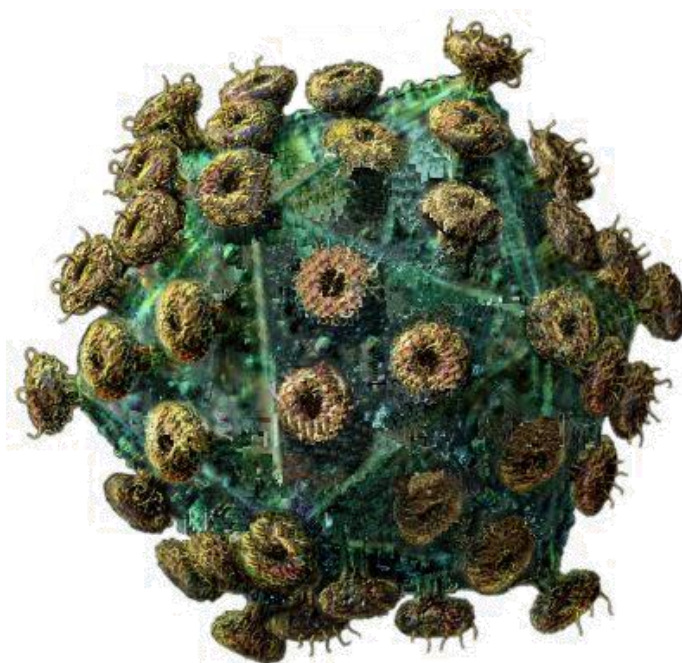


*Badania roli odwrotnej transkryptazy
w generowaniu zmienności genetycznej wirusa HIV*

Anna Kurzyńska-Kokorniak



*Praca doktorska wykonywana w Zespole Wirusologii Molekularnej
Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, w latach 1999-2004
pod kierunkiem doc. dr hab. Marka Figlerowicza*

*Gorące podziękowania składam
doc. dr hab. Markowi
Figlerowiczowi
za przekazaną wiedzę i
wrozumiałość, za stworzenie
miłej atmosfery pracy oraz za
obracanie każdego*

*Serdeczne podziękowania
składam
prof. dr hab. Mariuszowi
Jaskólskiemu
za przekazaną wiedzę
oraz za umożliwienie napisania
tej pracy*

*Pracownikom Instytutu Chemii
Bioorganicznej PAN w Poznaniu,
a szczególnie
Zespołowi Wirusologii
Molekularnej*

SPIS TREŚCI

1. WSTEP

7

1.1 Pochodzenie HIV

8

1.2 Budowa i replikacja HIV-1

13

1.3 Odwrotna transkrypcja

20

1.4 Budowa HIV-1 RT

24

1.5 Molekularne podstawy zmienności genetycznej wirusów typu RNA

29

1.5.1 Mutacje punktowe

30

1.5.2 Rearanżacje genomu wirusowego

34

2. CEL PRACY

46

3. MATERIAŁY I METODY

47

3.1 Materiały

47

3.1.1 Enzymy

47

3.1.2 Izotopy

47

3.1.3 Startery oraz matryce

47

3.1.4 Plazmidy

49

3.1.5 Bakterie

51

3.1.6 Gotowe zestawy do badań biochemicznych

51

3.1.7 Roztwory	52
3.1.8 Bufory	53
3.1.9 Pożywki	56
3.1.10 Żele	56
3.1.11 Wzorce długości DNA	58
3.1.12 Wzorce masy białek	58
3.2 Metody	59
3.2.1 Otrzymywanie białek	59
3.2.2 Amplifikacja DNA metodą PCR	62
3.2.3 Otrzymywanie poszczególnych podjednostek HIV-1 RT i jej mutantów	62
3.2.4 Otrzymywanie matryc	71
3.2.5 Analiza produktów reakcji wydłużania startera	73
3.2.6 Oczyszczanie kwasów nukleinowych	74
3.2.7 Otrzymywanie plazmidów	74
3.2.8 Trawienie dsDNA enzymami restrykcyjnymi	76
3.2.9 Wypełnianie jednoniciowych wystających końców 5' w dsDNA	77
3.2.10 Ligacja	77
3.2.11 Sekwencjonowanie	78

3.2.12	Transkrypcja <i>in vitro</i>	80
3.2.13	Izolacja kwasów nukleinowych z żeli poliakryloamidowych	81
3.2.14	Radioizotopowe znakowanie ssDNA na końcu 5'	81
3.2.15	Reakcja wydłużania startera na matrycy ssDNA lub RNA	82
3.2.16	Analiza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych	85
3.2.17	Analiza kwasów nukleinowych w żelach poliakryloamidowych	86
3.2.18	Analiza białek w żelach poliakryloamidowych	87

4. WYNIKI I DYSKUSJA

88

4.1 Otrzymywanie HIV-1 RT i jej podjednostek

88

4.1.1 Ekspresja HIV-1 RT w komórkach bakteryjnych

88

4.1.2 Oczyszczanie HIV-1 RT

90

4.1.3 Otrzymywanie podjednostki p51

93

4.1.3.1 Konstrukcja wektora ekspresyjnego p51pET

93

4.1.3.2 Ekspresja białka p51

93

4.1.3.3 Oczyszczanie białka p51

94

4.1.4 Otrzymywanie podjednostki p66

94

4.1.4.1 Konstrukcja wektora ekspresyjnego mutpDAR1

95

4.1.4.2 Ekspresja białka p66

96

4.1.3.3	<i>Oczyszczanie białka p66</i>	
		96
4.2	Badanie aktywności polimerazowej HIV-1 RT oraz homodimerów p66 i p51	
		97
4.2.1	Otrzymywanie matryc DNA i RNA	
		97
4.2.2	Wstępne badania aktywności polimerazowej	
		99
4.2.3	Optymalizacja warunków syntezy DNA	
		100
4.3	Wstępne badania wpływu struktury matrycy na wierność jej kopiowania	
		113
4.4	Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66	
		117
4.4.1	Rekombinacja homologiczna	
		117
4.4.1.1	<i>Wpływ struktury RNA rejonu liderowego HIV-1 na wydajność procesu rekombinacji</i>	
		118
4.4.1.2	<i>Badania aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66 wobec homologicznych rejonów R (HIV-R)</i>	
		124
4.4.1.3	<i>Badania aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66 wobec sekwencji homologicznych pochodzących z innego wirusa</i>	
		126
4.4.2	Rekombinacja niehomologiczna	
		130
4.4.2.1	<i>Lokalna struktura dwuniciowa jako czynnik wymuszający zatrzymywanie HIV-1 RT na matrycy donorowej</i>	
		134
4.4.2.2	<i>Badanie wpływu krótkich rejonów homologicznych na zdolność HIV-1 RT oraz homodimeru p66 do wykonywania niehomologicznych przeskoków rekombinacyjnych</i>	
		137
4.4.2.3	<i>Badanie wpływu degradacji lokalnej struktury dwuniciowej na zdolność HIV-1 RT oraz homodimeru p66 do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych</i>	
		139

4.4.3 Rekombinacja niehomologiczna wspierana przez cząsteczkę pomocniczą - HELPER
146

4.4.3.1 Konstrukcja układu do badania rekombinacji wspomaganej

146

4.4.3.2 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66
w układzie rekombinacji wspomaganej

148

**4.5 Wpływ oddziaływań HIV-1 RT z nicią potomną na przebieg
procesu homologicznej i niehomologicznej rekombinacji**

155

4.5.1 Mutageneza HIV-1 RT

156

4.5.1.1 Konstrukcja zmutowanych wektorów ekspresyjnych

156

4.5.1.2 Otrzymywanie mutantów podjednostki p66 HIV-1 RT

157

4.5.1.3 Otrzymywanie mutantów HIV-1 RT

158

4.5.2 Testowanie aktywności biologicznej mutantów HIV-1 RT

158

4.5.2.1 Aktywność polimerazowa

158

4.5.2.2 Aktywność rekombinacyjna

162

5. WNIOSKI

170

6. BIBLIOGRAFIA

172

1. WSTĘP

Spośród różnych zakażeń jakie mogą być wywoływane przez znane nam obecnie zakaźne czynniki chorobotwórcze, infekcje wirusowe charakteryzują się szczególną opornością na wszelkie metody terapii. Fakt ten nie zawsze jest przez nas dostrzegany ze względu na stosunkowo łagodny przebieg licznych chorób wirusowych. Niestety, obok łagodnych istnieją także i niezwykle groźne wirusy, do których z pewnością należy ludzki wirus upośledzenia odporności (HIV, *ang. human immunodeficiency virus*). Jak dotąd nie udało się opracować skutecznego leku czy szczepionki chroniącej przed infekcją HIV [Richman, 2001]. Podstawową trudnością, jaką napotykają badacze, jest niezwykle zmienność genetyczna tego drobnoustroju [Ho i wsp., 1995; Wei i wsp., 1995]. Stwierdzono, iż HIV potrzebuje zaledwie kilku tygodni czy miesięcy, by stać się opornym na każdy znany środek przeciwwirusowy [Coffin, 1995]. Zasadniczym warunkiem znalezienia skutecznych metod jego zwalczania jest więc dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie nowych, niewrażliwych na stosowane leki wariantów HIV. Stąd też jednym z głównych celów prowadzonych obecnie badań jest ustalenie, w jaki sposób dochodzić może do niezwykle szybkiej modyfikacji genomu wirusowego.

Zgodnie z centralnym dogmatem biologii molekularnej przepływ informacji genetycznej odbywa się od DNA poprzez RNA do białka. W przypadku wirusów zasada ta znajduje zastosowanie jedynie u tych, których genom zbudowany jest z DNA. U wirusów wykorzystujących RNA jako podstawowy nośnik informacji genetycznej powyższy schemat ulega uproszczeniu: RNA→białko (wirusy RNA), względnie rozbudowaniu: RNA→DNA→RNA→białko. Zgodnie z tym ostatnim schematem funkcjonują retrowirusy, a więc także HIV. Z zebranych dotychczas danych wynika, że istnieją dwa główne źródła niezwyklej zmienności genetycznej HIV, są nimi nieprecyzyjna replikacja genomu oraz genetyczna rekombinacja. W obydwu tych procesach kluczową rolę odgrywa odwrotna transkryptaza (HIV RT), która jest odpowiedzialna zarówno za nieprecyzyjne kopiowanie cząsteczek genomowych jak i za ich rekombinację. Częste wprowadzanie do genomu wirusowego mutacji punktowych, jest wynikiem braku aktywności naprawczej HIV RT. Z drugiej strony, obserwowana u HIV wysoka częstość rekombinacji wydaje się mieć ścisły związek z faktem, iż kompleks HIV RT-nić potomna posiada naturalną zdolność do przenoszenia się z jednej cząsteczki genomowej na inną, czyli do rekombinacji zachodzącej zgodnie z mechanizmem wybiórczego kopiowania (*ang. copy-choice*). Wiadomo bowiem, że proces replikacji genomu retrowirusowego wymaga, by kompleks odwrotnej transkryptazy z nicią potomną wykonał co najmniej dwa przeskoki rekombinacyjne. W ten właśnie sposób syntetyzowany jest dwuniciowy DNA, który ulega integracji z genomem gospodarza. W każdym wirionie HIV obecne są dwie genomowe cząsteczki RNA, stąd przeskoki rekombinacyjne mogą mieć charakter wewnątrz- lub międzycząsteczkowy. Po zsyntezowaniu jednoniciowego DNA dodatkowo dochodzić może do przeskoków rekombinacyjnych pomiędzy RNA a DNA. Zdolność odwrotnej transkryptazy do kopiowania genomowych cząsteczek wirusa oraz jej aktywność rekombinacyjna mogą zatem zależeć zarówno od właściwości samego enzymu jak i struktury replikowanych cząsteczek. Celem podjętych badań było lepsze poznanie mechanizmów umożliwiających powstawanie niejednorodnych populacji HIV. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów uzyskano szereg istotnych informacji

ukazujących jak struktura pierwszo- i drugorzędowa RNA/DNA wpływa na precyzję replikacji genomu oraz przebieg genetycznej rekombinacji wirusa. Z drugiej strony przeprowadzono wstępne badania roli jaką odwrotna transkryptaza pełni w obydwu omawianych procesach. Uzyskane wyniki, oprócz walorów czysto poznawczych, mogą mieć także znaczenie praktyczne w skutecznej walce z zakażeniami wirusem HIV.

1.1 Pochodzenie HIV

Retrowirusy wywołują wiele różnych chorób u ptaków oraz ssaków, w tym także naczelnych. Pierwszy ludzki retrowirus został odkryty w roku 1980. Był to wirus białaczki ludzkiej (HTLV-I, *ang. human T-cell leukemia virus type I*) [Poiesz i wsp., 1980; Yoshida i wsp., 1982]. Rok później zdiagnozowano nową jednostkę chorobową: nabyty zespół upośledzenia odporności (AIDS, *ang. acquired immunodeficiency syndrome*). Choroba rozwijała się u pacjentów zainfekowanych niezidentyfikowanym do tej pory retrowirusem. Zaobserwowano, że prowadzi ona do upośledzenia pracy układu odpornościowego, zaburzeń neurologicznych oraz powstawania licznych nowotworów. Badania epidemiologiczne dostarczyły informacji na temat sposobu rozprzestrzeniania się wirusa. Ustalono, że do zakażenia może dojść poprzez kontakt z krwią chorego np. w trakcie stosunków seksualnych, podczas dożylnego podawania narkotyków niesterylnymi igłami, w szpitalach podczas transfuzji krwi czy terapii preparatami krwiopochodnymi. Okazało się także, że wirus może zostać przeniesiony z seropozytywnej matki na dziecko. Wirusy wywołujące AIDS wyizolowano niezależnie w kilku laboratoriach. Pierwotnie otrzymały one nazwy: HTLV-III (*ang. human T-lymphotropic virus type III*) [Gallo i wsp., 1984] oraz LAV (*ang. lymphadenopathy-associated virus*) [Barre-Sinoussi i wsp., 1983; Wain-Hobson i wsp., 1991]. Analiza sekwencji dowiodła, że genomy obydwu wirusów są niemalże identyczne. W tym samym czasie z azjatyckich makaków wyizolowano wirusa wywołującego chorobę o objawach podobnych do AIDS. Ze względu na bardzo duże podobieństwo do HTLV-III wirus otrzymał nazwę STLV-III (*ang. simian T-lymphotropic virus type III*) [Letvin i wsp., 1985]. Na podstawie analiz genetycznych i strukturalnych ustalono, że zarówno ludzkie jak i małpie retrowirusy, wywołujące AIDS, można zakwalifikować do Lentivirusów z rodziny *Retroviridae* (retrowirusy) [Fields, *Virology*, Vol. 2, Ch. 58]. Opisane Lentiwirusy, infekujące naczelne, otrzymały odpowiednio nazwy: ludzki wirus upośledzenia odporności (HIV, *ang. human*

immunodeficiency virus) oraz małpi wirus upośledzenia odporności (SIV, *ang. simian immunodeficiency virus*) [Coffin i wsp., 1986]. Do tej pory wyizolowano wiele Lentiwirusów z różnych gatunków małp zamieszkujących Afrykę. Należy tutaj jednak dodać, że u swoich pierwotnych gospodarzy wirusy nie wywołują tak ostrych objawów chorobowych [Gardner i wsp., 1994].

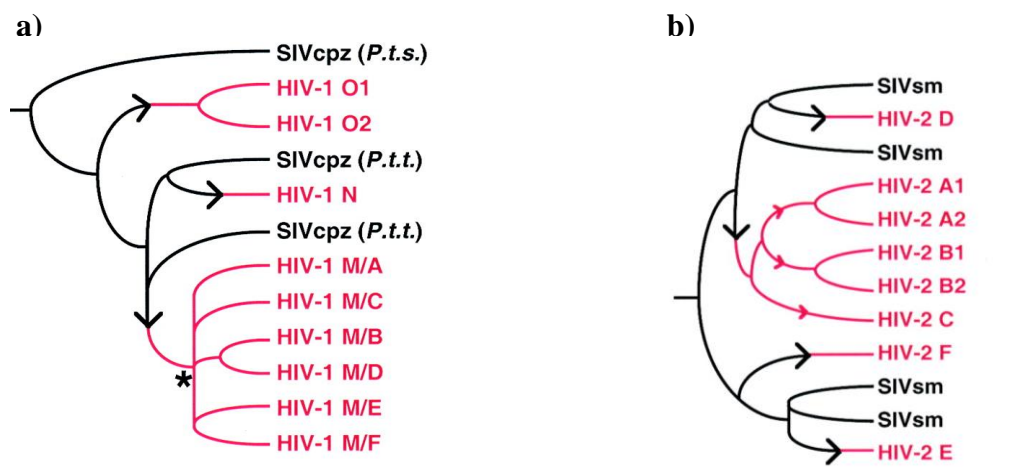
AIDS jest chorobą, którą cechuje długi okres wylegania. Dotychczas opisano dwa różne typy wirusów wywołujących AIDS u ludzi: HIV-1 i HIV-2. Wirusy te charakteryzuje ogromna różnorodność wewnątrzgatunkowa oraz oporność na stosowane leki. HIV-1 jest zdecydowanie liczniejszy, rozprzestrzenił się na wszystkie kontynenty. Nosicielami HIV-2 są natomiast głównie mieszkańcy Afryki wschodniej. Obydwa typy wirusa różnią się organizacją genomu oraz pochodzeniem [Hahn i wsp., 2000]. W skład HIV-1 wchodzi trzy różne grupy wirusów: M, N oraz O. Najliczniejsza jest grupa wirusów M, którą można z kolei podzielić na 11 podtypów: A-K. HIV-2 natomiast składa się z sześciu różniących się filogenetycznie grup: A-F.

Człowiek nie jest pierwotnym gospodarzem Lentiwirusów. Przodek HIV prawdopodobnie przekroczył barierę międzygatunkową na początku ubiegłego wieku. Obecnie uważa się, że HIV pochodzi od SIV, który infekuje małpy naczelne zamieszkujące kontynent afrykański. Z kolei SIV wywodzi się najprawdopodobniej od jednego retrowirusa, który w dalekiej przeszłości nabył zdolność infekowania małp [Hahn i wsp., 2000]. Później doszło do zróżnicowania zarówno pragospodarza jak i prawirusa (koewolucja) i wykształcenia nowych gatunków oraz podgatunków. Jednak zanim wirus zaadaptował się do nowego gospodarza, wiele tysięcy nieprzystosowanych jednostek, zarówno wśród małp jak i wirusów, wyginęło. Dobrym przykładem obrazującym ewolucję wirusa zależną od organizmu gospodarza (*ang. host-dependent evolution*) są szympansy będące nosicielami szczepu SIVcpz (szczep SIV infekujący szympanasy; cpz, *ang. Chimpanzee*) [Hahn i wsp., 2000]. Gatunek: Szympansy (*P. troglodytes*) można podzielić na cztery różne podgatunki: *P. t. verus*, *P. t. vellerosus*, *P. t. troglodytes*, *P. t. schweinfurthii*. Ustalono, że z sześciu zidentyfikowanych szczepów SIVcpz, pięć infekuje podgatunek *P. t. troglodytes*, natomiast jeden *P. t. schweinfurthii*. [Gao i wsp., 1999; Corbet i wsp., 2000]. Wszystkie SIVcpz tworzą osobny takson, różniący je od innych małpich lentiwirusów, ponadto wyniki analizy filogenetycznej dowodzą, że pięć szczepów pochodzących z *P. t. troglodytes* wykazuje bardzo duże podobieństwo filogenetyczne, podczas gdy szczep infekujący *P. t. schweinfurthii* znacząco się od nich różni (Rys. 1.1), [Gao i wsp., 1999; Corbet i wsp., 2000]. Najprawdopodobniej różne szczepy SIVcpz posiadały wspólnego przodka, który zainfekował wspólnego przodka szympanсів, a dopiero później doszło do zróżnicowania gospodarza i wirusa. Przykład koewolucji SIV i ich gospodarzy wskazuje, że Lentiwirusy przypuszczalnie infekują naczelne od setek tysięcy, a nawet milionów lat. Jednak na podstawie filogenetycznej analizy pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi szczepami wirusowymi można by wnioskować, że do zróżnicowania genetycznego SIV doszło całkiem niedawno. Większość małp zamieszkujących Afrykę jest nosicielami SIV, pomimo tego nie obserwuje się u nich żadnych objawów

chorobowych. Kiedy jednak wirus przekroczy barierę międzygatunkową, infekcja nowego gospodarza może przekształcić się w epidemię. [Hahn i wsp., 2000]. W przypadku kiedy nowy gospodarz jest już zainfekowany innym szczepem lentiwirusa może dojść do rekombinacji genetycznej pomiędzy różnymi szczepami wirusowymi, a w efekcie do utworzenia wirusa potomnego, którego genom złożony jest z fragmentów genomów wirusów rodzicielskich (genom mozaikowy) [Hahn i wsp., 2000; Jin i wsp., 1994; Georges-Courbot i wsp., 1998].

Uważa się, że HIV powstał w wyniku przekroczenia bariery międzygatunkowej przez SIV na początku ubiegłego wieku. O ile kwestia pochodzenia HIV-2 wydaje się oczywista, to w przypadku HIV-1 naukowcy mają wiele wątpliwości [Hahn i wsp., 2000; Gao i wsp., 1999]. Ustalono, że HIV-2 pochodzi od SIVsm infekującego mangaby szare (sm, *ang. Sooty mangabeys; lac. Chlorocebus atys*). Struktura genomu HIV-2 i SIVsm jest bardzo podobna, oba wirusy posiadają białko Vpx, którego nie zidentyfikowano u żadnego innego lentiwirusa [Hirsch i wsp., 1989]. Ponadto HIV-2 oraz SIVsm są ze sobą bardzo blisko spokrewnione filogenetycznie oraz infekują małpy i ludzi zamieszkujących tę samą strefę geograficzną. Pochodzenie HIV-1 nie jest w pełni oczywiste. Chociaż przodkiem tego wirusa wydaje się być SIVcpz, a organizacja genomu obydwu wirusów jest bardzo podobna (posiadają gen *vpu* niezidentyfikowany u innych lentiwirusów [Huet i wsp., 1990]), to stopień pokrewieństwa pomiędzy niektórymi szczepami SIVcpz i HIV-1 jest niewielki, a obszary występowania SIVcpz oraz pierwszych odnotowanych zakażeń HIV-1 nie pokrywają się [Morin i wsp., 1997; Hrđy i wsp., 1987]. Pierwotnym gospodarzem przodka HIV-1 był najprawdopodobniej podgatunek szympansa: *P. t. troglodytes* (szczepy SIVcpz pochodzące z tego podgatunku są filogenetycznie najbardziej spokrewnione z HIV-1). Przypuszcza się również, że pomiędzy różnymi szczepami SIVcpz dochodziło do wymiany materiału genetycznego na drodze rekombinacji genetycznej [Hahn i wsp., 2000; Gao i wsp., 1999]. Jednakże gdzie, kiedy i jak doszło do pierwszych zakażeń HIV-1 i dlaczego tak późno opisano pierwszy przypadek zakażenia człowieka tym wirusem, pomimo, że jego potencjalny przodek SIVcpz istniał w populacji szympanсів od bardzo dawna, nie wiadomo [Hahn i wsp., 2000]. Ustalono, że SIVcpz oraz SIVsm zostały co najmniej siedmiokrotnie niezależnie wprowadzone do populacji ludzkiej, wirusy grup M, N oraz O HIV-1 są dużo bardziej spokrewnione ze szczepami SIVcpz wywodzącymi się z *P. t. troglodytes* niż ze szczepem SIVcpz pochodzącym z podgatunku *P. t. schweinfurthii* oraz, że ostatni wspólny przodek wirusów grupy M HIV-1 pochodzi z roku ok. 1930 (± 20 lat) (Rys 1.1, Hahn i wsp., 2000). Przy okazji rozważań na temat pochodzenia HIV należałoby

wspomnieć o teorii zegara molekularnego, która zakłada, że częstość ewolucji genomów jest w przybliżeniu stała na przestrzeni dziejów. Zakładając słuszność powyższej teorii możliwe staje się ustalenie pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy gatunkami oraz szacowanie czasu pojawiania się nowych gatunków [MacIntyre, 1985]. Na podstawie analizy filogenetycznej HIV-1 można powiedzieć, że hipoteza zegara molekularnego odnosi się do ewolucji HIV-1 w niedalekiej przeszłości (ostatnich kilka lat). Hipoteza ta jednak nie może być wzięta pod uwagę przy szacowaniu daty przekroczenia bariery międzygatunkowej pomiędzy małpami i człowiekiem lub wykształcenia się poszczególnych podtypów HIV-1 [Lukashov i wsp., 2002]. Ocenianie stopnia pokrewieństwa pomiędzy różnymi retrowirusami na podstawie podobieństwa ich sekwencji może także doprowadzić do mylących wniosków. Genom wirusa HIV jest szczególnie bogaty w reszty adozynowe i jeśli uwzględnilibyśmy tylko powyższe kryterium do oszacowania wieku wirusa, popełnilibyśmy błąd [Berkhout i wsp., 1994]. Stąd też dokładny czas pojawienia się HIV jest przedmiotem licznych sporów i dyskusji.



Rysunek 1.1 Schemat drzewa filogenetycznego, przedstawiający pokrewieństwo pomiędzy SIV oraz HIV [Hahn i wsp., 2000]. Odgałęzienia zaznaczone czarnym kolorem obrazują ewolucję SIV w obrębie swojego pierwotnego gospodarza, czarne strzałki wskazują punkty przekroczenia bariery międzygatunkowej. Odgałęzienia zaznaczone kolorem czerwonym przedstawiają późniejszą ewolucję w nowym gospodarzu: człowieku. a) Ewolucja SIVcpz oraz HIV-1. Trzy znane grupy HIV-1: M, N, O wywodzą się ze szczepów SIVcpz infekujących *P. t. troglodytes* (*P.t.t.*) oraz *P. t. schweinfurthii* (*P.t.s.*). Liczne podtypy grupy M pochodzą od wspólnego przodka (na rysunku zaznaczony za pomocą gwiazdki). b) Ewolucja SIVsm oraz HIV-2. Znanych jest sześć grup HIV-2: A-F. Dalszy podział, który powstał w wyniku niezależnego przekraczania bariery międzygatunkowej przez wirusa dotyczy grup: A, B i C

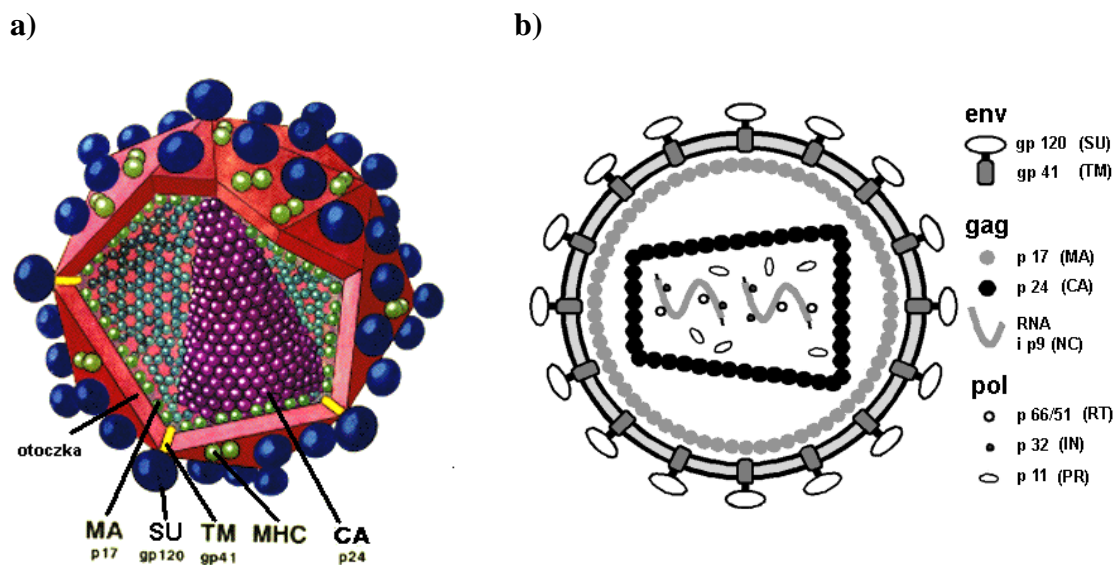
(czerwone strzałki). W przypadku HIV-2 największą różnorodność wśród wyizolowanych szczepów przypisuje się grupom: A i B.

Istnieją dwie hipotezy tłumaczące wybuch epidemii AIDS. Jedna z nich zakłada, że SIV przekroczył barierę międzygatunkową poprzez kontakt człowieka z zakażoną krwią małp podczas spożywania surowego mięsa lub też trzymania zwierząt jako maskotek domowych (*ang. zoonotic transmission*). Postęp techniczny, wzrost urbanizacji oraz rozpowszechnienie prostytucji istotnie przyczyniły się do rozwoju epidemii AIDS w drugiej połowie XX-tego wieku [Gao i wsp., 1999]. Dodatkowo szybkie rozprzestrzenianie HIV spowodowane było brakiem dostatecznej świadomości społecznej co do sposobu przenoszenia się i patogenności wirusa. Używanie niesterylnych igieł oraz masowa transfuzja zainfekowanej krwi doprowadziła do zakażenia setek tysięcy ludzi. Druga hipoteza sugeruje, że przyczyną pojawienia się AIDS było wprowadzenie szczepionki przeciwko wirusowi polio (OPV, *ang. oral polio vaccine*) w latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia, na terenie Kongo. Rzekomo do otrzymania szczepionek wykorzystano nerki zakażonych szympanсів i mangab szarych [Curtis i wsp., 1992]. Hipoteza ta jednak posiada zdecydowanie mniej zwolenników i w większości środowisk jest oficjalnie odrzucana.

Dokładne poznanie biologii, historii i ewolucji SIV, a także wiedza na temat potencjalnego ryzyka przeniesienia innych szczepów SIV na człowieka oraz samej patogenności HIV wydają się mieć istotne znaczenie, mogą bowiem pozwolić uniknąć podobnych epidemii w przyszłości.

1.2 Budowa i replikacja HIV-1

HIV-1 jest wirusem sferycznym o średnicy ok. 110 nm. W zewnętrznej otoczce osłaniającej stożkowaty nukleokapsyd (o średnicy ok. 100 nm) zakotwiczone są białka odpowiedzialne za specyficzne wiązanie wirusa do receptorów komórkowych [Marks i wsp., 1988; Nermut i wsp., 1993]. We wnętrzu nukleokapsydu znajdują się dwie identyczne lub prawie identyczne genomowe cząsteczki RNA o długości ok. 10 kb i polarność mRNA [Marquet i wsp., 1991]. Można zatem powiedzieć, iż HIV-1 jest drobnoustrojem "pseudodiploidalnym" (Rys. 1.2).



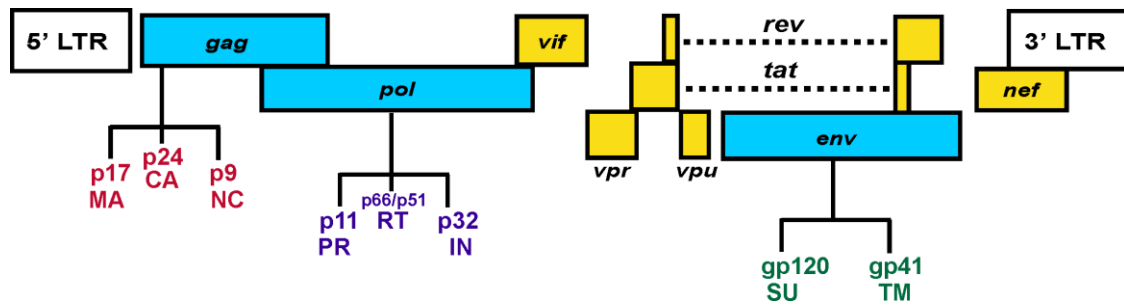
Rysunek 1.2 Budowa wirionu HIV-1 [Fields, Virology, Vol. 2, Ch. 60]. a) Model wirionu HIV-1 z usuniętym fragmentem otoczki wirusowej. MHC – białko głównego układu zgodności tkankowej (*ang. major histocompatibility complex*). b) Schematyczny opis wirusa. Typowa cząsteczka wirusowa jest kształtu sferycznego o średnicy ok. 110 nm. Na zewnątrz pokrywa ją dwuwarstwowa błona lipidowa (otoczka), w której zakotwiczone są białka: TM (gp41) i SU (gp120). Białko MA (p17), zlokalizowane jest pomiędzy nukleokapsydem i otoczką wirusową. Białka nukleokapsydu: CA (p24) i NC (p9) osłaniają genom wirusowy czyli dwie cząsteczki (+)RNA. Dodatkowo w stożkowatym nukleokapsydem znajdują się: RT (p66/p51), IN (p32), PR (p11) oraz białko Vpr, nie przedstawione na rysunku.

Na początku infekcji jednociowy RNA (ssRNA) zostaje przepisany na liniowy, dwuniciowy DNA (dsDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji katalizowanej przez wirusowy enzym odwrotną transkryptazę (RT). Liniowy dsDNA ulega integracji z genomem gospodarza. Tak więc cząsteczki genomowe retrowirusów mogą występować w dwóch formach: jako ssRNA, np. w pozakomórkowej fazie cyklu replikacyjnego wirusa, czyli wirionie oraz jako dsDNA – włączone do genomu gospodarza (provirus). W genomie HIV-1 zakodowane są trzy prekursorowe poliproteiny (gag, pol, env), z których powstają liczne białka wirusowe. Dodatkowo wyróżnić można kilka mniejszych otwartych ramek odczytu, np. *tat* lub *rev*. Gen *gag* koduje prekursor białek kapsydu (Pr55^{gag}): MA (*ang. matrix protein*), CA (*ang. capsid protein*) i NC (*ang. nucleocapsid protein*), gen *pol* koduje prekursor enzymów (Pr160^{gag-pol}): wirusowej proteazy (PR), RT oraz integrazy (IN), natomiast gen *env* - prekursor białek otoczki (gp160): SU (*ang. surface glycoprotein*, gp120) oraz TM (*ang. transmembrane protein*, gp41). Geny: *tat* (*ang. transcriptional transactivator*) oraz *rev*

(ang. *regulator of viral expression*), kodujące białka niezbędne do replikacji wirusa, mieszczą się w dwóch nachodzących na siebie ramkach odczytu, zlokalizowanych w obrębie genu *env*. W genomie HIV-1 zakodowane są także liczne geny, które jak się wydaje, nie spełniają istotnej funkcji w trakcie replikacji wirusa, (Tabela 1.1), [Fields, Virology, Vol. 2, Ch. 60]. Geny te nazwano genami dodatkowymi (ang. *accessory genes*) lub pomocniczymi (ang. *auxiliary genes*), są to: *vif*, *vpr*, *vpu* oraz *nef* (Rys. 1.3). Białka będące produktami genu *vpr* pakowane są do wirionów potomnych, natomiast produkty genów *vif*, *vpu* i *nef*, najprawdopodobniej nie.

Tabela 1.1 Geny i białka HIV-1

<u>GE</u> <u>N</u>	<u>BIAŁ</u> <u>KO</u>	UDZIAŁ W REPLIKACJI	FUNKCJA BIAŁKA	LOKALIZACJA BIAŁKA
<i>gag</i>	MA (p17)	TAK	białko macierzy, wyściela otoczkę wirusową,	wewnętrzna powierzchnia otoczki wirionu
	CA (p24)	TAK	białko kapsydu, ochrania rdzeń wirusa,	nukleokapsyd wirionu
	NC (p9)	TAK	białko kapsydu, ochrania genom, tworzy rdzeń wirusa,	nukleokapsyd wirionu
<i>pol</i>	PR (p11)	TAK	kluczowe podczas dojrzewania wirusa: proteolityczna hydroliza poliproteiny gag,	nukleokapsyd wirionu
	RT (p66/p51)	TAK	odwrotna transkrypcja genomowego RNA, dodatkowo posiada aktywność RNazy H,	nukleokapsyd wirionu
	IN (p32)	TAK	integracja prowirusa (dsDNA) z genomem gospodarza,	nukleokapsyd wirionu
<i>env</i>	SU (gp120)	TAK	glikoproteina zewnętrznej otoczki wirusowej, główny antygen wirusowy, wiąże receptor CD4,	otoczka wirionu
	TM (gp41)	TAK	śródbłonowe białko kotwiczące dojrzałą glikoproteinę otoczki; udział w fuzji błon,	błona otoczki wirionu
<i>vif</i>	p23	NIE	białko odpowiedzialne za hamowanie aktywności przeciwwirusowej białka CEM15, ulegającego ekspresji głównie w limfocytach T [Mangeat i wsp., 2003],	cytoplazma komórki
<i>vpr</i>	p15	NIE	białko wirionu, zwiększa dokładność kopiowania genomu wirusowego przez RT [Mansky i wsp., 1995]	wirion
<i>tat</i>	p14	TAK	aktywator transkrypcyjny w układzie trans, wiąże spinę TAR (ang. <i>trans-activating responsive element</i>) oraz czynniki komórkowe, (inicjacja i elongacja wirusowych transkryptów),	głównie w jądrze komórkowym
<i>rev</i>	p19	TAK	aktywator potranskrypcyjny w układzie trans, wiąże RRE (ang. <i>rev responsive element</i>) i czynniki komórkowe, (składanie i/lub transport i translacja wirusowego mRNA),	głównie w jądrze komórkowym
<i>vpu</i>	p16	NIE	wpływa na uwalnianie wirionów potomnych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zmniejsza ilość receptorów CD4,	błona komórkowa
<i>nef</i>	p27	NIE	wpływ na aktywację limfocytów T – zwiększony poziom transkrypcji z wirusowego promotora LTR (ang. <i>long terminal repeats</i>), zwiększa infekcyjność wirionów, zmniejsza ilość receptorów CD4,	błona komórkowa, cytoplazma komórki



Rysunek 1.3 Organizacja genomu HIV-1. Schemat przedstawia prowirusowy dsDNA. Geny strukturalne: *gag*, *pol* oraz *env* są zaznaczone w postaci niebieskich prostokątów. Geny dodatkowe: *tat* i *rev* (kluczowe geny regulatorowe) oraz *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* oznaczono żółtymi prostokątami, natomiast sekwencje flankujące 5'LTR oraz 3'LTR (*ang. long terminal repeats*) – białymi. Produktem genu *gag* jest prekursorowa poliproteina Gag (Pr55^{gag}), która ulega enzymatycznej proteolizie dając dojrzałe białka: MA, CA, NC. Produktem genu *pol* jest poliproteina Gag-Pol (Pr160^{gag-pol}) dająca białka: PR, RT oraz IN, natomiast produktem genu *env* jest poliproteina Env (gp160) będąca prekursorem białek SU i TM. Szczegółowy opis został zamieszczony w tekście.

Cząsteczki genomowe są otoczone przez białka powstające z poliproteiny Pr55^{gag} (Rys. 1.2). Białko MA (p17) mieści się pomiędzy kapsydem i otoczką wirusową; białko CA (p24) tworzy szkielet kapsydu (o grubości ok. 5 nm), natomiast białko NC (p9) wiąże się ściśle z genomowym RNA. Końce 5' dwóch cząsteczek genomowych oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe [Marquet i wsp., 1991], ponadto dimeryzację cząsteczek genomowych może ułatwiać białko NC [Sakaguchi i wsp., 1993; Huthoff i wsp., 2003]. W pobliżu końca 5' wirusowego RNA przyczepiona jest dodatkowo cząsteczka tRNA lizynowego (tRNA^{lys3}), pochodząca z organizmu gospodarza.

Produkty genu *pol*, wirusowe enzymy: PR (p11), RT (p66/p51), IN (p32) są także umieszczone wewnątrz nukleokapsydu (Rys. 1.2). Dodatkowo, z białkami nukleokapsydu wiąże się pomocnicze białko Vpr. Na powierzchni wirusa występują liczne wypustki będące pęczkiem czterech heterodimerów. Każdy heterodimer złożony jest z białek: SU (gp120) i TM (gp41) połączonych wiązaniami niekowalencyjnymi. Białko SU jest w dużym stopniu glikozylowane, zawiera także domenę rozpoznającą i wiążącą receptory CD4 limfocytów pomocniczych T_h (*ang. T-helper lymphocytes*). Białko TM zakotwicza wypustki w otoczce wirusowej. Chociaż błona otaczająca HIV-1 jest pochodzenia komórkowego, różni się znacząco od błony nieinfekowanych komórek gospodarza stosunkiem cholesterolu do fosfolipidów. Wirusową błonę cechuje mała

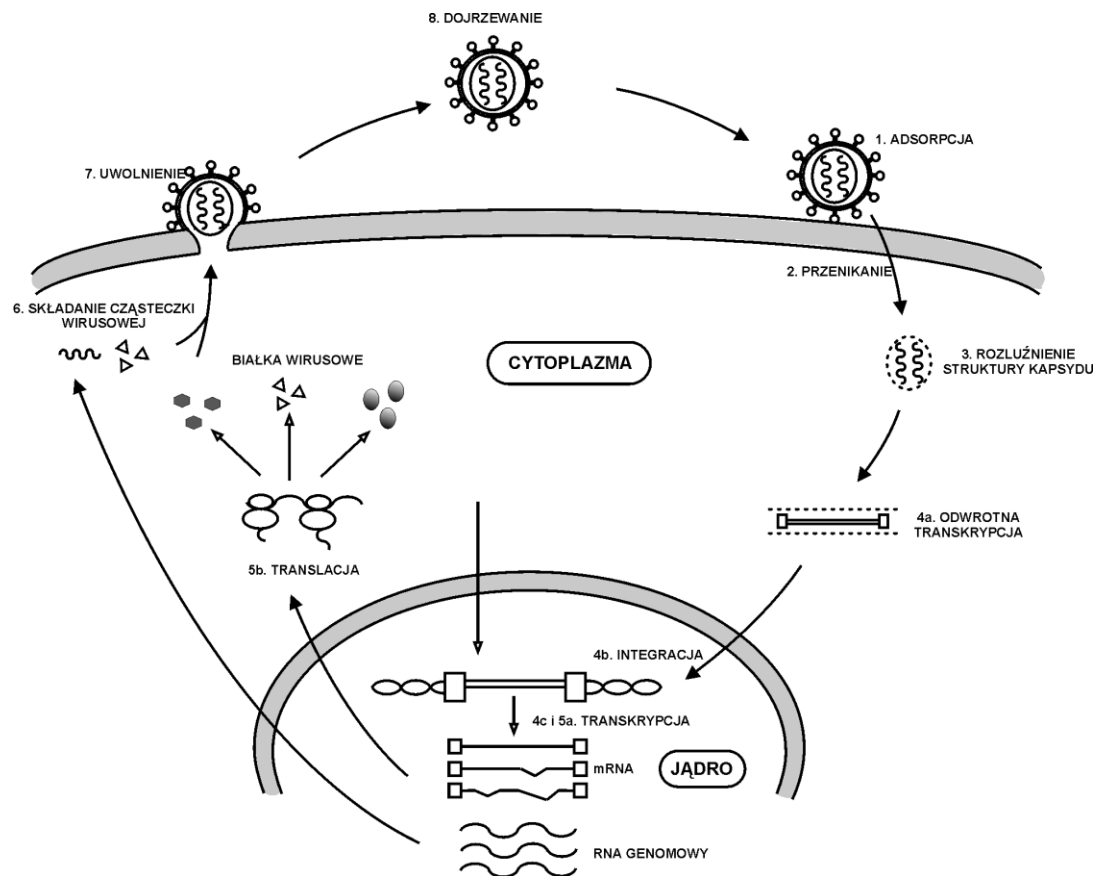
płynność oraz wysoki stopień uporządkowania, dodatkowo można w niej znaleźć białka komórkowe, które są pobierane podczas tworzenia i odpączkowywania wirusa potomnego [Arthur i wsp., 1992; Franke i wsp., 1994; Henderson i wsp., 1987; Marschang i wsp., 1995; Tiley i wsp., 1990].

HIV-1 infekuje głównie komórki układu odpornościowego człowieka posiadające na swojej powierzchni receptory CD4, czyli limfocyty pomocnicze T i makrofagi [Weiss i wsp., 1992]. Obecność wirusa zaobserwowano także w komórkach mikrogleju oraz w komórkach endotelium (śródbłónka) w mózgu. Infekcja rozpoczyna się od przyłączenia wirusa do powierzchni wrażliwej komórki. Wniknięcie nukleokapsydu do cytoplazmy następuje najczęściej w wyniku fuzji błony komórkowej gospodarza i otoczki wirusowej. W przypadku makrofagów może ono zachodzić także na drodze endocytozy [Stein i wsp., 1987; Maddon i wsp., 1988]. We wnętrzu komórki struktura nukleokapsydu ulega rozluźnieniu, równocześnie zainicjowany zostaje kilku etapowy proces replikacji genomu wirusowego [Bowerman i wsp., 1989; Farnet i wsp., 1991]. Prawie wszystkie składniki konieczne do jego zajścia znajdują się w wirionie. Są to: dwie kopie genomowego RNA, RT, IN, PR i starter tRNA^{lys3}. Niezbędne w procesie syntezy DNA trójfosforany deoksyrybonukleozydów (dNTP), występują w wysokim stężeniu w cytoplazmie gospodarza i bez przeszkód przenikają do wnętrza nukleokapsydu. Pierwszy etap replikacji polega na przepisaniu wirusowego, genomowego RNA na dsDNA [Peliska i wsp., 1992; Whitcomb i wsp., 1990]. Katalizowana przez RT reakcja przebiega w obrębie cytoplazmy chociaż kontakt wirusowego aparatu replikacyjnego z czynnikami komórkowymi jest wyraźnie ograniczony przez białka kapsydowe [Goff i wsp., 1993; Varmus i wsp., 1989], dokładny opis procesu odwrotnej transkrypcji został zamieszczony w podrozdziale 1.3.

W kolejnym etapie cyklu życiowego HIV, produkt odwrotnej transkrypcji – liniowy dsDNA, zostaje przeniesiony do jądra komórkowego, gdzie ulega integracji z genomem gospodarza. Zebrane dotychczas dane sugerują, iż miejsce włączenia wirusowego DNA wybierane jest w sposób całkowicie przypadkowy. W wyniku integracji HIV staje się prowirusem co oznacza, iż jego materiał genetyczny powielany jest wraz z DNA komórkowym [Goff i wsp., 1992; Whitcomb i wsp., 1992].

Ekspresja genów wirusowych jest procesem złożonym, wymaga obecności białek wirusowych działających w układzie cis i trans oraz białek gospodarza [Antoni i wsp., 1994; Jones i wsp., 1994]. Transkrypcja zintegrowanego wirusowego DNA zachodzi w jądrze i prowadzi do powstawania genomowych cząsteczek HIV oraz wirusowych mRNA. Proces ten katalizuje komórkowa polimeraza RNA II. Rozpoznaje ona sekwencję promotorową zlokalizowaną na końcu 5' wirusowego dsDNA (w rejonie zwanym długim powtórzeniem końcowym, LTR - *ang. long terminal repeat*)

[Cherrington i wsp., 1992; DeZazzo i wsp., 1992]. Początkowo syntetyzowane są tzw. białka „wczesne”, które pełnią funkcje regulatorowe i umożliwiają powstanie genomowego RNA oraz pozostałych białek funkcjonalnych i strukturalnych (białek „późnych”) [Cullen i wsp., 1989; Pomerantz i wsp., 1992]. Te ostatnie w formie polipeptydów transportowane są do błony komórkowej, gdzie utworzone zostają wiriony potomne. Istotną rolę w ich formowaniu odgrywa wirusowa proteaza przekształcająca prekursorowe polipeptydy w funkcjonalne składniki nukleokapsydu. Po opłaszczeniu, wirusowe cząstki potomne opuszczają komórkę gospodarza i rozpoczynają inwazję kolejnych komórek podatnych na infekcję (Rys. 1.4) [Wills i wsp., 1991; Bolognesi i wsp., 1978].



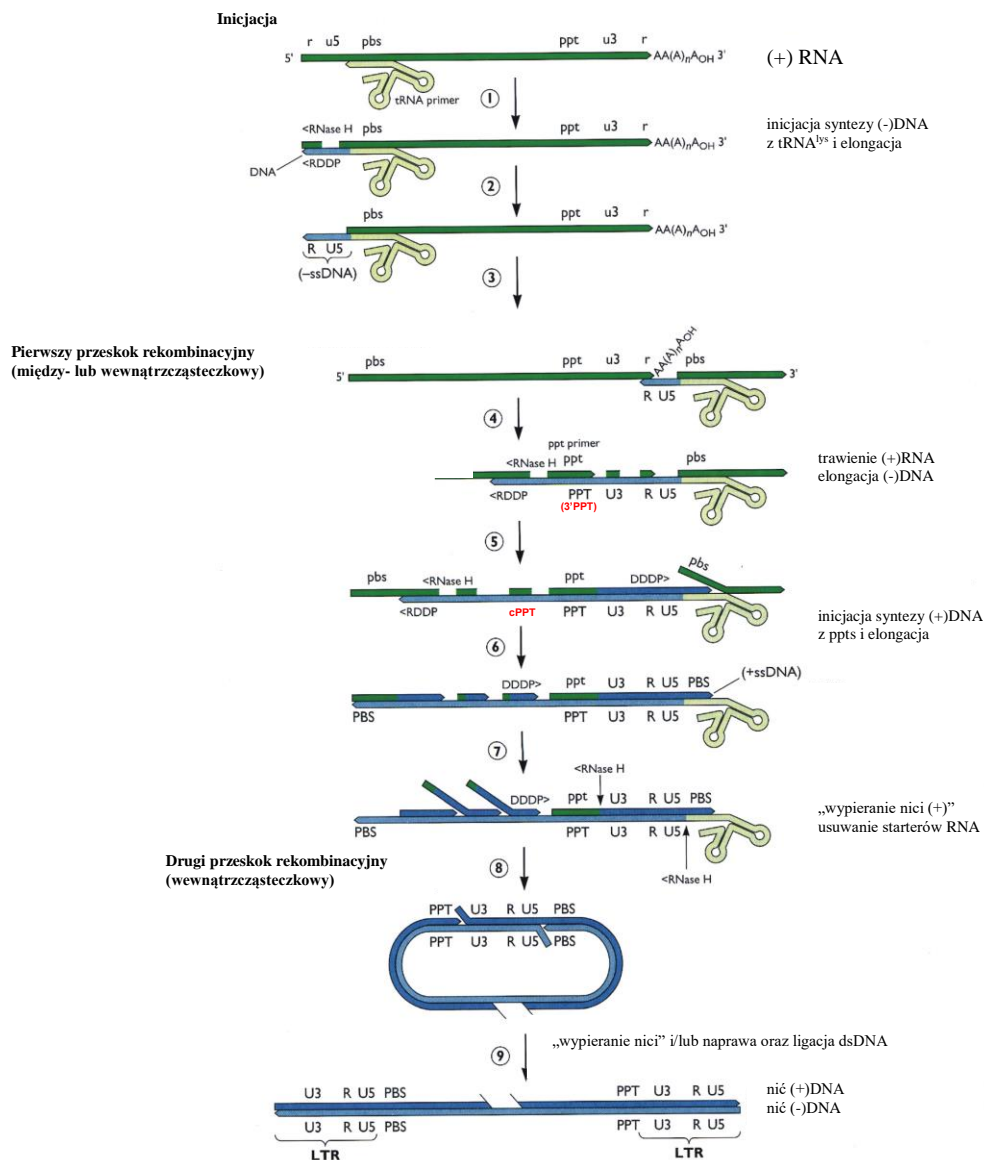
Rysunek 1.4 Replikacja HIV. 1) Adsorpcja cząsteczek wirusa na wrażliwych komórkach posiadających receptory CD4. 2) Przenikanie wirusa do cytoplazmy gospodarza. 3) Rozluźnienie struktury kapsydu. 4) Replikacja genomu wirusowego: a) przepisywanie genomowego RNA na dsDNA (odwrotna transkrypcja), b) integracja z genomem gospodarza, c) powielenie materiału genetycznego (głównie poprzez transkrypcję). 5) Ekspresja genów: a) transkrypcja, b) translacja. 6) Składanie cząsteczek potomnych wirusa. 7) Opuszczanie komórki gospodarza. 8) Dojrzenie.

1.3 Odwrotna transkrypcja

Wszystkie retrowirusowe polimerazy wykorzystują starter do rozpoczęcia syntezy nici potomnej [Leis i wsp., 1993; Mark i wsp., 1997]. W przypadku HIV-1 RT rolę tę spełnia tRNA^{lys3}. Przyłącza się on do genomowej cząsteczki wirusa (+)RNA w tzw. miejscu wiązania startera (PBS – *ang. primer binding site*), ulokowanym ok. 200 nukleotydów w dół od końca 5'. Sekwencja PBS jest komplementarna do ostatnich osiemnastu nukleotydów z końca 3' tRNA^{lys3} [Raba i wsp., 1979; Ratner i wsp., 1985]. Bardzo ważną funkcję w procesie inicjacji odwrotnej transkrypcji spełnia sekwencja aktywująca starter (PAS, *ang. primer activation signal*). Jest ona zaangażowana w oddziaływanie z nukleotydami ramienia TΨC tRNA^{lys3} [Beernes i wsp., 2002]. RT posiada aktywność polimerazy DNA i RNazy H, po rozpoznaniu kompleksu tRNA/RNA rozpoczyna odwrotną transkrypcję wydłużając koniec 3'-OH startera w kierunku 5' matrycy RNA. Jednocześnie dzięki aktywności RNazowej HIV-1 RT degradowany jest RNA w nowopowstającym kompleksie RNA/DNA. Pierwsze cięcie RNazy następuje zaraz za PBS. Sekwencja PBS nie zostaje strawiona, ponieważ hybrydyzuje do niej starter tRNA, powstaje zatem dupleks RNA/RNA nie będący substratem dla RNazy H. [Götte i wsp., 1995]. Dzięki temu sekwencja PBS zostaje odtworzona podczas późniejszego etapu odwrotnej transkrypcji. Kiedy HIV-1 RT dotrze do końca 5' matrycy, synteza nici potomnej zostaje chwilowo zatrzymana. Początkowy produkt reakcji odwrotnej transkrypcji, zwany (-) s-s DNA (*ang. minus-strand strong-stop DNA*), musi zostać przeniesiony na koniec 3' matrycy, aby synteza (-)DNA mogła być kontynuowana. Zajście tego procesu jest możliwe dzięki obecności identycznych sekwencji R (R – *ang. terminal repeat region*) na obu końcach cząsteczki genomowej. Aktywność RNazowa HIV-1 RT, usuwając RNA, powoduje, że (-) s-s DNA łatwo oddysocjowuje z końca 5' i ulega reasocjacji na końcu 3' genomowego RNA. Wirusowa cząstka zawiera dwie kopie genomowego RNA, dlatego przeskok rekombinacyjny może zachodzić w obrębie tej samej cząsteczki matrycowej (przeskok intramolekularny) lub (-) s-s DNA może przyłączyć się do końca 3' drugiej cząsteczki RNA (przeskok intermolekularny) [Panganiban i wsp., 1988; Hu i wsp., 1990; Van Wamel i wsp., 1998]. Pierwszy przeskok HIV-1 RT jest z reguły międzycząsteczkowy. W miarę jak postępuje synteza (-)DNA, RNaza H usuwa dalszą część nici matrycowej RNA. Na degradację odporne są jednak sekwencje bogate w zasady purynowe (PPTs -

ang. polypurine tracks), które służą jako startery do rozpoczęcia syntezy (+)DNA. Jeden z PPTs ulokowany jest blisko końca 3' cząsteczki genomowej (3'PPT), drugi, w części środkowej wirusowego RNA, na końcu sekwencji genu *pol* (cPPT – *ang. central PPT*) [Charneau i wsp., 1991; Steitz, 1999]. Jeszcze przed zakończeniem syntezy (-)DNA, niezdegradowane trakty polipurynowe PPTs wykorzystane zostają do rozpoczęcia syntezy dwóch segmentów (+)DNA. Fragmenty syntetyzowane z cPPT i 3'PPT nazwane zostały odpowiednio: D+ DNA (*ang. downstream*) i U+ DNA (*ang. upstream*) [Charneau i wsp., 1991; Charneau i wsp., 1992; Klarmann i wsp., 1997; Charneau i wsp., 1994]. Obecność tRNA w nici (-)DNA sprawia jednak, że proces odwrotnej transkrypcji zostaje ponownie zatrzymany, tym razem podczas syntezy nici (+)DNA. Powstały niepełnej długości produkt nosi nazwę (+) s-s DNA (*ang. plus-strand strong-stop DNA*). Enzym zatrzymuje się najprawdopodobniej na pierwszym modyfikowanym nukleotydzie tRNA^{lys3}, czyli metylowanej adenozyne w pozycji 19, licząc od końca 3' tRNA^{lys3} [Götte i wsp., 1999; Ben-Artzi i wsp., 1996]. W ten sposób zostaje odtworzona sekwencja PBS. RNaza H usuwa startery tRNA i PPTs z obu nici DNA. Usunięcie startera tRNA jest istotne dla drugiego przeskoku rekombinacyjnego, podczas którego kluczową rolę odgrywają komplementarne, osiemnasto-nukleotydowe sekwencje PBS. Jedna z nich jest kopią PBS, powstałą podczas syntezy (+)DNA z wykorzystaniem tRNA jako matrycy, druga natomiast powstaje w trakcie syntezy (-)DNA, kiedy polimeraza powieliła sekwencję PBS obecną na końcu 5' genomowego (+)RNA. Tak więc sekwencja PBS spełnia podwójną funkcję, umożliwia inicjację syntezy DNA poprzez związanie startera tRNA^{lys3} oraz zajście drugiego przeskoku rekombinacyjnego. Wspomniany przeskok zachodzi przypuszczalnie w obrębie tej samej cząsteczki, prowadząc do utworzenia kolistego produktu przejściowego [Panganiban i wsp., 1988; Hu i wsp., 1990]. HIV-1 RT posiada zdolność do tzw. „wypierania nici” (*ang. strand displacement activity*). Nie jest to aktywność helikazowa, jednak umożliwia ona osłabienie oddziaływań w obrębie dupleksów DNA. Dzięki tej właściwości HIV-1 RT może kontynuować syntezę (-)DNA oraz D+ DNA w obrębie dupleksu DNA/DNA w rejonie U3-R-U5 (Rys. 1.5). Koniec 5' U+ DNA służy jako matryca do ukończenia syntezy (-)DNA, natomiast koniec 5' (-)DNA służy jako matryca do ukończenia syntezy D+ DNA. Dodatkowo drugi przeskok HIV-1 RT pozwala na ukończenie syntezy U+ DNA. Synteza U+ DNA kończy się, kiedy RT osiągnie sekwencję terminalną (CTS - *ang. central termination sequence*), ulokowaną w środku cząsteczki genomowej. Zakończenie syntezy U+ DNA ma miejsce ok. 100 pz

w dół od końca 5' D⁺ DNA, tyle zasad RT musi „wyprzeć”, aby dotrzeć do sekwencji CTS. Konsekwencją dwóch przeskoków RT jest duplikacja sekwencji U3-R-U5, które tworzą na końcach prowirusa długie powtórzenia końcowe, LTR. Dodatkowo, zapoczątkowanie syntezy (+)DNA z dwóch starterów prowadzi do powstania nieciągłości w nici (+)DNA w prowirusowym dsDNA. Podsumowując, stwierdzić można, iż odwrotna transkrypcja jest wieloetapowym procesem nieciągłym, w którym utworzony zostaje dsDNA, dłuższy od genomowego RNA.

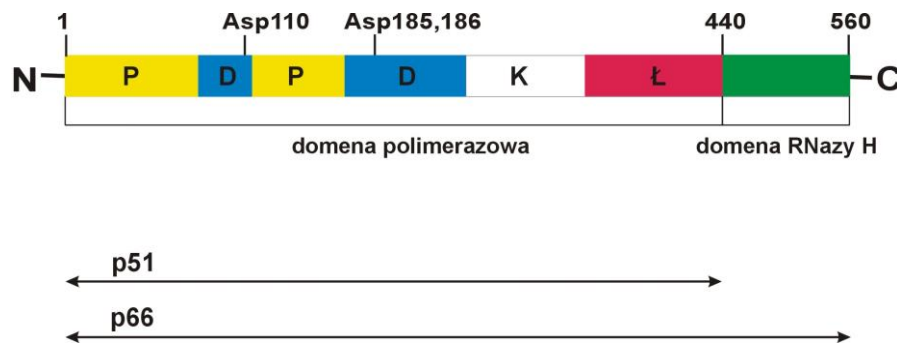


Rysunek 1.5 Schemat procesu odwrotnej transkrypcji u retrowirusów. W każdej cząstce wirusowej obecne są dwie identyczne lub prawie identyczne kopie genomowego (+)RNA. Wirusowe genomowe (+)RNA syntetyzowane są przez komórkową polimerazę RNA II, dlatego posiadają strukturę kapu (*ang. cap*) na końcu 5' oraz ogon poli(A) na końcu 3'. Ponadto na obu końcach genomowego RNA obecne są rejon identycznych powtórzeń (r). Małymi literami oznaczono sekwencje obecne w genomowym (+)RNA (zielone linie), dużymi - w potomnym dsDNA (niebieskie linie). Synteza (-)DNA rozpoczyna się w pobliżu końca 5' cząsteczki genomowej hybrydyzacją tRNA^{Lys} do miejsca wiążącego starter (pbs). Etapy odwrotnej transkrypcji: 1) Synteza nici potomnej (-)DNA w kierunku 5' genomowego (+)RNA oraz powstanie pierwszego produktu w wyniku zatrzymania RT na końcu matrycy: (-) s-s DNA. 2) Usuwanie RNA w nowopowstałym hybrydzie RNA/DNA przez RNazę H, w rezultacie powstaje jednoniciowy DNA. 3) Nowopowstały produkt zostaje przeniesiony na koniec 3' tej samej, lub homologicznej, cząsteczki genomowej; jest to możliwe dzięki obecności rejonów identycznych powtórzeń (r) na obu końcach genomu. 4) Kontynuacja syntezy (-)DNA na matrycy (+)RNA (RDDP – *ang. RNA-dependent DNA polymerization*), tworzenie starterów ppt do syntezy (+)DNA na matrycy (-)DNA (DDDP – *ang. DNA-dependent DNA polymerization*). 5) Dalsza synteza (-)DNA oraz usuwanie RNA przez RNazę H. 6) Powstawanie dodatkowych starterów do rozpoczęcia syntezy (+)DNA, w przypadku HIV-1 synteza nici (+)DNA odbywa się z dwóch starterów: cPPT oraz 3'PPT. 7) Zatrzymanie syntezy (+)DNA po skopiowaniu sekwencji startera (PBS) oraz powstanie (+) s-s DNA w wyniku zatrzymania RT na końcu matrycy, usuwanie tRNA przez RNazę H. 8) Sekwencje PBS umożliwiają drugi przeskok RT oraz kontynuację syntezy DNA. 9) Kopiowanie regionu U3-R-U5 dzięki zdolności RT do tzw. „wypierania nici” i tworzenie liniowej, prowirusowej cząsteczki, posiadającej wydłużone końce (LTRs – *ang. long terminal repeats*) w porównaniu z cząsteczką genomową. Brak ciągłości (+)DNA, wynikający z zapoczątkowania jego syntezy z więcej niż jednego startera, jest najprawdopodobniej usuwany przez komórkowe enzymy gospodarza. Szczegółowy opis procesu odwrotnej transkrypcji został zamieszczony w tekście.

1.4 Budowa HIV-1 RT

RT są enzymami katalizującymi proces syntezy DNA w oparciu o matrycową cząsteczkę RNA lub DNA. Podobnie jak inne polimerazy DNA, nie potrafią one inicjować syntezy *de novo*, dlatego do rozpoczęcia reakcji wymagana jest obecność startera (ssDNA lub ssRNA). Przeprowadzane badania strukturalne sugerują, że pomimo różnic w sekwencji aminokwasowej, wszystkie polimerazy charakteryzują się podobną budową przestrzenną [Doublie i wsp., 1999]. Domena polimerazowa przypomina prawą dłoń, dlatego tworzące ją poddomeny zostały nazwane: „kciukiem” (*ang. thumb*), „dłonią” (*ang. palm*) i „palcami” (*ang. fingers*). Oprócz aktywności polimerazowej, RT posiadają także aktywność RNazy H, która pozwala na rozpoznanie heterodupleksów RNA/DNA i specyficznie trawienie nici RNA.

HIV-1 RT jest heterodimerem zbudowanym z białek p66 i p51 (ich masa cząsteczkowa wynosi odpowiednio: 66 kDa i 51 kDa). Enzym powstaje podczas tworzenia wirionów potomnych z poliproteiny Gag-Pol (Pr160^{gag-pol}) w procesie katalizowanym przez wirusową proteazę. Początkowo z poliproteiny wycinane jest białko p66 (podjednostka p66 licząca 560 aminokwasów), które tworzy homodimer. Następnie wirusowa proteaza odcina 120 aminokwasów z końca karboksylowego jednej z podjednostek p66. W ten sposób powstaje heterodimer p66/p51. 440 aminokwasów z końca aminowego p66 tworzy domenę polimerazową, podczas gdy ostatnich 120 aminokwasów tworzy domenę RNazy H. Zarówno heterodimer p66/p51 jak i homodimer p66/p66 posiadają aktywność polimerazową i RNazową. Pomimo, że homodimer p51/p51 posiada aż dwie domeny polimerazowe, nie stwierdzono by wykazywał jakąkolwiek aktywność (Rys. 1.6) [Hostomsky i wsp., 1991; Le Grice i wsp., 1991].

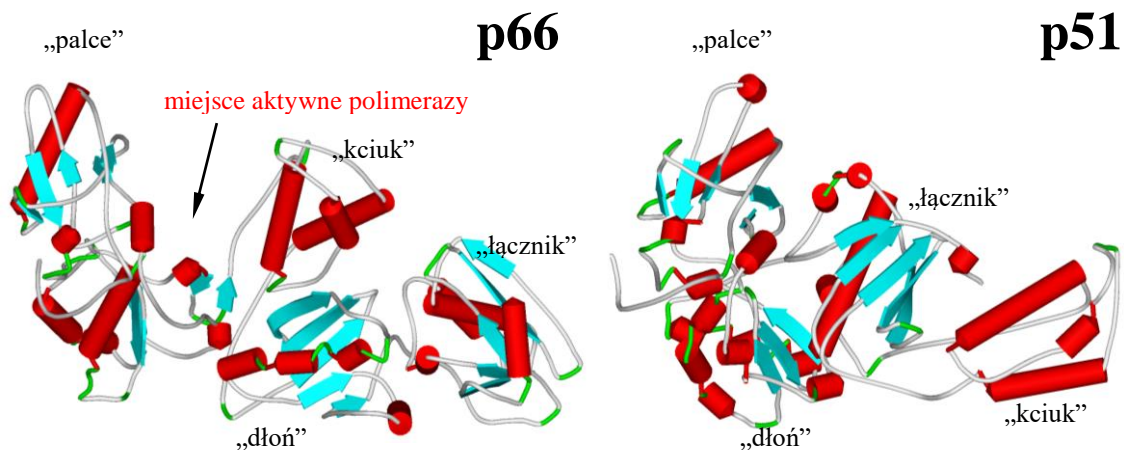


Rysunek 1.6 Domeny i poddomeny HIV-1 RT. HIV-1 RT powstaje z poliproteiny Gag-Pol, w reakcji katalizowanej przez wirusową proteazę. Początkowo powstaje homodimer p66/p66, następnie wirusowa proteaza odcina domenę RNazy H w jednej z podjednostek. W ten sposób powstaje heterodimer p66/p51. Trzeciorzędowa struktura domeny polimerazowej p66 przypomina prawą dłoń, dlatego jej poszczególne poddomeny zostały nazwane: „palcami” (żółte prostokąty oznaczone na rysunku literą P), „dłonią” (niebieskie prostokąty oznaczone literą D) oraz „kciukiem” (biały prostokąt oznaczony literą K). Domena polimerazowa połączona jest z domeną RNazy H (zaznaczona jako zielony prostokąt) przy pomocy poddomeny „łącznika” (czerwony prostokąt oznaczony literą Ł). Zaznaczone reszty aminokwasowe: Asp110, Asp185, Asp186 tworzą centrum aktywne polimerazy.

Struktura HIV-1 RT została poznana ponad 10 lat temu (Rys. 1.7 i Rys. 1.8), [Jacobso-Molina i wsp., 1991; Kohlstaedt i wsp., 1992; Jacobso-Molina i wsp., 1993]. Z przeprowadzonych badań wynika, że podjednostki p66 oraz p51 położone są w orientacji „głowa do ogona”. W podjednostce p66, poddomeny: „palców”, „dłoni”, „kciuka” oraz „łącznika” tworzą domenę polimerazową o wymiarach 110x30x45 Å. Domena polimerazowa połączona jest z domeną RNazy H przy pomocy poddomeny „łącznika”. Miejsce aktywne polimerazy leży w szczelinie poddomeny „dłoni” i zawiera wysoce konserwatywne dla wszystkich polimeraz DNA reszty aminokwasowe: Tyr183-Met184-Asp185-Asp186. Do aktywności katalitycznej potrzebna jest także Asp110, po sfałdowaniu białka reszta ta znajduje się w pobliżu centrum katalitycznego HIV-1 RT. Dwie helisy α podjednostki p66: jedna znajdująca się w poddomenie „kciuka”, druga w poddomenie „dłoni”, pracują jak zawias zapewniający właściwe usytuowanie kompleksu matrycy i startera w miejscu aktywnym enzymu (jest to tzw. „zawias starterowy”). Grupa 3'-OH startera znajduje się w pobliżu katalitycznie istotnych reszt aminokwasowych: Asp110-Asp185-Asp186. W ten sposób usytuowana końcowa grupa hydroksylowa jest gotowa do ataku nukleofilowego na znajdujący się w pozycji α atom fosforu należący do przyłączanego trójfosforanu deoksynukleozydowego. Kompleks

matryca:starter zlokalizowany jest w szczelinie utworzonej przez poddomeny: „palców”, „dłoni” i „kciuka” podjednostki p66. Poddomeny „łącznika” podjednostek p66 i p51 oraz poddomena „kciuka” p51 tworzą znaczną część podstawy szczeliny wiążącej kompleks matrycy ze starterem, jednakże tylko kilka reszt aminokasowych wspomnianych poddomen zaangażowanych jest bezpośrednio w tworzenie wiązań z DNA. Tzw. „zawias matrycowy” składa się z reszt aminokwasowych podjednostki p66, wchodzących w skład poddomen „dłoni” i „palców”, które oddziałują z nukleotydami nici matrycowej. Szczególnie istotne wydają się reszty aminokwasowe poddomeny „palców”, które wiążąc się z nicią matrycową odpowiedzialne są za jej odpowiednie usytuowanie podczas procesu polimeryzacji [Jacobo-Molina i wsp., 1993].

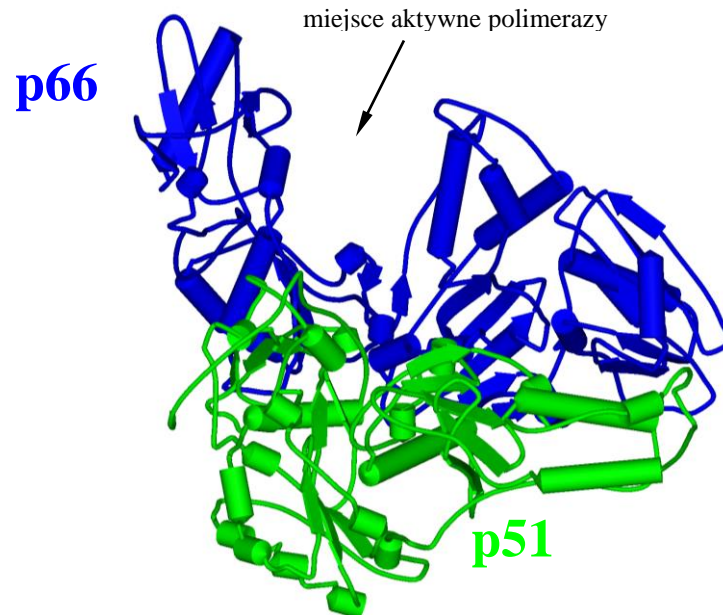
Na podstawie danych rentgenograficznych HIV-1 RT [Jacobo-Molina i wsp., 1993; Kohlstaedt i wsp., 1992] ustalono, że najelastyczniejszym elementem struktury jest poddomena „kciuka” p66, która w zależności od obecności lub braku substratu może być bardziej lub mniej odgięta. Poddomena ta zbudowana jest z pęczka helis, które biorą udział w oddziaływaniach ze szkieletem cukrowcowo-fosforanowym startera oraz nici matrycowej. Badania strukturalne potwierdziły, iż złożony z czterech helis motyw odpowiedzialny jest za wiązanie i translokację kompleksu starter:matryca. [Jacobo-Molina i wsp., 1993]. Poddomena „kciuka” p51 oddalona jest od reszty poddomen p51 i bierze udział w oddziaływaniach z domeną RNazy H białka p66. Poddomena „łącznika” p51 zwiija się w kierunku poddomeny „dłoni” p51, pomiędzy poddomeny „palców” i „kciuka”, w ten sposób szczelina wiążąca DNA zostaje zasłonięta i prawdopodobnie dlatego podjednostka p51 nie wykazuje aktywności polimerazowej (Rys. 1.7).



Rysunek 1.7 Organizacja elementów struktury drugorzędowej podjednostek p66 oraz p51 HIV-1 RT. Czerwone walce przedstawiają helisy α , niebieskie strzałki – łańcuchy β . Na rysunku przedstawione jest położenie czterech poddomen („palców”, „dłoni”, „kciuka” oraz „łącznika”) domeny polimerazowej podjednostek p66 i p51 HIV-1 RT. Rysunek został wykonany za pomocą programu DSVIEWERPro [<http://www.accelrys.com/viewer/>], w oparciu o dane krystalograficzne z Protein Data Bank (PDB) [<http://www.rcsb.org/pdb/>], kod: 1HYS.

Istotną rolę w procesie polimeryzacji przypisuje się dwuwartościowym jonom metali. W miejscu aktywnym HIV-1 RT znajdują się dwa jony Mg^{2+} , które są koordynowane przez dwie konserwatywne reszty Asp poddomeny „dłoni”. Jeden z jonów oddziałuje z wszystkimi trzema fosforanami nadchodzącego trójfosforanu deoksynukleozydowego, drugi natomiast oddziałuje z jego α -fosforanem oraz z grupą 3'-OH startera. W ten sposób jony Mg^{2+} aktywują koniec 3'-OH startera do nukleofilowego ataku na atom fosforu α przyłączanego deoksynukleotydu oraz stabilizują powstający pirofosforan [Doubie i wsp., 1999]. Przyłączenie do katalitycznego centrum polimerazy innych kationów dwuwartościowych niż Mg^{2+} (np. Mn^{2+}) powoduje osłabienie selektywności procesu syntezy DNA [Joyce 1997]. W wiernym powielaniu cząsteczki matrycowej istotną funkcję spełniają reszty aminokwasowe obecne w poddomenie „palców”. Poddomena ta zamyka się w momencie gdy wszystkie substraty potrzebne do utworzenia kolejnego wiązania międzynukleotydu zostały związane z miejscem aktywnym. Taka zmiana konformacyjna powoduje zbliżenie uczestniczących w reakcji reszt Asp do końca 3'-

OH startera i wymaga ścisłego dopasowania przyłączonego nukleotydu do matrycy. [Doublié i wsp., 1999].



Rysunek 1.8 Przestrzenne ułożenie podjednostek p66 i p51 tworzących HIV-1 RT (heterodimer p66/p51). Kolorem niebieskim zaznaczono podjednostkę katalitycznie aktywną: p66, kolorem zielonym podjednostkę p51. Helisy α zaznaczone są jako walce, natomiast łańcuchy β jako strzałki. Rysunek został wykonany za pomocą programu DSVIEWERPro [<http://www.accelrys.com/viewer/>], w oparciu o dane krystalograficzne z PDB [<http://www.rcsb.org/pdb/>], kod: 1HYS.

1.5 Molekularne podstawy zmienności genetycznej wirusów typu RNA

Pierwsze obserwacje wskazujące na niezwykle polimorfizm genetyczny wirusów RNA pochodzą z lat 70-tych XX-go wieku. Pionierskie badania Weissmann'a i współpracowników nad fagiem Q β pokazały, że genomy wirusów potomnych różnią się od genomów wirusów rodzicielskich średnio jedną lub dwoma pozycjami nukleotydowymi [Batschelet i wsp., 1976; Domingo i wsp., 1976]. Powstające w szybkim tempie żywotne mutanty podlegają silnej presji selekcyjnej [Domingo i wsp., 1978]. W następnych latach okazało się, że podobnie zachowują się również inne wirusy RNA oraz retrowirusy. Nie tworzą one w organizmie gospodarza genetycznie homogennej populacji lecz występują jako zbiór wariantów. [Holland i wsp., 1982; Pathak i wsp., 1997; Holland i wsp., 1992; Domingo i wsp., 1995; Eigen i wsp., 1996; Domingo i wsp., 1998; Figlerowicz i wsp., 2003]. Aby opisać tak skomplikowane populacje wirusowe wprowadzono pojęcie kwazi-gatunku. Pojęcie to zostało po raz pierwszy użyte przez autorów hipotezy świata RNA do opisanego procesu replikacji na wczesnym etapie ewolucji [Eigen i wsp., 1977; Eigen i wsp., 1988]. Kwazi-gatunkiem nazwano mieszaninę samoreplikujących się cząsteczek RNA podobnych do cząsteczki macierzystej. Wirusowy kwazi-gatunek został zdefiniowany jako cała populacja filogenetycznie spokrewnionych wariantów wirusowych, które występują w pojedynczym organizmie [Holland i wsp., 1992; Domingo i wsp., 1995; Eigen i wsp., 1996; Domingo i wsp., 1998]. Kiedy działa selekcja pozytywna, proces różnicowania populacji wirusowej jest przyspieszony, a korzystne mutacje mogą zostać w niej utrwalone. Podczas selekcji negatywnej polimorfizm genetyczny może zostać ograniczony poprzez usuwanie niektórych wariantów wirusowych z populacji. W efekcie poziom heterogenności wirusowego kwazi-gatunku nie zależy wyłącznie od tempa mutacji, ale także od wielu innych czynników mających wpływ na kształt populacji wirusowej [Mansky i wsp., 1998; Drake i wsp., 1999].

***Systematyczna analiza wirusów
powstających w zainfekowanym
organizmie umożliwiła identyfikację wielu***

mniej lub bardziej skomplikowanych modyfikacji występujących w obrębie genomu HIV. Najogólniej wyróżnić można ich dwa podstawowe typy: mutacje punktowe oraz bardziej skomplikowane rearanżacje cząsteczek genomowych [Pathak i wsp., 1997]. Pierwsze wprowadzane są zarówno w trakcie procesu replikacji genomu wirusowego jak i po jego zakończeniu, podczas gdy drugie są głównie produktem rekombinacji RNA [Figlerowicz i wsp., 2003; Kim i wsp., 1996].

1.5.1 Mutacje punktowe

1.5.1.1 Mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie mutacji punktowych u wirusów

Mutacje punktowe mogą pojawiać się w cząsteczkach genomowych wirusa w wyniku działania bardzo różnych czynników. Niektóre wprowadzane są podczas procesu zwanego edycją RNA. Edycja może powodować zmianę długości RNA w wyniku insercji bądź delecji nukleotydu. Proces edycji RNA może także prowadzić do substytucji nukleotydowych. Najczęściej powstające substytucje są wynikiem deaminacji adenozyliny lub cytozyny przez specyficzne enzymy komórkowe (zwane deaminazami) [Kim i wsp., 1996; Felder i wsp., 1994; Hajjar i wsp., 1995; Cattaneo i wsp., 1994]. Wirusowe RNA są bardzo podatne na deaminację. U wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV, *ang. hepatitis D virus*) dochodzi do deaminacji A do I (inozyny) przez enzym deaminazę adenozynową. I, podobnie jak G, tworzy parę z C, w związku z czym deaminacja A→I prowadzi do substytucji A→G. Wprowadzona substytucja powoduje zamianę kodonu stop amber (UAG) na kodon tryptofanu (UGG), dzięki czemu z pojedynczej ramki odczytu mogą powstać dwa różne białka: krótsze, biorące udział w replikacji i dłuższe, odgrywające istotną funkcję podczas procesu pakowania wirusów potomnych [Casey i wsp., 1995; Lai i wsp., 1995]. Mutacje punktowe mogą być wprowadzane do genomu wirusowego także na drodze fizycznej lub chemicznej mutagenezy, np. w wyniku naświetlania promieniami UV, działania promieniowania jonizującego, stosowania analogów nukleozydowych, traktowania związkami modyfikującymi zasady purynowe czy pirymidynowe. W warunkach fizjologicznych ilość tego typu mutacji jest jednak znikoma wobec ilości zmian wprowadzanych podczas nieprecyzyjnego kopiowania cząsteczek genomowych [Figlerowicz i wsp., 2003; Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002].

1.5.1.2 Nieprecyzyjne kopiowanie cząsteczek genomowych HIV-1

Cykl życiowy HIV wymaga wielokrotnego powielenia materiału genetycznego zanim dojdzie do wytworzenia wirionów potomnych [Overbaugh i wsp., 2001]. Na wstępie genomowy RNA zostaje przepisany na ssDNA, który w kolejnym etapie służy jako matryca do syntezy dsDNA. Oba procesy katalizowane są przez HIV-1 RT, będącą zarówno RNA- jak i DNA-zależną polimerazą DNA [Kim i wsp., 1996]. Po włączeniu do genomu komórkowego, prowirusowy DNA jest kopiowany wraz z całym genomem

gospodarza przez komórkowe kompleksy replikacyjne. W ostatniej fazie potomne cząsteczki genomowe transkrybowane są przez komórkową polimerazę RNA. Powstaje zatem pytanie, który z czterech wymienionych procesów (synteza DNA zależna od RNA, synteza DNA zależna od DNA, replikacja bądź transkrypcja) odpowiedzialny jest za wprowadzanie punktowych modyfikacji do materiału genetycznego HIV. Z pewnością nie jest nim replikacja genomu komórkowego, w trakcie której częstość mutacji wynosi zaledwie 10^{-10} - 10^{-12} [Glickman i wsp., 1994], tak więc możemy ją pominąć w naszych dalszych rozważaniach. W przeciwieństwie do kompleksów replikujących komórkowy DNA, odwrotne transkryptazy, podobnie jak polimerazy RNA, pozbawione są aktywności naprawczej (*ang. proofreading activity*), stąd też katalizowane przez nie reakcje będą głównym źródłem mutacji [Kim i wsp., 1996; Barklis i wsp., 1986; Williams i wsp., 1992]. Z zebranych dotąd danych wynika, że odwrotne transkryptazy kopiują cząsteczki genomowe z podobną dokładnością, z jaką w jądrze komórkowym syntetyzowany jest RNA. Rezultaty przeprowadzonych badań dowiodły ponadto, że HIV-1 RT wprowadza podobną ilość modyfikacji podczas RNA-zależnej jak i DNA-zależnej syntezy DNA. Można zatem przyjąć, iż wszystkie trzy procesy w jednakowym stopniu generują zmienność genetyczną HIV. Dwa pierwsze (synteza ssDNA i dsDNA) katalizowane są przez HIV-1 RT, tak więc enzym ten odpowiedzialny jest za wprowadzenie około 70% punktowych mutacji do pojedynczej cząsteczki wirusowej [Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002; Kim i wsp., 1996].

Szacuje się, że częstość z jaką HIV-1 RT wprowadza mutacje do nowosyntetyzowanej nici potomnej wynosi od 10^{-2} do 10^{-6} . Oznacza to, że aż 100 nukleotydów może zostać nieprawidłowo włączonych podczas jednego cyklu replikacyjnego genomu o długości ok. 10^4 zasad. Częstość mutacji uzależniona jest jednak od struktury pierwszo- i drugorzędowej RNA [Bebenek i wsp., 1993]. Po uwzględnieniu powyższych czynników ustalono prawdopodobne tempo mutacji HIV-1 *in vivo*, zmierzone przez częstość inaktywacji genu reporterowego *lacZa*. Wynosi ono 10^{-4} - 10^{-5} /pz/cykl replikacyjny [Bebenek i wsp., 1989; Ricchetti i wsp., 1990; Pathak i wsp., 1992]. W układach *in vitro* częstość mutacji wprowadzanych przez HIV-1 RT jest ok. 20-krotnie wyższa, co wskazuje na istnienie hipotetycznego czynnika komórkowego lub wirusowego zwiększającego dokładność replikacji [Mansky i wsp., 1995].

Najczęściej pojawiającymi się mutacjami są substytucje nukleotydowe (tranzycje i transwersje - ok. 81% mutacji). Zdecydowanie mniej liczne są zmiany

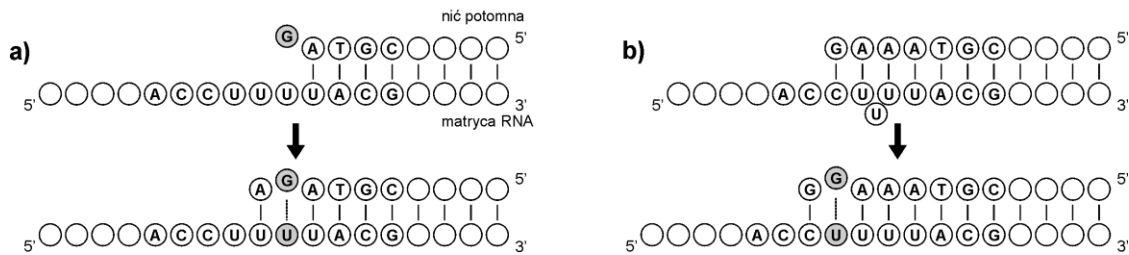
ramki odczytu (ok. 13% mutacji). Pozostałe mutacje to proste delecje (ok. 4%), delecje z insercjami (ok. 2%), bardzo rzadko obserwuje się natomiast duplikacje [Pathak i wsp., 1997]. Prawdopodobny mechanizm wprowadzania niektórych typów mutacji przedstawiony został na Rys. 1.9 [Figlerowicz i wsp., 2003; Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002].

Genom HIV-1 jest wyjątkowo bogaty w reszty adenozynowe (A), (35.6%) w porównaniu z komórkowymi genami oraz genomami wirusów nie należących do lentiwirusów [Berkhout i wsp., 1994]. Uważa się, że HIV-1 RT oraz inne lentiwirusowe polimerazy są szczególnie predysponowane do wprowadzania reszt A podczas nieprecyzyjnej replikacji genomu wirusowego. Alternatywna hipoteza zakłada, że przyczyną ukształtowania takiej struktury genomu HIV-1 jest selektywne pakowanie do wirionów potomnych cząsteczek genomowych zawierających liczne reszty A (działanie presji selekcyjnej w kierunku akumulowania matryc bogatych w reszty A) [Berkhout i wsp., 1994].

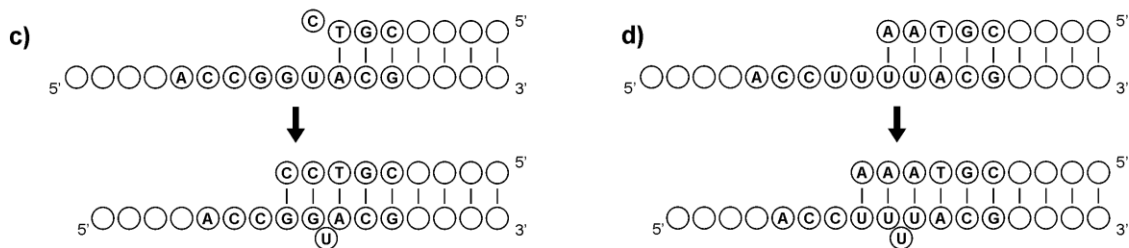
Częstość mutacji jest parametrem, który opisuje wyłącznie wierność, z jaką dana polimeraza kopiuje matrycę. Parametr ten nie uwzględnia wielkości genomu i częstości jego replikacji, dlatego nie może być bezpośrednio wykorzystywany w modelowaniu struktury genetycznej populacji czy przewidywaniu kierunków jej ewolucji. Tempo mutacji (wyrażane na długość genomu oraz na częstość replikacji) jest parametrem, który zdecydowanie lepiej opisuje potencjał ewolucyjny danej populacji [Drake i wsp., 1999]. Każdą grupę organizmów charakteryzuje inna wartość tempa mutacji [Drake i wsp., 1998]. Dla bakterii i wirusów, których genom zbudowany jest z DNA, wartość ta wynosi ok. 0.0034, dla Eucaryota 0.01, a dla wirusów typu RNA, aż 1.2 [Elena i wsp., 1999].

Stosowane obecnie procedury nie pozwalają precyzyjnie określić dokładności, z jaką polimerazy zależne od RNA kopiują cząsteczki matrycowe. Typowe procedury zwykle polegają na: (i) rozdzieleniu produktów polimeryzacji w żelu, (ii) izolacji właściwego produktu z żelu, (iii) amplifikacji izolatu metodą łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR, *ang. polymerase chain reaction*), (iv) wklonowaniu powielonego produktu do wektora, (v) transformacji bakterii otrzymanym konstruktem, (vi) wyizolowaniu plazmidowego DNA z pojedynczych koloni bakteryjnych, (vii) określeniu sekwencji wklonowanej do wektora. Podczas analizowania sekwencji należy jednak pamiętać, że polimeraza używana w reakcji PCR również wprowadza błędy, które muszą zostać uwzględnione. Optymalnym rozwiązaniem wydaje się pominięcie etapu powielania, o ile jest to oczywiście możliwe [Smith i wsp., 1997].

Substytucja nukleotydoma



Zmiana ramki odczytu



Rysunek 1.9 Proponowane mechanizmy powstawania mutacji punktowych. Dokładność kopiowania cząsteczek genomowych zależy od ich struktury oraz właściwości odwrotnej transkryptazy (RT). RT nie posiadają aktywności naprawczej; błędnie wprowadzone nukleotydy pozostają zatem w nowosyntetyzowanej nici. Dodatkowo występowanie charakterystycznych sekwencji – traktów poli-A lub poli-T może powodować tzw. ślizganie się enzymu wzdłuż matrycy (*ang. polymerase slippage*). Jeżeli, pomimo włączenia niewłaściwego nukleotydu, utworzy się słaba para zasad, np. G:U, enzym może kontynuować syntezę nici potomnej; w przypadku, gdy nie dochodzi do utworzenia poprawnych wiązań, synteza nici potomnej zostaje zatrzymana. Najczęściej występującymi mutacjami są substytucje nukleotydoma i zmiany ramki odczytu. Powstawanie substytucji nukleotydoma może być spowodowane: a) błędnym przyłączeniem nukleotydu lub b) utworzeniem chwilowego wybrzuszenia w miejscu niesparowania matrycy i nici potomnej. Do zmiany ramki odczytu może dochodzić: c) w przypadku nieprawidłowego wprowadzenia nukleotydu przez RT, a następnie powstawania miejscowego wybrzuszenia, w celu utworzenia prawidłowych wiązań typu Watsona-Cricka lub d) poprzez ślizganie się enzymu wzdłuż matrycy.

1.5.2 Rearanżacje genomu wirusowego

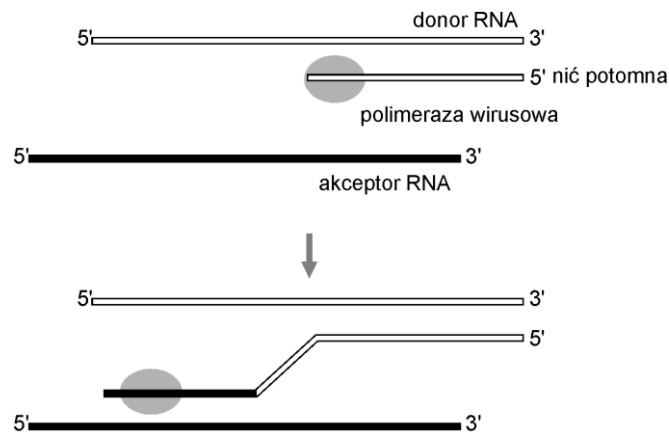
Większe zmiany zostają wprowadzane do genomu wirusowego na drodze rekombinacji RNA lub w wyniku tzw. przetasowań materiału genetycznego (ang. genetic reassortment). Pierwszy proces przypomina rekombinację zachodzącą w organizmach, których genom zbudowany jest z DNA, drugi natomiast może zostać porównany do wymiany chromosomów rodzicielskich podczas mejozy. Dotyczy on wirusów, których genom zbudowany jest z kilku cząsteczek RNA, np. wirusa grypy. Proces przetasowań nie dotyczy więc

retrowirusów stąd nie będzie przedmiotem dalszych rozważań.

1.5.2.1 Rekombinacja RNA

Rekombinacja RNA została po raz pierwszy odkryta na początku lat 60-tych u wirusa polio [Hirst i wsp., 1962; Ledinko i wsp., 1963]. Od tej pory zjawisko to stało się przedmiotem intensywnych badań, zarówno u innych picornawirusów [Pringle i wsp., 1965] jak i pozostałych wirusów RNA [Lai i wsp., 1992; Simon i wsp., 1994] czy retrowirusów [Coffin i wsp., 1979; Zhang i wsp., 1993]. Początkowo uważano, że rekombinacja genetyczna zachodzi tylko u wirusów, których genom jest zbudowany z (+)RNA. Opinia ta została jednak zweryfikowana pod koniec lat 80-tych, kiedy pojawiły się pierwsze doniesienia na temat rekombinacji niehomologicznej występującej u wirusa grypy (wirus (-)RNA) [Khatchikian i wsp., 1989] lub u faga $\Phi 6$ (wirus dsRNA) [Mindich i wsp., 1992; Onodera i wsp., 1993]. Jednak pogląd, że homologiczna rekombinacja zachodzi wyłącznie u wirusów typu (+)RNA, a nie (-)RNA czy dsRNA nadal pozostawał aktualny. Przełom w badaniach nad genetyczną rekombinacją RNA nastąpił dopiero pod koniec lat 90-tych, kiedy Suzuki opisał występowanie homologicznych przeskoków wewnątrzgenowych u rotawirusów (wirus dsRNA) [Suzuki i wsp., 1998]. Dalsze badania nad wirusami (-)RNA potwierdziły, że homologiczna rekombinacja RNA występuje powszechnie wśród wszystkich typów wirusów RNA [Plusnin i wsp., 2002].

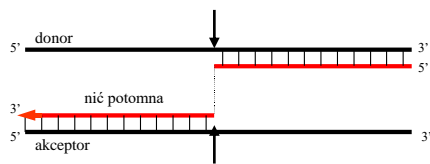
Zjawisko genetycznej rekombinacji RNA zdefiniować można jako proces tworzenia nowych cząsteczek genomowych w oparciu o fragmenty już istniejących genomów. Wstępne wyniki badań pozwoliły zaproponować dwa całkowicie różne mechanizmy tłumaczące w jaki sposób tworzone są rekombinanty wirusowe. Pierwszy zakłada, iż powstają one przez rozerwanie i ponowne połączenie cząsteczek kwasu nukleinowego (*ang. breakage and rejoining*), [Chetverin i wsp., 1997]. Mechanizm ten wykorzystywany jest w rekombinacji DNA. Drugi mechanizm zakłada, iż rekombinacja ma miejsce podczas replikacji genomu wirusowego, kiedy zaangażowana w ten proces polimeraza przenosi się z jednej cząsteczki matrycowej na drugą. Nazwano go mechanizmem wybiórczego kopiowania (*ang. copy choice*) [Vogt i wsp., 1971; Coffin i wsp., 1979]. Obecnie przeważa pogląd, iż rekombinacja RNA zachodzi zgodnie z założeniami hipotezy wybiórczego kopiowania (Rys. 1.10) [Figlerowicz i wsp., 2003; Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002; Alejska i wsp., 2001]. Istnieją jednak pojedyncze doniesienia wskazujące, iż w pewnych specyficznych sytuacjach obowiązywać może alternatywny mechanizm rekombinacji [Chetverin i wsp., 1997 A].



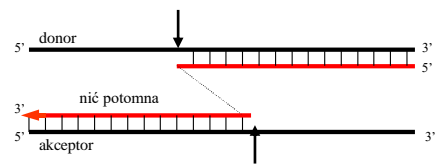
Rysunek 1.10 Schemat rekombinacji genetycznej zachodzącej zgodnie z założeniami hipotezy wybiórczego kopiowania. Hipoteza wybiórczego kopiowania zakłada, że wirusowe rekombinanty powstają podczas procesu replikacji. Wirusowa polimeraza (przedstawiona w postaci szarego owalu) rozpoczyna syntezę nici potomnej na matrycy nazwanej donorem, następnie dochodzi do przeniesienia enzymu na drugą cząsteczkę matrycową, zwaną akceptorem. W rezultacie rekombinant posiada sekwencje pochodzące z dwóch różnych cząsteczek matrycowych.

Jeżeli w rekombinacji uczestniczą dwie identyczne lub prawie identyczne cząsteczki kwasu nukleinowego mówimy, iż jest ona homologiczna, natomiast jeśli biorą w niej udział różne cząsteczki, nazywamy ją niehomologiczną (Rys.1.11) [Figlerowicz i wsp., 2003; Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002; Figlerowicz i wsp., 1997]. Rekombinacja homologiczna może prowadzić zarówno do stabilizacji, jak i destabilizacji genomu wirusowego (Rys. 1.12). Z jednej strony, dzięki zajściu rekombinacji homologicznej może ulec naprawie uszkodzony lub błędnie zsyntetyzowany fragment genu (Rys. 1.12a), z drugiej, rekombinacja homologiczna może pogłębiać proces różnicowania cząsteczek genomowych (Rys. 1.12b). Dodatkowo rekombinację homologiczną podzielić można na precyzyjną i nieprecyzyjną. O precyzyjnej mówimy wówczas, gdy miejsca przeskoków rekombinacyjnych ułożone są dokładnie na odpowiadających sobie nukleotydach. W wyniku zajścia tego typu rekombinacji odtworzone zostają cząsteczki rodzicielskie. Inaczej dzieje się w przypadku nieprecyzyjnej rekombinacji homologicznej, to znaczy gdy miejsca przeskoku rekombinacyjnego położone są w różnych rejonach cząsteczek rodzicielskich. Wówczas pewne fragmenty genomu wirusowego ulegają duplikacji lub delecji (Rys. 1.11) [Figlerowicz i wsp., 1997]. Zachodząca pomiędzy różnymi cząsteczkami RNA rekombinacja niehomologiczna prowadzi do największego zróżnicowania wirusów, odgrywa więc istotną rolę w procesie ich ewolucji. Powstawanie tysięcy wariantów umożliwia wyselekcjonowanie i powielenie tych najlepiej przystosowanych, dzięki którym wirus może przetrwać w niekorzystnych dla siebie warunkach [Hahn i wsp., 2000].

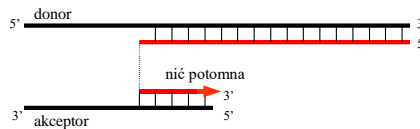
REKOMBINACJA HOMOLOGICZNA PRECYZYJNA



REKOMBINACJA HOMOLOGICZNA NIEPRECYZYJNA

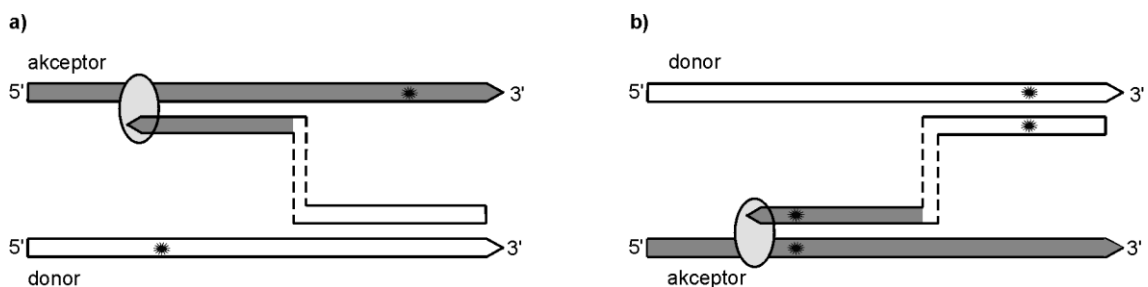


REKOMBINACJA NIEHOMOLOGICZNA



Rysunek 1.11 Dwa podstawowe typy rekombinacji RNA: homologiczna oraz niehomologiczna. W zależności od struktury i funkcji rekombinujących cząsteczek, możemy wyróżnić dwa podstawowe typy rekombinacji RNA: homologiczną oraz niehomologiczną. W rekombinacji homologicznej uczestniczą dwie identyczne lub prawie identyczne cząsteczki matrycowe. Rekombinacja homologiczna nazywana jest precyzyjną wówczas gdy miejsca przeskoku rekombinacyjnego (zaznaczone w postaci strzałek) zlokalizowane są dokładnie między odpowiadającymi sobie nukleotydami. Rekombinacja homologiczna nieprecyzyjna zachodzi, gdy miejsca przeskoku polimerazy zlokalizowane są w innych pozycjach. Rekombinacja homologiczna precyzyjna jest trudna do wykrycia, ponieważ cząsteczki potomne i rodzicielskie są identyczne. W przypadku rekombinacji homologicznej nieprecyzyjnej, pewne sekwencje ulegają duplikacji bądź delecji. Rekombinacja RNA nazywana jest niehomologiczną jeżeli donator i akceptor różnią się od siebie. Rekombinanty niehomologiczne są zwykle nieaktywne i dlatego rzadko obserwowane są *in vivo*, gdzie działa presja selekcyjna.

Genetyczna rekombinacja RNA obserwowana była u wirusów ludzkich, zwierzęcych, roślinnych oraz u bakteriofagów. Wymiana informacji genetycznej najczęściej ma miejsce w obrębie tej samej populacji wirusowej, aczkolwiek znane są przypadki rekombinacji pomiędzy różnymi wirusami, czy nawet pomiędzy RNA wirusowym a RNA pochodzącym z komórki gospodarza (również transgenicznym mRNA) [Green i wsp., 1994].



Rysunek 1.12 Rekombinacja homologiczna może zarówno stabilizować (a) jak i destabilizować (b) genom wirusowy. Załóżmy, że mamy dwie pule cząsteczek genomowych - pierwszą stanowią cząsteczki posiadające mutację na końcu 3', a drugą cząsteczki z mutacją na końcu 5' (mutacje oznaczono gwiazdkami) - oraz, że przeskoki rekombinacyjne zachodzą w części centralnej cząsteczek. a) Jeżeli polimeraza (zaznaczona szarym owalem) rozpocznie syntezę na matrycy nie posiadającej mutacji na końcu 3' (nić donorowa, zaznaczona kolorem białym), a następnie przeskoczy na matrycę nie posiadającą mutacji na końcu 5' (nić akceptorowa, zaznaczona kolorem szarym), utworzona cząsteczka

potomna będzie typu dzikiego. b) Jeżeli polimeraza rozpocznie syntezę na matrycy posiadającej mutację na końcu 3' (w tym przypadku jest to nić donorowa, oznaczona kolorem białym), a następnie przeskoczy na matrycę akceptorową (oznaczona kolorem szarym), posiadającą mutację na końcu 5', nowopowstała cząsteczka obciążona będzie obiema mutacjami.

1.5.2.1.1. Rekombinacja genetyczna retrowirusów

Jedną z najbardziej osobliwych cech retrowirusów jest wysoka częstość z jaką ich materiał genetyczny ulega rekombinacji. Do tej pory nie znaleziono innych naturalnie występujących układów biologicznych o tak dużej zdolności do wymiany materiału genetycznego [Pathak i wsp., 1997]. Badania mechanizmu replikacji genomów retrowirusowych pokazały, że rekombinacja genetyczna zachodząca zgodnie z hipotezą wybiórczego kopiowania odgrywa bardzo istotną rolę w cyklu życiowym tych wirusów [Pathak i wsp., 1997].

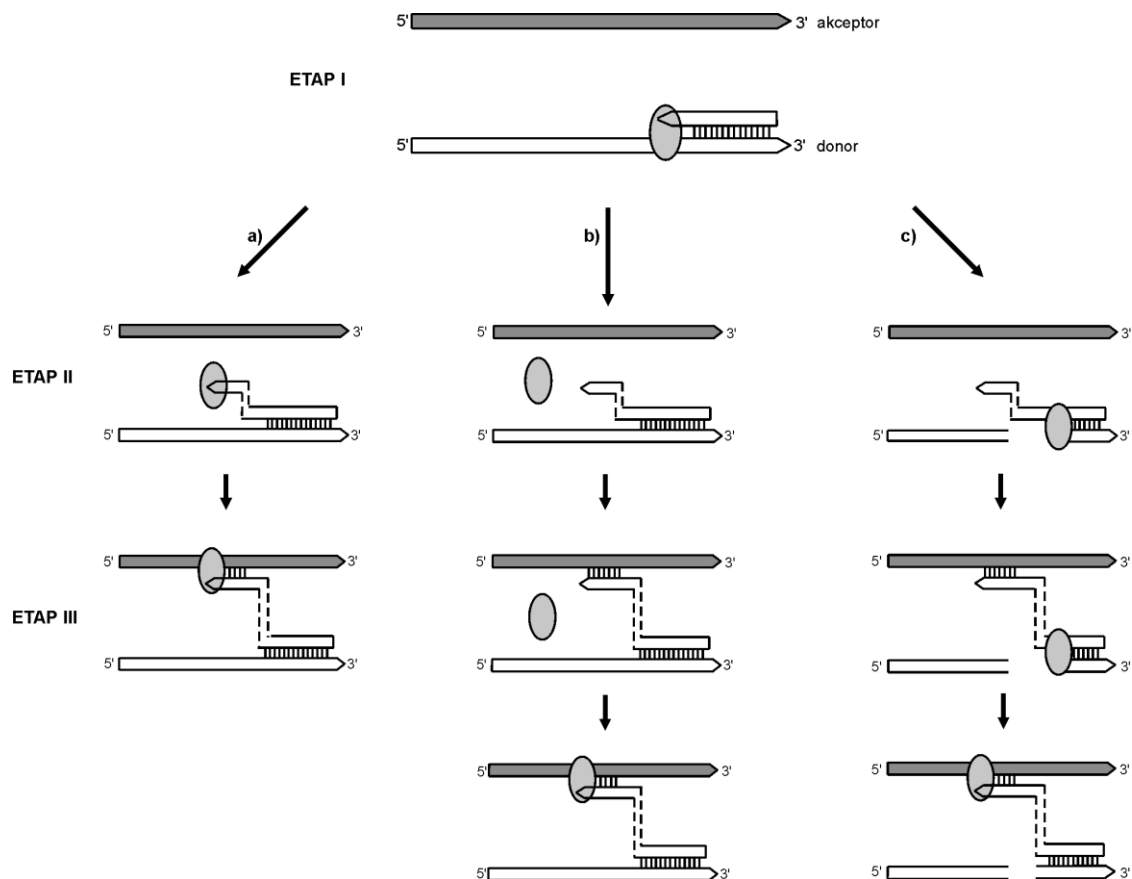
Obserwowana u HIV-1 wysoka częstość rekombinacji wydaje się mieć ścisły związek z faktem, iż HIV-1 RT posiada naturalną zdolność do przeskakiwania pomiędzy cząsteczkami genomowymi [Bebenek i wsp., 1989; Temin 1993]. Wiadomo bowiem, że proces replikacji genomu retrowirusowego wymaga, by kompleks -odwrotna transkryptaza-niść potomna co najmniej dwukrotnie przeniósł się z jednej cząsteczki matrycowej na drugą. Jak już wspomniano wcześniej, pierwszy przeskok -przeniesienie nowo zsyntetyzowanego (-) s-s DNA z końca 5' genomu wirusa na koniec 3', jest możliwy dzięki identycznym sekwencjom powtórzonym na obu końcach wirusowego RNA (sekwencje R). Drugi przeskok: przeniesienie nowozsyntetyzowanego (+) s-s DNA wymaga obecności drugiego rejonu homologii, którego rolę pełnią sekwencje wiążące starter PBS. W każdym wirionie HIV-1 zapakowane są dwie cząsteczki (+)RNA, stąd przeskoki rekombinacyjne mogą mieć charakter wewnątrz- lub międzycząsteczkowy [Pathak i wsp., 1997], dokładny opis procesu replikacji genomu wirusowego został umieszczony w podrozdziałach: 1.2 oraz 1.3.

Chociaż hipoteza wybiórczego kopiowania nie wyjaśnia molekularnych podstaw procesu rekombinacji, pozwala jednak wyróżnić jego trzy podstawowe etapy (Rys. 1.13), [Figlerowicz i wsp., 2003; Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002]. Podczas pierwszego, synteza nici potomnej na matrycy zwanej cząsteczką donorową zostaje zahamowana. Rolę cząsteczki donorowej pełnić może zarówno genomowy RNA jak i powstały w procesie odwrotnej transkrypcji ssDNA. Wiele jest przyczyn, dla których

RT ulega zatrzymaniu na cząsteczce donorowej. Najczęściej obserwowane to: brak ciągłości matrycy, obecność specyficznych sekwencji czy motywów strukturalnych, błędne wprowadzenie nukleotydu lub oddziaływania genomowego RNA z białkiem nie uczestniczącym w replikacji. W drugim etapie kompleks RT z nicią potomną zostaje uwolniony z donorowego RNA/ssDNA lub też RT cofa się na matrycy, uwalniając koniec 3' nowosyntetyzowanej nici. Ostatni etap polega na przeniesieniu RT wraz z cząsteczką potomną na nową matrycę zwaną akceptorem (genomowy RNA lub ssDNA). Scenariusz, według którego zachodzi ten proces, uzależniony jest od przebiegu etapu drugiego. Jeżeli RT oraz nić potomna zostały uwolnione z cząsteczki donorowej jako kompleks, mogą być w całości przeniesione na cząsteczkę akceptorową. Czynnikiem umożliwiającym zajście tego procesu jest hybrydyzacja nici potomnej do sekwencji komplementarnej występującej w akceptorowym RNA/ssDNA lub wiązanie RT do sekwencji promotorowej czy imitującej promotor, obecnej w akceptorowym RNA/ssDNA. Jeżeli po oddysocjowaniu z cząsteczki donorowej kompleks RT z nicią potomną uległ rozpadowi, musi on zostać odtworzony na innej matrycy. Najprostszym rozwiązaniem w tej sytuacji jest hybrydyzacja kilku nukleotydów z końca 3' nici potomnej do akceptorowego RNA/ssDNA. Następnie koniec ten może służyć RT jako starter. Jeżeli w drugim etapie doszło do cofnięcia RT na cząsteczce donorowej, wówczas matrycowy RNA/ssDNA może ulec degradacji (np. w skutek działania rybonukleazy H stanowiącej część odwrotnej transkryptazy lub nukleazy specyficznej dla ssDNA) w wyniku czego uwolniony zostaje koniec 3' nici potomnej. Hybrydyzuje on do sekwencji komplementarnej obecnej w cząsteczce akceptorowej, umożliwiając przeskok RT na nową matrycę.

W rezultacie częstych przeskoków rekombinacyjnych RT, materiał genetyczny wirusów potomnych pochodzi z obydwu cząsteczek genomowych obecnych w wirionie. Dodatkowo, podczas przeskoków rekombinacyjnych, RT często wprowadzają krótsze bądź dłuższe insercje, duplikacje oraz delecje do genomu wirusowego [Pathak i wsp., 1997; Coffin, 1979; Zhang i wsp., 1993; Stuhlmann i wsp., 1992; Zhang i wsp., 1994]. Pokazano na przykład, że RT mogą bardzo efektywnie usuwać identyczne powtórzenia nukleotydowe, wprowadzone do genomowego RNA. W zależności od długości identycznych powtórzeń, częstość rekombinacji waha się w granicach od 40% (dla sekwencji o długości ok. 100 nt) do nawet 90% (dla sekwencji o długości ok. 700 nt) [Stuhlmann i wsp., 1992]. Ponadto w wyniku rekombinacji niehomologicznej może dochodzić do włączania onkogenów do genomu retrowirusowego [Zhang i wsp., 1993

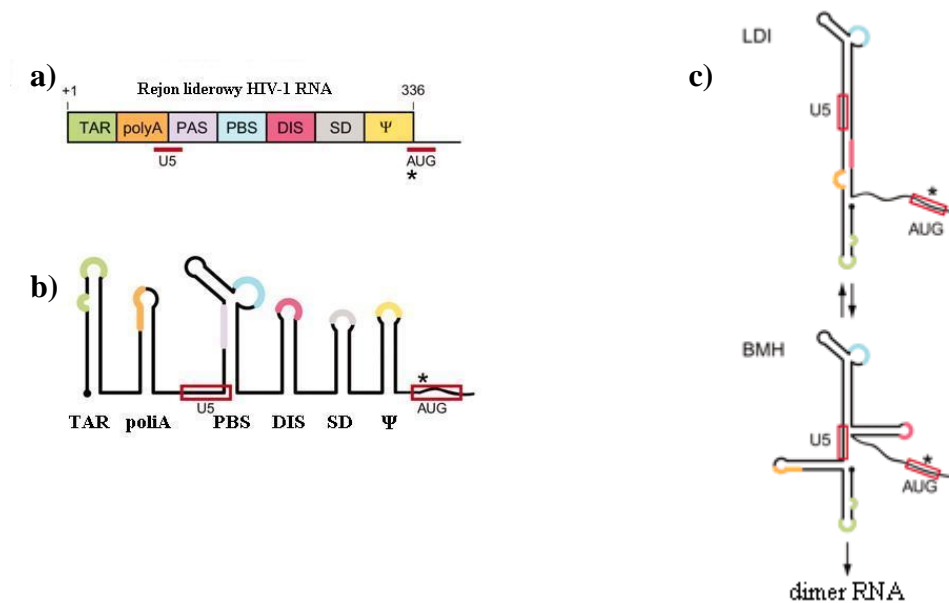
A]. Ponieważ obecność podobnych sekwencji w znaczącym stopniu zwiększa efektywność procesu rekombinacji, w miejscu włączenia onkogenu do genomu wirusowego występują zazwyczaj krótkie rejony oskrzydłające złożone z homologicznych powtórzeń [Figlerowicz i wsp., 2003].



Rysunek 1.13 Proponowane mechanizmy rekombinacji, zachodzącej zgodnie z hipotezą wybiórczego kopiowania. Zgodnie z hipotezą wybiórczego kopiowania proces rekombinacji genetycznej można podzielić na trzy podstawowe etapy. Zebrane dotychczas dane sugerują, iż przeniesienie kompleksu RT–nić potomna z cząsteczki donorowej na akceptorową może przebiegać według co najmniej trzech różnych scenariuszy. ETAP I – zahamowanie syntezy nici potomnej na matrycy donorowej (zaznaczona kolorem białym) - jest wspólny dla wszystkich trzech scenariuszy. Scenariusz a) ETAP II – kompleks RT (zaznaczona szarym owalem) z nicią potomną zostaje uwolniony z cząsteczki donorowej (jako całość). ETAP III – przeniesienie RT wraz z nicią potomną na matrycę akceptorową (zaznaczona kolorem szarym) i kontynuacja syntezy. Scenariusz b) ETAP II – RT i nić potomna zostają osobno uwolnione z cząsteczki donorowej. ETAP III- koniec 3' nowosyntetyzowanej nici zostaje przeniesiony na matrycę akceptorową, następnie do powstałego dupleksu przyłącza się RT. Po odtworzeniu kompleksu replikazowego synteza nici potomnej może zostać wznowiona. Scenariusz c) ETAP II – RT cofa się na matrycy uwalniając koniec 3' nowosyntetyzowanej nici, równocześnie degradując fragment cząsteczki donorowej (sytuacja taka może mieć miejsce, gdy cząsteczką matrycową jest RNA, ponieważ RT posiada aktywność RNazy H). ETAP III – uwolniony koniec 3' nowosyntetyzowanej nici hybryduje z sekwencją komplementarną, obecną w cząsteczce akceptorowej. RT może przenieść się na nową matrycę i kontynuować syntezę DNA.

1.5.2.1.2 Struktura genomu HIV-1 a częstość przeskoków rekombinacyjnych

RNA HIV-1 spełnia podwójną funkcję: służy jako mRNA oraz jako cząsteczka genomowa. Jej 5'-UTR (*ang. untranslated region*), zwany regionem liderowym, składa się z 335 nt (począwszy od nt +1) i zawiera liczne sekwencje regulatorowe odgrywające istotną rolę podczas cyklu replikacyjnego wirusa (Rys. 1.14). Pierwszych 97 nt to tzw. rejon R (*ang. redundancy*), zlokalizowany także na końcu 3' cząsteczki genomowej. Obecność identycznych powtórzeń wspiera pierwszy przeskok rekombinacyjny HIV-1 RT w trakcie odwrotnej transkrypcji. Wykazano, że w obrębie rejonu R ulokowane są dwie struktury typu spinki do włosów: TAR oraz poli(A) [Berkhout i wsp., 2001]. Spinka TAR spełnia ważną funkcję w procesie aktywacji transkrypcji genów wirusowych, oddziałując z białkiem Tat (*ang. transcription anti-termination protein*). Spinka poli(A) uczestniczy w regulacji poliadenylacji transkryptów wirusowych [Klasens i wsp., 1998]. Za rejonem R znajduje się sekwencja wiążąca starter, PBS, która również może przyjmować strukturę spinki do włosów. W jej trzonie znajduje się sekwencja aktywująca starter (PAS, *ang. primer activation signal*), która w prawdzie nie bierze udziału w przyłączaniu startera, za to jest niezbędna do efektywnej inicjacji i elongacji procesu odwrotnej transkrypcji [Berkhout i wsp., 2002]. W rejonie liderowym genomu HIV-1 występują ponadto: sekwencja kodująca sygnał inicjacji dimeryzacji (DIS, *ang. dimer initiation signal*), sekwencja uczestnicząca w tworzeniu subgenomowych mRNA (SD, *ang. major splice donor*), sekwencja kodująca sygnał pakowania (Ψ) oraz sekwencja zawierająca kodon START AUG, inicjujący syntezę poliproteiny Gag. Region Ψ wiąże białko nukleokapsydu (NC) i uczestniczy w selektywnym pakowaniu genomowych cząsteczek RNA do wirionów potomnych. Każda z sekwencji: DIS, SD oraz Ψ także może tworzyć strukturę spinki (Rys. 1.14a i 1.14b).



Rysunek 1.14 Organizacja rejonu liderowego (5'-UTR) HIV-1 [Abbink i wsp., 2003]. a) Organizacja 5'-UTR. Sekwencje regulatorowe zaznaczone są w postaci kolorowych prostokątów. Dwa segmenty, odległe od siebie w strukturze pierwszorzędowej, które biorą udział w tworzeniu dupleksu U5-AUG w strukturze drugorzędowej (BMH), zostały podkreślone czerwoną linią. Kodon START poliproteiny Gag oznaczono gwiazdką. b) Model struktury drugorzędowej rejonu 5'-UTR HIV-1. W rejonie liderowym może powstać sześć struktur spinkowych: TAR, poli(A), PBS, DIS, SD oraz Ψ. Sekwencje regulatorowe, obecne w poszczególnych spinkach, zaznaczone są kolorami, które odpowiadają oznaczeniom na Rys. 1.14a. c) 5'-UTR może tworzyć dwie alternatywne struktury: wydłużoną (LDI, *ang. long distance interaction*) oraz rozgałęzioną (BMH, *ang. branched multiple structure*). Postuluje się, że segmenty U5 oraz AUG, przedstawione na rysunku jako jednoniciowe, występują w konformerze BMH jako dupleks U5-AUG. Tworzenie tego typu oddziaływań odgrywa najprawdopodobniej istotną rolę w regulacji translacji poliproteiny Gag [Abbink i wsp., 2003].

Region liderowy HIV-1 może przybierać dwie struktury drugorzędowe: wydłużoną (LDI, *ang. long distance interaction*) oraz rozgałęzioną (BMH, *ang. branched multiple structure*) (Rys. 1.14c). Obydwie konformacje wykazują różną zdolność do tworzenia dimerów RNA. W przypadku konformeru LDI, sekwencja odpowiedzialna za dimeryzację jest zaangażowana w oddziaływania z sekwencją poliA, co uniemożliwia powstanie dimeru RNA. W konformerze BMH sekwencja DIS tworzy strukturę spinki z wyeksponowaną sekwencją palindromową uczestniczącą w oddziaływaniach typu *kissing-loop* z taką samą sekwencją palindromową obecną w drugiej genomowej cząsteczce RNA [Abbink i wsp., 2003]. Pokazano, że białko NC stymuluje przejście konformeru LDI w konformer BMH, stabilizując strukturę BMH [Huthoff i wsp., 2001]. Wydaje się zatem, iż dynamizm konformacyjny rejonu liderowego HIV-1 odgrywa istotną rolę w regulacji cyklu życiowego HIV-1.

Wstępne badania dotyczące wpływu motywów strukturalnych, występujących w rejonie liderowym HIV-1 RNA, na efektywność przeskoków rekombinacyjnych HIV-1 RT przeprowadzone zostały w ostatnich latach przez Berkhout'a

i współpracowników. Autorzy twierdzą, że najistotniejszą rolę podczas przeskoków rekombinacyjnych pełni górna część pętli spinki TAR, co w kontekście usuwania tego rejonu RNA przez RNazę H, przed przeniesieniem kompleksu replikazowego na matrycę akceptorową, wydaje się być paradoksem. Berkhout postuluje, że kluczową rolę w trakcie rekombinacji odgrywa motyw komplementarny do spinki TAR (spinka anty-TAR), obecna w (-) s-s DNA. Ponieważ rejony R występują na obydwu końcach genomowego RNA HIV-1, przeskoki rekombinacyjne mogą być wspierane przez oddziaływania typu *kissing-loop* występujące pomiędzy spinką anty-TAR (-) s-s DNA i spinką TAR występującą w rejonie R zlokalizowanym na końcu 3'. Wyniki badań Berkhout'a sugerują więc, że przeskoki rekombinacyjne zachodzą nie tylko dzięki homologii pomiędzy sekwencjami R, lecz także dzięki ich specyficznej strukturze. Wprowadzenie do donora mutacji, które znoszą parowanie nukleotydów pomiędzy spinką anty-TAR donora i spinką TAR akceptora, powoduje drastyczny spadek wydajności rekombinacji [Berkhout i wsp., 2001]. Badania prowadzone na dłuższym fragmencie rejonu liderowego, pozwalającym na utworzenie struktur LDI bądź BMH, sugerują, że stabilizacja struktury BMH, poprzez stabilizację struktury spinki poly(A), wpływa korzystnie na proces dimeryzacji, lecz, co zaskakujące, negatywnie na wydajność tworzenia rekombinantów przez HIV-1 RT [Huthoff i wsp., 2003; Berkhout i wsp., 2002; Berkhout i wsp., 2001].

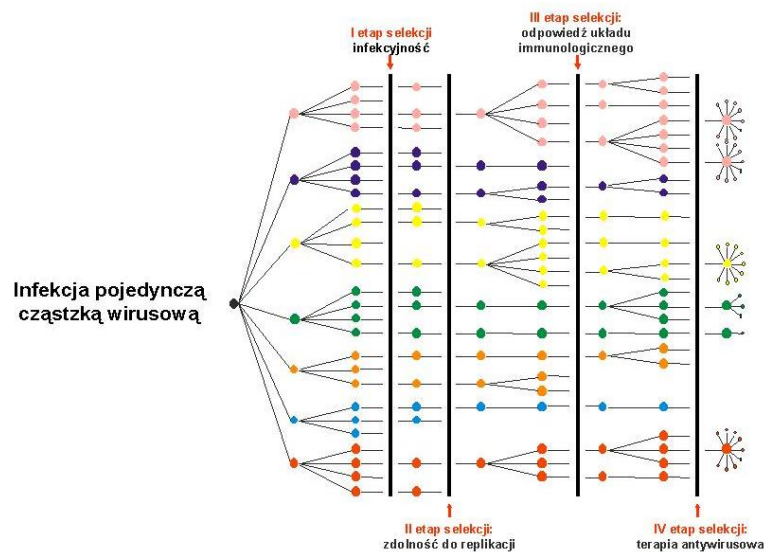
Podsumowanie. Genom HIV, podobnie jak i innych retrowirusów, stanowi stosunkowo długa i mało trwała pojedyncza cząsteczka RNA. Można by sądzić, iż posiadający niestabilny genom wirus jest z góry skazany na zagładę. Tymczasem wykorzystał on swoją zdawałoby się najsłabszą stronę jako atut w walce o przetrwanie. W rezultacie, niespotykany w „świecie DNA” polimorfizm genetyczny stał się jedną z cech charakterystycznych retrowirusów, w tym szczególnie HIV. Niezwykle istotnym elementem w zastosowanej strategii jest odwrotna transkryptaza odpowiedzialna zarówno za nieprecyzyjne kopiowanie cząsteczek genomowych jak i za wysoką częstość ich rekombinacji [Figlerowicz i wsp., 2003; Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002; Williams i wsp., 1992; Bebenek i wsp., 1993].

Uzyskane w ostatnich latach dane sugerują, że infekcję wirusową można przyrównać do niezwykle skomplikowanego eksperymentu selekcji RNA, podczas którego z puli zróżnicowanych cząsteczek wybierane i powielane zostają tylko te, które najlepiej dopasowują się do zadanych warunków (Rys. 1.15). W przypadku cząstek wirusowych, te najlepiej przystosowane charakteryzują się opornością na stosowane preparaty przeciwwirusowe oraz brakiem wrażliwości na odpowiedź immunologiczną gospodarza. Szacunkowe dane wskazują, iż podczas jednego tylko

dnia w organizmie chorego powstaje około 10^4 - 10^5 punktowych mutacji, w każdej pozycji nukleotydowej genomu HIV [Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2002].

Zmienność populacji wirusowej jest jednak głównie wynikiem procesu rekombinacji genetycznej. Im większa i bardziej zróżnicowana wyjściowa pula infekujących cząstek wirusowych, tym większe prawdopodobieństwo, że warianty odporne na potencjalnie zastosowany lek będą istniały w populacji wirusowej już przed rozpoczęciem terapii [Figlerowicz i wsp., 2003]. Proces selekcji przechodzą pozytywnie tylko najlepiej

przystosowane cząstki wirusowe, zostają one powielone i stanowią nową populację rodzicielską wirusów opornych na stosowany preparat. Taką sytuacja może zaistnieć w przypadku tak zmiennych wirusów jak HIV czy HCV, dlatego też właśnie one stanowią szczególne zagrożenie dla człowieka.



Rysunek 1.15 Infekcja wirusem HIV jako przykład selekcji RNA. Infekcja wirusem typu RNA może zostać porównana do eksperymentu selekcji RNA. Podczas pierwszego etapu, pojedyncza cząstka wirusowa (czarna kropka) infekuje komórkę i zaczyna się namnażać. W rezultacie powstaje pula wirusów potomnych (oznaczone w postaci kolorowych kropek), które różnią się od siebie i macierzystej cząstki wirusowej. Kiedy wirusowe cząstki potomne opuszczają infekowaną komórkę, poddane zostają selekcji ze strony organizmu gospodarza. Po pierwsze, wirusy potomne muszą być infekcyjne, by móc zakażać kolejne komórki gospodarza, jest to pierwszy etap selekcji. Wirusy infekujące kolejne komórki muszą być zdolne do powielania oraz produkcji kolejnych wirusów potomnych, w przeciwnym wypadku zostaną wyeliminowane, jest to drugi etap selekcji. Po kilku dniach, wirusy utrzymujące się w organizmie gospodarza poddawane są kolejnej selekcji ze strony układu odpornościowego gospodarza. W populacji wirusowej pozostają zatem jedynie warianty, które są niewrażliwe na odpowiedź immunologiczną gospodarza, jest to trzeci etap selekcji. Zainfekowany pacjent zazwyczaj zostaje poddany terapii przeciwwirusowej. W jego organizmie mogą przetrwać i dalej powielać się tylko takie warianty wirusowe, które są odporne na podany lek, jest to czwarty etap selekcji. W ten sposób, po czterech etapach selekcji, w organizmie zainfekowanego pacjenta z pojedynczej cząstki wirusowej powstaje nowa pula różnorodnych, infekcyjnych wirusów potomnych, zdolnych uniknąć odpowiedzi immunologicznej gospodarza i opornych na zaaplikowany preparat przeciwwirusowy.

2. CEL PRACY

Jednym z najpoważniejszych problemów, z jakimi boryka się współczesna medycyna, jest brak skutecznych metod profilaktyki i terapii zakażeń HIV. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy wydaje się być niezwykle polimorfizm genetyczny wirusa. Wyniki dotychczasowych badań dowodzą, że enzymem odgrywającym kluczową rolę w procesie różnicowania populacji HIV jest odwrotna transkryptaza. Odpowiada ona zarówno za nieprecyzyjne kopiowanie cząsteczek genomowych HIV jak i za wysoką częstość ich rekombinacji. Podstawowym celem pracy było zatem jak najlepsze poznanie czynników wpływających na zdolność odwrotnej transkryptazy do generowania nowych wariantów wirusa.

Realizacja tak zarysowanych badań wymagała osiągnięcia następujących celów szczegółowych:

1. Otrzymania biologicznie aktywnej odwrotnej transkryptazy ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (HIV-1 RT - heterodimer p51/p66) oraz jej podjednostek - p66 i p51.
2. Określenia optymalnych warunków reakcji odwrotnej transkrypcji *in vitro*.
3. Ustalenia, w jakim stopniu struktura matrycowych cząsteczek RNA czy DNA wpływa na precyzję, z jaką są one powielane przez HIV-1 RT.
4. Poznania zasadniczych czynników, indukujących homologiczne i niehomologiczne przeskoki rekombinacyjne HIV-1 RT.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Materiały

3.1.1 Enzymy

Kinaza polinukleotydowa T4 (10u/μl), polimeraza DNA Taq (5u/μl), producent Fermentas,

Inhibitor RNaz RNasin (40u/μl), ligaza DNA T4 (1-3u/μl), polimeraza DNA Taq (5u/μl), polimeraza DNA Pfu (2-3u/μl), polimeraza RNA T7 (20u/μl), odwrotna transkryptaza Mu-MLV (M-MLV lub M-MuLV 200u/μl), DNaza RQ1, wolna od RNaz (1u/μl), fragment Klenowa polimerazy DNA I (5-10u/μl), producent Promega,

Enzymy restrykcyjne

*Bam*H I (10u/μl), *Dpn* I (10u/μl), *Eco*R I (12u/μl), *Eco*R V (10u/μl), *Hind* III (10u/μl), *Kpn* I (8-12u/μl), *Mlu* I (10u/μl), *Pst* I (10u/μl), *Pvu* II (10u/μl) (8-12u/μl), *Sma* I (8-12u/μl), *Xba* I (8-12u/μl), producent Promega,
Nde I (10u/μl), producent Roche

3.1.2 Izotopy

dCTP [α 32 P] 3000 Ci/mmol

ATP [γ 32 P] 4000-5000 Ci/mmol

producent ICN

3.1.3 Startery oraz matryce

Jednoniciowe DNA (ssDNA) dostarczane były przez firmę ARK bądź Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Sekwencja promotora polimerazy RNA T7 została podkreślona; sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne zostały zaznaczone na czerwono.

Tabela 3.1 Użyte startery

STARTER	SEKWENCJA ZAPISANA OD KOŃCA 5' DO KOŃCA 3'
DT7-5	TAATACGACTCACTATAGGGCGACGGCGAGCTCGCTGGTGATTTG
Drec-3pUC19	TAGACACTCTTGTAAAGAGGTCTG
AT7-5pUc19	TAATACGACTCACTATAGGGCGAGCCTGCTAAGGCGGTCGTT
A3	CGGCGAGCTCGCTGGTGATTTG
EtoE-p	CCCGTTCTACCTGG

MATRYCA	SEKWENCJA ZAPISANA OD KOŃCA 5' DO KOŃCA 3'
EtoE-d ₁	CTCGAGGAGAGCCCTGTTCCAGGTAGGAACGGG
EtoE-a10	TGCTCGGAGGACTCGAGGAGA
EtoE-a5	TGCTCGGAGGACTAGCTCGA
EtoE-a3	TGCTCGGAGGACTAGTTCCTC
EtoE-a	TGCTCGGAGGACTAGTTCGAG
CopyKd	AAACGCTCTGATACCCAGGTAGGAACGGG
CopyKa	AAACGCTCTGATAC
HELPER-D	CGAGTCCGAACCTCTGCTCGATTATTTACACCAGGTAGGAACGGG
HELPER-A	CAATTACACAGTTGCAGGTTTCATGTACCAACCTCTGCTCGCGGTGAACACTTGCC
HELPER	GGCAAGTGTTCCCGCGAGCAGAGGTTCCGACTCG
EtoE-T7-RNA	<u>TAATACGACTCACTATAG</u>
EtoEd ₁ -M	CCC GTT CCT ACC TGG AAC AGG GCT CTC CTG AG CT ATA GTG AG TCG TAT TA
EtoE-a10-M	CTCCTCGAGCTCCTCCGAGCACTATAGTGAGTCGTATTA
EtoE-a5-M	CGAGCACTAGTCCTCCGAGCACTATAGTGAGTCGTATTA
EtoE-a3-M	AGCGAACTAGTCCTCCGAGCACTATAGTGAGTCGTATTA
EtoE-a-M	CTCGAACTAGTCCTCCGAGCACTATAGTGAGTCGTATTA
HEL-D-M	CCC GTT CCT ACC TGG TGT AAA TAA TCG AG CAG AGG TTC CGA CT CG CT ATA GTG AG TCG TAT TA
HEL-A-M	GGCAAGTGTTCCCGCGAGCAGAGGTTGGTACATGAACCTGCAACTGTGTAATTGCTATAGTGAGTCGTATTA
HEL-M	CGAGTCCGAACCTCTGCTCGCGGTGAACACTTGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
HVR-5-DNA*	AA TCTAGA CGTTGACGGGGAACTATGTGACAGGGGGACGATGGCCAAAAACCCCTCGGGATTACG
HCV-E1**	AA TCTAGA CCCGGCCACGTGACAGGTCACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCACTACAG

¹⁾ Sekwencja promotora polimerazy RNA T7 została podkreślona

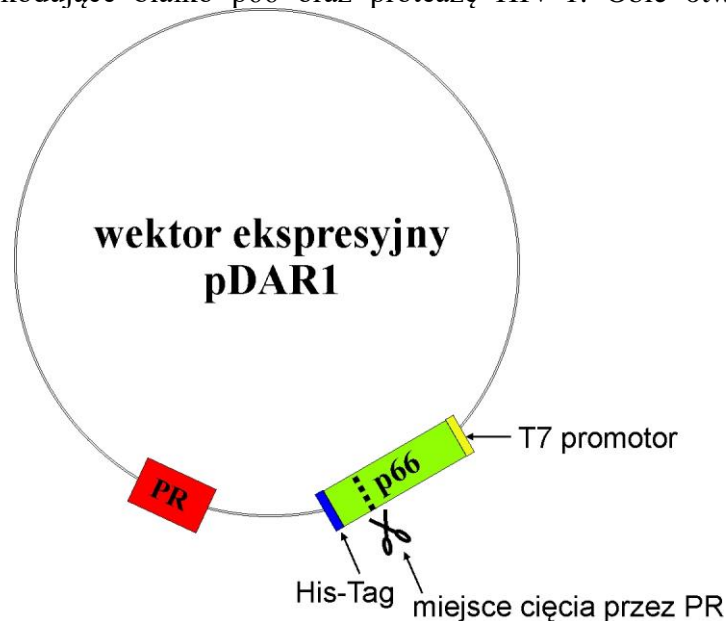
²⁾ Sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne zostały zaznaczone na czerwono

* Pozycja w genomie HCV: +1481/+1541, sekwencja została powiększona o 8 nt – miejsce rozpoznawane przez enzym *Xba* I i dwa dodatkowe nt

** Pozycja w genomie HCV: +1269/+1329, sekwencja została powiększona o 8 nt – miejsce rozpoznawane przez enzym *Xba* I i dwa dodatkowe nt

3.1.4 Plazmidy

Wektor ekspresyjny pDAR1 – otrzymany dzięki uprzejmości dr St. Hughes'a, National Cancer Institute, Frederic Cancer and Development Center, Frederic, USA. Zawiera cDNA kodujące białko p66 oraz proteazę HIV-1. Obie otwarte ramki



odczytu znajdują się pod tym samym promotorem polimerazy RNA T7. Obecność wirusowej proteazy sprawia, iż w komórkach bakteryjnych z części wyprodukowanego białka p66 powstaje podjednostka p51. W ten sposób utworzony zostaje heterodimer białek p66/p51 HIV-1 RT.

Rysunek 3.1 Wektor pDAR1. Wektor ekspresyjny zawiera cDNA kodujący podjednostkę p66 (zaznaczony zielonym prostokątem) i sześć reszt histydynowych (tzw. His-Tag, zaznaczony niebieskim prostokątem) oraz cDNA wirusowej proteazy (zaznaczony czerwonym prostokątem). Obydwe otwarte ramki odczytu oddalone są od siebie o 148 pz i mieszczą się pod tym samym promotorem polimerazy RNA T7 (zaznaczony żółtym prostokątem).

Wektor ekspresyjny pET11a (producent Novagen)

Plazmid pUC18 oraz pUC19 (producent Novagen)

Wektor ekspresyjny mutpDAR1 – otrzymany w oparciu o wektor pDAR1 i wykorzystywany do ekspresji podjednostki p66 w komórkach bakteryjnych

Wektor ekspresyjny p51pET - otrzymany w oparciu o wektor pET11a i wykorzystywany do ekspresji podjednostki p51 w komórkach bakteryjnych

Plazmid pUC18-HVR5 - plazmid pUC18 z wklonowanym cDNA, odpowiadającym 69-nt fragmentowi rejonu hiperzmiennego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. hepatitis C virus)

Plazmid pHIVRSd – plazmid pUC19, z wklonowanym cDNA, odpowiadającym fragmentowi +1/+137 sekwencji liderowej HIV-1, do badania rekombinacji homologicznej

Plazmid pHIVRSa – plazmid pUC19, z wklonowanym cDNA, odpowiadającym fragmentowi -20/+96 sekwencji 5'-LTR genomowej cząsteczki HIV-1, do badania rekombinacji homologicznej

Plazmid *pBMVRd* - plazmid pUC19, z wklonowaną sekwencją cDNA rekombinacyjnie aktywnego fragmentu genomowej cząsteczki RNA2 wirusa mozaiki stokłosa (BMV, *ang brome mosaic virus*), do badania rekombinacji homologicznej

Plazmid *pBMVRa* - plazmid pUC19 z wklonowaną sekwencją cDNA rekombinacyjnie aktywnego fragmentu genomowej cząsteczki RNA3 wirusa BMV, do badania rekombinacji homologicznej

Plazmid *pRNAI-NH* – plazmid pUC19 z wklonowaną sekwencją cDNA rekombinacyjnie aktywnego fragmentu genomowej cząsteczki RNA1 wirusa BMV, do badania rekombinacji niehomologicznej

Plazmid *pMar1-RNA3* – plazmid pUC19 z wklonowaną sekwencją cDNA rekombinacyjnie aktywnego fragmentu zmodyfikowanej genomowej cząsteczki RNA3 wirusa BMV, do badania rekombinacji niehomologicznej

3.1.5 Bakterie

Escherichia coli* szczep *BL21(DE3)pLysS (producent Promega) - szczep bakteryjny do ekspresji białek, posiada plazmid pLysS kodujący lizozym bakteriofaga T7 oraz plazmid kodujący polimerazę RNA T7. Sekwencja kodująca polimerazę znajduje się pod promotorem *lac* UV5, indukowanym IPTG.

Escherichia coli* szczep *DH5a (producent Gibco BRL)

3.1.6 Gotowe zestawy do badań biochemicznych

- zestaw do transkrypcji *in vitro* T7-MEGAscript™, producent AMBION,
- zestaw do sekwencjonowania ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit, producent ABI-PRISM,
- zestaw do oczyszczania białek posiadających sekwencję His-Tag metodą chromatografii powinowactwa His•Bind® Buffer Kit, producent Novagen,
- kolumna jonowymienna HiTrap® Q ion exchange column (o pojemności 1ml),
- kolumna do oczyszczania białek za pomocą wysokorozdzielczej chromatografii ciekowej (FPLC) Superdex 75, HiLoad 16/60, producent Pharmacia Biotech,
- kolumny do zagęszczania HIV-1 RT i jej pochodnych, 30,000MW, producent Prospecta lub Millipore,
- zestawy do oczyszczania DNA: PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Plasmid Maxi Kit, producent QIAGEN

Pozostałe odczynniki pochodziły z firm: **Sigma** - dekstroza, glicyna, etanol, izopropanol, fenol, chloroform, ampicylina, dodecylosiarczan sodu (SDS), kwas etylenodiamino-tetraoctowy (EDTA), ditiotreitrol (DTT), chlorek sodu (NaCl), Tris, kwaśny fosforan potasu (K₂HPO₄), wodorotlenek sodu (NaOH), octan amonu

(CH₃COONa), octan sodu (CH₃COONa), kwas borowy (H₂BO₃), błękit bromofenolowy, cjanol ksylenowy; **Promega** - chlorek magnezu (MgCl₂), chlorek manganu (MnCl₂), roztwór czterech 5'-trójfosforanów deoksyrybonukleozydowych (dNTP), roztwór czterech 5'-trójfosforanów rybonukleozydowych (NTPs); **Fermentas** - roztwór czterech 5'-trójfosforanów dideoksyrybonukleozydowych (ddNTP) lub **Serva** - agaroz, akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid, pepton, trypton, wyciąg drożdżowy, bacto-agar.

3.1.7 Roztwory

Roztwory do izolacji plazmidów w małej skali metodą lizy w warunkach alkalicznych (tzw. mini-prepy):

a) roztwór ALM1

50mM dekstroza

10mM EDTA

25mM Tris

b) roztwór ALM2 (świeżo przygotowany)

1% SDS

0,2M NaOH

Roztwory do wybarwiania białek rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym

a) barwiący roztwór komasyny (na 1000ml)

500ml metanolu

100ml kwasu octowego

2,5g Błękitu Coomassie'go R-250

dopełnić H₂O do 1000ml

b) roztwór odbarwiający (na 1000ml)

100ml metanolu

50ml kwasu octowego

dopełnić H₂O do 1000ml

Roztwór do wybarwiania kwasów nukleinowych po elektroforezie w żelu agarozowym

Bromek etydyny (roztwór wodny 0,5µg/ml)

Roztwór X-gal (0,5mg/ml) w dimetyloformamidzie (DMF)

Wodny roztwór IPTG (1M lub 0,1M)

Wodny roztwór ampicyliny (0,1g/ml)

3.1.8 Bufory

Bufory do izolacji i oczyszczania HIV-1 RT i jej pochodnych:

a) bufor I

50mM Na₂HPO₄, pH 8

50mM NaCl

b) bufor II

50mM Na₂HPO₄, pH 7

300mM NaCl

c) bufor III

50mM Na₂HPO₄, pH 6

300mM NaCl

10% glicerol

d) HEPES (50mM, pH 7)

1,5mM Na₂HPO₄

275mM NaCl

10mM KCl

10mM dekstroza

50mM HEPES

e) bufor równoważący do kolumny FPLC

50mM Na₂HPO₄, pH 6

100mM NaCl

10mM β-merkaptioetanol

5% glicerol

Bufory do analizy rozpuszczalności białek:

a) D x1

20mM Tris-HCl pH 8

20mM β-merkaptioetanol

5% glicerol

b) D x0,5

1obj. buforu D x1

1obj. 20mM MgCl₂

Bufor X - do przechowywania HIV-1 RT

50mM Tris-HCl pH 8

0,2M NaCl

0,1mM EDTA

1mM DTT

50% glicerol

Bufor RT - standardowy bufor do reakcji odwrotnej transkrypcji

50mM Tris-HCl, pH 8,3

75mM KCl

3mM MgCl₂

10mM DTT

Bufor do RT z Mn²⁺

50mM Tris-HCl, pH 8,3
 75mM KCl
 3mM MnCl₂
 10mM DTT

Bufor do elektroforezy kwasów nukleinowych (TBE)

100mM Tris-HCl pH 8.3
 100mM kwas borowy
 1mM EDTA

Bufor do elektroforezy białek w warunkach denaturujących

25mM Tris-HCl pH 8.3
 192mM Glicyna
 0,1% SDS

Bufory obciążające, stosowane podczas rozdziału elektroforetycznego:

- a) **bufor BJ (ang. blue juice) - do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu agarozowym, w warunkach natywnych (6x)**
 100μl 1M Tris-HCl, pH 7,5 (C_k=10mM)
 186mg EDTA (C_k=50mM)
 1g Ficoll 400 (C_k=10%)
 25mg Błękitu bromofenolowego (C_k=0,25%)
 25mg Cjanolu ksylenowego (C_k=0,25%)
 dopełniono H₂O do 10ml
- b) **bufory do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących**
 - **UD (ang. urea dye)** - 0,05% Błękit bromofenolowy i/lub 0,05% Cjanol ksylenowy w 7M wodnym roztworze mocznika
 - **FD (ang. formamide dye)** - 0,05% Błękit bromofenolowy i/lub 0,05% Cjanol ksylenowy, 20mM EDTA w 95% roztworze formamidu
- c) **bufor SB (ang. sample buffer) - do rozdziału elektroforetycznego białek w żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących (4x)**
 2,5ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 (C_k=200mM)
 2ml β-merkaptioetanol (C_k=20%)

0,8g SDS ($C_k=8\%$)
 15mg Błękitu bromofenolowego ($C_k=0,15\%$)
 4ml glicerolu ($C_k=40\%$)
 dopełniono H₂O do 10ml

3.1.9 Pożywki

Pożywka płynna LB

10g Bacto[®]-tryptonu
 5g wyciągu drożdżowego
 10g NaCl
 dopełniono H₂O do 1000ml i sterylizowano przez autoklawowanie

Pożywka płynna LB z ampicyliną (C_k 0,2mg/ml)

do 1l wysterylizowanej i schłodzonej do temp. co najmniej 55°C pożywki LB dodawano 2ml roztworu ampicyliny (0,1g/ml)

Pożywka stała z ampicyliną (C_k 0,2mg/ml)

2g Bacto[®]-tryptonu
 1,25g wyciągu drożdżowego
 1,25g NaCl
 dopełniono H₂O do 250ml
 dodano 3,75g bacto-agaru i sterylizowano przez autoklawowanie
 do schłodzonego roztworu, o temp. 55°C, dodano 0,5ml roztworu ampicyliny (0,1g/ml) i wylano na płytki

3.1.10 Żele

Żele agarozowe

a) 1,0% żel agarozowy

0,45g agarozy rozpuszczono w 450ml buforu TBE

b) 1,5 % żel agarozowy

0,675 g agarozy rozpuszczono w 450ml buforu TBE

Żele poliakryloamidowe do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych

a) 40% roztwór wodny bis-akryloamidu (29:1)

386,7g akryloamidu
 13,3g N,N'-metylenobisakrylamidu

dopełniono H₂O do 1000ml

b) 8% PAA, 7M mocznik

200ml 40% roztworu wodnego bis-akryloamidu

420g mocznika¹

100ml 10xTBE

dopełniono H₂O do 1000ml

c) 12% PAA, 7M mocznik

300ml 40% roztworu wodnego bis-akryloamidu

420g mocznika¹

100ml 10xTBE

dopełniono H₂O do 1000ml

¹ Roztwór bis-akryloamidu i mocznika dejonizowano 1h z wykorzystaniem 0,2 obj. żywicy jonowymiennej AG[®] 501-X8 (producent Bio-Rad). Po przesączeniu roztworu przez bibułę, dodano 10xTBE i dopełniono H₂O do 1000ml.

Żele poliakryloamidowe przygotowywano według schematu podanego w Tabeli 3.1 Mieszaniny wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji przez ok. 1h.

Tabela 3.1 Przygotowanie żeli poliakryloamidowych

wymiary żelu [mm]	8% lub 12% PAA*	APS	TEMED
180 × 195 × 1	45ml	450μl	12μl
400 × 325 × 0,5	95ml	900μl	27μl

*PAA – roztwór poliakryloamidu w przypadku denaturujących żeli poliakryloamidowych zawierał 7M mocznik (Materiały i Metody 3.1.10)

Żele poliakryloamidowe do rozdzielania elektroforetycznego białek w aparacie firmy Bio Rad

a) 15% PAA żel rozdzielający

6,00ml 30% akrylamid/ 0,8% N,N'-metylenobisakrylamid

4,40ml 1M Tris-HCl pH 8,7

0,12ml 10% SDS

0,01ml TEMED

0,04ml 10% APS
dopełniono H₂O do 12ml

b) 5% PAA żel zagęszczający

0,850ml 30% akrylamid/ 0,8% N,N'-metylenobisakrylamid

0,625ml 1M Tris-HCl pH 6,8

0,050ml 10% SDS

0,012ml TEMED

0,025ml 10% APS

dopełniono H₂O do 5ml

3.1.11 Wzorce długości DNA

1kB i 0,1kB (0,5mg/ml, producent SIGMA)

3.1.12 Wzorce masy białek

Mid-Range Protein Molecular Weight Marker (0,5mg/ml, producent Promega)

3.2 Metody

3.2.1 Otrzymywanie białek

3.2.1.1 Ekspresja HIV-1 RT, podjednostek p66 i p51 oraz mutantów p66 w komórkach bakteryjnych

1. Ze stoku glicerolowego bakterii *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformowanych wektorem pDAR1, mutpDAR1 lub p51pET, pobrano zaszczepkę i przeniesiono do 10ml pożywki LB z ampicyliną, hodowlę prowadzono 12h wytrząsając przy 280rpm, w temp. 37°C.
2. Zawiesiną bakterii zaszczepiono 0,5l pożywki LB z ampicyliną i inkubowano w temp. 37°C przez około 3-4h, cały czas wytrząsając przy 280rpm. Inkubacja powinna trwać do momentu osiągnięcia przez bakterie gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$.
3. Do 0,5l zawiesiny bakterii dodawano 250 μ l 1M roztworu wodnego IPTG i wytrząsano przez 3h, przy 280rpm, w temp. 37°C.
4. Zawiesinę bakterii wirowano 15min. z prędkością 5000rpm, w temp. 4°C; dalsze postępowanie prowadzone było w temp. 4°C.
5. Roztwór dekantowano, a osad rozpuszczano w buforze I, w proporcji 5g komórek na 10ml buforu.
6. Zawiesinę inkubowano 0,5h na lodzie.
7. Dodawano 1ml 4M NaCl, inkubowano na lodzie przez kolejne 15min.
8. Sonikowano trzykrotnie po 30sec (amplituda 70-80% - aparat Autotune Series, High Intensity Ultrasonic Processor, 750 Watt Model, producent Sigma), z 5min. odstępami na inkubację na lodzie.
9. Uzyskaną zawiesinę wirowano 30min. z prędkością 15000rpm, w temp. 4°C.
10. Supernatant przenoszono do nowej probówki i rozcieńczano jedną objętością buforu II.
11. Tak przygotowany ekstrakt наносzono na kolumnę niklową, uprzednio zrównoważoną buforem II.

3.2.1.2 Oczyszczanie białek

a) Chromatografia powinowactwa

1. Ekstrakt białkowy w buforze II наносzono na kolumnę niklową, zrównoważoną buforem II.

2. Kolumnę przemywano 20ml buforu II.
3. Kolumnę przemywano 20ml buforu III, zawierającego imidazol ($C_k=10\text{mM}$).
4. Kolumnę przemywano 10ml porcjami buforu III, do każdej kolejnej porcji dodawano imidazol tak, by jego stężenie końcowe wzrastało stopniowo i wynosiło: 100, 200, 300, 400, 500mM.
5. Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym.
6. Frakcję, zawierającą pożądane białko, zagęszczano (pkt. 3.2.1.2d) w obecności buforu 50mM Tris pH 8,0.

b) Chromatografia jonowymienna

1. Ekstrakt białkowy w buforze 50mM Tris pH 8,0 (w obj. 1ml) nanoszono na kolumnę Q-sefarożową, zrównoważoną buforem 50mM Tris pH 8,0.
2. Kolumnę przemywano 10ml buforu 50mM Tris pH 8,0.
3. Kolumnę przemywano gradientem buforu 50mM Tris pH 8,0 - 50mM Hapes pH 7,0 (Tabela 3.2.1).
4. Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym.
5. Frakcję, zawierającą pożądane białko, zagęszczano (pkt. 3.2.1.2d) w obecności buforu 50mM Tris pH 8,0.

Tabela 3.2.1 Warunki wmywania heterodimeru p66/p51 z kolumny jonowymiennej HiTrap® Q

nr	Tris pH 8,0	Hepes pH 7,0
1	4ml	1ml
2	3ml	2ml
3	2ml	3ml

c) Wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa (FPLC – ang. *Fast Performance Liquid Chromatography*)

1. Ekstrakt białkowy zagęszczano na filtrach molekularnych 30,000MW i umieszczano w buforze równoważącym do kolumny FPLC, w obj. 2ml.
2. Przygotowany preparat nanoszono na zrównoważoną buforem kolumnę FPLC.
3. Kolumnę przemywano buforem do kolumny FPLC.

4. Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym.
5. Frakcję, zawierającą pożądane białko, zagęszczano (pkt. 3.2.1.2d) w obecności buforu 50mM Tris pH 8,0.

d) Wymiana buforu oraz zagęszczanie białek

W celu wymiany buforu lub zagęszczenia białka, preparat białkowy sączono na filtrach 30,000MW (producent VIVASCIENCE lub Millipore).

3.2.1.3 Analiza rozpuszczalności białek

1. Pobrano 1ml zawiesiny bakteryjnej, poddanej 3h inkubacji w temp. 37°C, w obecności induktora IPTG (Materiały i Metody 3.2.1.1 pkt. 3) i wirowano 1min. z prędkością 10000rpm.
2. Roztwór dekantowano, a osad rozpuszczano w 100µl buforu 0,5x D.
3. Zawiesinę inkubowano 15min. na lodzie.
4. Wirowano 15min. z prędkością 14000rpm, w temp. 4°C.

W supernatancie powinna znajdować się frakcja białek rozpuszczalnych, natomiast w osadzie – frakcja białek nierozpuszczalnych.

5. Frakcję białek rozpuszczalnych połączono z buforem SB (do końcowego stężenia buforu 1x) i analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym (Materiały i Metody 3.2.18).
6. Osad zawieszano w 200µl 6M roztworu mocznika w buforze 0,5x D.
7. Inkubowano 15min. w temp. 37°C.
8. Wirowano 15min. z prędkością 14000rpm.
9. Supernatant połączono z buforem SB (do końcowego stężenia buforu 1x) i analizowano metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym (Materiały i Metody 3.2.18).

3.2.2 Amplifikacja DNA metodą PCR

Reakcje prowadzono w objętości 50 μ l, wg schematu podanego w Tabeli 3.2.2.

Tabela 3.2.2 Skład typowej reakcji PCR

nr	składnik	ilość
1.	matryca (0,01 μ g/ μ l)	1 μ l
2.	starter homologiczny do końca 5' powielanego fragmentu	3,2pmola
3.	starter komplementarny do końca 3' powielanego fragmentu	3,2pmola
4.	dNTP $C_p=2,5mM$, $C_k=0,2mM$	4 μ l
5.	bufor reakcyjny 10x ¹	5 μ l
6.	polimeraza DNA Taq (5u/ μ l)	1 μ l
7.	H ₂ O	do 50 μ l

¹ Skład buforu reakcyjnego 1x: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton[®] X-100

Wszystkie reakcje PCR prowadzone były w aparacie firmy Biometra[®], w warunkach ustalanych indywidualnie dla poszczególnych reakcji, następnie poddawane były analizie metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Stężenie uzyskanego DNA określano za pomocą pomiaru absorpcji promieniowania UV dla λ_{260} .

3.2.3 Otrzymywanie poszczególnych podjednostek HIV-1 RT i jej mutantów

3.2.3.1 Otrzymywanie podjednostki p66

a) klonowanie fragmentu kodującego białko p66 i wprowadzanie uzyskanej sekwencji do wektora ekspresyjnego pET11a

1. Fragment kodujący białko p66 powielano metodą PCR, z wykorzystaniem wektora pDAR1 jako matrycy i starterów: p66-3cor (0,15 μ g, 3,2pmola) oraz p66-5 (0,15 μ g, 3,2pmola), wprowadzających miejsca restrykcyjne rozpoznawane odpowiednio przez enzymy *Bam*H I oraz *Xba* I. Warunki reakcji PCR zostały opisane w Tabeli 3.2.3.

Tabela 3.2.3 Warunki reakcji PCR nr 1

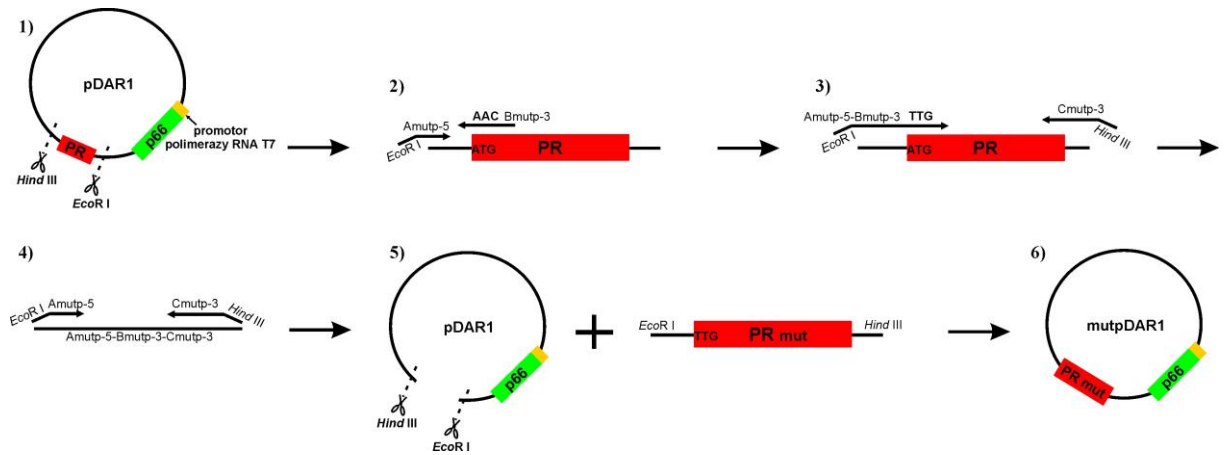
nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	5min	94°C	1
	Hybrydyzacja	1min	60°C	
	Elongacja	3min	72°C	
2.	Denaturacja	1min	94°C	30
	Hybrydyzacja	1min	60°C	
	Elongacja	3min	72°C	

2. Produkty reakcji PCR oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit.
3. Oczyszczony DNA poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi *BamH I* oraz *Xba I*.
4. Ponownie oczyszczano DNA przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit.
5. Tak przygotowany fragment poddano reakcji ligacji z plazmidem pET11a, który wcześniej został przecięty enzymami restrykcyjnymi *Nhe I* oraz *BamH I* (enzymy *Xba I* i *Nhe I* generują tzw. kompatybilne końce), Materiały i Metody 3.2.8 i 3.2.10.
6. Produktem ligacji transformowano komórki *E. coli* DH5 α , (Materiały i Metody 3.2.7.1b).
7. Wyizolowane z pojedynczych kolonii plazmidy poddano analizie restrykcyjnej, a następnie potwierdzono obecność insertu przez sekwencjonowanie. Plazmid pET11a z wligowaną, pomiędzy miejsca restrykcyjne *Nhe I* oraz *BamH I*, sekwencją kodującą białko p66 nazwano wektorem p66pET. Jego użycie do ekspresji białka p66 w komórkach bakteryjnych BL21(DE3)LysS zakończyło się niepowodzeniem, dlatego zdecydowano się na inną strategię otrzymania podjednostki p66.

b) ukierunkowana mutageneza wektora ekspresyjnego pDAR1

Zastosowana metoda miała na celu zmodyfikowanie wektora pDAR1 w taki sposób, aby w komórkach bakteryjnych nie dochodziło do ekspresji wirusowej proteazy i tworzenia podjednostki p51. W związku z brakiem unikalnego miejsca restrykcyjnego w pobliżu kodonu START proteazy, z wektora pDAR1 usunięto całą sekwencję kodującą wirusową proteazę, przy pomocy trawienia enzymami restrykcyjnymi *EcoR I*

oraz *Hind* III. Następnie wycięty fragment zrekonstruowano metodą PCR w taki sposób, by kodon START proteazy HIV-1, został zastąpiony kodonem leucynowym (AUG→UUG), (Rys. 3.2).



Rysunek 3.2 Schemat ukierunkowanej mutagenazy wektora ekspresyjnego pDAR1. 1) Z wektora ekspresyjnego pDAR1 wycięto fragment kodujący proteazę HIV-1, za pomocą enzymów restrykcyjnych *EcoR* I oraz *Hind* III. 2) Usunięty fragment, obejmujący sekwencję wirusowej proteazy, posłużył jako matryca do pierwszej reakcji PCR, z udziałem starterów: Amutp-5 - wprowadzającego sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny *EcoR* I oraz Bmutp-3, wprowadzającego mutację do kodonu START wirusowej proteazy AUG→UUG. 3) Otrzymany za pomocą starterów Amutp-5 oraz Bmutp-3 fragment posłużył jako starter w drugiej reakcji PCR., razem ze starterem Cmutp-3, wprowadzającym sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny *Hind* III oraz tę samą matrycę, którą użyto w pierwszej reakcji PCR. 4) Właściwej długości produkt reakcji PCR wyizolowano z żelu i powielono metodą PCR z wykorzystaniem starterów Amutp-5 oraz Bmutp-3. 5) Otrzymany fragment poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *EcoR* I oraz *Hind* III i wligowano do wektora pDAR1, zliniowanego enzymami *EcoR* I oraz *Hind* III. 6) Wektor ekspresyjny pDAR1, niosący mutację kodonu START wirusowej proteazy AUG→UUG, nazwano mutpDAR1.

1. Podczas pierwszego etapu mutagenazy, za pomocą reakcji PCR wprowadzono mutację A→U do kodonu START proteazy HIV-1. Jako matrycę wykorzystano fragment wycięty z wektora pDAR1 przy pomocy enzymów restrykcyjnych *EcoR* I oraz *Hind* III, jako startery Amutp-5 (0,15µg, 3,2pmola) oraz Bmutp-3 (0,15µg, 3,2pmola), warunki reakcji opisano w Tabeli 3.2.4.

Tabela 3.2.4 Warunki pierwszego etapu reakcji ukierunkowanej mutagenyzy sekwencji kodującej proteazę HIV-1, PCR nr 2

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	2min	94°C	1
	Hybrydyzacja	1min	61°C	
	Elongacja	1min	72°C	
2.	Denaturacja	30sec	94°C	30
	Hybrydyzacja	30sec	61°C	
	Elongacja	30sec	72°C	

2. Podczas drugiego etapu mutagenyzy, w reakcji PCR powielano fragment wycięty z wektora pDAR1, wykorzystując jako jeden ze starterów oczyszczony produkt pierwszego etapu reakcji ukierunkowanej mutagenyzy (5'-końcowy odcinek sekwencji kodującej wirusową proteazę, posiadający substytucję A→U w obrębie kodonu START) oraz starter komplementarny do końca 3' powielanej sekwencji - Cmutp-3 (0,15µg, 3,2pmola). Warunki reakcji podano w Tabeli 3.2.5.

Tabela 3.2.5 Warunki drugiego etapu reakcji ukierunkowanej mutagenyzy sekwencji kodującej proteazę HIV-1, PCR nr 3

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	4min	94°C	1
	Hybrydyzacja	30sec	60°C	
	Elongacja	30sec	72°C	
2.	Denaturacja	2min	94°C	15
	Hybrydyzacja	30sec	60°C	
	Elongacja	30sec	72°C	

3. Produkty drugiego etapu reakcji ukierunkowanej mutagenyzy rozdzielano w 1% żelu agarozowym i wyizolowano oczekiwanej długości DNA, stosując procedurę opisaną w QIAquick Gel Extraction Kit Protocol, producent QIAGEN.
4. Podczas trzeciej reakcji PCR, wyizolowany z żelu DNA powielano przy pomocy starterów Amutp-5 (0,15µg, 3,2pmola) oraz Cmutp-3 (0,15µg, 3,2pmola). Warunki reakcji podano w Tabeli 3.2.6.

Tabela 3.2.6 Amplifikacja sekwencji kodującej proteazę HIV-1, posiadającej mutację kodonu START AUG→UUG, PCR nr 4

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	2min	94°C	1
	Hybrydyzacja	1min	60°C	
	Elongacja	1min	72°C	
2.	Denaturacja	30sec	94°C	30
	Hybrydyzacja	30sec	60°C	
	Elongacja	30sec	72°C	

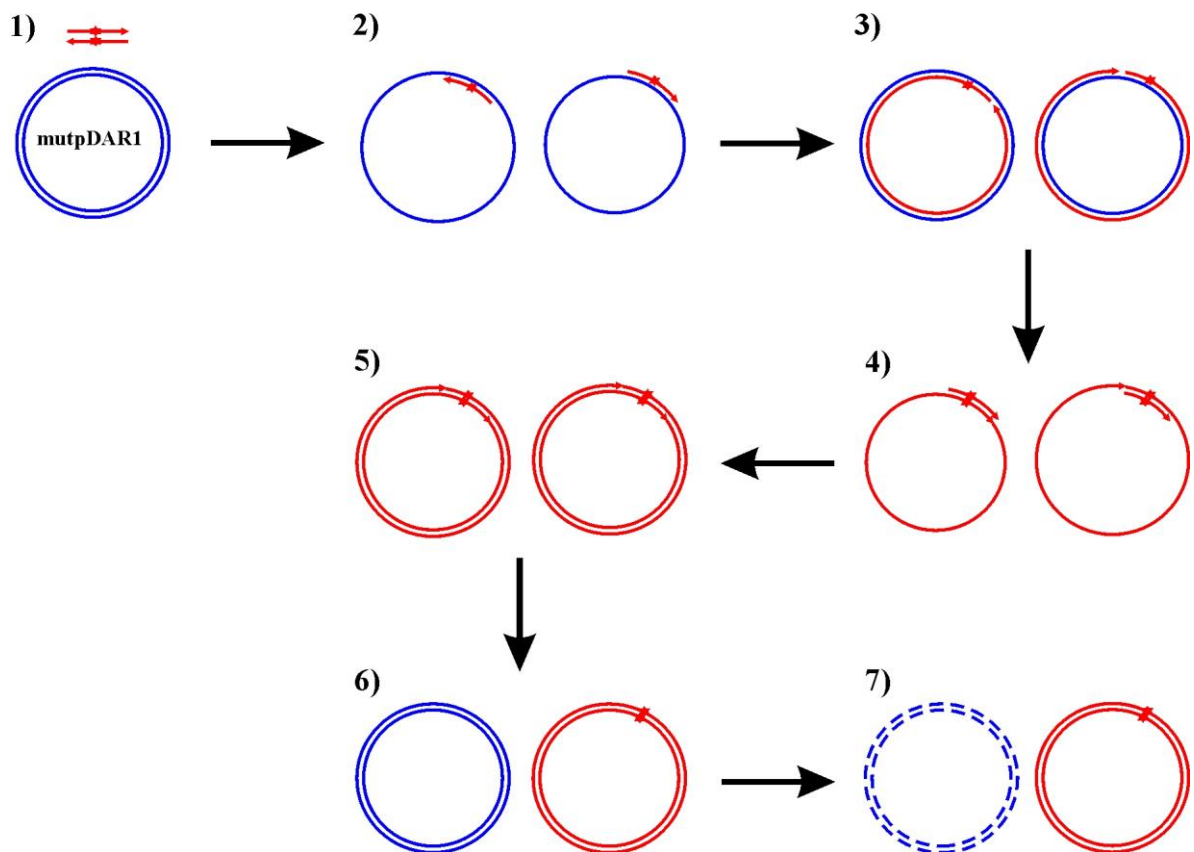
5. Oczyszczony produkt trzeciej reakcji PCR poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *EcoR* I oraz *Hind* III.
6. Preparat oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit.
7. Tak przygotowany fragment poddano reakcji ligacji z wektorem pDAR1, który został wcześniej przecięty enzymami restrykcyjnymi *EcoR* I oraz *Hind* III (Materiały i Metody 3.2.10).
8. Produktem ligacji transformowano komórki *E. coli* DH5α (Materiały i Metody 3.2.7.1b).
9. Wyizolowane z pojedynczych kolonii plazmidy poddano analizie restrykcyjnej, a następnie przesekwencjonowano, w celu potwierdzenia obecności mutacji.
10. Otrzymany wektor nazwano mutpDAR1. Ekspresja p66 prowadzona była w komórkach bakteryjnych BL21(DE3)LysS, Materiały i Metody 3.2.1.

3.2.3.2 Otrzymywanie podjednostki p51

W celu uzyskania podjednostki p51, przyjęto strategię zastosowaną pierwotnie do otrzymania podjednostki p66 (3.2.3.1a). Sklonowano fragment kodujący białko p51 i wprowadzono go do wektora ekspresyjnego pET11a. Fragment kodujący białko p51 powielano metodą PCR, w warunkach opisanych w Tabeli 3.2.3. W reakcji wykorzystano wektor pDAR1 jako matrycę oraz startery: p51-3cor (0,2µg, 3,2pmola) i p66-5 (0,15µg, 3,2pmola), wprowadzające miejsca restrykcyjne rozpoznawane odpowiednio przez enzymy *BamH* I oraz *Xba* I. Eksperyment został przeprowadzony zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.3.1a.

3.2.3.3 Otrzymywanie mutantów HIV-1 RT

W celu otrzymania mutantów HIV-1 RT zastosowano metodę tzw. „szybkiej mutagenезy” (*ang. Quick Change Mutagenesis Protocol*), pozwalającą na wprowadzanie mutacji podczas amplifikacji całych plazmidów, bez potrzeby wycinania i ponownego ligowania modyfikowanych sekwencji. Istotą wybranej strategii jest użycie polimerazy DNA Pfu, wiernie kopiującej zadane sekwencje. Polimeraza rozpoczyna replikację plazmidu z dwóch wzajemnie komplementarnych starterów, do których wprowadzono odpowiednie mutacje. W rezultacie powstaje mieszanina plazmidowych DNA, w skład której wchodzi niezmutowane cząsteczki matrycowe (plazmidy izolowane z bakterii, posiadające licznie metylowane zasady) oraz pozbawione metylacji zmutowane cząsteczki potomne. Dzięki zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *Dpn* I, specyficznemu rozpoznającemu zmetylowane sekwencje, można selektywnie zdegradować cząsteczki matrycowe. W rezultacie pozostają tylko mutanty, którymi transformuje się komórki kompetentne (Rys. 3.3).



Rysunek 3.3 Schemat wprowadzania mutacji do plazmidów metodą tzw. „szybkiej mutagenyzy”.

1) W reakcji PCR wykorzystano wektor ekspresyjny mutpDAR1 (jako matrycę) oraz dwa wzajemnie komplementarne startery (zaznaczone czerwonymi strzałkami), niosące zadane mutacje (zaznaczone gwiazdką). Plazmidy służące jako matryce (zaznaczone granatowymi liniami), wcześniej namnażane były w bakteriach, posiadały więc licznie metylowane zasady. 2) Poprzedzona denaturacją amplifikacja plazmidów, mogła zostać rozpoczęta dzięki obecności dwóch komplementarnych starterów. 3) Polimeraza DNA Pfu bardzo precyzyjnie kopiuje cząsteczki matrycowe. Po pierwszym cyklu reakcji PCR otrzymano plazmidy posiadające jedną nić metylowaną (nić matrycowa) oraz drugą niemetylowaną, niosącą mutację (nić potomna, zaznaczona czerwoną linią). 4) i 5) W kolejnych cyklach reakcji PCR wykładniczo przyrastała ilość plazmidów, posiadających mutację w obydwu niciach. 6) Po zakończeniu reakcji PCR, w mieszaninie reakcyjnej obecne były wektory typu dzikiego, hybrydy nici typu dzikiego oraz nici zmutowanych (nie przedstawione na rysunku) oraz, w największej ilości, plazmidy posiadające zadaną mutację. 7) Selekcję wektorów przeprowadzono wykorzystując enzym restrykcyjny *Dpn I*, specyficznie rozpoznający i przecinający metylowane sekwencje, obecne w wektorach matrycowych typu dzikiego.

1. Do otrzymania pięciu mutantów podjednostki p66 HIV-1 RT: M230→A, N255→A, Q258→A, K263→A oraz H361→A posłużył wektor mutpDAR1, wykorzystywany do ekspresji białka p66. Mutagenezę przeprowadzono dwustopniowo, wykorzystując pary wzajemnie komplementarnych starterów, wprowadzających zadane mutacje: **zestaw 1:** 5M-A230 i 3M-A230; **zestaw 2:** 5N-A255 i 3N-A255; **zestaw 3:** 5Q-A258 i 3Q-A258; **zestaw 4:** 5K-A263 i 3K-A263; **zestaw 5:** 5H-A361 i 3H-A361 (starter 5' wymieniany jest jako pierwszy, natomiast 3' – jako drugi).
- a) W pierwszym etapie mutagenazy przeprowadzono dwie niezależne reakcje PCR: **REAKCJA NR 1** - w obecności wektora mutpDAR1 jako matrycy i startera 5' oraz **REAKCJA NR 2** - w obecności wektora mutpDAR1 i startera 3'. Dodatkowo przeprowadzono reakcję kontrolną, w obecności samego wektora mutpDAR1, bez udziału starterów (**KONTROLA**). Warunki reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 3.2.7 oraz 3.2.8.

Tabela 3.2.7 I etap mutagenazy wektora mutpDAR1, PCR nr 5

SKŁADNIKI	KONTROLA	REAKCJA NR 1	REAKCJA NR 2
H ₂ O	Do 50μl	do 50μl	do 50μl
10x bufor reakcyjny dla polimerazy DNA Pfu	5μl	5μl	5μl
matryca mutpDAR1	0,5μg	0,5μg	0,5μg
starter 5'	-	1μg, 75pmol	-
starter 3'	-	-	1μg, 75pmol
dNTP Cp=2,5mM, Ck=0,25mM	5μl	5μl	5μl
polimeraza DNA Pfu (2-3u/μl)	1u	1u	1u

Tabela 3.2.8 Warunki reakcji PCR nr 5 -

I-go etapu mutagenyzy wektora mutpDAR1

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	1min	96°C	1
2.	Denaturacja	50sec	96°C	10
	Hybrydyzacja	50sec	60°C	
	Elongacja	16min	68°C	
3.	Elongacja	7min	68°C	1

b) W drugim etapie mutagenyzy, połączono produkty REAKCJI NR 1 oraz 2. Powstałą mieszaninę (100µl), rozdzielono na dwie probówki, po 50µl każda. Do tak przygotowanych próbek oraz próby kontrolnej dodano kolejną 1u polimerazy DNA Pfu i kontynuowano amplifikację plazmidów metodą PCR. Warunki reakcji PCR nr 6 przedstawiono w Tabeli 3.2.9.

Tabela 3.2.9 Warunki reakcji PCR nr 6 -

II-go etapu mutagenyzy wektora mutpDAR1

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	1min	96°C	1
2.	Denaturacja	50sec	96°C	20
	Hybrydyzacja	50sec	60°C	
	Elongacja	16min	68°C	
3.	Elongacja	7min	68°C	1

2. Produkty reakcji PCR oczyszczano za pomocą zestawu PCR Purification Kit (QIAGEN).
3. Oczyszczone produkty trawiono enzymem restrykcyjnym *Dpn* I, (Materiały i Metody 3.2.8).

4. Produkty reakcji ponownie oczyszczano za pomocą zestawu PCR Purification Kit (QIAGEN).
5. Uzyskanym DNA transformowano komórki *E. coli* DH5 α , (Materiały i Metody 3.2.7.1b).
6. Wyizolowane z pojedynczych kolonii plazmidy poddano analizie restrykcyjnej, a następnie przesekwencjonowano, w celu potwierdzenia obecności mutacji w domenie polimerazowej p66.
7. Ekspresja mutantów p66 prowadzona była w komórkach bakteryjnych BL21(DE3)LysS, Materiały i Metody 3.2.1.

3.2.4 Otrzymywanie matryc

3.2.4.1 Otrzymywanie matryc DNA

Jednoniciowe DNA otrzymywane były na drodze syntezy chemicznej, a następnie oczyszczane zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.13.

3.2.4.2 Otrzymywanie matryc RNA

a) matryce RNA (powyżej 60 nt)

1. Pierwszy etap otrzymywania długich cząsteczek RNA polegał na zsyntetyzowaniu dsDNA, zaopatrzonego w sekwencję promotorową, rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7. W reakcji PCR otrzymywano dsDNA, stanowiący matrycę do syntezy następujących cząsteczek RNA:
 - HVR-5-RNA - reakcję PCR prowadzono w obecności plazmidu pUC18-HVR5 (0,01 μ g) oraz starterów: RCT-7 (0,2 μ g, 3,2pmola) i RC-3 (0,15 μ g, 3,2pmola); Wyniki i Dyskusja 4.2.1,
 - RNA1-D - reakcję PCR prowadzono w obecności plazmidu pRNA1-NH 1 (0,01 μ g) oraz starterów: DT7-5 (0,2 μ g, 3,2pmola) i Drec-3pUC19 (0,1 μ g, 3,2pmola),
 - RNA3-A - reakcję PCR prowadzono w obecności plazmidu pMar1-RNA3 (0,01 μ g) oraz starterów: AT7-5pUC19 (0,2 μ g, 3,2pmola) oraz A3 (0,1 μ g, 3,2pmola), Wyniki i Dyskusja 4.4.2.1).

Warunki reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 3.2.10.

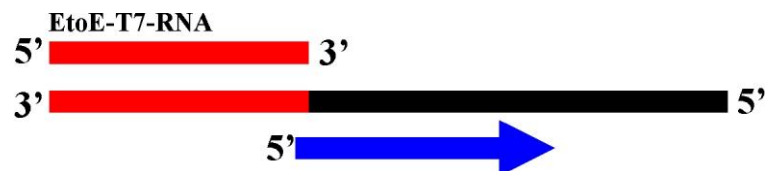
Tabela 3.2.10 Warunki reakcji syntezy dsDNA, zaopatrzonego w promotor polimerazy RNA T7, PCR nr 7

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	3min	94°C	1
	Hybrydyzacja	1min	61°C	
	Elongacja	1min	72°C	
2.	Denaturacja	30sec	94°C	30
	Hybrydyzacja	30sec	61°C	
	Elongacja	30sec	72°C	

2. Produkty reakcji oczyszczano metodą fenol-chloroform.
3. Oczyszczone dsDNA zostały wykorzystane jako matryce w reakcji transkrypcji *in vitro*, Materiały i Metody 3.2.12.

b) matryce RNA (do 60 nt)

Krótkie cząsteczki RNA otrzymywano również metodą transkrypcji *in vitro*, z tą różnicą, iż jako matryc DNA używano jednoniciowych syntetycznych cząsteczek DNA, posiadających sekwencję promotorową polimerazy RNA T7 (syntetyczne matryce ssDNA: EtoEd₁-M, EtoE-a10-M, EtoE-a5-M, EtoE-a3-M, EtoE-a-M, HEL-D-M, HEL-A-M, HEL-M). Przed reakcją matryce hybrydyzowano z krótszą cząsteczką ssDNA EtoE-T7-RNA. W ten sposób tylko sekwencja promotora występowała w formie dwuniciowej, niezbędnej do zainicjowania transkrypcji (Rys. 3.4).



Rysunek 3.4 Otrzymywanie cząsteczek RNA metodą transkrypcji *in vitro*. Czerwonym prostokątem oznaczono fragmenty tworzące promotor polimerazy RNA T7, niebieskim - produkt transkrypcji. Cząsteczki RNA otrzymywano podczas reakcji transkrypcji *in vitro*, do której wykorzystywano matryce ssDNA, zawierające sekwencję promotora polimerazy RNA T7 oraz oligonukleotyd do niej komplementarny (EtoE-T7-RNA). Hybrydyzacja tych fragmentów prowadziła do utworzenia częściowo dwuniciowej matrycy.

3.2.5 Analiza produktów reakcji wydłużania startera

1. Produkty reakcji wydłużania startera rozdzielano w żelu poliakryloamidowym.
2. 2µl roztworu, zawierającego wyizolowany z żelu produkt (Materiały i Metody 3.2.13), użyto jako matrycy do reakcji PCR. Jako startery wykorzystano ssDNA, komplementarne do końców powielanych fragmentów (3,2pmola każdy). Warunki reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 3.2.11.

Tabela 3.2.11 Warunki reakcji powielania produktów reakcji wydłużania startera, PCR nr 8

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1.	Denaturacja	2min	94°C	1
	Hybrydyzacja	1min	*	
	Elongacja	1min	72°C	
2.	Denaturacja	30sec	94°C	30
	Hybrydyzacja	30sec	*	
	Elongacja	30sec	72°C	

*) Temperatura hybrydyzacji starterów została obliczona wg wzoru: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C) - 5$ [°C], gdzie A+T oznacza ilość reszt A i T w starterze, a G+C – ilość reszt G oraz C.

3. Oczyszczone produkty reakcji PCR poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi (Materiały i Metody 3.2.8) lub wypełniano ich końce przy pomocy Fragmentu Klenowa Polimerazy DNA I (Materiały i Metody 3.2.9), a następnie ligowano z odpowiednio przygotowanym plazmidem pUC19, Materiały i Metody 3.2.10.
4. Uzyskanymi plazmidami transformowano bakterie *E. coli*, szczep DH5α, Materiały i Metody 3.2.7.1b.
5. Przeprowadzano izolację plazmidów z pojedynczych kolonii bakteryjnych, Materiały i Metody 3.2.7.2b.
6. Otrzymane plazmidy poddano analizie restrykcyjnej, Materiały i Metody 3.2.8.
7. Wyselekcjonowane klony sekwencjonowano, Materiały i Metody 3.2.11.1.

3.2.6 Oczyszczanie kwasów nukleinowych

3.2.6.1 Oczyszczanie DNA przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit

DNA oczyszczano zgodnie z zaleceniami producenta (dotyczy fragmentów o długości powyżej 100pz).

3.2.6.2 Oczyszczanie DNA lub RNA metodą fenol-chloroform

1. Mieszaninę reakcyjną, zawierającą kwas nukleinowy, rozcieńczano do objętości co najmniej 100 μ l i dodano 0,5 obj. fenolu oraz 0,5 obj. chloroformu.
2. Wytrząsano i wirowano 1min. z prędkością 14000 rpm.
3. Zawierającą kwas nukleinowy fazę wodną przenoszono do nowej probówki i dodawano do niej 1 obj. chloroformu, wytrząsano i wirowano 1min. z prędkością 14000 rpm (dwukrotnie).
4. Do otrzymanej po ekstrakcji fazy wodnej dodawano 0,1 obj. 3M CH₃COONa i 3 obj. 96% etanolu.
5. Roztwór inkubowano 30min. na lodzie.
6. Wirowano 20min. z prędkością 14000 rpm.
7. Roztwór dekantowano, a osad przemywano 500 μ l 70% etanolu.
8. Wirowano 20min. z prędkością 14000 rpm.
9. Roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 50 μ l H₂O.
10. Stężenie oczyszczonego DNA bądź RNA określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla λ_{260} .

3.2.7 Otrzymywanie plazmidów

3.2.7.1 Transformacja

a) transformacja metodą elektroporacji

1. Do 50 μ l zawiesiny komórek kompetentnych DH5 α dodawano 1ng plazmidu, całość umieszczano w kuwecie i przeprowadzano elektroporację (warunki elektroporacji: napięcie - 2,5kV; pojemność pola – 25 μ F; oporność - 200 Ω ; czas trwania: 3-7msec).
2. Do transformowanych komórek dodawano 1ml płynnej pożywki LB i wytrząsano 45min. w temp. 37°C.

3. 100-500 μ l zawiesiny bakteryjnej nanoszono na płytkę z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w temp. 37°C.
4. Następnego dnia otrzymywano pojedyncze kolonie bakterii.

b) transformacja metodą heat-shock:

1. Do 25µl (50µl w przypadku produktu ligacji) zawiesiny komórek kompetentnych DH5α dodawano 1ng plazmidu i inkubowano 45min. na lodzie.
2. Zawiesinę ogrzewano przez 45sec w temp. 42°C.
3. Schładzano 5min. na lodzie.
4. Do transformowanych komórek dodawano 1ml płynnej pożywki LB i wytrząsano 45min. w temp. 37°C.
5. 100µl zawiesiny bakteryjnej наносzono na płytkę z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w temp. 37°C (w przypadku plazmidów z systemem Blue/White screening, do 100µl zawiesiny bakteryjnej dodawano 30µl X-gal (50µg/ml) oraz 15µl 0,1M roztworu wodnego IPTG).
6. Następnego dnia otrzymywano pojedyncze kolonie bakterii.

3.2.7.2 Izolacja plazmidów**a) Otrzymywanie plazmidów w dużej skali (wydajność ok. 500µg)**

Plazmidy otrzymywano przy pomocy zestawu QIAGEN Plasmid Maxi kit, zgodnie z zaleceniami producenta.

b) Otrzymywanie plazmidów w małej skali metodą lizy w warunkach alkalicznych (tzw. mini-prepy, wydajność ok. 5-10µg)

1. Pojedyncze kolonie bakteryjne przenoszono do 2ml płynnej pożywki LB z ampicyliną i wytrząsano 12-14h w temp. 37°C.
2. Następnego dnia zawiesinę bakterii wirowano 1min. z prędkością 10000 rpm.
3. Roztwór dekantowano, a zawierający bakterie osad zawieszano w 100µl roztworu ALM1.
4. Dodawano 200µl świeżo przygotowanego roztworu ALM2, delikatnie mieszano i inkubowano 5 min. na lodzie.
5. Dodawano 150µl 7,5M CH₃COONH₄, mieszano i inkubowano 20min. na lodzie.
6. Wirowano 15min. z prędkością 14000 rpm w temp. pokojowej.
7. Supernatant przenoszono do nowych probówek i dodawano 1ml 96% etanolu.
8. Inkubowano 20min. w temp. pokojowej.
9. Wirowano 15min. z prędkością 14000 rpm.
10. Roztwór dekantowano, a osad, po wysuszeniu rozpuszczano w 50µl H₂O z dodatkiem 2µl RNazy A (o stężeniu 2,5 µg/µl).

3.2.8 Trawienie dsDNA enzymami restrykcyjnymi do celów preparatywnych

1. Reakcję prowadzono w objętości 100µl, w następującej mieszance reakcyjnej:

10µl 10x buforu do trawienia restrykcyjnego (Tabela 3.2.12)

5-10µg DNA

~60U enzymu restrykcyjnego

uzupełniono H₂O do 100µl

2. Mieszankę reakcyjną inkubowano przez 4h zgodnie z zaleceniami producenta.

3. Produkt reakcji oczyszczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.6.1 lub 3.2.6.2.

4. Produkty reakcji analizowano w żelu agarozowym.

Do celów analitycznych reakcje prowadzono w objętości 10µl.

Tabela 3.2.12 Trawienie dsDNA enzymami restrykcyjnymi

Substrat poddany trawieniu	Enzym restrykcyjny	Bufor
Plazmid pET11a	<i>NheI</i> , <i>BamH I</i>	B, E
Plazmid pET11a z wprowadzoną sekwencją dla p51	<i>EcoR V</i>	D
Produkt PCR nr 4, uzyskany z wykorzystaniem starterów: Amutp-5, Bmutp-3, Cmutp-3	<i>EcoR I</i> , <i>Hind III</i>	H, E
Produkt PCR nr 1, uzyskany z wykorzystaniem starterów: p51-3cor i p66-5 lub p66-3cor i p66-5	<i>BamH I</i> , <i>Xba I</i>	E, D
Plazmid pDAR1	<i>EcoR I</i> , <i>Hind III</i>	H, E
Produkt PCR nr 6 - II-go etapu mutagenazy mutpDAR1	<i>Dpn I</i>	B
Plazmid mutpDAR1	<i>Pst I</i>	H
Produkt PCR nr 7, uzyskiwany z wykorzystaniem starterów RCT7-5 oraz RC-3	<i>Pst I</i>	H
Plazmid pUC18 przed ligacją	<i>Sma I</i> , <i>Pst I</i>	J, H
Plazmid pUC18- HVR5	<i>Pst I</i> , <i>EcoR I</i>	H
Liniowanie plazmidu pUC18 przed reakcją transkrypcji	<i>Pst I</i>	H
Produkty PCR nr 8, uzyskane z wykorzystaniem starterów wprowadzających sekwencje rozpoznawane przez enzymy <i>EcoR I</i> i <i>Pst I</i>	<i>Pst I</i> , <i>EcoR I</i>	H

Oznaczenia buforów wprowadzone przez producenta (firma Promega) [Protocols and Applications Guide, Third Edition]

3.2.9 Wypełnianie jednoniciowych wystających końców 5' w dsDNA przy pomocy Fragmentu Klenowa Polimerazy DNA I (tzw. „tępienie końców”)

Reakcję prowadzono w objętości 20 μ l. Mieszanina zawierała: produkt reakcji PCR lub przecięty enzymami restrykcyjnymi wektor, 50 μ M dNTP oraz bufor reakcyjny (50mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl₂, 1mM DTT). Reakcję rozpoczynano podaniem 5u Fragmentu Klenowa Polimerazy DNA I (10u/ μ l). Inkubację prowadzono 10min. w temp. 37°C. Produkty reakcji oczyszczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.6.1 lub 3.2.6.2.

3.2.10 Ligacja

1. Skład mieszaniny reakcyjnej (objętość końcowa 10 μ l):

1 μ l 10x buforu do ligacji

0,1 μ g wektora

insert (dsDNA, stosunek molowy wektor : insert wynosił 1:3)

1u ligazy DNA T4

uzupełniono H₂O do 10 μ l

2. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 12h w temp. 4°C, w przypadku ligacji produktów posiadających „tępe” końce lub w temp. 16°C, w przypadku ligacji produktów posiadających „lepkie” końce (do reakcji wykorzystano termocykler firmy Biometra®).

3. Analiza produktów ligacji:

- transformacja produktów ligacji do komórek kompetentnych DH5 α (Materiały i Metody 3.2.7.1),
- przygotowanie plazmidów w małej skali (Materiały i Metody 3.2.7.2b),
- analiza restrykcyjna otrzymanych plazmidów, w objętości 10 μ l (Materiały i Metody 3.2.8),
- sekwencjonowanie wyselekcjonowanych klonów (Materiały i Metody 3.2.11.1).

Każdorazowo przygotowywano kontrolną reakcję ligacji (kontrolę negatywną), zawierającą zliniowany wektor, bez insertu. Przeprowadzone reakcje ligacji przedstawiono w Tabeli 3.2.13.

Tabela 3.2.13 Przeprowadzone reakcje ligacji

Wektor (enzymy użyte do liniowania)	Insert (enzymy wykorzystane do przygotowania insertu)
pDAR1 (<i>EcoR</i> I, <i>Hind</i> III)	produkt PCR nr 4 (<i>EcoR</i> I, <i>Hind</i> III)
pET11a (<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> H I)	produkt PCR nr 1 (<i>Xba</i> I, <i>Bam</i> H I)
pUC18 (<i>Sma</i> I, <i>Pst</i> I)	produkt PCR nr 7 (produkty poddane reakcji z użyciem fragmentu Klenowa Polimerazy DNA I, <i>Pst</i> I)
pUC19 (<i>Sma</i> I)	dsDNA (poddane reakcji z użyciem fragmentu Klenowa Polimerazy DNA I)
pUC19 (<i>EcoR</i> I, <i>Pst</i> I)	dsDNA (<i>EcoR</i> I, <i>Pst</i> I)

3.2.11 Sekwencjonowanie

3.2.11.1 Automatyczne sekwencjonowanie plazmidów za pomocą ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit

1. Reakcję prowadzono w objętości 10µl, w następującej mieszance reakcyjnej:

- 4µl Terminator Ready Reaction Mix
- 3,2pmola startera
- 200-500ng matrycy (plazmidowy DNA)
- uzupełniano H₂O do 10 µl

Tabela 3.2.14 Warunki reakcji sekwencjonowania plazmidów

etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
Denaturacja	30sec	96°C	30
Hybrydyzacja	15sec	50°C/60°C	
Elongacja	4min	60°C	

Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania:

- do 10µl mieszaniny reakcyjnej dodawano 2µl 3M octanu sodu pH 4,6 i 50µl 96% etanolu,
- inkubowano 10min. na lodzie,
- wirowano 30min. z prędkością 14000 rpm w temp. 4°C,
- roztwór dekantowano, a osad przemywano 250µl 70% etanolu,

- wirowano 15min. z prędkością 14000 rpm, w temp. 4°C,
- roztwór dekantowano, a osad osuszano,
- osad rozpuszczano w 8µl TSR (Template Suppressing Reagent, ABI PRISM),
- próbkę denaturowano 3min. w temp. 96°C i gwałtownie schładzano na lodzie,
- sekwencjonowanie przeprowadzano w sekwentatorze ABI-PRISM.

3.2.11.2 Sekwencjonowanie ssDNA oraz RNA

1. Równolegle prowadzono 4 reakcje, w każdej używano innego dideoksynukleotydu.
Skład poszczególnych mieszanin przedstawiono w Tabeli 3.2.15 oraz Tabeli 3.2.16.

Tabela 3.2.15 Skład reakcji sekwencjonowania matryc

kolejność podawania składników	ddA	ddC	ddG	ddT
1. Matryca ssDNA/RNA 1.5pmol	1.5pmol	1.5pmol	1.5pmol	1.5pmol
2. Wyznakowany starter (ATP [γ 32 P]) 15pmol	15pmol	15pmol	15pmol	15pmol
3. 10x bufor reakcyjny do PCR	4µl	4µl	4µl	4µl
4. MgCl ₂ C _p =25mM, C _k =3Mm	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
5. H ₂ O	do 40µl	do 40µl	do 40µl	do 40µl
6. dN ₀ mix*	7µl dA ₀	7µl dC ₀	7µl dG ₀	7µl dT ₀
7. ddNTP C _p =0,5mM, C _k =50µM	4µl ddA	4µl ddC	4µl ddC	4µl ddT
8. Polimeraza DNA Taq 5u/µl	1µl	1µl	1µl	1µl

*) mieszanina deoksynukleotydów zawierała dN₀mix:

Tabela 3.2.16 Skład mieszaniny dN₀mix

	dA ₀	dC ₀	dG ₀	dT ₀
dATP	1µl (0,025mM) C _k =0,625µM	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM
dCTP	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM	1µl (0,025mM) C _k =0,625µM	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM
dGTP	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM	1µl (0,025mM) C _k =0,625µM	2µl (0,25mM) C _k =12,5µM

dTTP	2 μ l (0,25mM) $C_k=12,5\mu$ M	2 μ l (0,25mM) $C_k=12,5\mu$ M	2 μ l (0,25mM) $C_k=12,5\mu$ M	1 μ l (0,025mM) $C_k=0,625\mu$ M
-------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---

Tabela 3.2.17 Warunki reakcji sekwencjonowania jednoniciowych cząsteczek DNA i RNA

etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
Denaturacja	30sec	96°C	30
Hybrydyzacja	15sec	60°C	
Elongacja	4min	72°C	

2. Przygotowanie reakcji sekwencjonowania do rozdziału elektroforetycznego:

- reakcje sekwencjonowania rozcieńczano wodą do objętości 200µl,
- przeprowadzano ekstrakcję fenol-chloroform,
- dodawano 0,1 obj. 3M octanu sodu pH 5 i wytrącano 3 obj. 96% etanolu przez noc w temp. -20°C,
- wirowano 20min. z prędkością 14000rpm,
- roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 20µl roztworu UD,
- rozdział elektroforetyczny prowadzono w denaturującym żelu poliakrylamidowym.

3.2.12 Transkrypcja *in vitro* wg AMBION T7-MEGAscript™

1. Reakcję prowadzono w objętości 10 µl, w następującej mieszance reakcyjnej:

- 1µl 10x buforu do transkrypcji
- 1µl ATP 75mM
- 1µl CTP 75mM
- 1µl GTP 75mM
- 1µl UTP 75mM
- matryca DNA (zgodnie z zaleceniami producenta)
- 1µl T₇ MEGA ENZYME MIX
- uzupełniono H₂O do objętości 10µl

2. Mieszankę reakcyjną inkubowano 24h w temp. 37°C.

3. Dodawano 1 obj. Gel Loading Buffer.

4. Produkt transkrypcji rozdzielano w denaturującym żelu poliakrylamidowym i izolowano (Materiały i Metody 3.2.13).

3.2.13 Izolacja kwasów nukleinowych z żeli poliakryloamidowych

1. Produkty reakcji (transkrypcji, znakowania radioizotopowego, wydłużania startera, nieoczyszczone oligonukleotydy) denaturowano 2-5min. w temp. 95°C i gwałtownie schładzano na lodzie.
2. Zdeanturowane preparaty rozdzielano w denaturującym żelu poliakryloamidowym.
3. Pożądaney długości prążki wycinano z żelu i umieszczano w osobnych probówkach.
4. Dodawano 150μl buforu elucyjnego (10% roztwór wodny 3M octanu sodu pH 5) i wytrząsano 1,5h (dwukrotnie).
5. Zebrane frakcje łączono, kwasy nukleinowe wytrącano 3 obj. 96% etanolu przez noc w temp. -20°C.
6. Wirowano 20min. z prędkością 14000rpm.
7. Roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 50μl H₂O.
8. Stężenie oczyszczonego DNA bądź RNA określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla λ_{260} .

3.2.14 Radioizotopowe znakowanie ssDNA na końcu 5' (fosforylacja końcowej grupy 5'-OH)

1. Denaturacja ssDNA:
 - ssDNA denaturowano 2min. w temp.95°C
 - chłodzono 10min. na lodzie.
2. Reakcję prowadzono w objętości 10μl. Skład mieszaniny reakcyjnej:
 - 1μl 10x bufor do kinazowania PNK A
 - 2μl ATP [γ ³²P] 4000-5000 Ci/mmol
 - ~100pmol ssDNA
 - 1μl kinazy polinukleotydowej T4 (10u/μl)
 - uzupełniano H₂O do objętości 10 μl.
3. Mieszaninę inkubowano 0,5h w temp. 37°C.
4. Dodawano 90μl H₂O.
5. DNA oczyszczano metodą fenol-chloroform.
6. Dodawano 0,1 obj. 3M octanu sodu pH 5 i wytrącano 3 obj. 96% etanolu przez noc w temp. -20°C.
7. Wirowano 20min. z prędkością 14000 rpm, w temp. 4°C.

8. Roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w H₂O (w przypadku starterów) bądź w buforze UD lub FD (w przypadku wzorców długości).

3.2.15 Reakcja wydłużania startera na matrycy ssDNA lub RNA

Reakcje prowadzono w objętości 40µl, wykorzystując starter znakowany radioizotopowo na końcu 5' [γ ³²P] bądź dCTP [α ³²P].

3.2.15.1 Badanie aktywności polimerazowej HIV-1 RT oraz p66 w zmiennych warunkach temperaturowych, w obecności jonów Mg²⁺ lub Mn²⁺

Tabela 3.2.18 Skład mieszaniny reakcyjnej

	HIV-1 RT	p66	Mu-MLV	HIV-1 RT	p66	Mu-MLV
H ₂ O	do 40µl	do 40µl	do 40µl	do 40µl	do 40µl	do 40µl
matryca 4pmol HVR-5 DNA lub RNA	DNA	DNA	DNA	RNA	RNA	RNA
5x bufor do RT z Mg ²⁺ lub Mn ²⁺	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl
starter RC-3*	8pmol	8pmol	8pmol	8pmol	8pmol	8pmol
Denaturacja 3min. w temp. 95°C, hybrydacja startera 5min. w temp. 60°C						
enzym 1µl HIV-1 RT/p66/Mu-MLV	HIV-1 RT	p66	Mu-MLV	HIV-1 RT	p66	Mu-MLV
dNTP C _p =0,25mM, C _k =50µM	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl

*) starter znakowany ATP [γ ³²P] 4000-5000 Ci/mmol

1. Reakcję prowadzono 1h w temp. 37°C, 45°C lub 55°C.
2. Po inkubacji dodawano 60µl H₂O.
3. Kwasy nukleinowe oczyszczano metodą fenol-chloroform..
4. Dodawano 0,1 obj. 3M octanu sodu pH 5 i wytrącano 3 obj. 96% etanolu przez noc w temp. -20°C.
5. Wirowano 20min. z prędkością 14000 rpm, w temp. 4°C.
6. Roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 20µl buforu UD lub FD.
7. Produkty reakcji wydłużania startera rozdzielano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakryloamidowym, Rozdział 3.2.17.

3.2.15.2 Badania przedwczesnej terminacji reakcji wydłużania startera

Tabela 3.2.19 Skład mieszaniny reakcyjnej

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
H ₂ O	do 40µl	do 40µl	do 40µl	do 40µl	do 40µl	do 40µl
donor RNA1-D	0,8pmol	-	0,8pmol	0,8pmol	0,8pmol	0,8pmol
akceptor RNA3-A	-	0,8pmol	0,4pmol	0,8pmol	1,6pmol	4pmol
5x standardowy bufor do RT	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl
starter Drec-3pUC19*	8pmol	8pmol	8pmol	8pmol	8pmol	8pmol
Denaturacja 3min. w temp. 95°C i powolne schładzanie do temp. 45°C (1°C/min)						
enzym (6µg/µl) HIV-1 RT lub p66	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
dNTP C _p =0,25mM, C _k =50µM	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl

*) starter znakowany ATP [γ ³²P] 4000-5000 Ci/mmol

1. Reakcję prowadzono 1h w temp. 45°C.
2. Dodawano 60µl H₂O.
3. Kwasy nukleinowe oczyszczano metodą fenol-chloroform.
4. Dodawano 0,1 obj. 3M octanu sodu pH 5 i wytrącano 3 obj. 96% etanolu przez noc w temp. -20°C.
5. Wirowano 20min. z prędkością 14000 rpm, w temp. 4°C.
6. Roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 20µl buforu UD lub FD.
7. Produkty reakcji wydłużania startera rozdzielano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakryloamidowym, Rozdział 3.2.17.

Według powyższego schematu prowadzono również reakcje wydłużania startera w układach do badania rekombinacji homologicznej wspieranej przez sekwencje HIV-1 R oraz BMV-R.

3.2.15.3 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66

Tabela 3.2.20 Skład mieszaniny reakcyjnej

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
H ₂ O	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl
donor ssDNA/RNA	10pmol	-	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol
akceptor ssDNA/RNA	-	10pmol	5pmol	10pmol	20pmol	50pmol
5x standardowy bufor do RT	8μl	8μl	8μl	8μl	8μl	8μl
starter	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol
Denaturacja 3min. w temp. 95°C i powolne schładzanie do temp. 45°C (1°C/min)						
enzym (6μg/μl) HIV-1 RT lub p66	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
dNTPmix ¹	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl

1) dNTPmix. Do każdej pojedynczej mieszaniny reakcyjnej podawano 8,3μl mieszaniny dNTPmix, zawierającej: 0,25mM dATP/dGTP/dTTP, 0,125mM dCTP (8μl) oraz 0,3μl dCTP [α ³²P] 3000 Ci/mmol ($C_{k(dATP/dGTP/dTTP)}=50\mu\text{M}$, $C_{k(dCTP)}=25\mu\text{M}$)

1. Reakcję prowadzono 1h w temp. 45°C.
2. Dodawano 20 μl buforu UD (x1).
3. Produkty reakcji wydłużania startera rozdzielano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakryloamidowym (nakładano po 20μl mieszaniny reakcyjnej na kieszonkę), Rozdział 3.2.17.

3.2.15.4 Badanie udziału HIV-1 RT oraz homodimeru p66 w miejscowo-specyficznej rekombinacji niehomologicznej, wspieranej przez cząsteczkę HELPERA

Tabela 3.2.21 Skład mieszaniny reakcyjnej

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
H ₂ O	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl
donor ssDNA/RNA	10pmol	-	-	10pmol	10pmol	-	10pmol
akceptor ssDNA/RNA	-	10pmol	-	10pmol		10pmol	10pmol
HELPER ssDNA/RNA	-	-	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol	-
5x standardowy bufor do RT	8μl	8μl	8μl	8μl	8μl	8μl	8μl
starter EtoEp	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol
Denaturacja 3min. w temp. 95°C i powolne schładzanie do temp. 45°C (1°C/min)							
enzym (6μg/μl) HIV-1 RT lub p66	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
dNTPmix ¹	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl

1) dNTPmix. Do każdej pojedynczej mieszaniny reakcyjnej podawano 8,3μl mieszaniny dNTPmix, zawierającej: 0,25mM dATP/dGTP/dTTP, 0,125mM dCTP (8μl) oraz 0,3μl dCTP [α ³²P] 3000 Ci/mmol ($C_{k(dATP/dGTP/dTTP)}=50\mu M$, $C_{k(dCTP)}=25\mu M$)

1. Reakcję prowadzono 1h w temp. 45°C.
2. Dodawano 20 μl buforu UD (x1).
3. Produkty reakcji wydłużania startera rozdzielano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym (nakładano po 20μl mieszaniny reakcyjnej na kieszonkę), Rozdział 3.2.17.

3.2.16 Analiza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Produkty reakcji PCR, trawienia restrykcyjnego oraz oczyszczania poddawane były analizie metodą elektroforezy w żelu agarozowym (1% w przypadku produktów o długości powyżej 300 pz oraz 1,5% w przypadku produktów krótszych).

1. Do preparatów rozdzielanych w żelu dodawano 1/6 obj. buforu BJ. Jako wzorzec długości DNA używano 2µg 0,1kB (w przypadku krótkich cząsteczek DNA - poniżej 1000 pz) lub 1kB (w przypadku długich cząsteczek DNA - powyżej 1000 pz).
2. Rozdział prowadzono przy natężeniu 40-50mA i napięciu 120-130V.
3. Produkty rozdziału elektroforetycznego wybarwiano w wodnym roztworze bromku etydyny przez 1h i analizowano w świetle UV.

3.2.17 Analiza kwasów nukleinowych w żelach poliakryloamidowych

Produkty reakcji wydłużania startera oraz sekwencjonowania jednoniciowych matryc poddawane były analizie elektroforetycznej w denaturującym żelu poliakryloamidowym (8% w przypadku produktów o długości powyżej 100 nt oraz 12%, w przypadku produktów krótszych).

1. Do preparatów rozdzielanych w żelu dodawano bufor UD lub FD (do uzyskania końcowego stężenia buforu 1x).
2. Tak przygotowane preparaty poddawano denaturacji 3min. w 94°C.
3. Inkubowano 5min. na lodzie.
4. Rozdział prowadzono w żelu poddanym wcześniejszej preelektroforezie, przy natężeniu 10mA i napięciu 100-200V (max 25W na małych szybach o wymiarach 180 x 196 x 1mm oraz max 50W - na dużych szybach – 400 x 325 x 0,5mm). Początkowe warunki rozdziału wynosiły: natężenie 10mA, napięcie 100-200V (max 25W) dla małych żeli oraz 10mA, napięcie 300V (max 50W) dla dużych żeli. Po wejściu preparatów w żel, natężenie podwyższono do 40mA, a napięcie do 500V (max 25W) dla małych żeli oraz natężenie do 40mA, a napięcie do 1500V (max 50W) dla dużych żeli. Jako wzorców długości używano odpowiedniej długości ssDNA, wyznakowanych radioizotopowo ³²P na końcu 5'.
5. Produkty rozdziału elektroforetycznego analizowano z użyciem skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).

3.2.18 Analiza białek w żelach poliakryloamidowych

Otrzymywane preparaty białkowe poddawane były analizie metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym.

1. Do próbek dodawano $\frac{1}{4}$ objętości buforu SB.
2. Tak przygotowane preparaty poddawano denaturacji 3min. w 94°C.
3. Inkubowano 5min. na lodzie.
4. Nanoszono na żel. Początkowe warunki rozdziału wynosiły: natężenie 25mA oraz napięcie 80V (w żelu zagęszczającym). Po wejściu preparatów w żel rozdzielający, podwyższono natężenie do 50mA, a napięcie do 200V. Jako wzorzec długości użyto Mid-Range Protein Molecular Weight Marker (0,5µg).
5. Produkty rozdziału elektroforetycznego barwiono w roztworze komasyny przez 1h, a następnie płukano w roztworze odbarwiającym przez kolejną godzinę.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

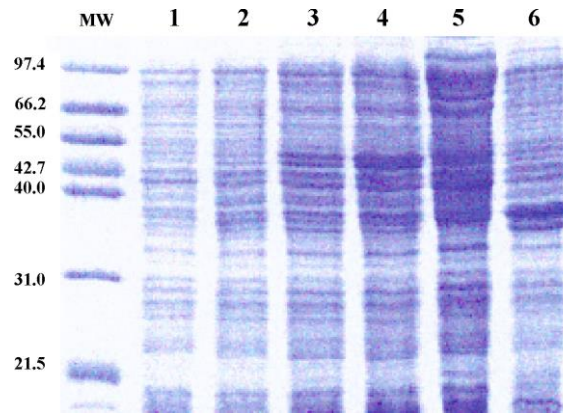
4.1 Otrzymywanie HIV-1 RT i jej podjednostek

4.1.1 Ekspresja HIV-1 RT w komórkach bakteryjnych

HIV-1 RT (heterodimer p66/p51) produkowana była w komórkach bakteryjnych BL21(DE3)LysS, transformowanych wektorem ekspresyjnym pDAR1, otrzymanym dzięki uprzejmości dr St. Hughes'a z National Cancer Institute - Frederick Cancer and Development Center, Frederick, USA. W wektorze tym znajdują się dwie niezależne otwarte ramki odczytu. Pierwsza, koduje podjednostkę p66, zaopatrzoną w His-Tag na końcu C, druga natomiast proteazę HIV-1. Pomiedzy cDNA kodujące wirusowe białka wprowadzona została 148-nt sekwencja, zawierająca miejsce do klonowania, intron, oraz część genu *gag* HIV-1. Obydwa cDNA znajdują się pod kontrolą tego samego promotora polimerazy RNA T7. W komórkach bakteryjnych powstaje zatem jeden dicystronowy mRNA, z którego syntetyzowane jest białko p66 oraz niewielka ilość wirusowej proteazy. Poziom ekspresji proteazy został dobrany w taki sposób, iż tylko około 50% podjednostek p66 było pozbawionych domeny RNazowej. W rezultacie, w komórkach bakteryjnych powstawały obydwie podjednostki HIV-1 RT: p66 oraz p51

(pozbawiona His-Tagu i domeny RNazowej). Komórki bakteryjne użyte do produkcji heterodimeru p66/p51 to: *E. coli*, szczep BL21(DE3)pLysS. Szczep ten posiada zintegrowany z genomem gen *I* bakteriofaga T7, kodujący polimerazę RNA T7. Gen polimerazy umieszczony jest pod kontrolą promotora *lac* UV5, który zostaje uaktywniony po dodaniu β -D-izopropyl- β -D-galaktopiranozydu (IPTG). Dodatkowo, użyty szczep bakteryjny posiada plazmid pLysS, w którym obecny jest gen lizozymu bakteriofaga T7. Ilość lizozymu, powstająca w nieindukowanych komórkach bakteryjnych, jest wystarczająca, aby zapobiec transkrypcji z promotora polimerazy RNA T7 (lizozym jest naturalnym inhibitorem bakteriofagowej polimerazy), jest ona jednak zbyt mała, żeby mieć znaczący wpływ na transkrypcję po indukcji IPTG. Jednak podstawową funkcją lizozymu, który znajduje się pod kontrolą indukowanego niskimi temperaturami promotora genów kodujących białka szoku termicznego, jest liza ścian komórkowych bakterii. Komórki BL21(DE3)pLysS transformowano wektorem ekspresyjnym pDAR1 metodą elektroporacji (Materiały i Metody 3.2.7.1a). Transformowane komórki namnażano w płynnej pożywce LB i wysiewano na pożywkę stałą z ampicyliną w celu uzyskania pojedynczych kolonii. Komórki bakteryjne posiadające plazmid pDAR1 były odporne na antybiotyk, przeżywały więc na pożywce selekcyjnej (w obrębie plazmidu zakodowana została sekwencja β -laktamazy, enzymu hydrolizującego ampicylinę). Pojedynczą kolonią bakteryjną zaszczerpiono płynną pożywkę LB. Hodowlę prowadzono do momentu osiągnięcia przez zawiesinę bakteryjną gęstości optycznej $A_{600}=0,6-0,8$. Wówczas hodowla osiąga fazę wzrostu logarytmicznego i najlepiej nadaje się do ekspresji białka. Zanim jednak gen polimerazy RNA T7 został indukowany, pobrano niewielką ilość hodowli w celu przygotowania 10% glicerolowych zawiesin bakterii. W takiej postaci bakterie mogą być przechowywane przez dłuższy czas w temp. -70°C . Następnie do hodowli dodawano IPTG, aktywujący gen polimerazy RNA T7. Powstająca polimeraza rozpoznaje promotor, obecny w plazmidzie pDAR1 i rozpoczyna transkrypcję znajdujących się pod nim genów. W tym przypadku produktem transkrypcji był dicistronowy mRNA, posiadający dwie otwarte ramki odczytu: białka p66 oraz wirusowej proteazy. Przebieg ekspresji monitorowano analizując ekstrakty białkowe, uzyskane z bakterii pobieranych przed i po dodaniu czynnika indukującego (po 1, 2 oraz 3h). Dodatkowo sprawdzono, w której frakcji białek - rozpuszczalnych, czy nierozpuszczalnych - znajduje się heterodimer p66/p51 (Materiały i Metody 3.2.1.3). Ekstrakty białek poddano analizie metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym (Materiały

i Metody 3.2.18). Powstająca w bakteriach HIV-1 RT występowała jednak w stosunkowo niskim stężeniu, stąd trudno było jednoznacznie określić, które z obserwowanych na żelu prążków odpowiadają tworzącym ją białkom (Rys.4.1).



*Rysunek 4.1 Analiza białek wyizolowanych z *E. coli* BL21(DE3)LysS, transformowanych wektorem pDAR1. Białka poddano analizie metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. MW - wzorzec mas Mid-Range, białka wyizolowane z bakterii: 1 - przed indukcją IPTG, 2-4- po indukcji IPTG (2 - po 1h, 3 - po 2h, 4 -po 3h inkubacji w 37°C), 5 - frakcja białek*

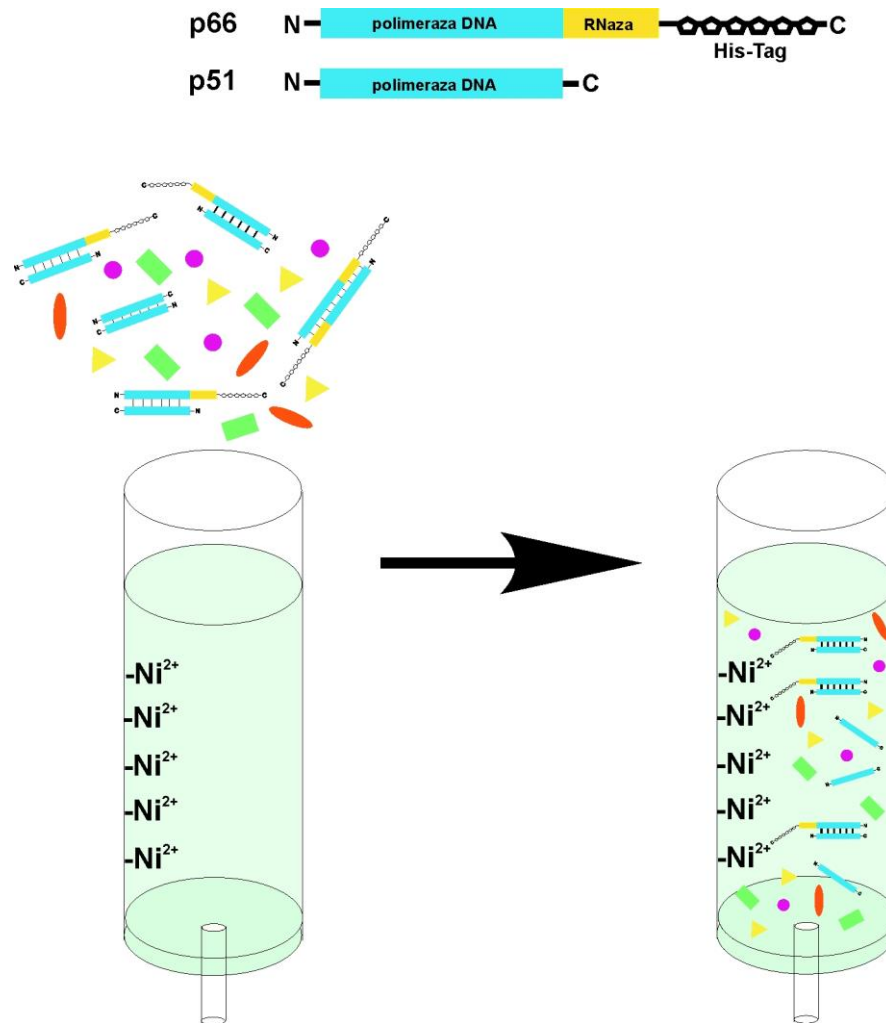
rozpuszczalnych, 6 - frakcja białek nierozpuszczalnych.

4.1.2 Oczyszczanie HIV-1 RT

W celu oczyszczenia HIV-1 RT zastosowano metodę chromatografii powinowactwa oraz chromatografii jonowymiennej. Użyte procedury pozwoliły na otrzymanie homogennego preparatu białkowego (powyżej 95% homogenności), [Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2003].

a) Oczyszczanie na kolumnie powinowactwa (Ni-NTA Agaroza)

Wyizolowany z bakterii ekstrakt białkowy nałożono na kolumnę, w której znajdował się nośnik His•Bind Resin z unieruchomionymi jonami niklu (Ni^{2+}). Ekstrakt zawierał podjednostkę p66 (posiadającą His-Tag na końcu C) oraz podjednostkę p51 (nieposiadającą domeny RNazowej oraz His-Tagu). Z kolumną wiązało się jedynie białko p66. Ponieważ posiada ono zdolność specyficznego wiązania podjednostki p51, stąd na kolumnie zatrzymywana była również podjednostka p51. Istotą zastosowanej metody oczyszczania HIV-1 RT było więc podwójne powinowactwo: (i) reszt histydynowych, obecnych na końcu C podjednostki p66, do jonów niklu oraz (ii) podjednostki p51 do podjednostki p66 (Rys. 4.2). Nadmiar białka p51 oraz większość pozostałych składników ekstraktu nie wiązała się z kolumną. Jako czynnik wypierający HIV-1 RT z kolumny zastosowano imidazol, który zrywa wiązania powstałe pomiędzy jonami niklu a pierścieniem imidazolowym histydyny. Frakcja zawierająca heterodimer p66/p51 wmywana była przy 10 i 100mM stężeniu imidazolu (Rys. 4.3). Uzyskany preparat, po wymianie buforu na 50mM Tris pH 8.0 i zagęszczeniu (Materiały i Metody 3.2.1.3d), poddano dalszemu oczyszczaniu na kolumnie jonowymiennej.

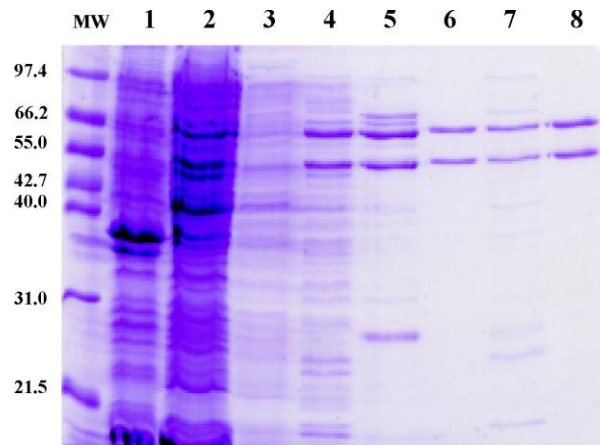


Rysunek 4.2 Schemat oczyszczania HIV-1 RT metodą chromatografii powinowactwa. W zastosowanej metodzie wykorzystano powinowactwo reszt histydynowych - His-Tagu, obecnych na końcu C podjednostki p66, do jonów niklu, obecnych w żelu kolumny. Podjednostka p51, powstająca z podjednostki p66 w wyniku odcięcia domeny RNazowej przez wirusową proteazę, nie posiada His-Tagu na końcu C, dlatego nie może związać się bezpośrednio z podłożem kolumny. Jednakże zostaje ona zatrzymana na kolumnie dzięki tworzeniu specyficznych oddziaływań z podjednostką p66 (tworzenie heterodimeru p66/p51). Pozostałe białka, nie posiadające His-Tagu, są wymywane z kolumny.

b) Oczyszczanie na kolumnie jonowymiennej-anionicznej, Hi-TrapQ

Aby uzyskać homogeny preparat HIV-1 RT, zastosowano kolejny etap oczyszczania - na kolumnie jonowymiennej. Jony trimetyloamoniowe, unieruchomione na nośniku wypełniającym kolumnę (Q-Sefarozą), odwracalnie wiązały obdarzony ładunkiem kompleks p66/p51. Przemycając kolumnę buforami o malejącym pH, zaczynając od zasadowego do coraz bardziej kwaśnego, wyizolowano preparat zawierający ponad 95% heterodimeru. Wyniki kolejnych etapów oczyszczania HIV-1 RT przedstawione zostały na Rys. 4.3. Wydajność ekspresji heterodimeru p66/p51 w komórkach bakteryjnych wynosiła około 4mg HIV-1 RT, z jednego litra hodowli wyjściowej. Oczyszczony preparat zagęszczono zgodnie z procedurą opisaną w Materiałach i Metodach 3.2.1.3d. Otrzymane białko

poddano analizie metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym (Rys. 4.3). HIV-1 RT przechowywano w buforze X, w temp.-20°C. Końcowe stężenie tak przygotowanego preparatu wynosiło 6µg/µl.



Rysunek 4.3 Analiza preparatów białkowych, otrzymanych w poszczególnych etapach izolacji i oczyszczania HIV-1 RT. Białka poddano analizie metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących. MW - wzorzec mas Mid-Range Protein Molecular Weight Marker, 1 - frakcja białek nierozpuszczalnych, 2 - frakcja białek rozpuszczalnych poddana dalszemu oczyszczaniu: 3 - 5 - na kolumnie powinowactwa – niklowej (3 – frakcja po przemyciu buforem II, 4 - frakcja po przemyciu buforem III z 10mM imidazolem, 5 - frakcja po przemyciu buforem III ze 100mM imidazolem), 6-7 - na kolumnie jonowymiennej (frakcje po przemyciu buforem Tris pH 8,0 / HEPES pH 7,0 w proporcjach 4:1 - linia nr 6 oraz 3:2 – linia nr 7), 8 - produkt po zagęszczeniu na filtrach molekularnych 30 kDa.

4.1.3 Otrzymywanie podjednostki p51

4.1.3.1 Konstrukcja wektora ekspresyjnego p51pET z wklonowaną sekwencją kodującą podjednostkę p51

cDNA kodujący podjednostkę p51 zawarty jest w sekwencji kodującej podjednostkę p66. Strategia uzyskania podjednostki p51 polegała więc na przeniesieniu kodującego ją DNA z wektora pDAR1 do innego wektora ekspresyjnego. W tym celu powielono cDNA kodujący podjednostkę p51 metodą PCR, wykorzystując pDAR1 jako matrycę. Startery użyte w reakcji: p51-3cor oraz p66-5 wprowadzały miejsca restrykcyjne *Bam*H I i *Xba* I oraz sekwencję kodującą 6 reszt histydynowych (Materiały i Metody 3.2.3, Reakcja PCR nr 1). Uzyskany w ten sposób produkt trawiono enzymami restrykcyjnymi *Bam*H I i *Xba* I (Materiały i Metody 3.2.8) i wligowano do wektora pET11a przeciętego enzymami restrykcyjnymi *Nhe* I i *Bam*H I (Materiały i Metody 3.2.10). Enzymy *Nhe* I i *Xba* I generują tzw. kompatybilne końce, dzięki czemu możliwa była wydajna ligacja. Uzyskaną mieszaniną ligacyjną transformowano komórki bakteryjne szczepu DH5α. Transformację przeprowadzono metodą heat-shock (Materiały i Metody 3.2.7.1). W celu scharakteryzowania produktów ligacji namnożono pojedyncze kolonie bakteryjne i wyizolowano z nich plazmidy (Materiały i Metody 3.2.7.2b). Aby potwierdzić obecność wligowywanego insertu, otrzymane plazmidy trawiono enzymem *Eco*R V. Plazmidy zawierające insert wyzwalały fragmenty o długości:

4230, 1669 oraz 1057 pz. Wybrany plazmid (p51pET) poddano sekwencjonowaniu (Materiały i Metody 3.2.11.1) – w ten sposób potwierdzono, iż sekwencja kodująca p51 oraz His-Tag została wprowadzona pomiędzy miejsca restrykcyjne *Nhe* I i *Bam*H I.

4.1.3.2 Ekspresja białka p51

Plazmid ekspresyjny p51pET został otrzymany w dużej skali zgodnie z przepisem zamieszczonym w rozdziale Materiały i Metody 3.2.7.2a. Następnie użyto go do transformacji *E. coli* BL21(DE3)LysS metodą elektroporacji (Materiały i Metody 3.2.7.1a). Ekspresję białka prowadzono według schematu opracowanego dla heterodimeru p66/p51 (Rozdział 4.1.1), zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.1.1. Równoległe przygotowano 10% stok glicerolowy bakterii BL21(DE3)LysS transformowanych plazmidem p51pET. Przebieg ekspresji monitorowano analizując powstające w bakteriach białko metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (Materiały i Metody 3.2.18).

4.1.3.3 Oczyszczanie białka p51

W celu oczyszczenia podjednostki p51 przyjęto analogiczną strategię jak w przypadku heterodimeru p66/p51. Wyizolowany z bakterii ekstrakt białkowy nałożono na kolumnę powinowactwa - niklową. Podjednostka p51 obdarzona została sekwencją His-Tag, dlatego mogła związać się z podłożem kolumny, zawierającym jony Ni^{2+} . Podobnie jak w przypadku HIV-1 RT, białko p51 wymyte zostało buforami zawierającymi 10mM i 100mM imidazol (Materiały i Metody 3.2.1.3a). W przypadku p51 oczyszczanie na kolumnie jonowymiennej Hi-TrapQ okazało się nieskuteczne, czystość otrzymanego preparatu była stosunkowo niska. Białko doczyszczono zatem metodą wysokorozdzielczej chromatografii ciekowej FPLC (Materiały i Metody 3.2.1.3c). Z jednego litra hodowli otrzymano ok. 4mg białka o homogenności powyżej 95%. Oczyszczony preparat zagęszczono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.1.3d i przechowywano w buforze X, w temp. $-20^{\circ}C$. Końcowe stężenie tak przygotowanego białka wynosiło 6 μ g/ μ l. Czystość uzyskanego białka określono analizując preparat metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym (Rys. 4.4).

4.1.4 Otrzymywanie podjednostki p66

W celu otrzymania podjednostki p66 zastosowano podobną procedurę postępowania jak w przypadku podjednostki p51. Obecną w wektorze pDAR1 sekwencję kodującą podjednostkę p66 i His-Tag powielono metodą PCR przy użyciu starterów oskrzydających ten obszar. Otrzymany fragment wligowano do wektora ekspresyjnego pET11a. Wektorem ekspresyjnym transformowano komórki *E. coli* DH5 α . Wyizolowane z pojedynczych kolonii plazmidy poddano analizie restrykcyjnej oraz sekwencjonowaniu, w celu potwierdzenia obecności sekwencji kodującej białko p66. Uzyskanym wektorem p66pET transformowano komórki bakteryjne BL21(DE3)LysS, a następnie indukowano ekspresję białka p66. Przebieg

ekspresji monitorowano analizując uzyskane z bakterii ekstrakty białkowe. Niestety, w żadnej z analizowanych prób nie stwierdzono obecności oczekiwanego białka. Zastosowano zatem inną strategię postępowania, polegającą na usunięciu z wektora pDAR1 kodonu START, występującego w sekwencji kodującej proteazę HIV-1. Pod nieobecność wirusowej proteazy, produkowane w bakteriach białko p66 nie powinno ulegać częściowej proteolizie do p51. Ukierunkowana mutageneza prowadziła do wymiany kodonu AUG na kodon UUG – leucynowy.

4.1.4.1 Konstrukcja wektora ekspresyjnego mutpDAR1

Ponieważ w pobliżu kodonu START proteazy nie znajdowało się żadne unikalne miejsce restrykcyjne, zmutowany fragment pDAR1 uzyskano dwuetapowo (Materiały i Metody 3.2.3.1b). Zaprojektowano trzy startery: Amutp-5, Bmutp-3 oraz Cmutp-3. Starter Bmutp-3 zawierał mutację A→U, podczas gdy dwa pozostałe: Amutp-5 i Cmutp-3 oskrzydlały sekwencję proteazy i zawierały unikalne miejsca restrykcyjne *EcoR* I i *Hind* III. Wektor pDAR1 cięto enzymami restrykcyjnymi *EcoR* I oraz *Hind* III i oczyszczono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.6.1. Pomiedzy miejsca restrykcyjne *EcoR* I i *Hind* III wstawiono zmodyfikowaną sekwencję wirusowej proteazy. Zmutowany insert otrzymano w dwuetapowej reakcji PCR. Podczas pierwszego etapu, przy pomocy starterów Amutp-5 i Bmutp-3 oraz fragmentu wektora pDAR1 jako matrycy (fragment wyzwalany podczas cięcia pDAR1 enzymami *EcoR* I oraz *Hind* III), zsyntetyzowano produkt o długości 156 pz, posiadający mutację A→U w obrębie kodonu start proteazy (Materiały i Metody 3.2.3, reakcja PCR nr 2). Otrzymany produkt posłużył jako jeden ze starterów podczas drugiego etapu mutagenezy. Jako drugi starter, do otrzymania zmutowanej proteazy, użyto Cmutp-3, ponadto wykorzystano taką samą matrycę jak w reakcji PCR nr 2 (Materiały i Metody 3.2.3, reakcja PCR nr 3). Uzyskane produkty PCR rozdzielono w żelu agarozowym (Materiały i Metody 3.2.16) i wyizolowano prążek o długości 361 pz, zawierający zmutowaną sekwencję (Materiały i Metody 3.2.6.1, zgodnie z procedurą opisaną w QIAquick Gel Extraction Kit Protocol). Ponieważ wydajność reakcji PCR była stosunkowo mała, obdarzony mutacją DNA powielono metodą PCR przy pomocy starterów Amutp-5 oraz Cmutp-3 (Materiały i Metody 3.2.3, reakcja PCR nr 4). Produkt reakcji PCR nr 4 trawiono enzymami *EcoR* I oraz *Hind* III i wligowano do wektora ekspresyjnego pDAR1 pomiędzy analogiczne miejsca restrykcyjne (Materiały i Metody 3.2.8 i 3.2.10). Uzyskaną mieszaniną ligacyjną transformowano komórki *E. coli* DH5 α . Transformację przeprowadzono metodą heat-shock (Materiały i Metody 3.2.7.1). W celu scharakteryzowania produktów ligacji namnożono pojedyncze kolonie bakteryjne i wyizolowano z nich plazmidy (Materiały i Metody 3.2.7.2b). Aby potwierdzić obecność wligowywanego insertu, otrzymane plazmidy poddano sekwencjonowaniu. Plazmid pDAR1, posiadający zmutowany kodon START (AUG→UUG) w obrębie sekwencji kodującej wirusową proteazę nazwano wektorem mutpDAR1.

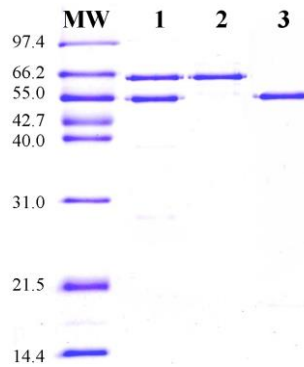
4.1.4.2 Ekspresja białka p66

Plazmid ekspresyjny mutpDAR1 został otrzymany w dużej skali zgodnie z przepisem zamieszczonym w Materiałach i Metodach 3.2.7.2a. Komórki bakteryjne *E. coli* BL21(DE3)LysS transformowano wektorem mutpDAR1 metodą

elektroporacji (Materiały i Metody 3.2.7.1a). Ekspresję białka prowadzono według schematu opracowanego dla heterodimeru p66/p51 (Rozdział 4.1.1), zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.1.1. Równolegle przygotowano 10% stek glicerolowy bakterii BL21(DE3)LysS transformowanych plazmidem mutpDAR1. Przebieg ekspresji monitorowano analizując powstające w bakteriach białka metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

4.1.3.3 Oczyszczanie białka p66

W celu oczyszczenia podjednostki p66 przyjęto analogiczną strategię jak w przypadku heterodimeru p66/p51. Wyizolowany z bakterii ekstrakt białkowy nałożono na kolumnę powinowactwa - niklową. Podjednostka p66 posiada His-Tag na końcu karboksylowym, dlatego mogła związać się z podłożem kolumny, zawierającym jony Ni^{2+} . Podobnie jak w przypadku HIV-1 RT oraz p51, białko p66 wymyte zostało buforami zawierającymi 10mM i 100mM imidazol (Materiały i Metody 3.2.1.3a). Po zastosowaniu opisanej procedury preparat wykazywał 95% homogenność i nie wymagał dalszego doczyszczania. Podobnie jak w przypadku HIV-1 RT oraz p51, z jednego litra hodowli otrzymano ok. 4mg białka. Oczyszczony preparat zagęszczono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.1.3d i przechowywano w buforze X, w temp. -20°C . Końcowe stężenie tak przygotowanego białka wynosiło $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$, jego czystość określono analizując preparat metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym [Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2003] (Rys. 4.4).



Rysunek 4.4 Analiza otrzymanych preparatów HIV-1 RT (heterodimeru p66/p51), p66 i p51 metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym. HIV-1 RT (linia nr 1), p66 (linia nr 2), p51 (linia nr 3), MW - wzorzec mas Mid-Range Protein Molecular Weight Marker.

Podsumowanie. W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów otrzymano trzy preparaty: heterodimer p66/p51 oraz homodimery: p66 i p51. Z informacji przedstawionych we Wstępie wynika, że HIV-1 RT posiada co najmniej trzy aktywności: polimerazową, rekombinacyjną i nukleazową. Dalsze badania koncentrowały się na dwóch pierwszych aktywnościach, ponieważ to właśnie one odpowiedzialne są za niezwykle polimorfizm genetyczny wirusa HIV. Nieprecyzyjna synteza prowirusowego DNA jest głównym źródłem mutacji punktowych, podczas gdy rekombinacja prowadzi do bardziej skomplikowanych modyfikacji genomu wirusowego.

4.2 Badanie aktywności polimerazowej HIV-1 RT oraz homodimerów p66 i p51

4.2.1 Otrzymywanie matryc DNA i RNA

HIV-1 RT jest polimerazą DNA zależną od DNA i od RNA. W celu przetestowania aktywności polimerazowej uzyskanych białek, otrzymano więc obydwa typy matryc. Ich sekwencja nie została wybrana w sposób przypadkowy, odpowiadała ona 69-nt fragmentowi hiperzmiennego rejonu (HVR, *ang. hyper variable region*) genomowej cząsteczki wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, *ang. hepatitis C virus*). Jednoniciowa matryca DNA (HVR-5-DNA) otrzymana została na drodze syntezy chemicznej (Materiały i Metody 3.2.4.1). Następnie w oparciu o HVR-5-DNA uzyskano matrycę RNA (HVR-5-RNA). Pierwszym etapem było otrzymanie dwuniciowego DNA (dsDNA) w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów RCT7-5 oraz

RC-3 (Materiały i Metody 3.2.4.2, reakcja PCR nr 7). Starter RCT7-5 zawierał sekwencję promotora polimerazy RNA T7, natomiast starter RC-3 wprowadzał sekwencję rozpoznawaną przez enzym *Pst* I. Otrzymany produkt poddano reakcji tępienia końców, wykorzystując fragment Klenowa polimerazy DNA I (Materiały i Metody 3.2.9). Tak przygotowany dsDNA poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym *Pst* I, a następnie wligowano do wektora pUC18 pomiędzy końce powstałe w wyniku cięcia enzymami *Sma* I i *Pst* I (Materiały i Metody 3.2.8 oraz 3.2.10). Uzyskaną mieszaniną ligacyjną transformowano komórki bakteryjne szczepu DH5 α . Transformację przeprowadzono metodą heat-shock (Materiały i Metody 3.2.7.1).

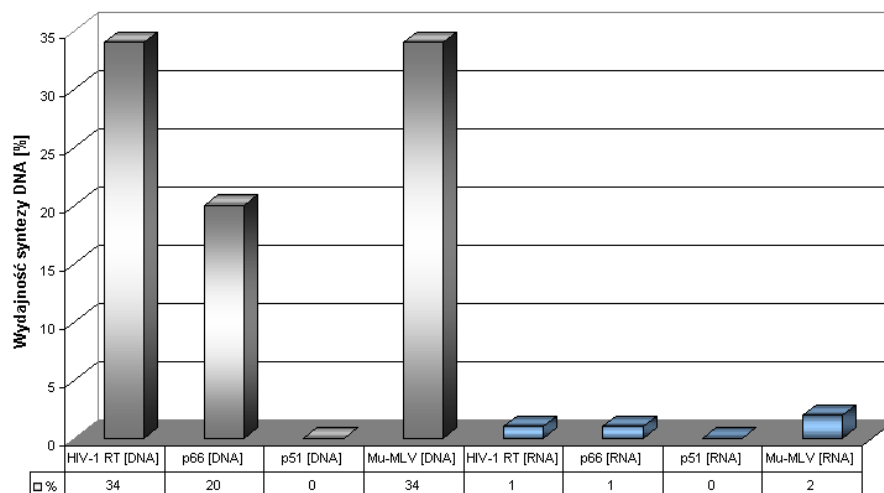
pUC18 należy do grupy plazmidów, u których możliwe jest zastosowanie metody selekcyjnej opartej na insercyjnej inaktywacji genu (tzw. *blue-white screening*). Wykorzystany w tej metodzie gen β -galaktozydazy (*lacZ*) znajduje się pod kontrolą promotora *lac*. Podanie induktora – IPTG – aktywuje ekspresję obecnego w plazmidzie genu *lacZ*. Powstający w komórkach bakteryjnych enzym rozkłada syntetyczny substrat: 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -galaktopiranozyd (X-gal), co prowadzi do powstawania charakterystycznych niebieskich kolonii. W momencie wprowadzenia obcej sekwencji w obszar genu *lacZ*, nie dochodzi do ekspresji β -galaktozydazy, X-gal nie jest rozkładany i na szalkach powstają białe kolonie bakteryjne.

Po namnożeniu transformowanych bakterii DH5 α , wysiano je na pożywkę stałą z ampicyliną, dodatkowo na szalki podano 30 μ l X-gal (0,5mg/ml) oraz 15 μ l 0,1M IPTG. Następnego dnia otrzymano mieszaninę białych i niebieskich kolonii. Izolację plazmidów przeprowadzono z pojedynczych, białych kolonii (Materiały i Metody 3.2.7.2b). Aby potwierdzić obecność wligowywanego insertu, otrzymane plazmidy trawiono enzymami *EcoR* I oraz *Pst* I, a następnie sekwencjonowano (Materiały i Metody 3.2.8 i 3.2.11.1). Plazmid pUC18 z wligowanym pomiędzy miejsca restrykcyjne *Sma* I i *Pst* I fragmentem HVR, nazwano pUC18-HVR5.

Plazmid pUC18-HVR5 otrzymano w dużej skali (Materiały i Metody 3.2.7.2a) i wykorzystano jako matrycę w reakcji transkrypcji *in vitro*. W tym celu plazmid został zliniowany za pomocą enzymu restrykcyjnego *Pst* I (Materiały i Metody 3.2.8). Reakcję transkrypcji prowadzono przy użyciu zestawu AMBION T7-MEGAscriptTM (Materiały i Metody 3.2.12). Powstający RNA (HVR-5-RNA) był dłuższy od HVR-5-DNA o 6 nt – 5 pochodzących z fragmentu promotora polimerazy RNA T7, który ulega transkrypcji oraz dodatkowy nukleotyd, pozostający na końcu 5' nici matrycowej po zliniowaniu plazmidu pUC18-HVR-5 enzymem *Pst* I.

4.2.2 Wstępne badania aktywności polimerazowej

Aktywność polimerazową HIV-1 RT, homodimeru p66 (HD-p66) oraz homodimeru p51 (HD-p51) testowano w reakcji wydłużania startera RC-3, wyznakowanego ^{32}P na końcu 5' (Materiały i Metody 3.2.14). Jako matryce wykorzystano jednoniciowe cząsteczki HVR-5-DNA oraz HVR-5-RNA. Reakcje prowadzono w standardowym buforze do RT, zgodnie ze schematem opisanym w rozdziale Materiały i Metody 3.2.15.1. Dla porównania przeprowadzono analogiczne reakcje z użyciem komercyjnie dostępnej odwrotnej transkryptazy Mu-MLV (Mu-MLV RT). Produkty reakcji oczyszczono metodą fenol-chloroform, rozdzielono w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym, a następnie analizowano za pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo. Wydajność syntezy produktów pełnej długości, powstających w wyniku skopiowania całej cząsteczki matrycowej, przedstawiono na Rys 4.5, [Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2003].



Rysunek 4.5 Wydajność syntezy pełnej długości produktu DNA w reakcji wydłużania startera katalizowanej przez HIV-1 RT i jej podjednostki: p66 i p51. Porównanie wydajności syntezy DNA przez: HIV-1 RT, HD-p66 i HD-p51 oraz

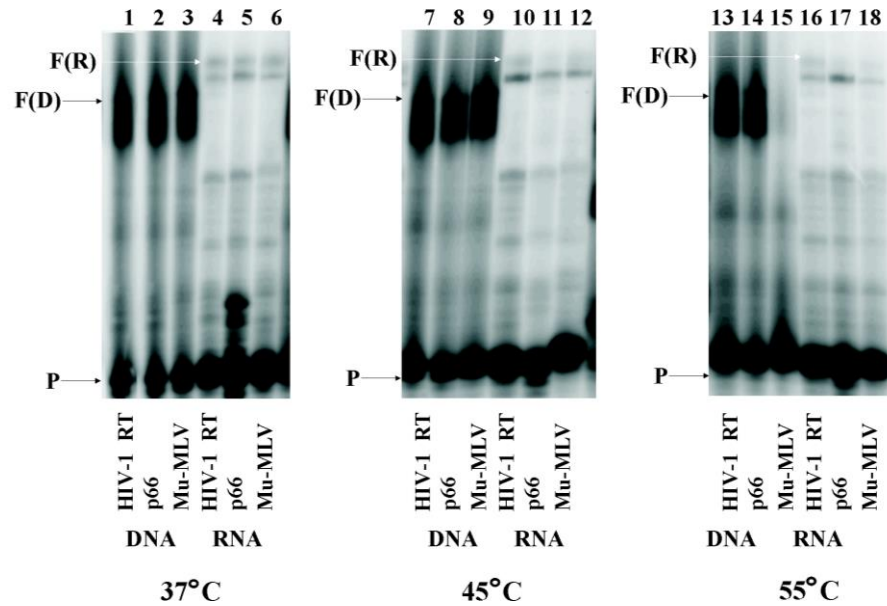
*komercyjnie dostępną Mu-MLV RT.
Wydajność syntezy DNA była badana w
reakcji wydłużania startera, w temp.
37°C, na matrycach ssDNA oraz RNA.*

Przeprowadzona analiza wykazała, że synteza DNA zachodzi zdecydowanie mniej efektywnie na matrycy RNA, niż na matrycy DNA. Otrzymana HIV-1 RT wykazywała podobną aktywność polimerazową jak Mu-MLV RT, zarówno na matrycy DNA jak i RNA. Synteza DNA na matrycach DNA oraz RNA, katalizowana przez HD-p66, zachodziła z prawie dwukrotnie niższą wydajnością w porównaniu z HIV-1 RT. HD-p51 nie wykazywał aktywności polimerazowej. Uzyskane wyniki były zgodne z wynikami innych grup badawczych [Katz i wsp., 1994].

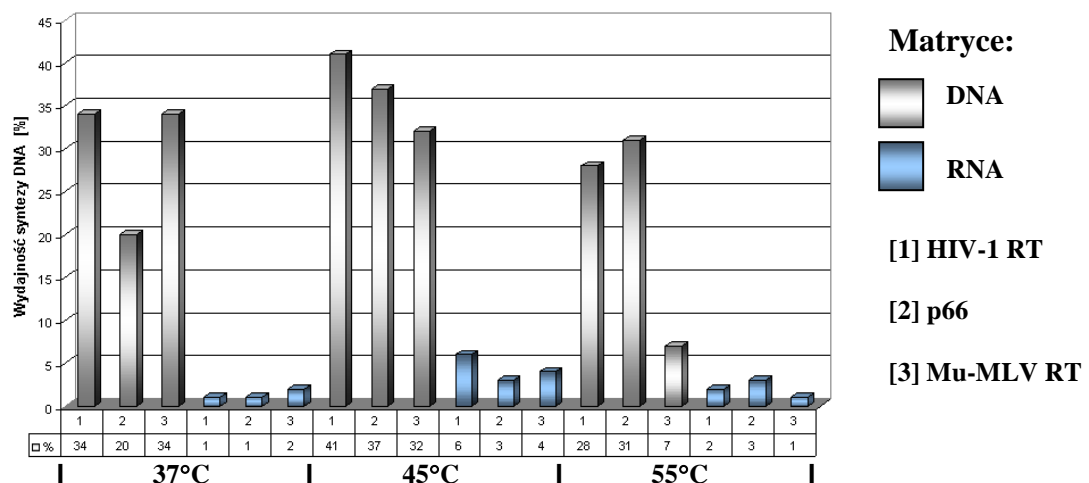
Z uwagi na brak wykrywalnej aktywności polimerazowej podjednostki p51, do dalszych badań użyto HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV jako kontrolę. Kolejnym etapem była optymalizacja warunków reakcji syntezy DNA.

4.2.3 Optymalizacja warunków syntezy DNA

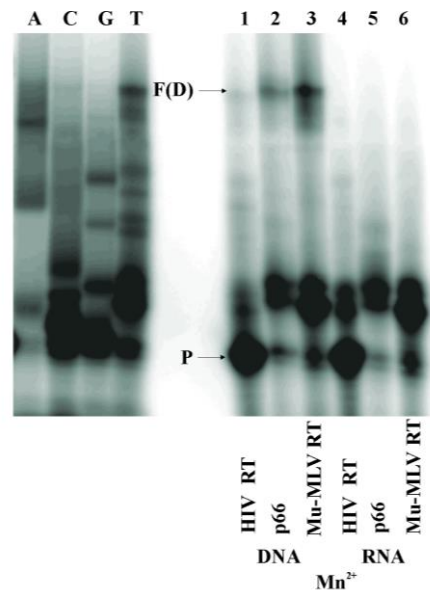
W celu określenia optymalnych warunków syntezy DNA przez HIV-1 RT oraz HD-p66, reakcje wydłużania startera prowadzone były w różnych temperaturach: 37°C, 45°C oraz 55°C. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Przykładowe wyniki zamieszczono na Rys. 4.6, a analizę ilościową powstałych produktów na Rys. 4.7. Synteza DNA przeprowadzana była również w środowisku, gdzie jony Mg^{2+} zastąpiono jonami Mn^{2+} (Rys. 4.8 i Rys. 4.9), (Materiały i Metody 3.2.15.1). Jako kontrolę, wykorzystano Mu-MLV RT. W celu określenia długości powstających produktów, równolegle przeprowadzono reakcje sekwencjonowania matrycy HVR-5-DNA (Materiały i Metody 3.2.11.2), [Kurzyńska-Kokorniak i wsp., 2003].



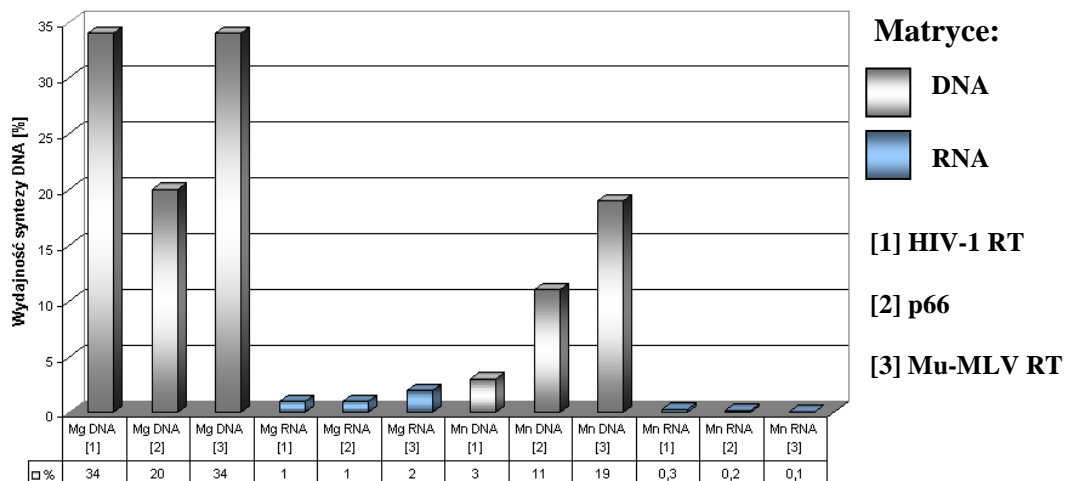
Rysunek 4.6 Analiza elektroforetyczna produktów reakcji wydłużania startera, prowadzonych w różnych warunkach temperaturowych. Reakcje wydłużania startera prowadzone były w temp. 37°C, 45°C oraz 55°C, na matrycach ssDNA (HVR-5-DNA) oraz RNA (HVR-5-RNA), z udziałem enzymów: HIV-1 RT (linie 1, 4, 7, 10, 13, 16), HD-p66 (linie 2, 5, 8, 11, 14, 17) oraz komercyjnie dostępnej Mu-MLV RT (linie 3, 6, 9, 12, 15 i 18). W celu określenia długości produktów, równolegle przeprowadzono reakcje sekwencjonowania matrycy (nie przedstawione na rysunku). Symbolem F(D) oznaczono produkty pełnej długości, powstające w wyniku powielenia całej matrycy ssDNA (69 nt), natomiast F(R) - produkty pełnej długości, powstające w wyniku powielenia całej matrycy RNA (74 nt). Literą P oznaczono starter RC3 (wyznakowany ³²P na końcu 5'), który nie został wykorzystany w reakcji.



Rysunek 4.7 Aktywność polimerazowa HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT w różnych warunkach temperaturowych. Porównanie wydajności syntezy produktów pełnej długości przez HIV-1 RT, HD-p66 oraz komercyjnie dostępną Mu-MLV RT. Wydajność syntezy DNA była badana w reakcji wydłużania startera, w temp.: 37°C, 45°C, 55°C, na matrycach ssDNA oraz RNA.



Rysunek 4.8 Analiza elektroforetyczna produktów reakcji wydłużania startera, prowadzonych w obecności dwuwartościowych jonów Mn^{2+} . Reakcje wydłużania startera prowadzone były w buforze do RT, zawierającym jony Mn^{2+} , na matrycach DNA (HVR-5-DNA) oraz RNA (HVR-5-RNA), z udziałem enzymów: HIV-1 RT (linie 1 i 4), HD-p66 (linie 2 i 5) oraz komercyjnie dostępnej Mu-MLV RT (linie 3 i 6). W celu określenia długości produktów, równoległe przeprowadzono reakcje sekwencjonowania matrycy (linie A, C, G, T). Symbolem F(D) oznaczono produkty pełnej długości, powstające w wyniku powielenia całej matrycy ssDNA (69 nt). Produkty pełnej długości, powstające w wyniku powielenia całej matrycy RNA są niewidoczne na rysunku. Literą P oznaczono starter RC3 (wyznakowany ^{32}P na końcu 5'), który nie został wykorzystany w reakcji.



Rysunek 4.9 Aktywność polimerazowa HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT w obecności kationów: Mg^{2+} lub Mn^{2+} . Porównanie wydajności syntezy produktów pełnej długości przez HIV-1 RT,

HD-p66 oraz komercyjnie dostępną Mu-MLV RT. Wydajność syntezy DNA była badana w reakcji wydłużania startera, w temp. 37°C, w obecności jonów Mg^{2+} lub Mn^{2+} , na matrycach ssDNA oraz RNA.

W wyniku reakcji wydłużania startera otrzymano szereg produktów (Rys. 4.6 i Rys. 4.8), które można było podzielić na trzy podstawowe grupy:

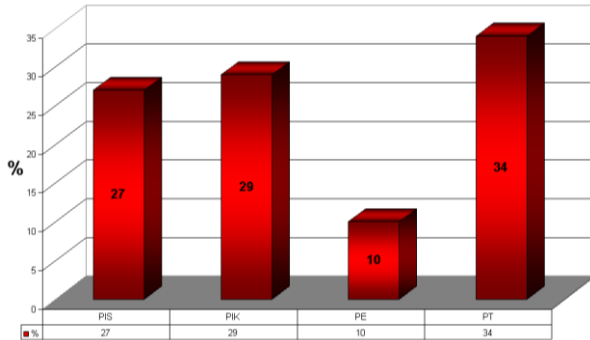
- produkty powstałe podczas etapu inicjacji (PI),
- produkty powstałe podczas etapu elongacji (PE),
- produkty terminacji (PT).

Dodatkowo produkty powstałe podczas etapu inicjacji (PI) można było podzielić na dwie podgrupy:

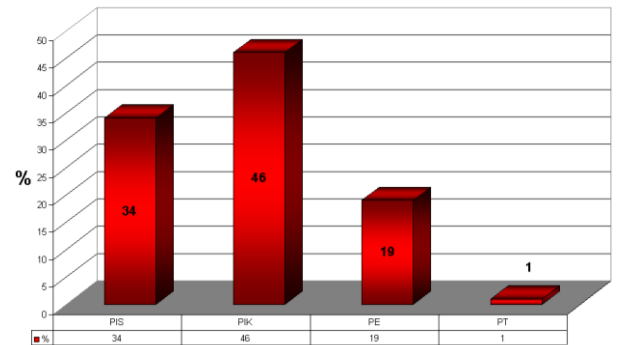
- produkty wstępnej fazy inicjacji syntezy DNA (PIS), dłuższe o 1,2 lub 3 nukleotydy od startera. Ze względu na brak możliwości odróżnienia sygnału pochodzącego od PIS i znakowanego startera wydajność tworzenia PIS powiększona została o ilość niewykorzystanego w reakcji startera,
- produkty końcowej fazy inicjacji (PIK), zaraz przed przejściem do etapu elongacji - produkty dłuższe od startera o 4,5,6,7 lub 8 nukleotydów.

Chcąc scharakteryzować badany proces w sposób ilościowy wykorzystano program komputerowy Image Quantification pozwalający dokładnie określić wydajność, z jaką powstawały poszczególne produkty reakcji. W przypadku reakcji wydłużania startera wyznakowanego ^{32}P na końcu 5', wydajność syntezy DNA przez określony enzym mierzona była w następujący sposób: wartość impulsu pochodzącego od całej, rozdzielonej w żelu poliakryloamidowym mieszaniny reakcyjnej przyjmowana była jako 100%. W zależności od analizowanych parametrów, wartość tę dzielono na poszczególne produkty. Wyniki analizy ilościowej przedstawiono na Rys. 4.7 i Rys. 4.9 (wydajność syntezy produktów pełnej długości) oraz na Rys.: 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 (wydajność syntezy PIS, PIK, PE i PT). Przedstawione na wykresach wyniki są wartościami średnimi, wyznaczonymi w oparciu o trzy niezależne eksperymenty.

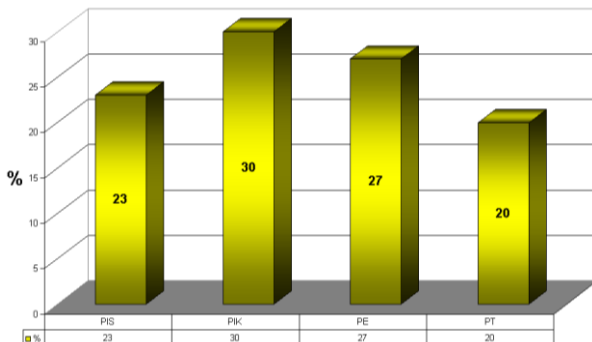
*Wydajność syntezy
DNA na matrycy DNA
HIV-1 RT*



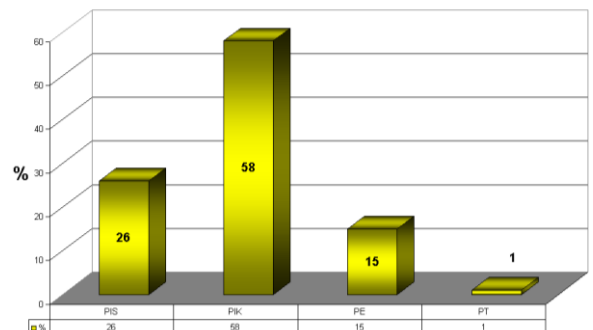
*Wydajność syntezy
DNA na matrycy RNA
HIV-1 RT*



*Wydajność syntezy
DNA na matrycy DNA
p66*



*Wydajność syntezy
DNA na matrycy RNA
p66*

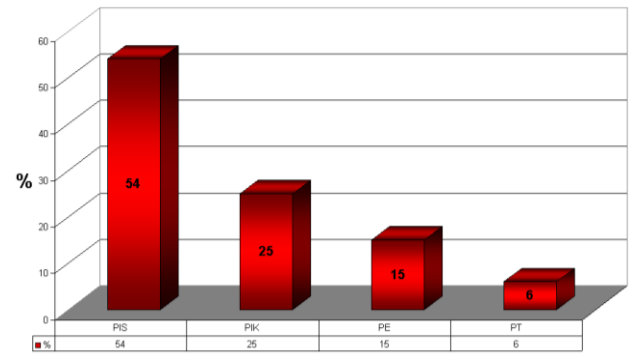
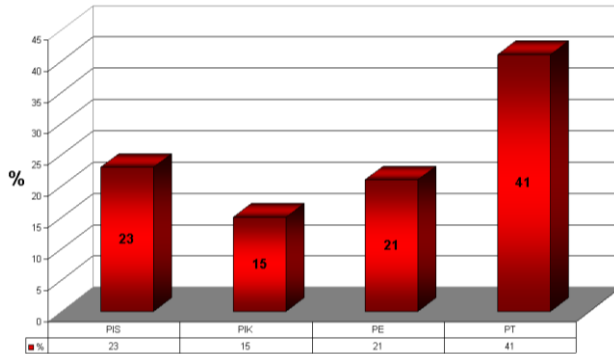


Wydajność syntezy

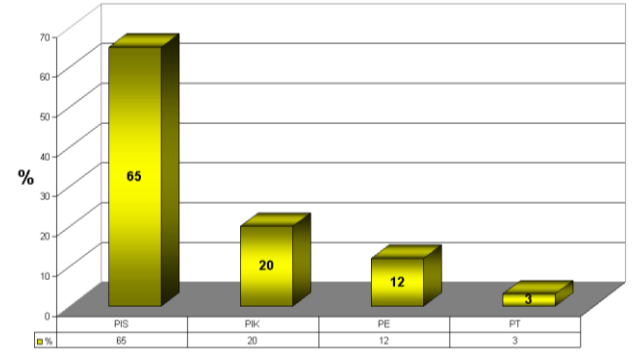
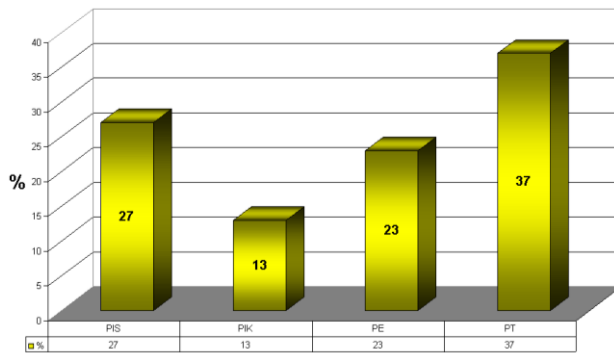
Wydajność syntezy

Rysunek 4.10 Porównanie wydajności z jaką tworzyły się produkty poszczególnych etapów syntezy DNA na matrycach DNA lub RNA, w temperaturze 37°C, z wykorzystaniem enzymów HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT. Oznaczenia: PIS – produkty powstałe podczas wczesnego etapu inicjacji syntezy DNA, PIK - produkty powstałe w końcowej fazie inicjacji syntezy DNA, PE – produkty powstałe podczas etapu elongacji, PT – produkty terminacji.

*Wydajność syntezy DN_n na matrycy DNA
HIV-1 RT* *Wydajność syntezy DN_n
na matrycy RNA
HIV-1 RT*

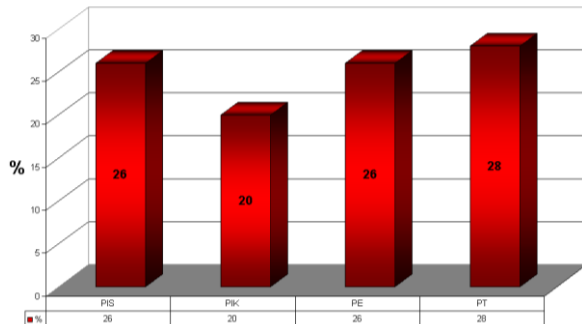


*Wydajność syntezy DN_n na matrycy DNA
p66* *Wydajność syntezy DN_n
na matrycy RNA
p66*

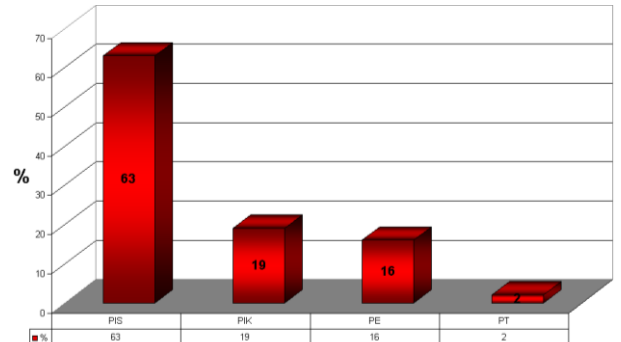


Rysunek 4.11 Porównanie wydajności z jaką tworzyły się produkty poszczególnych etapów syntezy DNA na matrycach DNA lub RNA, w temperaturze 45°C, z wykorzystaniem enzymów HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT. Oznaczenia: PIS – produkty powstałe podczas wczesnego etapu inicjacji syntezy DNA, PIK - produkty powstałe w końcowej fazie inicjacji syntezy DNA, PE – produkty powstałe podczas etapu elongacji, PT – produkty terminacji.

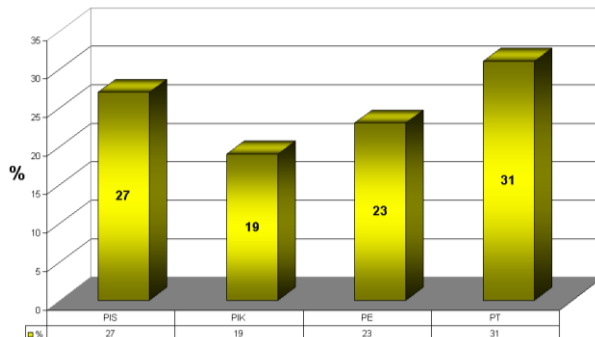
*Wydajność syntezy DNA na matrycy DNA
HIV-1 RT*



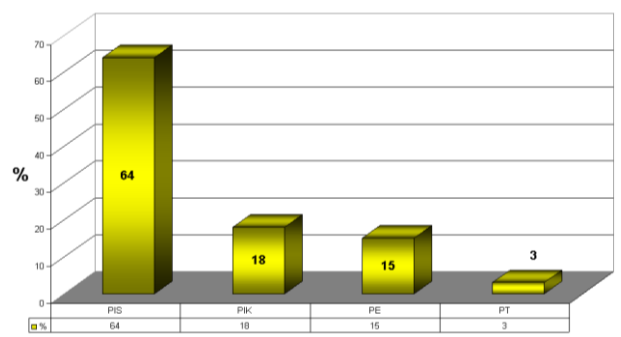
*Wydajność syntezy DNA na matrycy RNA
HIV-1 RT*



*Wydajność syntezy DNA na matrycy DNA
p66*

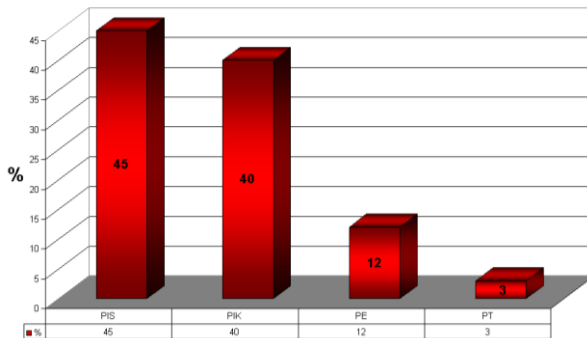


*Wydajność syntezy DNA na matrycy RNA
p66*

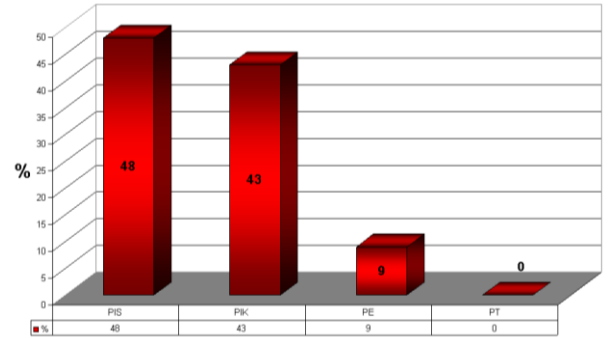


Rysunek 4.12 Porównanie wydajności z jaką tworzyły się produkty poszczególnych etapów syntezy DNA na matrycach DNA lub RNA, w temperaturze 55°C, z wykorzystaniem enzymów HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT. Oznaczenia: PIS – produkty powstałe podczas wczesnego etapu inicjacji syntezy DNA, PIK - produkty powstałe w końcowej fazie inicjacji syntezy DNA, PE – produkty powstałe podczas etapu elongacji, PT – produkty terminacji.

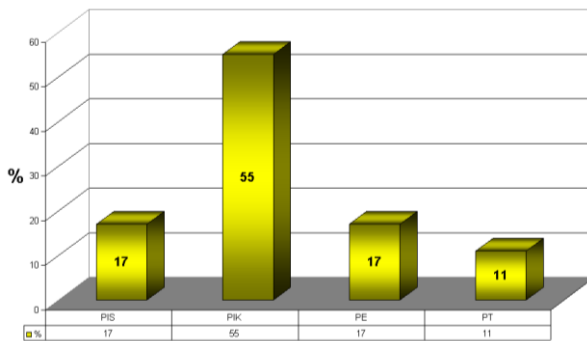
*Wydajność syntezy
DNA na matrycy RNA
HIV-1 RT*



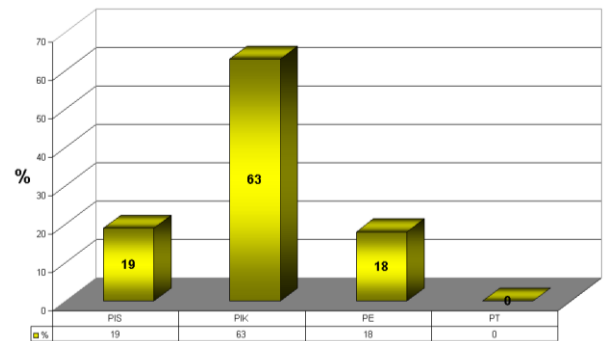
*Wydajność syntezy
DNA na matrycy RNA
HIV-1 RT*



*Wydajność syntezy
DNA na matrycy DNA
p66*



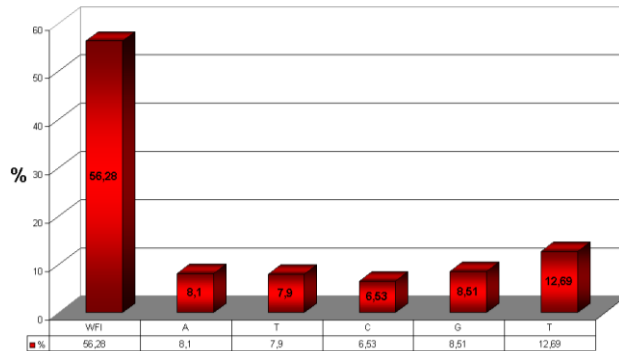
*Wydajność syntezy
DNA na matrycy RNA
p66*



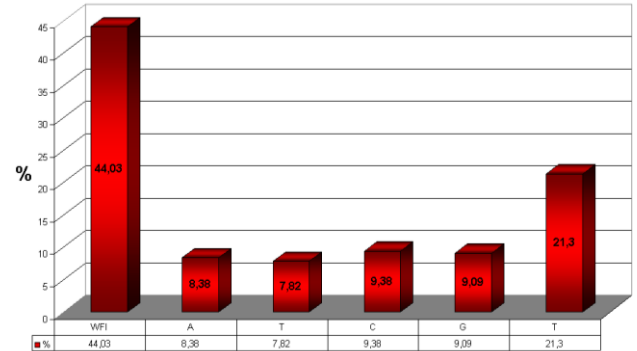
Rysunek 4.13 Porównanie wydajności z jaką tworzyły się produkty poszczególnych etapów syntezy DNA na matrycach DNA lub RNA, w obecności jonów Mn^{2+} , z wykorzystaniem enzymów HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT. Oznaczenia: PIS – produkty powstałe podczas wczesnego etapu inicjacji syntezy DNA, PIK - produkty powstałe w końcowej fazie inicjacji syntezy DNA, PE – produkty powstałe podczas etapu elongacji, PT – produkty terminacji.

Szczegółowa analiza ilościowa produktów powstających podczas reakcji wydłużania startera: PIS, PIK, PE oraz PT pokazała, że w badanym zakresie temperatur: 37°C, 45°C i 55°C, HIV-1 RT efektywnie katalizuje proces syntezy DNA, wykazując najwyższą aktywność w temp. 45°C. Odmienne wyniki uzyskano dla enzymu kontrolnego - Mu-MLV RT, której optymalne warunki syntezy mieszczą się w przedziale 37-45°C, natomiast w temp. 55°C wydajność syntezy pełnej długości DNA przez Mu-MLV drastycznie spada. Porównując HIV-1 RT z HD-p66, można stwierdzić, że heterodimer wykazuje wyższą aktywność polimerazową. Etap elongacji przebiegał bez większych przeszkód we wszystkich badanych przypadkach. Ponadto, we wszystkich analizowanych próbach, efektywność syntezy pełnej długości DNA na matrycy RNA była stosunkowo niewielka. Zaobserwowano, że podczas syntezy DNA na matrycy RNA szczególnie często dochodziło do przedwczesnej terminacji syntezy na etapie inicjacji (PIS+PIK). Przejście od fazy inicjacji do fazy elongacji okazało się zresztą dla wszystkich testowanych enzymów głównym punktem limitującym wydajność syntezy produktów pełnej długości. Wpływ przedwczesnej terminacji na wydajność procesu syntezy DNA jest najlepiej widoczny na przykładzie reakcji przeprowadzonych w obecności jonów Mn^{2+} , podczas których powstaje niewiele produktów pełnej długości. Uzyskane dane świadczą, że najtrudniejszą do pokonania barierą jest synteza pierwszych trzech wiązań międzynukleotydowych. Inaczej przedstawiała się sytuacja, kiedy reakcję prowadzono w obecności jonów Mn^{2+} , wówczas do zatrzymania syntezy najczęściej dochodziło podczas włączenia 4, 5,...8 nukleotydu (etap PIK). Z uwagi na interesujące wyniki uzyskane podczas analizy wstępnego etapu reakcji syntezy DNA, etap ten został prześledzony szczegółowo (Rys. 4.14 i Rys. 4.15). Następnie porównano jak etap inicjacji przebiegał we wszystkich przeprowadzonych reakcjach (Rys. 4.16). Przedstawione na wykresach wyniki są wartościami średnimi, wyznaczonymi w oparciu o trzy niezależne eksperymenty.

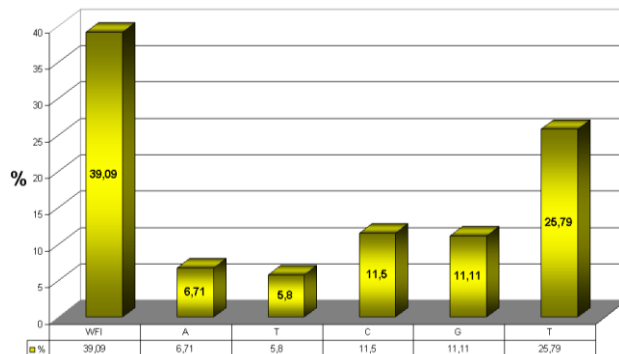
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy DNA
HIV-1 RT**



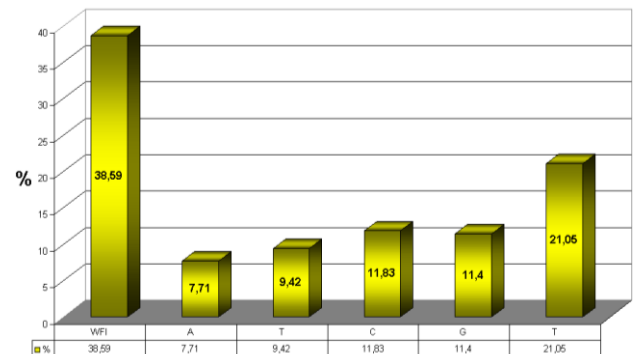
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy RNA
HIV-1 RT**



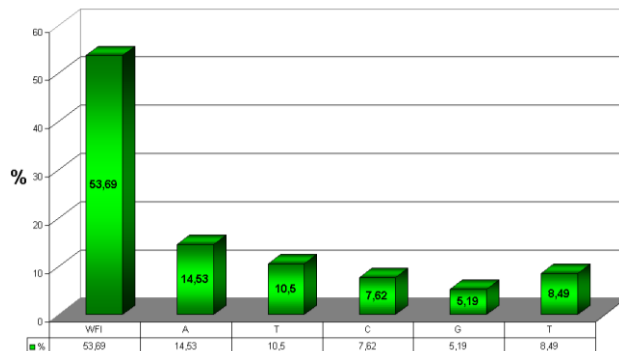
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy DNA
p66**



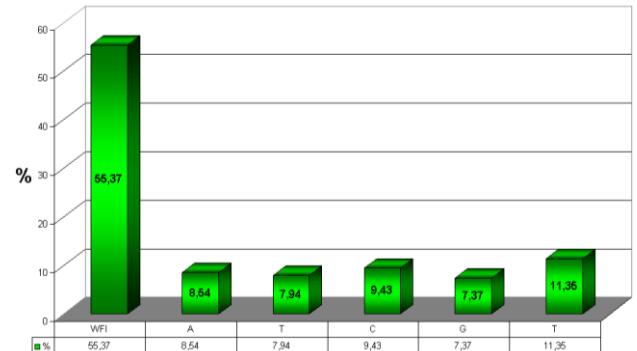
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy RNA
p66**



**Inicjacja syntezy DNA na matrycy DNA
Mu-MLV RT**

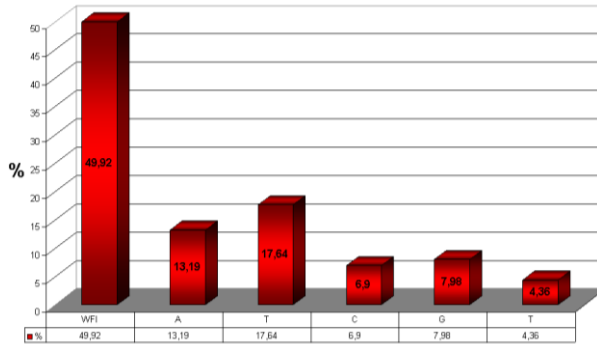


**Inicjacja syntezy DNA na matrycy RNA
Mu-MLV RT**

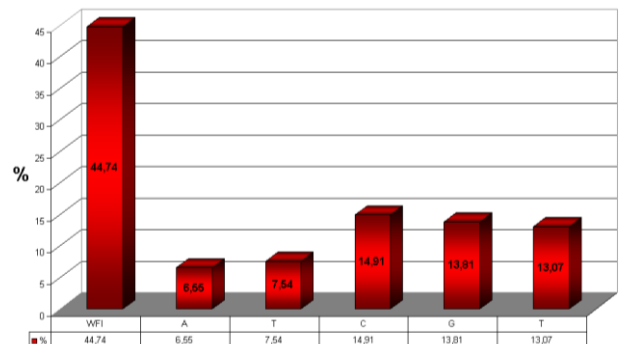


Rysunek 4.14 Przebieg procesu inicjacji syntezy DNA na matrycach DNA lub RNA, w temperaturze 37°C i obecności jonów Mg^{2+} , z wykorzystaniem enzymów HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT. Oznaczenia: WFI (Wczesna Faza Inicjacji) – efektywność terminacji procesu syntezy DNA podczas włączania pierwszych trzech nukleotydów, dalsze pozycje na wykresie oznaczone: A, T, C, G, T, odzwierciedlają efektywność terminacji syntezy na kolejnych pozycjach nukleotydowych. Suma impulsów, pochodzących od WFI, A, T, C, G oraz T, została przyjęta jako 100%.

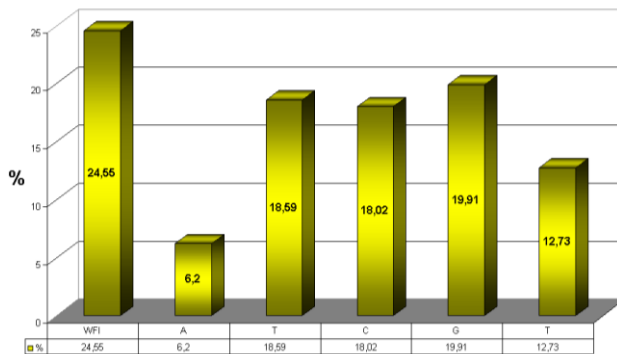
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy DNA
HIV-1 RT**



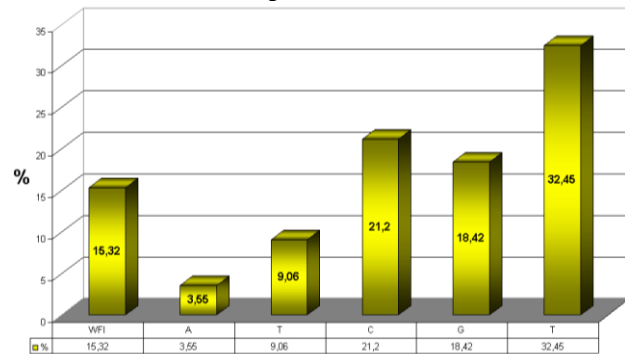
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy RNA
HIV-1 RT**



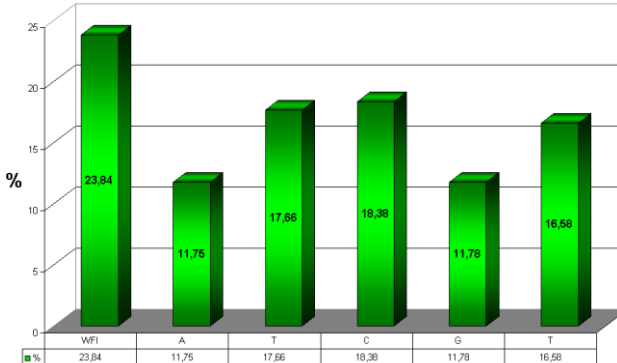
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy DNA
p66**



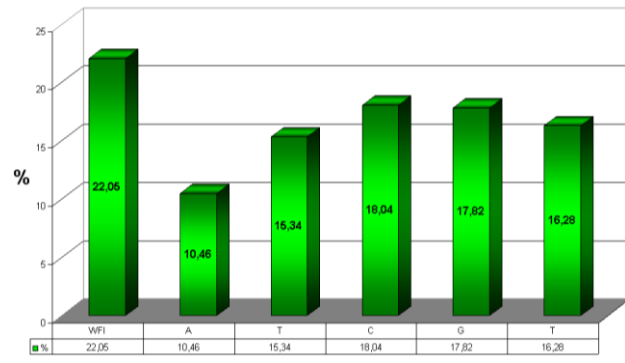
**Inicjacja syntezy DNA na matrycy RNA
p66**



**Inicjacja syntezy DNA na matrycy DNA
Mu-MLV RT**

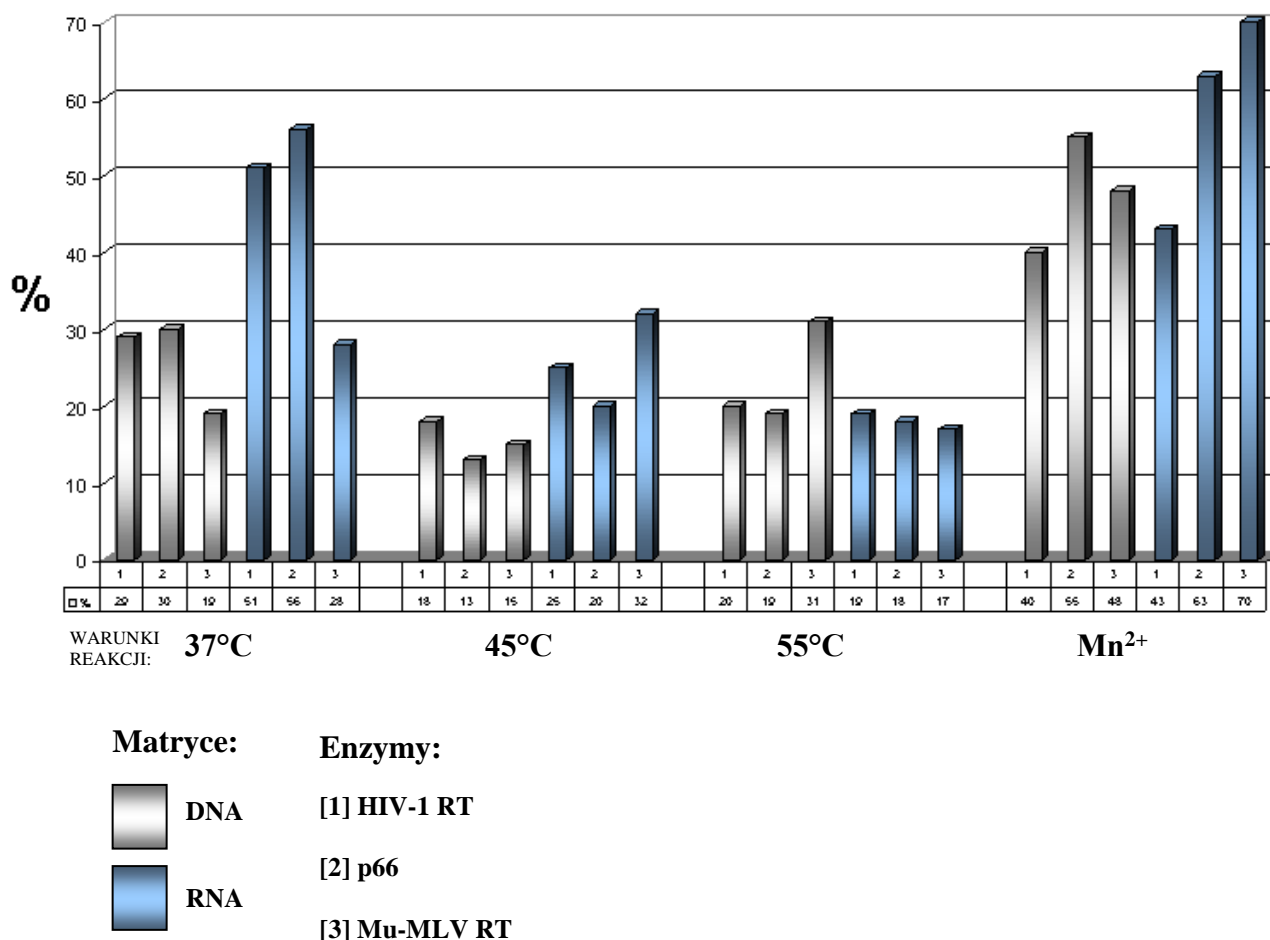


**Inicjacja syntezy DNA na matrycy RNA
Mu-MLV RT**



Rysunek 4.15 Przebieg procesu inicjacji syntezy DNA na matrycach DNA lub RNA, w temperaturze 37°C i obecności jonów Mn^{2+} , z wykorzystaniem enzymów HIV-1 RT, HD-p66 oraz Mu-MLV RT. Oznaczenia: WFI (Wczesna Faza Inicjacji) – efektywność terminacji procesu syntezy DNA podczas włączania pierwszych trzech nukleotydów, dalsze pozycje na wykresie oznaczone: A, T, C, G, T, odzwierciedlają efektywność terminacji syntezy na kolejnych pozycjach nukleotydowych. Suma impulsów, pochodzących od WFI, A, T, C, G oraz T, została przyjęta jako 100%.

Przedwczesna terminacja podczas procesu inicjacji syntezy DNA



Rysunek 4.16 Wpływ warunków reakcji na przebieg procesu inicjacji syntezy DNA. Na wykresie przedstawiono wydajność tworzenia produktów przedwczesnej terminacji podczas etapu inicjacji syntezy DNA. Porównanie zostało przeprowadzone dla reakcji wydłużania startera prowadzonych na matrycach ssDNA lub RNA, w temp. 37°C, 45°C i 55°C oraz w buforze do RT, gdzie jony Mg²⁺ zastąpiono jonami Mn²⁺.

Przeprowadzone badania wskazują na istotną rolę jonów Mg²⁺ podczas przechodzenia kompleksu polimerazowego z fazy inicjacji do fazy elongacji. Zaobserwowano znaczące różnice pomiędzy procesem inicjacji zachodzącym w obecności jonów Mg²⁺ i Mn²⁺ (Rys. 4.14 i Rys. 4.15). W przypadku jonów Mg²⁺, do terminacji syntezy DNA najwydajniej dochodziło podczas przyłączania do startera pierwszych trzech nukleotydów (WFI, Rys. 4.14). Przyłączanie 4-, 5-, 6- oraz 7-go nukleotydu zachodziło bez większych zakłóceń. Silny sygnał terminacji pojawiał się dopiero po włączeniu

ósmego nukleotydu. Obecność jonów Mn^{2+} powodowała wyraźne podwyższenie częstości terminacji syntezy na wszystkich ośmiu analizowanych pozycjach nukleotydowych (Rys. 4.15). Ponadto, HIV-1 RT okazała się być enzymem najmniej wrażliwym na zamianę jonów (przebieg fazy inicjacji w obecności jonów Mg^{2+} i Mn^{2+} przedstawiał się podobnie). Terminacja syntezy DNA podczas etapu inicjacji zachodziła natomiast najwydajniej w obecności HD-p66 (na matrycy DNA) oraz Mu-MLV RT (na matrycy RNA), (Rys. 4.16).

Podsumowanie. Szczegółowa analiza produktów reakcji wydłużania startera wskazuje, iż badany proces można podzielić na trzy etapy: inicjacji, elongacji oraz terminacji. Dodatkowo w obrębie etapu inicjacji można wyróżnić trzy podetapy. Podczas pierwszego, enzym wiąże się z matrycą i zhybrydowanym z nią starterem. W drugim, rozpoczęta zostaje synteza DNA, czyli tworzenie pierwszych wiązań międzynukleotydowych. W trzecim, dochodzi do przekształcenia kompleksu inicjacyjnego w elongacyjny. Dokładna analiza procesu inicjacji pokazała, że synteza DNA bardzo często zostaje zakończona po dodaniu zaledwie kilku pierwszych nukleotydów. Na żelu zaobserwowano powstawanie produktów dłuższych od startera o 1,2...8 nukleotydów (PI=PIS+PIK). Ustalono, że proces przedwczesnej terminacji zachodzi szczególnie często po przyłączeniu do startera pierwszego, drugiego oraz trzeciego nukleotydu – najintensywniejszy pik, oznaczony WFI (Rys.4.14). Wydawać by się mogło, że po przyłączeniu pierwszych trzech nukleotydów synteza DNA zachodzić będzie bez większych przeszkód – słabe impulsy pochodzące od startera z przyłączonymi: 4, 5, 6 oraz 7 nukleotydami (Rys.4.14). Jednakże po włączeniu 8 nukleotydu do nowosyntetyzowanej nici, ilość produktów przedwczesnej terminacji ponownie wzrasta (Rys. 4.14). Nagły wzrost częstości przedwczesnej terminacji syntezy DNA można wiązać ze zmianami strukturalnymi, zachodzącymi w kompleksie kwas nukleinowy-białko, czyli z pokonywaniem bariery energetycznej, dzielącej etap inicjacji od etapu elongacji. Po przejściu do fazy elongacji, synteza DNA przebiega bez większych przeszkód. Zaobserwowano powstawanie niewielkiej ilości produktów niepełnej długości (PE). Ostatecznie enzym osiąga koniec 5' cząsteczki i dochodzi do etapu terminacji, podczas którego wytworzonych zostaje kilka produktów (PT).

Podsumowując uzyskane wyniki można powiedzieć, że synteza DNA przez HIV-1 RT przebiega najefektywniej, gdy cząsteczką matrycową jest ssDNA, w temperaturze 45°C, w standardowym buforze do RT (Rys. 4.7). Takie warunki ograniczają proces przedwczesnej terminacji syntezy DNA (Rys. 4.16), zostały więc zastosowane podczas

kolejnych reakcji. Ponadto interesujące wyniki uzyskano dla reakcji prowadzonych w buforze do RT, zawierającym dwuwartościowe jony Mn^{2+} (Rys. 4.8). W obecności tych jonów, przejście z etapu inicjacji do etapu elongacji było szczególnie trudne (Rys. 4.16), stąd też najprawdopodobniej wynikała niska wydajność tworzenia produktów pełnej długości.

4.3 Wstępne badania wpływu struktury matrycy na wierność jej kopiowania

Aby stwierdzić, w jakim stopniu dokładność kopiowania cząsteczek genomowych zależy od specyficznych właściwości polimerazy, a w jakim zakresie jest ona uwarunkowana strukturą matrycy, testowano precyzję, z jaką HIV-1 RT powieliła szczególnie zmienną sekwencję, pochodzącą z genomu wirusowego. W badaniach wykorzystano modelową sekwencję, obecną w genomowej cząsteczce HCV – fragment tzw. regionu hiperzmiennego (HVR).

W doświadczeniu użyto matryce HVR-5-DNA oraz HVR-5-RNA, opisane w rozdziale Wyniki i Dyskusja 4.2.1 Przeprowadzono standardowe reakcje syntezy DNA (w buforze do RT z Mg^{2+} , w $45^{\circ}C$), z wykorzystaniem startera RC-3, wyznakowanego ^{32}P . Produkty syntezy rozdzielono w denaturującym żelu poliakryloamidowym, a następnie wyizolowano ssDNA odpowiadające produktom pełnej długości (Materiały i Metody 3.2.13). Oczyszczone preparaty poddano amplifikacji metodą PCR, stosując polimerazę DNA Pfu, która zgodnie z informacją dostarczoną przez producenta, posiada zdolność szczególnie wiernego kopiowania cząsteczek DNA (dzięki obecności aktywności egzonukleazowej $3' \rightarrow 5'$). Jako kontrolę, przeprowadzono reakcję PCR w obecności matrycy HVR-5-DNA, z użyciem polimerazy DNA Pfu. Produkty PCR były klonowane i sekwencjonowane (Materiały i Metody 3.2.5). Przykładowe sekwencje przedstawiono na Rys. 4.17.

<u>HVR-5 wt</u>	5' -AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K PCR [1]	5' -AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGGC_AAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K PCR [4]	5' -AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGAAA_A_GGGGGACATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K PCR [5]	5' -AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGAGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'

K PCR [6]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACA_GGGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D PCR [3]	5'-AATCTAGACGTTGAC_GGGGAACATATGTGACAGGGGAAACGATGGCCAAAAACA_CCTCGGGATTACG-3'
D PCR [4]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGAGGAC_ATGACAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D PCR [11]	5'-AATCTAGACGTTGAC_GGGGAACCTATGTGACAGGGGAGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D PCR [14]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACA_GGGGAACAAATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D PCR [17]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGAGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
R PCR [3]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGG_CAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
R PCR [8]	5'-AATCTAGACGTTGAC_GGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGG_TTACG-3'
R PCR [9]	5'-AATCTAGACGTTGAC_GGGGAACCTATGTACAGGGGGAACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
R PCR [11]	5'-AATCTAGACGTTGAC_GGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
R PCR [17]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAAGGAGGACGATGG_CAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K [3]	5'-AATCTAGACGTTG_CGGGGGAACCTATGTGACAGGAAGAACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K [5]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGAGGAAGATAGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K [7]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGAAGATAGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K [8]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGAACAAAAACACCCTC_GGATTACG-3'
K [14]	5'-AATCTAGACGTTGAC_GGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACAAATGG_CAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
K [21]	5'-AATCTAGACGTTGAC+GGGGGAACCTATGGGACAGGGGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3
K [24]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATCTTAAAGGGGGGACGATAGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3
D [10]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGAAAACCTATGTGACA+GGGGGACAAATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3
D [15]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGAC_ATGGACAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D [16]	5'-AATATAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGAGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D [24]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGCAGGACGATGAACAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D [29]	5'-AATCTAGACGTTAACGAGGGAACCTATGTGACAGGAGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D [31]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGGCCAAAAACACCCTAGGGATTACG-3'
D [39]	5'-TA_TAGACGTTAACGGGGAAACCTATGTGACAGGGGGGAGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3'
D [41]	5'-AATCTAGACGTTGACGGGGAAACCTATGTGA_AGGGGGACGATGGCCAAAAACACCCTCGGGATTACG-3

Rysunek 4.17 Przykładowe sekwencje cząsteczek potomnych, otrzymanych w wyniku powielania fragmentu rejonu hiperzmiennego HCV przez HIV-1 RT oraz polimerazę DNA Pfu. **Sekwencja matrycy wyjściowej (typu dzikiego) została zaznaczona jako HVR-5-DNA wt**, pozostałe oznaczenia: **K** – kontrolna reakcja syntezy DNA, prowadzona na matrycy HVR-5-DNA przez polimerazę DNA Pfu, **D** – reakcja syntezy DNA, prowadzona na matrycy HVR-5-DNA przez HIV-1 RT, **R** – reakcja odwrotnej transkrypcji, prowadzona na matrycy HVR-5-RNA przez HIV-1 RT, skrót PCR w nazwie klonu oznacza, że produkt reakcji został poddany amplifikacji metodą PCR, z wykorzystaniem polimerazy DNA Pfu. Liczby umieszczone w nawiasach kwadratowych oznaczają numery poszczególnych klonów. Substytucje nukleotydowe zostały zaznaczone kolorem czerwonym, delecje - kreską poziomą, natomiast insercje – krzyżykiem. Odnotowano dwie insercje nukleotydu G, w klonie K [21] oraz D [10].

Analiza sekwencji otrzymanych klonów dała zaskakujące wyniki. Okazało się, że podczas reakcji kontrolnych i reakcji z udziałem HIV-1 RT (zarówno na matrycy ssDNA jak i RNA), wprowadzana była podobna ilość mutacji punktowych, co wskazywało na to, iż rodzaj użytej do reakcji polimerazy nie miał większego znaczenia. Całe doświadczenie powtórzono dwukrotnie. Aby pominąć etap amplifikacji, podczas którego polimeraza mogła wprowadzić liczne mutacje do nici potomnych, przeprowadzono reakcję syntezy DNA na matrycy DNA. W rezultacie uzyskano dwuniciowy DNA, którego jedna nić otrzymana była na drodze syntezy chemicznej, a druga przy udziale HIV-1 RT. Jako kontrolę przeprowadzono analogiczną reakcję z użyciem polimerazy DNA Pfu. Otrzymane produkty rozdzielono w natywnym żelu

poliakryloamidowym, wyizolowano pełnej długości dsDNA, który następnie został poddany procedurze wypełniania końców przy pomocy Fragmentu Klenowa polimerazy DNA I (Materiały i Metody 3.2.9). Tak przygotowane inserty były klonowane i sekwencjonowane (Materiały i Metody 3.2.5). Sekwencje wybranych klonów przedstawiono na Rys. 4.17, szczegółowa analiza wprowadzonych mutacji punktowych została przedstawiona w Tabeli 4.1.

Uzyskane wyniki były zgodne z wcześniejszymi spostrzeżeniami, iż rodzaj użytej polimerazy nie wpływa na wierność, z jaką kopiowany jest hiperzmienny fragment genomu HCV (jego odpowiednik DNA). Aby ustalić w jakim stopniu struktura matrycy decydować może o precyzji replikacji genomów wirusowych, doświadczenie zostało powtórzone, z tą różnicą, że jako matrycę użyto 69-nt sekwencję pochodzącą ze stosunkowo zachowawczego fragmentu genomu HCV (HCV-E1). Jednoniciowa cząsteczka DNA została otrzymana na drodze syntezy chemicznej. W reakcji użyto starter HCV-E1-p. Po przeanalizowaniu sekwencji dwudziestu otrzymanych klonów, okazało się, że podczas kopiowania matrycy HCV-E1 zarówno HIV-1 RT jak i polimeraza DNA Pfu nie wprowadzały mutacji punktowych, niezależnie od tego czy sekwencjonowaniu poddawane były produkty

reakcji wydłużania startera bezpośrednio po jej zakończeniu czy amplifikowane w reakcji PCR.

Tabela 4.1 Zidentyfikowane mutacje punktowe, wprowadzone do nici potomnej podczas powielania 69-nt matrycy HVR-5-DNA lub HVR-5-RNA przez HIV-1 RT lub polimerazę DNA Pfu

Nazwa mutacji punktowych		Ilość mutacji	
SUBSTYTUCJE NUKLEOTYDOWE	TRANZYCJE G→A	32	
	TRANSWERSJE	A→T	1
		C→A	11
		G→C	2
		G→T	2
		T→A	1
		T→G	1
DELECJE		23	
INSERCJE (G)		2	
		<u>ŁACZNIE:</u> 75	

Podsumowanie. Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono, że dokładność kopiowania matrycy jest uzależniona nie tylko od rodzaju enzymu lecz także od sekwencji powielanego fragmentu. W przypadku kopiowania fragmentu rejonu HVR, charakteryzującego się dużym polimorfizmem genetycznym, obydwie polimerazy wprowadzały porównywalną ilość mutacji, przy czym zaobserwowano

wyraźne preferencje dotyczące zarówno rodzaju jak i miejsca wprowadzanych mutacji. Najczęściej były one ułożowane w obszarze bogatym w powtórzenia guanozynowe, gdzie odnotowano liczne delecje oraz tranzycje G→A. Z doniesień literaturowych wiadomo, iż na genomy wirusów takich jak HIV czy HCV działa presja selekcyjna, zorientowana w kierunku akumulowania cząsteczek bogatych w reszty adenozyne [Berkhout i wsp., 1994]. Reszty adenozyne występują licznie w kodonach asparaginy czy tyrozyny, czyli w aminokwasach, które mogą ulegać glikozylacji. Najprawdopodobniej zwiększenie ilości miejsc glikozylacji białek otoczki wirusowej (sekwencja HVR koduje białką otoczki HCV) daje wirusowi potencjalną szansę stworzenia nowych wariantów opornych na leki czy przeciwciała obecne w organizmie zainfekowanej osoby.

Podsumowując, można stwierdzić, że w przypadku fragmentu sekwencji *HVR*, cechującego się dużym polimorfizmem genetycznym, właściwości polimerazy (np. obecność aktywności naprawczej) nie wywierały większego wpływu na wierność, z jaką był on powielany. Podczas kopiowania matrycy *HVR-5-DNA*, zarówno *HIV-1 RT* jak i polimeraza *DNA Pfu* wprowadzały podobną ilość mutacji. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono średnią częstość wprowadzania mutacji punktowych podczas kopiowania matrycy *HVR-5-DNA* bądź *HVR-5-RNA* – $3,7 \times 10^{-2}$, co oznacza, że do nowosyntetyzowanej nici średnio wprowadzanych było 3,7 mutacji na każde 100 przyłączanych nukleotydów. Ponadto, pokazano, że inny fragment sekwencji kodującej białka otoczki *HCV*, który z kolei cechował się względną

zachowawczością, był kopiowany przez użyte w doświadczeniu polimerazy praktycznie bezbłędnie. Można zatem przypuszczać, iż struktura kwasu nukleinowego odgrywa bardzo ważną rolę w wiernym powielaniu genomów wirusowych.

4.4 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66

4.4.1 Rekombinacja homologiczna

Rekombinacja homologiczna może odgrywać dwojaką rolę w cyklu życiowym wirusa HIV. Z jednej strony jest ona niezbędna do przepisania genomowej cząsteczki RNA na dsDNA, który ulega integracji z genomem gospodarza. Z drugiej strony umożliwia wymianę informacji genetycznej pomiędzy różnymi wariantami HIV.

W celu lepszego poznania strukturalnych uwarunkowań rekombinacji homologicznej postanowiono

stwierdzić, jakie elementy zawarte w strukturze tzw. sekwencji liderowej genomu HIV-1 odpowiedzialne są za naturalnie zachodzące przesłoki rekombinacyjne HIV-1 RT. Wcześniejsze doniesienia literaturowe sugerowały, iż najistotniejszym czynnikiem umożliwiającym przeniesienie HIV-1 RT z końca 5' cząsteczki genomowej na jej koniec 3', nie jest 97-nt sekwencja homologiczna (rejon R), obecna na obydwu końcach genomu HIV-1, lecz struktura drugorzędowa całej sekwencji liderowej [Berkhout i wsp., 2001; Huthoff i wsp., 2003]. Aby zweryfikować ten pogląd testowano aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT oraz HD-p66 wobec sekwencji liderowej HIV-1 oraz wobec samych tylko rejonów R. Dodatkowo, chciano ustalić czy homologiczne sekwencje R wykazują jakąś szczególną zdolność do wspierania przesłoków HIV-1 RT. Dlatego też

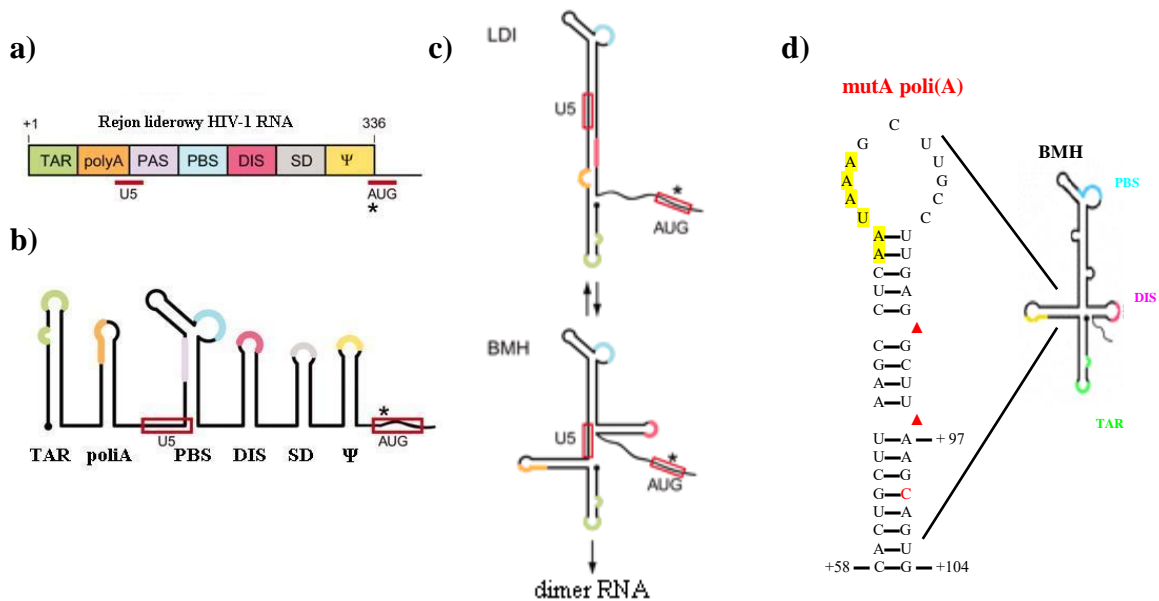
porównano jak zmienia się aktywność rekombinacyjna HIV-1 RT, gdy rejon R zastąpi się sekwencją, która efektywnie wspiera rekombinację homologiczną u całkowicie innego wirusa.

W eksperymentach tych wykorzystano dobrze scharakteryzowaną sekwencję R-BMV, pochodzącą z modelowego (+)RNA wirusa roślinnego – BMV.

4.4.1.1 Wpływ struktury RNA rejonu liderowego HIV-1 na wydajność procesu rekombinacji

Doświadczenia przeprowadzone w pracowni Berkhout'a wskazywały, że efektywność rekombinacji zależy od tego, którą z dwóch alternatywnych konformacji przyjmie rejon liderowy HIV-1 – stabilniejszą termodynamicznie konformację LDI czy mniej stabilną, BMH. Powstanie struktury BMH może zostać wymuszone obecnością białka nukleokapsydu, NC lub poprzez

wprowadzenie specyficznych mutacji (*mutA*) do spinki poli(A), (Rys. 4.18) [Berkhout i wsp., 2001; Huthoff i wsp., 2003]. Z doniesień literaturowych wiadomo, że proces odwrotnej transkrypcji, podczas którego tworzone są rekombinanty, wspierany jest obecnością struktury BMH. Nie uzyskano jednak jednoznacznej odpowiedzi, czy struktura BMH powstaje wskutek przyłączenia startera $tRNA^{lys3}$, czy jest obecna jeszcze przed jego hybrydyzacją do miejsca PBS, np. dzięki oddziaływaniom z białkiem NC [Berkhout i wsp., 2002].

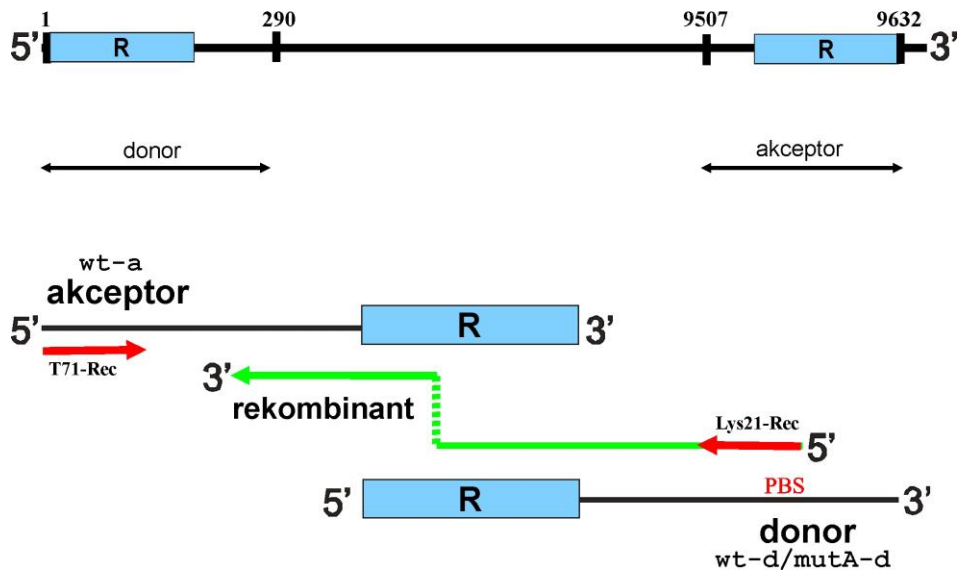


Rysunek 4.18 Organizacja rejonu liderowego (5'-UTR) HIV-1 [Abbink i wsp., 2003]. a) Organizacja 5'-UTR. Sekwencje regulatorowe zaznaczone są w postaci kolorowych prostokątów. b) Model struktury drugorzędowej rejonu 5'-UTR HIV-1. W rejonie liderowym może powstać sześć struktur spinkowych: TAR, poli(A), PBS, DIS, SD oraz Ψ . Sekwencje regulatorowe, obecne w poszczególnych spinkach, zaznaczone są kolorami, które odpowiadają oznaczeniom na Rys. 4.18a. c) 5'-UTR może tworzyć dwie alternatywne struktury: wydłużoną (LDI) oraz rozgałęzioną (BMH), sprzyjającą dimeryzacji genomowych cząsteczek HIV. d) sekwencja spinki poli(A), z wprowadzonymi mutacjami: substytucją U100→C oraz delecjami w pozycjach: 91 oraz 96 (mutant mutA), stabilizującymi strukturę spinkową, a tym samym konformację BMH.

W przeprowadzonych doświadczeniach jako matrycę donorową wykorzystano fragment genomu HIV-1, zawarty między nukleotydami 1 i 290 (matryca donorowa typu dzikiego, przyjmująca strukturę LDI – wt-d) oraz analogiczny odcinek, niosący mutacje mutA (U100→C, Δ 91, Δ 96), stabilizujące

strukturę spinki poli(A), (matryca donorowa mutA-d, przyjmująca stabilną strukturę BMH). Częsteczką akceptorową był fragment genomu HIV-1, obejmujący nukleotydy 9507/9632 (126-nt sekwencja obecna na końcu 3' HIV-1 RNA), matryca wt-a (Rys. 4.19). Matryce RNA zostały otrzymane metodą transkrypcji in vitro, w oparciu o plazmidy otrzymane dzięki uprzejmości B. Berkhout'a (Department of Human Retrovirology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Holandia). Obydwie matryce posiadały sekwencję homologiczną - rejon R, który obejmuje pozycję od 1 do 97 nt w genomowej cząsteczce HIV-1.

GENOMOWA CZĄSTECZKA RNA HIV-1



Rysunek 4.19 Schemat genomowej cząsteczki RNA HIV-1 oraz matryce RNA, wykorzystane do testowania naturalnej aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz HD-p66.

Aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT oraz HD-p66 badano w reakcji wydłużania startera na matrycy donorowej (wt-d lub mutA-d), w obecności matrycy akceptorowej (wt-a). Czas trwania reakcji wynosił: 30-, 45- oraz 60min. Jako kontrole, prowadzono reakcje wyłącznie na matrycy donorowej (wt-d lub mutA-d) lub akceptorowej (Materiały i Metody 3.2.15.3). W reakcji wykorzystano starter Lys21, komplementarny do rejonu PBS (182/202)

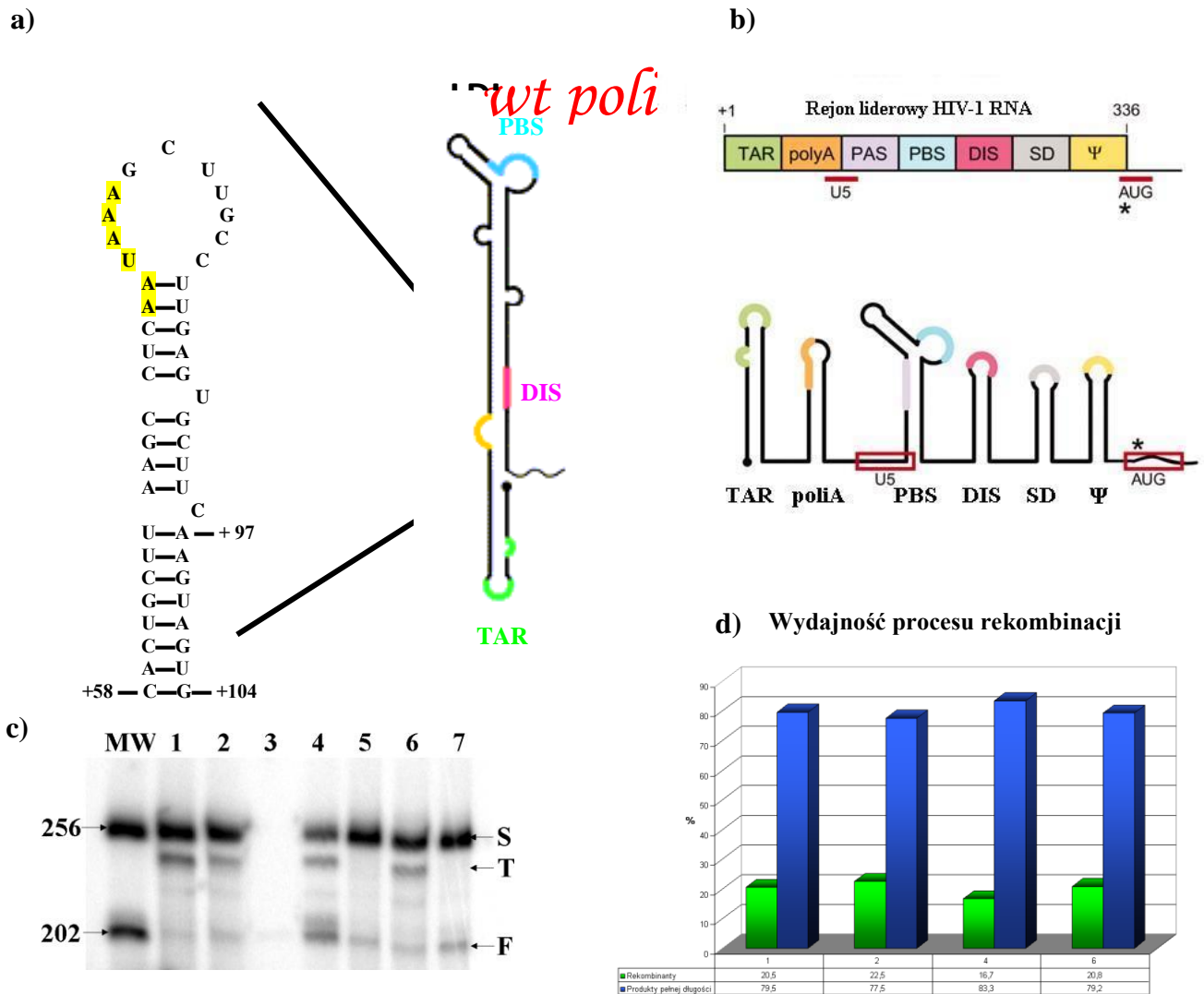
cząsteczki donorowej. Reakcja wydłużania startera była więc inicjowana w pozycji 182 (wt-d lub mutA-d), stąd długość produktu, powstającego w wyniku powielenia cząsteczki donora, wynosiła 202 nt (produkt pełnej długości). Produkty reakcji odwrotnej transkrypcji analizowano w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym, przykładowe wyniki zamieszczono na Rys. 4.20c - reakcje prowadzone w obecności matrycy donorowej wt-d, przyjmującej strukturę LDI oraz na Rys. 4.21c - reakcje prowadzone w obecności matrycy donorowej mutA-d, przyjmującej stabilną strukturę BMH. W celu oszacowania długości powstających produktów, otrzymano wyznakowane ^{32}P wzorcowe cząsteczki DNA: 202 pz (wzorzec odpowiadający produktom pełnej długości), 219 pz (wzorzec odpowiadający

potencjalnym rekombinantom) oraz 256
pz.

W reakcjach wydłużania startera, w których uczestniczyła zarówno matryca donorowa (wt-d, tworząca strukturę LDI i mutA-d, tworząca stabilną strukturę BMH) jak i akceptorowa, obok produktów pełnej długości (prążki oznaczone literą F), otrzymano dłuższe cząsteczki, oznaczone literą T. Były one nieobecne w reakcjach kontrolnych, przeprowadzanych na samej matrycy donorowej bądź akceptorowej. Podczas reakcji prowadzonej w obecności matrycy typu dzikiego, obserwowano pojawianie się dodatkowych produktów, opisanych literą S (Rys. 4.20c). W celu zidentyfikowania powstających produktów, fragmenty odpowiadające prążkom T (Rys. 4.20c oraz 4.21c) oraz S (Rys. 4.20c) zostały wyizolowane z żelu (Materiały i Metody 3.2.13), a następnie

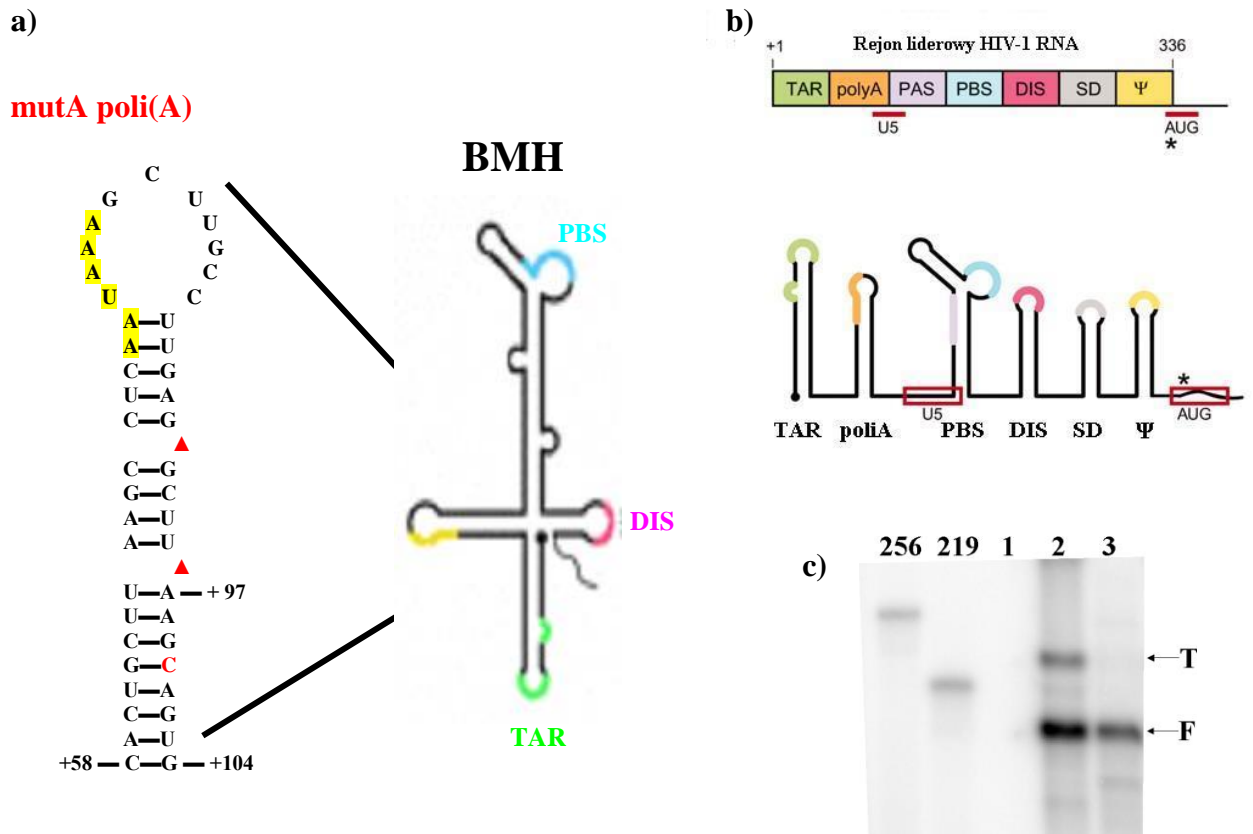
namnożone przy pomocy specyficznych starterów (Lys21-R_{ec} oraz T71-R_{ec}, Rys. 4.19) oraz samego startera Lys21-R_{ec}, (Materiały i Metody 3.2.5, Reakcja PCR nr 8). Produkty reakcji amplifikacji zostały wklonowane do wektora pUC19 i prasekwencjonowane. Okazało się, że produkty S, namnożone za pomocą jednego tylko startera Lys21-R_{ec}, komplementarnego do matrycy donorowej, tworzone były w rezultacie „samoprimowania” (ang. self-primed synthesis). Ich powstawanie było możliwe dzięki oddziaływaniom wewnątrzcząsteczkowym, zachodzącym w obrębie matrycy donorowej. Powodują one, że cząsteczką służy zarówno jako matryca jak i jako starter (prążki oznaczone na Rys. 4.20c literą S). Wydajność tworzenia produktów S była porównywalna dla reakcji wydłużania startera prowadzonych przez: 30, 45 oraz

60min. Produkty T, namnożone za pomocą starterów Lys21-R_{ec} oraz T71-R_{ec}, okazały się rekombinantami (prążki oznaczone na Rys. 4.20c oraz Rys. 4.21c literą T). Ich koniec 5' zsyntetyzowany został na matrycy wt-d/mutA-d, a koniec 3' na matrycy wt-a. Do rekombinacji dochodziło w obrębie homologicznych rejonów R, stąd nie można było precyzyjnie określić miejsca przeskoğu.



Rysunek 4.20 Badania aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz HD-p66 wobec sekwencji liderowej HIV-1, tworzącej strukturę LDI. a) Drugorzędowa struktura rejonu liderowego HIV-1 (konformacja LDI) wraz z sekwencją spinki poli(A), typu dzikiego. b) Organizacja oraz motywy strukturalne obecne w rejonie liderowym HIV-1. c) Analiza produktów reakcji wydłużania startera w 8% żelu poliakryloamidowym. Matryce użyte w reakcji: wt-d (donor przyjmujący strukturę LDI) oraz wt-a (akceptor). Reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzono w mieszaninie reakcyjnej, gdzie obecne były: starter Lys21, donor, akceptor oraz HIV-1 RT, czas inkubacji: 30min. (linia nr 1) i 45min. (linia nr 2); starter Lys21, akceptor, HIV-1 RT, czas inkubacji: 60min (linia nr 3); starter Lys21, donor, akceptor oraz HIV-1 RT, czas inkubacji: 60min (linia nr 4); starter Lys21, donor oraz HIV-1 RT, czas inkubacji: 60min (linia nr 5); starter Lys21, donor, akceptor oraz HD-p66, czas inkubacji: 60min (linia nr 6); starter Lys21, donor oraz HD-

p66, czas inkubacji: 60min (linia nr 7). Literą F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej, literą T – produkty rekombinacji, natomiast literą S – produkty „samoprimowania” (szczegóły w tekście). Długość wzorców (MW), odpowiada przypisanym im wartościom liczbowym. d) Wydajność procesu rekombinacji. Produkty pełnej długości (suma sygnałów pochodzących od prążków F i S na Rys. 4.20c) oznaczono kolorem granatowym, natomiast rekombinanty (prążki T) – kolorem zielonym. 1, 2, 4 – reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzone przez HIV-1 RT w obecności matryc wt-d oraz wt-a, odpowiednio: 30, 45 oraz 60min.; 6 - reakcja odwrotnej transkrypcji prowadzona przez HD-p66, w obecności matryc wt-d oraz wt-a, przez 60min.



Rysunek 4.21 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT wobec sekwencji liderowej HIV-1, tworzącej stabilną strukturę BMH. a) Drugorzędowa struktura rejonu liderowego HIV-1 (konformacja BMH) wraz z sekwencją spinki poli(A), do której wprowadzono trzy mutacje stabilizujące strukturę BMH: 2 delecje: pozycja 91 i 96 oraz substytucję U→C w pozycji 100 [Berkhout i wsp., 2000]. b) Organizacja oraz motywy strukturalne obecne w rejonie liderowym HIV-1. c) Analiza produktów reakcji wydłużania startera w 8% żelu poliakryloamidowym. Matryce użyte w reakcji: mutA-d (donor przyjmujący stabilną strukturę BMH) oraz wt-a (akceptor). Reakcje z HIV-1 RT prowadzono w mieszaninie reakcyjnej, gdzie obecne były: starter Lys21 i akceptor (linia nr 1); starter Lys21, donor i akceptor (linia nr 2) oraz starter Lys21 i donor (linia nr 3). Porównywalne wyniki otrzymano w reakcjach z użyciem HD-p66 (nie przedstawiono na rysunku). Literą F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej, natomiast literą T – produkty rekombinacji. Długość wzorców (MW), odpowiada przypisanym im wartościom liczbowym.

4.4.1.2 Badania aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66 wobec homologicznych rejonów R (HIV-R)

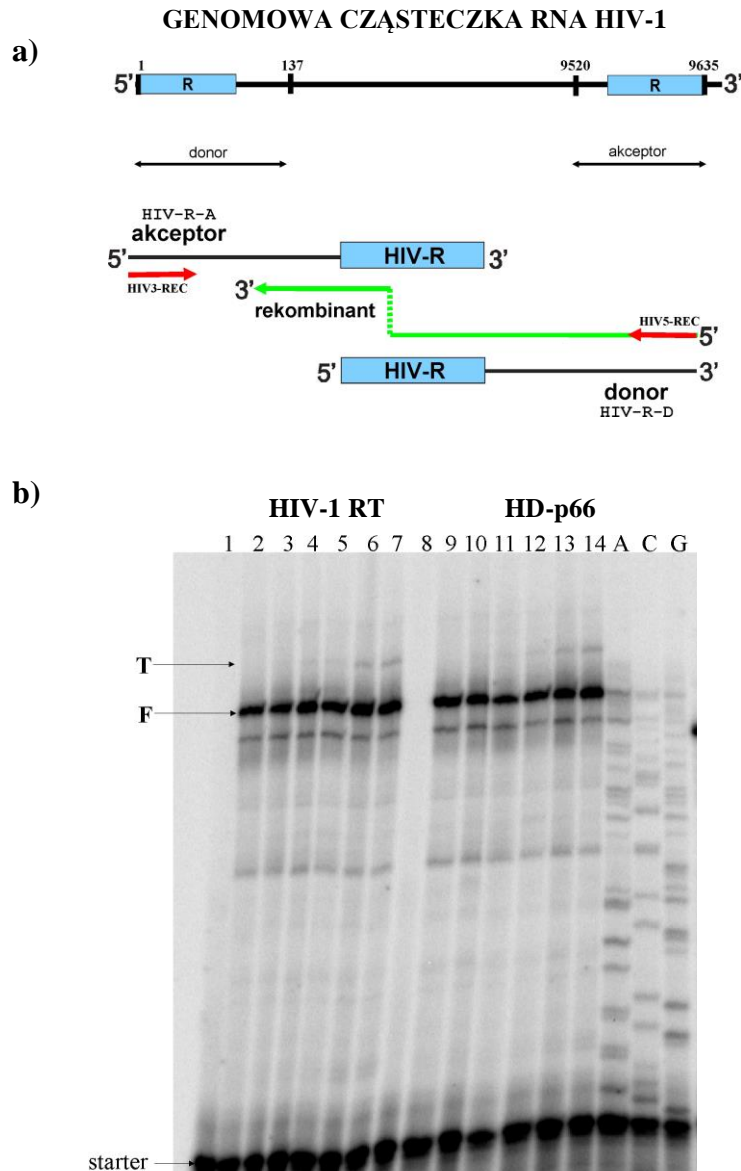
Kolejnym etapem prowadzonych badań była próba odpowiedzi na pytanie, czy same rejony homologiczne – sekwencje R HIV-1, niezdolne do utworzenia dwóch konformerów: LDI oraz BMH, są w stanie indukować przesłoki rekombinacyjne HIV-1 RT oraz HD-p66. W doświadczeniu wykorzystano dwie matryce RNA: donorową (137 nt, HIV-R-D), obejmującą rejon 1/137 genomu HIV-1 oraz akceptorową (116 nt, HIV-R-A), obejmującą rejon 9520/9635 (Rys. 4.22). Obydwie matryce zsyntetyzowane zostały metodą transkrypcji in vitro, w oparciu o plazmidy, odpowiednio pHIVRSd i pHIVRSa, otrzymane wcześniej w Zespole Wirusologii Molekularnej, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Obydwie matryce posiadały rejon R, znajdujący się na końcu 5' i 3'

genomu HIV-1. Reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzone były zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.15.2, gdy w mieszaninie reakcyjnej obecna była sama matryca donorowa, sama matryca akceptorowa oraz matryca donorowa i akceptorowa w proporcjach: 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:5 (molewowy stosunek donora do akceptora). W każdej mieszaninie reakcyjnej obecny był starter HIV-D3, komplementarny do końca 3' matrycy donorowej HIV-R-D. Produkty reakcji wydłużania startera analizowano w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Przykładowy wynik analizy przedstawiono na Rys. 4.22.

W celu oszacowania długości powstających produktów, przeprowadzono reakcję sekwencjonowania matrycy donorowej (Materiały i Metody 3.2.11.2).

Podczas odwrotnej transkrypcji donora HIV-R-D, w obecności cząsteczki akceptorowej HIV-R-A, oprócz produktu pełnej długości, będącego wynikiem powielenia całej cząsteczki donorowej (prążki oznaczone na Rys. 4.22 literą F), otrzymano dłuższy produkt, oznaczony literą T (Rys. 4.22). Produkt ten był nieobecny w reakcjach kontrolnych, przeprowadzanych na samej matrycy donorowej oraz gdy mieszanina reakcyjna zawierała tylko starter HIV-D3 i akceptor. Ilość produktu T zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia akceptora. Aby stwierdzić, czy w mieszaninach reakcyjnych doszło do powstania rekombinantów, produkt odpowiadający prążkom T, został wyizolowany z żelu (Materiały i Metody 3.2.13), a następnie namnożony metodą PCR przy zastosowaniu specyficznych starterów (HIV3-REC oraz HIV5-REC, Rys. 4.22),

(Materiały i Metody 3.2.5, Reakcja PCR nr 8).



Rysunek 4.22 Analiza elektroforetyczna produktów reakcji wydłużania startera, z udziałem matryc zawierających sekwencje HIV-R. a) Schemat genomowej cząsteczki RNA HIV-1 oraz matryce RNA, wykorzystywane do testowania aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz HD-p66 wobec sekwencji homologicznych, obecnych na obydwu końcach genomu HIV-1 (sekwencje R). b) Proces rekombinacji badany był w reakcji wydłużania startera HIV-D3 (wyznaczonego ^{32}P), katalizowanej przez HIV-1 RT (linie 1-7) oraz HD-p66 (linie 8-14), gdy w mieszaninie reakcyjnej obecny był sam akceptor (linie 1 i 8), sam donor (linie 2 i 9) oraz donor i akceptor w molowych proporcjach (D:A): 1:0,25 (linie 3 i 10); 1:0,5 (linie 4 i 11); 1:1 (linie 5 i 12); 1:2 (linie 6 i 13) oraz 1:5 (linie 7 i 14). Literą F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej, literą T oznaczono rekombinanty. W celu otrzymania wzorca długości przeprowadzono reakcje sekwencjonowania matrycy donorowej (linie A, C, G). Produkty reakcji rozdzielono w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym.

Produkty reakcji amplifikacji zostały wklonowane do wektora pUC19 i przesekwencjonowane (20 klonów). Stwierdzono, że wszystkie kłony były identyczne. Ich koniec 5' zsyntetyzowany został na matrycy donorowej, a koniec 3' – na matrycy akceptorowej. Centralna część produktu T była komplementarna do sekwencji HIV-R. Do rekombinacji dochodziło w rejonie homologii pomiędzy donorem i akceptorem, stąd nie można było precyzyjnie ustalić miejsc przeskoków. W ten sposób jednoznacznie potwierdzono powstawanie rekombinantów w obecności matryc HIV-R-D oraz HIV-R-A.

4.4.1.3 Badania aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66 wobec sekwencji homologicznych pochodzących z innego wirusa

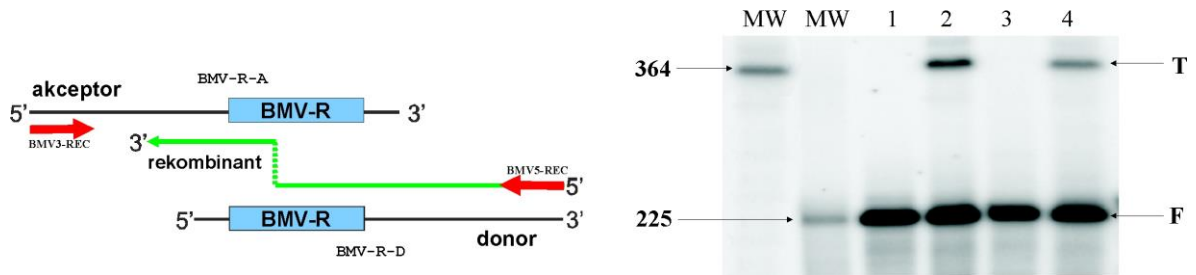
Wydajność procesu rekombinacji, z udziałem HIV-1 RT oraz HD-p66, w obecności sekwencji liderowej HIV-1 oraz samych rejonów R, nie różniła się w sposób znaczący (Rys. 4.24). Postanowiono zatem sprawdzić jak zmieni się aktywność rekombinacyjna HIV-1 RT oraz HD-p66, gdy rejon R zastąpi się sekwencją, która efektywnie wspiera rekombinację homologiczną u modelowego (+)RNA wirusa roślinnego – BMV. W doświadczeniu wykorzystano dwie matryce RNA: donorową (225 nt, BMV-R-D), obejmującą rejon 2640/2865 cząsteczki RNA2 BMV oraz akceptorową (216 nt, BMV-R-A), obejmującą rejon 1763/1961 cząsteczki RNA3 BMV, powiększony o 16 nukleotydów, dodanych w trakcie reakcji PCR.

Obydwe cząsteczki zostały zsyntetyzowane metodą transkrypcji *in vitro*, w oparciu o plazmidy, odpowiednio pBMVRd i pBMVRa, otrzymane wcześniej w Zespole Wirusologii Molekularnej, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (Rys. 4.23). Matryca donorowa posiadała 60-nt rejon homologiczny (BMV-R) pochodzący z cząsteczki RNA2 BMV (fragment 2647/2706), natomiast matryca akceptorowa – analogiczny region BMV-R, pochodzący z cząsteczki RNA3 BMV (fragment 1900/1960). Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono na matrycy donorowej, w obecności matrycy akceptorowej i startera BMV3-REC, komplementarnego do końca 3' donora. Stosunek molowy donora do akceptora wynosił 1:5 (Materiały i Metody 3.2.15.3). Wcześniejsze badania pozwoliły ustalić, iż taki stosunek molowy donora i akceptora zapewnia wysoką wydajność rekombinacji (Rys. 4.22).

Produkty reakcji analizowano w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Przykładowy wynik analizy przedstawiono na Rys. 4.23. W celu oszacowania długości powstających produktów, wykorzystano wzorcowe DNA (znakowane ^{32}P), otrzymane metodą PCR; 225 nt (odpowiadający produktom pełnej długości) oraz 364 nt (odpowiadający potencjalnym rekombinantom).

a)

b)



Rysunek 4.23 Analiza produktów reakcji wydłużania startera, z udziałem matryc zawierających homologiczne rejony *BMV-R*. a) Matryce RNA, wykorzystane do testowania aktywności rekombinacyjnej *HTV-1 RT* oraz *HD-p66* wobec sekwencji homologicznych *BMV-R*. b) Analiza elektroforetyczna produktów reakcji wydłużania startera, z udziałem *HTV-1 RT* (linie 1, 2) oraz *HD-p66* (linie 3, 4), gdy w mieszaninie reakcyjnej obecny był sam donor (linie: 1 i 3) oraz donor i akceptor w molowych proporcjach (D:A) 1:5 (linie 2 i 4). Literą F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej, literą T oznaczono rekombinanty. MW – wzorce długości: 225-nt oraz 364-nt. Produkty reakcji rozdzielono w 8% denaturującym żelu poliakrylamidowym.

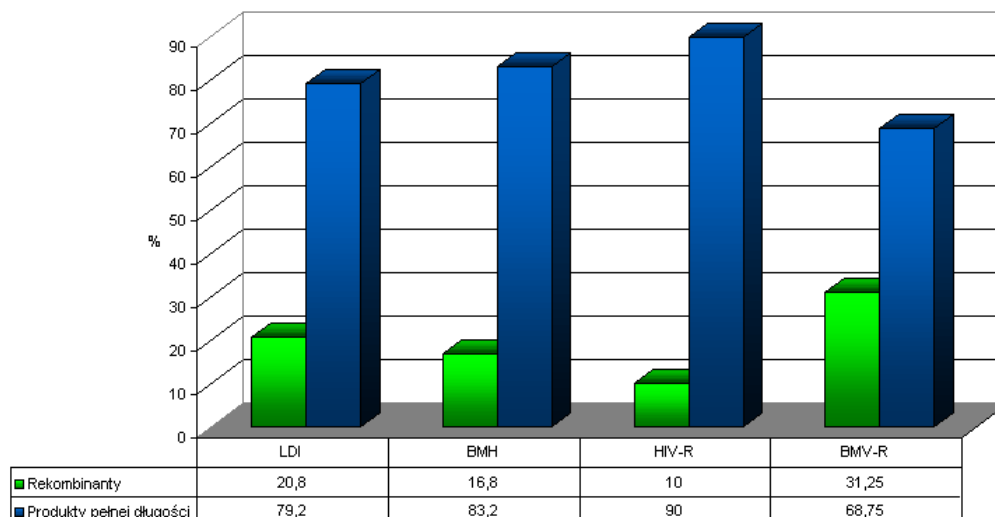
W reakcjach prowadzonych w obecności samej cząsteczki donorowej powstawał głównie jeden produkt (oznaczony literą F), będący wynikiem powielenia całej cząsteczki donorowej.

*Dłuższe produkty (prążek T) obserwowane były jedynie wówczas, gdy mieszanina reakcyjna zawierała zarówno cząsteczki donorowe jak i akceptorowe. W celu potwierdzenia obecności rekombinantów, produkty odpowiadające prążkom T zostały wyizolowane z żelu, a następnie namnożone przy pomocy specyficznych starterów (*BMV3-REC* oraz *BMV5-REC*) w reakcji PCR*

(Materiały i Metody 3.2.5, reakcja PCR nr 8). Produkty reakcji amplifikacji zostały wklonowane do wektora pUC19 i przeniezione. Analiza 20 klonów pokazała, że produkt T został zsyntetyzowany w oparciu o dwie matryce: BMV-R-D i BMV-R-A, tym samym potwierdziła jednoznacznie, że był on rekombinantem.

Porównanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66 wobec różnych sekwencji homologicznych

Aktywność rekombinacyjna HIV-1 RT oraz HD-p66 testowana była wobec trzech różnych par cząsteczek donorowych i akceptorowych, tj. (i) wobec 290-nt sekwencji liderowej genomu HIV-1, zdolnej do tworzenia struktur LDI lub BMH (donor) oraz 126-nt sekwencji z końca 3' genomu HIV-1 (akceptor); (ii) wobec samych sekwencji homologicznych HIV-R, występujących na obydwu końcach genomu HIV-1 oraz (iii) wobec sekwencji homologicznej BMV-R, efektywnie wspierającej przeskok rekombinacyjny u wirusa BMV. Proces rekombinacji badano w reakcji wydłużania startera. Następnie uzyskane produkty analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych. Wydajność badanego procesu wyznaczano za pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600), w następujący sposób: wartość impulsu, pochodzącego od produktu pełnej długości oraz dłuższych cząsteczek traktowano jako 100%. Następnie obliczano jaką część stanowi produkt pełnej długości, a jaką rekombinanty. W sytuacji, gdy obok produktu F powstawał produkt „samoprimowania” (S), sumowano je i rozważano łącznie jako produkt pełnej długości. Przedstawione na wykresie (Rys. 4.24) wyniki są wartościami średnimi,



wyznaczonymi w oparciu o trzy niezależne eksperymenty.

Rysunek 4.24 Wydajność procesu rekombinacji homologicznej, z udziałem HIV-1 RT. Wydajność syntezy produktów pełnej długości (suma sygnałów pochodzących od

produktów F i S lub tylko od produktu F – słupek granatowy) oraz rekombinantów (sygnał pochodzący do produktu T – słupek zielony) w reakcjach katalizowanych przez HIV-1 RT. LDI — reakcja odwrotnej transkrypcji prowadzona w obecności matrycy wt-d (tworzącej strukturę LDI) i wt-a; BMH – reakcja w obecności matrycy mutA-d (tworzącej stabilną strukturę BMH) i wt-a; HIV-R - reakcja w obecności matrycy HIV-R-D oraz HIV-R-A, zawierających rejon identycznych powtórzeń – R, pochodzący z HIV-1; BMV-R - reakcja w obecności matrycy BMV-R-D oraz BMV-R-A, zawierających rejon homologiczny BMV-R, obecny w genomie wirusa BMV. Podobne wydajności procesu rekombinacji uzyskano dla HD-p66.

Szczegółowa analiza wydajności procesu rekombinacji, nie potwierdziła wcześniejszych wyników, otrzymanych w laboratorium Berkhout'a [Berkhout i wsp., 2001]. Wykazano, że obecność mutacji stabilizujących konformację BMH sekwencji liderowej, nie wpływa w istotny sposób na efektywność tworzenia rekombinantów. Zarówno w obecności matrycy donorowej wt-d, występującej w konformacji LDI, jak i mutA-d, występującej w konformacji BMH, wydajność procesu rekombinacji była podobna (Rys. 4.24). Ponadto, skrócenie sekwencji liderowej w taki sposób, aby nie mogło dochodzić do utworzenia struktur LDI lub BMH i pozostawienie samego rejonu R, nie zahamowało rekombinacji, chociaż wpłynęło na obniżenie wydajności badanego procesu. Co ciekawe, rekombinacja homologiczna z udziałem HIV-1 RT zachodziła najwydajniej w obecności sekwencji homologicznej, pochodzącej z innego wirusa - BMV.

Podsumowanie. Zmiany konformacyjne, zachodzące wewnątrz rejonu liderowego HIV-1, odgrywają znaczącą rolę w regulacji cyklu życiowego wirusa [Berkhout i wsp., 2002]. Badania, prowadzone w laboratorium Berkhout'a, sugerowały, że struktura rejonu liderowego może wywierać istotny wpływ

na efektywność pierwszego przesłoku rekombinacyjnego, niezbędnego do wytworzenia prowirusowego dsDNA [Berkhout i wsp., 2001]. Zdaniem Berkhout'a mutacje stabilizujące spinkę poli(A) wymuszają przyjęcie konformacji BMH, przez co ułatwiają przyłączenie startera, a tym samym inicjację procesu odwrotnej transkrypcji. Dodatkowo, utworzenie struktury BMH przez rejon liderowy HIV-1 RT wspiera dimeryzację genomowych cząsteczek wirusa, umożliwiając zajście pierwszego przesłoku rekombinacyjnego HIV-1 RT [Berkhout i wsp., 2002]. Przedstawiona hipoteza stara się również tłumaczyć, w jaki sposób dochodzi do powstawania produktu S (Rys. 4.20) w obecności matrycy typu dzikiego oraz co powoduje jego brak w obecności matrycy posiadającej mutacje stabilizujące strukturę spinki poli(A). Zakłada ona, że oddziaływania wewnątrz

stabilnej struktury spinkowej są na tyle silne, że nie występują dodatkowe oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe, wspierające proces „samoprimowania”. Uzyskane przez nas wyniki nie są jednak zgodne z obserwacjami Berkhout’a. Okazuje się, że efektywność tworzenia rekombinantów, w obecności matryc typu dzikiego oraz matryc posiadających mutacje stabilizujące spinkę poli(A), jest porównywalna (Rys. 4.20 oraz Rys. 4.21). Być może udział specyficznych, drugorzędowych struktur RNA nie jest tak ważny dla zajścia badanego procesu jak pierwotnie zakładano? Odpowiedź na to pytanie przyniósł eksperyment, w którym testowano aktywność rekombinacyjną samego rejonu R, niezdolnego do tworzenia dwóch konformerów LDI oraz BMH Pokazał on, że proces rekombinacji genetycznej zachodzi z podobną wydajnością zarówno w obecności matryc

zawierających 97-nt rejony R , jak i matryc obejmujących cały rejon liderowy HIV-1. W kolejnym etapie badań starano się ustalić w jakim stopniu struktura pierwszo- lub drugorzędowa rejonu R , a w jakim sama tylko homologia, odpowiedzialne są za obserwowane przesłoki rekombinacyjne. W tym celu porównano aktywność rekombinacyjną rejonu R pochodzącego z genomu HIV oraz rejonu R , pochodzącego z genomowych RNA BMV. Okazało się, że 60-nt sekwencje homologiczne, pochodzące z wirusa BMV, zdecydowanie efektywniej wspierają przesłoki rekombinacyjne HIV-1 RT oraz HD-p66.

Podsumowując, można stwierdzić, że sekwencje rejonu liderowego HIV-1, warunkujące pierwszy przesłok rekombinacyjny HIV-1 RT *in vivo*, zachowują swoją aktywność rekombinacyjną również w warunkach *in*

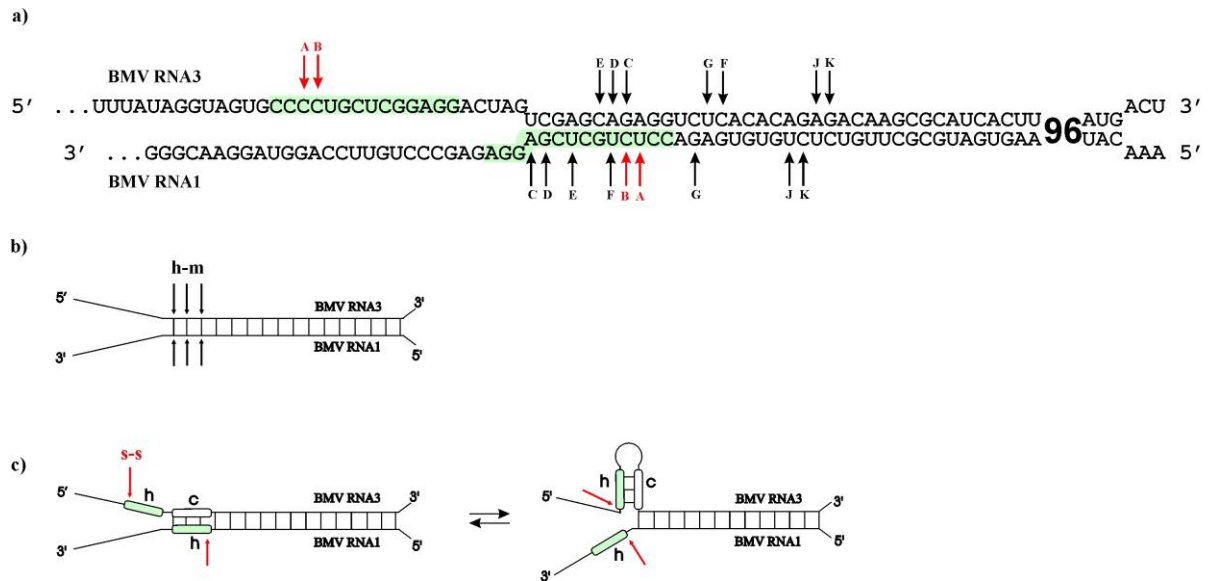
vitro. Pozwala to sądzić, że do zajścia procesu rekombinacji nie są wymagane dodatkowe cząsteczki pochodzenia wirusowego czy komórkowego. Ponadto, uzyskane wyniki sugerują, iż podczas rekombinacji homologicznej, drugorzędowa struktura cząsteczek biorących udział w reakcji odgrywa mniej istotną rolę niż pierwotnie zakładano [Berkhout i wsp., 2001]. Wydaje się, że kluczowym elementem jest homologia pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami, stąd rekombinację mogą wspierać również sekwencje pochodzące z innych wirusów. Można zatem przypuszczać, iż istnieją uniwersalne motywy strukturalne, indukujące rekombinację u wielu różnych wirusów.

4.4.2 Rekombinacja niehomologiczna

*Wcześniejsze badania, prowadzone w Zespole Wirusologii Molekularnej IChB PAN w Poznaniu, pozwoliły zidentyfikować dwa typy niehomologicznej rekombinacji RNA, tzw. rekombinację wspieraną przez dupleks (jej produkty nazwano rekombinantami h-m, ang. heteroduplex-mediated) oraz rekombinację miejscowo-specyficzną (produkty nazwano rekombinantami s-s, ang. site-specific) [Figlerowicz, 2000]. Oba rodzaje przesłoków rekombinacyjnych obserwowane były *in vivo* podczas infekcji wywołanej przez wirusa BMV, oba wymagały też lokalnej hybrydyzacji pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV (tworzenie lokalnego duplesu RNA/RNA, Rys. 4.25). Do rekombinacji miejscowo-specyficznej dochodziło, gdy duplesowi towarzyszyły krótkie sekwencje homologiczne, specyficznie usytuowane w cząsteczce donora i*

akceptora – na samym początku dupleksu w matrycy donorowej i tuż przed dupleksem w matrycy akceptorowej. W jej rezultacie zawsze generowane były tylko dwa prawie identyczne rekombinanty (Rys. 4.25b) [Figlerowicz, 2000].

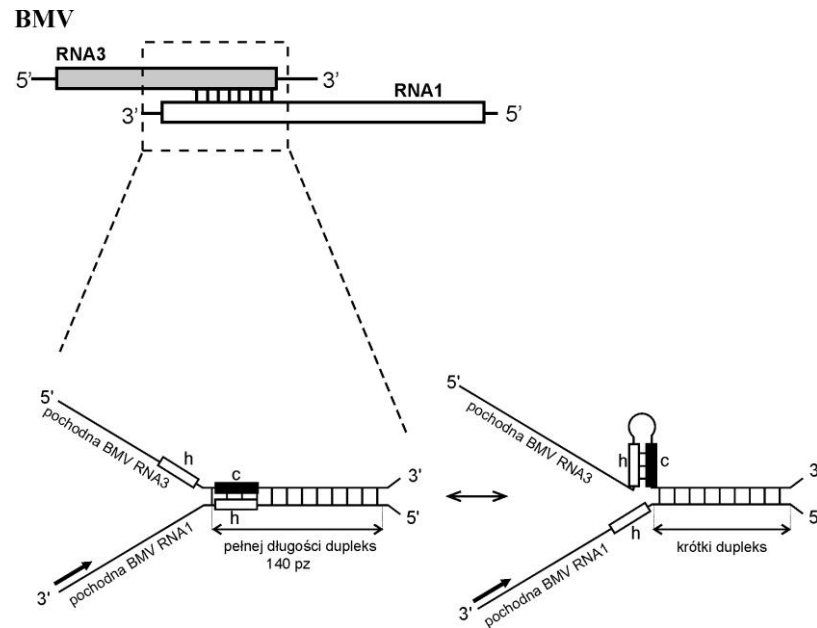
Rekombinacja wspierana przez dupleks wymagała jedynie stworzenia odpowiednio długiej struktury dwuniciowej i generowała wiele różnych rodzajów rekombinantów (Rys. 4.25c). W przypadku rekombinantów h-m, miejsca przeskoków ułożone były blisko siebie (zwykle oddalone o 2-3 nukleotydy) w obrębie pierwszych 20 pz tworzących dupleks [Figlerowicz, 2000].



Rysunek 4.25 Dwa typy rekombinacji niehomologicznej obserwowanej podczas infekcji BMV.

a) Przykład struktury dupleksowej, tworzonej przez genomowe cząsteczki RNA wirusa BMV: RNA1 oraz RNA3 (zielonymi prostokątami oznaczono rejony homologiczne), wspierającej obydwie typy rekombinacji niehomologicznej: rekombinację wspieraną przez dupleks oraz rekombinację miejscowo-specyficzną. Czarnymi strzałkami oznaczono miejsca przeskoków, obserwowane dla rekombinantów typu h-m (rekombinanty: C-G, J, K), natomiast czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca przeskoków rekombinantów typu s-s (rekombinanty: A i B). b) Rekombinacja niehomologiczna wspierana przez dupleks obserwowana była, gdy genomowe cząsteczki RNA1 oraz RNA3 wirusa BMV tworzyły odpowiednio długi dupleks (40-140 pz). c) Miejscowo-specyficzna rekombinacja niehomologiczna zachodziła, gdy dupleksowi towarzyszyły krótkie sekwencje homologiczne, specyficznym usytuowane w cząsteczce donora i akceptora.

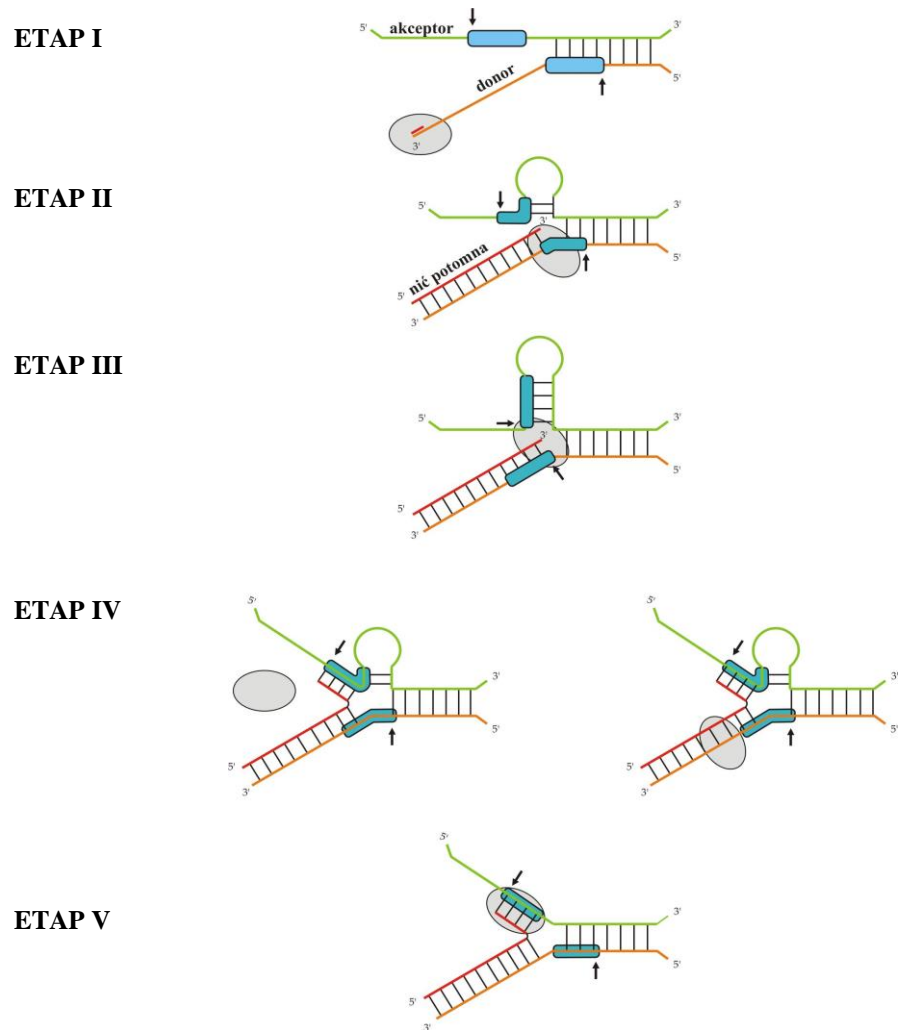
Aby stwierdzić czy poczynione obserwacje mają charakter uniwersalny, czy dotyczą wyłącznie BMV, badano aktywność rekombinacyjną HIV-1 RT wobec sekwencji, pochodzących z BMV. W tym celu stworzono system umożliwiający badanie rekombinacji *in vitro* (Rys. 4.26).



Rysunek 4.26 Konstrukcja układu do badania rekombinacji niehomologicznej HIV-1 RT *in vitro*. W oparciu o genomowe cząsteczkę RNA1 oraz RNA3 wirusa BMV, dla których obserwowano obydwa typy rekombinacji niehomologicznej, tj. rekombinację wspieraną przez dupleks oraz rekombinację miejscowo-specyficzną, stworzone zostały dwie cząsteczki: donorkowa (pochodząca z RNA1) oraz akceptorowa (pochodząca z RNA3). Matryce zostały skonstruowane tak, aby powstające rekombinanty były dłuższe od matrycy donorkowej i akceptorowej, co powinno ułatwić ich odróżnienie podczas analizy w żelu poliakrylamidowym. Testowane cząsteczki zawierały wszystkie elementy, potrzebne do zajęcia obydwu typów rekombinacji: tworzyły odpowiednio długą strukturę dwuniciową oraz posiadały rejony homologiczne (białe prostokąty), specyficznym usytuowane w cząsteczce donora i akceptora. Dzięki temu, dupleks utworzony przez rekombinujące cząsteczki mógł występować w dwóch różnych konformacjach: jako tzw. pełnej długości dupleks oraz jako krótszy dupleks, któremu towarzyszyła struktura spinki, ulokowana na cząsteczce akceptorowej.

Przeprowadzone *in vitro* badania pokazały, iż HIV-1 RT może generować rekombinanty typu s-s, lecz nie typu h-m. Zaproponowany mechanizm miejscowo-specyficznej rekombinacji

*niehomologicznej, przedstawiony został na
Rys. 4.27, [Figlerowicz i wsp., 2000 A].*



Rysunek 4.27 Model rekombinacji miejscowo-specyficznej [Figlerowicz i wsp., 2000]. Szary owal symbolizuje odwrotną transkryptazę, natomiast niebieskimi polami oznaczono rejony homologiczne obecne w sekwencjach donora i akceptora. Strzałki wskazują miejsca przeskoków rekombinacyjnych. ETAP I: RT rozpoczyna syntezę DNA na końcu 3' matrycy donorowej. ETAP II: Napotykając rejon dupleksu, RT rozplata kilka pierwszych par zasad, indukując tym samym utworzenie spinki na nici akceptora. ETAP III: Powstawanie spinki ułatwia przemieszczanie się enzymu w kierunku 5' donora. W momencie zakończenia procesu tworzenia spinki, dochodzi do terminacji reakcji odwrotnej transkrypcji. RT zatrzymuje się na końcu rejonu homologicznego. Wydłużające się ramię spinki powoduje przestrzenne zbliżenie miejsc przeskoku, które znajdują się na końcach 5' krótkich rejonów homologicznych. ETAP IV: Zatrzymanie RT prowadzi do jej oddysocjowania od matrycy lub cofnięcia w kierunku 3' donora. Umożliwia to rekonstrukcję dupleksu z równoczesnym rozpleceniem spinki. ETAP V: RT nie mogąc przyłączyć się do sekwencji homologicznej, obecnej w cząsteczce donora, hybrydyzuje z analogiczną sekwencją występującą w cząsteczce akceptorowej i wznawia syntezę nici potomnej.

Niestety, przeprowadzone badania nie pozwoliły ustalić dlaczego HIV-1 RT nie jest w stanie tworzyć rekombinantów typu h-m. Pewnym wytłumaczeniem tego faktu może być założenie, że czynnikiem indukującym rekombinację wspieraną przez dupleks, jest zjawisko potranskrypcyjnego wyciszenia genów (ang. posttranscriptional gene silencing, PTGS). W warunkach in vivo prowadzi ono do degradacji lokalnej struktury dwuniciowej [Ratcliff i wsp., 1997; Covey i wsp., 1997; Voinnet, 2001]. Niezdegradowane fragmenty cząsteczek RNA mogą służyć jako substraty do rekombinacji. Degradacja dupleksu sprawia, że nie może dojść do lokalnej hybrydyzacji pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami RNA. W takiej sytuacji rekombinanty mogą powstać na skutek przeniesienia kompleksu polimerazowego z końca 5' jednej cząsteczki (donora), na

końiec 3' drugiej cząsteczki (akceptora),
tzw. aktywność *end-to-end template switching* (aktywność EtoE). Niedawno,
Kim i Kao wykazali, iż polimeraza BMV
jest zdolna do wykonywania tego typu
przeskoków [Kim i wsp., 2001].

Chcąc lepiej poznać mechanizm
miejscowo-specyficznego rekombinacji
niehomologicznej RNA, postanowiono
ustalić, które ze zidentyfikowanych
wcześniej czynników: (i) obecność lokalnej
struktury dwuniciowej, (ii) krótkie
sekwencje homologiczne czy (iii) dynamizm
konformacyjny całego układu
rekombinacyjnego odgrywają kluczową
rolę w badanym procesie [Figlerowicz i
wsp., 2000 A]. Dodatkowo, podjęto próbę
wyjaśnienia, dlaczego HIV-1 RT nie jest
w stanie tworzyć rekombinantów typu h-
m.

4.4.2.1 Lokalna struktura dwuniciowa jako czynnik wymuszający zatrzymywanie HIV-1 RT na matrycy donorowej

Z przedstawionego na wstępie ogólnego schematu rekombinacji RNA (WSTĘP, Rys. 1.13), wynika, iż w pierwszym etapie badanego procesu, dochodzi do zatrzymania wirusowej polimerazy na matrycy donorowej.

Postanowiono zatem ustalić, w jaki sposób hybrydyzacja pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami RNA wpływa na częstość zatrzymywania się HIV-1 RT na matrycy donorowej, szczególnie w rejonie, w którym ulokowane były miejsca przeskoków rekombinacyjnych.

W doświadczeniu wykorzystano fragmenty cząsteczek genomowych RNA1 oraz RNA3 BMV (odpowiednio RNA1-D i RNA3-A). Potrzebny do ich syntezy dsDNA otrzymano w reakcji PCR, z wykorzystaniem plazmidów pRNA1-NH oraz pMar1-RNA3 [Figlerowicz i wsp., 2000 A] oraz specyficznych

starterów wprowadzających sekwencję promotora polimerazy RNA T7 (Materiały i Metody 3.2.4.2, Reakcja PCR nr 7). Otrzymane cDNA zostały wykorzystane jako matryce w reakcji transkrypcji in vitro (Materiały i Metody 3.2.12), w wyniku której otrzymano odpowiednio, 190-nt matrycę donorową – RNA1-D oraz 188-nt matrycę akceptorową – RNA3-A (Rys. 4.28). W celu określenia pozycji nukleotydowych, przy których dochodzi do zatrzymania HIV-1 RT lub HD-p66 na matrycy donorowej, przeprowadzono szereg reakcji wydłużania startera w obecności samej matrycy donorowej oraz w obecności zhybrydowanych matryc: donorowej i akceptorowej (Rys. 4.28), (Materiały i Metody 3.2.15.2). Ponadto, aby ustalić z dokładnością co do jednego nukleotydu miejsca stopowania kompleksu polimerazowego na donorze, został on

*poddany reakcji sekwencjonowania
(Materiały i Metody 3.2.11.2).*

*Jak wspomniano wcześniej, analizie
poddano tę część cząsteczki donorowej,
w której ulokowane były miejsca
przeskoków rekombinacyjnych (tj.
fragment pomiędzy 60 i 100 nt).*

*Niezależnie czy mieszanina reakcyjna
zawierała wyłącznie cząsteczki donorowe,
czy zarówno donorowe jak i akceptorowe,
obserwowano powstawanie trzech
głównych produktów przedwczesnej
terminacji. Ich długość została oceniona
na podstawie analizowanych równolegle
produktów reakcji sekwencjonowania
donora. Ustalono, że produkt STOP I
(Rys. 4.28) powstaje w wyniku
przedwczesnej terminacji kompleksu
polimerazowego po nukleotydzie C
(pozycja 90 w matrycy donorowej RNA1-
D, nukleotyd ten nie jest zaangażowany
w tworzenie dupletu). Kolejne miejsca*

zatrzymywania się HIV-1 RT oraz HD-p66 na matrycy donorowej (odpowiadające prążkom STOP II i III, Rys. 4.28) odnotowano po nukleotydach: U (STOP II - po U78 oraz STOP III - po U73; obydwie nukleotydy są zaangażowane w tworzenie dupletu). Intensywność sygnału, odpowiadającego produktowi STOP I, zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia akceptora. Natomiast intensywność sygnałów, odpowiadających drugiemu i trzeciemu produktowi zatrzymania enzymu na matrycy donorowej – STOP II i III, wzrasta wraz ze wzrostem stężenia akceptora (Rys. 4.28).

4.4.2.2 Badanie wpływu krótkich rejonów homologicznych na zdolność HIV-1 RT oraz homodimeru p66 do wykonywania niehomologicznych przeskoków rekombinacyjnych

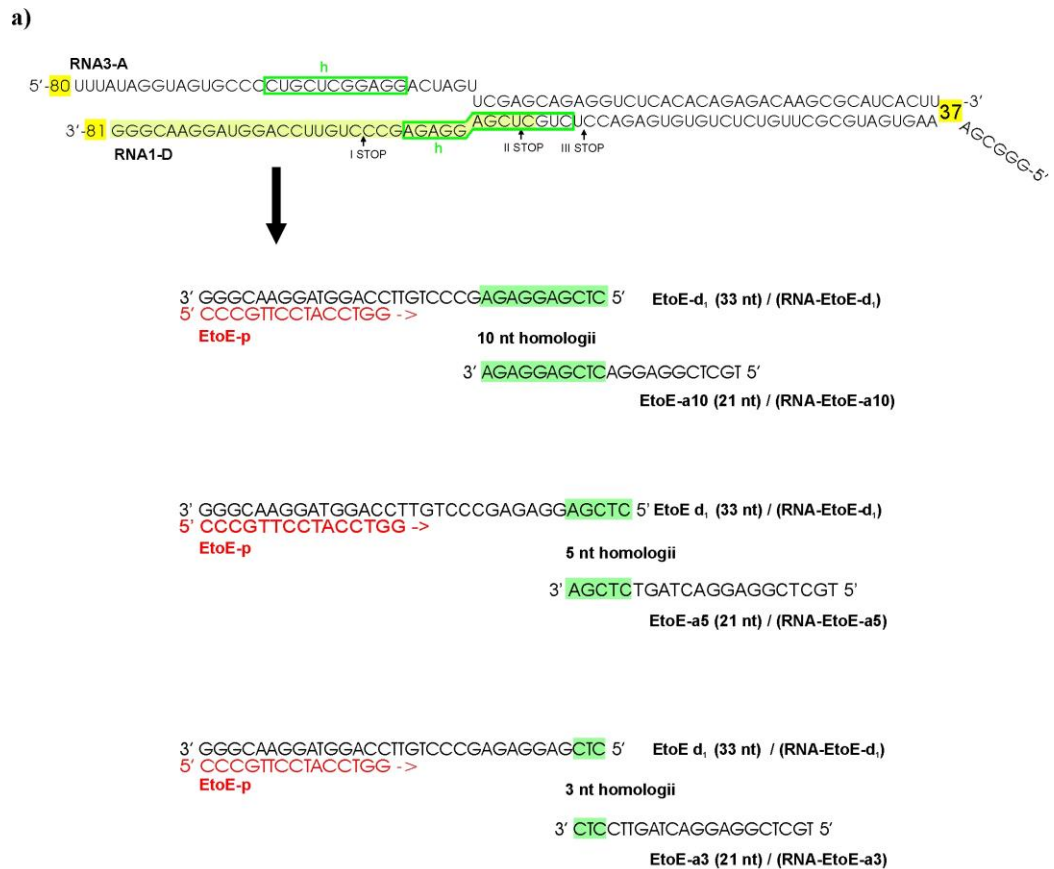
Aby ustalić czy obecność krótkich sekwencji homologicznych jest w stanie samodzielnie indukować proces rekombinacji niehomologicznej, zaprojektowano układ złożony z jednej cząsteczki donorowej oraz trzech cząsteczek akceptorowych. Matryca donorowa (RNA-EtoEd₁) była fragmentem cząsteczki RNA1-D (77/109), natomiast matryce akceptorowe zostały zaprojektowane w taki sposób, aby na końcu 3' miały: 10, 5 lub 3 nukleotydy homologiczne do końca 5' matrycy donorowej (odpowiednio RNA-EtoE-a10, RNA-EtoE-a5, RNA-EtoE-a3), (Rys. 4.29). W celu łatwego i szybkiego zidentyfikowania produktów rekombinacji, układ został skonstruowany tak, by powstające rekombinanty były dłuższe od produktu kopiowania matrycy

donorowej. Badania przeprowadzone zostały na matrycach RNA i ich odpowiednikach - ssDNA (nazwy matryc DNA powstały w oparciu o nazwy matryc RNA, odpowiednio: EtoE-a10, EtoE-a5, EtoE-a3, Rys. 4.29a). Matryce ssDNA zostały otrzymane na drodze syntezy chemicznej, natomiast matryce RNA – w wyniku transkrypcji *in vitro* (Materiały i Metody 3.2.12). Do reakcji transkrypcji *in vitro* użyto syntetycznych cząsteczek ssDNA, posiadających sekwencje promotora polimerazy RNA T7: EtoEd1-M, EtoE-a10-M, EtoE-a5-M lub EtoE-a3-M, które zostały zhybrydyzowane z krótszą, komplementarna do promotora, cząsteczką ssDNA EtoE-T7-RNA, dokładny opis otrzymywania matryc zamieszczono w rozdziale Materiały i Metody 3.2.4.26.

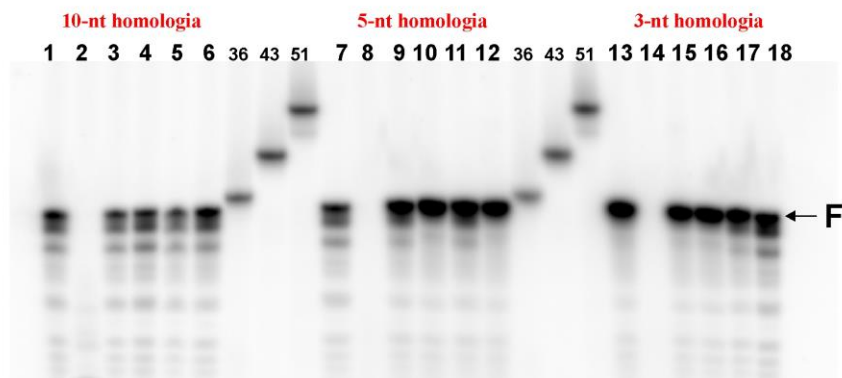
Badania zdolności HIV-1 RT oraz HD-p66 do wykonywania przeskoków

rekombinacyjnych pomiędzy jednoniciowymi matrycami DNA lub RNA, posiadającymi sekwencje homologiczne o różnej długości, testowano w reakcji wydłużania startera. Reakcje prowadzone były zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.15.3. W mieszaninie reakcyjnej obecna była sama matryca donorowa, sama matryca akceptorowa oraz matryca donorowa i akceptorowa w proporcjach: 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:5 (molekowy stosunek donora do akceptora). W każdym z doświadczeń użyto pary matryc ssDNA lub RNA oraz startera EtoEp, komplementarnego do końca 3' cząsteczki donorowej. Produkty reakcji analizowano w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym (Materiały i Metody 3.2.17). Wynik obydwu typów reakcji, tj. prowadzonych z udziałem cząsteczek ssDNA jak i RNA był identyczny.

Przykładowy rezultat analizy produktów reakcji metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym przedstawiono na



b)



Rys. 4.29.

Rysunek 4.29 Analiza aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT, w obecności matryc ssDNA (donorowej oraz akceptorowej), posiadających rejony homologiczne o różnej długości. a) Trzy zestawy matryc (ssDNA), użytych w eksperymencie. W każdej reakcji stosowano tę samą cząsteczkę donorową EtoEd₁. Odpowiadała ona fragmentowi matrycy

RNA1-D (77/109), który został zaznaczony jasnozielonym kolorem. Częsteczkę akceptorową zostały zaprojektowane w taki sposób, by posiadały: 10-, 5- oraz 3-nt sekwencje homologiczne do donora. Na rysunku przedstawiono sekwencje poszczególnych matryc ssDNA. Doświadczenie zostało przeprowadzone również na analogicznych matrycach RNA (ich nazwy umieszczono w nawiasach, obok nazw matryc ssDNA). Litera d w nazwie cząsteczek oznacza donora, litera a – akceptor, natomiast litera p – starter. b) Przykładowa analiza produktów reakcji wydłużania startera przez HIV-1 RT, na matrycach ssDNA, w 12% żelu poliakrylamidowym. Matryce użyte w reakcji posiadały: 10-nt sekwencje homologiczne (linie 1-6), 5-nt sekwencje homologiczne (linie 7-12) oraz 3-nt sekwencje homologiczne (linie 13-18), dokładny opis matryc zamieszczono na Rys. 4.29a. Reakcje syntezy DNA prowadzono w obecności HIV-1 RT, startera EtoEp oraz: donora (linie 1, 7, 13); akceptora (linie: 2, 8, 14); donora i akceptora w molowych proporcjach (D:A): 1:0,5 (linie 3, 9, 15); 1:1 (linie 4, 10, 16); 1:2 (linie 5, 11, 17) oraz 1:5 (linie 6, 12, 18). Litera F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej. Wzorce długości zostały otrzymane poprzez wyznaczenie ^{32}P na końcu 5' syntetycznych ssDNA o długościach: 36, 44 oraz 51 nt. Oczekiwana długość produktów rekombinacji, w przypadku matryc zawierających 10-nt rejon homologiczny, wynosiła: 44 nt, w przypadku matryc zawierających 5-nt rejon homologiczny: 49 nt, natomiast w przypadku matryc zawierających 3-nt rejon homologiczny: 51 nt.

Podczas analizy produktów reakcji syntezy DNA, prowadzonej w obecności matryc (ssDNA bądź RNA), które posiadały 10-, 5- oraz 3-nt sekwencje homologiczne, zaobserwowano prążki odpowiadające produktom pełnej długości (F), powstałym w rezultacie powielania całej cząsteczki donorowej. Ponadto, stwierdzono obecność licznych produktów przedwczesnej terminacji syntezy DNA przez HIV-1 RT lub HD-p66 (prążki położone poniżej prążką F, Rys. 4.296). Niestety, w żadnym z badanych układów nie odnotowano pojawienia się produktów rekombinacji.

4.4.2.3 Badanie wpływu degradacji lokalnej struktury dwuniciowej na zdolność HIV-1 RT oraz homodimeru p66 do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych

Wcześniejsze badania, prowadzone w Zespole Wirusologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, wykazały, że obecność

struktury dwuniciowej, o długości od 40 do 140 pz., efektywnie wspiera proces rekombinacji in vivo u BMV, nie jest jednak w stanie indukować przeskoków rekombinacyjnych HIV-1 RT in vitro [Figlerowicz, 2000]. Wyniki uzyskane w ostatnich latach wskazują, iż czynnikiem indukującym in vivo proces tzw. niehomologicznej rekombinacji, wspieranej przez dupleks, może być specyficzna degradacja dwuniciowych rejonów RNA [Alejska i wsp., 2004]. Dotychczasowe eksperymenty, prowadzone in vitro, pod nieobecność czynników komórkowych i wirusowych, nie pozwalały na zbadanie omawianego procesu.

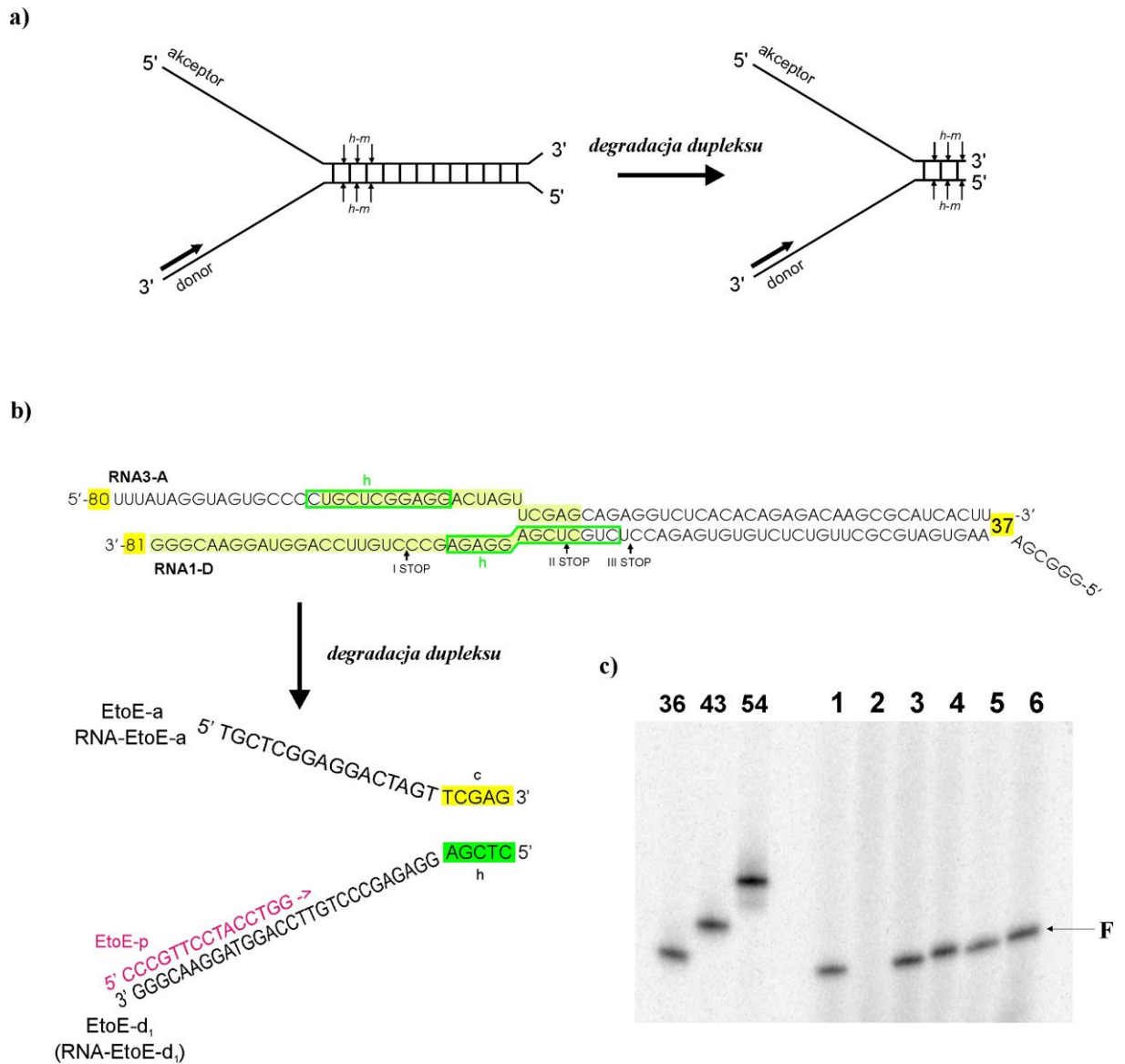
Aby odtworzyć warunki, jakie mogą zaistnieć in vivo na skutek działania mechanizmu PTGS, zaprojektowano modelowe matryce, które imitują produkty powstające w wyniku degradacji dupleksu (Rys. 4.30a i b). W układzie tym

rekombinanty mogłyby powstać poprzez przeniesienie kompleksu replikazowego HIV-1 RT z końca 5' matrycy donorowej na koniec 3' matrycy akceptorowej (ang. *end-to-end template switching*) [Kim i wsp., 2001]. W doświadczeniu ponownie wykorzystano matrycę donorową RNA-EtoEd₁ (RNA) i jej odpowiednik EtoEd₁ (ssDNA) oraz nową matrycę akceptorową RNA-EtoE-a (fragment 98/118 RNA3-A) i jej odpowiednik EtoE-a (ssDNA), (Rys. 4.30). Matryce zostały otrzymane według schematu przedstawionego w pkt.

4.2.3.2.2. W celu uzyskania cząsteczki RNA-EtoE-a, do reakcji transkrypcji *in vitro* użyto otrzymanej na drodze syntezy chemicznej cząsteczki EtoE-a-M, zhybrydizowanej z cząsteczką EtoE-T7-RNA (Materiały i Metody 3.2.4.26).

Badania zdolności HIV-1 RT oraz HD-p66 do przeskakiwania z końca 5' jednej matrycy na koniec 3' innej, testowano wobec cząsteczek imitujących produkty powstałe w wyniku degradacji dupleksu (Rys. 4.30). Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.15.3. W mieszaninie reakcyjnej obecna była sama matryca donorowa, sama matryca akceptorowa oraz matryca donorowa i akceptorowa w proporcjach: 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:5 (molewowy stosunek donora do akceptora). Doświadczenie przeprowadzone zostało pomiędzy dwiema matrycami ssDNA lub RNA z użyciem startera EtoEp, komplementarnego do końca 3' matrycy donorowej. Reakcje wydłużania startera analizowano w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Z uwagi na identyczny wynik rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji

prorowadzonych na zestawie matryc ssDNA i RNA, z udziałem HIV-1 RT bądź HD-p66, przykładowo zaprezentowano jedynie analizę aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT, w obecności matryc ssDNA (Rys. 4.30c). W badanym układzie nie można było jednoznacznie określić długości oczekiwanych rekombinantów. Układ został jednak zaprojektowany w taki sposób, aby powstające rekombinanty były dłuższe od produktu kopiowania matrycy donorowej, co ułatwiałoby ich identyfikację podczas analizy prowadzonej metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym.



Rysunek 4.30 Analiza aktywności EtoE HIV-1 RT w obecności matryc ssDNA imitujących produkty powstające w wyniku degradacji duplesu. a) **Rejon dwuniciowy, utworzony przez matryce wykorzystywane do badania rekombinacji niehomologicznej (po stronie lewej) został silnie skrócony (po stronie prawej), tak, że dalsza hybrydyzacja obydwu matryc nie była możliwa; oznaczenia: *h-m* – miejsca przeskoków rekombinacyjnych typu *h-m*.** b) Matryca donorowa odpowiadała zaznaczonemu jasnozielonym kolorem fragmentowi RNA1-D (77/109), akceptorowa natomiast – zaznaczonemu fragmentowi RNA3-A (98/119). Poniżej przedstawiono matryce ssDNA, które zostały wykorzystane w doświadczeniu. Litera *d* w nazwie cząsteczki oznacza donor, litera *a* - akceptor, natomiast *p* – starter. Doświadczenie zostało przeprowadzone także na analogicznych matrycach RNA (ich nazwy umieszczono w nawiasach, obok nazw matryc ssDNA). c) Analiza elektroforetyczna produktów reakcji wydłużania startera przez HIV-1 RT, w obecności matryc ssDNA EtoEd₁ oraz EtoEa.

Produkty rozdzielono w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Reakcje prowadzono w mieszaninie reakcyjnej, gdzie obecny był sam donor (linia nr 1), sam akceptor (linia nr 2) oraz donor i akceptor w molowych proporcjach (D:A): 1:0,5 (linia nr 3); 1:1 (linia nr 4); 1:2 (linia nr 5) oraz 1:5 (linia nr 6). Literą F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej. Liczbami oznaczono wzorce długości, które zostały otrzymane poprzez wyznaczenie ³²P cząsteczek ssDNA odpowiednio: 36-, 43- i 54-nt.

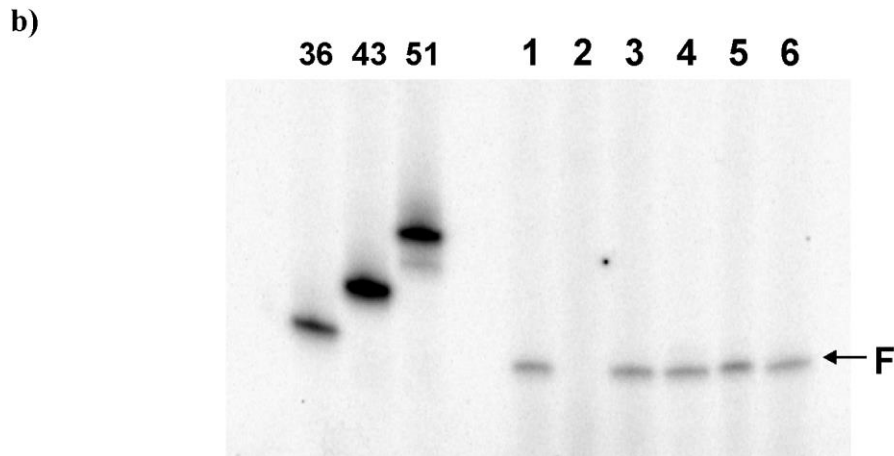
Analiza produktów reakcji ujawniła jedynie obecność cząsteczek powstałych w wyniku powielenia całej cząsteczki donorowej (produkt F, Rys. 4.30b). Niestety, w badanym układzie nie odnotowano pojawienia się rekombinantów.

Doświadczenie zostało powtórzone, tym razem jednak matrycę donorową EtoEd₁ zastąpiono jej pochodną, w której 5 nukleotydów z końca 5', zastąpiono sekwencją AAACG. Wcześniejsze badania prowadzone przez Kao i wsp. pozwoliły ustalić, że wydajność przenoszenia polimerazy BMV z końca 5' donora na koniec 3' akceptora zależy od struktury pierwszorzędowej rekombinujących cząsteczek [Kim i wsp., 2001]. Kao zaobserwował, iż obecność sekwencji AAACG na końcu 5' matrycy donorowej, najefektywniej wspiera aktywność EtoE polimerazy BMV. Niestety, HIV-1 RT w obecności tak przygotowanych matryc, również nie wykazywała aktywności rekombinacyjnej (wynik analizy nie został przedstawiony).

Ponieważ wszystkie dotychczasowe próby otrzymania rekombinantów poprzez przeniesienie HIV-1 RT z końca 5' donora na koniec 3' akceptora okazały się nieskuteczne, postanowiono wykorzystać identyczne matryce jak Kao. Zgodnie z uzyskanymi przez niego wynikami, rekombinacja zachodziła najwydajniej dla cząsteczki o sekwencji: 5'-CAUAGUCUCGCAAA-3' [Kao i wsp., 2001]. Kao badał aktywność rekombinacyjną polimeraz RNA, zależnych od RNA, które posiadają

zdolność syntezy nici potomnej *de novo*. HIV-1 RT jest polimerazą DNA i takiej aktywności nie posiada, dlatego koniec 3' matrycy donorowej został wydłużony o sekwencję komplementarną do startera EtoEp (Rys. 4.31a). Doświadczenie zostało przeprowadzone analogicznie do dwóch poprzednich. Matryce: donorową CopyKd oraz akceptorową CopyKa otrzymano na drodze syntezy chemicznej. Produkty reakcji analizowano w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Z uwagi na identyczny wynik uzyskany dla HIV-1 RT i HD-p66, zaprezentowano tylko analizę aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT (Rys. 4.31b). Oczekiwana długość produktów powstających w wyniku przeniesienia kompleksu polimerazowego z końca 5' cząsteczki CopyKd, na koniec 3' takiej samej cząsteczki wynosi: 58 nt, natomiast

*z końca 5' cząsteczki CopyKd, na koniec
3' cząsteczki CopyKa – 43 nt.*



Rysunek 4.31 Analiza zdolności HIV-1 RT do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych pomiędzy końcem 5' cząsteczki donorowej, a końcem 3' cząsteczki akceptorowej. a) Matryce, które zostały wykorzystane w badaniu zdolności HIV-1 RT do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych pomiędzy końcem 5' cząsteczki donorowej, a końcem 3' cząsteczki akceptorowej. Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencje oraz nukleotydy wspierające badany proces. Litera d w nazwie cząsteczki oznacza donor, litera a – akceptor, natomiast p – starter. b) Analiza produktów reakcji wydłużania startera na matrycach CopyKd oraz CopyKa w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Proces rekombinacji badany był w reakcji wydłużania startera, z udziałem HIV-1 RT, oraz matryc ssDNA posiadających pięcionukleotydowe sekwencje wspierające przenoszenie kompleksów polimerazowych z końca 5' matrycy donorowej na koniec 3' matrycy akceptorowej. Reakcje prowadzono w mieszaninie reakcyjnej, gdzie obecny był sam donor (linia nr 1), sam akceptor (linia nr 2) oraz donor i akceptor w molowych proporcjach (D:A): 1:0,5 (linia nr 3); 1:1 (linia nr 4); 1:2 (linia nr 5) oraz 1:5 (linia nr 6). Literą F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej. Liczbami oznaczono wzorce długości, które zostały otrzymane poprzez wyznakowanie ^{32}P cząsteczek ssDNA odpowiednio: 36-, 43- i 51-nt.

Analizując produkty reakcji prowadzonej przez HIV-1 RT lub HD-p66 w obecności matryc CopyKd oraz CopyKa, zaobserwowano jedynie tworzenie produktów pełnej długości (F), które były efektem powielenia całej cząsteczki donorowej. (Rys. 4.31). Również w tym układzie nie odnotowano pojawienia się produktów rekombinacji.

Podsumowanie. Zgodnie z założeniami hipotezy wybiórczego kopiowania, zatrzymywanie się kompleksu polimerazowego na matrycy donorowej jest ważnym etapem poprzedzającym przeskok rekombinacyjny [Figlerowicz i wsp., 2000 A]. Na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że miejsca zatrzymywania kompleksu polimerazowego są zakodowane w strukturze pierwszorzędowej cząsteczki

donorowej (obserwowano trzy produkty STOP, niezależnie od tego czy reakcja prowadzona była w obecności samej matrycy donorowej, czy matrycy donorowej zhybrydyzowanej z matrycą akceptorową). Hybrydyzacja matryc wpływa jednak w istotny sposób na wydajność przedwczesnej terminacji. Tworzenie dupleksu powodowało wzrost akumulacji produktów STOP II oraz STOP III (miejsca zatrzymania ulokowane w obrębie struktury dwuniciowej), kosztem produktu STOP I (miejsce zatrzymania niezaangażowane w tworzenie dupleksu). Najintensywniejszy sygnał pochodzący od produktu STOP I obserwowany był gdy w mieszaninie reakcyjnej obecna była tylko matryca donorowa RNA1-D. Akumulacja produktu STOP I zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia akceptora. Z doniesień literaturowych wiadomo również, że do przeszkód

rekombinacyjnych dochodzi szczególnie często w obrębie sekwencji bogatych w reszty adenozynowe bądź urydynowe, czyli w miejscach występowania nukleotydów tworzących słabsze wiązania typu Watsona-Crick'a [Figlerowicz i wsp., 2000 A]. Spośród trzech zidentyfikowanych miejsc terminacji, dwa miały miejsce po nukleotydach U (STOP II i III). Jeżeli jednak w mieszaninie reakcyjnej obecny był sam donor, wówczas wydajność, z jaką tworzyły się produkty STOP II i STOP III była stosunkowo niska. Dopiero przy stopniowym wzroście stężenia akceptora, ilość obydwu produktów wzrastała, osiągając wartość maksymalną w przypadku, gdy proporcja molowa donora i akceptora wynosiła 1:5. Produkt STOP II i STOP III zlokalizowany był w obrębie heterodupleksu utworzonego przez matrycę donorową oraz

akceptorową. Zgodnie z zaproponowaną hipotezą, polimeraza wchodząc w obszar hetetrodupleksu rozplata kilka pierwszych par zasad, a następnie zatrzymuje się na matrycy donorowej. Aby doszło do przeskoaku rekombinacyjnego, kompleks polimerazowy musi zostać uwolniony z nici donorowej [Figlerowicz i wsp., 2000 A]. W przypadku odwrotnych transkryptaz proces ten ułatwia aktywność nukleazowa, powodująca usuwanie RNA w nowopowstającym hybrydzie DNA/RNA. RNaza H trawi jednak wiązania fosfodiesterowe położone 18 nukleotydów poniżej miejsca aktywnego polimerazy. Zatem tuż przed przeskoakiem rekombinacyjnym, kompleks polimerazowy jest najprawdopodobniej zhybrydyzowany z nicią potomną i niezdegradowanym fragmentem matrycy donorowej. Obecność słabszej pary zasad (A-T bądź U-A) na końcu hybrydu

RNA/DNA przypuszczalnie ułatwia odłączenie się nici potomnej od matrycy donorowej i przeniesienie kompleksu polimerazowego wraz z nicią potomną (razem bądź osobno) na cząsteczkę akceptorową. Zlokalizowanie miejsc zatrzymywania kompleksu polimerazowego w obrębie heteroduplexu po resztach urydynowych przemawia na korzyść zaproponowanej hipotezy [Figlerowicz i wsp., 2000 A].

Przeprowadzone badania, wykazały również, że żaden z analizowanych czynników, tj.: obecność krótkich sekwencji homologicznych, komplementarność pomiędzy donorem i akceptorem [Figlerowicz i wsp., 2000 A] czy degradacja duplexu, nie jest w stanie samodzielnie indukować przesłoków rekombinacyjnych HIV-1 RT oraz HD-p66. Dopiero jednoczesne występowanie wszystkich elementów umożliwiało zajście

procesu rekombinacji niehomologicznej [Figlerowicz i wsp., 2000 A].

Najprawdopodobniej kluczowym czynnikiem indukującym przesłoki typu s-s jest dynamizm konformacyjny rekombinujących cząsteczek. W układzie tym, aktywność rekombinacyjną wykazywały zarówno polimeraza BMV jak i HIV-1 RT [Figlerowicz i wsp., 2000 A], tak więc można przypuszczać, iż miejscowo-specyficzna niehomologiczna rekombinacja RNA jest zjawiskiem powszechnie wykorzystywanym przez wirusy RNA oraz retrowirusy do tworzenia polimorficznych populacji.

Dodatkowo stwierdzono, że w przeciwieństwie do niektórych wirusowych polimeraz RNA, zależnych od RNA, HIV-1 RT nie wykazuje zdolności do wykonywania przesłoków z końca 5' matrycy donorowej na koniec 3' matrycy akceptorowej. Wydaje się, że brak tej

aktywności u HIV-1 RT powoduje, że enzym nie jest w stanie generować rekombinantów typu h-m.

Z przeprowadzonych badań wynika, że rekombinacja wspierana przez dupleks występuje wyłącznie u wirusów RNA [Figlerowicz 2000]. Być może obecność tego typu rekombinacji, pozwala wirusom RNA na odtwarzanie infekcyjnych cząsteczek, które wcześniej uległy degradacji na skutek działania mechanizmów obronnych gospodarza (np. wskutek działania PTGS).

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć jeszcze jeden wniosek. W genomach wirusów, których materiałem genetycznym jest RNA, występują dwa rodzaje motywów strukturalnych, indukujących proces rekombinacji: sekwencje uniwersalne oraz wirusowo-specyficzne. Przykładem motywów uniwersalnych mogą być

elementy wspierające homologiczne i miejscowo-specyficzne niehomologiczne przesłoki rekombinacyjne zarówno HIV-1 RT jak i polimerazy BMV. Przykładem motywów wirusowo-specyficznych może być struktura dupleksu, aktywna rekombinacyjnie tylko dla BMV, in vivo [Figlerowicz 2000, Figlerowicz i wsp., 2000 A].

4.4.3 Rekombinacja niehomologiczna wspierana przez cząsteczkę pomocniczą – HELPER

4.4.3.1 Konstrukcja układu do badania rekombinacji wspomaganej

Na podstawie przeprowadzonych badań można było sądzić, że czynnikiem indukującym miejscowo-specyficzne przesłoki, oprócz odpowiedniej lokalizacji rejonów homologicznych i komplementarnych, jest dynamizm konformacyjny rekombinujących cząsteczek. Aby potwierdzić słuszność przyjętej hipotezy, stworzono całkiem nowy system rekombinacyjny, który

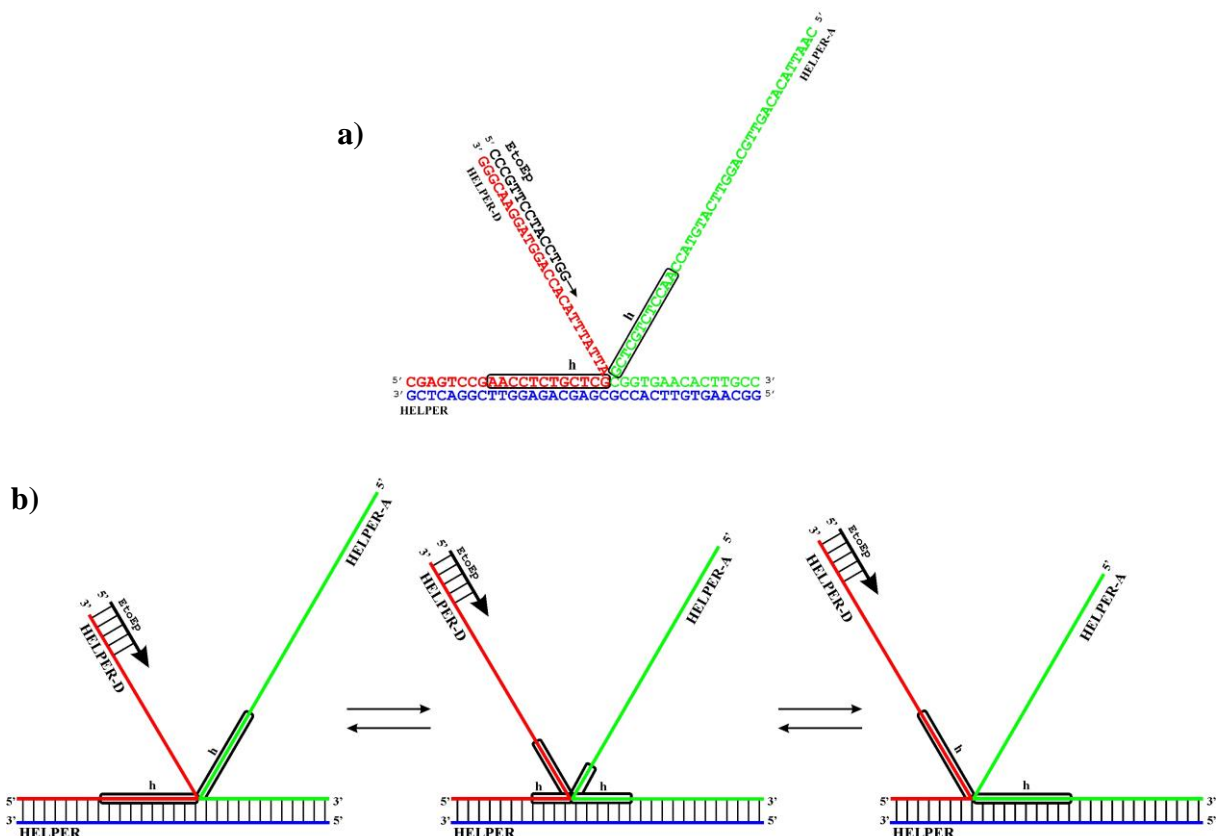
nazwano układem rekombinacji wspomaganej (układem helperowym). Miał on umożliwić precyzyjne przenoszenie HIV-1 RT pomiędzy cząsteczkami posiadającymi krótkie sekwencje homologiczne (ok. 10 nt). System został wyposażony w dodatkową cząsteczkę, nie uczestniczącą bezpośrednio w procesie syntezy DNA. Cząsteczką ta została nazwana DNA/RNA wspomagającym (HELPEREM), ponieważ zgodnie z założeniami powinna stanowić platformę katalizującą proces miejscowo-specyficznej niehomologicznej rekombinacji DNA/RNA. HELPER miał być odpowiedzialny za precyzyjne odnalezienie donora i akceptora. Dodatkowo powinien spełniać analogiczną funkcję jak dupleks, czyli zwiększać wydajność przedwczesnej terminacji na matrycy donorowej. Środkowa część sekwencji HELPERA była komplementarna do krótkich rejonów

homologicznych, obecnych w donorze i akceptorze, podczas gdy końce 3' i 5' specyficznym wiązały się odpowiednio z donorem i akceptorem (Rys. 4.32).

HELPER został zaprojektowany w taki sposób, by wymuszał przyjęcie właściwej struktury przez rekombinujące cząsteczki, a równocześnie zapewniał odpowiedni dynamizm konformacyjny całego układu.

Dlatego tworzenie dupleksu pomiędzy homologicznymi rejonami donora i akceptora oraz sekwencją komplementarną HELPERA mogło odbywać się na wiele różnych sposobów: cały fragment homologiczny, przyłączający się do cząsteczki wspomagającej, mógł pochodzić z donora bądź akceptora, możliwe jednak były sytuacje pośrednie – część zhybrydyzowanych z HELPEREM nukleotydów mogła pochodzić z sekwencji homologicznej donora, część, z akceptora

(Rys. 4.326). Potencjalne rekombinanty powinny zostać utworzone w wyniku przeniesienia kompleksu polimerazowego z cząsteczki donorowej na akceptorową, w obrębie rejonów homologicznych obydwu matryc. Podobnie jak to miało miejsce wcześniej, układ zaprojektowano w taki sposób, aby tworzące się rekombinanty były dłuższe od nici potomnych, powstałych w wyniku kopiowania matrycy donorowej i mogły być w łatwy sposób identyfikowane metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych.



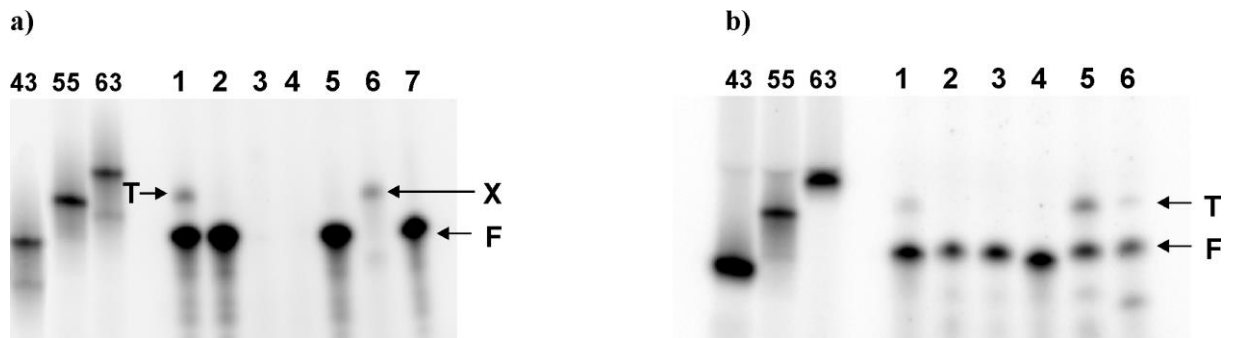
Rysunek 4.32 Schemat układu do badania miejscowo specyficznej, niehomologicznej rekombinacji DNA/RNA wspieranej przez cząsteczkę HELPERA. a) ssDNA użyte w badaniach miejscowo-specyficznej rekombinacji wspieranej przez cząsteczkę HELPERA. Zaprojektowany układ składa się z trzech cząsteczek: donora (HELPER-D, zaznaczony kolorem czerwonym), akceptora (HELPER-A, zaznaczony kolorem zielonym) i cząsteczki wspierającej rekombinację (HELPER, zaznaczony kolorem niebieskim). Cząsteczka HELPERA jest komplementarna do donora (jego końca 5'), akceptora (jego końca 3') oraz do krótkiego rejonu homologii pomiędzy donorem i akceptorem (sekwencje homologiczne zostały zaznaczone prostokątami i literą h). Testowanie aktywności rekombinacyjnych HIV-1 RT i HD-p66 przeprowadzono w reakcji wydłużania startera EtoEp (na Rys. b zaznaczony czarną strzałką), w układzie, gdzie wszystkie cząsteczki były ssDNA lub RNA, bądź w układach mieszanych. b) Przykładowe konformacje cząsteczek biorących udział w miejscowo-specyficznej, niehomologicznej rekombinacji, wspieranej przez cząsteczkę HELPERA. Przypuszczalnie sekwencje homologiczne, obecne w cząsteczce donorowej i akceptorowej współzawodniczą o wiązanie się z sekwencją komplementarną, obecną w cząsteczce HELPERA.

4.4.3.2 Badanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz homodimeru p66 w układzie rekombinacji wspomaganej

W celu zbadania zdolności HIV-1 RT oraz HD-p66 do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych w nowoutworzonym systemie, otrzymano zestawy matryc ssDNA: HELPER-D, HELPER-A, HELPER oraz analogiczne matryce RNA: RNA-HELPER-D, RNA-HELPER-A, RNA-HELPER. Podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach, matryce ssDNA zostały otrzymane na drodze syntezy chemicznej, natomiast matryce RNA – w wyniku transkrypcji in vitro (Materiały i Metody 3.2.12). Do reakcji transkrypcji in vitro użyto cząsteczek ssDNA (otrzymanych na drodze syntezy chemicznej), posiadających sekwencje promotora polimerazy RNA T7: HEL-D-M, HEL-A-M oraz HEL-M, które zostały zhybrydyzowane z

cząsteczką ssDNA EtoE-T7-RNA
(Materiały i Metody 3.2.4.2b).
Zdolność HIV-1 RT oraz HD-p66 do
wykonywania przeskoków
rekombinacyjnych badano
przeprowadzając reakcje wydłużania
startera zgodnie z procedurą opisaną w
rozdziale Materiały i Metody 3.2.15.4. W
mieszaniu reakcyjnej, oprócz enzymu
oraz startera EtoEp, komplementarnego
do końca 3' matrycy donorowej, obecny był
donor, akceptor i HELPER. Dodatkowo
przeprowadzono reakcje kontrolne,
w których obok enzymu i startera obecna
była sama cząsteczka donorowa, sama
cząsteczka akceptorowa, sam HELPER
oraz: donor z HELPEREM, akceptor
z HELPEREM, donor z akceptorem.
Pierwsza seria doświadczeń
przeprowadzona została na cząsteczkach
ssDNA. Uzyskane mieszaniny reakcyjne
analizowano w 12% denaturującym żelu

poliakryloamidowym (Materiały i Metody 3.2.17). Wybrane rezultaty przedstawiono na Rys. 4.33a. Długość oczekiwanych rekombinantów wynosi: 65 nt.



Rysunek 4.33 Analiza aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT w układzie do badania miejscowo-specyficznej niehomologicznej rekombinacji, wspieranej przez cząsteczkę HELPERA. a) Analiza elektroforetyczna produktów reakcji wydłużania startera z udziałem HIV-1 RT oraz matryc ssDNA. Reakcje prowadzono w mieszaninie reakcyjnej, gdzie obecne były: donor, akceptor, HELPER oraz starter EtoEp (linia nr 1), donor oraz starter EtoEp (linia nr 2), akceptor oraz starter EtoEp (linia nr 3); HELPER oraz starter EtoEp (linia nr 4); donor, HELPER oraz starter EtoEp (linia nr 5), akceptor, HELPER oraz starter EtoEp (linia nr 6) i donor, akceptor oraz starter EtoEp. b) Analiza elektroforetyczna produktów reakcji wydłużania startera z udziałem HIV-1 RT oraz matryc ssDNA/RNA. Reakcje prowadzono w mieszaninie reakcyjnej, gdzie obecne były: donor, akceptor, HELPER (matryce ssDNA) oraz starter EtoEp (linia nr 1), donor, akceptor, HELPER (matryce RNA) oraz starter EtoEp (linia nr 2), donor, HELPER (matryce RNA) oraz starter EtoEp (linia nr 3); donor (ssDNA), akceptor (RNA), HELPER (RNA) oraz starter EtoEp (linia nr 4); donor (RNA), akceptor (ssDNA), HELPER (RNA) oraz starter EtoEp (linia nr 5); donor (RNA), akceptor (RNA), HELPER (ssDNA) oraz starter EtoEp (linia nr 6). Literą F oznaczono produkt pełnej długości, powstający w wyniku powielenia całej matrycy donorowej, natomiast literą T – produkty rekombinacji. Liczbami oznaczono wzorce długości ssDNA. Wzorce długości zostały otrzymane poprzez wyznakowanie ^{32}P na końcu 5' syntetycznych ssDNA o długościach odpowiednio: 43, 55 oraz 63 nt. Produkty rozdzielono w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym.

*Analizując produkty powstałe w
reakcji prowadzonej z udziałem trzech*

cząsteczek *ssDNA* (donor, akceptor oraz *HELPER*), zauważono, że produkty pełnej długości (prążki oznaczone literą *F* na Rys. 4.33a), tworzą się zawsze, gdy w mieszaninie reakcyjnej obecna jest matryca donorowa, starter *EtoEp* oraz enzym: *HIV-1 RT* lub *HD-p66*. Zaobserwowano również obecność dodatkowych produktów, o długości podobnej, ale nie identycznej z przewidywaną dla rekombinantów (prążki oznaczone literą *T* oraz *X* na Rys. 4.33a). Produkt *T* powstawał, gdy w mieszaninie reakcyjnej, oprócz enzymu i startera *EtoEp*, obecne były wszystkie cząsteczki systemu helperowego (*ssDNA*): donor, akceptor, *HELPER* (Rys. 4.33a, linia nr 1). Do utworzenia produktu *T* nie dochodziło, gdy w reakcji, oprócz enzymu i startera, uczestniczyły: sam donor, sam akceptor, sam *HELPER* oraz donor i

HELPER, akceptor i *HELPER* lub donor i akceptor (Rys. 4.33a).

Produkt T został wyizolowany z żelu (Materiały i Metody 3.2.13), a następnie poddany amplifikacji metodą PCR, z wykorzystaniem starterów *Eco-hel* - komplementarny do końca 3' donora - oraz *Pst-hel* - homologiczny z końcem 5' akceptora - (Materiały i Metody 3.2.5, Reakcja PCR nr 8). Oczyszczone produkty reakcji PCR poddano cięciu restrykcyjnemu enzymami *EcoRI* oraz *Pst I* (Materiały i Metody 3.2.8) i wligowano do wektora pUC19 (Materiały i Metody 3.2.10).

Otrzymanymi konstrukcjami transformowano bakterie *E. coli* (Materiały i Metody 3.2.7.16). W celu ustalenia sekwencji powielonych fragmentów, wybrane plazmidy poddane zostały sekwencjonowaniu (Materiały i Metody 3.2.5). Wszystkie otrzymane kłony posiadały identyczną 65-nt sekwencję,

pochodzącą zarówno z matrycy donorowej jak i akceptorowej (Rys.4.34), co świadczyło, że wyizolowane ze ścieżki nr 1 (Rys. 4.33a) cząsteczki są rekombinantami.

Podczas analizy produktów reakcji syntezy DNA w niepełnym układzie helperowym (akceptor, HELPER oraz starter), zaobserwowano również pojawianie się produktu o długości zbliżonej do rekombinantów (produkt X, ścieżka nr 6, Rys. 4.33a). W analizowanej mieszaninie reakcyjnej nieobecny był donor, w związku z czym nie powstawał tzw. produkt pełnej długości (F). Produkt X został wyizolowany i poddany standardowej procedurze amplifikacji metodą PCR, w obecności starterów Eco-hel oraz Pst-hel. Wynik reakcji PCR był negatywny - izolowany produkt nie ulegał powielaniu. Przeprowadzone analizy nie pozwoliły ustalić pochodzenia produktu

obecnego w ścieżce nr 6 (Rys. 4.33a). Przyjęto hipotezę, że w mieszaninie reakcyjnej, gdzie brak jest cząsteczki donorowej, HELPER niespecyficycznie hybrydyzuje z akceptorem i służy jako starter dla HIV-1 RT czy HD-p66. W celu potwierdzenia powyższego założenia przygotowano dwie mieszaniny reakcyjne: w pierwszej obecny był akceptor, HELPER oraz starter, w drugiej natomiast – akceptor i HELPER, bez startera. Reakcję przeprowadzono według standardowej procedury. Okazało się, że w obydwu przypadkach wytworzony został ten sam produkt nie będący rekombinantem, przy czym tworzył się on wydajniej w mieszaninie reakcyjnej pozbawionej startera. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że brak donora w mieszaninie reakcyjnej ułatwia hybrydyzację HELPERA i akceptora. W

rezultacie koniec 3' *HELPERA* zostaje wykorzystany jako starter do powielenia pozostałej, niezaangażowanej w tworzenie dupletu, sekwencji akceptora.

Materiał genetyczny wirusa HIV składa się z dwóch cząsteczek (+)RNA. Z doniesień literaturowych wiadomo, że do przeskoków rekombinacyjnych HIV-1 RT dochodzi najczęściej podczas syntezy nici (-)DNA, czyli podczas procesu odwrotnej transkrypcji [Zhang i wsp., 2000]. Postanowiono zatem stworzyć układ helperowy, w którym cząsteczki ssDNA zostały zastąpione przez RNA. Doświadczenie przeprowadzono według takiego samego schematu, jak w przypadku systemu helperowego, złożonego z cząsteczek ssDNA. Długość oczekiwanych rekombinantów wynosiła 66 nt. Powstawanie produktów rekombinacji dłuższych o jeden nukleotyd, wynikało z obecności dodatkowej reszty

guanozynowej na końcu 5' cząsteczek RNA, pochodzącej z transkrybowanego fragmentu promotora polimerazy RNA T7.

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu były zaskakujące. W żadnej z reakcji nie dochodziło do tworzenia produktów T, nawet wtedy, gdy w mieszaninie reakcyjnej obecne były wszystkie trzy cząsteczki: donor, akceptor oraz HELPER (Rys. 4.33b, linia nr 2). Jedyny obserwowany produkt powstawał w wyniku powielenia całej matrycy donorowej (F).

Ponieważ system rekombinacji wspomaganej, złożony z samych cząsteczek ssDNA, efektywnie wspierał przeskok rekombinacyjny HIV-1 RT oraz HD-p66, podjęto próby wyjaśnienia, dlaczego produktów rekombinacji nie obserwowano w analogicznym systemie RNA. Aby ustalić, który z jego elementów uniemożliwia zajście procesu rekombinacji,

zaprojektowano układy mieszane. W każdym z nich, oprócz startera EtoEp, obecne były trzy cząsteczki: donor, akceptor oraz HELPER, jedna z nich była ssDNA, podczas gdy dwie pozostałe były RNA. W taki sposób otrzymano trzy układy mieszane, złożone z: (i) donora ssDNA, akceptora RNA i HELPERA RNA; (ii) donora RNA, akceptora ssDNA i HELPERA RNA oraz (iii) donora RNA, akceptora RNA i HELPERA ssDNA. Reakcje wydłużania startera przez HIV-1 RT oraz HD-p66, przeprowadzono w analogiczny sposób jak w dwóch poprzednich doświadczeniach. Produkty reakcji rozdzielono w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym, przykładowy wynik analizy przedstawiono na Rys.

4.33b (linie 4-6).

Analiza produktów reakcji wydłużania startera EtoEp, pokazała, że produkty T tworzone były w obecności:

donora RNA, akceptora ssDNA i HELPERA RNA (Rys. 4.33b, linia nr 5) oraz donora RNA, akceptora RNA i HELPERA ssDNA (Rys. 4.33b, linia nr 6). Produkt T nie powstawał, gdy w mieszaninie reakcyjnej był donor ssDNA, akceptor RNA i HELPER RNA (Rys. 4.33b, linia nr 4).

Produkty, odpowiadające prążkom T zostały wyizolowane z żelu (Materiały i Metody 3.2.13), a następnie poddane standardowej procedurze amplifikacji metodą PCR, z wykorzystaniem starterów Eco-hel i Pst-hel (Materiały i Metody 3.2.5, Reakcja PCR nr 8). Produkty reakcji PCR trawiono EcoRI i Pst I (Materiały i Metody 3.2.8), a następnie poddano ligacji z odpowiednio przygotowanym plazmidem pUC19 (Materiały i Metody 3.2.10).

Otrzymanymi konstrukcjami transformowano bakterie E. coli (Materiały i Metody 3.2.7.16). W celu

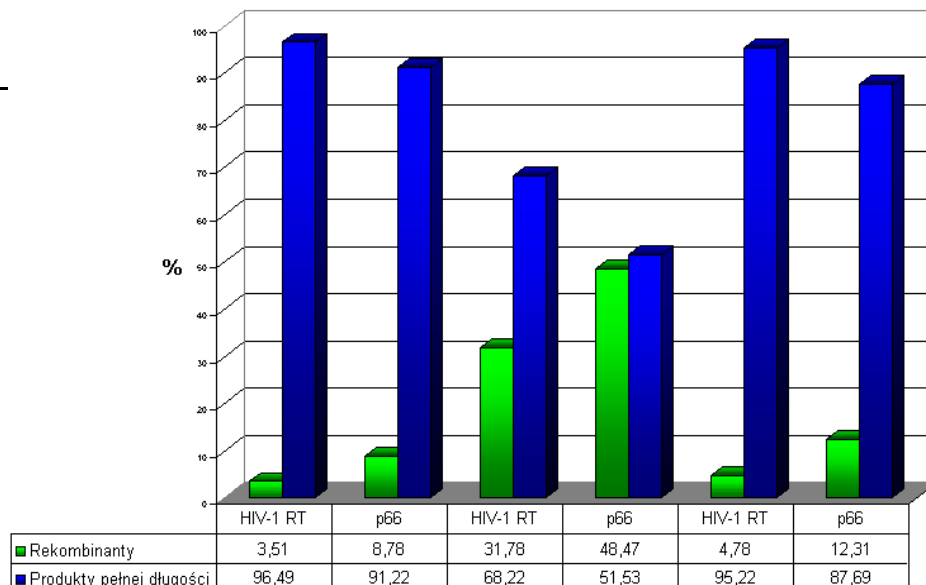
ustalenia sekwencji powielonych fragmentów, wybrane plazmidy poddane zostały sekwencjonowaniu (Materiały i Metody 3.2.5). Wszystkie wyizolowane i powielone produkty T, posiadały identyczne sekwencje nukleotydowe, o długości 65 nt oraz 66 nt (w przypadku reakcji przeprowadzonych w obecności akceptora RNA), pochodzące zarówno z matrycy donorowej jak i akceptorowej (Rys. 4.34).

5' - **CCCGTTCCTACCTGGTGTAATAAT**CGAGCAGAGGTTGGTACATGAACCTGCAACTGTGTAATTG (C) - 3'

Rysunek 4.34 Sekwencja nukleotydowa rekombinantów, powstających w układzie helperowym. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencję pochodzącą z nici donorowej, kolorem zielonym – z nici akceptorowej. Wytłuszczonym drukiem zaznaczona jest 12-nt sekwencja homologiczna, obecna zarówno w donorze jak i w akceptorze. Przeszkoki rekombinacyjne każdorazowo zachodziły w obrębie sekwencji homologicznych. Nukleotyd C, umieszczony w nawiasie, obecny był w sekwencji rekombinantów, które powstawały w oparciu o akceptor RNA (w przeciwieństwie do akceptora DNA, posiadał on na końcu 5' dodatkową resztę guanozyny, która w rekombinancie odpowiadała 3'-końcowej reszcie cytydylowej).

Aby określić wydajność, z jaką powstawały rekombinanty, rozdzielone w żelu poliakryloamidowym produkty poszczególnych reakcji analizowano za pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon

8600). Przedstawione na wykresie wyniki są wartościami średnimi, wyznaczonymi w oparciu o trzy niezależne eksperymenty (Rys. 4. 35).



matryce :

ssDNA
wszystkieakceptor ssDNA
donor i HELPER RNAHELPER ssDNA
donor i akceptor RNA

Rysunek 4.35 Porównanie wydajności tworzenia rekombinantów przez HIV-1 RT oraz HD-p66, w układzie miejscowo-specyficznej rekombinacji, wspieranej przez cząsteczkę HELPERA. Aktywność rekombinacyjna badana była w reakcji wydłużania startera. Wydajność tworzenia produktów pełnej długości (prążki F na Rys. 4.33), powstających w wyniku skopięwania całej matrycy donorowej, oznaczono kolorem granatowym. Wydajność tworzenia rekombinantów (prążki T na Rys. 4.33) oznaczono kolorem zielonym. Produkty rekombinacji obserwowano tylko w przypadku, gdy w mieszaninie reakcyjnej obecne były: (i) same cząsteczki ssDNA (pozycja pierwsza i druga na wykresie), (ii) donor i HELPER - RNA, a akceptor - ssDNA (pozycja trzecia i czwarta na wykresie), (iii) donor i akceptor - RNA, HELPER - ssDNA (pozycja piąta i szósta na wykresie).

Na podstawie przeprowadzonych obliczeń stwierdzono, że HIV-1 RT oraz HD-p66 wykazują najwyższą aktywność rekombinacyjną w obecności donora i HELPERA RNA oraz akceptora ssDNA. Wydajność procesu rekombinacji była najniższa w układzie trzech cząsteczek ssDNA.

Podsumowanie. Przeprowadzone badania dowiodły, iż dzięki zastosowaniu cząsteczki HELPEROWEJ można precyzyjnie i efektywnie przenosić HIV-1 RT z jednej matrycy na drugą, o ile posiadają one krótkie sekwencje homologiczne (ok. 10 nt). Szczegółowa analiza produktów reakcji, pozwoliła ustalić, że rekombinacja zachodzi najwydajniej, gdy donor i HELPER są cząsteczkami RNA, natomiast akceptor – ssDNA. Przeszkoki rekombinacyjne zachodzą również w obecności donora i akceptora RNA oraz HELPERA DNA. Najsłabsza aktywność rekombinacyjna HIV-1 RT oraz HD-p66 zanotowana została w układzie składającym się z samych cząsteczek ssDNA. Rekombinanty, oznaczone jako produkt T, charakteryzowały się jednak mniejszą, niż oczekiwana, długością: 65 i 66 nt. Analiza ich sekwencji pozwala przypuszczać, że

skrócenie produktów rekombinacji jest wynikiem przedwczesnej terminacji syntezy DNA na matrycy akceptorowej.

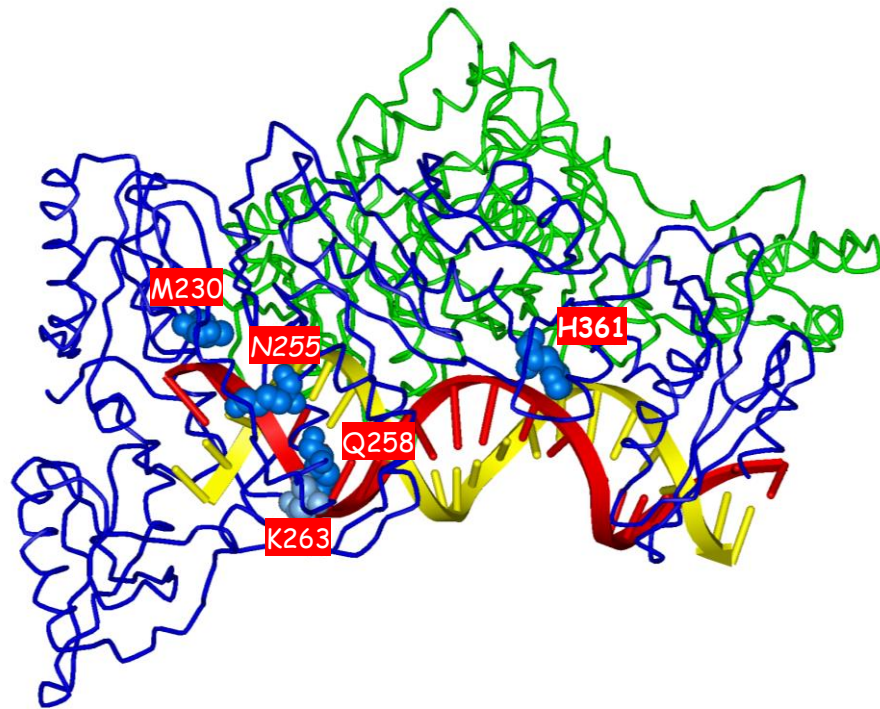
Podsumowując uzyskane wyniki, można stwierdzić, że niehomologiczne miejscowo-specyficzne przesłoki HIV-1 RT oraz HD-p66 zachodzą wydajniej, jeżeli cząsteczką donorową jest RNA.

Podobne wyniki uzyskały także inne grupy badawcze [Anderson i wsp., 1998; Yu i wsp., 1998]. Podczas testowania rekombinacyjnych układów homologicznych in vivo, zauważono, że najwięcej rekombinantów powstaje podczas syntezy nici (-)DNA. Można zatem przypuszczać, że u retrowirusów obydwa rodzaje rekombinacji genetycznej: homologiczna i niehomologiczna, zachodzą najwydajniej podczas pierwszego etapu odwrotnej transkrypcji – przepisywania genomowego RNA na (-)DNA.

4.5 Wpływ oddziaływań HIV-1 RT z nicią potomną na przebieg procesu homologicznej i niehomologicznej rekombinacji

Z przeprowadzonych we Wstępie rozważań wynika, że w procesie rekombinacji szczególnie istotną rolę odgrywają oddziaływania polimerazy z nicią potomną. Ich wysokie powinowactwo umożliwia oddysocjowywanie kompleksu polimeraza-niść potomna od cząsteczki matrycowej i ponowną reasocjację z inną lub tą samą matrycą (jeśli opisywane zjawisko ma miejsce podczas odwrotnej transkrypcji, wówczas dodatkowo dochodzi do degradacji matrycy dzięki aktywności RNazowej RT).

Aby potwierdzić słuszność powyższych założeń postanowiono ustalić w jaki sposób osłabienie wiązań pomiędzy HIV-1 RT a nowosyntetyzowaną nicią DNA wpływa na przebieg rekombinacji homologicznej i niehomologicznej. Bazując na danych krystalograficznych, opisujących strukturę kompleksu HIV-1 RT z dupleksem RNA-DNA [Sarafianos i wsp., 2001; kod PDB: **1HYS**, Rys. 4.36] ustalono, które z reszt aminokwasowych tworzą najsilniejsze, niespecyficzne wiązania ze szkieletem cukrowo-fosforanowym nici potomnej. Analiza oddziaływań DNA-białko przeprowadzona została z wykorzystaniem programu komputerowego InsightII. W rezultacie zidentyfikowano pięć reszt aminokwasowych: M230, N255, Q258, K263, H361 (Rys. 4.36). Każda z nich zaangażowana była w silne oddziaływania wodorowe – odległość pomiędzy atomami, tworzącymi wiązanie wodorowe wynosiła mniej niż 4,5 Å. Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie ukierunkowanej mutagenyzy poszczególnych reszt aminokwasowych. Aby ustalić jaką funkcję pełnią ich łańcuchy boczne, każdy z aminokwasów został wymieniony na alaninę. Następnie testowano, w jaki sposób wprowadzone zmiany wpływają na wydajność procesu rekombinacji.



Rysunek 4.36. Struktura krystalograficzna kompleksu heterodimeru p66/p51 z hybrydem RNA:DNA. Kolorem niebieskim zaznaczono podjednostkę p66, kolorem zielonym – podjednostkę p51. Matrycową cząsteczkę RNA zaznaczono na żółto, natomiast potomną cząsteczkę DNA – na czerwono. Wyselekcjonowane reszty aminokwasowe, biorące udział w oddziaływaniach z nicią potomną, zostały uwidocznione w postaci niebieskich kulek, oznaczających poszczególne atomy aminokwasów: M230, N255, Q258, K263 oraz H361. Rysunek został wykonany za pomocą programu DSViewerPro [<http://www.accelrys.com/viewer/>], w oparciu o dane krystalograficzne z PDB, kod: 1HYS.

4.5.1 Mutageneza HIV-1 RT

4.5.1.1 Konstrukcja zmutowanych wektorów ekspresyjnych

W celu otrzymania zmodyfikowanych form HIV-1 RT przeprowadzono ukierunkowaną mutagenezę wektora ekspresyjnego mutpDAR1, zgodnie z procedurą opisaną szczegółowo w rozdziale Materiały i Metody 3.2.3.3. Obecność mutacji, w poszczególnych

wektorach mutpDAR1, potwierdzono poprzez ich sekwencjonowanie (Materiały i Metody 3.2.11.1, wykorzystano starter mut-seq). W rezultacie otrzymano pięć nowych wektorów ekspresyjnych: mutpDAR1-A230, mutpDAR1-A255, mutpDAR1-A258, mutpDAR1-A263, mutpDAR1-A361. Pełna charakterystyka uzyskanych mutantów przedstawiona została w Tabeli 4.2.

Tabela 4.2 Charakterystyka mutantów HIV-1 RT

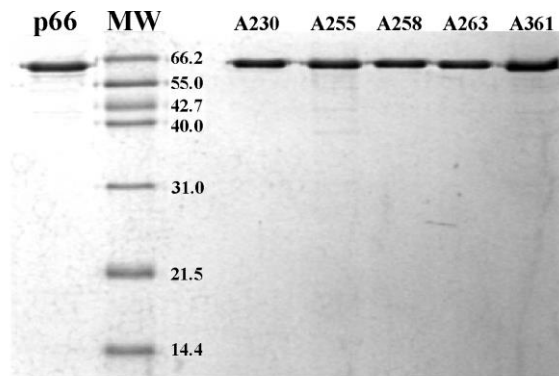
<i>mutant HIV-1 RT</i>	<i>zmodyfikowany kodon</i>	<i>wprowadzona mutacja</i>	<i>miejsce mutacji</i>	<i>wektor do ekspresji mutantu</i>
<i>A230</i>	<i>ATG→GCG</i>	<i>Met(M)230→Ala</i>	<i>poddomena dłoni</i>	<i>mutpDAR1-A230</i>
<i>A255</i>	<i>AAT→GCT</i>	<i>Asn(N)255→Ala</i>	<i>poddomena kciuka</i>	<i>mutpDAR1-A255</i>
<i>A258</i>	<i>CAG→GCG</i>	<i>Gln(Q)258→Ala</i>	<i>poddomena kciuka</i>	<i>mutpDAR1-A258</i>
<i>A263</i>	<i>AAA→GCA</i>	<i>Lys(K)263→Ala</i>	<i>poddomena kciuka</i>	<i>mutpDAR1-A263</i>
<i>A361</i>	<i>CAC→GCC</i>	<i>His(H)361→Ala</i>	<i>poddomena łącznika</i>	<i>mutpDAR1-A361</i>

4.5.1.2 Otrzymywanie mutantów podjednostki p66 HIV-1 RT

Uzyskanymi wektorami ekspresyjnymi transformowano komórki bakteryjne E.coli BL21(DE3)LysS (Materiały i Metody

3.2.7.1a). Ekspresję białek prowadzono według schematu opracowanego dla HIV-1 RT (Wyniki i Dyskusja 4.1.1), zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale *Materiały i Metody 3.2.1.1*). Równolegle przygotowano 10% stoki glicerolowe bakterii BL21(DE3)LysS transformowanych wektorami: mutpDAR1-A230, mutpDAR1-A255, mutpDAR1-A258, mutpDAR1-A263, mutpDAR1-A361. Przebieg ekspresji monitorowano analizując izolowane z bakterii białka metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym (*Materiały i Metody 3.2.14*). W celu oczyszczenia zmutowanych białek, przyjęto analogiczną strategię jak w przypadku HD-p66. Wyizolowane z bakterii ekstrakty białkowe nałożono na kolumnę powinowactwa - niklową. Mutanty, podobnie jak podjednostką p66, posiadały

His-Tag na końcu karboksylowym, dlatego mogły wiązać się z podłożem kolumny, zawierającym jony Ni^{2+} . Następnie wmywane były buforami zawierającymi 10mM i 100mM imidazol (Materiały i Metody 3.2.1.3a). Po zastosowaniu opisanej procedury, podobnie jak to miało miejsce w przypadku podjednostki p66 typu dzikiego, preparaty wykazywały ok. 95% homogenność i nie wymagały dalszego oczyszczania. Z jednego litra hodowli otrzymywano ok. 4mg białka, które zagęszczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.1.3d i przechowywano w buforze X, w temp. – 20°C. Końcowe stężenie tak przygotowanych białek wynosiło 6µg/µl. Uzyskane preparaty poddano analizie elektroforetycznej w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym (Rys. 4.37).



Rysunek 4.37 Analiza otrzymanych mutantów podjednostki p66 HIV-1 RT metodą elektroforezy w 15% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Powyżej ścieżek umieszczono nazwy mutantów (na prawo od wzorca mas). Dla porównania, analizowano również preparat zawierający typ dziki białka p66 (na lewo od wzorca mas). MW – wzorzec mas Mid-Range Protein Molecular Weight Marker.

4.5.1.3 Otrzymywanie mutantów HIV-1 RT

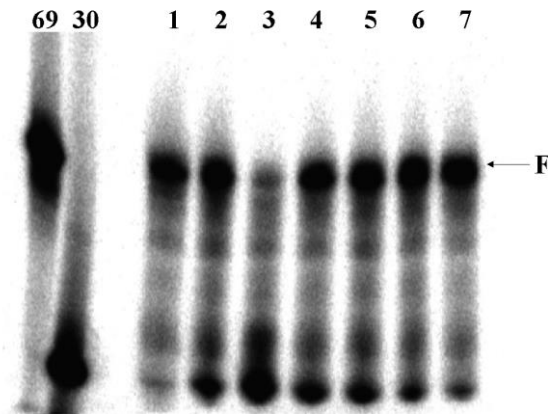
Aby otrzymać zmodyfikowane formy HIV-1 RT przeprowadzono rekonstytucję enzymu, wykorzystując mutanty podjednostki p66 oraz podjednostkę p51 typu dzikiego. Mutanty p66: A230, A255, A258, A263 oraz A361, hybrydyzowano 20min. w temp. 37°C z białkiem p51 typu dzikiego, w identycznych proporcjach molowych. Jako reakcję kontrolną przeprowadzono hybrydyzację obydwu podjednostek typu dzikiego: p66 oraz p51. Następnie analizowano aktywność

biologiczną tak przygotowanych preparatów. Stwierdzono, że zrekonstruowany heterodimer p66/p51 typu dzikiego, zachowywał porównywalną aktywność biologiczną jak HIV-1 RT otrzymywana w komórkach bakteryjnych transformowanych wektorem ekspresyjnym pDAR1.

4.5.2 Testowanie aktywności biologicznej mutantów HIV-1 RT

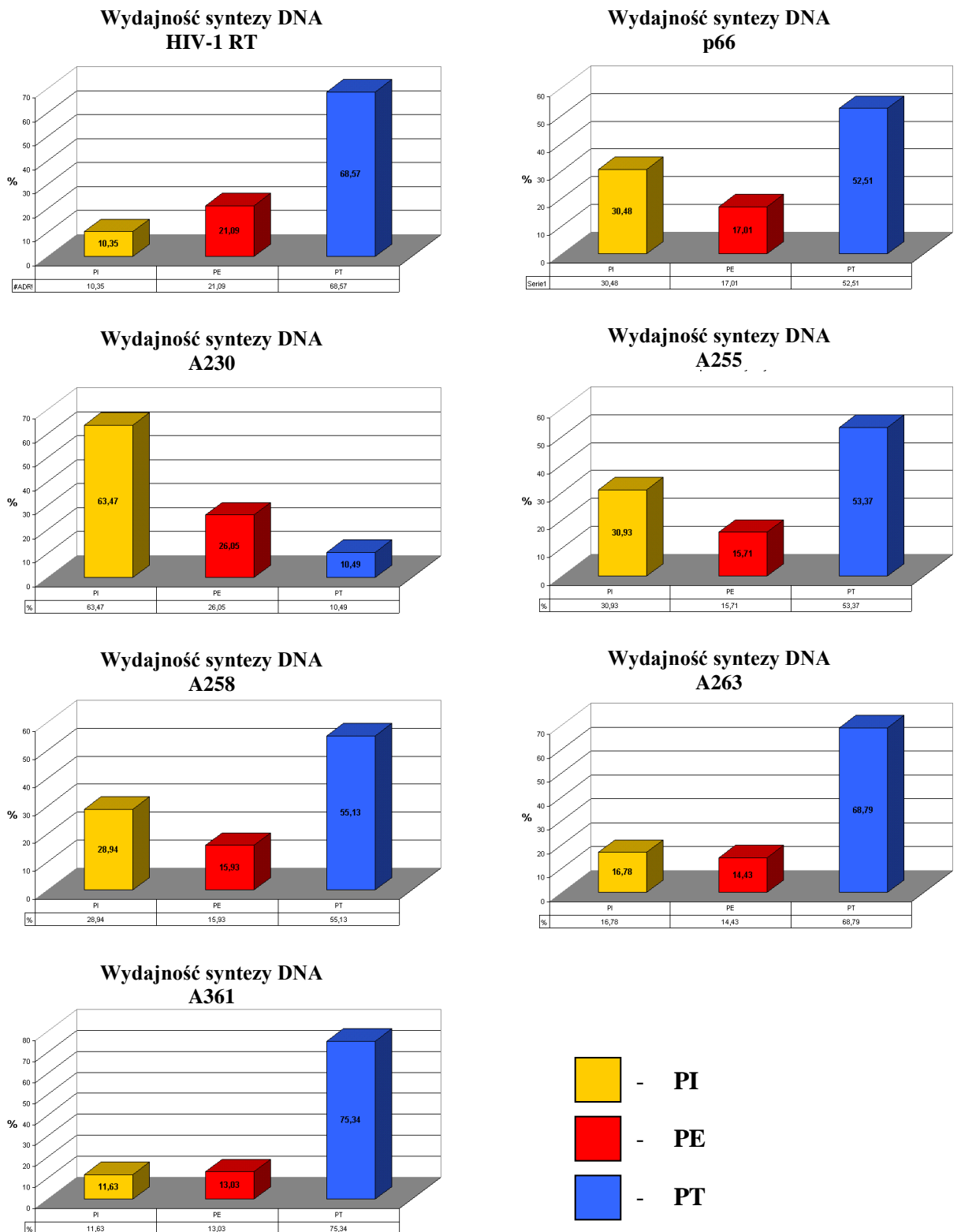
4.5.2.1 Aktywność polimerazowa

Aktywność polimerazową mutantów HIV-1 RT testowano w reakcji wydłużania startera (starter RC-3, znakowany ^{32}P). Reakcje prowadzono w obecności matrycy ssDNA HVR-5-DNA, w standardowych warunkach, zgodnie ze schematem opisanym w rozdziale Materiały i Metody 3.2.15.1. Dla porównania, przeprowadzono analogiczne reakcje z użyciem HIV-1 RT typu dzikiego oraz HD-p66, również typu dzikiego. Produkty reakcji oczyszczano metodą fenol-chloroform i rozdzielano w 12% denaturującym żelu poliakryloamidowym, zdjęcie przykładowego żelu zamieszczono na Rys. 4.38. Produkty reakcji analizowano za pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo.



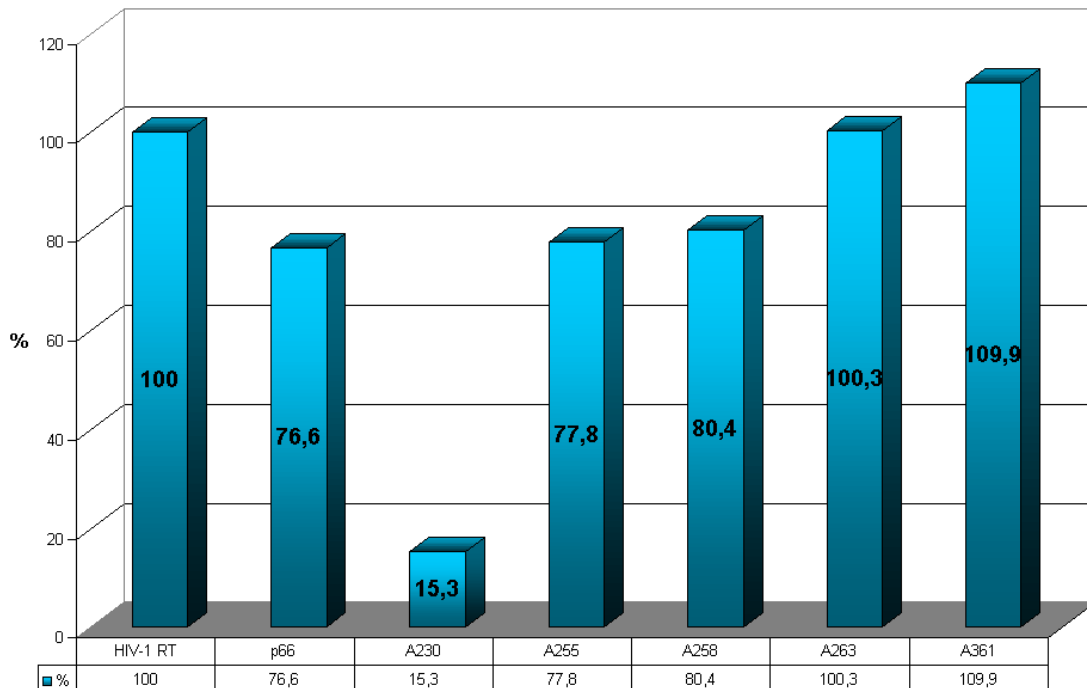
Rysunek 4.38 Analiza produktów reakcji wydłużania startera przez mutanty HIV-1 RT. Reakcje prowadzone były w temp. 45°C, ma matrycy HVR-5- DNA, z udziałem enzymów: HIV-1 RT (linia nr 1), HD-p66 (linia nr 2), mutanta A230 (linia nr 3), mutanta A255 (linia nr 4), mutanta A258 (linia nr 5), mutanta A263 (linia nr 6) oraz mutanta A361 (linia nr 7). Literą F oznaczono produkty pełnej długości, powstające w wyniku powielenia całej cząsteczki matrycowej. Liczbami 69 i 30 oznaczono wzorce długości, tj. 69- i 30-nt ssDNA.

Analiza produktów reakcji wydłużania startera wykazała, że wszystkie mutanty HIV-1 RT zachowały aktywność polimerazową, stąd w każdej ścieżce widoczne są prążki oznaczone literą F. Odpowiadają one produktom pełnej długości, powstającym w wyniku skopiowania całej cząsteczki matrycowej. Podobnie jak w przypadku reakcji katalizowanych przez HIV-1 RT oraz HD-p66, powstawały trzy podstawowe grupy produktów: produkty inicjacji (PI), produkty elongacji (PE) oraz produkty terminacji (PT) (Wyniki i Dyskusja 4.2.3). Wydajność ich syntezy określona została za pomocą programu komputerowego Image Quantification (Rys. 4.39). Dodatkowo, wydajność, z jaką w poszczególnych reakcjach syntetyzowany był produkt pełnej długości, porównano na Rys. 4.40.



Rysunek 4.39 Porównanie wydajności, z jaką tworzyły się produkty poszczególnych etapów syntezy DNA w reakcjach katalizowanych przez otrzymane mutanty: A230, A255, A258, A263, A361 oraz przez HIV-1 RT i HD-p66 (reakcje kontrolne). Oznaczenia: PI – produkty powstałe w fazie inicjacji syntezy DNA (zaznaczone kolorem żółtym), PE – produkty powstałe podczas etapu elongacji (zaznaczone kolorem czerwonym), PT – produkty terminacji (zaznaczone kolorem niebieskim).

Wydajność syntezy DNA



Rysunek 4.40 Porównanie wydajności syntezy produktów pełnej długości przez mutanty HIV-1 RT oraz enzymy typu dzikiego: HIV-1 RT i HD-p66. Wydajność syntezy DNA była badana w reakcji wydłużania startera, w warunkach standardowych, na matrycy HVR-5-DNA. Wydajność syntezy produktów pełnej długości przez HIV-1 RT została przyjęta jako 100%.

Analiza ilościowa produktów powstających podczas syntezy DNA, na matrycy HVR-5-DNA, z wykorzystaniem mutantów HIV-1 RT oraz heterodimeru p66/p51 i HD-p66 jako kontroli, pokazała, że wszystkie otrzymane mutanty zachowały aktywność polimerazową. Wydajność, z jaką mutanty syntetyzowały poszczególne rodzaje produktów, była podobna do uzyskanej dla enzymów typu dzikiego. Jedyny wyjątek stanowił mutant A230 (Rys. 4.39). W jego przypadku, wydajność syntezy produktów pełnej długości była znacząco niższa (Rys. 4.40). Piek, odpowiadający wydajności, z jaką powstawały produkty inicjacji syntezy DNA, był za to zdecydowanie najintensywniejszy (Rys 4.39).

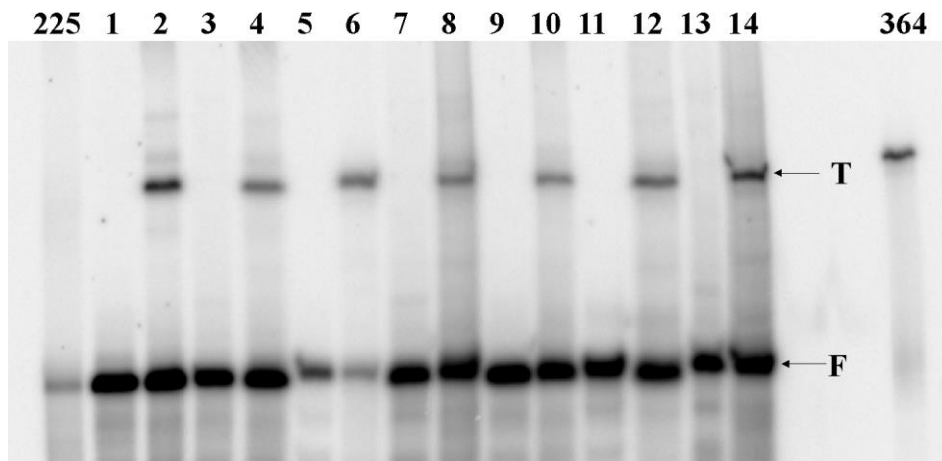
4.5.2.2 Aktywność rekombinacyjna

Przeprowadzone wcześniej doświadczenia pozwoliły określić aktywność rekombinacyjną szeregu sekwencji pochodzących z genomowych cząsteczek HIV-1 oraz BMV. Aby stwierdzić czy mutacje wprowadzone do HIV-1 RT wpływają na przebieg rekombinacji, zastosowaliśmy dwa układy matryc, dla których badane zjawisko zachodziło najefektywniej, tj.:

- matryce BMV-R-D oraz BMV-R-A (opisane w rozdziale Wyniki i Dyskusja 4.4.1.3), do testowania wpływu mutacji na wydajność rekombinacji homologicznej,
- system rekombinacji wspomaganiej (opisany w rozdziale 4.4.3), do testowania wpływu mutacji na wydajność rekombinacji niehomologicznej.

a) Wpływ mutacji HIV-1 RT na przebieg rekombinacji homologicznej

W celu określenia zdolności mutantów HIV-1 RT do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych pomiędzy cząsteczkami zawierającymi rejony homologiczne, wykorzystano matryce RNA posiadające sekwencje pochodzące z genomu BMV - BMV-R. Aktywność rekombinacyjną mutantów testowano w reakcji wydłużania startera w obecności matryc donorowej (BMV-R-D) i akceptorowej (BMV-R-A), których stosunek molowy wynosił 1:5 (dokładny opis doświadczenia znajduje się w rozdziale Wyniki i Dyskusja 4.4.1.3 oraz Materiały i Metody 3.2.15.3). Kontrolne reakcje wydłużania startera przeprowadzono w obecności samej matrycy donorowej, ponadto, dla porównania, przeprowadzono reakcje z wykorzystaniem enzymów typu dzikiego: heterodimeru p66/p51 oraz HD-p66. Produkty reakcji analizowano w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym (Materiały i Metody 3.2.17), przykładowy rezultat zamieszczono na Rys. 4.41. W celu oszacowania długości powstających produktów, wykorzystano wyznakowane ³²P produkty reakcji PCR, o długościach: 225 pz – wzorzec odpowiadający produktowi pełnej długości, oraz 364 pz – wzorzec odpowiadający potencjalnym rekombinantom.

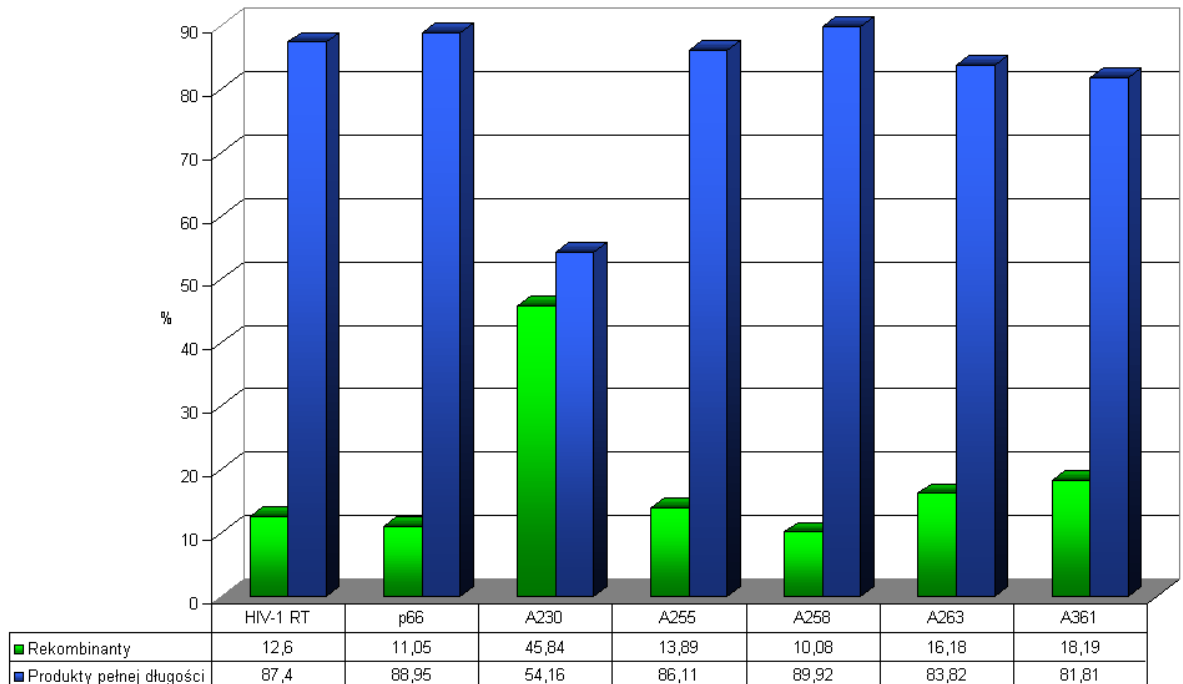


Rysunek 4.41 Analiza aktywności rekombinacyjnej mutantów HIV-1 RT wobec matryc zawierających homologiczne rejony BMV-R. Produkty reakcji rozdzielone zostały metodą elektroforezy w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Produkty powstałe przy udziale HIV-1 RT (linie 1, 2), HD-p66 (linie 3, 4) oraz mutantów HIV-1 RT: A230 (linie 5, 6), A255 (linie 7, 8), A258 (linie 9, 10), A263 (linie 11, 12), A361 (linie 13, 14), gdy w mieszaninie reakcyjnej obecny był sam donor (linie: 1, 3, 5, 7, 9, 11 i 13) oraz donor i akceptor w molowych

proporcjach (D:A) 1:5 (linie 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14). Literą F oznaczono produkty pełnej długości, powstające w wyniku powielenia całej matrycy donorowej, literą T oznaczono rekombinanty. Wzorce długości: 225-nt oraz 364-nt.

W reakcjach, w których obecne były obydwie matryce, tj. donorowa i akceptorowa, obserwowano tworzenie dwóch produktów. Pierwszy powstawał w wyniku powielenia całej matrycy donorowej (prążki oznaczone na Rys. 4.41 literą F). Drugi, był najprawdopodobniej rekombinantem (prążki oznaczone literą T). Produkt rekombinacji był nieobecny w reakcjach kontrolnych, przeprowadzanych na samej matrycy donorowej. Produkty odpowiadające prążkom T zostały wyizolowane z żelu zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.13, a następnie namnożone metodą PCR przy pomocy specyficznych starterów (BMV3-REC – komplementarny do końca 3' matrycy donorowej, oraz BMV5-REC – homologiczny do końca 5' matrycy akceptorowej), (Materiały i Metody 3.2.5, reakcja PCR nr 8). Produkty reakcji amplifikacji zostały wklonowane do wektora pUC19 i przesekwencjonowane. W ten sposób jednoznacznie potwierdzono, że cząsteczkę DNA, migrujące podobnie jak wzorzec 364, są rekombinantami.

Wydajność tworzenia rekombinantów analizowano przy pomocy skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600). Przedstawione na wykresie (Rys. 4.42) wyniki są wartościami średnimi, wyznaczonymi w oparciu o trzy niezależne eksperymenty.

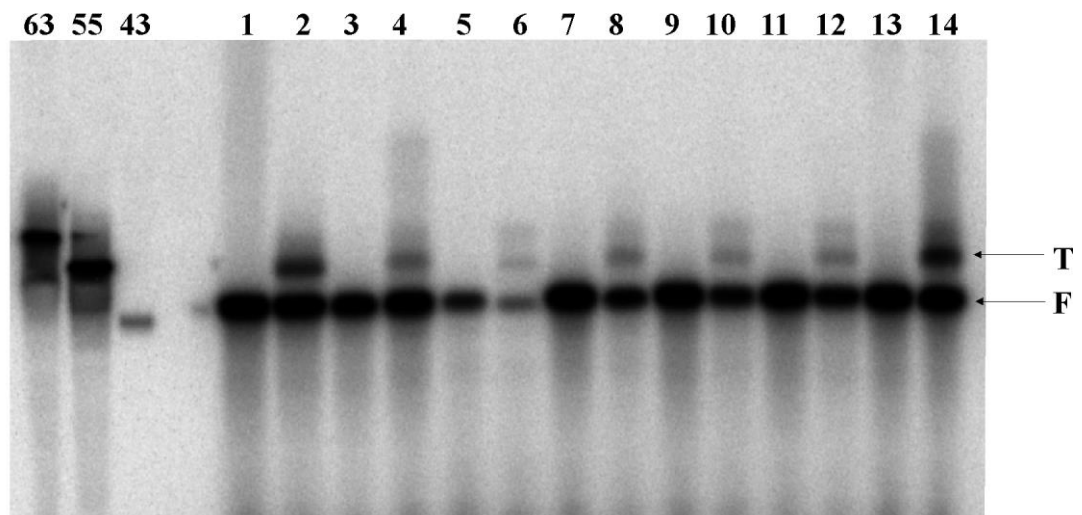


Rysunek 4.42 Porównanie wydajności tworzenia homologicznych rekombinantów przez HIV-1 RT, HD-p66 oraz mutanty HIV-1 RT, na matrycach zawierających sekwencje BMV-R. Aktywność rekombinacyjna badana była w reakcji wydłużania startera. Wydajność tworzenia produktów pełnej długości (prążki F na Rys. 4.41), powstających w wyniku skopiowania całej matrycy donorowej, oznaczono kolorem granatowym. Wydajność tworzenia rekombinantów (prążki T na Rys. 4.41) oznaczono kolorem zielonym.

Na podstawie analizy ilościowej produktów powstających w wyniku reakcji wydłużania startera na matrycach zawierających homologiczne rejony BMV-R, można powiedzieć, że najwyższą aktywność rekombinacyjną wykazywał mutant A230 (46% - wydajność tworzenia rekombinantów). Pozostałe mutanty posiadały aktywność rekombinacyjną zbliżoną lub nieco wyższą od enzymów typu dzikiego. Wydajność, z jaką powstawały rekombinanty wynosiła od 11 do 18%.

b) Wpływ mutacji HIV-1 RT na przebieg rekombinacji niehomologicznej

W celu zbadania zdolności mutantów HIV-1 RT do wykonywania niehomologicznych przeskoków rekombinacyjnych, zastosowano system helperowy, wspierający rekombinację miejscowo-specyficzną. Jako matryce wykorzystano ssDNA: HELPER-D, HELPER-A oraz HELPER (Wyniki i Dyskusja 4.4.3). Aktywność rekombinacyjną mutantów badano w reakcji wydłużania startera (Materiały i Metody 3.2.15.4). Kontrolne reakcje przeprowadzono w obecności samej matrycy donorowej, ponadto, dla porównania, przeprowadzono reakcje z wykorzystaniem enzymów typu dzikiego: heterodimeru p66/p51 oraz HD-p66. Produkty reakcji analizowano w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym, przykładowy rezultat przedstawiono na Rys. 4.43. Wzorce długości zostały otrzymane poprzez wyznakowanie na końcu 5' syntetycznych ssDNA o długościach: 43, 55 oraz 63 nt (Materiały i Metody 3.2.14).

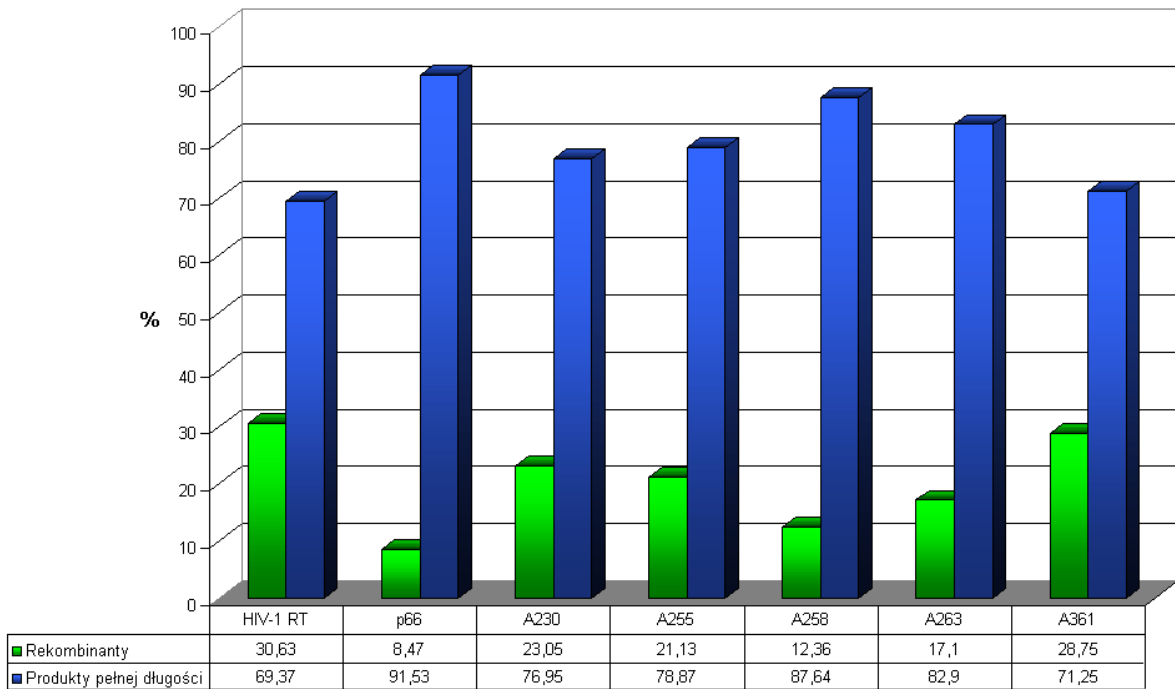


Rysunek 4.43 Analiza aktywności rekombinacyjnej mutantów HIV-1 RT w układzie do badania miejscowo-specyficznej niehomologicznej rekombinacji, wspieranej przez cząsteczkę HELPERA. Produkty reakcji rozdzielone

zostały metodą elektroforezy w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym. Produkty powstałe przy udziale HIV-1 RT (linie 1, 2), HD-p66 (linie 3, 4) oraz mutantów HIV-1 RT: A230 (linie 5, 6), A255 (linie 7, 8), A258 (linie 9, 10), A263 (linie 11, 12), A361 (linie 13, 14), gdy w mieszaninie reakcyjnej obecny był sam donor (linie: 1, 3, 5, 7, 9, 11 i 13) oraz donor, akceptor i HELPER (linie 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14). Literą F oznaczono produkty pełnej długości, powstające w wyniku powielenia całej matrycy donorowej, literą T oznaczono rekombinanty. Liczbami oznaczono wzorce długości ssDNA. Długość wzorców odpowiada przypisanym im wartościom liczbowym.

W reakcjach przeprowadzonych w obecności cząsteczek ssDNA: HELPER-D, HELPER-A oraz HELPER, otrzymano produkt pełnej długości (prążek oznaczony na Rys. 4.43 literą F), będący wynikiem powielenia całej matrycy donorowej. Ponadto, powyżej obserwowano dodatkowy prążek (oznaczony literą T), nieobecny w reakcjach kontrolnych, przeprowadzanych na samej matrycy donorowej. W celu potwierdzenia obecności rekombinantów, produkty odpowiadające prążkom T zostały wyizolowane z żelu, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody 3.2.13), a następnie namnożone metodą PCR, przy pomocy specyficznych starterów (Eco-hel - komplementarny do końca 3' matrycy donorowej, oraz Pst-hel – homologiczny do końca 5' matrycy akceptorowej) (Materiały i Metody 3.2.5, reakcja PCR nr 8). Produkty reakcji amplifikacji zostały wkłanowane do wektora pUC19 i przesekwencjonowane. W ten sposób jednoznacznie potwierdzono, że produkty T były rekombinantami.

Wydajność tworzenia rekombinantów analizowano przy pomocy skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600). Przedstawione na wykresie (Rys. 4.44) wyniki są wartościami średnimi, wyznaczonymi w oparciu o trzy niezależne eksperymenty.



Rysunek 4.44 Porównanie wydajności tworzenia rekombinantów przez HIV-1 RT, HD-p66 oraz mutanty HIV-1 RT, w układzie do badania miejscowo-specyficznej niehomologicznej rekombinacji, wspieranej przez cząsteczkę HELPERA. Aktywność rekombinacyjna badana była w reakcji wydłużania startera. Wydajność tworzenia produktów pełnej długości (prążki F na Rys. 4.43), powstających w wyniku skopiowania całej matrycy donorowej, oznaczono kolorem granatowym. Wydajność tworzenia

*rekombinantów (prążki T na Rys. 4.43)
oznaczono kolorem zielonym.*

Na podstawie analizy ilościowej produktów powstających w wyniku reakcji wydłużania startera na matrycach ssDNA: HELPER-D, HELPER-A oraz HELPER, przez mutanty HIV-1 RT (A230, A255, A258, A263 oraz A361) oraz enzymy typu dzikiego: HIV-1 RT oraz HD-p66, można powiedzieć, że najwyższą aktywność rekombinacyjną wykazywał enzym typu dzikiego: heterodimer p66/p51 (31% wydajność tworzenia rekombinantów). Pozostałe enzymy: mutanty HIV-1 RT oraz HD-p66, wykazywały niższą aktywność rekombinacyjną. Zmieniała się ona w zakresie od 8 do 29%.

Podsumowanie. Wprowadzenie mutacji destabilizujących oddziaływania HIV-1 RT z nicią potomną, nie wpłynęło w znaczący sposób na aktywność polimerazową większości mutantów. Jedynie mutant A230 wykazywał zdecydowanie obniżoną zdolność syntezy DNA pełnej długości (15% aktywności enzymu typu dzikiego, Rys. 4.40). Ponadto, wszystkie otrzymane mutanty zachowały również aktywność rekombinacyjną w obecności wybranych matryc, wspierających rekombinację homologiczną jak i niehomologiczną. W układzie do badania rekombinacji homologicznej, wspieranej przez rejony BMV-R, większość otrzymanych mutantów wykazywała nieco wyższą aktywność rekombinacyjną niż heterodimer p66/p51 typu dzikiego. Jedynie mutant A230, posiadający osłabioną aktywność polimerazową, charakteryzował się kilkukrotnie zwiększoną aktywnością rekombinacyjną (Rys. 4.40). Być może częste zatrzymywanie się zmutowanego kompleksu polimerazowego, skutkujące słabszą wydajnością syntezy produktów pełnej długości (Rys. 4.39), prowadzi do częstszych przeskoków rekombinacyjnych. W układzie do badania miejscowo-specyficznej rekombinacji niehomologicznej, wspieranej przez cząsteczkę HELPERA, mutanty HIV-1 RT wykazywały niższą aktywność rekombinacyjną od HIV-1 RT typu dzikiego. Różny wpływ wprowadzonych mutacji na częstość rekombinacji homologicznej oraz niehomologicznej wskazuje na to, iż mechanizmy odpowiedzialne za przebieg obydwu procesów są inne. Uzyskane wyniki zgodne są z wcześniejszymi obserwacjami, dotyczącymi polimerazy BMV [Figlerowicz i wsp., 1997 A; Figlerowicz i wsp., 1998]. Ponadto świadczą one, że modyfikując HIV-1 RT, można modulować zarówno aktywność polimerazową jak i rekombinacyjną enzymu. Uzyskany wynik dowodzi, że HIV-1 RT, oprócz aktywności polimerazowej i RNazowej, posiada dodatkową aktywność - zdolność do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych.

Szczegółowa analiza uzyskanych wyników wskazuje, że stabilność kompleksu HIV-1 RT-nić potomna nie jest konieczna dla efektywnego przebiegu rekombinacji homologicznej, jest ona jednak istotna podczas przeskoków zachodzących pomiędzy niehomologicznymi matrycami. Wydaje się, że w trakcie rekombinacji homologicznej może dochodzić do rozpadu kompleksu RT-nić potomna. Dzięki obecności sekwencji homologicznych w donorze i akceptorze, koniec 3' nowosyntetyzowanej nici, uwolniony od cząsteczki donorowej, jest w stanie hybrydyzować z taką samą lub bardzo podobną sekwencją, obecną w akceptorze. Kluczową rolę w badanym mechanizmie

odgrywa zatem homologia sekwencji. Do utworzonego dupleksu może ponownie przyłączyć się RT, by kontynuować syntezę nici potomnej na akceptorze. W konsekwencji powstaje rekombinant. Potwierdzeniem przyjętych założeń są wyniki uzyskane dla mutantu A230. Osłabienie oddziaływań pomiędzy HIV-1 RT i nicią potomną najprawdopodobniej zdestabilizowało kompleks replikazowy, tym samym niezwiązana z enzymem nić potomna mogła łatwiej przyłączyć się do odpowiedniego miejsca w akceptorze. RT rozpoznaje ją jako starter i kontynuuje syntezę DNA. Stabilność kompleksu replikazowego wydaje się odgrywać istotną rolę w przypadku rekombinacji niehomologicznej – wszystkie mutanty generowały rekombinanty z mniejszą wydajnością niż HIV-1 RT typu dzikiego. Uzyskane wyniki są zgodne z proponowanym mechanizmem miejscowo-specyficznej rekombinacji (Rys. 4.27). Zakłada on, że przeniesienie kompleksu RT-niść potomna z cząsteczki donorowej na akceptorową zachodzi w sposób ciągły i wymaga współdziałania kilku czynników. Obecność samych tylko krótkich sekwencji homologicznych, czy samych sekwencji komplementarnych nie indukuje przeskoków rekombinacyjnych. Stabilność oddziaływań pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami uczestniczącymi w rekombinacji może być konieczna dla właściwego przebiegu badanego procesu.

5. WNIOSKI

1. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano efektywne metody otrzymywania homogennych preparatów HIV-1 RT (heterodimer p66/p51) oraz tworzących ją białek: p66 i p51. Potwierdzono wcześniejsze obserwacje, że aktywność polimerazową wykazuje heterodimer p66/p51 i homodimer p66, podczas gdy homodimer p51 jest nieaktywny.
2. Stwierdzono, że zarówno HIV-1 RT jak i homodimer p66 wydajniej syntetyzują DNA na matrycy DNA, niż na matrycy RNA. Obydwa enzymy są więc efektywniejszymi replikazami niż odwrotnymi transkryptazami. Ustalono, że HIV-1 RT najwydajniej syntetyzuje nić potomną w temperaturze 45°C.
3. Pokazano, że nie tylko właściwości polimerazy, ale i struktura RNA, wpływać mogą w istotny sposób na dokładność, z jaką powielane są genomy wirusowe.
4. Wbrew wcześniejszym doniesieniom, nie stwierdzono, by struktura drugorzędowa RNA odgrywała kluczową rolę podczas pierwszego przeskoku rekombinacyjnego HIV-1 RT pomiędzy końcem 5' a końcem 3' cząsteczki genomowej.
5. Pokazano, że miejscowo-specyficzna niehomologiczna rekombinacja RNA zachodzi wówczas, gdy lokalnej strukturze dwuniciowej towarzyszą krótkie sekwencje homologiczne. Jednakże żaden ze zidentyfikowanych elementów strukturalnych (sekwencje komplementarne, krótkie sekwencje homologiczne, spinka, powstająca w cząsteczce akceptorowej) nie jest w stanie samodzielnie indukować przeskoków rekombinacyjnych HIV-1 RT. Dopiero dzięki współdziałaniu wszystkich motywów polimeraza może zostać przeniesiona z matrycy donorowej na akceptorową.
6. Badania pierwszego etapu miejscowo-specyficznej rekombinacji (zatrzymanie kompleksu polimerazowego na cząsteczce donorowej) pokazały, że sygnały indukujące zahamowanie syntezy DNA zakodowane są zarówno w pierwszo- jak i drugorzędowej strukturze cząsteczki matrycowej. Obecność dodatkowych sygnałów (np. oddziaływania z innymi cząsteczkami – struktura czwartorzędowa), może zwiększać efektywność terminacji syntezy DNA.

7. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do polimeraz RNA zależnych od RNA, HIV-1 RT nie posiada zdolności do wykonywania przeskoków rekombinacyjnych w obrębie lokalnej struktury dwuniciowej. Rekombinantów nie obserwowano także w obecności matryc mogących powstawać w wyniku degradacji dupletu RNA. Okazało się bowiem, że odwrotna transkryptaza pozbawiona jest aktywności EtoE (zdolności do przeskakiwania z końca 5' cząsteczki donorowej na koniec 3' cząsteczki akceptorowej). Aktywność taka obserwowana jest u niektórych polimeraz RNA zależnych od RNA.
8. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że w genomach wirusowych występują dwa rodzaje rekombinacyjnie aktywne sekwencji:
 - uniwersalne – wykazujące zdolność do indukowania przeskoków rekombinacyjnych polimeraz pochodzących z różnych typów czy rodzin wirusowych,
 - wirusowo-specyficzne – aktywne wobec polimeraz kodowanych przez pokrewne wirusy (np. sekwencje promotoro-podobne czy duplety).
9. Szczegółowa analiza motywów strukturalnych, wspierających miejscowo-specyficzne przeskoki HIV-1 RT, dała podstawy do stworzenia całkowicie nowego systemu rekombinacyjnego, nazwanego systemem helperowym. Zastosowano w nim wspomagającą cząsteczkę RNA/DNA, stanowiącą platformę, dzięki której może dojść do precyzyjnego przeniesienia polimerazy z cząsteczki donorowej na akceptorową. Opracowany system pozwala łączyć jednoniciowe cząsteczki DNA i RNA na drodze rekombinacji zachodzącej zgodnie z modelem wybiórczego kopiowania.
10. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że modyfikując strukturę RT, można wpływać na częstość przeskoków rekombinacyjnych. Ponieważ niektóre z wprowadzonych mutacji inaczej wpływały na rekombinację homologiczną i niehomologiczną, należy przypuszczać, że inny jest mechanizm molekularny obydwu procesów. Wydaje się, że stabilność kompleksu replikacyjnego, szczególnie oddziaływań RT-nic potomna, nie odgrywa kluczowej roli podczas rekombinacji homologicznej, jest natomiast bardzo istotna w trakcie rekombinacji niehomologicznej.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Abbink T. E. M., Berkhout B. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278:11601-11611.
2. Alejska M., Kurzyńska-Kokorniak A., Broda M., Kierzek R., Figlerowicz M. (2001) *Acta Biochimica Polonica* 48:391-407.
3. Alejska M., Malinowska N., Figlerowicz, M. (2004) Two different mechanisms of non-homologous RNA recombination in brome mosaic virus [w przygotowaniu].
4. Anderson J. A., Teufel R. J., Yin P. D., Hu W.-S. (1998) *J Virol.* 72 (2):1186-1194.
5. Antoni B. A., Stein S. B., Rabson A. B. (1994) *Adv. Virus. Res.*, 43, 53-145.
6. Arthur L. O., Bess J. W., Sowder R. C. Benveniste R. E., Chermann J., Henderson L. E., (1992) *Science*, 258:1935-1938.
7. Barklis E., Mulligan R. C., Jaenisch R. (1986) *Cell*, 47:391-399.
8. Barre-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., i wsp. (1983) *Science*, 220:868-871.
9. Batschelet E., Domingo E., Weissmann C. (1976) *Gene*, 1:27-32.
10. Bebenek K., Abbotts J., Roberts J. D., Wilson S. H., Kunkel T. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264:16948-16956.
11. Bebenek K., Kunkel T. A. (1993) in: Skalka A. M., Goff S. P., eds. *Reverse transcriptase*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 85-102.
12. Beernes N., Berkhout B. (2002) *J. Virol.* 76:2329-2339.
13. Ben-Artzi H., Shemesh J., Zeelon E., Amit B., Kleiman L., Gorecki M., Panet A. (1996) *Biochemistry*, 35:10549-10557.
14. Berkhout B., Ooms M., Beerens N., Huthoff H., Southern E., Verhoef K. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277:19967-19975.
15. Berkhout B., van Hemert F. J. (1994) *Nucleic Acid Res.*, 22:1705-1711.
16. Berkhout B., van Hemert F. J. (1994) *Nucleic Acid Res.*, 22:1705-1711.
17. Berkhout B., van Wamel J. L. B. (2000) *RNA*, 6:282-295.
18. Berkhout B., Vastenhouw N. L., Klasens B. I. F., Huthoff H. (2001) *RNA*, 7:1097-1114.
19. Bolognesi D. P., Montelaro R. C., Frank H., Schafer W. (1978) *Science*, 199:183-186.

20. Bowerman B., Brown P. O., Bishop J. M., Varmus H. E. (1989) *Genes Dev.*, 3:469-478.
21. Casey J. L., Gerin J. L. (1995) *J. Virol.*, 69:7593-7600.
22. Cattaneo R. (1994) *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 4:895-900.
23. Charneau P., Alizon M., Clavel F. (1992) *J. Virol.* 66:2814-2820.
24. Charneau P., Clavel F. (1991) *J. Virol.* 65:2415-2421.
25. Charneau P., Mirambeau G., Roux P., Paulous S., Buc H., Clavel F. (1994) *J. Mol. Biol.* 241:651-662.
26. Cherrington J., Ganem D. (1992) *EMBO J.*, 11:1513-1524.
27. Chetverin A. B. (1997) *Seminars in Virology*, 8:121-129. A
28. Chetverin A. B., Chetverina H. V., Demidenko A. A., Ugarov V. I. (1997) *Cell*, 88:503-513.
29. Coffin J. M. (1979) *J. Gen. Virol.*, 199, 47-59.
30. Coffin J. M., Haase A., Levy J. A., i wsp. (1986) *Science*, 232:697.
31. Coffin J. M. (1979) *J. Gen. Virol.*, 199:47-59.
32. Corbet S., i wsp. (2000) *J. Virol.*, 74:529.
33. Covey S. N., Al-Kaff N. S., Langara A., Turner D. S. (1997) *Nature* 385:781-782.
34. Cullen B. R., Greene W. C. (1989) *Cell*, 58:423-426.
35. Curtis T., *Rolling Stone* (no. 626) 54 (1992); B. F. Elswood and R. B. Stricker, (1997) *Med. Hypotheses*, 48:193; E. Hooper, *The River: A Journey to the Source of HIV and AIDS* (Little, Brown, New York, 1999).
36. DeZazzo J. D., Scott J. M., Imperiale M. J. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, 12, 5555-5562.
37. Domingo E., Escarmis C, Sevilla N, Baranowski E. (1998) *Adv. Exp Med & Biol*, 440:721-727.
38. Domingo E., Flavell R. A., Weissmann C. (1976) *Gene*, 1:3-25.
39. Domingo E., Holland J., Biebricher C., Eigen M. (1995) In: Gibbs AG, Calisher CH, Garcia-Arenal F, editors. *Molecular Basis of Virus Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press. 1995. pp. 181-191.
40. Domingo E., Sabo D., Taniguchi T., Weissmann C. (1978) *Cell*, 13:735-744.
41. Doublet S., Sawaya M. R., Ellenberger T (1999) *Structure*, 7:R31-R35.
42. Drake J. W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J., F. (1998) *Genetics*, 148:1667-1686.

43. Drake J. W., Holland J. J. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:13910-13913.
44. Eigen M., McCaskill J., Schuster P. (1988) *J Phys. Chem.*, 92:6881-6891.
45. Eigen M., Schuster P. (1977) *Naturwissenschaften*, 64:541-565.
46. Eigen M. (1996) *Trends Microbiol.*, 4: 216-217.
47. Elena S. F., Moya A. (1999) *J Evol. Biol.*, 12:1078-1088.
48. Farnet C. M., Haseltine W. A. (1991) *J. Virol.*, 65:1910-1915.
49. Felder M.-P., Laughier D., Yatsula B., Dezelee P., Calothy G., Marx M. (1994) *J. Virol.*, 68:4759-4767.
50. Figlerowicz M. (2000) *Nucleic Acid Res.*, 28:1714-1723.
51. Figlerowicz M., Alejska M., Kurzynska-Kokorniak A., Figlerowicz M. (2003) *Med. Res. Rev.*, 23:488-518.
52. Figlerowicz M., Bibiło A. (2000) *RNA*, 6:339-351 A.
53. Figlerowicz M., Bujarski J. J. (1997) *Postępy Biochemii*, 43:257-266.
54. Figlerowicz M., Nagy P. D., Bujarski J. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:2073-2078 A.
55. Figlerowicz M., Nagy P. D., Tang N., Kao C. C., Bujarski J. J. (1998) *J. Virol.*, 72:9192-9200.
56. Franke E. K., Yuan H. E. H., Bossolt K. L., Goff S. P., Luban J. (1994) *J Virol*, 68:5300-5305.
57. Gallo R. C., Salahuddin S. Z., Popovic M., i wsp. (1984) *Science*, 224:500-503.
58. Gao F., i wsp. (1999) *Nature*, 397:436.
59. Gardner M. B., Enders M, Barry P. A. (1994) In: Levy J. A. ed. *The retroviridae*. New York: Plenum Press 1994:133-276.
60. Georges-Courbot M. C., i wsp. (1998) *J. Virol.* 72:600.
61. Glickman B. W., Saddi V. A., Curry J. (1994) *Mutat. Res.*, 304, 19-32.
62. Goff S. J., Skalka A. M. (1993) eds. *Reverse transcriptase*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
63. Goff S. (1992) *Annu. Rev. Genet.*, 26:527-544.
64. Gonder M. K., i wsp. (1997) *Nature*, 388:337.
65. Götte M., Fackler S., Hermann T. i wsp. (1995) *EMBO J.*, 14:833-841.
66. Götte M., Li X., Wainberg M. A. (1999) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 365:199-210.
67. Green A. M., Allison R. F. (1994) *Science* 1994, 263:1423-1425.

68. Hahn H., Shaw G. M., De Cock K.M., Sharp P. M. (2000) *Science*, 287, 607-614.
69. Hajjar A. M., Linial M. L. (1995) *J. Virol.*, 69:5878-5882.
70. Henderson L. E., Sowder R., Copeland T. D., Oroszlan S., Arthur L. O., Robey W. G., Fischinger P. J. (1987) *J Virol*, 61:629-632.
71. Hirsch V. M., Olmsted R. A., Murphey-Corb M., Purcell R. H., Johnson P. R. (1989) *Nature*, 339:389.
72. Hirst G. K. (1962) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27:303-309.
73. Holland J., DelaTorre J. C., Steinhauer D. A. (1992) In: Holland J, editor. *Genetic Diversity of RNA Viruses*. Springer Verlag, pp.1-20.
74. Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., van de Pol S. (1982) *Science*, 215:1577-1585.
75. Hostomsky Z., Hostomska Z., Hudson G. O., Woomaw E. W., Nodes B. R. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:1148-1152.
76. Hrды D. B. (1987) *Rev. Infect. Dis.*, 9:1109; Sonnet J., *Scand. J. (1987) Infect. Dis.*, 19:511.
77. Hu W. S., Temin H. M. (1990) *Science*, 250:1227-1233.
78. Huet T., Cheynier R., Meyerhans A., Roelants G., Wain-Hobson S. (1990) *Nature*, 345:356.
79. Huthoff H., Berkhout B. (2001) *RNA*, 7:143-157.
80. Jacobo-Molina A., Clark A. D. Jr., Hughes St., H., Arnold E. i wsp. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10895-10899.
81. Jacobo-Molina A., Clark A. D. Jr., Hughes St., H., Arnold E. i wsp. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:6320-6324.
82. Jin M. J., i wsp. (1994) *EMBO J.*, 13:2935.
83. Jones K. A., Peterlin B. M. (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 717-743.
84. Joyce C. M. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:1619-1622.
85. Katz R. A., Skalka A. M. (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, 63:133-173.
86. Khatchikian D., Orlich M., Rott R. (1989) *Nature*, 340:156-157.
87. Kim T., Mudry R. A. Jr., Rexrode C. A., Pathak V. K. (1996) *J. Virol.*, 70:7594-7602.
88. Klarmann G. J., Yu H., Chen X., Dougherty J.P., Preston B. D. (1997) *J. Virol.* 71:9259-9269.

89. Klasens B. I. F., Das A. T., Berkhout B. (1998) *Nucleic Acid Res.*, 26:1870-1876.
90. Kohlstaedt L. A., Wang J., Friedman J. M., Rice P. A., Steitz T. A. (1992) *Science*, 256:1783-1790.
91. Kurzyńska-Kokorniak A., Jaskólski M., Figlerowicz M. (2002) *Biotechnologia*, 1(56):24-34.
92. Kurzyńska-Kokorniak A., Urbanowicz A., Jackowiak P., Jankowska A., Malinowska N., Alejska M., Figlerowicz M. (2003) *Annals of the Polish Chemical Society*, 2(1):104-109.
93. Lai M. M. (1995) *Annu Rev Biochem*, 64:259-286.
94. Lai M. M. (1992) *Microbiol. Rev*, 56:61-79.
95. Le Grice S. F. J., Naas T., Wohlgensinger B., Schatz O. (1991) *EMBO J.*, 10:3905-3911.
96. Ledinko N. (1963) *Virology*, 20:107-119.
97. Leis J., Ashok A., Cobrinik D. (1993) In *Reverse Transcriptase* (Skalka A. M., Goff S. P.) pp. 33-84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
98. Letvin N. L., Daniel M. D., Sehgal P. K. (1985) *Science*, 230:71-73.
99. Lukashov V. V., Goudsmit J. (2002) *Journal of Molecular Evolution*, 54:680-691.
100. MacIntyre R. J. (1985) *Molecular Evolutionary Genetics*.
101. Maddon P., J., McDougal J. S., Clapham P. R., Dalglish A. G., Jamal S., Weiss R. A., Axel R. (1988) *Cell*, 54:865-874.
102. Mangeat B., Turelli P., Caron G., Friedli M., Perrin L., Trono D. (2003) *Nature*, 424:99-103.
103. Mansky L. M., Temin H. M. (1995) *J. Virol.*, 69:5087-5094.
104. Mansky L. M., Temin H. M. (1995) *Retroviruses Meeting*, pp 319, 25-30 May 1995, Cold Spring Harbor, New York, USA. A
105. Mansky L. M. (1998) *J Gen Virol.*, 79:1337-1345.
106. Mark J., Kleiman L. (1997) *J. Virol.*, 71:8087-8095.
107. Marks P. A., Munn R. J., Joy K. I. (1988) *Lab. Invest.*, 58, 112-118.
108. Marquet R., Baudin F., Gabus C., Darlix J. L., Mougel M., Ehresman C., Ehresman B. (1991) *Nucleic Acid Res.*, 19:2349-2357.

109. Marschang P., Sodroski J., Wurzner R., Dierich M. P. (1995) *Eur J Immunol*, 25:285-290.
110. Mindich L., Qiao X., Onodera S., Gottlieb P., Strassman J. (1992) *J. Virol.*, 66:2605-2610.
111. Morin P. A., i wsp. (1994) *Science*, 265:1193.
112. Nermut M. V., Grief C., Hashmi S., Hockley D. J. (1993) *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 9:929-938.
113. Onodera S., Qiao X., Gottlieb P., Strassman J., Frilander M., Mindich L. (1993) *J Virol.*, 67:4914-4922.
114. Overbaugh J., Bangham Ch. R. (2001) *Science*, 292, 1106-1109.
115. Panganiban A. T., Fiore D. (1988) *Science*, 241:1064-1069.
116. Pathak V. K., Hu W.-S. (1997) *Seminars in Virology*, 8:141-150.
117. Pathak V. K., Temin H. M. (1992) *J. Virol.*, 66:3093-3100.
118. Peliska J. A., Benkovic S. J. (1992) *Science*, 258:1112-1118.
119. Plyusnin A., Kukkonen S. K. J., Plyusnina A., Vapalahti O., Vaheri A. (2002) 21:1497-1503.
120. Poiesz B. J., Ruscetti R. W., Gazdar A. F., Bunn P. A., Minna J. D., Gallo R. C. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:7415-7418.
121. Pomerantz R. J., Bagasra O., Baltimore D. (1992) *Curr. Opin. Immunol.*, 4:475-480.
122. Pringle C. R. (1965) *Virology*, 25:48-54.
123. Raba M., Limburg K., Burghagen M., Katze J. R., Simsek M., Heckman J. E., Rajbhandary U. L., Gross H. J. (1979) *Eur. J. Biochem.* 97:305-318.
124. Ratcliff F., Harrison B. D., Baulcombe D. C. (1997) *Science* 276:1558-1560.
125. Ratner L., Wong-Staal F., i wsp. (1985) *Nature* 313:277-284.
126. Ricchetti M., Buc H. (1990) *EMBO J.*, 9:1583.
127. Sakaguchi K., Zambrano N., Baldwin E. T., Shapiro B. A., Erickson J. W., Omichinski J. G., Clore G. M., Gronenborn A. M., Appella E. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:5219-5223.
128. Simon A. E., Bujarski J. J. (1994) *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32:337-362.
129. Smith D. B., McAllister J., Casino C., Simmonds P. (1997) *Journal of General Virology*, 78:1511-1519.
130. Stein B. S., Gowda S. D., Lifson J. D., Penhallow R. C., Bensch K. G., Engleman E. G. (1987) *Cell*, 49:659-668.

131. Steitz T. A. (1999) *Jurnal of Biol. Chem.* 25:17395-17398.
132. Stuhlmann H., Berg P. (1992) *J. Virol.*, 66:2378-2381.
133. Suzuki Y., Gojobori T., Nakagomi O. (1998) *FEBS Lett.*, 427:183-187.
134. Temin H. M. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:6900-6903.
135. Tiley L. S., Brown P. H., Cullen B. R. (1990) *Virology*, 178:560-567.
136. van Wamel J. L., Berkhout B. (1998) *Virology*, 244:245-251.
137. Varmus H., Brown P. (1989) In Howe M., Berg D., eds. *Mobile DNA*, Washington: ASM, 53-108.
138. Vogt P. K. (1971) In: *Possible Episomes in Eukaryotes*, (L. Sylvestri, Ed.) North-Holland, Amsterdam, pp. 35-41.
139. Voinnet O. (2001) *Trends Gen.* 17:449-459.
140. Wain-Hobson S., Vartanian J.P., Henry M., et. al. (1991) *Science*, 252:961-965.
141. Weiss C. D., König B., Müller H-J., Seidel H., Goody R. S. (1992) *Gene*, 111:183-197.
142. Whitcomb J. M., Huges S. M. (1992) *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 8:275-306.
143. Whitcomb J. M., Kumar R., Hughes S. H. (1990) *J. Virol.*, 64:4903-4906.
144. Williams K. J., Loeb L. A. (1992) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 176:165-180.
145. Wills J. W., Craven R. C. (1991) *AIDS*, 5:639-654.
146. Yoshida M., Miyoshi I., Hinuma Y. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:2031-2035.
147. Yu H., Jetzt A. E., Ron Y., Preston B. D., Dougherty J. P. (1998) *J Biol Chem.* 273 (43):28384-28391.
148. Zhang J., Temin H. M. (1993 A) *J. Virol.*, 67:1747-1751.
149. Zhang J., Temin H. M. (1993) *Science*, 259:234-238.
150. Zhang J., Temin H. M. (1994) *J. Virol.*, 68:2409-2414.