

mgr Rafał Kamiński

Analiza oddziaływań pomiędzy wirusowym białkiem Rev, cząsteczkami wirusowego RRE RNA i komórkowym czynnikiem Purα

Ludzki wirus upośledzenia odporności typu I (HIV-1, human immunodeficiency virus-1) jest złożonym retrowirusem, którego stosunkowo mały, składający się z około 9300-stu rybonukleotydów genom, koduje aż 15 różnych białek odpowiedzialnych za regulację cyklu replikacyjnego wirusa i budowę nowych wirionów. Dzięki procesowi alternatywnego splicingu, z pierwotnego transkryptu zsyntezowanego na matrycy prowirusowego DNA, powstają dodatkowe dwie klasy cząsteczek mRNA: całkowicie pozbawione intronów oraz zawierające jeden intron. Zwiększenie różnorodności kodujących cząsteczek mRNA powoduje zwiększenie liczby różnych produktów białkowych i tym samym pojemności genetycznej genomu wirusa. Transport do cytoplazmy cząsteczek mRNA które nie przeszły albo przeszły tylko częściowo proces splicingu, jest możliwy dzięki wirusowemu białku Rev (*Regulator of expression of viron proteins*). Białko Rev wiąże się specyficznie do sekwencji RRE (*Rev Responsive Element*) zlokalizowanej w ostatnim intronie wirusowego mRNA i kieruje powstały kompleks nukleoproteinowy na komórkową drogę eksportu jądrowego wykorzystywaną normalnie do przenoszenia rybosomowego RNA do cytoplazmy. Jako, że sekwencja RRE zawiera liczne powtórzenia GGN, które są znanym miejscem wiązania czynnika komórkowego jakim jest białko Purα, postanowiono przebadąć możliwość oddziaływania pomiędzy wirusowym białkiem Rev, RNA zawierającym RRE i komórkowym białkiem Purα. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że białko Purα należy do komórkowych partnerów wirusowego białka Rev. Nadekspresja białka Purα zwiększyła ilość wirusowego mRNA zawierającego RRE w cytoplazmie. Obniżenie ekspresji Purα, poprzez użycie specyficznego siRNA, obniżyło ekspresję zależnego od Rev wirusowego RNA. Oba białka współlokalizowały w rejonie przyjądrowym ztransfekowanych komórek. Oczyszczone białka fuzyjne GST-Rev i GST-Purα tworzyły kompleksy z zawartymi w lizatach komórkowych białkami Purα i Rev. Analiza tego wiązania przy użyciu mutantów delecyjnych wykazała, że Purα oddziałuje z Rev poprzez

swoją centralną domenę wiążącą kwasy nukleinowe a Rev poprzez domeny odpowiedzialne za tworzenie multimerów i wiązanie się do RNA. Immunoprecypitacja przy użyciu przeciwciała przeciwko Puro α wykazała obecność kompleksów Puro α :Rev w cytoplazmatycznych jak i jądrowych frakcjach komórkowych. Co więcej, podobnie jak białko Rev, białko Puro α wiązało się bezpośrednio do cząsteczek RRE RNA, a w obecności białka Rev tworzyło kompleksy o niższej ruchliwości elektroforetycznej niż te uzyskane dla pojedynczych białek (Rev:RRE i Puro α :RRE). Doświadczenia z użyciem immunoprecypitacji RNA ujawniły obecność kompleksów Puro α :RRE w frakcji cytoplazmatycznej, zwiększonych w obecności białka Rev. Uzyskane wyniki sugerują, że komórkowe białko Puro α bierze udział w cytoplazmatycznej fazie obróbki, zawierających introny, wirusowych cząsteczek mRNA. Poprzez oddziaływania z białkiem Rev, jak i bezpośrednio z zawierającymi sekwencję RRE wirusowymi cząsteczkami mRNA, Puro α stymuluje ekspresję zawartych w nich genów wpływając na poziom ekspresji niektórych białek wirusa. Jaki wpływ ten efekt ma na losy infekcji wirusem HIV-1 i czy regulacja poziomu białka Puro α może wpływać na ekspresję wirusa w zainfekowanych komórkach pozostaje do ustalenia.

Lista publikacji:

- **Kaminski R**, Darbinian N, Sawaya BE, Slonina D, Amini S, Johnson EM, Rappaport J, Khalili K and Darbinyan A; (2008) Puro α as a cellular co-factor of Rev/RRE-mediated expression of HIV-1 intron-containing mRNA; *J Cell Biochem.* 103(4) :1231-45
- **Kaminski R**, Darbinian A, Merabova N, Deshmane SL, White MK, Khalili K; (2008) Protective role of Puro α to cisplatin; *Cancer Biol Ther.* Dec 7(12):1926-35