

Integrujte se a množte se

RETROVIROVÁ INTEGRACE

Za objev integrovaných provirů byla roku 1975 udělena Nobelova cena. K tomuto objevu významnou měrou přispěl svými experimenty také prof. Jan Svoboda. Co víme o integraci retrovirů dnes a jak dokážeme tyto informace využívat?

text **DALIBOR MIKLÍK**

MIMO infikovanou buňku jsou retroviry částicemi, které nesou svou genetickou informaci zakódovanou v molekulách RNA. Brzy po vstupu do buňky však virové enzymy tuto informaci přepíší do molekuly DNA, která se o chvíli později stává součástí jaderné DNA buňky – buněčného genomu. Vkládání virové DNA do genomu infikované buňky neboli integrace je esenciálním a charakteristickým krokem retrovirového replikačního cyklu. Znemožníme-li retrovirům integraci, je schopnost následné exprese retrovirových genů a produkce virového potomstva velmi omezena, ne-li úplně znemožněna. Také proto jsou látky blokující retrovirovou integraci součástí antiretrovirových terapií. Vytvoření proviru, tedy integrované formy retrovirové DNA, má za následek rovněž stálou infekci buňky. Provirus se stává genem buňky vlastním a je předáván do buněk dceřiných.

Přítomnost provirů způsobuje komplikace spojené s retrovirovou infekcí. Buňky totiž postrádají schopnost zbavit se této parazitické DNA. Jednou z možností, jak může napadená buňka zamezit množení retroviru, je zablokování aktivity genů proviru. Obecně se fenomén takového vypínání genů nazývá epigenetickým umlčováním genové exprese. Toto umlčování genové exprese provirů je užitečné při zpomalování šíření infekce, avšak přítomnost umlčených provirů komplikuje úplně vyléčení retrovirové infekce.

Schopnost integrace retrovirové DNA vybízí k využití retrovirů ve formě tzv. retrovirových vektorů. Virovými vektory máme obecně na mysli viry, jejichž geny jsou metodami genového inženýrství nahrazeny geny, které mají být přeneseny do cílové buňky. Retroviry nabízejí vlastnosti, které se rovnají vlastnostem ideálních virových vektorů – možnost stálé exprese přeneseného genu nejen v infikované buňce, ale také v celé linii buněk

dceřiných. Virové vektory schopné takové stabilní exprese pak nalézají využití nejen při výzkumu funkce genů, ale také při vývoji celých transgenních organismů či v humánní medicíně při léčbě některých vrozených vad – genové terapii. I přes své vlastnosti mají současné retrovirové vektory k ideálu daleko. Také retrovirové vektory totiž podléhají epigenetickému umlčování a samotná integrace vyvolává obavy z možného narušení a poškození genomu hostitelské buňky. K pochopení výhod a problémů provázejících retrovirové vektory je však potřeba blíže porozumět samotnému procesu integrace.

Integrace retrovirové DNA je typem rekombinace, která je katalyzována virovým enzymem integrázou. Integráza je přítomna již v retrovirové částici a na virovou DNA se váže ihned po jejím vytvoření reverzní transkriptázou. K buněčnému genomu se dostává preintegrační komplex skládající se z DNA, integrázy a dalších virových a buněčných proteinů. Ačkoliv jde funkčně stále o stejný enzym, liší se integrázy mezi jednotlivými skupinami retrovirů svou strukturou a schopností interagovat s buněčnými proteiny. A právě ona interakce s buněčnými proteiny dává různým retrovirům jejich specifické vlastnosti, které mohou ovlivňovat další pokračování replikačního cyklu a jejich případné využití jako retrovirových vektorů.

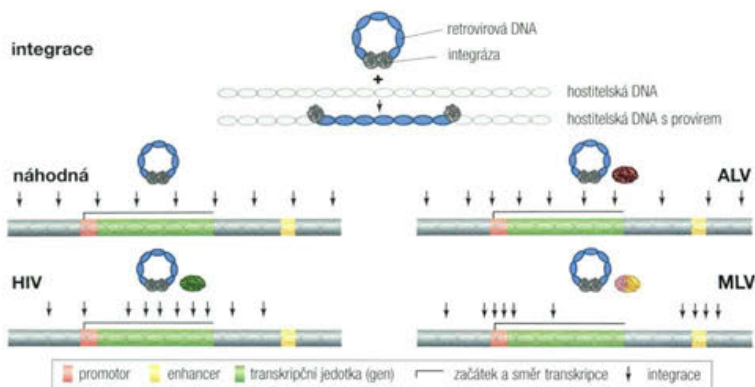
I přestože je virová integráza in vitro sama schopná katalyzovat integraci retrovirové DNA, je situace in vivo, tedy v živé buňce, o něco složitější. K efektivní integraci totiž virová integráza potřebuje pomoc buněčných proteinů, které preintegrační komplex k jaderné DNA přitahují. Jako první buněčný faktor hrající roli v retrovirové integraci byl identifikován protein LEDGF/p75, který k jaderné DNA přitahuje virus lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1). Až v nedávné době

byly objeveny proteiny interagující s integrázami dalších retrovirů. Konkrétně šlo o myší leukemický virus a virus způsobující ptačí leukózy. Zamezení interakce virových integráz s jejich buněčnými protějšky výrazně ovlivňuje schopnost retrovirů integrovat svou DNA do genomu hostitelských buněk. Není tedy divu, že se tyto interakce staly potenciálním cílem pro další generaci látek omezujících replikaci retrovirů.

Interakce s buněčnými proteiny však má i další roli v retrovirové integraci. Retroviry necílí svou integraci do jednoho konkrétního místa v genomu, ale ani se neintegrují úplně náhodně. Genom buňky totiž není jen holým řetězcem nukleotidů. Většina buněčné DNA je v komplexu s nepřehledným množstvím proteinů s enzymatickými aktivitami či plnicími strukturálními role. Kombinace proteinů spolu s vlastnostmi DNA v daném místě genomu pak často definují funkční části, které mohou hrát roli při řízení transkripční aktivity dané genomové oblasti či zaujímat různé role v trojrozměrné struktuře jaderné DNA. Právě podle proteinů a jejich modifikací rozeznáváme různé typy chromatinu – charakteristické vlastnosti mají např. začátky aktivních genů (promotory), jejich vnitřní části nebo enhancery – části DNA regulující aktivitu promotorů vzdálených až tisíce nukleotidů daleko. A právě proteiny přitahující retrovirové integrázy k hostitelské DNA jsou ty, které interagují se specifickým typem chromatinu. To způsobuje nenáhodnou distribuci provirů v genomu hostitelských buněk.

Z pohledu retrovirové integrace dokážeme rozeznat tři vzory výběru míst integrace. Takový vzor, který se podobá zcela náhodnému výběru místa pro integraci, byl pozorován např. u ptačích virů vyvolávajících leukózy. Výrazné cílení do vnitřních částí aktivních genů bylo pozorováno u HIV-1. O tomto lidském zástupci lentivirů také víme to, že se přednostně integruje do okrajových částí buněčného jádra, které jsou vnitřním částem promotorů – branám do buněčného jádra, jež lentiviry pro vstup do jádra využívají. Zřejmě nejužší profil integrace byl popsán pro myší leukemické viry, které svou integraci cílí do oblastí promotorů a enhancerů. Tyto retroviry se tedy s oblibou integrují do regulačních oblastí, jež zásadním způsobem ovlivňují aktivitu genů.

Zatím můžeme pouze spekulovat o významu existence takového výběru místa integrace pro různé retroviry. Jednoduchá logika napovídá, že výběr aktivních genů či aktivních regulačních oblastí může vést ke zvýšené pravděpodobnosti úspěšné produkce virového potomstva. Naše výsledky např. ukazují, že jsou-li savčí buňky infikovány ptačími retroviry, je expresní aktivita jejich provirů velmi účinně umlčována. Jsou-li však tyto proviry integrovány v blízkosti aktivních promotorů, odolávají umlčování a vykazují vysokou stabilitu exprese.



Experimentální tlak na expresní aktivitu tak v tomto případě vede k akumulaci provirů v místech genomu, kam se jiné retroviry integrují vlivem interakce s vybranými buněčnými proteiny. Potvrdit či vyvrátit teorii o roli integrační preference v replikačním cyklu retrovirů však může až další výzkum.

V devadesátých letech 20. století byly retroviróvé vektory odvozené od myších leukemických virů vcelku úspěšně použity pro experimentální léčbu těžké kombinované imunodeficiency, kdy je kvůli mutaci jediného genu zcela vyřazen imunitní systém pacienta. I přes úspěšnou aplikaci se na přelomu 21. století do historie genové terapie nechvalně zapsala experimentální léčba dětských pacientů v Londýně a Paříži. Ačkoliv u 17 z 20 pacientů došlo k alespoň částečné obnově funkcí imunitního systému, u 5 pacientů se rozvinula leukémie a jeden pacient jí podlehl. Pozdější výzkum ukázal, že leukemické buňky obsahovaly proviry vektoru v blízkosti promotorů protoonkogenů. Inzerční aktivace způsobená integrací vektorů tedy vedla k nežádoucí aktivaci těchto genů, která vyústila až v rozvoj leukémie. Tato smutná událost způsobila pozastavení aplikace retroviróvé genové terapie. Na druhou stranu ale vedla k intenzivnímu výzkumu integrace retrovirů a k vývoji bezpečnějších retroviróvných vektorů.

Dnes využívané retroviróvé vektory často patří do kategorie samoinaktivujících se vektorů, které pro expresi přenášeného genu nevyužívají své původní regulační sekvence, nýbrž sekvence, jež by neměly vykazovat inzerční aktivaci. Do vektorů jsou vkládány i takové sekvence, které by měly proviry

bránit před umlčováním jejich exprese. Využívány jsou také nové generace lentivirových vektorů, tedy vektorů odvozených od HIV či jemu příbuzných retrovirů. Lentivirové vektory totiž primárně necílí na regulační oblasti, a představují tak menší riziko narušení regulace buněčných genů. Možné je také využití ptačích retrovirů, které vykazují náhodnou distribuci provirů. Změna integrační preference vektorů pomocí cíleného ovlivnění interakce integrázy a jejich buněčných partnerů je další možností, jak předcházet případnému narušení expresních regulací

v genomu. Svatým grálem je pak vytvoření takových vektorů, které svou integraci cílí do konkrétních míst genomu, jež představují minimální riziko z pohledu narušení genomu a zároveň umožňují spolehlivou aktivitu proviru. Dodnes se však takové cílené integrace nepodařilo dosáhnout.

Objev schopnosti retrovirů integrovat svou genomovou DNA patří mezi ty, které zásadně ovlivnily nejen pohled na retroviry, ale také výzkum v molekulární genetice. Látky zamezující integraci jsou součástí antiretroviróvé léčby HIV a integrující se retroviróvé vektory jsou dnes v laboratořích po celém světě využívány jako běžné nástroje pro přenos genů. Použití retroviróvných vektorů v humánní medicíně pak dalo základ oboru genové terapie. I když je léčba genovou terapií stále léčbou experimentální, probíhají po světě desítky klinických testů využívajících různé typy virových vektorů. Ani v posledních letech není nouze o nové informace definující retroviróvou integraci. Aktuální výsledky základního výzkumu retroviróvé integrace také ukazují, že se i v budoucnu můžeme těšit na novinky, které mohou posunout jak metody léčby pacientů infikovaných HIV, tak vývoj retroviróvných vektorů. ●

INZERCE

Soutěž STUDENT GIS PROJEKT

13. září 2017 | Fakulta životního prostředí ČZU

Navštivte finále soutěže Student GIS Projekt, kde absolventi představí své práce s tematikou geografických informačních systémů Esri a ENVI.

Seznámíte se s projekty z univerzit a poznáte nadějně mladé geoinformatiky.

Účast pro posluchače je zdarma.

Více informací na www.arcdata.cz

ARCDATA PRAHA
esri Official Distributor



Mediální partneři:

gis portal
ČZU

NATIONAL GEOGRAPHIC
ČESKO

vesmír

DALIBOR MIKLÍK studuje doktorandský program *molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie* Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. V Laboratoři virové a buněčné genetiky Ústavu molekulární genetiky pracuje na objasnění vztahu expresní aktivity retrovirů a zabývá se epigenetickými charakteristikami genomu v místech cílených retroviróvou integrací.

