možné presne stanoviť teplotu nasadania, boli použité štyri uvedené teploty (65°C, 60°C, 55°C a 50°C).

3.2.1.2 Elektroforetické delenie molekúl DNA v agarózovom gély

Analýza DNA bola prevádzaná elektroforetickou separáciou v agarózovom gély v horizontálnom usporiadaní. Separácia prebiehala v TAE tlmivom roztoku a podľa očakávanej molekulovej hmotnosti separovaných fragmentov sa koncentrácia agarózy v gély pohybovala v rozmedzí 1 - 2%. Vizualizáciu DNA exponovanú UV žiareniu zabezpečoval prípravok GelRed a molekulová hmotnosť bola orientačne stanovovaná podľa komerčne dostupných štandardov molekulových hmotností „1 kb DNA Ladder“ a „100 bp DNA Ladder“.

3.2.1.3 Izolácia fragmentov DNA z agarózového gélu

Požadované fragmenty DNA získané PCR alebo restričným štiepením, ďalej použité pri klonovaní boli izolované z agarózového gélu po elektroforetickej separácii pomocou komerčného kitu QIAquick Gel Extraction Kit podľa inštrukcií výrobcu.

3.2.1.4 Restričné štiepenie DNA

Pri molekulárnom klonovaní boli získavané špecifické fragmenty DNA použitím restričných endonukleáz rozpoznávajúcich a štiepiacich špecifickú sekvenciu DNA. Restričné štiepenie bolo taktiež využívané pri analýze pripravovaných molekulárnych konštruktov. Reakcie prebiehali obvykle v 50 µl objeme a reakčné zmesi mali nasledujúce zloženie:

- tlmivý roztok NEB 1, 2, 3 alebo 4 (10x konc.) 5 µl
- podľa potreby BSA (10 mg/ml) 0,5 µl
- templátová DNA 5-10 µg / 50 µl
- enzým, alebo dvojica enzýmov v množstve (počet U / reakciu) závislom na východiskovej konc. enzýmu a množstve templátu v reakcii
- doplnené ddH₂O na konečný objem 50 µl

Postup sa v zásade pridržiaval doporučením výrobcu, podľa požiadaviek konkrétnych restriktáz bol pridávaný BSA a zvolený vhodný tlmivý roztok NEB 1, 2, 3 alebo 4. Štiepenie prebiehalo obvykle cez noc, pri doporučenej teplote.

3.2.1.5 Ligácia fragmentov DNA

Ligáciou fragmentov DNA do linearizovaných vektorov boli pripravované plazmidové konštrukty. Ligačná reakcia bola katalyzovaná komerčne dostupnou T4 DNA ligázou (New England Biolabs) a prebiehala štandardne v 20 µl objememe, ktorý obsahoval 2 µl pufru (10x konc.) pre T4 DNA ligázu. Reakcia štandardne obsahovala 0,1 µg vektorovej DNA. Inzert bol pridávaný približne v molárnom pomere 3:1

k vektoru. Reakcia prebiehala cez noc vo vodnom kúpely, ktorý na začiatku obsahoval ľadovú drť a mal preto teplotu okolo 4°C. Počas inkubácie pri laboratórnej teplote dochádzalo k postupnému vyrovnaniu teploty kúpeľa s okolitým prostredím a enzým mohol pracovať pri optimálnej teplote (asi 12-16°C) nachádzajúcej sa v tomto rozmedzí teplôt. Ako kontrola bola použitá popísaná ligačná reakcia, ale bez prídavku inzertu.

3.2.1.6 Príprava kompetentných buniek *E.coli* DH5a za použitia roztoku CaCl₂

Pojem kompetentné bunky označuje bunky schopné prijať plazmidovú DNA z okolitého prostredia. Bakteriálne bunky *E.coli* DH5a boli rozotreté na agarové misky a LB médiom a inkubované cez noc pri 37°C. Jedna z takto získaných kolónií bola inokulovaná do 100 ml LB média a kultúra bola kultivovaná cez noc pri 37°C a 220 otáčkach za minútu. Z tejto bunečnej kultúry ($OD_{590} = 1,694$) boli inokulované 4 ml do 400 ml LB média a inkubované 190 minút pri 37°C a 220 otáčkach za minútu. Počas inkubácie bola monitorovaná OD_{590} aby bola suspenzia zachytená v tom čase, kedy jej OD_{590} dosiahla rozmedzie hodnôt 0,3 - 0,5. V čase 180 minút od inokulácie dosiahla OD_{590} bakteriálnej suspenzie hodnotu 0,322 a začal proces spracovávania buniek. Bakteriálna suspenzia bola rozdelená do predchladených a sterilných centrifugačných kyviet, inkubovaná na ľade po dobu 10 minút a následne bola podrobená centrifugácii pri 1600 g po dobu 7 minút pri 4°C. Po odstránení supernatantu bola bunečná peleta jemne resuspendovaná v 40 ml ľadovo chladného roztoku CaCl₂ a znova podrobená centrifugácii po dobu 5 minút pri 1100 g a 4°C. Po odstránení supernatantu bola bunečná peleta opäť resuspendovaná v 40 ml ľadovo chladného roztoku CaCl₂, inkubovaná na ľade počas 30 minút a následne podrobená centrifugácii po dobu 5 minút pri 1100 g a 4°C. Výsledné bakteriálne pelety boli resuspendované v 4 ml ľadovo chladného roztoku CaCl₂, rozdelené do ľadovo chladných skúmaviek po 100 µl alikvótach, okamžite zamrazené v zmesi suchého ľadu s etanolom a skladované pri teplote -70°C.

3.2.1.7 Transformácia kompetentných buniek *E.coli* DH5a metódou tepelného šoku

Po vybratí z -70°C bola 100 µl alikvóta rozmrazená na ľade a bolo k nej pridaných 14 µl ligačnej zmesi, s ktorou bola bunečná suspenzia inkubovaná na ľade po dobu 30 minút. Teplotný šok prebiehal pri teplote 42°C po dobu 90 sekúnd, následne boli bunky umiestnené na ľade po dobu asi 2 - 3 minút. K bunkám bolo pridaných 800 µl LB média laboratórnej teploty a bunečná suspenzia bola inkubovaná pri 37°C po dobu 45 minút až 1 hodinu. Nakoniec bolo 200 µl bunečnej suspenzie rozotrenej na misky s LB agarom

a obsahom antibiotika (podľa použitej selekcie sa jednalo buď o ampicilín v koncentrácii 100 µg/ml alebo kanamycín s koncentráciou 50 µg/ml). Bakteriálna kultúra bola inkubovaná cez noc pri teplote 37°C.

3.2.1.8 Preparácia plazmidovej DNA

Plazmidová DNA z vybraných bakteriálnych klonov bola minipreparovaná pomocou komerčne dostupného kitu Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research), podľa priloženého protokolu. Takto získaná DNA bola podrobená restriktívnej analýze.

Midipreparácia plazmidovej DNA bola prevádzaná použitím komerčne dostupného kitu Plasmid Midi Kit (QIAGEN) a riadila sa priloženým protokolom. Týmto spôsobom boli preparované finálne konštrukty používané pri transfekcii buniek *in vitro*, resp. takto získaná DNA slúžila ako zásoba použitá pri ďalšom klonovaní.

3.2.1.9 Sekvenačná analýza DNA

Konštrukty pripravené pomocou PCR boli verifikované sekvenačnou analýzou. Množstvo 150 - 300 ng dsDNA bolo zmiešané s ddH₂O na výsledný objem 13 µl a pridaný bol 1 µl primeru s konc. 3,2 pmol/µl. Takto pripravené vzorky boli odoslané na komerčnú sekvenáciu do Laboratória sekvenace DNA, Centrum servisných laboratórií biologické sekce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7.

3.2.2 Práca s tkanivovými kultúrami

3.2.2.1 Kultivácia ľudských endoteliálnych ľadvinových buniek 293T

Pre účely expresie vírusových proteínov a produkciu vírusových častíc boli využité bunky ľudského ľadvinového endotelu (HEK, z angl. human endothelial kidney) označované 293T. Bunky boli kultivované na miskách s priemerom 10 cm, prevrstvené 10 ml DMEM s 10% FBS, v inkubátore pri 37°C a v atmosfére 5% CO₂. Každé 2 dni bolo z buniek odsaté médium, bunky boli opláchnuté s cca 10 ml PBS vytemperovaného na 37°C a opôsobené 1 ml 0,05% roztoku trypsínu s EDTA pri 37°C po dobu asi 1 - 2 minút, pokiaľ nebolo mikroskopicky potvrdené uvoľnenie buniek z povrchu. Následne bolo na bunky s trypsínom pridaných cca 9 ml DMEM s 10% FBS vytemperovaného na 37°C a bunky boli v médiu resuspendované. Zo suspenzie bol odobratý 1 ml a prenesený na novú misku s cca 9 ml čerstvého DMEM.

3.2.2.2 Transfekcia buniek v tkanivovej kultúre

V čase 24 hodín pred transfekciou boli bunky uvoľnené z povrchu misky pôsobením trypsínu a nasadené v množstve asi $8 \cdot 10^5$ do cca 4 ml DMEM s 10% FBS,

na miske s priemerom 6 cm. V čase transfekcie, kedy dosahovala bunecná kultúra na povrchu misiek 50 - 70% konfluenciu, bolo vymenené DMEM s 10% FBS za čerstvé, vytemperované na 37°C. Do 200 µl DMEM (bez FBS) vytemperovaného na laboratórnu teplotu bolo pridaných 8 µg DNA v roztoku. Roztok PEI (1 µg/µl) s objemom 21 µl bol doplnený DMEM (bez FBS) vytemperovaným na laboratórnu teplotu na výsledný objem 200 µl. Oba roztoky boli zmiešané, vortexované a inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút. Transfekčná zmes bola pridaná k bunecnej kultúre prevrstvanej DMEM s 10% FBS a bunecná kultúra bola inkubovaná pri 37°C a 5% CO₂ po dobu 24 hodín.

3.2.2.3 Metabolické značenie tkanivovej kultúry

Transfekované bunky v tkáňovej kultúre boli značené zmesou [³⁵S]metionínu a [³⁵S]cysteínu. Z misiek, ktorej povrch bol porastený transfekovanými bunkami bolo odsaté médium a bunky boli 2x opláchnuté cca 4 ml PBS vytemperovaným na 37°C. Značiace médium bolo pripravené pridaním zmesi [³⁵S]metionínu a [³⁵S]cysteínu do DMEM bez FBS a bez metionínu a cysteínu tak, aby bola výsledná aktivita 100 µCi/ml. Na 1 misku s bunkami bol aplikovaný 1 ml značiaceho média a bunky boli inkubované 60 minút pri 37°C a 5% CO₂. Po uplynutí doby metabolického značenia bolo značiace médium odobraté. Bunky boli buď hneď lyzované, alebo boli ďalej inkubované v 4 ml DMEM s 10% FBS po dobu 18 hodín pri 37°C a 5% CO₂.

3.2.2.4 Imunoprecipitácia MMTV proteínov

Z buniek bolo odobraté inkubačné médium, pridaný bol 1 ml lyzačného roztoku A s 10 mM PMSF a bunky boli lyzované na ľade po dobu 15 minút. Bunecný lyzát bol z povrchu misiek premiestnený do skúmavky a bunecné jadrá boli odtránené centrifugáciou pri 8000 g a 4°C po dobu 1 minúty. Postnukleárny supernatant bol premiestnený do čistej skúmavky a pridaných bolo 10 µl 10% SDS, takže vznikol lyzačný roztok B s výslednou konc. SDS rovnou 0,1%. Do výsledného bunecného lyzátu bolo pridaných 1,5 µl králičieho polyklonálneho anti-CA séra a lyzát s protilátkami bol inkubovaný za miešania po dobu 1 hodiny pri 4°C. Po 1 hodine bolo k lyzátu s protilátkami pridaných 40 µl 50% suspenzie sepharózy 4B s imobilizovaným rekombinantným proteínom A v lyzačnom roztoku A a inkubácia pri 4°C pokračovala ďalšiu 1 hodinu. Po uplynutí inkubačnej doby boli vzorky centrifugované pri 4000 g a 4°C po dobu 1 minúty. Supernatant bol odsatý a pelet bol resuspendovaný v 700 µl lyzačného roztoku B. Vzorky boli znova centrifugované za vyššie uvedeníých podmienok a tento postup bol prevedený celkovo 2 krát. Pelet bol následne

resuspendovaný v 900 µl roztoku Tris-Cl s pH 8, suspenzia bola premiestnená do čistej skúmavky a centrifugovaná za vyššie uvedeníých podmienok. Supernatant bol odstránený a výsledný pelet pozostávajúci z MMTV proteínov obsahujúcich CA doménu naviazaných na častice sepharózy 4B s imobilizovaným rekombinantným proteínom A prostredníctvom protilátky z králičieho séra bol resuspendovaný v 25 µl 2x konc. PLB.

3.2.2.5 Preparácia vírusových častíc uvoľnených z buniek do inkubačného média

Médium bolo z misiek s bunkami odobraté pomocou injekčnej striekačky a prefiltrované cez 0,45 µm filter do ultracentrifugačnej kyvety. Médium bolo podvrstvené 1 ml roztoku 20% sacharózy v PBS a doplnené PBS pod okraj kyvety. Vyvážené kyvety s médiom boli ultracentrifugované v rotore SW41Ti pri 35000 otáčkach za minútu a 4°C po dobu 60 minút. Supernatant bol odstránený, výsledný pelet bol resuspendovaný v 1 ml lyzačného roztoku B a ďalej spracovávaný rovnako ako bunecný lyzát, postupom popísaným v predchádzajúcej podkapitole.

3.2.2.6 Vertikálna elektroforéza v denaturujúcom polyakrylamidovom gély

Vzroky boli zmiešané s proteínovým vzorkovým roztokom (viz podkapitolu 2.1.2) v pomere 1:1 a denaturované varom po dobu asi 2 minút. Proteíny boli analyzované pomocou SDS-PAGE v 5% zaostrovačom a 10% separačnom gély. Elektroforéza prebiehala v Tris - glycínovom roztoku (podkapitola 2.1.2) pri konštantnom napätí 200 V. Po skončení elektroforetického delenia boli gély fixované vo fixačnom roztoku (podkapitola 2.1.2) po dobu 30 minút a následne dva krát prepláchnuté v dH₂O, pokaždé po dobu 15 minút. Gél bol následne sušený v sušičke gélov pri teplote 80°C po dobu 30 - 45 minút. Vysušený gél bol analyzovaný autoradiograficky použitím systému Storage Fosfor Screen, Fosfor Imager Typhoon a programu ImageQuant™.

3.2.2.7 Kvantifikácia

Kvantifikácia bola prevedená analýzou intenzity autoradiografie u sledovaných proteínov pomocou programu ImageQuant™. Sledovaná bola intracelulárna hladina Gag prekurzorových polyproteínov po 1 hodine metabolického značenia a množstvo polyproteínu Gag uvoľnené z buniek vo forme nezrelých vírusových častíc počas 18 hodín od metabolického značenia. Hodnota charakterizujúca hladiny extracelulárne detegovaných molekúl bola vzťahnutá ku hodnote, ktorá udávala celkové množstvo proteínov exprimovaných počas 1 hodiny metabolického značenia. Takto bol stanovený

relatívny podiel extracelulárne uvoľnených molekúl Gag z celkovej kvantity značených molekúl, ktorý charakterizoval účinnosť uvoľňovania MMTV častíc. Podiel tejto hodnoty pre mutantný prekursor Gag a Gag polyproteín divokého typu udával zmenu v schopnosti uvoľňovania vírusových častíc, spôsobenú študovanou mutáciou. Pre pochopenie princípu popísanej kvantitatívnej analýzy je dôležité uvedomiť si, že metabolicky značené molekuly Gag (obsahujúce CA doménu kľúčovú pri imunoprecipitácii) uvoľnené z buniek do inkubačného média vo forme nezrelých vírusových častíc počas 18 hodín pochádzajú z celkového množstva molekúl Gag, ktoré boli v bunkách exprimované počas 1 hodiny metabolického značenia.

3.2.2.8 Fixácia buniek pre elektrón mikroskopickú analýzu

Bunky boli 24 hodín po transfekcii opláchnuté s PBS laboratórnej teploty a priamo na miskách boli fixované 3% roztokom glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovom roztoku pri 4°C po dobu 30 minút. Potom boli bunky zoškrabnuté z povrchu misky a spolu s fixačným roztokom premiestnené do skumavky a centrifugované 1 minútu pri 1000 g. Supernatant bol odsatý a bunečná peleta bola resuspendovaná v 1 ml fixačného roztoku a fixovaná 30 minút pri 4°C. Ďalšie spracovanie vzoriek obnášalo fixáciu pomocou 1% tetroxidu osmia, zaliatie vzoriek do epoxidovej živice AGAR 100 a prípravu ultratenkých rezov a spoločne s vlastnou elektrón mikroskopickou analýzou prebiehalo na špecializovanom pracovisku UOCHB AV ČR, s využitím transmisného elektrónového mikroskopu JOEL JEM-1010 pri pracovnom napätí 80 kV.

3.2.2.9 Modely proteínových štruktúr

Modely proteínových štruktúr boli generované serverom <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>. Po odoslaní aminokyselinovej sekvencie na uvedený server bol spätne obdržaný súbor, ktorý bol ďalej spracovaný programom PyMOL.

4 Výsledky

4.1 Charakterizácia parentálnych konštruktov pSMt-HYB a pSMt-HYB/D26A

Pre tranzientnú produkciu MMTV v ľudských embryonálnych obličkových (HEK, z angl. human embryonic kidney) 293T bunkách boli použité provírusové konštrukty pSMt-HYB a pSMt-HYB/D26A. U bunecnej línie 293T bola preukázaná produkcia infekčných častíc MMTV po stabilnej transfekcii provírusovej DNA a dokázaná bola tiež schopnosť MMTV infikovať uvedené bunky (INDÍK et al., 2005).

V experimentoch s použitím MMTV provírusového konštruktú nesúceho originálnu 5' LTR sekvenciu bola produkcia vírusových polyproteínov na hranici detegovateľnosti (ZÁBRANSKÝ et al., 2009). Plazmid pSMt-HYB (obr. 8) nesie MMTV provírusovú sekvenciu pod kontrolou heterologického M-PMV promótoru, čím dochádzalo k expresii MMTV génov na detegovateľnej úrovni. Táto modifikácia mala za následok produkciu neinfekčných častíc MMTV, pretože heterologická 5' LTR sekvencia blokuje proces reverznej transkripcie v kroku, kedy dochádza k prvému prenosu vlákna.

Plazmid pSMt-HYB/D26A bol oproti pSMt-HYB modifikovaný mutáciou v géne *pro* (obr. 8), ktorá má za následok substitúciu katalytického Asp26 v aktívnom mieste proteázy za alanín. Táto substitúcia, označená ako D26A, zbavuje vírusovú PR enzymatickej aktivity a tým pádom nedochádza k proteolytickému spracovaniu Gag polyproteínových prekurzorov (ZÁBRANSKÝ et al., 2009). V experimentoch, ktoré sa nezaobierajú proteolytickým spracovaním retrovírusových polyproteínov, ale morfogenezou a uvoľňovaním vírusových častíc z buniek, ako je tomu v tejto diplomovej práci, prináša práca so systémom bez proteázovej aktivity výhody. Predchádza sa tým predčasnej aktivácii proteázy, ktorá u MMTV môže kolidovať s tvorbou intracytoplazmatických častíc.

Tranzientná expresia Pr77^{Gag} kódovaného uvedenými konštruktmi slúžila ako štandard pre porovnanie s mutovanými druhmi Gag polyproteínových prekurzorov. Ako negatívna kontrola boli použité netransfekované bunky.

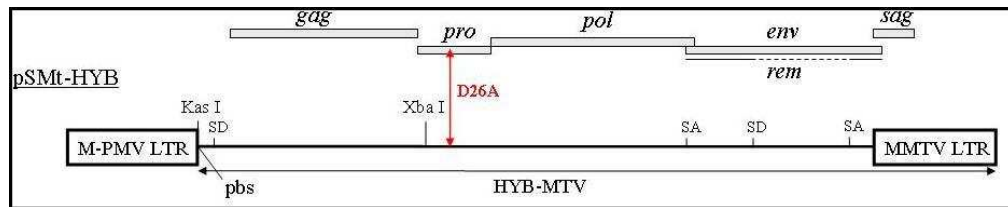
Po 1 hodine metabolického značenia bola v lyzáte buniek transfekovaných vektorom pSMt-HYB detegovaná prítomnosť Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} (obr. 9, dráha 4). Fúzny polyproteín Pr110^{Gag-Pro} je výsledkom jedného a Pr160^{Gag-Pro-Pol} dvoch ribozomálnych posunov čítacieho rámca o -1 nukleotid, ku ktorým dochádza pri translácii mRNA genómovej dĺžky s účinnosťou asi 25%, resp. 10% (MOORE et al., 1987). Ďalej bol detegovaný proteín, označený vzhľadom k svojej relatívnej

molekulovej hmotnosti určenej na základe SDS-PAGE ako p30, a taktiež nízka hladina intracelulárneho maturovaného CA proteínu. Jedná sa o špecifické produkty proteolytického štiepenia prekursorových polyproteínov vírusovou proteázou aktivovanou vo vnútri buniek, nezávisle na procese pučania (ZÁBRANSKÝ et al., 2009). Počas 15 hodín inkubácie nasledujúcej po metabolickom značení dochádzalo v bunkách k proteolytickému spracovaniu Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} pôsobením aktivovanej vírusovej proteázy za vzniku maturovaného CA proteínu (obr. 9, dráha 5). Hladina p30 poklesla a preto sa zdá, že tento proteín bol ďalej proteolyticky štiepený za vzniku maturovaného CA proteínu. V kultivačnom médiu bol 15 hodín po metabolickom značení detegovaný maturovaný CA proteín (obr. 9, dráha 6), čo svedčí o uvoľňovaní vírusových častíc z buniek.

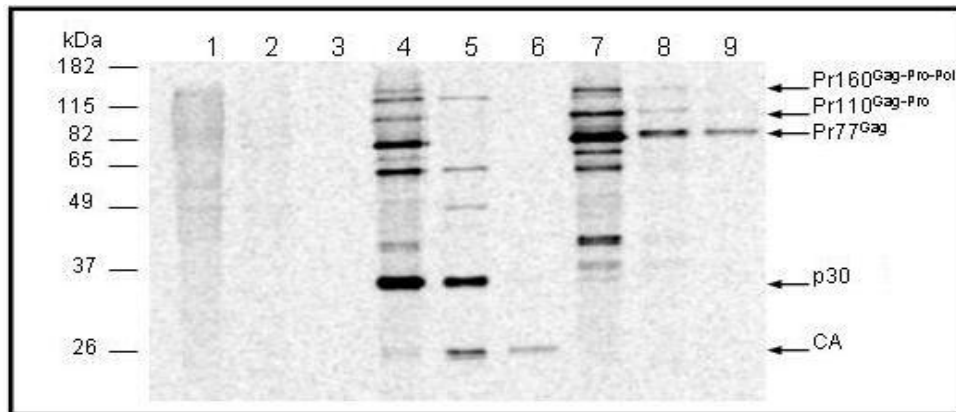
Rovnako, ako v prípade konštruktu pSMt-HYB, bola po 1 hodine metabolického značenia detegovaná v lyzáte buniek transfekovaných vektorom pSMt-HYB/D26A prítomnosť Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} (obr. 9, dráha 7). Produkty proteolytického štiepenia vírusovou proteázou podľa očakávania detegované neboli. Na rozdiel od systému s aktívnou proteázou zostávali vo vnútri buniek stabilné Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} aj počas 15 hodín (obr. 9, dráha 8). Je teda zrejmé, že inaktívacia vírusovej proteázy zvyšuje vnútrobunečnú stabilitu prekursorových polyproteínov. V inkubačnom médiu buniek exprimujúcich inaktivovanú vírusovú proteázu bol detegovaný polyproteín Pr77^{Gag} (obr. 9, dráha 9), uvoľnený z buniek vo forme nezrelých vírusových častíc.

V prípade oboch konštruktov boli detegované proteíny obsahujúce CA doménu, s relatívnou molekulovou hmotnosťou nižšou ako uvedené polyproteínové prekursorov. Pravdepodobne sa jedná o produkty internej inicializácie translácie alebo o produkty degradácie prekursorových polyproteínov.

V prípade kontrolných, netransfekovaných buniek nebol detegovaný žiaden metabolicky značený intracelulárny MMTV proteín obsahujúci CA doménu ani po 1 hodine metabolického značenia (obr. 9, dráha 1), ani po následnej 15 hodinovej inkubácii (obr. 9, dráha 2) a ani extracelulárne uvoľnený proteín charakteristický pre MMTV (obr. 9, dráha 3).



Obr. 8 Schématické znázornenie provírusového konštruktu pSMt-HYB. Zobrazená je relatívna pozícia génov *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *rem* a *sag* (hore), ako aj restričné miesta enzýmov KasI a XbaI, ktoré boli použité pri klonovaní a vyznačená je mutácia D26A (červená dvojitá šípka), ktorá v prípade konštruktu pSMt-HYB/D26A inaktívuje vírusovú proteázu. V 5' oblasti sa nachádza heterologický promotor príbuzného betaretrovírusu, Masonovho-Pfizerovho opičieho vírusu (M-PMV LTR), sekvencia HYB-MTV pochádzala z konštruktu pHYB-MTV (SHACKLEFORD a VARMUS, 1988) a na 3' konci sa nachádzala originálna dlhá koncová repetícia (MMTV LTR). SA - akceptorové miesto zostrihu, SD - donorové miesto zostrihu, pbs - primér viažúce miesto.



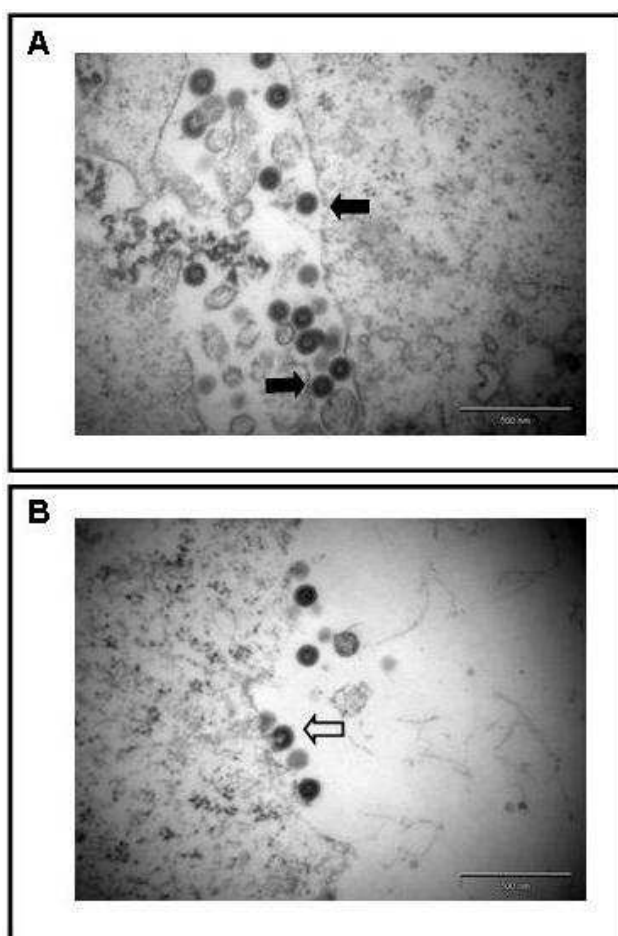
Obr. 9 Porovnanie expresie a uvoľňovania MMTV proteínov z 293T buniek v prípade s aktívnou a inaktívnou vírusovou proteázou. Proteíny v bunkách boli značené [³⁵S]-Met a [³⁵S]-Cys po dobu 1 hodiny (dráhy 1, 4 a 7), resp. značené a ďalej inkubované po dobu 15 hodín (dráhy 2, 5 a 8). Inkubačné médium bolo prefiltrované cez 0,45μm filter a vírusové častice uvoľnené počas 15 hodín boli ultracentrifugované cez 20% sacharózu (dráhy 3, 6 a 9). Vírusové proteíny boli imunoprecipitované polyklonálnym králičím anti-CA sérom, separované pomocou SDS-10%PAGE a vizualizované autoradiograficky. Porovnanie netransfekovaných buniek (dráhy 1, 2 a 3), buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A (dráhy 7, 8 a 9), ktorý kódoval inaktívovanú vírusovú proteázu. Vpravo je vyznačená poloha polyproteínov Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol}, ako aj štiepneho produktu p30 a maturovaného kapsidového (CA) proteínu. Vľavo je vyznačená relatívna molekulová hmotnosť použitého štandardu.

4.1.1 Kvantifikácia

Pre relatívnu kvantitatívnu analýzu vírusových proteínov bol použitý konštrukt s inaktívnou proteázou, ktorého výhoda spočívala v analýze jediného polyproteínového prekursoru obsahujúceho CA doménu, pričom nebolo potrebné započítavať produkty proteolytického štiepenia, akým je napr. spomínaný p30, u ktorých nebolo definitívne preukázané o ktoré Gag fragmenty sa jedná. Relatívny podiel extracelulárne uvoľnených molekúl Gag bol stanovený vzťahnutím hodnoty charakterizujúcej hladinu extracelulárne detegovaných molekúl ku hodnote, ktorá udávala celkové množstvo proteínov exprimovaných počas 1 hodiny metabolického značenia. Kvantitatívne stanovená účinnosť extracelulárneho uvoľňovania MMTV exprimovaného z parentálneho konštruktu pSMt-HYB/D26A slúžila ako štandard pre porovnanie s mutovanými druhmi MMTV.

4.1.2 Elektrónová mikroskopia

Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) ultratenkých rezov buniek tranzientne produkujúcich MMTV po transfekcii konštruktom pSMt-HYB/D26A slúžila ako štandard pre porovnanie s TEM analýzou buniek produkujúcich mutované druhy MMTV. Inaktivácia vírusovej proteázy mala zvýšiť úspešnosť pozorovania intracytoplazmatických, nezrelých vírusových častíc, nakoľko v prípade aktívnej proteázy neboli pozorované žiadne intracytoplazmatické častice a len malý počet častíc opúšťajúcich bunku (ZÁBRANSKÝ et al., 2009). Vo viacerých prezretých preparátoch boli objavené nezrelé MMTV častice pučiace na cytoplazmatickej membráne, rovnako ako nezrelé vírusové častice uvoľnené z buniek a zachytené pri fixácii (obr. 10). Morfológická stavba pozorovaných viriónov bola charakteristická pre nezrelé retrovírusové častice, fixované a pozorované metódou TEM ultratenkých rezov. Jednalo sa o sférické útvary s elektrón denzným okrajom a svetlejším vnútrom. Prekvapivo boli pozorované aj vírusové častice skladajúce sa priamo na membráne spôsobom typickým pre retrovírusy morfogenetického typu C (obr 10B).



Obr. 10. Elektrón mikroskopická analýza ultratenkých rezov 293T buniek produkujúcich nezrelé MMTV častice. Reprezentatívne snímky buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A, ktorý kodoval inaktivovanú vírusovú proteázu. Šípky ukazujú na pučiace vírusové častice (A a B), pričom bol zaznamenaný aj morfogenetický proces typu C (biela šípka, B). Zväčšenie na oboch snímkoch je 60000 násobné, úsečka vpravo dole značí 500 nm.

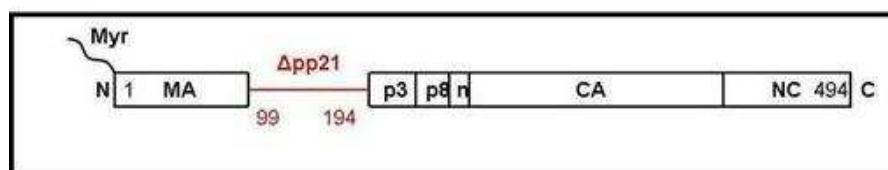
4.2 Nekanonické domény MMTV Gag polyproteínu

Produkt génu *gag* je v prípade MMTV exprimovaný ako polyproteínový prekurzor Pr77^{Gag}. Jeho vnútorná organizácia pripomína M-PMV Pr78^{Gag} a tak ako všetky retrovírusové Gag molekuly, obsahuje v smere od N-konca matrixovú (MA), kapsidovú (CA) a nukleokapsidovú (NC) doménu. V závislosti na konkrétnom retrovírusovom druhu sú v molekule Gag ďalej prítomné unikátne, tzv. nekanonické proteínové alebo peptidové domény. V prípade MMTV sú lokalizované medzi MA a CA doménou a jedná sa (v uvedenom poradí v smere od N-konca) o fosfoproteín pp21, proteín p3, proteín p8 a peptidovú doménu označovanú ako „n“ (jedná sa o sekvenciu 17 aminokyselín kódovaných v genóme, ktoré ale neboli doposiaľ izolované medzi proteínmi purifikovanými zo zrelých viriónov). Ich význam v replikačnom cykle MMTV ani úloha pri tvorbe a uvoľňovaní častíc neboli doposiaľ popísané.

Pre objasnenie úlohy nekanonických domén pri skladaní a pučaní častíc MMTV boli pripravené mutantné konštrukty provírusovej sekvenice s deléciami uvedených domén. Účinnosť uvoľňovania mutovaných častíc MMTV bola kvantitatívne porovnaná s účinnosťou uvoľňovania MMTV častíc tvorených divokým typom Pr77^{Gag} a častice tvorené mutovanými druhmi Gag boli analyzované elektrónovou mikroskopiou.

4.2.1 Fosfoproteín pp21

Fosfoproteín pp21 je jednou z proteínových domén unikátnych pre MMTV Gag polyproteín. V primárnej štruktúre prekurzoru Gag nasleduje pp21 za C-koncom MA domény (viz obr. 11). V ekvivalentnej lokalizácii ako pp21 u MMTV nachádzame pp24/16 u M-PMV. Sekvencia M-PMV pp24/16 obsahuje tetrapeptidový motív PPPY s L doménovou funkciou. Z tohto dôvodu blokuje delécia pp24/16 uvoľňovanie častíc M-PMV (YASUDA a HUNTER, 1998; GOTTWEIN et al., 2003). Úloha pp21 pri tvorbe a uvoľňovaní častíc MMTV nebola doposiaľ popísaná. Pre objasnenie úlohy pp21 v týchto procesoch bola testovaná schopnosť mutovaného prekurzoru Gag Δ pp21 vytvárať a uvoľňovať vírusové častice. Analýza bola prevedená v kontexte s aktívnou aj v s inaktivovanou vírusovou proteázou.



Obr. 11. Schématický nákres molekuly MMTV Gag s deléciou pp21 domény. Uvedená delécia je vyznačená červenou horizontálnou úsečkou. Vertikálne úsečky oddeľujúce jednotlivé proteínové domény vyznačujú štiepne miesta vírusovej proteázy a čísla udávajú poradie aminokyselínových zvyškov v smere od amino (N) po karboxylový (C) koniec. Myr - zvyšok kyseliny myristylovej, MA - matrixová, CA - kapsidová a NC - nukleokapsidová doména, pp21 – fosfoproteínová doména a krátke domény p3, p8, n.

4.2.1.1 Príprava expresného vektoru pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21

Existujúci plazmid pSMt-HYB/ Δ pp21 obsahujúci MMTV provírusovú sekvenciu s deléciou oblasti *gag* génu kódujúcou pp21, bol štiepený restriktázami KasI a XbaI. Fragment KasI-XbaI s dĺžkou 1281 bp obsahujúci uvedenú deléciu bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gely, vyizolovaný, prečistený a použitý v ligačnej reakcii spolu s 10122 bp vektorom pSMt-HYB/D26 štiepeným rovnakou dvojicou restriktáz. Ligačnou zmesou bol transformovaný kompetentný bakteriálny kmeň *E.coli* DH5 α a kultivovaný pod selekčným tlakom na rezistenciu voči ampicilínu, nakoľko uvedený plazmid kódoval rezistenciu voči ampicilínu. Plazmidová DNA z vybraných bakteriálnych klonov bola použitá pri restriktívnej analýze. Klon nesúci konštrukt s deléciou pp21 domény bol identifikovaný na základe poklesu veľkosti mutovaného 1821 bp KasI-XbaI fragmentu v porovnaní s pôvodným 2106 bp KasI-XbaI fragmentom. Delécia bola potvrdená ďalšou restriktívou analýzou použitím enzýmov StuI a NruI, ktorá sa zakladala na skutočnosti, že so sekvenciou kódujúcou pp21 doménu bolo odstránené aj jedno z dvoch StuI restriktívnych miest. Touto reakciou bola potvrdená aj prítomnosť mutácie inaktivujúcej proteázy, nakoľko mutačný zásah vedúci k tejto modifikácii vnášal do provírusovej sekvencie nové a unikátne NruI restriktívne miesto. Popísaným postupom bol pripravený konštrukt pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21 nesúci MMTV provírusovú sekvenciu s deléciou oblasti kódujúcej doménu pp21 a zároveň bodovú mutáciu v géne *pro*, inaktivujúcu vírusovú proteázu.

4.2.1.2 Vplyv delécie pp21 na tvorbu a uvoľňovanie častíc MMTV z buniek

Bunky tranzientne transfekované plazmidmi pSMt-HYB/ Δ pp21, resp. pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21 boli 24 hodín po transfekcii metabolicky značené po dobu 1 hodiny a sledovaný bol vplyv uvedenej delécie na produkciu MMTV. Ako štandard pre porovnanie s mutovaným druhom Gag Δ pp21 poslúžila tranzientná expresia Pr77^{Gag}. Ako negatívna kontrola boli použité netransfekované bunky.

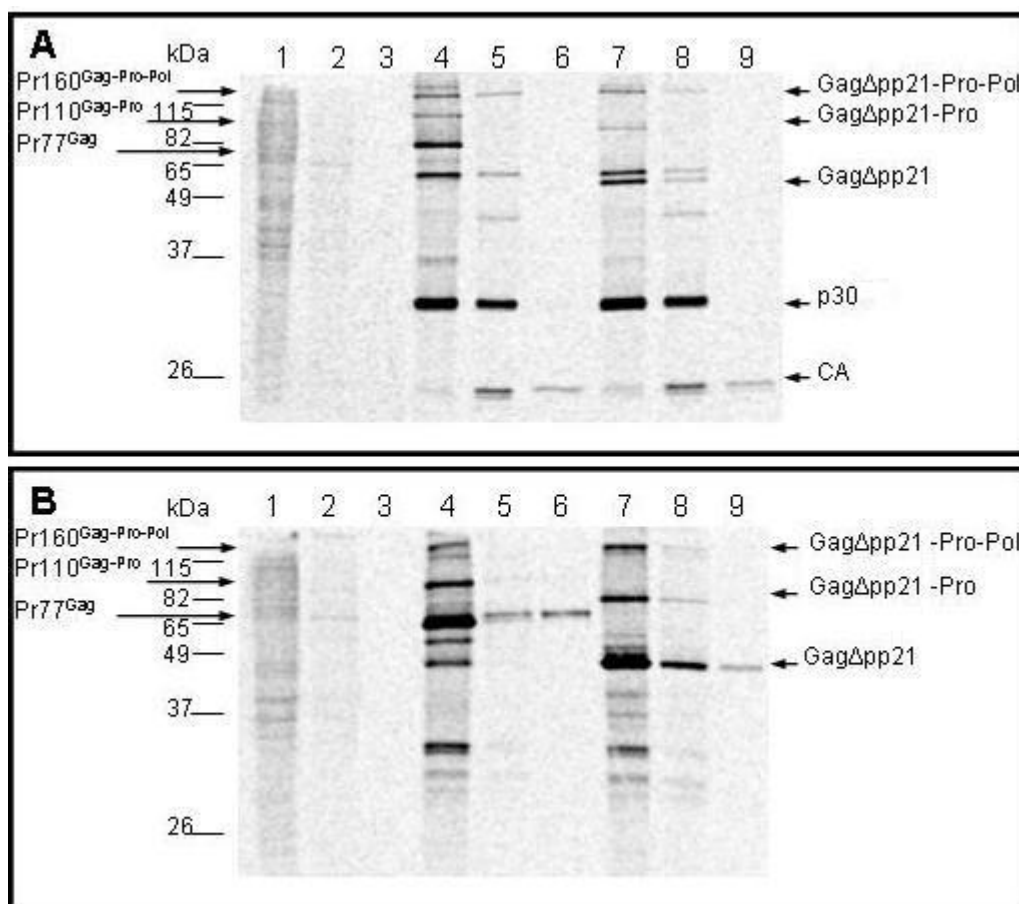
Ako vidieť na obr. 12, delécia 95 aminokyselinových zvyškov tvoriacich pp21 doménu mala za následok zníženie relatívnej molekulovej hmotnosti mutovaných polyproteínových prekursorov Gag Δ pp21, Gag Δ pp21-Pro a Gag Δ pp21-Pro-Pol. Po 1 hodine metabolického značenia bola v lyzáte buniek transfekovaných vektorom pSMt-HYB/ Δ pp21 detegovaná prítomnosť mutovaných druhov Gag Δ pp21, Gag Δ pp21-Pro a Gag Δ pp21-Pro-Pol (obr. 12A, dráha 7). Prítomný bol aj proteín p30 a na nízkej úrovni aj intracelulárny, maturovaný CA proteín (obr. 12A, dráha 8). Tieto produkty proteolytického štiepenia prekursorových polyproteínov vznikli intracelulárnym

pôsobením vírusovej proteázy. Po 15 hodinách inkubácie nasledujúcej po metabolickom značení neboli detegované mutované intracelulárne prekursorové polyproteíny. V bunkách bol naďalej prítomný p30 a maturovaný CA proteín. Počas 15 hodín došlo k proteolytickému spracovaniu prekursorových polyproteínov za vzniku nekompletne rozštiepeného fragmentu p30 a maturovaného CA proteínu. Proteín p30 bol ďalej proteolyticky štiepený za vzniku maturovaného CA proteínu. V inkubačnom médiu bol detegovaný maturovaný CA proteín (obr. 12A, dráha 9), ktorý bol z buniek uvoľnený vo forme MMTV častíc tvorených mutovými prekursorovými polyproteínmi.

Rovnako, ako v bunkách transfekovaných vektorom pSMt-HYB/ Δ pp21, boli v bunkách transfekovaných vektorom pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21 po 1 hodine metabolického značenia detegované mutované polyproteíny Gag Δ pp21, Gag Δ pp21-Pro a Gag Δ pp21-Pro-Pol (obr. 12B, dráha 7). Na rozdiel od systému s aktívnou vírusovou proteázou neboli v lyzáte buniek v prípade proteázy inaktivovanej podľa očakávania detegované proteolytické štiepne produkty p30 a CA. Po 15 hodinách inkubácie nasledujúcej po metabolickom značení bolo v buncnom lyzáte naďalej možné detegovať Gag Δ pp21 (obr. 12B, dráha 8). Polyproteín Gag Δ pp21-Pro ani (Gag Δ pp21)-Pro-Pol detegovaný nebol. V inkubačnom médiu bol detegovaný Gag Δ pp21 (obr. 12B, dráha 9) uvoľnený z buniek počas 15 hodín vo forme nezrelých vírusových častíc.

4.2.1.3 Kvantifikácia

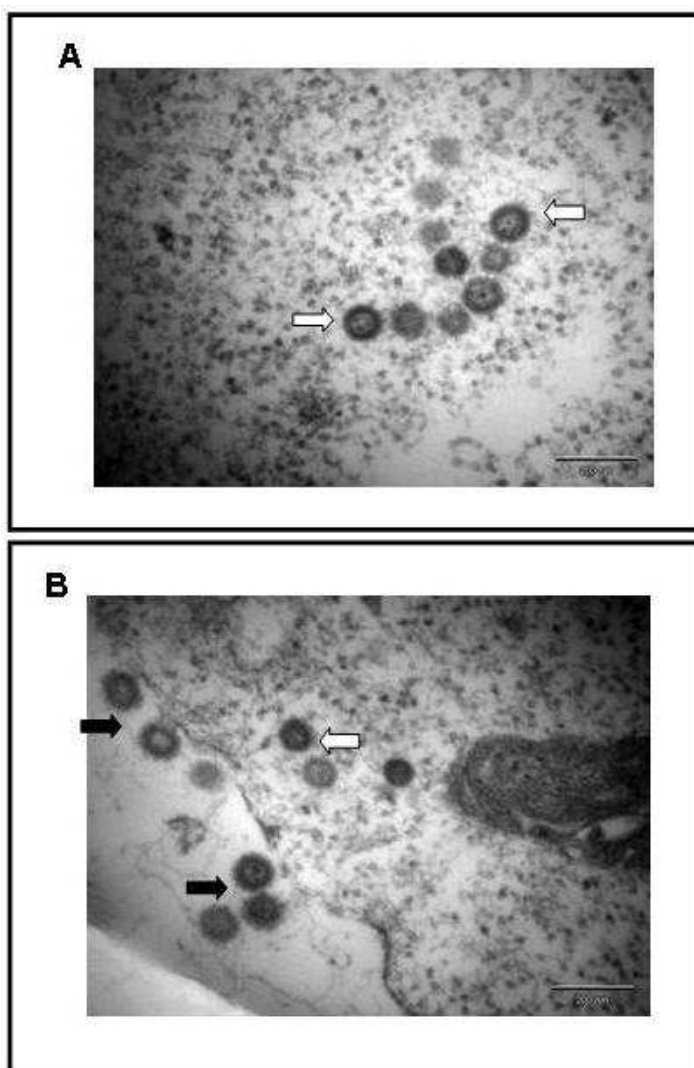
Pre relatívnu kvantitatívnu analýzu vírusových proteínov pomocou programu ImageQuant™ bol využitý konštrukt pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21 kódujúci mutovaný Gag Δ pp21 a inaktivovanú vírusovú proteázu. Účinnosť uvoľňovania nezrelých MMTV častíc tvorených mutovaným Gag Δ pp21 bola porovnaná s účinnosťou uvoľňovania častíc tvorených divokým typom Pr77^{Gag} exprimovaným po tranzientnej transfekcii buniek konštruktom pSMt-HYB/D26A. Účinnosť uvoľňovania nezrelých MMTV častíc tvorené mutovaným druhom polyproteínového prekursoru Gag Δ pp21 je redukovaná asi na polovicu v porovnaní s účinnosťou uvoľňovania častíc tvorených polyproteínom Pr77^{Gag} divokého typu (obr. 19, str. 68). Inými slovami, delécia pp21 znižuje účinnosť uvoľňovania častíc MMTV z buniek, ale prítomnosť pp21 domény Gag polyproteínu nie je nevyhnutná pre tvorbu a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek.



Obr. 12. Sledovanie vplyvu delécie pp21 domény na produkciu častíc MMTV v tranzientne transfekovaných 293T bunkách. Proteíny v bunkách boli značené [³⁵S]-Met a [³⁵S]-Cys po dobu 1 hodiny (dráhy 1, 4 a 7), resp. značené a ďalej inkubované po dobu 15 hodín (dráhy 2, 5 a 8). Inkubačné médium bolo prefiltrované cez 0,45μm filter a vírusové častice uvoľnené počas 15 hodín boli ultracentrifugované cez 20% sacharózu (dráhy 3, 6 a 9). Vírusové proteíny boli imunoprecipitované polyklonálnym králičím anti-CA sérom, separované SDS-10%PAGE a vizualizované autoradiograficky. Netransfekované bunky (dráhy 1, 2 a 3) slúžili ako negatívna kontrola. (A) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYBΔpp21 (dráhy 7, 8 a 9). (B) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/Δpp21 (dráhy 7, 8 a 9). Vpravo je vyznačená poloha mutovaných polyproteínov Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol s deléciou domény pp21, a v prípade aktívnej vírusovej proteázy aj štiepneho produktu p30 a maturovaného kapsidového (CA) proteínu. Vľavo je vyznačená poloha Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} a relatívna molekulová hmotnosť použitého štandardu.

4.2.1.4 Elektrónová mikroskopia

Pre získanie informácií o morfológii MMTV častíc tvorených GagΔpp21 bola vykonaná elektrón mikroskopická analýza ultratenkých rezov buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/Δpp21. V cytoplazme buniek boli pozorované nezrelé intracelulárne častice MMTV (obr. 13A), ako aj častice pučiace z cytoplazmatickej membrány (obr. 13B) a tiež častice uvoľnené z buniek a zachytené pri fixácii. Jednalo sa o sférické útvary s elektrón denzným okrajom a svetlejším vnútrm, čo je morfológická stavba typická pre nezrelé častice.

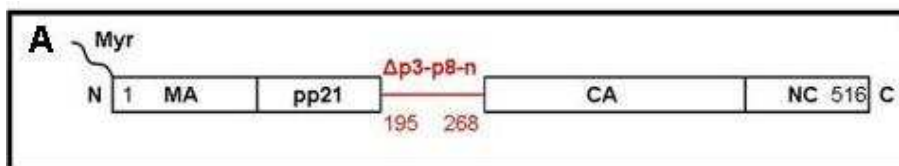


Obr. 13. Elektrón mikroskopická analýza ultratenkých rezov 293T buniek produkujúcich MMTV s deléciou pp21 domény. Reprezentatívne snímky buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ Δ pp21 ukazujú intracytoplazmatické (biele šípky, A a B) a pučiace (čierne šípky, B) nezrelé MMTV častice. Zväčšenie je 100000-násobné, úsečka vpravo dole značí 200 nm.

4.2.2 Proteínové domény p3-p8-n

Proteínové domény p3-p8-n patria k nekanonickým doménam charakteristickým pre MMTV Pr77^{Gag}. Sú lokalizované medzi C-koncom domény pp21, ďalšou z nekanonických domén MMTV, a N-koncom CA domény (viz obr. 14). Lokalizáciou v rámci Pr77^{Gag} sú domény p3-p8-n ekvivalentné p12 doméne Pr78^{Gag} u M-PMV. Sekvencia p12 domény obsahuje tzv. ISD (z angl. internal scaffold domain), ktorá je esenciálna pre intracytoplazmatickú tvorbu nezrelých M-PMV častíc.

V prípade MMTV nebola doposiaľ charakterizovaná úloha proteínových domén p3-p8-n pri tvorbe a uvoľňovaní vírusových častíc. Pre zodpovedanie tejto otázky bola testovaná schopnosť mutovaného Gag polyproteínu s deléciou domén p3-p8-n vytvárať a uvoľňovať vírusové častice z buniek.



Obr. 14. Schématický náčrt molekuly MMTV Gag s deléciou domén p3-p8-n. Uvedená delécia je vyznačená červenou horizontálnou úsečkou. Vertikálne úsečky oddeľujúce jednotlivé proteínové domény vyznačujú štiepne miesta vírusovej proteázy a čísla udávajú poradie aminokyselínových zvyškov v smere od amino (N) po karboxylový (C) koniec. Myr - zvyšok kyseliny myristylovej, MA - matrixová, CA - kapsidová a NC - nukleokapsidová doména, pp21 - fosfoproteínová doména a krátke domény p3, p8 a n.

4.2.2.1 Príprava expresného vektoru pSMt-HYB/D26A/ Δ (p3-n)

Z existujúceho plazmidu pSMt-HYB/ Δ (p3-n), ktorý obsahoval MMTV provírusovú sekvenciu s deléciou časti *gag* génu kódujúcou domény p3-p8-n, bol vyštiepený 1884 bp KasI-XbaI fragment s mutovanou *gag* sekvenciou a elektroforeticky separovaný v agarózovom gély. Po izolácii z gélu a purifikácii bol mutovaný fragment použitý v ligačnej reakcii spoločne s 10122 bp vektorom pSMt-HYB/D26A štiepeným restriktázami KasI a XbaI. Kompetentný bakteriálny kmeň *E.coli* DH5 α bol transformovaný ligačnou zmesou a kultivovaný pod selekčným tlakom ampicilínu, nakoľko uvedený plazmid kódoval ampicilínovú rezistenciu. Plazmidová DNA izolovaná z vybraných bakteriálnych klonov bola podrobená restriktívnej analýze. Identifikácia klonu nesúceho konštrukt s deléciou p3-p8-n bola založená na poklese veľkosti mutantného 1884 bp KasI-XbaI fragmentu oproti pôvodnému 2106 bp KasI-XbaI fragmentu. Delécia bola potvrdená dodatočnou restriktívou analýzou použitím enzýmov PflMI a NruI. Odstránením sekvencie kódujúcej p3 bolo odstránené aj jedno z dvoch PflMI restriktívnych miest prítomných v pôvodnej sekvencii *gag* génu. Štiepením plazmidu enzýmom NruI bola zároveň potvrdená prítomnosť mutácie D26A, nakoľko mutácia inaktivujúca proteázu zavádza do sekvencie nové a unikátne NruI restriktívne miesto. Uvedeným postupom bol vytvorený konštrukt pSMt-HYB/D26A/ Δ (p3-n) obsahujúci MMTV provírusovú sekvenciu s deléciou oblasti kódujúcej domény p3-p8-n a bodovou mutáciou v géne *pro* inaktivujúcou vírusovú proteázu.

4.2.2.2 Vplyv delécie p3-p8-n na uvoľňovanie častíc MMTV

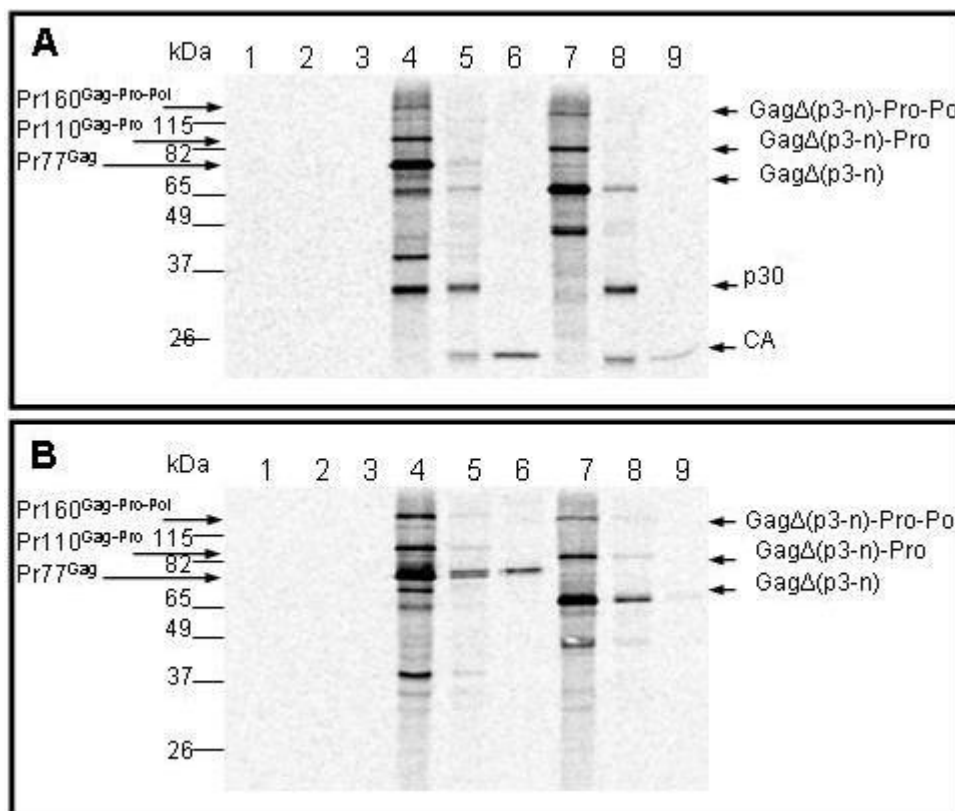
V čase 24 hodín po transfekcii plazmidmi pSMt-HYB/ Δ p3-n, resp. pSMt-HYB/D26A/ Δ p3-n boli bunky metabolicky značené po dobu 1 hodiny a sledovaný bol vplyv uvedenej delécie na produkciu MMTV. Ako štandard pre porovnanie s mutovaným druhom Gag Δ (p3-n) poslúžila tranzientná expresia Pr77^{Gag}. Ako negatívna kontrola boli použité netransfekované bunky.

Z obr. 15 je zjavné, že delécia 74 aminokyselínových zvyškov tvoriacich proteíny p3-p8-n spôsobila zníženie relatívnej molekulovej hmotnosti mutovaných polyproteínových prekursorov Gag Δ (p3-n), Gag Δ (p3-n)-Pro a Gag Δ (p3-n)-Pro-Pol. Po 1 hodine metabolického značenia bola v bunkách transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/ Δ (p3-n) detegovaná expresia polyproteínov Gag Δ (p3-n), Gag Δ (p3-n)-Pro a Gag Δ (p3-n)-Pro-Pol (obr. 15A, dráha 7). V tomto prípade, na rozdiel od parentálneho konštruktu alebo systému s deléciou pp21 domény, nebol detegovaný žiaden intracelulárny p30 ani maturovaný CA proteín. Po 15 hodinách inkubácie nasledujúcej po metabolickom značení bolo v bunecnom lyzáte stále možné detegovať nízku hladinu mutovaného prekursoru Gag Δ (p3-n). Polyproteíny Gag Δ (p3-n)-Pro a Gag Δ (p3-n)-Pro-Pol detegované neboli. V tomto čase bol v bunecnom lyzáte detegovaný proteín p30 a maturovaný CA proteín (obr. 15A, dráha 8). V literatúre sa uvádza, že v prípade MMTV proteínu p30 by sa mohlo jednať o nerozštiepený fragment p8-n-CA (OTT et al., 2003; MÜLLNER et al., 2008). Výsledky získané deléciou domén p3-p8-n však túto možnosť vylučujú, nakoľko bol proteín p30 bol prítomný aj po odstránení uvedených domén. Na základe relatívnej molekulovej hmotnosti asi 30 kDa by sa dalo predpokladať, že sa jedná o nerozštiepený fragment CA-NC s teoretickou molekulovou hmotnosťou 37 kDa.

Popísaná situácia, kedy proteolytické štiepne produkty CA a p30 nie sú prítomné po 1 hodine, ale až po 15 hodinách by sa dala vysvetliť alternáciou pôvodného štiepneho miesta na rozhraní domén n-CA novo vzniknutým spojením pp21-CA domén. Táto mutovaná sekvencia je ako substrát pre MMTV proteázu stále vhodná, o čom svedčí vznik maturovaného CA proteínu počas 15 hodín. Nie je však substrátom natoľko ideálnym ako bola definovaná pôvodná sekvencia na rozhraní n-CA (MENÉNDEZ-ARIAS et al., 1992), pretože produkty proteolytického štiepenia obsahujúce CA doménu (proteín p30 a maturovaný CA proteín) sa neštandardne objavujú až po 15 hodinách a nie sú detegované už po 1 hodine metabolického značenia tak, ako v prípade parentálneho konštruktu, alebo konštruktu s deléciou pp21 domény. V inkubačnom médiu bol detegovaný maturovaný CA proteín (obr. 15A, dráha 9), uvoľnený z buniek počas 15 hodín vo forme vírusových častíc.

Podobne, ako v bunkách transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/ Δ (p3-n), boli v bunkách transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ Δ (p3-n) po 1 hodine metabolického značenia detegované polyproteíny Gag Δ (p3-n), Gag Δ (p3-n)-Pro a Gag Δ (p3-n)-Pro-Pol (obr. 15B, dráha 7). Podľa očakávania neboli prítomné proteolytické štiepne produkty p30 a CA. Po 15 hodinách inkubácie nasledujúcej po

metabolickom značení bolo v bunecnom lyzáte naďalej možné detegovať GagΔ(p3-n) polyproteín (obr. 15B, dráha 8), jeho hladina však oproti situácii spred 15 hodín poklesla. Polyproteín GagΔ(p3-n)-Pro ani GagΔ(p3-n)-Pro-Pol detegovaný nebol. V inkubačnom médiu bola v tomto čase detegovaná len nízka hladina GagΔ(p3-n) prekurzoru (obr. 15B, dráha 9).



Obr. 15. Sledovanie vplyvu delécie domén p3-p8-n na produkciu častíc MMTV v tranzientne transfekovaných 293T bunkách. Proteíny v bunkách boli značené [³⁵S]-Met a [³⁵S]-Cys po dobu 1 hodiny (dráhy 1, 4 a 7), resp. značené a ďalej inkubované po dobu 15 hodín (dráhy 2, 5 a 8). Inkubačné médium bolo prefiltrované cez 0,45μm filter a vírusové častice uvoľnené počas 15 hodín boli ultracentrifugované cez 20% sacharózu (dráhy 3, 6 a 9). Vírusové proteíny boli imunoprecipitované polyklonálnym králičím anti-CA sérom, separované SDS-10%PAGE a vizualizované autoradiograficky. Netransfekované bunky (dráhy 1, 2 a 3) slúžili ako negatívna kontrola. (A) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSmt-HYB (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSmt-HYBΔ(p3-n) (dráhy 7, 8 a 9). (B) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSmt-HYB/D26A (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSmt-HYB/D26A/Δ(p3-n) (dráhy 7, 8 a 9). Vpravo je vyznačená poloha mutovaných polyproteínov Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol s deléciou domén p3-p8-n, a v prípade aktívnej vírusovej proteázy aj štiepneho produktu p30 a maturovaného kapsidového (CA) proteínu. Vľavo je vyznačená poloha Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} a relatívna molekulová hmotnosť použitého štandardu.

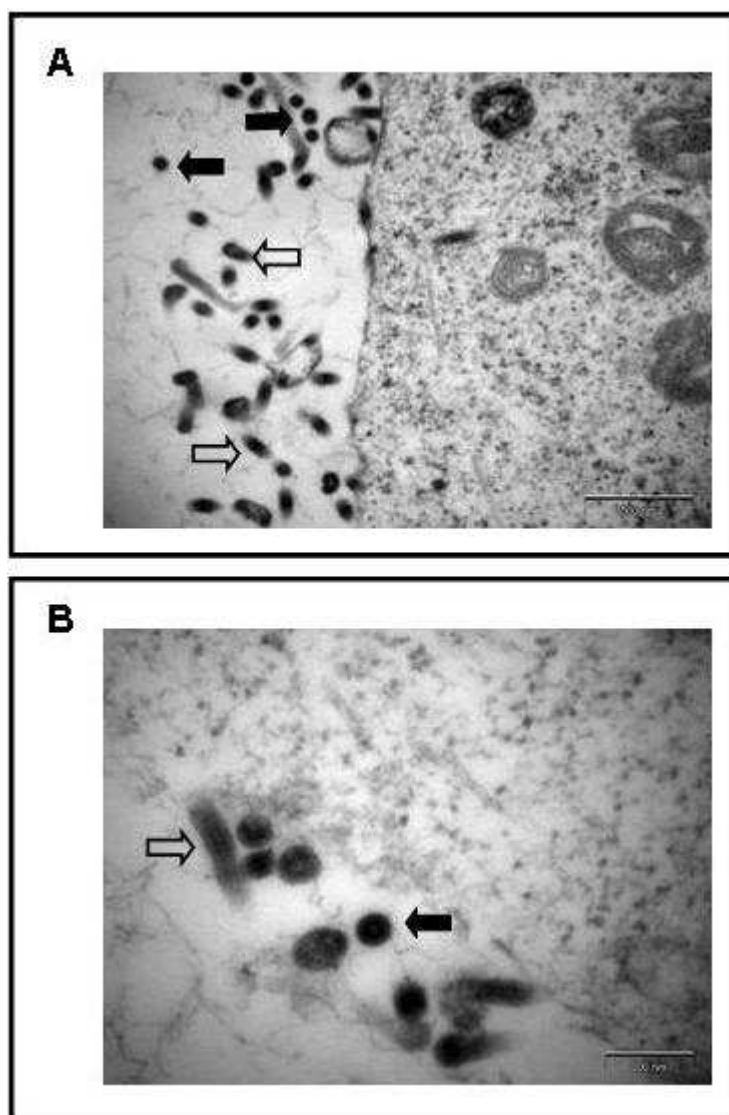
4.2.2.3 Kvantifikácia

Pre zodpovedanie otázky, nakoľko je oblasť p3-p8-n domén potrebná v procese uvoľňovania častíc MMTV, bola prevedená kvantitatívna analýza spôsobom popísaným v kapitole 3.1.1. Nezrelé častice MMTV tvorené polyproteínom GagΔp3-n boli uvoľňované z buniek s účinnosťou rovnou asi jednej pätine účinnosti uvoľňovania častíc tvorených polyproteínom Pr77^{Gag} divokého typu (obr. 19, str. 68). Inak povedané,

delécia domén p3-p8-n významne znižuje účinnosť uvoľňovania nezrelých častíc MMTV z buniek, ale prítomnosť domén p3-p8-n nie je absolútne nevyhnutná pre tento proces.

4.2.2.4 Elektrónová mikroskopia

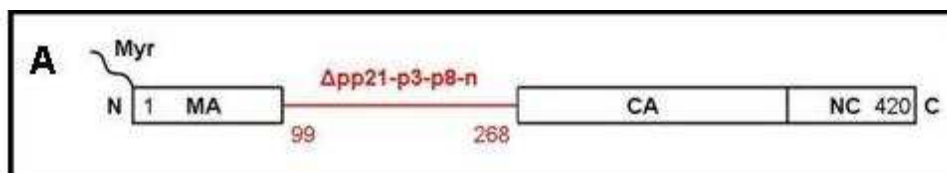
Za účelom bližšej charakterizácie defektu v produkcii MMTV častíc, spôsobeného deléciou proteínových domén p3-p8-n, bola prevedená elektrón mikroskopická analýza ultra tenkých rezov buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ Δ (p3-n). V menšej miere v cytoplazme a vo väčšej miere uvoľnené z buniek a zachytené pri fixácii boli pozorované mutované častice MMTV tvorené polyproteínom Gag Δ (p3-n). Zastúpené boli sférické útvary, ale viaceré z pozorovaných častíc, mali defektný tvar (obr. 16).



Obr. 16. Elektrón mikroskopická analýza ultratenkých rezov 293T buniek produkujúcich MMTV s deléciou domén p3-p8-n. Reprezentatívne snímky buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ Δ (p3-n) ukazujú uvoľnené sférické častice (čierne šípky) a defektné útvary (prázdna šípka). Zväčšenie (A) 60000-krát, (B) 100000-násobné, úsečka vpravo dole značí 500 nm (A), resp. 200 nm (B).

4.2.3 Minimálny MMTV Gag polyproteínový prekurzor

Odstránenie všetkých nekanonických domén MMTV Gag polyproteínu dáva vzniknúť minimálnemu Gag prekurzoru, ktorý je tvorený len doménami MA-CA-NC (obr. 17), ktoré sa nachádzajú v ekvivalentnej pozícii u všetkých druhov retrovírusov. Testovaná bola schopnosť minimálneho Gag polyproteínu vytvárať a uvoľňovať vírusové častice z buniek.



Obr. 17. Schématický náčrt molekuly MMTV Gag s deléciou domén pp21-p3-p8-n. Uvedená delécia je vyznačená červenou horizontálnou úsečkou. Vertikálne úsečky oddeľujúce jednotlivé proteínové domény vyznačujú štiepne miesta vírusovej proteázy a čísla udávajú poradie aminokyselínových zvyškov v smere od amino (N) po karboxylový (C) koniec. Myr - zvyšok kyseliny myristylovej, MA - matrixová, CA - kapsidová a NC - nukleokapsidová doména, pp21 - fosfoproteínová doména a krátke domény p3, p8 a n.

4.2.3.1 Príprava expresných vektorov pSMt-HYB/ Δ (pp21-n) a pSMt-HYB/D26A/ Δ (pp21-n)

Použitím mutagénneho reverzného priméru Mt-dpp-n-R a priameho priméru Mt-Kas-F bol polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) odstránený úsek MMTV provírusovej sekvencie kódujúci domény pp21-p3-p8-n. Ako templát poslúžil plazmid pSMtv nesúci MMTV gag gén. Oblasť 3'-konca primeru Mt-dpp-n-R bola komplementárna k 3'-koncu sekvencie kódujúcej MA doménu. Oblasť 5'-konca tohto primeru bola komplementárna k 5'-koncu sekvencie kódujúcej CA doménu, kde sa nachádzalo aj SfcI restričné miesto. Produkt PCR dlhý 491 bp bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gély, vyizolovaný, purifikovaný a štiepený restriktázou PstI (na 5'-konci) a následne restriktázou SfcI (3'-koniec). Takto opracovaný 347 bp fragment bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gély, izolovaný, prečistený a následne použitý v trojcestnej ligačnej reakcii spoločne s 4209 bp vektorom pSMtv štiepeným enzýmami XbaI a PstI, spolu s doplnkovým 1122 bp fragmentom SfcI-XbaI pochádzajúcim zo štiepenia plazmidu pSMtv. Enzým SfcI, ktorý bol použitý pri opracovaní PCR produktu, štiepil sekvenciu pSMtv na 7 miestach a preto bola zvolená klonovacia stratégia využívajúca aditívneho fragmentu k mutovanému inzertu a vektoru. Ligačnou zmesou transformovaný kompetentný kmeň *E.coli* DH5 α bol inkubovaný pod selekčným tlakom na ampicilínovú rezistenciu, nakoľko vektor kódoval rezistenciu voči ampicilínu. Plazmidová DNA vytvoreného konštruktu pSMtv Δ (pp21-n) bola izolovaná z vybraných bakteriálnych klonov a podrobená restričnej analýze enzýmami KasI

a XbaI. Oproti pôvodnému 2106 bp KasI-XbaI fragmentu mal mutovaný KasI-XbaI fragment dĺžku 1596 bp. Delečná mutácia bola ďalej potvrdená restriktčnou analýzou dvojicou enzýmov StuI a PflMI. Restriktčné miesto PflMI sa nachádzalo v sekvencii kódujúcej pp21 domény a StuI restriktčné miesto sa nachádzalo v sekvencii kódujúcej p3 domény. Preto boli odstránením oblasti génu *gag* kódujúcej domény pp21-p3-p8-n odstránené aj miesta štiepenia restriktázami StuI a PflMI.

Uvedeným postupom bol pripravený konštrukt pSMt Δ (pp21-n) s deléciou oblasti *gag* génu kódujúcou úsek pp21-p3-p8-n domén, pričom oblasť kódujúca CA domény bola pripojená za oblasť kódujúcu MA domény, a to bezo zmeny čítacieho rámca. Polyproteínový produkt kódovaný týmto konštruktom je možné označiť ako minimálny MMTV Gag tvorený doménami MA-CA-NC. Tieto domény nachádzame v rovnakej relatívnej pozícii u Gag prekurzorov všetkých retrovírusov napriek tomu, že ich aminokyselinová sekvencia nie je výraznejšie konzervovaná. V primárnej štruktúre minimálneho polyproteínu Gag došlo k pripojeniu C-konca MA domény za N-koniec CA domény. Vo finále bola *gag* génová sekvencia obsahujúca uvedenú deléciu vyštiepená z plazmidu pSMtv Δ (pp21-n) restriktázami KasI a XbaI a 1596 bp fragment bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gély. Po izolácii z gélu a purifikácii bol použitý v ligačnej reakcii s 10122 bp pSMt-HYB, resp. pSMt-HYB/D26A vektorom štiepeným enzýmami KasI a XbaI. Tento postup bol nevyhnutný, nakoľko sekvencia pSMt-HYB, resp. pSMt-HYB/D26A neposkytovala dostatok unikátnych restriktčných miest potrebných pre uvedené klonovanie a využiť sa dali restriktčné miesta KasI a XbaI približne ohraničujúce sekvenciu génu *gag*. Ligačnými zmesami bol transformovaný kompetentný kmeň *E.coli* DH5 α a baktérie boli kultivované pod selekčným tlakom ampicilínu. Výsledné plazmidové konštrukty, označené ako pSMt-HYB/ Δ (pp21-n), resp. pSMt-HYB/D26A/ Δ (pp21-n) boli overené sekvenačnou analýzou.

4.2.3.2 Minimálny Gag v procese tvorby a uvoľňovania MMTV častíc

Bunky boli tranzientne transfekované plazmidmi pSMt-HYB/ Δ (pp21-n), resp. pSMt-HYB/D26A/ Δ (pp21-n) a 24 hodín po transfekcii boli po dobu 1 hodiny metabolicky značené. Sledovaná bola schopnosť minimálneho polyproteínu Gag (minGag) vytvárať a uvoľňovať MMTV častice z buniek. Bunky tranzientne transfekované konštruktmi pSMt-HYB, resp. pSMt-HYB/D26A slúžili ako štandard pre porovnanie a netransfekované bunky boli negatívnou kontrolou.

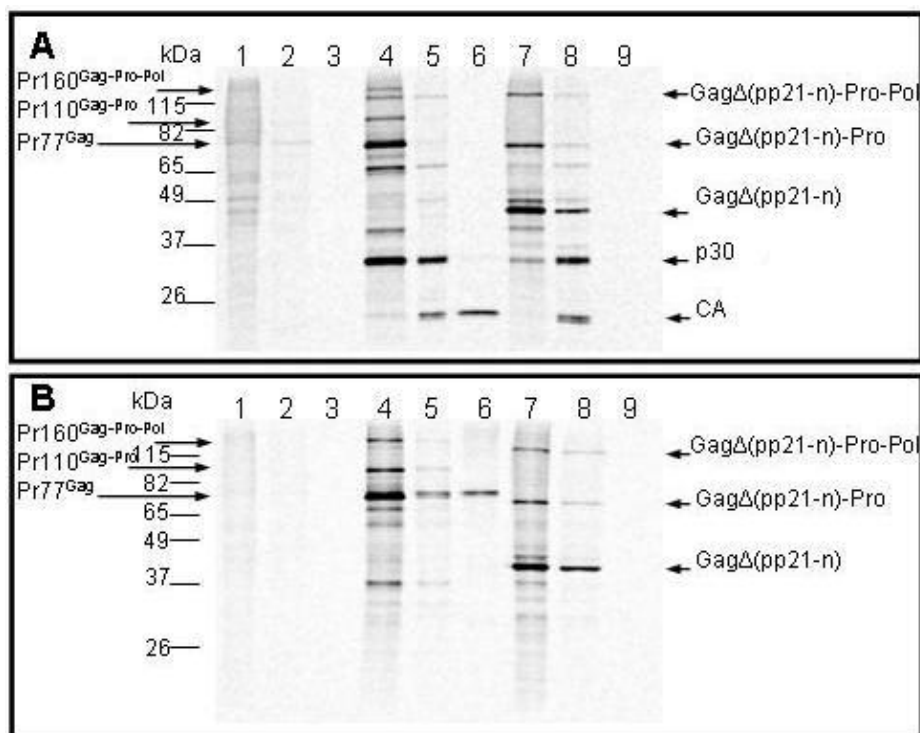
Deléciou domén pp21-p3-p8-n bolo odstránených 170 aminokyselinových zvyškov. Výsledný minGag polyproteínový prekurzor tvorený MA-CA-NC pozostával

zo 420 aminokyselinových zvyškov. Podľa očakávania došlo v porovnaní s pôvodnými molekulami Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} k zníženiu relatívnej molekulovej hmotnosti prekursorov minGag, minGag-Pro a minGag-Pro-Pol (obr. 18). V lyzáte buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/ Δ (pp21-n) boli po 1 hodine metabolického značenia detegované mutované polyproteínové prekursorové minGag, minGag-Pro a minGag-Pro-Pol, spolu s nízkou hladinou p30 (obr 18A, dráha 7), ktorý vznikol pôsobením intracelulárne aktivovanej vírusovej proteázy. Maturovaný CA proteín detegovaný nebol. V porovnaní so systémom pSMt-HYB bola za rovnakých podmienok detegovaná nižšia hladina p30 a naopak, vo vyššie popísanom prípade s deléciou nekanonických domén p3-p8-n, nebol za týchto podmienok detegovaný žiaden p30. Ponúka sa nasledujúce vysvetlenie. Pri úplnej delícii nekanonických domén došlo k zániku rozhrania n-CA domén a k pripojeniu C-konca MA domény k N-koncu CA domény. Týmto bolo nahradené prirodzené štiepne miesto MMTV proteázy na N-konci CA domény, ktoré je zo všetkých štiepných miest prítomných v Gag prekuzore pre proteázu z kinetického hľadiska najvýhodnejšie (MENÉNDEZ-ARIAS et al., 1992). Pravdepodobným dôsledkom je nižšia účinnosť proteolytického spracovania minGag prekuzoru v porovnaní s Pr77^{Gag}. V porovnaní s Gag Δ (p3-n), kde bol C-koniec pp21 domény pripojený k N-koncu CA domény je účinnosť vyššia, pretože štiepne miesto na C-konci MA domény je kineticky vhodnejším substrátom pre MMTV proteázu ako štiepne miesto na C-konci pp21 domény (MENÉNDEZ-ARIAS et al., 1992). Po 15 hodinách inkubácie nasledujúcej po metabolickom značení bolo v bunečnom lyzáte stále možné detegovať polyproteíny minGag a v menšej miere aj fúzne produkty minGag-Pro a minGag-Pro-Pol (obr. 18A, dráha 8). Intracelulárna aktivita vírusovej proteázy prispela počas 15 hodín ku zníženiu hladiny uvedených prekursorov a ku zvýšeniu hladiny štiepneho produktu p30 a vzniku maturovaného CA proteínu. V inkubačnom médiu nebol detegovaný žiaden extracelulárny CA proteín (obr. 18A, dráha 9) uvoľnený z buniek vo forme vírusových častíc.

V lyzáte buniek transfekovaných plazmidom pSMt-HYB/D26A/ Δ (pp21-n) boli rovnako ako v systéme s inaktivovanou proteázou detegované po 1 hodine metabolického značenia molekuly minGag, minGag-Pro a minGag-Pro-Pol (obr. 18B, dráha 7). Produkty proteolytického štiepenia vírusovou proteázou neboli podľa očakávania detegované ani v tomto čase, ani po 15 hodinách. Po 15 hodinách inkubácie nasledujúcej po metabolickom značení boli opäť detegované prekursorové polyproteíny minGag, minGag-Pro a minGag-Pro-Pol (obr. 18B, dráha 8). V inkubačnom médiu

nebol detegovaný žiaden MMTV proteínový produkt obsahujúci CA doménu a extracelulárne uvoľnený vo forme vírusových častíc (obr. 18C, dráha 9).

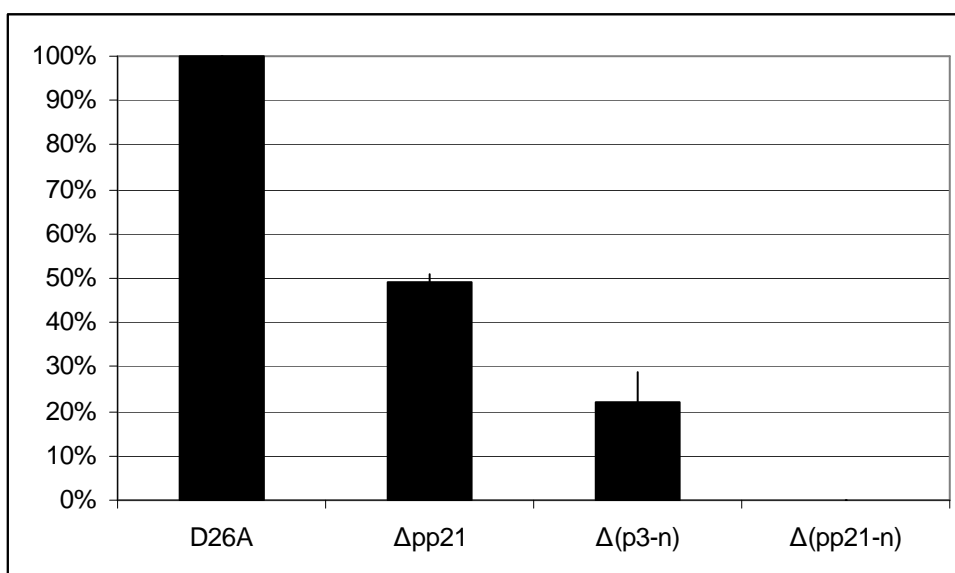
Nepřítomnosť CA proteínu, resp. minGag uvoľneného z buniek do inkubačného média vo forme vírusových častíc môže znamenať, že minGag polyproteín (spolu s minGag-Pro a minGag-Pro-Pol) nie sú schopné tvorby vírusových častíc, alebo že vírusové častice potenciálne vytvorené uvedenými prekurzormi nie sú účinne uvoľňované z buniek. Častice tvorené prekurzormi GagΔpp21, resp. GagΔ(p3-n) boli z buniek uvoľňované a preto sa ani jedna z nekanonických domén nejaví ako absolútne nevyhnutná pre tvorbu a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek. V prípade minimálneho Gag polyproteínového prekurzoru naznačujú dáta získané z experimentov s metabolickým značením na poruchu v tvorbe častíc, alebo na blokáciu v ich uvoľňovaní z buniek. Pre potvrdenie tohto predpokladu bola vykonaná elektrón mikroskopická analýza buniek exprimujúcich minGag.



Obr. 18. Sledovanie vplyvu delécie domén pp21-p3-p8-n na produkciu častíc MMTV v tranzientne transfekovaných 293T bunkách. Proteíny v bunkách boli značené [³⁵S]-Met a [³⁵S]-Cys po dobu 1 hodiny (dráhy 1, 4 a 7), resp. značené a ďalej inkubované po dobu 15 hodín (dráhy 2, 5 a 8). Inkubačné médium bolo prefiltrované cez 0,45μm filter a vírusové častice uvoľnené počas 15 hodín boli ultracentrifugované cez 20% sacharózu (dráhy 3, 6 a 9). Vírusové proteíny boli imunoprecipitované polyklonálnym králičím anti-CA sérom, separované SDS-10%PAGE a vizualizované autoradiograficky. Netransfekované bunky (dráhy 1, 2 a 3) slúžili ako negatívna kontrola. (A) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYBΔ(pp21-n) (dráhy 7, 8 a 9). (B) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/Δ(pp21-n) (dráhy 7, 8 a 9). Vpravo je vyznačená poloha mutovaných polyproteínov Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol s deléciou domén pp21-p3-p8-n, a v prípade aktívnej vírusovej proteázy aj štiepneho produktu p30 a maturovaného kapsidového (CA) proteínu. Vľavo je vyznačená poloha Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} a relatívna molekulová hmotnosť použitého štandardu.

4.2.3.3 Elektrónová mikroskopia

Z dôvodu absencie extracelulárne uvoľneného, mutovaného polyproteínového prekursoru Gag Δ (pp21-p3-p8-n) nebola vykonaná kvantifikácia. Aby bolo možné určiť, v ktorej fáze životného cyklu MMTV sa prejavuje defekt spôsobený deléciou nekanonických domén Gag polyproteínu, bola prevedená transmisná elektrón mikroskopická analýza ultratenkých rezov buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ Δ (pp21-n). V žiadnom z prezretých preparátov neboli nájdené vnútrobunecné častice MMTV, ani častice pučiace na cytoplazmatickej membráne (dáta neuvedené). Negatívny výsledok nasvedčuje, že absencia extracelulárne uvoľnených MMTV častíc tvorených minGag prekursorom pozorovaná pomocou metabolického značenia je spôsobená neschopnosťou minGag polyproteínu vytvárať vírusové častice.



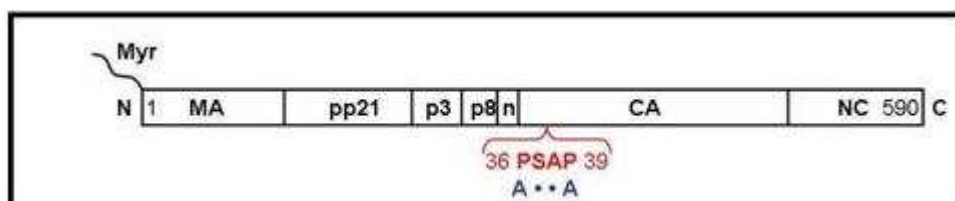
Obr. 19. Relatívna účinnosť uvoľňovania nezrelých častíc mutovaných druhov MMTV. Účinnosť uvoľňovania bola stanovená pre každý mutovaný druh MMTV porovnaním množstva extracelulárne uvoľnených molekúl Gag s celkovým množstvom molekúl Gag exprimovaných počas metabolického značenia. Účinnosť uvoľňovania mutovaných druhov MMTV s inaktivovanou proteázou a s deléciou pp21 domény (Δ pp21), domén p3-p8-n (Δ p3-n), resp. všetkých nekanonických domén (Δ pp21-n) bola porovnaná s účinnosťou uvoľňovania MMTV s inaktivovanou proteázou (D26A). Experimenty boli opakované dva krát a uvedený je priemer nameraných dát s uvedenou odchýlkou.

4.3 Identifikácia a testovanie motívov s potenciálnou L doménovou funkciou

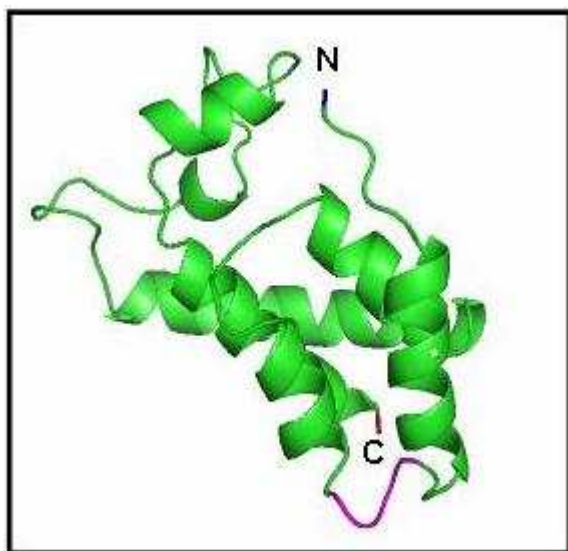
Podľa výsledkov delečnej analýzy nekanonických domén MMTV Gag polyproteínu sa javí pravdepodobné, že neobsahujú sekvenciu s L doménovou funkciou, ktorá je nevyhnutná pre účinné uvoľňovanie vírusových častíc z buniek. Preto by bolo možné očakávať lokalizáciu L doménového motívu v zvyšnej časti sekvencie Gag. Inšpekcia primárnej štruktúry MMTV Gag polyproteínového prekursoru skutočne priniesla na základe sekvenčnej homológie s doposiaľ definovanými L doménovými motívmi dvoch kandidátov na túto funkciu. Prvým je Pro-Ser-Ala-Pro (PSAP) motív, lokalizovaný medzi 36. - 39. aminokyselinovým zvyškom CA domény (obr. 20 a 21). Druhým motívom, ktorý sa dostal do centra pozornosti z hľadiska potenciálnej L doménovej funkcie, je Tyr-Pro-Ile-Trp-Leu (YPIWL) sekvencia lokalizovaná medzi 81. a 85. aminokyselinovým zvyškom MA domény (obr. 24 a 25).

4.3.1 Motív PSAP a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek

Motív PSAP (obr. 20 a 21) je sekvenčne homologický s P(T/S)AP konsenzom L doménovej sekvencie prítomnej u HIV-1 p6^{Gag} (GÖTTLINGER et al., 1991; HUANG et al., 1995), M-PMV pp16^{Gag} (GOTTWEIN et al., 2003) a MA proteínu HTLV-1 (BOUAMR et al., 2003; WANG et al., 2004). Lokalizácia p6^{Gag} je u HIV-1 i C-terminálna, M-PMV pp16^{Gag} je lokalizovaný medzi MA a CA doménou molekuly Gag a matrixová časť Gag molekuly HTLV-1 je N-terminálna. Uvedené literárne zdroje popisujú mutáciu jediného z prolínových zvyškov ohraničujúcich L doménovú sekvenciu P(T/S)AP ako letálnu pre uvoľňovanie retrovírusových častíc z buniek. Treba pripomenúť, že potenciálna lokalizácia L doménovej sekvencie v CA oblasti molekuly Gag by bola doposiaľ bezprecedentná. Prípadná L doménová funkcia PSAP motívu u MMTV bola preskúmaná mutačnou analýzou aminokyselinových zvyškov Pro36 a Pro39.



Obr. 20. Schématický nákres molekuly MMTV Gag. Vyznačený je motív PSAP (červená) a zavedené alanínové substitúcie (modrá). Úsečky oddeľujúce jednotlivé proteínové domény vyznačujú štiepne miesta vírusovej proteázy a čísla udávajú poradie aminokyselinových zvyškov v smere od amino (N) po karboxylový (C) koniec. Myr - zvyšok kyseliny myristylovej, MA - matrixová, CA - kapsidová a NC - nukleokapsidová doména, pp21 - fosfoproteínová doména, krátke domény p3, p8, n.



Obr. 21. Stužkový model aminoterminálnej domény MMTV kapsidového proteínu. Jedná sa o predikciu na základe homológie s vyriešenou štruktúrou aminoterminálnej domény kapsidového proteínu príbuzného betaretrovírusu, ktorým je Jaagsiekte ovčí retrovírus (MORTUZA et al., 2009). Model bol vytvorený porovnaním aminokyselinových sekvencií s využitím serveru <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/> a programu PyMOL. Modrou farbou je vyznačený aminokonec (N), červenou karboxylový koniec (C) a fialovou je vyznačený úsek tvorený sekvenciou PSAP.

4.3.1.1 Príprava expresných vektorov pSMt-HYB/ASAA a pSMt-HYB/D26A/ASAA

Pomocou oligonukleotidom riadenej mutagenézy boli substituované prolínové zvyšky 36 a 39 CA proteínu za zvyšky alanínové (substitúcia P36A-P39A). Zmena kodónov pre Pro36 a Pro39 v sekvencii kódujúcej kapsidový proteín za kodóny pre alanín sa uskutočnila pomocou PCR s mutagénnym priamym primerom F-Nco-ASAA zavádzajúcim uvedené mutácie a komplementárnym reverzným primerom Mt-2433-R. Templátom bol plazmid pSMtv nesúci MMTV *gag* gén. Amplifikovaný úsek s očakávanými mutáciami bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gély, izolovaný, purifikovaný a opracovaný restriknými endonukleázami NcoI a XhoI. Výsledný 965 bp fragment a doplnkový 315 bp fragment PflMI-NcoI vyštiepený zo sekvencie pSMtv bol použitý v ligačnej reakcii spolu s plazmidom pSMtv, z ktorého bol vyštiepený pôvodný 1280 bp PflMI-XhoI fragment a vytvorený bol konštrukt pSMtv/ASAA. Použitá klonovacia stratégia s doplnkovým fragmentom bola zvolená na základe možností, ktoré poskytovali unikátne restrikné miesta dostupné v sekvencii pSMtv.

Fragment KasI-XbaI kódujúci P36A-P39A substitúciu, vyštiepený zo sekvencie pSMtv/ASAA bol použitý v ligačnej reakcii spolu plazmidom pSMt-HYB, resp. pSMt-HYB/D26A, z ktorých bol vyštiepený pôvodný KasI-XbaI fragment. Týmto postupom bol pripravený konštrukt pSMt-HYB/ASAA, resp. pSMt-HYB/D26A/ASAA. Použitie plazmidu pSMtv/ASAA pre vytvorenie mutácie a následné preklonovanie génu *gag* bolo nevyhnutné, pretože plazmidy pSMt-HYB a pSMt-HYB/D26A neposkytovali vhodné unikátne restrikné miesta. Ligačnými zmesami boli transformované kompetentné bunky *E.coli* DH5 α a kultivované pod selekčným tlakom ampicilínu, nakoľko uvedené plazmidy kodovali ampicilínovú rezistenciu. Vybrané kolónie boli

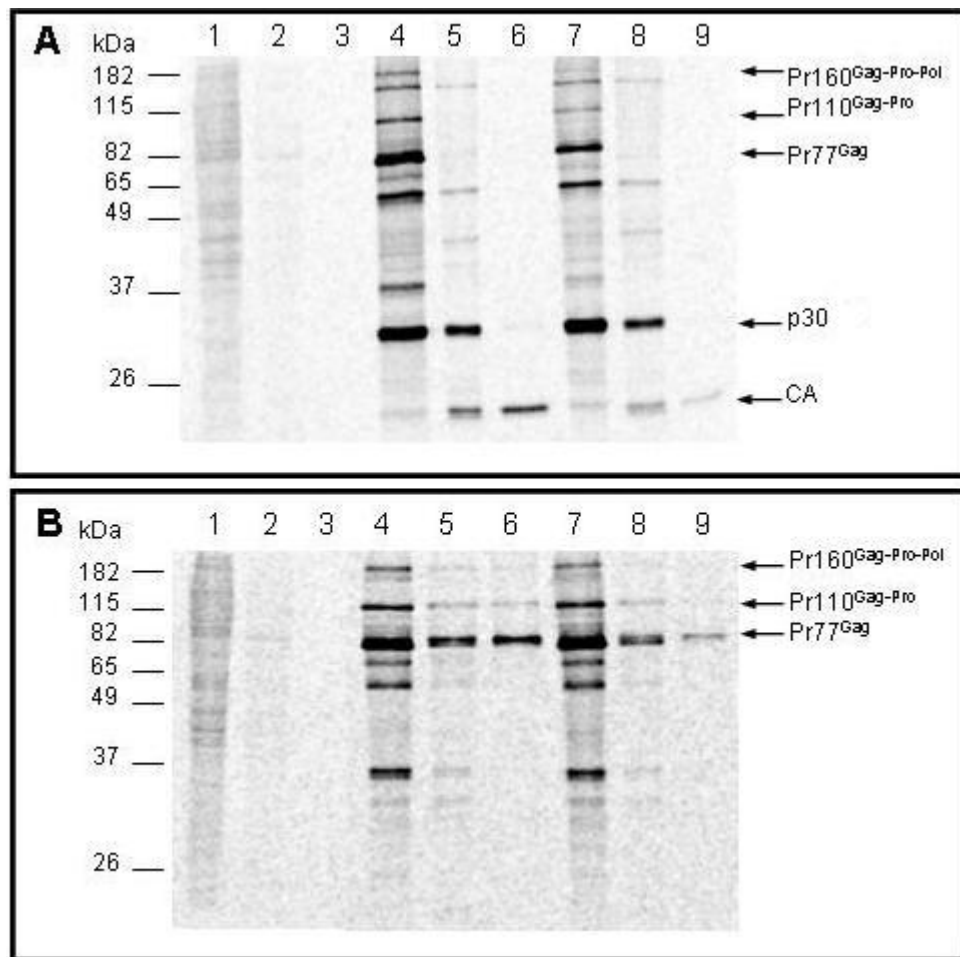
použitie pre izoláciu plazmidovej DNA a prítomnosť mutácií kódujúcich P36A-P39A substitúcie bola potvrdená sekvenačnou analýzou, ktorou bola zároveň overená sekvencia vzniknutá počas PCR.

4.3.1.2 Vplyv P36A-P39A substitúcie v sekvencii CA proteínu na tvorbu a uvoľňovanie častíc MMTV

Bunky tranzientne transfekované konštruktmi pSMt-HYB/ASAA, resp. pSMt-HYB/D26A/ASAA boli 24 hodín po transfekcii metabolicky značené po dobu 1 hodiny. Sledovaný bol vplyv substitúcie CA zvyškov P36A-P39A na uvoľňovanie MMTV častíc z buniek. Ako štandard pre porovnanie slúžila produkcia MMTV v bunkách tranzientne transfekovaných konštruktmi pSMt-HYB, resp. pSMt-HYB/D26A a ako negatívna kontrola netransfekované bunky.

Po 1 hodine metabolického značenia bola v lyzáte buniek transfekovaných plazmidom pSMt-HYB/ASAA detegovaná expresia Pr77^{Gag} a fúzyých polyproteínových prekurzorov Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} (obr. 22A, dráha 7). V bunečnom lyzáte bol prítomný aj proteín p30 a maturovaný CA proteín, produkty proteolytického štiepenia prekurzorových polyproteínov intracelulárne aktivovanou vírusovou proteázou. V čase 15 hodín po metabolickom značení neboli detegované žiadne intracelulárne polyproteíny Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} ani Pr160^{Gag-Pro-Pol}. Intracelulárna hladina p30 počas 15 hodín poklesla a hladina maturovaného, intracelulárneho CA proteínu naopak vzrástla (obr. 22A, dráha 8). Popísaná situácia je výsledkom intracelulárneho pôsobenia vírusovej proteázy, ktorá štiepi prekurzorové proteíny na maturovaný CA proteín, pravdepodobne cez intermediát p30. Pokles intracelulárnej hladiny prekurzorových polyproteínov je čiastočne spôsobený aj ich uvoľnením z buniek vo forme vírusových častíc, nakoľko bol v inkubačnom médiu detegovaný maturovaný CA proteín (obr. 22A, dráha 9).

V systéme s inaktivovanou vírusovou proteázou boli v bunečnom lyzáte 1 hodinu po metabolickom značení detegované polyproteínové prekurzory Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} (obr. 22B, dráha 7). Produkty proteolytického štiepenia prekurzorových polyproteínov vírusovou proteázou podľa očakávania detegované neboli ani v tomto čase, ani po následnej 15 hodinovej inkubácii. Po 15 hodinách inkubácie nasledujúcich po metabolickom značení boli v bunečnom lyzáte naďalej detegované polyproteíny Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} (obr. 22B, dráha 8). V inkubačnom médiu bol identifikovaný Pr77^{Gag} uvoľnený z buniek vo forme nezrelých častíc MMTV počas 15 hodín (obr. 22B, dráha 9).



Obr. 22. Sledovanie vplyvu substitúcie P36A-P39A v CA proteíne na produkciu častíc MMTV v tranzientne transfekovaných 293T bunkách. Proteíny v bunkách boli značené [³⁵S]-Met a [³⁵S]-Cys po dobu 1 hodiny (dráhy 1, 4 a 7), resp. značené a ďalej inkubované po dobu 15 hodín (dráhy 2, 5 a 8). Inkubačné médium bolo prefiltrované cez 0,45µm filter a vírusové častice uvoľnené počas 15 hodín boli ultracentrifugované cez 20% sacharózu (dráhy 3, 6 a 9). Vírusové proteíny boli imunoprecipitované polyklonálnym králičím anti-CA sérom, separované SDS-10%PAGE a vizualizované autoradiograficky. Netransfekované bunky (dráhy 1, 2 a 3) slúžili ako negatívna kontrola. (A) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/ASAA (dráhy 7, 8 a 9). (B) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ASAA (dráhy 7, 8 a 9). Vpravo je vyznačená poloha polyproteínov Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} a v prípade aktívnej vírusovej proteázy aj štiepneho produktu p30 a maturovaného kapsidového (CA) proteínu. Vľavo je vyznačená relatívna molekulová hmotnosť použitého štandardu.

4.3.1.3 Kvantifikácia

V prípade Pr77^{Gag} polyproteínov nesúcich P36A-P39A substitúciu v CA doméne bola zaznamenaná redukcia v uvoľňovaní vírusových častíc z buniek. Pre určenie miery redukcie v účinnosti uvoľňovania nezrelých viriónov MMTV, ku ktorej došlo vplyvom mutácie PSAP motívu, bola prevedená kvantitatívna analýza spôsobom popísaným v kapitole 3.1.1.

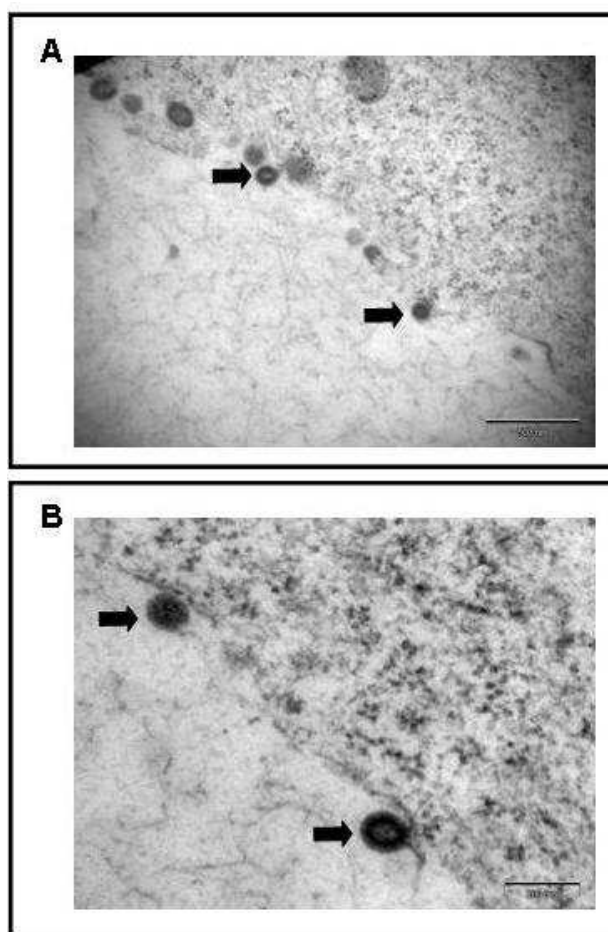
Účinnosť uvoľňovania nezrelých MMTV častíc tvorených mutovaným druhom polyproteínového prekursoru so substitúciou P36A-P39A je redukovaná asi na polovicu v porovnaní s účinnosťou uvoľňovania častíc pozosávajúcich z polyproteínu Pr77^{Gag}

divokého typu (obr 28). Pozorovaná miera redukcie v uvoľňovaní MMTV častíc spôsobená mutáciou PSAP motívu nie je postačujúca na definovanie L doménovej mutácie. Kritériá pre prisúdenie L doménovej funkcie určitej aminokyselinovej sekvencii sú prísnejšie. V literatúre sa uvádza úplná blokácia v uvoľňovaní retrovírusových častíc spôsobená mutačným zásahom do primárnej štruktúry L domén a tento defekt spôsobuje už mutácia jediného prolínového zvyšku tvoriaceho tetrapeptid P(T/S)AP (HUANG et al., 1995).

4.3.1.4 Elektrónová mikroskopia

Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) ultratenkých rezov buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ASAA a produkujúcich vírusové častice bola vykonaná za účelom bližšie preskúmať popísaný defekt spôsobený P36A-P39 substitúciou v CA proteíne MMTV.

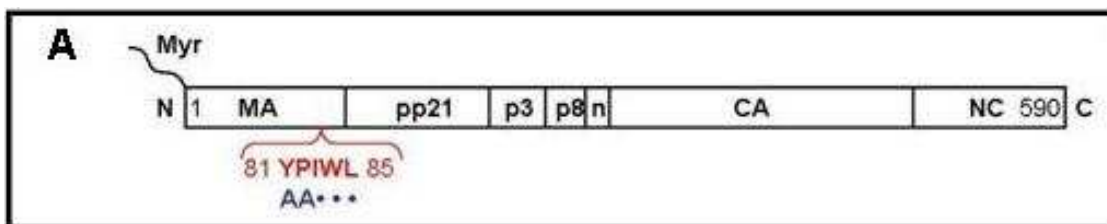
V prezretých preparátoch boli pozorované nezrelé častice MMTV pučiace na cytoplazmatickej membráne (obr. 23). Žiadna anomália zaznamenaná nebola.



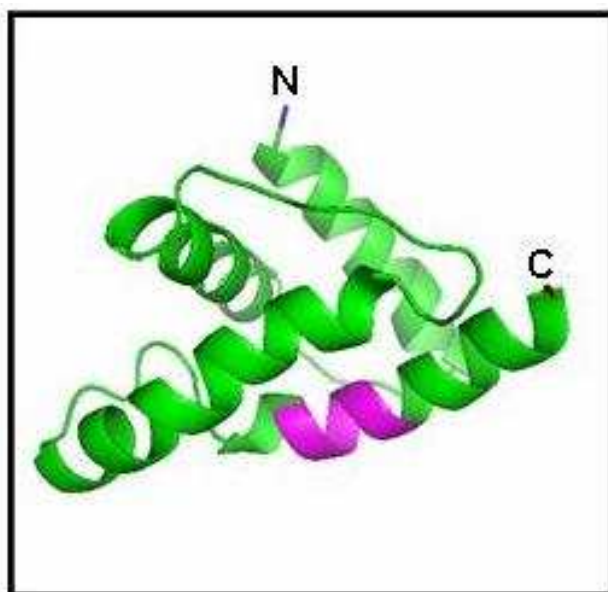
Obr. 23. Elektrón mikroskopická analýza ultratenkých rezov 293T buniek produkujúcich MMTV s mutáciou P36A-P39A v CA proteíne. Reprezentatívne snímky buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/ASAA ukazujú nezrelé MMTV častice pučiace na buncnej membráne (čierne šípky). (A) Zväčšenie 50000-krát, (B) 100000-krát úsečka vpravo dole značí (A) 500 nm, resp. (B) 200 nm.

4.3.2 Motív YPIWL a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek

Motív YPIWL (obr. 24 a 25) spĺňa podmienky konsenzu sekvencie YP(x)_nL (kde x predstavuje ľubovoľnú aminokyselinu a n ≤ 3), ktorý zabezpečuje L doménovú funkciu u viacerých retrovírusov. V prípade EIAV je esenciálnym pre uvoľňovanie vírusových častíc motív YPDL, ktorý je súčasťou N-terminálnej p9^{Gag} domény (PARENT et al., 1995; PUFFER et al., 1997). Uvoľňovanie častíc HIV-1 je závislé na intaktnom motíve PTAP lokalizovanom v C-terminálnej p6^{Gag} doméne, pričom C-proximálne nachádzame motív YPLTSL so sekundárnou L doménovou funkciou (STRACK et al., 2003). Na rozhraní MA a p12^{Gag} domény MLV leží motív YPAL, ktorý spolu s motívom PSAP zvyšuje účinnosť uvoľňovania vírusových častí závislú na intaktnom PPPY motíve (SEGURA-MORALES et al., 2005). Jediným doposiaľ známym retrovírusom, u ktorého je sekvencia s L doménovou funkciou lokalizovaná v MA doméne je HTLV-1 a jedná sa o sekvencie PPPY a PTAP (WANG et al., 2004). Pre objasnenie prípadnej úlohy sekvencie YPIWL v životnom cykle MMTV boli aminokyselinové zvyšky Tyr81 a Pro82 podrobené mutačnej analýze.



Obr. 24. Schématický náčrt molekuly MMTV Gag. Vyznačený je motív YPIWL (červená) a zavedené alanínové substitúcie (modrá). Úsečky oddeľujúce jednotlivé proteínové domény vyznačujú štiepne miesta vírusovej proteázy a čísla udávajú poradie aminokyselinových zvyškov v smere od amino (N) po karboxylový (C) koniec. Myr - zvyšok kyseliny myristylovej, MA - matrixová, CA - kapsidová a NC - nukleokapsidová doména., pp21 - fosfoproteínová doména, krátke domény p3, p8, n.



Obr. 25. Stužkový model matrixového proteínu MMTV. Jedná sa o predikciu na základe homológie s vyriešenou štruktúrou matrixového proteínu príbuzného betaretrovírusu, ktorým je Masonov-Pfizerov opičí vírus (CONTE et al., 1997). Model bol vytvorený porovnaním aminokyselinových sekvencií s využitím serveru <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/> a programu PyMOL. Modrou farbou je vyznačený aminokonec (N), červenou karboxylový koniec (C) a fialovou je vyznačený úsek tvorený sekvenciou YPIWL.

4.3.2.1 Príprava expresných vektorov pSMt-HYB/AAIWL a pSMt-HYB/D26A/AAIWL

Metódou oligonukleotidom riadenej mutagenézy bola zavedená substitúcia v sekvencii kódujúcej Tyr81 a Pro82 zvyšky MA domény za alanín (substitúcia Y81A-P82A). Prevedené boli dve oddelené PCR. Ako templát slúžil v oboch reakciách plazmid pSMtv obsahujúci MMTV *gag* gén. V prvej PCR bol použitý priamy primer Mt-Kas-F a reverzný mutagénny primer YP/AA-Pst-R. Vzniknutý PCR produkt bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gély, izolovaný, purifikovaný a štiepený restriktčnými endonukleázami KasI a AcuI. V druhej PCR bol použitý mutagénny priamy primér YP/AA-Pst-F a reverzný primér pSMtv-Xho-R. Vzniknutý PCR produkt bol separovaný elektroforézou v agarózovom gély, vyizolovaný, prečistený a štiepený enzýmami AcuI a PflMI. Uvedené mutagénne priméry si boli navzájom komplementárne a okrem uvedených mutácií zavádzali do mutovanej sekvencie aj nové PstI restriktčné miesto, ktoré bolo použité pri restriktčnej analýze. Pôvodný 765 bp úsek sekvencie MMTV *gag* génu v plazmide pSMtv bol vyštiepený enzýmami KasI a PflMI a vzniknutý 5423 bp vektor bol použitý v trojcestnej ligačnej reakcii spolu s 435 bp KasI-AcuI PCR fragmentom a 330 bp AcuI-PflMI PCR fragmentom. Ligačnou zmesou bol transformovaný kompetentný kmeň *E.coli* DH5 α a kultivovaný pod selekčným tlakom ampicilínu. Z vybraných klonov bola izolovaná plazmidová DNA a podrobená restriktčnej analýze. Klon kódujúci Y81A-P82A mutáciu bol identifikovaný na základe špecifického 287 bp fragmentu PstI-PstI, ktorý vznikol vďaka novému PstI restriktčnému miestu prítomnému v mutovanej, ale nie v pôvodnej sekvencii *gag* génu. Provírusová sekvencia kódujúca požadovanú mutáciu bola vyštiepená z vektoru pSMtv/AAIWL enzýmami KasI a XbaI, 2106 bp fragment bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gély a použitý v ligačnej reakcii spolu s vektorom pSM-HYB a pSMt-HYB/D26A, z ktorých bol vyštiepený pôvodný KasI-XbaI úsek. Ligačnou zmesou bol transformovaný kompetentný bakteriálny kmeň DH5 α a kultivovaný pod selekčným tlakom ampicilínu. Výsledné konštrukty pSMt-HYB/AAIWL, resp. pSMt-HYB/D26A/AAIWL boli midipreparované a overené sekvenačnou analýzou.

4.3.2.2 Vplyv Y81A-P82A mutácie na tvorbu a uvoľňovanie častíc MMTV

V čase 24 hodín po transfekcii konštruktmi pSMt-HYB/AAIWL, resp. pSMt-HYB/D26A/AAIWL boli bunky metabolicky značené po dobu 1 hodiny a sledovaný bol vplyv substitúcie Y81A-P82A v sekvencii MA proteínu na uvoľňovanie MMTV častíc z buniek.

Po 1 hodine metabolického značenia boli v lyzáte buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/AAIWL detegované polyproteíny Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} (obr. 26A, dráha 7) V prítomnosti aktívnej vírusovej proteázy bol už po 1 hodine identifikovaný intracelulárny proteín p30 ako aj nízka hladina maturovaného CA proteínu. V priebehu 15 hodín inkubácie nasledujúcej po metabolickom značení došlo v bunkách exprimujúcich aktívnu vírusovú proteázu k úplnému proteolytickému spracovaniu prekursorových molekúl Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} za vzniku p30 maturovaného CA proteínu, ktorého hladina oproti stavu pred 15 hodín stúpila. U proteínu p30 naopak došlo k poklesu. Pozoruhodné je zistenie, že v inkubačnom médiu nebol detegovaný žiaden metabolicky značený, maturovaný CA proteín uvoľnený počas 15 hodín z buniek vo forme vírusových častíc.

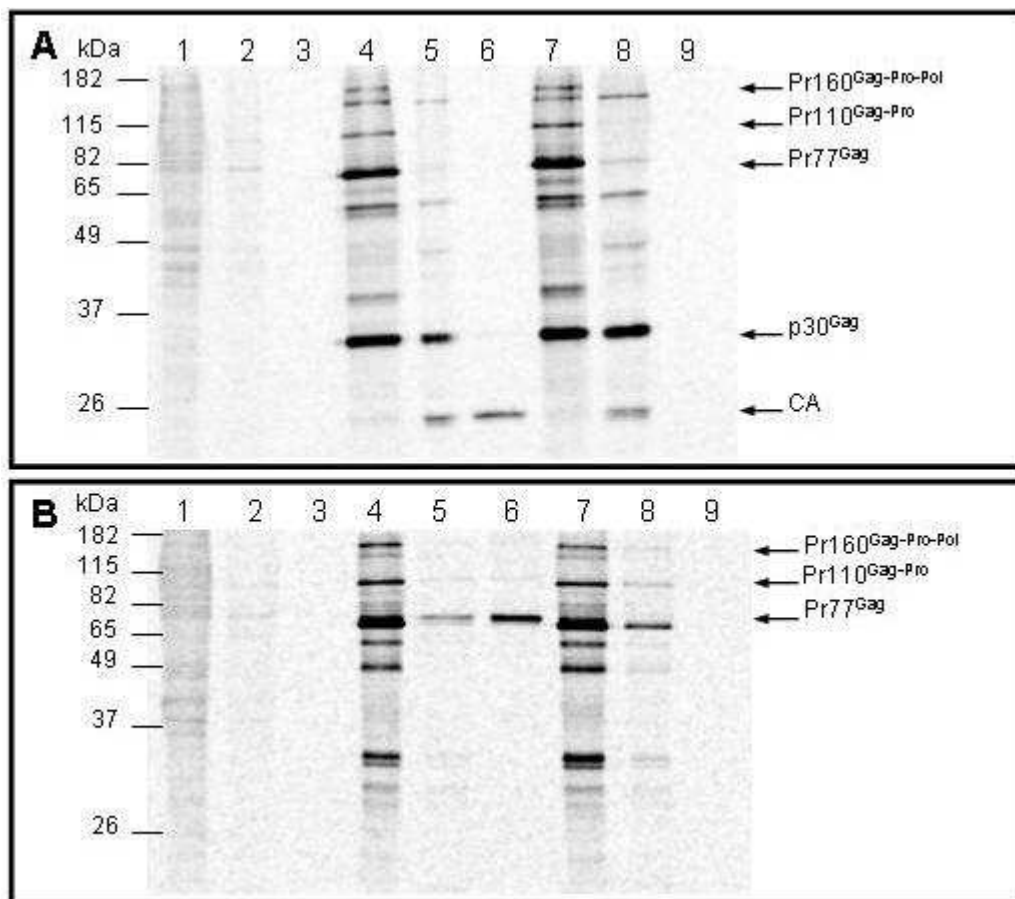
V bunkách transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/AAIWL boli po 1 hodine metabolického značenia detegované, rovnako ako u konštruktu s aktívnou vírusovou proteázou, polyproteíny Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} (obr. 26B, dráha 7). Produkty proteolytického štiepenia prekursorových polyproteínov vírusovou proteázou podľa očakávania detegované neboli ani po 1 hodina metabolického značenia, ani po 15 hodinách nasledujúcej inkubácie. Po 15 hodinách bolo v bunkách naďalej možné detegovať uvedené vírusové polyproteínové prekursorovú (obr.26B, dráha 8). V inkubačnom médiu nebol detegovaný Pr77^{Gag} uvoľnený z buniek vo forme vírusových častíc počas 15 hodín (obr. 26B, dráha 9).

Popísané skutočnosti naznačujú, že aminokyselinové zvyšky MA domény Tyr81 a Pro82 sú nevyhnutné pre uvoľňovanie MMTV častíc z buniek, nakoľko substitúcia Y81A-P82A blokuje tento proces. Za týchto okolností, kedy neboli extracelulárne produkované žiadne MMTV proteíny nebol dôvod prevádzať kvantitatívnu analýzu. Pre bližšie určenie defektu spôsobeného Y81A-P82A substitúciou bola prevedená analýza ultratenkých rezov buniek exprimujúcich provírusový konštrukt pSMt-HYB/D26A/AAIWL transmisnou elektrónovou mikroskopiou.

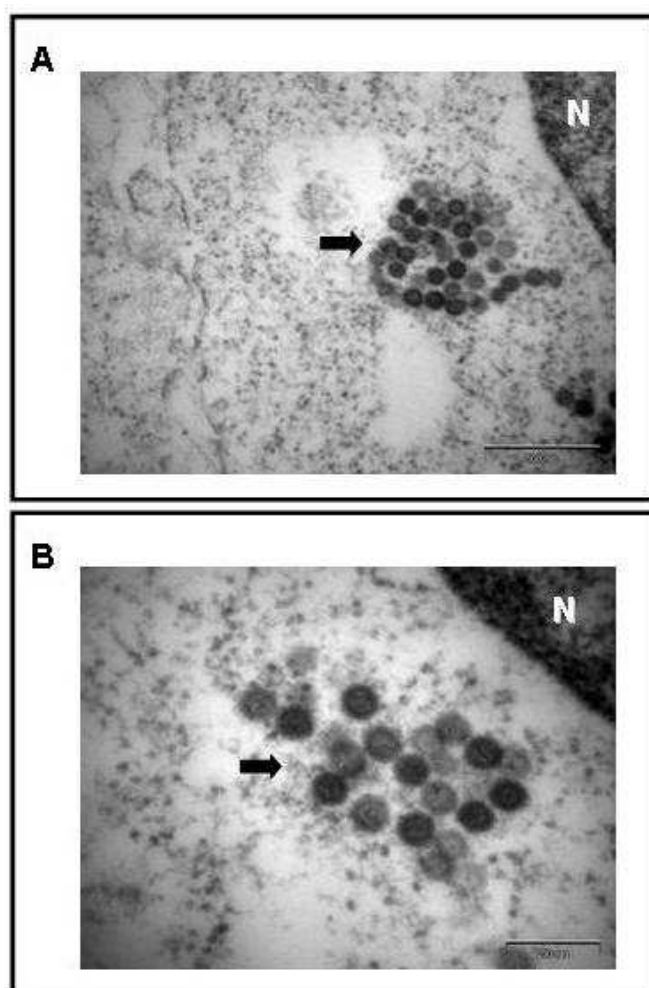
4.3.2.3 Elektrónová mikroskopia

Pre bližšiu špecifikáciu blokácie v uvoľňovaní MMTV častíc z buniek zapríčinenú substitúciou Y81A-P82A v MA doméne Pr77^{Gag} boli ultratenké rezy buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/AAIWL analyzované transmisnou elektrónovou mikroskopiou. V preparátoch boli pozorované zhľuky nezrelých, intracelulárnych častíc MMTV lokalizovaných v blízkosti buncného jadra (obr. 27). Je možné predpokladať, že sa jedná o pericentriolárnu oblasť, ktorá bola

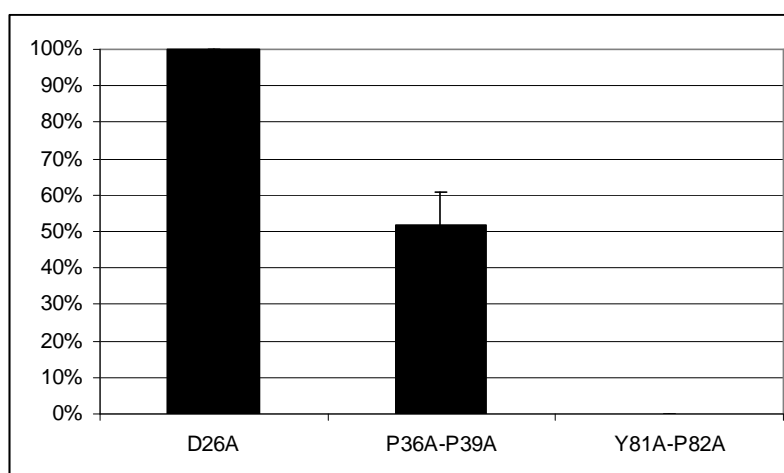
definovaná ako miesto intracytoplazmatickej tvorby nezrelých retrovírusových kapsíd (SFAKIANOS et al., 2003; SFAKIANOS a HUNTER 2003). Z uvedeného pozorovania vyplýva, že sa nejedná o defekt spôsobný stratou L doménovej funkcie, ktorá je manifestovaná viriónmi zachytenými na bunčnom povrchu, neschopnými opustiť bunku, ale o blokáciu vo vnútrobunčnom transporte nezrelých častíc z miesta ich vzniku k plazmatickej membráne.



Obr. 26. Sledovanie vplyvu substitúcie Y81A-P82A v MA proteíne na produkciu častíc MMTV v tranzientne transfekovaných 293T bunkách. Proteíny v bunkách boli značené [³⁵S]-Met a [³⁵S]-Cys po dobu 1 hodiny (dráhy 1, 4 a 7), resp. značené a ďalej inkubované po dobu 15 hodín (dráhy 2, 5 a 8). Inkubačné médium bolo prefiltrované cez 0,45µm filter a vírusové častice uvoľnené počas 15 hodín boli ultracentrifugované cez 20% sacharózu (dráhy 3, 6 a 9). Vírusové proteíny boli imunoprecipitované polyklonálnym králičím anti-CA sérom, separované SDS-10%PAGE a vizualizované autoradiograficky. Netransfekované bunky (dráhy 1, 2 a 3) slúžili ako negatívna kontrola. (A) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/AWIWL (dráhy 7, 8 a 9). (B) Porovnanie buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A (dráhy 4, 5 a 6) a buniek transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/AWIWL (dráhy 7, 8 a 9). Vpravo je vyznačená poloha polyproteínov Pr77^{Gag}, Pr110^{Gag-Pro} a Pr160^{Gag-Pro-Pol} a v prípade aktívnej vírusovej proteázy aj štiepneho produktu p30 a maturovaného kapsidového (CA) proteínu. V ľavo je vyznačená relatívna molekulová hmotnosť použitého štandardu.



Obr. 27. Elektrón mikroskopická analýza ultratenkých rezov 293T buniek produkujúcich MMTV s mutáciou Y81A-P82A v MA proteíne. Reprezentatívne snímky buniek tranzientne transfekovaných konštruktom pSMt-HYB/D26A/AIWL ukazujú zhluky nezrelých MMTV častíc (čierne šípky) v blízkosti bunecného jadra (N). (A) Zväčšenie 50000-krát, (B) 100000-krát, úsečka vpravo dole značí (A) 500 nm, resp. (B) 200 nm.



Obr. 28. Relatívna účinnosť uvoľňovania nezrelých častíc mutovaných druhov MMTV. Účinnosť uvoľňovania bola stanovená pre každý mutovaný druh MMTV porovnaním množstva extracelulárne uvoľnených molekúl Gag s celkovým množstvom molekúl Gag exprimovaných počas metabolického značenia. Účinnosť uvoľňovania mutovaných druhov MMTV s inaktivovanou proteázou a substitúciou P36A-P39A, resp. Y81A-P82A bola porovnaná s účinnosťou uvoľňovania MMTV s inaktivovanou proteázou (D26A). Experimenty boli opakované dva krát a uvedený je priemer nameraných dát s uvedenou odchýlkou.

4.4 Interakcia Gag polyproteínov s bunecnými proteínmi

Neskorá fáza životného cyklu retrovírusov zahŕňa viacero dejov sprostredkovaných proteín - proteínovými interakciami. Homotypické interakcie medzi štruktúrnymi polyproteínmi sú základom pre tvorbu vírusových častíc, interakcie medzi komponentmi viriónov a bunecnými proteínmi sú esenciálne pri uvoľňovaní nezrelých kapsíd z cytoplazmatickej membrány. Retrovírusy pri svojej ceste von z bunky uzurpujú hostiteľskú mašinériu vakuolárneho triedenia proteínov. Blokácia týchto bunecných dráh narušuje uvoľňovanie retrovírusových častíc z buniek. Popísané boli priame interakcie viacerých retrovírusových Gag polyproteínov, závislé na L doménovej sekvencii, s bunecnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4, ktoré sú za normálnych okolností zapojené v dráhach vakuolárneho triedenia proteínov (zhrnuté v MORITA a SUNDQUIST, 2004; DEMIROV a FREED, 2004).

4.4.1 Ľudský betaretrovírus HBRV

Možnosť interakcie medzi Gag polyproteínom ľudského betaretrovírusu (HBRV, z angl. *human betaretrovirus*) a bunecnými proteínmi ALIX, TSG101, resp. NEDD4 bola prešetrená využitím kvasinkového dvojhybridového systému Matchmaker 3 (Clontech Laboratories, Inc.).

Provírusová sekvencia HBRV bol naklonovaný z DNA lymfatických uzlín pacientov trpiacich primárnou biliárnou cirhózou PBC (z angl. *primary biliary cirrhosis*) (XU et al., 2004). PBC je chronické, progresívne, cholestatické ochorenie pečene, postihujúce najmä ženy v strednom veku, charakterizované deštrukciou malých intrahepatálnych žlčovodov. Deštrukcia býva zapríčinená zápalovým procesom, za ktorý je zodpovedný imunitný systém pacienta a vedie k cirhóze a celkovému zlyhaniu pečene s potrebou transplantácie tohto orgánu (VERGANI et al., 2004). Z tohto dôvodu bol HBRV, ako medicínsky významné etiologické agens, použitý pri experimentoch popísaných nižšie. Aminokyselinová sekvencia Gag polyproteínov MMTV a HBRV zdieľa 96% homológiu a preto je možné výsledky experimentov s HBRV Gag polyproteínom aplikovať v práci zaoberajúcej sa zbalovaním a pučaním MMTV.

4.4.2 Kvasinkový dvojhybridový seystém

Kvasinkový dvojhybridový systém predstavuje alternatívu k biochemickým metódam skúmajúcim proteín - proteínové interakcie, ako je napr. chemické prekríženie, koimunoprecipitácia alebo chromatografická kofrakcionácia. Tento systém je založený na využití transkripčného aktivátoru GAL4 u *S.cerevisiae*, ktorý pozostáva

z dvoch oddeliteľných, funkčne esenciálnych domén. N-terminálna doména špecificky interaguje s DNA a označuje sa ako BD (väzbová, z angl. binding domain), C-terminálna doména je vlastným transkripčným aktivátorom a označuje sa ako AD (z angl. activation domain). Potenciálnu interakciu medzi proteínmi „X“ a „Y“ je možné skúmať konštrukciou rekombinantných, dvojhybridových proteínov, kde je BD GAL4 fúzaná s proteínom „X“ a AD s proteínom „Y“. V prípade interakcie medzi proteínmi „X“ a „Y“ dochádza k funkčnému priblíženiu A a B domény transkripčného aktivátoru GAL4, ktorý spúšťa transkripciu reportérových génov pod kontrolou GAL4 promótoru (FIELDS a SONG, 1989). V tejto diplomovej práci bol použitý komerčný systém Matchmaker 3, reportérové gény *HIS3* a *ADE2* a kvasinkový kmeň *S.cerevisiae* AH109. Kmeň AH109 nie je schopný biosyntézy histidínu, adenínu, leucínu ani tryptofanu a preto nie je schopný rásť na médiu bez obsahu týchto látok. V prípade, že je do bunky transformáciou vnesený plazmid nesúci gén *LEU1*, resp. *TRP1*, ktoré slúžia ako nutričné selekčné markery, dovoľuje expresia génov *LEU1*, resp. *TRP1* kvasinkovej bunke rásť na Leu⁻, resp. Trp⁻ minimálnom médiu. V prípade interakcie medzi proteínmi „X“ a „Y“ dovoľuje Gal4-responzívna expresia génov *HIS3*, resp. *ADE2* kvasinkovej bunke syntetizovať histidín, resp. adenín a rásť na His⁻, resp. Ade⁻ minimálnom médiu. Systém bol najprv otestovaný využitím známej Gag - Gag homotypickej interakcie a následne bola preskúmaná potenciálna interakcia Gag polyproteínov s proteínmi ALIX, TSG101, resp. NEDD4.

4.4.2.1 Príprava expresných konštruktov pre dvojhybridový systém

Z plazmidu pcDNA3.1Zeo(+)+HBRVgag, ktorý niesol sekvenciu kódujúcu HBRV Gag polyproteínový prekursor, bol vyštiepený 1225 bp PflMI-XhoI fragment a 644 bp fragment HindIII-PflMI, oba obsahujúce časti HBRV *gag* génu. Po elektroforetickej separácii v agarózovom gély, izolácii a purifikácii bol fragment HindIII-PflMI ďalej štiepený enzýmom NcoI a izolovaný bol 591 bp fragment NcoI-PflMI. Fragменты NcoI-PflMI a PflMI-XhoI boli ligované spoločne s komerčne dostupným vektorom pGADT7, resp. pGBKT7, ktoré boli štiepené restriktázami NcoI a XhoI. Ligačnou zmesou boli transformované kompetentné bunky *E.coli* DH5α a kultivované pod selekčným tlakom na rezistenciu voči antibiotiku. V prípade plazmidu pGADT7 sa jednalo ampicilínovú rezistenciu a v prípade pGBKT7 to bola rezistencia na kanamycín. Z vybraných bakteriálnych klonov bola preparovaná DNA pripravených plazmidových konštruktov pGADT7+HBRVgag, ktorý kódoval HBRV

Gag polyproteín N-terminálne fúzovaný s Gal4 AD, resp. pGBKT7+HBRVgag, ktorý kódoval HBRV Gag polyproteín N-terminálne fúzovaný s Gal4 BD.

Dvojhybridový systém so sebou nesie limitáciu, ktorá by mohla kolidovať s detekciou prípadnej interakcie medzi skúmanými proteínmi. V prípade skúmaných proteínov predstavujúcich priestorovo väčšie molekuly, ktoré sú svojim N-koncom fúzované k AD, resp. BD a interakcia medzi skúmanými proteínmi by sa odohrávala na ich C-konci, mohla by oblasť molekuly medzi N a C-koncom predstavovať stericú prekážku. Výsledný komplex by potom nemusel obnoviť funkciu Gal4 ako transkripčného aktivátora a potenciálna interakcia medzi skúmanými proteínmi by nebola detegovaná. Z tohto dôvodu bola odstránená MA a pp21 doména HBRV Gag polyproteínu a vytvorený bol skrátený Gag polyproteín, ktorý by mal umožňovať detekciu prípadných interakcií v blízkosti svojho C-konca.

Úsek HBRV *gag* génovej sekvencie kódujúci MA a pp21 doménu bol odstránený PCR použitím mutagénneho priameho primeru HBRVgag-Xma-p3-F a reverzného primeru HBRVgag-R. Primer HBRVgag-Xma-p3-F bol navrhnutý tak, že jeho 3'-koniec bol komplementárny k 5'-koncu sekvencie HBRV *gag* génu, ktorá kódovala doménu p3. Použitím uvedenej dvojice primerov bol amplifikovaný úsek HBRV *gag* génu bez sekvencie kódujúcej MA a pp21 doménu, čím sa v exprimovanom Gag polyproteíne skrátene od N-konca o MA a pp21 doménu stala N-terminálnou doména p3. Produkt PCR s veľkosťou 1263 bp bol elektroforeticky separovaný v agarózovom gély, izolovaný, prečistený a štiepený restriktázami XmaI a XhoI. Výsledný 1241 bp fragment XmaI-XhoI bol použitý v ligačnej reakcii spoločne s 7956 bp plazmidom pGADT7 štiepeným restriktázami XmaI a XhoI, resp. 7303 bp plazmidom pGBKT7 štiepeným restriktázami XmaI a XmaI. Ligačnými zmesami boli transformované kompetentné bunky *E.coli* DH5 α a z vybraných klonov bola izolovaná plazmidová DNA. Takto boli pripravené konštrukty pGADT7+HBRVp3-NC a pGBKT7+HBRVp3-NC, ktoré boli overené sekvenačnou analýzou. Konštrukt pGADT7+HBRVp3-NC kódoval HBRV polyproteín Gag skrátene o MA a pp21 doménu, pričom doména p3 bola N-koncovo fúzovaná s AD Gal4. Konštrukt pGBKT7+HBRVp3-NC kódoval HBRV polyproteín Gag skrátene o MA a pP21 doménu, pričom doména p3 bola N-koncovo fúzovaná s BD Gal4.

4.4.2.2 Homotypická interakcia medzi HBRV Gag polyproteínmi a HBRV Gag polyproteínmi skrátеныmi o MA a pp21 doménu

Kmeň *S.cerevisiae* AH109 bol kotransformovaný plazmidmi pGADT7+HBRVgag (ďalej označovaný ako AD-Gag) a pGBKT7+HBRVgag (BD-Gag). Ako negatívna kontrola slúžili bunky kotransformované plazmidmi pGADT7+HBRVgag a pGBKT7 (BD), ktorý kóduje samotnú Gal4 BD a ďalej bunky kotransformované plazmidmi pGBKT7+HBRVgag a pGADT7 (AD), ktorý kóduje samotnú Gal4 AD.

Zvolený bol selekčný postup, ktorý umožňuje detekciu aj slabých proteín - proteínových interakcií (tzv. „jump start“ selekcia). V prvom kroku sú selektované bunky obsahujúce oba plazmidy použité pri kotransformácii a počas trvania tejto selekcie dochádza v bunkách k syntéze rekombinantných, fúzných proteínov. Získané kolónie sú následne podrobené selekcii, ktorá je zameraná na samotný prieskum potenciálnych proteín - proteínových interakcií.

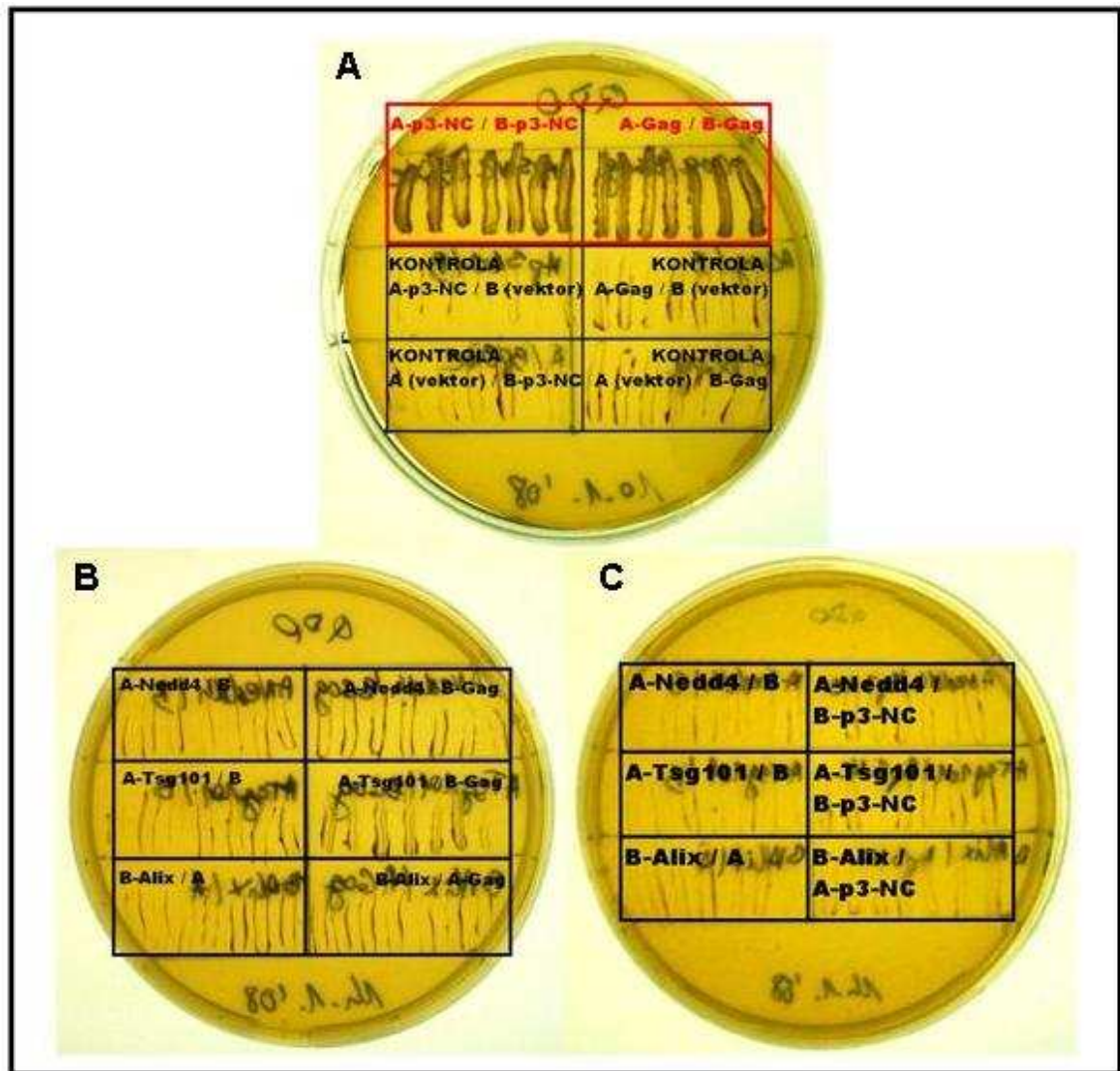
Kotransformované bunčné kultúry boli kultivované na minimálnom médiu bez Trp a bez Leu. Nakoľko plazmid pGADT7+HBRVgag kódoval *LEU2* nutričný selekčný selekčný marker a plazmid pGBKT7+HBRVgag kódoval *TRP1* nutričný selekčný marker, na Leu⁻ Trp⁻ minimálnom médiu vyrástli po 3 dňoch inkubácie pri 30°C kvasinkové kolónie nesúce oba uvedené plazmidy. Rovnaký postup bol uplatnený aj v prípade konštruktov s HBRV Gag polyproteínom skrátеныm o MA a pp21 doménu.

Po 3 dňoch inkubácie na Leu⁻ Trp⁻ minimálnom médiu bolo vybraných 7 reprezentatívnych kolónií z každej kotransformácie (AD-Gag/BD-Gag, AD-Gag/BD, AD/BD-Gag, AD-p3-NC/BD-p3-NC, AD-p3-NC/BD, AD/BD-p3-NC), ktoré boli prečiarkované na Leu⁻ Trp⁻ Ade⁻ His⁻ minimálne médium a inkubované pri 30°C. Po 3 dňoch kultivácie vyrástlo na Leu⁻ Trp⁻ Ade⁻ His⁻ minimálnom médiu všetkých 7 klonov kotransformovaných plazmidmi AD-Gag a BD-Gag, rovnako ako všetkých 7 klonov nesúcich plazmidy AD-p3-NC a BD-p3-NC (obr. 29). Klony slúžiace ako negatívna kontrola, kotransformované vždy jedným plazmidom kódujúcim HBRV Gag fúzovaný s AD, resp. BD a druhým plazmidom kódujúcim samotnú BD, resp. AD na Leu⁻ Trp⁻ Ade⁻ His⁻ minimálnom médiu nevyrástli. Vzájomná interakcia medzi Gag polyproteínmi mala za následok priestorové priblíženie Gal4 AD a BD, čím došlo ku vzniku funkčného transkripčného aktivátoru. Transkripcia reportérskych génov pod kontrolou Gal4 promótoru umožnila rast kvasinkových buniek na Leu⁻ Trp⁻ Ade⁻ His⁻ minimálnom médiu.

Uvedené výsledky dokazujú v kvasinkovom dvojhybridovom systéme špecifickú homotypickú interakciu jednak medzi kompletnými HBRV Gag molekulami a aj medzi HBRV Gag molekulami N-koncovo skrátеныmi o MA a pp21 doménu. Vylúčená bola nešpecifická interakcia medzi polyproteínom Gag a AD, resp. BD alebo DNA, ktorá by poskytovala falošne pozitívne výsledky. Popísaným experimentom bola preukázaná použiteľnosť kvasinkového dvojhybridového systému, ktorý mohol byť ďalej využitý na prešetrenie potenciálnej interakcie kompletných alebo skrátенých HBRV Gag molekúl s bunecnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4, pričom potvrdené homotypické interakcie slúžili ako pozitívna kontrola.

4.4.2.3 Testovanie potenciálnej interakcie polyproteínu Gag s bunecnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4

Existujúce plazmidy pGBKT7+ALIX (ďalej označovaný ako BD-ALIX), pGADT7+TSG101 (AD-TSG101), resp. pGADT7+NEDD4 (AD-NEDD4) boli použité pre kotransformáciu *S.cerevisiae*, kmeň AH109, spoločne s pripravenými plazmidmi pGADT7+HBRVgag (AD-Gag), pGBKT7+HBRVgag (BD-Gag), pGADT7+HBRVp3-NC (AD-p3-NC), resp. pGBKT7+HBRVp3-NC (BD-p3-NC). Plazmid pGBKT7 kodoval ľudský proteín ALIX fúzovaný s Gal4 BD, plazmidy pGADT7+TSG101, resp. pGADT7+NEDD4 kodovali ľudské proteíny TSG101, resp. NEDD4, fúzované s Gal4 AD. Bunky boli kotransformované nasledujúcimi dvojicami plazmidov: BD-ALIX/AD-Gag, BD-ALIX/AD-p3-NC, BD-ALIX/AD (negatívna kontrola), AD-NEDD4/BD-Gag, AD-NEDD4/BD-p3-NC, AD-NEDD4/BD (negatívna kontrola), AD-TSG101/BD-Gag, AD-TSG101/BD-p3-NC a AD-TSG101/BD (negatívna kontrola). Celkovo bolo teda kotransformovaných 9 dvojíc plazmidov a bunky boli kultivované na Leu⁻ Trp⁻ minimálnom médiu pri 30°C. Po 3 dňoch bolo z každej z 9 misiek, kde rástli bunky kotransformované uvedenými dvojicami plazmidov, prečiarkovaných 7 kolónií na Leu⁻ Trp⁻ Ade⁻ His⁻ minimálne médium a inkubovaných pri 30°C. Na rozdiel od pozitívnej kontroly a rovnako ako v prípade negatívnej kontroly, nebol počas nasledujúcich 5 dní detegovaný rast buniek na selekčnom médiu indikujúci sledovanú potenciálnu interakciu (obr. 29). Tieto výsledky nasvedčujú, že v kvasinkovom dvojhybridovom systéme nedochádza k interakcii HBRV Gag polyproteínov, ani HBRV Gag polyproteínov N-koncovo skrátенých o MA a pp21 doménu s ľudskými bunecnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4, ktoré boli popísané ako interakčný partneri pre viaceré retrovírusové Gag polyproteíny.



Obr. 29. Výsledok analýzy proteín - proteínových interakcií pomocou kvasinkového dvojhybridového systému. Fotografia Petriho misiek s kvasinkovým selekčným médiom dokumentuje rast kolónií *S.cerevisiae* AH109 kotransformovaných konštruktami AD-Gag/BD-Gag a AD-p3-NC/BD-p3-NC (červený rám), čo potvrdzujú homotypickú interakciu medzi HBRV Gag polyproteínmi. V ostatných prípadoch rast zaznamenaný nebol (čierne rámy). To znamená že v prípadoch, kedy bola skúmaná potenciálna interakcia medzi HBRV Gag polyproteínmi a bunecnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4, bol výsledok experimentu negatívny.

5 Diskusia

Súčasťou primárnej štruktúry Gag polyproteínov viacerých retrovírusov sú špecifické nekanonické proteínové domény lokalizované medzi MA a CA doménou. Lokalizácia pp21 domény C-proximálne k MA doméne Gag polyproteínového prekursoru MMTV je ekvivalentná lokalizácii domény pp24/16 v rámci polyproteínu Pr78^{Gag} u príbuzného betaretrovírusu, ktorým je M-PMV. U M-PMV má pp24/16 doména viacero funkcií. Jednou z nich je stabilizácia molekuly Pr78^{Gag}. V experimente využívajúcom tranzientnú expresiu M-PMV a metabolické značenie bolo preukázané, že delécia N-koncovej oblasti M-PMV pp24/16 znižuje intracelulárnu stabilitu Pr78^{Gag} (YASUDA a HUNTER, 1998). Tranzientnou expresiou a metabolickým značením popísanými v tejto diplomovej práci nebola zaznamenaná destabilizácia MMTV Pr77^{Gag} spôsobená deléciou pp21 domény. Stabilita mutovaných molekúl GagΔpp21 nie je významnejšie narušená ani v priebehu 15 hodín.

V kvasinkovom dvojhybridovom systéme nebola použitím fragmentu M-PMV MA-pp24/16, resp. MMTV MA-pp21, preukázaná žiadna, resp. veľmi slabá homotypická interakcia. To znamená, že M-PMV pp24/16 ani MMTV pp21 sa nepodieľajú na interakciách pôsobiacich medzi Gag molekulami pri tvorbe retrovírusových častíc (ZÁBRANSKÝ et al., 2005). Súčasťou primárnej štruktúry C-koncovej oblasti M-PMV pp24/16 sú sekvencie PPPY a PSAP plniace L doménovú funkciu, nevyhnutnú v neskorých fázach uvoľňovania viriónov M-PMV z buniek. Z tohto dôvodu kompletná delécia pp24/16, ako aj delécia C-koncovej oblasti pp24/16, blokuje uvoľňovanie častíc M-PMV. Tolerovaná je len čiastočná delécia N-koncovej oblasti pp24, ktorá nezahŕňa L doménové sekvencie (YASUDA a HUNTER, 1998; GOTTWEIN et al., 2003). Podľa získaných výsledkov je situácia u MMTV odlišná. Kompletná delécia pp21 domény nebráni molekulám GagΔpp21 vytvárať nezrelé častice MMTV a uvoľňovať ich z buniek. Účinnosť tohto procesu je však odstránením pp21 domény z polyproteínu Gag u MMTV narušená. Častice tvorené molekulami GagΔpp21 boli uvoľňované z buniek s asi 49% účinnosťou v porovnaní s časticami tvorenými Pr77^{Gag} divokého typu, ktoré slúžili ako štandard pre kvantitatívnu analýzu. Biochemické štúdie boli ďalej potvrdené elektrón mikroskopickou analýzou ultratenkých rezov buniek produkujúcich častice MMTV tvorené mutovanými molekulami GagΔpp21. Zdokumentované boli intracytoplazmatické vírusové častice i vírusové častice pučiace na cytoplazmatickej membráne. Nezrelé častice tvorené mutovanými molekulami GagΔpp21 vykazujú na elektrón mikroskopických snímkoch

rovnakú morfológiu ako častice MMTV tvorené Pr77^{Gag} divokého typu. V oboch prípadoch sa jedná o sférické útvary s elektrón denzným prstencovým okrajom a svetlejším vnútrom. Mutowané molekuly Gag Δ pp21 si zachovávajú schopnosť vytvárať nezrelé intracytoplazmatické vírusové častice, ktoré musia interagovať s cytoplazmatickou membránou aby boli uvoľnené z buniek. Preto by odstránenie pp21 domény nemalo fatálne narúšať konformáciu molekuly Gag, ale čiastočnú deformáciu štruktúry nie je možné vylúčiť. Konformačné zmeny v molekule polyproteínu Gag spôsobené deléciou domény pp21 by mohli vysvetľovať pokles v účinnosti uvoľňovania mutantných častíc MMTV, resp. čiastočne narúšať proces tvorby vírusových častíc. Za najdôležitejšie zistenie je možné považovať fakt, že MMTV častice sú z buniek uvoľňované aj po delícii pp21 proteínu a teda v sekvencii pp21 sa nenachádza motív s L doménovou funkciou.

U M-PMV, tak isto ako u Mo-MLV je v rámci Gag polyproteínu N-proximálne k CA doméne lokalizovaná doména označovaná u oboch retrovírusov na základe svojej relatívnej molekulovej hmotnosti ako p12. Toto umiestnenie je ekvivalentné oblasti krátkych domén p3-p8-n u MMTV Gag polyproteínového prekurzoru. V prípade Mo-MLV je súčasťou primárnej štruktúry p12 domény sekvencia PPPY s L doménovou funkciou. Z toho dôvodu delécia p12^{Gag} domény blokuje uvoľňovanie častíc Mo-MLV z buniek (YUAN et al., 1999, 2000). Súčasťou primárnej štruktúry M-PMV p12 domény je ISD sekvencia, ktorá je zodpovedná za efektívne intracytoplazmatické skladanie M-PMV kapsíd (SOMMERFELT et al., 1992). Zo záverov biochemickej charakterizácie purifikovaného M-PMV proteínu p12 vyplýva, že tento proteín má značný oligomerizačný potenciál. Na homotypickej interakcii sa podieľa najmä N-terminálna časť p12 s α -helikálnou štruktúrou, pravdepodobne prostredníctvom sekvencie podobnej leucínovým zipsom (KNEJZLÍK et al., 2004, 2007). Výsledky biochemickej analýzy boli potvrdené v kvasinkovom dvojhybridovom systéme, kde sa prejavila výrazná schopnosť homotypickej interakcie M-PMV p12 proteínu. Na rozdiel od M-PMV proteínu p12, bola v kvasinkovom dvojhybridovom systéme homotypická interakcia medzi MMTV proteínmi p3-p8-n na hranici detegovateľnosti. Homotypická interakcia medzi jednotlivými MMTV proteínmi p3, resp. p8-n detegovaná nebola (ZÁBRANSKÝ et al., 2005). Výsledky prezentované v tejto diplomovej práci nasvedčujú, že oblasť domén p3-p8-n nie je nevyhnutná pre uvoľňovanie MMTV častíc z buniek. Kvantifikácia v prípade delécie oblasti p3-p8-n bola tak ako vo všetkých prípadoch prevedená v systéme s inaktivovanou proteázou a účinnosť uvoľňovania častíc mutantného druhu MMTV bola stanovená na približne 22% v porovnaní

s parentálnym konštruktom. Elektrón mikroskopická analýza odhalila defektné štruktúry tubulárneho tvaru, uvoľňované z buniek produkujúcich MMTV Gag Δ (p3-n). Preto sa zdá, že odstránenie domén p3-p8-n narušuje správnosť tvorby nezrelých častíc MMTV. V našom laboratóriu bol pozorovaný podobný defekt v prípade delécií pri N-konci CA domény MMTV Gag polyproteínu (ZÁBRANSKÝ, nepublikované výsledky).

Je potrebné brať do úvahy, že expresia MMTV génov pod kontrolou M-PMV promotóru môže predstavovať nedexpresiu. V literatúre sú zdokumentované prípady, kedy dochádzalo k uvoľňovaniu retrovírusových častíc z buniek produkujúcich Gag molekuly vo vysokých koncentráciách aj v prípade mutačných zásahov do sekvencie L domén (zhrnuté v FREED 2002, DEMIROV a FREED 2004). Taktiež sa v literatúre uvádza, že inaktiváciou retrovírusovej protázy môže byť čiastočne prekonaný defekt spôsobený mutáciou L domén (HUANG et al., 1995; WANG et al., 2002). Po zvážení všetkých okolností preto nie možné s istotou vylúčiť prítomnosť L doménovej funkcie v sekvencii p3-p8-n. Nemôže sa však jednať o žiadnu z doposiaľ definovaných L doménových sekvencií, nakoľko tieto v primárnej štruktúre p3-p8-n prítomné nie sú.

V literatúre neboli popísané experimenty v tkanivových kultúrach cicavčích buniek s minimálnym Gag polyproteínovým prekurzorom u M-PMV. Dôvod je zrejmý. Ak zhrnieme dohromady výsledky experimentov s deléciou samotnej pp24/16 domény a výsledky experimentov s deléciou p12 domény M-PMV Gag polyproteínu je jasné, že minimálny Gag prekurzor nebude schopný intracytoplazmatickej tvorby a uvoľňovania častíc M-PMV, nakoľko sa v primárnej štruktúre p12 domény nachádza ISD nevyhnutná pre intracytoplazmatickú tvorbu nezrelých kapsíd M-PMV (SOMMERFELT et al., 1992) a v sekvencii pp24/16 je lokalizovaná L doménová funkcia (YASUDA a HUNTER, 1998; GOTTFWEIN et al., 2003). Obnoviť produkciu M-PMV častíc po odstránení ISD bolo možné smerovaním prekurzorových molekúl na cytoplazmatickú membránu, ktorá plní podpornú funkciu pri morfogéneze vírusových častíc (SAKALIAN a RAPP, 2006). Homotypických interakcií medzi molekulami MMTV Gag sa v kvasinkovom dvojhybridovom systéme zúčastňuje najmä NC doména (ZÁBRANSKÝ et al., 2005). Pre tvorbu a uvoľňovanie MMTV je však minimálny Gag polyproteín, tvorený doménami MA, CA a NC nepostačujúci. Defekt spôsobený parciálnou deléciou MMTV pp21, alebo p3-p8-n domén by mohol mať kumulatívny efekt. Je pravdepodobné, že rozsiahlymi deléciami dochádza ku zmene v konformácii molekuly Gag. Kompletná delécia nekanonických domén MMTV je preto neúnosná a úplne znemožňuje tvorbu nezrelých kapsíd.

V literatúre bolo popísaných viacero interesantných mutácií v MA doméne M-PMV (RHEE a HUNTER, 1990, 1991; STANSELL et al., 2004, 2007). Matrixová doména je primárne zodpovedná za vnútrobunečný transport Gag molekúl, resp. nezrelých retrovírusových kapsíd a interakciu s cytoplazmatickou membránou. Tá sa uskutočňuje prostredníctvom tzv. bipartitného signálu, ktorý pozostáva z N-koncovej modifikácie molekuly hydrofóbnym zvyškom kyseliny myristylovej a bázických aminokyselinových zvyškov, ktoré elektrostaticky interagujú so záporne nabitými fosfolipidovými komponentami plazmatickej membrány (CONTE et al., 1997). Okrem toho sa MA doména podieľa na stabilizácii konformácie molekuly Gag (RHEE a HUNTER, 1991) a aminokyselinové zvyšky so záporným nábojom vplývajú na subcelulárny transport a účinnosť uvoľňovania M-PMV častíc z buniek (STANSELL et al., 2007). Mutačná analýza priniesla mnohé poznatky o úlohe M-PMV MA domény pri tvorbe, transporte a uvoľňovaní vírusových častíc z buniek. Integráciou týchto poznatkov bol navrhnutý model intracytoplazmatickej tvorby retrovírusových kapsíd typu D. V cytoplazme buniek infikovaných M-PMV sú na voľných polyzómoch syntetizované molekuly Gag polyproteínového prekursoru, ktorých N-koniec je kotranslačne modifikovaný myristyláciou. V závislosti na interakcii CTRS s Tctex-1 komponentom dyneínového molekulárneho motorového komplex (VLACH et al., 2008) sú Gag molekuly transportované pozdĺž mikrotubúl do pericentriolárnej oblasti v bunke, kde po dosiahnutí kritickej koncentrácie dochádza k tvorbe nezrelých kapsíd (RHEE a HUNTER, 1990; CHOI et al., 1999; SFAKIANOS et al., 2003).

Napriek tomu, že MMTV spolu s M-PMV predstavujú prototypických zástupcov čeľade betaretrovírusov, proces morfogénzy u MMTV nie je zďaleka tak dobre charakterizovaný ako M-PMV. Pri pátraní po potenciálnej L doménovej sekvencii boli substituované aminokyselinové zvyšky Tyr81 a Pro82 v MA doméne MMTV za zvyšky alanínové. Táto substitúcia mala za následok blokáciu v uvoľňovaní MMTV častíc z buniek, dokumentovanú biochemickými analýzami. Literatúra uvádza podobný efekt spôsobený mutáciou Tyr82 v MA doméne M-PMV, kedy dochádzalo k interferencii s transportom nezrelých kapsíd z miesta ich vzniku v pericentriolárnej oblasti a akumulácii v tejto subcelulárnej lokalite (STANSELL et al., 2004).

Výsledky biochemických analýz prezentované v tejto diplomovej práci boli podporené elektrón mikroskopickou analýzou a pozorovania sú podobné ako uvádza literatúra v prípade M-PMV. Blok v uvoľňovaní mutantných MMTV častíc nebol pozorovaný na cytoplazmatickej membráne, ako by tomu bolo v prípade mutácie L domény, ale boli objavené zhľuky nezrelých MMTV kapsíd v blízkosti bunečného jadra.

Vychádzajúc z analógie s M-PMV je možné predpokladať, že sa jedná o pericentriolárnu oblasť, kam sú transportované MMTV Gag molekuly a kde dochádza k tvorbe nezrelých MMTV častíc. Túto hypotézu podporuje aj skutočnosť, že sekvencia ekvivalentná 18 aminokyselinám tvoriacim CTRS u M-PMV je lokalizovaná medzi 44. - 61. aminokyselinovým zvyškom MMTV MA domény (RHEE a HUNTER, 1990). Mutácia Y81A-P82A v MA doméne MMTV, popísaná v tejto diplomovej práci, by sa teda mohla prejavovať interferenciou s transportom nezrelých MMTV kapsíd z miesta ich vzniku k cytoplazmatickej membráne. Dôsledkom toho nedochádzalo k ich uvoľňovaniu z buniek. Zdá sa teda, že aminokyselinové zvyšky Tyr81 a Pro82 v MA doméne MMTV Gag polyproteínového prekursoru nie sú súčasťou L doménového motívu, ale súčasťou signálnej sekvencie esenciálnej pre transport nezrelých MMTV častíc z miesta ich vzniku k cytoplazmatickej membráne.

V súčasnosti prispieva k pochopeniu významu L domén poznatok, že fungujú ako proteín - proteínové interakčné platformy. Ich funkcia sa uplatňuje v kooperácii s bunecnými proteínmi, ktoré sa podieľajú na procesoch triedenia proteínov a formovania membránových včkov. Ako interakčný partneri pre retrovírusové Gag polyproteíny boli v závislosti na L doménových sekvenciách popísané bunecné proteíny ALIX, TSG101 a NEDD4 (GARRUS et al., 2001; KIKONYOGO et al., 2001; STRACK et al., 2003; SEGURA-MORALES et al., 2005). Potenciálna interakcia MMTV Gag polyproteínu s uvedenými bunecnými proteínmi nebola v kvasinkovom dvojhybridovom systéme zaznamenaná.

U niektorých retrovírusov bolo popísaných viac L doménových motívov, pričom jeden sa vždy javil ako primárny a ďalšie ako sekundárne (GOTTWEIN et al., 2003; WANG et al., 2004; SEGURA-MORALES et al., 2005) Sekvencia L domény, ktorej mutácia mala za následok kompletnú blokáciu uvoľňovania vírusových častíc zastávala primárnu L doménovú funkciu. Mutácia ďalších L doménových sekvencií nablokovala uvoľňovanie vírusových častíc z buniek úplne, ale znižovala účinnosť tohto procesu. Sekundárne L doménové sekvencie preto prispievajú k vyššej účinnosti uvoľňovania vírusových častíc z buniek, pre ktoré je esenciálna funkcia primárnej L domény.

Uvedený negatívny výsledok získaný v dvojhybridovom systéme je v súlade s ďalšími pozorovaniami popísanými v tejto diplomovej práci. Interakcia medzi Gag polyproteínmi a bunecným proteínom ALIX je závislá na L doménovej sekvencii YP(x)_nL (STRACK et al., 2003; LEE et al., 2007, ZHAI et al., 2008), u bunecného proteínu TSG101 je to L doménová sekvencia P(T/S)AP (GARRUS et al., 2001; SEGURA-MORALES et al., 2005). Zistenia, že u MMTV sa nepreukázala L doménová

funkcia motívov YPIWL a PSAP a v kvasinkovom dvojhybridovom systéme nebola zachytená interakcia medzi MMTV polyproteínom Gag a uvedenými bunecnými proteínmi spolu v tomto smere korešponujú.

Napriek tomu, že mutácia PSAP sekvencie u MMTV redukovala účinnosť uvoľňovania vírusových častíc z buniek asi na úroveň 52% v porovnaní so štandardom nezdá sa, že by sa jednalo ani o sekundárny L doménový motív. V prípade L doménovej funkcie by mal motív PSAP sprostredkovať špecifickú interakciu Gag polyproteínu s bunecným proteínom TSG101. V kvasinkovom dvojhybridovom systéme však táto interakcia detegovaná nebola, čo by spoločne s mutačnou analýzou mohlo vylučovať sekundárnu L doménovú funkciu motívu PSAP u MMTV.

6 Súhrn

- Prevedená bola delečná analýza špecifických nekanonických domén MMTV Gag polyproteínu a testovaná bola schopnosť mutovaných druhov MMTV vytvárať a uvoľňovať vírusové častice z buniek.
 - Pripravený bol mutantný druh MMTV s deléciou pp21 domény štruktúrneho polyproteínu Gag, v kontexte s inaktivovanou vírusovou proteázou. Metabolickým značením bol testovaný vplyv uvedenej delécie na proces tvorby a uvoľňovania vírusových častíc z buniek a prevedená bola elektrón mikroskopická analýza. Výsledkom bolo zistenie, že pp21 doména nie je nevyhnutná pre tvorbu a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek, ale jej delécia čiastočne redukuje účinnosť týchto procesov.
 - Pripravený bol mutantný druh MMTV s deléciou domén p3-p8-n štruktúrneho polyproteínu Gag v kontexte s inaktivovanou vírusovou proteázou. Metabolickým znarčením bol testovaný vplyv uvedenej delécie na proces tvorby a uvoľňovania vírusových častíc z buniek a prevedená bola analýza elektrónovou mikroskopiou. Výsledkom bolo zistenie, že prítomnosť domén p3-p8-n nie je nevyhnutná pre tvorbu a uvoľňovanie MMTV častíc z buniek, ale ich delécia redukuje účinnosť týchto procesov.
 - Odstránením všetkých nekanonických domén pp21-p3-p8-n špecifických pre MMTV bol pripravený mutovaný, tzv. minimálny MMTV Gag polyproteínový prekurzor tvorený výlučne doménami MA-CA-NC. Testovaná bola schopnosť minimálneho Gag polyproteínového prekurzoru vytvárať a uvoľňovať vírusové častice z buniek a výsledkom bolo zistenie, že minimálny Gag prekurzor nie je postačujúci pre tvorbu nezrelých MMTV častíc.
- Prevedená bola mutačná analýza aminokyselinových sekvencií predstavujúcich potenciálnych kandidátov na L doménovú funkciu. Jednalo sa o YPIWL motív lokalizovaný medzi 81. - 85. aminokyselinovým zvyškom MA domény a o PSAP motív lokalizovaný medzi 36. - 39. aminokyselinovým zvyškom CA domény.
 - Do CA domény bola zavedená substitúcia P36A-P39A a pripravený mutovaný druh bol testovaný na produkciu vírusových častíc metabolickým značením a elektrón mikroskopickou analýzou. Výsledkom bolo zistenie, že aminokyselinové zvyšky CA domény Pro36 a Pro39 nie sú esenciálne pre uvoľňovanie MMTV častíc z buniek, ale ich mutácia znižuje účinnosť tohto procesu.

- Do MA domény bola zavedená substitúcia Y81A-P82A a pripravený mutovaný druh bol testovaný na produkciu vírusových častíc metabolickým značením a elektrónovou mikroskopiou. Ukázalo sa, že uvedená mutácia kompletne blokuje uvoľňovanie častíc MMTV z buniek. Elektrón mikroskopická analýza odhalila zhľuky nezrelých častíc v blízkosti buniečného jadra. Žiadne častice zachytené na buniečnej membráne v neskorej fáze uvoľňovania pozorované neboli. Z uvedeného vyplýva, že aminokyselinové zvyšky MA domény Tyr81 a Pro82 sú pravdepodobne súčasťou signálnej sekvencie esenciálnej pre intracelulárny transport nezrelých kapsíd z miesta ich vzniku k cytoplazmatickej membráne.
- Pre testovanie potenciálnych interakcií HBRV Gag polyproteínu s buniečnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4 bol vytvorený konštrukt pre kvasinkový dvojhybridový systém, kódujúci HBRV Gag polyproteín, resp. HBRV Gag polyproteín skrátenej o MA a pp21 doménu N-koncovo fúzaný jednak s Gal4 AD, a taktiež s Gal4 BD. Použitelnosť kvasinkového dvojhybridového systému bola potvrdená očakávanou homotypickou interakciou medzi HBRV Gag polyproteínmi.
 - V kvasinkovom dvojhybridovom systéme nebola detegovaná potenciálna interakcia kompletného HBRV Gag polyproteínu, resp. HBRV Gag polyproteínu skrátenej o MA a pp21 doménu s buniečnými proteínmi ALIX, TSG101 a NEDD4. Tento výsledok je v súlade s mutačnou analýzou vybraných aminokyselinových sekvencií Gag polyproteínu.

7 Zoznam použitej literatúry

- Accola M A, Strack B, Göttlinger H G (2000): Efficient particle production by minimal Gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid-p2 and a late assembly domain. *J Virol.* 74(12):5395-402.
- 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.
- 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.
- Bhadra S, Lozano M M, Dudley J P (2005): Conversion of mouse mammary tumor virus to a lymphogenic virus. *J Virol.* 79(19):12592-12596.
- Bieniasz P D (2005): Late budding domains and host proteins involved in enveloped virus release. *Virology* 344:55-63.
- Bittner J J (1936): Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84:162.
- Bouamr F, Melillo JA, Wang MQ, Nagashima K, de Los Santos M, Rein A, Goff SP (2003): PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 *J Virol.* 77(22):11882-95.
- 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.
- Briggs J A, Watson B E, Gowen B E, Fuller S D (2004): Cryoelectron microscopy of mouse mammary tumor virus. *J Virol.* 78(5):2606-8.
- Bryant M, Ratner L. (1990) Myristoylation dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *PNAS.* 87:523-527.
- Büchen-Osmond, C. (Ed), (2006) Index to ICTVdB virus descriptions. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. ICTVdB Management, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, NY, USA
- Callahan E M, Wills J W. (2000) Repositioning basic residues in the M domain of the Rous sarcoma virus Gag polyprotein. *74:11222-11229.*
- Cereseto A, Giacca M. (2004) Integration site selection by retroviruses. *AIDS Rev.* 6(1):13-21.
- 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.
- Chen C, Li F, Montelaro R C (2001): Functional roles of equine infectious anemia virus Gag p9 in viral budding and infection. *J Virol.* 75(20):9762-70.
- 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.
- Craven RC, Leure-duPree AE, Weldon RA Jr, Wills JW. (1995) *J Virol.* 69(7):4213-27.
- Demirov D G, Ono A, Orenstein J M, Freed E O (2002): Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *PNAS* 99(2):955-960.
- Demirov D G, Freed E O (2004): Retrovirus budding. *Virus Res.* 106(2):87-102.

- Fields S, Song O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-6.
- 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.
- Garrus J E, von Schwedler U K, Pornillos O W, Morham S G, Zavitz K H, Wang H E, Wettstein D A, Stray K M, Côté 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(1):55-65.
- Goila-Gaur R, Demirov D G, Orenstein J M, Ono A, Freed E O (2003): Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol.* 77(11):6507-19.
- Gottwein E, Bodem J, Müller B, Schmechel A, Zentgraf H, Kräusslich H G (2003): The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release. *J Virol.* 77(17):9474-85.
- Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *PNAS* (86):5781-5785.
- 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.
- Greatorex JS, Laisse V, Dockhelar MC, Lever AM. (1996) Sequences involved in the dimerisation of human T cell leukaemia virus type-1 RNA. *Nucleic Acids Res.* 24(15):2919-23.
- Haddrick M, Lear AL, Cann AJ, Heaphy S. (1996) Evidence that a kissing loop structure facilitates genomic RNA dimerisation in HIV-1. *J Mol Biol.* 259(1):58-68.
- Harvey K F, Kumar S (1999): Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol.* 9(5):166-9.
- 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.
- Hershko A, Ciechanover A (1998): The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-479.
- 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.
- Hizzi A, Henderson L E, Copeland T D, Sowder R C, Hixson C V, Oroszlan S (1987): Characterization of mouse mammary tumor virus gag-pro gene products and the ribosomal frameshift site by protein sequencing. *PNAS* 84:7041-7045.
- Hizzi A, Henderson L E, Copeland T D, Sowder R C, Krutzsch H C, Oroszlan S (1989): Analysis of gag proteins from mouse mammary tumor virus. *J Virol.* 63(6):2543-2549.
- Holland J F, Pogo B G (2004): Mouse mammary tumor virus-like viral infection and human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10(17):5647-9.
- 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.

- Indik S, Günzburg W H, Salmons B, Rouault F (2005): Mouse mammary tumor virus infects human cells. *Cancer Res.* 65(15):6651-9.
- Indik S, Günzburg W H, Kulich P, Salmons B, Rouault F (2007): Rapid spread of mouse mammary tumor virus in cultured human breast cells. *Retrovirology* 4:73.
- Kay B K, Williamson M P, Sudol M (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14(2):231-41.
- Kiernan, R.E., Ono, A., Englund, G., Freed EO (1998) Role of matrix in an early postentry step in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle. *J Virol* 72(5):4116-26.
- Kikonyogo A, Bouamr F, Vana M L, Xiang Y, Aiyar A, Carter C, Leis J (2001): Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells *PNAS* 98(20):11199-204.
- Knejzlík Z, Strohalm M, Sedláčková L, Kodíček M, Sakalian M, Ruml T. (2004): Isolation and characterization of the Mason-Pfizer monkey virus p12 protein. *Virology* 324(1):204-12.
- Knejzlík Z, Smékalová Z, Ruml T, Sakalian M. (2007): Multimerization of the p12 domain is necessary for Mason-Pfizer monkey virus Gag assembly in vitro. *Virology* 365(2):260-70.
- Kuff, E. L., Lauders, K. K. (1988): The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv. Cancer Res.* 51:183-276.
- Langelier C, von Schwedler U K, Fisher R D, De Domenico I, White P L, Hill C P, Kaplan J, Ward D, Sundquist W I (2006): Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J Virol.* 80(19):9465-80.
- Melana M M, Nepomnaschy I, Sakalian M, Abbott A, Hasa J, Holland J F, Pogo B G T (2007): Characterization of viral particles isolated from primary cultures of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 67(18):8960-8965.
- Menéndez-Arias L, Young M, Oroszlan S (1992): Purification and characterization of the mouse mammary tumor virus protease expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 33(25):24134-24139.
- Menéndez-Arias L, Risco C, Pinto da Silva P, Oroszlan S (1992): Purification of immature cores of mouse mammary tumor virus and immunolocalization of protein domains. *J Virol.* 66(9):5615-5620.
- Mertz J A, Simper M S, Lozano M M, Payne S M, Dudley J P (2005): Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus. *J Virol.* 79(23):14737-14747.
- Moore R, Dixon M, Smith R, Peters G, Dickson C (1987): Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of gag and pol. *J Virol.* 61(2):480-90.
- Morita, E., Sundquist, W. I. (2004): Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20:395-425.
- Mortuza G B, Goldstone D C, Pashley C, Haire L F, Palmarini M, Taylor W R, Stoye J P, Taylor I A. (2009): Structure of the capsid amino-terminal domain from the betaretrovirus, Jaagsiekte sheep retrovirus. *J Mol Biol.* 386(4):1179-92.
- Munshi U M, Kim J, Nagashima K, Hurley J, Freed E O (2007): An Alix fragment potently inhibits HIV-1 budding. *J Biol. Chem.* 282(6):3847-55. Epub 2006 Dec 8.
- Ott D E, Coren L V, Chertova E N, Gagliardi T D, Schubert U (2000): Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 278(1):111-21.

- Ott D E, Coren L V, Sowder R C 2nd, Adams J, Nagashima K, Schubert U (2002): Equine infectious anemia virus and the ubiquitin-proteasome system. *J Virol.* 76(6):3038-44.
- Ott D E, Coren L V, Sowder R C 2nd, Adams J, Schubert U (2003): Retroviruses have differing requirements for proteasome function in the budding process. *J Virol.* 77(6):3384-93.
- 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 part of the retrovirus budding machinery. *PNAS* 97(24):13069-74.
- Patnaik A, Chau V, Li F, Montelaro R C, Wills J W (2002): Budding of equine infectious anemia virus is insensitive to proteasome inhibitors. *J Virol.* 76(6):2641-7.
- Popov S, Popova E, Inoue M, Göttlinger H (2008): Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through nucleocapsid. *J Virol.* 82(3):1389-1398.
- Pornillos O, Garrus J E, Sundquist W I (2002): Mechanism of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol.* 12(12):569-79.
- 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):633-7.
- 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(1):77-86
- Rhee, S. S., Hunter E.(1991): Amino acid substitutions within the matrix protein of type D retroviruses affect assembly, transport and membrane association of a capsid. *EMBO J.* 10(3):535-46.
- Rosenberg N, Jolicoeur P (1997): Retroviral pathogenesis. In: Coffin J M, Hughes S H, Varmus H E (Eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor
- Sakalian M, Hunter E. (1999) Separate assembly and transport domains within the Gag precursor of Mason-Pfizer monkey virus. *J Virol.* 73(10):8073-82.
- 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.
- Schultz, A. M., Oroszlan, S. (1983): In vivo modification of retroviral gag gene-encoded polyproteins by myristic acid. *J. Virol.* 46: 355-361.
- Schultz, A. M., Rein, A. (1989): Unmyristylated Moloney murine leukemia virus Pr65^{Gag} is excluded from virus assembly and maturation events. *J Virol.* 63:2370-2373.
- Segura-Morales C, Pescia C, Chatellard-Causse C, Sadoul R, Bertrand E, Basyuk E (2005): Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol. Chem.* 280(29):27004-12.
- Shackleford G M, Varmus H E (1988): Construction of clonable, infectious, and tumorigenic mouse mammary tumor virus provirus and a derivative genetic vector. *PNAS* 85:9655-9659.
- Shehu-Xhilaga M, Ablan S, Demirov D G, Chen C, Montelaro R C, Freed E O (2004): Late domain-dependent inhibition of equine infectious anemia virus budding. *J Virol.* 78(2):724-32.
- Stansell E, Tytler E, Walter MR, Hunter E. (2004): An early stage of Mason-Pfizer monkey virus budding is regulated by the hydrophobicity of the Gag matrix domain core. *J Virol.* 78(10):5023-31.

- Stansell E, Apkarian R, Haubova S, Diehl WE, Tytler EM, Hunter E. (2007): Basic residues in the Mason-Pfizer monkey virus gag matrix domain regulate intracellular trafficking and capsid-membrane interactions. *J Virol.* 81(17):8977-88.
- Sudol M, Hunter T (2000): NeW wrinkles for an old domain. *Cell* 103(7):1001-4.
- Svoboda J, Geryk J, Elleder D (2003) Heterogenous Pathogenicity of retroviruses: lessons from birds, primates, and rodents *Adv. Cancer Res* 87:59-126.
- 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.
- Song C, Dubay SR, Hunter E. (2002) A tyrosine motif in the cytoplasmic domain of mason-pfizer monkey virus is essential for the incorporation of glycoprotein into virions. *J Virol.* 77(9):5192-5200.
- 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, Accola M A, Palu G, Gottlinger H G (2000): A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus budding. *PNAS* 97(24):13063-8.
- Strack B, Calistri A, Göttlinger H G (2002): Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol.* 76(11):5472-9.
- 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. In: Coffin J M, Hughes S H, Varmus H E (Eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 263-334.
- Teramoto Y A, Puentes M J, Young L J T, Cardiff R D (1974): Structure of the mouse mammary tumor virus: polypeptides and glycoproteins. *J Virol.* 13(2):411-418.
- Varmus H. (1988) *Retroviruses*. *Science* 240(4858):1427-35.
- Vergani D, Bogdanos D-P, Baum H (2004): Unusual suspects in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 39(1):38-41.
- Vergani D, Bogdanos DP, Baum H. (2004): Unusual suspects in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 39(1):38-41.
- VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa T J, Agresta B, Kikonyogo A, Leis J, Carter C A (2001): Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV-1 type Pr55^{Gag}. *PNAS* 98(14):7724-7729.
- Vlach J, Lipov J, Rumlová M, Veverka V, Lang J, Srb P, Knejzlík Z, Pichová I, Hunter E, Hrabal R, Ruml T. (2008): D-retrovirus morphogenetic switch driven by the targeting signal accessibility to Tctex-1 of dynein. *PNAS* 105(30):10565-70.
- Vogt V M (2000): Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander? *PNAS* 97(24):12945-7.
- Wang H, Machesky N J, Mansky L M (2004): Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release. *J Virol.* 78(3):1503-12.
- Wang H, Norris K M, Mansky L M (2002): Analysis of bovine leukemia virus gag membrane targeting and late domain function. *J Virol.* 76(16):8485-93.

- Weldon RA Jr, Parker WB, Sakalian M, Hunter E. (1998) Type D retrovirus capsid assembly and release are active events requiring ATP. *J Virol.* 72(4):3098-106.
- 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.
- Xiang Y, Cameron C E, Wills J W, Leis J (1996): Fine mapping and characterization of the Rous sarcoma virus Pr76gag late assembly domain. *J Virol.* 70(8):5695-700.
- Xu L, Sakalian M, Shen Z, Loss G, Neuberger J, Mason A (2004): Cloning the human betaretrovirus proviral genome from patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 39(1):151-156.
- 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.
- Yasuda J, Hunter E. (2000) Role of matrix protein in the type D retrovirus replication cycle: importance of the arginine residue at position 55. *Virology* 268(2):533-8.
- Yasuda J, Hunter E, Nakao M, Shida H (2002): Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding. *EMBO Rep.* 3(7):636-40.
- Yuan B, Li X, Goff SP. (1999): Mutations altering the moloney murine leukemia virus p12 Gag protein affect virion production and early events of the virus life cycle. *EMBO J.* 18(17):4700-10.
- Yuan B, Campbell S, Bacharach E, Rein A, Goff SP.(2000): Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J Virol.* 74(16):7250-60.
- Zábranský A, Sakalian M, Pichová I (2005): Localization of self-interacting domains within betaretrovirus Gag polyproteins. *Virology* 332(2):659-66.
- Zábranský, A., Hadravová, R., Štokrová, J., Sakalian, M., Pichová, I. (2009): Premature processing of mouse mammary tumor virus Gag polyprotein impairs intracellular capsid assembly. *Virology* 384(1):33-7
- Zhai Q, Fisher R D, Chung H-Y, Myszka D G, Sundquist W I, Hill C P (2008): Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX_nL late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat Struct Mol Biol.* 15(1):43-9.