Chem. Listy *106*, 911−919 (2012) Referát

VYŘEŠENÍ STRUKTURY RETROVIROVÉ ČÁSTICE JAKO KLÍČ K INHIBICI HIV

PAVEL ULBRICH, TIBOR FÜZIK, RŮŽENA PÍCHALOVÁ, IRENA VORÁČKOVÁ a TOMÁŠ RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
ulbrichp@vscht.cz, rumlt@vscht.cz

Klíčová slova: retrovirus, skládání retrovirové částice, struktura retrovirové částice, HIV, M-PMV, elektronová mikroskopie, kryo-elektronová mikroskopie

Obsah

1. Úvod
2. Základní popis retrovirů a jejich životního cyklu
3. Současné přístupy k inhibici retrovirů
4. Strukturní proteiny retroviru
5. Skládání a struktura retrovirových částic
   5.1. Nezralá částice
   5.2. Vznik a struktura zralé částice
6. Metody studia struktury retrovirů
   6.1. Elektronmikroskopické techniky
   6.2. Určení 3D struktury retrovirové částice
   6.3. Mikroskopie atomárních sil
7. Závěr

1. Úvod

Retroviry patří do skupiny obalených RNA virů, které jsou známy zejména v souvislosti se závažnými lidskými chorobami, např. se syndromem získané imunitní nedostatečnosti (AIDS) nebo leukémií. Kromě člověka napadají retroviry i další obratlovce včetně opic, koní, kočkovitých šelem, dobytka, ryb a dalších. Způsobují celoživotní infekce vedoucí např. k různým typům nádorových onemocnění nebo imunodeficienci. Za zmínku stojí i fakt, že téměř deset procent lidského genomu tvoří desetitisíce endogenních retrovirových sekvencí ve formě tzv. retrotransposonů, které jsme „získali“ v průběhu evoluce. I přesto, že jsou retroviry po několik desetiletí předmětem intenzivního studia mnoha laboratoří, zůstávají stále některé děje v jejich životním cyklu neobjasněné. Detailní znalost mechanismu jednotlivých kroků replikace retrovirů na molekulární úrovni může pomoci např. při vývoji nových účinných antivirových léčiv. A právě nová léčiva inhibující retroviry jsou velmi žádána, neboť díky tomu, že jsou tyto viry velmi nepřesné při replikaci své genetické informace, vzniká mnoho jejich mutantů, rezistentních k současným inhibitorům[1]. Dalším zajímavým aspektem studia retrovirů je možnost jejich použití při genových terapiích jako vektorů pro cílené vnášení genů[2].

2. Základní popis retrovirů a jejich životního cyklu

Tak jako ostatní viry, i retroviry jsou plně závislé na hostitelské buňce, která poskytuje všechny buněčné faktory a mechanismy potřebné pro jejich replikaci[3]. Životní cyklus retrovirů lze rozdělit na časnou a pozdní fázi (pro detailní popis životního cyklu retrovirů viz např. cit.[4]). Prvním krokem časné fáze je rozpoznání cílové buňky a vstup části viru do cytoplasmy. Retroviry napadají hostitelské buňky na základě specifické interakce povrchových glykoproteinů virové částice s buněčnými receptory. V případě viru lidské imunodeficience (HIV) jsou infikovány především makrofágy a T_h lymfocyty (pomocné T lymfocyty), jejichž CD4 receptory slouží společně s dalšími membránovými proteiny, koreceptory, k interakci s povrchovými glykoproteiny viru. Poté je indukována fúze virové a buněčné membrány, následně dochází k uvolnění virového jádra, nesoucího genom viru, tzv. „core“, které vstupuje do buňky. Po obnažení virového genomu dochází k reverzní transkripci genomové virové RNA za vytvoření dvojřetězcové DNA. Tento proces katalyzuje enzym reverzní transkriptasa, jejíž objevení bylo převratné, jelikož změnilo v té době uznávané centrální dogma molekulární genetiky, založené na předpokladu, že genetická informace může být využita pouze ve směru DNA → RNA → protein. Po reverzní transkripci je vzniklá DNA transportována do jádra a integrována do genomu hostitelské buňky retrovirovým enzymem integrasou. Integrovaný provirus může přetrvávat latentně řadu let v genomu buněk jako jeho trvalá součást. Po určité době však dochází dosud neznámým mechanismem k aktivaci viru a transkripcí virové mRNA je pak nastartována pozdní fáze virového životního cyklu. Část transkriptu slouží pro syntézu virových proteinů a část je inkorporována do nově vznikajících částic jako genomová RNA.

Genom většiny retrovirů je tvořen dvěma identickými molekulami jednořetězcové pozitivní RNA o délce 7 až 12 tisíc basí. Na jeho koncích se nacházejí nekódující regulační oblasti, mezi nimž jsou umístěny, podle typu retroviru, tři nebo čtyři otevřené čtecí rámce, kódující strukturní proteiny a enzymy viru, a to *gag*, *pro*, *pol* a *env*.

Gen *gag* kóduje strukturní polyproteinový prekurzor Gag (název pochází z „group antigen“), v němž jsou obsaženy všechny strukturní proteiny, které tvoří schránku viru. Translací genu *gag* ve formě polyproteinového pre-

kurzoru si retroviry zajišťují ekvimolární zastoupení všech strukturních proteinů i po jejich proteolytickém uvolnění z prekurzoru.

Translací genu *pol* vzniká další prekurzor Pol navazující na Gag (spojený, fúzní polyprotein Gag-Pol), kódující retrovirové enzymy reverzní transkriptasu, proteasu a integrasu. Tento Gag-Pol prekurzor (u některých retrovirů má gen pro proteasu vlastní čtecí rámec (*pro*): Gag-Pro a Gag-Pro-Pol) vzniká v cca desetkrát nižší molární koncentraci oproti Gag. Důvodem je přibližně desetiprocentní frekvence posunu čtecího rámce před koncem genu *gag*, a tím eliminace stop kodonu[5]. Retroviry takto rafinovaným způsobem regulují vzájemné molární poměry strukturních proteinů a enzymů. Těch prvních je totiž zapotřebí více k vytvoření celé částice než enzymů, které mají vysokou aktivitu[6].

U většiny retrovirů, včetně lentivirů, mezi něž patří HIV, dochází ke skládání virových částic z prekurzorů Gag (resp. Gag-Pro, či Gag-Pro-Pol) na membráně hostitelské buňky. U některých retrovirů (např. Mason-Pfizerův opičí virus, M-PMV) se však částice skládají u jádra, kam jsou polyproteiny Gag aktivně transportovány dyneinovým molekulovým motorem[7]. Složená nezralá částice je poté transportována k membráně.

Retroviry jsou obalené viry, jejichž proteinová schránka je obklopena membránou, kterou virus získává během uvolňování z buňky, procesem podobným pučení. V membráně jsou umístěny povrchové glykoproteiny, kódované virovým genem *env*. Prekurzor Env je štěpen na dvě podjednotky a to povrchovou (SU), která je nekovalentně spojena s transmembránovou (TM) podjednotkou, kotvící celý komplex v membráně.

Obalové glykoproteiny jsou, podobně jako jiné membránové proteiny, syntetizovány na membráně endoplasmatického retikula a přes Golgiho aparát jsou transportovány sekrečními váčky do cytoplasmatické membrány[8]. Tam se setkávají s nezralou částicí a dochází k vychlípení membrány a odškrcení nezralého viru. Během tohoto procesu je aktivována virová proteasa, která vyštěpuje jednotlivé proteiny z polyproteinových prekurzorů a částice zraje, za přeskupení strukturních proteinů částice a vzniku infekčního viru s pozorovatelným jádrem, „core“. Některé výsledky naznačují, že by se proteasa mohla uplatňovat i v časné fázi, bezprostředně po infekci při rozložení „core"[9].

Komplexní viry (např. HIV) kódují navíc regulační proteiny, které ovlivňují charakter retrovirové infekce. V částicích HIV bylo navíc nalezeno i přes 200 proteinů hostitelské buňky, jejichž funkce v životním cyklu retrovirů, pokud vůbec nějaká je, není známá.

3. Současné přístupy k inhibici retrovirů

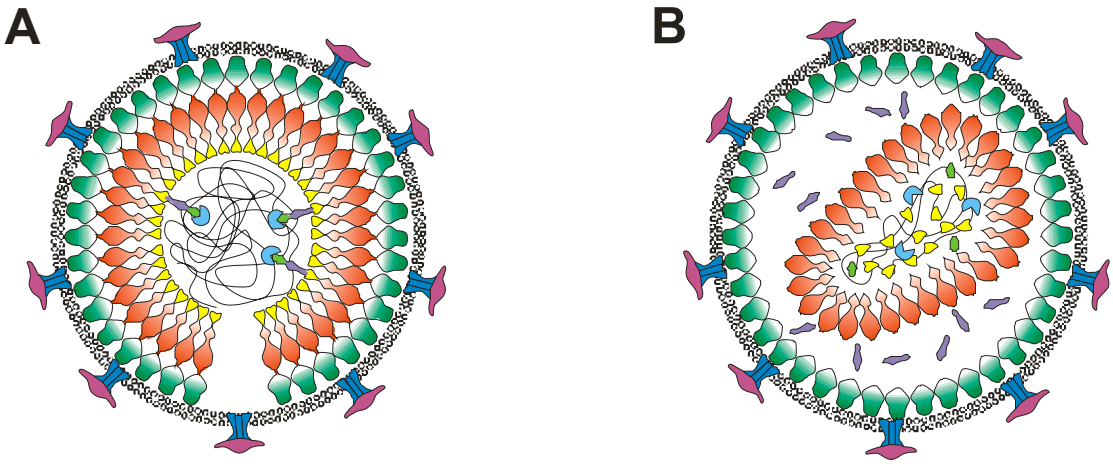
Zpočátku se zdálo snadné vyvinout antiretrovirovou vakcínu, která by problém AIDS definitivně vyřešila, ale přes nesmírné úsilí řady akademických pracovišť i farmaceutických společností není dosud účinná vakcína k dispozici[10]. Pro prevenci infekce byly testovány i různé gely, určené k aplikaci na potenciální místa vstupu viru do těla. Další možností protivirové terapie je využití inhibitorů vstupu viru do buněk. HIV primárně napadá pouze buňky imunitního systému, nesoucí na svém povrchu CD4 receptory, tedy makrofágy a T_h lymfocyty. Pro účinný vstup do těchto buněk navíc tento virus potřebuje i koreceptory CCR5 a CXCR4, a tak může být inhibice jeho vstupu do buněk založena na cílené mutaci koreceptorů, případně jejich stínění, nebo nadprodukci v rozpustné formě[11]. Zatím však pořád platí, že nejúčinnější prevencí je stálý partner či používání kondomů.

V případě léčení pacientů trpících AIDS se v současné době využívá tzv. vysoce účinná antiretrovirová terapie (HAART; z angl. highly active antiretroviral therapy). Ta spočívá v současném použití tří inhibitorů enzymů, zejména proteasy, reverzní transkriptasy a nově i integrasy. Tento postup je v současnosti jedinou schválenou terapií proti AIDS. Důvodem použití tří látek současně je vysoká proměnlivost viru v důsledku chyb při kopírování genomu HIV. Tím vzniká mnoho mutantů, z nichž někteří mohou být k inhibitorům necitliví a ti v populaci převládnou. V případě kombinace tří inhibitorů se toto riziko významně snižuje. Pro dlouhodobě účinnou antiretrovirovou terapii je však potřebné hledat nové inhibitory, působící i na další kroky životního cyklu retrovirů, jako jsou např. vnitrobuněčný transport virové částice nebo proces jejího „pučení“. V poslední době směřuje pozornost i k novým přístupům včetně inhibice skládání virové částice[12]. K cílenému návrhu inhibitorů těchto procesů je nutné pochopení proteinových interakcí v částici i podrobná znalost uspořádání a struktury nezralé nebo zralé retrovirové částice. Použitím inhibitorů vybraných kroků životního cyklu retrovirů však nedochází ke kompletnímu odstranění virů z těla pacienta, neboť, jak bylo výše zmíněno, virus přetrvává ve formě integrovaného proviru v lidském genomu. Nadějnou strategií by mohla být genová terapie cílená na všechny buňky obsahující provirus. Prvním krokem v tomto směru bylo použití *ex vivo* genové terapie, při transplantaci kmenových buněk kostní dřeně ošetřených tak, aby neprodukovaly CCR5 koreceptor HIV[11].

4. Strukturní proteiny retroviru

Retrovirová částice primárně vzniká v nezralé formě, tvořené polyproteinovými prekurzory (obr. 1A). Až po uvolnění z buňky jsou prekurzory štěpeny a vzniklé produkty tvoří zralý infekční virion (obr. 1B). Společné strukturní proteiny v prekurzoru Gag u všech retrovirů jsou matrixový (MA), kapsidový (CA) a nukleokapsidový (NC) protein.

Matrixový protein je zodpovědný za cílení Gag na místo skládání nezralé virové částice (buď přímo k cytoplasmatické membráně nebo k jádru infikované buňky), iniciuje interakci s membránou, s níž po maturaci zůstává asociován. Na *N*-konci je kotranslačně myristoylovaný, což zvyšuje jeho afinitu k membráně. Má také velký vý-



Obr. 1. **Schéma struktury nezralé (A) a zralé (B) HIV částice. Barevně jsou znázorněny domény polyproteinů;** a) **Gag**: tmavě zelená – matrixový protein, červená – kapsidový protein, žlutá – nukleokapsidový protein, b) Gag-**Pol**: fialová – retrovirová proteasa, světle zelená – reverzní transkriptasa, světle modrá – integrasa, c) **povrchových glykoproteinů:** tmavě růžová – povrchová podjednotka (SU), modře – transmembránová podjednotka (TM) ukotvená v lipidové membráně. Černě je znázorněna genomová nukleová kyselina

znam při inkorporaci komplexu povrchových glykoproteinů do virionu. Pravděpodobně se podílí i na vazbě retrovirového genomu při tvorbě nezralé částice.

Kapsidový protein je hlavním mediátorem skládání virové částice, neboť se podílí na hlavních interakcích vedoucích k vytvoření jak nezralé částice, tak (po maturaci) i „core“ zralého virionu.

Nukleokapsidový protein působí jako „chaperon“ virové genomové RNA, tedy protein zabezpečující správnou prostorovou strukturu RNA. NC zprostředkovává dimerizaci a specifickou inkorporaci RNA do nezralé částice, k jejímuž vytvoření tak přispívá. V „core“ tvoří prostřednictvím zinkových prstů a bazické oblasti komplex s virovou RNA.

U řady virů jsou v polyproteinu Gag přítomny i další proteiny mezi MA a CA, či krátké peptidy mezi CA a NC, nebo za NC, které mají různé specifické role (někdy dosud neznámé) v životním cyklu retrovirů.

5. Skládání a struktura retrovirových částic

Bylo zjištěno, že ke skládání proteinové schránky retrovirových částic není nutné prostředí přirozeného hostitele, neboť exprese samotného genu *gag* vedla k tvorbě viru podobných částic (VLP; z angl. virus-like particles) i ve hmyzích[13] nebo bakteriálních buňkách[14]. Bylo prokázáno, že tyto částice jsou svým strukturním uspořádáním shodné s virovými částicemi vytvořenými ve svém přirozeném prostředí, tedy v infikovaných živočišných buňkách. Navíc bylo ukázáno, že lze VLP připravit i z izolovaných proteinů Gag mimo buňku. Poprvé byly *in vitro* poskládány částice z purifikovaného polyproteinu Gag M-PMV produkovaného v *E. coli*[14]. Na toto zjištění navázalo mnoho dalších studií tvorby částic ostatních retrovirů a obecně lze říci, že *in vitro* systém skládání, jak nezralých, tak i zralých retrovirových částic, slouží po mnoho let ke studiu těchto základních kroků životního cyklu retrovirů. Tento systém se ukázal jako velmi výhodný i pro testování velkých souborů látek s cílem vyhledat potenciální inhibitory skládání retrovirových částic.

Pro přípravu retroviru podobné částice *in vitro* lze použít i zkrácené mutanty Gag. Je však vždy nezbytné zachovat CA protein, který je základní strukturní determinantou virové částice a je zodpovědný za vzájemné intra- a inter-molekulární interakce při oligomerizaci proteinů a tvorbě retrovirové částice. Samotný CA různých retrovirů vytváří za vhodných podmínek tubulární, kónické anebo i sférické útvary, podobné „core“ zralého viru. Pro tvorbu těchto „core“ *in vitro* je zapotřebí dosáhnout zvýšené lokální koncentrace CA, která podpoří vzájemné, převážně hydrofobní interakce nutné pro iniciaci skládání částice. Toho může být dosaženo buď v přítomnosti vysoké koncentrace soli, nebo v prostředí inertních makromolekul, tzv. „crowding agents“[15]. Částice zralého uspořádání je možné poskládat i z fúzního proteinu CANC. Tento proces je samovolný i bez výše zmíněných podmínek, neboť NC v přítomnosti nukleové kyseliny iniciuje přiblížení domén CA, které následně vzájemně interagují[16]. Při přípravě CANC lze navíc výhodně využít přítomnosti zinkových prstů v NC pro purifikaci metaloafinitní chromatografií[17] a eliminovat tak přítomnost histidinové kotvy, která ovlivňuje morfologii *in vitro* poskládaných částic[18].

Skládání nezralé VLP je možno navodit stíněním, nebo odstraněním *N*-koncové aminokyseliny CA proteinu, prolinu[19]. To zabrání vzniku zralého „core“, pro jehož vytvoření je nutný strukturní motiv β-ohybu, který *in vivo* vzniká při zrání retrovirů (po vyštěpení CA z prekurzoru Gag) interakcí *N*-terminálního prolinu CA s Asp v pozici 50 až 57 (cit.[20–22]). V případě nezralé částice totiž β-ohyb

nevzniká, neboť *N*-koncový prolin CA je vázán na předchozí sekvenci řetězce Gag. Nezralé částice lze v *in vitro* systému na rozdíl od zralých částic připravit za fyziologických podmínek; neutrálního pH a nízké iontové síly.

5.1. Nezralá částice

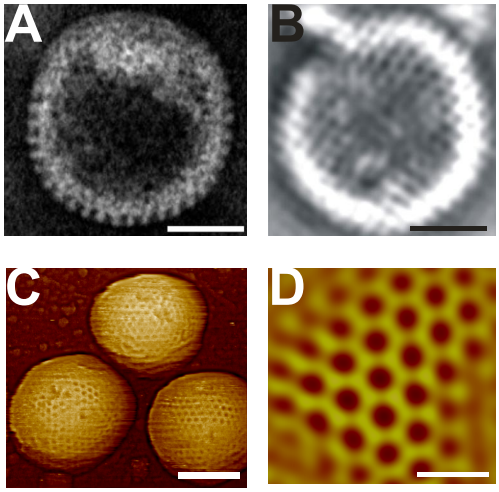
Nezralé retrovirové částice jsou sférické a mají většinou uniformní velikost, která může být v závislosti na typu viru 90–120 nm, což souvisí s různým počtem molekul Gag v částici (mezi 1500–2500 kopií).

Interakce molekul Gag v nezralé retrovirové částici byly studovány převážně u HIV, viru Rousova sarkomu (RSV) a M-PMV. Je známo, že hlavními interakčními motivy jsou CA a NC domény Gag a nikoli MA. Ačkoliv MA může v roztoku trimerizovat[23] a na lipidové membráně tvořit hexamery[24], pravděpodobně není v rámci celého Gag dostatečně silným interakčním motivem, aby mohl přispět k vytvoření nezralé částice. CA vytváří v nezralé částici hexamerní prstence, navzájem propojené různými typy interakcí, které se liší od interakcí ve zralé retrovirové částici, viz níže.

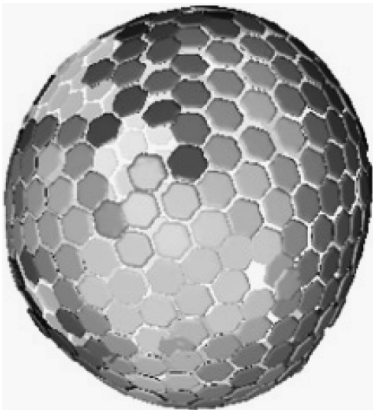
Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) je možné v nezralé retrovirové částici (negativně barvené) vizualizovat jednotlivé molekuly Gag, které jsou radiálně umístěny, přičemž *N*-konec Gag je exponován vně částice a jeho *C*-konec zasahuje dovnitř (obr. 1). Dříve se předpokládalo, že sférická, nezralá retrovirová částice je ikosaedrální, nebo má strukturu fullerenu podobné mřížky. V případě ikosaedrálního uspořádání by hexamerní síť tvořící plochy musela být doplněna dvanácti pentamery ve vrcholech. Přítomnost takovýchto pentamerů však nebyla prokázána.

Mikroskopií atomárních sil (AFM) byly pozorovány stovky *in vitro* připravených nezralých částic M-PMV, složených z CANC s odstraněným *N*-koncovým prolinem[25]. V hexamerním uspořádání strukturních proteinů lze pozorovat praskliny bez přítomnosti pentamerů nebo oblastí s pětičetnou symetrií (obr. 2). Tato studie ukázala, že nezralé retrovirové částice nejsou sféry s pravidelným uspořádáním proteinových podjednotek. Pomocí kryo-elektronové mikroskopie (kryo-EM) a tomografie byly analyzovány nezralé částice připravené z celého Gag, i z výše zmíněného, modifikovaného CANC. Tato metoda, která na rozdíl od výše zmíněné analýzy povrchu částic poskytla 3D analýzu celé částice, jednoznačně prokázala, že nezralá retrovirová částice je nekompletní sférický útvar (obr. 3). Potvrdila rovněž, že oblasti s hexagonální symetrií jsou přerušovány nepravidelnými prasklinami[26].

Skládání nezralé částice je velmi rychlé a tvorba sítě polyproteinů Gag je pravděpodobně iniciována z jednoho hexameru CA všemi směry. Při připojování dalších hexamerních podjednotek dochází mezi nimi k určitému pnutí, které se zvyšuje s počtem připojených podjednotek. V okamžiku, kdy je pnutí vyšší než flexibilita celé proteinové sítě, vzniká nepravidelnost ve struktuře částice. Z tohoto důvodu jsou nezralé retrovirové částice nepravidelné sféry, jejichž lokální pravidelné hexamerní uspořádání proteinových podjednotek je doplněno řadou nepravidelností, tj. chybějících molekul Gag. Defekty a nepravidelnosti ve struktuře nezralé retrovirové částice mají pravděpodobně význam při zrání retrovirů. Konkrétně při interakci s buněčnými membránovými proteiny při pučení. U *C*-konce Gag (tedy uvnitř nezralé částice) totiž byly lokalizovány aminokyselinové sekvence nezbytné pro tento proces, které by v případě kompletního uzavření hexamerní sítě nebyly přístupné. Nemenší význam



Obr. 2. **Zobrazení nezralé *in vitro* složené částice M-PMV pomocí TEM a AFM:** metodou negativního barvení (panel A), analýza obrazu TEM filtrací FFT (panel B). Panel C – zobrazení v kapalném prostředí pomocí AFM, panel D – analýza obrazu AFM filtrací FFT. Úsečka v panelech A a B představuje 30 nm, v panelu C 80 nm a v panelu D 15 nm. Obrázek C převzat z Kuznetsov, et al.: Virology *360*, 434 (2007), doi:10.1016/j.virol.2006.10.015 (Copyright © Elsevier Inc. 2006)

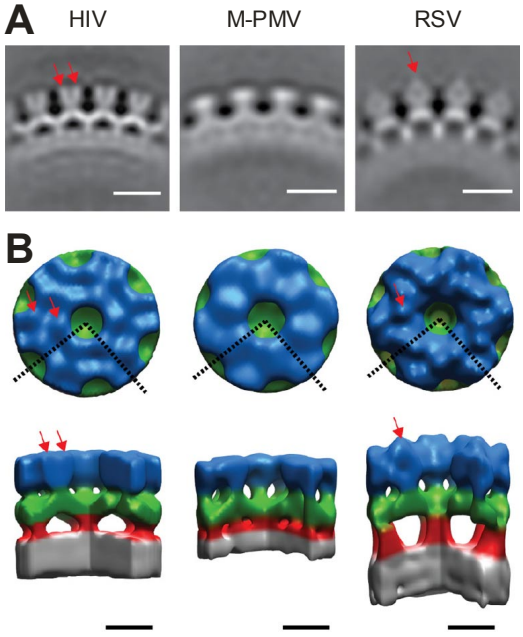


Obr. 3. **Globální hexamerní uspořádání proteinových podjednotek v nezralých *in vitro* složených částicích M-PMV.** Intenzity šedé barvy vyjadřují míru pravděpodobnosti výskytu hexameru na daném místě sférické částice. Převzato z de Marco, et al.: Journal of Virology *84*, 1129 (2010), doi:10.1128/JVI.01423-10 (Copyright © American Society for Microbiology 2010)

prasklin lze předpokládat při prvním kroku zrání částice, jímž je odštěpení MA od zbytku Gag. Vzhledem k tomu, že je proteasa lokalizována v rámci Gag-Pol ve středu částice a MA doména Gag je na povrchu, lze si těžko představit interakci proteasy s MA v rámci kompletní a poměrně rigidní částice. U D-typu retrovirů, skládajících nezralé částice v cytoplasmě, by praskliny mohly mít význam i při jejich transportu k membráně.

Bylo zjištěno, že přestože hlavní strukturní domény (CA a NC) u různých typů retrovirů, konkrétně HIV, RSV (vznikají u membrány) a M-PMV (vzniká u jádra), jsou v zásadě velmi podobné, existují mezi nimi určité odlišnosti v oblasti peptidu oddělujícího CA a NC (SP1) a částečně i v uspořádání NTD CA (obr. 4).

Nepravidelnosti v nezralé sférické částici bránily získání jejího elektronmikroskopického obrazu ve vysokém rozlišení pro určení přesné pozice a orientace jednotlivých strukturních proteinů. Přestože jsou známy struktury CA různých retrovirů (NMR a krystalografická data), nebylo možné přesně určit jejich interakční rozhraní. Nedávno se však podařilo z proteinu CANC M-PMV, postrádajícího *N*-koncový prolin, připravit tubulární částice se stejným uspořádáním jako je v nezralé sférické retrovirové částici. Díky pravidelnému uspořádání proteinů v tubule



Obr. 4. **Panel A- znázornění průřezu nezralých částic tří typů retrovirů, pomocí kryo-EM a tomografické analýzy. Panel B- subtomogramová analýza hexamerní strukturní podjednotky částice, výše pohled shora a níže pohled z boku.** Modře je zobrazena NTD CA, zeleně CTD CA, červeně tzv. „spacer peptid“, šedě část NC s navázanou nukleovou kyselinou. Červené šipky v panelech A i B označují vzájemně si odpovídající části NTD CA. Úsečky reprezentují 10 nm. Převzato a upraveno z de Marco, et al.: Journal of Virology *84*, 1129 (2010), doi:10.1128/JVI.01423-10 (Copyright © American Society for Microbiology 2010)

bylo možné pomocí kryo-EM a tomografie analyzovat a rekonstruovat její strukturu s rozlišením 0,8 nm (cit.[27]). Tato metoda poskytla obraz nezralé částice s přesně definovanými obrysy elektronových hustot helixů CA, což dovolilo do získané mapy přesně orientovat jednotlivé známé struktury kapsidového proteinu (obr. 5). Získaný model je aplikovatelný na sférickou částici a vzhledem ke strukturní podobnosti všech retrovirových CA je obecně platný pro retroviry.

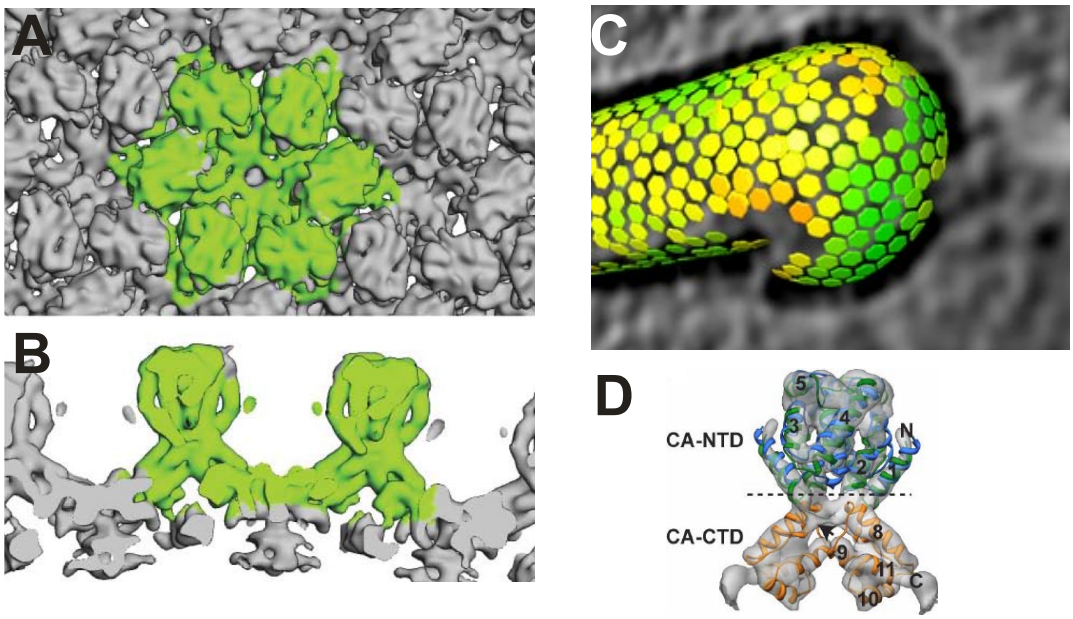
CA se skládá ze dvou relativně nezávislých domén, NTD CA a CTD CA, které jsou navzájem spojeny flexibilní spojkou. V hexamerní síti nezralé retrovirové částice, fixované vazbami CA, lze nalézt tři typy symetrií. NTD CA jsou v hexamerních prstencích kolem velkých otvorů a mají sice šestičetnou symetrii, ale nejsou spojeny přímými intra-hexamerními interakcemi. Tyto interakce lze naopak nalézt u CTD CA v oblasti konzervované u všech retrovirů, tzv. hlavní homologní oblasti. To vysvětluje význam této domény a důvod pro její zachování u různých retrovirů během evoluce. CTD CA i NTD CA fixují sousední hexamery silnými dimerními interakcemi s dvoučetnou symetrií. Mezi jednotlivými dimery NTD CA lze však najít i tříčetnou symetrii, a to v místech kontaktu sousedních hexamerů[27].

V Gag HIV se nacházejí ještě dva tzv. „mezerníkové peptidy“ (spacer peptides; SP), což jsou domény Gag označované jako SP1 (umístěný mezi CA a NC) a SP2 (přítomný za NC). Bylo předpovězeno, že SP1 je významným interakčním motivem, který tvoří šest navzájem interagujících helixů. NC není v nezralé částici strukturovaný, dokonce není nutný ani pro vytvoření nezralé VLP. Jeho roli při iniciaci interakcí domén CA lze nahradit jinými peptidy s interakčním motivem, např. dimerizační doménou typu leucinového zipu[28]. Nedávné výsledky rovněž ukázaly, že pro tvorbu nezralé VLP postačuje pouze CA s *N*-terminální částí NC, jejíž bazická rezidua zřejmě vazbou na nukleovou kyselinu podporují iniciační interakce nutné pro skládání částice[29]. Tedy NC pravděpodobně slouží, díky své vazbě na nukleovou kyselinu, pouze k vhodnému přiblížení interakčních oblastí kapsidového proteinu.

O strukturním významu a interakcích dalších domén některých retrovirů, např. fosfoproteinové domény a proteinu p12 u M-PMV, nebo krátkých peptidů p4 u M-PMV či p6 u HIV zatím není nic známo. Bylo však prokázáno, že p12 obsahuje silný interakční motiv, vedoucí k jeho oligomerizaci *in vitro*[30] a peptidy p6 a p4 hrají roli při interakci s buněčnými proteiny stimulujícími odškrcení viru z cytoplasmatické membrány.

5.2. Vznik a struktura zralé částice

V okamžiku, kdy nezralá retrovirová částice opouští buňku procesem podobným pučení, dochází dosud neznámým způsobem k aktivaci retrovirové proteasy, která postupně a přesně definovaně rozštěpí Gag na jednotlivé funkční domény. Toto štěpení způsobí zásadní změny struktury retrovirové částice, kdy dochází ke kompletnímu



Obr. 5. **Subtomogramová analýza tubulární *in vitro* složené nezralé částice M-PMV.** Zobrazení hexamerního uspořádání podjednotek shora – panel A, a z boku – panel B, zeleně je zvýrazněna jedna strukturní hexamerní podjednotka částice. Panel C – uspořádání hexamerních proteinových podjednotek v tubulární částici zakončené sférou. Různé barvy udávají míru pravděpodobnosti výskytu hexameru v rámci částice, zelená znamená nejvyšší pravděpodobnost, žlutá pak nižší. Panel D – struktury retrovirových proteinů umístěné do mapy elektronových densit získané ze subtomogramového průměrování. C, N – C a N-terminální část CA proteinu. Čísla označují jednotlivé helixy CA proteinu. Převzato a upraveno z Bharat, et al.: Nature *487*, 385 (2012), doi:10.1038/nature11169 (Copyright © Nature Publishing Group 2012)

přeskupení jednotlivých proteinů a i ke změně jejich vzájemných interakcí. Uvolněný NC kondenzuje s genomovou nukleovou kyselinou ve středu částice. Odštěpený MA zůstává asociován s membránou prostřednictvím tzv. bipartitního interakčního motivu, sestávajícího z bazické domény na povrchu a *N*-terminálního zbytku kyseliny myristové, který se zanořuje do membrány[31,32]. A CA vytvoří okolo nukleoproteinu (komplexu NC-RNA) jádro, tzv. „core“. Zbytek molekul CA zůstává v částici volně. Některé zralé retrovirové částice mohou obsahovat dvě i více „core“[33].

Z publikovaných struktur obou domén CA různých retrovirů vyplývá, že i přes značnou rozdílnost v primární struktuře CA jsou terciární struktury těchto domén téměř totožné u všech retrovirů. NTD CA je tvořena sedmi helixy a CTD CA čtyřmi helixy. Retrovirové CA navíc obsahují konzervované části, důležité pro zajištění protein-proteinových interakcí a stabilizaci částice. Jedná se zejména o dimerizační doménu a tzv. hlavní homologní oblast. Důležitý je i výše zmíněný β-ohyb, vznikající po vyštěpení CA z polyproteinu Gag. U HIV je pro vytvoření tohoto ohybu navíc nutné i odštěpení peptidu SP1. Ačkoliv je β-ohyb nezbytný pro tvorbu „core“ ve zralé částici, bylo zjištěno, že pravděpodobně nehraje významnou roli ve vzájemných interakcích molekul CA.

Při zrání viru vzniká „core“ procesem, který není dosud zcela objasněn. Úvaze, že jeho velikost je určena velikostí vnitřního prostoru částice, odporují nepublikovaná data, ukazující, že velikost „core“ připravených z izolovaného CA *in vitro*, tedy mimo částici, je shodná s virovým „core“. Uspořádání CA v “core“ retrovirů, zejména HIV, RSV a MLV, bylo studováno transmisní elektronovou mikroskopií a kryo-elektronovou mikroskopií spojenou s tomografií. Bylo zjištěno, že CA proteiny jsou v “core“ umístěny do pravidelné hexamerní mřížky, jejíž geometrie je odvozená od fullerenů. Přes podobné hexamerní uspořádání se vzdálenost center jednotlivých hexamerů ve zralé a nezralé částici liší. Tvar „core“ může být sférický (např. v RSV), tubulární (M-PMV) nebo kónický (HIV), ale „core“ mohou mít i jiné tvary, nebo být amorfní[34]. Zakřivení a uzavření struktury je umožněno díky přítomnosti pentamerů strukturních proteinů, umístěných v případě tubulárních a kónických „core“ na jejich zaoblených koncích[35], nebo v případě sférického tvaru jsou tyto pentamery rovnoměrně rozmístěny[36].

Krystalografií, kryo-elektronovou mikroskopií a tomografií byla vyřešena struktura zralého „core“ HIV s velmi vysokým rozlišením[37]. Bylo zjištěno, že „core“ je stabilizováno pomocí několika protein-proteinových interakčních rozhraní. Pro detailní analýzy proteinových interakcí ve zralé částici HIV byly připraveny i krystaly hexameru a pentameru CA proteinu[37]. Při pohledu shora se uspořádání proteinů jeví jako hexamerní síť, která je tvořena dvěma prstenci, spodním z CTD CA a svrchním z NTD

CA. Kontakty mezi hexamerními podjednotkami zajišťují dimerní CTD-CTD interakce CA v sousedních hexamerech. V rámci jednoho hexameru jsou CA proteiny propojeny pomocí jejich NTD-NTD interakcí a NTD-CTD interakcí. Překvapivě se jednotlivé interakce v pentameru a hexameru liší minimálně[36]. Volba, zda bude do hexamerní sítě inkorporován pentamer nebo hexamer, závisí na elektrostatických silách a stérických požadavcích proteinové sítě. Podrobné znalosti struktur zralé i nezralé částice s vysokým rozlišením umožnily simulaci zrání retrovirové částice a vysvětlení strukturních změn včetně určení změn jednotlivých interakčních rozhraní NTD i CTD kapsidového proteinu při tomto procesu[27].

6. Metody studia struktury retrovirů

6.1. Elektronmikroskopické techniky

Základní metodou studia struktur retrovirových částic je elektronová mikroskopie. Jelikož při použití detailních struktur biologických vzorků je reálné rozlišení skenovacího elektronového mikroskopu nedostatečné, je nutné použít transmisní elektronový mikroskop. Rozlišovací schopnost TEM totiž umožňuje vizualizovat i jednotlivé proteiny virové částice, např. polyprotein Gag. Ze získaných dat lze poté vhodnou metodou analýzy obrazu, jako je např. i Fourierova transformace, určit uspořádání proteinů v částicích (obr. 2). Takto bylo zjištěno, že strukturní polyproteiny Gag jsou v retrovirové částici uspořádány do hexamerní mřížky[38]. Mikroskopií ultratenkých řezů transformovaných nebo infikovaných buněk lze pozorovat vytvořené retrovirové částice i v bakteriálních nebo živočišných buňkách. Ovšem nevýhodou základních metod elektronové mikroskopie virových částic, jako je např. negativní barvení pomocí solí těžkých kovů, je fakt, že při vysušení vzorku může dojít k ovlivnění jeho struktury. Z tohoto důvodu se v poslední době k určení detailní struktury virových částic nejčastěji využívá kryo-elektronová mikroskopie, kdy je vzorek v kapalině velmi rychle zamražen při velmi nízké teplotě (cca –190 °C), čímž zůstává zachována jeho struktura. Kombinací této metody s tomografickou analýzou je možné odhalit 3D struktury částic virů s velmi vysokým rozlišením (obr. 4, 5). Pro tyto metody je ovšem nutno disponovat nejen velmi kvalitním mikroskopem, ale i špičkovým počítačovým a softwarovým vybavením, umožňujícím složitou analýzu získaných obrazů. Rozlišení získané struktury virové částice je závislé na pravidelnosti uspořádání jednotlivých domén strukturních proteinů v rámci částice.

6.2. Určení 3D struktury retrovirové částice

K vyřešení 3D struktury retrovirové částice lze s výhodou použít kryo-elektronové mikroskopie s následnou tomografií. Nejprve je potřeba získat dostatečné množství snímků částic s co nejvyšším rozlišením. Tomografická analýza probíhá tak, že je pozorovaná virová částice snímána z mnoha různých úhlů, záznamy elektronových densit jsou poté zpracovány analýzou obrazu, poskytující obrázek 3D struktury částice, tzv. tomogram. Pro zvýšení rozlišení vybrané části struktury částice lze tomogram rozdělit do řady menších částí, tzv. subtomogramů, které se poté navzájem porovnávají, a hledá se mezi nimi shoda. Pokud dojde k vhodné korelaci mezi jednotlivými elektronovými densitami, mohou tyto být zprůměrovány, což výrazně zvýší rozlišení subtomogramu, reprezentujícího část 3D struktury virové částice (obr. 4, 5).

Do získaných map elektronových densit je pak možné vložit známé struktury virových proteinů či jejich domén, které byly získány rentgenovou krystalografií anebo NMR spektroskopií (obr. 5). Čím je rozlišení struktury virové částice vyšší, tím přesněji lze struktury proteinů do elektronové mapy umístit. Vzhledem ke komplexnímu uspořádání a flexibilitě jednotlivých domén Gag a zejména úseků, které je spojují, se dosud nepodařilo připravit jeho krystal pro vyřešení jeho struktury. Byly však vyřešeny struktury jednotlivých domén Gag. Flexibilní úseky spojující strukturované části nejsou pravděpodobně pravidelně uspořádané, což má logický důvod, umožňují totiž jednotlivým proteinům se natáčet a interagovat prostřednictvím různých interakčních rozhraní. Hrají také podstatnou roli při zrání retrovirové částice, tedy při štěpení Gag na jeho jednotlivé domény, neboť jsou snadno přístupné proteolytickému štěpení.

6.3. Mikroskopie atomárních sil

Pro pozorování struktury virových částic je možné použít i mikroskopii atomárních sil (AFM), která umožňuje vizualizaci povrchu studovaného předmětu pomocí jemného hrotu. Velmi šetrné je zejména použití tzv. semikontaktního módu, při pozorování retrovirových částic v kapalině, což eliminuje deformaci jejich tvaru a povrchové struktury. Tato metoda také poskytuje velmi vysoké rozlišení, umožňující po vhodné analýze obrazu i vizualizaci jednotlivých proteinů v částici a určení jejich uspořádání (obr. 2). Její nevýhodou je však omezení pouze na zobrazení povrchu pozorovaného vzorku, který by měl být v optimálním případě planární. Zakřivení povrchu v případě sférických částic značně limituje rozlišení. Pozorováním povrchu nativních VLP pomocí AFM bylo poprvé zjištěno, že nezralá retrovirová částice je nekompletní sféra[25], s množstvím defektů a že se nejedná o ikosaedrální či fullerenu podobné uspořádání strukturních proteinů částice, tak jak je tomu často u jiných sférických virů.

7. Závěr

Vyřešení struktury zralé i nezralé retrovirové částice s vysokým rozlišením bylo zásadním pokrokem pro získání podrobné informace nejen o přesném umístění jednotlivých strukturních proteinů a jejich domén v částicích, ale i o kritických interakčních rozhraních těchto proteinů. Tyto výsledky by tak mohly být významnou pomocí při

snaze hledat nové inhibitory procesů skládání či zrání retrovirové částice. Jednou z možností je např. použití počítačového modelování pro cílené navrhování látek blokujících protein-proteinové interakce v retrovirových částicích a zabraňujících složení částice. Na základě porovnání struktur zralé a nezralé virové částice byl také simulován proces zrání retrovirové částice, který přispívá i k rozšíření obecných znalostí o životním cyklu retrovirů.

Seznam použitých zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil
CA	kapsidový protein
CTD	*C*-terminální doména
FFT	rychlá Fourierova transformace
HAART	vysoce účinná antiretrovirová terapie
kryo-EM	kryo-elektronová mikroskopie
MA	matrixový protein
M-PMV	Mason-Pfizerův opičí virus
NC	nukleokapsidový protein
NTD	*N*-terminální doména
RSV	virus Rousova sarkomu
SP	mezerníkový peptid
SU	povrchová podjednotka povrchového glykoproteinu
TM	transmembránová podjednotka povrchového glykoproteinu
VLP	viru podobná částice

Práce vznikla za podpory grantu MŠMT KONTAKT číslo: LH12011.

LITERATURA

1. Cortez K. J., Maldarelli F.: Viruses *3*, 347 (2011).
2. Sakuma T., Barry M. A., Ikeda Y.: Biochem. J. *443*, 603 (2012).
3. Lever A. M. L., Jeang K.-T.: Biochemistry *50*, 920 (2011).
4. Ganser-Pornillos B. K., Yeager M., Pornillos O.: Adv. Exp. Med. Biol. *726*, 441 (2012).
5. Smekalova Z., Ruml T.: Chem. Listy *100*, 1068 (2006).
6. Kohoutová Z., Rumlová M., Andreánsky M., Sakalian M., Hunter E., Pichová I., Ruml T.: Virology *384*, 59 (2009).
7. Vlach J., Lipov J., Rumlová M., Veverka V., Lang J., Srb P., Knejzlík Z., Pichová I., Hunter E., Hrabal R., Ruml T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 10565 (2008).
8. Balasubramaniam M., Freed E. O.: Physiology (Bethesda) *26*, 236 (2011).
9. Rumlová M., Ruml T., Pohl J., Pichová I.: Virology *310*, 310 (2003).
10. Grznárová P., Lipov J.: Chem. Listy *104*, 1006 (2010).
11. Lai Y.: Curr. Stem Cell Res. Ther. *7*, 310 (2012).
12. Marsden M. D., Zack J. A.: J. Antimicrob. Chemother. *63*, 7 (2009).
13. Gheysen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thines D., De Wilde M.: Cell *59*, 103 (1989).
14. Klikova M., Rhee S. S., Hunter E., Ruml T.: J. Virol. *69*, 1093 (1995).
15. del Alamo M., Rivas G., Mateu M. G.: J. Virol. *79*, 14271 (2005).
16. Ulbrich P., Haubova S., Nermut M. V., Hunter E., Rumlova M., Ruml T.: J. Virol. *80*, 7089 (2006).
17. Voráčková I., Suchanová S., Ulbrich P., Diehl W. E., Ruml T.: Protein Expr. Purif. *79*, 88 (2011).
18. Rumlová M., Benedíková J., Cubínková R., Pichová I., Ruml T.: Protein Expr. Purif. *23*, 75 (2001).
19. Rumlova-Klikova M., Hunter E., Nermut M. V., Pichova I., Ruml T.: J. Virol. *74*, 8452 (2000).
20. 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).
21. Macek P., Chmelík J., Křížová I., Kadeřávek P., Padrta P., Žídek L., Wildová M., Hadravová R., Chaloupková R., Pichová I., Ruml T., Rumlová M., Sklenář V.: J. Mol. Biol. *392*, 100 (2009).
22. Cortines J. R., Monroe E. B., Kang S., Prevelige P. E.: J. Mol. Biol. *410*, 641 (2011).
23. Vlach J., Srb P., Prchal J., Grocký M., Lang J., Ruml T., Hrabal R.: J. Mol. Biol. *390*, 967 (2009).
24. Alfadhli A., Barklis R. L., Barklis E.: Virology *387*, 466 (2009).
25. Kuznetsov Y. G., Ulbrich P., Haubova S., Ruml T., McPherson A.: Virology *360*, 434 (2007).
26. de Marco A., Davey N. E., Ulbrich P., Phillips J. M., Lux V., Riches J. D., Fuzik T., Ruml T., Kräusslich H.-G., Vogt V. M., Briggs J. A. G.: J. Virol. *84*, 11729 (2010).
27. Bharat T. a M., Davey N. E., Ulbrich P., Riches J. D., de Marco A., Rumlova M., Sachse C., Ruml T., Briggs J. A. G.: Nature *487*, 385 (2012).
28. Crist R. M., Datta S. a K., Stephen A. G., Soheilian F., Mirro J., Fisher R. J., Nagashima K., Rein A.: J. Virol. *83*, 2216 (2009).
29. Bohmova K., Hadravova R., Stokrova J., Tuma R., Ruml T., Pichova I., Rumlova M.: J. Virol. *84*, 1977 (2009).
30. Knejzlík Z., Smékalová Z., Ruml T., Sakalian M.: Virology *365*, 260 (2007).
31. Bouamr F., Scarlata S., Carter C.: Biochemistry *42*, 6408 (2003).
32. Tang C., Loeliger E., Luncsford P., Kinde I., Beckett D., Summers M. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 517 (2004).
33. Briggs J. A. G., Wilk T., Welker R., Kräusslich H.-G., Fuller S. D.: EMBO J. *22*, 1707 (2003).
34. Ganser-Pornillos B. K., Yeager M., Sundquist W. I.: Curr. Opin. Struct. Biol. *18*, 203 (2008).
35. Pornillos O., Ganser-Pornillos B. K., Kelly B. N., Hua Y., Whitby F. G., Stout C. D., Sundquist W. I., Hill C. P., Yeager M.: Cell *137*, 1282 (2009).

36. Cardone G., Purdy J. G., Cheng N., Craven R. C., Steven A. C.: Nature *457*, 694 (2009).
37. Pornillos O., Ganser-Pornillos B. K., Yeager M.: Nature *469*, 424 (2011).
38. Nermut M. V., Bron P., Thomas D., Rumlova M., Ruml T., Hunter E.: J. Virol. *76*, 4321 (2002).

P. Ulbrich, T. Füzik, R. Píchalová, I. Voráčková, and T. Ruml *(Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague)*: **Structure of Retroviral Particles as a Tool for Designing HIV Inhibitors**

This article describes basic principles of retroviral shell architecture and the approaches to its studies. Elucidation of the retrovirus particle structure, both in immature and mature forms, is essential for designing compounds that could block interactions at interfaces of viral proteins, which are critical for formation and stability of the particle. Detailed understanding of HIV structure could thus be a significant tool in the search for novel types of HIV inhibitors targeted on the assembly or maturation of this virus.