



**Katarzyna Pachulska-Wieczorek**

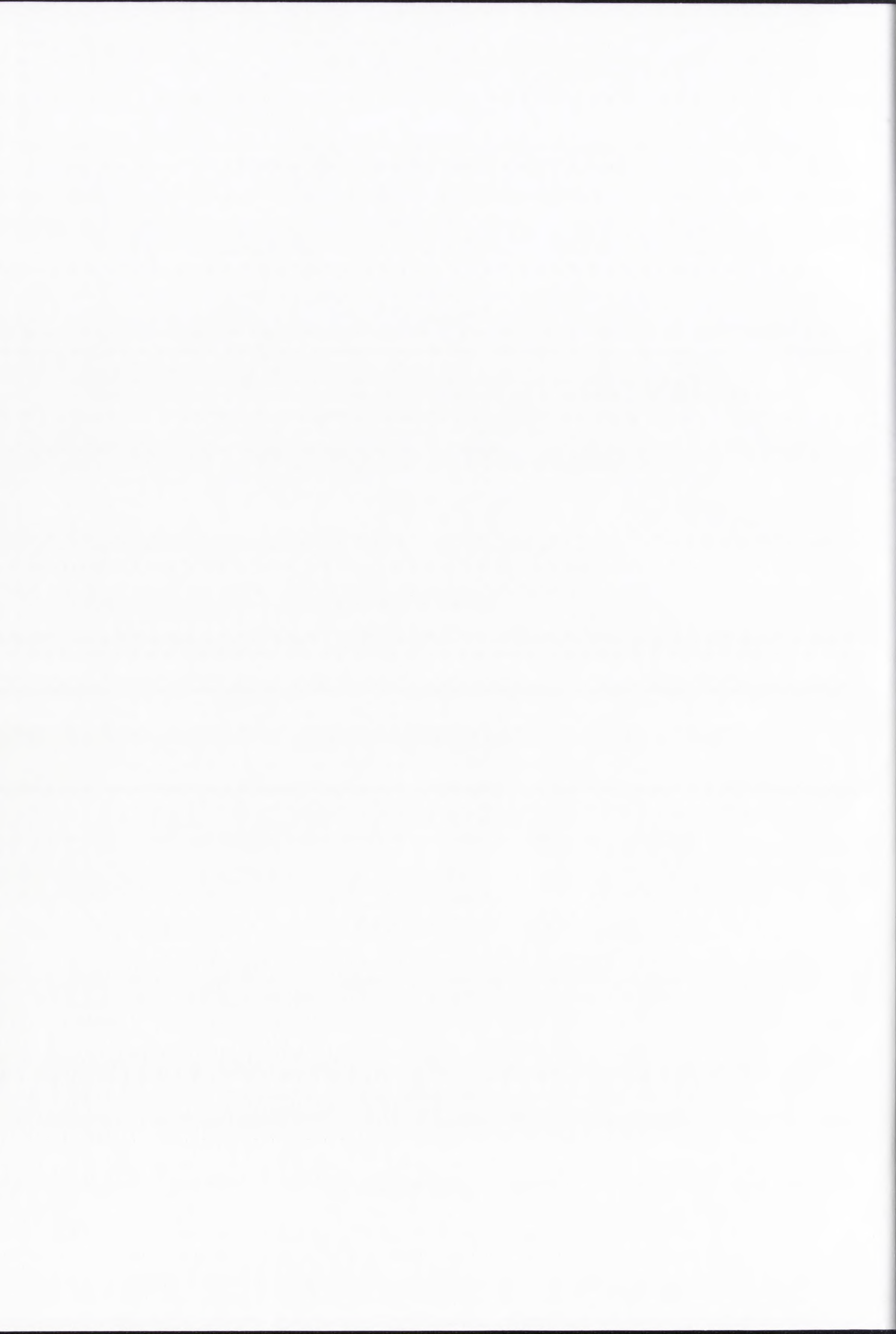
**REGION TAR LIDEROWEGO RNA WIRUSA HIV-2  
ORAZ JEGO ODDZIAŁYWANIE  
Z BIAŁKAMI TAT-2 I CYKLINĄ T1**

**Praca doktorska**

**Promotor pracy:  
Prof. dr hab. Ryszard W. Adamiak**

**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN  
Pracownia Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych**

Poznań, czerwiec 2006



*Panu Prof. Ryszardowi W. Adamiakowi dziękuję za opiekę naukową,  
wszechstronną pomoc i życzliwość w każdej sytuacji  
oraz zaraźliwy optymizm.*

*Mojej Serdecznej Przyjaciółce Katarzynie Purzyckiej dziękuję  
za nieocenioną pomoc w laboratorium i nie tylko.*

*Wszystkim Członkom Pracowni dziękuję za pomoc okazaną  
w trakcie realizacji tej pracy.*

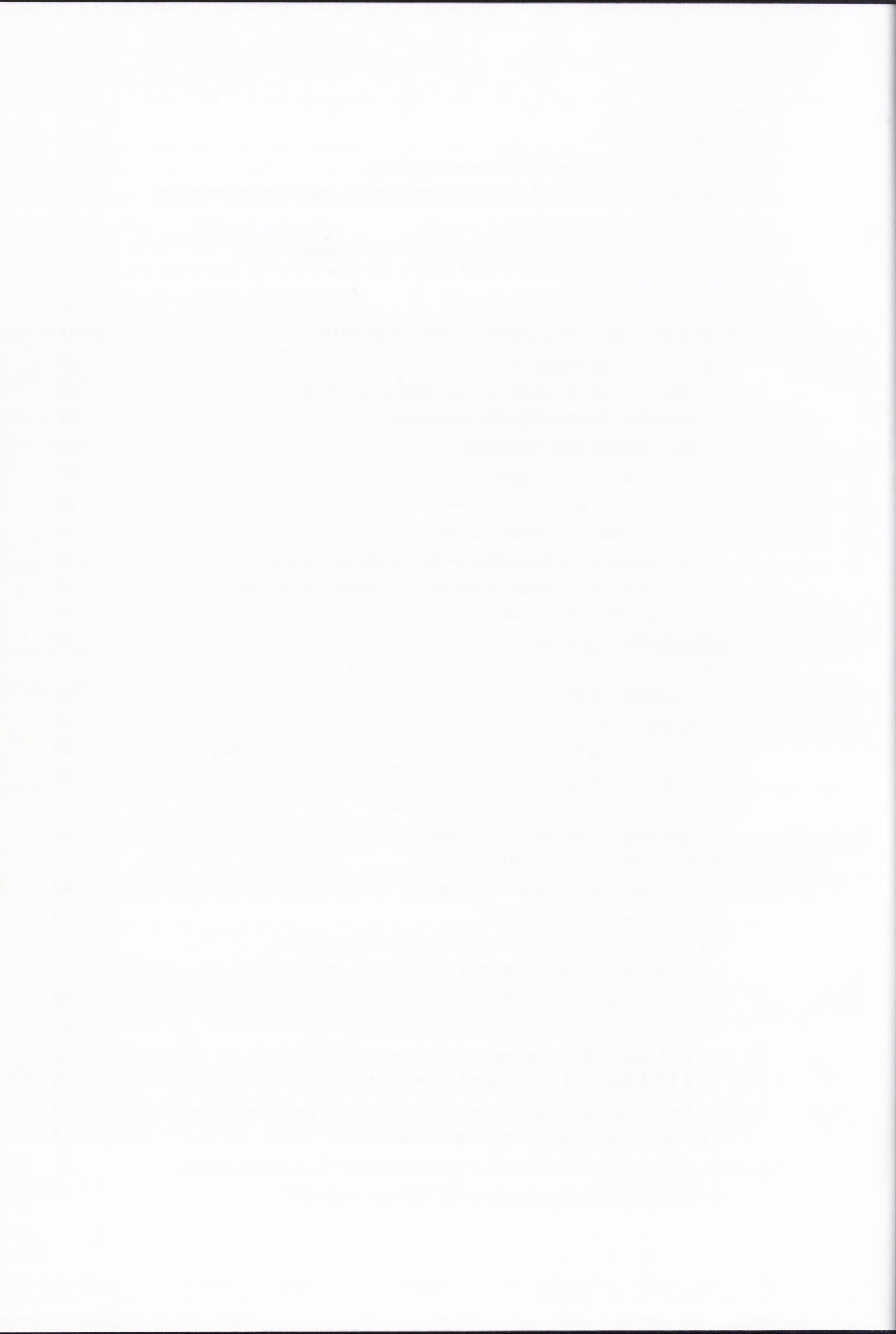
*Mojej Rodzinie, a w szczególności moim Rodzicom dziękuję  
za wiarę we mnie i wszystko co dla mnie zrobili  
i ciągle jeszcze chcą zrobić.*

*Wyjątkowe podziękowania składam  
Mojemu Wspaniałemu Mężowi Arkowi.*

BIBLIOTEKA  
INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ul. Noskowskiego 12/14  
61-704 POZNAŃ

D-156

<b>I. WPROWADZENIE</b>	<b>6</b>
<b>II. CEL PRACY</b>	<b>8</b>
<b>III. NAZEWNICTWO I SKRÓTY STOSOWANE W PRACY</b>	<b>9</b>
<b>IV. REGION TAR LIDEROWEGO RNA WIRUSA HIV-2 ORAZ JEGO ODDZIAŁYWANIE Z BIAŁKAMI TAT-2 I CYKLINĄ T1</b>	<b>11</b>
IV.1. Historia odkrycia HIV-2 - ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 2 oraz epidemiologia AIDS	11
IV.2. Biologia molekularna wirusa HIV-2	16
2.1. Budowa wironu oraz organizacja genomu wirusa HIV-2	16
2.2. Szkic cyklu życiowego wirusa HIV-2	20
2.3. Struktura i funkcja rejonu liderowego RNA wirusa HIV-2	23
2.3.1. Domena PBS - odwrotna transkrypcja	25
2.3.2. Domena TAR - transkrypcja	27
2.3.3. Domena SD - splicing	27
2.3.4. Domena poli(A) - poliadenylacja	29
2.3.5. Domena DIS - dimeryzacja genomowego RNA	30
2.3.6. Domeny $\Psi$ - pakowanie RNA do wirionów potomnych	32
IV.3. TAR RNA wirusa HIV-2 oraz jego oddziaływanie z białkiem Tat i cykliną T1	34
3.1. Struktura TAR RNA wirusa HIV-2	34
3.2. Białka Tat wirusów HIV	35
3.3. Od TAK do P-TEFb, czyli o identyfikacji istotnych dla procesu <i>trans</i> -aktywacji czynników komórkowych	37
3.4. Ludzka cyklina T1	39
3.5. Oddziaływanie TAR RNA z wirusowym białkiem Tat i ludzką cykliną T1	40
3.6. Rola TAR RNA, białka Tat i cykliny T1 w regulacji wirusowej transkrypcji	44
3.7. Inhibicja oddziaływania TAR / Tat / cyklina T1 jako droga poszukiwania nowych leków przeciwko AIDS	49
<b>V. WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH I ICH DYSKUSJA</b>	<b>53</b>
V.1. Analiza struktury drugorzędowej TAR-2 RNA	53
1.1. Otrzymywanie RNA do badań	53
1.2. Analiza komputerowa struktury drugorzędowej TAR-2 RNA	54
1.3. Analiza filogenetyczna TAR RNA wirusów HIV-2 i SIV	57
1.4. Analiza migracji TAR-2 RNA w żelu poliakryloamidowym w warunkach natywnych	58
1.5. Enzymatyczne i chemiczne mapowanie struktury TAR-2 RNA	61
1.5.1. Enzymatyczne mapowanie struktury TAR-2 RNA	62
1.5.2. Modyfikacja chemiczna TAR-2 RNA - DEPC	70
1.5.3. Mapowanie struktury TAR-2 RNA metodą cięć indukowanych jonami $Pb^{2+}$	72
1.6. Analiza oddziaływania TAR-2 RNA z jonami metali	77
V.2. Analiza oddziaływania TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2 i ludzką cykliną T1	82
2.1. Nadekspresja i oczyszczanie białek Tat-2 oraz cykliny T1	82



2.2. Analiza oddziaływania TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2	85
2.3. Analiza oddziaływania TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2 i ludzką cykliną T1	89
2.4. Analiza wiązania amidu argininy do TAR-2 RNA	93
<b>VI. PODSUMOWANIE</b>	<b>99</b>
<b>VII. MATERIAŁY I METODY</b>	<b>103</b>
VII.1. Materiały stosowane w badaniach	103
1.1. Odczynniki chemiczne i biochemiczne	103
1.2. Związki promieniotwórcze	103
1.3. Enzymy	103
1.4. Zestawy odczynników	103
1.5. Oligonukleotydy	103
1.6. Plazmidy	103
1.7. Szczepy bakteryjne	104
1.8. Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek	104
1.9. Stosowane bufony, roztwory i pożywki	104
VII.2. Ważniejsza aparatura stosowana w pracy	104
VII.3. Metody standardowe stosowane w pracy	107
3.1. Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	107
3.2. Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących	107
3.3. Elektroforeza kompleksów RNA / białko w żelu poliakryloamidowym	107
3.4. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	108
3.5. Elucja kwasów nukleinowych	108
3.6. Precypitacja kwasów nukleinowych	108
3.7. Trawienie RNA rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących	108
3.8. Hydroliza RNA formamidem	109
3.9. Elektroforeza jednokierunkowa białek w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS i barwienie żeli białkowych	109
3.10. Oznaczanie zawartości białka	109
VII.4. Opis metodyki badań własnych	110
4.1. Przygotowanie RNA do badań	110
4.1.1. Chemiczna synteza RNA	111
4.1.2. Otrzymywanie matrycowych DNA do reakcji transkrypcji <i>in vitro</i>	111
4.1.3. Transkrypcja <i>in vitro</i>	112
4.1.4. Znakowanie 5' końca RNA izotopem <sup>32</sup> P	113
4.2. Analiza migracji RNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących	113
4.3. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA	114
4.3.1. Enzymatyczne mapowanie struktury drugorzędowej RNA	114





4.3.2. Chemiczne mapowanie struktury RNA	114
4.3.3. Hydroliza RNA indukowana jonami $Pb^{2+}$	114
4.3.4. Hydroliza RNA indukowana jonami $Mg^{2+}$	115
4.3.5. Analiza produktów reakcji mapowania struktury RNA	115
4.4. Komputerowe przewidywania struktury drugorzędowej RNA	115
4.5. Eksperymenty kompetycyjnej inhibicji hydrolizy RNA indukowanej jonami $Pb^{2+}$	116
4.6. Nadekspresja i oczyszczanie wirusowego białka Tat-2 i ludzkiej cykliny T1	116
4.6.1. Transformacja komórek <i>E. coli</i>	116
4.6.2. Nadekspresja białek GST-Tat-2 i GST- hCycT1 303 w systemie <i>E. coli</i>	116
4.6.3. Oczyszczanie rekombinantowych białek Tat-2 i cykliny T1	117
4.7. Analiza migracji kompleksów RNA / Tat-2 i RNA / Tat-2 / cykliny T1 w żelach poliakryloamidowych w warunkach natywnych	117
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>119</b>



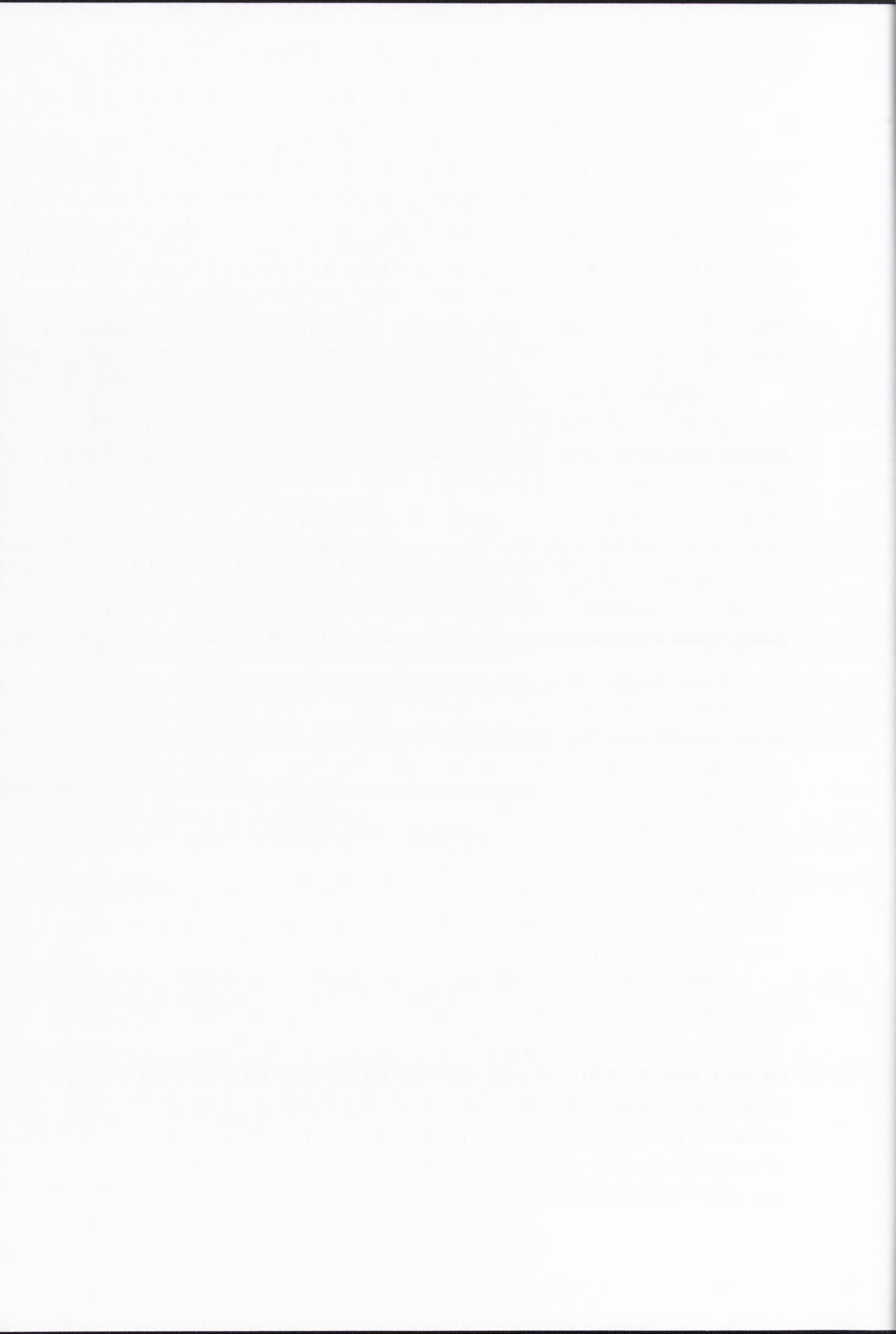
## I. WPROWADZENIE

Olbrzymie zagrożenie, jakie wywołała epidemia AIDS doprowadziło do skierowania poważnych środków finansowych na badania, które koncentrują się na zagadnieniach biologii molekularnej, biochemii i biologii strukturalnej HIV-1 oraz procesach inhibicji podstawowych mechanizmów molekularnych tego retrowirusa, celem projektowania potencjalnych farmaceutyków. Znacznie słabsze zaangażowanie w badania systemu HIV-2 może dziwić wobec silnego rozprzestrzenienia się tego wirusa w niektórych rejonach świata (1-4).

W odróżnieniu od HIV-1, który rozprzestrzenił się szybko na całym świecie, epidemia HIV-2 ograniczona jest głównie do tych terenów, gdzie wirus ten jest endemiczny (1;4-6). Ponadto, wirus HIV-2 jest znacząco mniej patogenny niż HIV-1 i wydaje się być osłabioną, łagodniejszą formą HIV-1 (1;5;7). HIV-2 jest za to znacznie bardziej patogenny, niż spokrewniony z nim wirus SIV (4;7;8). Dokładne poznanie różnic pomiędzy wirusami HIV-1 i HIV-2 może przyczynić się do wyjaśnienia natury silnej patogenności wirusa HIV-1, a w dalszej perspektywie znalezienia skutecznych metod leczenia AIDS oraz skierowanej przeciwko HIV szczepionki. Konieczne jest zatem zintensyfikowanie badań dotyczących samego wirusa HIV-2 jak i indukowanych przez niego infekcji u ludzi.

Dotychczasowe badania zmierzające do opanowania epidemii AIDS doprowadziły do wprowadzenia na rynek różnych leków, które w większości są ukierunkowane na inhibicję dwóch ważnych białek cyklu życiowego wirusów HIV: odwrotnej transkryptazy i proteazy (9-11). Bardzo istotnym problemem pozostaje poszukiwanie inhibitorów działających na innych etapach cyklu życiowego wirusa. Punktem wyjścia do tych badań musi być ustalenie podstaw mechanizmów i uczestniczących w nich struktur RNA i białek. Sądzono, że oddziaływanie TAR/Tat w obrębie systemu HIV jest dobrym celem dla poszukiwania inhibitorów. Teraz wiemy, że TAR RNA uwikłany jest w cały wachlarz oddziaływań z białkami retrowirusowymi oraz komórki gospodarza, jednym z nich jest ludzka cyklina T1 oddziałująca z TAR RNA w kompleksie z wirusowym białkiem Tat (12;13).

Wiek XXI będzie zapewne wiekiem odkrywania i poznawania niekodujących cząsteczek RNA. Coraz więcej dowiadujemy się na temat ich struktury i funkcji, powoli odkrywając ogromny potencjał RNA. Niekodujące rejony RNA odgrywają również kluczową rolę w cyklu życiowym retrowirusów, takich jak HIV-1 i HIV-2 (14-16). Problematyka niniejszej pracy dotyczy analizy struktury i funkcji niekodującego rejonu RNA wirusa HIV-2, nazwanego rejonem liderowym. W szczególności koncentruje się ona na znajdującej się na 5' końcu rejonu liderowego domenie TAR-2 RNA (ang. *trans-activator responsive region*) oraz na poznaniu istotnych aspektów strukturalnych oddziaływania TAR-2



z wirusowym białkiem Tat-2 i ludzką cykliną T1. Oddziaływania te zostały dość dokładnie zbadane dla wirusa HIV-1, jednak w przypadku HIV-2 wiadomo niewiele. Większość badaczy zakłada, że oddziaływania TAR / Tat / cyklina T1 u wirusa HIV-2 są analogiczne do HIV-1, z drugiej strony wiadomo jednak, że często jest to zbyt daleko idące uproszczenie.

Dynamiczny charakter struktury RNA związany jest z funkcją jaką pełni on w komórkach żywych organizmów oraz u wirusów. W związku z tym, najważniejszym osiągnięciem tej pracy doktorskiej wydaje się być udowodnienie, że TAR RNA wirusa HIV-2 występuje w formie dwóch alternatywnych struktur globalnych. Tym bardziej, że jest to pierwsze takie doniesienie. Dotychczas postulowano bowiem, że pomimo dynamicznej struktury rejonu liderowego wirusów HIV, znajdujący się na jego 5' końcu TAR-2 RNA przyjmuje tylko jedną strukturę drugorzędową z trzema charakterystycznymi motywami spinkowymi (17-19). Zaproponowanie nowej struktury TAR-2 RNA rodzi pytanie o jej biologiczną funkcję i na to pytanie w ramach niniejszej pracy starałam się znaleźć, choć częściową odpowiedź.

Przedstawianą pracę doktorską wykonałam w Pracowni Chemii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem Prof. dr hab. Ryszarda W. Adamiaka.

Moje badania prowadziłam w ramach następujących projektów badawczych promotora:

- „Struktura, właściwości i równowagi konformacyjne cząsteczek RNA w warunkach zwiększonego, względem fizjologicznego, stężenia soli w roztworze”, KBN 7T09A 097 20 (2003 – 2005)
- „Region TAR liderowego RNA wirusa HIV-2 oraz jego oddziaływanie z białkami Tat-2 i cykliną T1”, KBN (promotorski) 2 P04A 061 26 (2004 – 2006)
- Subsydium Profesorskie FNP dla Prof. dr hab. Ryszarda W. Adamiaka „Struktura liderowego RNA HIV-2 i jej dostępność dla specyficznej degradacji według mechanizmu RNAi w świetle terapii AIDS”, (2004-2007)
- „Równowagi konformacyjne i struktury przestrzenne niskiej rozdzielczości domen TAR-2 (nt+1-124) oraz TAR-2+poli(A) (nt+1-184) liderowego RNA genomu wirusa HIV-2 w świetle dostępności dla specyficznej degradacji według mechanizmu siRNA”, KBN 3 T09A 014 29 (2005-2007)

Większość uzyskanych przeze mnie wyników została zawarta w publikacjach:

1. Pachulska-Wieczorek, K., Purzycka, K.J. and Adamiak, R.W. (2006) New, extended hairpin form of the TAR-2 RNA domain points to the structural polymorphism at the 5' end of the HIV-2 leader RNA. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2984-2997.
2. Kulinski, T., Olejniczak, M., Huthoff, H., Bielecki, L., Pachulska-Wieczorek, K., Das, A.T., Berkhout, B. and Adamiak, R.W. (2003) The apical loop of the HIV-1 TAR RNA hairpin is stabilized by a cross-loop base pair. *J Biol Chem.*, **278**, 38892-38901.

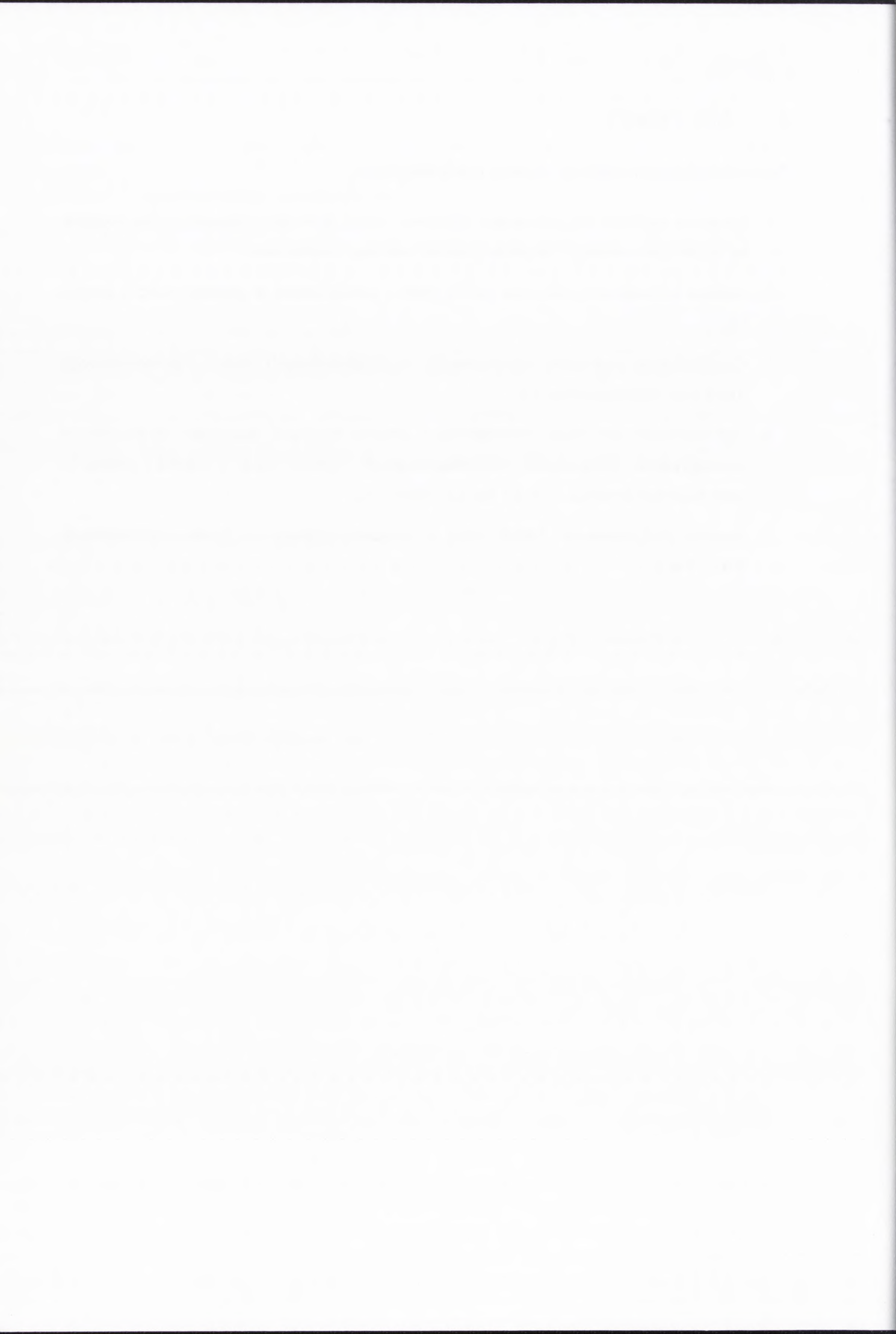


## II. CEL PRACY

Celem moich badań podjętych w pracy doktorskiej było:

1. Ustalenie struktury drugorzędowej 123-meru TAR-2 RNA oraz izolowanych fragmentów tej cząsteczki metodami degradacji enzymatycznej i chemicznej,
2. Analiza oddziaływań 123-meru TAR-2 RNA z jonami metali w szczególności z jonami  $Mg^{2+}$ ,
3. Optymalizacja procedury otrzymywania rekombinantowych białek: retrowirusowego Tat-2 oraz ludzkiej cykliny T1,
4. Optymalizacja warunków formowania i analiza istotnych aspektów strukturalnych oddziaływania kompleksów dwuskładnikowych TAR-2 / Tat-2 i TAR-2 / cyklina T1 oraz trójskładnikowych TAR-2 / Tat-2 / cyklina T1,
5. Analiza oddziaływania TAR-2 RNA z amidem argininy – model oddziaływania TAR / Tat-2.





### III. NAZEWNICTWO I SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

Poniżej przedstawiam alfabetyczną listę nazw i skrótów najczęściej używanych w pracy wraz z ich wyjaśnieniami.

AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności (ang. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
ARM	motyw białkowy bogaty w reszty argininowe (ang. <i>arginine-rich motif</i> )
BCA	metoda oznaczania zawartości białka oparta o stosowanie kwasu bicianchinowego (ang. <i>bicinchoninic acid protein assay</i> )
BSA	albumina z surowicy bydłej (ang. <i>bovine serum albumine</i> )
CDK	kinaza cyklino-zależna (ang. <i>cyclin dependent kinase type 9</i> )
DIS	domena kluczowa dla inicjacji procesu dimeryzacji, znajdująca się w rejonie liderowym RNA wirusów HIV (ang. <i>dimer initiation site</i> )
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DTT	ditiotreitol
EMSA	technika opóźnionej migracji kompleksów w żelu (ang. <i>electrophoretic mobility shift assay</i> )
GST	S-transferaza glutationowa (ang. <i>glutathione S-transferase</i> )
HEXIM	białko stanowiące komponent nieaktywnego kompleksu P-TEFb
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i> )
IPTG	izopropyl β-D-tiogalaktopiranozyd
LTR	długie powtórzenia sekwencji DNA na obu końcach genomu retrowirusów (ang. <i>long terminal repeat</i> )
MALDI-TOF	jonizacja przez resorpcję laserową w stałej matrycy - czas przelotu (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight</i> )
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> )
N-TEF	negatywny czynnik elongacji transkrypcji (ang. <i>negative - transcription elongation factor</i> )
PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
PBS	sekwencja RNA wiążąca starterowy tRNA (ang. <i>primer binding site</i> ) podczas odwrotnej transkrypcji wirusów HIV lub cała domena rejonu liderowego zawierająca sekwencję PBS
PCR	reakcja łańcuchowej polimeryzacji (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )
PMSF	fluorek fenylometylosulfonowy
poli(A)	domena RNA rejonu liderowego HIV zawierający sygnały poliadenylacji 3' końca mRNA (ang. <i>polyadenylation site</i> )
P-TEFb	aktywujący czynnik elongacji transkrypcji typu b (ang. <i>positive - transcription elongation factor type b</i> )
RNA	kwas rybonukleinowy
RRE	znajdujący się w obrębie genu <i>env</i> wirusowego mRNA charakterystyczny motyw oddziałujący z białkiem Rev (ang. <i>Rev responsive element</i> )
SBTI	inhibitor proteaz z nasion soi (ang. <i>soybean trypsin inhibitor</i> )
SIV	małpie wirusy niedoboru odporności (ang. <i>simian immunodeficiency virus</i> ) pochodzące m.in. od mangaby szarej (SIV <sub>sm</sub> ), szympansów (SIV <sub>cpz</sub> ), afrykańskiej



	małpy zielonej (SIV <sub>agm</sub> ), makaków (SIV <sub>mac</sub> ) oraz mandryli (SIV <sub>mnd</sub> )
SD	domena rejonu liderowego HIV odgrywająca istotną rolę w regulacji procesu splicingu (ang. <i>major splice donor site</i> )
TAK	kinaza związana z białkiem Tat (ang. <i>Tat-associated kinase</i> ), nazywana wcześniej PITALRE
TAR	domena RNA rejonu liderowego HIV wiążąca białko Tat (ang. <i>trans-activator responsive region</i> )
Tat	białko trans-aktywatorowe (ang. <i>trans-activator</i> )
TF	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>transcription factor</i> )
TRM	kluczowa dla oddziaływania z białkiem Tat i TAR RNA sekwencja aminokwasowa ludzkiej cykliny T1 (ang. <i>TAR/Tat recognition motif</i> )
USE	charakterystyczna dla wirusów RNA sekwencja RNA wzmacniająca poliadenylację mRNA (ang. <i>upstream enhancer</i> )
UTR	niepodlegające translacji końcowe rejonu RNA (ang. <i>untranslated region</i> )
ψ	domeny RNA rejonu liderowego HIV istotne dla formowania wirionów potomnych

W przypadku terminów pochodzących z języka angielskiego, co do których wystąpił problem wyboru polskich odpowiedników stosowałam nazewnictwo zgodne z polskim tłumaczeniem podręcznika Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002) „Biochemia”, przekład zbiorowy pod redakcją Szwejkowska-Kulińska, Z., Jarmołowski, A. (2005) PWN, Warszawa.

Poniżej przedstawiam przykłady najczęściej stosowanych terminów:

kap – ang. *cap*

egzon – ang. *exon*

splicing – ang. *splicing*



## IV. REGION TAR LIDEROWEGO RNA WIRUSA HIV-2 ORAZ JEGO ODDZIAŁYWANIE Z BIAŁKAMI TAT-2 I CYKLINĄ T1

### IV.1. HISTORIA ODKRYCIA HIV-2 - LUDZKIGO WIRUSA NIEDOBORU ODPORNOŚCI TYPU 2 ORAZ EPIDEMIOLOGIA AIDS

W 1985 u grupy zdrowych Senegalczyków opisano występowanie przeciwciał o wysokim powinowactwie do wirusa SIV (ang. *simian immunodeficiency virus*) (20). Spokrewniony z SIV, ludzki wirus niedoboru odporności - HIV-2 (ang. *human immunodeficiency virus*), został wyizolowany po raz pierwszy w 1986 roku z krwi pacjentów pochodzących z Gwinei – Bissau, czyli w trzy lata od odkrycia wirusa HIV-1 (21). HIV-1 i HIV-2 są jedynymi znanymi ludzkimi lentiwirusami, ale należą do dwóch różnych grup genetycznych spośród czterech wyodrębnionych dla lentiwirusów (2;22). Wirus HIV-2 jest znacznie bliżej spokrewniony z niektórymi wirusami SIV, występującymi u mangaby szarej (SIV<sub>sm</sub>) i makaków (SIV<sub>mac</sub>), niż z HIV-1 (1;7). Wirusy te cechuje wysokie pokrewieństwo filogenetyczne i podobna organizacja genomu (w tym typowy tylko dla HIV-2 i pewnych wirusów SIV gen *vpx*) oraz wspólny geograficzny obszar występowania (2;8;22;23). Pomimo, że HIV-1 i HIV-2 kodują prawie identyczny zestaw białek, to na poziomie sekwencji kwasów nukleinowych wykazują zaledwie 40% podobieństwo, podczas gdy analogiczne podobieństwo pomiędzy HIV-2 i SIV wynosi 75% lub więcej (23;24).

Dla HIV-1 wyodrębniono trzy różne grupy filogenetyczne M, N i O, (rys. IV.1) przy czym najsilniej rozpowszechnione są podtypy należące do grupy M (3). W przypadku HIV-2 wyodrębniono siedem podtypów filogenetycznych (A – G). Podtypy A i B są reprezentowane przez liczne szczepy i są epidemiologiczne, podczas gdy podtypy C – G nie indukują epidemii i poza podtypem D, do którego należą dwa szczepy, każdy z nich reprezentowany jest przez zaledwie jeden szczep wirusa. Większość infekcji wirusem HIV-2 związana jest z podtypem A wirusa (HIV-2A), który jest dominujący w Gwinei – Bissau oraz w Europie (głównie Portugalia), do tego podtypu należy najbardziej rozpowszechniony szczep wirusa, HIV-2<sub>rod</sub>. Podtyp HIV-2B wydaje się mieć swoje źródła w wschodniej części Afryki zachodniej (Guana i Wybrzeże Kości Słoniowej) (2;25;26).

HIV-2 był pierwszym ludzkim lentiwirusem, dla którego wykazano, że wywodzi się od wirusa SIV, dokładniej SIV<sub>sm</sub> (8). Wirus SIV<sub>sm</sub>, jest dość powszechny u mangaby szarej i w niektórych stadach zainfekowanych jest nawet 22% osobników (4). W niektórych krajach Afryki zachodniej młode mangaby często traktowane są jako zwierzęta domowe, natomiast mięso osobników starszych jest powszechnie spożywane. Powodowało to częsty kontakt człowieka z zainfekowanymi zwierzętami i prawdopodobnie stało się bezpośrednią przyczyną międzygatunkowej transmisji wirusa SIV<sub>sm</sub>. Chociaż wszystkie podtypy HIV-2 wywodzą się od wirusa SIV<sub>sm</sub>, to na podstawie analizy filogenetycznej wykazano, że każdy z nich został

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities related to the business.

2. It then goes on to describe the various methods and techniques used to collect and analyze data, including surveys, interviews, and focus groups.

3. The next section covers the process of identifying and defining research objectives, as well as the selection of appropriate research methods and tools.

4. This is followed by a detailed discussion of the data collection process, including the design of questionnaires and the implementation of field studies.

5. The final part of the document focuses on the analysis and interpretation of the collected data, highlighting the various statistical techniques used to draw meaningful conclusions.

6. Throughout the document, the author emphasizes the need for a systematic and rigorous approach to research, ensuring that the results are reliable and valid.

7. The document also provides practical advice and tips for researchers, such as how to manage time effectively and how to communicate research findings clearly.

8. In conclusion, the document serves as a comprehensive guide for anyone interested in conducting research, providing a clear and structured framework for the entire process.

9. The author hopes that this document will be a valuable resource for researchers and students alike, helping them to navigate the complexities of research with confidence and ease.

10. Finally, the author expresses their gratitude to the many individuals and organizations that have supported their work and provided valuable feedback throughout the process.

11. The document is intended to be a living document, and the author invites readers to provide their own feedback and suggestions for future editions.

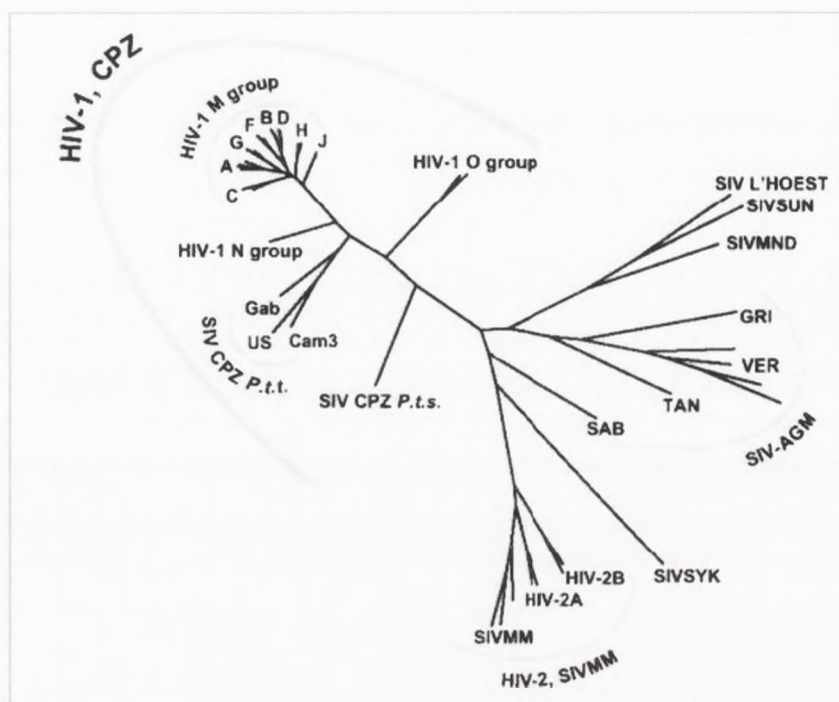
12. The author also acknowledges the limitations of the document and encourages readers to consult other sources and experts in the field for more detailed information.

13. The document is a product of the author's own research and experience, and it is intended to provide a unique perspective on the research process.

14. The author believes that research is a fundamental part of our lives, and it is our responsibility to ensure that it is conducted in a responsible and ethical manner.

15. The document is a testament to the power of research to uncover new insights and advance our understanding of the world around us.

wprowadzony do populacji ludzkiej niezależną drogą międzygatunkowej transmisji (4;8;25;26). Wirusy SIV nie indukują AIDS u swoich naturalnych gospodarzy, a nazwanie ich wirusami niedoboru odporności wynika jedynie z podobieństwa do wirusów HIV. Jednak ich transmisja do innych gatunków naczelnych, w tym człowieka, często powoduje, że stają się one chorobotwórcze (4;8).



**Rysunek IV 1.** Schemat reprezentujący pokrewieństwo filogenetyczne lentiwirusów występujących u naczelnych. Analiza na podstawie sekwencji silnie konserwatywnego genu *pol* (2).

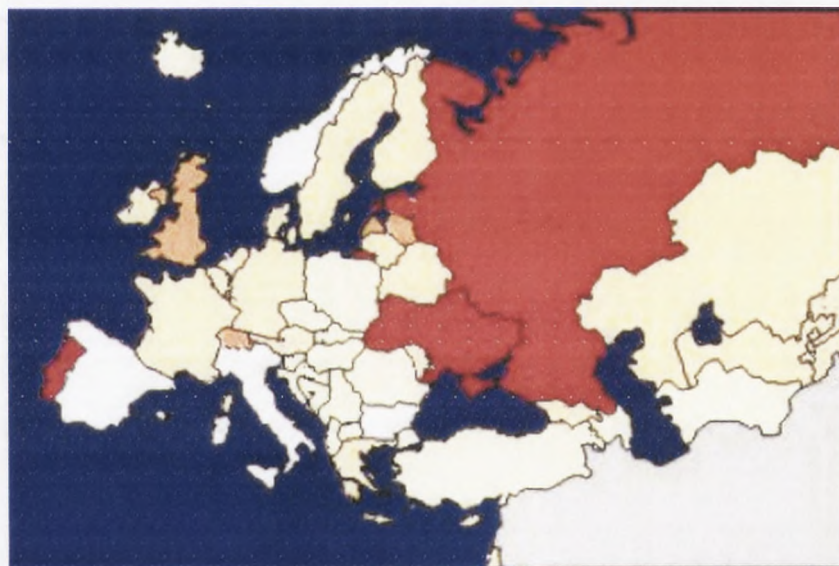
Według oficjalnych statystyk, na koniec 2005 roku na całym świecie żyło około 39 milionów ludzi zakażonych wirusami HIV, z czego ponad 25 milionów w Afryce Subsaharyjskiej ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)). W tym samym roku z powodu AIDS zmarły prawie 3 miliony osób. Szacuje się, że od 1981 roku z powodu AIDS zmarło około 30 milionów osób. Według aktualnych oficjalnych statystyk Krajowego Centrum ds. AIDS, w Polsce do czerwca 2006 odnotowano 10150 zarażeń wirusem HIV-1, z czego 1778 osób zachorowało na AIDS, zmarło 816 chorych. Nie ma danych na temat zarażeń wirusem HIV-2 w Polsce.

HIV-1 rozpowszechniony jest na całym świecie, jednak za epicentrum infekcji uważana jest Afryka wschodnia (4;7). W ostatnich latach znaczący wzrost zakażeń odnotowano w Rosji i na Ukrainie oraz w krajach dawnej Jugosławii, a także na terenach południowej i południowo-wschodniej Azji, jak Chiny czy Indie. Problem HIV-2 dotyczy w głównej mierze terenów Afryki zachodniej oraz Portugalii, gdzie wirus ten ma charakter endemiczny (2;5;6;27). Przypuszcza się, że do pierwszych zakażeń wirusem HIV-2 doszło najprawdopodobniej około 1966 roku (27). Ustalenie procentowego udziału zakażeń wirusem





HIV-2 w ogólnej liczbie zakażeń renowirusami u ludzi nie jest łatwe i różne źródła podają rozbieżne dane. Pewne jest jednak, że największy odsetek zakażeń HIV-2 odnotowano na terenie Gwinei – Bissau, stanowiącej dawną kolonię portugalską i wynosi on około 14% (1). W sąsiadujących krajach jak Gambia, Senegal czy Gwinea jest on wyraźnie niższy – 1 do 2%, jednak w niektórych środowiskach, szczególnie tych związanych z prostytutką dochodzi do 28%. Znaczącą liczbę zakażeń HIV-2 odnotowano również w krajach, które łączyły z Portugalią dawne społeczne i ekonomiczne kontakty, jak Angola, Mozambik, Brazylia czy południowo-zachodnie Indie (1;2). Badania prowadzone w Afryce zachodniej wskazują na powolny spadek zakażeń indukowanych wirusem HIV-2 w stosunku do HIV-1 (1;28). Wynika to jednak bardziej z pandemicznego charakteru wirusa HIV-1 w stosunku do endemicznego wirusa HIV-2, niż ze spadku ilości zakażeń wirusem HIV-2. W Europie najwyższy wskaźnik zakażeń HIV-2 odnotowano w Portugalii i stanowi on 10 do 13% wszystkich zakażeń wirusami HIV oraz 5% zachorowań na AIDS (6). W przypadku więcej niż połowy zakażonych pacjentów nie udało się wskazać żadnego związku z infekcjami HIV-2 występującymi na terenach Afryki, co wskazało na endemiczny charakter infekującego wirusa (1;6).



**Rysunek. IV.2.** Aktualny zasięg epidemii AIDS w Europie i w państwach sąsiadujących - bez rozróżnienia na zakażenia HIV-1 i HIV-2. Intensywność koloru jest proporcjonalna do ilości zakażeń wirusami HIV, kolor czerwony oznacza obszary o największym nasileniu epidemii. Kolor szary oznacza brak danych dla danego obszaru. Na podstawie Komunikatu Rady Parlamentu Europejskiego w sprawie zwalczania HIV/AIDS w Unii Europejskiej i w państwach z nią sąsiadujących w latach 2006-2009.

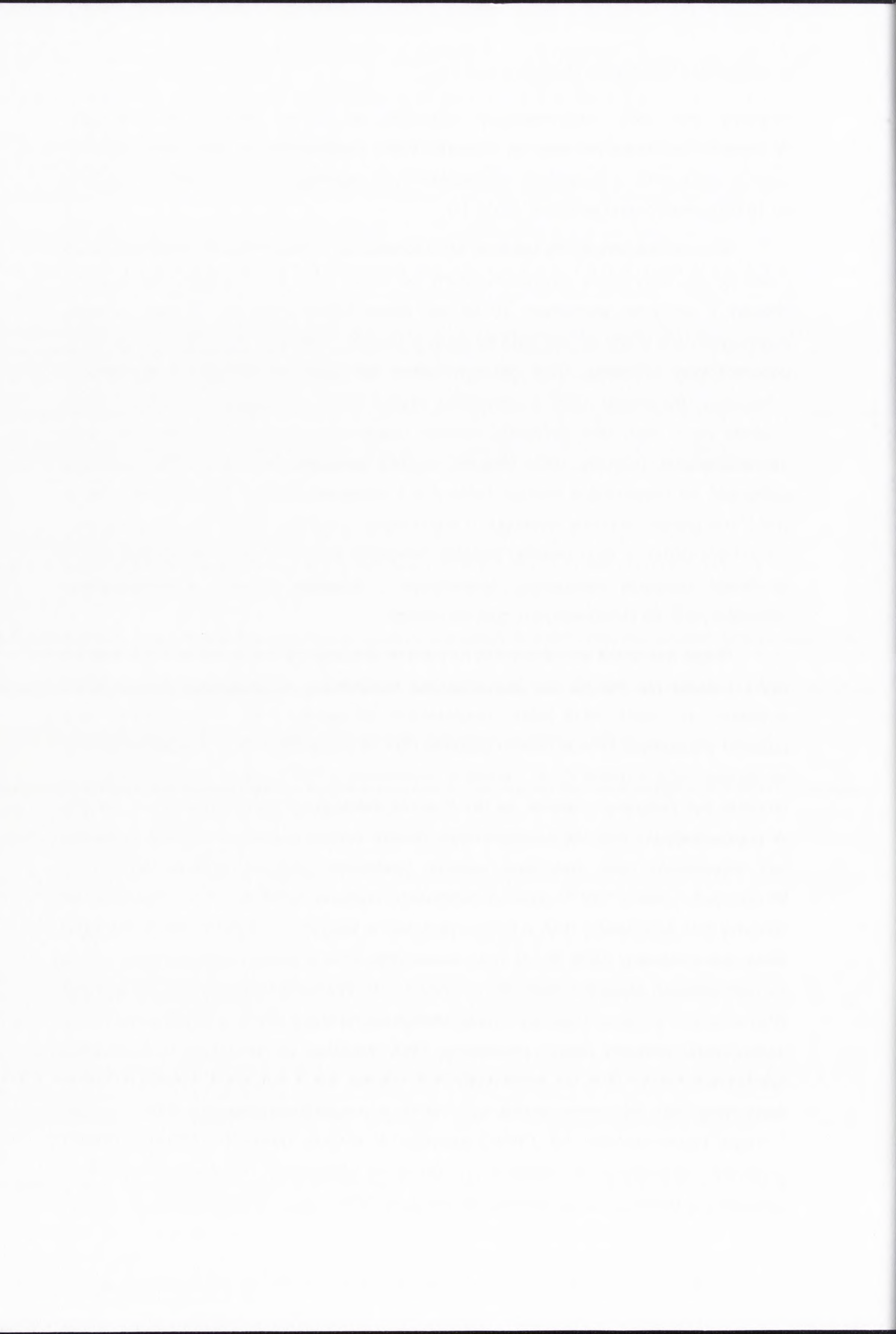
Poza Afryką zachodnią, Portugalią oraz krajami stanowiącymi dawne kolonie portugalskie infekcje wirusem HIV-2 są raczej sporadyczne, choć w niektórych krajach Europy zauważalna jest tendencja wzrostowa infekcji HIV-2 w stosunku do HIV-1 (1;4;6). Kilkadziesiąt zakażeń HIV-2 odnotowano w Wielkiej Brytanii oraz we Francji, w większości



dotyczyły one osób przebywających wcześniej na terenie Afryki zachodniej (29). W Stanach Zjednoczonych testy na obecność HIV-2 wprowadzono w 1992 roku i aktualne dane w połączeniu z badaniami retrospektywnymi wskazują, że tylko jedno zakażenie na 10 000 powodowane jest przez HIV-2 (1).

Chociaż oba wirusy HIV indukują AIDS to wirus HIV-2 jest wyraźnie mniej patogenny i cechuje go długi okres asymptotyczny od czasu infekcji do wystąpienia objawów choroby u pacjenta, wynoszący 10 lat lub nawet więcej (1;29;30). Ponadto u wielu zarażonych osób wcale nie dochodzi do rozwoju choroby. Obydwa wirusy HIV niszczą układ odpornościowy człowieka, gdyż głównym celem ich ataku są limfocyty T pomocnicze i monocyty. Symptomy AIDS w przypadku infekcji HIV-2 są bardzo podobne do HIV-1 i zalicza się do nich silną limfopatię, choroby układu oddechowego, poważne schorzenia dermatologiczne, grzybicę, ostre biegunki, wysoką gorączkę, znaczącą utratę wagi oraz podatność na nawracające infekcje bakteryjne i wirusowe (1;2;30). Choroba indukowana HIV-2 ma jednak znacznie wolniejszy i łagodniejszy przebieg, co za tym idzie pacjenci przeżywają dłużej. Z tego powodu badania dotyczące infekcji wirusem HIV-2 dają lepszą możliwość poznania patogenezы lentiwirusów i działania układu immunologicznego człowieka podczas indukowanych przez nie infekcji.

Ciągle poszukuje się odpowiedzi na pytanie, dlaczego HIV-2 jest mniej patogenny niż HIV-1 i nadal nie ma na nie jednoznacznej odpowiedzi. W przypadku infekcji HIV-1 wykazano, że rozwój AIDS zależy bezpośrednio od spadku ilości komórek CD4+ oraz poziomu wirusowego RNA w osoczu pacjenta (31). W przypadku HIV-2, również obserwuje się spadek ilości komórek CD4+, jednak w porównaniu z HIV-1 jest on wyraźnie mniejszy, co może być związane z faktem, że HIV-2 słabiej indukuje apoptozę limfocytów T (30;32). W poprzedzającym chorobę bezobjawowym okresie infekcji poziom HIV-1 RNA w osoczu jest stosunkowo niski, natomiast wzrasta gwałtownie podczas rozwoju AIDS (31). W przypadku infekcji HIV-2, pomimo obniżonego poziomu komórek CD4+, obserwuje się znikomą ilość wirusowego RNA w osoczu pacjenta na wszystkich etapach infekcji, włączając silnie zaawansowany AIDS (6;33). Ilość wirusowego DNA u pacjenta jest bardzo podobna na odpowiednich etapach infekcji HIV-1 i HIV-2 (34). Wyraźnie niższy poziom wirusowego RNA w osoczu pacjenta świadczy o mniej efektywnej replikacji HIV-2, w stosunku do HIV-1. Jednocześnie podobny poziom wirusowego DNA wskazuje, że nie wynika to z obniżonej dostępności matrycy DNA do transkrypcji RNA wirusa, ale z obniżenia wydajności samej transkrypcji (33). Być może wynika to z różnic w regulacji transkrypcji u HIV-1 i HIV-2, z drugiej strony wiadomo, że u HIV-2 dochodzi do syntezy znacznej ilości uszkodzonych genomów, niezdolnych do replikacji (1). Obniżona efektywność replikacji wirusa HIV-2, połączona z mniejszą toksycznością dla komórek CD4+ oraz znacznie silniejszą indukcją



układu immunologicznego człowieka może być prawdopodobną przyczyną mniejszej patogenności i infekcyjności tego wirusa (1;6;30;32;33).

Leczenie AIDS indukowanego wirusem HIV-2 jest podobne do stosowanego w przypadku HIV-1 (1;6;29). Niewiele jest jednak danych dotyczących jego skuteczności. Wiadomo, że terapia HIV-2 daje obiecujące wyniki przy stosowaniu nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy, natomiast w odróżnieniu od HIV-1, inhibitory nienukleozydowe są mało skuteczne (1;29). Ponadto, wykazano wrażliwość HIV-2 na leki hamujące wirusową proteazę (35). Najlepsze wyniki, tak jak w przypadku HIV-1, daje stosowanie łączonej terapii antywirusowej opartej na różnych lekach - HAART (ang. *highly active antiretroviral therapy*) (1;29). Największym problemem w terapii AIDS jest jednak powstawanie lekoopornych mutantów obu wirusów, ponadto niektóre szczepy HIV-2 posiadają naturalną odporność na stosowane czynniki antywirusowe (1;36). Warto podkreślić przerażający fakt, że jedynie 4% spośród zakażonych HIV objętych jest odpowiednią terapią przeciwwirusową (1).

Istnieją pewne dane epidemiologiczne wskazujące, że zakażenie HIV-2 chroni przed HIV-1, jednak są one dość kontrowersyjne i nie do końca potwierdzone (37). Z drugiej jednak strony proponowane są molekularne mechanizmy, które mogłyby sprzyjać temu zjawisku. Wykazano na przykład, że TAR RNA wirusa HIV-2 hamuje *trans*-aktywację i replikację HIV-1, zapewne poprzez współzawodnictwo w oddziaływaniu z białkiem Tat HIV-1 i istotnymi dla wirusa faktorem komórki (38).

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

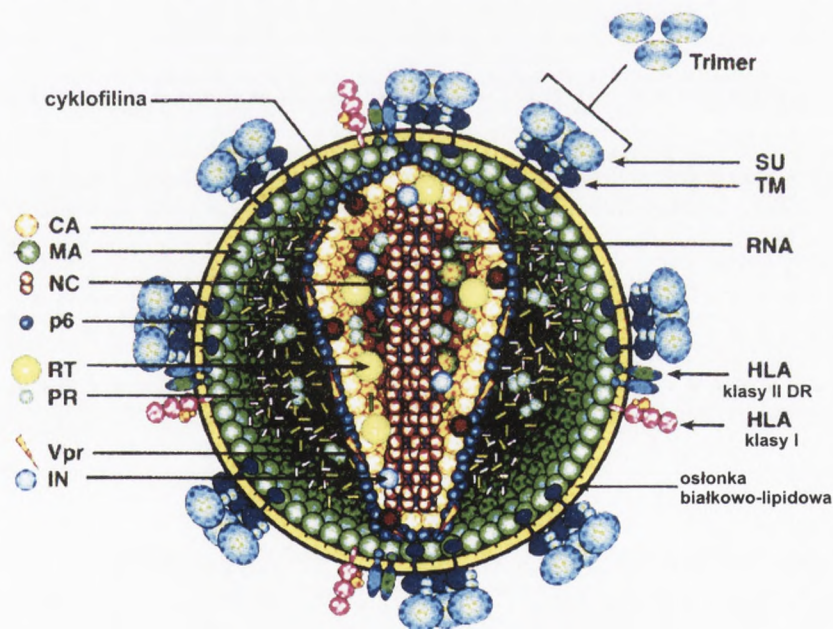
Second block of faint, illegible text, appearing as a separate paragraph or section.

Large block of extremely faint, illegible text occupying the bottom half of the page.

## IV.2. BIOLOGIA MOLEKULARNA WIRUSA HIV-2

### 2.1. BUDOWA WIRONU ORAZ ORGANIZACJA GENOMU WIRUSA HIV-2

Budowa wirionu HIV-2 jest bardzo podobna do HIV-1 (2). Z zewnątrz wirion otoczony jest białkowo-lipidową osłonką pochodzącą z błony komórki gospodarza (rys. IV.3). Osłonka wirusa zawiera zarówno białka ludzkie (np. antygeny zgodności tkankowej), jak i glikozylowane białka własne wirusa, takie jak białko powierzchniowe – SU (ang. *surface protein*) oraz białko transbłonowe - TM (ang. *transmembrane protein*). Białka SU i TM połączone są ze sobą przez wiązania disiarczkowe i tworzą charakterystyczne trimery. W dojrzałej cząsteczce wirusa pod osłonką znajduje się warstwa utworzona przez strukturalne białko macierzy – MA (ang. *matrix protein*). W środkowej części wirionu, białko kapsydu – CA (ang. *capsid protein*) formuje wirusowy kapsyd, wewnątrz którego znajduje się rybonukleinowy rdzeń utworzony przez dwie nici genomowego RNA związane z licznymi cząsteczkami białka nukleokapsydu – NC (ang. *nucleocapsid protein*). W kapsydzie znajdują się również specyficzne wirusowe enzymy: odwrotna transkryptaza – RT (ang. *reverse transcriptase*), proteaza – PR (ang. *protease*) oraz integraza – IN (ang. *integrase*), a także wirusowe białka regulatorowe Nef, Vif i Vpr (2;39;40).



**Rysunek IV.3.** Budowa wirionu HIV na przykładzie wirusa HIV-1. Szczegółowy opis rysunku znajduje się w tekście. Na podstawie (41)

Genom wirusów HIV stanowią dwie identyczne cząsteczki RNA o długości około 9,2 kb (HIV-1) lub 10,3 kb (HIV-2) połączone ze sobą niekowalencyjnie w pobliżu 5' końców poprzez oddziaływanie rejonów dimeryzacji (DIS) każdej z nici (41;42). Obie cząsteczki RNA są aktywne funkcjonalnie. Podczas cyklu życiowego retrowirusa genomowy RNA,

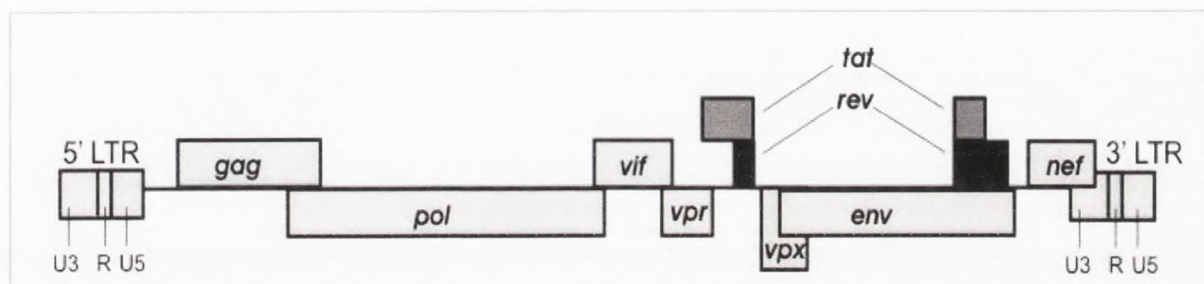


The first part of the book is devoted to a general introduction to the theory of the firm. It begins with a discussion of the basic concepts of the firm, such as the firm as a collection of individuals, the firm as a collection of resources, and the firm as a collection of activities. It then discusses the firm's objectives, the firm's production function, and the firm's cost function. The second part of the book is devoted to a detailed analysis of the firm's production function. It begins with a discussion of the firm's production function as a function of inputs and outputs, and then discusses the firm's production function as a function of inputs and outputs, and the firm's production function as a function of inputs and outputs. The third part of the book is devoted to a detailed analysis of the firm's cost function. It begins with a discussion of the firm's cost function as a function of inputs and outputs, and then discusses the firm's cost function as a function of inputs and outputs, and the firm's cost function as a function of inputs and outputs.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

The first part of the book is devoted to a general introduction to the theory of the firm. It begins with a discussion of the basic concepts of the firm, such as the firm as a collection of individuals, the firm as a collection of resources, and the firm as a collection of activities. It then discusses the firm's objectives, the firm's production function, and the firm's cost function. The second part of the book is devoted to a detailed analysis of the firm's production function. It begins with a discussion of the firm's production function as a function of inputs and outputs, and then discusses the firm's production function as a function of inputs and outputs, and the firm's production function as a function of inputs and outputs. The third part of the book is devoted to a detailed analysis of the firm's cost function. It begins with a discussion of the firm's cost function as a function of inputs and outputs, and then discusses the firm's cost function as a function of inputs and outputs, and the firm's cost function as a function of inputs and outputs.

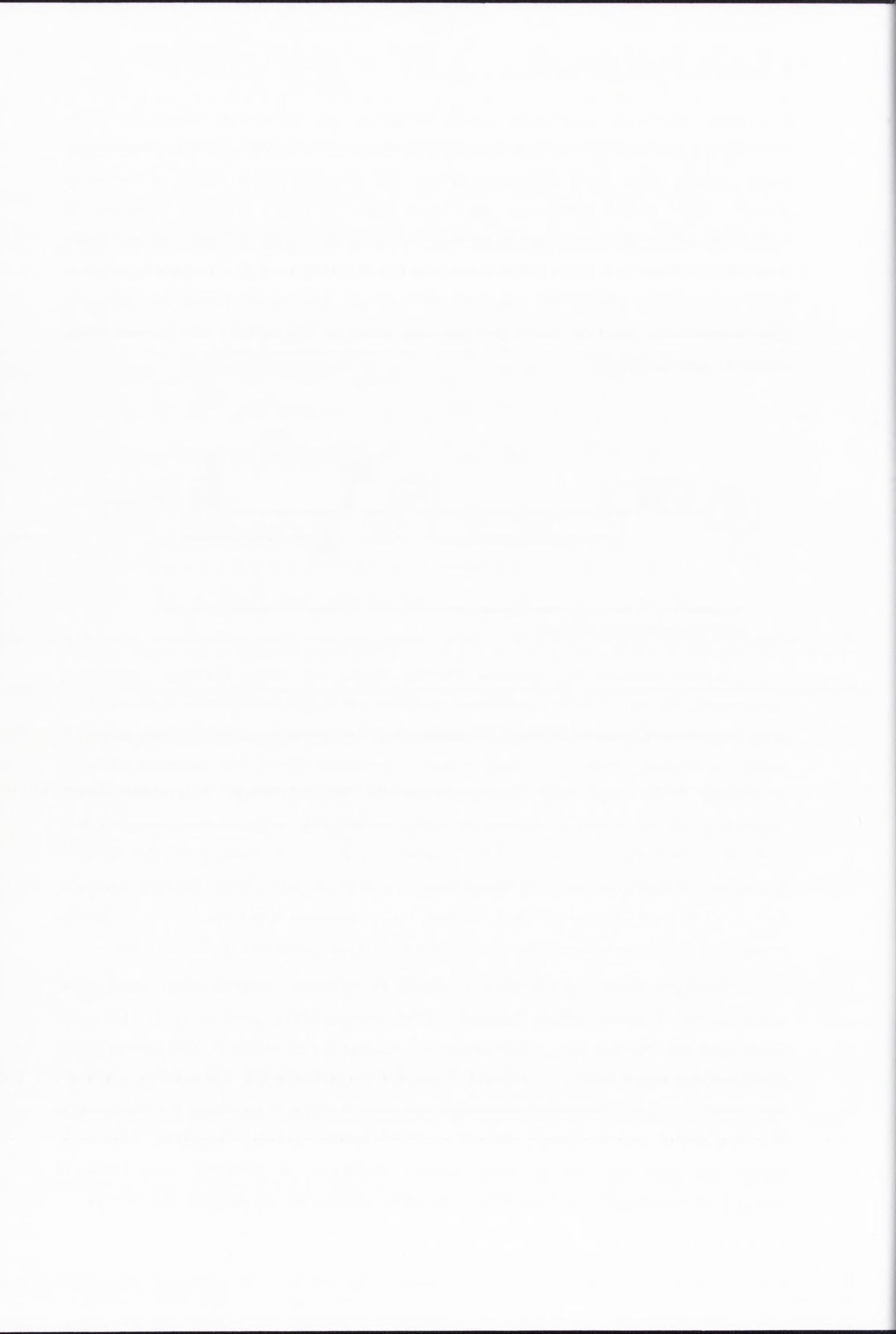
w procesie odwrotnej transkrypcji, zostaje przepisany na dwuniciową cząsteczkę DNA, integrującą z genomem gospodarza (prowirus) i w takiej formie retrowirusowy DNA pozostaje przez większą część cyklu życiowego wirusa HIV. Pomimo dużej różnicy w sekwencji genomu, HIV-2 koduje praktycznie takie same białka jak HIV-1 (1;23;43). Wspólne dla wszystkich retrowirusów i wysoce konserwatywne są trzy geny *gag*, *pol* i *env* kodujące białka strukturalne wirusa (rys. IV.4). Genom wirusów HIV-1, HIV-2 oraz SIV zawiera dodatkowe ramki odczytu dla genów *tat*, *rev*, *nef*, *vif* oraz *vpr* kodujących białka regulatorowe. Charakterystyczny tylko dla HIV-1 jest gen *vpu*, podczas gdy HIV-2 i SIV zamiast niego zawierają gen *vpx* (23;41).



**Rysunek IV.4.** Schemat organizacji genetycznej wirusa HIV-2 (prowirus). Szczegółowy opis schematu znajduje się w tekście.

Genom wirusów HIV zawiera również istotne dla wielu procesów sekwencje niekodujące. Na 5' i 3' końcu prowirusa znajdują się długie powtórzenia końcowe LTR (ang. *long terminal repeats*). Każdy LTR zawiera trzy funkcjonalne rejony: U3 (ang. *unique 3' terminus*), R (ang. *repeat*) i U5 (ang. *unique 5' terminus*). Rejony U3 zawierają promotor z kasetą TATA oraz cały szereg elementów regulatorowych i wzmacniających odgrywających istotną rolę w regulacji wirusowej transkrypcji, w tym miejsca wiązania SP1 i NF- $\kappa$ B (43-45). Ponieważ rejony LTR znajdują się na 5' i 3' końcu prowirusa inicjacja transkrypcji mogłaby teoretycznie następować w każdym z nich. Liczne badania wykazują jednak, że synteza wirusowego RNA inicjowana jest wyłącznie w obrębie 5' LTR, a inicjacja w rejonie 3' LTR obserwowana jest jedynie, gdy 5' LTR jest całkowicie nieaktywny (46).

Pierwsza reszta nukleotydowa w rejonie R wyznacza miejsce startu transkrypcji, a tym samym 5' koniec mRNA. Powstały mRNA zawiera niekodujące rejony R i U5 na 5' końcu oraz U3 i R na 3' końcu. Sekwencje niekodujące R i U5 końca 5' RNA tworzą część charakterystycznego rejonu o istotnych funkcjach regulatorowych, nazywanego rejonem liderowym (14-16;47). Natomiast sekwencje niekodujące końca 3' są istotne dla dojrzewania 3' końca mRNA (poliadenylacja). Wirusowy mRNA zawiera strukturę kap (ang. *cap*) na 5' końcu oraz długi ciąg reszt A (ogon poli(A)), przyłączony do ostatniej reszty rejonu R końca 3'. W modyfikacji 5' końca mRNA istotną rolę odgrywa wirusowe białko Tat (48;49).

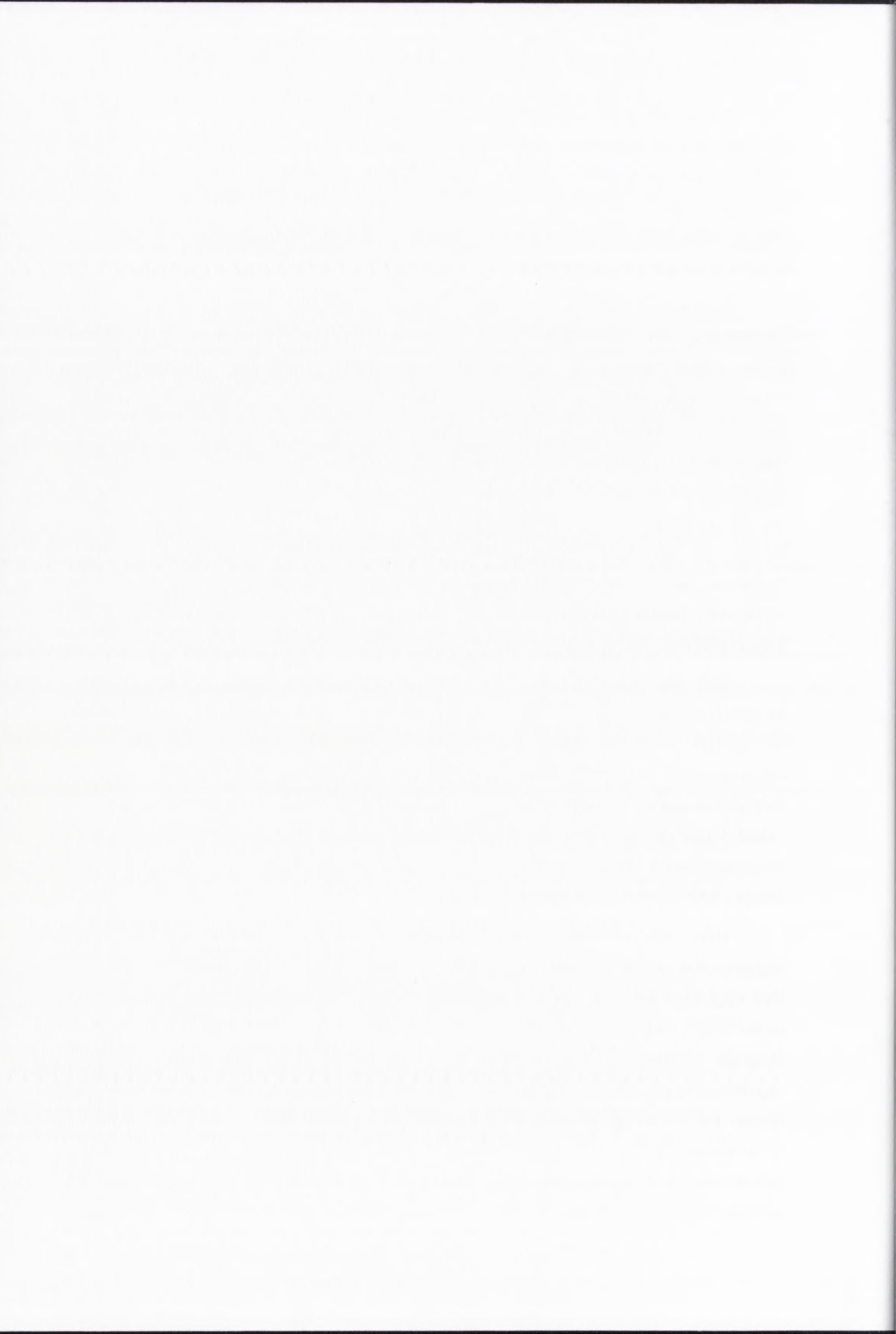


Produktem genu *gag* jest prekursorowa glikoproteina Gag, cięta przez wirusową proteazę PR do kilku mniejszych białek strukturalnych wirionu MA, CA i NC. Warto podkreślić fakt, że białko NC promuje dimeryzację genomowych cząsteczek RNA (42;50). Białko MA odgrywa dodatkowo istotną rolę w wewnątrzkomórkowym transporcie podczas infekcji wirusowej. Pełnej długości prekursorowa glikoproteina Gag jest kluczowa dla formowania wirionów potomnych oraz ich uwalniania z komórki gospodarza (51;52).

Produktami genu *pol* są istotne wirusowe enzymy: proteaza (PR), odwrotna transkryptaza (RT) oraz integraza (IN), powstające z prekursorowej poliproteiny Gag-Pol. Ramka odczytu genu *pol* znajduje się pozycji -1 w stosunku do ramki odczytu genu *gag* i ekspresja genu *pol* następuje przez przesunięcie ramki odczytu, prowadzące do ekspresji prekursorowej poliproteiny Gag-Pol. Do przesunięcia ramki odczytu dochodzi stosunkowo rzadko i stosunek ilościowy Gag do Gag-Pol wynosi zazwyczaj około 20 : 1 (53). Poliproteina Gag-Pol, podobnie jak Gag, jest włączana do wirionów potomnych. Odgrywa ona istotną rolę w cyklu życiowym wirusa nie tylko dlatego, że w wyniku jej cięcia powstają wirusowe enzymy, ale warunkuje ona stabilność uwolnionych z zainfekowanej komórki, potomnych cząstek wirusa HIV (52). Równowaga pomiędzy poziomem ekspresji Gag i Gag-Pol reguluje proces formowania i uwalniania wirionów potomnych. W odróżnieniu od Gag-Pol, wysoki poziom poliproteiny Gag promuje uwalnianie potomnych cząstek wirusa (39;52).

Gen *env* wirusa HIV-2 koduje prekursorową glikoproteinę gp 140, rozcinaną do dwóch białek Env: gp 125 (SU) i gp 36 (TM). U HIV-1 jest to gp 160, cięta odpowiednio do gp 120 i gp 41 (2;54). Za proteolityczne cięcie prekursorowej glikoproteiny odpowiedzialne są enzymy komórki gospodarza, tak samo zresztą jak za glikozylację, formowanie wiązań disiarczkowych oraz prawidłowe zwinięcie produktów genu *env* (39). Podczas gdy gp 125 odpowiedzialna jest za związanie receptora CD4 oraz koreceptorów chemokininowych na powierzchni infekowanej komórki, gp 36 odpowiada za fuzję otoczki wirusa z błoną komórki gospodarza (2;54).

Geny *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* oraz *vpu* lub *vpx* kodują istotne, wirusowe białka regulatorowe; są to odpowiednio białka Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr oraz Vpu lub Vpx. Pod względem ekspresji białka te można podzielić na dwie główne grupy (43). Pierwsza grupa białek, do której należą Tat, Rev i Nef, powstaje we wczesnej fazie infekcji, w wyniku ekspresji niezależnej od białka Rev. Druga grupa, do której należą pozostałe białka regulatorowe, powstaje w późnej fazie infekcji, a ich ekspresja jest zależna od białka Rev. Białka Tat i Rev są absolutnie konieczne do replikacji wirusa (55;56). Początkowo na podstawie badań *in vitro* białka Nef, Vif, Vpr oraz Vpu lub Vpx uważano za mało istotne, jednak nowsze dane wykazały, że spełniają one wiele istotnych funkcji w cyklu życiowym wirusów HIV i SIV (57;58). Niestety niewiele wiadomo na temat funkcjonalnych różnic



dotyczących Nef, Vif i Rev pomiędzy HIV-1 i HIV-2, przyjmuje się jednak, że ich rola u HIV-2 jest podobna do pełnionej u HIV-1 (1).

Białko Tat zlokalizowane jest głównie w jądrze zainfekowanej komórki. Odgrywa ono istotną rolę w *trans*-aktywacji wirusowej transkrypcji. Więcej miejsca zagadnieniom związanym z białkiem Tat poświęcono w dalszej części pracy – rozdział IV.3.

Powstające we wczesnej fazie infekcji wirusowe białko Rev, zlokalizowane jest głównie, podobnie jak Tat, w jądrze zainfekowanej komórki (39). Białko to reguluje transport z jądra do cytoplazmy różnych mRNA wirusa, powstałych na skutek alternatywnego splicingu (ang. *splicing*) (55). Regulacja ta odbywa się przez oddziaływanie Rev z charakterystyczną strukturą RRE (ang. *Rev responsive element*) znajdującą się w obrębie sekwencji genu *env* wirusowego mRNA (59;60). Białko Rev wpływa również bezpośrednio na splicing mRNA, wiążąc uczestniczące w nim czynniki komórkowe i w ten sposób hamuje lub ogranicza jego efektywność. Zależna od Rev regulacja ekspresji wirusowych genów jest silnie zachowawcza u wszystkich lentiwirusów (61).

Białko Nef powstaje głównie we wczesnej fazie ekspresji i stanowi wtedy prawie 80% wszystkich powstających białek. Zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie, często przyłączone do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej (62). Pewna niewielka ilość Nef jest pakowana do wirionów potomnych. Białko to jest istotne dla zachowania wysokiego poziomu replikacji wirusa oraz jego patogenności i zdolności do infekcji. Nef spełnia liczne funkcje, ale główną wydaje się być regulacja ilości receptorów CD4 na powierzchni zainfekowanej komórki (62-64). Związanie Nef do receptora CD4 błony komórkowej powoduje skierowanie go na drogę degradacji. W ten sposób białko Nef zwiększa przeżywalność komórki gdyż zapobiega powtórnej infekcji wirusem.

Białko Vpr zlokalizowane jest głównie w jądrze zainfekowanej komórki, przypisuje mu się rolę w zarówno w rozwoju wirusa, jak i procesach komórkowych. Najprawdopodobniej uczestniczy w transporcie wirusowego kompleksu preintegracyjnego PIC z cytoplazmy do jądra (65). Ponadto Vpr aktywuje ekspresję komórkowych genów, a poprzez oddziaływanie z cyklinami wpływa na wzrost i podziały zainfekowanej komórki (65;66). W odróżnieniu od HIV-1, gdzie liczne cząsteczki białka Vpr są pakowane do wirionów potomnych, w wirionie HIV-2 znajduje się tylko niewielka ich ilość (1;65).

Homologiczne do białka Vpr jest białko Vpx, charakterystyczne tylko dla HIV-2 i spokrewnionych z nim wirusów SIV (2). Liczne cząsteczki białka Vpx znajdują się w dojrzałym wirionie HIV-2. Funkcja Vpx nie jest do końca poznana, wiadomo jednak, że jest niezbędne do wydajnej infekcji HIV-2. W niektórych typach komórek białko to związane jest z transportem wirusowego kompleksu PIC z cytoplazmy do jądra (67;68).

The document contains several paragraphs of text, which are extremely faint and illegible. The text appears to be a formal report or document, possibly containing technical or administrative information. The layout includes a header section at the top, followed by several paragraphs of body text, and a footer section at the bottom. The text is too light to transcribe accurately.

Vif (ang. *viral infectivity factor*) jest białkiem cytoplazmatycznym, powstającym w późnej fazie infekcji, jedynie nieliczne cząsteczki białka Vif znajdują się w wirionach potomnych (39;69). Vif zwiększa infekcyjność potomnych cząstek wirusa, czyniąc je zdolnymi do wczesnych etapów infekcji, najprawdopodobniej przez zwiększenie stabilności kompleksu odwrotnej transkryptazy. Na późniejszych etapach infekcji Vif wpływa na prawidłowe upakowanie nukleoproteinowego rdzenia wirionu i uczestniczy w transporcie powstających wirionów do błony komórkowej (1;39). Ostatnie dane wskazują na to, że w przypadku HIV-1 białko Vif oddziałuje bezpośrednio 5' końcem rejonu liderowego wirusowego mRNA (TAR i poli(A)) i razem z innymi białkami zapewnia prawidłowe zwinięcie wirusowego RNA, ułatwiając w ten sposób jego pakowanie do wirionów potomnych (70).

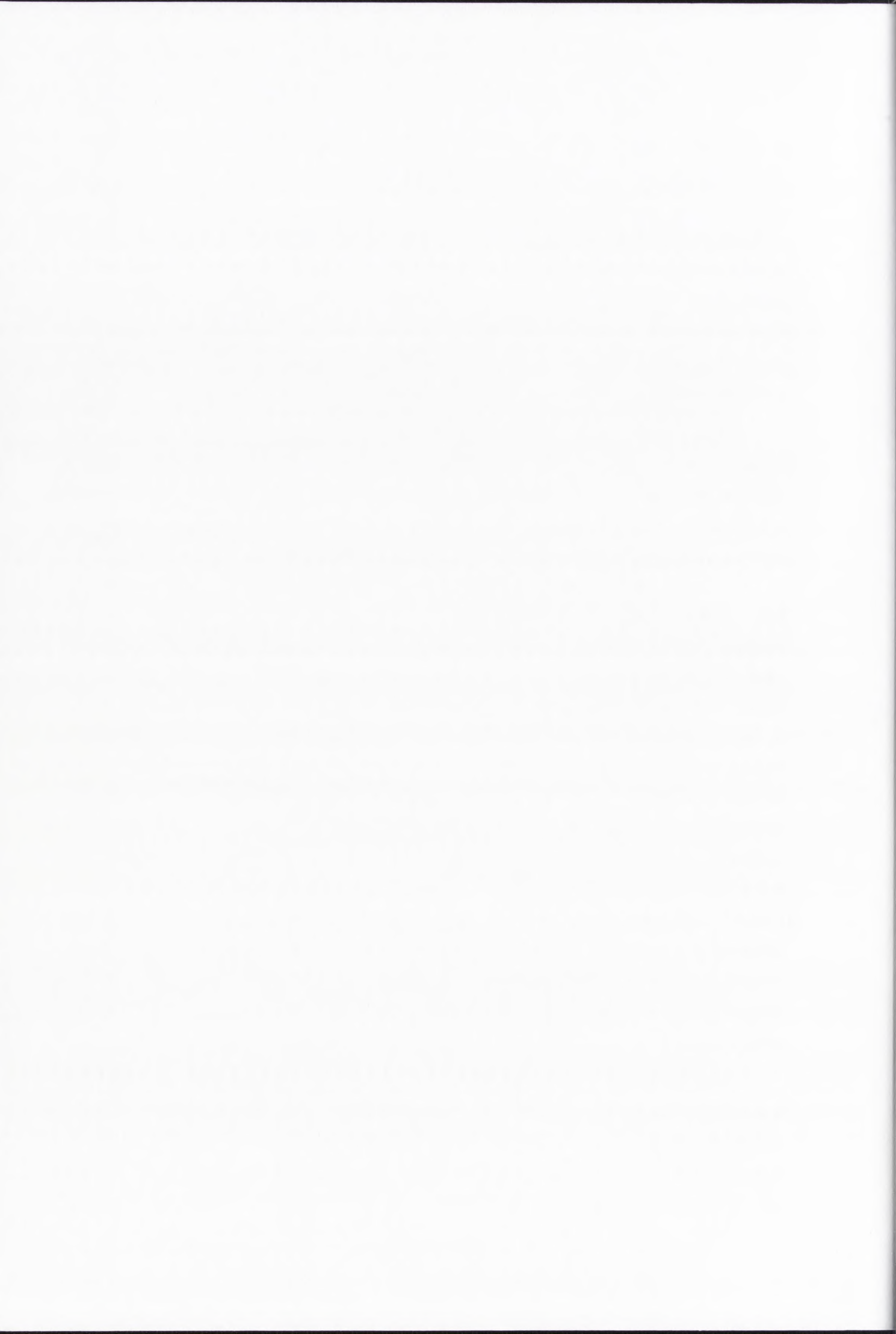
U HIV-2 brak charakterystycznego dla HIV-1 białka Vpu (2). Wysoka ekspresja Vpu następuje w późnej fazie wirusowej infekcji. Vpu jest integralnym białkiem błonowym istotnym dla dojrzewania i uwalniania wirionów potomnych. Nie znajduje się go jednak w potomnych wirionach. Vpu reguluje poziom receptorów CD4 na powierzchni komórki, jednak poprzez mechanizm inny niż w przypadku białka Nef (39).

## 2.2. SZKIC CYKLU ŻYCIOWEGO WIRUSA HIV-2

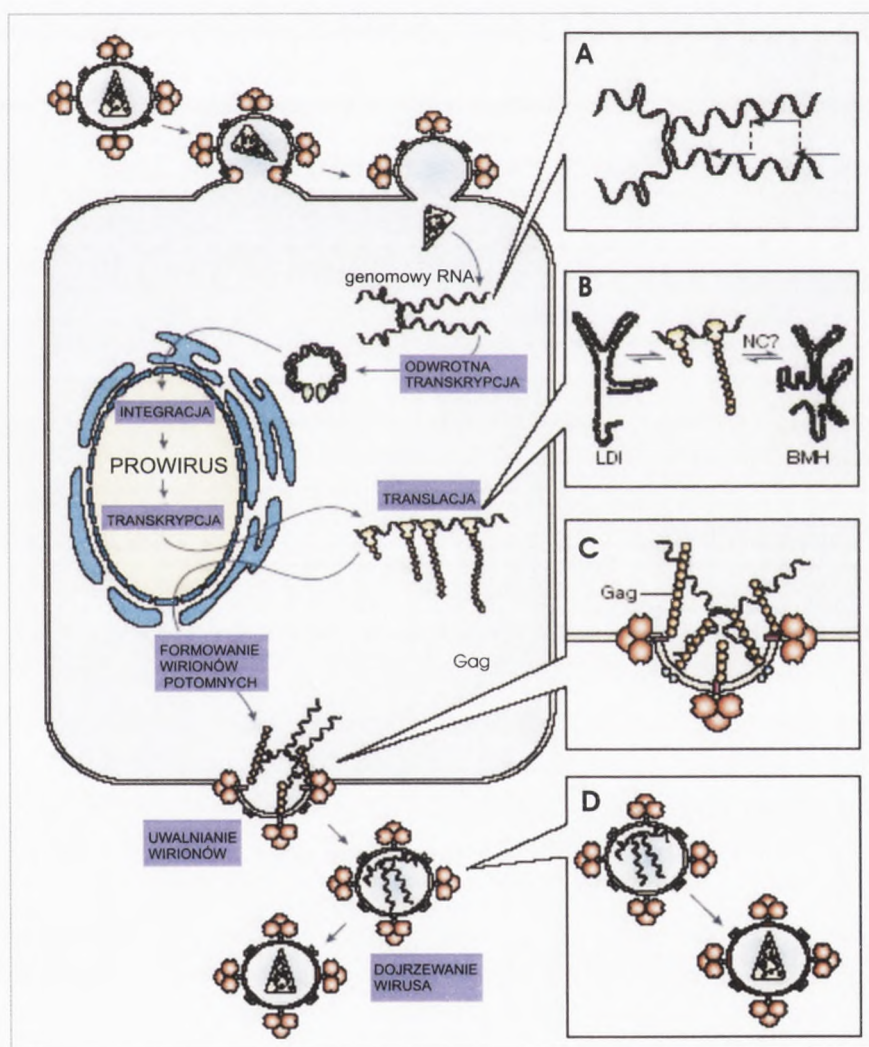
Podczas infekcji komórki gospodarza wirus HIV-2, podobnie jak HIV-1, rozpoznaje i wykorzystuje głównie receptor CD4 oraz pewne receptory chemokininowe jako koreceptory. Wirusy HIV wykorzystują zazwyczaj koreceptory CCR-5 albo CXCR-4, ale co ciekawe, w świetle mniejszej patogenności HIV-2, może on wykorzystywać dużo większą liczbę różnych koreceptorów niż HIV-1 (2;54). Ponadto niektóre szczepy HIV-2 mogą infekować komórki gospodarza w sposób całkowicie niezależny od receptora CD4, głównie przy wykorzystaniu samego tylko CXCR-4 albo CCR-5 (71). Za związanie odpowiedniego receptora na powierzchni infekowanej komórki odpowiedzialna jest glikoproteina powierzchniowa wirusa SU (gp 120 lub gp 125), która wiąże zarówno komórkowy receptor CD4 jak i odpowiedni koreceptor. Związanie receptora CD4 indukuje zmianę konformacji SU, umożliwiającą związanie koreceptora chemokininowego, to z kolei wprowadza dodatkową zmianę konformacji doprowadzającą białko transbłonowe TM (gp41 lub gp 36) do stanu aktywnego dla fuzji, przez co może nastąpić zlanie się otoczki wirusa z błoną komórki gospodarza (2;54).

Po wniknięciu wirusa do komórki, ulega on częściowemu odplaszczeniu, a pierwszym procesem, który ma miejsce w komórce po uwolnieniu wirusowego RNA jest odwrotna transkrypcja przy udziale odwrotnej transkryptazy (RT) oraz tRNA<sup>Lys3</sup> jako startera (rys. IV.5) (72). Powstająca w wyniku tego procesu, dwuniciowa cząsteczka cDNA znajduje się w obrębie kompleksu preintegracyjnego PIC (ang. *preintegration complex*),

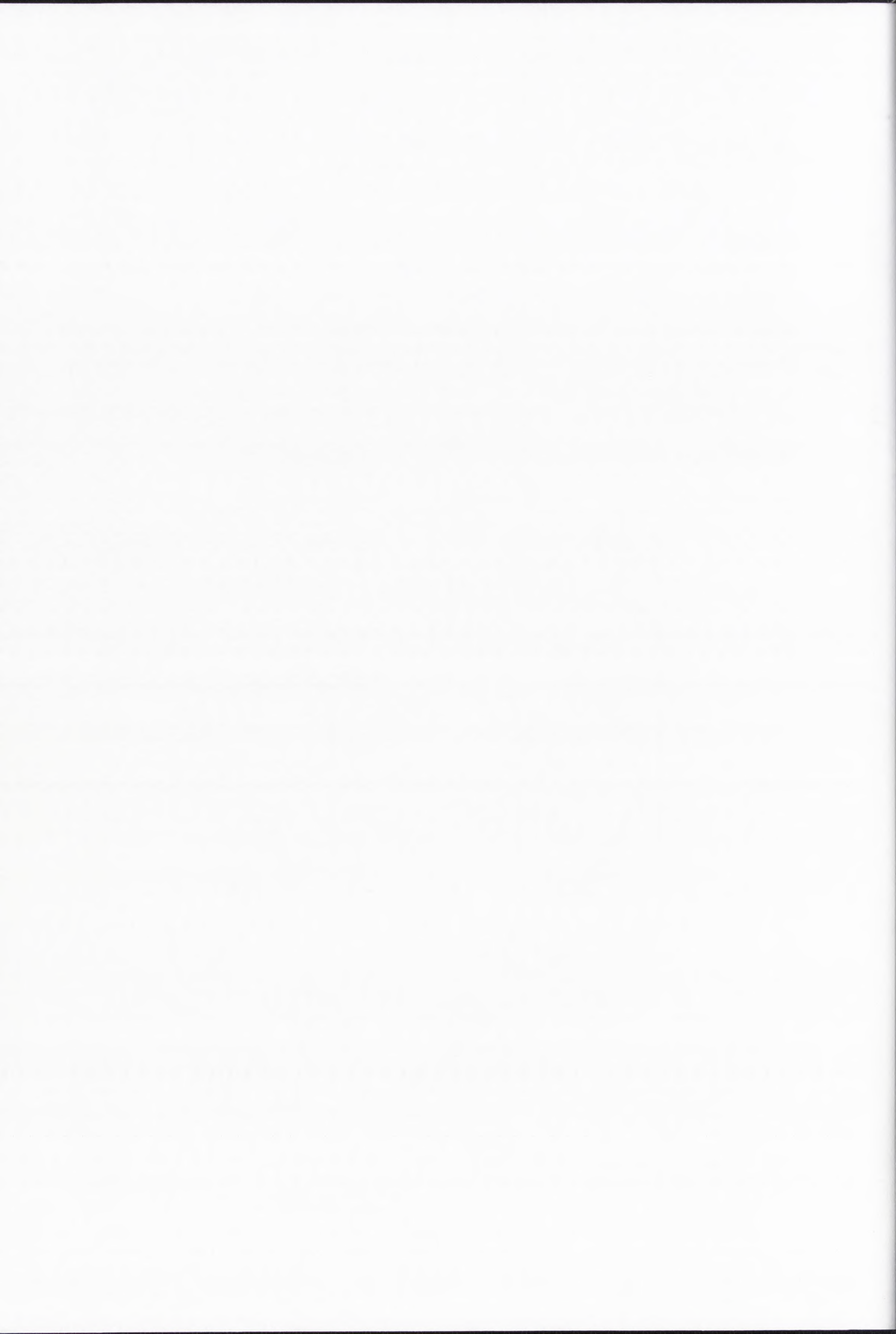




którego innymi składnikami są RT, IN, NC, MA i Vpr (39). Przedostanie się kompleksu PIC do jądra jest istotnym etapem wirusowej replikacji i jest konieczne do integracji wirusowego DNA z genomem gospodarza. Lentiwirusy posiadają specyficzny mechanizm importu przez błonę jądrową niezależny od podziału komórki. Wirusowy DNA integruje z genomem gospodarza w niespecyficznym miejscu. W pierwszym etapie integraza (IN) odcina po 2 nukleotydy z 3' końca każdej nici wirusowego DNA. Ten etap następuje jeszcze w cytoplazmie bezpośrednio przed wejściem do jądra. Następnym krokiem jest zsynchronizowana reakcja cięcia i łączenia. Poprzez nukleofilowy atak grup hydroksylowych obecnych na 3' końcach wirusowego DNA dochodzi do cięcia docelowej sekwencji gospodarza, a następnie ligacji wirusowego DNA do 5' końców DNA gospodarza w miejscu cięcia. Powstałe przerwy w docelowym DNA są naprawiane, prawdopodobnie przez enzymy komórkowe, tworząc krótkie powtórzenia na końcach prowirusa (73;74).



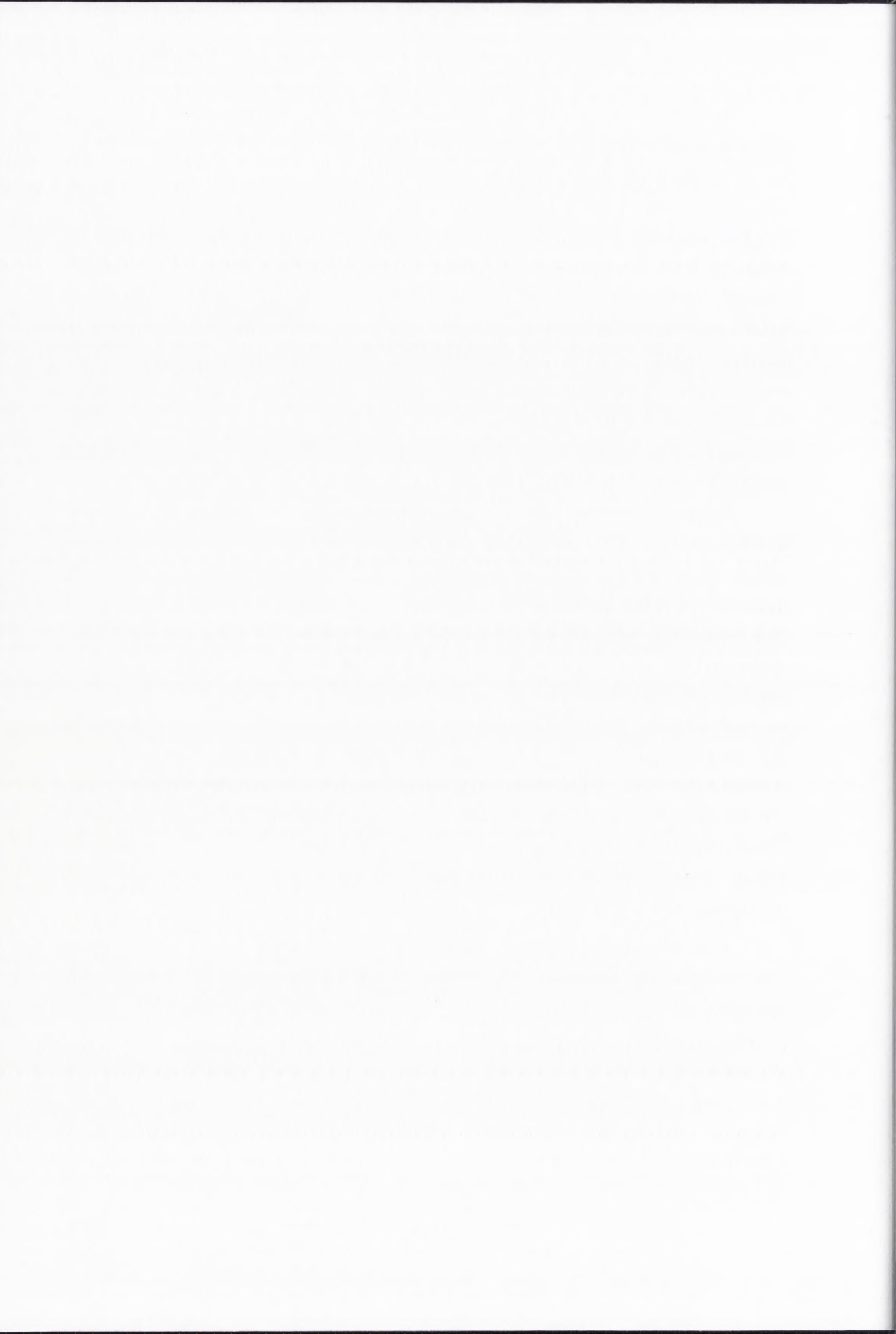
**Rysunek IV.5.** Cykl życiowy wirusów HIV. **A.** Stan dimeryczny wirusowego genomu ułatwia przeskokki odwrotnej transkryptazy podczas syntezy wirusowego DNA. **B.** Dwie konformacje globalne regionu liderowego wirusowego RNA. **C.** Formowanie wirionów potomnych. **D.** Dojrzewanie wirionów potomnych. Szczegółowy opis schematu przedstawiono w tekście. Na podstawie (42), zmodyfikowany.



Prowirus zintegrowany z DNA gospodarza wykorzystuje komórkową maszynę do transkrypcji i translacji swoich genów. Komórkowa polimeraza RNA II wykorzystywana jest do syntezy transkryptów wirusa, które służą zarówno jako mRNA dla translacji wirusowych białek oraz jako genomowe RNA, które będą włączane do wirionów potomnych (44). Wydajna ekspresja wirusowych genów wymaga szeregu regulatorowych mechanizmów związanych z białkami Tat i Rev oraz komórkowymi czynnikami transkrypcyjnymi (55;56;75). Powstały mRNA wirusa może podlegać procesowi splicingu przy wykorzystaniu specyficznych czynników komórkowych. We wczesnej fazie ekspresji wirusowych genów powstają mRNA dla białek regulatorowych Tat, Rev oraz Nef. W późniejszej fazie syntetyzowane są mRNA dla białek Env, Vif, Vpr i Vpu lub Vpx. Białka Gag i Gag-Pol powstają w końcowej fazie infekcji. Proporcje różnych białek na odpowiednich etapach cyklu życiowego wirusa określa poziom regulatorowego białka Rev, które służy jako swoisty przełącznik pomiędzy wczesną, a późną fazą ekspresji wirusowych genów (55).

Odpowiedni poziom Gag i Gag-Pol stanowi sygnał do rozpoczęcia formowania wirionów potomnych (52). Proces ten rozpoczyna się od asocjacji połączonych ze sobą, dwóch nici genomowego RNA wirusa z poliproteinami prekursorowymi Gag i Gag-Pol (rys. IV.5), szczególnie istotną rolę odgrywa tu domena NC poliproteiny Gag (76;77). Obie poliproteiny włączane są do powstających wirionów. Jednocześnie ma miejsce ekspresja i dojrzewanie białek Env (SU i TM), które są transportowane, a następnie włączane do błony komórkowej gospodarza. Ostateczne formowanie wirionów potomnych ma miejsce tuż pod błoną komórki i zawsze w tych obszarach błony, które zawierają białka Env. Kompleks genomowego RNA z Gag i Gag-Pol asocjuje z białkami Env posadowionymi w błonie komórkowej. W powstałych wirionach HIV obecne są również inne białka, w dużej (Vpr lub Vpx) lub znikomej tylko ilości (Nef, Vif), jednak mechanizmy ich włączania nie są do końca poznane. Ponadto w wirionach znajdują się liczne cząsteczki RNA gospodarza, między innymi tRNA<sup>Lys3</sup>, selektywnie pakowany do wirionów potomnych poprzez oddziaływanie z sekwencją RT poliproteiny Gag-Pol (39).

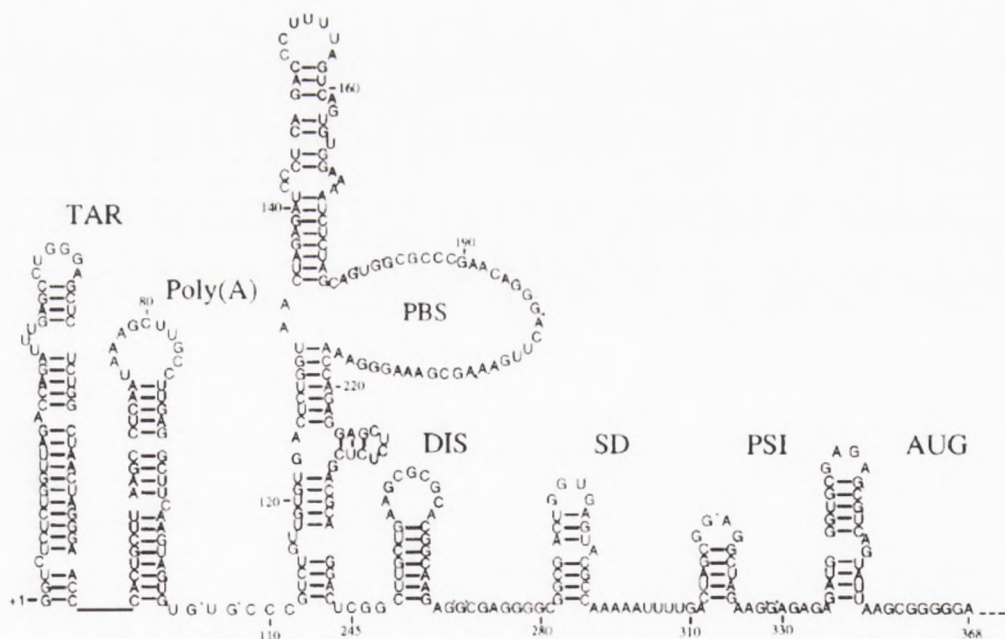
Wiriony uwolnione z komórki gospodarza nie są jeszcze w pełni ukształtowane i są niezdolne do infekowania innych komórek, dlatego podlegają one specyficznemu procesowi dojrzewania (rys. IV.5). Polega on przede wszystkim na rozcięciu prekursorowej poliproteiny Gag, przez wirusową proteazę, stanowiącą część poliproteiny Gag-Pol (78). W pierwszej kolejności odcinane jest białko NC, cząsteczki białka NC oddziałują z wirusowym RNA doprowadzając do wytworzenia nukleoproteinowego rdzenia wirionu. Następnie odcinane jest białko CA, co umożliwia jego odłączenie od otoczki wirusa i uformowanie kapsydu. Białko MA poprzez oddziaływanie z białkami Env tworzy warstwę znajdującą się tuż pod otoczką wirionu (79).



### 2.3. STRUKTURA I FUNKCJA REJONU LIDEROWEGO RNA WIRUSA HIV-2

Szczególnie interesującym fragmentem genomu HIV jest znajdujący się na 5' końcu wirusowego RNA rejon liderowy. Rejon ten, nie podlegając translacji, spełnia istotne funkcje regulatorowe (14-16). Rejon liderowy HIV-2 rozpoczyna się od nt +1, stanowiącego miejsce startu transkrypcji, obejmuje rejony R i U5 oraz fragment sekwencji do pozycji nt +545, stanowiącej pierwszą resztę nukleotydową kodonu start (AUG) otwartej ramki odczytu białka Gag. Rejon liderowy wirusa HIV-1 jest znacznie krótszy i obejmuje rejon +1 – 336 mRNA, także proponowane struktury drugorzędowe rejonu liderowego są inne dla HIV-1 oraz HIV-2.

W 1993 roku zaproponowano dwa modele strukturalne rejonu liderowego RNA wirusa HIV-1. Modele te różnią się od siebie znacząco za wyjątkiem takiej samej struktury spinki TAR na 5' końcu. Jeden z nich zakłada istnienie wydłużonych form RNA z licznymi pętlami wewnętrznymi (80), natomiast drugi model proponuje tworzenie charakterystycznych struktur spinkowych (16). Chociaż istnieją zwolennicy jednego i drugiego modelu, to zaproponowany przez Berkhouta model spinkowy jest w tej chwili powszechnie akceptowany (rys. IV.6). Związane jest to z faktem, że dostępnych jest już wiele szczegółowych danych na temat struktury izolowanych domen tego rejonu (81-83). W ostatnim czasie spinkowa struktura pełnej długości rejonu liderowego HIV-1 została potwierdzona przez szczegółowe obliczenia komputerowe (84) oraz z wykorzystaniem technik mikromacierzy DNA (85).

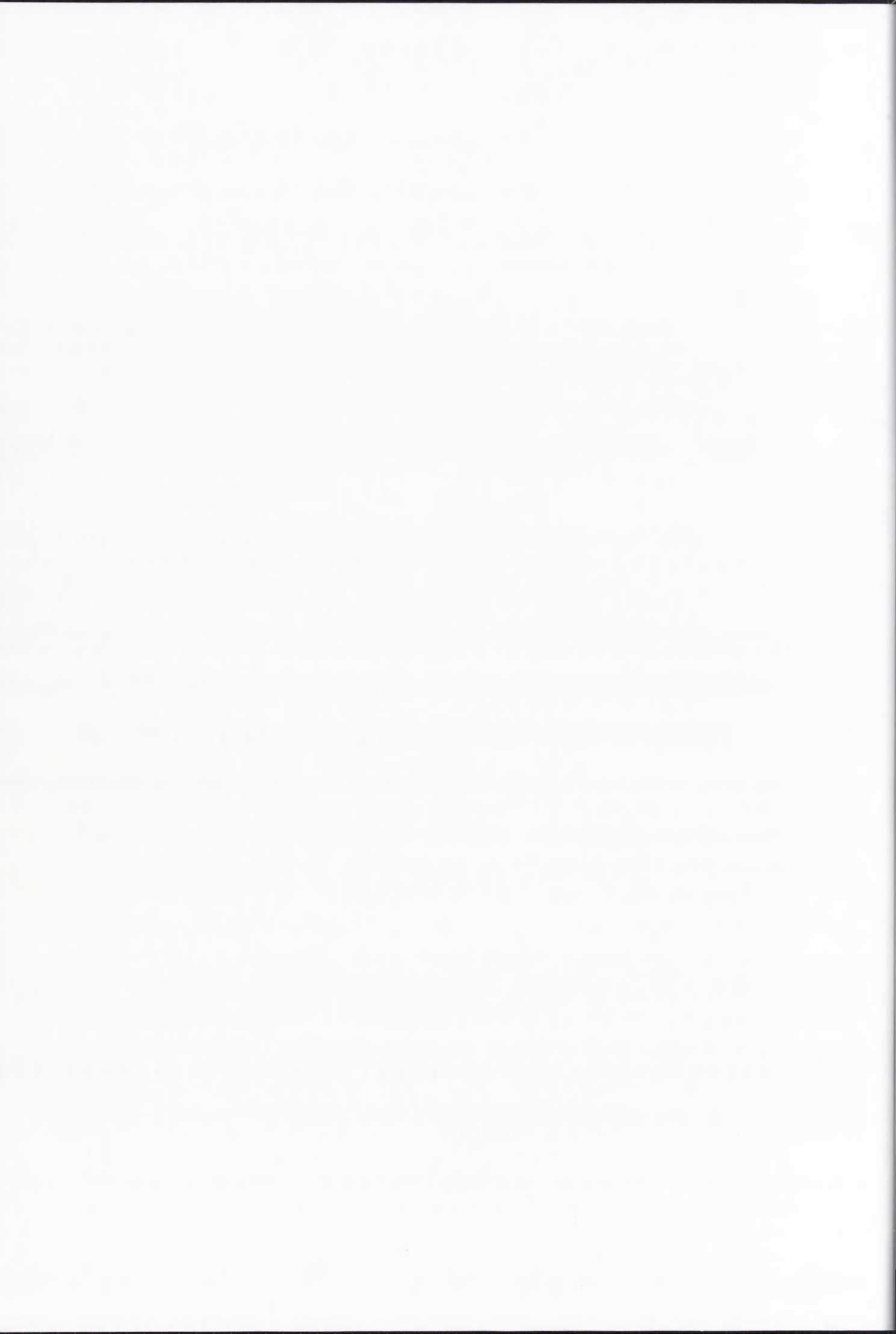


**Rysunek IV.6.** Zaproponowana przez Berkhouta i współpracowników struktura drugorzędowa rejonu liderowego RNA wirusa HIV-1.

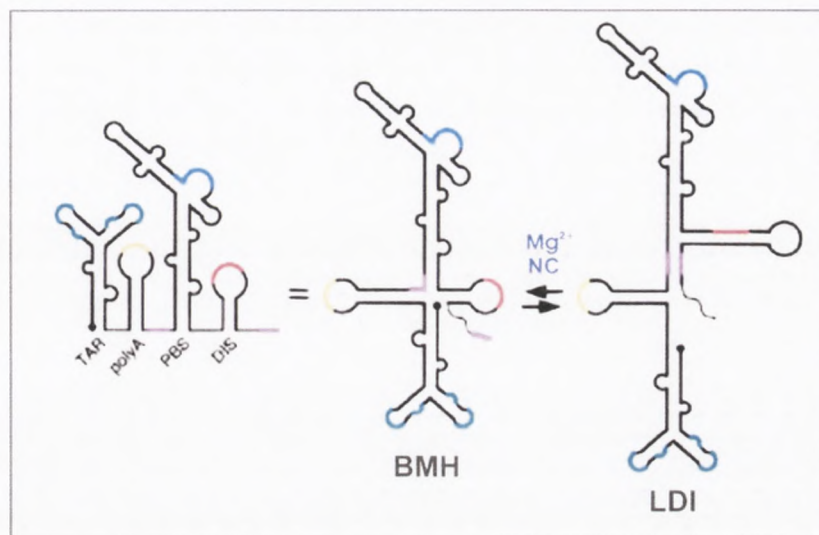








U obu wirusów HIV przejście od struktury LDI do BMH jest wspomagane przez związanie białka nukleokapsydu NC oraz obecność dwuwartościowych jonów, głównie  $Mg^{2+}$  (rys. IV.8).



**Rysunek IV.8.** Alternatywne, globalne konformery rejonu liderowego RNA wirusa HIV-2.

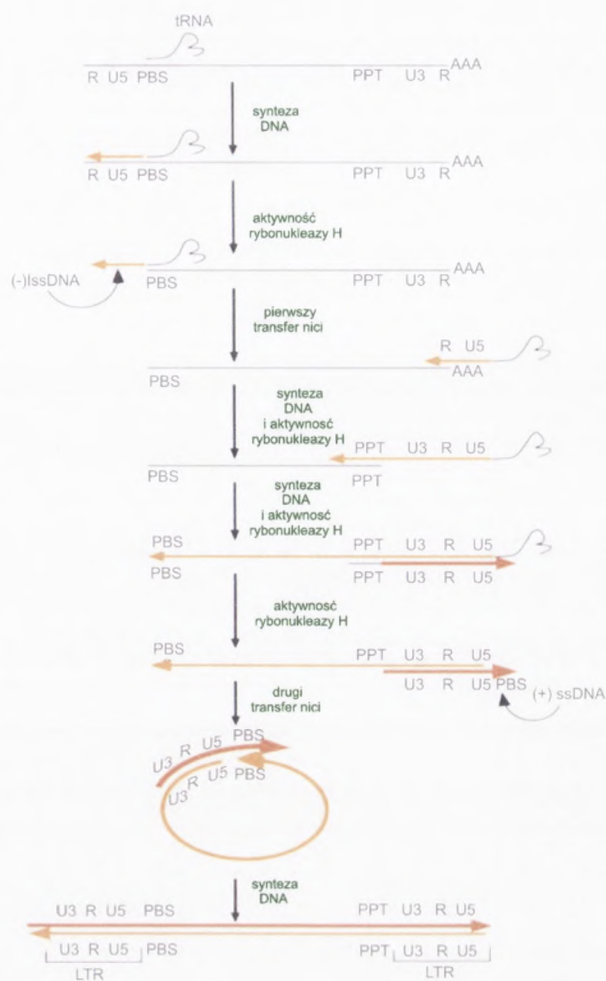
Występowanie dwóch konformerów rejonu liderowego, dobrze koreluje z podwójną funkcją spełnianą przez wirusowy RNA, który funkcjonuje zarówno jako mRNA dla translacji wirusowych białek, jak i jako genom HIV. Konformer LDI zapobiega przedwczesnej dimeryzacji RNA i najprawdopodobniej ułatwia w ten sposób syntezę wirusowych białek (88). Konformer BMH związany jest z dimeryzacją wirusowego RNA, która z kolei promuje proces pakowania RNA do wirionów potomnych (15;90).

### 2.3.1. Domena PBS - odwrotna transkrypcja

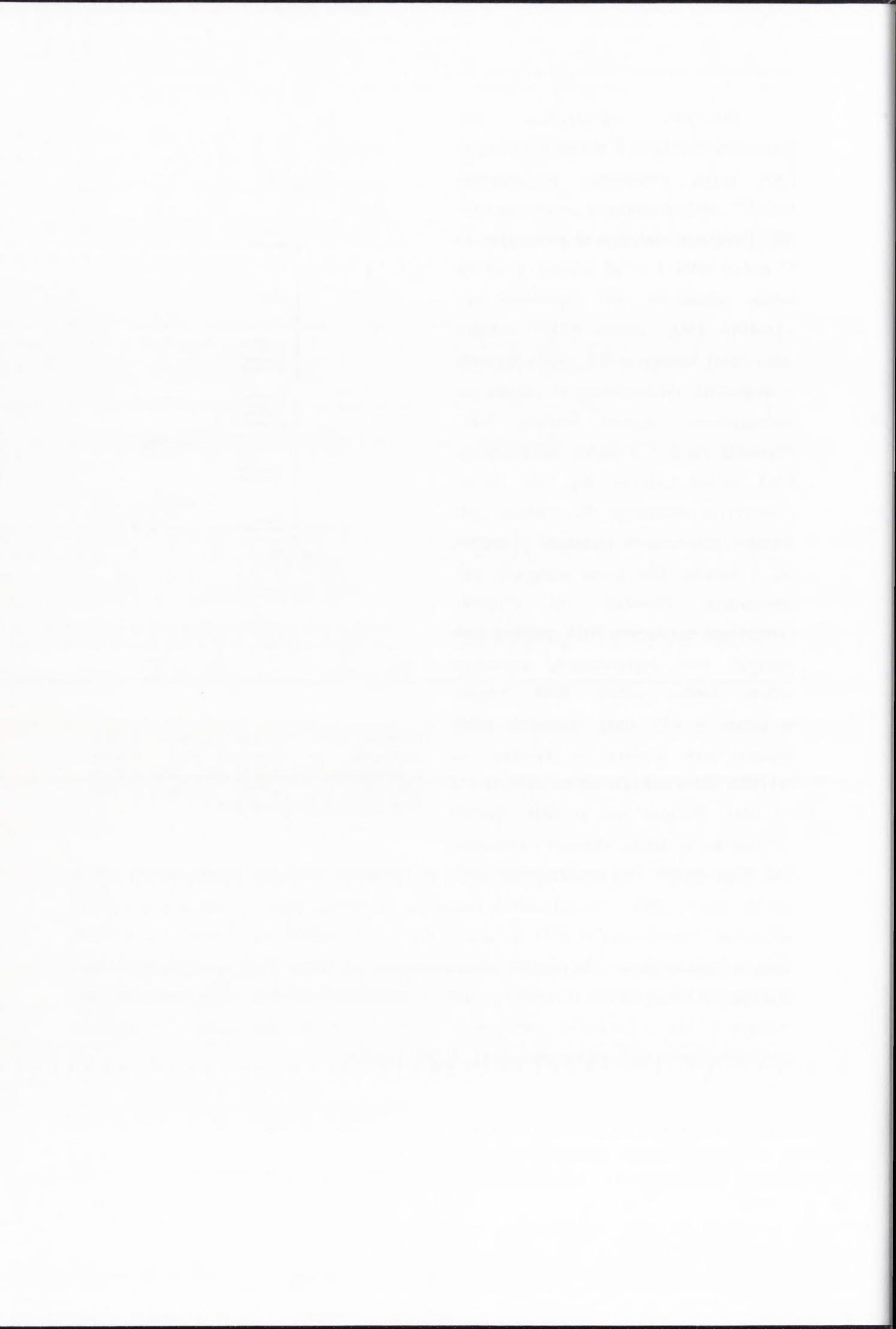
Zdimeryzowana cząsteczka RNA wirusa HIV służy jako matryca dla procesu odwrotnej transkrypcji prowadzonego przez wirusowy enzym, odwrotną transkryptazę – RT (ang. *reverse transcriptase*). W jego wyniku generowana jest dwuniciowa cząsteczka cDNA, integrująca następnie z DNA gospodarza. U HIV-1 i HIV-2 jako starter dla odwrotnej transkrypcji wykorzystywany jest pakowany do wirionów potomnych, komórkowy tRNA<sup>Lys3</sup> (72). Za wybór odpowiedniego tRNA z puli różnych komórkowych tRNA odpowiedzialna jest odwrotna transkryptaza (91). Genomowy RNA obu wirusów HIV zawiera w obrębie rejonu liderowego złożoną z 21 reszt nukleotydowych niesparowaną sekwencję, komplementarną do 3' końca starterowego tRNA, nazywaną miejscem wiązania startera PBS (ang. *primer binding site*). Sekwencja ta znajduje się w obrębie skomplikowanego motywu struktury drugorzędowej, skrótowo również nazywanego PBS (47;92). Reszty nukleotydowe z 3' końca starterowego tRNA asocjują w rejonie sekwencji PBS (93).



Odwrotna transkrypcja jest inicjowana w pobliżu 5' końca wirusowego RNA przez wydłużenie starterowego tRNA<sup>Lys3</sup>, oddziałującego z sekwencją PBS (93). Elongacja następuje aż do osiągnięcia 5' końca RNA i w jej wyniku powstaje krótka cząsteczka DNA określana jako (-) ssDNA (ang. *minus-strand strong-stop DNA*). Następnie RT, dzięki domenie o aktywności rybonukleazy H, usuwa już wykorzystany fragment matrycy RNA. Ponieważ na 5' i 3' końcu genomowego RNA wirusa znajdują się takie same, powtórzone sekwencje R, możliwy jest transfer / przesunięcie powstałej (-) ssDNA na 3' koniec RNA gdzie elongacja jest wznowiana. Powstaje nić (-) DNA. Genomowa cząsteczka RNA, służąca jako matryca jest degradowana, pozostają jedynie krótkie odcinki RNA, bogate w puryny – PPT (ang. *polipurine tract*), służące jako startery do syntezy nici (+) DNA, która odbywa się na matrycy nici (-) DNA. Synteza nici (+) DNA również odbywa się w dwóch etapach i konieczny jest drugi transfer nici powstającego DNA. W pierwszej kolejności syntetyzowany jest 3' koniec nici (+) DNA – nić (+) ssDNA. Następnie starterowy tRNA<sup>Lys3</sup> jest usuwany dzięki aktywności rybonukleazy H (RT), co ułatwia transfer (+) ssDNA na 3' koniec nici (-) DNA. Obie nici oddziałują za sobą poprzez komplementarne sekwencje PBS. Dochodzi do syntezy brakujących odcinków nici (+) DNA i (-) DNA, w której obie nici służą sobie wzajemnie jako matryce. W taki to sposób wygenerowana zostaje dwuniciowa cząsteczka DNA otoczona z obu stron takimi samymi sekwencjami LTR (39;72;93;94).



**Rysunek IV.9.** Schemat procesu odwrotnej transkrypcji u wirusów HIV. Kolorem pomarańczowym oznaczono nić (-) DNA, kolorem czerwonym nić (+) DNA. Szczegółowy opis schematu znajduje się w tekście.



### 2.3.2. Domena TAR - transkrypcja

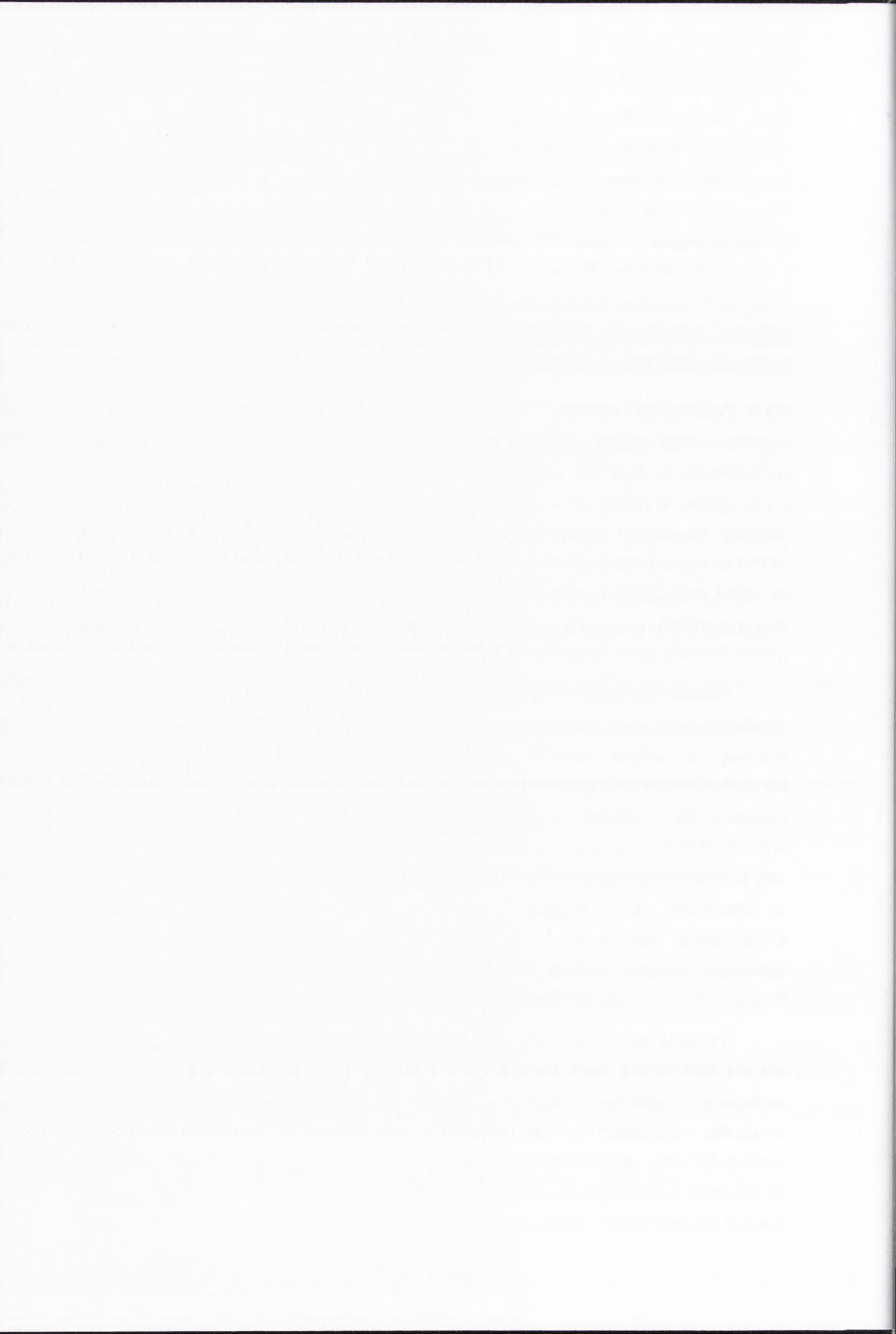
Transkrypcja wirusowych cząsteczek mRNA odbywa się na matrycy DNA zintegrowanego z genomem gospodarza. Wirus wykorzystuje w tym celu komórkową RNA polimerazę II oraz liczne komórkowe faktory transkrypcyjne. Na 5' końcu rejonu liderowego znajduje się charakterystyczna domena TAR RNA (+1 – 123). Wiadomo, że oddziaływanie TAR RNA z wirusowym białkiem Tat oraz ludzką cykliną T1 jest kluczowe dla regulacji procesu transkrypcji. Ponieważ niniejsza praca poświęcona jest badaniu struktury domeny TAR HIV-2 oraz jego oddziaływań z Tat-2 i cykliną T1, zagadnieniom tym poświęcono osobny rozdział w dalszej części pracy – rozdział IV.3.

### 2.3.3. Domena SD - splicing

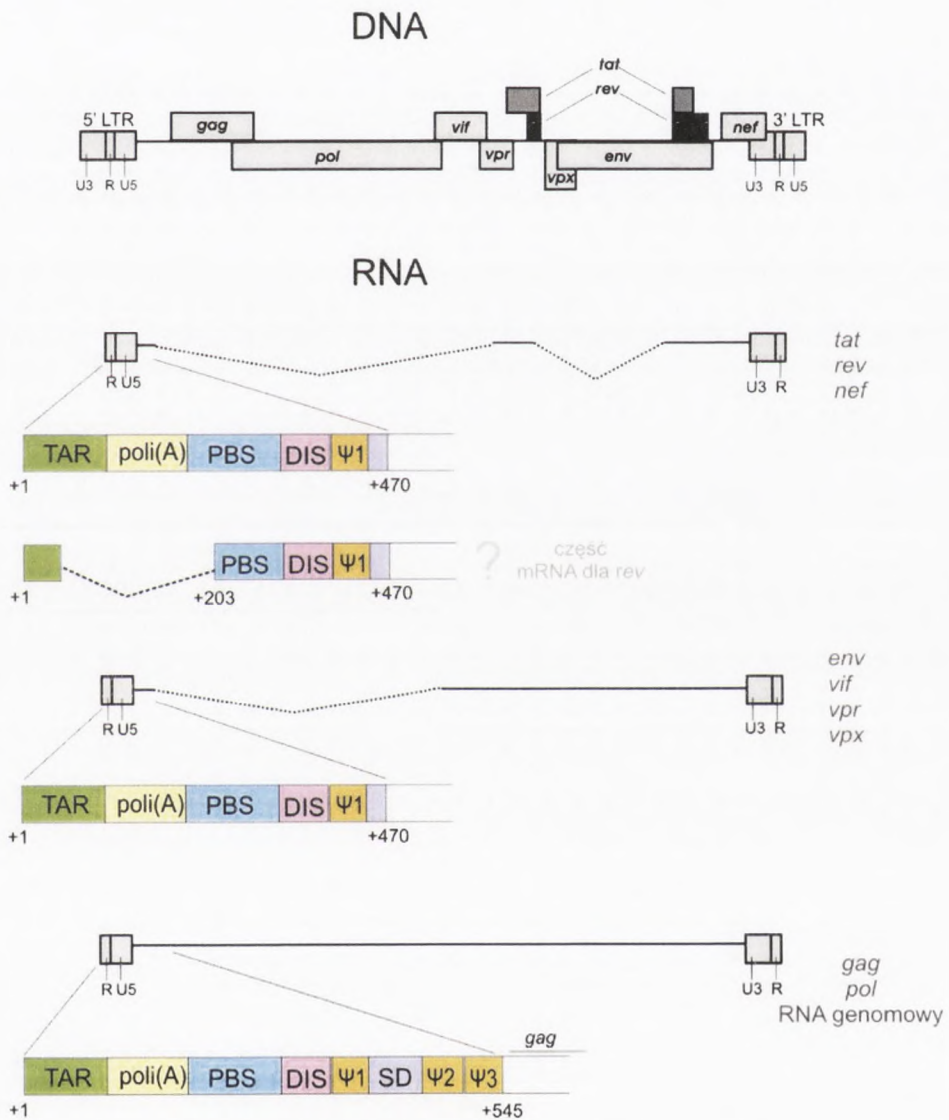
Cząsteczki RNA wirusa podlegają procesowi splicingu natychmiast po zsyntetyzowaniu, wykorzystując do tego celu odpowiednie czynniki komórkowe. Proces ten regulowany jest przez obecne w jądrze zainfekowanej komórki wirusowe białko Rev. We wczesnej fazie ekspresji wirusowych genów powstają podlegające wielokrotnemu składaniu cząsteczki mRNA kodujące białka regulatorowe Tat, Rev oraz Nef. W późniejszej fazie syntetyzowane są mRNA podlegające tylko pojedynczemu składaniu kodujące białka Env, Vif, Vpr i Vpx lub Vpu oraz mRNA, które wcale nie podlegają składaniu, kodujące białka Gag i Gag-Pol oraz wykorzystywane jako genomowy RNA (44).

Proces splicingu pre-mRNA oraz transport cząsteczek mRNA z jądra do cytoplazmy regulowany jest przez wirusowe białko Rev. W nieobecności białka Rev, w cytoplazmie znajdują się jedynie nieliczne cząsteczki mRNA, które nie podlegały splicingowi lub podlegały tylko pojedynczemu splicingowi. Natomiast wysoki poziom białka Rev indukuje pojawienie się w cytoplazmie dużej ilości tego typu mRNA. Wszystkie mRNA powstające w późnej fazie infekcji zawierają charakterystyczną strukturę RRE w obrębie sekwencji genu *env*. Oddziaływanie pomiędzy RRE a regulatorowym białkiem Rev aktywuje transport z jądra do cytoplazmy pełnej długości cząsteczek mRNA oraz tych, które podlegały tylko pojedynczemu splicingowi. Dodatkowo Rev, poprzez oddziaływanie z komórkowymi czynnikami splicingu, wpływa bezpośrednio na proces wycinania intronów, hamując jego efektywność i w ten sposób zwiększając ilość pełnej długości wirusowych mRNA (60;61;95).

Zarówno u HIV-1 jak i HIV-2 pełnej długości rejon liderowy znajduje się tylko w tych cząsteczkach mRNA, które wcale nie podlegały splicingowi (IV.10). Rejon liderowy mRNA podlegającego splicingowi, niezależnie czy pojedynczemu czy wielokrotnemu, jest skrócony, co wynika z obligatoryjnego wykorzystywania, znajdującej się w obrębie rejonu liderowego domeny SD (ang. *major splice donor site*) +464 – 485. U HIV-1 rejon liderowy jest skracany do 290 reszt nukleotydowych, a u HIV-2 do 470 reszt (44). Skrócenie rejonu liderowego RNA wpływa na dimeryzację RNA i jego pakowanie do wirionów potomnych, gdyż w obrębie



wycinanego intronu znajdują się istotne dla tych procesów motywy strukturalne RNA (96;97). Dodatkowo u HIV-2 i SIV<sub>mac</sub> dla części mRNA kodujących białka regulatorowe opisano alternatywny *splicing* związany z wycinaniem intronu obejmującego rejon +60 – 202, stanowiący część domeny TAR oraz całą spinkę poli(A). W przypadku wirusa SIV<sub>mac</sub> stwierdzono, że takie cząsteczki RNA stanowią lepsze matryce do procesu translacji (98). U HIV-2 jak dotychczas proces ten zaobserwowano tylko dla mRNA regulatorowego białka Rev i jest on słabo scharakteryzowany oraz nie wiadomo do końca, jaką rolę pełni powstały mRNA (99).



**Rysunek IV.10.** Powstające na skutek alternatywnego splicingu różne cząsteczki mRNA wirusa HIV-2 oraz typowa dla nich organizacja rejonu liderowego. Szczegółowy opis rysunku znajduje się w tekście.





### 2.3.4. Domena poli(A) - poliadenylacja

Poliadenylacja jest jednym z procesów dojrzewania eukariotycznych mRNA, polegającym na przecięciu nowopowstałego mRNA i dodaniu około 250 reszt A na jego 3' końcu. Nowopowstający mRNA zawiera w pobliżu 3' końca uniwersalną, sześci nukleotydową sekwencję AAUAAA, stanowiącą sygnał poliadenylacji, a także zlokalizowaną około 20 do 30 reszt za nią mniej zachowawczą sekwencję bogatą w reszty GU lub U. Sekwencje te są istotne dla wiązania czynników komórkowych uczestniczących w poliadenylacji. Pomiędzy nimi przypada miejsce cięcia mRNA, zazwyczaj znajduje się ono około 15 reszt nukleotydowych za AAUAAA. Poliadenylacji mogą podlegać również wirusowe mRNA, w tym mRNA wirusów HIV. Dla wirusów RNA charakterystyczna jest dodatkowa sekwencja wzmacniająca poliadenylację - USE (ang. *upstream enhancer*), bogata zazwyczaj w reszty U, lecz wykazująca duże zróżnicowanie w sekwencji i strukturze (100).

U HIV-1 i HIV-2 sygnał poliadenylacji AAUAAA jest zawarty w rejonie R, obecnym zarówno na 3' jak i 5' końcu wirusowego mRNA, zatem jedna cząsteczka mRNA zawiera dwa sygnały poliadenylacji (101). Rodzi to konieczność wyciszenia sygnału obecnego na 5' końcu lub wzmocnienia tego z końca 3'. Poliadenylacja na końcu 3' jest wzmacniana dzięki zlokalizowanej w pobliżu sekwencji USE oddziałującej bezpośrednio z czynnikami komórkowymi (100;102). Do wyjaśnienia represji poliadenylacji na 5' końcu mRNA proponowane są różne mechanizmy. Jeden z nich zakłada, że wynika ona z za małej odległości sygnału AAUAAA od miejsca startu transkrypcji i przesuwanego się kompleksu transkrypcyjnego nie jest jeszcze zdolny do poliadenylacji (103). Inny mechanizm związany jest z represją indukowaną przez sekwencję SD (ang. *major splice donor*) położoną u HIV-2 około 300 reszt nukleotydowych za AAUAAA (u HIV-1 około 200). Oddziaływanie sekwencji SD z rybonukleoproteiną U1 snRNP hamuje przedwczesną poliadenylację na 5' końcu (104). Wprowadzenie mutacji do sekwencji SD uniemożliwiających wiązanie U1 snRNP, powoduje zachodzenie przedwczesnej poliadenylacji na 5' końcu wirusowego mRNA.

Obecny na 5' końcu mRNA sygnał poliadenylacji AAUAAA wraz z sekwencją bogatą w reszty GU zlokalizowany jest w jednej z domen rejonu liderowego, nazywaną domeną poli(A). Domena ta u wszystkich wirusów HIV i SIV ma postać spinki, a sekwencja AAUAAA zlokalizowana jest w jej pętli apikalnej, może też być częściowo sparowana (105). Domena poli(A) wirusa HIV-1 (+58 – 104) ma postać regularnej spinki z pętlą terminalną złożoną z 11 reszt nukleotydowych. Dwie pierwsze reszty A sekwencji AAUAAA są sparowane, tworząc pary zasad zamykające pętlę (101). Sekwencja bogata w GU jest również częściowo sparowana i stanowi dolną część trzonu spinki. Proponowana dotychczas struktura domeny poli(A) wirusa HIV-2 (+125 – 185) jest dość zagadkowa - spinka z ogromną 29-nukleotydową pętlą terminalną, w obrębie której znajduje się niesparowana sekwencja AAUAAA (47;47).



Od pewnego czasu motyw ten jest obiektem badań strukturalnych prowadzonych w naszej Pracowni.

Udowodniono, że u HIV-1 struktura domeny poli(A) znajdującej się w obrębie rejonu liderowego (koniec 5') ogrywa istotną rolę w procesie transkrypcji i regulacji poliadenylacji końca 3' mRNA. Szybkie formownie przez nowopowstały mRNA struktury spinki z częściowo sparowanymi sekwencjami istotnymi dla poliadenylacji, zapobiega przedwczesnemu wystąpieniu tego procesu. Destabilizacja struktury domeny poli(A) rejonu liderowego powoduje znaczące obniżenie wirusowej transkrypcji, najprawdopodobniej na skutek uwolnienia sygnałów poliadenylacji końca 5', co prowadzi do przedwczesnej poliadenylacji objawiającej się powstawaniem jedynie bardzo krótkich transkryptów (101;102;106).

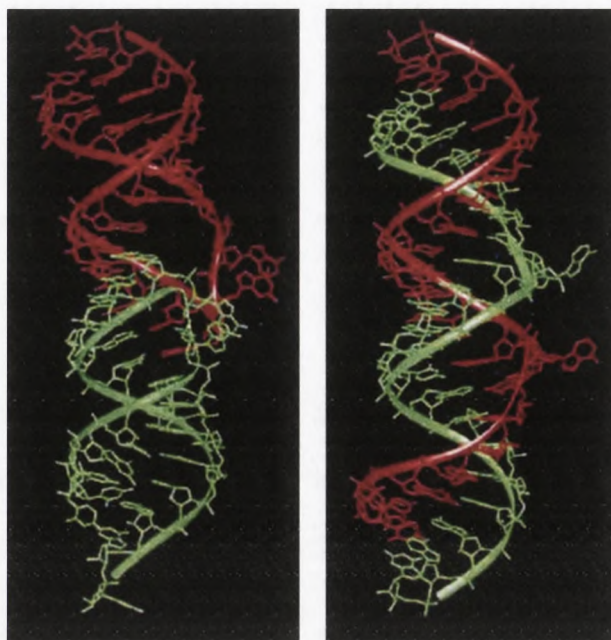
### 2.3.5. Domena DIS - dimeryzacja genomowego RNA

Unikalną cechą retrowirusów jest obecność w wirionie dwóch identycznych lub prawie identycznych kopii genomowego RNA, zasocjowanych w pobliżu ich 5' końców (41). W ostatnich latach poczyniono znaczący postęp w badaniach dimeryzacji genomowego RNA retrowirusów i wykazano istotne znaczenie tego zjawiska dla różnych etapów replikacji wirusa. Postuluje się, na przykład, że dimeryzacja zapewnia fizyczny kontakt pomiędzy cząsteczkami RNA, ułatwiając przeskok polimerazy podczas odwrotnej transkrypcji. Zwiększa to prawdopodobieństwo zachodzenia rekombinacji genomowego RNA, a tym samym indukuje genetyczną różnorodność wirusów HIV (107;108). Dimeryzacja odgrywa również istotną rolę podczas formowania wirionów potomnych, ponieważ dimery RNA są pakowane preferencyjnie (90;96). Stabilność termodynamiczna dimeru RNA zmienia się w czasie i obserwowany na początku słaby kompleks dimeru, oparty o oddziaływania pętla - pętla (ang. *kissing loop complex*), ulega transformacji do bardziej stabilnej, podwójnoniciowej formy dimeru - (ang. *extended duplex*). W przejściu od słabej do stabilnej formy dimeru istotną rolę odgrywa wirusowe białko nukleokapsydu (NC) oraz jony  $Mg^{2+}$  (42;109). Pomimo, że w dimeryzację retrowirusowego RNA *in vivo* zaangażowane są istotne czynniki białkowe, to zarówno w przypadku HIV-1, jak HIV-2 może on ulegać spontanicznej dimeryzacji *in vitro* pod wpływem podwyższonej temperatury (50 - 65°C) i inkubacji w buforze zawierającym jony  $Mg^{2+}$ , dodatek białka NC zwiększa jednak znacznie efektywność tego procesu (86;88;110).

Dla dimeryzacji genomowego RNA wirusa HIV-1 *in vitro* i *in vivo* kluczowa jest, znajdująca w obrębie rejonu liderowego, spinka DIS (ang. *dimerization initiation site*). W pętli apikalnej zawiera ona palindromową sekwencję, najczęściej GCGCGC. Oddziaływanie sekwencji palindromowych spinek DIS indukuje formowanie zarówno słabych, jak i stabilnych dimerów RNA (111). Znana jest zarówno struktura NMR, jak i krystalograficzna (rys. IV.11)



23-meru o sekwencji spinki DIS wirusa HIV-1 (82;83;112;113). Dane otrzymane dla tych krótkich fragmentów RNA wskazują, że przejście od słabej do stabilnej formy dimeru *in vitro* następuje najprawdopodobniej bez etapu dysocjacji rejonów pętlowych spinek DIS.



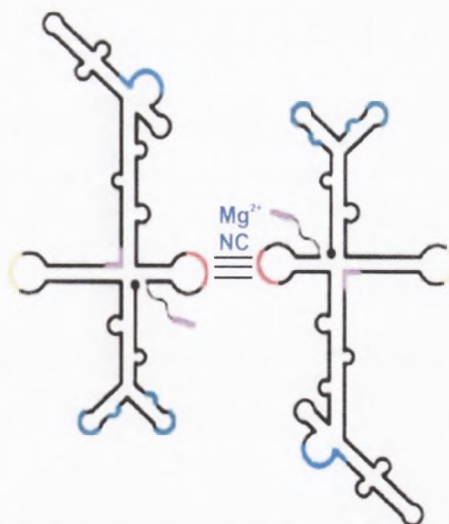
**Rysunek. IV.11** Struktura krystalograficzna dimeru typu *kissing-loop complex* - NDB IDUR005 (po lewej) i *extended duplex* - UR0016 (po prawej) 23-meru RNA o sekwencji domeny DIS HIV-1. Dwie nici RNA oznaczone są odpowiednio kolorem czerwonym i zielonym.

O ile w przypadku HIV-1 dane dotyczące dimeryzacji są raczej zgodne (42;109), to w przypadku HIV-2 sytuacja jest bardziej skomplikowana. Według jednej grupy badaczy spinka DIS HIV-2, pomimo ogólnego podobieństwa strukturalnego do DIS HIV-1, nie odgrywa żadnej roli w dimeryzacji *in vitro* i *in vivo*, a istotna dla tego procesu jest inna palindromowa sekwencja GGCGCC, nazywana *Nar I*. Stanowi ona fragment domeny PBS, dokładnie 5' koniec miejsca wiązania starterowego tRNA i obejmuje rejon +304 - 309. Proponowany model dimeryzacji zakłada formowanie struktury spinki przez rejon +283 – 323 domeny PBS, a sekwencja *Nar I* znajduje się wtedy w jej pętli apikalnej. Oddziaływanie pętli apikalnych, zawierających sekwencję *Nar I*, dwóch cząsteczek RNA prowadzi do formowania dimerów RNA HIV-2 (110).

Drugi model dimeryzacji RNA HIV-2 jest analogiczny do proponowanego dla HIV-1. Według niego, znajdująca się w obrębie rejonu liderowego spinka DIS (+397-443) jest kluczowa i zarazem wystarczająca do efektywnej dimeryzacji (86). Pętla terminalna spinki DIS wirusa HIV-2 zawiera również palindromową sekwencję, jednak o innym składzie reszt nukleotydowych – GGUACC, niż w przypadku HIV-1. U obu wirusów HIV dimeryzacja regulowana jest przez występowanie alternatywnych konformerów rejonu liderowego – LDI i BMH (89). W konformerze LDI istotna dla dimeryzacji sekwencja palindromowa spinki DIS



zaangażowana jest w oddziaływanie W-C z sekwencją znajdującą się od 3' strony tej spinki (rys. IV.8). Zapobiega to przedwczesnej dimeryzacji RNA wirusa, która automatycznie hamowałaby inne wcześniejsze etapy wirusowej replikacji. Natomiast struktura BMH, z wyeksponowaną spinką DIS, wyzwała wydajną dimeryzację genomu (rys.IV.12) oraz pozwala na prezentowanie znajdujących się od 3' strony rejonu DIS sekwencji kontrolujących pakowanie RNA do wirionów potomnych. Nie ma danych krystalograficznych ani NMR dotyczących struktury spinki DIS wirusa HIV-2. Proponowana, na podstawie analiz biochemicznych, struktura spinki DIS HIV-2 z dużą jedenastonukleotydową pętlą apikalną jest dość kontrowersyjna i dlatego badania w tym kierunku metodami dynamiki molekularnej prowadzone są w naszej Pracowni (dr Łukasz Bielecki).



**Rysunek IV. 12.** Model dimeryzacji RNA HIV-2 poprzez oddziaływanie spinek DIS rejonów liderowych dwóch cząsteczek RNA

Trzeci mechanizm jest połączeniem dwóch pierwszych i zakłada, że zarówno sekwencja *Nar I* jak i sekwencja palindromowa spinki DIS uczestniczą w dimeryzacji. Podczas gdy sekwencja *Nar I* związana jest z formowaniem słabych dimerów, homologiczna do HIV-1, spinka DIS HIV-2 konieczna jest do formowania stabilnych dimerów wirusowego RNA (114;115)

Proponuje się, że również inne domeny rejonu liderowego wirusów HIV, jak TAR, poli(A) czy trzy spinki  $\Psi$  zlokalizowane od 3' strony domeny DIS, mogą być bezpośrednio zaangażowane w dimeryzację wirusowego RNA (42;96).

### 2.3.6. Domeny $\Psi$ - pakowanie RNA do wirionów potomnych

Wiriony potomne HIV-1 i HIV-2 zawierają jedynie pełnej długości cząsteczki genomowego RNA, które nie podlegały procesowi splicingu. Takie RNA powstają jedynie w późnej fazie wirusowej infekcji, służąc zarówno jako genomowy RNA, jak i mRNA dla białek Gag i Gag-Pol (44). Pomimo, że genomowy RNA wirusa stanowi zaledwie 1% całkowitej ilości RNA w zainfekowanej komórce, jest on wysoce specyficznie rozpoznawany. Za selekcję odpowiedniego RNA odpowiedzialne są zlokalizowane obrębie 3' końca rejonu liderowego spinkowe struktury RNA nazywane sygnałami pakowania –  $\Psi$ , a także czynniki białkowe w szczególności pełnej długości wirusowa poliproteina Gag (76;77;116).

RNA wirusa HIV-1 zawiera tylko jeden główny sygnał pakowania  $\Psi$  i znajduje się on





pomiędzy domeną SD, a kodonem start otwartej ramki odczytu białka Gag (117). Taka lokalizacja zapewnia obecność spinek  $\Psi$  jedynie w tych cząsteczkach RNA, które nie podlegały procesowi splicingu (rys. IV.10). Poliproteina Gag rozpoznaje i specyficznie wiąże tylko te cząsteczki RNA, które zawierają spinę  $\Psi$  (118). Szczególnie istotna dla tego wiązania jest domena NC poliproteiny Gag, zawierająca dwa palce cynkowe (ang. *zinc finger region*) (116;119;120). Związanie poliproteiny Gag do spinki  $\Psi$  blokuje translację, zatem taki RNA nie może być dalej wykorzystywany jako mRNA i jako genomowy RNA pakowany jest do wirionów potomnych (76;116).

Dla HIV-2 proces pakowania RNA do wirionów potomnych jest poznany znacznie słabiej. Wiadomo, że tak jak u HIV-1 istotną rolę odgrywają sygnały pakowania  $\Psi$ , występujące w obrębie rejonu liderowego oraz poliproteina Gag, jednak mechanizm procesu pakowania jest inny (76). Sekwencje nukleotydowe sygnałów pakowania  $\Psi$  wirusów HIV-1 i HIV-2 wykazują niewielką tylko homologię, natomiast sekwencje aminokwasowe domeny NC poliproteiny Gag są bardzo podobne (121). Pełnej długości liderowy RNA HIV-2 zawiera trzy motywy spinkowe stanowiące trzy odrębne sygnały pakowania  $\Psi$ . Jeden z nich znajduje się po 5' stronie spinki SD i uważany jest najczęściej za kluczowy sygnał pakowania. Dwa pozostałe sygnały  $\Psi$  od 3' strony spinki SD są najprawdopodobniej mniej istotne (122). Istnieją jednak przesłanki, że wszystkie trzy spinki  $\Psi$  są niezbędne dla efektywnego pakowania genomowego RNA do wirionów potomnych (123). A zatem w odróżnieniu od wirusa HIV-1, u HIV-2 zarówno mRNA, który nie podlegał procesowi splicingu, jak i ten u którego doszło do tego procesu, może zawierać sygnały lub sygnał  $\Psi$  (97). Rodzi to konieczność istnienia dodatkowego mechanizmu selekcji pełnej długości genomowych cząsteczek RNA. Mechanizm ten opiera się na połączeniu pakowania RNA z translacją wirusowej poliproteiny Gag (76;124). Do wirionów potomnych efektywnie pakowane są jedynie te cząsteczki RNA, które nie tylko nie podlegały splicingowi, ale jeszcze stanowiły matrycę do translacji pełnej długości poliproteiny Gag. Nowopowstała poliproteina Gag, poprzez domenę NC, oddziałuje z sekwencjami stanowiącymi sygnały  $\Psi$  w mRNA na matrycy, którego zastała zsyntetyzowana (rys.IV.5). Oddziaływanie poliproteiny Gag z „własnym” mRNA ułatwia pakowanie genomowego RNA, gdyż w przypadku wirusa HIV-2 tylko mała część tej poliproteiny znajduje się w odpowiednich do formowania wirionów potomnych przedziałach zainfekowanej komórki. Dla kontrastu HIV-1 syntetyzuje dużą ilość poliproteiny Gag, swobodnie dostępnej w różnych rejonach komórki (39;124).

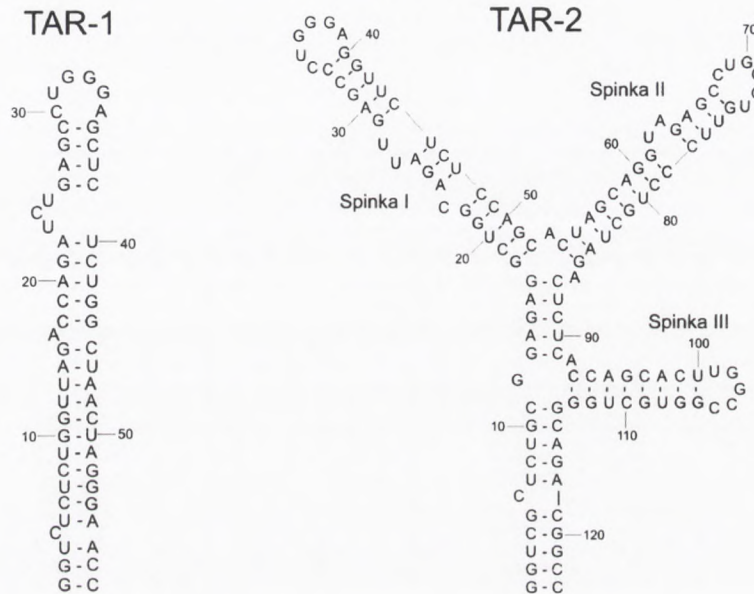
Chociaż spinki  $\Psi$  są najistotniejsze dla pakowania RNA do wirionów potomnych, to również inne motywy rejonu liderowego genomowego RNA, wskazywane są jako istotne dla tego procesu. Postuluje się nawet, że globalna struktura całego lidera ma wpływ na formowanie potomnych wirionów HIV-1 i HIV-2 (15;90;96).

The text on this page is extremely faint and illegible. It appears to be a standard page of prose, possibly containing a list or numbered items, but the content cannot be discerned. The text is organized into several paragraphs, with some lines appearing to be bulleted or numbered. The overall structure suggests a formal document or report.





pierwszych spinek TAR-2 przypomina spinę TAR wirusa HIV-1. Dwunukleotydowe wybrzuszenia znajdują się w pozycji podobnej do trójnukleotydowego wybrzuszenia UCU TAR-1. Taka sama jest ilość reszt nukleotydowych w pętłach apikalnych oraz w przypadku spinki pierwszej także sekwencja, natomiast pętla apikalna spinki drugiej różni się tylko jedną resztą nukleotydową (U zamiast A) w ostatniej pozycji pętli. Opisana powyżej rozgałęziona struktura drugorzędowa TAR RNA HIV-2 jest jedyną, jaką dotychczas zaproponowano.



**Rysunek IV.13.** Struktura drugorzędowa domeny TAR RNA wirusa HIV-1 (TAR-1) oraz rozgałęziona, trójspinkowa struktura TAR RNA wirusa HIV-2 (TAR-2). Obie struktury są powszechnie akceptowane, jednak tylko struktura TAR-1, w odróżnieniu od TAR-2, została potwierdzona szczegółowymi badaniami strukturalnymi.

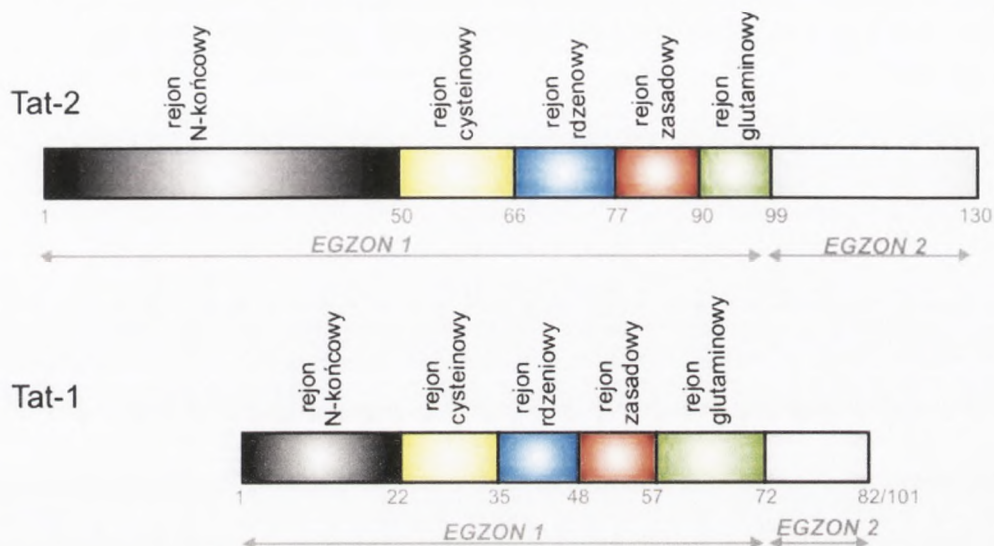
Niestety brakuje jakichkolwiek danych krystalograficznych oraz NMR dotyczących struktury zarówno pełnej długości TAR-2, jak i jego fragmentów. Znana jest jedynie określona metodą NMR struktura chimerycznej spinki I TAR-2 z TAR-1 RNA; dokładniej jest to apikalna część spinki TAR-1 z wybruszeniem UU, charakterystycznym dla spinki I TAR-2. Ustalono zarówno jej strukturę w formie wolnej, jak i w kompleksie z amidem argininy (132-134). Do tych ustaleń nawiążę w dalszej części pracy, podczas dyskusji moich własnych wyników (rozdział V.2.4.).

### 3.2. BIAŁKA TAT WIRUSÓW HIV

Białka Tat (ang. *trans-activator*) są bogatymi w argininę białkami regulatorowymi, oddziałującymi z RNA. Występują u wirusów HIV, SIV, EIAV oraz BIV. Białka wirusów HIV-1 i HIV-2 oznaczane są odpowiednio jako Tat-1 i Tat-2. Są to małe białka, składające się z 82 - 101 reszt aminokwasowych u HIV-1 (dostępne są różne dane, jednak prawidłowa



wydaje się liczba 101 aa) oraz z 130 reszt aminokwasowych u HIV-2. Białka Tat kodowane są przez dwa osobne egzony genu *tat*, przy czym za kluczowy dla ich funkcji uważany jest rejon kodowany przez pierwszy egzon, obejmujący dla Tat-1 pierwsze 72 reszty aminokwasowe, natomiast w przypadku Tat-2 pierwsze 99 reszt (135-138).

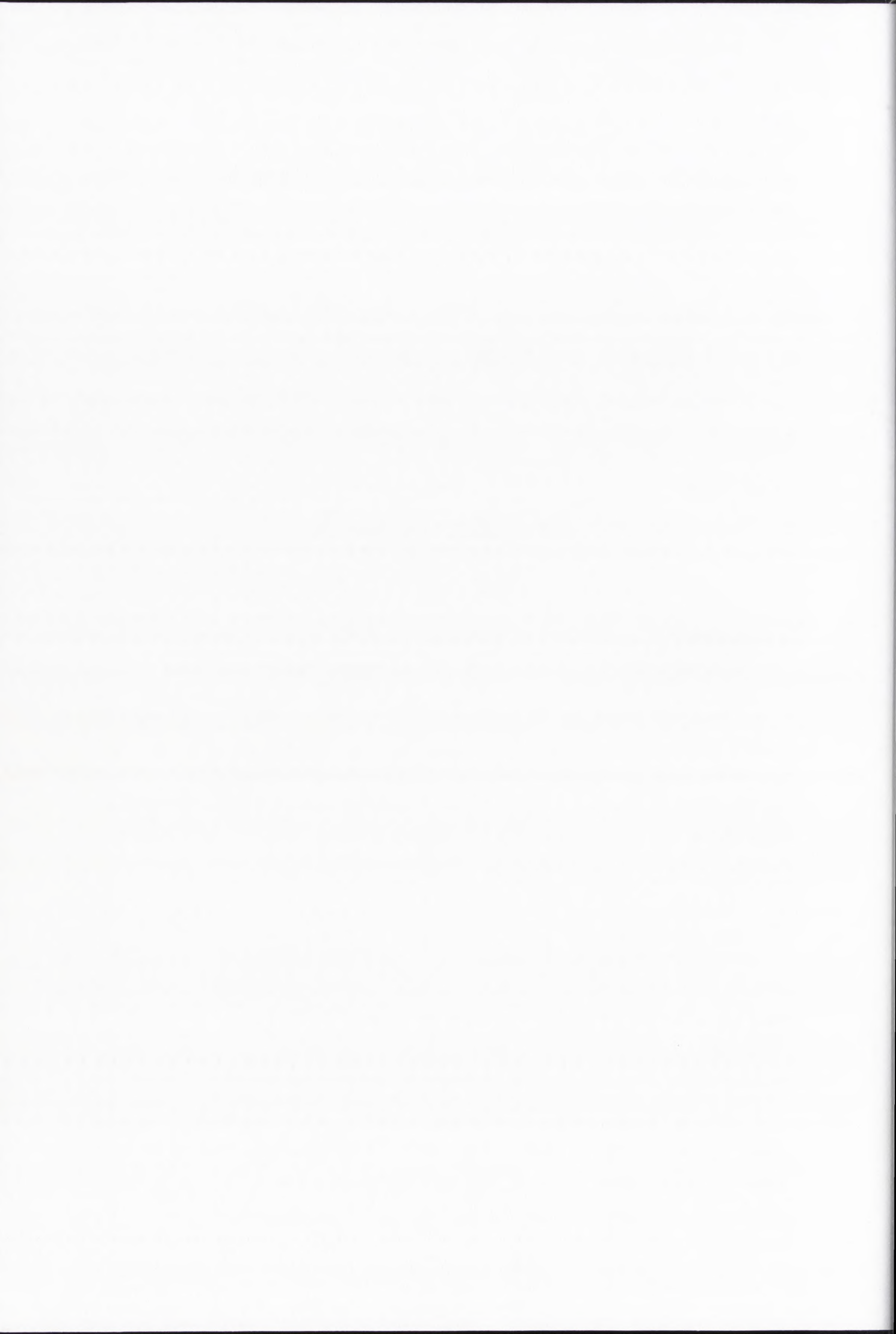


**Rysunek IV.14.** Schematyczne porównanie organizacji rejonów funkcjonalnych białek Tat wirusów HIV-1 i HIV-2, ze wskazaniem numerów reszt aminokwasowych tworzących dany rejon. Na podstawie (136;137), zmodyfikowany. Szczegółowy opis schematu znajduje się w tekście.

W obrębie białek Tat można wyróżnić kilka rejonów funkcjonalnych, nazywanych również często domenami pomimo tego, że nie tworzą odrębnych motywów strukturalnych (rys. IV.14). Są to kolejno: rejon N-końcowy; rejon bogaty w reszty cysteinowe (5 lub 7 reszt odpowiednio dla Tat-1 i Tat-2); rejon rdzeniowy, zawierający liczne aminokwasy hydrofobowe; rejon zasadowy (ARM - ang. *arginine-rich motif*) z 7 resztami argininy i dwoma lizyny, który jest charakterystyczny dla białek wiążących RNA oraz rejon bogaty w reszty glutaminowe. Silnie zachowawcze wśród wszystkich lentiwirusów są rejony rdzeniowy i zasadowy, natomiast największa zmienność obserwowana jest w rejonie N-końcowym (136-139). Na podstawie analizy mutacyjnej wyznaczono dwie funkcjonalne domeny białek Tat istotne dla zachodzenia procesu *trans*-aktywacji. Bogaty w reszty argininy rejon zasadowy ARM stanowi domenę istotną dla wiązania TAR RNA (rys. IV. 17). Rejon N-końcowy, cysteinowy i rdzeniowy tworzą wspólnie domenę aktywacyjną białek Tat, odpowiedzialną za wiązanie czynników komórkowych, w tym cykliny T1 (136;138-140).

Obydwie istotne domeny funkcjonalne kodowane są przez pierwszy egzon genu *tat*, jednak najprawdopodobniej rejony Tat kodowane przez drugi egzon również mają pewien wpływ na aktywność tych białek. W przypadku Tat-1 sugeruje się, że rejon kodowany przez drugi egzon częściowo hamuje funkcjonowanie domeny aktywacyjnej białka i dopiero





oddziaływanie Tat-1 z czynnikami komórkowymi pozwala na pełną aktywność tej domeny. W przypadku białka Tat-2 wykazano, że rejon kodowany przez drugi egzon nie ma hamującego wpływu na domenę aktywacyjną białka, a co więcej wzmacnia *trans*-aktywację, zwiększając powinowactwo Tat-2 do TAR-2 RNA (137). Niestety brak jest szczegółowych danych strukturalnych dotyczących białek Tat, a w szczególności białka Tat-2. Warto jednak podkreślić, że na podstawie spektroskopii NMR polipeptydu otrzymanego drogą syntezy chemicznej, ustalono strukturę trzeciorzędową wolnego białka Tat-1 (141-143).

Bogaty w cysteinę rejon białek Tat wiąże niektóre jony metali dwuwartościowych, jak  $Zn^{2+}$ , ale nie  $Mg^{2+}$ , przy czym rejon ten nie ma struktury palca cynkowego, ani innych scharakteryzowanych motywów wiążących cynk (144). Każdy monomer białka Tat wiąże dwa atomy  $Zn^{2+}$  a koordynacyjne związanie tych jonów przez dwie cząsteczki białka Tat prowadzi do formowanie dimerów białka Tat. Białka Tat mogą również tworzyć dimery niezależnie od obecności  $Zn^{2+}$ . Sugeruje się jednak, że podczas *trans*-aktywacji Tat spełnia swoją funkcję najprawdopodobniej jako monomer, a nie dimer (145;146). Jony  $Zn^{2+}$  odgrywają za to istotną rolę w oddziaływaniu białka Tat z ludzką cykliną T1 (147).

W porównaniu do Tat-1, wiedza dotycząca białka Tat-2 jest znacznie skromniejsza. Wykazano jednak, że białka Tat-1 i Tat-2 odgrywają bardzo podobną rolę w cyklu życiowym wirusów HIV, a ich główną funkcją jest *trans*-aktywacja elongacji wirusowej transkrypcji, poprzez oddziaływanie z TAR RNA i cykliną T1 kompleksu P-TEFb. Białko Tat-2 w odróżnieniu od Tat-1 może wiązać także inne cykliny, jak cyklina T2a czy T2b jednak kompleksy te nie są efektywne w *trans*-aktywacji wirusowej transkrypcji, gdyż nie oddziałują z TAR-2 RNA (148;149).

### 3.3. OD TAK DO P-TEFb, CZYLI O IDENTYFIKACJI ISTOTNYCH DLA PROCESU *TRANS*-AKTYWACJI CZYNNIKÓW KOMÓRKOWYCH

Dla zrozumienia mechanizmu działania białek Tat konieczne było zidentyfikowanie oddziałujących z nimi czynników komórkowych. Na podstawie licznych eksperymentów ustalono, że białka Tat wirusów HIV-1 i HIV-2 oddziałują z tymi samymi czynnikami komórki gospodarza, a najważniejszym z nich jest komórkowa kinaza, nazywana TAK (ang. *Tat-associated kinase*). Już na początku lat dziewięćdziesiątych wykazano, że domena aktywacyjna białek Tat-1 i Tat-2 wiąże TAK *in vitro*, a mutacje w domenie aktywacyjnej Tat, uniemożliwiające wiązanie TAK, hamują wirusową transkrypcję *in vivo* (150). TAK jest kinazą serynowo-treoninową, zdolną do fosforylacji C-końcowej domeny RNA polimerazy II (CTD). Zaproponowano, że Tat rekrutuje lub aktywuje TAK, która z kolei prowadzi do hyperfosforylacji CTD RNA polimerazy II (151;152). Kinaza TAK nie była spokrewniona z innymi znanymi kinazami zidentyfikowanymi u człowieka i początkowo została uznana za nową kinazę CTD, jednak bardzo zbliżoną do występującego u *Drosophila* czynnika



transkrypcyjnego P-TEFb. Wkrótce analogiczny czynnik P-TEFb zidentyfikowano u człowieka (153). P-TEFb jest istotnym czynnikiem etapu elongacji procesu transkrypcji i jest wymagany do transkrypcji większości genów klasy II (154;155). Dalsze prace badawcze wykazały, że katalityczną podjednostkę TAK i P-TEFb stanowi kinaza nazywana początkowo PITALRE, a później CDK9, należąca do rodziny cyklino-zależnych kinaz białkowych (156;157). Stąd krótka już była droga do ustalenia, że TAK to nic innego, jak P-TEFb (158).

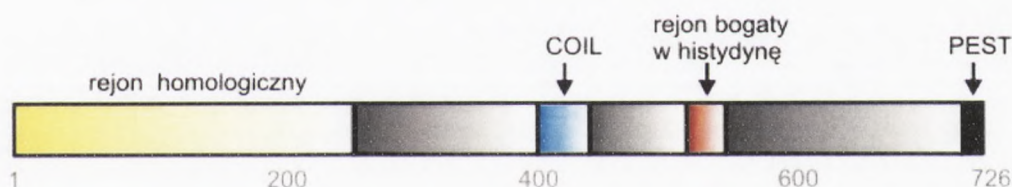
Masa P-TEFb występującego u człowieka wynosi około 110kDa, a CDK9 tylko 42kDa, było zatem oczywiste, że TAK / P-TEFb zawiera jeszcze inne dodatkowe podjednostki i podejrzewano, że jedną z nich jest najprawdopodobniej jakaś cyklina. Ostatecznie ustalono, że regulacyjną podjednostkę cyklinową P-TEFb stanowi cyklina T, nazwana tak ze względu na jej znaczenie dla procesu transkrypcji (131;159). Trzy różne cykliny T mogą być komponentem P-TEFb i są to cyklina T1, T2a oraz T2b. Cykliny te kodowane są przez dwa geny, odpowiednio *T1* i *T2*. Dwie różne cykliny T2 powstają na skutek alternatywnego splicingu produktu genu *T2*. Cykliny T1 i T2 mają ponad 80% homologii sekwencji aminokwasowej w rejonie szczególnie istotnym dla ich aktywności, określanym jako kasetta cyklinowa (ang. *cyclin box*), ale tylko 50% homologii w pozostałej sekwencji. Podjednostki kompleksu P-TEFb nie występują w komórce w formie wolnej, około 80% CDK9 jest zasocjowane z cyklina T1, a tylko 10 do 20% z cyklina T2a lub T2b (159;160). Cykliny T2a i T2b nie mają wpływu na zależną od białka Tat *trans*-aktywację genów HIV, podczas gdy cyklina T1 jest kluczowa dla tego procesu (75;131;148;149). Nie wiadomo, dlaczego promotory lentiwirusowe, w odróżnieniu od komórkowych, wymagają formowania kompleksu TAR / Tat / cyklina T1 dla aktywności P-TEFb (161).

Ostatnie badania wykazały, że P-TEFb istnieje w komórce w dwóch różnych formach. Forma aktywna P-TEFb zawiera tylko dwie podjednostki i są nimi kinaza CDK9 i cyklina T1 lub jedna z cyklin T2. W formie nieaktywnej P-TEFb jest większym kompleksem, który oprócz CDK9 i cykliny T1 zawiera 7SK RNA oraz dodatkowe białko nazywane HEXIM (162). 7SK RNA jest występującym powszechnie niekodującym, małym, jądrowym RNA (snRNA). Białko HEXIM asocjuje tylko z tymi kompleksami P-TEFb, które zawierają 7SK RNA. Zarówno 7SK RNA jak i białko HEXIM hamują aktywność kinazy CDK9 (163). Wzajemne oddziaływanie P-TEFb z 7SK RNA i białkiem HEXIM jest odwracalne i jego przerwanie przywraca aktywną formę P-TEFb. Stosunek aktywnej do nieaktywnej formy P-TEFb w komórce zmienia się w czasie, a w niektórych fazach życia komórki więcej niż połowa P-TEFb tworzy nieaktywne kompleksy z 7SK RNA oraz HEXIM. Oddziaływanie P-TEFb z HEXIM uniemożliwia asocjację z białkiem Tat ponieważ HEXIM wiąże się do tego samego rejonu cykliny T1 jak Tat, zatem Tat może oddziaływać tylko z aktywną formą P-TEFb (164).



### 3.4. LUDZKA CYKLINA T1

Cyklina T1 jest kodowanym na chromosomie 12, białkiem o masie 87 kDa zbudowanym z 726 reszt aminokwasowych (165). Analiza sekwencji cykliny T1 wykazała, że 250 reszt aminokwasowych z N-końca tego białka wykazuje silną homologię z cyklinami C różnych organizmów i rejon ten zawiera dwa takie same powtórzenia motywu pięciu helis  $\alpha$  (1 – 5 i 1' – 5'). W obrębie tego rejonu znajduje się silnie zachowawczy układ 25 reszt aminokwasowych nazywany kasetą cyklinową (ang. *cyclin box*). Dalsza część cykliny T1 jest słabo scharakteryzowana, ale wiadomo, że zawiera ona kilka charakterystycznych rejonów: motyw *coiled-coil* (379 - 430 aa), rejon bogaty w histydynę (506 - 530 aa) oraz sekwencję PEST na C-końcu (709 – 726 aa) (rys.IV.15). Sekwencja PEST jest charakterystyczna dla cyklin fazy G1 i związana jest z regulacją procesu degradacji białek. Należy podkreślić, że w odróżnieniu od białek Tat, cyklina T1 nie zawiera typowej domeny wiążącej RNA (160). Dla aktywności cykliny T1 istotny jest rejon homologiczny z innymi cyklinami oraz kilkanaście reszt aminokwasowych znajdujących się bezpośrednio za nim. Pozostała część cykliny T1 nie ma znaczenia dla jej aktywności *in vitro*, ale najprawdopodobniej jest potrzebna dla pełnej aktywności *in vivo* i choć nie jest jeszcze znane jej znaczenie funkcjonalne to może stanowić miejsce wiązania różnych białek (131;147;166;167).



**Rysunek IV.15.** Schemat organizacji poszczególnych domen ludzkiej cykliny T1, ze wskazaniem numerów reszt aminokwasowych tworzących dany rejon. Na podstawie (166), zmodyfikowany. Szczegółowy opis schematu znajduje się w tekście.

Cyklina T1 jest ważnym kofaktorem dla białek Tat obu wirusów HIV. Zarówno wolna cyklina T1, jak i w kompleksie z kinazą CDK9 wiąże białko Tat, a utworzony kompleks oddziałuje z TAR RNA (131;148). Kinaza CDK9 bez udziału cykliny T1, nie oddziałuje ani z białkiem Tat, ani z TAR RNA. Kinaza CDK9 wiąże się do rejonu cykliny T1 zawierającego układ pierwszych pięciu helis  $\alpha$ , czyli do innego miejsca niż białko Tat (rys. IV.17). Dla formowania trójskładnikowego kompleksu TAR / Tat / cyklina T1 wystarczający jest rejon cykliny T1 obejmujący reszty aminokwasowe 1 – 272, czyli cała domena homologiczna z innymi cyklinami oraz kilka reszt aminokwasowych znajdujących się bezpośrednio za nią. Kluczowe są tu reszty 250 – 272 tworzące rejon nazywany TRM (ang. *TAR/Tat recognition motif*). Szczególnie ważna dla formowania kompleksu z Tat i TAR RNA jest reszta cysteiny pozycji 261 cykliny T1 (166;168).



Sekwencja cykliny T1 zaangażowana w oddziaływanie z Tat-1 lub Tat-2 jest bardzo podobna, ale nie identyczna (169). Mutacja w pozycji 261 cykliny T1 powoduje utratę zdolności wiązania białka Tat-1, co ciekawe nie ma ona wpływu na wiązanie Tat-2. Proponuje się, że reszta cysteiny 261 jest kluczowa dla oddziaływania z Tat-1, natomiast w przypadku Tat-2 stanowi ona tylko jedno z licznych miejsc kontaktu pomiędzy białkami w kompleksie Tat-2 / cyklina T1. Jednak zarówno w przypadku kompleksów z białkiem Tat-1, jak i Tat-2, cysteina 261 cykliny T1 jest krytyczna dla oddziaływania kompleksu Tat / cyklina T1 z TAR RNA. Kluczowe dla oddziaływania Tat z cykliną T1 są jony metali w szczególności jony  $Zn^{2+}$  oddziałujące z resztami cysteinowymi występującymi w obydwu białkach (147).

Istnieją również doniesienia, że cyklina T1 może aktywować transkrypcję genów HIV bez udziału białka Tat i TAR RNA i wymagane jest do tego oddziaływanie cykliny T1 z wiążącym się do rejonu LTR, komórkowym czynnikiem SP1 (170).

### 3.5. ODDZIAŁYWANIE TAR RNA Z WIRUSOWYM BIAŁKIEM TAT I LUDZKĄ CYKLINĄ T1

Oddziaływanie TAR RNA z wirusowym białkiem Tat i ludzką cykliną T1 jest kluczowe dla procesu *trans*-aktywacji etapu elongacji wirusowej transkrypcji i z tego powodu stanowi obiekt intensywnych badań wielu laboratoriów. Zdecydowana większość badań skupia się jednak na analizie tego oddziaływania dla wirusa HIV-1. W przypadku wirusa HIV-2 problem formowania się kompleksu TAR RNA z białkiem Tat-2 i ludzką cykliną T1 jest poznany znacznie słabiej i aktualnie brak jest jednoznacznych danych dotyczących stechiometrii, topologii, a tym bardziej struktury kompleksu TAR-2 / Tat-2 / cyklina T1 w obrębie systemu HIV-2. Wszystkie dotychczasowe rozważania dotyczące oddziaływania TAR-2 z białkami Tat i cykliną T1 prowadzono w świetle rozgałęzionej (trójspinkowej) struktury tej domeny RNA.

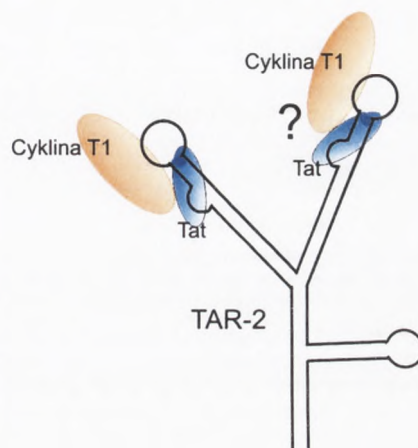
Dla TAR-1 głównym miejscem oddziaływania z białkiem Tat jest rejon trójnukleotydowego wybrzuszenia UCU oraz sąsiadujące z nim pary zasad. Wykazano, że białko Tat-1, poprzez pojedynczą resztę argininy rejonu ARM, oddziałuje z pierwszą resztą (U23) trójnukleotydowego wybrzuszenia TAR-1, a pozostałe dwie służą jedynie jako strukturalny łącznik i mogą być zastąpione przez inne reszty nukleotydowe (171;172). Na podstawie szczegółowych badań strukturalnych z wykorzystaniem krótkich peptydów o sekwencji białka Tat-1 oraz amidu argininy ustalono, że Tat-1 rozpoznaje również dwie pary nukleotydowe znajdujące się w rejonie helikalnym bezpośrednio nad wybrzuszeniem (G26 – C39 oraz A27 – U38), przy czym para zasad A27 – U38 i reszta wybrzuszenia U23 formują charakterystyczny układ trójki zasad (ang. *base triple*) istotny dla wiązania białka Tat (126;173;174). Ponadto w oddziaływanie z białkiem Tat zaangażowane są również grupy fosforanowe reszt nukleotydowych znajdujących się poniżej wybrzuszenia – P21, P22 i P40.





Według zaproponowanego modelu kompleksu TAR-1 / Tat-1, białko Tat-1 oddziałuje początkowo z dużą bruzdą dostępną w strukturze TAR-1, co z kolei wywołuje konformacyjną rearanżację TAR-1, która umożliwia umieszczenie N-końca białka Tat w bliskim sąsiedztwie nukleotydów wybrzuszenia i pętli apikalnej TAR-1 (136).

W rozgałęzionej strukturze TAR-2 dwie pierwsze spinki od strony 5' uważane są za potencjalne miejsca oddziaływań z białkami istotnymi dla procesu *trans*-aktywacji. Jako miejsca wiązania białka Tat-2 w strukturze TAR-2 wskazywane są dwunukleotydowe wybrzuszenia spinek I i II (rys.IV.16). Spinka III ze względu na brak wybrzuszenia uważana jest za nieistotną w oddziaływaniu z białkiem Tat, brak jednak na to jednoznacznych dowodów (19;87). Dane dotyczące ważności dwóch pierwszych spinek TAR-2 w procesie *trans*-aktywacji są niekompletne i często sprzeczne. Zresztą samo istnienie u HIV-2 dwóch spinek wydaje się zagadkowe w świetle faktu, że geny HIV-1 podlegają wydajnej ekspresji pomimo, obecności tylko jednej spinki TAR na 5' końcu wirusowego mRNA.



**Rysunek IV.16.** Utworzony na podstawie dostępnych danych literaturowych prawdopodobny model oddziaływania białka Tat-2 oraz ludzkiej cykliny T1 z rozgałęzioną strukturą TAR-2 RNA.

Do pełnej *trans*-aktywacji HIV-1 i HIV-2 LTR przez białko Tat-1 wymagana jest sekwencja +1 - 53 wirusowego mRNA. Natomiast do pełnej aktywacji HIV-2 LTR przez Tat-2 wymagana jest dodatkowa sekwencja, unikalna dla HIV-2 i obejmująca rejon +54 - 99 czyli sekwencję drugiej spinki TAR-2 (17;19;175;176). W świetle rozgałęzionej struktury TAR-2 RNA wskazuje to, że pojedyncza spinka TAR jest wystarczająca dla pełnej aktywności białka Tat-1, podczas gdy Tat-2 wymaga dwóch spinek TAR. Istnieją również przeciwne dane eksperymentalne wskazujące, że dla *trans*-aktywacji przez białko Tat-2 konieczna i zarazem wystarczająca jest sekwencja tylko pierwszej spinki (+1 - 53) TAR-2 (177).

Chociaż dwunukleotydowe wybrzuszenia obu spinek zdolne są do wiązania Tat-2 *in vitro* to proponuje się, że tylko wybrzuszenie spinki I jest wykorzystywane *in vivo* (87). Usunięcie wybrzuszenia spinki I powoduje 70% spadek poziomu *trans*-aktywacji zależnej od białka Tat-2, natomiast brak wybrzuszenia w drugiej spince ma jedynie niewielki wpływ na ten proces. Delecja wybrzuszeń obu spinek powodowała znaczną redukcję wiązania Tat-2 *in vitro* i prawie całkowicie hamowała *trans*-aktywację. Z drugiej strony prezentowane są również przeciwne wyniki wskazujące, że wybrzuszenie drugiej spinki jest jednak wykorzystywane *in vivo*, ponieważ pomimo usunięcia pierwszego wybrzuszenia TAR-2 nadal obserwowano wydajną *trans*-aktywację (178).



Podsumowując dostępne dane, można wysunąć wniosek, że obie spinki I i II rozgałęzionej struktury TAR-2 mają zdolność wiązania białka Tat-2, jednak spinka I jest miejscem preferencyjnego wiązania tego białka i jest niezbędna do zachodzenia procesu *trans*-aktywacji. Spinka II TAR-2 może wiązać Tat-2, ale najprawdopodobniej tylko w nieobecności lub podczas inaktywacji spinki i nawet częściowe funkcjonowanie spinki I maskuje aktywność spinki II w *trans*-aktywacji (87;178). Proponuje się, że różnica w aktywności spinek I i II TAR-2 wynika z odległości od miejsca startu transkrypcji (130;177). Warto wspomnieć o jeszcze jednej ciekawej teorii mówiącej, że zduplikowanie struktury spinki TAR u wirusa HIV-2 prowadzi do zahamowania aktywności białka Tat-2 i jest przyczyną powstawania znacząco większej ilości krótkich, niedokończonych transkryptów, niż obserwuje się dla HIV-1, co przekłada się na mniejszą wydajność transkrypcji, a w dalszej perspektywie być może mniejszą patogenność HIV-2 (178).

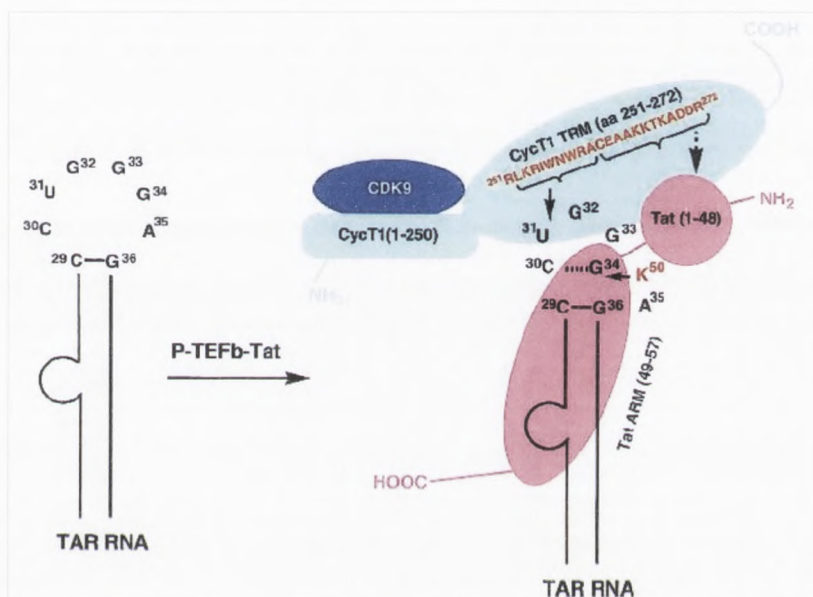
Białko Tat-1 wiąże TAR-2 z podobnym powinowactwem jak TAR-1 i aktywuje HIV-2 LTR z taką samą wydajnością, jak swój własny LTR. Natomiast białko Tat-2 bardzo słabo wiąże TAR-1 RNA i tylko częściowo aktywuje HIV-1 LTR (19;138;175;176). Istnieją nawet doniesienia, że *in vitro* białko Tat-1 wiąże TAR-2 znacznie silniej niż TAR-1 (131). Z drugiej strony inni badacze obserwowali, że białko Tat-2 wiąże TAR-1 i TAR-2 z takim samym powinowactwem (178). Ciekawy jest również fakt, że TAR-2 pozbawiony obu wybrzuszeń nie jest zdolny do wiązania białka Tat-1 i Tat-2 *in vitro*, ale *in vivo* obserwuje się wydajną *trans*-aktywację transkrypcji indukowaną przez Tat-1, ale nie przez Tat-2 (179). Pozostaje niejasne czy różnica w poziomie *trans*-aktywacji HIV-2 LTR indukowanej przez białko Tat-1 i Tat-2 wynika bezpośrednio z struktury TAR-2 RNA, czy też wpływają na to oddziaływania ze specyficznymi czynnikami komórkowymi.

Chociaż *in vitro* białka Tat wiążą się samodzielnie do TAR RNA, to *in vivo* Tat najpierw oddziałuje z ludzką cykliną T1, a dopiero potem z TAR RNA i najprawdopodobniej *in vivo* Tat nie może wiązać TAR RNA bez udziału cykliny T1 (12;13;180). Formowanie przez cyklinę T1 heterodimeru z białkiem Tat-1 lub Tat-2 wykazano zarówno w eksperymentach przeprowadzonych *in vitro* jak i *in vivo*, przy czym utworzony heterodimer cykliny T1 / Tat wykazuje większe powinowactwo do wiązania TAR RNA niż każde z tych białek osobno (131;147;166). Białko Tat-1 słabo wiąże TAR-1 *in vitro*, ale wiązanie to ulega silnemu wzmocnieniu w obecności cykliny T1. Cyklina T1 zwiększa również powinowactwo Tat-2 do TAR-2 jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku Tat-1 / TAR-1, zapewne dlatego, że Tat-2 *in vitro* wiąże silnie TAR-2 nawet bez udziału cykliny T1 (131).

Sekwencje TAR RNA istotne do wiązania białka Tat *in vitro*, nie są do końca zgodne z tymi, które wymagane są dla efektywnej *trans*-aktywacji *in vivo*. Natomiast sekwencje TAR istotne dla oddziaływania *in vitro* z kompleksem Tat / cyklina T1 są takie same jak te,



które wymagane są do efektywnej *trans*-aktywacji. Zarówno w przypadku TAR-1, jak i TAR-2 wykazano, że nie tylko mutacje w rejonach wybrzuszeń, ale także mutacje w pętlach apikalnych hamują proces *trans*-aktywacji (131;147;180). To właśnie te obserwacje stały się pierwotną przesłanką hipotezy o udziale dodatkowych czynników białkowych, wiążących się z obszarem pętli apikalnych spinek TAR podczas *trans*-aktywacji wirusowej transkrypcji. Dokładny sposób oddziaływania ludzkiej cykliny T1 z TAR RNA i białkiem Tat systemu HIV jest nieznan (12;13). Pierwotnie przypuszczano, że cyklina T1 nie wiąże się bezpośrednio z TAR, lecz oddziałuje z Tat zmieniając jego konformację w taki sposób, aby białko to mogło oddziaływać z pętlą apikalną TAR (131;147;180).



**Rysunek IV.17.** Uszczegółowiony model kompleksu TAR-1 RNA z wirusowym białkiem Tat-1 i ludzką cykliną T1. Przedstawiony model wskazuje kluczowe dla wzajemnego oddziaływania sekwencje aminokwasowe białek lub nukleotydowe RNA. Kolorem różowym oznaczono białko Tat, błękitnym cyklinę T1, granatowym kinazę CDK9 (181). Szczegółowy opis w tekście.

Szczegółowe badania systemu HIV-1 potwierdziły, że w obecności cykliny T1 poza wiązaniem białka Tat-1 w rejonie wybrzuszenia TAR-1, obserwuje się także silne i specyficzne oddziaływanie Tat-1 z resztami nukleotydowymi pętli apikalnej (rys. IV.17). Ponadto, chociaż sama cyklina T1 nie jest zdolna do wiązania TAR RNA *in vitro*, to w kompleksie z białkiem Tat-1 oddziałuje bezpośrednio z rejonem pętli apikalnej TAR-1 (181-183). Białko Tat-1 oddziałuje głównie z resztą G34 pętli apikalnej, natomiast cyklina T1 oddziałuje z kilkoma resztami nukleotydowymi w pozycjach 30, 31, 33, 34, przy czym reszta U31 jest głównym miejscem wiązania cykliny T1 do TAR-1 RNA. Heterodimer Tat-1 / cyklina T1 wiąże się najpierw bezpośrednio do rejonu wybrzuszenia TAR-1, co ułatwia oddziaływanie Tat-1 i cykliny T1 z resztami nukleotydowymi pętli apikalnej. Badania z użyciem techniki FRET potwierdziły pierwotne przypuszczenia, że cyklina T1 zmienia konformację białka Tat-1, zwiększając jego powinowactwo do TAR-1, jednocześnie

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.



Main body of faint, illegible text at the bottom of the page, likely the main content or a concluding paragraph.

TAR RNA wzmacnia oddziaływanie pomiędzy białkiem Tat i cyklina T1 (184). Prawdopodobnie cyklina T1, poprzez oddziaływanie z białkiem Tat-1 oraz resztą U31 pętli apikalnej TAR, indukuje także strukturalną rearanżację TAR, która umożliwia oddziaływanie białka Tat-1 z resztą G34 pętli. Reszta G34 pętli jest krytyczna dla wiązania kompleksu Tat-1 / cyklina T1 do TAR-1 (181;182). Badania strukturalne prowadzone w naszej Pracowni wykazały, że reszta G34 formuje parę nukleotydową z resztą C30 pętli (ang. *cross-loop base pair*) (128). Udowodniono, że hamujący wpływ mutacji w pozycji 34 pętli może zostać znacząco zredukowany, jeśli w pozycji 30 wprowadzona zostanie reszta nukleotydowa, komplementarna względem zmutowanej reszty 34. Za oddziaływanie z resztą U31 pętli apikalnej TAR-1 odpowiedzialny jest rejon cykliny T1 obejmujący reszty aminokwasowe 252 – 261, natomiast za oddziaływanie białka Tat-1 z resztą G34 TAR-1 odpowiedzialna jest reszta lizyny w pozycji 50 białka - K50 (181;184).

Efektywne oddziaływanie TAR RNA z kompleksem Tat / cyklina T1 wymaga więc obecności prawidłowych sekwencji zarówno w wyrzyszeniach jak i w pętlach apikalnych spinek TAR. W przypadku TAR-2 wiadomo, że mutacje w pętlach apikalnych mają wpływ na zależną od Tat-2 *trans*-aktywację, nie wiadomo jednak dokładnie, które reszty nukleotydowe pętli są zaangażowane w oddziaływanie z białkiem Tat i cyklina T1 (131;177).

### 3.6. ROLA TAR RNA, BIAŁKA TAT I CYKLINY T1 W REGULACJI WIRUSOWEJ TRANSKRYPCJI

Fosforylacja C-końcowej domeny (CDT) większej podjednostki polimerazy RNA II stanowi istotny mechanizm regulacji procesu transkrypcji w komórkach eukariotycznych. W transkrypcyjnym kompleksie preinicjacyjnym CTD jest tylko częściowo fosforylowana (hypofosforylowana), podczas gdy w aktywnym kompleksie elongacyjnym jest ona silnie fosforylowana (hyperfosforylowana). Fosforylacja CTD polimerazy RNA II indukuje zmiany konformacji tego enzymu, związane z utworzeniem jego w pełni aktywnej formy, sprzyjającej efektywnej elongacji transkrypcji. Jest ona również istotna dla uwolnienia kompleksu preinicjacyjnego z rejonu promotora i może zaburzać kontakt z czynnikami transkrypcyjnymi, które nie będą obecne w kompleksie elongacyjnym w tym z negatywnymi czynnikami elongacji transkrypcji N-TEF (185;186).

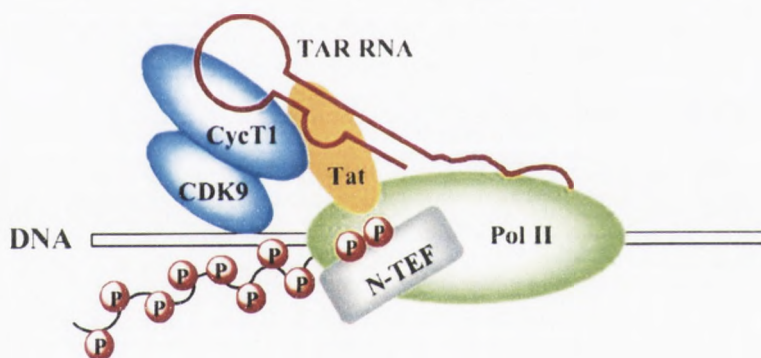
CTD polimerazy RNA II zawiera 52 powtórzenia siedmioaminokwasowej sekwencji Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7. Znane są trzy cyklino-zależne kinazy, które zdolne są do fosforylacji tej sekwencji podczas transkrypcji i są to CDK7, CDK8 oraz CDK9 (187). Wszystkie trzy fosforylują głównie resztę Ser 5 w sekwencji CTD, przy czym kinaza CDK9 może również fosforylować również resztę Ser 2. Każda z kinaz ma specyficzny dla siebie wzór modyfikacji CTD, stanowiący unikalny sygnał dla maszynerii transkrypcyjnej. Aktywacja poszczególnych kinaz związana jest z odpowiednimi etapami procesu transkrypcji.





Stanowiąca komponent istotnego czynnika transkrypcyjnego TFIIH, kinaza CDK7 odpowiedzialna jest za częściową fosforylację CTD polimerazy RNA II zaraz po uformowaniu kompleksu preinicjacyjnego. Natomiast fosforylacja CTD prowadzona przez kinazę CDK9 czynnika P-TEFb związana jest z wytworzeniem aktywnego kompleksu elongacyjnego (155).

HIV-1 i HIV-2 wykorzystują polimerazę RNA II gospodarza oraz komórkowe czynniki transkrypcyjne do syntezy wirusowego RNA, jednak retrowirusy posiadają własne mechanizmy regulacji tego procesu. Zależna od wirusowego białka Tat *trans*-aktywacja wirusowej transkrypcji jest kluczowym przykładem regulacji ekspresji genów HIV. Główną rolą białka Tat jest aktywacja elongacji wirusowej transkrypcji poprzez oddziaływanie z P-TEFb i TAR RNA (12;13). Podczas procesu *trans*-aktywacji heterodimer Tat / cyklina T1 jest sprowadzany do kompleksu transkrypcyjnego poprzez wiązanie z nowopowstałym TAR RNA (180). Jednocześnie cyklina T1 jako komponent P-TEFb zasocjowana jest z kinazą CDK9 (rys. IV.18), która po ściągnięciu w rejon promotora fosforyluje polimerazę RNA II (12;75;188). Część badaczy proponuje również dodatkową rolę Tat podczas inicjacji transkrypcji i jego potencjalne oddziaływanie z kompleksem preinicjacyjnym (189).



**Rysunek IV.18.** Model oddziaływania P-TEFb (CDK9 i Cyc T1) z białkiem Tat i TAR RNA na wczesnym etapie elongacji transkrypcji u wirusa HIV-1. Skrót N-TEF oznacza negatywne czynniki elongacji transkrypcji (ang. *negative transcription elongation factors*).

Liczne prace badawcze wskazują, że oddziaływanie białka Tat z kompleksem preinicjacyjnym (rys.IV.19) prowadzi do aktywacji wirusowej transkrypcji (158;178;189-192). Proponuje się, że istotną rolę w tym procesie odgrywają występujące w rejonie wirusowego LTR elementy regulatorowe obejmujące miejsca wiązania czynników NF- $\kappa$ B i SP1 oraz kasetę TATA (45). Najprawdopodobniej białka Tat-1 i Tat-2 nie oddziałują jednak bezpośrednio z rejonem LTR i nie mają wpływu na formowanie kompleksu preinicjacyjnego, lecz asocjują z już uformowanym kompleksem poprzez oddziaływanie z jego komponentami białkowymi, jak SP1, TPB - białka wiążące się kasetą TATA (ang. *TATA binding protein*) oraz TFIIH (189;193;194). Ponadto na wczesnych etapach transkrypcji białka Tat mogą również oddziaływać bezpośrednio z polimerazą RNA II bez udziału TAR RNA i P-TEFb (195).



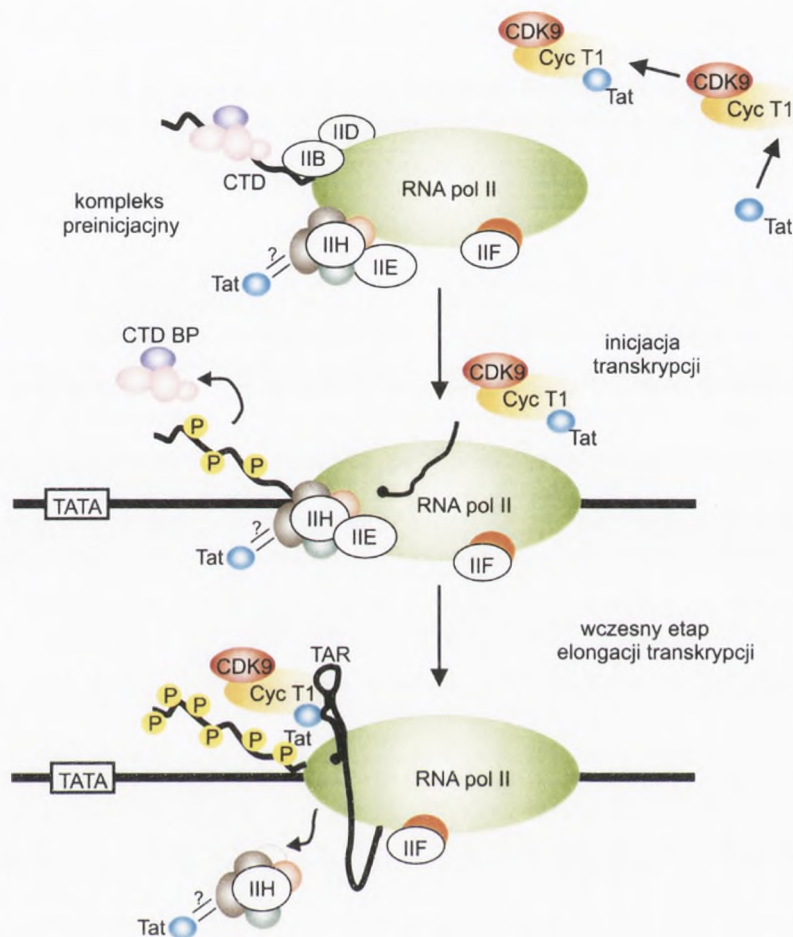
Warte rozważań jest oddziaływanie białka Tat z czynnikiem transkrypcyjnym TFIIH, odgrywającym kluczową rolę w inicjacji transkrypcji i uwolnieniu kompleksu preinicjacyjnego z rejonu promotora. TFIIH dysocjuje z kompleksu preinicjacyjnego po zsyntetyzowaniu fragmentu RNA o długości około 30–50 reszt nukleotydowych i nie jest obecny w kompleksie elongacyjnym (196). Podjednostkę katalityczną TFIIH stanowi kinaza CDK7, która może fosforylować CTD polimerazy RNA II, jednak tylko na ograniczonym poziomie (187). Na temat oddziaływania Tat z TFIIH dostępne są liczne, jednak często ze sobą sprzeczne dane. Z jednej strony wskazują one, że Tat może asocjować z TFIIH, aktywując inicjację transkrypcji (193;197), z drugiej natomiast, że efektywna transkrypcja wirusowych genów wcale nie wymaga TFIIH (198). Zatem rola TFIIH w zależnej od białka Tat *trans*-aktywacji jest nie do końca jasna. Ponieważ TFIIH jest obecny tylko w kompleksie preinicjacyjnym, natomiast P-TEFb głównie w kompleksie elongacyjnym proponuje się, że najprawdopodobniej białko Tat oddziałuje z każdym z nich po kolei na różnych etapach transkrypcji (199). Nowsze badania wskazują jednak, że w kompleksie preinicjacyjnym białko Tat nie aktywuje kinazy CDK7 (TFIIH), a nawet kinazy CDK9 (P-TEFb). Najprawdopodobniej wynika to ze struktury kompleksu preinicjacyjnego, w której obie kinazy są niedostępne dla Tat (188;200).

Kompleks transkrypcyjny, który tworzy się w rejonie promotora HIV w nieobecności białka Tat jest zdolny do inicjacji transkrypcji wirusowych genów, natomiast elongacja jest nieefektywna na skutek działania negatywnych czynników elongacji transkrypcji N-TEF (ang. *negative transcription elongation factors*) (201;202) oraz hamującego wpływu struktury nowopowstającego RNA, która zatrzymuje kompleks polimerazy RNA II (203). Powstają jedynie bardzo krótkie, niefunkcjonalne transkrypty, które nie mogą być wykorzystane w dalszych etapach replikacji wirusa i szybko podlegają degradacji. Delecja transkrybowanego najwcześniej fragmentu mRNA, jakim jest TAR nie znosi tego efektu, co wskazuje, że TAR nie działa jako klasyczny terminator procesu transkrypcji (13;204).

Szczególnie istotny dla wznowienia elongacji transkrypcji wirusowego mRNA jest czynnik transkrypcyjny P-TEFb (rys. IV.19). Białko Tat tworzy silne kompleksy z P-TEFb niezależnie od obecności polimerazy RNA II oraz TAR RNA. P-TEFb nie jest zasocjowany, ani z kompleksem inicjacyjnym, ani elongacyjnym polimerazy i nie do końca wiadomo, w jaki sposób jest on naturalnie sprowadzany w rejon promotora (155). Postuluje się zatem, że główną rolą Tat podczas aktywacji wirusowej transkrypcji jest ściągnięcie P-TEFb w rejon promotora HIV. Proces ten jest możliwy dzięki jednoczesnemu oddziaływaniu białka Tat z cykliną T1, stanowiącą komponent P-TEFb oraz elementem TAR RNA, znajdującym się na 5' końcu nowopowstałego mRNA (75;148;169;180). TAR wydaje się służyć jedynie jako



miejsce wiązania Tat/P-TEFb, bowiem nie pozostaje ściśle związany z kompleksem elongacyjnym na dalszych etapach elongacji transkrypcji (13;205). P-TEFb dzięki aktywności kinazy CDK9 fosforyluje CTD polimerazy RNA II, prowadząc do silnej aktywacji tego enzymu i neutralizacji działania negatywnych czynników elongacji transkrypcji (151;188;202;206).



**Rysunek IV.19.** Hipotetyczny model zależnej od białka Tat i TAR RNA *trans*-aktywacji transkrypcji genów wirusów HIV. Na podstawie (12), zmodyfikowany. Szczegółowy opis schematu znajduje się w tekście (skrót CTD BP oznacza białka wiążące się z CTD RNA polimerazy II w kompleksie preinicjacyjnym, lecz nieobecne na dalszych etapach transkrypcji).

Okazuje się, że białko Tat nie tylko rekrutuje P-TEFb do rejonu promotora, ale również reguluje jego funkcje. Wiadomo, że Tat stymuluje zależną od CDK9 fosforylację CTD polimerazy RNA II podczas elongacji transkrypcji (188;200;206;207). W eksperymentach *in vitro* wykazano, że samo białko Tat wzmacnia fosforylację CTD polimerazy RNA II, jednak w obecności TAR RNA poziom tej fosforylacji jest znacznie wyższy (200). Może to wynikać z faktu, że TAR wzmacnia oddziaływanie Tat z cykliną T1 (184). Ponieważ jednak kompleks Tat / cyklinaT1 / CDK9 oddziałuje specyficznie z TAR RNA tylko na wczesnych etapach elongacji transkrypcji (205), aktywacja CDK9 wynika raczej z jej oddziaływań z białkiem Tat i cykliną T1, niż z TAR RNA. W nieobecności Tat kinaza CDK9



pomimo, że może być obecna w kompleksie elongacyjnym, nie fosforyluje CTD polimerazy RNA II w rejonie promotora HIV. Prawdopodobnie CDK9 jest albo nieaktywna, albo CTD polimerazy RNA II nie jest dostępna do fosforylacji (188).

Nie do końca jednak wiadomo, w jaki sposób białko Tat aktywuje kinazę CDK9. Aktywacja cyklino-zależnych kinaz, takich jak CDK9 jest zazwyczaj dwuetapowa. Proponowany model zakłada, że w pierwszym etapie kinaza CDK9 wiąże się ze swoim partnerem cyklinowym – cykliną T1, co wywołuje zmianę jej konformacji, jednak niewystarczającą do pełnej aktywacji. W drugim etapie, kinaza CDK9 podlega aktywowanej przez białko Tat specyficznej autofosforylacji, najprawdopodobniej fosforylacji podlega również C-terminalna część cykliny T1 (200). Sugeruje się, że fosforylacja CDK9 prowadzi do zmiany konformacji sekwencji regulatorowych znajdujących się na C-końcu CDK9, co doprowadza do powstania aktywnej formy kinazy. Proces aktywacji przez Tat jest specyficzny tylko dla kinazy CDK9 i wbrew wcześniejszym doniesieniom, nowsze badania nie potwierdzają aby białko Tat aktywowało inne kinazy, w tym CDK7 (188;200).

Indukowana przez białko Tat fosforylacja P-TEFb jest także kluczowa dla wiązania kompleksu Tat / P-TEFb do TAR RNA, a tym samym poziom tej fosforylacji reguluje zależną od białka Tat *trans*-aktywację. Długo uważano, że CDK9 nie ma żadnego wpływu na oddziaływanie P-TEFb z TAR, niedawno wykazano jednak, że silne i specyficzne związanie TAR wymaga wcześniejszej autofosforylacji kinazy CDK9 oraz być może również fosforylacji cykliny T1 (200;208). Chociaż dane te nie są do końca potwierdzone, to postuluje się, że nieufosforylowana forma CDK9 oraz C-końcowa część cykliny T1 silnie zaburzają oddziaływanie Tat / TAR, a fosforylacja obydwu z nich prowadzi do zmiany konformacji cykliny T1 w kompleksie Tat / P-TEFb, która ułatwia jego oddziaływanie z TAR RNA.

Fosforylacja CTD polimerazy RNA II podczas elongacji transkrypcji jest również regulowana przez odpowiednie fosfatazy komórkowe (209). Nie ma zgodności, co do wpływu białka Tat na aktywność fosfataz CTD. Z jednej strony uważa się, że białka Tat mają zdolność ich inhibicji (154), z drugiej natomiast, że wpływ Tat na ich aktywność jest niewielki (188). Wszyscy jednak są zgodni, że nie inhibicja fosfataz, ale zależna od Tat aktywacja CDK9 ma kluczowy wpływ na specyficzne wzmocnienie fosforylacji CTD polimerazy RNA II.

Na późnych etapach elongacji Tat zamiast z TAR RNA asocjuje bezpośrednio z polimerazą RNA II wskazując, że oddziaływanie Tat / P-TEFb / TAR jest przerywane. Mechanizm uwalniania kompleksu Tat / P-TEFb z TAR RNA nie jest znany, ale jest możliwe, że wynika ono z działania specyficznych fosfataz białkowych (205).





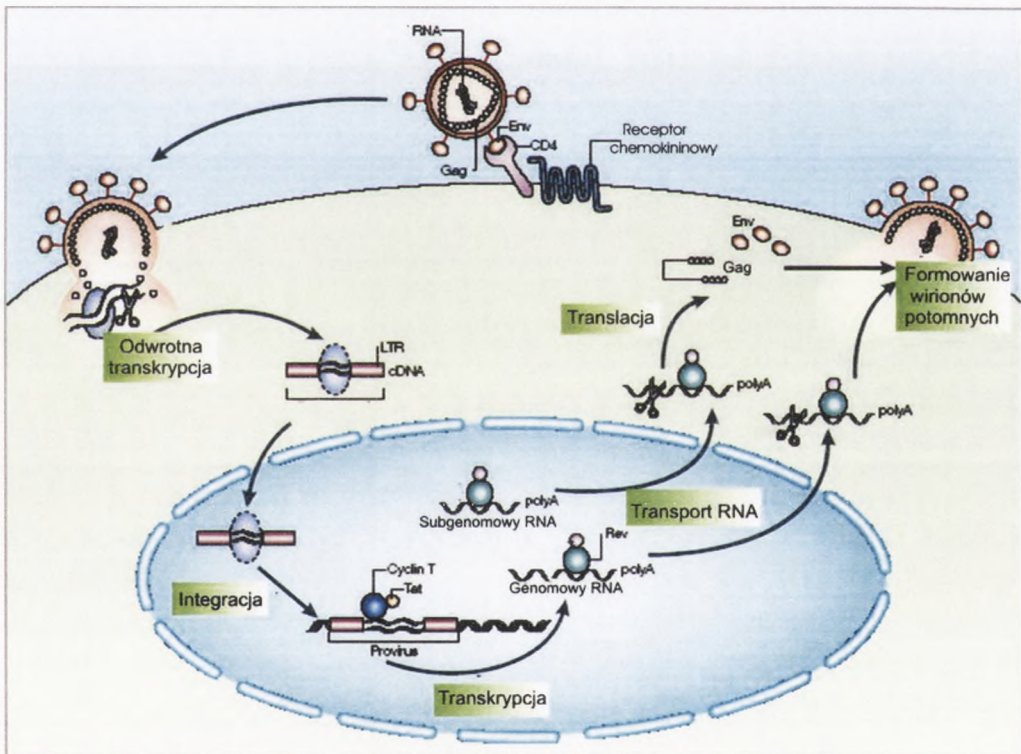
### 3.7. INHIBICJA ODDZIAŁYWANIA TAR / TAT / CYKLINA T1 JAKO DROGA POSZUKIWANIA NOWYCH LEKÓW PRZECIWKO AIDS

Szybkie rozprzestrzenianie się wirusów HIV i rozwój pandemii AIDS na świecie zmuszają do poszukiwania skutecznych metod leczenia oraz chroniącej przed HIV szczepionki. Stosowane obecnie terapie antywirusowe mogą znacznie przedłużyć życie pacjenta, ale jednocześnie ogromny problem sprawia ciągłe pojawianie się nowych, lekoopornych szczepów HIV (patrz rozdział IV.1). Fakt ten wymusza poszukiwanie innych leków przeciwko HIV niż stosowane dotychczas farmaceutyki hamujące odwrotną transkryptazę lub proteazę wirusa (9-11). Oddziaływanie TAR / Tat / cyklina T1 jako kluczowy etap cyklu życiowego HIV-1 i HIV-2 stanowi obiecujący cel terapeutyczny w leczeniu AIDS. Prowadzone są różne badania zmierzające do zablokowania formowania kompleksu TAR / Tat poprzez wpływ na TAR RNA lub inhibicję translacji i aktywności białka Tat (210-214). Wykazano, że zablokowanie *trans*-aktywacji wirusowych genów poprzez negatywny wpływ na białko Tat lub TAR RNA faktycznie prowadzi do znacznego zahamowania ekspresji wirusowych genów, jednak często w dłuższym okresie czasu przekłada się to jedynie na opóźnienie replikacji wirusa HIV, a nie jej trwałe zahamowanie. Ciekawe wyniki dają badania zmierzające do zablokowania oddziaływania białka Tat z P-TEFb. Popularne ostatnio badania z wykorzystaniem dezaktywującego P-TEFb białka HEXIM, wykazują, że wprowadzenie nadmiaru egzogenego białka HEXIM, znacząco hamuje ekspresję wirusowych genów poprzez blokowanie oddziaływania białka Tat z cykliną T1. Nie ma jednak zgodności co do wpływu nadmiaru HEXIM na transkrypcję genów komórkowych (144;163). Ten pojedynczy przykład wskazuje jak należy być ostrożnym proponując strategię terapeutyczne oparte o inhibicję, wykorzystywanych w cyklu życiowym wirusa, czynników komórkowych. Zatem wszelkie metody zmierzające do hamowania aktywności cykliny T1 lub kinazy CDK9 muszą uwzględniać fakt, że P-TEFb jest istotny nie tylko dla transkrypcji wirusowych genów, ale również ogromnej grupy genów komórkowych.

Poszukiwania nowych, potencjalnych metod terapeutycznych przeciwko wirusom HIV coraz częściej oparte są o strategię RNAi (215-218). Choć droga do ich wykorzystania w leczeniu chorych na AIDS pacjentów jest jeszcze daleka, to w związku z dużym zaangażowaniem wielu grup badawczych na świecie i aktualnymi pracami prowadzonymi w naszym laboratorium, dokładniejsze przedstawienie tego zagadnienia wydaje się być bardzo istotne. W terapii RNAi skierowanej przeciwko wirusowi HIV wykorzystuje się zasadniczo dwa podejścia. Pierwsze, polegające na wyciszeniu genów kodujących białka własne wirusa, w szczególności jego białka regulatorowe. W drugim podejściu wyciszeniu podlegają mRNA gospodarza, kodujące wykorzystywane przez wirus receptory błonowe i białka komórki.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The document then goes on to describe the various methods and techniques used to collect and analyze data, highlighting the need for consistency and reliability in the information gathered. It also discusses the challenges associated with data collection and analysis, such as the need for specialized equipment and the potential for human error. The document concludes by emphasizing the importance of regular review and updating of records to ensure that they remain accurate and up-to-date.

Odpowiednie cząsteczki siRNA mogą powodować inhibicję replikacji wirusa HIV na różnych etapach jego cyklu życiowego (rys.IV.20). Celem dla siRNA mogą być, stanowiące matrycę dla odwrotnej transkrypcji, dwie genomowe cząsteczki RNA wirusa, wprowadzane do komórki już podczas infekcji oraz mRNA powstające w wyniku transkrypcji wirusowych genów. W przypadku mRNA, kodującego białka wirusowe udowodniono wyciszenie genów kodujących białka regulatorowe (Tat, Rev, Nef), podlegających ekspresji w pierwszej fazie infekcji (219-221). Wyciszane są również podlegające późniejszej ekspresji geny dla białek strukturalnych wirusa – *gag* i *env* (222). We wczesnej fazie infekcji maszyna RNAi ma do zwalczenia jedynie dwie cząsteczki wirusowego RNA, w późniejszych fazach replikacji wirusa sprawa jest dużo bardziej skomplikowana, trzeba bowiem zniszczyć wiele tysięcy cząsteczek RNA wirusa. Jednak specyficzne wyciszenie generowanych *de novo* cząsteczek RNA jest bardziej efektywne, w porównaniu z genomowym RNA wirusa występującym w rybonukleinowym kompleksie odwrotnej transkryptazy (218).



**Rysunek IV.20.** Potencjalne miejsca działania RNAi w cyklu życiowym wirusów HIV. Szczegółowy opis schematu znajduje się w tekście. Na podstawie (218), zmodyfikowany.

Wiele grup badawczych niezależnie udowodniło, że wyciszenie ekspresji genów kodujących czynniki komórkowe, istotne dla cyklu życiowego wirusa HIV-1, powodowało zahamowanie replikacji wirusa. Jako cel dla działania RNAi wybierane są najczęściej mRNA receptorów komórkowych, jak CD4, CCR5 czy CXCR4, ale również komórkowe czynniki transkrypcyjne, jak P-TEFb. Wyciszenie ekspresji białek komórkowych niesie jednak dość



duże ryzyko ze względu na ich istotne funkcje dla samej komórki. Spośród receptorów komórkowych największe szanse w terapii RNAi stwarza CCR5, gdyż wiadomo od dawna, że homozygotyczne mutacje genu kodującego CCR5 chronią przed HIV bez istotnego wpływu na funkcje układu immunologicznego (223;224). Bardzo ciekawie prezentują się wyniki specyficznego wyciszenia białek wchodzących w skład kompleksu P-TEFb, czyli cykliny T1 i kinazy CDK9. Specyficzne cząsteczki RNAi powodowały takie obniżenie stężenia tych białek w komórce, że zachodzenie *trans*-aktywacji genów HIV stawało się niemożliwe, dochodziło tym samym do zahamowania replikacji wirusa. Jednocześnie poziom cykliny T1 i kinazy CDK9 był wystarczający dla prawidłowego prowadzenia transkrypcji genów komórkowych (225;226).

Większość obiecujących terapeutycznie eksperymentów, w których wykazano hamujący wpływ RNAi na infekcje powodowane wirusem HIV miało jednak krótki zakres czasowy. Wyniki dłużej trwających eksperymentów, sprawdzających działanie RNAi w zainfekowanych HIV komórkach po kilku tygodniach czy miesiącach od infekcji, nie są już tak jednoznaczne. Eksperymenty prowadzące do wyciszenia genu wirusowego białka Tat, wykazały początkowo znaczne obniżenie poziomu białka Tat w zainfekowanych HIV komórkach. Po dłuższym okresie prowadzenia eksperymentu wyciszenie genu białka Tat było znoszone i dochodziło do replikacji wirusa. Przyczyną tego stanu rzeczy jest pojawienie się punktowej mutacji w środkowej części genu *tat*, która uniemożliwia jego rozpoznanie przez siRNA-Tat (227). Badania z wykorzystaniem siRNA przeciwko genowi wirusowego białka regulatorowego Nef, wskazują również na początkowe silne wyciszenie genu *nef* i zablokowanie replikacji wirusa. Blokada ta nie jest całkowita i ponowne sprawdzenie tych samych komórek po kilku miesiącach, wykazało powrót do poziomu kontrolnego białka Nef. Przyczyną tego stanu rzeczy jest pojawienie się odpornych na siRNA-Nef wariantów wirusa posiadających mutacje w sekwencji docelowej RNA, czyli w genie *nef*; są to nie tylko mutacje punktowe, ale i częściowe lub całkowite delecje genu *nef* (228). Mutacje te powstają *de novo* i co ciekawe częstość mutacji zostaje zwiększona tylko w obrębie sekwencji docelowej, a nie w całym genomie HIV. Ostatnie badania wskazują, że część z tych mutacji może prowadzić do zmiany struktury docelowego RNA wirusa i w ten sposób przestaje on być dostępny dla terapeutycznych cząsteczek RNAi (229).

Ciągle otwarte pozostaje zatem pytanie: co zrobić aby terapia RNAi była skuteczna? Dotychczasowe dane wskazują, że wydajna inhibicja replikacji HIV może następować w komórkach transfekowanych siRNA w sposób ciągły. Taką możliwość dają wektory ekspresyjne kodujące odpowiednie shRNA (ang. *short-hairpin* RNA), pod kontrolą promotora U6 lub H1 dla polimerazy RNA III. Działanie RNAi ulega wtedy wydłużeniu z kilku godzin

[The text on this page is extremely faint and illegible. It appears to be a multi-paragraph document, possibly a letter or a report, but the specific content cannot be discerned.]

do kilku tygodni (218). Najnowsze badania wskazują, że jeszcze lepszy efekt terapeutyczny niż shRNA daje stosowanie lhRNA (ang. *long-hairpin RNA*) (230). Wadą syntetycznych siRNA, poza krótszym czasem trwania, jest często ich zbyt wysokie stężenie w komórce, które w efekcie może okazać się dla niej letalne. Ze względu na wysoką częstość mutacji wirusa HIV, stosowane siRNA powinny wykazywać zróżnicowanie sekwencji, obejmujące mutacje w sekwencji docelowej. Innym wyjściem jest jednoczesne użycie różnych siRNA, skierowanych na więcej niż jedną sekwencję docelową w genomie wirusa. Jednak stosowanie mieszaniny różnych siRNA jest ograniczone dopuszczalnym stężeniem obcego kwasu nukleinowego w komórce. Innym możliwym do wykorzystania podejściem jest projektowanie siRNA przeciw silnie konserwatywnym sekwencjom w genomie wirusa o ważnych funkcjach regulatorowych (231). Szczególnie bogate w tego typu sekwencje są rejony UTR wirusowego RNA, w tym również rejon liderowy. Tu jednak, jak wskazują także wyniki bieżących badań naszej Pracowni, pojawia się problem wysokiej strukturalizacji tych rejonów. Alternatywną strategią mogą być siRNA skierowane przeciwko silnie konserwatywnym sekwencjom w genomie człowieka, kodującym faktory ważne dla replikacji wirusa, ale nieistotne dla przetrwania komórki.





## V. WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH I ICH DISKUSJA

### V.1. ANALIZA STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ TAR-2 RNA

Rejon liderowego RNA wirusów HIV tworzy skomplikowaną i dynamiczną strukturę, zdolną do formowania dwóch alternatywnych konformerów, w zależności od obecności białka nukleokapsydu – NC oraz stężenia jonów  $Mg^{2+}$  (88;89). W każdym z nich określone domeny rejonu liderowego przyjmują odmienną strukturę, charakterystyczną dla danego konformera. Autorzy prac postulujących istnienie alternatywnych globalnych konformerów rejonu liderowego proponują jednak, że struktura znajdującej się na jego 5' końcu domeny TAR jest stała i nie zmienia się razem z rearanżacją całego rejonu (86;89;232). Z drugiej strony w związku z proponowanym udziałem TAR w procesie dimeryzacji wykazano, że TAR RNA wirusa HIV-1 może występować w formie dwóch konformerów (108). Ponadto mutacje w TAR-1 zaburzają formowanie konformerów rejonu liderowego wirusa HIV-1 i wpływają na proces dimeryzacji genomowego RNA wirusa (125). W przypadku HIV-2 wiadomo, że usunięcie struktury TAR z 5' końca rejonu liderowego silnie zaburza proces dimeryzacji wirusowego RNA (89), co wskazuje nie tylko na potencjalną rolę TAR-2 w dimeryzacji, ale również jego wpływ na strukturę całego rejonu liderowego, gdyż TAR nie stanowi głównego miejsca dimeryzacji.

W ramach niniejszej pracy przedstawiam wyniki szczegółowej analizy strukturalnej małego poznanej cząsteczki 123-meru odpowiadającego domenie TAR RNA wirusa HIV-2. Wykorzystano w tym celu metody komputerowego przewidywania struktury drugorzędowej RNA oraz techniki eksperymentalne oparte o elektroforezę w warunkach natywnych oraz enzymatyczne i chemiczne mapowanie struktury drugorzędowej RNA. Uzyskane przez nas dane strukturalne (233) stały się podstawą do dalszych badań dotyczących oddziaływania TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2 oraz ludzką cykliną T1.

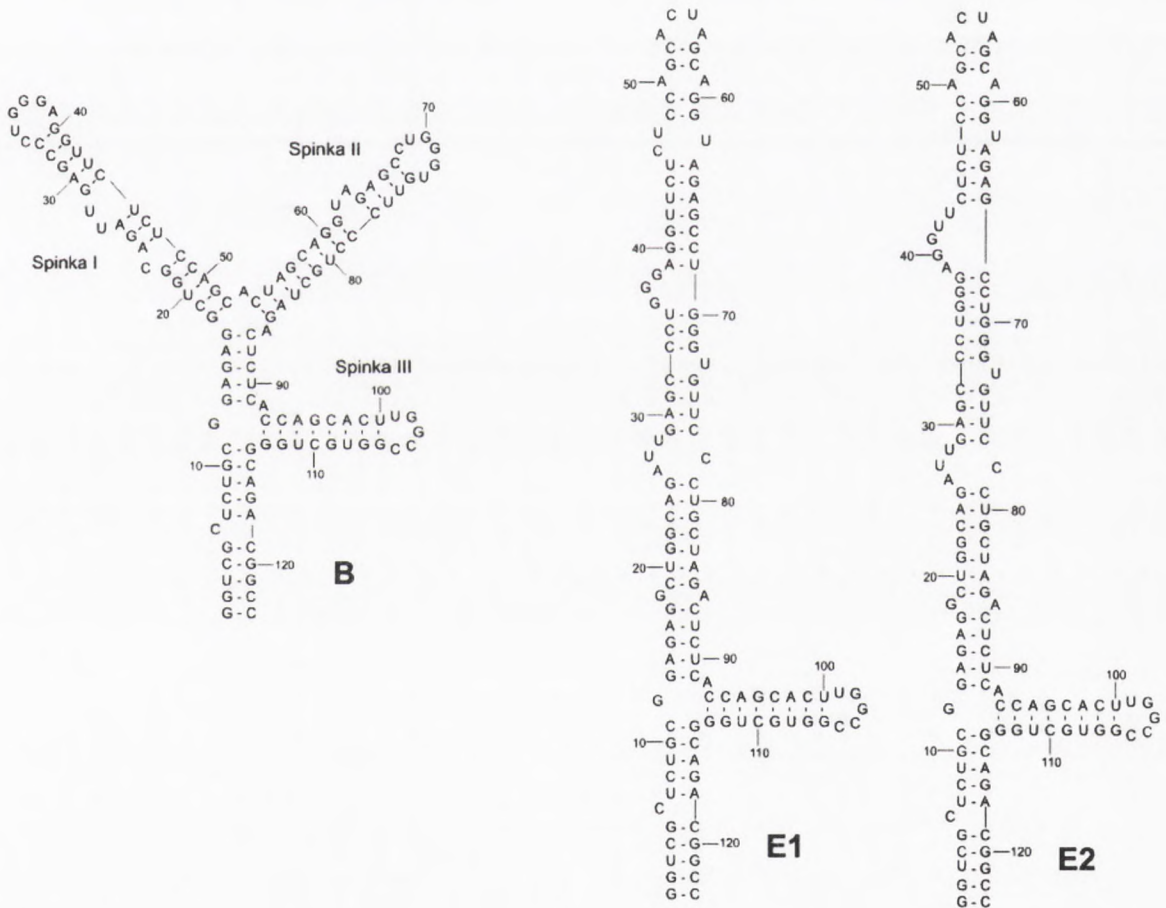
#### 1.1. OTRZYMYWANIE RNA DO BADAŃ

Analizowane cząsteczki RNA otrzymałam metodą transkrypcji *in vitro* przy użyciu enzymu T7 RNA polimerazy. Dwuniciowe matryce DNA do reakcji transkrypcji uzyskałam metodą PCR w oparciu o plazmid HIV-2  $\Psi$  large (91) - dzięki uprzejmości Prof. Bena Berkhoua, Department of Human Retrovirology, Uniwersytet w Amsterdamie. Plazmid ten zawiera, poprzedzoną promotorem dla T7 RNA polimerazy, sekwencję całego rejonu liderowego oraz 5' końcową część genu *gag* wirusa HIV-2 (+1 – 892). Stosowanie odpowiednich zestawów starterów do reakcji PCR umożliwiło otrzymanie matryc DNA do syntezy różnych fragmentów rejonu liderowego. Oligorybonukleotydy o sekwencji TAR-1, spinki W oraz izolowanej spinki III TAR-2 wt otrzymałam drogą syntezy chemicznej.



## 1.2. ANALIZA KOMPUSEROWA STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ TAR-2 RNA

Dla 123-meru RNA o sekwencji TAR-2 wirusa HIV-2<sub>rod</sub> program *Mfold* (234;235) generuje dwa wysoce uporządkowane modele strukturalne, jako najbardziej korzystne energetycznie warianty struktury drugorzędowej TAR-2. Jednym z nich jest powszechnie akceptowany model rozgałęziony TAR-2 z trzema motywami spinkowymi; co ciekawe nie jest to model najbardziej korzystny energetycznie. Drugi model, bardziej korzystny energetycznie stanowi wydłużona struktura TAR-2 z dwoma spinkami. Modele te w dalszej części pracy oznaczane są odpowiednio jako B (ang. *branched form*) i E1 (ang. *extended form*). Pomimo dużej różnicy w strukturze obu modeli TAR-2, różnica w energii swobodnej pomiędzy nimi jest niewielka i  $\Delta G$  wynosi -65.4 kcal/mol dla B TAR-2 oraz -66.7 kcal/mol dla E1 TAR-2. Rozgałęzioną, trójspinkową strukturę oraz strukturę wydłużoną z dwoma spinkami przyjęto jako dwie globalne formy TAR-2 RNA (rys. V.1).



**Rysunek V.1.** Generowane przez program *Mfold* i potwierdzone eksperymentalnie struktury drugorzędowe TAR RNA HIV-2. Po lewej stronie przedstawiono rozgałęzioną formę TAR-2, oznaczoną B, po prawej dwa konformery reprezentujące wydłużoną formę TAR-2 RNA, oznaczone E1 i E2.



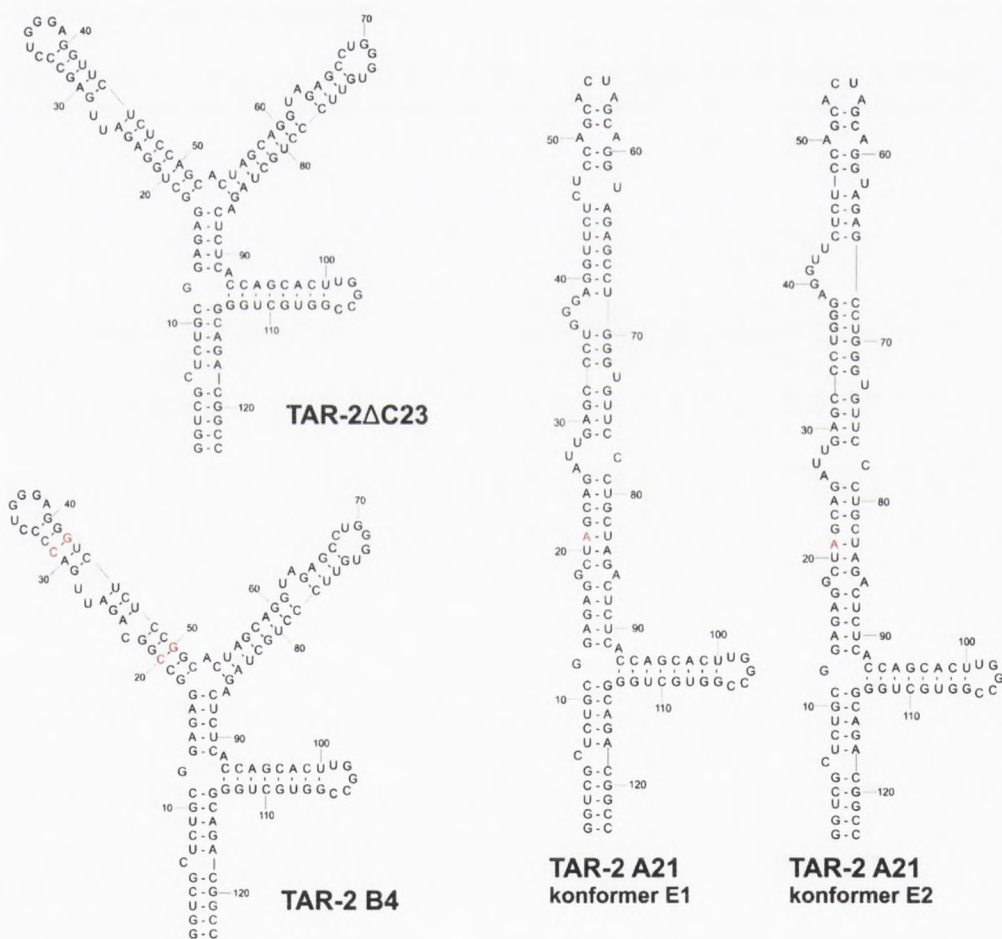
Porównując strukturę obu modeli można zauważyć, że ramię 5' głównej, długiej spinki wydłużonej formy TAR-2 uformowane jest przez ciąg reszt nukleotydowych tworzących spinkę I w strukturze B TAR-2, zaś ramię 3' przez reszty odpowiednie dla spinki II. Jednocześnie miejsce rozgałęzienia pomiędzy spinkami formy rozgałęzionej staje się pętlą apikalną w formie wydłużonej TAR-2. Mała 21-nukleotydowa spinka od 3' strony (spinka III dla B TAR-2) jest wspólna dla obu form TAR-2. Należy podkreślić, że reszty nukleotydowe, sugerowane jako istotne w trójspinkowej strukturze TAR-2 dla oddziaływania z białkiem Tat podczas procesu *trans*-aktywacji (87;131), pozostają w większości niesparowane w formie wydłużonej TAR-2.

Analiza struktury drugorzędowej 123-meru TAR-2 wykazała istnienie ciekawej dynamiki strukturalnej w obrębie rejonu bogatego w reszty G (G36G37G38A39G40G41) TAR-2 RNA (rozdział V.1.5.1). Jeden z otrzymywanych obrazów cięć enzymatycznych nie pasował do żadnej z proponowanych form globalnych TAR-2, powróciłam zatem do analiz *in silico* w celu poszukiwania struktur zgodnych z otrzymanymi wynikami eksperymentalnymi. Zmiana parametrów programu *Mfold*, pozwalająca na generowanie modeli bardziej zbliżonych strukturalnie i energetycznie, umożliwiła znalezienie drugiego konformeru w obrębie wydłużonej formy TAR-2 RNA, nazwanego E2 (rys. V.1). Program *Mfold* generuje więcej podobnych do siebie konformerów wydłużonej formy TAR-2 RNA, jednak wybór konkretnego modelu E2, oparty był na jego zgodności z otrzymanymi danymi eksperymentalnymi. Konformer E2 jest mniej stabilny energetycznie ( $\Delta G = -66.4$  kcal/mol) niż konformer E1. Analiza komputerowa obu konformerów wskazuje, że w obrębie rejonu bogatego w reszty G konformeru E2 formowane jest duże pięcionukleotydowe wybrzuszenie A39G40G41U42U43, podczas gdy dla E1 proponowane jest trójnukleotydowe wybrzuszenie G36G37G38, a rejon A39 – U43 jest sparowany. Dynamikę strukturalną w obrębie rejonu bogatego w reszty G wydłużonych konformerów TAR-2, potwierdzają również badania zmierzające do generowania struktur trzeciorzędowych 123-meru TAR-2, prowadzone w naszej Pracowni przez dr Mariusza Popędę.

Program *Mfold* został również wykorzystany do zaprojektowania strukturalnych mutantów TAR-2 RNA, przyjmujących wyłącznie rozgałęzioną lub wyłącznie wydłużoną formę (rys. V.2). Przy projektowaniu mutantów przyjęto założenie, że wprowadzone zmiany sekwencji nie mogą obejmować reszt nukleotydowych proponowanych jako istotne dla procesu *trans*-aktywacji, ponadto muszą one pozostać niesparowane. Zaprojektowanie mutantu przyjmującego jedynie formę wydłużoną TAR-2 okazało się być bardzo proste i wystarczała do tego pojedyncza mutacja G21A lub G18U. Mutant z substytucją G21A, nazwany TAR-2 A21, najlepiej odzwierciedlał TAR-2 w formie wydłużonej, dlatego też został wybrany jako jej model eksperymentalny. Dla TAR-2 A21 program *Mfold* generował



konformery nazwane przez nas E1 A21 i E2 A21, analogiczne do konformerów E1 i E2 wydłużonej formy TAR-2 wt (rys V.2). Zaprojektowanie mutantu reprezentującego, mniej korzystną energetycznie, rozgałęzioną formę TAR-2 było bardziej skomplikowane i wymagało licznych substytucji w rejonie helikalnym cząsteczki TAR-2. Z tego powodu początkowo zrezygnowałam z preparatyki mutantu reprezentującego formę rozgałęzioną i skupiłam się na analizie mutantu TAR-2 A21 oraz jego porównaniu z TAR-2 wt. W końcowym etapie badań na prośbę recenzentów publikacji (233) zsyntetyzowano i poddano kluczowym analizom mutanty reprezentujące formę rozgałęzioną TAR-2. Z zaprojektowanych wcześniej mutantów wybrano dwa z najmniejszą ilością zmian w sekwencji oznaczone jako TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta$ C23. Mutant TAR-2 B4 zawierał cztery mutacje punktowe w rejonie helikalnym spinki I (według formy rozgałęzionej) - U20C, A50G, G31C i U42G, stabilizujące rozgałęzioną formę TAR-2, natomiast konstruując mutant TAR-2  $\Delta$ C23 usunięto pojedynczą niesparowaną resztę C23.



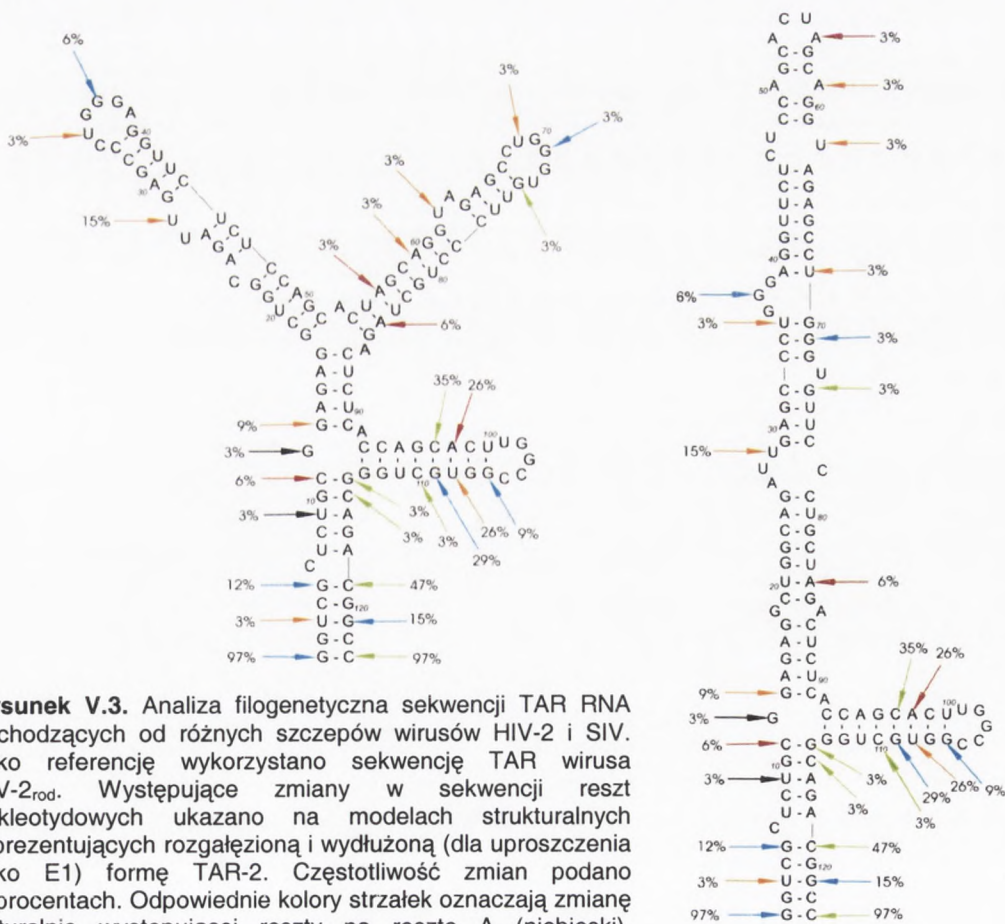
**Rysunek V.2.** Struktury drugorzędowe, zaprojektowanych przy użyciu programu *Mfold*, mutantów reprezentujących rozgałęzioną (TAR-2  $\Delta$ C23 i TAR-2 B4) oraz wydłużoną (TAR-2 A21) formę TAR-2 RNA. W przypadku mutantu TAR-2 A21 przedstawiono dwa konformery analogiczne do konformerów E1 i E2 wydłużonej formy TAR-2. Kolorem czerwonym oznaczono reszty nukleotydowe zmienione względem naturalnej sekwencji TAR-2. Struktura transkryptów o sekwencji analizowanych mutantów została dodatkowo potwierdzona eksperymentalnie poprzez trawienia enzymatyczne (rozdział V.1.5.1.).





### 1.3. ANALIZA FILOGENETYCZNA TAR RNA WIRUSÓW HIV-2 I SIV

Celem przeprowadzonej analizy było stwierdzenie czy zaobserwowana u HIV-2<sub>rod</sub> tendencja do tworzenia wydłużonej formy domeny TAR jest zachowana u innych szczepów HIV-2 i spokrewnionych z nimi szczepów wirusa SIV. Prezentowane wyniki otrzymałam we współpracy z mgr Katarzyną Purzycką. Sekwencję rejonu liderowego różnych szczepów uzyskano z bazy danych HIV (<http://hiv-web.lanl.gov>), następnie przy wykorzystaniu programu *Mfold* generowano struktury drugorzędowe fragmentów RNA tworzących domenę TAR u różnych szczepów HIV-2 i SIV. Wybór szczepów ograniczyliśmy do tych, u których długość sekwencji tworzącej domenę TAR była porównywalna z HIV-2<sub>rod</sub>. Porównanie sekwencji domeny TAR analizowanych szczepów wykazało niewielką ilość zmian reszt nukleotydowych w jej obrębie, co potwierdziło, że sekwencja TAR RNA jest dość silnie zachowawcza u różnych szczepów HIV-2 i SIV (rys.V.3), (18). Zmiany występujące w sekwencji TAR nie wykluczają formowania ani rozgałęzionej, ani wydłużonej formy domeny TAR. Ustalono, że u wszystkich analizowanych szczepów zachowana zostaje tendencja do tworzenia wydłużonej formy TAR RNA jako najbardziej korzystnej energetycznie struktury tej domeny. Wyjątek stanowi szczep SIV<sub>STM</sub>, u którego TAR może przyjmować wydłużoną formę, jednak nie jest ona najbardziej korzystną energetycznie strukturą.

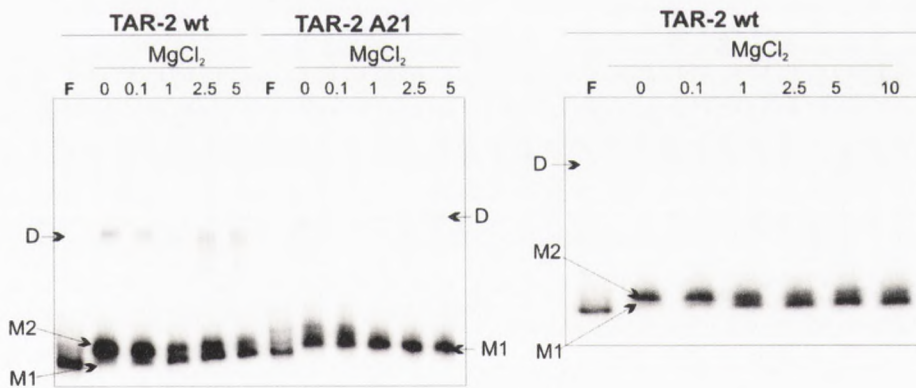


**Rysunek V.3.** Analiza filogenetyczna sekwencji TAR RNA pochodzących od różnych szczepów wirusów HIV-2 i SIV. Jako referencję wykorzystano sekwencję TAR wirusa HIV-2<sub>rod</sub>. Występujące zmiany w sekwencji reszt nukleotydowych ukazano na modelach strukturalnych reprezentujących rozgałęzioną i wydłużoną (dla uproszczenia tylko E1) formę TAR-2. Częstotliwość zmian podano w procentach. Odpowiednie kolory strzałek oznaczają zmianę naturalnie występującej reszty na resztę A (niebieski), C (pomarańczowy), G (czerwony), U (zielony). Delekcję danej reszty oznaczono strzałką o kolorze czarnym.



#### 1.4. ANALIZA MIGRACJI TAR-2 RNA W ŻELU POLIAKRYLOAMIDOWYM W WARUNKACH NATYWNYCH

Wykorzystując metodę elektroforezy RNA w warunkach natywnych potwierdziłam, że TAR-2 RNA rzeczywiście może przyjmować *in vitro* różne formy struktury drugorzędowej. Analizę migracji 123-meru RNA o sekwencji naturalnie występującej domeny TAR wirusa HIV-2<sub>rod</sub>, określanego w niniejszej pracy jako TAR-2 wt (ang. *wild type*), prowadzono w ściśle kontrolowanej temperaturze żelu. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że transkrypt o sekwencji TAR-2 wt, podczas natywnej elektroforezy wykazuje wyraźną i powtarzalną tendencję do migracji jako dwa prążki. Ujawniała się ona jednak tylko wtedy, gdy elektroforeza prowadzona była przy niskiej, ściśle kontrolowanej temperaturze żelu (rys.V.4). Fakt ten oznacza, że TAR-2 RNA może przyjmować przynajmniej dwie odmienne formy globalne. Powyższe stwierdzenie było zgodne z przeprowadzoną analizą komputerową struktury drugorzędowej TAR-2 wt (rozdział V.1.2.). W oparciu o powszechne założenie, że w żelu natywnym cząsteczki RNA o rozgałęzionej strukturze migrują wolniej, niż RNA o strukturze bardziej zwartej i wyciągniętej zaproponowano, że wolniej migrujący prążek (M2) odpowiada trójspinkowej, rozgałęzionej formie TAR-2 RNA (B), podczas gdy szybciej migrujący (M1) reprezentuje nową, nieznaną wcześniej, wydłużoną formę TAR-2 (E1 i E2).



**Rysunek V.4.** Zależna od stężenia jonów magnezu migracja transkryptów o sekwencji TAR-2 wt i TAR-2 A21 w żelu niedenaturującym o niskiej temperaturze (4°C). Dla porównania przedstawiono wynik rozdziału uzyskany w dwóch różnych buforach elektroforetycznych. Panel lewy - 0,5xTB z Tritonem X-100, panel prawy - 0,25xTBE. Pozostałe warunki elektroforezy były takie same w obu rozdzielach. Symbolem M oznaczono alternatywnie zwinięte monomeryczne formy RNA, D - dimery RNA, linia F wskazuje RNA poddany procesowi denaturacji w formamidzie. Ponad odpowiednimi liniami podano stężenie MgCl<sub>2</sub> w mM.

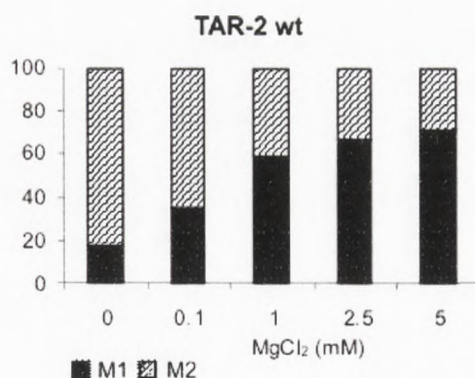
Bardzo podobna migracja w żelu obu form strukturalnych TAR-2 RNA powoduje, że ich rozdzielanie jest niezmiernie trudny. Zapewne fakt ten nie jest bez wpływu na dotychczasowe spojrzenie na strukturę drugorzędową TAR-2, przedstawianą jak dotąd tylko w jednej, rozgałęzionej formie (17-19;87;177), a na żelu niedenaturującym jako jeden prążek (86;131;176;236). Należy podkreślić, że większość prezentowanych wcześniej wyników,



dotyczących analizy TAR-2 wt z wykorzystaniem natywnej elektroforezy, została otrzymana w pokojowej lub wyższej temperaturze żelu. Wyniki uzyskane w naszym laboratorium potwierdzają, że elektroforeza w temperaturze 20°C nie pozwala na rozdział dwóch form TAR-2 RNA (rys.V.6.).

Poszukiwania optymalnych warunków rozdziału 123-meru TAR-2 wt doprowadziły do opracowania protokołu, w którym za najbardziej istotne uznano niską temperaturę żelu elektroforetycznego, wynoszącą 4°C. Ponadto separację różnych form strukturalnych TAR-2 wt ułatwiają dodatkowe czynniki, jak zmniejszenie usieciowania żelu (stosunek akrylamidu do bisakrylamidu 75:1), stałe parametry prądowe (30 mA, 350V), dodatek 0,1% Tritonu X-100 do buforu elektroforetycznego oraz mała ilość RNA w analizowanej próbce. Testowano również różne warunki etapu denaturacji / renaturacji RNA, zmieniając temperaturę i czas inkubacji RNA w odpowiednim buforze oraz stosując szybki (natychmiastowe przełożenie do lodu) lub wolny (2°C / 1 min.) sposób chłodzenia RNA po denaturacji. Wszystkie testowane warunki pozwalały na rozdział form 123-meru TAR-2 RNA, zatem kluczowe dla separacji różnych form strukturalnych RNA były nie warunki denaturacji / renaturacji, ale odpowiednie warunki elektroforezy.

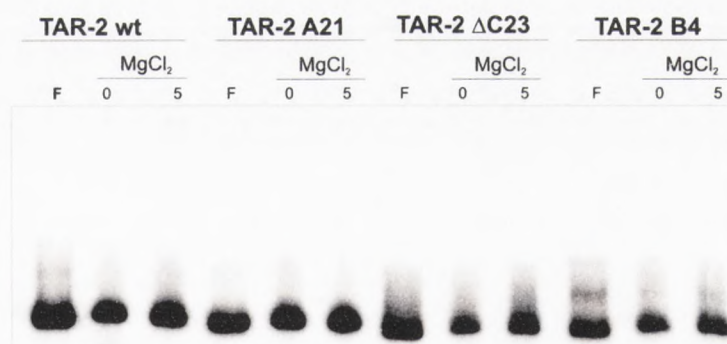
Jak wykazano, równowaga pomiędzy wolniej i szybciej migrującą formą TAR-2 wt zależy od stężenia jonów magnezu, w zakresie niskich stężeń magnezu, charakterystycznych dla warunków *in vivo*. Przy braku jonów  $Mg^{2+}$  oraz przy bardzo niskim ich stężeniu (0,1 mM) występuje w zasadzie, jedynie wolniej migrująca forma (M2) odpowiadająca strukturze rozgałęzionej TAR-2 (rys.V.5). Wzrastające stężenie  $MgCl_2$  w buforze, w którym prowadzono zwijanie RNA (od 0,1 do 5 mM) powoduje stopniowe zwiększenie ilości formy szybciej migrującej (M1) czyli wydłużonej TAR-2, kosztem formy rozgałęzionej. Przy 1 mM stężeniu  $MgCl_2$  obie formy występowały w prawie równej ilości. Od 2,5 mM stężenia  $MgCl_2$  forma wydłużona była dominującą formą TAR-2 RNA.



**Rysunek V.5.** Zależny od stężenia jonów magnezu procentowy udział szybciej (M1) i wolniej migrującej (M2) formy w całkowitej puli TAR-2 RNA. M1 odpowiada formie wydłużonej TAR-2 wt, M2 jego formie rozgałęzionej.



Bardzo podobna migracja w żelu natywnym dwóch, znacznie różniących się strukturą drugorzędową form TAR-2 wt była, nie ukrywając, dużym zaskoczeniem oraz powodowała trudności w interpretacji otrzymanych wyników. Aby potwierdzić, że obserwowane prążki elektroforetyczne rzeczywiście odpowiadają formie rozgałęzionej i wydłużonej TAR-2 wt oraz, że RNA o tak odmiennej strukturze mogą migrować w bardzo podobny sposób, porównano migrację TAR-2 wt z zaprojektowanymi w oparciu o program *Mfold* mutantami TAR-2, przyjmującymi wyłącznie wydłużoną (TAR-2 A21) lub wyłącznie rozgałęzioną formę (TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta$ C23). Porównanie migracji tych cząsteczek w żelu natywnym, w temperaturze 20°C wykazało, że mutant reprezentujący formę wydłużoną i mutanty reprezentujące formę rozgałęzioną migrują z szybkością zgodną ze sobą oraz z TAR-2 wt (rys.V.6). Zatem obserwowane dla TAR-2 wt w niskiej temperaturze żelu dwa migrujące blisko siebie prążki mogą rzeczywiście odpowiadać rozgałęzionej i wydłużonej formie analizowanej cząsteczki. Mutanty TAR-2 nie były jednak pomocne w ostatecznym potwierdzeniu, który z dwóch prążków TAR-2 wt odpowiada danej formie tej cząsteczki. Chociaż w warunkach wymaganych dla separacji szybciej i wolniej migrującej formy TAR-2 wt mutanty migrowały zgodnie z TAR-2 wt, to niestety w sposób pośredni do prążków odpowiadających poszczególnym formom TAR-2 wt. Brak zgodności w migracji mutantów z szybciej lub wolniej migrującą formą TAR-2 wt, może wynikać z mutacji w sekwencji analizowanych cząsteczek (237), nie można bowiem pominąć faktu, że stosowany zestaw elektroforetyczny oraz warunki elektroforezy wykorzystywane są do wykrywania mutacji punktowych w kwasach nukleinowych (238).



**Rysunek V.6.** Zależna od stężenia jonów magnezu migracja transkryptów o sekwencji TAR-2 wt i mutantów TAR-2 A21, TAR-2  $\Delta$ C23 i TAR-2 B4 w żelu niedenaturującym w temperaturze 20°C. Pozostałe warunki eksperymentu były takie same jak w przypadku rozdziału przedstawionego na rysunku V.4. Rozdział prowadzono w buforze 0,5 $\times$ TB z Tritonem X-100. Linia F wskazuje RNA poddany procesowi denaturacji w formamidzie. Ponad odpowiednimi liniami podano stężenie MgCl<sub>2</sub> w mM.

Ponieważ jednym z celów niniejszej pracy jest analiza nowej, wydłużonej formy TAR-2, dlatego mutant reprezentujący tą właśnie formę (TAR-2 A21) został poddany bardziej szczegółowym badaniom. W niskiej temperaturze żelu, przy braku MgCl<sub>2</sub> lub jego niskich



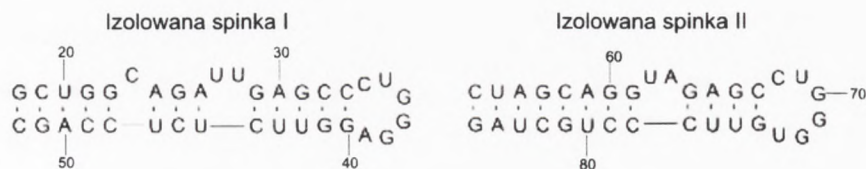


stężeniach obserwowano powtarzalne zjawisko „smużenia”, a nawet jego delikatnego rozdzielenia na dwa prążki (rys.V.4.). Może to być związane z tym, że transkrypt TAR-2 A21 wymaga jonów magnezu dla przyjęcia prawidłowej struktury, albo też wynikać z faktu rozdzielenia TAR-2 A21 na dwa pasma, odpowiadające konformerom E1 i E2 wydłużonej formy TAR-2 RNA. Przy wyższych stężeniach  $MgCl_2$  (od 1 mM) obserwowany był jeden, wyraźny prążek. Stężenie  $MgCl_2$  miało również wpływ na migrację TAR-2 A21 w niskiej temperaturze żelu. Przy wysokim stężeniu jonów  $Mg^{2+}$  mutant TAR-2 A21 migrował na poziomie odpowiadającym formie wydłużonej TAR-2 wt. Natomiast w nieobecności jonów  $Mg^{2+}$  lub przy ich niskich stężeniach analizowany mutant migrował na poziomie zbliżonym do prążka elektroforetycznego odpowiadającego formie rozgałęzionej TAR-2 wt.

Dodatkowe potwierdzenie dla istnienia dwóch form TAR-2 RNA pochodzi z analizy TAR-2 wt wydłużonego o sekwencję domeny poli(A). TAR-2 + poli(A) migruje w żelu natywnym jako dwa wyraźne i znacznie od siebie oddalone prążki, podczas gdy 60-mer RNA o sekwencji izolowanej domeny poli(A), migruje niezależnie od stężenia jonów  $Mg^{2+}$  jako jeden prążek. Zatem obecność dwóch form TAR-2 + poli(A) nie wynika z właściwości domeny poli(A), ale najprawdopodobniej istnienia dwóch form domeny TAR-2. Zagadnienie to będzie dalej analizowane szczegółowo w badaniach prowadzonych w naszej Pracowni przez mgr Katarzynę Purzycką.

### 1.5. ENZYMATYCZNE I CHEMICZNE MAPOWANIE STRUKTURY TAR-2 RNA

Kolejnym etapem moich badań była analiza struktury drugorzędowej zaproponowanych form TAR-2 RNA. Kluczowe było porównanie wyników otrzymanych dla 123-meru TAR-2 wt z danymi otrzymanymi dla transkryptu TAR-2 A21, reprezentującego wydłużoną formę TAR-2 oraz z transkryptami TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta C23$ , reprezentującymi formę rozgałęzioną. Ponadto przeprowadziłam porównawczą analizę wzorów cięć pełnej długości TAR-2 wt (123 nt) z wzorami cięć otrzymanymi dla spinek I (35-mer obejmujący rejon +18 - 52) i II (32-mer obejmujący rejon +54 - 85), fragmentów formy B TAR-2 wt. Ze względu na brak kontekstu strukturalnego, spinki te nazwałam spinkami izolowanymi.



**Rysunek V.7.** Struktura drugorzędowa izolowanych spinek I i II rozgałęzionej formy TAR-2. Numeracja reszt nukleotydowych jest zgodna ze stosowaną dla pełnej długości TAR-2 RNA.



Do badania struktury analizowanych cząsteczek RNA wykorzystano metody ograniczonego trawienia RNA nukleazami oraz metody chemicznej modyfikacji RNA, w tym cięcia indukowane w obecności jonów  $Pb^{2+}$ . W przypadku TAR-2 wt, jak wynika z rozdziałów na żelu niedenaturującym, mamy do czynienia z dwoma globalnymi formami tej cząsteczki, pozostającymi w równowadze zależnej od stężenia jonów magnezu. Fakt ten był znaczącym utrudnieniem w przeprowadzonej analizie strukturalnej. Dodatkowo, większość charakterystycznych dla rozgałęzionej formy TAR-2 rejonów jednoniciowych, pozostaje niesparowana w wydłużonej formie TAR-2, zmienia się tylko rodzaj motywu strukturalnego np. wybrzuszenie na wewnętrzną pętlę, pętla apikalna na wybrzuszenie. Ponieważ równowaga pomiędzy formami TAR-2 zależy od jonów  $Mg^{2+}$ , poszukiwano również cięć RNA, których obecność lub intensywność zależna jest od stężenia tych jonów.

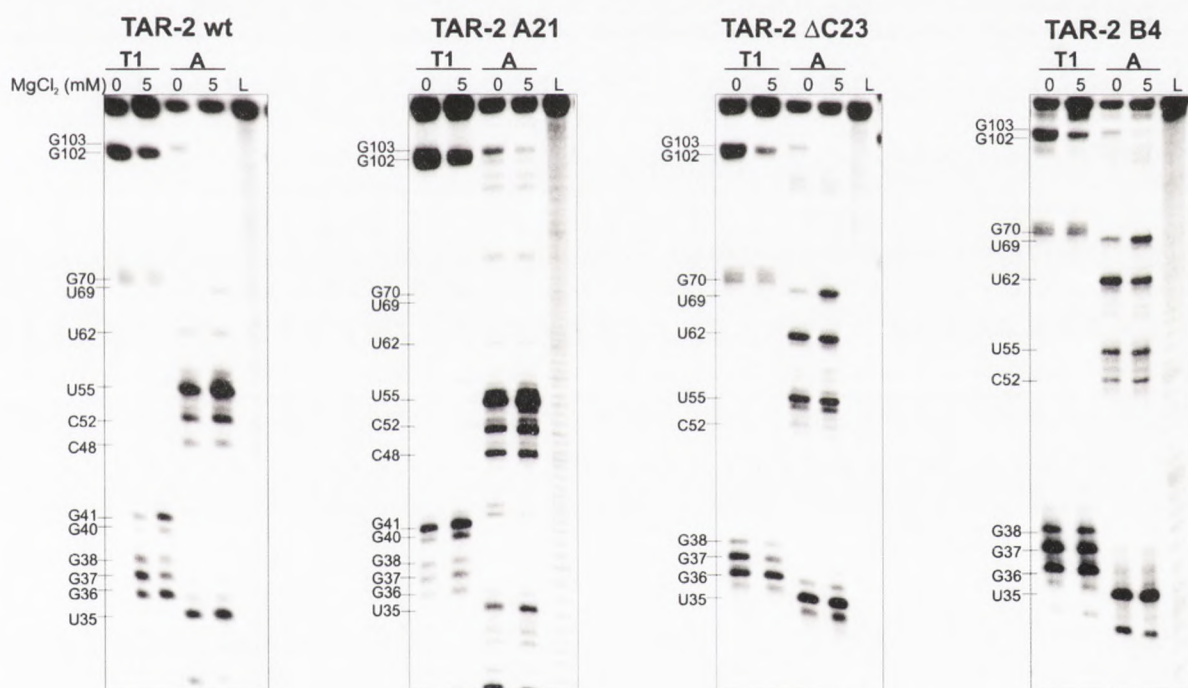
### 1.5.1. Enzymatyczne mapowanie struktury TAR-2 RNA

Do enzymatycznego mapowania struktury drugorzędowej analizowanych cząsteczek RNA wykorzystano specyficzne względem rejonów jednoniciowych rybonukleazy T1 i A oraz nukleazę S1, a także specyficzną względem rejonów dwuniciowych rybonukleazę V1.

Charakterystyczne dla rozgałęzionej formy TAR-2 są dwie sześci nukleotydydowe pętle apikalne o prawie identycznej sekwencji, inna jest jedynie ostatnia reszta nukleotydydowa pętli - U lub A. Jednak pętle te są rozpoznawane w zupełnie inny sposób przez enzymy specyficzne względem rejonów jednoniciowych (rys.V.8 i V.10). Rejon pierwszej pętli TAR-2 wt podlegał silnym trawieniom enzymatycznym, natomiast rejon drugiej pętli był znacznie słabiej rozpoznawany przez analogiczne enzymy. Ulokowany w rejonie pierwszej pętli układ trzech reszt G (G36G37G38), w tym szczególnie reszta G36, był silnie trawiony przez rybonukleazę T1, podczas gdy układ trzech reszt G (G70G71G72) przypisanych do drugiej pętli formy rozgałęzionej TAR-2 nie był dostępny dla rybonukleazy T1. O ile pochodzące z innych laboratoriów dane dotyczące analizy enzymatycznej rejonu pierwszej pętli są zgodne ze sobą oraz z powyższymi wynikami, to dostępne wyniki dotyczące drugiej pętli są sprzeczne ze sobą. Z jednej strony pokazywany jest zupełny brak cięć reszt G70G71G72 rybonukleazą T1 (18;131), z drugiej inna praca przedstawia wyniki dość silnych cięć w tym samym rejonie (87), uzyskane jednak przy bardzo wysokim stężeniu enzymu. Brak trawień reszt G drugiej pętli apikalnej, tłumaczono jako wynik ich oddziaływania dalekiego zasięgu (ang. *long-distance interaction*) z rejonem +189 – 191, zlokalizowanym pomiędzy domeną poli(A) a domeną PBS (47). Wyjaśnienie to nie znajduje potwierdzenia w naszych wynikach, gdyż brak cięć rejonu G70G71G72 obserwowany był dla samego 123-meru TAR-2 wt. Zupełnie inne obrazy cięć dwóch podobnych pętli apikalnych, nie pasują do rozgałęzionego modelu struktury TAR-2, łatwo je jednak wytłumaczyć w oparciu o model struktury wydłużonej TAR-2. Reszty



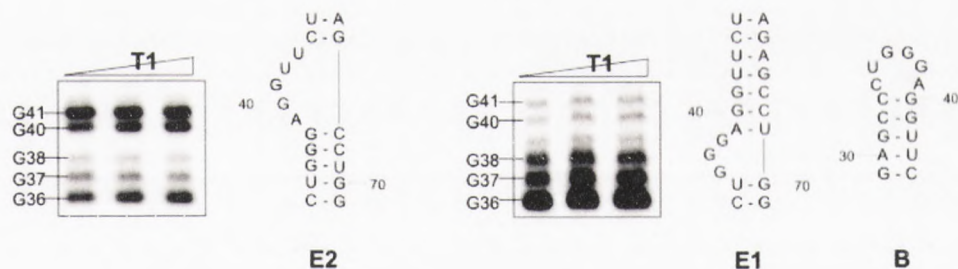
G70G71G72 są tu sparowane i jako takie nie powinny podlegać trawieniom rybonukleazą T1, natomiast intensywnie cięty rejon G36G37G38 wykazuje tendencję do formowania trójnukleotydowego wybrzuszenia (konformer E1). Powyższe stwierdzenie potwierdzają wyniki trawienia rybonukleazą T1 mutantu TAR-2 A21, przyjmującego tylko formę wydłużoną. Ponadto, w przypadku mutantów reprezentujących rozgałęzioną formę TAR-2 (TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta$ C23) zaobserwowano, że układ trzech reszt G drugiej pętli był cięty silniej niż dla TAR-2 wt, natomiast reszty G pierwszej pętli były cięte na podobnym poziomie do TAR-2 wt (rys. V.8). Zarówno dla naturalnej cząsteczki TAR-2, jak i wszystkich jej mutantów silne trawienia rybonukleazą T1 obserwowane były w rejonie pętli apikalnej, krótszej spinki ulokowanej od 3' strony domeny TAR-2, charakterystycznej dla obu form TAR-2. Co ciekawe, wzrost stężenia  $MgCl_2$  powodował silną inhibicję cięć rybonukleazą T1 i A w rejonie tej pętli. Z badań prowadzonych w naszej Pracowni wynika, że najprawdopodobniej związane jest to z faktem zaangażowania spinki 3' domeny TAR-2 w proces dimeryzacji wirusowego RNA.



**Rysunek V.8.** Analiza struktury drugorzędowej transkryptów o sekwencji TAR-2 wt oraz mutantów TAR-2 A21 TAR-2  $\Delta$ C23 i TAR-2 B4 metodą ograniczonego trawienia rybonukleazami T1 i A. Każda z analiz została przeprowadzona w buforze bez  $MgCl_2$  oraz w buforze zawierającym 5 mM  $MgCl_2$ . Stężenie odpowiedniego enzymu było takie samo w obu analizach.



Trawienie rybonukleazą T1 pozwoliło również na wskazanie konformacyjnej niestabilności w bogatym w reszty G rejonie G36G37G38A39G40G41 cząsteczki TAR-2 wt. Pomimo starań o utrzymanie jednakowych warunków eksperymentalnych, w szeregu doświadczeń otrzymywano dwa różne wzory cięć tego rejonu (rys. V.9). Pierwszy z nich otrzymywany stosunkowo rzadko, ukazuje silniejsze cięcia reszt G36G37G38, a słabsze G40G41. Taki wzór cięć pasuje do rozgałęzionej struktury TAR-2 oraz do wydłużonego konformeru E1. Znacznie częściej uzyskiwany, drugi wzór trawień ukazywał bardzo silne cięcia reszt G40G41. Reszty te tworzą stabilne pary G-C, zarówno w rozgałęzionej formie TAR-2 jak i w konformerze E1, traktowanym początkowo jako jedyny wydłużony konformer TAR-2. Należy podkreślić, że omawiane dwa wzory cięć rejonu bogatego w reszty G występowały również w przypadku mutantu TAR-2 A21. Silne cięcia reszt G40G41 stały się impulsem powrotu do analiz *in silico* w celu poszukiwania modelu strukturalnego TAR-2 zgodnego z obserwowanym wzorem cięć. Generowany przez program *Mfold* dla TAR-2 wt i TAR-2 A21 drugi wydłużony konformer E2, pozwolił wyjaśnić silne cięcia w pozycjach G40G41, gdyż w E2 reszty te usytuowane są w obrębie dużego pięcionukleotydowego wybrzuszenia. Istotnym dowodem istnienia wydłużonego konformeru E2 jest całkowity brak cięć reszt G40G41 dla mutantów reprezentujących rozgałęzioną formę TAR-2 (TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta$ C23) oraz izolowanej spinki I (rys. V.8. i V.11).

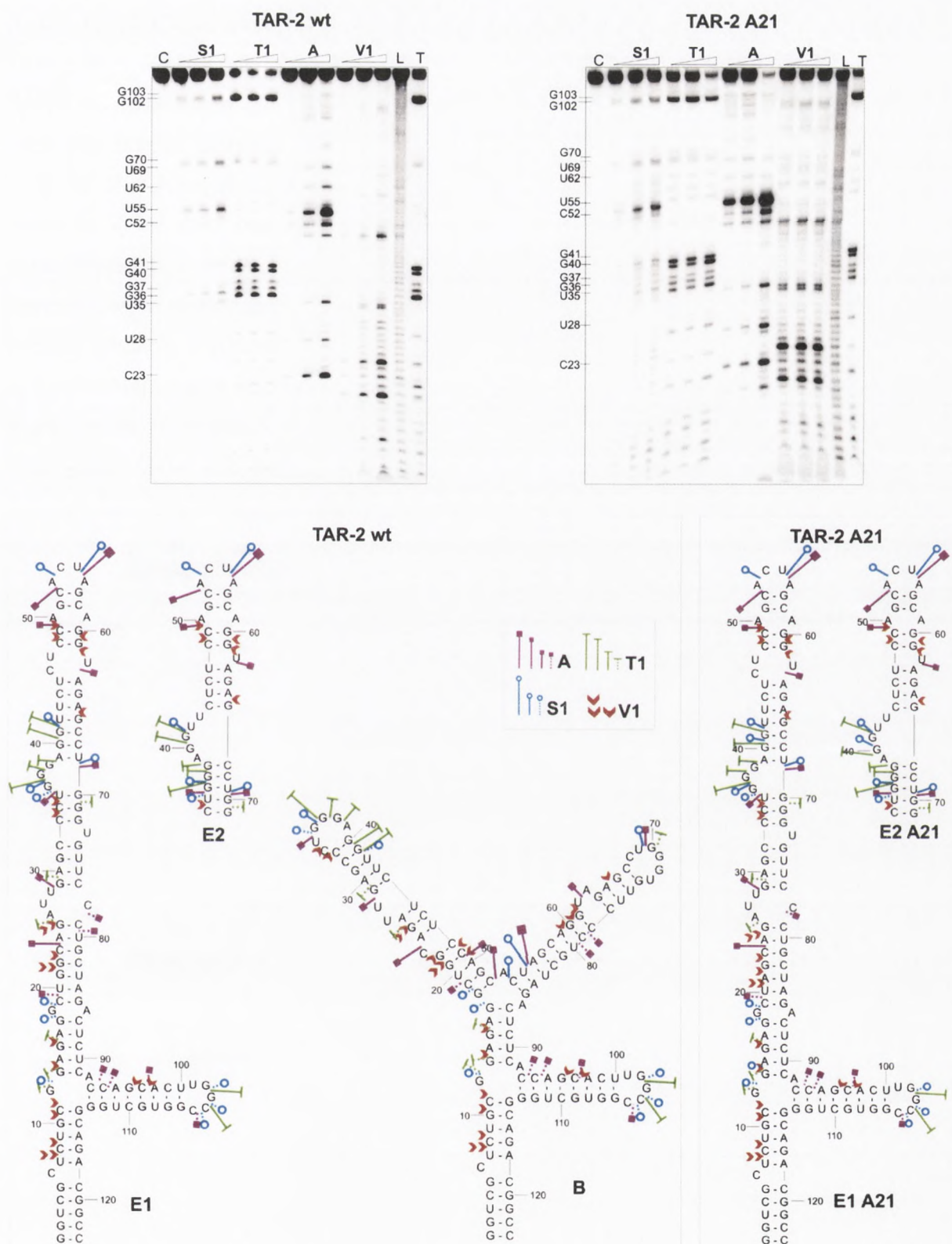


**Rysunek V.9.** Dwa różne obrazy cięć rybonukleazą T1 otrzymywane dla transkryptów o sekwencji TAR-2 wt i TAR-2 A21, potwierdzające konformacyjną niestabilność w rejonie bogatym w reszty G cząsteczki TAR-2. Po prawej stronie każdego żelu pokazano, odpowiadającą danemu obrazowi, organizację rejonu bogatego w reszty G jako fragment różnych struktur drugorzędowych TAR-2 RNA.

Silne cięcia reszt G40 i G41 rybonukleazą T1 są widoczne również w innych pracach analizujących organizację domeny TAR-2 RNA metodami enzymatycznymi (18;47;87;239). Jednak ich obecność była zupełnie pomijana przy ostatecznym ustalaniu struktury TAR-2. Ponadto, cięcia te były obserwowane także w przypadku silnie podobnej do TAR HIV-2<sub>rod</sub>, izolowanej domeny TAR RNA wirusa SIV<sub>mac</sub> (98). Fakt ten potwierdza wcześniejsze stwierdzenie, wynikające z analiz *in silico*, że domena TAR wirusów SIV również ma możliwość formowania form wydłużonych.



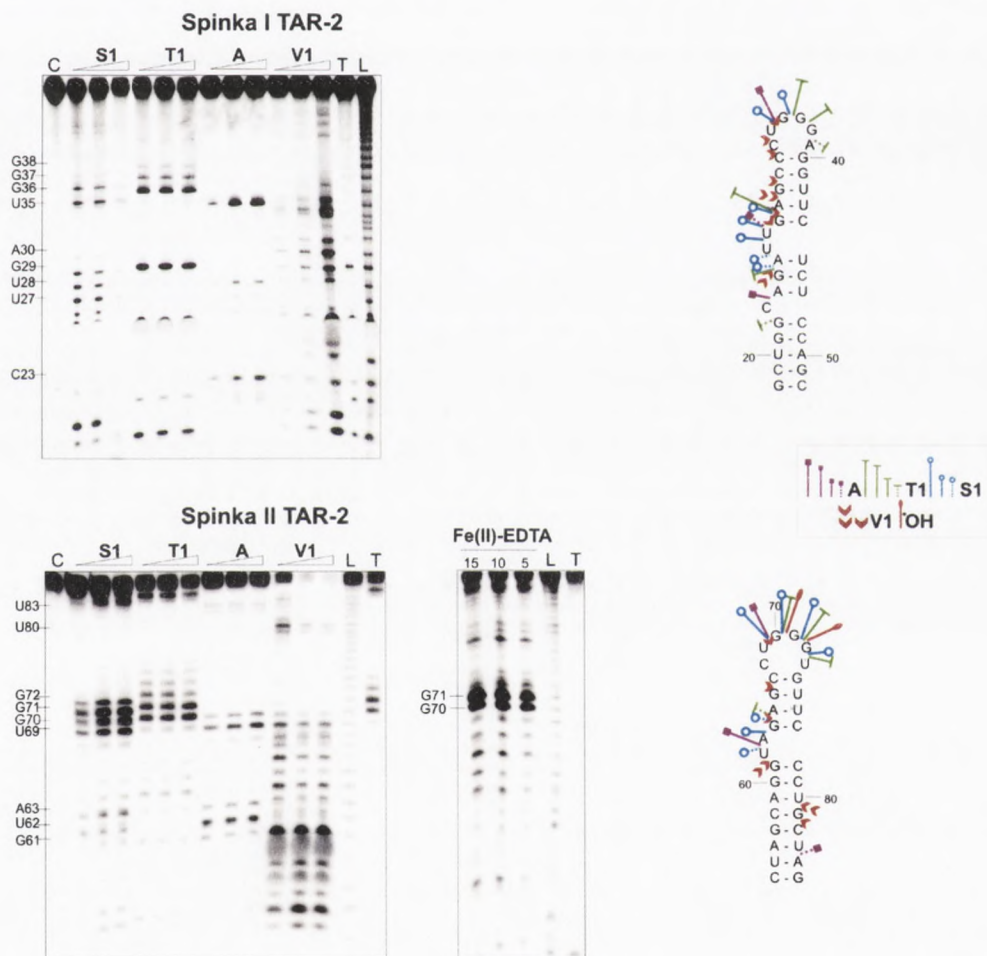




**Rysunek V.10.** Analiza struktury drugorzędowej transkryptów o sekwencji TAR-2 wt i TAR-2 A21 metodą ograniczonych trawień enzymatycznych – S1, T1, A i V1. Dolna część rysunku jest podsumowaniem przeprowadzonych analiz enzymatycznych i przedstawia struktury drugorzędowe TAR-2 wt oraz TAR-2 A21 ze wskazaniem miejsc cięć oraz ich intensywności (reakcje w buforze z 5 mM MgCl<sub>2</sub>). W przypadku rybonukleazy T1 na strukturę naniesiono wszystkie możliwe cięcia rejonu bogatego w reszty G. Linia C - reakcja kontrolna; linia L – hydrolizat formamidowy; linia T – trawienie rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących. Dla przejrzystości schematu pokazano tylko górną (inną od E1) część struktury konformeru E2 i E2 A21.



Reszty G36G37G38 pierwszej pętli apikalnej, zarówno dla izolowanej spinki I jak i mutantów TAR-2 B4 i TAR-2 ΔC23, rozpoznawane były przez rybonukleazę T1 podobnie jak dla TAR-2 wt. Przeciwnie do TAR-2 wt, reszty G70G71G72 pętli apikalnej izolowanej spinki II podlegały bardzo silnemu cięciu nie tylko rybonukleazą T1, ale i nukleazą S1 (rys. V.11). Ponadto charakterystyczne tylko dla izolowanej spinki II oraz mutantów reprezentujących formę B TAR-2 było bardzo silne cięcie reszty U69. Cięcie rejonu drugiej pętli apikalnej w izolowanej spince II oraz mutantach TAR-2 B4 i TAR-2 ΔC23 specyficznymi dla rejonów jednoniciowych nukleazami, wobec zdecydowanie słabszych cięć lub ich braku dla TAR-2 wt, wspiera istnienie wydłużonych konformerów TAR-2, gdzie rejon U69 – G72, odpowiadający pętli apikalnej drugiej spinki (formy B TAR-2) jest sparowany. Ponadto, dla izolowanej spinki II, ale nie dla 123-meru TAR-2 wt, obserwowano silne cięcia indukowane przez wolne rodniki w pozycjach G70 i G71 (rys. V.11).



**Rysunek V.11.** Analiza struktury drugorzędowej transkryptów o sekwencji izolowanych spinek I (35-mer) i II (32-mer) rozgałęzionej formy TAR-2 RNA wt metodą ograniczonego trawienia enzymami – S1, T1, A i V1 oraz cięcia indukowanego przez wolne rodniki (spinka II). Obok żeli przedstawiono struktury drugorzędowe spinek I i II ze wskazaniem miejsc cięć oraz ich intensywności. Linia C - reakcja kontrolna; linia L – hydrolizat formamidowy; linia T – trawienie rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących. Wszystkie reakcje przeprowadzono w buforze zawierającym 5 mM MgCl<sub>2</sub>.



Najsilniejsze cięcie nukleazą S1 i rybonukleazą A w całej cząsteczce TAR-2 wt przypada na resztę nukleotydomową U55 (rys. V.8. i V.10). Wynik ten jest bardzo zaskakujący w świetle rozgałęzionej, trójspinkowej struktury TAR-2, gdyż reszta U55 jest tu sparowana i umiejscowiona w dolnej części trzonu spinki II. Wskazuje on raczej na posadowienie tej reszty w rejonie niesparowanym, jak to ma miejsce w obu wydłużonych konformerach TAR-2, gdzie reszta U55 znajduje się w pętli apikalnej głównej spinki. Chociaż silne cięcia w rejonie U55 – G57 były obserwowane już wcześniej przez innych badaczy (87;131), to fakt ten był pomijany przy ustalaniu struktury TAR-2, a ich obecność tłumaczono wyłącznie oddziaływaniami trzeciorzędowymi, zapobiegającymi formowaniu stabilnych par zasad (87). Analiza cięć reszty U55 u mutantów TAR-2 wskazuje, że oba wyjaśnienia powinny być brane pod uwagę, jednak niesparowanie reszty U55, charakterystyczne tylko dla wydłużonej formy TAR-2, wydaje się być główną przyczyną wysokiej intensywności tego cięcia. U mutantu TAR-2 A21 analogicznie jak w przypadku TAR-2 wt cięcie U55 jest najsilniejszym cięciem indukowanym przez nukleazę S1 i rybonukleazę A w całym transkrypcie. Ponadto, zarówno dla TAR-2 wt jak i TAR-2 A21 intensywność cięcia reszty U55 rybonukleazą A wzrastała ze stężeniem  $MgCl_2$ , co można powiązać z zależną od stężenia jonów magnezu przewagą formy wydłużonej TAR-2 nad formą rozgałęzioną. Dla transkryptów mutantów reprezentujących rozgałęzioną formę TAR-2 (TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta C23$ ) także obserwowano cięcie reszty U55 rybonukleazą A, należy jednak podkreślić jest ono zdecydowanie słabsze niż w przypadku TAR-2 wt i TAR-2 A21 oraz niezależne od stężenia jonów magnezu w buforze (rys. V.8).

Dla rozgałęzionego modelu TAR-2 charakterystyczne są dwunukleotydowe wybrzuszenia U27U28 oraz U62A63, umiejscowione podobnie w strukturze spinek I i II, odpowiednio (87). Przy braku jonów magnezu reszty U27 i U28 TAR-2 wt podlegały silnemu cięciu rybonukleazą A (rys. V.8 i V.12). Wzrost stężenia  $MgCl_2$  jedynie do 1 mM powodował silne osłabienie tych cięć; co ciekawe, zależny od magnezu efekt osłabienia cięć reszt U27 i U28 nie był obserwowany dla izolowanej spinki I. Natomiast, analogiczny jak dla TAR-2 wt, efekt osłabienia silnych cięć reszt U27 i U28 przez jony  $Mg^{2+}$ , obserwowano dla reprezentującego wydłużoną formę TAR-2 zmutowanego transkryptu TAR-2 A21. Dla mutantów TAR-2 ustabilizowanych w formie rozgałęzionej (TAR-2  $\Delta C23$  i TAR-2 B4) rybonukleaza A generowała jedynie słabe cięcia reszt U27 i U28. Reszty nukleotydomowe U62 i A63 tworzące drugie wybrzuszenie w rozgałęzionym modelu TAR-2, podlegały dla transkryptu TAR-2 wt jedynie słabemu cięciu enzymami, niezależnie od stężenia jonów magnezu w buforze. Podobny wynik zaobserwowano dla mutantu TAR-2 A21. Dla kontrastu, w przypadku mutantów reprezentujących rozgałęzioną formę



TAR-2 reszta U62 podlegała bardzo silnemu cięciu enzymatycznemu. Obecność  $MgCl_2$  nie powodowała inhibicji intensywności tego cięcia. Powyższa analiza wskazuje, że wzór cięć rejonów U27U28 i U62A63 transkryptu TAR-2 wt jest zgodny z wzorem typowym dla formy wydłużonej (TAR-2 A21), ale znacząco różni się od wzoru obserwowanego dla formy rozgałęzionej (TAR-2  $\Delta C23$  i TAR-2 B4). W wydłużonych konformerach TAR-2 reszty U27U28 są umiejscowione w wewnętrznej pętli, natomiast reszta U62 jest pojedynczym wybrzuszonym nukleotydem.

Dwunukleotydowe wybrzuszenia izolowanych spinek I (U27U28) i II (U62A63), inaczej niż w pełnej długości cząsteczce TAR-2 wt podlegały porównywalnie intensywnym cięciom enzymatycznym (rys. V.11). Pomimo, że wybrzuszenia izolowanych spinek nie były szczególnie silnie rozpoznawane przez rybonukleazę A, to podlegały silnemu cięciu nukleazą S1, czego nie obserwowano dla analogicznych rejonów 123-meru TAR-2 wt. Dodatkowo, bardzo silnemu cięciu podlegała sąsiadująca bezpośrednio z wybrzuszeniem reszta G29 izolowanej spinki I.

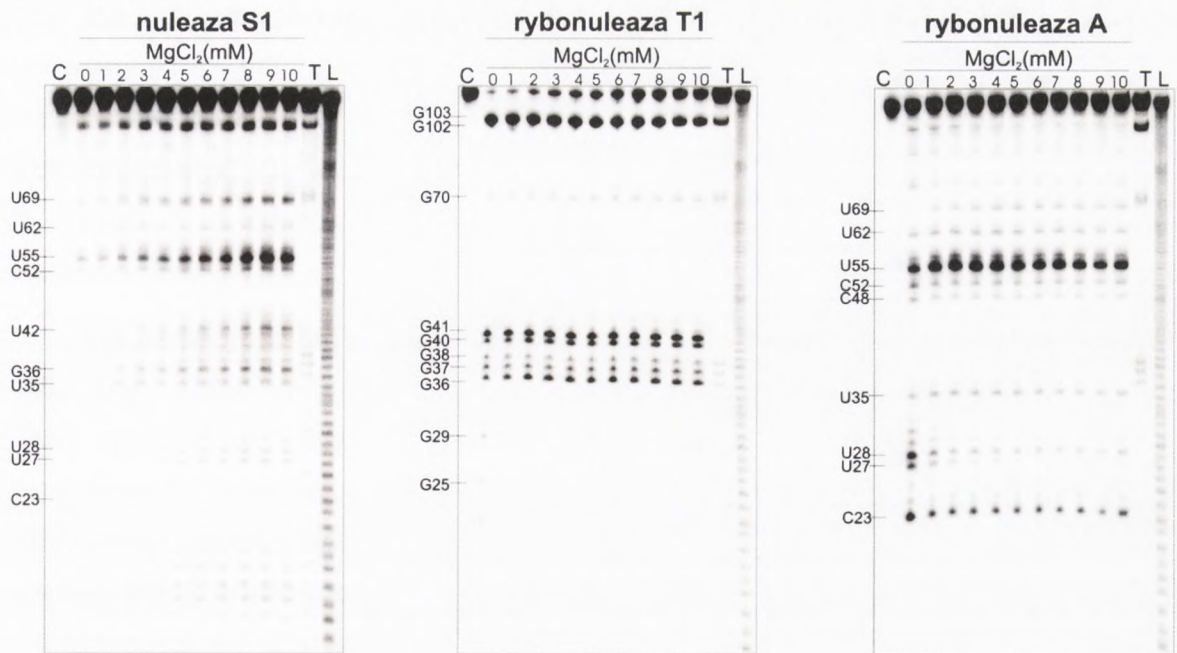
Dla TAR-2 wt oraz izolowanej spinki I silnemu cięciu rybonukleazą A podlegała również reszta C23 (rys. V.10 i V.11). W rozgałęzionej strukturze TAR-2 reszta ta stanowi jednonukleotydowe wybrzuszenie, a więc intensywne cięcie w pozycji C23 mogłoby stanowić silny argument wspierający formę rozgałęzioną. Jednak obecność silnego cięcia w pozycji C23 dla zmutowanego transkryptu TAR-2 A21, gdzie reszta ta jest sparowana i umiejscowiona wewnątrz rejonu dwuniciowego osłabia siłę tego argumentu (rys. V.10).

Trawienia specyficzną względem rejonów dwuniciowych rybonukleazą V1 również występowały w tych samych pozycjach dla TAR-2 wt i TAR-2 A21. Najsilniejszym cięciom podlegały reszty U7, G21 (A21 dla mutantu A21) oraz G25, które w obu proponowanych globalnych formach TAR-2 przewidywane są jako sparowane (rys. V.10.).

W związku z zaobserwowanym faktem, że równowaga pomiędzy formą rozgałęzioną i wydłużoną TAR-2 zależy od jonów magnezu, poszukiwano takich cięć, których obecność lub intensywność zależałaby od stężenia  $MgCl_2$ . Okazało się, że jedynie w przypadku stosowania rybonukleazy A udało się takie cięcia wskazać – opisane powyżej cięcia reszt U27, U28 i U55 TAR-2 wt. Wzrastające stężenie  $MgCl_2$  (od 0 do 10 mM, ze wzrostem co wartość 1 mM) powodowało specyficzne osłabienie niektórych cięć, wzmocnienie innych lub też wcale nie miało wpływu na część z nich (rys. V.12). W przypadku innych enzymów (S1, T1) obserwowano wzmocnienie intensywności wszystkich cięć w cząsteczce RNA, co najprawdopodobniej bardziej związane jest z wpływem jonów magnezu na aktywności samego enzymu niż z zależną od jonów magnezu równowagą pomiędzy formą rozgałęzioną i wydłużoną TAR-2 RNA.







**Rysunek V. 12.** Wyniki ograniczonego trawienia enzymatycznego transkryptu o sekwencji TAR-2 wt w buforach zawierających różne stężenia  $MgCl_2$ , wobec stałego stężenia odpowiedniego enzymu (S1, T1, A). Linia C - reakcja kontrolna; linia L - hydrolizat formamidowy; linia T - trawienie rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących.

Podsumowując otrzymane wyniki analizy enzymatycznej należy podkreślić, że wzór większości cięć 123-meru TAR-2 wt nie wyklucza żadnej z proponowanych form TAR-2 i można go przypisać zarówno do formy rozgałęzionej jak i wydłużonej. Ponadto wzór cięć otrzymany dla TAR-2 wt jest bardziej zgodny z wzorem otrzymanym dla mutantu reprezentującego formę wydłużoną (TAR-2 A21) niż dla mutantów reprezentujących formę rozgałęzioną (TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta C23$ ). Interesujące spostrzeżenia wniosła również analiza porównawcza wyników otrzymanych dla izolowanych spinek I oraz II i pełnej długości TAR-2 wt. W przypadku izolowanej spinki I, poza brakiem cięcia reszt G40 i G41 nie widać bardzo istotnych różnic w porównaniu z TAR-2 wt. Wynika to z faktu, że niezależnie od tego, jaką strukturę przyjmuje 123-mer TAR-2 rejonu odpowiadające wybruszeniu i pętli apikalnej izolowanej spinki I mogą pozostać niesparowane. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku spinki II, tak duża różnica w obrazie cięć pomiędzy izolowaną spinką II i TAR-2 wt wskazuje wyraźnie, że rejon +54 - 85 TAR-2 wcale nie musi przyjmować struktury spinki z sześci nukleotydową pętlą apikalną i dwunukleotydowym wybruszeniem.



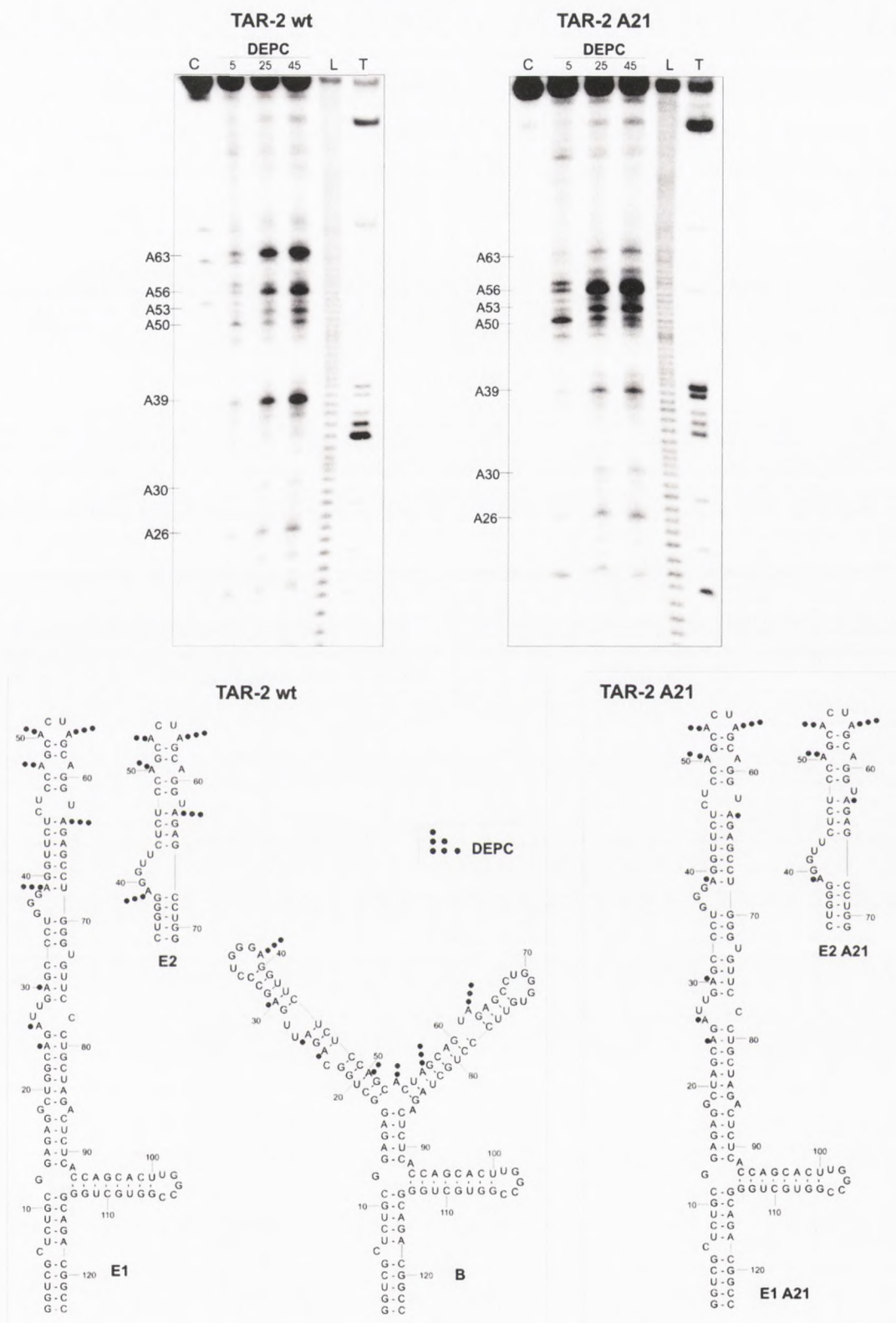
### 1.5.2. Modyfikacja chemiczna TAR-2 RNA - DEPC

Wykorzystanie DEPC (dietylopirowęglanu) do analizy struktury RNA pozwala wskazać niesparowane reszty A w strukturze badanej cząsteczki (240). Jednak brak cięcia danej reszty adenozy, nie zawsze wynika z tworzenia przez nią pary zasad, lecz może być rezultatem zaangażowania danej, niesparowanej reszty w specyficzne oddziaływania warstwowe (240;241).

Dla transkryptu TAR-2 w najsilniejszej modyfikacji DEPC podlegały reszty A39, A56 i A63 (rys. V.13). W rozgałęzionym modelu TAR-2 reszta A39 usytuowana jest w pętli apikalnej pierwszej spinki. Równie dobrze, cięcie to można wyjaśnić w oparciu o konformer E2 formy wydłużonej, gdyż A39 jest pierwszą resztą pięcionukleotydowego wybrzuszenia głównej spinki. Jednak w przypadku transkryptu TAR-2 A21 reszta A39 podlegała wyraźnie słabszej modyfikacji, co może wynikać z jej sparowania i zaangażowania w oddziaływania warstwowe w drugim wydłużonym konformerze - E1. Rozpoznawana silnie w TAR-2 w reszta A56, jest najintensywniej modyfikowaną resztą A w cząsteczce TAR-2 A21. W wydłużonych konformerach TAR-2 reszta ta, podobnie jak bardzo silnie cięta enzymami U55, umiejscowiona jest w pętli apikalnej głównej spinki. W rozgałęzionym modelu reszta A56 posadowiona jest w rejonie dwuniciowym i jako taka raczej nie powinna podlegać tak silnej modyfikacji. Zatem można powiedzieć, że modyfikacja w pozycji A56 silnie wspiera formę wydłużoną formę TAR-2. Jednocześnie bardzo intensywna modyfikacja w pozycji A63 transkryptu TAR-2 w jest silnym argumentem dla formy rozgałęzionej, gdzie reszta ta razem z U62 tworzy dwunukleotydowe wybrzuszenie drugiej spinki. Modyfikacja A63 w transkrypcie TAR-2 A21 jest bardzo słaba, gdyż w obu konformerach wydłużonej formy TAR-2 reszta ta jest sparowana. Obserwowany pomimo tego pewien niski poziom modyfikacji A63 może wynikać z jej bezpośredniego umiejscowienia za wybrzuszoną resztą U62. Charakterystyczne zarówno dla TAR-2 w jak i TAR-2 A21 są modyfikacje reszt A50 i A53. Reszta A53 jest niesparowana w obu formach TAR-2. Natomiast reszta A50 w rozgałęzionej formie TAR-2 znajduje się wewnątrz rejonu helikalnego, a w konformerach E1 i E2 jest ona niesparowana.

Dostępne, nieliczne dane literaturowe (18) dotyczące analizy struktury TAR-2 w z wykorzystaniem DEPC wskazują, że podobnie jak w przypadku naszych eksperymentów silnej modyfikacji podlegała reszta U39. Na podobnym poziomie rozpoznawana była również reszta A53. Jednak bardzo silnie modyfikowana w naszych analizach, reszta A62, ulegała jedynie słabej modyfikacji. Co ciekawe, wcale nie obserwowano modyfikacji w pozycji A56. Najprawdopodobniej opisane różnice wynikają z faktu, że wcześniejsze reakcje modyfikacji RNA z użyciem DEPC przeprowadzono w buforze, który nie zawierał jonów magnezu.





**Rysunek V. 13.** Analiza struktury drugorzędowej transkryptów o sekwencji TAR-2 wt oraz TAR-2 A21 przy wykorzystaniu DEPC. Dolna część rysunku przedstawia struktury drugorzędowe TAR-2 wt oraz TAR-2 A21 ze wskazaniem miejsc cięć oraz ich intensywności. Linia C - reakcja kontrolna; linia L – hydrolizat formamidowy; linia T – trawienie rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących. Reakcje prowadzono w buforze zawierającym 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Czas trwania reakcji został podany nad odpowiednimi liniami. Dla przejrzystości schematu pokazano tylko górną część struktury konformeru E2 i E2 A21.



Przedstawiane w poprzednim rozdziale wyniki analiz enzymatycznych TAR-2 wt i TAR-2 A21 mogłyby mylnie sugerować, że własności strukturalne tych dwóch cząsteczek RNA są praktycznie takie same. Warto zatem podkreślić jest fakt, że reakcje modyfikacji RNA z użyciem DEPC, w przeciwieństwie do analizy enzymatycznej, pozwoliły na rozróżnienie transkryptów TAR-2 wt i TAR-2 A21. Pomimo różnic, wszystkie modyfikacje DEPC obserwowane dla transkryptu mutantu reprezentującego wyłącznie wydłużoną formę TAR-2, były obserwowane dla TAR-2 wt. Wynik ten wydaje się być najzupełniej prawidłowy gdyż TAR-2 wt jest mieszaniną formy wydłużonej i rozgałęzionej. Analogicznie, pewne silne cięcia (np. A63) były typowe tylko dla TAR-2 wt, a ich intensywność dla TAR-2 A21 była znacząco mniejsza.

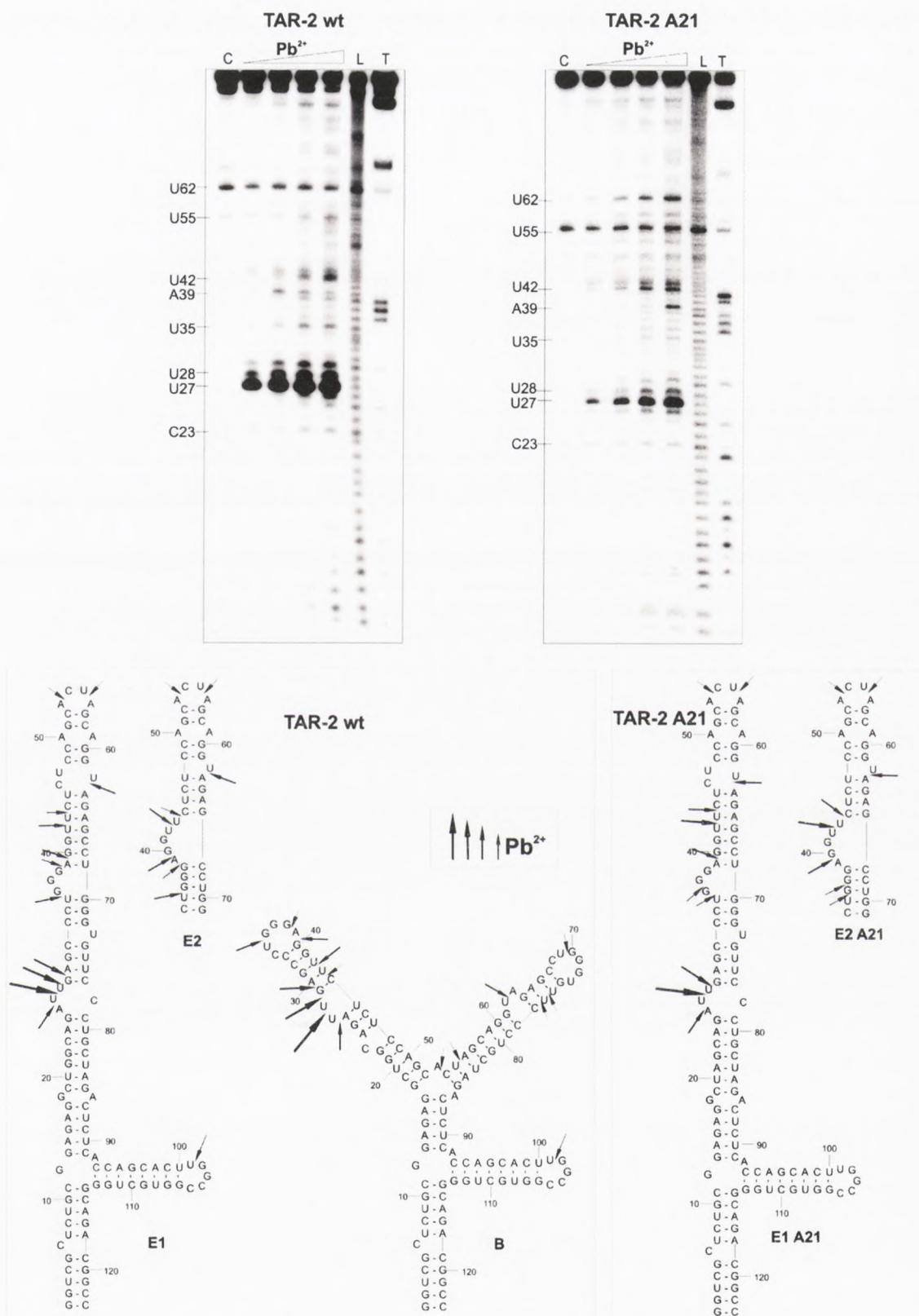
### 1.5.3. Mapowanie struktury TAR-2 RNA metodą cięć indukowanych jonami $Pb^{2+}$

Indukowane jonami metali cięcia hydrolytyczne są bardzo czułą metodą mapowania struktury RNA oraz poszukiwania miejsc wiązania jonów metali w cząsteczkach RNA (242-244). Jony  $Pb^{2+}$  indukują cięcia wiązań fosfodiesterowych przede wszystkim w rejonach jednoniciowych RNA, takich jak pętle czy wybrzuszenia, lecz także w rejonach dwuniciowych o zaburzonej strukturze (242-244).

W pełnej długości transkrypcie TAR-2 wt rejonny odpowiadające dwunukleotydowym wybrzuszeniom (U27U28 oraz U62A63) spinek I i II rozgałęzionej formy TAR-2, rozpoznawane były przez jony  $Pb^{2+}$  w zupełnie inny sposób (rys. V.14). Rejon odpowiadający pierwszemu wybrzuszeniu stanowił miejsce najsilniejszego działania jonów  $Pb^{2+}$  w całej badanej cząsteczce i wydajne cięcie reszt U27 i U28 zachodziło już przy zaledwie 0,25 mM stężeniu  $Pb(OAc)_2$ . Chociaż obie reszty pierwszego wybrzuszenia cięte są bardzo silnie, to szczególnie intensywne cięcie przypada w pozycji U27. Odmiennie, rejon drugiego wybrzuszenia podlegał jedynie bardzo słabemu cięciu jonami  $Pb^{2+}$ , niezależnie od ich stężenia w reakcji i tylko w pozycji U62. Taki wzór cięć odpowiada znacznie lepiej formie wydłużonej TAR-2, gdzie reszty U27 i U28 ulokowane są w wewnętrznej pętli, reszta U62 stanowi pojedynczy wybrzuszony nukleotyd, a reszta A63 jest sparowana. Powyższe wyjaśnienie potwierdza wzór cięć indukowanych przez jony  $Pb^{2+}$  otrzymany dla reprezentującego wyłącznie wydłużoną formę TAR-2, transkryptu TAR-2 A21 (rys. V.14). Dla TAR-2 A1 intensywność cięcia reszty U62 jest, tak jak w cząsteczce TAR-2 wt, dużo słabsza niż U27. Chociaż intensywność cięcia w pozycji U27 transkryptu TAR-2 A21 nie jest aż tak wysoka, jak obserwowana dla TAR-2 wt, to należy zaznaczyć, że tak jak w przypadku TAR-2 wt jest to miejsce najsilniejszego cięcia indukowanego w obecności jonów  $Pb^{2+}$  w całej cząsteczce analizowanego transkryptu.



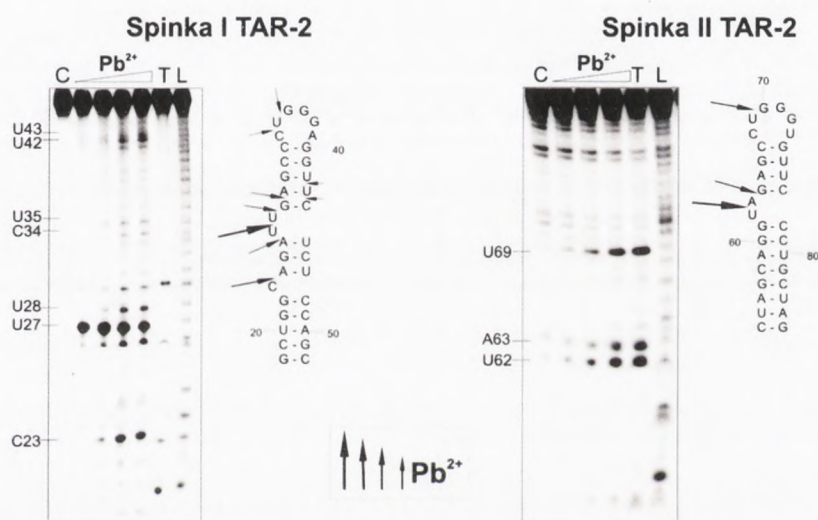




**Rysunek V.14.** Analiza struktury drugorzędowej transkryptów o sekwencji TAR-2 wt oraz TAR-2 A21 metodą cięć indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$  (0,25; 0,5; 1 i 2 mM  $Pb(OAc)_2$ ). Dolna część rysunku przedstawia struktury drugorzędowe TAR-2 wt oraz TAR-2 A21 ze wskazaniem miejsc cięć oraz ich intensywności. Linia C - reakcja kontrolna; linia L - hydrolizat formamidowy; linia T - trawienie rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących. Dla przejrzystości schematu pokazano tylko górną (inną od E1) część struktury konformeru E2 i E2 A21.



W przypadku oligorybonukleotydów o sekwencji izolowanych spinek I i II rozgałęzionej formy TAR-2, intensywne cięcia indukowane w obecności jonów  $Pb^{2+}$  obserwowano w rejonach wybrzuszeń obu spinek (rys. V.15). W izolowanej spince I (35-mer), tak jak w pełnej długości TAR-2 wt, reszta U27 podlegała bardzo silnemu cięciu już przy niskim, zaledwie 0,25 mM stężeniu  $Pb(OAc)_2$ . Natomiast reszta U28 oraz reszty od 3' strony wybrzuszenia były cięte dużo słabiej niż w pełnej długości transkrypcie TAR-2 wt. W przeciwieństwie do 123-meru TAR-2 wt, w izolowanej spince II (32-mer) przy wyższych stężeniach  $Pb(OAc)_2$ , obserwowano bardzo intensywne cięcie w rejonie wybrzuszenia i co istotne, cięciu podlegała nie tylko reszta U62, ale także A63.

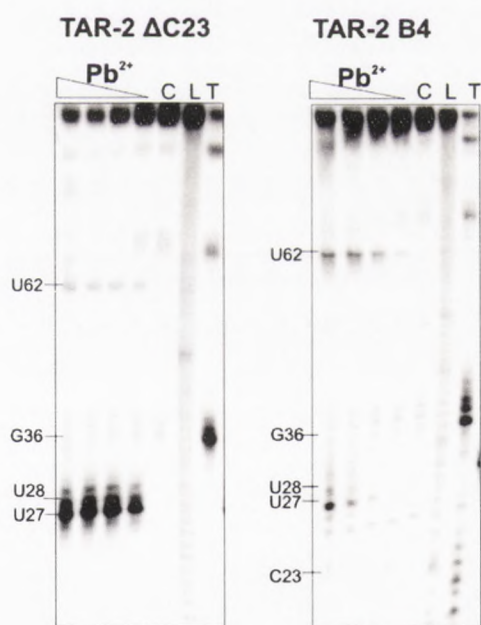


**Rysunek V.15.** Analiza struktury drugorzędowej transkryptów o sekwencji izolowanej spinki I (35-mer) i II (32-mer) rozgałęzionej formy TAR-2 metodą cięć indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$  (0,25; 0,5; 1 i 2 mM  $Pb(OAc)_2$ ). Po prawej stronie każdego żelu przedstawiono struktury drugorzędowe odpowiedniej izolowanej spinki ze wskazaniem miejsc cięć oraz ich intensywności. Linia C - reakcja kontrolna; linia L - hydrolizat formamidowy; linia T - trawienie rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących.

Występowanie wydłużonej formy TAR-2 nie jest jedynym wyjaśnieniem dużej różnicy w intensywności cięć indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$  w rejonach U27U28 i U62A63 transkryptu TAR-2 wt. W przypadku mutantów TAR-2 ustabilizowanych w formie rozgałęzionej, dwunukleotydowe wybrzuszenie U62A63 także podlega tylko słabemu cięciu jonami  $Pb^{2+}$  (rys. V.16). Wynik uzyskany dla izolowanej spinki II wskazuje, że konformacja wybrzuszenia U62A63 pozwala na jego silne cięcie jonami  $Pb^{2+}$ . Trzeba jednak pamiętać, że jest to struktura izolowana, tym samym pozbawiona kontekstu strukturalnego wnoszonego przez pozostałe rejony domeny TAR-2. Zatem, bardzo słabe cięcie wybrzuszenia U62A63 w pełnej długości transkrypcie TAR-2 wt oraz mutantach TAR-2  $\Delta C23$  i TAR-2 B4 może wynikać z oddziaływań trzeciorzędowych, które tak zmieniają konformację wybrzuszenia U62A63, że przestaje być ono dostępne dla jonów  $Pb^{2+}$ .



Analiza struktury rejonu U62A63 transkryptów reprezentujących rozgałęzioną formę TAR-2, przeprowadzona z wykorzystaniem jonów  $Pb^{2+}$ , nie jest zgodna z wynikami otrzymanymi z eksperymentów trawień enzymatycznych. Wskazywały one bowiem jednoznacznie, że w transkryptach TAR-2  $\Delta C23$  i TAR-2 B4 reszta U62 podlega znacznie silniejszemu cięciu enzymatycznemu niż w TAR-2 wt (rys. V.8.). Te dwie metody badawcze dają jednak porównywalny wynik analizy struktury rejonu U27U28 i obie wskazują, że w transkryptach mutantów reprezentujących rozgałęzioną formę TAR-2, rejon U27U28 (wybrzuszenie pierwszej spinki) podlega słabszemu cięciu niż w przypadku TAR-2 wt. Zgodność nie jest jednak całkowita. Analiza enzymatyczna wskazywała, że reszty U27U28 są cięte porównywalnie słabo w obu transkryptach reprezentujących rozgałęzioną formę TAR-2. Analiza cięć indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$  wskazuje natomiast, że dla TAR-2  $\Delta C23$  osłabienie cięć w stosunku do TAR-2 wt jest niewielkie, natomiast w przypadku TAR-2 B4 jony  $Pb^{2+}$  nie indukują cięć w rejonie U27U28. Prawdopodobnie różnice obserwowane przy użyciu tych dwóch metod są spowodowane faktem, że jony  $Pb^{2+}$  są bardziej wrażliwe na lokalne zmiany struktury niż enzymy. Uzyskane wyniki sugerują również, że zmiany sekwencyjne wprowadzone w zmutowanym transkrypcie TAR-2 B4 mają znaczny, w tej chwili bliżej nieokreślony wpływ na strukturę pierwszej spinki.



**Rysunek V.16.** Analiza struktury drugorzędowej transkryptów TAR-2  $\Delta C23$  i TAR-2 B4 metodą cięć indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$  (0,25; 0,5; 1 i 2 mM  $Pb(OAc)_2$ ). Linia C - reakcja kontrolna; linia L - hydrolizat formamidowy; linia T - trawienie rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących.

W cząsteczce TAR-2 wt rejon odpowiadający trzem pętli apikalnym rozgałęzionego modelu TAR-2 podlegały tylko słabemu cięciu jonami  $Pb^{2+}$  (rys. V.14) Szczegółowa analiza wyników z kilku niezależnych eksperymentów wskazuje jednak, że rejon odpowiadający pierwszej pętli (+34 – 39) był lepiej rozpoznawany przez jony  $Pb^{2+}$  niż rejon pętli drugiej (+68 – 72). Natomiast w transkryptach reprezentujących rozgałęzioną formę TAR-2 nie obserwowano różnicy w intensywności cięć pomiędzy rejonami obu tych



pętli. Typowa dla TAR-2 wt różnica intensywności cięć indukowanych jonami  $Pb^{2+}$  w rejonach +34 – 39 i +68 – 72 zgodna jest z przedstawionymi wcześniej wynikami analizy enzymatycznej. Prawdopodobnie wynika ona z faktu, że w wydłużonych konformerach TAR-2 reszty +34 – 39 mogą formować wybrzuszenia lub bezpośrednio z nimi sąsiadować. Natomiast rejon +68 – 72 w wydłużonej formie TAR-2 jest sparowany, niezależnie od tego czy analizujemy konformer E1 czy E2. Wyjaśnienie to znajduje wsparcie w obserwacjach innych badaczy, które wskazują, że jony  $Pb^{2+}$  indukują silniejsze cięcia cząsteczek RNA w rejonach wybrzuszeń niż w pętlach apikalnych (127;243).

Efekt bardzo słabych cięć w pętlach apikalnych obserwowano również dla izolowanych spinek I i II (rys. V.15). Ponadto jony  $Pb^{2+}$  rozpoznawały pętlę apikalną izolowanej spinki I słabiej niż odpowiadający jej rejon w pełnej długości transkrypcie TAR-2 wt; poza bardzo słabymi cięciami reszt C34 i U35, pozostałe reszty pętli nie były wcale cięte. Rejon pętli apikalnej izolowanej spinki II, podobnie jak w TAR-2 wt nie podlegał cięciu jonami  $Pb^{2+}$ , wyjątek stanowi bardzo silne cięcie reszty U69. Cięcie to było typowe tylko dla izolowanej spinki II i nie było obserwowane dla TAR-2 wt, co może być związane z sparowaniem tej reszty w wydłużonej formie TAR-2.

Można by oczekiwać, że wybrzuszenia występujące w wydłużonych konformerach, w szczególności złożone z pięciu reszt wybrzuszenie konformera E2, powinny podlegać silniejszym cięciom niż obserwowane dla TAR-2 wt. Jednak analiza cięć indukowanych jonami  $Pb^{2+}$  w transkrypcie TAR-2 A21 wykazała, że podobnie jak w cząsteczce naturalnej, większość reszt tworzących wybrzuszenia podlega jedynie słabemu cięciu (rys.V.14), najprawdopodobniej dlatego, że są to reszty G. Podobnie jak dla transkryptu TAR-2 wt, dla TAR-2 A21 silniejsze cięcia obserwowano jedynie dla reszt A39, U42 i U43, stanowiących skrajne reszty pięcionukleotydowego wybrzuszenia konformera E2. Reszta A39 może być niesparowana w obu formach TAR-2, natomiast reszty U42 i U43 w rozgałęzionej formie TAR-2 znajdują się w rejonie helikalnym. Pomimo tego indukowane jonami  $Pb^{2+}$  cięcia reszt U42 i U43 obserwowano również dla izolowanej spinki I.

Reszta U55, silnie cięta enzymami specyficznymi dla rejonów jednoniciowych, podlegała jedynie słabemu cięciu jonami  $Pb^{2+}$  w transkrypcie TAR-2 wt i TAR-2 A21 (rys. V.14). Obserwacja ta wspiera umiejscowienie reszty U55 w pętli apikalnej głównej spinki wydłużonej formy TAR-2, gdyż jest to mała czteronukleotydowa pętla i jak wiadomo takie pętlice mają często uporządkowaną strukturę, przez co są słabo rozpoznawane przez jony metali (243). Gdyby cięcie enzymatyczne U55 wynikało jedynie z silnego zaburzenia struktury rejonu helikalnego rozgałęzionej formy TAR-2 (87), to taki rejon powinien podlegać silniejszym cięciom indukowanym przez jony  $Pb^{2+}$ .





### 1.6. ANALIZA ODDZIAŁYWANIA TAR-2 RNA Z JONAMI METALI

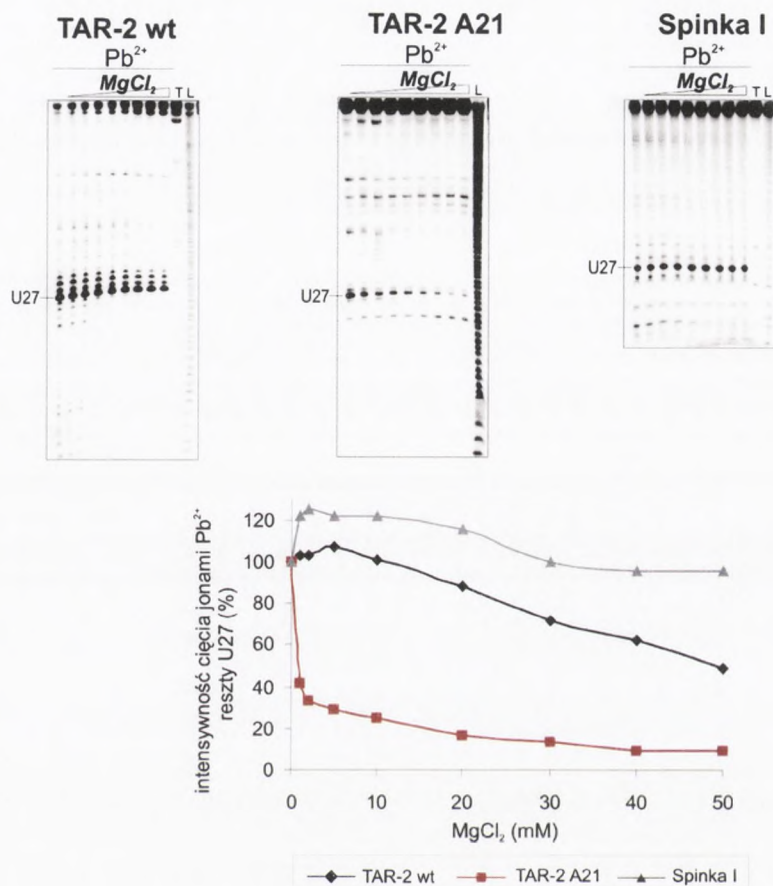
Oddziaływania RNA z jedno- i dwuwartościowymi jonami metali odgrywają ważną funkcję w zwijaniu i stabilizacji polianionowej struktury RNA oraz w regulacji oddziaływań makrocząsteczkowych w komórce (87;245-247). Aczkolwiek brakuje szczegółowych danych strukturalnych, dotyczących oddziaływań określonych domen rejonu liderowego RNA wirusa HIV-2 z jonami metali, to udowodniono, że jony  $Mg^{2+}$  odgrywają istotną rolę w globalnej rearanzacji strukturalnej liderowego RNA wirusa, z utworzeniem konformera BMH, odpowiedzialnego za dimeryzację genomu (86;89). Jak wykazano w poprzednich rozdziałach jony  $Mg^{2+}$  są także kluczowe dla stanu równowagi pomiędzy globalnymi formami TAR-2 wt. Może ona wynikać zarówno ze specyficznego wiązania jonów metali w strukturze TAR-2 RNA, jak i z niespecyficznego oddziaływań z jonami  $Mg^{2+}$  obecnymi w roztworze.

Jak dotychczas brak jest danych dotyczących wiązania jonów metali w strukturze domeny TAR-2 RNA. Dostępne są jednak pewne informacje na temat oddziaływania TAR RNA HIV-1 z jonami metali, pochodzące z badań krystalograficznych modelowego dupleksu, obejmującego rejon wybrzuszenia TAR, ale pozbawionego pętli apikalnej. Wskazują one, że w kryształach konformacja wybrzuszenia spinki TAR-1 jest stabilizowana przez trzy jony  $Ca^{2+}$  (248). Ponieważ techniki krystalizacji RNA wymagają stosowania znacznie większego od fizjologicznego stężenia soli, co może zmieniać warunki wiązania kationów, pełna charakterystyka miejsc specyficznego wiązania jonów metali wymaga uzupełnienia metod krystalograficznych o techniki służące do analizy oddziaływań RNA / jony metali w roztworze, jako w warunkach bardziej zbliżonych do naturalnych. Dane pochodzące z naszej Pracowni dotyczące oddziaływań spinki TAR-1 z jonami metali w roztworze wskazują, że rejon trójnukleotydowego wybrzuszenia UCU jest miejscem wiązania jonów  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  oraz  $Co(NH_3)_6^{3+}$  (127).

Wysokie podobieństwo spinki I rozgałęzionej formy TAR-2 do TAR-1 może sugerować, że rejon wybrzuszenia tej spinki może także stanowić potencjalne miejsce wiązania jonów metali. Dlatego w ramach niniejszej pracy postanowiłam sprawdzić czy rejon odpowiadający wybrzuszeniu I spinki (reszty U27U28) TAR-2 stanowi miejsce wiązania jonów metali, w szczególności jonów  $Mg^{2+}$ . W tym celu zastosowałam metodę cięć indukowanych jonami  $Mg^{2+}$  oraz eksperymenty inhibicji kompetycyjnej cięć indukowanych jonami  $Pb^{2+}$  przez jony  $Mg^{2+}$ . W związku ze znacznie wyższą wartością  $pK_a$  hydratów jonów magnezowych (242) warunki, w których prowadzono reakcję hydrolizy RNA indukowanej jonami  $Mg^{2+}$  odbiegały od tych, w których prowadzono cięcie jonami  $Pb^{2+}$  - 37°C, pH 8,5 oraz znacznie dłuższy czas reakcji (15 godzin). Eksperymenty inhibicji kompetycyjnej opierają się na współzawodnictwie pomiędzy różnymi jonami, ale wiążącymi się do tego samego miejsca w strukturze RNA, których wiązanie wzajemnie się wyklucza.



Reakcja prowadzona jest w warunkach, w których tylko jeden z jonów (tu jon  $Pb^{2+}$ ) może indukować cięcia w strukturze RNA. Metodę tą stosowano już wcześniej (249;250), również w naszej Pracowni do analizy wiązania jonów metali do spinki TAR-1 RNA (127).



**Rysunek V.17.** Porównanie wpływu  $MgCl_2$  (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM) na cięcia indukowane jonami  $Pb^{2+}$  w pozycji U27 transkryptów o sekwencji TAR-2 wt, TAR-2 A21 oraz izolowanej spinki I. Wykres przedstawia ilościową analizę uzyskanych danych eksperymentalnych.

Indukowane jonami  $Mg^{2+}$  cięcia w pozycjach U27 i U28 były obserwowane zarówno dla transkryptu TAR-2 wt jak i TAR-2 A21 (rys. V.18). Jednakże w przypadku TAR-2 A21 były one szczególnie intensywne, wskazując na możliwość wiązania jonów  $Mg^{2+}$  w rejonie wewnętrznej pętli, obejmującej reszty U27 i U28, struktury wydłużonej TAR-2. Zostało to potwierdzone silną inhibicją przez jony  $Mg^{2+}$ , cięcia indukowanego jonami  $Pb^{2+}$  w pozycji U27 TAR-2 A21; przy czym inhibicję tą powodowało już bardzo niskie, zaledwie 1 mM stężenie  $MgCl_2$  (rys. V.17). Dla TAR-2 wt obserwowano jedynie słabą inhibicję cięcia reszty U27 i to dopiero przy wysokich stężeniach  $MgCl_2$ . Natomiast w przypadku izolowanej spinki I nie obserwowano najmniejszej nawet inhibicji, a wręcz odwrotnie, wyraźne wzmocnienie intensywności cięcia reszty U27, utrzymujące się nawet przy wysokich stężeniach  $MgCl_2$ . Zakładając, że TAR-2 istnieje w dwóch alternatywnych formach globalnych, a konformację reszty U27 w jednej z nich odzwierciedla izolowana



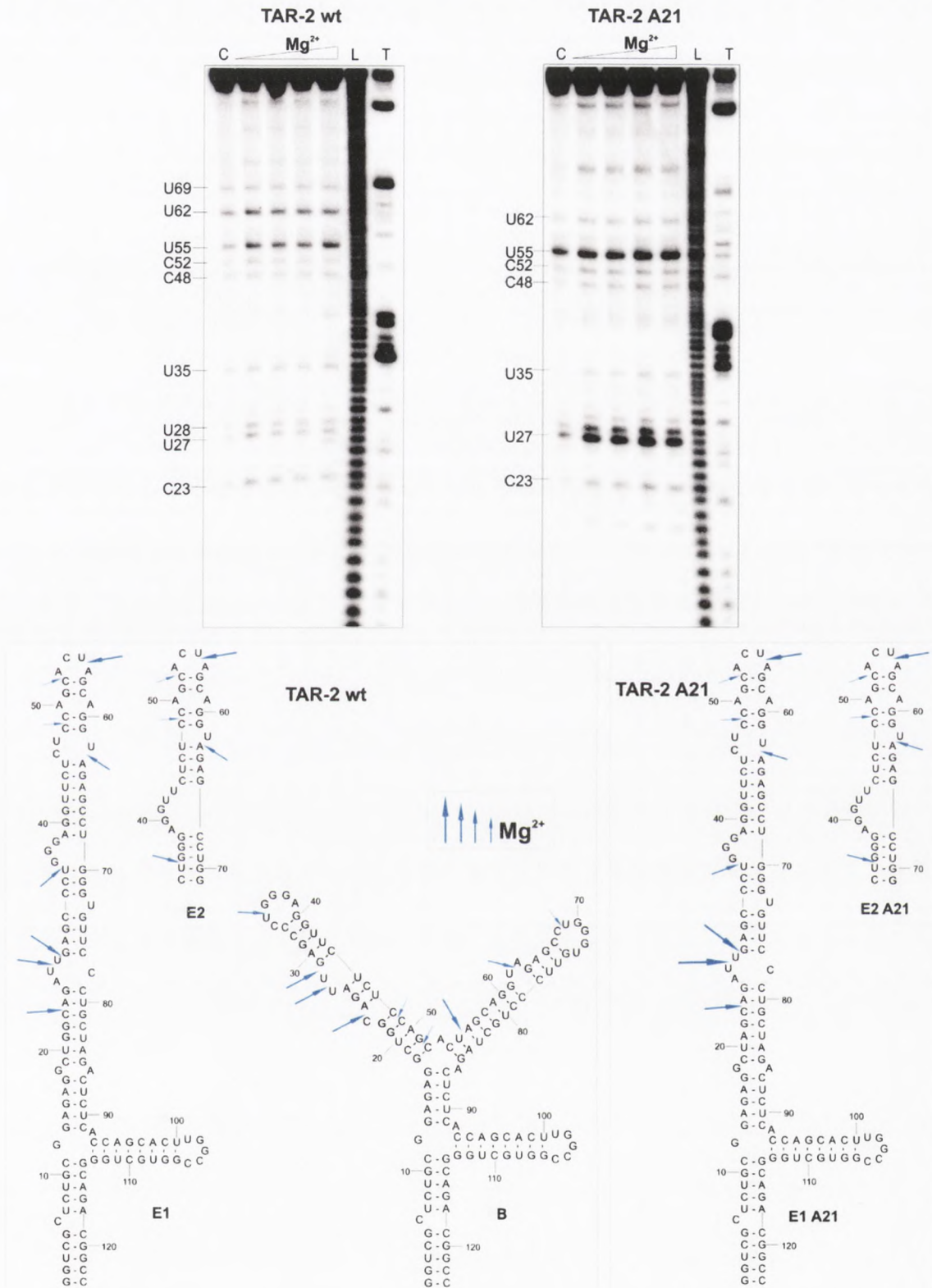
spinka I, w drugiej natomiast mutant TAR-2 A21, wynik eksperymentu inhibicji kompetycyjnej otrzymany dla transkryptu o sekwencji TAR-2 wt nie stanowi większego zaskoczenia.

Dla transkryptu TAR-2 wt wzór cięć indukowanych przez jony  $Mg^{2+}$ , poza słabszym cięciem rejonu U27U28, jest w zasadzie podobny do wzoru otrzymanego dla TAR-2 A21 (rys.V.18). Pewne, niezbyt jednak intensywne, cięcia obserwowane są w pozycjach C23, U35, U55 oraz U62. Nie są one jednak na tyle silne, aby wskazać którąś z wymienionych reszt jako miejsce specyficznego wiązania jonów  $Mg^{2+}$  w strukturze naturalnie występującego TAR-2 RNA.

W obu powyższych transkryptach inkubacja przez 15 godzin w temperaturze  $37^{\circ}C$  i podwyższonym pH prowadzi do generowania niespecyficzných cięć, widocznych w reakcjach kontrolnych. Cięcia te przypadają w tych samych pozycjach dla obu analizowanych cząsteczek RNA. Jednak w transkrypcie TAR-2 A21 cięcia w rejonie U27U28 i dla reszty nukleotydowej U55 są zdecydowanie bardziej intensywne niż w przypadku TAR-2 wt. Fakt ten przekłada się na występowanie silniejszych cięć tych reszt w obecności jonów  $Mg^{2+}$ . Szczególnym zaskoczeniem jest silne niespecyficzne cięcie reszty U55, umiejscowionej w analizowanym mutancie w małej czteronukleotydowej pętli apikalnej. Co ciekawe, w transkrypcie TAR-2 wt, gdzie reszta ta może być ulokowana w pętli apikalnej (E1 i E2) lub, jak sugerowano wcześniej, w rejonie dwuniciowym o silnie zaburzonej strukturze (87), obserwowane niespecyficzne cięcie U55 jest wyraźnie słabsze.

Obserwowane dla TAR-2 wt słabe, ale jednak obecne, cięcia jonami  $Mg^{2+}$  reszt U27U28 i pewien poziom inhibicji cięcia reszty U27 jonami  $Pb^{2+}$ , wobec rosnącego stężenia  $MgCl_2$  wskazują, że rejon U27U28 może stanowić tylko słabe miejsce wiązania jonów  $Mg^{2+}$  w strukturze TAR-2 wt. Jak wynika z analizy izolowanej spinki I, charakterystyczne dla rozgałęzionej struktury TAR-2 dwunukleotydowe wybrzuszenie U27U28, nie stanowi miejsca wiązania jonów  $Mg^{2+}$ , zatem ta uznawana powszechnie za najbardziej podobną do TAR-1 struktura ma inne powinowactwo do jonów  $Mg^{2+}$  niż TAR-1. Wyniki otrzymane dla mutantu TAR-2 A21 wskazują, że proponowane słabe wiązanie jonów  $Mg^{2+}$  w rejonie U27U28 TAR-2 wt związane jest raczej z tworzeniem wydłużonej formy TAR-2, gdzie reszty te nie formują dwunukleotydowego wybrzuszenia, ale umiejscowione są w wewnętrznej pętli głównej spinki i to zarówno w konformerze E1 jak i E2. Słabe wiązanie jonów  $Mg^{2+}$  w rejonie U27U28 TAR-2 wt wskazuje, że zależny od stężenia tych jonów stan równowagi pomiędzy rozgałęzioną i wydłużoną formą TAR-2, może wynikać z wiązania jonów  $Mg^{2+}$  w zupełnie innych miejscach domeny TAR-2.



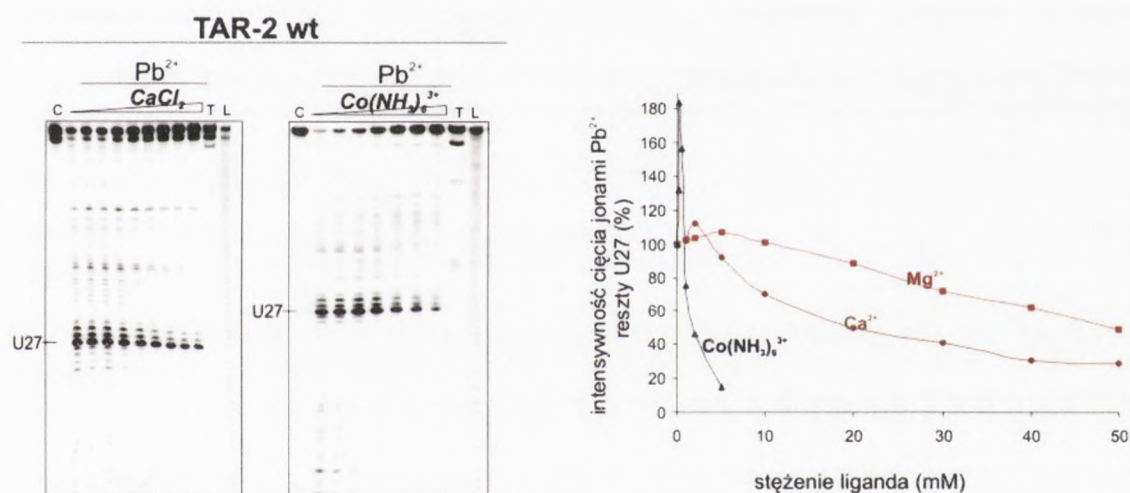


**Rysunek V.18.** Cięcia indukowane w obecności jonów  $Mg^{2+}$  (0,25, 0,5, 1, 2 mM  $MgCl_2$ ) w transkryptach o sekwencji TAR-2 wt oraz TAR-2 A21. Dolna część rysunku przedstawia struktury drugorzędowe TAR-2 wt oraz TAR-2 A21 ze wskazaniem miejsc cięć oraz ich intensywności w badanych cząsteczkach. Linia C - reakcja kontrolna; linia L - hydrolizat formamidowy; linia T - trawienie rybonukleazą T1 w warunkach denaturujących. Dla przejrzystości schematu pokazano tylko górną (inną od E1) część struktury konformeru E2 i E2 A21.





Ponieważ trójnukleotydowe wybrzuszenie TAR-1 wiąże nie tylko jony  $Mg^{2+}$ , ale również  $Ca^{2+}$  oraz  $Co(NH_3)_6^{3+}$  postanowiłam sprawdzić, jakie jest powinowactwo rejonu U27U8 TAR-2 wt do wiązania tych jonów (rys. V.19). Co ciekawe, odwrotnie niż obserwowano dla TAR-1 (127), jony  $Ca^{2+}$  powodowały silniejszą inhibicję cięcia indukowanego przez  $Pb^{2+}$ , niż jony  $Mg^{2+}$ . Wiadomo, że jony  $Co(NH_3)_6^{3+}$  wiążą się kilkakrotnie mocniej do RNA, niż jony  $Mg^{2+}$  (251), nie jest zatem zaskoczeniem, że powodują one znacznie silniejszą inhibicję cięć indukowanych przez jony  $Pb^{2+}$ . Niskie, zaledwie 2 mM stężenie jonów  $Co(NH_3)_6^{3+}$  wystarczało do 50% zahamowania intensywności cięcia reszty U27. Niskie stężenia jonów  $Co(NH_3)_6^{3+}$  powodowały jednak gwałtowny wzrost intensywności cięcia, podobnego efektu nie obserwowano dla spinki TAR-1 RNA (127). Chociaż jony  $Ca^{2+}$  oraz  $Co(NH_3)_6^{3+}$  powodują silniejszą inhibicję cięcia reszty U27 TAR-2 niż jony  $Mg^{2+}$  to i tak wiązanie tych jonów do rejonu U27U28 jest dużo słabsze niż w przypadku TAR-1.



**Rysunek V.19.** Porównanie wpływu  $CaCl_2$  (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM) oraz  $Co(NH_3)_6Cl_3$  (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 mM) na cięcie indukowane jonami  $Pb^{2+}$  w pozycji U27 transkryptu TAR-2 wt. Wykres przedstawia ilościową analizę uzyskanych danych eksperymentalnych.



## V.2. ANALIZA ODZIAŁYWANIA TAR-2 RNA Z WIRUSOWYM BIAŁKIEM TAT-2 I LUDZKĄ CYKLINĄ T1

Zaproponowanie nowego modelu struktury TAR-2 RNA wiąże się z pytaniem o jego udział w funkcjach biologicznych, jakie pełni liderowy RNA wirusa HIV-2. Ponieważ TAR-2 RNA odgrywa kluczową rolę w regulacji transkrypcji wirusowych genów, poprzez oddziaływanie z *trans*-aktywującym białkiem Tat-2 oraz ludzką cykliną T1 (12;56;75), postanowiłam sprawdzić czy wydłużone formy TAR-2 mogą wiązać białko Tat-2 oraz kompleks(y) białek Tat-2 / cyklina T1. Analizę tą oparłam o określenie zdolności różnych form TAR-2 RNA do formowania *in vitro* dwuskładnikowych kompleksów z białkiem Tat-2 oraz kompleksów trójskładnikowych z Tat-2 i cykliną T1. Dodatkowo, zbadalam również wiązanie amidu argininy do analizowanych cząsteczek RNA. Ponieważ zaplanowane eksperymenty wymagały równoczesnej dostępności do dwóch preparatów rekombinantowych białek o wysokiej jakości oraz ośmiu znakowanych izotopowo cząsteczek RNA, ich wykonanie było możliwe dzięki nieocenionej pomocy współpracującej ze mną mgr Katarzyny Purzyckiej.

Należy podkreślić, że dla kontrastu z elementem TAR wirusa HIV-1, oddziaływanie TAR RNA HIV-2 z wirusowym białkiem Tat-2, a tym bardziej z ludzką cykliną T1 poznane jest bardzo słabo i dostępnych jest niewiele danych dotyczących tego zagadnienia. Bardzo często upraszcza się je po prostu do dobrze poznanego oddziaływania TAR-1 / Tat-1 / cyklina T1. Jednak czy słusznie? Należy bowiem pamiętać, że struktura domeny TAR jest inna u HIV-1 i HIV-2, a wirusowe białko Tat-2 słabo wiąże TAR-1 i mało wydajnie aktywuje transkrypcję genów wirusa HIV-1 (19;138;175;176).

### 2.1. NADEKSPRESJA I OCZYSZCZANIE BIAŁEK TAT-2 ORAZ CYKLINY T1

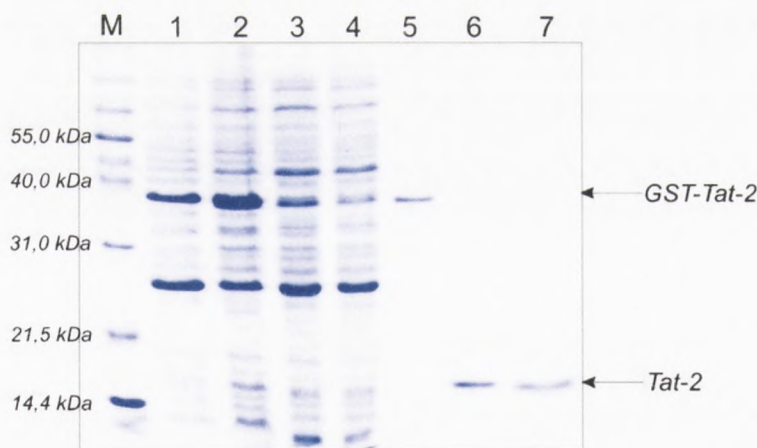
Pomimo zaproponowania w ciągu ostatnich kilkunastu lat licznych protokołów otrzymywania i oczyszczania białek Tat (140;146;252;253) uzyskanie tych białek w dostatecznej ilości, odpowiedniej czystości oraz zdolności do specyficznego wiązania TAR RNA nie jest łatwe. Świadczy o tym chociażby fakt, że rekombinantowe białka Tat-1 i Tat-2 nie były dotychczas obiektami badań strukturalnych i nie jest znana struktura białek Tat ani w formie wolnej ani w postaci kompleksu z TAR RNA. Dostępne dane strukturalne dla białka Tat-1 oparte są o analizę polipeptydu otrzymanego drogą syntezy chemicznej (142;143). Trudności związane z wydajnym otrzymywaniem i uzyskaniem prawidłowego zwinięcia białek Tat hamują postęp w badaniach strukturalnych ich kompleksów. Problemy te wynikają z unikalnych cech budowy białek Tat wirusów HIV-1 i HIV-2, zawierają one bowiem na wąskim obszarze obejmującym około 20 reszt aminokwasowych aż pięć (Tat-1) lub siedem (Tat-2) reszt cysteinowych (136). Prowadzi to do łatwego tworzenia nieprawidłowych wiązań wewnątrz- oraz międzycząsteczkowych, multimeryzacji białka oraz generowania form utlenionych (140;252;253). W rezultacie tych procesów dochodzi do stosunkowo



szybkiej utraty aktywności przez rekombinantowe białka Tat.

Zaplanowane w ramach niniejszej pracy eksperymenty formowania kompleksów TAR-2 RNA z białkiem Tat-2 oraz z Tat-2 i cykliną T1 wymagały równoczesnej dostępności do preparatów białkowych o odpowiedniej czystości i aktywności danego białka. W tym celu dopracowałam stosowany wcześniej w naszej Pracowni (dr M. Olejniczak) protokół otrzymywania rekombinantowego białka Tat-2 oraz na jego podstawie zoptymalizowałam metodę otrzymywania ludzkiej cykliny T1. Pozwoliło mi to na uzyskanie preparatów białkowych o wysokiej jakości, które z powodzeniem zostały wykorzystane w eksperymentach kompleksowania z odpowiednimi cząsteczkami RNA.

Z uwagi na wcześniejsze doświadczenia naszej Pracowni zdecydowałam się na otrzymywanie rekombinantowego białka Tat-2 w oparciu o plazmid pGEX-2T z wklonowanym genem białka Tat-2 (dzięki uprzejmości dr E. Wyszko, IChB PAN). W takim systemie białko Tat-2 ulega ekspresji jako białko fuzyjne z S-transferazą glutationową (GST), której obecność pomaga w oczyszczeniu właściwego produktu białkowego. Nadekspresję białka Tat-2 prowadziłam w bakteriach *E. coli*, z tą istotną różnicą, że stosowany wcześniej w naszej Pracowni szczep *E. coli* BL21(DE3) pLysS zastąpiłam szczepem *E. coli* BL21 - Codon Plus (DE3) – RIL (*Stratagene*). Bakterie tego szczepu zwierają dodatkowe geny różnych tRNA, w tym tRNA<sup>Arg</sup>, co wydaje się szczególnie istotne w przypadku nadekspresji bogatego w argininę białka Tat-2.



**Rysunek V.20.** Etapy procedury nadekspresji i oczyszczania białka Tat-2 kontrolowane metodą elektroforezy w obecności SDS. M-marker masy, 1 - białka *E. coli* przed indukcją IPTG, 2 - białka *E. coli* po indukcji IPTG, 3 - białka frakcji rozpuszczalnej lizatu bakteryjnego przez wiązaniem z sefarozą, 4 - białka frakcji rozpuszczalnej lizatu bakteryjnego po wiązaniu z sefarozą, 5 - białka związane na sefarozie po przemyciu złoza zestawem odpowiednich buforów, 6 - otrzymany preparat białka Tat-2, 7 - preparat białka Tat-2 z odrębnej izolacji, ukazujący powtarzalność jakości uzyskiwanego białka.



Otrzymane białko fuzyjne wiązałam na sefarozie S-glutationowej i poddawałam kolejnym etapom oczyszczania. Ponieważ w eksperymentach kompleksowania nie chciałam stosować fuzyjnego białka Tat – GST, oczyszczone białko fuzyjne poddawałam hydrolizie specyficzną sekwencyjnie proteazą (trombina). Zamiana szczepu bakteryjnego oraz dopracowanie protokołu izolacji i oczyszczania białka Tat-2 pozwoliło na około 200% zwiększenie ilości otrzymywanego białka, o dużo większej czystości niż notowaliśmy uprzednio i posiadającego wysoką aktywność w wiązaniu TAR-2 RNA, która utrzymywała się przez około cztery tygodnie. Bardzo istotny jest również fakt, że otrzymany preparat białka Tat-2 nie posiadał aktywności rybonukleazowej. Z jednej hodowli bakteryjnej w skali 1 litra otrzymywałam około 1 mg białka Tat-2, co jest bardzo satysfakcjonującym wynikiem w porównaniu z danymi literaturowymi (140;252;253).

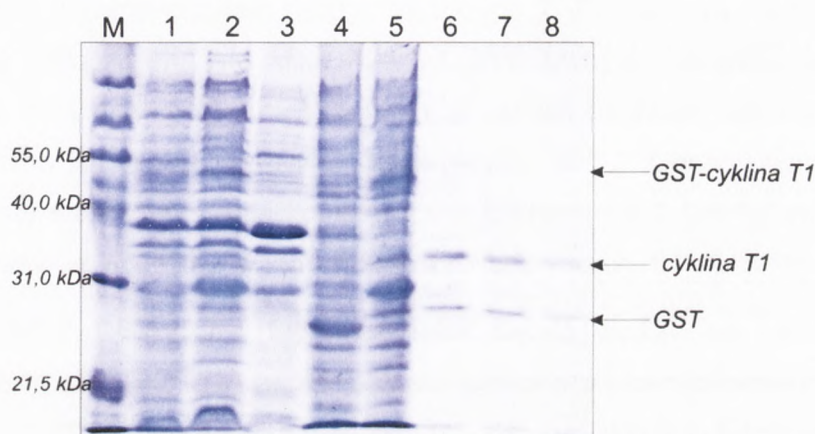
Poszczególne etapy nadekspresji i oczyszczania białka Tat-2 kontrolowałam metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Otrzymane białko Tat-2 migruje na poziomie nieznacznie wyższym niż oczekiwany, odpowiadającym białkom o masie około 15 kDa, podczas gdy masa białka Tat-2 wynosi 11,4 kDa. Wynik ten nie stanowi jednak zaskoczenia, gdyż jest to fakt odnotowany już wcześniej w laboratorium Prof. A. P. Rica'a (Baylor College of Medicine, Houston, Texas), które jest pierwotnym źródłem stosowanego plazmidu zawierającego gen białka Tat-2 (253). Dodatkowo, mgr K. Purzycka zbadała otrzymany preparat białka Tat-2 metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF, która potwierdziła prawidłową masę oraz homogenność otrzymanego preparatu białka Tat-2.

Cyklina T1 jest ludzkim białkiem o długości 726 reszt aminokwasowych, jednak idąc śladem innych laboratoriów, zajmujących się oddziaływaniami cykliny T1 z białkami Tat i TAR RNA, zdecydowałam się wykorzystać w swoich badaniach N-końcowy fragment cykliny T1 o długości 303 reszt aminokwasowych (131;166). Tworzy on konieczną i zarazem wystarczającą domenę dla oddziaływania z białkami Tat i kinazą CDK-9, a tym samym dla *trans*-aktywacji genów HIV (147;166). Dla ułatwienia w dalszej części N-końcową domenę cykliny T1 nazywam po prostu cyklina T1. Ludzką cyklina T1 otrzymałam tą samą metodą, którą opracowałam wcześniej dla otrzymywania białka Tat-2. Istnieją również inne wydajne metody otrzymywania cykliny T1 np. z ekstraktów HeLa (254), czy w systemach translacji *in vitro* (149). Kierowałam się jednak posiadanym już doświadczeniem w otrzymywaniu białek fuzyjnych z GST w systemie *E. coli*. Metoda otrzymywania cykliny T1 jako białka fuzyjnego z GST jest z powodzeniem wykorzystywana przez inne grupy badawcze (131;166;253). Plazmid GST-hCycT1 303 kodujący sekwencję N-końcowego fragmentu ludzkiej cykliny T1 w postaci fuzji z genem GST otrzymano dzięki uprzejmości Prof. Katherine A. Jones z Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, Kalifornia).





W ramach prowadzonych doświadczeń przetestowałam nadekspresję białka, odpowiadającego N-końcowemu fragmentowi ludzkiej cykliny T1, w różnych szczepach bakteryjnych. Ostatecznie wykorzystałam jednak ten sam szczep (*E. coli* BL21 - Codon Plus (DE3) – RIL), który stosowałam dla otrzymania białka Tat-2, gdyż pozwalał on na otrzymanie największej ilości białka o odpowiedniej jakości.



**Rysunek V.21.** Etapy procedury nadekspresji i oczyszczania ludzkiej cykliny T1 kontrolowane metodą elektroforezy w obecności SDS. M-marker masy, 1 - białka *E. coli* przed indukcją IPTG, 2 - białka *E. coli* po indukcji IPTG, 3 - białka frakcji nierozpuszczalnej lizatu bakteryjnego, 4 - białka frakcji rozpuszczalnej lizatu bakteryjnego przez wiązaniem z sefarozą, 5 - białka frakcji rozpuszczalnej lizatu bakteryjnego po wiązaniu z sefarozą, 6 - otrzymany preparat ludzkiej cykliny T1, 7, 8 - kolejne elucje otrzymanego białka ze złoża.

W odróżnieniu od białka Tat-2 w przypadku cykliny T1 nie obserwowałam znaczącej utraty aktywności przy dłuższym przechowywaniu uzyskanego preparatu białkowego. Otrzymany preparat cykliny T1 był za to mniej homogeny i zawierał pewną ilość GST. Nie stanowi to jednak większego problemu gdyż udowodniono eksperymentalnie, że GST nie oddziałuje ani z TAR-2, ani z TAR-1 RNA i nie wpływa na oddziaływanie z białkami Tat (176). Fakt ten potwierdza również, powszechne stosowanie w eksperymentach kompleksowania białek fuzyjnych GST-Tat oraz GST-cyklina T1 (131;147;166;180).

Szczegóły wypracowanych protokołów otrzymywania rekombinantowych białek Tat-2 i cykliny T1 przedstawiłam poniżej w rozdziale VI. MATERIAŁY I METODY.

## 2.2. ANALIZA ODZIAŁYWANIA TAR-2 RNA Z WIRUSOWYM BIAŁKIEM TAT-2

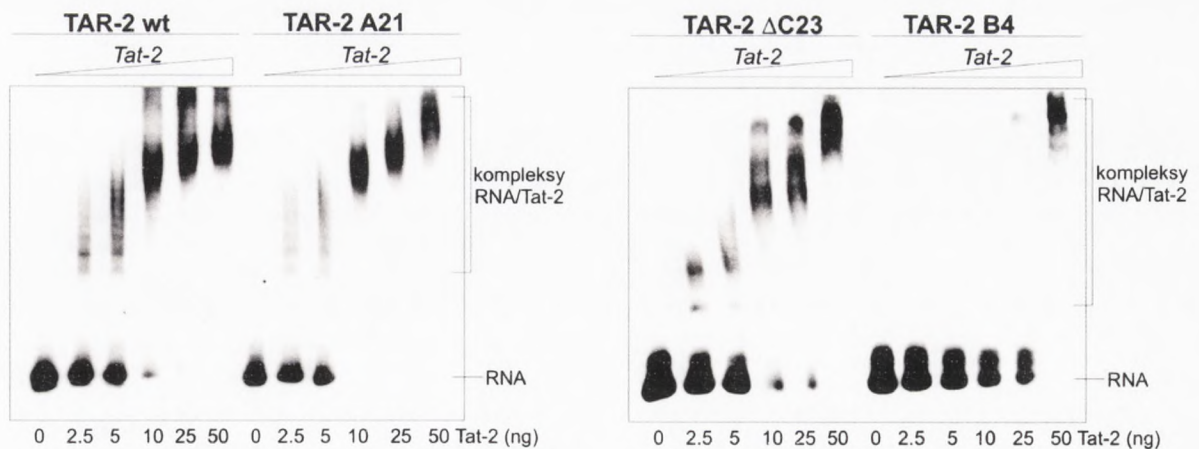
Do analizy oddziaływania TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2 *in vitro* stosowałam metodę opóźnionej migracji kompleksów na żelach natywnych – EMSA (ang. *electrophoretic mobility shift assay*). Elektroforezy prowadzono w niskiej, ściśle kontrolowanej temperaturze żelu, wynoszącej 4°C. W ramach prowadzonych eksperymentów zbadano zdolność do formowania kompleksów z rekombinantowym białkiem Tat-2 dla transkryptu o sekwencji naturalnie występującej domeny TAR-2 (TAR-2 wt) oraz transkryptów mutantów



reprezentujących wydłużoną (TAR-2 A21) lub rozgałęzioną formę TAR-2 (TAR-2  $\Delta$ C23 i TAR-2 B4). Oprócz analizy pełnej długości TAR-2 wt i jego mutantów, zbadano wiązanie białka Tat-2 do oligomerów o sekwencji każdej z trzech spinek rozgałęzionej formy TAR-2 (izolowane spinki I, II i III) oraz do spinki TAR-1 RNA.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że otrzymane, rekombinantowe białko Tat-2 z wysokim powinowactwem wiąże transkrypt TAR-2 wt (rys. V.22). Przy niskim stężeniu białka widocznych było kilka, niezbyt intensywnych kompleksów. Zwiększenie stężenia białka Tat-2 powodowało ich zanik, a w zamian pojawiało się wolniej migrujące, intensywne pasmo kompleksu lub kompleksów RNA z Tat-2. Obserwowany przeze mnie charakterystyczny wzór formowania kompleksów z białkiem Tat-2 jest typowy dla TAR-2 wt i był prezentowany już wcześniej w innych pracach badawczych (87;131;176).

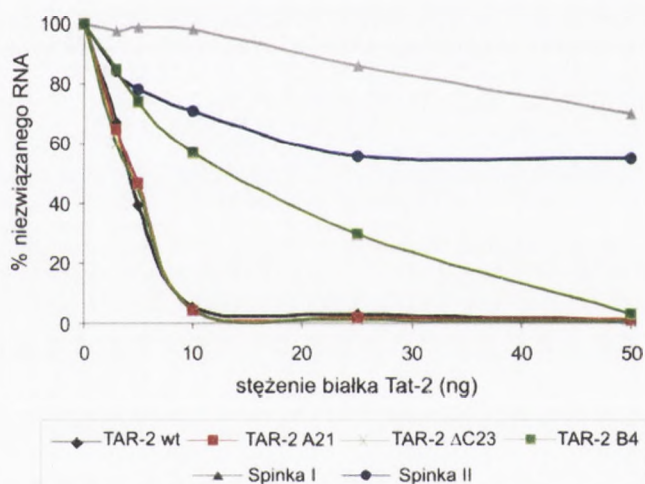
Najistotniejszym wynikiem tego fragmentu badań wydaje się być udowodnienie, że wydłużona forma TAR-2 RNA zdolna jest do formowania kompleksów z białkiem Tat-2 *in vitro* (rys. V.22). Analiza przeprowadzona dla transkryptu TAR-2 A21 wykazała, że wprowadzenie do sekwencji TAR-2 mutacji G21A, uniemożliwiającej formowanie rozgałęzionej struktury trójspinkowej, nie ogranicza zdolności wiązania białka Tat-2. A co więcej, mutant TAR-2 A21 wiąże białko Tat-2 z wydajnością zgodną, a nawet nieznacznie wyższą niż TAR-2 wt (rys. V.23). Obserwowany dla TAR-2 A21 wzór formowania kompleksów jest uderzająco podobny do wzoru typowego dla TAR-2 wt. Formowanie silnych kompleksów z białkiem Tat-2 przez wydłużoną formę TAR-2, która nie posiada w swojej strukturze dwunukleotydowych wybrzuszeń wskazuje, że inne motywy strukturalne, niż tego typu wybrzuszenia, mogą być rozważane jako potencjalne miejsca wiązania białka Tat-2 (255).



**Rysunek V.22.** Analiza procesu formowania oraz obraz migracji kompleksów z wirusowym białkiem Tat-2 dla transkryptów o sekwencji TAR-2 wt oraz TAR-2 A21, TAR-2  $\Delta$ C23 i TAR-2 B4. Wszystkie próby zawierały stałą ilość RNA (znakowanego  $^{32}\text{P}$  na 5' końcu), wobec rosnącego stężenia białka Tat-2, które podano poniżej odpowiednich linii.



Cenne spostrzeżenia wniosła analiza wiązania białka Tat-2 do transkryptów mutantów reprezentujących wyłącznie rozgałęzioną formę TAR-2 (rys. V.22). Podczas gdy mutant TAR-2  $\Delta$ C23 wiązał białko Tat-2 z podobnym powinowactwem jak TAR-2 wt i TAR-2 A21, to w przypadku drugiego mutantu TAR-2 B4 obserwowałam znacząco słabsze oddziaływanie z białkiem Tat-2 (rys. V.23). Zatem stabilizacja rozgałęzionej formy TAR-2 poprzez usunięcie pojedynczej wybrzuszonej reszty C23 nie miała wpływu na wiązanie białka Tat-2, a stabilizacja poprzez wprowadzenie zmian w sekwencji rejonu helikalnego upośledzała zdolność wiązania Tat-2. Powyższy przykład wskazuje jak dużą ostrożność należy zachować przy wprowadzaniu zbyt licznych zmian (tu zamiana czterech reszt nukleotydowych) do naturalnie występujących sekwencji RNA i to nawet w rejonach helikalnych, które nie są uznawane za kluczowe dla analizowanego oddziaływania. Jednocześnie wynik ten, potwierdza słuszność naszej początkowej decyzji o rezygnacji z analizy mutantów TAR-2 stabilizowanych w formie rozgałęzionej przez liczne mutacje (rozdział V.1.2).

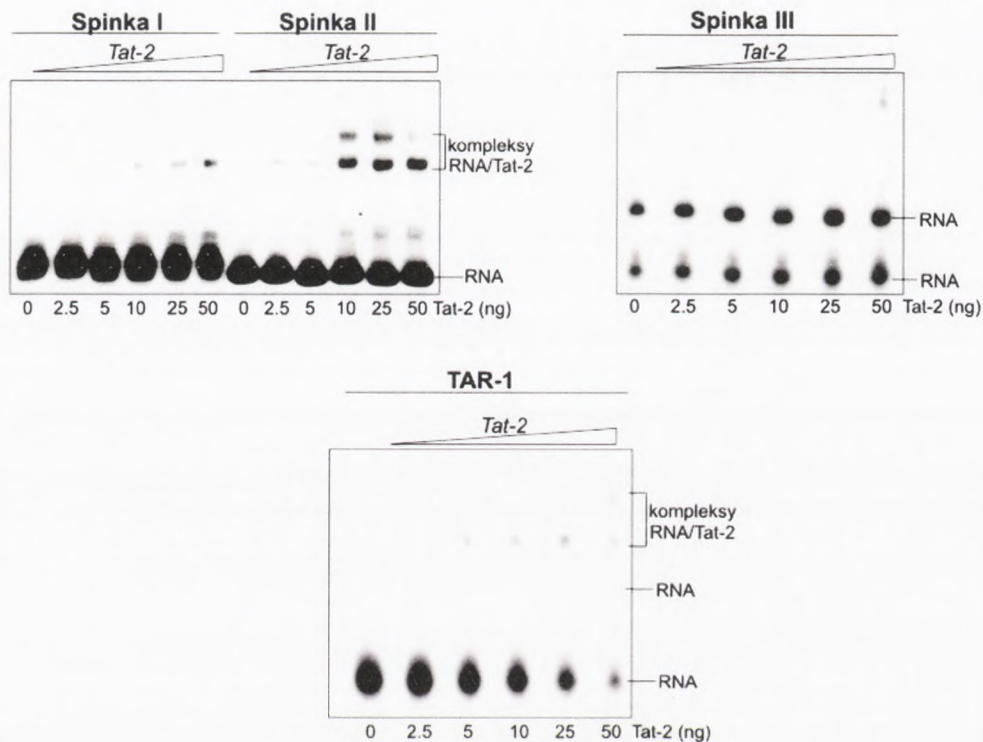


**Rysunek V.23.** Porównanie poziomu zdolności wiązania białka Tat-2 dla transkryptów o sekwencji TAR-2 wt, TAR-2 A21, TAR-2  $\Delta$ C23 i TAR-2 B4 oraz oligorybonukleotydów o sekwencji izolowanych spinek I i II rozgałęzionej formy TAR-2.

Wszystkie opisane dotychczas w literaturze rozważania dotyczące oddziaływania białka Tat-2 z TAR-2 RNA prowadzono w świetle rozgałęzionej, trójspinkowej formy TAR-2. Przy czym spinka I uważana jest powszechnie za kluczową dla *trans*-aktywacji, a tym samym wiązania białka Tat-2, natomiast rola spinki II nie jest do końca jasna. Nie wiadomo również czy spinki te działają jako dwa niezależne motywy, czy też sekwencja obu spinek jest niezbędna do efektywnego wiązania białka Tat-2 (19;175;177;178). W celu sprawdzenia czy spinki I i II rozgałęzionej formy TAR-2 stanowią dwa funkcjonalnie niezależne elementy przeprowadziłam eksperymenty kompleksowania z białkiem Tat-2 oligomerów o sekwencji izolowanej spinki I (+18 - 52) i izolowanej spinki II (+54 - 85).



Takie izolowane spinki wydają się służyć jako dobre modele pojedynczego miejsca wiązania dla białka Tat-2. Dodatkowo postanowiłam zbadać czy wspólna dla obu globalnych form TAR-2 mała spinka od 3' strony, nazwana izolowaną spinką III (+93 - 113), nie oddziałuje z białkiem Tat-2.



**Rysunek V.24.** Analiza procesu formowania oraz obraz migracji kompleksów z wirusowym białkiem Tat-2 dla oligorybonukleotydów o sekwencji izolowanych spinek I, II i III rozgałęzionej formy TAR-2 oraz o sekwencji TAR-1. Wszystkie próby zawierały stałą ilość RNA (znakowanego  $^{32}\text{P}$  na 5' końcu), wobec rosnącego stężenia białka Tat-2, które podano poniżej odpowiednich linii.

Wyniki kompleksowania izolowanych spinek z białkiem Tat-2 były bardzo zaskakujące, okazało się bowiem, że izolowane spinki wiążą białko Tat-2 nieporównywalnie słabiej niż pełnej długości TAR-2 wt oraz TAR-2 A21 i TAR-2  $\Delta\text{C23}$  (rys. V.24). Co więcej, dla izolowanej spinki II, uważanej za mniej istotną dla *trans*-aktywacji (87;175), obserwowałam formowanie silniejszych kompleksów z białkiem Tat-2 niż dla spinki I. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami (19;176), izolowana spinka III nie ma zdolności wiązania białka Tat-2. Słabe wiązanie Tat-2 przez izolowane spinki I i II było porównywalne z wynikiem kompleksowania białka Tat-2 z 29-merem TAR-1 RNA. Większość danych literaturowych pokazuje, że tak jak w naszym przypadku białko Tat-2 wiąże TAR-1, nieporównywalnie słabiej niż TAR-2 (17;19;175).

Przeprowadzone eksperymenty wskazują, że reszty nukleotydowe obejmujące rejon obu spinek (I i II) rozgałęzionej formy TAR-2 są konieczne do wydajnego formowania





kompleksów z białkiem Tat-2. Biorąc pod uwagę rozgałęzioną formę TAR-2 można powiedzieć, że do wiązania białka Tat-2 niezbędne są dwie spinki (I i II). Spinki te nie są funkcjonalnie niezależnymi elementami, gdyż każda z nich osobno bardzo słabo oddziałuje z białkiem Tat-2. W świetle faktu, że wydłużona forma TAR-2 (TAR-2 A21) wykazuje wysokie powinowactwo do wiązania białka Tat-2, być może istotna rola całej sekwencji +18 – 85 (rejon obu spinek) wynika z formowania przez nią głównej spinki wydłużonej formy TAR-2.

Sugeruje się, że obserwowana na żelach retardacyjnych obecność więcej niż jednego kompleksu TAR-2 wt z Tat-2, wynika z formowania przynajmniej dwóch miejsc wiązania dla białka Tat-2 w strukturze TAR-2 RNA. Wykazano, że usunięcie jednego z wybrzuszeń upraszcza obserwowany na żelu wzór formowania kompleksów TAR-2 / Tat-2 (87;176). Jednak w przeprowadzonych przeze mnie eksperymentach obserwowałam przynajmniej dwa kompleksy także podczas wiązania białka Tat-2 do izolowanych spinek I i II oraz TAR-1 RNA, a jak wiadomo każda z tych cząsteczek posiada tylko jedno miejsce potencjalnego oddziaływania z białkiem Tat-2 (87;138;175;177). Zatem ilość potencjalnych miejsc wiązania białka nie przekłada się, w prosty sposób na ilość obserwowanych na żelu kompleksów. Ponieważ nie do końca wiadomo czy białko Tat-2 oddziałuje z TAR-2 RNA jako monomer czy jako multimer, a może i jedno i drugie, to obecność więcej niż jednego kompleksu dla TAR-2 wt, jego mutantów, izolowanych spinek I i II oraz TAR-1 może wynikać z tego właśnie faktu. Poza tym nie można wykluczyć, że chociaż otrzymany preparat białka Tat-2 wydaje się być homogenny, to może on ulegać częściowej degradacji (np. utlenieniu) i analizowane cząsteczki RNA oddziałują zarówno z prawidłowym białkiem Tat-2, jak i jego mniej aktywnymi formami.

### 2.3. ANALIZA ODZIAŁYWANIA TAR-2 RNA Z WIRUSOWYM BIAŁKIEM TAT-2 I LUDZKĄ CYKLINĄ T1

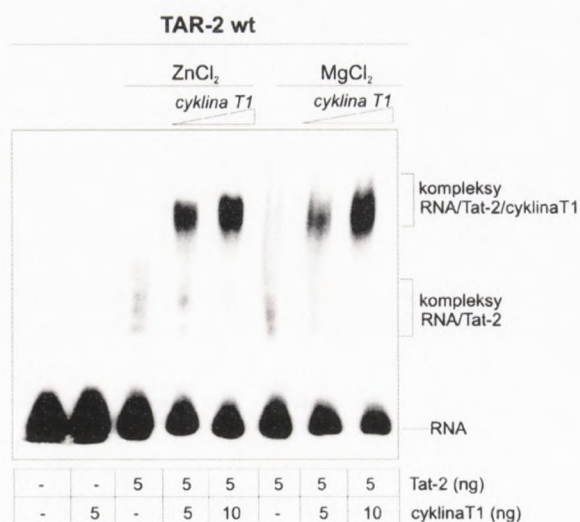
Pomimo, że badania oddziaływania TAR RNA z białkiem Tat wnoszą wiele cennych informacji, pełne poznanie oddziaływania *in vitro* TAR z białkami istotnymi dla *trans*-aktywacji wymaga analizy formowania kompleksów trójskładnikowych TAR / Tat / cyklina T1. Wynika to z kilku faktów. Po pierwsze, najprawdopodobniej *in vivo* u obu wirusów HIV białko Tat oddziałuje z TAR RNA dopiero po uformowaniu kompleksu Tat / cyklina T1 (12;13;166;180). Po drugie, zarówno u HIV-1 jak i HIV-2 wykazano, że sekwencje TAR RNA istotne dla oddziaływania z białkiem Tat *in vitro*, nie są do końca zgodne z tymi, które wymagane są dla efektywnej *trans*-aktywacji *in vivo*. Natomiast sekwencje TAR istotne dla oddziaływania *in vitro* z kompleksem Tat / cyklina T1 są takie same jak te, które wymagane są do efektywnej *trans*-aktywacji (131;147;180). Po trzecie, w przypadku wirusa HIV-1 udowodniono, że oddziaływanie cykliny T1 z białkiem Tat-1 zmienia w istotny sposób jego konformację i białko Tat-1 w kompleksie z cykliną T1 oddziałuje nie tylko z rejonem

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data. The second part of the document provides a detailed breakdown of the financial data, including a list of all accounts and their respective balances. It also includes a summary of the total assets and liabilities, which shows that the organization is in a financially sound position. The final part of the document discusses the future outlook and the steps that will be taken to ensure continued growth and success. It highlights the organization's commitment to innovation and excellence in all aspects of its operations.

wybrzuszenia spinki TAR-1, ale także z jej pętlą apikalną (181;182).

Niewiele wiadomo na temat aspektów strukturalnych oddziaływania TAR-2 z kompleksem Tat / cyklina T1. Na podstawie analizy mutantów TAR-2 ustalono jedynie, że dla oddziaływania z tym kompleksem istotne są rejony wybruszeń i pętli apikalnych dwóch pierwszych spinek TAR-2 (według akceptowanej dotychczas formy rozgałęzionej). Mutacje w wybrzuszeniach hamowały oddziaływanie z białkiem Tat-2 oraz z kompleksem Tat-2 / cyklina T1. Natomiast mutacje w pętlach apikalnych silnie zaburzały oddziaływanie TAR-2 z kompleksem Tat-2 / cyklina T1, za to nie miały wpływu na oddziaływanie z białkiem Tat-2 (131).

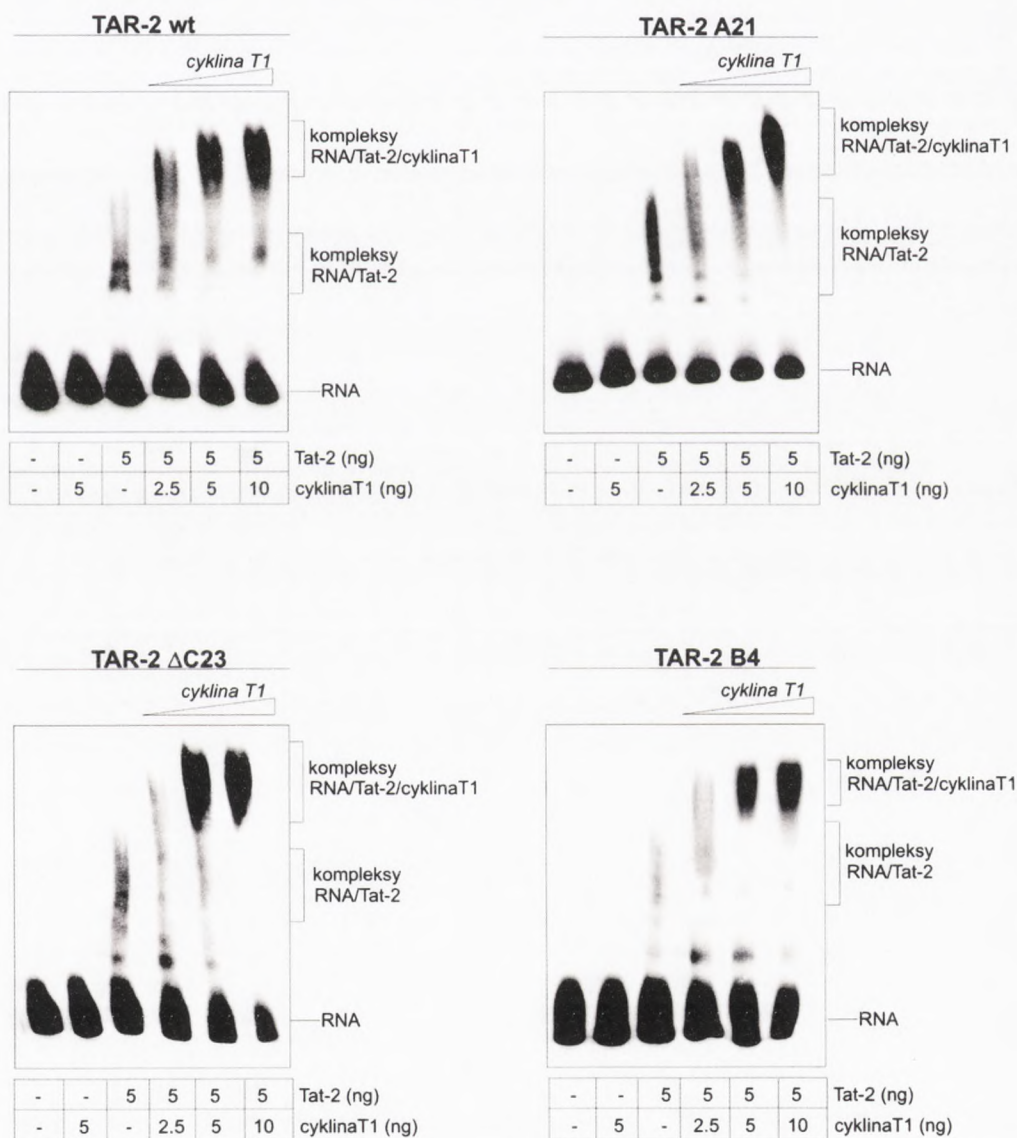
Analizę oddziaływania *in vitro* TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2 i N-końcową domeną ludzkiej cykliny T1 (nazywaną cykliną T1) przeprowadziłam w oparciu o metodę EMSA (ang. *electrophoretic mobility shift assay*). Elektroforezy prowadzono w niskiej, ściśle kontrolowanej temperaturze żelu (4°C). Zdolność do formowania trójskładnikowych kompleksów RNA / Tat-2 / cyklina przebadano dla TAR-2 wt i wszystkich analizowanych w ramach pracy mutantów TAR-2, a także dla oligorybonukleotydów o sekwencji izolowanych spinek I i II. W standardowo opisywanych procedurach formowania kompleksów TAR / Tat-2 / cyklina T1 do buforu, w którym prowadzi się asocjację dodawane są jony  $Zn^{2+}$  lub  $Mg^{2+}$  (131;147;166;184) Przeprowadziłam testowe eksperymenty mające na celu zbadanie wpływu każdego z tych jonów na proces asocjacji. W obecności jonów  $Zn^{2+}$  silny kompleks TAR / Tat-2 / cyklina T1 był obserwowany przy niższym stężeniu cykliny T1 (rys. V.25). W związku z tym zdecydowałam się na stosowanie buforu zawierającego  $ZnCl_2$ . Ważny był dla mnie również fakt, że już dawno wykazano istotne znaczenie jonów  $Zn^{2+}$  w oddziaływaniach białek Tat z cykliną T1 (147).



**Rysunek V.25.** Porównanie kompleksów TAR-2 wt / Tat-2 / cyklina T1 formowanych w buforach zawierających  $ZnCl_2$  lub  $MgCl_2$ . Wszystkie próby zawierały stałą ilość RNA (znakowanego  $^{32}P$  na 5' końcu). Ilość białka Tat-2 i cykliny T1 podano poniżej obrazu żelu.



Ponadto przetestowałam dwie alternatywne metody formowania kompleksów TAR / Tat / cyklina. W jednej z nich najpierw tworzony jest kompleks Tat / cyklina T1, a dopiero potem dodawany jest odpowiedni RNA. W drugiej metodzie przeprowadza się jednoczesną asocjację analizowanego RNA z obydwojema białkami. Ponieważ w przypadku obu metod otrzymywałam takie same wyniki, zdecydowałam się na stosowanie drugiej metody. W odróżnieniu od oddziaływania TAR-1 / Tat-1, białko Tat-2 *in vitro* wiąże TAR-2 silnie nawet bez udziału cykliny T1 i obecność silnych plam kompleksów z Tat-2 utrudnia ich odróżnienie od kompleksów RNA / Tat / cyklina T1. W związku z tym eksperymenty kompleksowania wymagały stosowania małej ilości białka Tat-2.

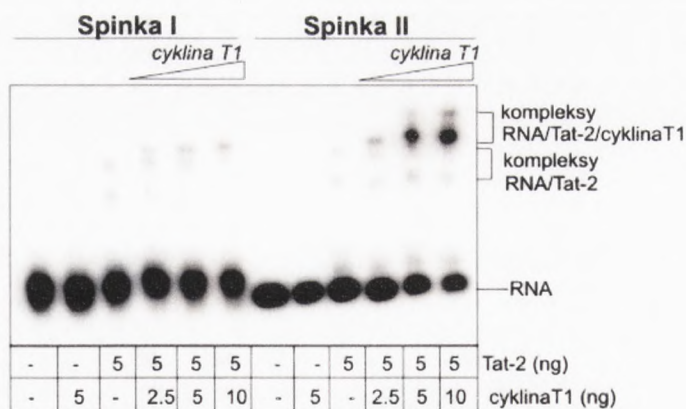


**Rysunek V.26.** Analiza procesu formowania oraz obraz migracji kompleksów z wirusowym białkiem Tat-2 i ludzką cykliną T1 dla transkryptów o sekwencji TAR-2 wt oraz TAR-2 A21, TAR-2 ΔC23 i TAR-2 B4. Wszystkie próby zawierały stałą ilość RNA (znakowanego <sup>32</sup>P na 5' końcu), ilość białka Tat-2 oraz cykliny T1 podano poniżej obrazów żeli.



W przeprowadzonych eksperymentach silny kompleks RNA / Tat / cyklina T1 obserwowany był nie tylko dla TAR-2 wt, ale i dla wszystkich jego mutantów i to nawet w przypadku słabo wiążącego białko Tat-2 mutanta TAR-2 B4 (rys.V.26). Zatem obie globalne formy TAR-2, nie tylko wiążą białko Tat-2, ale także zdolne są do specyficznego oddziaływania z kompleksem Tat-2 / cyklina T1. Natomiast cyklina T1 bez udziału białka Tat-2 nie tworzyła kompleksów z żadną z analizowanych cząsteczek RNA. Przeprowadzone analizy wskazują, zgodnie z wcześniejszymi danymi literaturowymi (131;181;182;197), że cyklina T1 wyraźnie wzmacnia oddziaływanie TAR-2 RNA z białkiem Tat, ponadto jeśli cyklina T1 bezpośrednio oddziałuje z którymś z rejonów TAR-2 RNA to następuje to dopiero po uformowaniu kompleksu Tat-2 / cyklina T1.

Izolowane spinki I (35-mer) i II (32-mer) rozgałęzionej formy TAR-2 wiążą kompleksy Tat-2 / cyklina T1 nieporównywalnie słabiej niż pełnej długości TAR-2 wt oraz jego mutanty (rys. V.27). Przy czym analogicznie jak w przypadku asocjacji izolowanych spinek z białkiem Tat-2, spinka II silniej oddziałuje z kompleksem Tat-2 / cyklina T1. Do wydajnego oddziaływania z analizowanymi białkami konieczny jest więc rejon obejmujący sekwencję obu spinek (+18 – 85). Ponieważ obie globalne formy TAR-2 zdolne są do efektywnego oddziaływania z kompleksem Tat-2 / cyklina T1, uzyskane wyniki wskazują, że w rozgałęzionej formie TAR-2 do wydajnego formowania kompleksów niezbędna jest obecność dwóch spinek (I i II). Natomiast, w wydłużonej formie TAR-2 istotna rola całej sekwencji +18 – 85 wynika najprawdopodobniej z formowana przez nią głównej spinki wydłużonej formy TAR-2.



**Rysunek V.27.** Analiza procesu formowania oraz obraz migracji kompleksów z wirusowym białkiem Tat-2 i ludzką cyklina T1 dla transkryptów o sekwencji izolowanej spinek I i II. Wszystkie próby zawierały stałą ilość RNA (znakowanego  $^{32}\text{P}$  na 5' końcu). Ilość białka Tat-2 oraz cykliny T1 podano poniżej obrazu żelu.





W rozgałęzionej formie TAR-2 jako miejsca kluczowe dla oddziaływania z samym białkiem Tat-2 oraz w kompleksie cyklina T1 wskazywane są dwunukleotydowe wybrzuszenia dwóch pierwszych spinek. Proponuje się, że po związaniu kompleksu Tat / cyklina T1 do wybrzuszenia danej spinki każde z białek oddziałuje dodatkowo z rejonem jej pętli apikalnej (131). Zakładając, że reszty nukleotydowe tych motywów strukturalnych, są faktycznie kluczowe dla analizowanych oddziaływań, to w wydłużonej formie TAR-2 niesparowane, a tym samym dostępne dla oddziaływań z białkami, są tylko rejony odpowiadające wybrzuszeniu i pętli apikalnej spinki pierwszej. Wynik otrzymany dla mutanta TAR-2 A21 ustabilizowanego w formie wydłużonej sugeruje, że struktura motywów RNA, z którymi oddziałuje analizowany kompleks może być także inna. Najprawdopodobniej w wydłużonej formie TAR-2 białko Tat-2 samo lub w kompleksie z cyklina T1 wiąże się najpierw do wewnętrznej pętli obejmującej resztę U27U28, a następnie oba białka kompleksu oddziałują z charakteryzującym się dużą dynamiką strukturalną, rejonem bogatym w reszty G, odpowiadającym pętli apikalnej I spinki formy rozgałęzionej.

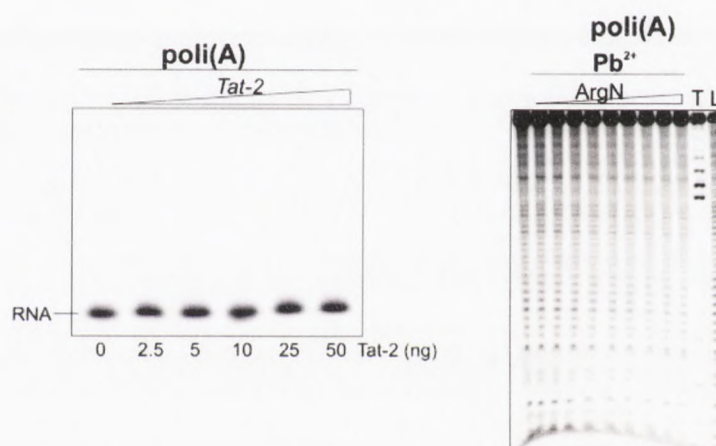
Podsumowując należy stwierdzić, że ostateczne rozstrzygnięcie, która z form TAR-2 odgrywa kluczową rolę w procesie *trans*-aktywacji wymaga jednak potwierdzenia w eksperymentach *in vivo*. Nie bez znaczenia jest też fakt, że wirus HIV-1 replikuje efektywnie z jedną tylko spinką TAR, czemu więc miałyby służyć zduplikowanie tej struktury u wirusa HIV-2?

#### 2.4. ANALIZA WIĄZANIA AMIDU ARGININY DO TAR-2 RNA

Kluczowa dla oddziaływania TAR RNA z białkiem Tat jest pojedyncza reszta argininy w rejonie zasadowym białka Tat, a związanie cząsteczki amidu argininy do TAR-1 RNA wywołują taką samą rearanżację strukturalną, jak związanie białka Tat-1 (171;174;256). Z tego powodu oddziaływanie TAR / Tat jest często upraszczane do oddziaływania TAR / amid argininy. Szczególnie często podejście to jest wykorzystywane w badaniach NMR, znana jest na przykład ustalona metodami NMR struktura TAR-1 RNA z amidem argininy (126;256;257) oraz chimerycznej struktury TAR-1 z spinką I TAR-2 (132-134). Oddziaływanie RNA z amidem argininy można również analizować wykorzystując techniki biochemiczne, na przykład metodę cięć indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$  (127). Związanie amidu argininy wpływa na intensywność cięć, indukowanych w analizowanej cząsteczce RNA. W badaniach prowadzonych w naszej Pracowni wykazano, że związanie amidu argininy do TAR-1 RNA, powoduje inhibicję specyficznych cięć jonami  $Pb^{2+}$  w rejonie trójnukleotydowego wybrzuszenia UCU, uznawanego za miejsce wiązania białka Tat (127).



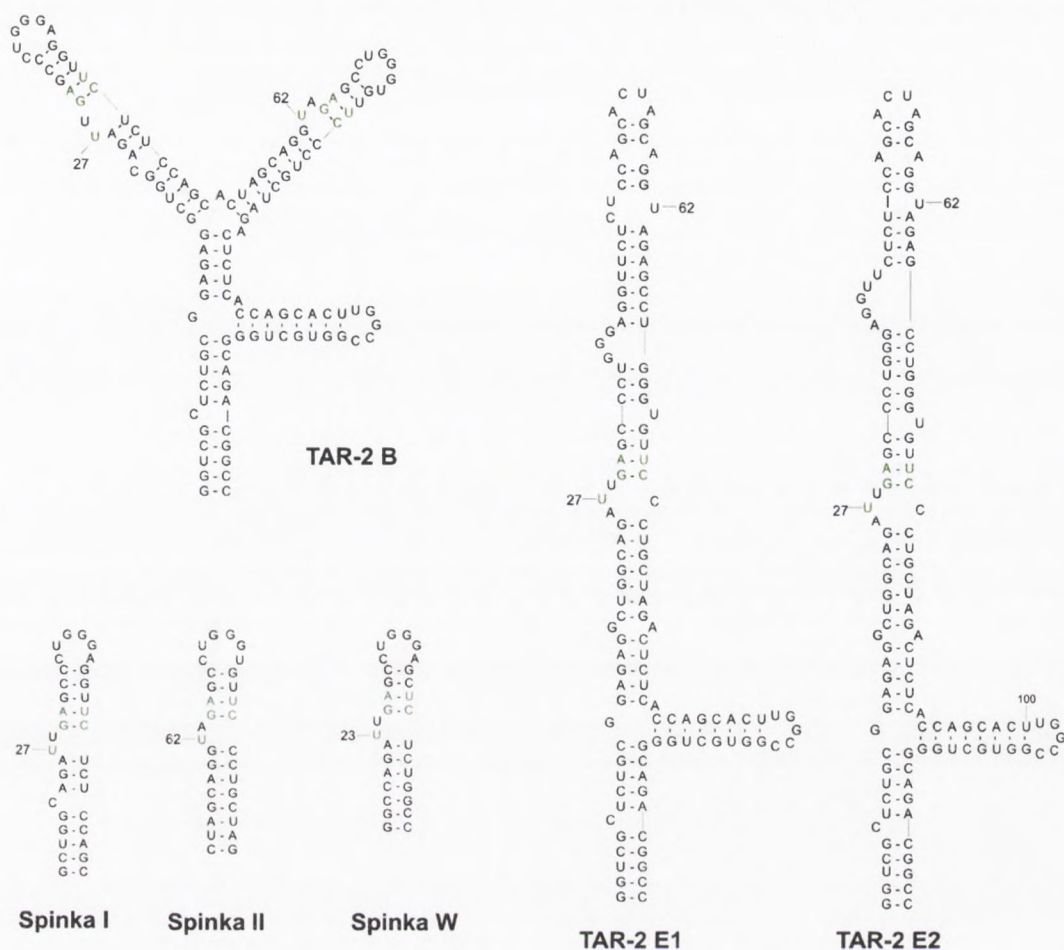
W ramach niniejszej pracy analizowałam oddziaływanie amidu argininy z transkryptem o sekwencji naturalnie występującego 123-meru TAR-2, jego mutantu TAR-2 A21, jak również oligorybonukleotydów, reprezentujących izolowaną I lub II spinkę rozgałęzionej formy TAR-2. W tym celu zbadalam wpływ amidu argininy na intensywność specyficznych cięć RNA indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$ . Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone przy stałym 2 mM stężeniu  $Pb(OAc)_2$ , wobec wzrastającego stężenia amidu argininy. Jako cząsteczkę referencyjną wykorzystałam transkrypt 60-meru o sekwencji domeny poli(A) (+125 – 185), ponieważ ten fragment rejonu liderowego nie oddziałuje z bogatym w argininę białkiem Tat-2. Przeprowadzone eksperymenty (rys. V.28) potwierdziły, że izolowana domena poli(A) RNA, nie tworzy *in vitro* żadnych kompleksów z białkiem Tat-2. Analogicznie, wzrastające stężenie amidu argininy nie miało wpływu na cięcia indukowane jonami  $Pb^{2+}$  w transkrypcie poli(A).



**Rysunek V.28.** Analiza procesu formowania kompleksów z wirusowym białkiem Tat-2 przez transkrypt o sekwencji domeny poli(A) – panel lewy. Wszystkie próby zawierały stałą ilość RNA wobec rosnącego stężenia białka Tat-2. Panel prawy - wpływ amidu argininy (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM) na cięcia indukowane jonami  $Pb^{2+}$  (2 mM  $Pb(OAc)_2$ ) w transkrypcie poli(A).

W trójspinkowej strukturze TAR-2 za miejsca wiązania białka Tat-2 uznawane są dwunukleotydowe wybrzuszenia U27U28 i U62U63 spinek I i II, odpowiednio (87;131). W przypadku 123-meru TAR-2 wt wzrastające stężenie amidu argininy powodowało silną inhibicję cięcia jonami  $Pb^{2+}$  reszty U27 (wybrzuszenie spinki I), natomiast cięcie reszty U62 (wybrzuszenie spinki II) nie podlega inhibicji, a wręcz odwrotnie silnemu wzmocnieniu (rys. V.30). Zupełnie przeciwny efekt obserwowany dla dwóch wybrzuszeń, z których każde stanowi potencjalne miejsce wiązania białka Tat-2 jest bardzo zaskakujący. Tym bardziej, że każde z nich zawiera charakterystyczny układ reszt nukleotydowych (rys. V.29) uznawanych, na podstawie badań NMR, za motyw wiążący amid argininy w strukturze TAR-1 oraz w spince będącej chimerą TAR-1 ze spinką pierwszą TAR-2 – patrz opisana poniżej spinaka W (132;133;174;257).

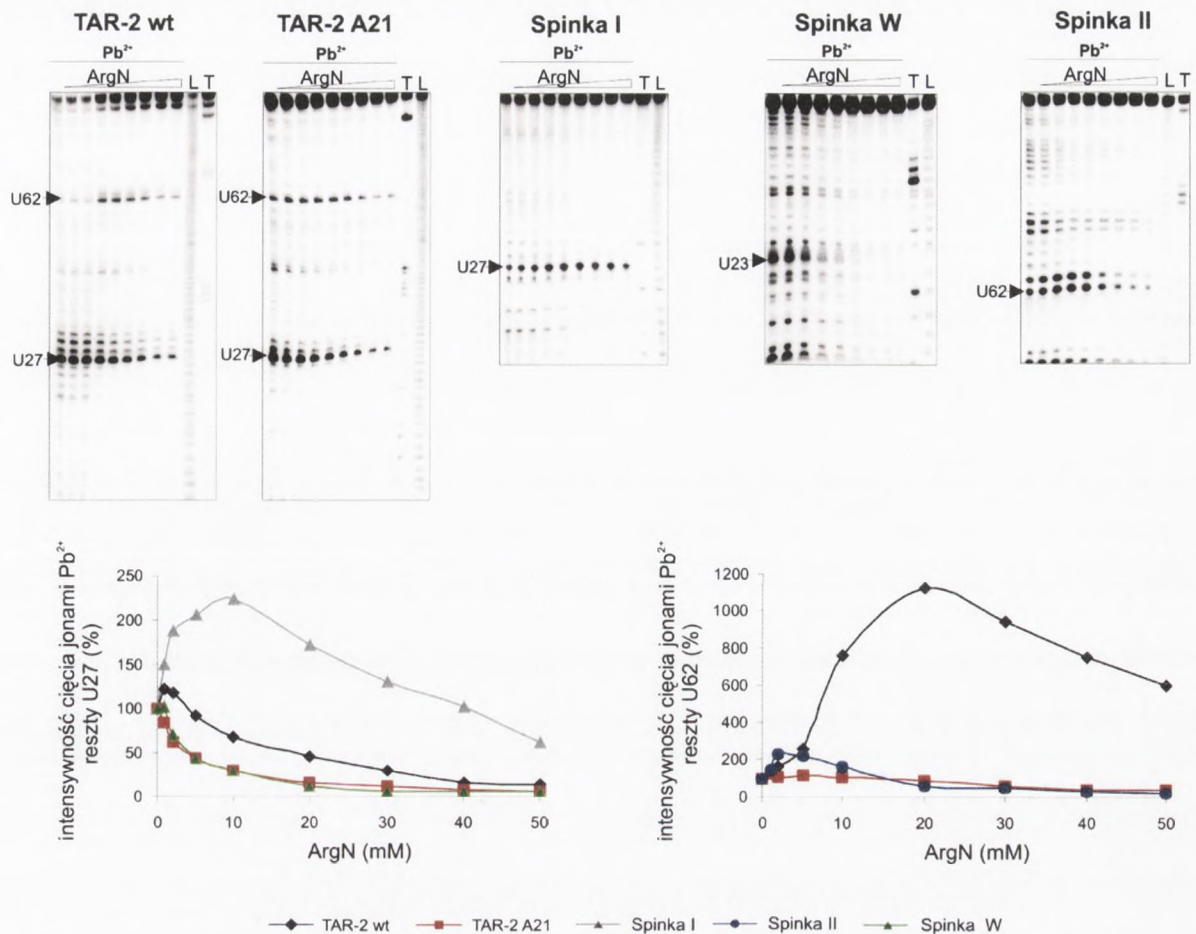




**Rysunek V.29.** Potencjalne miejsca wiązania amidu arginy w strukturze TAR-2 wt, izolowanych spinek I i II oraz w spine W. Kluczowe reszty nukleotydowe motywu wiążącego oznaczono kolorem zielonym. Dla TAR-2 wt pokazano potencjalne miejsca wiązania amidu arginy w strukturze obu form globalnych, rozgałęzionej (B) i wydłużonej (konformery E1 i E2).

Rozpatrując rozgałęzioną (B) strukturę TAR-2 można zaproponować przynajmniej dwa wyjaśnienia otrzymanego wyniku. Po pierwsze, być może tylko pierwsze wybrzuszenie stanowi miejsce wiązania amidu arginy, a tym samym białka Tat, po drugie związanie amidu arginy wywołuje zupełnie inną rearanżację strukturalną w każdym z wybrzuszeń. Analizując powyższy wynik w świetle budowy wydłużonych konformerów (E1 i E2) TAR-2 RNA należy podkreślić, że reszty nukleotydowe U27U28 i U62A62 usytuowane są w odmiennych motywach strukturalnych. Tylko jeden z tych motywów zawiera układ reszt nukleotydowych uważanych za motyw wiążący amid arginy i tworzą go niesparowana reszta U27, usytuowana w wewnętrznej pętli oraz sąsiadujące z nią bezpośrednio pary zasad G29 - C77 i A30 - U76 (rys. V.29). Choć struktura tego motywu nie jest dokładnie taka sama jak w przypadku TAR-1 czy spinek I i II (wewnętrzna pętla zamiast wybrzuszenia), to wyniki otrzymane z analizy zmutowanego transkryptu TAR-2 A21 potwierdziły, że tego typu motyw strukturalny może stanowić miejsce wiązania amidu arginy – rosnące stężenie amidu arginy powodowało silną inhibicję cięcia reszty U27 (rys. V.30).



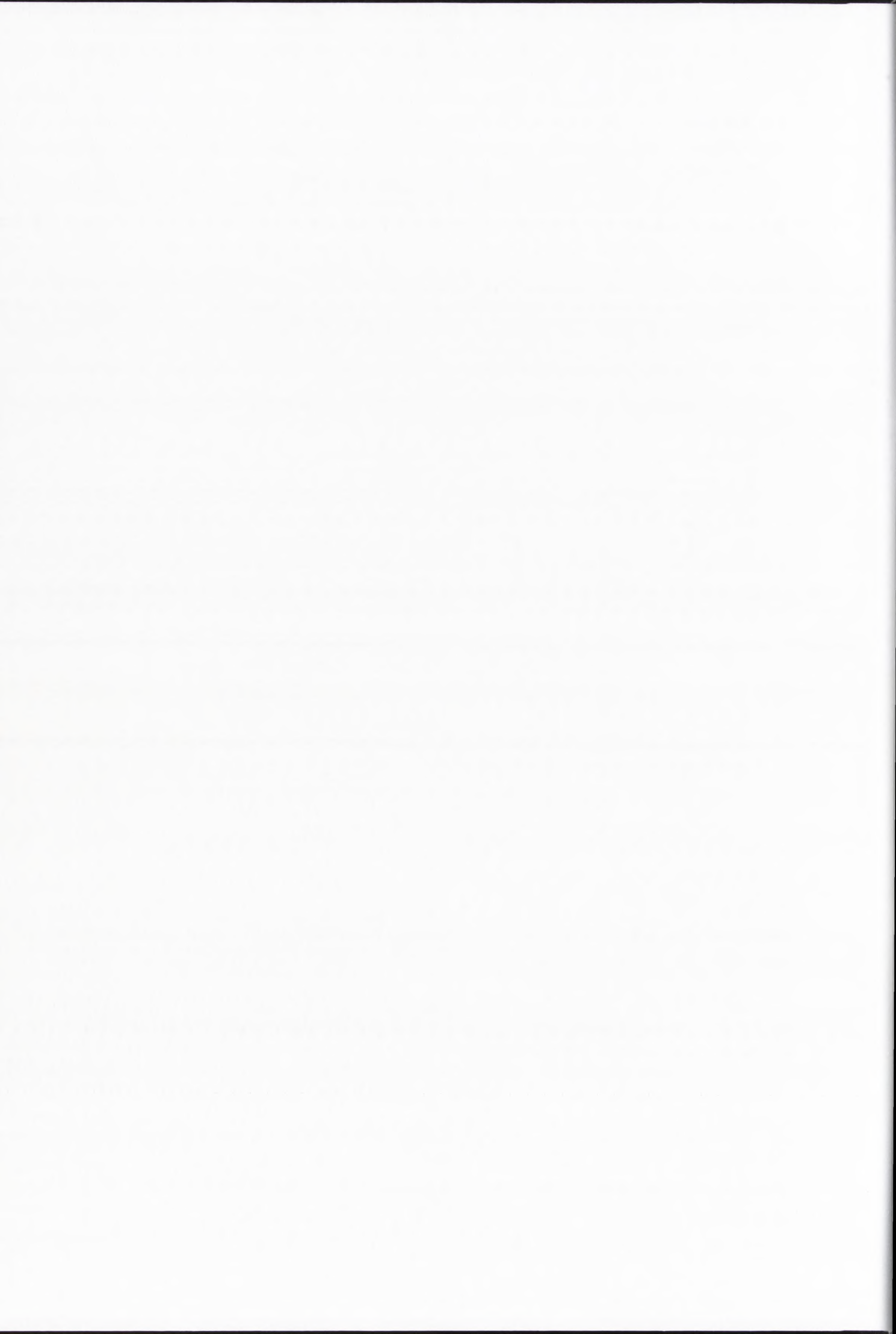


**Rysunek V.30.** Porównanie wpływu amidu argininy (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM) na cięcia indukowane w obecności jonów Pb<sup>2+</sup> w pozycji U27 i U62. Analizę przeprowadzono dla transkryptów o sekwencji TAR-2 wt, TAR-2 A21, izolowanych spinek I i II oraz dla spinki W. Wszystkie reakcje przeprowadzono przy stałym 2mM stężeniu Pb(OAc)<sub>2</sub>.

Wpływ amidu argininy na cięcia indukowane jonami Pb<sup>2+</sup> w pozycji U62 nie jest łatwy do wyjaśnienia. Reszta ta ulokowana jest inaczej w obu globalnych formach TAR-2, a także w wydłużonych konformerach E1 i E2. Dla TAR-2 A21, zamiast widocznego dla TAR-2 wt silnego wzmocnienia cięcia, prawie nie obserwowano wpływu amidu argininy na cięcie reszty U62 (rys. V.30). Zatem wydaje się, że efekt obserwowany dla reszty U62 transkryptu TAR-2 wt nie jest związany z występowaniem wydłużonej formy domeny TAR-2. Jak dotychczas nie udało mi się w pełni wyjaśnić rezultatów obserwowanych dla TAR-2 wt, nie można jednak wykluczyć, że wynikają one z sekwencyjnego wiązania amidu argininy do tak złożonej struktury jak domena TAR-2.

Dane uzyskane z analizy wiązania amidu argininy dla pełnej długości transkryptu TAR-2 wt, porównałam z wynikami analogicznych eksperymentów przeprowadzonych dla izolowanych spinek I (35-mer) i II (32-mer). W odróżnieniu od 123-meru TAR-2 wt, w przypadku izolowanej spinki I nie obserwowałam hamującego wpływu amidu argininy na indukowane jonami Pb<sup>2+</sup> cięcia reszty U27 (rys. V.30). Wynik ten był dla mnie tym bardziej





zaskakujący, że znana jest ustalona metodami NMR struktura oligomeru nazwanego spinką pierwszą TAR-2 w kompleksie z amidem argininy (132-134). Jednak dokładny ogląd tego oligomeru wykazał, że jego sekwencja nie odpowiada pierwszej spince rozgałęzionej formy TAR-2, lecz jest to TAR-1 RNA z dwunukleotydowym wybrzuszeniem UU, charakterystycznym dla pierwszej spinki TAR-2 (rys. V.29). Tą chimeryczną strukturę nazwaliśmy spinką W (od J. R. Williamson, autora struktury NMR). Postanowiłam sprawdzić, jaki będzie wpływ amidu argininy na indukowane jonami  $Pb^{2+}$  cięcie oligorybonukleotydu o sekwencji spinki W. Tak jak można było oczekiwać, w przypadku tej struktury rosnące stężenie amidu argininy, powoduje silną inhibicję cięć jonami  $Pb^{2+}$  w rejonie wybrzuszenia UU. Utwierdziło mnie to w przekonaniu, że wynik otrzymany dla izolowanej spinki I jest prawidłowy, a użyta metoda analizy słuszna.

Zupełnie inny wynik otrzymany dla oligomeru o sekwencji zgodnej z pierwszą spinką TAR-2 (izolowana spinka I) i oligomeru o sekwencji spinki W, rodzi pytanie czy taką chimeryczną strukturę można traktować jako analogiczną z spinką I TAR-2 RNA? Spinka W i spinka I rozgałęzionej formy TAR-2 mają identyczne pętle apikalne i wybrzuszenia, a różnica między nimi tkwi w rejonach dwuniciowych, których jak wykazują powyższe rezultaty nie można traktować zamiennie. W tym miejscu należy wspomnieć ustabilizowany w rozgałęzionej formie mutant TAR-2 B4 w przypadku, którego mutacje wprowadzone w rejonach helikalnych również miały istotny wpływ na właściwości tej cząsteczki RNA. Wynik uzyskany dla izolowanej spinki I wskazuje, że pomimo ogólnego podobieństwa strukturalnego do TAR-1, nie wiąże ona amidu argininy, a tym samym nie powinna wiązać białka Tat-2. Przedstawione w rozdziale V.2.2. wyniki eksperymentów formowania *in vitro* kompleksów RNA / białko w pełni dowodzą, że izolowana spinka I bardzo słabo oddziałuje z białkiem Tat-2.

Podobne porównanie jak dla reszty U27 zostało przeprowadzone dla reszty U62. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że tak jak w przypadku reszty U27, wpływ amidu argininy na cięcie jonami  $Pb^{2+}$  reszty U62, jest inny dla 123-meru TAR-2 wt i dla izolowanej spinki II. Wzrastające stężenie amidu argininy powodowało inhibicję cięcia reszty U62 izolowanej spinki II, natomiast dla 123-meru TAR-2 wt obserwowałam silne wzmocnienie intensywności cięcia. Wynik wiązania amidu argininy do izolowanej spinki II jest zgodny z wcześniejszą obserwacją wskazującą, że choć obie izolowane spinki słabo wiążą Tat-2, to w spinka II formuje wyraźnie silniejsze kompleksy z tym białkiem. Jednocześnie należy podkreślić, że dla inhibicji cięcia reszty U62 izolowanej spinki II, konieczne było jednak dużo wyższe stężenie amidu argininy, niż dla opisanych powyżej inhibicji cięć w pozycji U27 TAR-2 wt i TAR-2 A21. Analogicznie do tej obserwacji, izolowana spinka II wyraźnie słabiej oddziałuje z białkiem Tat-2 niż TAR-2 wt i TAR-2 A21.



Podsumowując należy stwierdzić, że wpływ amidu argininy na cięcia indukowane jonami  $Pb^{2+}$ , zależy od globalnej konformacji całej analizowanej cząsteczki RNA. Na oddziaływanie amidu argininy z określoną resztą nukleotydową wpływa jej umiejscowienie czy to w izolowanej spince czy też w pełnej długości TAR-2. Zatem o zdolności wiązania amidu argininy przez dany rejon, o określonej sekwencji, decyduje cały szereg oddziaływań wyższego rzędu, które nie występują w izolowanych spinkach, ale są obecne w pełnej długości TAR-2 RNA.

Otrzymane wyniki wskazują, że nie tylko rozgałęziona, ale i wydłużona forma TAR-2 RNA wiąże specyficznie amid argininy. W obu formach główne miejsce wiązania przypada w rejonie reszty nukleotydowej U27, czyli w miejscu uznawanym za kluczowe dla oddziaływania z białkiem Tat-2 (87;176). W rozgałęzionej formie TAR-2 reszta U27 jest jedną z reszt dwunukleotydowego wybrzuszenia UU pierwszej spinki. W formie wydłużonej U27 posadowiona jest w wewnętrznej pętli i wspólnie z sąsiadującymi z nią resztami nukleotydowymi, wydaje się stanowić miejsce wiązania amidu argininy, a tym samym najprawdopodobniej miejsce wiązania białka Tat-2.

Ponadto warto dodać, że w badaniach opartych o selekcję *in vitro* wykazano, iż bogate w pirymidyny wewnętrzne pętle, wiążą białko Tat-2 lepiej, niż dwunukleotydowe wybrzuszenia (255). Analiza wiązania amidu argininy potwierdza wyniki eksperymentów formowania kompleksów RNA / białko Tat-2 i obie metody zgodnie wskazują, że pozbawione dwunukleotydowych wybrzuszeń, wydłużone konformery TAR-2, mogą wiązać białka bogate w argininę, takie jak Tat.



## VI. PODSUMOWANIE

W mojej pracy doktorskiej przeprowadziłam szczegółową analizę struktury drugorzędowej domeny TAR RNA wirusa HIV-2 oraz zbadalam jej oddziaływania z jonami metali. Znaczącą część pracy poświęciłam na badania oddziaływań TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2 i ludzką cykliną T1, a także z amidem argininy, jako uproszczonym modelem białka Tat.

Poniżej przedstawiam zwięzłe podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej.

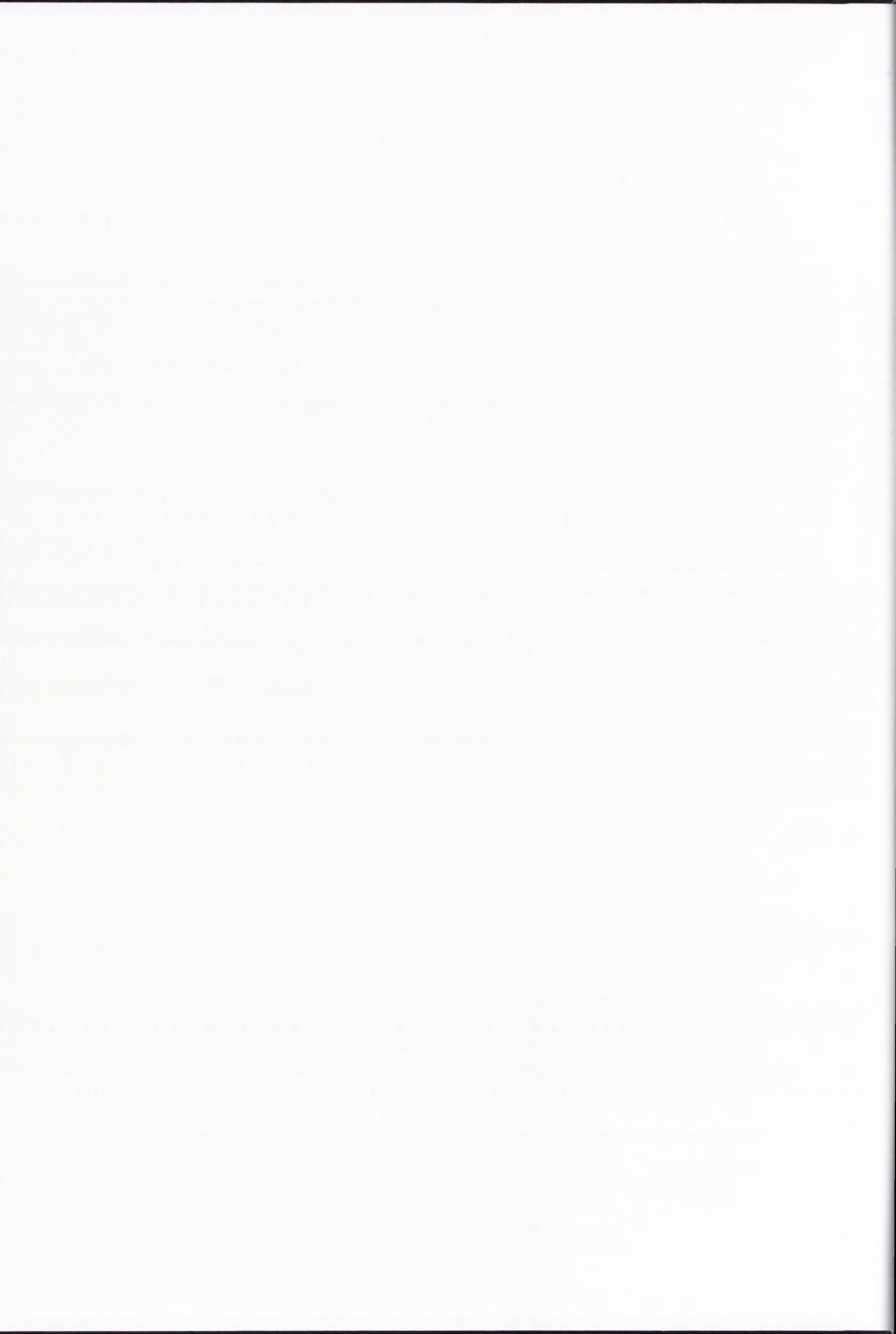
1. W oparciu o techniki elektroforezy w żelu natywnym, eksperymenty mapowania struktury drugorzędowej oraz analizy komputerowe struktur 2D RNA udowodniłam, że wbrew powszechnej opinii, domena TAR RNA wirusa HIV-2 może tworzyć *in vitro* przynajmniej dwie, odmienne formy globalne. Jedną z nich jest, ustalona już na początku lat osiemdziesiątych, rozgałęziona forma TAR-2 RNA z trzema charakterystycznymi motywami spinkowymi, drugą natomiast stanowi nowa, zaproponowana w naszej Pracowni, wydłużona forma TAR-2. Forma wydłużona reprezentowana jest przez dwa konformery (E1 i E2), różniące się organizacją rejonu bogatego w reszty G.
2. Równowaga pomiędzy dwoma formami globalnymi TAR-2 jest zależna od stężenia jonów  $Mg^{2+}$ , w zakresie ich niskich stężeń, charakterystycznych dla warunków *in vivo*. Przy braku jonów  $Mg^{2+}$  oraz przy bardzo niskim ich stężeniu dominuje forma rozgałęziona TAR-2, wzrost stężenia jonów  $Mg^{2+}$  powoduje zwiększenie ilości formy wydłużonej, kosztem formy rozgałęzionej.
3. Przeprowadzona analiza filogenetyczna wykazała, że zaobserwowana u HIV-2<sub>rod</sub> tendencja do tworzenia wydłużonej formy TAR RNA jest zachowana u innych szczepów wirusów HIV-2 i spokrewnionych z nimi wirusów SIV.
4. Wyniki eksperymentów mapowania struktury drugorzędowej transkryptu 123-meru o sekwencji naturalnie występującej domeny TAR HIV-2, nie wykluczają żadnej z proponowanych form TAR-2. Warto podkreślić, że wzór cięć enzymatycznych TAR-2 wt jest zgodny z wzorem otrzymanym dla transkryptu mutantu TAR-2 A21, reprezentującego formę wydłużoną TAR-2, ale różni się od otrzymanego dla mutantów reprezentujących formę rozgałęzioną (TAR-2 B4 i TAR-2  $\Delta$ C23). Chemiczna modyfikacja RNA z użyciem DEPC pozwoliła na rozróżnienie transkryptów TAR-2 wt i mutantu ustabilizowanego w formie wydłużonej. Jednak wszystkie modyfikacje typowe dla mutantu TAR-2 A21 były obserwowane także dla TAR-2 wt, ale nie odwrotnie,



potwierdzając, że TAR-2 wt jest mieszaniną formy wydłużonej i rozgałęzionej.

5. Analiza struktury izolowanych spinek I (35-mer) i II (32-mer), odpowiadających fragmentom rozgałęzionej formy TAR-2 wykazała, że dla izolowanej spinki I, poza brakiem cięcia reszt G40 i G41, nie ma szczególnych różnic w porównaniu z pełnej długości TAR-2 wt. Istotne różnice obserwowano natomiast w przypadku izolowanej spinki II. Wynika to z faktu, że niezależnie od tego, jaką formę przyjmuje 123-mer TAR-2 wt rejony odpowiadające wybrzuszeniu i pętli apikalnej izolowanej spinki I mogą pozostać niesparowane. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku spinki II, ponieważ w wydłużonych konformerach TAR-2 rejon odpowiadający pętli apikalnej spinki II jest sparowany i tylko jedna z reszt wybrzuszenia (U62) pozostaje niesparowana. Nie można jednak całkowicie wykluczyć, że obserwowane różnice wynikają nie tylko z formowania wydłużonej formy TAR-2, ale także wyizolowania danej spinki z całej domeny, a tym samym pozbawienia jej specyficznych oddziaływań trzeciorzędowych.
6. Ponieważ stan równowagi pomiędzy globalnymi formami TAR-2 zależy od stężenia jonów  $Mg^{2+}$ , starałam się znaleźć centrum specyficznego wiązania tych jonów w strukturze TAR-2. Przeprowadzone eksperymenty nie pozwoliły jednak wskazać miejsca silnego i specyficznego wiązania jonów  $Mg^{2+}$ . Analizowany, przez analogię do TAR-1, rejon U27U28 TAR-2 wt może stanowić jedynie słabe miejsce wiązania jonów  $Mg^{2+}$ . Na podstawie wyników otrzymanych dla transkryptu TAR-2 A21 wydaje się, że wiązanie to może wynikać z tworzenia wydłużonej formy TAR-2, gdzie reszty U27 i U28 umiejscowione są w wewnętrznej pętli głównej spinki. Natomiast, reszty U27 i U28 jako dwunukleotydowe wybrzuszenie, charakterystyczne dla rozgałęzionej formy TAR-2 nie stanowią miejsca wiązania jonów  $Mg^{2+}$ , co wykazała analiza izolowanej spinki I.
7. Optymalizacja warunków nadekspresji i oczyszczania rekombinantowych białek Tat-2 i N-końcowej domeny ludzkiej cykliny T1 pozwoliła na otrzymanie preparatów białkowych o wysokiej jakości i aktywności. Otrzymane białko Tat-2 wiąże z wysokim powinowactwem TAR-2 wt, a N-końcowa domena cykliny T1 w specyficzny sposób wzmacnia oddziaływanie TAR-2 wt / Tat-2. Obraz żeli otrzymywanych z eksperymentów kompleksowania jest zgodny z prezentowanymi wcześniej w literaturze.
8. Analiza formowania kompleksów z białkiem Tat-2 przez transkrypty mutantów, ustabilizowanych w jednej z globalnych form TAR-2 (TAR-2 A21 i TAR-2  $\Delta$ C23) wykazała, że obie formy, rozgałęziona i wydłużona, zdolne są do wydajnego oddziaływania z białkiem Tat-2 *in vitro*. Silne wiązanie białka Tat-2 przez mutantą ustabilizowanego w formie wydłużonej wskazuje, że motywy strukturalne inne



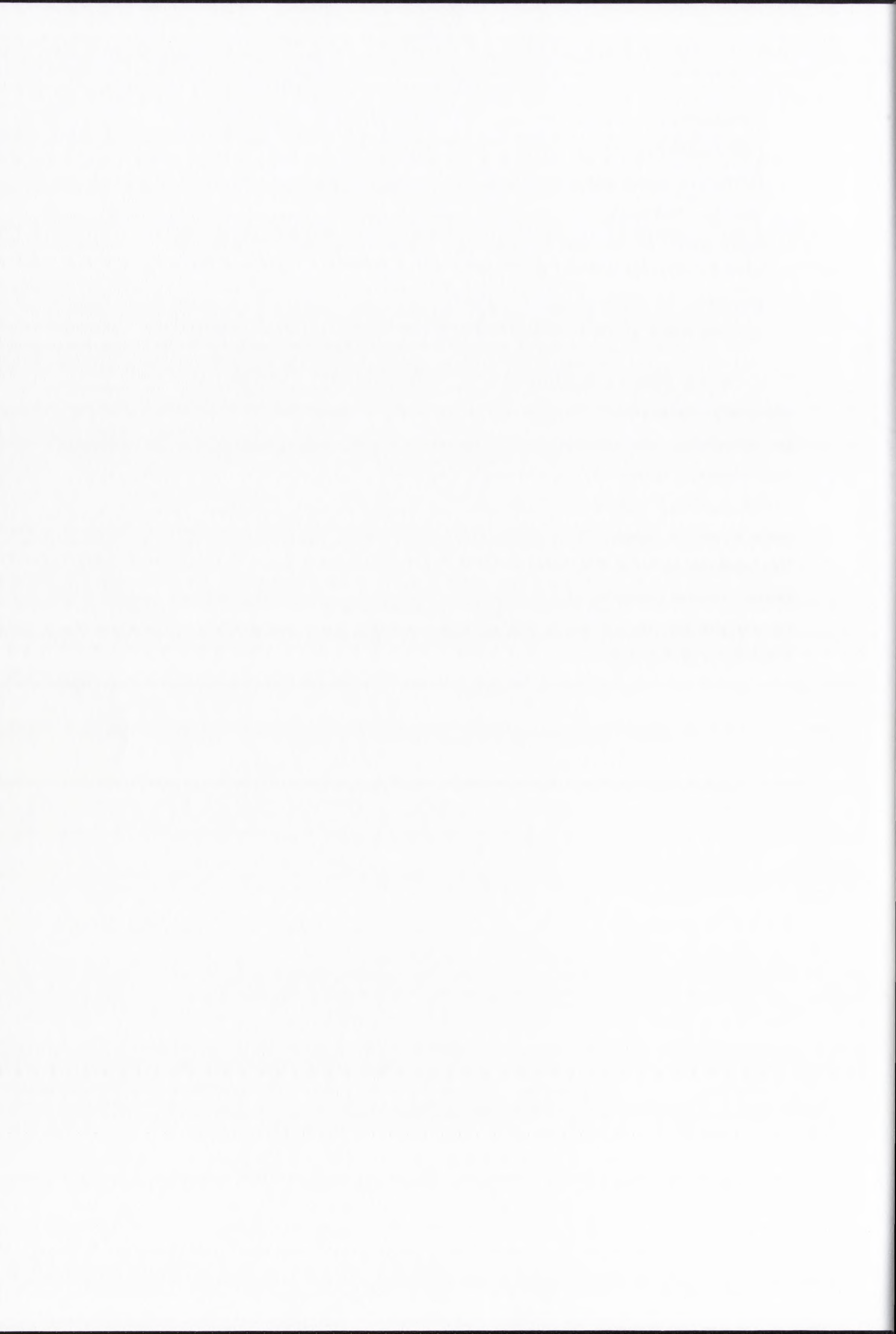


- niż dwunukleotydowe wybrzuszenia, powinny być rozważane jako potencjalne miejsca wiązania białka Tat-2 w strukturze TAR-2 RNA.
9. Obie globalne formy TAR-2 nie tylko wiążą białko Tat-2, ale także zdolne są do specyficznego oddziaływania z kompleksem Tat-2 / cyklina T1. Natomiast cyklina T1 bez udziału białka Tat-2 nie tworzyła kompleksów z żadną z badanych cząsteczek RNA. Otrzymane dane wskazują, że cyklina T1 wyraźnie wzmacnia oddziaływanie analizowanych mutantów TAR-2 RNA z białkiem Tat, ponadto jeśli cyklina T1 oddziałuje bezpośrednio z którymś z rejonów TAR-2 RNA to następuje to dopiero po uformowaniu kompleksu Tat-2 / cyklina T1.
  10. Izolowane spinki I i II odpowiadające fragmentom rozgałęzionej formy TAR-2, wiążą białko Tat-2 i kompleksy Tat-2 / cyklina T1 nieporównywalnie słabiej niż pełnej długości TAR-2 wt oraz jego mutanty. Ponieważ obie formy TAR-2 zdolne są do specyficznego wiązania białek związanych z *trans*-aktywacją, to wyniki uzyskane dla izolowanych spinek wskazują, że w rozgałęzionej formie TAR-2 do wydajnego formowania kompleksów niezbędna jest obecność dwóch spinek (I i II). Natomiast w wydłużonej formie TAR-2 istotna rola całej sekwencji +18 – 85, obejmującej rejon obu spinek (formy B TAR-2), wynika z formowania przez nią głównej spinki wydłużonej formy TAR-2 (E1 i E2).
  11. Wynik otrzymany dla mutantu TAR-2 A21 ustabilizowanego w formie wydłużonej wskazuje, że również inne motywy strukturalne niż typowe dla formy rozgałęzionej dwunukleotydowe wybrzuszenia i sześci nukleotydowe pętle apikalne, mogą stanowić miejsce wiązania kompleksu Tat-2 / cyklina T1. Wydaje się, że najprawdopodobniej w wydłużonej formie TAR-2 białko Tat-2 samo oraz w kompleksie z cyklina T1 wiąże się najpierw do wewnętrznej pętli obejmującej reszty U27U28, a następnie oba białka kompleksu oddziałują z charakteryzującym się dużą dynamiką strukturalną, rejonem bogatym w reszty G, odpowiadającym pętli apikalnej I spinki formy rozgałęzionej. Odkrycie formy wydłużonej TAR-2 sprawia, że musimy spojrzeć w innym świetle na asocjację TAR-2 / Tat-1 / cyklina T1. Badania w tym kierunku będą kontynuowane w naszej Pracowni metodami fotozszywania.
  12. Analiza wpływu amidu argininy na cięcia indukowane jonami  $Pb^{2+}$  wykazała, że obie formy TAR-2 wiążą specyficznym amide argininy. Główne miejsce wiązania przypada w rejonie reszty nukleotydowej U27, czyli w miejscu uznawanym za kluczowe dla oddziaływania z białkiem Tat-2. W rozgałęzionej formie TAR-2 reszta U27 jest jedną z reszt dwunukleotydowego wybrzuszenia UU pierwszej spinki. W formie wydłużonej, U27 posadowiona jest w wewnętrznej pętli i wspólnie z sąsiadującymi z nią resztami



nukleotydowymi, wydaje się stanowić miejsce wiązania amidu argininy, a tym samym najprawdopodobniej miejsce wiązania białka Tat-2. Analiza wiązania amidu argininy potwierdza wyniki eksperymentów formowania kompleksów RNA / Tat-2 i obie metody zgodnie wskazują, że pozbawione dwunukleotydowych wybruszeń, wydłużone konformery TAR-2, mogą wiązać białka bogate w argininę, takie jak Tat. Porównanie wyników otrzymanych dla pełnej długości TAR-2 wt oraz dla izolowanych spinek I i II wskazuje, że wpływ amidu argininy na indukowane jonami  $Pb^{2+}$  cięcie danej reszty nukleotydowej, zależy od globalnej struktury całej analizowanej cząsteczki RNA.

Wyniki badań przedstawionych w mojej pracy doktorskiej dowodzą, że koniec 5' liderowego RNA HIV-2 charakteryzuje się polimorfizmem strukturalnym. Mam nadzieję, że przyczynią się one także do lepszego zrozumienia, kluczowego dla procesu *trans*-aktywacji genów HIV, oddziaływania domeny TAR-2 RNA z wirusowym białkiem Tat-2 i ludzką cykliną T1. Dane strukturalne charakteryzujące TAR-2 RNA mogą również wyjaśnić wiele aspektów związanych z dynamiką i funkcją całego rejonu liderowego wirusa HIV-2. Szczegółowe badania RNA wirusa HIV-2 oraz jego oddziaływań z białkami, pozwalające poznać różnice pomiędzy HIV-1 i HIV-2, są szczególnie istotne, gdyż mogą przyczynić się do wyjaśnienia natury silnej patogenności wirusa HIV-1, a w dalszej perspektywie znalezienia skutecznych metod leczenia AIDS.



## VII. MATERIAŁY I METODY

### VII.1. MATERIAŁY STOSOWANE W BADANIACH

#### 1.1. Odczynniki chemiczne i biochemiczne

Większość odczynników stosowanych w przedstawionych eksperymentach pochodziła z firm Sigma, Aldrich, Fluka lub Serva. Odczynniki były najwyższej klasy czystości i oznaczone jako wolne od rybonukleaz. Dodatkowo, nośnikowy tRNA (drożdżowy tRNA) pochodził z firmy Ambion, sączki Milex GP z firmy Millipore, sefaroza S-glutationowa i kolumnienki NAP-25 z firmy Pharmacia Biotech. Amidofosforyny z blokadą 2'-O-TOM zakupiono w firmie Glen Research, pozostałe odczynniki zgodnie ze standardem Applied Biosystems, stosowane do chemicznej syntezy RNA pochodziły z firmy Roth.

#### 1.2. Związki promieniotwórcze

[ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (4000 – 5000 Ci / mmol) – ICN

#### 1.3. Enzymy

T4 kinaza polinukleotydowa – Fermentas, rybonukleaza T1 - Boehringer Mannheim, rybonukleaza A – Sigma, nukleaza S1 – Fermentas, rybonukleaza V1 – Ambion, trombina – Sigma

#### 1.4. Zestawy odczynników

Zestaw do reakcji PCR - Ambion SuperTaq<sup>TM</sup> Plus polymerase

Zestaw do transkrypcji - Ambion T7-MEGAshortscript transcription kit

Zestaw do defosforylacji i znakowania 5'-końca RNA przy użyciu [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP - Ambion KinaseMax kit

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakterii - Qiagen

Zestaw do oznaczania ilości białka z zastosowaniem kwasu bikiwonowego – Sigma

#### 1.5. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy DNA stosowane jako matryce w reakcjach transkrypcji *in vitro* oraz wykorzystywane jako startery w reakcjach PCR, prowadzących do otrzymania matrycowych DNA, zakupiono w IBB PAN w Warszawie. Oligonukleotydy RNA o sekwencji izolowanej spinki III TAR-2 (21-mer), spinki W (30-mer) oraz TAR-1 (29-mer) otrzymałam metodą syntezy chemicznej.

#### 1.6. Plazmidy

Plazmidy wykorzystywane w przeprowadzonych eksperymentach, ze wskazaniem źródła ich pochodzenia:

1. plazmid HIV-2  $\Psi$  large zawierający, poprzedzoną promotorem dla T7 RNA polimerazy, sekwencję całego rejonu liderowego oraz 5' końcową część genu *gag* wirusa HIV-2 (+1 – 892) – prof. Ben Berkhout, Department of Human Retrovirology, Uniwersytet w Amsterdamie,
2. plazmid pGEX-2T z wklonowanym genem białka Tat-2 - dr E. Wyszko, IChB PAN, Poznań, (prof. A. P. Rica, Baylor College of Medicine, Houston, Texas),

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

The history of the United States is a story of growth and change. From the first European settlers to the present day, the nation has evolved through various stages of development. The early years were marked by exploration and the establishment of colonies. The American Revolution led to the birth of a new nation, and the subsequent years saw the expansion of territory and the growth of industry. The Civil War was a pivotal moment in the nation's history, leading to the abolition of slavery and the strengthening of the federal government. The late 19th and early 20th centuries were characterized by rapid industrialization and the rise of a new middle class. The United States emerged as a world power in the early 20th century, and its influence has continued to grow ever since.

The history of the United States is a story of growth and change. From the first European settlers to the present day, the nation has evolved through various stages of development. The early years were marked by exploration and the establishment of colonies. The American Revolution led to the birth of a new nation, and the subsequent years saw the expansion of territory and the growth of industry. The Civil War was a pivotal moment in the nation's history, leading to the abolition of slavery and the strengthening of the federal government. The late 19th and early 20th centuries were characterized by rapid industrialization and the rise of a new middle class. The United States emerged as a world power in the early 20th century, and its influence has continued to grow ever since.

3. plazmid GST-hCycT1 303 kodujący N-końcowy fragment ludzkiej cykliny T1 z przyłączonym genem - GST - prof. Katherine A. Jones, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, Kalifornia.

### 1.7. Szczepy bakteryjne

*E. coli* DH5 $\alpha$  - Stratagene

*E. coli* BL21 (DE3) pLysS - Stratagene

*E. coli* BL21 - Codon Plus (DE3) – RIL - Stratagene

### 1.8. Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek

Marker do oznaczania masy białek w żelach denaturujących z SDS - Protein Molecular Mass Markers, Mid Range – Promega,

Marker do analizy masy fragmentów DNA w żelach agarozowych – Mass Ruler DNA Ladder, Low Range – Fermentas

### 1.9. Stosowane bufony, roztwory i pożywki

#### ***Bufor elektroforetyczny 1xTBE***

100 mM Tris, 100 mM kwas borowy, 2,5 mM EDTA; pH 8,3

#### ***Bufor elektroforetyczny 0,25xTBE***

25 mM Tris, 25 mM kwas borowy, 0,625 mM EDTA; pH 8,3

#### ***Bufor elektroforetyczny 0,5xTB***

50 mM Tris, 50 mM kwas borowy; pH 8,3

#### ***Bufor elektroforetyczny 0,5xTB z Tritonem X-100***

50 mM Tris, 50 mM kwas borowy, 0,01% Triton X-100; pH 8,3

#### ***40% roztwór żelu poliakrylamidowego 19 : 1 (w / w)***

190 g akrylamidu, 10 g bisakrylamidu, H<sub>2</sub>O do 500 ml

#### ***40% roztwór żelu poliakrylamidowego 75 : 1 (w / w)***

197,4 g akrylamidu, 2,63 g bisakrylamidu, H<sub>2</sub>O do 500 ml

#### ***30% roztwór żelu białkowego***

150 g akrylamidu, 4 g bisakrylamidu, H<sub>2</sub>O do 500 ml

#### ***Roztwory obciążające do nakładania na elektroforezę próbek zawierających RNA lub DNA***

##### Elektroforeza w warunkach denaturujących

8 M mocznik, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

dejonizowany formamid, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

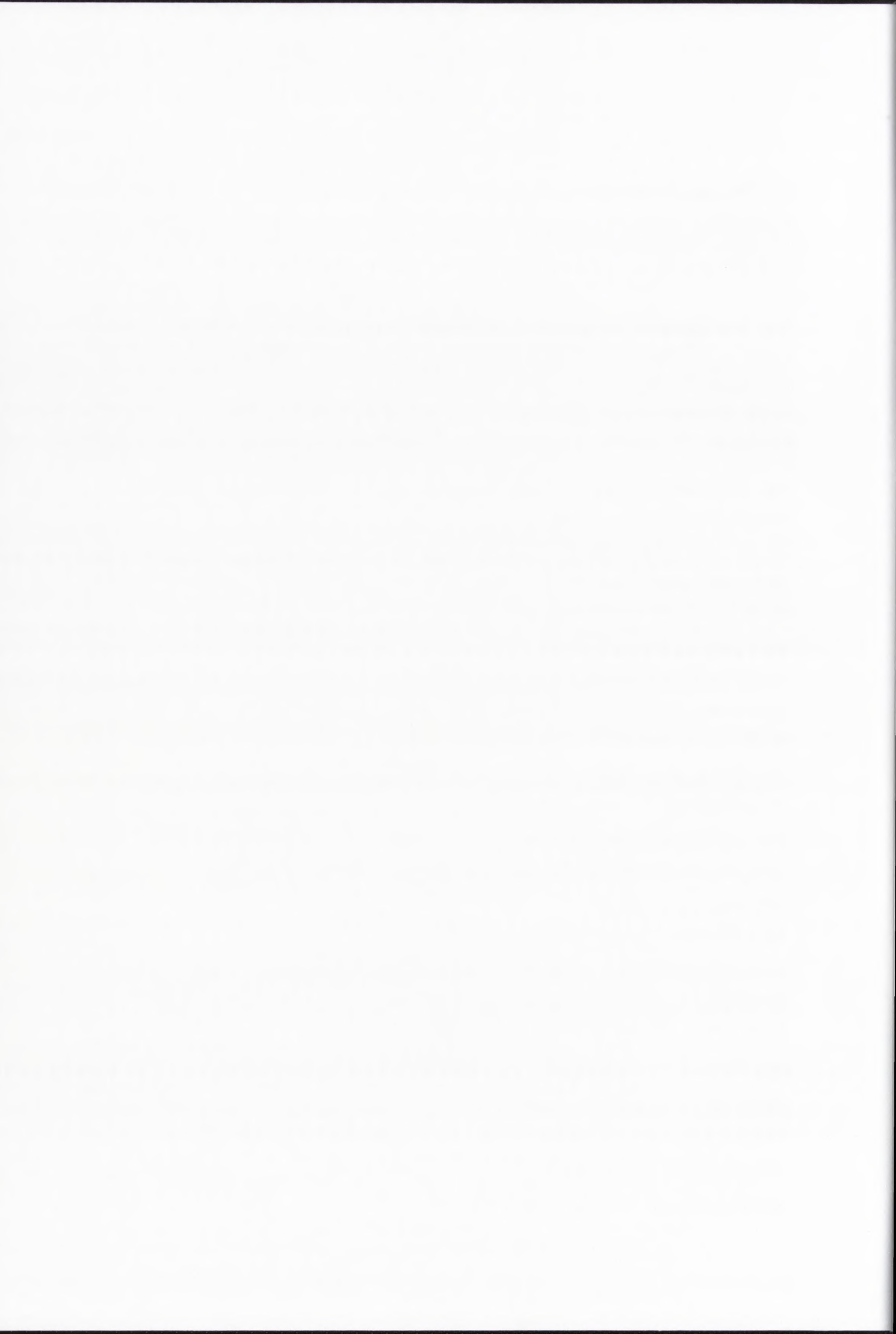
##### Elektroforeza w warunkach niedenaturujących

25% w/v Ficoll, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

30% glicerol, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

50% w/v sacharoza, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol





***Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliaryloamidowego***

0,3 M octan sodu, 1 mM EDTA

***Bufor do elektroforezy denaturującej białek***

25 mM Tris-HCl pH 8,3, 190 mM glicyna, 0,1% SDS

***Roztwór do denaturacji i obciążania próbek białkowych – roztwór SSB***

50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol, 10% β-merkaptoetanol, 0,02% w/v błękit bromofenolowy

***Bufor TN (10 × stężony)***

100 mM Tris-HCl pH 7,2, 400 mM NaCl

***Bufor do trawienia rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących***

50 mM cytrynian sodu pH 5,3, 7 M mocznik

***Roztwór formamidowy do hydrolizy RNA***

3 mM MgCl<sub>2</sub> w 100% formamidzie

***Bufor „stop”***

8 M mocznik, 20 mM EDTA, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

***Bufor TK do formowania kompleksów RNA / białko (10 × stężony)***

500 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 1 M DTT, 1% Triton X-100

***Bufor dla T4 kinazy polinukleotydowej - Fermentas***

50 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,1 mM spermidyna i 0,1 mM EDTA

***Bufory do izolacji i oczyszczania rekombinantowych białek fuzyjnych z GST***

***Bufor PBS***

140 mM NaCl<sub>2</sub>, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

***Bufor L***

50 mM Tris-HCl pH 7,9, 100 mM KCl, 1% Triton-X 100, 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 2 mg / ml benzamidyna

***Bufor I***

PBS pH 7,4, 1% Triton-X 100, 2 mM DTT, 1 × inhibitory proteaz

***Bufor II***

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 × inhibitory proteaz

***Bufor III***

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 10% glicerol, 2 mM DTT

***Bufor dla trombiny***

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM KCl, 1 mM DTT



***Inhibitory proteaz (100 x)***

400 µg / ml leupeptyna, 100 µg / ml aprotynina, 100 µg / ml pepstatna A, 100 µg / ml SBTI, 200 mg / ml benzamidyna, 10 mM PMSF

**Pożywki do hodowli bakteryjnych**

***Pożywka LB płynna***

10 g pepton, 5 g ekstrakt drożdżowy, 5 g NaCl, 1 ml 1 M NaOH, H<sub>2</sub>O do 1000 ml

***Pożywka LB stała***

2 g pepton, 1 g ekstrakt drożdżowy, 1 g NaCl, 0,2 ml 1 M NaOH, 3 g agaru, H<sub>2</sub>O do 200 ml

***Antybiotyki***

Roztwory wyjściowe:

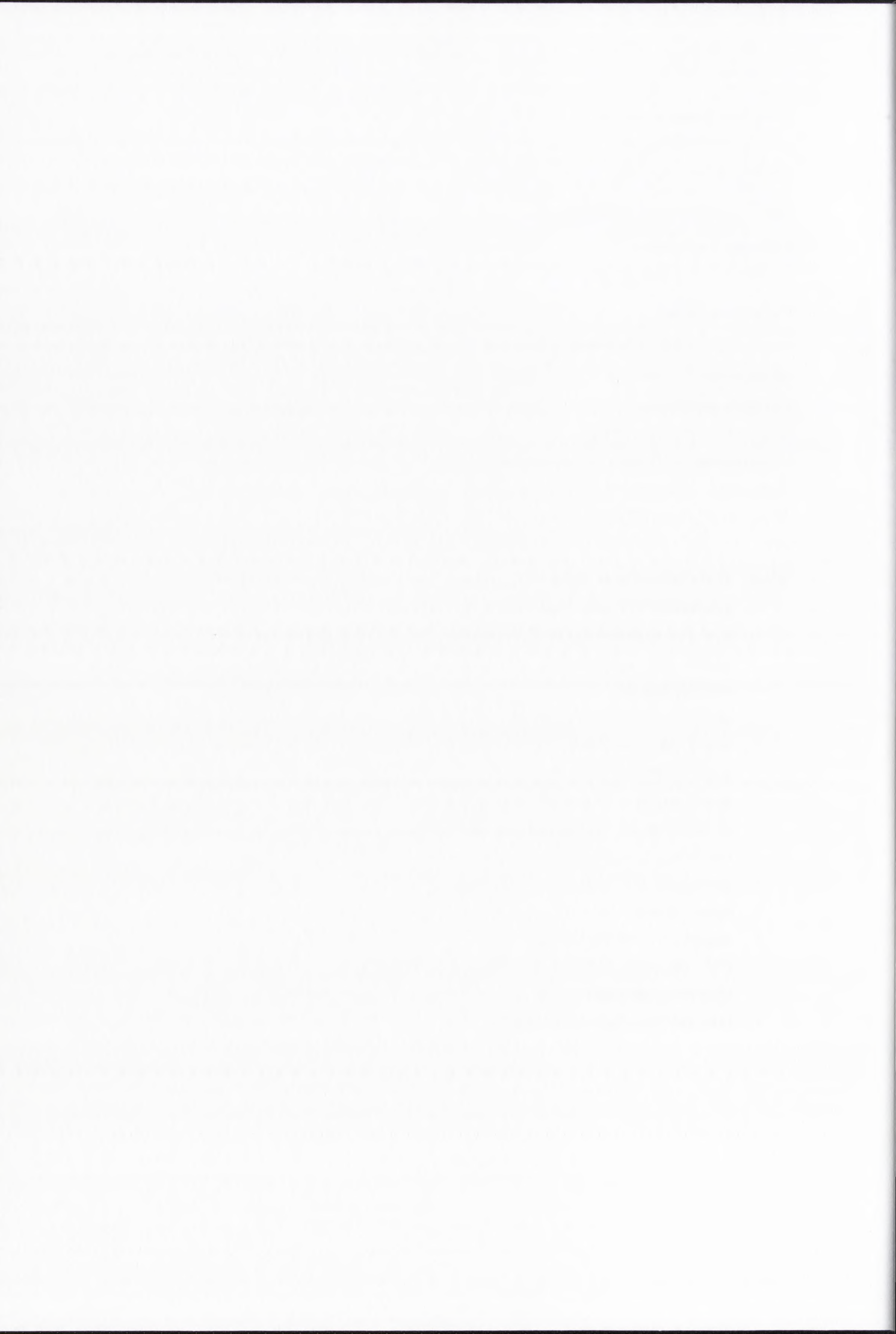
ampicylina – 30 mg / 1ml H<sub>2</sub>O

chloramfenikol – 50 mg / 1 ml izopropanolu

Ostateczne stężenie antybiotyków w pożywce podczas hodowli bakteryjnych wynosiło 30 µg (ampicylina) i 50 µg (chloramfenikol) na 1 ml pożywki.

**VII.2. WAŻNIEJSZA APARATURA STOSOWANA W PRACY**

- syntetyzer PCR Mate, firmy Applied Biosystems
- aparat do elektroforezy poziomej w żelu agarozowym firmy Kucharczyk
- aparat do elektroforezy pionowej w żelu poliakrylamidowym, firmy Kucharczyk, model MEDIUM
- aparat do elektroforezy sekwencyjnej z systemem chłodzącym, firmy GIBCO, model S2001
- aparat do elektroforezy pionowej w ściśle kontrolowanej temperaturze żelu, DNA Pointer System, firmy Kucharczyk
- aparat do jednokierunkowej elektroforezy białek firmy Kucharczyk
- phosphorimager Typhoon G-8600 – Amersham Pharmacia
- licznik scyntylicyjny Beckmann LS5000TA
- termocykler PTC-200, firmy MJ Research
- spektrofotometr UV / VIS Lambda Bio 10, firmy Perkin Elmer
- wyparka wirówkowa Univapo 150H z systemem chłodzącym Heto
- LKB Bromma 8300 Uvicord II (monitorowanie elucji oligomerów odsalanych metodą chromatografii kolumnowej)
- pH-metr, firmy Denver Instrument



### VII.3. METODY STANDARDOWE STOSOWANE W PRACY

#### 3.1. Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę elektroforezy analitycznej (grubość żelu 0,4 mm) w warunkach denaturujących wykorzystywano do oczyszczania fragmentów RNA po transkrypcji i znakowaniu izotopowym (aparatus MEDIUM, rozmiar żelu 15×15 cm) oraz do analizy produktów specyficznej degradacji po próbkowaniu struktury drugorzędowej RNA metodami enzymatycznymi i chemicznymi (aparatus GIBCO S2001, rozmiar żelu 30×40 cm). Ponadto, preparatywną elektroforezę w warunkach denaturujących (grubość żelu 2 mm) stosowano do oczyszczania oligorybonukleotydów po syntezie chemicznej (aparatus GIBCO S2001, rozmiar żelu 30×40 cm). Stosowałam żel poliakryloamidowy o usieciowaniu 19:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu) z 8 M mocznikiem i bufor elektroforetyczny 1×TBE. Procentowość żelu była zależna od długości analizowanych fragmentów RNA:

15% - spinka I (35-mer), spinka II (32-mer), spinka III (21-mer), TAR-1 (29-mer), spinka W (30-mer);

12% - poli(A) (60-mer);

10% - TAR-2 (123-mer) i jego mutanty.

Elektroforezę prowadzono przy stałej mocy prądu 12 W (żel 15×15 cm) lub 120 W (żel 30×40 cm). Każdą elektroforezę poprzedzono 30 min. preelektroforezą stosując o połowę mniejszą moc prądu niż podczas właściwej elektroforezy. Próbkę obciążano w stosunku 1:1 8 M roztworem mocznika lub formamidu z barwnikami elektroforetycznymi.

#### 3.2. Elektroforeza kwasów rybonukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących

Elektroforezę analizowanych fragmentów RNA w warunkach niedenaturujących prowadzono w ściśle kontrolowanych warunkach prądowych i temperaturowych, wykorzystując zestaw DNA Pointer System firmy Kucharczyk. W celu znalezienia optymalnych warunków rozdziału konformerów RNA przetestowano różne warunki elektroforezy. Stosowano 6% lub 8% żełe poliakryloamidowe o usieciowaniu 19:1 lub 75:1. Jako bufor elektroforetyczny używano 0,25×TBE lub 0,5×TB z Tritonem X-100. Elektroforezy prowadzono w kontrolowanej temperaturze żelu wynoszącej 4°C lub 20°C, przy stałej mocy prądu (10 lub 20 W) przez około 1 godz. Stosowano płyty o rozmiarze 16 × 10 cm i przekładki grubości 1mm. Próbkę obciążano 25% Ficoll'em z barwnikami w stosunku 5:1.

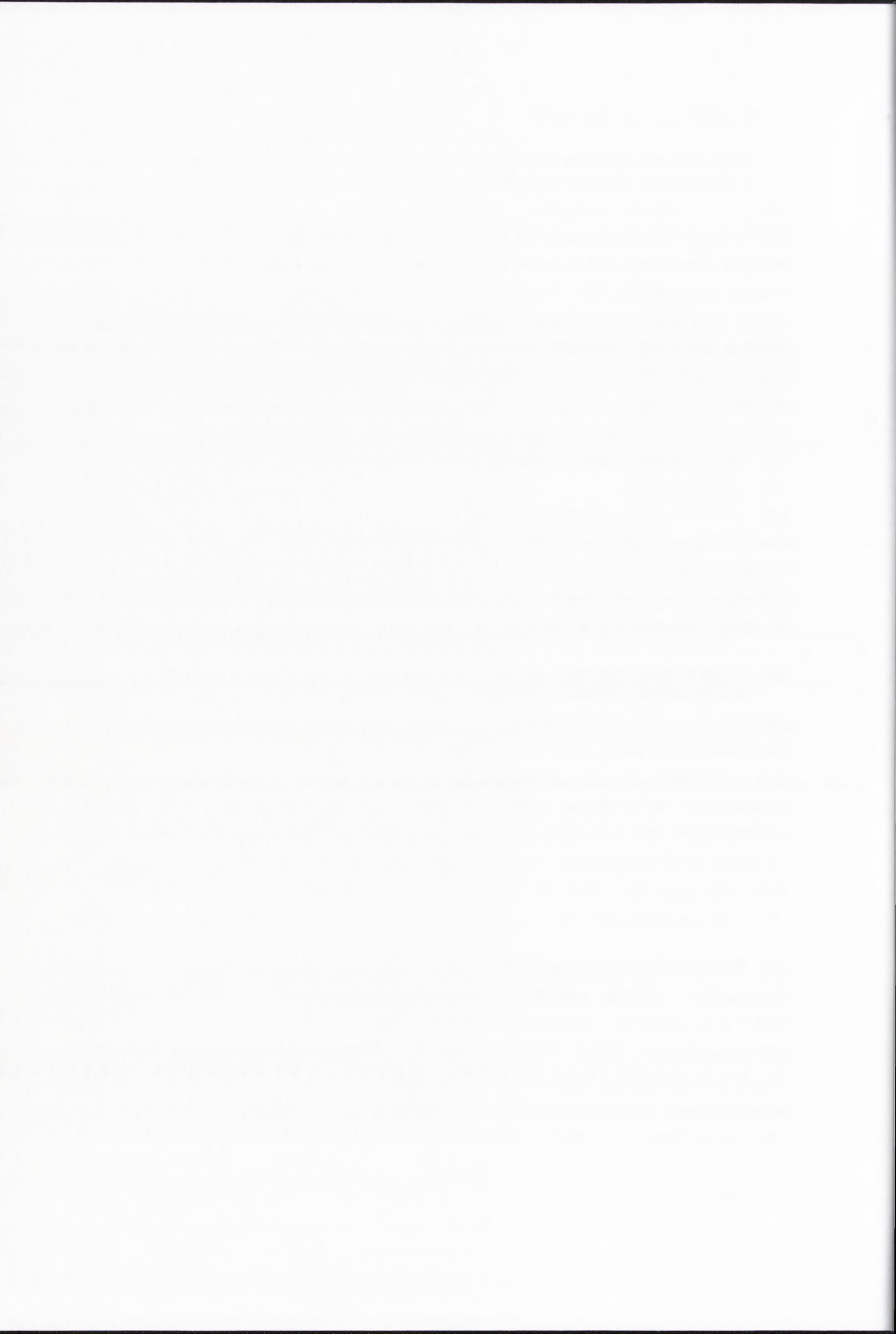
#### 3.3. Elektroforeza kompleksów RNA / białko w żelu poliakryloamidowym

Formowanie i migrację kompleksów dwuskładnikowych RNA / Tat-2 oraz trójskładnikowych RNA / Tat-2 / cyklina T1 analizowano metodą elektroforezy w niedenaturującym żelu poliakryloamidowym o niskiej, kontrolowanej temperaturze (4°C), wykorzystując zestaw DNA Pointer System firmy Kucharczyk. Stosowano żel o usieciowaniu 75:1 i 0,5×TB z Tritonem X-100 jako bufor elektroforetyczny. Procentowość żelu była zależna od długości analizowanych cząsteczek RNA:

10% - spinka I (35-mer), spinka II (32-mer), spinka III (21-mer), TAR-1 (29-mer);

6% - poli(A) (60-mer), TAR-2 (123-mer) i jego mutanty.

Stosowano płyty o rozmiarze 16 × 10 cm i przekładki grubości 1mm. Elektroforezy prowadzono



z barwnikami w stosunku 5:1. Zastosowanie Ficollu jako roztworu obciążającego, poprzedzono przetestowaniem innych standardowo stosowanych w tym celu roztworów, zawierających sacharozę lub glicerol. Ficoll zapewniał jednak najlepsze wnikania kompleksów w żel (brak materiału w kieszonkach żelu).

### 3.4. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Elektroforezę w żelu agarozowym wykorzystywano do analizy otrzymanych metodą PCR fragmentów DNA, stanowiących matryce do reakcji transkrypcji *in vitro*. Stosowano 2% (w/v) żel agarozowy i bufor elektroforetyczny 0,5×TB. Próbkę obciążano 30% glicerolem z barwnikami, w stosunku 1:5. W celu uwidocznienia DNA, żel po elektroforezie barwiono przez 20 minut w roztworze bromku etydyny (0,5 µg/ml H<sub>2</sub>O) i obserwowano w świetle UV.

### 3.5. Elucja kwasów nukleinowych

Po rozdziale na żelu poliakryloamidowym prążki odpowiadające właściwym fragmentom RNA wizualizowano w świetle UV, wycinano z żelu i eluowano metodą „crash and soak” przez inkubację kawałków żelu w buforze elucyjnym lub w sterylnej, dejonizowanej wodzie (po elektroforezie preparatywnej) przez noc, w temperaturze 4°C, z łagodnym mieszaniem.

### 3.6. Precypitacja kwasów nukleinowych

W celu precypitacji kwasów nukleinowych do zebranego nad żelu supernatantu dodawano 1/10 objętości 3 M octanu sodu i 2,5 objętości schłodzonego 96% etanolu, po czym całość inkubowano w suchym lodzie przez 20 min. W przypadku RNA dodawano glikogen jako koprecypitant (60 µg na 1ml roztworu). Roztwór wirowano 14.000 r.p.m. / 30min. / 4°C, oddzielano supernatant, a otrzymany osad suszono w wyparce wirówkowej. Próbkę przechowywano w stanie zliofilizowanym w temperaturze -20°C, a do bezpośredniej pracy jako roztwory w sterylnej wodzie.

Stężenie kwasu nukleinowego w próbce oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali  $\lambda = 260$  nm. Stosowano następujące przeliczniki:

ssRNA:  $1A_{260} / \text{ml} = 33 \mu\text{g} / \text{ml}$ ,

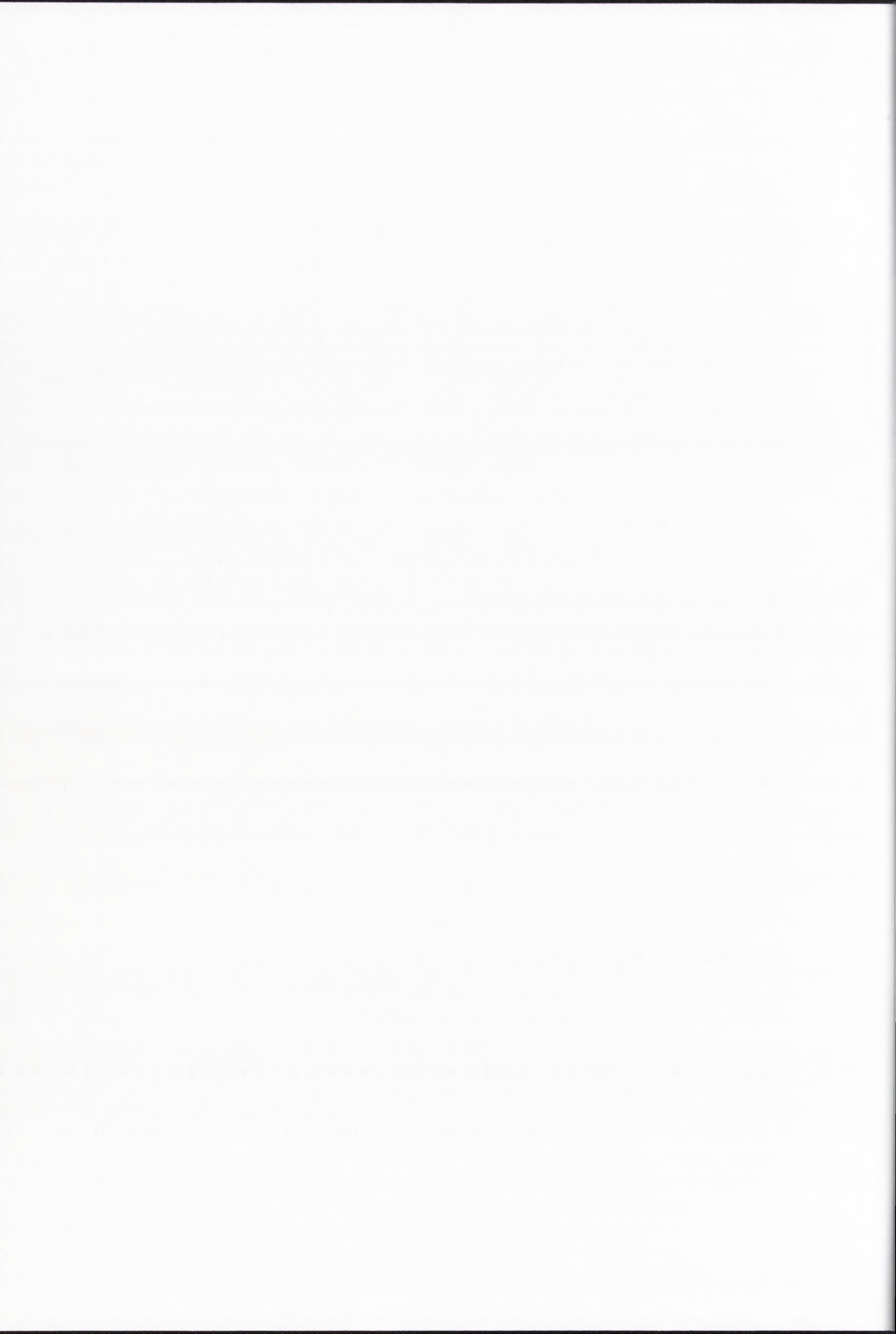
ssDNA:  $1A_{260} / \text{ml} = 33 \mu\text{g} / \text{ml}$ ,

dsDNA:  $1A_{260} / \text{ml} = 50 \mu\text{g} / \text{ml}$ .

### 3.7. Trawienie RNA rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących

Do 1 µl analizowanego RNA (30.000 c.p.m.), znakowanego izotopem <sup>32</sup>P na 5' końcu (patrz rozdział 4.1.4.) i rozpuszczonego w sterylnej wodzie dodawano 8 µl buforu do trawienia rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących. Mieszaninę ogrzewano przez 1 min. w temperaturze 90°C, chłodzono przez 2 minuty w temperaturze pokojowej, po czym dodawano 2 U rybonukleazy T1. Reakcję inkubowano przez 20 minut w 55°C, przerywano przez dodanie równej objętości buforu „stop” i przeniesienie do suchego lodu. Produkty reakcji analizowano w denaturującym żelu poliakryloamidowym z buforem 1×TBE.





### 3.8. Hydroliza RNA formamidem

Do analizowanego RNA (30.000 c.p.m.) znakowanego izotopem  $^{32}\text{P}$  na 5' końcu, dodawano dejonizowany formamid w stosunku objętościowym 1 : 5. Reakcję inkubowano 20 min. w temperaturze 100°C, przerywano przez dodanie równej objętości buforu „stop” i przeniesienie do suchego lodu. Produkty reakcji analizowano w denaturującym żelu poliakryloamidowym z buforem 1×TBE.

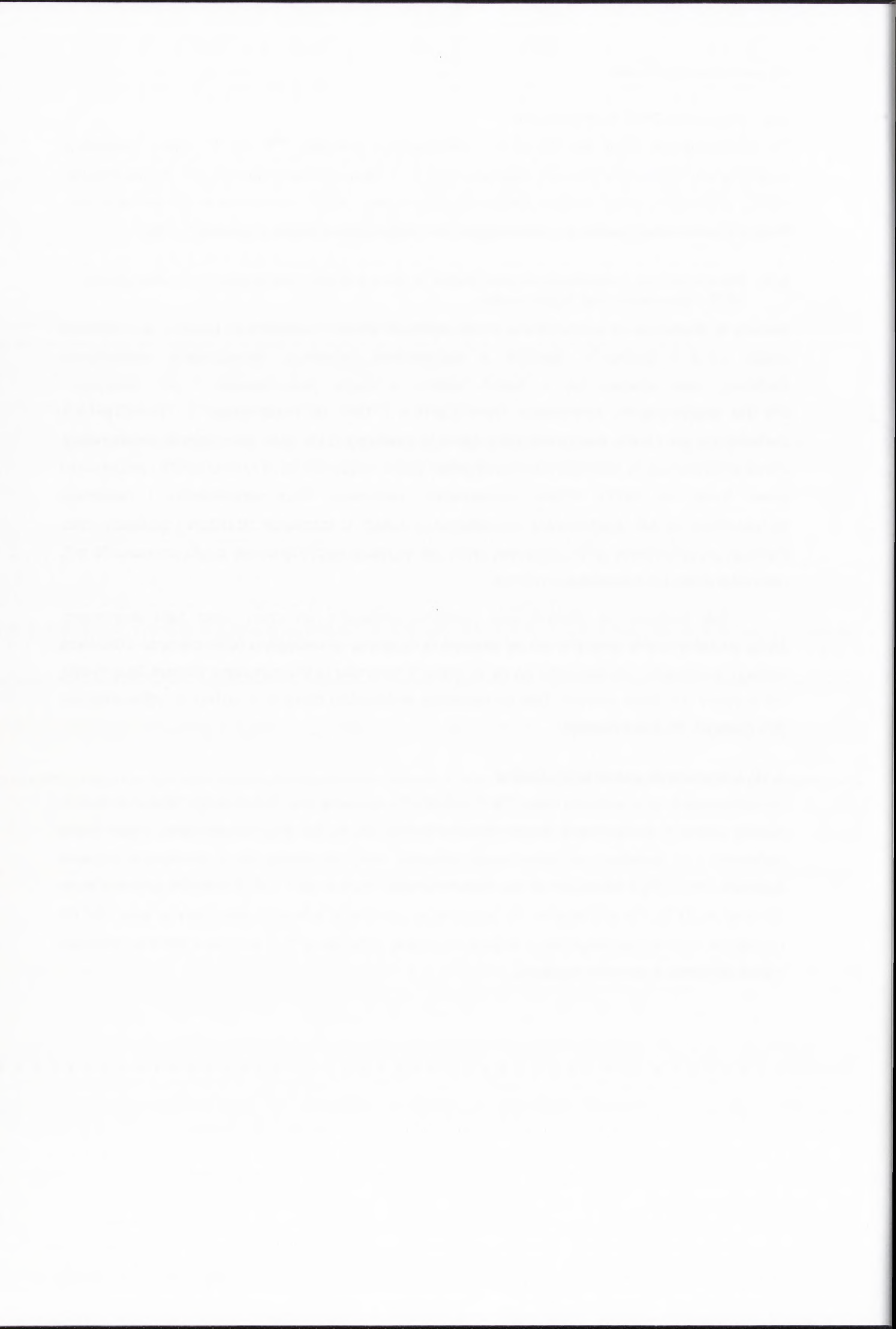
### 3.9. Elektroforeza jednokierunkowa białek w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS i barwienie żeli białkowych

Metodę tą stosowano do kontrolowania poszczególnych etapów nadekspresji, izolacji i oczyszczania białek Tat-2 i cykliny T1. Zgodnie z standardową procedurą denaturującej elektroforezy białkowej, żełe składały się z dwóch warstw o różnej procentowości i pH. Stosowano 5% żel zagęszczający, zawierający Tris-HCl pH 6,8 i 15% żel rozdzielający z Tris-HCl pH 8,8. Zarówno żel jak i bufor elektroforetyczny (pH 8,3) zawierały 0,1% SDS jako czynnik denaturujący. Przed elektroforezą do każdej analizowanej próbki białka dodawano 50  $\mu\text{l}$  roztworu SSB i inkubowano przez 5 min. w 100°C. Próbkę zwirowywano, pobierano 10  $\mu\text{l}$  supernatantu i nakładano bezpośrednio na żel. Elektroforezę prowadzono w żelach o rozmiarze 10×10cm i grubości 1mm. Podczas przechodzenia próbki białkowej przez żel zagęszczający natężenie prądu wynosiło 55 mA, natomiast przez żel rozdzielający 120 mA.

Żele białkowe po elektroforezie barwiono kumasyną, po czym obraz żelu skanowano. Zaraz po zakończeniu elektroforezy żel płukano w roztworze utrwalającym (45% metanol, 10% kwas octowy), a następnie umieszczano go na 20 minut w barwniku (0,2% kumasyna Brilliant Blue R-250, 5% metanol, 7% kwas octowy). Żele po barwieniu wielokrotnie płukano w roztworze odbarwiającym (5% metanol, 7% kwas octowy).

### 3.10. Oznaczanie zawartości białka

Po nadekspresji i oczyszczaniu białek Tat-2 i cykliny T1 całkowitą ilość otrzymanego białka oznaczano metodą opartą o zastosowanie kwasu bikinchonowego (BCA). Do 50  $\mu\text{l}$  analizowanej próbki białka dodawano 1 ml świeżego przygotowanego reagenta, który otrzymano przez zmieszanie roztworu siarczynu miedzi (II) z roztworem kwasu bikinchonowego w proporcji 1 : 50. Próbkę inkubowano przez 30 minut w 37°C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej mierzono absorbancję przy 562 nm i uzyskane wartości porównywano z krzywą wzorcową, przygotowaną w oparciu o standard białkowy – BSA (albumina z surowicy bydłowej).



## VII.4. OPIS METODYKI BADAŃ WŁASNYCH

## 4.1. PRZYGOTOWANIE RNA DO BADAŃ

Analizowane w niniejszej pracy cząsteczki RNA otrzymano dwoma różnymi metodami. Większość z nich została otrzymana metodą transkrypcji *in vitro* przy użyciu enzymu T7 RNA polimerazy. Część krótszych oligorybonukleotydów, wykorzystując doświadczenie naszej Pracowni w syntezie chemicznej kwasów nukleinowych, otrzymano przez syntezę metodą amidofosforynową na podłożu stałym.

Nazwa cząsteczki RNA	Sekwencja badanych cząsteczek RNA (5' → 3')	Metoda otrzymywania
izolowana spinka I (35-mer)	GCUGGCAGAUUGAGCCCUGGGAGGUUCUCUCCAGC	transkrypcja <i>in vitro</i>
izolowana spinka II (32-mer)	CUAGCAGGUAGAGGCCUGGGUGUUCCUGCUAG	transkrypcja <i>in vitro</i>
izolowana spinka III (21-mer)	CCAGCACUUGGCCGGUGCUGG	synteza chemiczna
TAR-1 (29-mer)	GGCAGAUCUGAGCCUGGGAGCUCUCUGCC	synteza chemiczna
Spinka W (30-mer)	GGCCAGAUUGAGCCUGGGAGCUCUCUGGCC	synteza chemiczna
TAR-2 wt (123-mer)	GGUCGCUCUGCGGAGAGGCUGGCAGAUUGAGCCCUGGGAGGUUCU CUCCAGCACUAGCAGGUAGAGGCCUGGGUGUUCCUGCUAGACUCU CACCAGCACUUGGCCGGUGCUGGGCAGACGGCC	transkrypcja <i>in vitro</i>
TAR-2 A21 (123-mer)	GGUCGCUCUGCGGAGAGGCUGGCAGAUUGAGCCCUGGGAGGUUCU CUCCAGCACUAGCAGGUAGAGGCCUGGGUGUUCCUGCUAGACUCU CACCAGCACUUGGCCGGUGCUGGGCAGACGGCC	transkrypcja <i>in vitro</i>
TAR-2 B4 (123-mer)	GGUCGCUCUGCGGAGAGGCCUGGCAGAUUGAGCCCUGGGAGGUUCU CUCCAGCACUAGCAGGUAGAGGCCUGGGUGUUCCUGCUAGACUCU CACCAGCACUUGGCCGGUGCUGGGCAGACGGCC	transkrypcja <i>in vitro</i>
TAR-2 ΔC23 (122-mer)	GGUCGCUCUGCGGAGAGGCUGGCAGAUUGAGCCCUGGGAGGUUCU UCCAGCACUAGCAGGUAGAGGCCUGGGUGUUCCUGCUAGACUCU ACCAGCACUUGGCCGGUGCUGGGCAGACGGCC	transkrypcja <i>in vitro</i>

**Tabela VII.1.** Sekwencje analizowanych cząsteczek RNA, ze wskazaniem metod ich otrzymywania. Przez podkreślenie wskazano reszty nukleotydowe zmienione względem naturalnej sekwencji TAR-2 RNA.

PHILOSOPHY DEPARTMENT

PHILOSOPHY 101: INTRODUCTION TO PHILOSOPHY  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 102: LOGIC AND CRITICAL THINKING  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 103: ETHICS AND MORALS  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 104: THE HISTORY OF PHILOSOPHY  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 105: METAPHYSICS AND EPISTEMOLOGY  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 106: ENVIRONMENTAL ETHICS  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 107: POLITICAL PHILOSOPHY  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 108: PHILOSOPHY OF LANGUAGE  
Lecturer: [Name]

PHILOSOPHY 109: PHILOSOPHY OF SCIENCE  
Lecturer: [Name]

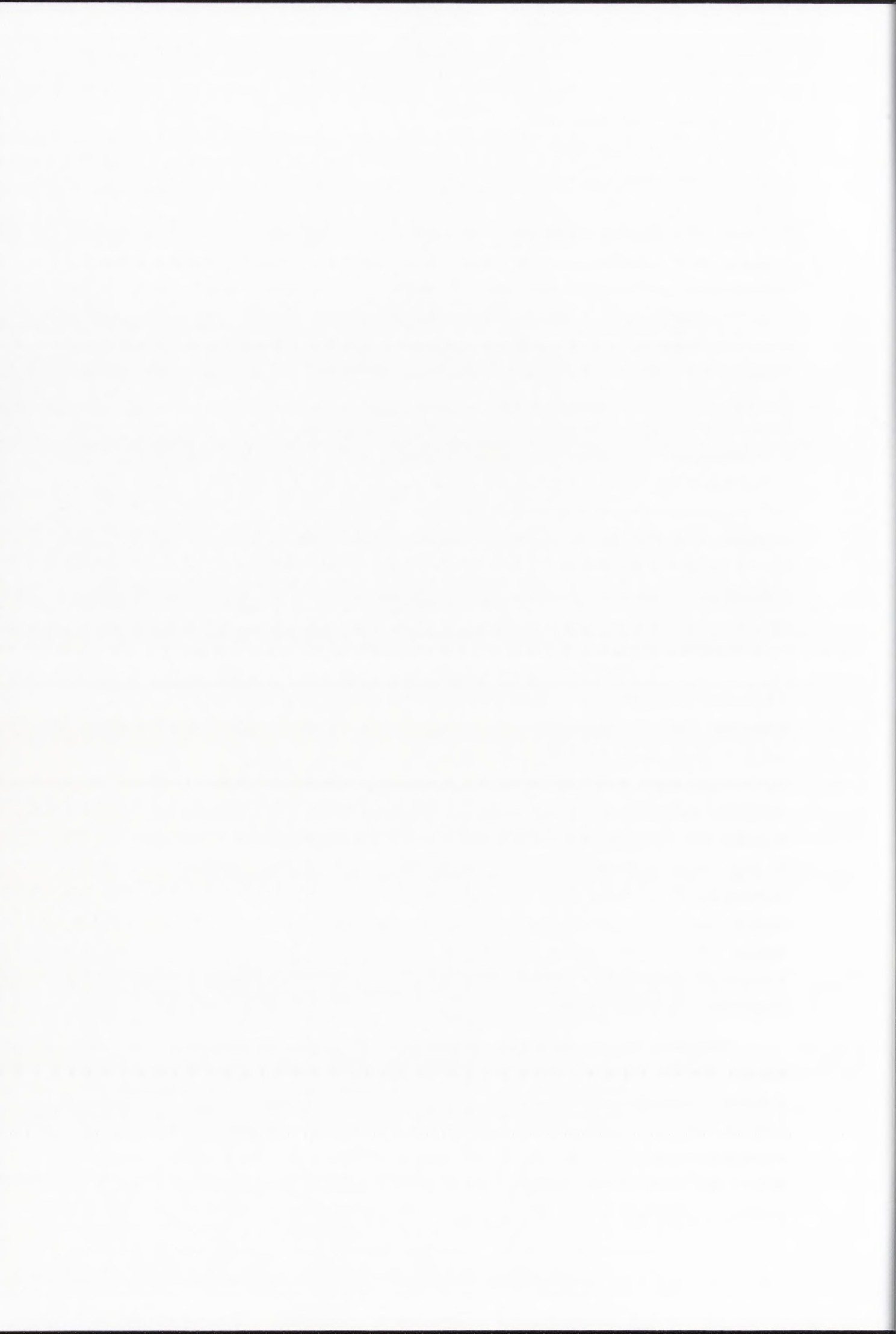
#### 4.1.1. Chemiczna synteza RNA

Syntezę oligorybonukleotydów przeprowadzono na syntetyzerze PCR Mate firmy Applied Biosystems z wykorzystaniem metody amidofosforynowej na podłożu stałym – CPG (ang. *Controlled Pore Glass*). Syntezę prowadzono w skali 1  $\mu$ mola przy użyciu komercyjnie dostępnych amidofosforynów z blokadą 2'-O-TOM (2'-O-triizopropylsiloxymetylową). Po syntezie otrzymywano oligorybonukleotydy z odblokowaną końcową grupą 5'-OH. W celu odcięcia oligorybonukleotydów od podłoża i odblokowania grup zasadolabilnych, podłoże zalewano 40% roztworem  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  w  $\text{H}_2\text{O}$  (0,75 ml) i 33% roztworem  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  w EtOH (0,75 ml); całość inkubowano przez 20 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór zbierano z nad podłoża, podłoże dokładnie płukano mieszaniną  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{EtOH} : \text{H}_2\text{O}$  (3:1:1 v/v/v). Roztwory łączono i odparowano do sucha (wyparka wirówkowa). W celu odsilowania otrzymany osad oligorybonukleotydu rozpuszczono w 1 ml fluorku tetrabutylamoniumowego (1M w THF) i inkubowano przez 20 godzin w temperaturze pokojowej, z wytrząsaniem. Następnie do roztworu dodano 1 ml buforu 1 M Tris-HCl (pH 7,5) i pozostawiono na 30 min. w temperaturze pokojowej, aby usunąć 2'-hemiacetale. W celu usunięcia THF mieszaninę odparowano do połowy objętości i oczyszczono na kolumnie wypełnionej złożem Sephadex G-25, zsyntetyzowany oligomer eluowano sterylną, dejonizowaną  $\text{H}_2\text{O}$ . Zebrane frakcje łączono i zatężano (wyparka wirówkowa). Główny produkt syntezy wydzielano metodą elektroforezy preparatywnej w denaturującym żelu poliakrylamidowym z 1xTBE. Oligomer eluowano z żelu sterylną, dejonizowaną wodą i odsalano na kolumnkach NAP-25 (elucja sterylną, dejonizowaną  $\text{H}_2\text{O}$ ). Odsolone oligomery RNA liofilizowano i przechowywano w  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.2. Otrzymywanie matrycowych DNA do reakcji transkrypcji *in vitro*

Matrycowe DNA do transkrypcji *in vitro* otrzymano przez amplifikację fragmentów plazmidu HIV-2  $\Psi$  large metodą PCR. Plazmid ten zawiera sekwencję kodującą rejon liderowy HIV-2<sub>rod</sub> i 5' końcową część genu *gag* wirusa HIV-2 (+1 – 892), poprzedzoną promotorem dla T7 RNA polimerazy. Matryce do syntezy różnych fragmentów rejonu liderowego otrzymano dzięki stosowaniu odpowiednich zestawów starterów (krótkich oligodeoksyrybonukleotydów), oznaczonych jako  $p_u$  (ang. *primer upstream*) i  $p_d$  (ang. *primer downstream*). Matryce do syntezy transkryptów reprezentujących fragmenty rejonu liderowego, rozpoczynające się w pozycji innej niż +1, otrzymano stosując startery  $p_u$  z przyłączoną na 5' końcu sekwencją promotora dla T7 RNA polimerazy. Matryce dla zaprojektowanych, zmutowanych transkryptów TAR-2 otrzymano przy użyciu wydłużonych starterów  $p_u$ , w których naturalna sekwencja TAR-2 HIV-2<sub>rod</sub> została zmieniona w celu otrzymania pożądanej mutacji.

Wszystkie reakcje PCR przeprowadzono w takich samych warunkach przy użyciu zestawu Ambion SuperTaq<sup>TM</sup> Plus polymerase zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcje, w całkowitej objętości 50  $\mu$ l, zawierały: bufor PCR z  $\text{MgSO}_4$ , 50 ng matrycy DNA, 100 ng każdego z dwóch starterów, 200  $\mu$ M każdego z dNTP i 1,25 U enzymu. Zastosowano następujące warunki temperaturowe reakcji PCR:  $95^\circ\text{C}$  - 5 min. (wstępna denaturacja), a następnie 30 cykli:  $95^\circ\text{C}$  - 1 min.,  $55^\circ\text{C}$  - 1 min.,  $72^\circ\text{C}$  - 2 min.; końcowe wydłużanie  $72^\circ\text{C}$  - 10 min. Produkty reakcji PCR strącano etanolem z dodatkiem octanu sodu, wirowano i odparowywano. Matrycowe DNA wykorzystywane



do reakcji transkrypcji rozpuszczano w sterylnej wodzie. Roztwór przechowywano w  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dodatkowo otrzymane fragmenty DNA analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

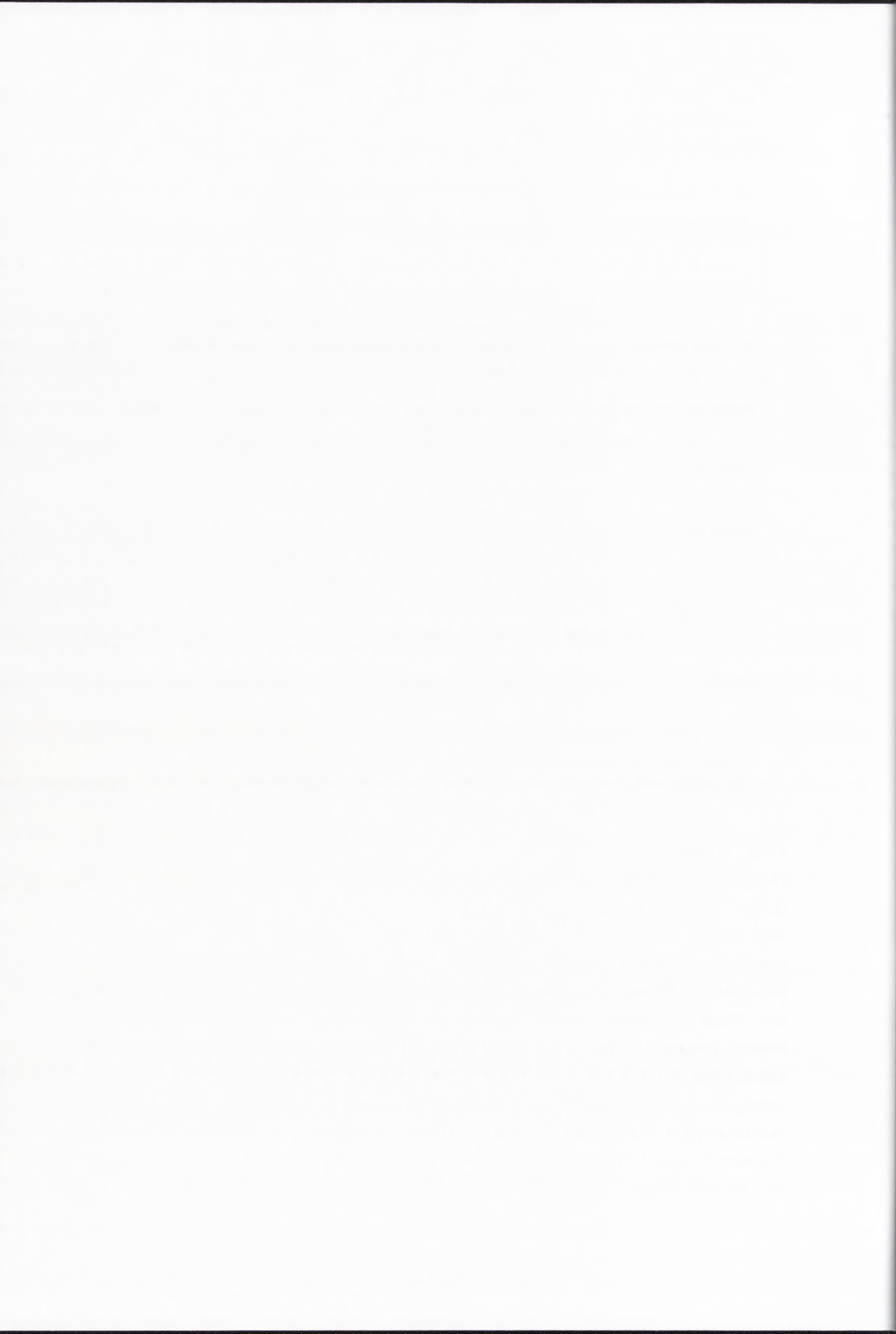
Nazwa cząsteczki RNA	Sekwencja starterów (5' → 3')
izolowana spinka I	$p_u$ <u>GAATTCTAATACGACTCACTATAGG</u> GCTGGCAGATTGAGCCCTGG $p_d$ GCTGGAGAGAACC
izolowana spinka II	$p_u$ <u>GAATTCTAATACGACTCACTATAG</u> CTAGCAGGTAGAGCCTGGGT $p_d$ TCTAGCAGGGAAC
TAR-2 wt	$p_u$ <u>GAATTCTAATACGACTCACTATAG</u> GG $p_d$ GGCCGTCTGCCCAGCACCGG
TAR-2 A21	$p_u$ <u>GAATTCTAATACGACTCACTATAG</u> GGTTCGCTCTGCGGAGAGGCTAGC $p_d$ GGCCGTCTGCCCAGCACCGG
TAR-2 B4	$p_u$ <u>GAATTCTAATACGACTCACTATAG</u> GGTTCGCTCTGCGGAGAGGCCGGCAGATT GACCCCTGGGAGGGTCTCTCCGGC $p_d$ GGCCGTCTGCCCAGCACCGG
TAR-2 $\Delta$ C23	$p_u$ <u>GAATTCTAATACGACTCACTATAG</u> GGTTCGCTCTGCGGAGAGGCTGGAGATT $p_d$ GGCCGTCTGCCCAGCACCGG
poli(A)	$p_u$ <u>GAATTCTAATACGACTCACTATAG</u> CACGCTTGCTTGCTTAAAAA $p_d$ CACACACTTAACTTGCTTCT

**Tabela VII.2.** Startery stosowane w reakcjach PCR w celu otrzymania odpowiednich matryc do reakcji transkrypcji *in vitro*. Przez podkreślenie wskazano sekwencję promotora dla T7 RNA polimerazy.

#### 4.1.3. Transkrypcja *in vitro*

Wszystkie transkrypty otrzymano przy użyciu zestawu do transkrypcji firmy Ambion (Ambion T7-MEGAscript transcription kit), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Jako matryce stosowano dwuniciowe cząsteczki DNA, otrzymane w sposób opisany powyżej. Reakcję prowadzono w skali  $20\ \mu\text{l}$ . Stężenie matrycy DNA w reakcjach transkrypcji było różne (od  $2\ \mu\text{M}$  do  $200\ \text{nM}$ ) i zależało od długości transkryptu, im krótszy transkrypt tym większa ilość matrycy. Końcowe stężenie każdego z trójfosforanów nukleozydów wynosiło  $7,5\ \text{mM}$ . Reakcję inkubowano przez 4 godziny lub przez noc w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . W przypadku długich transkryptów (60 do 123 nt) uzyskiwano około  $30\ \mu\text{g}$  materiału z jednej reakcji, krótkich (około 30 nt) jedynie  $5 - 10\ \mu\text{g}$  materiału. Transkrypt oczyszczano w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących i wizualizowano w świetle UV. Eluowano z żelu w buforze elucyjnym przez noc, strącano etanolem z dodatkiem octanu sodu i glikogenu, wirowano i osuszano (wyparka wirówkowa). RNA przechowywano w  $-20^{\circ}\text{C}$  w stanie zliofilizowanym lub jako roztwory w sterylnej wodzie.





#### 4.1.4. Znakowanie 5' końca RNA izotopem $^{32}\text{P}$

Do reakcji znakowania izotopem  $^{32}\text{P}$  5' końca cząsteczek RNA, otrzymanych metodą syntezy chemicznej, stosowano  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  i T4 kinazę polinukleotydową. Reakcję prowadzono w skali  $10\ \mu\text{l}$  w komercyjnie dostępnym buforze (Fermentas). Do jednej reakcji wykorzystywano  $10\ \mu\text{Ci}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , 2U enzymu i 2 – 4  $\mu\text{g}$  RNA. Reakcję inkubowano przez 30 min. w  $37^\circ\text{C}$ .

Do izotopowego znakowania cząsteczek RNA otrzymanych metodą transkrypcji *in vitro* stosowano zestaw do defosforylacji i znakowania 5' końca RNA (Ambion KinaseMax kit), zgodnie z zaleceniami producenta. Po etapie defosforylacji enzym usuwano z mieszaniny reakcyjnej przy pomocy dołączonego do zestawu reagentu PRR (ang. *phosphatase removal reagent*), a następnie mieszaninę odparowywano do objętości około  $1\ \mu\text{l}$ . Do jednej reakcji znakowania 5' końca RNA stosowano  $20\ \mu\text{Ci}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  i 2 – 4  $\mu\text{g}$  RNA. Zarówno reakcję defosforylacji, jak i reakcję znakowania inkubowano przez 1 h w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ .

Wyznakowane izotopowo na 5' końcu cząsteczki RNA oczyszczano w denaturującym żelu poliakryloamidowym z  $1\times\text{TBE}$ . RNA wizualizowano w świetle UV, eluowano przez noc w buforze elucyjnym, strącano etanolem z dodatkiem octanu sodu i glikogenu, wirowano i osuszano. Poziom radioaktywności znakowanych cząsteczek RNA oznaczano za pomocą licznika scyntylicyjnego.

#### 4.2. ANALIZA MIGRACJI RNA W ŻELACH POLIAKRYLAMIDOWYCH W WARUNKACH NIEDENATURUJĄCYCH

Przed analizą w warunkach natywnych homogenność wszystkich badanych cząsteczek RNA sprawdzano drogą elektroforezy w denaturującym żelu poliakryloamidowym z buforem  $1\times\text{TBE}$ . Elektroforezę w żelu niedenaturującym przeprowadzano w ściśle kontrolowanych warunkach temperaturowych oraz prądowych, wykorzystując zestaw DNA Pointer System firmy Kucharczyk. Analizowany RNA ( $20.000\ \text{c.p.m.}$  na jedna reakcję) znakowany na 5' końcu izotopem  $^{32}\text{P}$  rozpuszczano w sterylnej wodzie, ogrzewano 1 min. w  $90^\circ\text{C}$ , a następnie wolno chłodzono do temperatury pokojowej. Dodawano bufor TN (ostatecznie  $1\times\text{TN}$ ) i roztwór  $\text{MgCl}_2$  do końcowego stężenia 0; 0,1; 1; 2,5 i 5 mM, po czym mieszaninę inkubowano przez 10 minut w  $65^\circ\text{C}$  i wolno chłodzono do temperatury pokojowej. W celu stabilizacji konformerów RNA próbki umieszczano na 5 minut w lodzie. Przed elektroforezą próbki obciążano  $2\ \mu\text{l}$  25% Ficollu z barwnikami elektroforetycznymi i nakładano bezpośrednio na schłodzony do temperatury  $4^\circ\text{C}$ , niedenaturujący żel poliakryloamidowy. Jednocześnie na żel nakładano ten sam RNA poddany procesowi denaturacji (5 min. /  $100^\circ\text{C}$ ) w formamidzie. Testowano różne warunki etapu denaturacji / renaturacji RNA oraz elektroforezy. Najlepsze warunki rozdzielania różnych form RNA zapewniała elektroforeza prowadzona w żelu o temperaturze  $4^\circ\text{C}$  i usieciowaniu 75:1 oraz bufor elektroforetyczny  $0,5\times\text{TB}$  z Tritonem X-100.



### 4.3. MAPOWANIE STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ RNA

#### 4.3.1. Enzymatyczne mapowanie struktury drugorzędowej RNA

Reakcje ograniczonego trawienia enzymatycznego cząsteczek RNA, znakowanych na 5'-końcu izotopem  $^{32}\text{P}$ , przeprowadzono w buforze  $1 \times \text{TN}$  z  $5 \text{ mM MgCl}_2$  i dodatkiem  $8 \mu\text{M}$  nośnikowego tRNA. Bezpośrednio przed reakcją analizowany RNA ( $30.000 \text{ c.p.m.}$ ) poddawano denaturacji / renaturacji w buforze reakcyjnym:  $1 \text{ min.} / 90^\circ\text{C}$  i powolne chłodzenie do temperatury pokojowej. Następnie dodawano odpowiednią ilość danego enzymu: S1 ( $0,5; 0,75; 1 \text{ U}$ ), T1 ( $0,2; 0,3; 0,4 \text{ U}$ ), A ( $0,1; 0,05; 0,01 \text{ ng}$ ), V1 ( $0,01; 0,005; 0,0025 \text{ U}$ ) i reakcję inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej lub w  $37^\circ\text{C}$  (nukleaza S1). Reakcję kończono dodając bufor „stop” (w stosunku  $1 : 1$ ) i przenosząc do suchego lodu. Produkty reakcji analizowano w denaturujących żelach poliakryloamidowych o odpowiedniej procentowości.

Analogiczne eksperymenty przeprowadzono przy stałych stężeniach enzymów: T1 ( $0,4 \text{ U}$ ), S1 ( $1 \text{ U}$ ), A ( $0,1 \text{ ng}$ ) i V1 ( $0,01 \text{ U}$ ) wobec zmiennego stężenia  $\text{MgCl}_2$  ( $0 - 10 \text{ mM}$ ).

#### 4.3.2. Chemiczne mapowanie struktury drugorzędowej RNA

Przed modyfikacją chemiczną RNA z wykorzystaniem DEPC, analizowany RNA ( $50.000 \text{ c.p.m.}$ ), znakowany na 5'-końcu  $^{32}\text{P}$  i rozpuszczony w sterylnej wodzie denaturowano  $1 \text{ min.}$  w  $90^\circ\text{C}$ . Dodawano bufor TN (ostatecznie  $1 \times \text{TN}$ ) i  $\text{MgCl}_2$  do końcowego stężenia  $5 \text{ mM}$ . Całość inkubowano przez 5 minut w  $65^\circ\text{C}$  i 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano  $0,5 \mu\text{l}$  DEPC i reakcję pozostawiano na 5, 15 lub 30 minut w  $37^\circ\text{C}$ . Mieszaninę reakcyjną strącano dwukrotnie etanolem z dodatkiem  $5 \mu\text{g}$  nośnikowego tRNA i odparowywano do sucha. Do każdej próbki dodawano  $10 \mu\text{l}$  buforu anilinowego ( $\text{pH } 4,5$ ) w celu degradacji łańcucha RNA w miejscach modyfikacji. Inkubowano w ciemności przez 20 minut w  $65^\circ\text{C}$  i ponownie dwukrotnie strącano etanolem z dodatkiem  $5 \mu\text{g}$  nośnikowego tRNA. Osad mieszaniny reakcyjnej odparowywano do sucha. Przed nałożeniem na żel rozpuszczano go w  $5 \mu\text{l}$  sterylnej wody i dodawano  $5 \mu\text{l}$  formamidu z barwnikami. Produkty reakcji analizowano w denaturujących żelach poliakryloamidowych o odpowiedniej procentowości.

Reakcje hydrolizy cząsteczek RNA, znakowanych na 5'-końcu  $^{32}\text{P}$ , rodnikami generowanymi przez Fe(II)-EDTA, prowadzono w buforze zawierającym  $50 \text{ mM Tris-HCl pH } 7,5$ ,  $1 \text{ mM MgCl}_2$  i  $5 \text{ mM DTT}$ . Bezpośrednio przed reakcją analizowany RNA ( $100.000 \text{ c.p.m.}$ ) poddawano denaturacji / renaturacji w buforze reakcyjnym:  $1 \text{ min.} / 90^\circ\text{C}$  i powolne chłodzenie do temperatury pokojowej. Do każdej reakcji (całkowita objętość  $10 \mu\text{l}$ ) dodawano  $1 \mu\text{l}$  świeżo przygotowanego roztworu  $50 \text{ mM}$  heksahydratu siarczanu amonowo-żelazawego (II) i  $1 \mu\text{l}$   $20 \text{ mM EDTA pH } 8,0$ . Reakcje inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5, 10 lub 15 minut. Po reakcji do każdej z próbek dodawano  $10 \mu\text{l}$  formamidu z barwnikami i nakładano bezpośrednio na denaturujący żel poliakrylamidowy.

#### 4.3.3. Hydroliza RNA indukowana jonami $\text{Pb}^{2+}$

Reakcję indukowanego jonami  $\text{Pb}^{2+}$  cięcia RNA, znakowanego na 5'-końcu  $^{32}\text{P}$ , prowadzono w buforze  $1 \times \text{TN}$  z  $10 \text{ mM MgCl}_2$  i  $8 \mu\text{M}$  nośnikowym tRNA. Bezpośrednio przed reakcją analizowany

AMERICAN JOURNAL OF MATHEMATICS

Volume 125, Number 1, February 2003

Editorial Board

Editorial Board

Editorial Board

RNA (30.000 c.p.m.) poddawano denaturacji / renaturacji przez ogrzewanie w buforze reakcyjnym 1 min. / 90°C i powolne chłodzenie do temperatury pokojowej. Następnie dodawano świeżo przygotowany roztwór  $Pb(OAc)_2$  do końcowego stężenia 0,25; 0,5; 1 i 2 mM i reakcję inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję kończono dodając bufor „stop” (w stosunku 1 : 1) i przenosząc do suchego lodu. Produkty reakcji analizowano w denaturujących żelach poliakryloamidowych o odpowiedniej procentowości.

#### 4.3.4. Hydroliza RNA indukowana jonami $Mg^{2+}$

Przed reakcją cięcia RNA w obecności jonów  $Mg^{2+}$ , badane cząsteczki RNA (30,000 c.p.m.), znakowane na 5'-końcu  $^{32}P$ , rozpuszczano w roztworze zawierającym 40 mM NaCl, 8  $\mu$ M nośnikowy tRNA i 0,025 mM EDTA. Mieszaninę ogrzewano przez 1 minutę w temperaturze 90°C, wolno chłodzono do temperatury pokojowej i dodawano bufor Tris-HCl pH 8,5 do końcowego stężenia 10 mM. Następnie dodawano  $MgCl_2$  do ostatecznego stężenia 0,25; 0,5; 1 lub 2 mM i reakcję inkubowano przez 15 godzin w 37°C. Reakcję kończono przez dodanie buforu „stop” (w stosunku 1 : 1) i przeniesienie do suchego lodu. Produkty reakcji analizowano w denaturujących żelach poliakryloamidowych o odpowiedniej procentowości.

#### 4.3.5. Analiza produktów reakcji mapowania struktury RNA

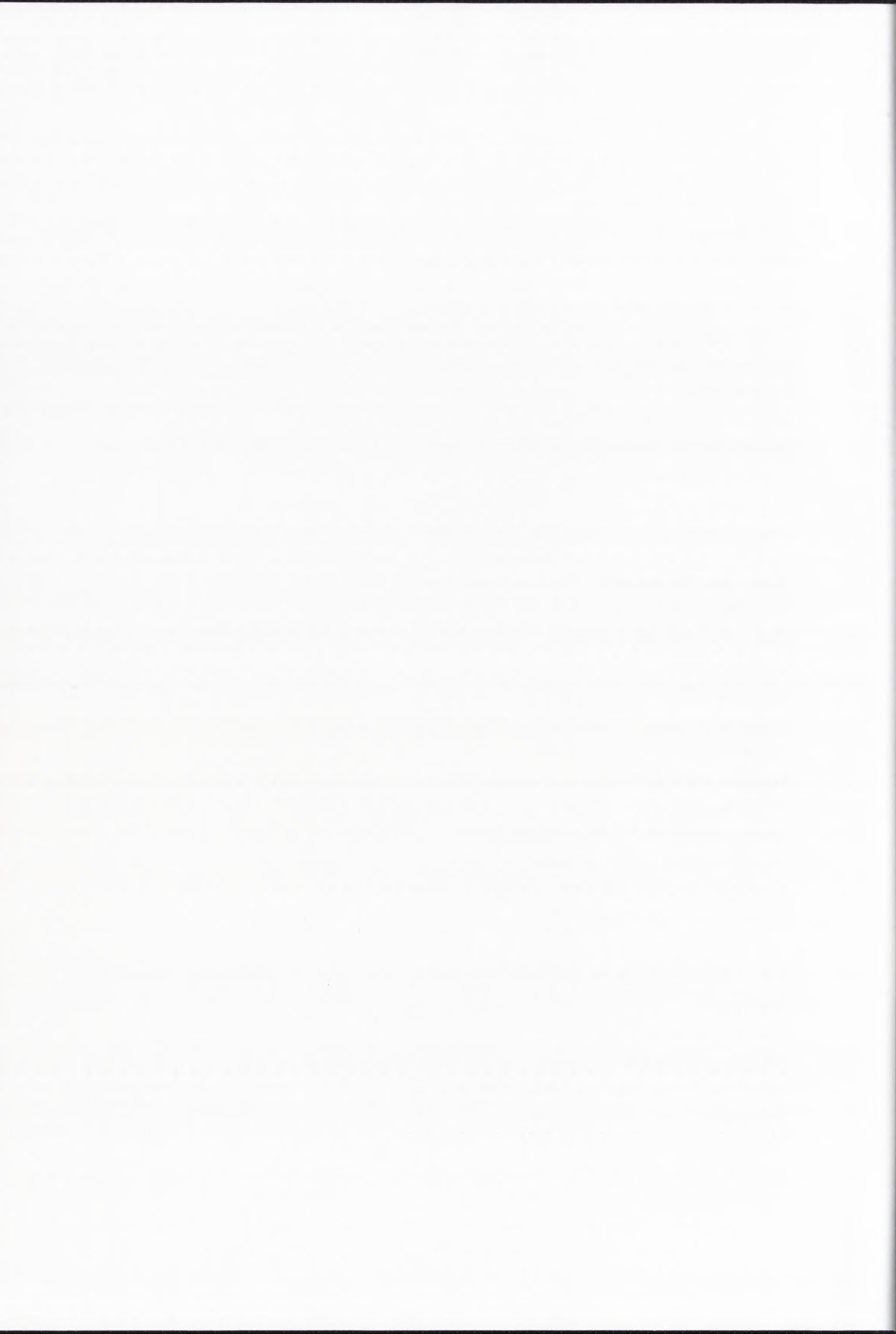
Wszystkie produkty trawień enzymatycznych, cięć chemicznych i indukowanych jonami metali analizowano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakryloamidowym (19:1), z buforem elektroforetycznym 1 $\times$ TBE. Procentowości żelu dobierano w zależności od długości analizowanych cząsteczek RNA. W celu precyzyjnego określenia miejsc cięć hydrolitycznych, produkty reakcji nakładano na żel wraz z produktami hydrolizy formamidem i trawienia rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących, tego samego RNA.

Wszystkie prezentowane wyniki eksperymentów elektroforetycznych były wizualizowane i analizowane ilościowo przy użyciu ekranów odwzorowujących i skanera radioaktywności Typhoon 8600 z oprogramowaniem ImageQuant (Molecular Dynamics).

Reprezentatywne wyniki wszystkich opisanych powyżej i poniżej eksperymentów przedstawiono w rozdziale V. pracy, jednakże w każdym przypadku identyczne rezultaty uzyskano w przynajmniej trzech niezależnych eksperymentach.

#### 4.4. KOMPUTEROWE PRZEWIDYWANIA STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ RNA

Odpowiednie sekwencje rejonu liderowego różnych szczepów wirusów HIV-2 i SIV pobrano z komputerowej bazy danych HIV (<http://hiv-web.lanl.gov>). Przewidywanie struktury drugorzędowej TAR RNA przeprowadzono przy użyciu programu RNA structure PC v. 4.11 i *Mfold* web serwer v. 3.2 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) stosując domyślne ustawienia (234;235). Rozpatrywano wszystkie wygenerowane struktury drugorzędowe, wykazujące w stosunku do najbardziej stabilnego wariantu, różnicę energii swobodnej nie większą niż 10%. Następnie zmieniano parametr wielkości okna oglądu, aby wygenerować struktury blisko spokrewnione. Program *Mfold* 3.2 został także wykorzystany do projektowania, analizowanych w pracy, mutantów TAR-2 RNA.



#### 4.5. EKSPERYMENTY KOMPETYCYJNEJ INHIBICJI HYDROLIZY RNA INDUKOWANEJ JONAMI $Pb^{2+}$

Znakowane na 5'-końcu izotopem  $^{32}P$  cząsteczki RNA poddawano denaturacji / renaturacji w buforze 1xTN przez ogrzewanie 1 min. / 90°C i powolne chłodzenie do temperatury pokojowej. Reakcje prowadzono przy stałym, 2 mM stężeniu  $Pb(OAc)_2$ , w temperaturze pokojowej przez 15 minut, wobec wzrastającego stężenia badanego liganda. Ligand dodawano do mieszaniny reakcyjnej 5 min. przed dodaniem roztworu  $Pb(OAc)_2$ , chociaż dodanie liganda bezpośrednio przed roztworem  $Pb(OAc)_2$  nie miało wpływu na wynik eksperymentu. Stosowano następujące stężenia odpowiednich ligandów:  $MgCl_2$  i  $CaCl_2$  (1; 2; 5; 10; 20; 30; 40 i 50 mM),  $Co(NH_3)_6Cl_3$  (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; i 5 mM). Wszystkie reakcje kończono przez dodanie buforu „stop” (w stosunku 1 : 1) i zamrożenie w suchym lodzie. Produkty reakcji rozdzielano w denaturującym żelu poliakryloamidowym, wizualizowano i analizowano ilościowo przy użyciu ekranów odwzorowujących i skanera radioaktywności Typhoon 8600 z oprogramowaniem ImageQuant (Molecular Dynamics).

Eksperymenty badające wpływ amidu argininy na indukowane w obecności jonów  $Pb^{2+}$  cięcia RNA prowadzono w analogiczny sposób. Stosowano następujące stężenia amidu argininy (1; 2; 5; 10; 20; 30; 40 i 50 mM). Dodatkowo zbadano wpływ obecności  $MgCl_2$  w buforze reakcyjnym na wynik tych eksperymentów i okazało się, że jony  $Mg^{2+}$  nie wprowadzały żadnych istotnych zmian.

#### 4.6. NADEKSPRESJA I OCZYSZCZANIE WIRUSOWEGO BIAŁKA TAT-2 I LUDZKIEJ CYKLINY T1

Wirusowe białko Tat-2 oraz N-końcowy fragment ludzkiej cykliny T1 otrzymano w postaci białek fuzyjnych z S-transferazą glutationową (GST), w oparciu o plazmid pGEX-2T z wklonowanym genem białka Tat-2 lub plazmid GST-hCycT1 303. Nadekspresję białek przetestowałam w różnych szczepach *E. coli* i ostatecznie zdecydowałam się na *E. coli* BL21 - Codon Plus (DE3) – RIL. Białka fuzyjne oczyszczano na sefarozie S-glutationowej i poddawano trawieniu trombiną.

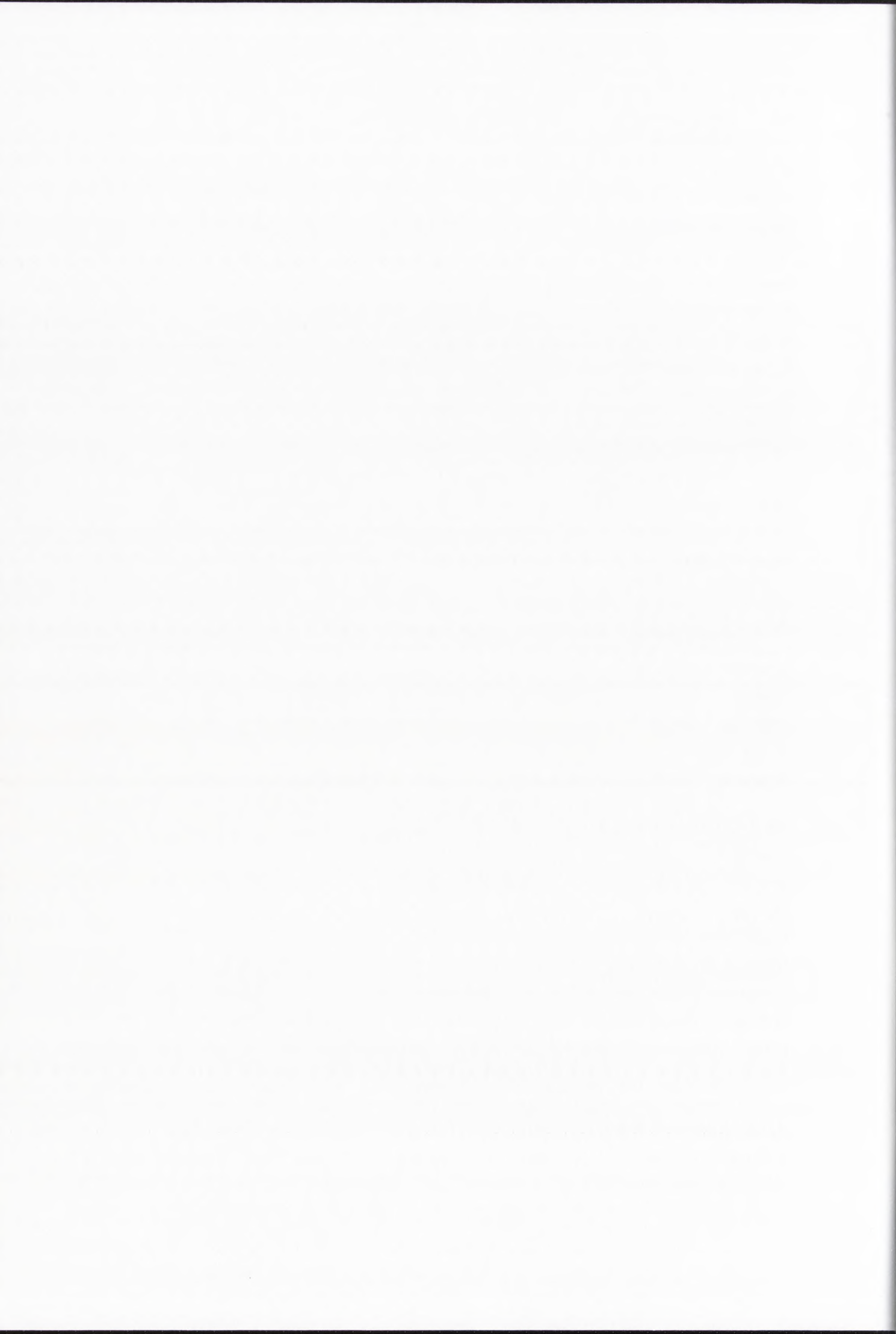
##### 4.6.1. Transformacja komórek *E. coli*

Plazmid kodujący białko GST-Tat-2 lub plazmid kodujący GST-hCycT1 303 wprowadzano do komórek kompetentnych *E. coli* BL21 – Codon Plus (DE3) – RIL metodą szoku temperaturowego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie i do 20  $\mu$ l zawiesiny komórkowej dodawano 30 - 40 ng odpowiedniego plazmidu, po czym całość inkubowano w lodzie przez 30 minut. Zawiesinę komórkową umieszczano w 42°C na 20 - 25 sekund, następnie inkubowano w lodzie przez kolejne 2 minuty. Dodawano 1 ml pożywki SOC, całość przenoszono do falkonów o objętości 10 ml i hodowano w temperaturze 37°C przez 1h, z wytrząsaniem (225 – 250 r.p.m.). Zawiesinę stransformowanych bakterii (100  $\mu$ l) rozprowadzono na powierzchni płytek agarozowych z pożywką LB, ampicyliną i chloramfenikolem, hodowlę prowadzono przez 16 h w temperaturze 37°C.

##### 4.6.2. Nadekspresja białek GST-Tat-2 i GST- hCycT1 303 w systemie *E.coli*

Bakteriami pochodzącymi z pojedynczej kolonii *E.coli* BL21 - Codon Plus (DE3) – RIL z plazmidem kodującym białko GST-Tat-2 lub GST-hCycT1 303 infekowano 20 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną i chloramfenikolem. Prekulturę prowadzono przez noc w temperaturze 37°C z wytrząsaniem





(225 – 250 r.p.m.). Następnego dnia prekulturę bakteryjną przeszczepiano do 1000 ml ( $4 \times 250$  ml) świeżej pożywki LB z ampicyliną i chloramfenikolem, hodowlę prowadzono przez 2 – 3 godziny w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (225 – 250 r.p.m.). Nadekspresję białka indukowano we wczesnej fazie logarytmicznej ( $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ ) przez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Hodowlę kontynuowano przez kolejne 3 godziny (GST-Tat-2) lub 5 godzin (GST-hCycT1 303) w takich samych warunkach. Po zakończeniu hodowli kulturę zwirowywano 15 min. / 4°C / 5.000 r.p.m. i otrzymany osad zawieszano w 10 ml buforu L. Osad przechowywano w temperaturze -20°C przez noc. Następnie osad rozmrażano i poddawano sonikacji na lodzie,  $2 \times 30$  sekund z 1 minutowymi przerwami. W celu oddzielenia pozostałości komórek oraz nierozpuszczalnej frakcji białkowej, sonikat wirowano 40 min. / 4°C / 15.000 r.p.m. Supernat oddzielano od osadu i zawarte w nim białka rozpuszczalne poddawano dalszemu oczyszczaniu.

Przebieg hodowli i wydajność nadekspresji kontrolowano metodą elektroforezy białkowej w żelu poliakryloamidowym z SDS.

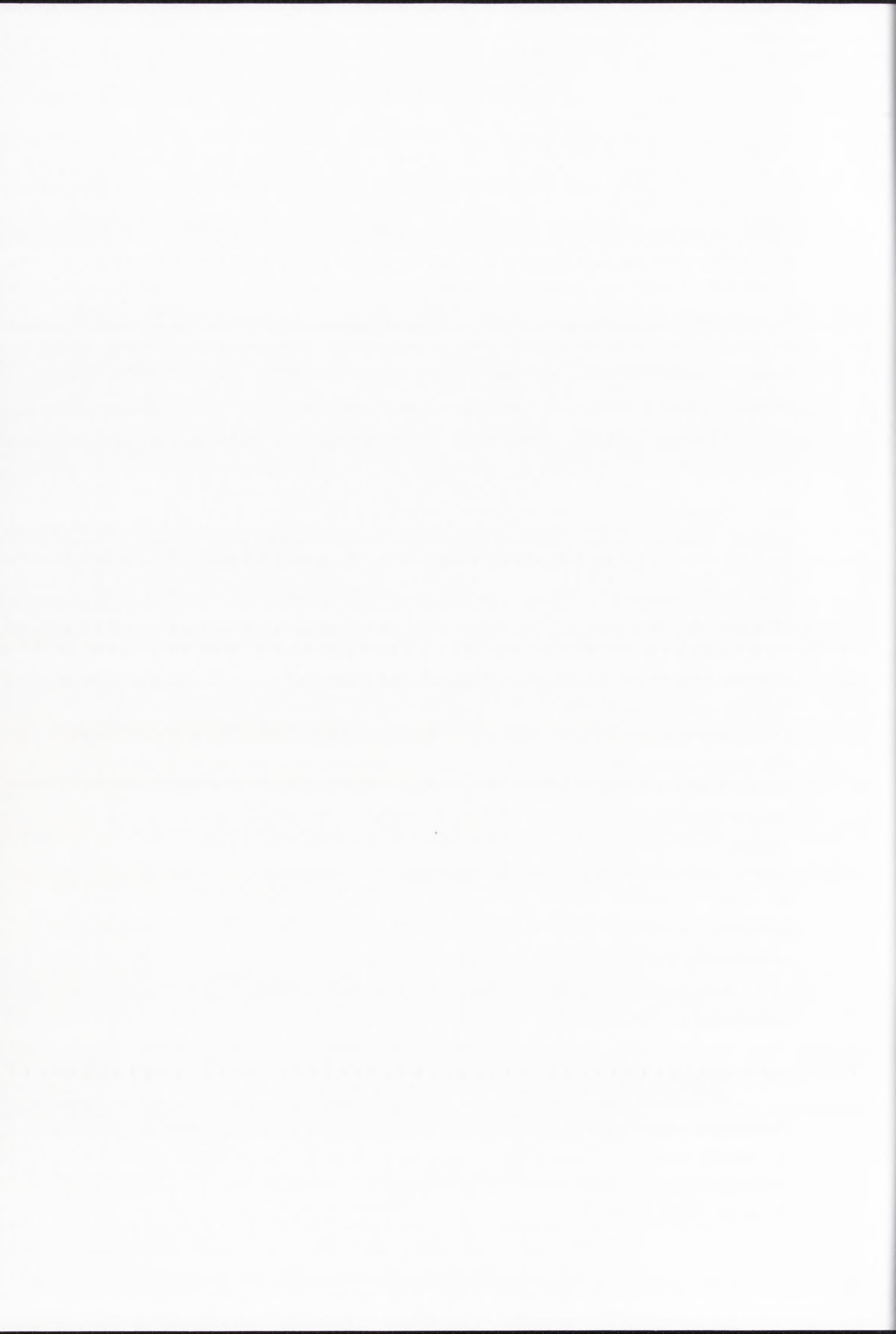
#### 4.6.3. Oczyszczanie rekombinantowych białek Tat-2 i cykliny T1

Zarówno wirusowe białko Tat-2 jak i ludzką cyklinę T1 otrzymywano w postaci białek fuzyjnych z S-transferazą glutationową (GST) i jako takie poddawano oczyszczaniu na sefarozie S-glutationowej. Zgodnie z zaleceniami producenta sefarozę przygotowano przez kilkukrotne płukanie zimnym buforem PBS pH 7,4. Do oczyszczenia każdego z białek stosowano 750  $\mu$ l sefarozy na supernatant pochodzący z 1000 ml hodowli bakteryjnej. Do supernatantu dodawano inhibitory proteaz (10  $\mu$ l na 1 ml supernatantu) i przygotowaną sefarozę. W celu związania obecnego w supernatancie białka fuzyjnego całość inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem. Następnie sefarozę oddzielano od supernatantu przez łagodne wirowanie. Aby oczyścić złoże od niespecyficznie związanych innych białek, poddawano je dwukrotnemu płukaniu każdym z następujących buforów, w kolejności: bufor I, bufor II, bufor I, bufor III. Ostatnie płukanie prowadzono w buforze dla trombiny. Do każdego płukania dodawano trzykrotnie większą objętość buforu niż objętość sefarozy. Po każdym płukaniu złoże delikatnie zwirowywano, odlewano bufor i dodawano kolejną porcję odpowiedniego, świeżego buforu. Po ostatnim wirowaniu do złoża dodawano 200  $\mu$ l buforu dla trombiny i 5 U trombiny. Reakcję trawienia prowadzono przez noc w temperaturze 4°C. Roztwór zawierający białko zbierano z sefarozy i przechowywano w temperaturze 4°C.

Poszczególne etapy oczyszczania kontrolowano metodą elektroforezy białkowej w żelu poliakryloamidowym z SDS.

#### 4.7. ANALIZA MIGRACJI KOMPLEKSÓW RNA / TAT-2 I RNA / TAT-2 / CYKLINA T1 W ŻELACH POLIAKRYLOAMIDOWYCH W WARUNKACH NATYWNYCH

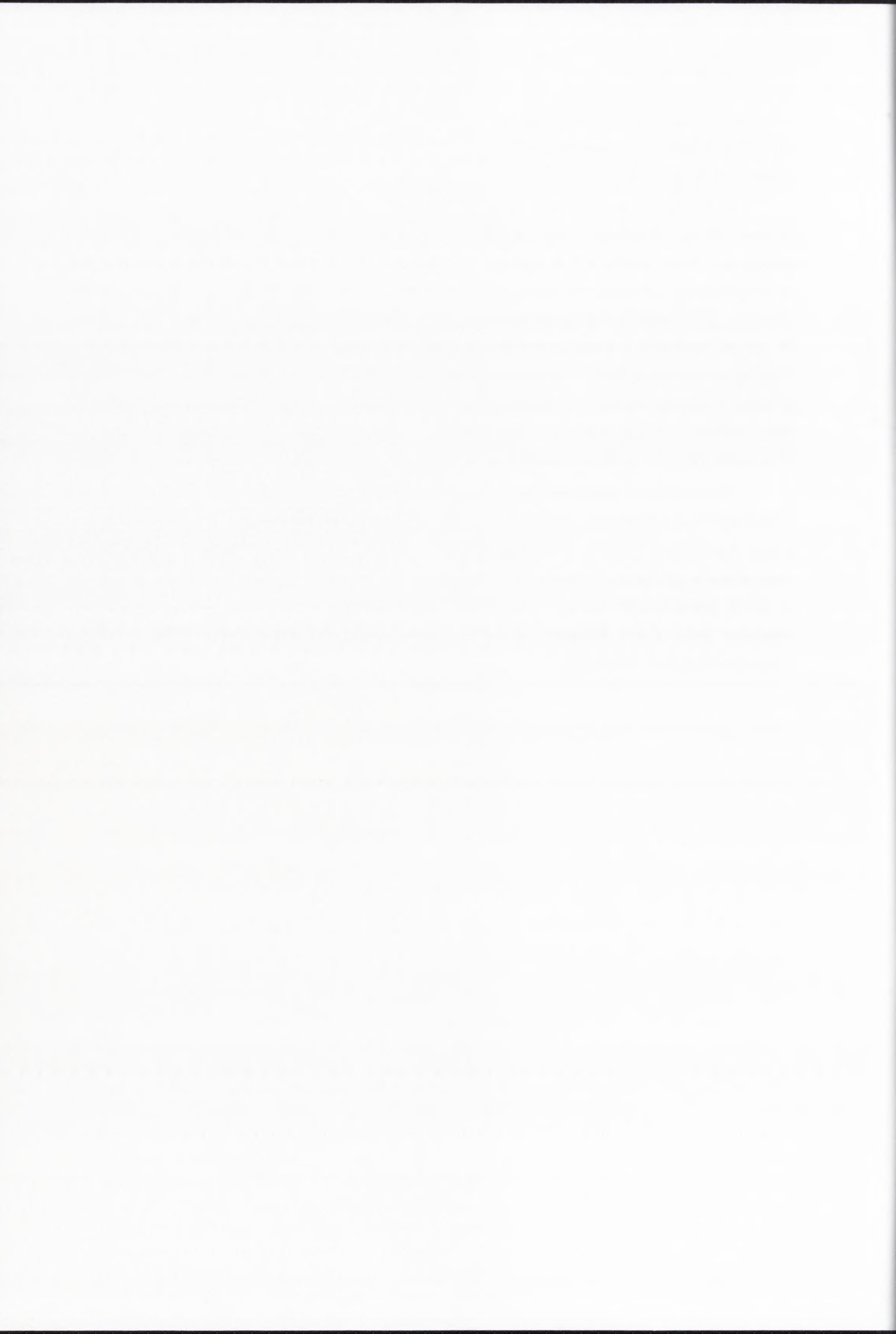
Bezpośrednio przed reakcją analizowany RNA (30.000 c.p.m.) poddawano denaturacji / renaturacji w sterylnej wodzie: 1 min. / 90°C i powolne chłodzenie do temperatury pokojowej. Formowanie kompleksów RNA / białko Tat-2 prowadzono w skali 10  $\mu$ l w buforze  $1 \times TK$ , dodatkowo do każdej reakcji dodawano 0,5  $\mu$ g nośnikowego tRNA. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut



w lodzie. Stosowano następujące ilości białka Tat-2 (0; 2,5; 5; 10; 25 i 50 ng) wobec stałej ilości RNA. Analizę formowania kompleksów RNA / cyklina T1 przeprowadzono w taki sam sposób, z wyjątkiem dodania 2 mM ZnCl<sub>2</sub> do buforu TK.

Formowanie kompleksów trójskładnikowych RNA / Tat-2 / cyklina T1 było bardziej skomplikowane. Stosowano dwa podejścia eksperymentalne. W jednym najpierw formowano kompleksy Tat-2 / cyklina T1 w buforze 1 × TK z 2 mM ZnCl<sub>2</sub>. Po 15 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej do mieszaniny kompleksów białkowych dodawano analizowany RNA (30.000 c.p.m.) razem z 0,5 μg nośnikowego tRNA. Całość inkubowano przez 10 minut w lodzie. W drugim podejściu w procesie asocjacji dodawano jednocześnie oba białka, analizowany RNA i 0,5 μg nośnikowego tRNA i całość inkubowano w buforze 1 × TK z 2 mM ZnCl<sub>2</sub> przez 10 minut w lodzie. Ponieważ nie zaobserwowano istotnej różnicy w obrazie otrzymywanych żeli, standardowo wykorzystywano drugie podejście eksperymentalne. W każdym procesie wiązania stosowano stałą ilość białka Tat-2 (5 ng) i RNA (30.000 c.p.m.) wobec rosnącego stężenia cykliny T1 (2,5; 5 i 10 ng).

Po inkubacji w lodzie wszystkie analizowane próby obciążano 2 μl 25% Ficollu barwnikami i nakładano bezpośrednio na schłodzony do temperatury 4°C, niedenaturujący żel poliakryloamidowy (75:1) zawierający 0,5×TB z Tritonem X-100. Wszystkie elektroforezy prowadzono w niskiej, kontrolowanej temperaturze żelu (4°C). W zależności od długości analizowanych RNA używano żele o różnej procentowości (6 lub 10%). Wyniki eksperymentów były wizualizowane i analizowane ilościowo przy użyciu ekranów odwzorowujących i skanera radioaktywności Typhoon 8600 z oprogramowaniem ImageQuant.



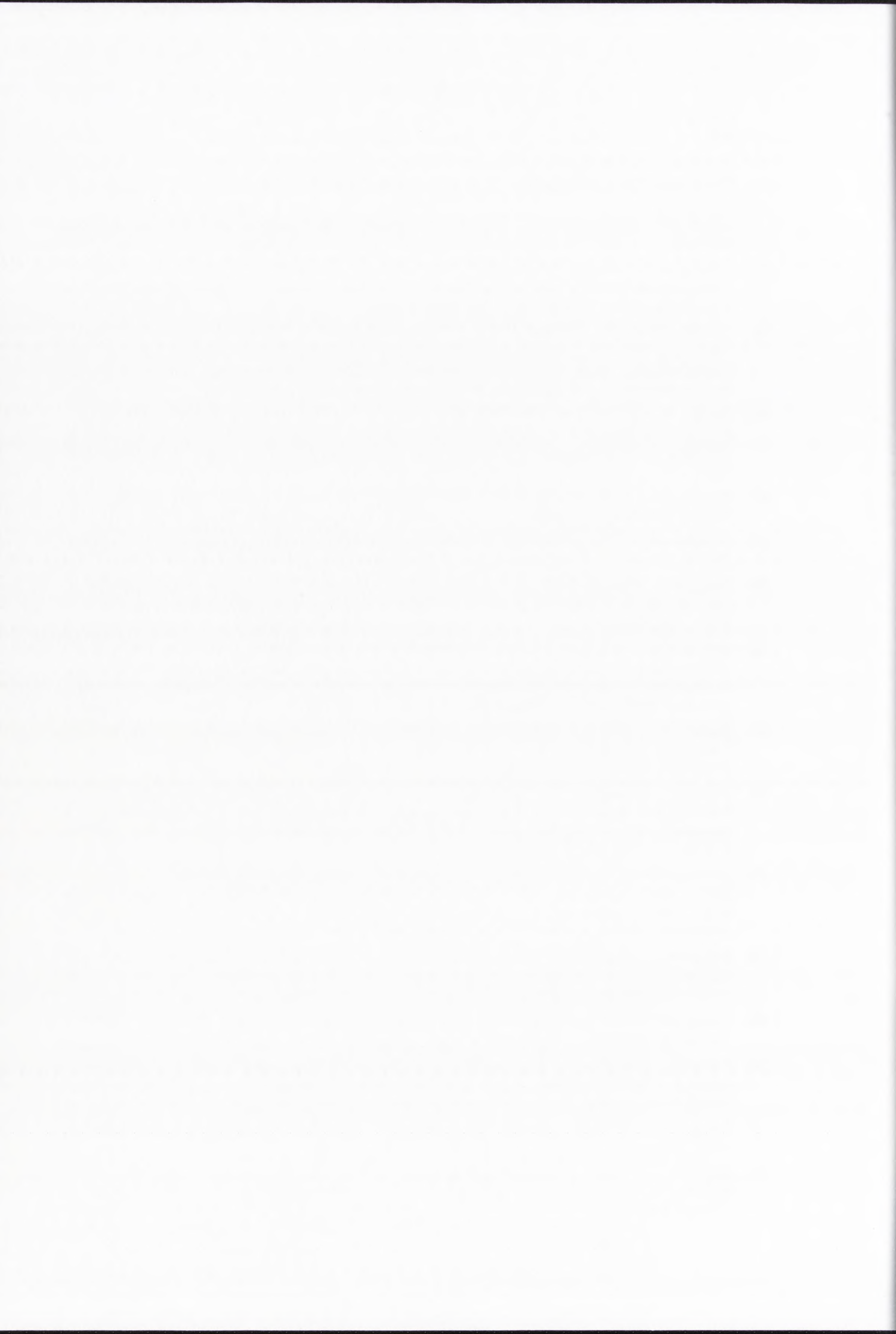
**VIII. BIBLIOGRAFIA**

1. Bock,P.J. and Markovitz,D.M. (2001) Infection with HIV-2. *AIDS*, **15 Suppl 5**, S35-S45.
2. Reeves,J.D. and Doms,R.W. (2002) Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol.*, **83**, 1253-1265.
3. Lemey,P., Pybus,O.G., Wang,B., Saksena,N.K., Salemi,M. and Vandamme,A.M. (2003) Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6588-6592.
4. Hahn,B.H., Shaw,G.M., De Cock,K.M. and Sharp,P.M. (2000) AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, **287**, 607-614.
5. Romieu,I., Marlink,R., Kanki,P., M'Boup,S. and Essex,M. (1990) HIV-2 link to AIDS in West Africa. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **3**, 220-230.
6. Soriano,V., Gomes,P., Heneine,W., Holguin,A., Doruana,M., Antunes,R., Mansinho,K., Switzer,W.M., Araujo,C., Shanmugam,V. *et al.* (2000) Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med. Virol.*, **61**, 111-116.
7. Miller,R.J., Cairns,J.S., Bridges,S. and Sarver,N. (2000) Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol.*, **74**, 7187-7195.
8. Hirsch,V.M., Olmsted,R.A., Murphey-Corb,M., Purcell,R.H. and Johnson,P.R. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*, **339**, 389-392.
9. Balzarini,J. (2002) Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors of HIV-1. In Emini,E.A. (ed.), *The Human Immunodeficiency Virus. Biology, Immunology and Therapy*. Princeton University Press, pp. 132-171.
10. Condra,J.H. and Vacca,J.P. (2002) HIV-1 Protease Inhibitors. In Emini,E.A. (ed.), *The Human Immunodeficiency Virus. Biology, Immunology and Therapy*. Princeton University Press, pp. 172-222.
11. Götte,M., Spira,S. and Wainberg,M.A. (2002) Nucleoside Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase and the Problem of Drug Resistace. In Emini,E.A. (ed.), *The Human Immunodeficiency Virus. Biology, Immunology and Therapy*. Princeton University Press, pp. 100-131.
12. Jones,K.A. (1997) Taking a new TAK on tat transactivation. *Genes Dev.*, **11**, 2593-2599.
13. Karn,J. (1999) Tackling Tat. *J Mol. Biol*, **293**, 235-254.
14. Berkhout,B. (2000) Multiple biological roles associated with the repeat (R) region of the HIV-1 RNA genome. *Adv. Pharmacol.*, **48**, 29-73.
15. Berkhout,B., Ooms,M., Beerens,N., Huthoff,H., Southern,E. and Verhoef,K. (2002) In vitro evidence that the untranslated leader of the HIV-1 genome is an RNA checkpoint that regulates multiple functions through conformational changes. *J Biol Chem.*, **277**, 19967-19975.
16. Berkhout,B. (1996) Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*, **54**, 1-34.
17. Arya,S.K. and Gallo,R.C. (1988) Human immunodeficiency virus type 2 long terminal repeat: analysis of regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9753-9757.
18. Berkhout,B. (1992) Structural features in TAR RNA of human and simian immunodeficiency viruses: a phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 27-31.
19. Emerman,M., Guyader,M., Montagnier,L., Baltimore,D. and Muesing,M.A. (1987) The specificity of the human immunodeficiency virus type 2 transactivator is different from that of human immunodeficiency virus type 1. *EMBO J*, **6**, 3755-3760.
20. Barin,F., M'Boup,S., Denis,F., Kanki,P., Allan,J.S., Lee,T.H. and Essex,M. (1985) Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet*, **2**, 1387-1389.
21. Clavel,F., Guyader,M., Guetard,D., Salle,M., Montagnier,L. and Alizon,M. (1986) Molecular



- cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*, **324**, 691-695.
22. Myers,G., MacInnes,K. and Korber,B. (1992) The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **8**, 373-386.
  23. Guyader,M., Emerman,M., Sonigo,P., Clavel,F., Montagnier,L. and Alizon,M. (1987) Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*, **326**, 662-669.
  24. Chakrabarti,L., Guyader,M., Alizon,M., Daniel,M.D., Desrosiers,R.C., Tiollais,P. and Sonigo,P. (1987) Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature*, **328**, 543-547.
  25. Chen,Z., Luckay,A., Sodora,D.L., Telfer,P., Reed,P., Gettie,A., Kanu,J.M., Sadek,R.F., Yee,J., Ho,D.D. *et al.* (1997) Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol.*, **71**, 3953-3960.
  26. Gao,F., Yue,L., Robertson,D.L., Hill,S.C., Hui,H., Biggar,R.J., Neequaye,A.E., Whelan,T.M., Ho,D.D., Shaw,G.M. *et al.* (1994) Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol.*, **68**, 7433-7447.
  27. Bryceson,A., Tomkins,A., Ridley,D., Warhurst,D., Goldstone,A., Bayliss,G., Toswill,J. and Parry,J. (1988) HIV-2-associated AIDS in the 1970s. *Lancet*, **2**, 221.
  28. Bouckenoghe,A. and Shandera,W. (1999) HIV trends in African blood donors. *J Infect.*, **39**, 122-128.
  29. Smith,N.A., Shaw,T., Berry,N., Vella,C., Okorafor,L., Taylor,D., Ainsworth,J., Choudhury,A., Daniels,R.S., El-Gadi,S. *et al.* (2001) Antiretroviral therapy for HIV-2 infected patients. *J Infect.*, **42**, 126-133.
  30. Marlink,R.G., Ricard,D., M'Boup,S., Kanki,P.J., Romet-Lemonne,J.L., N'Doye,I., Diop,K., Simpson,M.A., Greco,F., Chou,M.J. *et al.* (1988) Clinical, hematologic, and immunologic cross-sectional evaluation of individuals exposed to human immunodeficiency virus type-2 (HIV-2). *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **4**, 137-148.
  31. Mellors,J.W., Munoz,A., Giorgi,J.V., Margolick,J.B., Tassoni,C.J., Gupta,P., Kingsley,L.A., Todd,J.A., Saah,A.J., Detels,R. *et al.* (1997) Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med.*, **126**, 946-954.
  32. Michel,P., Balde,A.T., Roussilhon,C., Aribot,G., Sarthou,J.L. and Gougeon,M.L. (2000) Reduced immune activation and T cell apoptosis in human immunodeficiency virus type 2 compared with type 1: correlation of T cell apoptosis with beta2 microglobulin concentration and disease evolution. *J Infect. Dis.*, **181**, 64-75.
  33. Shanmugam,V., Switzer,W.M., Nkengasong,J.N., Garcia-Lerma,G., Green,T.A., Ekpini,E., Sassan-Morokro,M., Antunes,F., Manshino,K., Soriano,V. *et al.* (2000) Lower HIV-2 plasma viral loads may explain differences between the natural histories of HIV-1 and HIV-2 infections. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **24**, 257-263.
  34. Popper,S.J., Sarr,A.D., Gueye-Ndiaye,A., Mboup,S., Essex,M.E. and Kanki,P.J. (2000) Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol.*, **74**, 1554-1557.
  35. Roberts,N.A., Craig,J.C. and Duncan,I.B. (1992) HIV proteinase inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 513-516.
  36. Rodes,B., Holguin,A., Soriano,V., Dourana,M., Mansinho,K., Antunes,F. and Gonzalez-Lahoz,J. (2000) Emergence of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 2-infected subjects undergoing antiretroviral therapy. *J Clin. Microbiol.*, **38**, 1370-1374.
  37. Travers,K.U., Eisen,G.E., Marlink,R.G., Essex,M.E., Hsieh,C.C., Mboup,S. and Kanki,P.J. (1998) Protection from HIV-1 infection by HIV-2. *AIDS*, **12**, 224-225.
  38. Arya,S.K. and Gallo,R.C. (1996) Human immunodeficiency virus (HIV) type 2-mediated inhibition of HIV type 1: a new approach to gene therapy of HIV-infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4486-4491.

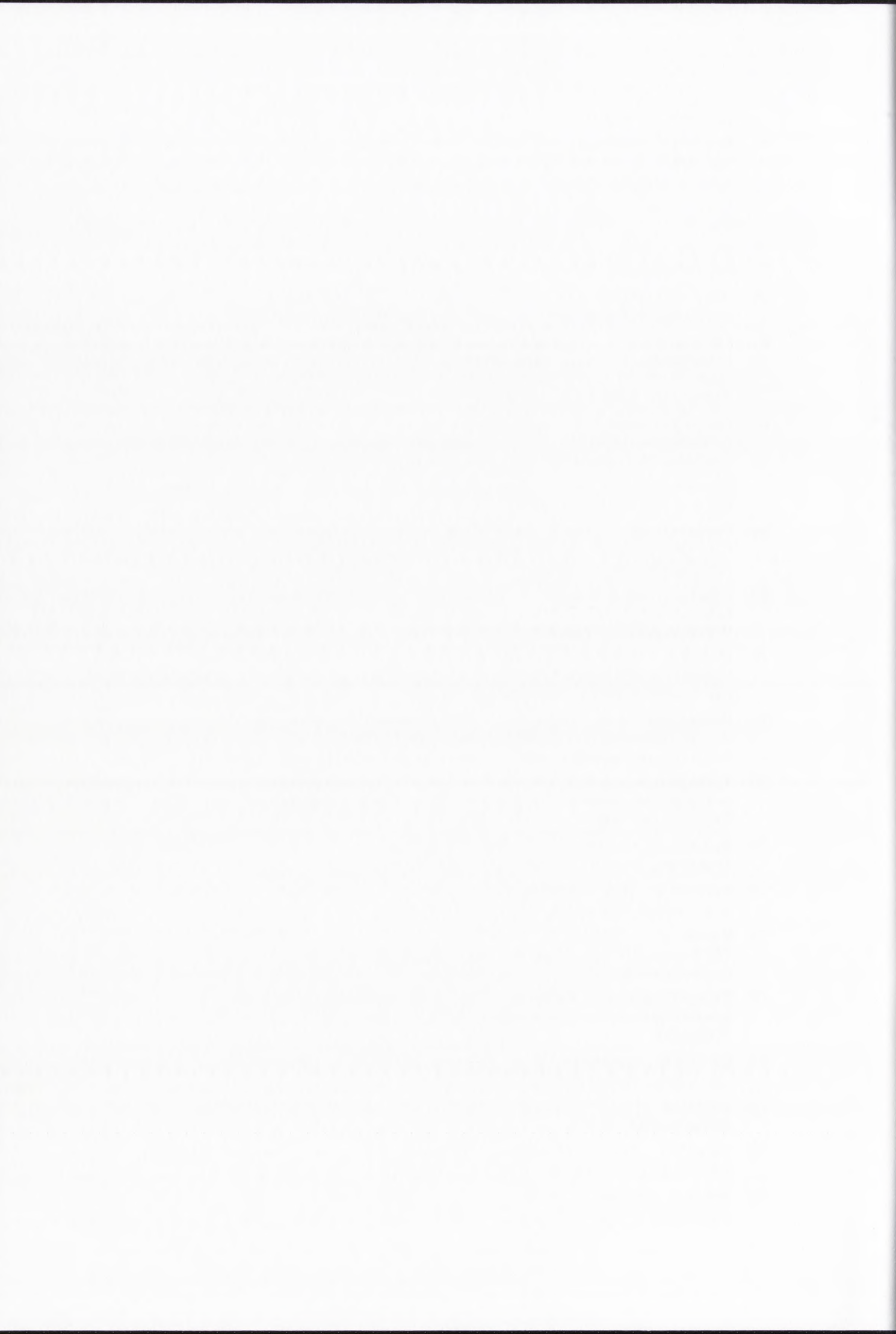




39. Cherry,E. and Wainberg,M.A. (2002) The Structure and Biology of HIV-1:Introduction. In Emini,E.A. (ed.), *The Human Immunodeficiency Virus* . Princeton University Press, pp. 1-44.
40. Gelderblom,H.R., Hausmann,E.H., Ozel,M., Pauli,G. and Koch,M.A. (1987) Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*, **156**, 171-176.
41. Vogt,V.M. (1997) Retroviral Virions and Genomes. In Coffin,J.M., Hughes,S.H. and Varmus,H.E. (eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 27-70.
42. Paillart,J.C., Shehu-Xhilaga,M., Marquet,R. and Mak,J. (2004) Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 461-472.
43. Anderson,J.P., Rain,M., Shringer,D., Rodrigo,A.G., Wang,Y., Nickle,D., Learn,G.H., Naugler,W.E. and Mullins,J.I. (2002) The Genetics of HIV-1. *The Human Immunodeficiency Virus. Biology, Immunology and Therapy*. Princeton University Press, pp. 44-99.
44. Rabson,A.B. and Graves,B.J. (1997) Synthesis and Processing of Viral RNA. In Coffin,J.M., Hughes,S.H. and Varmus,H.E. (eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 205-262.
45. Berkhout,B. and Jeang,K.T. (1992) Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol.*, **66**, 139-149.
46. Klaver,B. and Berkhout,B. (1994) Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J Virol.*, **68**, 3830-3840.
47. Berkhout,B. and Schoneveld,I. (1993) Secondary structure of the HIV-2 leader RNA comprising the tRNA-primer binding site. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1171-1178.
48. Chiu,Y.L., Coronel,E., Ho,C.K., Shuman,S. and Rana,T.M. (2001) HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J Biol Chem.*, **276**, 12959-12966.
49. Chiu,Y.L., Ho,C.K., Saha,N., Schwer,B., Shuman,S. and Rana,T.M. (2002) Tat stimulates cotranscriptional capping of HIV mRNA. *Mol. Cell*, **10**, 585-597.
50. Alfadhli,A., Dhenub,T.C., Still,A. and Barklis,E. (2005) Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly. *J Virol.*, **79**, 14498-14506.
51. Wills,J.W. and Craven,R.C. (1991) Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS*, **5**, 639-654.
52. Resh,M.D. (2005) Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev.*, **7**, 84-91.
53. Jacks,T., Power,M.D., Masiarz,F.R., Luciw,P.A., Barr,P.J. and Varmus,H.E. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, **331**, 280-283.
54. Reeves,J.D., Hibbitts,S., Simmons,G., McKnight,A., zevedo-Pereira,J.M., Moniz-Pereira,J. and Clapham,P.R. (1999) Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J Virol.*, **73**, 7795-7804.
55. Jeang,K.T., Chang,Y., Berkhout,B., Hammarskjold,M.L. and Rekosh,D. (1991) Regulation of HIV expression: mechanisms of action of Tat and Rev. *AIDS*, **5 Suppl 2**, S3-14.
56. Jones,K.A. (1989) HIV trans-activation and transcription control mechanisms. *New Biol*, **1**, 127-135.
57. Emerman,M. and Malim,M.H. (1998) HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, **280**, 1880-1884.
58. Trono,D. (1995) HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell*, **82**, 189-192.
59. Michienzi,A., Deangelis,F.G., Bozzoni,I. and Rossi,J.J. (2006) A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS Res. Ther.*, **3**, 13.
60. Dillon,P.J., Nelbock,P., Perkins,A. and Rosen,C.A. (1990) Function of the human immunodeficiency virus types 1 and 2 Rev proteins is dependent on their ability to interact with



- a structured region present in env gene mRNA. *J Virol.*, **64**, 4428-4437.
61. Malim, M.H., Bohnlein, S., Fenrick, R., Le, S.Y., Maizel, J.V. and Cullen, B.R. (1989) Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8222-8226.
  62. Das, S.R. and Jameel, S. (2005) Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med. Res.*, **121**, 315-332.
  63. Balog, K. and Minarovits, J. (2006) Nef: a pleiotropic modulator of primate lentivirus infectivity and pathogenesis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **53**, 51-75.
  64. Roeth, J.F. and Collins, K.L. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol Rev.*, **70**, 548-563.
  65. Fletcher, T.M., III, Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M.A., Stivahtis, G., Sharp, P.M., Emerman, M., Hahn, B.H. and Stevenson, M. (1996) Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). *EMBO J*, **15**, 6155-6165.
  66. Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H. and Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med.*, **4**, 65-71.
  67. KewalRamani, V.N. and Emerman, M. (1996) Vpx association with mature core structures of HIV-2. *Virology*, **218**, 159-168.
  68. Mahalingam, S., Van, T.B., Santiago, M.L., Gao, F., Shaw, G.M. and Hahn, B.H. (2001) Functional analysis of the simian immunodeficiency virus Vpx protein: identification of packaging determinants and a novel nuclear targeting domain. *J Virol.*, **75**, 362-374.
  69. Adachi, A., Iida, S., Fukumori, T., Tamaki, M., Inubushi, R., Shimano, R., Oshima, Y., Akari, H. and Koyama, A.H. (1999) Exchangeability of accessory Vif and Vpu proteins between various HIV/SIVs (review). *Int. J. Mol. Med.*, **3**, 193-197.
  70. Henriot, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Paillart, J.C. and Marquet, R. (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol. Biol.*, **354**, 55-72.
  71. Reeves, J.D. and Schulz, T.F. (1997) The CD4-independent tropism of human immunodeficiency virus type 2 involves several regions of the envelope protein and correlates with a reduced activation threshold for envelope-mediated fusion. *J Virol.*, **71**, 1453-1465.
  72. Telesnitsky, A. and Goff, S.P. (1997) Reverse Transcriptase and Generation of Retroviral RNA. In Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Laboratory Press, pp. 121-160.
  73. Kulkosky, J. and Skalka, A.M. (1994) Molecular mechanism of retroviral DNA integration. *Pharmacol. Ther.*, **61**, 185-203.
  74. Brown, P.O. (1997) Integration. In Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Laboratory Press, pp. 121-204.
  75. Bieniasz, P.D., Grdina, T.A., Bogerd, H.P. and Cullen, B.R. (1999) Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7791-7796.
  76. Kaye, J.F. and Lever, A.M. (1999) Human immunodeficiency virus types 1 and 2 differ in the predominant mechanism used for selection of genomic RNA for encapsidation. *J Virol.*, **73**, 3023-3031.
  77. Lever, A.M., Richardson, J.H. and Harrison, G.P. (1991) Retroviral RNA packaging. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 963-966.
  78. Vogt, V.M. (1996) Proteolytic processing and particle maturation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **214**, 95-131.
  79. Fuller, S.D., Wilk, T., Gowen, B.E., Krausslich, H.G. and Vogt, V.M. (1997) Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr. Biol.*, **7**, 729-738.
  80. Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J.L., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1993) Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural

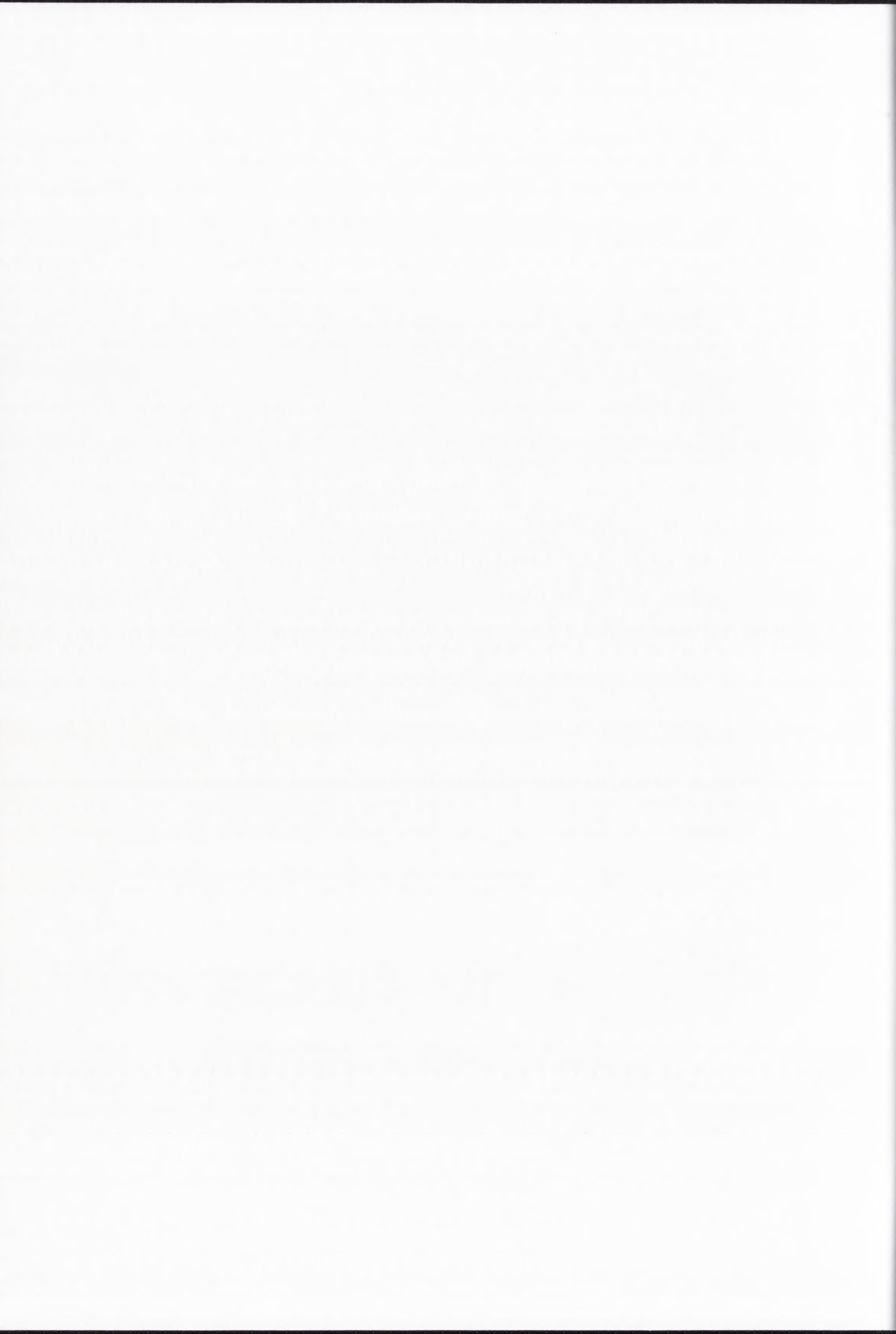


- domains. *J Mol. Biol*, **229**, 382-397.
81. Aboul-ela,F., Karn,J. and Varani,G. (1996) Structure of HIV-1 TAR RNA in the absence of ligands reveals a novel conformation of the trinucleotide bulge. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3974-3981.
  82. Beaurain,F. and Laguerre,M. (2003) MD studies of the DIS/DIS kissing complex solution and x-ray structures. *Oligonucleotides.*, **13**, 501-514.
  83. Kieken,F., Paquet,F., Brule,F., Paoletti,J. and Lancelot,G. (2006) A new NMR solution structure of the SL1 HIV-1Lai loop-loop dimer. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 343-352.
  84. Kasprzak,W., Bindewald,E. and Shapiro,B.A. (2005) Structural polymorphism of the HIV-1 leader region explored by computational methods. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 7151-7163.
  85. Ooms,M., Verhoef,K., Southern,E., Huthoff,H. and Berkhout,B. (2004) Probing alternative foldings of the HIV-1 leader RNA by antisense oligonucleotide scanning arrays. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 819-827.
  86. Dirac,A.M., Huthoff,H., Kjems,J. and Berkhout,B. (2001) The dimer initiation site hairpin mediates dimerization of the human immunodeficiency virus, type 2 RNA genome. *J Biol Chem.*, **276**, 32345-32352.
  87. Rhim,H. and Rice,A.P. (1994) Functional significance of the dinucleotide bulge in stem-loop1 and stem-loop2 of HIV-2 TAR RNA. *Virology*, **202**, 202-211.
  88. Huthoff,H. and Berkhout,B. (2001) Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA*, **7**, 143-157.
  89. Dirac,A.M., Huthoff,H., Kjems,J. and Berkhout,B. (2002) Regulated HIV-2 RNA dimerization by means of alternative RNA conformations. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2647-2655.
  90. Ooms,M., Huthoff,H., Russell,R., Liang,C. and Berkhout,B. (2004) A riboswitch regulates RNA dimerization and packaging in human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol.*, **78**, 10814-10819.
  91. Oude Essink,B.B., Das,A.T. and Berkhout,B. (1996) HIV-1 reverse transcriptase discriminates against non-self tRNA primers. *J Mol. Biol*, **264**, 243-254.
  92. Ehresmann,C., Ehresmann,B., Marquet,R. and Wainberg (1998) Sequence analysis of the primer binding site (PBS) region of the RNA genome of simian and human immunodeficiency viruses (SIV and HIV). *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1134.
  93. Isel,C., Ehresmann,C., Keith,G., Ehresmann,B. and Marquet,R. (1995) Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol. Biol*, **247**, 236-250.
  94. Goldschmidt,V., Paillart,J.C., Rigourd,M., Ehresmann,B., Aubertin,A.M., Ehresmann,C. and Marquet,R. (2004) Structural variability of the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem.*, **279**, 35923-35931.
  95. Dillon,P.J., Nelbock,P., Perkins,A. and Rosen,C.A. (1991) Structural and functional analysis of the human immunodeficiency virus type 2 Rev protein. *J Virol.*, **65**, 445-449.
  96. Lanchy,J.M., Ivanovitch,J.D. and Lodmell,J.S. (2003) A structural linkage between the dimerization and encapsidation signals in HIV-2 leader RNA. *RNA*, **9**, 1007-1018.
  97. Lanchy,J.M., Szafran,Q.N. and Lodmell,J.S. (2004) Splicing affects presentation of RNA dimerization signals in HIV-2 in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4585-4595.
  98. Viglianti,G.A., Rubinstein,E.P. and Graves,K.L. (1992) Role of TAR RNA splicing in translational regulation of simian immunodeficiency virus from rhesus macaques. *J Virol.*, **66**, 4824-4833.
  99. Chatterjee,P., Garzino-Demo,A., Swinney,P. and Arya,S.K. (1993) Human immunodeficiency virus type 2 multiply spliced transcripts. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **9**, 331-335.
  100. Gilmartin,G.M., Fleming,E.S., Oetjen,J. and Graveley,B.R. (1995) CPSF recognition of an HIV-1 mRNA 3'-processing enhancer: multiple sequence contacts involved in poly(A) site definition. *Genes Dev.*, **9**, 72-83.
  101. Das,A.T., Klaver,B. and Berkhout,B. (1999) A hairpin structure in the R region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is instrumental in polyadenylation site selection.



- J Virol.*, **73**, 81-91.
102. Klasens,B.I., Thiesen,M., Virtanen,A. and Berkhout,B. (1999) The ability of the HIV-1 AAUAAA signal to bind polyadenylation factors is controlled by local RNA structure. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 446-454.
  103. Cherrington,J. and Ganem,D. (1992) Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *EMBO J*, **11**, 1513-1524.
  104. Ashe,M.P., Pearson,L.H. and Proudfoot,N.J. (1997) The HIV-1 5' LTR poly(A) site is inactivated by U1 snRNP interaction with the downstream major splice donor site. *EMBO J*, **16**, 5752-5763.
  105. Berkhout,B., Klaver,B. and Das,A.T. (1995) A conserved hairpin structure predicted for the poly(A) signal of human and simian immunodeficiency viruses. *Virology*, **207**, 276-281.
  106. Klasens,B.I., Das,A.T. and Berkhout,B. (1998) Inhibition of polyadenylation by stable RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1870-1876.
  107. Götte,M., Li,X. and Wainberg,M.A. (1999) HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 199-210.
  108. Andersen,E.S., Contera,S.A., Knudsen,B., Damgaard,C.K., Besenbacher,F. and Kjems,J. (2004) Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *J Biol Chem.*, **279**, 22243-22249.
  109. Paillart,J.C., Marquet,R., Skripkin,E., Ehresmann,C. and Ehresmann,B. (1996) Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications. *Biochimie*, **78**, 639-653.
  110. Jossinet,F., Lodmell,J.S., Ehresmann,C., Ehresmann,B. and Marquet,R. (2001) Identification of the in vitro HIV-2/SIV RNA dimerization site reveals striking differences with HIV-1. *J Biol Chem.*, **276**, 5598-5604.
  111. Berkhout,B. and van Wamel,J.L. (1996) Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*, **70**, 6723-6732.
  112. Baba,S., Takahashi,K., Noguchi,S., Takaku,H., Koyanagi,Y., Yamamoto,N. and Kawai,G. (2005) Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers. *J Biochem. (Tokyo)*, **138**, 583-592.
  113. Ennifar,E., Walter,P., Ehresmann,B., Ehresmann,C. and Dumas,P. (2001) Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1064-1068.
  114. Lanchy,J.M. and Lodmell,J.S. (2002) Alternate usage of two dimerization initiation sites in HIV-2 viral RNA in vitro. *J Mol. Biol.*, **319**, 637-648.
  115. Lanchy,J.M., Rentz,C.A., Ivanovitch,J.D. and Lodmell,J.S. (2003) Elements located upstream and downstream of the major splice donor site influence the ability of HIV-2 leader RNA to dimerize in vitro. *Biochemistry*, **42**, 2634-2642.
  116. Zhang,Y. and Barklis,E. (1995) Nucleocapsid protein effects on the specificity of retrovirus RNA encapsidation. *J Virol.*, **69**, 5716-5722.
  117. Harrison,G.P. and Lever,A.M. (1992) The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol.*, **66**, 4144-4153.
  118. Darlix,J.L., Gabus,C., Nugeyre,M.T., Clavel,F. and Barre-Sinoussi,F. (1990) Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol. Biol.*, **216**, 689-699.
  119. Lee,B.M., De Guzman,R.N., Turner,B.G., Tjandra,N. and Summers,M.F. (1998) Dynamical behavior of the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol. Biol.*, **279**, 633-649.
  120. South,T.L. and Summers,M.F. (1993) Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC. *Protein Sci*, **2**, 3-19.
  121. Kaye,J.F. and Lever,A.M. (1998) Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus

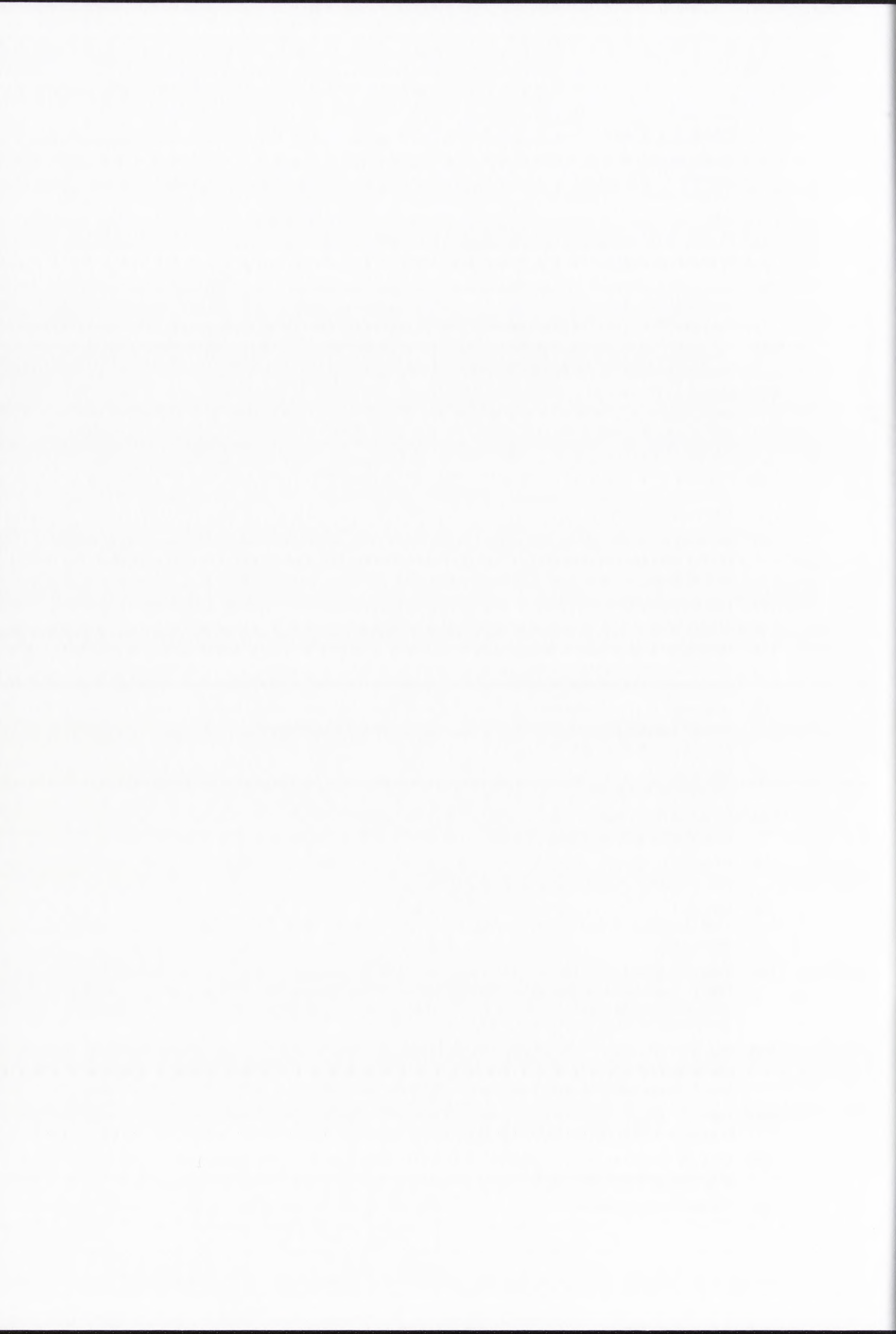




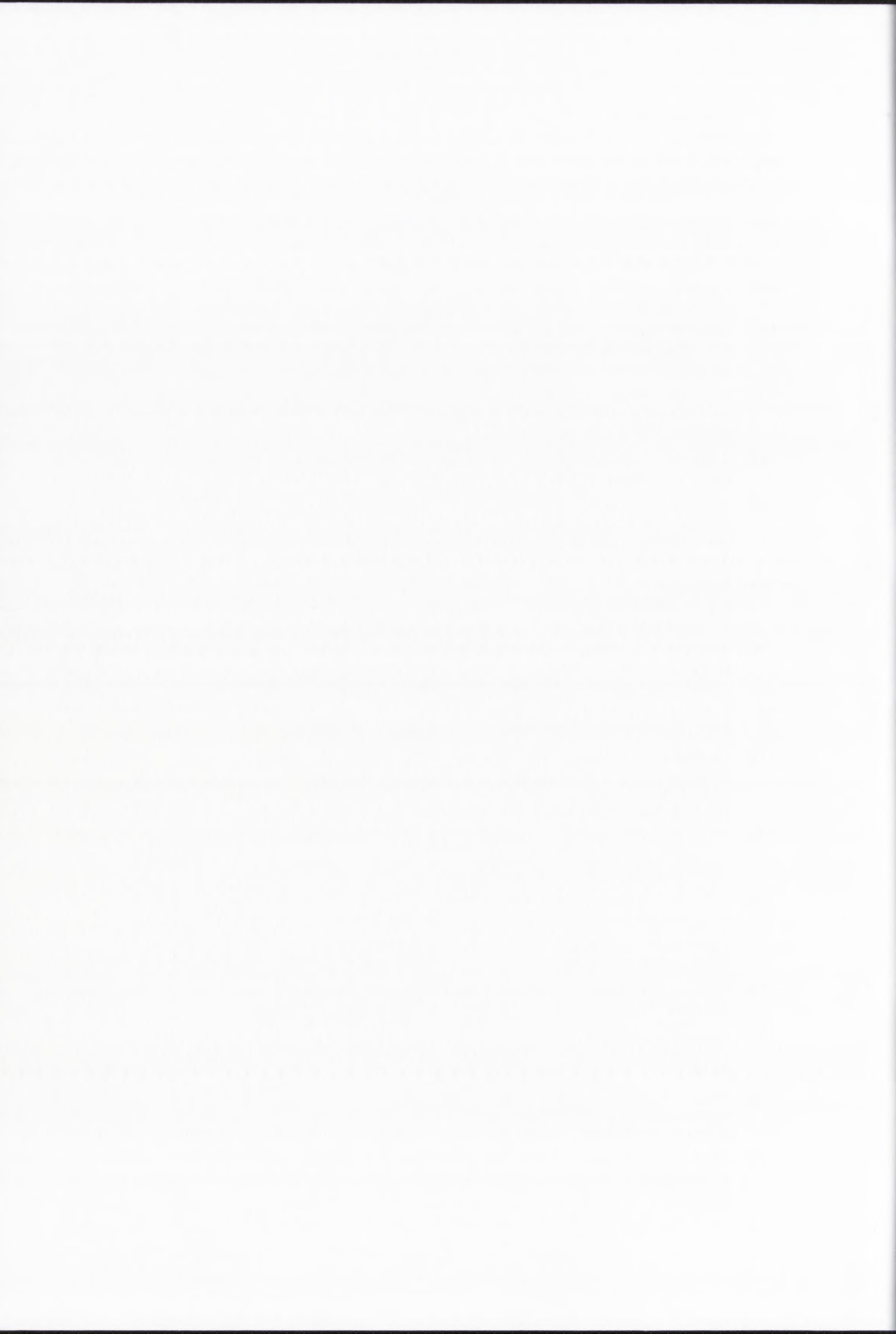
- type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *J Virol.*, **72**, 5877-5885.
122. McCann,E.M. and Lever,A.M. (1997) Location of cis-acting signals important for RNA encapsidation in the leader sequence of human immunodeficiency virus type 2. *J Virol.*, **71**, 4133-4137.
  123. Poeschla,E., Gilbert,J., Li,X., Huang,S., Ho,A. and Wong-Staal,F. (1998) Identification of a human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) encapsidation determinant and transduction of nondividing human cells by HIV-2-based lentivirus vectors. *J Virol.*, **72**, 6527-6536.
  124. Griffin,S.D., Allen,J.F. and Lever,A.M. (2001) The major human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) packaging signal is present on all HIV-2 RNA species: cotranslational RNA encapsidation and limitation of Gag protein confer specificity. *J Virol.*, **75**, 12058-12069.
  125. Huthoff,H. and Berkhout,B. (2001) Mutations in the TAR hairpin affect the equilibrium between alternative conformations of the HIV-1 leader RNA. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2594-2600.
  126. Aboul-ela,F., Karn,J. and Varani,G. (1995) The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J Mol. Biol.*, **253**, 313-332.
  127. Olejniczak,M., Gdaniec,Z., Fischer,A., Grabarkiewicz,T., Bielecki,L. and Adamiak,R.W. (2002) The bulge region of HIV-1 TAR RNA binds metal ions in solution. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4241-4249.
  128. Kulinski,T., Olejniczak,M., Huthoff,H., Bielecki,L., Pachulska-Wieczorek,K., Das,A.T., Berkhout,B. and Adamiak,R.W. (2003) The apical loop of the HIV-1 TAR RNA hairpin is stabilized by a cross-loop base pair. *J Biol Chem.*, **278**, 38892-38901.
  129. Puglisi,J.D., Tan,R., Calnan,B.J., Frankel,A.D. and Williamson,J.R. (1992) Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science*, **257**, 76-80.
  130. Selby,M.J. and Peterlin,B.M. (1990) Trans-activation by HIV-1 Tat via a heterologous RNA binding protein. *Cell*, **62**, 769-776.
  131. Wei,P., Garber,M.E., Fang,S.M., Fischer,W.H. and Jones,K.A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, **92**, 451-462.
  132. Brodsky,A.S. and Williamson,J.R. (1997) Solution structure of the HIV-2 TAR-argininamide complex. *J Mol. Biol.*, **267**, 624-639.
  133. Brodsky,A.S., Erlacher,H.A. and Williamson,J.R. (1998) NMR evidence for a base triple in the HIV-2 TAR C-G.C+ mutant-argininamide complex. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1991-1995.
  134. Dayie,K.T., Brodsky,A.S. and Williamson,J.R. (2002) Base flexibility in HIV-2 TAR RNA mapped by solution (<sup>15</sup>N), (<sup>13</sup>C) NMR relaxation. *J Mol. Biol.*, **317**, 263-278.
  135. Jones,K.A. and Peterlin,B.M. (1994) Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 717-743.
  136. Rana,T.M. and Jeang,K.T. (1999) Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 175-185.
  137. Rhim,H. and Rice,A.P. (1994) Exon2 of HIV-2 Tat contributes to transactivation of the HIV-2 LTR by increasing binding affinity to HIV-2 TAR RNA. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4405-4413.
  138. Arya,S.K. (1993) Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) trans-activator (Tat): functional domains and the search for trans-dominant negative mutants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **9**, 839-848.
  139. Echetebe,C.O. and Rice,A.P. (1993) Mutational analysis of the amino and carboxy termini of the HIV-2 Tat protein. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **6**, 550-557.
  140. Orsini,M.J., Garcia-Martinez,L.F., Mavankal,G., Gaynor,R.B. and Debouck,C.M. (1996) Purification and functional characterization of wild-type and mutant HIV-1 and HIV-2 Tat proteins expressed in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.*, **8**, 238-246.
  141. Bayer,P., Kraft,M., Ejchart,A., Westendorp,M., Frank,R. and Rosch,P. (1995) Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol. Biol.*, **247**, 529-535.
  142. Klostermeier,D., Bayer,P., Kraft,M., Frank,R.W. and Rosch,P. (1997) Spectroscopic



- investigations of HIV-1 trans-activator and related peptides in aqueous solutions. *Biophys. Chem.*, **63**, 87-96.
143. Peloponese, J.M., Jr., Gregoire, C., Opi, S., Esquieu, D., Sturgis, J., Lebrun, E., Meurs, E., Collette, Y., Olive, D., Aubertin, A.M. *et al.* (2000) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance assignment and structural characterization of HIV-1 Tat protein. *C. R. Acad Sci III*, **323**, 883-894.
  144. Frankel, A.D., Bredt, D.S. and Pabo, C.O. (1988) Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science*, **240**, 70-73.
  145. Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M. and Skinner, M.A. (1990) HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J*, **9**, 4145-4153.
  146. Rice, A.P. and Chan, F. (1991) Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a monomer when expressed in mammalian cells. *Virology*, **185**, 451-454.
  147. Garber, M.E., Wei, P., KewalRamani, V.N., Mayall, T.P., Herrmann, C.H., Rice, A.P., Littman, D.R. and Jones, K.A. (1998) The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev.*, **12**, 3512-3527.
  148. Bieniasz, P.D., Grdina, T.A., Bogerd, H.P. and Cullen, B.R. (1998) Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J*, **17**, 7056-7065.
  149. Wimmer, J., Fujinaga, K., Taube, R., Cujec, T.P., Zhu, Y., Peng, J., Price, D.H. and Peterlin, B.M. (1999) Interactions between Tat and TAR and human immunodeficiency virus replication are facilitated by human cyclin T1 but not cyclins T2a or T2b. *Virology*, **255**, 182-189.
  150. Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1993) Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology*, **197**, 601-608.
  151. Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1995) Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol.*, **69**, 1612-1620.
  152. Herrmann, C.H., Gold, M.O. and Rice, A.P. (1996) Viral transactivators specifically target distinct cellular protein kinases that phosphorylate the RNA polymerase II C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 501-508.
  153. Marshall, N.F. and Price, D.H. (1995) Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem.*, **270**, 12335-12338.
  154. Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z. and Price, D.H. (1996) Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem.*, **271**, 27176-27183.
  155. Price, D.H. (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol*, **20**, 2629-2634.
  156. Gold, M.O., Yang, X., Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1998) PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation in vivo. *J Virol.*, **72**, 4448-4453.
  157. Yang, X., Gold, M.O., Tang, D.N., Lewis, D.E., Guilar-Cordova, E., Rice, A.P. and Herrmann, C.H. (1997) TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12331-12336.
  158. Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B. and Price, D.H. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.*, **11**, 2622-2632.
  159. Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T. and Price, D.H. (1998) Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.*, **12**, 755-762.
  160. De, L.A., De, F.M., Baldi, A. and Paggi, M.G. (2003) Cyclin T: three forms for different roles in physiological and pathological functions. *J Cell Physiol*, **194**, 101-107.
  161. Bieniasz, P.D., Grdina, T.A., Bogerd, H.P. and Cullen, B.R. (1999) Highly divergent lentiviral Tat

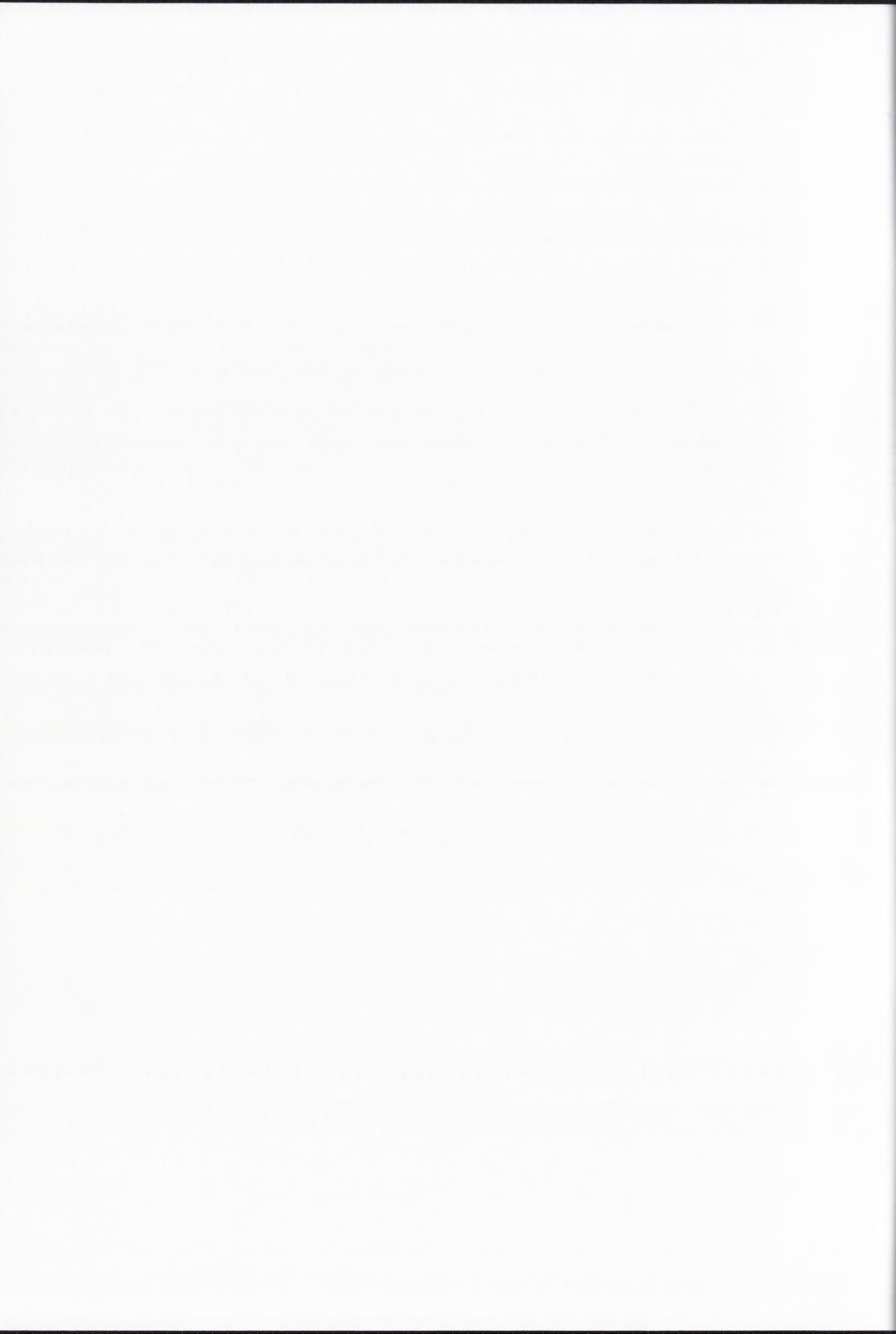


- proteins activate viral gene expression by a common mechanism. *Mol. Cell Biol*, **19**, 4592-4599.
162. Yik,J.H., Chen,R., Pezda,A.C. and Zhou,Q. (2005) Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive positive transcription elongation factor b complexes for control of transcription. *J Biol Chem.*, **280**, 16368-16376.
163. Yik,J.H., Chen,R., Nishimura,R., Jennings,J.L., Link,A.J. and Zhou,Q. (2003) Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol. Cell*, **12**, 971-982.
164. Fraldi,A., Varrone,F., Napolitano,G., Michels,A.A., Majello,B., Bensaude,O. and Lania,L. (2005) Inhibition of Tat activity by the HEXIM1 protein. *Retrovirology.*, **2**, 42.
165. Hart,C.E., Ou,C.Y., Galphin,J.C., Moore,J., Bachelier,L.T., Wasmuth,J.J., Petteway,S.R., Jr. and Schochetman,G. (1989) Human chromosome 12 is required for elevated HIV-1 expression in human-hamster hybrid cells. *Science*, **246**, 488-491.
166. Ivanov,D., Kwak,Y.T., Nee,E., Guo,J., Garcia-Martinez,L.F. and Gaynor,R.B. (1999) Cyclin T1 domains involved in complex formation with Tat and TAR RNA are critical for tat-activation. *J Mol. Biol*, **288**, 41-56.
167. Kwak,Y.T., Ivanov,D., Guo,J., Nee,E. and Gaynor,R.B. (1999) Role of the human and murine cyclin T proteins in regulating HIV-1 tat-activation. *J Mol. Biol*, **288**, 57-69.
168. Garber,M.E., Wei,P., KewalRamani,V.N., Mayall,T.P., Herrmann,C.H., Rice,A.P., Littman,D.R. and Jones,K.A. (1998) The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CytT1 protein. *Genes Dev.*, **12**, 3512-3527.
169. Bieniasz,P.D., Grdina,T.A., Bogerd,H.P. and Cullen,B.R. (1999) Analysis of the effect of natural sequence variation in Tat and in cyclin T on the formation and RNA binding properties of Tat-cyclin T complexes. *J Virol.*, **73**, 5777-5786.
170. Yedavalli,V.S., Benkirane,M. and Jeang,K.T. (2003) Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *J Biol Chem.*, **278**, 6404-6410.
171. Calnan,B.J., Tidor,B., Biancalana,S., Hudson,D. and Frankel,A.D. (1991) Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science*, **252**, 1167-1171.
172. Churcher,M.J., Lamont,C., Hamy,F., Dingwall,C., Green,S.M., Lowe,A.D., Butler,J.G., Gait,M.J. and Karn,J. (1993) High affinity binding of TAR RNA by the human immunodeficiency virus type-1 tat protein requires base-pairs in the RNA stem and amino acid residues flanking the basic region. *J Mol. Biol*, **230**, 90-110.
173. Olsen,G.L., Edwards,T.E., Deka,P., Varani,G., Sigurdsson,S.T. and Drobny,G.P. (2005) Monitoring tat peptide binding to TAR RNA by solid-state <sup>31</sup>P-19F REDOR NMR. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3447-3454.
174. Puglisi,J.D., Chen,L., Frankel,A.D. and Williamson,J.R. (1993) Role of RNA structure in arginine recognition of TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3680-3684.
175. Berkhout,B., Gagnol,A., Silver,J. and Jeang,K.T. (1990) Efficient trans-activation by the HIV-2 Tat protein requires a duplicated TAR RNA structure. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1839-1846.
176. Rhim,H. and Rice,A.P. (1993) TAR RNA binding properties and relative transactivation activities of human immunodeficiency virus type 1 and 2 Tat proteins. *J Virol.*, **67**, 1110-1121.
177. Fenrick,R., Malim,M.H., Hauber,J., Le,S.Y., Maizel,J. and Cullen,B.R. (1989) Functional analysis of the Tat trans activator of human immunodeficiency virus type 2. *J Virol.*, **63**, 5006-5012.
178. Garcia-Martinez,L.F., Mavankal,G., Peters,P., Wu-Baer,F. and Gaynor,R.B. (1995) Tat functions to stimulate the elongation properties of transcription complexes paused by the duplicated TAR RNA element of human immunodeficiency virus 2. *J Mol. Biol*, **254**, 350-363.
179. Rhim,H. and Rice,A.P. (1995) HIV-1 Tat protein is able to efficiently transactivate the HIV-2 LTR through a TAR RNA element lacking both dinucleotide bulge binding sites. *Virology*, **206**, 673-678.

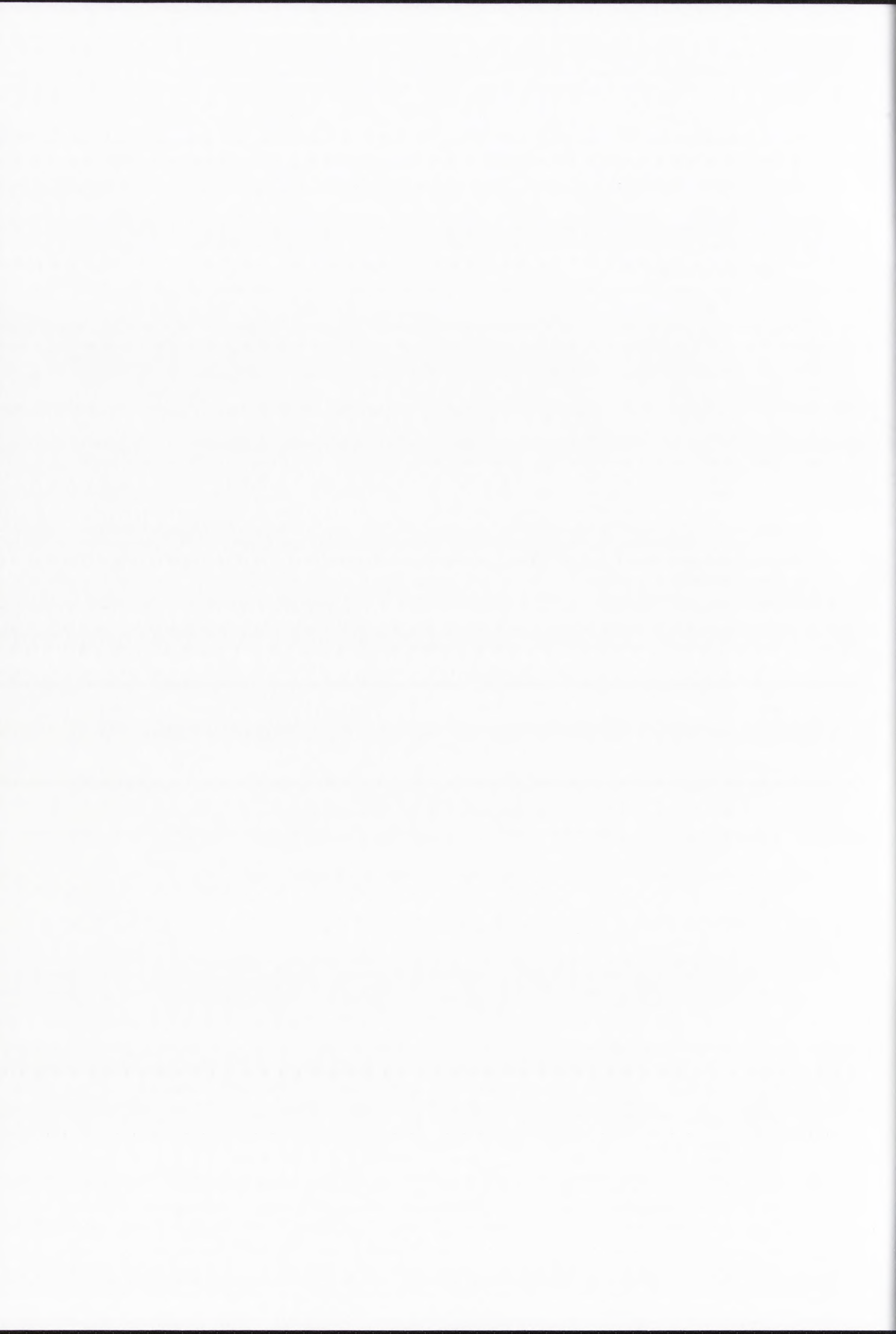


180. Garber, M.E., Wei, P. and Jones, K.A. (1998) HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **63**, 371-380.
181. Richter, S., Ping, Y.H. and Rana, T.M. (2002) TAR RNA loop: a scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7928-7933.
182. Richter, S., Cao, H. and Rana, T.M. (2002) Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation. *Biochemistry*, **41**, 6391-6397.
183. Wang, Z., Huq, I. and Rana, T.M. (1999) Proximity of a Tat peptide to the HIV-1 TAR RNA loop region determined by site-specific photo-cross-linking. *Bioconjug. Chem.*, **10**, 512-519.
184. Zhang, J., Tamilarasu, N., Hwang, S., Garber, M.E., Huq, I., Jones, K.A. and Rana, T.M. (2000) HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *J Biol Chem.*, **275**, 34314-34319.
185. Hirose, Y. and Manley, J.L. (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.*, **14**, 1415-1429.
186. Riedl, T. and Egly, J.M. (2000) Phosphorylation in transcription: the CTD and more. *Gene Expr.*, **9**, 3-13.
187. Ramanathan, Y., Rajpara, S.M., Reza, S.M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M.B. and Pe'ery, T. (2001) Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J Biol Chem.*, **276**, 10913-10920.
188. Kim, Y.K., Bourgeois, C.F., Isel, C., Churcher, M.J. and Karn, J. (2002) Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 4622-4637.
189. Garcia-Martinez, L.F., Ivanov, D. and Gaynor, R.B. (1997) Association of Tat with purified HIV-1 and HIV-2 transcription preinitiation complexes. *J Biol Chem.*, **272**, 6951-6958.
190. Churcher, M.J., Lowe, A.D., Gait, M.J. and Karn, J. (1995) The RNA element encoded by the trans-activation-responsive region of human immunodeficiency virus type 1 is functional when displaced downstream of the start of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2408-2412.
191. Rittner, K., Churcher, M.J., Gait, M.J. and Karn, J. (1995) The human immunodeficiency virus long terminal repeat includes a specialised initiator element which is required for Tat-responsive transcription. *J Mol. Biol.*, **248**, 562-580.
192. Marciniak, R.A. and Sharp, P.A. (1991) HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *EMBO J*, **10**, 4189-4196.
193. Garcia-Martinez, L.F., Mavankal, G., Neveu, J.M., Lane, W.S., Ivanov, D. and Gaynor, R.B. (1997) Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIIH complex that modulates HIV-1 transcription. *EMBO J*, **16**, 2836-2850.
194. Wang, Z., Morris, G.F., Rice, A.P., Xiong, W. and Morris, C.B. (1996) Wild-type and transactivation-defective mutants of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein bind human TATA-binding protein in vitro. *J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, **12**, 128-138.
195. Zhou, C. and Rana, T.M. (2002) A bimolecular mechanism of HIV-1 Tat protein interaction with RNA polymerase II transcription elongation complexes. *J Mol. Biol.*, **320**, 925-942.
196. Zawel, L., Kumar, K.P. and Reinberg, D. (1995) Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.*, **9**, 1479-1490.
197. Ping, Y.H. and Rana, T.M. (1999) Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes. *J Biol Chem.*, **274**, 7399-7404.
198. Chen, D. and Zhou, Q. (1999) Tat activates human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation independent of TFIIH kinase. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 2863-2871.
199. Yankulov, K. and Bentley, D. (1998) Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation. *Curr. Biol.*, **8**, R447-R449.
200. Garber, M.E., Mayall, T.P., Suess, E.M., Meisenhelder, J., Thompson, N.E. and Jones, K.A. (2000) CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human





- immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Mol. Cell Biol*, **20**, 6958-6969.
201. Garber, M.E. and Jones, K.A. (1999) HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Curr. Opin. Immunol.*, **11**, 460-465.
202. Ping, Y.H. and Rana, T.M. (2001) DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *J Biol Chem.*, **276**, 12951-12958.
203. Palangat, M., Meier, T.I., Keene, R.G. and Landick, R. (1998) Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol. Cell*, **1**, 1033-1042.
204. Graeble, M.A., Churcher, M.J., Lowe, A.D., Gait, M.J. and Karn, J. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 transactivator protein, tat, stimulates transcriptional read-through of distal terminator sequences in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6184-6188.
205. Keen, N.J., Churcher, M.J. and Karn, J. (1997) Transfer of Tat and release of TAR RNA during the activation of the human immunodeficiency virus type-1 transcription elongation complex. *EMBO J*, **16**, 5260-5272.
206. Isel, C. and Karn, J. (1999) Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol. Biol*, **290**, 929-941.
207. Zhou, M., Halanski, M.A., Radonovich, M.F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D.H. and Brady, J.N. (2000) Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol. Cell Biol*, **20**, 5077-5086.
208. Fong, Y.W. and Zhou, Q. (2000) Relief of two built-in autoinhibitory mechanisms in P-TEFb is required for assembly of a multicomponent transcription elongation complex at the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol. Cell Biol*, **20**, 5897-5907.
209. Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O. and Reinberg, D. (1999) A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev.*, **13**, 1540-1552.
210. Brown, D.E., Arzumanov, A., Syed, S., Gait, M.J. and Lever, A.M. (2006) Inhibition of HIV-1 replication by oligonucleotide analogues directed to the packaging signal and trans-activating response region. *Antivir. Chem. Chemother.*, **17**, 1-9.
211. Turner, J.J., Ivanova, G.D., Verbeure, B., Williams, D., Arzumanov, A.A., Abes, S., Lebleu, B. and Gait, M.J. (2005) Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6837-6849.
212. Davis, B., Afshar, M., Varani, G., Murchie, A.I., Karn, J., Lentzen, G., Drysdale, M., Bower, J., Potter, A.J., Starkey, I.D. *et al.* (2004) Rational design of inhibitors of HIV-1 TAR RNA through the stabilisation of electrostatic "hot spots". *J Mol. Biol*, **336**, 343-356.
213. Hamma, T., Saleh, A., Huq, I., Rana, T.M. and Miller, P.S. (2003) Inhibition of HIV tat-TAR interactions by an antisense oligo-2'-O-methylribonucleoside methylphosphonate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1845-1848.
214. Lee, C.W., Cao, H., Ichiyama, K. and Rana, T.M. (2005) Design and synthesis of a novel peptidomimetic inhibitor of HIV-1 Tat-TAR interactions: squaryldiamide as a new potential bioisostere of unsubstituted guanidine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4243-4246.
215. Berkhout, B. (2004) RNA interference as an antiviral approach: targeting HIV-1. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **6**, 141-145.
216. Cullen, B.R. (2005) Does RNA interference have a future as a treatment for HIV-1 induced disease? *AIDS Rev.*, **7**, 22-25.
217. Rossi, J.J. (2006) RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques*, **Suppl**, 25-29.
218. Stevenson, M. (2003) Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 851-858.
219. Lee, M.T., Coburn, G.A., McClure, M.O. and Cullen, B.R. (2003) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-



- specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol.*, **77**, 11964-11972.
220. Lee,N.S., Dohjima,T., Bauer,G., Li,H., Li,M.J., Ehsani,A., Salvaterra,P. and Rossi,J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 500-505.
221. Omoto,S., Ito,M., Tsutsumi,Y., Ichikawa,Y., Okuyama,H., Brisibe,E.A., Saksena,N.K. and Fujii,Y.R. (2004) HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology.*, **1**, 44.
222. Park,W.S., Miyano-Kurosaki,N., Nakajima,E. and Takaku,H. (2001) Specific inhibition of HIV-1 gene expression by double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res. Suppl*, 219-220.
223. Anderson,J. and Akkina,R. (2005) HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. *AIDS Res. Ther.*, **2**, 1.
224. Buttica,C., Ciuffi,A., Munoz,M., Thomas,J., Bridge,A., Pebernard,S., Iggo,R., Meylan,P. and Telenti,A. (2003) Protection from HIV-1 infection of primary CD4 T cells by CCR5 silencing is effective for the full spectrum of CCR5 expression. *Antivir. Ther.*, **8**, 373-377.
225. Chiu,Y.L., Cao,H., Jacque,J.M., Stevenson,M. and Rana,T.M. (2004) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor P-TEFb (CDK9/CyclinT1). *J Virol.*, **78**, 2517-2529.
226. Li,Z., Xiong,Y., Peng,Y., Pan,J., Chen,Y., Wu,X., Hussain,S., Tien,P. and Guo,D. (2005) Specific inhibition of HIV-1 replication by short hairpin RNAs targeting human cyclin T1 without inducing apoptosis. *FEBS Lett.*, **579**, 3100-3106.
227. Boden,D., Pusch,O., Lee,F., Tucker,L. and Ramratnam,B. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol.*, **77**, 11531-11535.
228. Das,A.T., Brummelkamp,T.R., Westerhout,E.M., Vink,M., Madiredjo,M., Bernards,R. and Berkhout,B. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol.*, **78**, 2601-2605.
229. Westerhout,E.M., Ooms,M., Vink,M., Das,A.T. and Berkhout,B. (2005) HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 796-804.
230. Konstantinova,P., de,V.W., Haasnoot,J., Ter,B.O., de,H.P. and Berkhout,B. (2006) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by RNA interference using long-hairpin RNA. *Gene Ther.*
231. Turner,J.J., Fabani,M., Arzumanov,A.A., Ivanova,G. and Gait,M.J. (2006) Targeting the HIV-1 RNA leader sequence with synthetic oligonucleotides and siRNA: Chemistry and cell delivery. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 290-300.
232. Dirac,A.M., Huthoff,H., Kjems,J. and Berkhout,B. (2002) Requirements for RNA heterodimerization of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 genomes. *J Gen Virol.*, **83**, 2533-2542.
233. Pachulska-Wieczorek,K., Purzycka,K.J. and Adamiak,R.W. (2006) New, extended hairpin form of the TAR-2 RNA domain points to the structural polymorphism at the 5' end of the HIV-2 leader RNA. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2984-2997.
234. Mathews,D.H., Sabina,J., Zuker,M. and Turner,D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol. Biol.*, **288**, 911-940.
235. Zuker,M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-3415.
236. Garcia-Martinez,L.F., Mavankal,G., Peters,P., Wu-Baer,F. and Gaynor,R.B. (1995) Tat functions to stimulate the elongation properties of transcription complexes paused by the duplicated TAR RNA element of human immunodeficiency virus 2. *J Mol. Biol.*, **254**, 350-363.
237. Sarkar,G., Yoon,H.S. and Sommer,S.S. (1992) Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 871-878.
238. Bezak,A., Kaczanowski,R., senbach-Glaninger,A., Kucharczyk,K., Lubitz,W. and Hopmeier,P. (2005) Detection of single nucleotide polymorphisms in coagulation factor XI deficient patients



- by multitemperature single-strand conformation polymorphism analysis. *J Clin. Lab Anal.*, **19**, 233-240.
239. Berkhout, B. (1997) The primer binding site on the RNA genome of human and simian immunodeficiency viruses is flanked by an upstream hairpin structure. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4013-4017.
240. Peattie, D.A. and Gilbert, W. (1980) Chemical probes for higher-order structure in RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4679-4682.
241. Mandiyan, V. and Boublik, M. (1990) Structural analysis of the 5' domain of the HeLa 18S ribosomal RNA by chemical and enzymatic probing. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7055-7062.
242. Ciesiolka, J., Wrzesinski, J., Gornicki, P., Podkowinski, J. and Krzyzosiak, W.J. (1989) Analysis of magnesium, europium and lead binding sites in methionine initiator and elongator tRNAs by specific metal-ion-induced cleavages. *Eur. J Biochem.*, **186**, 71-77.
243. Ciesiolka, J., Michalowski, D., Wrzesinski, J., Krajewski, J. and Krzyzosiak, W.J. (1998) Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J Mol. Biol.*, **275**, 211-220.
244. Krzyzosiak, W.J., Marciniak, T., Wiewiorowski, M., Romby, P., Ebel, J.P. and Giege, R. (1988) Characterization of the lead(II)-induced cleavages in tRNAs in solution and effect of the Y-base removal in yeast tRNAPhe. *Biochemistry*, **27**, 5771-5777.
245. Fedor, M.J. (2002) The role of metal ions in RNA catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 289-295.
246. Pyle, A.M. (2002) Metal ions in the structure and function of RNA. *J Biol Inorg. Chem.*, **7**, 679-690.
247. Woodson, S.A. (2005) Metal ions and RNA folding: a highly charged topic with a dynamic future. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 104-109.
248. Ippolito, J.A. and Steitz, T.A. (1998) A 1.3-Å resolution crystal structure of the HIV-1 trans-activation response region RNA stem reveals a metal ion-dependent bulge conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9819-9824.
249. Streicher, B., Westhof, E. and Schroeder, R. (1996) The environment of two metal ions surrounding the splice site of a group I intron. *EMBO J*, **15**, 2556-2564.
250. Winter, D., Polacek, N., Halama, I., Streicher, B. and Barta, A. (1997) Lead-catalysed specific cleavage of ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1817-1824.
251. Cowan, J.A. (1993) Metallobiochemistry of RNA. Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>(3+) as a probe for Mg<sup>2+</sup>(aq) binding sites. *J Inorg. Biochem.*, **49**, 171-175.
252. Rhim, H., Chan, F., Echeteu, C.O. and Rice, A.P. (1993) Rapid purification of monomer HIV-2 Tat protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, **4**, 24-31.
253. Rhim, H., Echeteu, C.O., Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1994) Wild-type and mutant HIV-1 and HIV-2 Tat proteins expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **7**, 1116-1121.
254. Garriga, J., Peng, J., Parreno, M., Price, D.H., Henderson, E.E. and Grana, X. (1998) Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation. *Oncogene*, **17**, 3093-3102.
255. Rhim, H. and Rice, A.P. (1997) RNAs Selected in vitro by the HIV-2 Tat Protein. *J Biomed. Sci.*, **4**, 28-34.
256. Tao, J. and Frankel, A.D. (1992) Specific binding of arginine to TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2723-2726.
257. Puglisi, J.D., Tan, R., Calnan, B.J., Frankel, A.D. and Williamson, J.R. (1992) Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science*, **257**, 76-80.