

GENOM RETROVIRŮ A FYZIOLOGICKÁ FUNKCE JEHO PRODUKTŮ

PETR STRNAD, ŠÁRKA HAUBOVÁ
a TOMÁŠ RUML*

Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum integrované genetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: tomas.ruml@vscht.cz

Došlo 30.5.02, přepracováno 23.7.02, přijato 13.1.03.

Klíčová slova:

Obsah

1. Úvod
2. Struktura virionu
3. Organizace genomu
4. Životní cyklus
5. Klasifikace retrovirů
6. Virus lidské imunodeficience
7. Strukturní proteiny
 - 7.1. Polyproteinový prekurzor Gag
 - 7.2. Matrixový protein
 - 7.3. Kapsidový protein
 - 7.4. Nukleokapsidový protein
8. Závěr

1. Úvod

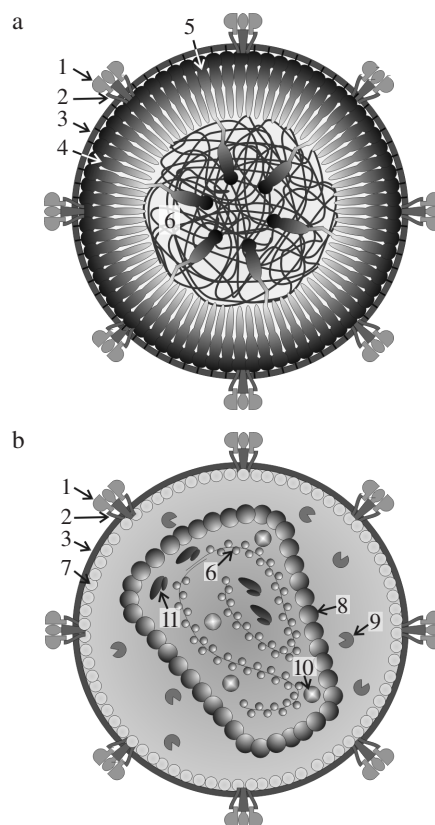
Čeď *Retroviridae* zahrnuje viry s diploidním RNA genomem, replikujícím se pomocí RNA-dependentní DNA polymerasy (reverzní transkriptasy). Retroviry jsou v posledních letech předmětem velmi intenzivního výzkumu zejména v souvislosti s pandemií choroby AIDS, ale i vzhledem k jejich onkogenním účinkům. Detailní studium regulace genové exprese, životního cyklu, způsobu skládání kapsid a mechanismu infekce přináší poznatky použitelné nejen v oblasti medicíny a farmakologie, ale odhaluje též základy chování biologických objektů na molekulární úrovni. Příkladem může být objev reverzní transkripce, díky němuž muselo být přehodnoceno známé centrální dogma molekulární biologie. Výzkum retrovirů indukované onkogeneze byl prvním krokem k pochopení buněčného cyklu a vedl k objevu buněčných onkogenů. Retroviry také poskytly nepostradatelný nástroj molekulární biologie, jakým je použití reverzní transkriptasy pro přípravu tzv. cDNA knihoven. Jedná se o soubory genů ve formě dvojřetězcové DNA, získaných přepisem sestřížených mRNA, tj. kódujících úseků zbavených intronů jakožto „nadbytečných“ úseků. Lze je tedy využít pro expresi eukaryotických genů i v bakteriálních buňkách, jímž mechanismus sestříhu chybí. Další perspektivní oblastí je využití

* Autor pro korespondenci

modifikovaných retrovirových genomů pro expresi klonovaných genů v buňkách obratlovců a jako „dopravních prostředků“ pro genové terapie¹.

2. Struktura virionu

Struktura virové částice je v základních rysech společná všem retrovirům. Má sférický tvar o průměru asi 80–100 nm (cit.¹). Je složena přibližně z 1–2 % RNA, 35 % lipidů a 65 % proteinů². Vnější obal je tvořen fosfolipidovou membránou, kterou virus získává během uvolnění z buňky procesem podobným pučení. Ačkoli pochází z hostitelské buňky, její složení se liší od plazmatické membrány vyšším obsahem sfingomyelinu a cholesterolu, přítomných v místech pučení ve zvýšené koncentraci (tzv. „lipid rafts“)^{3,4}. Ve fosfolipidové membráně virionu je zakotven transmembránový glykoprotein, na který je pomocí nekovalentních interakcí vázán povrchový glykoprotein, který je zodpovědný za vazbu na receptory hostitelské



Obr. 1. Struktura nezralého (a) a zralého (b) viru; 1 – povrchový glykoprotein, 2 – transmembránový glykoprotein, 3 – dvojvrstvá fosfolipidů, 4 – polyproteinový prekurzor Gag, 5 – polyproteinový prekurzor Gag-Pro-Pol, 6 – genomová RNA, 7 – matrixový protein, 8 – „core“ tvořený kapsidovým proteinem, 9 – proteasa, 10 – integrasa, 11 – reverzní transkriptasa¹

buňky a je tedy i relativně variabilní mezi retroviry. Doména transmembránového glykoproteinu, lokalizovaná vně virionu, je zodpovědná za fúzi membrán⁵.

Během tzv. zrání dochází k proteolytickému štěpení polyproteinových prekurzorů Gag (resp. Gag-Pro-Pol), tedy proteinů nezralé kapsidy a k reorganizaci struktur uvnitř virové partikule (obr. 1). K tomuto procesu dochází u všech retrovirů, kromě spumavirů⁶.

V nezralé částici (obr. 1a) jsou molekuly Gag a Gag-Pro-Pol ukotveny pod plazmatickou membránou pomocí N-koncové domény Gag, tj. matrixového proteinu (MA), který je modifikován na N-konci myristylací (většina retrovirů), nebo acetylací (ASLV) (cit.⁷). Molekuly Gag zde mají pravděpodobně hexagonální uspořádání (u HIV-1, M-PMV) (cit.^{8,9}). Uvnitř nezralé kapsidy jsou s molekulami Gag spojené dvě nekovalentně vázané kopie genomové RNA, dále jsou zde přítomny buněčné tRNA a buněčné proteiny, které jsou do virionu buď náhodně nebo specificky inkorporovány.

Ve zralém virionu (obr. 1b) je polyproteinový prekurzor Gag rozštěpen na jednotlivé proteiny⁶. Těsně pod fosfolipidovou membránou zůstává MA, který je k ní vázán stejným způsobem, jako dříve celý Gag v nezralé částici. Uvnitř je lokalizováno kondenzované jádro (tzv. „core“), které je tvořeno kapsidovým proteinem (CA). Tvar „core“ se liší u jednotlivých retrovirů a je jedním z kritérií jejich klasifikace (viz kap. 5.). Uvnitř „core“ je komplex diploidní genomové RNA, integrasy (IN) a reverzní transkriptasy (RT) a nukleokapsidového proteinu (NC). Dále zde nalézáme tRNA, sloužící jako primer pro reverzní transkripci, mRNA a některé buněčné proteiny.

Kromě těchto domén, jež jsou společné většině retrovirů existují další, pro různé viry specifické proteiny, mající své místo a funkci ve virionu (např. u HIV jsou to Vpr, cyklofilin, HLA třídy I a další)².

3. Organizace genomu

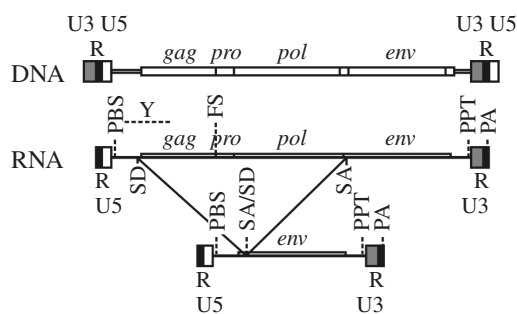
Organizací genomu jsou si všechny retroviry podobné. Jeho zobecněné schéma je na obr. 2. Je tvořen dimerem molekuly RNA, která má na 5' konci methylovanou čepičku, následuje sekvence LTR (z angl. „long terminal repeat“), tvořená úsekem R (z angl. „repeat“ – sekvence opakující se i na 3' konci) a U5 (z angl. „unique“ – jedinečná sekvence pro 5' konec). LTR v podobném uspořádání, tedy úsek U3 (sekvence jedinečná pro 3' konec) a R nalézáme i na 3' konci. V LTR se nachází promotor, zesilovač, polyadenylační signál a případně i další regulační sekvence.

Mezi koncovými sekvencemi LTR je signál pro sbalování RNA a geny pro virové proteiny. Ty jsou tvořeny minimálně geny *gag*, *pro*, *pol* a *env*. Z nesestřížené mRNA je syntetizován polyproteinový prekurzor Gag, který je prekurzorem strukturálních proteinů kapsidy. Během translace dochází s určitou pravděpodobností k posunu čtecího rámce před koncem genu *gag* (obr. 2 – FS). Tím je zrušen v původním čtecím rámci stop kodón a jsou translatovány i geny *pro* a *pol* za vzniku proteinu Gag-Pro nebo Gag-Pro-Pol. Sestřížená mRNA slouží pro translaci obalových glykoproteinů Env. Kromě těchto základních genů obsahují tzv. komplexní retroviry ještě řadu regulačních genů, které jsou translatovány podle mRNA vzniklých alternativním sestřihem.

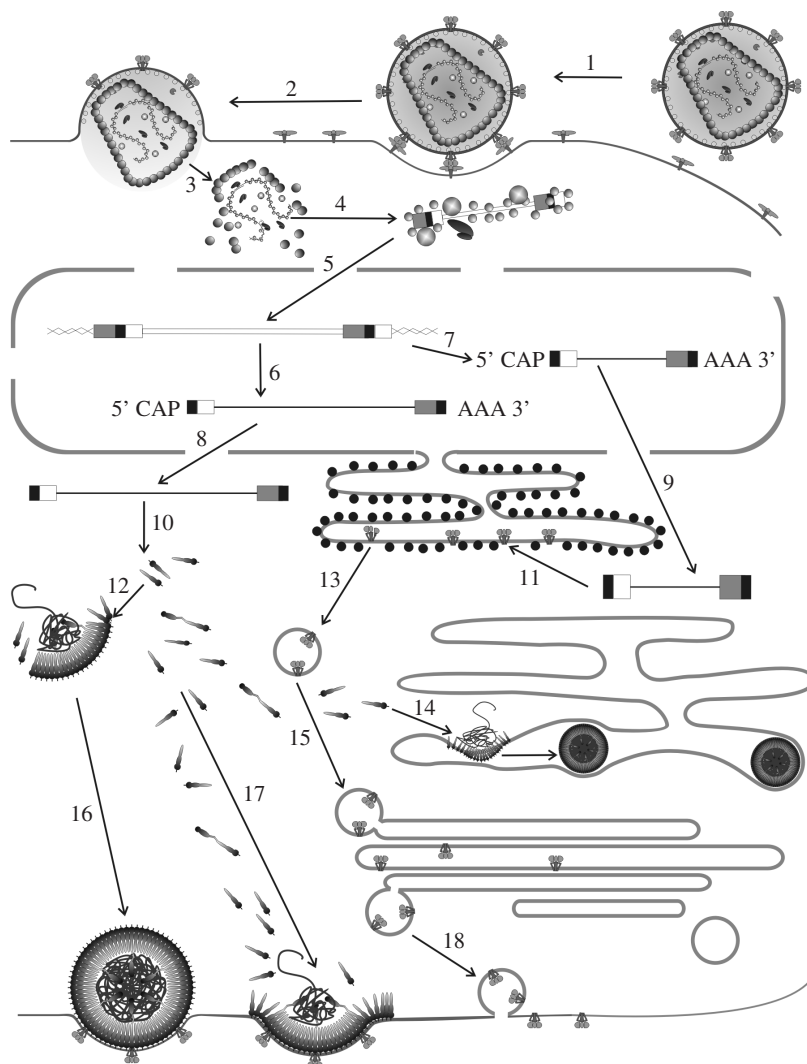
Gen *gag* kóduje polyproteinový prekurzor Gag, z kterého štěpením virovou proteasou vznikají obecně tyto proteiny: MA – matrixový protein, CA – kapsidový protein, NC – nukleokapsidový protein. Kromě těchto kódují jednotlivé viry ještě další specifické proteiny. Geny *pro* a *pol* (translatované ve fúzi s *gag* kódují prekurzor Gag-Pro-Pol) kódují PR – proteasou, RT – reverzní transkriptasu a IN – integrasu. Gen *env* kóduje obalové glykoproteiny; povrchový glykoprotein (SU) a transmembránovou podjednotku (TM).

4. Životní cyklus

Životní cyklus retrovirů lze rozdělit na dvě fáze: časnou a pozdní. Časná fáze zahrnuje procesy od vstupu viru do buňky až po reverzní transkripci RNA genomu retroviru (obr. 3, kroky 1–4). Prvním krokem virové infekce je vazba povrchových glykoproteinů viru (SU) na receptory hostitelské buňky a následná fúze membrán zprostředkovaná transmembránovým proteinem (TM), zejména jeho hydrofobní oblastí (obr. 3, kroky 1, 2). Specifita vazby SU na buněčný receptor určuje, které buňky jsou pro vstup viru permissivní. Dále dochází ke vstupu „core“ do cytoplazmy a k jeho rozpadu (obr. 3, krok 3). Následuje využití tRNA jako primeru na vazebném místě (PBS) virové RNA, čímž je zahájena reverzní transkripce, jež probíhá v několika krocích a jejím výsledkem je přepsání jednořetězcového RNA genomu do dvojřetězcové DNA pomocí RT (obr. 3, krok 4). Tento komplexní proces je lokalizován v cytoplazmě a postupně využívá obou molekul RNA. Původní genomová RNA je z meziprojektu tohoto procesu, hybridu RNA-DNA, degradována rovněž reverzní transkriptasou, která vykazuje i RNasovou aktivitu. Je nutno poznamenat, že reverzní transkripce je ve srovnání s replikací buněčných genomů značně nepřesná a je zdrojem mnoha mutací. Proto je terapie pacientů trpících AIDS komplikována velmi rychlým vznikem mutantů resistantních k použitým lékům, a z těchto důvodů se jako jediná možnost jeví aplikace tří různých inhibitorů (dosud pouze kombinace inhibitorů reverzní transkriptasy a proteasy), tzv. kombinovaná terapie. Reverzní transkripce většinou probíhá v cytoplazmě (u ALV až v jádře a u hepadnavirů již ve virionu) v tzv. nukleoproteinovém komplexu, který obsahuje části Gag jako např. MA, CA,



Obr. 2. **Genom retrovirů;** DNA – schéma provirové DNA, RNA – schéma virové RNA (nahore) a jejího sestřihu (dole), PBS – místo vazby primeru pro reverzní transkripci, Ψ – signál pro sbalování RNA, FS – posun čtecího rámce, SA/SD – místa sestřihu, PPT – terminátor, PA – polyadenylační signál



Obr. 3. Schematické znázornění životního cyklu retrovirů; 1 – interakce s buněčnými receptory, 2 – fúze membrán a vstup „core“ do cytoplazmy, 3 – „rozbalení“ „core“, 4 – reverzní transkripce, 5 – integrace provirové DNA do chromosomu, 6, 7 – transkripce, 8, 9 – export RNA z jádra, 9 – sestřih RNA, 10, 11 – translace, 13, 15, 18 – posttranslační modifikace a sekrece obalových glykoproteinů, 12, 14, 17 – skládání kapsidy

NC, enzymy RT, IN a některé faktory pocházející z hostitelské buňky.

Prvním krokem pozdní fáze životního cyklu je integrace produktu reverzní transkripce do genomu hostitelské buňky za vzniku proviru (obr. 3, krok 5). Tento děj je katalyzován IN, která pro tento proces vyžaduje vytvoření specifického preintegračního komplexu, který vstupuje do jádra. Součástí preintegračního komplexu je lineární provirová DNA, RT, IN a pravděpodobně i CA, NC a MA. Provirus zůstává v latentní fázi dokud není aktivován.

Produkce nových virů začíná transkripcí provirové DNA buněčnou DNA polymerasou II (obr. 3, krok 6). Při její iniciaci se kromě promotoru uplatňuje řada *cis*-regulačních elementů (v LTR), transkripčních faktorů hostitelské buňky a u komplexních retrovirů také vlastních transkripčních aktivátorů (Tat, Tex u HIV-1). Část vznikající RNA je sestřihena (obr. 3, krok 9), opatřena methylovanou čepičkou na 5' konci a poly-

adenylována na 3' konci. Všechny formy RNA jsou pak exportovány do cytoplazmy, kde nesestřihená RNA slouží jako virová genomová RNA a mRNA pro translaci genů *gag*, *pro*, *pol* (obr. 3, krok 10). Sestřihená RNA je využita k expresi Env, případně dalších virových proteinů.

Gen *env* je translatován na drsném endoplazmatickém retikulu (obr. 3, krok 11) a uvnitř je produkt Env štěpen buněčnými proteasami. Vznikají tak proteiny SU a TM, které jsou transportovány do Golgiho komplexu (obr. 3, kroky 13, 15), kde probíhá jejich glykosylace, a následně jsou vystaveny na povrch buňky v místech bohatých na sfingomyelin a cholesterol (obr. 3, krok 18).

Polyproteinový prekurzor Gag vzniká translací genu *gag* na volných polysomech. Přibližně s 5–20% účinností dochází k posunu čtecího rámce před koncem *gag*, a zaniká tak stop kodón. Tím vzniká fúzní genový produkt Gag-Pro případně Gag-Pro-Pol. Tímto mechanismem je u každého viru re-

gulován poměr množství Gag:Gag-Pro:Gag-Pro-Pol. Další osud polyproteinu Gag závisí na morfogenetickém typu viru. U retrovirů typu C a lentivirů je Gag a Gag-Pro-Pol transportován k plazmatické membráně, kde vytváří shluky na vnitřní straně membrány a pučí ven z buňky (obr. 3, krok 17). V poslední době se však ukazuje, že i u retrovirů morfogenetického typu C dochází k částečné asociaci percursorů Gag již v cytoplasmě (podrobněji viz kap. 7.). U retrovirů typu B a D a spumavirů je Gag (Gag-Pro-Pol) pravděpodobně transportován na určité místo v cytoplasmě (obr. 3, krok 12), kde vytváří tzv. A částice (strukturně podobné nezralým virionům), které jsou následně transportovány k plazmatické membráně a pučí ven z buňky (obr. 3, krok 16). Poslední možností je vznik tzv. IAP („intracisternal A-type particles“). Mechanismus je podobný morfogenesi typu C s tím rozdílem, že virus pučí do endoplazmatického retikula (obr. 3, krok 14). Tento typ se vyskytuje u některých endogenních retrovirů.

Pučením získávají retroviry svůj vnější obal, tedy fosfolipidovou dvojvrstvu mající původ v buněčné plazmatické membráně. Vzájemnou interakcí Gag a TM jsou do membrány viru selektivně inkorporovány virové obalové glykoproteiny. Jak již bylo zmíněno, důležitou roli pro transport Gag a jeho vazbu k membráně má MA doména a její N-koncová modifikace (nejčastěji myristylace).

Posledním krokem v životním cyklu retrovirů je zrání virionu. To je způsobeno proteolytickým štěpením Gag a Gag-Pro-Pol a dochází k němu velmi brzy po uvolnění viru z hostitelské buňky. Zrání je proces kompletní přestavby struktury virionu spojený s tvorbou „core“.

5. Klasifikace retrovirů

Retroviry taxonomicky zařazujeme do čeledi *Retroviridae*, patřící mezi DNA a RNA viry mající reverzní transkriptasu. Další členění je odvozeno od struktury a morfogenese virionu, struktury a velikosti genomu a LTR, velikosti genů a přítomnosti dalších specifických genů, tRNA použité jako primer pro reverzní transkripci atd. Toto rozdělení dobře odpovídá výsledkům fylogenetické analýzy sestavené podle vybraných domén reverzní transkriptasy. Současná klasifikace rozděluje *Retroviridae* do sedmi rodů, které jsou shrnuty v tab. I. Lentiviry jsou dále děleny do pěti skupin podle hostitele¹⁰.

Retroviry lze dále členit na komplexní a jednoduché. Komplexní mají oproti jednoduchým více možností sestihu RNA, což zvyšuje variabilitu genových produktů, např. HIV a SIV mají kromě *gag*, *pro*, *pol*, *env* ještě šest dalších proteinů, z nichž některé mají specifickou regulační funkci.

Retroviry zahrnují sedm rodů:

- alfaretrovirů. Tato skupina reprezentuje exogenní i endogenní ptačí viry. Zástupci těchto virů jsou např. ALV (Avian leukosis virus) a RSV (Rous sarcoma virus),
- betaretrovirů. Do této skupiny patří retroviry morfologického typu B (MMTV – Mouse mammary tumor virus) a retroviry morfologického typu D (M-PMV – Mason-Pfizer monkey virus). Jedná se o endogenní i exogenní viry myši, ovci a primátů,
- gamaretrovirů. Mezi ně patří retroviry morfologického typu C. Tato skupina zahrnuje exogenní i endogenní viry savců. Prototypem je MLV (Murine leukemia virus),

Tabulka I
Klasifikace retrovirů

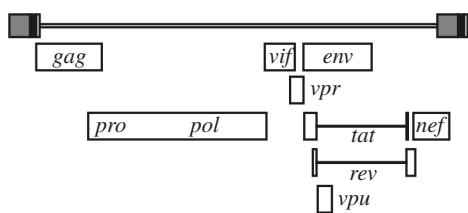
Rod	Prototyp viru	Morfogenese	Tvar zralého virionu
<i>Jednoduché retroviry</i>			
<i>Alpharetrovirus</i>	ALV	C typ	
<i>Betaretrovirus</i>	MMTV, M-PMV	B/D typ	
<i>Gammaretrovirus</i>	MLV	C typ	
<i>Komplexní retroviry</i>			
<i>Deltaretrovirus</i>	BLV	C typ	
<i>Epsilonretrovirus</i>	WDSV	C typ	
<i>Lentivirus</i>	HIV-1	C typ	
<i>Spumavirus</i>	CFV	B/D typ	

- deltaretrovirů. Morfologie a tvorba kapsid těchto virů je podobná gamaretrovirům. Pro infekci jsou typická dlouhá období latence, způsobují leukémie a neurologické poruchy. Do této skupiny patří např. BLV (Bovine leukemia virus),
- epsilonretroviry. Zástupcem této skupiny je WDSV (Walleye dermal sarcoma virus),
- lentiviry. Lentiviry jsou exogenní viry způsobující pomalé, často fatální onemocnění u řady savců. Tato skupina zahrnuje HIV-1 (Human immunodeficiency virus), HIV-2, SIV (Simian immunodeficiency virus),
- spumaviry. Své označení získaly podle pěnovitěho vzhledu infikovaných buněk, jenž je způsoben vakuolizací. Viry této skupiny nezpůsobují nádorová onemocnění. Mezi zástupce patří např. CFV (Chimpanzee foamy virus) a SFM (Simian foamy virus).

6. Virus lidské imunodeficience

Virus lidské imunodeficience (HIV) se díky pandemii choroby AIDS (syndrom získaného selhání imunity) stal pravděpodobně nejstudovanějším virem. Spolu s SIV patří do skupiny lentivirů primátů. Existují dva vzdálené subtypy HIV; HIV-1 převažuje ve většině oblastí světa, HIV-2 byl izolován především v západní Africe. Kmen HXB-2 HIV-1 je používán jako prototyp ve většině studií, a je ve světovém měřítku hlavní příčinou AIDS. Oba subtypy virů vznikly pravděpodobně nezávislým přenosem SIV na příslušníky domorodých kmenů žijících v Africe¹¹.

Geny *pro* a *pol*, kódující PR, RT, IN, jsou umístěny v jed-



Obr. 4. **Genom HIV-1**; obdélníky symbolizují geny v jednotlivých čtecích rámcích

nom čtecím rámci a jsou translatovány jako součást Gag-Pol. Polyprotein Env je po translaci v endoplazmatickém retikulu štěpen buněčnou proteasou za vzniku SU a TM, které jsou po glykosylaci transportovány na povrch buňky, kde jsou inkorporovány do cytoplazmatické membrány. Struktura a funkce genu *gag* je podrobně probrána v kapitole 7. Jak již bylo zmíněno výše, genom HIV-1 obsahuje kromě základních genů ještě geny pro další proteiny, které jsou překládány ze sestřižených forem mRNA.

Jsou to: Vif, který je nutný pro produkci infekčních částic v některých buněčných liniích¹²; Vpr je specificky inkorporován do virionů prostřednictvím interakcí s p6 doménou Gag (cit.¹³) a je nezbytný pro replikaci viru a směrování provirové DNA do jádra¹⁴; Tat se váže na specifickou sekundární strukturu u 5' konce RNA a způsobuje zvýšenou produkci virové RNA; Nef způsobuje odstranění CD4 z povrchu napadené buňky¹⁵; Rev se váže na specifické místo virové RNA a zvyšuje množství nesestřižené a jednou sestřižené RNA; Vpu je integrální membránový protein, který způsobuje v endoplazmatickém retikulu disociaci komplexů SU-TM-CD4 (cit.¹⁶).

7. Strukturní proteiny

7.1. Polyproteinový prekurzor Gag

Polyproteinový prekurzor Gag je již sám o sobě, bez přítomnosti dalších virem kódovaných proteinů, schopen vytvářet kapsidy a pučet ven z buňky. Podílí se také na inkorporaci enzymů a většiny dalších virových komponent (RNA, SU, TM, Vpr) do virionu. Po štěpení virovou proteasou z něj vzniká celá řada proteinů. Struktura polyproteinu Gag zatím není známa. U různých retrovirů však byla objasněna struktura i funkce následujících domén polyproteinu Gag.

7.2. Matrixový protein

Matrixový protein (MA) tvoří N-terminální doménu Gag. Struktura matrixového proteinu, který vzniká po vyštěpení z Gag proteasou, byla stanovena pro HIV-1 krystalograficky¹⁷ a pomocí NMR spektroskopie^{18,19}. HIV-1 MA tvoří v krystalech trimery, ale NMR studie ukazují na jeho monomerní formu v roztoku. Nicméně cílené mutace tohoto proteinu u M-PMV, které jsou podle modelu na plochách zprostředkujících trimerizaci, způsobily snížení stability Gag a účinnosti skládání kapsid^{20,21}. Biologická funkce multimerizace není dosud známa, ale může být důležitá pro transport, skládání kapsid a inkorporaci Env do virionu²⁰.

Jednou z hlavních funkcí MA je zprostředkování vazby

Gag k membráně. Mutace N-koncového glycinu, který je myristylován, blokuje u HIV-1 vazbu Gag k membráně^{22–24}. Další mutační studie bazických aminokyselin v MA HIV-1, v souvislosti s jeho prostorovou strukturou, ukazují, že pozitivní náboj vytvořený v MA doméně také zprostředkovává vazbu ke kyselým fosfolipidům na vnitřní straně membrány^{17,18,25}. Podobné výsledky byly získány i u dalších retrovirů^{20,26,27}. Sekvence v MA proteinu zodpovědné za vazbu k membráně byly pojmenovány M domény²⁸. Zjištění, že samostatný MA se váže na membránu méně účinně než Gag, a že delece na C konci MA vedou k pevnější vazbě samotného MA k membráně, vedly k vytvoření teorie tzv. „myristyl switch“ (cit.^{29,30}). Tento model je založen na předpokladu, že řetězec kyseliny myristové je v Gag vystaven ven z molekuly, zatímco v samotném MA je částečně schován. Tím je možno vysvětlit, že i přes relativně pevnou vazbu Gag k membráně může samotný MA již v rané fázi infekce disociovat od membrány a podílet se na tvorbě preintegračního komplexu. Tato teorie byla částečně podpořena dalšími studiemi^{31–33}. Určitou roli v regulaci vazby MA k membráně může hrát jeho fosforylace^{34–36}, avšak podíl fosforylovaného a nefosforylovaného MA nezávisí na jeho vazbě k membráně²⁹. Další studie ukazují, že fosforylace MA je důležitá pro jeho vazbu k IN (cit.³⁵). Již byla identifikována a charakterizována proteinkinasa asociovaná s virem^{37,38}.

Další funkcí MA domény je směrování polyproteinového prekurzoru Gag na místo skládání kapsidy. U C typu retrovirů a lentivirů včetně HIV je to plazmatická membrána, ale delece části MA domény HIV-1 způsobila pučení do ER (cit.^{39,40}). Náhrada MA v Gag heterologním proteinem, který se váže na membránu, způsobila pučení nejen přes plazmatickou, ale také přes intracelulární membrány³³. Mutace jediné aminokyseliny změnila místo skládání kapsid z cytoplazmatické membrány na membrány Golgiho aparátu a z něj vznikajících cisteren⁴¹.

Vzhledem k tomu, že bodová mutace MA M-PMV změnila morfogenesi z B/D na C typ, můžeme předpokládat existenci dominantního signálu, který zabrání přímému transportu Gag k plazmatické membráně. Na místo toho je Gag transportován na určité místo v cytoplazmě, kde dochází ke skládání kapsidy⁴². Tato myšlenka byla podpořena identifikací oblasti 18 aminokyselin v MA M-PMV, která je zodpovědná za směrování resp. udržení polyproteinu Gag v cytoplazmě. Vložení této sekvence do MA MoMuLV, tedy retroviru typu C, způsobilo změnu morfogenese na B/D typ. Snímky buněk z fluorescenčního mikroskopu, které produkují GFP ve fúzi s touto sekvencí, ukazují bodovou lokalizaci GFP v cytoplazmě^{20,43}.

V poslední době se ukazuje, že alespoň u některých retrovirů typu C vznikají intracelulární agregáty Gag, které však nejsou viditelné pomocí elektronové mikroskopie, a proto zůstaly dlouho nepopsány. Pomocí *in vitro* transkripce–translace byla analyzována raná fáze skládání kapsid HIV-1. Bylo zjištěno, že během tohoto procesu dochází postupně ke vzniku několika komplexů, jejichž konverze na složené nezralé kapsidy může být blokována nepřítomností ATP a k detergentům citlivých a necitlivých buněčných faktorů⁴⁴. Toto pozorování je v souladu se zjištěním, že při expresi Gag v kvasinkách nedochází ke vzniku kapsid⁴⁵, zatímco v bakulovirových i savčích expresních systémech vznikají nezralé kapsidy⁴⁷. V CD4⁺ T lymfocytech infikovaných HIV-1 byly kromě uvolněných zralých částic a nezralých virionů identifikovány ještě dva

intermediáty v procesu skládání kapsid lišící se svou citlivostí k detergentům. Tato data naznačují interakci mezi HIV-1 molekulami Gag ještě před jeho směřováním k plazmatické membráně⁴⁷.

7.3. Kapsidový protein

Kapsidový protein (CA) tvoří ve zralém virionu tzv. „core“, které vytváří obal uzavírající genomovou RNA spolu s dalšími proteiny a RNA (viz kap. 2.). CA jako součást Gag polyproteinu hraje důležitou roli v procesu skládání virové kapsidy a jejím zrání. CA je složen ze dvou částí: N-terminální, tzv. „core“ domény, která je důležitá pro zrání virionu a u HIV-1 váže cyklofilin A (Cyp A), a C-terminální, tzv. dimerizační domény, přispívající ke vzájemným interakcím mezi molekulami Gag (cit.⁴⁸). Strukturální data pro CA HIV-1 byla získána pomocí NMR spektroskopie⁴⁹ a rentgenové strukturální analýzy^{50,51}. „Core“ doména je složena ze 7 α -helixů. Dále obsahuje 2 β -skládané listy a exponovanou smyčku, která slouží jako vazebné místo pro Cyp A (cit.⁵⁰). C-terminální doména je globulární, z velké části složena z α -helixů⁵². Tato část obsahuje také jedinou oblast Gag, která vykazuje vysokou homologii mezi jednotlivými rody retrovirů, takzvaná „major homology region“ (MHR).

Mutace C koncové části HIV-1 CA domény Gag blokuje produkci virionů⁵³, což naznačuje její účast na Gag-Gag interakcích. Tento fakt byl také podpořen strukturálními studiemi⁵². Mutace v MHR HIV-1 poskytují široké spektrum fenotypů. Konkrétně poruchy v procesu skládání a zrání kapsidy a sníženou infektivitu⁵⁴. Vysvětlení je třeba hledat ve faktu, že aminokyselinové zbytky MHR tvoří síť vodíkových vazeb stabilizujících strukturu celé CA domény⁵². Mutace v MHR tedy pravděpodobně způsobují větší konformační změny, což může být příčinou širokého spektra pozorovaných defektů.

Pomocí kvasinkového dvouhybridového systému byla prokázána interakce HIV CA s proteiny z rodiny cyklofilinů, které v buňce slouží jako peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerasy⁵⁵. Cyklofilin A (Cyp A) je specificky inkorporován do HIV-1 virionů a jeho inkorporace je nutná pro infektivitu. Viriony bez Cyp A vykazovaly defekt v rané fázi infekce, ještě před zahájením reverzní transkripce⁵⁶, ale jeho přesná role v životním cyklu viru není známa. Doména vázající Cyp A se nachází v okolí prolinu v pozici 90 (cit.^{50,57}) a inkorporace Cyp A do virionů může být blokována cyklosporinem A. Toto zjištění se zdálo být velmi slibné z terapeutického hlediska, ale při působení této látky velmi rychle vznikají rezistentní mutanty⁵⁸. Přestože tyto rezistentní varianty mají mutace v blízkosti vazebného místa pro Cyp A, stále váží *in vitro* Cyp A a cyklosporin je i nadále schopen tuto vazbu narušit⁵⁸. Tyto mutace tedy snížily inkorporaci Cyp A, ale způsobily, že tato látka již není ve virionu potřeba. Prostorová struktura N-terminální domény HIV-1 CA naznačuje, že inkorporace Cyp A může uvolnit CA-CA interakce a napomáhat tak v procesu otevření viru po infekci buňky⁵⁰.

Mutace N-terminální domény CA obecně nezpůsobují poruchy skládání a tvorby částic, ale produkované viriony mají sníženou infektivitu a porušenou strukturu „core“⁵⁹. Po proteolytickém štěpení vazby MA-CA dojde ke změně prostorové struktury N-konce CA. Tím vzniká nový motiv ovlivňující vazbu CA-CA, který může hrát důležitou roli při vzniku „core“⁶⁰.

Rekombinantní HIV-1 CA vytváří *in vitro* cylindrické útvary, což je v souladu s jeho rolí při tvorbě „core“. N-terminální extenze CA C-koncovou sekvencí MA změnila tvar *in vitro* vznikajících částic na kulovité, což souhlasí s teorií o změně struktury N-konce CA po proteolytickém štěpení vazby MA-CA a s odlišným tvarem nezralé kapsidy a „core“^{60,61}. Elektronmikroskopické studie struktur tvořených v *E. coli* ukázaly, že za tuto změnu tvaru částic odpovídá expozice či maskování N-terminálního prolinu CA (cit.⁶²).

7.4. Nukleokapsidový protein

Společným znakem nukleokapsidových proteinů (NC) většiny retrovirů je přítomnost jedné nebo dvou Cys-His domén o obecné sekvenci Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys domén. Tato doména je také označována jako CCHC motiv nebo zinkový prst a její obdobu nalézáme v mnoha buněčných DNA vazebných proteinech. NC jak HIV-1 tak M-PMV obsahuje dvě takové domény, z nichž každá váže jeden zinečnatý ion⁶³. Ve virionu nalézáme NC v jádře, vázaný na RNA (viz kap. 2.). Struktura jak samotného HIV-1 a M-PMV NC tak i HIV-1 NC vázaného na krátký oligonukleotid byla určena pomocí NMR a ukazuje, že zinkové prsty jsou lokalizovány v centrální globulární oblasti, zatímco N- a C-konce jsou relativně volnější, bez globulární struktury^{64,65}.

Během skládání kapsidy dochází také k inkorporaci dvou kopií virové RNA. Bylo zjištěno, že virově specifická nesestřižená RNA je preferována před sestřiženými formami virové RNA a buněčnými mRNA. Mutace konzervativních cysteinů a histidinů v zinkových prstech NC u HIV-1 způsobuje významné defekty ve specifitě sbalování virové RNA a ve vazbě RNA *in vitro*⁶⁶. V některých případech byl zvýšen poměr sestřižené a nesestřižené RNA ve virionu^{66,67}. Chimérický Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) Gag obsahující HIV-1 NC specificky inkorporoval do vznikajících částic HIV-1 RNA (cit.⁶⁷). Z toho vyplývá, že kromě nespecifické vazby na RNA je NC schopen specificky rozpoznávat virovou RNA a je zodpovědný za její inkorporaci do virionu. Primární doména virové RNA zodpovědná za tuto specifickou vazbu se nazývá ψ sekvence a vyskytuje se s určitou homologií u všech retrovirů. Tato oblast se nachází na 5' konci virové RNA mezi LTR a začátkem genu *gag* a vytváří strukturu 4 vlásenek (SL1–SL4) (cit.⁶⁷). Vlásenky SL1–SL3, na rozdíl od SL4, vykazují vysokou afinitu k NC (cit.⁶⁸). Pomocí NMR byla určena prostorová struktura HIV-1 NC s navázaným fragmentem RNA odvozeným od SL3 (cit.⁶⁹) a SL2 (cit.⁷⁰). Kromě specifické vazby NC jakožto součásti Gag k ψ sekvenci, odpovídající za účinnou inkorporaci virové RNA do nezralé kapsidy, je maturní NC uvnitř „core“, kde svou vazbou na RNA napomáhá její dimerizaci a zvyšuje její stabilitu⁷¹.

Mutace a delece HIV-1 Gag v oblasti NC domény způsobují poruchy uvolňování viru nebo zabraňují účinnému skládání kapsid, z čehož lze usuzovat, že NC doména Gag je důležitá i pro skládání virionu^{72,73}. Jedná se zejména o N-koncovou oblast složenou z bazických aminokyselin⁷⁴. Delece NC u RSV vedla k tvorbě částic o nižší hustotě. Tento defekt lze opravit vložením basické části NC jiného retroviru⁷⁵. Analýza pomocí kvasinkového dvouhybridového systému rovněž ukazuje, že NC zprostředkovává interakce mezi molekulami Gag (cit.⁷⁶). *In vitro* vytváří CA ve fúzi s NC cylindrické částice účinněji než CA samotný⁷⁷. Heterologní protein, který zpro-

středkovává proteinové interakce, může zastoupit NC v procesu skládání kapsidy⁷⁸. Oblasti v NC důležité pro multimerizaci Gag byly pojmenovány jako tzv. I domény (z angl. „interaction domains“)²⁸.

V současnosti není jasné, jakou roli hraje RNA v procesu skládání kapsidy. Studie skládání přečištěného HIV-1 CA-NC *in vitro* podporují roli RNA v multimerizaci Gag, protože purifikovaný CA-NC ošetřený RNasou nevytváří cylindrické částice⁷⁷.

8. Závěr

Je zřejmé, že retroviry jsou přes svoji malou velikost a zdánlivou jednoduchost velmi komplexní částice, v nichž všechny komponenty mají zcela specifickou a nepostradatelnou funkci. Pro nalezení účinných terapeutik je nutno znát podrobně jak mechanismus replikace jejich genomu tak zejména funkce a vzájemné interakce produktů jednotlivých genů. Kromě retrovirových enzymů, jež jsou v současnosti jediným cílem používaným pro terapii, jsou předmětem studia i regulační proteiny a interakce mezi strukturními proteiny vedoucí ke vzniku kapsidy. Objasnění těchto interakcí je důležité nejen z hlediska možného terapeutického využití, ale také pro vývoj vektorů pro genové terapie.

Seznam použitých zkratk

ALV	Avian leukosis virus
BLV	Bovine leukemia virus
CA	kapsidový protein
CFV	Chimpanzee foamy virus
GFP	green fluorescent protein
HIV-1	Human immunodeficiency virus
IN	integráza
LTR	long terminal repeat
MA	matrixový protein
MHR	major homology region
MLV	Murine leukemia virus
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MoMuLV	Moloney murine leukemia virus
M-PMV	Mason-Pfizer monkey virus
NC	nukleokapsidový protein
PR	proteasa
RT	reverzní transkriptáza
SFM	Simian foamy virus
SU	surface glykoprotein
TM	transmembrane glykoprotein
WDSV	Walleye dermal sarcoma virus

Tato práce byla podpořena grantem Grantové agentury České republiky č. 203/00/1005 a grantem CEZ:J19/18:223300006 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

LITERATURA

- Vogt P. K., v knize: *Retroviruses* (Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E., ed.), kap. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997.
- Vogt V. M., v knize: *Retroviruses* (Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E., ed.), kap. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997.
- Quigley J. P., Rifkin D. B., Reich R.: *Virology* 46, 106 (1971).
- Aloia R. C., Titan H., Jensen F. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5181 (1993).
- Kliková M., Ruml T.: *Chem. Listy* 88, 660 (1994).
- Vogt V. M.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, 95 (1996).
- Henderson L. E., Krutzsch H. C., Oroszlan S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 339 (1983).
- Nermut M. V., Hockley D. J., Jowett J. B. M., Jones I. M., Garreau M., Thomas D.: *Virology* 198, 228 (1994).
- Nermut M. V., Bron P., Thomas D., Rumlova M., Ruml T., Hunter E.: *J. Virol.* 76, 4321 (2002).
- Hunter E., Casey J., Hahn B., Hayami M., Korber B., Kurth R., Neil J., Rethwilm A., Sonigo P., Stoye J., v knize: *Virus Taxonomy* (Van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., ed.), kap. 3. Academic Press, San Diego 2000.
- Rambaut A., Robertson D. L., Pybus O. G., Peeters M., Holmes E. C.: *Nature* 410, 1047 (2001).
- Gabuzda D. H., Lawrence K., Langhoff E., Terwilliger E. F., Dorfman T., Haseltine W. A., Sodroski J.: *J. Virol.* 66, 6489 (1992).
- Kondo E., Mammano F., Cohen E. A., Götlinger H. G.: *J. Virol.* 69, 2759 (1995).
- Heinzinger N. K., Bukrinsky M. I., Haggerty S. A., Ragland A. M., Kewalramani V., Lee M. A., Gendelman H. E., Ratner L., Stevenson M., Emerman M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7311 (1994).
- Garcia J. V., Miller A. D.: *Nature* 350, 508 (1992).
- Willey R. L., Maldarelli F., Martin M. A., Strebel K.: *J. Virol.* 66, 7193 (1992).
- Hill C. P., Worthylake D., Bancroft D. P., Christensen A. M., Sundquist W. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3099 (1996).
- Massiah M. A., Starich M. R., Paschall C., Summers M. F., Christensen A. M., Sundquist W. I.: *J. Mol. Biol.* 244, 198 (1994).
- Matthews S., Barlow P., Clark N., Kingsman S., Kingsman A., Campbell I.: *Biochem. Soc. Trans.* 23, 725 (1995).
- Conte M. R., Kliková M., Hunter E., Ruml T., Matthews S.: *EMBO J.* 16, 5819 (1997).
- Rhee S. S., Hunter E.: *EMBO J.* 10, 535 (1991).
- Götlinger H. G., Sodroski J. G., Haseltine W. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5781 (1989).
- Freed E. O., Martin M. A.: *Nature* 369, 107 (1994).
- Gheysen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thines D., De Wilde M.: *Cell* 59, 103 (1989).
- Zhou W., Parent L. J., Wills J. W., Resh M. D.: *J. Virol.* 68, 2556 (1994).
- Matthews S., Mikhailov M., Burny A., Roy P.: *EMBO J.* 15, 3267 (1996).
- McDonnell J. M., Fushman D., Cahill S. M., Zhou W., Wolven A., Wilson C. B., Nelle T. D., Resh M. D., Wills J., Cowburn D.: *J. Mol. Biol.* 279, 921 (1998).
- 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 R. C., Wills J. W.: *J. Virol.* 69, 5455 (1995).

29. Spearman P., Horton R., Ratner L., Kuli-Zade I.: *J. Virol.* **71**, 6582 (1997).
30. Zhou W., Resh M. D.: *J. Virol.* **70**, 8540 (1996).
31. Ono A., Freed E. O.: *J. Virol.* **73**, 4136 (1999).
32. Paillart J. C., Gottlinger H. G.: *J. Virol.* **73**, 2604 (1999).
33. Reil H., Bukovsky A. A., Gelderblom H. R., Gottlinger H. G.: *EMBO J.* **17**, 2699 (1998).
34. Gallay P., Swingler S., Aiken C., Trono D.: *Cell* **80**, 379 (1995).
35. Gallay P., Swingler S., Song J., Bushman F., Trono D.: *Cell* **83**, 569 (1995).
36. Bukrinskaya A. G., Ghorpade A., Heinzinger N. K., Smithgall T. E., Lewis R. E., Stevenson M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 367 (1996).
37. Jacque J. M., Mann A., Enslin H., Sharova N., Brichacek B., Davis R. J., Stevenson M.: *EMBO J.* **17**, 2607 (1998).
38. Camaur D., Gallay P., Swingler S., Trono D.: *J. Virol.* **71**, 6834 (1997).
39. Facke M., Janetzko A., Shoeman R. L., Krausslich H. G.: *J. Virol.* **67**, 4972 (1993).
40. Gallina A., Mantoan G., Rindi G., Milanesi G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 1031 (1994).
41. Freed E. O., Orenstein J. M., Buckler-White A. J., Martin M. A.: *J. Virol.* **68**, 5311 (1994).
42. Rhee S. S., Hunter E.: *Cell* **63**, 77 (1990).
43. Choi G., Park S., Choi B., Hong S., Lee J., Hunter E., Rhee S. S.: *J. Virol.* **73**, 5431 (1999).
44. Lingappa J. R., Hill R. L., Wong M. L., Hegde R. S.: *J. Cell. Biol.* **136**, 567 (1997).
45. Jacobs E., Gheysen D., Thines D., Francotte M., de Wilde M.: *Gene* **79**, 71 (1989).
46. Boulanger P., Jones I.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**, 237 (1996).
47. Lee Y. M., Yu X. F.: *Virology* **243**, 78 (1998).
48. Freed E. O.: *Virology* **251**, 1 (1998).
49. Gitti R. K., Lee B. M., Walker J., Summers M. F., Yoo S., Sundquist W. I.: *Science* **273**, 231 (1996).
50. Gamble T. R., Vajdos F. F., Yoo S., Worthylake D. K., Houseweart M., Sundquist W. I., Hill C. P.: *Cell* **87**, 1285 (1996).
51. Momany C., Kovari L. C., Prongay A. J., Keller W., Gitti R. K., Lee B. M., Gorbalenya A. E., Tong L., McClure J., Ehrlich L. S., Summers M. F., Carter C., Rossmann M. G.: *Nat. Struct. Biol.* **3**, 763 (1996).
52. Gamble T. R., Yoo S., Vajdos F. F., von Schwedler U. K., Worthylake D. K., Wang H., McCutcheon J. P., Sundquist W. I., Hill C. P.: *Science* **278**, 849 (1997).
53. Zhang W. H., Hockley D. J., Nermut M. V., Morikawa Y., Jones I. M.: *J. Gen. Virol.* **77** (Pt 4), 743 (1996).
54. Mammano F., Ohagen A., Hoglund S., Gottlinger H. G.: *J. Virol.* **68**, 4927 (1994).
55. Luban J., Lee C., Goff S. P.: *J. Virol.* **67**, 3630 (1993).
56. Braaten D., Franke E. K., Luban J.: *J. Virol.* **70**, 3551 (1996).
57. Franke E. K., Yuan H. E., Luban J.: *Nature* **372**, 359 (1994).
58. Braaten D., Aberham C., Franke E. K., Yin L., Phares W., Luban J.: *J. Virol.* **70**, 5170 (1996).
59. Reicin A. S., Ohagen A., Yin L., Hoglund S., Goff S. P.: *J. Virol.* **70**, 8645 (1996).
60. von Schwedler U. K., Stemmler T. L., Klishko V. Y., Li S., Albertine K. H., Davis D. R., Sundquist W. I.: *EMBO J.* **17**, 1555 (1998).
61. Gross I., Hohenberg H., Huckhagel C., Krausslich H. G.: *J. Virol.* **72**, 4798 (1998).
62. Rumlova-Klikova M., Hunter E., Nermut M. V., Pichova I., Ruml T.: *J. Virol.* **74**, 8452 (2000).
63. Darlix J. L., Lapadat-Tapolsky M., de Rocquigny H., Roques B. P.: *J. Mol. Biol.* **254**, 523 (1995).
64. Morellet N., Jullian N., de Rocquigny H., Maigret B., Darlix J. L., Roques B. P.: *EMBO J.* **11**, 3059 (1992).
65. South T. L., Summers M. F.: *Protein Sci.* **2**, 3 (1993).
66. Schwartz M. D., Fiore D., Panganiban A. T.: *J. Virol.* **71**, 9295 (1997).
67. Zhang Y., Barklis E.: *J. Virol.* **69**, 5716 (1995).
68. Amarasinghe G. K., Zhou J., Miskimon M., Chancellor K. J., McDonald J. A., Matthews A. G., Miller R. R., Rouse M. D., Summers M. F.: *J. Mol. Biol.* **314**, 961 (2001).
69. De Guzman R. N., Wu Z. R., Stalling C. C., Pappalardo L., Borer P. N., Summers M. F.: *Science* **279**, 384 (1998).
70. Amarasinghe G. K., De Guzman R. N., Turner R. B., Chancellor K. J., Wu Z. R., Summers M. F.: *J. Mol. Biol.* **301**, 491 (2000).
71. Feng Y. X., Copeland T. D., Henderson L. E., Gorelick R. J., Bosche W. J., Levin J. G., Rein A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 7577 (1996).
72. Dorfman T., Luban J., Goff S. P., Haseltine W. A., Gottlinger H. G.: *J. Virol.* **67**, 6159 (1993).
73. Hong S. S., Boulanger P.: *J. Virol.* **67**, 2787 (1993).
74. Jowett J. B., Hockley D. J., Nermut M. V., Jones I. M.: *J. Gen. Virol.* **73** (Pt 12), 3079 (1992).
75. Bennett R. P., Nelle T. D., Wills J. W.: *J. Virol.* **67**, 6487 (1993).
76. Franke E. K., Yuan H. E., Bossolt K. L., Goff S. P., Luban J.: *J. Virol.* **68**, 5300 (1994).
77. Campbell S., Vogt V. M.: *J. Virol.* **69**, 6487 (1995).
78. Zhang Y., Qian H., Love Z., Barklis E.: *J. Virol.* **72**, 1782 (1998).

P. Strnad, Š. Haubová, and T. Ruml (*Department of Biochemistry and Microbiology and Center for Integrated Genomics, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Retroviral Genome and Physiological Function of Its Products**

Retroviridae comprise viruses with diploid RNA genome, which are replicated by RNA-dependent DNA polymerase, i.e. reverse transcriptase. This enzyme itself is a valuable tool of molecular biology. However, retroviruses are in the forefront of scientific interest mainly due to the serious diseases they cause. In addition, elucidation of some aspects of the cell cycle and cellular oncogens originated from the studies of retroviral oncogenesis. Another attractive area is the design of retroviral vectors for gene therapies. This review attempts to sum up the most recent general knowledge of the function of retroviral genes and their products in the virus life cycle.