

VILNIAUS UNIVERSITETAS
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS

Raimundas Ražanskas

Hepatito B viruso šerdies baltymo ir jo mutantinių formų sąveika su žmogaus kepenų baltymais

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P), nukleorūgštys, baltymų sintezė (P 320)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 1999–2010 metais Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos laboratorijoje.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas:

Prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija - 04P, nukleorūgštys, baltymų sintezė – P 320)

Turinys

SANTRUMPOS	1
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
Viruso ir šeimininko baltymų sąveikos ir jų reikšmė.....	7
1.1. Baltymų sąveikos virusui patenkant į ląstelę	9
1.2. Baltymų sąveikos, užtikrinančios viruso komponentų viduląstelinį transportą.....	14
1.3. Virusinių baltymų įtaka šeimininko antivirusinėms sistemoms	21
1.3.1. Apoptozės reguliavimas.....	22
1.3.2. Virusų aptikimo ir interferoninio atsako sistemų įtakojimas.....	28
1.3.3. Virusinių baltymų įtaka NF-κB signaliniam keliui.....	32
1.3.4. Virusų įtaka komplemento sistemos veikimui	34
1.3.5. Virusų apsisaugojimas nuo NK ląstelių	38
1.3.6. Virusų naudojami įgytojo imuninio atsako išvengimo mechanizmai.....	40
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	46
2.1. Medžiagos.....	46
2.1.1. Reagentai	46
2.1.2. Oligonukleotidai	47
2.1.3. Mikroorganizmų kamienai.....	49
2.1.4. Plazmidės.....	50
2.1.5. Tirpalai	51
2.1.6. Mitybinės terpės.....	53
2.2. Metodai.....	54
2.2.1. DNR elektroforezė agarozės gelyje	54
2.2.2. DNR hidrolizė ir ligavimas.....	55
2.2.3. Polimerazės grandininė reakcija	55
2.2.4. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio.....	56
2.2.5. Plazmidinės DNR skyrimas	56
2.2.6. <i>E.coli</i> kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija.....	57
2.2.7. Plazmidžių konstravimas	58
2.2.8. Rekombinantinių baltymų sintezė <i>E.coli</i> ląstelėse.....	60
2.2.9. Baltymų elektroforezė PAA gelyje ir dažymas.....	60
2.2.10. Imunoblotingas.....	61
2.2.11. Baltymų sąveikos nustatymas „GST ištraukimo“ metodu.....	61
2.2.12. Mielių <i>S.cerevisiae</i> transformacija.....	62
2.2.13. Mielių dviejų hibridų metodas ir <i>MATCHMAKER LexA</i> sistema.....	62
2.2.14. Sąveikaujančių baltymų atranka naudojant mielių dviejų hibridų metodą.....	66
2.2.15. Reporterinių genų raiškos įvertinimas.....	67
2.2.16. NF-κB aktyvumo nustatymas matuojant CAT aktyvumą	67

2.2.17. NF-κB aktyvumo nustatymas EMSA metodu	68
2.2.18. Bioinformatinė analizė.....	68
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	70
3.1. HBV šerdies baltymų ir jų mutantinių formų sąveika mielių dvių hibridų sistemoje.....	70
3.2. Žmogaus baltymų, sąveikaujančių su HBV šerdies baltymais ir jų mutantinėmis formomis, paieška.....	74
3.3. Žmogaus baltymai, sąveikaujantys ir su laukinio tipo, ir su mutantniais HBV šerdies baltymais.....	80
3.3.1. GIPC1	80
3.3.2. GIPC2	86
3.4. Žmogaus baltymai, sąveikaujantys su mutantniais HBV šerdies baltymais	89
3.4.1. Nenustatytos funkcijos baltymas FLJ20850.....	89
3.4.2. IKKγ (NEMO).....	95
3.5. Rezultatų apibendrinimas	104
4. IŠVADOS	106
PADĖKA.....	107
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	108
LITERATŪROS SĄRAŠAS	109

SANTRUMPOS

AdV	Adenovirusas
angl.	Angliškai
ar.	Aminorūgštis
Ap	Ampicilinas
ASFV	Afrikos kiaulių karštinės virusas
ASR	Atviras skaitymo rėmelis
Cm	Chloramfenikolas
CMV	Citomegalo virusas
DNR	Deoksiribonukleorūgštis
dNTP	Deoksiribonukleotidtrifosfatas
DTT	DL-ditiotreitolis
EBV	Epštein-Bar virusas
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgštis
EGTA	Etilenglikoltetraacto rūgštis
EMSA	Elektroforetinio judrumo poslinkio tyrimas
ET	Endoplazminis tinklas
GIPC	Su GAIP C galu sąveikaujantis baltymas
HBV	Hepatito B virusas
HBc	Hepatito B viruso šerdies baltymas
HCV	Hepatito C virusas
HEPES	(4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis
HSV	Paprastojo herpeso (<i>herpes simplex</i>) virusas
HVS	Herpeso virusas saimiri
IFN	Interferonas
IKKy	Kapa B slopiklio kinazės komplekso gama subvienetas
IPTG	Izopropil- β -D-galaktopiranozidas
iRNR	Informacinė ribonukleorūgštis
YNB	Vitaminų ir mikroelementų rinkinys minimaliai mielių terpei

YPD	Mielių mitybinė terpė su gliukoze
kb	Kilobazė
kDa	Kilodaltonas
Kn	Kanamicinas
KSHV	Su Kapoši sarkoma susijęs herpeso virusas
LB	Luria-Bertani mitybinė terpė
MHC	Didysis audinių suderinamumo kompleksas
NDS-PAGE	Natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė
NF-κB	Branduolio transkripcijos veiksnys kapa B
nt	Nukleotidas
ONPG	Orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranozidas
PAA	Poliakrilamidas
PBS	Fosfatinis buferinis tirpalas
PDZ	Domenas, turintis PSD-95, Dlg ir ZO-1 baltymuose randamus pasikartojimus
PEG	Polietilenglikolis
PGR	Polimerazinė grandininė reakcija
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoridas
PSM	PDZ domenų atpažįstamų sekų motyvas
PVDF	Polivinilidenfluoridas
RNR	Ribonukleorūgštis
RSV	Respiracinis sincitinis virusas
SD	Sintetinė mielių terpė su amino rūgščių ir nukleotidų rinkiniu
SV40	Beždžionių virusas 40
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletildiaminas
TLR	Į <i>toll</i> panašus receptorius
TMB	3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidas
TNF	Navikų nekrozės veiksnys
Tris	Tris-(hidroksimetil)-aminometanas
VSV	Vezikulinio stomatito virusas

VV	Karvės raupų (<i>vaccinia</i>) virusas
ŽHV	Žmogaus herpeso virusas
ŽIV	Žmogaus imunodeficito virusas
ŽPV	Žmogaus papilomos virusas
ŽTLV	Žmogaus T ląstelių limfotropinis virusas
ŽCMV	Žmogaus citomegalo virusas
wt	Laukinis tipas
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozidas

IVADAS

Hepatito B virusas (HBV) yra plačiai paplitęs žmogaus infekcinis patogenas, visame pasaulyje kasmet užkrečiantis 300-400 mln. žmonių [27]. Dauguma užsikrėtusiųjų hepatitu B greitai pasveiksta, bet 5%-10% nesugeba susidoroti su virusu ir liga tampa lėtinė. Dalis sergančiųjų lėtine infekcija susiduria su rimtomis sveikatos problemomis - kepenų ciroze ir kepenų vėžiu [69]. Šios komplikacijos kasmet nusineša apie milijoną gyvybių visame pasaulyje.

HBV yra gana gerai ištirtas patogenas, turintis kompaktišką genomą su persidengiančiais genais. Šio viruso struktūra ir jo baltymų tarpusavio sąveika gana gerai ištirta [15], bet neabejotinai dar sudėtingesnės ir skaitlingesnės yra viruso baltymų sąveikos su šeimininko baltymais. Tam, kad išgyventų ir daugintųsi žmogaus organizme, virusui reikia įveikti daugybę kliūčių, o kiekvienas jo baltymas turi atlikti keletą funkcijų. Dauguma šių funkcijų atliekama sąveikaujant baltymams. Tarpusavio sąveikos dėka baltymai gali judėti ląstelės viduje ir išorėje; kauptis tam tikroje ląstelės vietoje, prisitvirtindami prie reikiamo „inkaro“; formuoti baltyminius kompleksus; sudaryti tarpbaltyminius ryšius, reikalingus fermentiniam modifikavimui. Iki šiol geriausiai ištirtos HBV X baltymo sąveikos šeimininko ląstelėje [12]. Tuo tarpu tiriant šio viruso šerdies baltymą (HBc), didžiausias dėmesys buvo kreipiamas į kapsidžių formavimąsi ir genomo pakavimą. Vis tik atsiranda vis daugiau duomenų, kad virusų patogenezėje reikšmingą vaidmenį gali atlikti ir struktūriniai baltymai, kaip yra hepatito C viruso šerdies baltymo atveju. Šis struktūrinis baltymas daro įtaką apoptozės, imuninio atsako, oksidacinio streso, kancerogenezės ir daugeliui kitų ląstelės procesų [49]. Norint išsiaiškinti viruso struktūrinių baltymų vaidmenį HBV užkrėstų hepatocitų patogenezėje, būtina ištirti jų sąveikas su šeimininko ląstelės baltymais. Atrastos sąveikos galėtų padėti nustatyti žmogaus baltymus, dalyvaujančius svarbiose viruso raidos ciklo stadijose, pavyzdžiui virusui patenkant į ląstelę ar transportuojant nukleokapsidę į branduolį [57, 109]. Nustatytos baltymų

sąveikos galėtų tapti svarbiais antivirusinės chemoterapijos taikiniai.

Laukinio tipo HBV dar neatspindi viso su šiuo virusu susijusių problemų spektro. Šiuo metu vyrauja nuomonė, kad laukinio tipo HBV nėra tiesiogiai kenksmingas kepenų ląstelėms, o kepenų pažeidimus dažniausiai sukelia šeimininko imuninis atsakas [20]. Taip pat žinoma, kad hepatito B virusu užsikrėtusiems, ilgą laiką imunitetą slopinančius vaistus gaunantiems pacientams, neretai išsivysto cirozė ir galutinės stadijos kepenų liga, nors šiais atvejais žalingas imuninės sistemos poveikis mažai tikėtinas. Ankstesni tyrimai atskleidė, kad imunosupresuojamų inkstų transplantacijos recipientų sunkias hepatitų formas lydi HBV atmainų, turinčių iškritas centrinėje šerdies baltymo dalyje, kaupimasis [42, 72]. Šios iškritos siejamos su galutinės stadijos kepenų ligos išsivystymu ir pacientų mirtimi. Vis tik iki šiol neaišku, kaip pakitę HBV šerdies baltymai susiję su kepenų ligos paūmėjimu.

Vienas iš galimų mechanizmų yra tiesioginis mutantinių HBc baltymų citotoksiškumas. Nors kai kurie virusai, ypač nuėję ilgesnį evoliucijos kelią, dauginasi savo šeimininko ląstelėse nesukeldami akivaizdžių patologinių pokyčių, paprastai toks dauginimasis sutrikdo normalią ląstelės veiklą ir sukelia patologinius pakitimus. Dažniausias tokių sąveikų tikslas – susilpninti šeimininko antivirusinį atsaką ar nukreipti šeimininko išteklius viruso dauginimosi reikmėms. Bet smarkiai pakitę, paprastai nesugebantys savarankiškai daugintis mutantiniai virusai, gali sukelti netikėtą žalą dėl sąveikos su baltymais, nesusijusiais su viruso išgyvenimu. Tokių sąveikų aptikimas galėtų prisidėti prie mutantinių virusų patogenezės mechanizmų supratimo ir naujų gydymo būdų kūrimo.

Šiame darbe su HBV šerdies baltymu ir jo mutantinėmis formomis sąveikaujančių žmogaus baltymų buvo ieškoma panaudojant mielių dviejų hibridų sistemą [33] ir žmogaus hepatocitų kDNR biblioteką.

Pagrindiniai darbo tikslai:

Panaudojant mielių dviejų hibridų sistemą ir žmogaus hepatocitų kDNR

biblioteką nustatyti žmogaus baltymus, sąveikaujančius su hepatito B viruso šerdies baltymu.

Nustatyti žmogaus baltymus, sąveikaujančius su hepatito B viruso šerdies baltymo mutantinėmis formomis.

Detaliai ištirti atrinktų baltymų porų tarpusavio sąveikas.

Mokslinis naujumas:

Nustatyta, kad hepatito B viruso šerdies baltymai gali sąveikauti su žmogaus GIPC1 baltymu. HBc baltymo C gale aptikta potenciali PDZ domenų atpažinimo seka ir parodyta, kad ši seka būtina HBc sąveikai su GIPC1 baltymo PDZ domenu, o jos amino rūgščių sudėtis įtakoja šią sąveiką.

Atrasta hepatito B viruso šerdies baltymo sąveika su žmogaus GIPC2 baltymu. Parodyta, kad HBc baltyme esančios PDZ domenų atpažinimo sekos amino rūgščių sudėtis įtakoja HBc sąveiką su GIPC2 baltymo PDZ domenu.

Nustatyta, kad mutantiniai, bet ne laukinio tipo HBc baltymai gali sąveikauti su nežinomos funkcijos žmogaus baltymu FLJ20850. Parodyta, kad šių baltymų tarpusavio sąveiką apsprendžia natūraliai aptinkama arba dirbtinai įvesta HBc centrinės dalies iškrita. Atlikta bioinformatinė FLJ20850 geno ir jo raiškos analizė.

Aptikta mutantinių, bet ne laukinio tipo HBc baltymų sąveika su žmogaus baltymu IKK γ . Išaiškintos abiejų baltymų sritys, įtakojančios jų tarpusavio sąveiką.

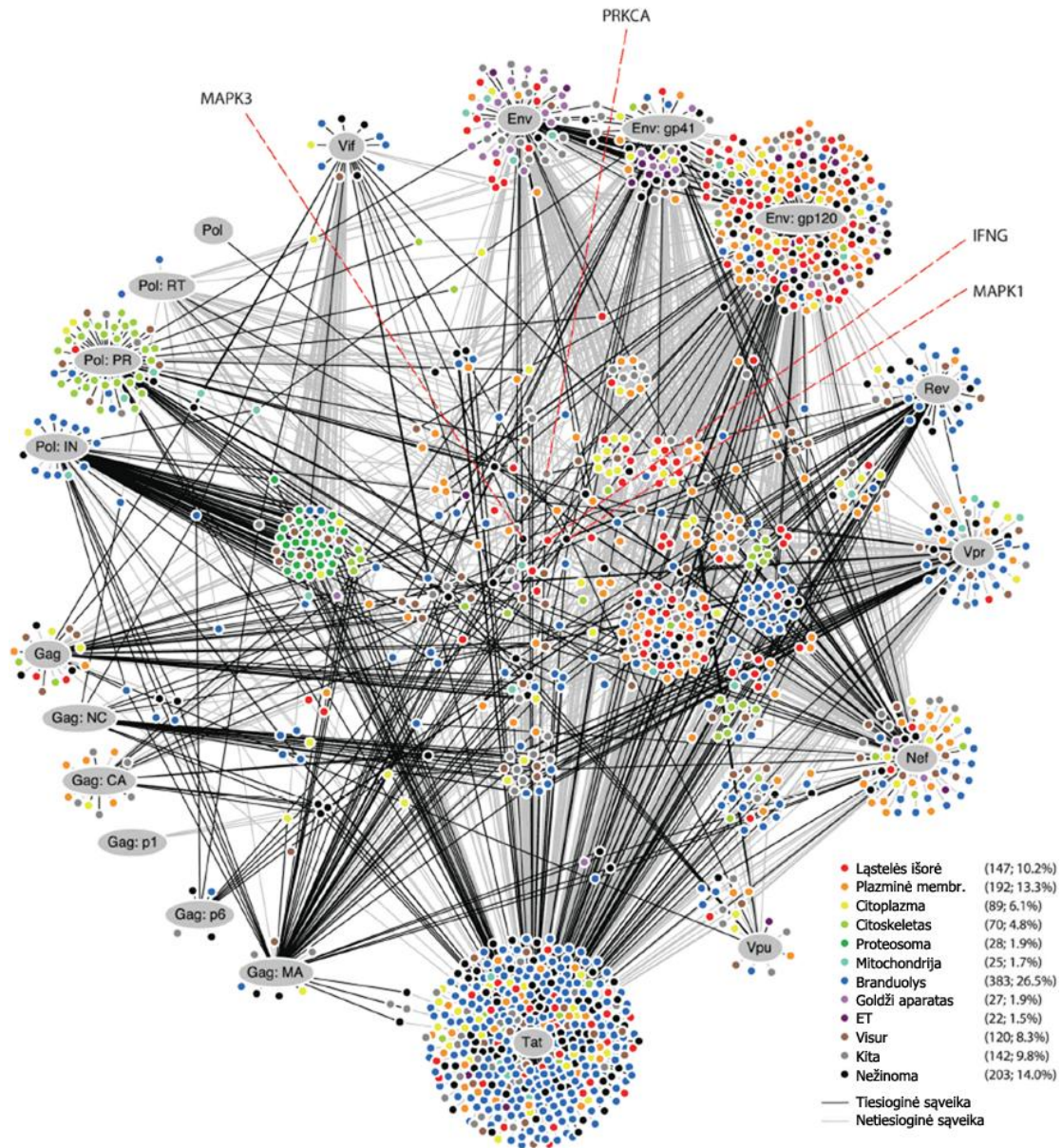
1. LITERATŪROS APŽVALGA

Viruso ir šeimininko baltymų sąveikos ir jų reikšmė

Virusai yra išimtinai viduląsteliniai parazitai, todėl savo dauginimosi ciklo metu neišvengiamai turi sąveikauti su šeimininko ląstelės komponentais. Dėl savo palyginti paprastos struktūros ir mažo genomo dydžio virusai neturi daugelio matabolizmui, biosintezei ar judėjimui būtinų komponentų. Todėl daugelį virusui reikalingų funkcijų atlieka šeimininko ląstelės struktūros, kuriomis virusas sumaniai pasinaudoja. Visa viruso „išmintis“ užkoduota pirminėje jo genomo sekoje, o ji realizuojama viruso nukleorūgštims ir baltymams sąveikaujant su ląstelės komponentais, dažniausiai baltymais. Virusų genomo replikaciją, iRNR ir baltymų sintezę didžiausia dalimi apsprendžia šeimininko baltymų sąveika su atitinkamomis viruso nukleorūgščių sekomis. Tuo tarpu viruso ir ląstelės baltymų tarpusavio sąveika neišvengiama virusui patenkant į ląstelę, viruso baltymams ir jų suformuotoms struktūroms keliaujant ląstelės viduje, viruso baltymams įtakojant ląstelės signalinių kelių ir antivirusinės gynybos mechanizmų komponentus. Virusinių baltymų sąveikos su šeimininko baltymais tyrimais siekiama ne tik išsiaiškinti virusų replikacijos ciklo ypatumus ar suprasti jų patogenezės mechanizmus, aptiktomis sąveikomis galima pasinaudoti ir siekiant sukurti naujus antivirusinius medikamentus bei gydymo būdus.

Tokių tyrimų pradžioje daugiausia buvo nagrinėjamos pavienių baltymų sąveikos, pastaruoju metu vykdoma vis daugiau proteominių plataus masto tyrimų, sudarinėjamos sąveikaujančių baltymų duomenų bazės. Geriausiai ištirtų virusų ir žmogaus baltymų sąveikos jau skaičiuojamos tūkstančiais (**1 lentelė**). Sąveikose su virusais dalyvauja visų kategorijų žmogaus baltymai ir žymiai daugiau baltymų, nei galima būtų tikėtis žinant viruso replikacijos ciklą. Geriausiai ištirtų virusų sąveikos su žmogaus baltymais jau vaizduojamos sudėtingais tinklais, ir į šiuos tinklus kasdien įtraukiama vis daugiau

komponentų (1 pav.).



1 pav. ŽIV-1 ir žmogaus baltymų tarpusavio sąveikos tinklas. Pilki ovalai žymi žmogaus imunodeficito viruso 1 (ŽIV-1) baltymus. Spalvotais skrituliukais pavaizduoti žmogaus baltymai sutelkti aplink ŽIV-1 baltymą, su kuriuo jie sąveikauja. Žmogaus baltymai, sąveikaujantys su keliais virusiniais baltymais, pavaizduoti paveikslėlio centre. Spalvos žymi Genų ontologijos konsorciumo apibrėžtas žmogaus ląstelės baltymų kategorijas. Kiekvienos kategorijos žmogaus baltymų skaičius ir procentas nuo visų 1448 su ŽIV-1 sąveikaujančių baltymų nurodytas skliausteliuose. Juodos linijos žymi tiesioginę sąveiką (pvz. surišimą), o pilkos linijos – netiesioginę sąveiką (pvz. raiškos slopinimas). Pagal [93].

Lentelė 1. Duomenys apie kai kurių virusų sąveikas su žmogaus baltymais

Grupė	Sąveikų skaičius	Viruso atmainų skaičius	Sąveikaujančių unikalių žmogaus baltymų skaičius
ŽIV	8024	44	743
Hepatito virusai	1244	16	109
Gripo virusai	287	4	76
Papilomos virusai	229	12	96
Epštein-Bar virusas	211	2	135
Adenovirusas	80	9	60
Herpeso virusai	64	20	54
Sarkomos virusas	52	6	36
T-limfotropiniai virusai	25	2	23
Karvės raupų virusas	13	4	7
Tymų virusas	10	3	4

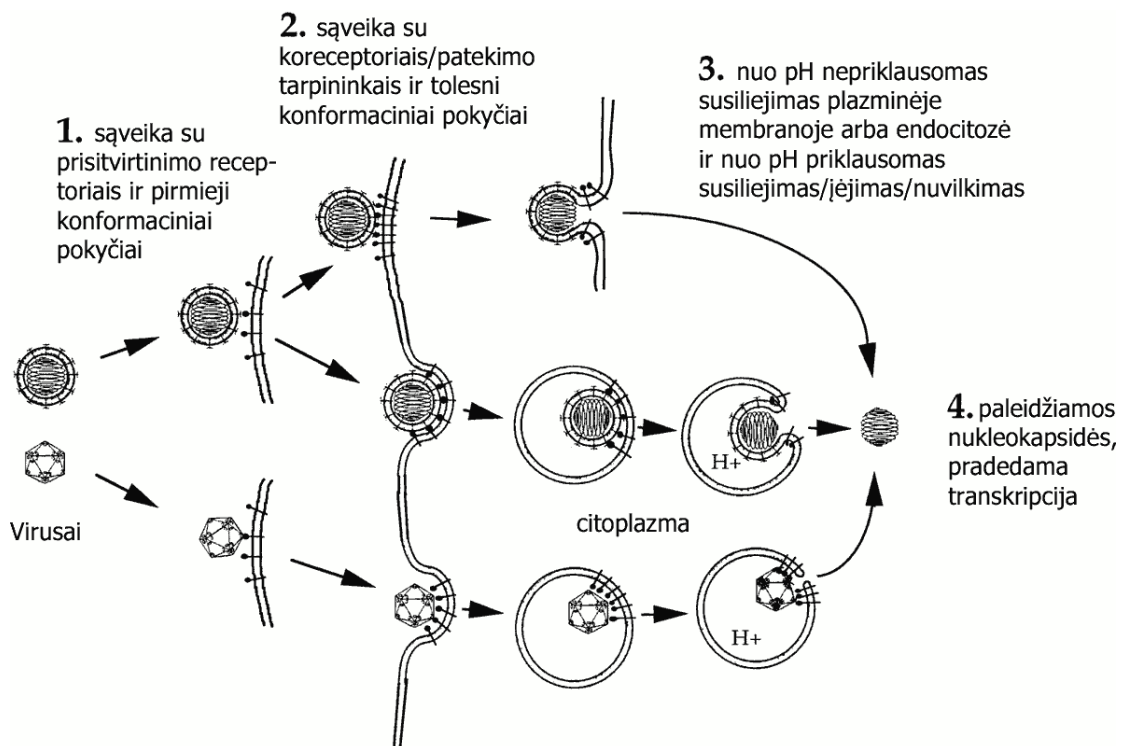
Pagal [28]

1.1. Baltymų sąveikos virusui patenkant į ląstelę

Tai, kokias rūšis, kokius organizmo audinius ir kokius ląstelių tipus užkrės konkretus virusas, dažniausiai apsprendžia to viruso paviršiuje esančių baltymų gebėjimas sąveikauti su tam tikrais šeimininko ląstelės paviršiaus komponentais. Prisitvirtinimo prie ląstelės funkciją atlieka apvaskalą turinčių virusų paviršiaus baltymų išsikišimai ir apvaskalo neturinčių virusų kapsidės baltymų išsikišimai. Nors viruso sąveika su receptoriumi būtina infekcijos pradžia, ne visada vien ji apsprendžia kurias ląsteles užkrės konkretus virusas. Daug ką lemia viduląstelinė aplinka, ląstelių gynybiniai mechanizmai, tam tikrų transkripcijos veiksnių ir proteazių buvimas, tiesioginis viruso perdavimas kitiems organams ir kiti veiksniai. Pavyzdžiui, nors hepatito virusai A ir C sąveikauja su receptoriais, esančiais daugelio tipų ląstelių paviršiuose, o konkretus hepatito B viruso receptorius iki šiol nenustatytas, šie virusai dauginasi beveik išimtinai hepatocituose. Nors tikėtina, kad kai kurie šių virusų receptoriai ar koreceptoriai dar nenustatyti, šių virusų specifiškumą gali apspręsti ir jų genomuose randamos daugiausia kepenyse sintetinamų transkripcijos veiksnių surišimo sekos. Kitą vertus, net jei virusas neužkrečia tam tikrų ląstelių tipų, sąveikos su receptoriumi sužadintas signalas gali turėti didelę įtaką ligos eigai. Pavyzdžiui ŽIV ir paprastojo herpeso virusai (HSV) gali sužadinti interferono α sintezę vien sąveikaudami su dendritinių ląstelių ar

monocitų paviršiuje esančiu manozės receptoriumi [106].

Viruso patekimą į ląstelę galima suskirstyti į keletą etapų (2 pav.). Pirmajam patekimo etapui, prisitvirtinimui prie ląstelės, virusai dažnai naudoja angliavandenius, lipidus arba standartinius ląstelės paviršiaus baltymų motyvus. Pavyzdžiui gripo virusas sąveikauja su sialo rūgštimi, o adenovirusai ir kai kurie pikornavirusai naudoja integrinų RGD (argininas-glicinas-aspartatas) sekas, kuriomis pastarieji sąveikauja su neląstelinėmis adhezijos molekulėmis. Dažniausiai virusų naudojami angliavandenių turintys prisitvirtinimo receptoriai – glikoproteinai, glikosfingolipidai ir proteoglikanai. Dažniausiai pirmajame etape naudojami baltyminiai receptoriai – integrinai, ląstelių adhezijos molekulės ir su tarpląstelinėmis jungtimis susiję baltymai [10].



2 pav. Keturi virusų patekimo į ląsteles etapai. Virusinės dalelės sąveikauja su prisitvirtinimo receptoriais sukeldami pirmuosius virusinio apvalkalo konformacinius pokyčius (1). Pirmasis etapas suteikia galimybę sąveikauti su specifiskesniais receptoriais bei sukeldami konformacinius plazminės membranos pokyčius (2), galinčius sąlygoti membranų susiliejimą (3). Kai kuriems virusams išėjimui iš endosomų reikalingas žemas pH. Šių įvykių dėka virusinės dalelės arba plikas genomas patenka į citoplazmą ir prasideda viruso replikacijos ciklas (4). Pagal [106].

Lentelė 2. Virusų receptoriai ir jų patekimo į ląstelę būdai

Virusas	Tipas	Genomas	Ø nm	Receptorius	Patekimas
AdV-2, AdV-5	Be apvalkalo	dgDNR	80-110	CAR, koreceptorius: $\alpha\beta 5$ integrinas	Klatrininė endocitozė
AdV-8, AdV-37			80-110	$\alpha(2,3)$ -sialo rūgštis	
ASFV	Su apvalkalu		175-215		
Ebola virusas		vgRNR(-)	80	Foliato receptorius- α , lektinas	
HCV		vgRNR(+)	50	CD81, SR-B, lektinas	
TBEv		vgRNR	40-60	HSPG	
Dengė virusas		vgRNR(+)	40-60	Lektinas, HSPG	
HBV		dgDNR	40-48	Nežinomas	
ŽCMV			100-110	Lektinas, HSPG	
Gripo A virusas		vgRNR(-)	80-120	Sialo rūgštis	
ŽPV	Be apvalkalo	dgDNR	40-55	HSPG, $\alpha_6\beta_4$ integrinas	
JCV			40-50	Sialo rūgštis GT1b, koreceptorius: 5HT-2a	
AAV-2		vgDNR	20-25	HSPG, koreceptoriai: HFGFR I, $\alpha\beta 5$	
AAV-5			20-25	$\alpha(2,3)$ -sialo rūgštis	
MVM			20-26		
Šunų parvovirusas			20-26	40 ir 42 kDa glikoproteinai	
Parechovirusas-1		vgRNR(+)	30-60	$\alpha\beta 3$ integrinas, $\alpha\beta 1$ integrinas	
HRV-2			30	LDL	
VV	Su apvalkalu	dgDNR	250-360	32 kDa baltymas	
Reovirusas	Be apvalkalo		60-80	JAM baltymai	
ASLV	Su apvalkalu	vgRNR(+)		TNF artimas baltymas	
Pasiutligės virusas		vgRNR(-)	45-100	Acetilcholinas, NCAM	
VSV			70	Fosfatidilserinas	
Sindbi virusas		vgRNR	70	HSPG	
SFV		RNR(+)	50-70	CD155, HLA-A, HLA-B, pelių H-2d	
Raudonukės virusas		vgRNR(+)	50-60	Fosfolipidai ir glikolipidai	
ŽPV-31	Be apvalkalo	dgDNR	50-55	Nežinomas	Kalveolinė endocitozė
BK virusas			45-55	$\alpha(2,3)$ -sialo rūgštis GD1b, GT1b	
NDV	Su apvalkalu	vgRNR(-)	150-300	Sialo rūgštis beta anomeras	
RSV			125-250	Nežinomas	
Koksaki B	Be apvalkalo	vgRNR(+)	20-30	CAR, koreceptorius: DAF	
EV1			24-30	$\alpha 2\beta 1$ integrinas VLA-2	
SV40		dgDNR	45-50	GM1 gangliozidas	
MuPyV			40-50	Sialo rūgštis, GM1, GD1a, GT1b	
HSV-1	Su apvalkalu		100-110	HVEA, HSPG, nektinas-1 α , nektinas-1 β	Susiliejinimas su plazmine membrana
EBV			120-220	CD21, CR2	

HPIV-3		vgRNR(-)	125–250	HSPG, sialo rūgštis	
Tymų virusas			125–250	SLAM	
Sendai virusas			125–250	Sialo rūgštis	
NDV			150–300	Sialo rūgšties beta anomeras	
RSV			125–250	Nežinomas	
ŽIV-1		vgRNR(+)	120	CD4, koreceptoriai: CCR5, CXCR4	
MLV			90	CAT1	
LCMV		vgRNR(-)	110–130	Alfa-distroglikanas	Nebūtinai aktinas
AdV-2	Be apvalkalo	dgDNR	80–110	CAR, koreceptorius: $\alpha\beta 5$ integrinas	Makropino-citozė
Gripo virusas	Su apvalkalu	vgRNR(-)	80–120	Sialo rūgštis	Nebūtinai klatrinas
Poliovirusas	Be apvalkalo	vgRNR(+)	22–30	Ig šeima	Nebūtinai dinaminas
HRV (HRV-14)			25–30	ICAM-1	
EV11			24–30	DAF	Būtinai lipido dariniai
Rotavirusas		dgDNR	60–80	$\alpha 2\beta 1$ & ir $\alpha\beta 3$ integrinai, Hsc70, gangliozidai, N-glikoproteinai	Būtinai Ca(2+)

Sutrumpinimai: *dgDNRI*, dvigrandė DNR; *TBEv*, erkinio encefalito virusas; *AAV*, adenosusijęs virusas; *MVM*, mažasis pelių virusas, *HRV-2*, 2-o tipo žmogaus rinovirusai; *ASLV*, paukščių leukozės sarkomos virusas; *SFV*, Semliki forest virusas; *HPIV-3*, žmogaus paragripo virusas-3; *vgRNR*, viengrandė RNR; *CD81*, diferenciacijos klasteris 81; *SR-B*, B klasės “scavenger” receptorius; *HSPG*, heparano sulfato proteoglikanas; *JCV*, Džeimstauno kanjono virusas; *NCAM*, neuronų ląstelių adhezijos molekulė; *JAM*, jungčių adhezijos molekulės; *LDL*, žemo tankio lipoproteinai; *CD155*, diferenciacijos klasteris 155; *HLA-A*, žmogaus leukocitų antigenai A; *HLA-B*, žmogaus leukocitų antigenai B; *NDV*, Njukaslo ligos virusas; *CAR*, koksaki-adenovirusų receptorius; *DAF*, irimą skatinantis veiksnys; *VLA-2*, labai vėlyvas antigenas 2; *EV1*, echovirusas 1; *MuPyV*, pelių poliomos virusas; *HVEA*, herpeso viruso įėjimo tarpininkas A; *CD21*, diferenciacijos klasteris 21; *CR2*, komplemento receptorius 2; *SLAM*, signalizuojanti limfocitų aktyvavimo molekulė; *CD4*, diferenciacijos klasteris 4; *CCR5*, chemokinių (C-C motyvas) receptorius 5; *CXCR4*, chemokinių (C-X-C motyvas) receptorius 4; *MLV*, pelių leukemijos virusas; *LCMV*, limfocitinis choriomeningito virusas; *ICAM-1*, viduląstelinė adhezijos molekulė 1; *EV11*, echovirusas 11; *Hsc70I*, 70-kDa šiluminio šoko atpažinimo baltymas. Pagal [78].

Antrajame patekimo į ląstelę etape virusai daug specifiškiau sąveikauja su baltymineis receptoriais. Akivaizdu, kad receptoriai dažnai atlieka aktyvų vaidmenį surišant virusą ir jam patenkant į ląstelę. Patekdami į ląstelę virusai dažniausiai pasinaudoja įprasta receptoriaus signaline funkcija. Vienas virusas gali sąveikauti su keletu tokių receptorių. Pavyzdžiui pasiutligės virusas naudoja nikotino-acetilcholino receptorių, neuronų ląstelės adhezijos molekulę ir p75 neutropino receptorių. Taip pat ir vieną receptorių gali naudoti skirtingos virusų šeimos – pavyzdžiui į imunoglobulinas panašų

receptorių CAR naudoja daug koksakivirusų ir adenovirusų atstovų. Manoma, kad virusų receptoriai gali būti tik molekulės, atitinkančios šiuos kriterijus: jų ląstelės paviršiuje turi būti gausu, jos turi būti pasiekiamos virusui, jos turi būti arti ląstelės membranos ar koreceptorių, pageidautina, kad jos dalyvautų išorinių komponentų patekimo į ląstelę mechanizmuose ar signaliniuose keliuose [64]. Kai kurie skirtingų virusų šeimų pirmojo ir antrojo etapo receptoriai kartu su šių virusų patekimo į ląstelę būdais bei kitomis esminėmis charakteristikomis pateikti lentelėje (**2 lentelė**).

Savo patekimui į ląstelę virusai dažniausiai naudojami įprastais makromolekulių patekimo į ląsteles mechanizmais, pavyzdžiui endocitoze. Bet kai kurie virusai sugeba patekti į ląstelės vidų ir nesinaudodami šiais mechanizmais – viruso sąveika su receptoriumi gali sąlygoti jo apvalkalo arba kapsidės konformacinius pokyčius ir palengvinti viruso patekimą. Siekdami patekti į ląstelę apvalkalą turintys ir jo neturintys virusai susiduria su skirtingomis problemomis, ir tas problemas jie sprendžia šiek tiek skirtingomis priemonėmis. Apvalkalą turintys virusai gali patekti į ląstelę šiam apvalkalui susiliejus su endosomos (vykstant sąveikos su receptoriumi sukeltai endocitozei) ar tiesiog ląstelės membrana. Virusų ir endosomos membranos susiliejimas sukelia endocitinių pūslelių parūgštėjimą ir aktyvuoja pūsleles lizuojančius fermentus. Iš suirusios pūslelės viruso šerdis patenka į citoplazmą ir į paskirties vietą toliau keliauja naudodamasi kitomis viduląstelinio transporto sistemomis.

Dauguma neturinčių apvalkalo virusų į ląstelės vidų patenka endocitozės būdu. Poliovirusai patenka endocitozės būdu arba įstumdami savo genomus į ląstelę per porą, kurią ląstelės membranoje suformuoja jo kapsidės baltymas VP1. Kai kurie pikornavirusai ir reovirusai panaudoja ląstelės endosomų rūgštinimo mechanizmus, kurie sukelia konformacinius kapsidės pokyčius. Tuomet atsiskleidusios hidrofobinės sritys įsiterpia į membraną ir suformuoja poras, per kurias genomai išstumiami į citoplazmą. Adenovirusas susiriša su savo receptoriumi integrinu, taip aktyvuoja PI3K ir Rho GTP-azes, kurios

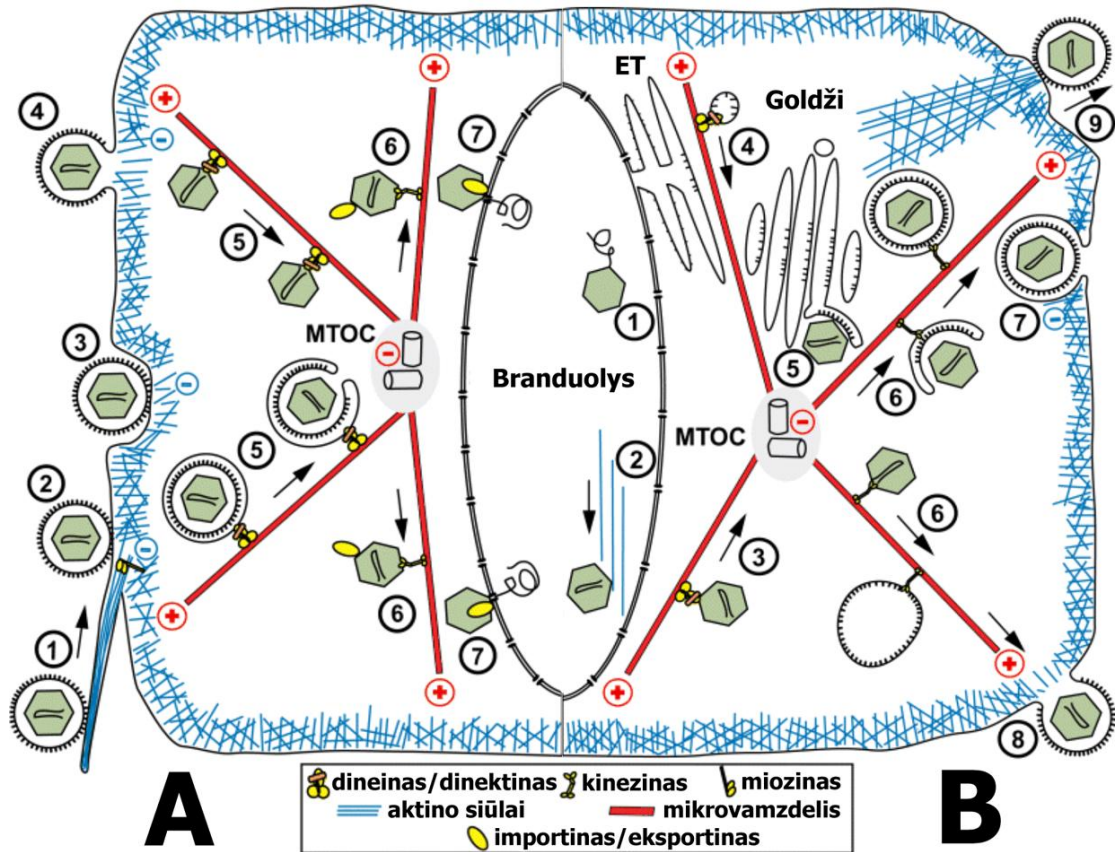
sukelia citoskeleto aktino persitvarkymus ir įgalina viruso patekimą į ląstelę. Toliau kapsidė transportuojama į branduolį endosomose, kurias pakeliui virusinė proteazė užrūgština ir suardo [64].

Alternatyviuose patekimo į ląstelę keliuose virusai pasinaudoja kalveolėmis, kurios paprastai dalyvauja signalo perdavime. SV40 priverčia savo receptorius, pirmos klasės didžiojo audinių suderinamumo (MHC I) molekules, burtis kalveolėse, kurios įtraukiamos į ląstelės vidų, susilieja su kalveosomomis ir keliauja į endoplazminį tinklą (ET), iš kur virusas transportuojamas į branduolį. Dengė virusas išmoningai pasinaudoja prie jo prisijungusiomis antikūnų molekulėmis, kurios sąveikauja su makrofagų receptoriais, ir į ląstelės vidų patenka pasinaudojęs imuninių kompleksų įsiurbimo mechanizmu. Kai kurie virusai priverčia vienas ląsteles tiesiogiai juos perduoti kitoms. Pavyzdžiui ŽIV-1 rišasi su dendritinių ląstelių paviršiuje esančiu lektinu DC-SIGN, o šios antigenus pristatančios ląstelės gali perduoti virusą T limfocitams. Taip pat ir Epštein-Bar virusas rišasi su komplemento receptoriumi CD21 limfocitų B paviršiuje, o po to pernešamas į epitelines ląsteles kai dviejų tipų ląstelės suformuoja tarpląstelines sinapses [64].

1.2. Baltymų sąveikos, užtikrinančios viruso komponentų viduląstelinį transportą

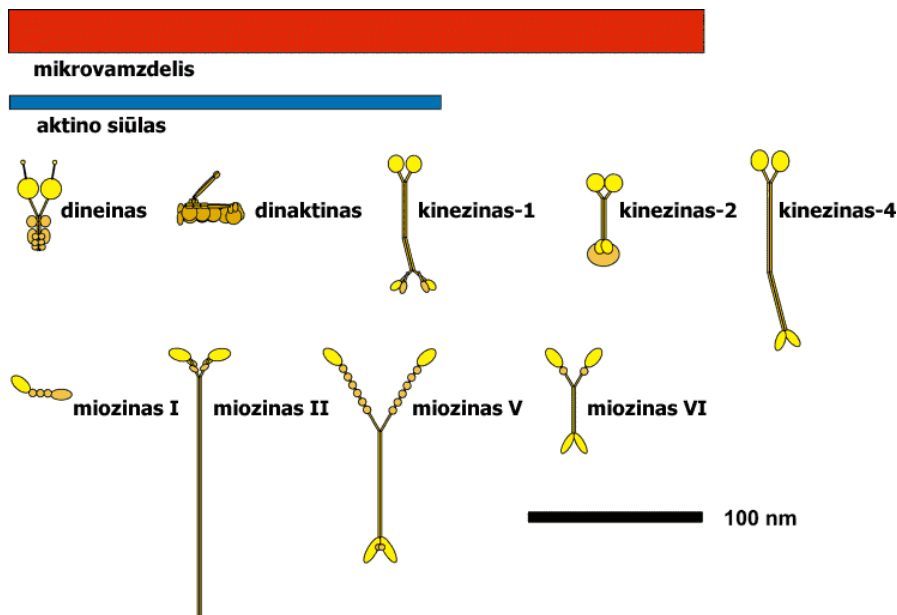
Patekęs į citoplazmą ir nusimetęs arba dalinai nusimetęs baltyminius apvalkalus, viruso genomas turi būti nugabentas į savo replikacijos vietą citoplazmoje arba branduolyje. Naujai susintetintas virusas ar jo komponentai turi keliauti į savo susirinkimo ar išėjimo iš ląstelės vietą. Bet ląstelės citoskeletas, aukšta baltymų koncentracija (iki 300 mg/ml) ir gausybė organelių apsunkina laisvą difuziją, o didesnės nei 500 kDa ar 20 nm skersmens struktūros citoplazmoje visai nejudrios. Didelių DNR molekulių difuzija ląstelėje taip pat praktiškai nevyksta – 250 nt ir 2000 nt DNR atkarpų difuzija citoplazmoje yra atitinkamai 17 ir daugiau kaip 100 kartų lėtesnė nei

vandenyje, o branduolyje DNR praktiškai nejudri [110]. Todėl virusas ar subvirusinė dalelė turi naudotis viduląstelinio transporto ir importo į branduolį mechanizmais.



3 pav. Virusų naudojami viduląstelinio transporto keliai A. Viruso patekimas į ląstelę ir kelionė į jos centrą. Pavaizduoti hipotetiniai apibendrinti virusų modeliai. Skirtingų šeimų virusų sąveika su citoskeletu vyksta skirtingai, ir, kiek iki šiol žinoma, nė vienas virusas nesinaudoja visais čia pavaizduotais mechanizmais, bet gali naudoti ir čia nepavaizduotus. Hipotetinis virusas prisikabina prie plazminės membranos ir slenka išilgai filopodijų (1) iki didelio endocitinio aktyvumo srities (2), kur endocitozės būdu įtraukiamas į ląstelės vidų (3). Kiti virusai iš karto susilieja su plazmine membrana (4). Praskrodę aktino žievę patys ar endocitinių pūslelių viduje, virusai dineinų/dinaktinų pagalba yra transportuojami išilgai mikrovamzdelių link mikrovamzdelių organizacijos centro (MTOC) (5). Toliau virusai juda link branduolio, galbūt, pasinaudodami branduolio importo/eksporto mechanizmais (6). Prisitvirtinę prie branduolio poros, virusai paleidžia savo genomą replikuotis (7). **B. Virusų susirinkimas ir išėjimas iš ląstelės.** Į naujai susintetintas kapsides pakuojamas genomas (1) ir prieš palikdamas branduolį transportuojamas išilgai branduolio aktino (2). Plikos virusinės dalelės mikrovamzdelių motoro dineino pagalba transportuojamos link MTOC (3), o virusiniai membraniniai baltymai sintetunami endoplazminio tinklo (ET) membranoje ir išilgai mikrovamzdelių transportuojami iš ET į Goldži aparatą (4), nuo kurio pumpuruoja kapsidės (5). Subvirusines daleles arba pūslelėse esančius pilnus virusus kinezinai išilgai mikrovamzdelių transportuoja link plazminės membranos (6), po to virusai pereina aktino žievę ir palieka ląstelę egzocitozės būdu (7) arba atsipumpuruodami nuo ląstelės membranos (8). Perėjusį plazminę membraną virusą dinaminė aktino atšaka gena link gretimos ląstelės (9). Pagal [96].

Endosomose į ląstelės vidų patekę virusai paprastai transportuojami mikrovamzdelių ir jais slenkančių motorinių baltymų dineino bei kinezino pagalba. Taip link branduolio keliauja parvovirusai ir adenovirusai. Trumpų atstumų transporte dažniausiai panaudojami aktino siūleliai ir jais judantys miozinai. Virusai, patenkantys į citozolį tiesiai per plazminę membraną, pavyzdžiui herpeso virusai ir ŽIV, turi tiesiogiai sąveikauti su šeiminingo viduląstelinio transporto mechanizmais. Virusų naudojami viduląstelinio transporto mechanizmai jiems patenkant į ląstelę, keliaujant link branduolio, judant link viruso susirinkimo vietų ir išeinant iš ląstelės pavaizduoti iliustracijoje (3 pav.).



4 pav. Subvienetinė motorinių baltymų struktūra. Dineinai ir kinezinai juda išilgai mikrovamzdelių. Dineinas susideda iš dviejų motorinių aktyvumą turinčių sunkiųjų grandinių (DHC, geltonos), dviejų tarpinių (DIC), dviejų lengvųjų tarpinių (DLIC) ir šešių lengvųjų grandinių (DLC), priklausančių baltymų šeimoms tctex, LC8 ir LC7 (oranžinės). Jų kofaktorius dinaktinas (tamsiai oranžinis) susideda iš trumpos lazdelės, kurią pagrinde sudaro baltymas Arp1 ir lankšties atšakos, kurią sudaro p150^{Glued}. Kinezinai 1, 2 ir 4 turi po du motorinius domenų (geltoni), kurie kinezino-1 atveju vadinami kinezino sunkiosiomis grandinėmis (KHC), kinezino-2 atveju – KIF3, o kinezino-4 atveju – KIF4. Kinezinai 1 ir 2 turi papildomų subvienetų (oranžiniai): dvi lengvosios grandinės (KLC) įeina į kinezino-1, o su kinezinu susijęs baltymas (KAP) – į kinezino-2 sudėtį. Miozinai II, V ir VI taip pat turi po du motorinius domenų (geltoni), o miozinas I – tik vieną. Miozinas II dar turi dvi reguliacines ir dvi esmines lengvasias grandines, miozinai I, V ir VI turi keletą kalmodulino subvienetų, o miozino V gale dar yra LC8 (visi oranžiniai). Molekulių dydis grubiai atitinka mastelį. Pagal [96].

Nors virusų judėjimas aktino siūlais kol kas daug mažiau ištirtas nei jų judėjimas mikrovamzdeliais, jau nustatyta kad daugybė virusinių baltymų

sąveikauja tiesiogiai su aktinu arba su baltymais, sąveikaujančiais su aktinu. Retrovirusų, pikornavirusų ir herpeso virusų subrendusiose virusinėse dalelėse netgi randama aktino. Aktino siūlų storis yra 7-9 nm, jie sudaryti iš "galva-uodega" susijungusių aktino monomerų. Taigi, aktino siūlai yra poliniai ir turi greitai ilgėjantį "plius" galą bei lėtai ilgėjantį "minus" galą, o jų dinamiką reguliuoja daugybė su aktinu susirišančių baltymų. Aktino siūlai susirenka į linijinius pluoštus, plokštuminius tinklus ir erdvinius gelius. Aktino yra visame citozolyje, bet didžiausia jo koncentracija yra prie pat plazminės membranos, su kuria aktino struktūras susieja tarpiniai baltymai.

Aktino siūlais juda ir gabena krovinius motoriniai baltymai miozinai. Miozinai sudaryti iš vienos ar dviejų sunkiųjų grandinių ir vienos ar daugiau lengvųjų grandinių (**4 pav.**). Sunkioji grandinė sudaryta iš konservatyvaus N-galinio motorinio domeno, besirišančio su aktino siūlais ir hidrolizuojančio ATP, keitiklio domeno, verčiančio išsiskiriančią energiją į judėjimą, jungiančiojo domeno, sąveikaujančio su lengvosiomis grandinėmis, ir skirtingų C-galo sferinių domenų, surišančių krovinį. Remiantis sunkiosios grandinės homologijomis išskirta 20 miozinų klasių. Žmogus turi 12 skirtingų klasių miozinų. Paprastai aktino siūlų "plius" galai nukreipti link plazminės membranos, taigi link "plius" galo judantys miozinai, pavyzdžiui miozinai I ir V, savo krovinį gabena link plazminės membranos. Link "minus" galo judantys miozinai, pavyzdžiui miozinai VI ir galbūt IXb, juda priešinga kryptimi.

Išmanevravę per ląstelės aktino žievę patys ar pūslelių viduje, virusai, kaip ir endosomos, savo kelionėje link ląstelės centro pereina nuo aktino ant mikrovamzdelių nutiestų takų. Tai padaroma arba atsikabinant nuo miozinų ir prisikabinant prie dineinų, arba išlaikant susiejimą ir su miozinais, ir su dineiniais. Mikrovamzdeliai virusams ne tik suteikia galimybę judėti, bet ir atlieka navigacinę funkciją – nukreipia juos link branduolio. Link mikrovamzdelių organizacijos centre esančių "minus" galų juda dineinai ir C-tipo kinezinai, o N-tipo kinezinai juda link mikrovamzdelių "plius" galų, paprastai nukreiptų į ląstelės periferiją ir susisiekančių su aktino žieve.

Lentelė 3. Virusinių baltymų sąveikos su ląstelės dineiniais ir kineziniais

Virusas	Molekulinis motoras	Viruso komponentas
AdV-2, AdV-5	Dineinas-1	Visa viruso kapsidė
Adenovirusai	DYNLL	Proteazė
AdV-2	TCTEL1, per adaptorių FIP-1	R3-14.7K baltymas
AAV	Dineinas-1	Visa viruso kapsidė
ASFV	DYNLL	p54 baltymas
Bakulovirusas	DYNLL	AMV179 baltymas
Citoplazminiai virusai	Kinezinas-1	Kapsidės
Gripo virusas X-31	Dineinas	Nenustatytas
Žmogaus RSV	DYNLL	Prisitvirtinimo glikoproteino išorinis domenas
HSV-1	DYNC1I	UL37 baltymas
	DIC-1a	UL34 baltymas
	DYNLT1 (Tctex1), DYNLT3 (Rp3)	VP26 baltymas
	Dineinas	VP1-3 baltymai
	KHC	US11 baltymas
	PAT1	US11 baltymas
	DYNLL	UL9 (helikazė)
	DYNLL	VP5 (kapsidės baltymas)
	KIF1A	UL56 baltymas
	YMV	DYNLL
VV	Dineinas/dinaktinas	A27L baltymas
	KLC	A36R baltymas
	DYNLL	Polimerazė
Lisavirusas	DYNLL	Fosfobaltymas
M-PMV	DYNLL	Gag baltymas
Mokola virusas	DYNLL	P baltymas
Pasiutligės virusas	DYNLL	P baltymas
Poliovirusas	DYNLT1 (Tctex1)	CD155 receptorius
Retrovirusai	KIF4	Gag baltymas
Šunų parvovirusas	Dineinas-1	Visa viruso kapsidė
ŽIV	Dineinas	Atvirkštinės transkriptazės kompleksas
	KIF4	Gag
	DYNLL	Integrazė
	DYNLL	Kapsidės baltymas
Žmogaus koksaki virusas	DYNLL	Kapsidės baltymas
ŽPV	DYNLL	E4 baltymas
HFV	DYNLL	Gag baltymas

Sutrumpinimai: *DYNLL*, citoplazminio dineino lengvoji grandinė LC8; *TCTEL1*, dineino subvienetas; *AAV*, adeno-susijęs virusas; *DYNC1I*, citoplazminio dineino tarpinė grandinė; *DIC-1a*, dineino subvienetas; *DYNLT1*, citoplazminio dineino lengvoji grandinė; *DYNLT3*, citoplazminio dineino lengvoji grandinė; *KHC*, kinezino subvienetas; *PAT1*, kinezino subvienetas; *KIF1A*, kinezino-3 subvienetas; *YMV*, Yam mozaikinis potivirusas; *KLC*, kinezino-1 subvienetas; *M-PMV*, Mason-Pfizer beždžionių virusas; *KIF4*, kinezinas-4; *HFV*, žmogaus putotas virusas. Pagal [29, 40, 66].

Citoplazminių dineinų dvi sunkiosios grandinės rišasi su mikrovamzdeliais ir hidrolizuoja ATP. Šešios lengvosios grandinės priklauso trims baltymų

šeimoms (LC8/PIN, tctex ir LC7/roadblock), dar yra dvi lengvosios tarpinės grandinės ir dvi tarpinės grandinės, visos jos siejamos su krovinio surišimu. Citoplazminis dineinas yra sukibęs su dinaktinu, kuris reikalingas atliekant daugumą, o gal net visas dineino funkcijas. Dinaktinas padidina dineino procesyvumą ir dalyvauja krovinio surišime (**4 pav.**).

Kinezinai būna dviejų formų: įprastinis kinezinas-1 susideda iš dviejų lengvųjų grandinių ir dviejų motorinių subvienetų, heterotrimerinis kinezinas-2 susideda iš dviejų skirtingų motorinių aktyvumą turinčių subvienetų ir trečio subvieneto, vadinamo su kinezinu susijusiu baltymu, o kinezinas-3 ir kinezinas-4 susideda atitinkamai iš vieno ir dviejų motorinių subvienetų (**4 pav.**). Dideli motoriniai subvienetai suriša mikrovamzdelius ir ATP bei gali surišti krovinį, tuo tarpu nemotoriniai subvienetai reguliuoja transportinę ir krovinio surišimo funkciją. Nauji tyrimai rodo, kad kinezino-2 atliekamame transporte dalyvauja ir dinaktinas [96]. Žinomos virusinių baltymų sąveikos su dineiniais ir kineziniais susistemintos lentelėje (**3 lentelė**). Reikia pažymėti, kad lentelėje pateiktos tik tiesioginės virusinių baltymų sąveikos su dineiniais ir kineziniais, bet labai dažnai tiek dineinų ir kinezinų, tiek miozinų atveju virusiniai baltymai sąveikauja su jais ne tiesiogiai, o per tarpinius adaptorinius baltymus.

Paskutinis daugelio virusų kelionės į ląstelę etapas – jų genomų patekimas į branduolį. Daug branduolyje besireplikuojančių virusų naudojami ląstelėje esančiais transporto keliais, siekdami į jį patekti per branduolio porų kompleksus. Viename gerai išnagrinėtame importo į branduolį mechanizme dalyvauja importinai, surišantys branduolio lokalizacijos signalus (NLS) turinčius ląstelės baltymus. Jie perneša savo krovinis per branduolio poras padedami citoplazminių filamentų ir branduolio porų baltymų, vadinamų nukleoporiniais. Šiame kelyje transporto kryptingumą užtikrina ir pagrindinė varomoji jėga yra GTP surišantys baltymai Ran. Ran-GDP susiriša su importiniais ir kroviniumi citoplazmoje, o branduolyje jie virsta Ran-GTP ir naudojami transporte iš branduolio. Besinaudojantieji šiuo mechanizmu

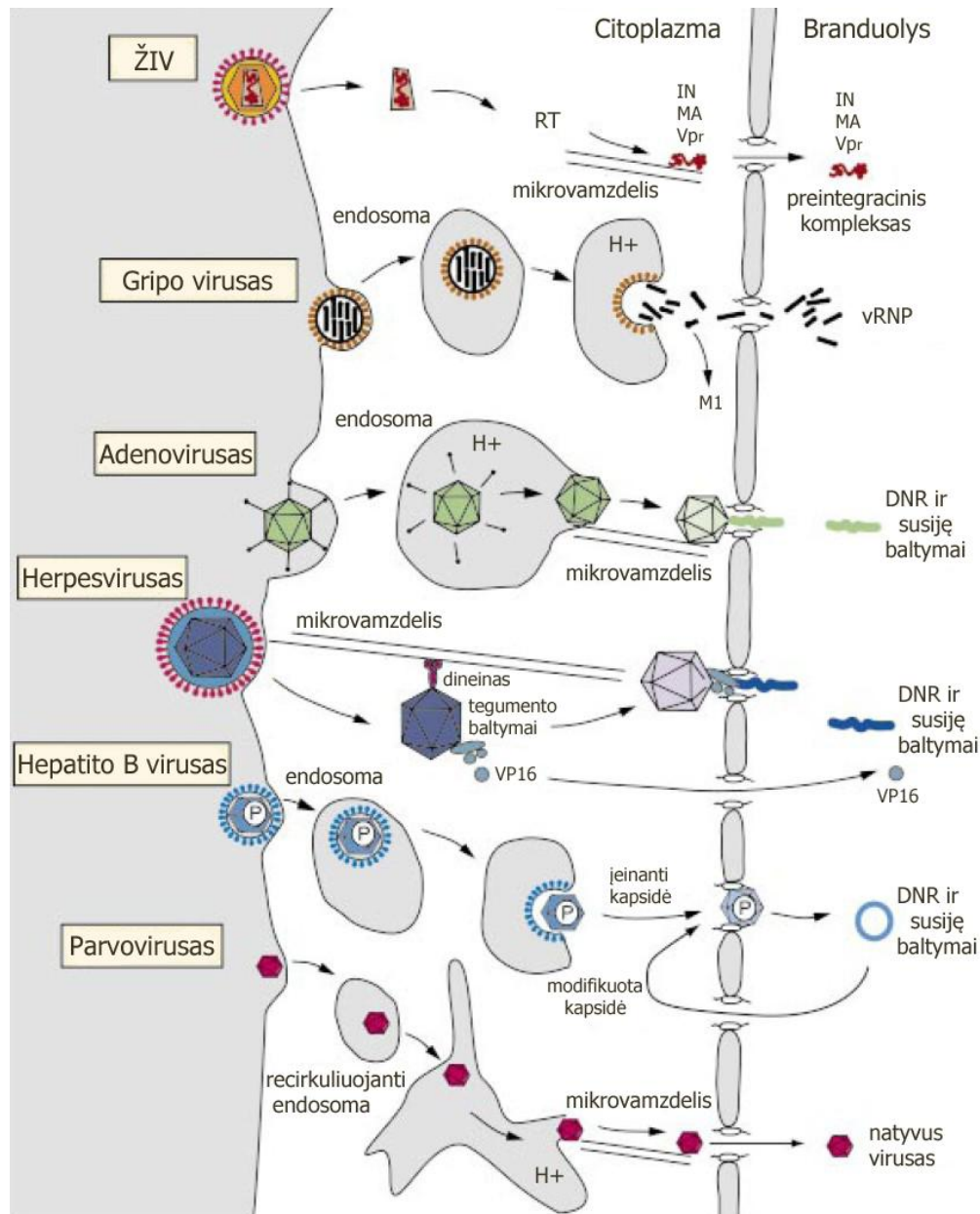
virusai su importiniais sąveikauja jų baltymuose esančiomis NLS sekomis. Pavyzdžiui gripo viruso ribonukleoproteinas turi keturis baltymus su NLS sekomis.

Lentelė 4. Kai kurių virusų patekimo į branduolį būdai

Patekimo į branduolį būdas	Viruso šeima	Virusas	Genomas
Patekimas mitozės metu	<i>Retroviridae</i>	SIV-1	RNR (RT)
Baltymų numetimas citoplazmoje, transportas per branduolio porą	<i>Retroviridae</i>	ŽIV-1	RNR (RT)
Baltymų numetimas citoplazmoje	<i>Orthomyxoviridae</i>	Gripo virusas	vgRNR (-)
	<i>Bornaviridae</i>	Borna ligos virusas	vgRNR (-)
Kapsidės prisitvirtinimas prie poros/nepažeistos kapsidės patekimas į branduolį	<i>Hepadnaviridae</i>	HBV	dgDNR (RT)
Nepažeisto viruso patekimas į branduolį	<i>Geminiviridae</i>	BDMV, SLCV	vgDNR
	<i>Parvoviridae</i>	Parvovirusas B19	vgDNR
	<i>Polyomaviridae</i>	SV40	dgDNR
Viruso prisitvirtinimas prie branduolio poros	<i>Adenoviridae</i>	AdV-2	dgDNR
	<i>Herpesviridae</i>	HSV, CMV	dgDNR
	<i>Baculoviridae</i>	AcMNP	dgDNR

Sutrumpinimai: *vgRNR*, viengrandė RNR; *vgDNR*, viengrandė DNR; *dgDNR*, dvigrandė DNR; *SIV-1*, beždžionių imunodeficitu virusas 1; *BDMV*, pupų nykštukinės mozaikos virusas; *SLCV*, moliūgų lapasukio virusas; *AcMNPV*, *Autographa californica* daugybinės branduolinės polihedrozės virusas. Pagal [122].

Maži virusai, kurių diametras nesiekia 40 nm, pavyzdžiui HBV ir parvovirusai, patenka į branduolius be jokių pakitimų kapsidėse. Nuo HBV genomo baltymai atsiskiria jau branduolyje. Bet kai kurių DNR virusų, pavyzdžiui adenovirusų, herpeso virusų ir SV40, kapsidės yra per didelės kad patektų į branduolį per jo poras. Pavyzdžiui adenoviruso kapsidė prisitvirtina prie branduolio poros citoplazminio filamentinio baltymo CAN/Nup214 ir išardoma dalyvaujant histono H1 transporto į branduolį mechanizmams. Histonas H1 išeina iš branduolio per jo porą, susiriša su adenoviruso kapsidėje esančiu baltymu heksonu ir importinų, sąveikaujančių su histonu H1 pagalba, yra transportuojamas atgal į branduolį. Herpeso viruso 1 kapsidės baltymai atskiriami prieš patenkant į porą ir plika virusinė DNR patenka į branduolį. Atrodo, kad branduolio poros baltymai aktyviai dalyvauja šiame kapsidės išardymo procese [64]. Virusų patekimo į branduolį mechanizmai apibendrinti lentelėje (**4 lentelė**), o visa kelionė link branduolio – iliustracijoje (**5 pav.**).



4 pav. Branduolyje besireplikuojančių virusų genomų kelionė į ląstelės branduolį. Prieš patekdami į branduolį kai kurių virusų genomai daugumą baltymų nusimeta citoplazmoje (ŽIV ir gripo virusai). Virusai taip pat gali prisitvirtinti prie poros komplekso ir nusimesti baltymus citoplazminėje branduolio membranos pusėje (adenovirusai ir herpeso virusai). Kai kurie virusų genomai baltymus nusimeta branduolio poroje ar jo viduje (hepatito B virusas). Galiausiai, į branduolį patenka ir kai kurių virusų visiškai nepakitusios virusinės dalelės (parvovirusai). Pagal [122].

1.3. Virusinių baltymų įtaka šeimininko antivirusinėms sistemoms

Ląstelės ir organizmai nėra vien pasyvūs virusinių infekcijų stebėtojai. Jie aktyviai kovoja prieš įsiveržusius svetimkūnius, naudodami trijų lygių

gynybinius mechanizmus: įgimtus autonominius (apoptozė, RNR interferencija, citidino deaminimas ir kt.), įgimtus neautonominius (nespecifinis imuninis atsakas, kurį daugiausia valdo tirpūs imuninės sistemos veiksniai) ir įgyto imuniteto (antigenams specifinis antikūnų ir limfocitų atsakas). Pirmapradis daugialąsčių organizmų atsakas į virusinę infekciją yra užkrėstų ląstelių aukojimas užprogramuotos mirties būdu. Šis atsakas būdingas visiems daugialąsčiams, įskaitant ir augalus, kurie neturi mobiliomis ląstelėmis grįstos imuninės sistemos. Žinduoliuose mikrobinė infekcija be užprogramuotos ląstelių mirties mechanizmo sukelia ir imuninį atsaką. Hierarchiškai organizuotoje gynyboje pirmosiose linijose stovi įgimti imuniniai veiksniai (pvz. infiltruojantys fagocitai ir NT [natūralios žudikės] ląstelės), po jų į kovą stoja įgytasis imunitetas, kurio pagrindiniai vykdytojai yra T ir B limfocitai. Bet virusų replikacijai bei plitimui kelią pastoja ir kiti gynybiniai mechanizmai. Bestuburiams, pavyzdžiui vaisinei muselei *Drosophyla melanogaster*, taip pat ir augalams, labai svarbus antivirusinis mechanizmas yra RNR interferencija (RNAi). Nors RNAi mechanizmai aktyvūs ir žinduoliuose, jų antivirusinę funkciją palaipsniui išstūmė labai galinga interferono sistema ir kiti papildomi mechanizmai. Skirtingi antivirusinio atsako komponentai skirti aptikti virusines daleles, virusų užkrėstas ląsteles, virusų sukeltus streso signalus (tame tarpe ir ląstelės mirtį) ir pašalinti patogeną (kartu su šeimininko ląstele) bei sukurti imunologinę atmintį. Bet šeimininko ir viruso bendra evoliucija privertė pastarąjį sukurti priemones, kuriomis jis siekia šeimininko gynybinius mechanizmus paveikti sau palankia linkme.

1.3.1. Apoptozės reguliavimas

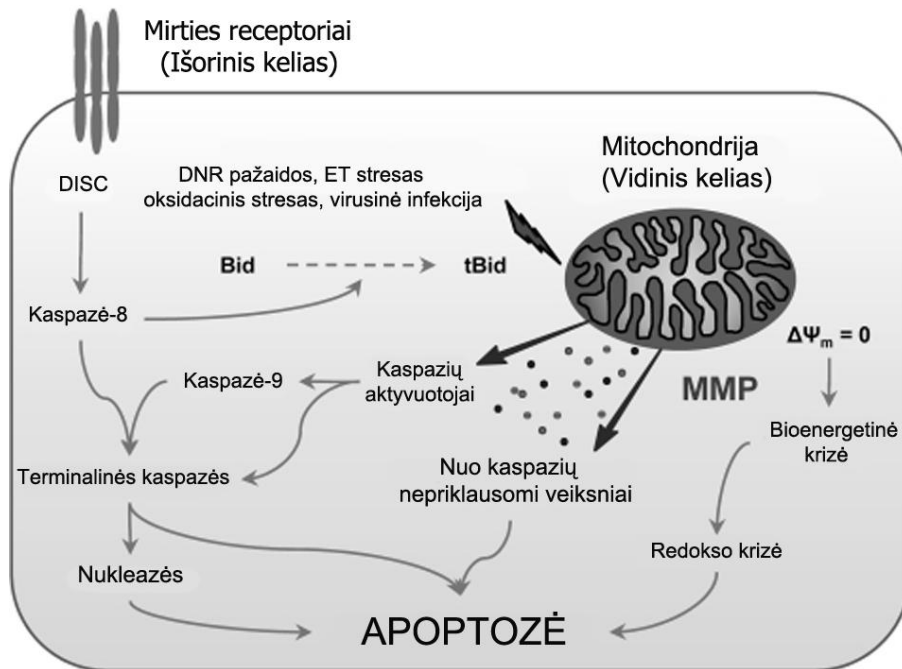
Apoptozė yra aktyvus užprogramuotos ląstelių mirties būdas, lydimas serijos būdingų morfologinių ir biocheminių pokyčių, pagal kuriuos jis gali būti atskiriamas nuo kitų ląstelės mirties būdų. Būdingi morfologiniai požymiai yra smarkus ląstelės tūrio sumažėjimas (ląstelės susitraukimas), branduolio

piknozė (chromatino kondensacija) ir karioreksis (branduolio fragmentacija). Galiausiai žūnančios ląstelės subyra į mažus fragmentus, vadinamus apoptoziniais kūneliais. Morfologinius apoptozės pokyčius lydi ir biocheminiai: (1) struktūrinio vientisumo ir bioenergetinių funkcijų praradimas, (2) būdingo katabolinių fermentų rinkinio (kaspazių šeimos proteazių, nukleazių) kaskadinis aktyvavimas, (3) fosfatidilserino eksponavimas plazminės membranos išorėje, (4) plazminė membrana nustoja atlikti užtvaros funkciją.

Apoptozę gali sukelti dvi visiškai skirtingos signalų kaskados – išorinis ir vidinis (arba mitochondrinis) aktyvavimo keliai (**5 pav.**). Išorinį kelią aktyvuoja ligandų sukeliama specifinių ląstelės paviršiaus receptorių, pavyzdžiui Fas/CD95 ar auglių nekrozės veiksnio, oligomerizacija. Tai indukuoja mirtį sukeliančio signalinio komplekso (DISC) viduląstelinį susirinkimą, kuris savo ruožtu aktyvuoja kaspazių kaskadą, prasidedančią nuo kaspazės-8 ir sąlygojančią kitų kaspazių bei nukleazių aktyvavimą (kaspazės 3, 6 ir 7, kaspazių aktyvuojama DNazė). Vidinį kelią kontroliuoja mitochondrijos, kurios surenka ir integruoja pro- ir priešapoptozinius signalus, siunčiamus kitų organelių ar ląstelės išorėje esančios mikroaplinkos. Vidinį apoptozės kelią aktyvuoja ir mitochondrijų membranos pralaidumą (MMP) sukelia tokie skirtingi proapoptotiniai stimulai kaip DNR pažeidimas, endoplazminio tinklo stresas, lizosominis stresas, reaktyvios deguonies formos ir kalcio (Ca^{2+}) perteklius. Kai kuriose ląstelėse mitochondrinė apoptozė vyksta ir aktyvavus mirties receptorių, kai kaspazės-8 proteolitiškai aktyvuotas Bid baltymas sukelia MMP.

Kadangi užkrėstų ląstelių pašalinimas užprogramuotos mirties būdu ir vienas iš seniausių gynybinių mechanizmų, apoptozės išvengimas yra beveik būtinas viruso replikacijos ciklo įrankis. Kita vertus, virusai gali gauti naudos ir iš apoptozės skatinimo, nužudydami neužkrėstas imunines ląsteles arba suardydami užkrėstas ląsteles ir išlaisvindami virusines daleles tolesniam plitimui. Kai kurie virusai turi šeiminiško apoptozę reguliuojančių baltymų,

pavyzdžiui Bcl-2 šeimos homologus. Kiti virusai koduoja jokios homologijos su šeimininko baltymais neturinčius baltymus, veikiančius pagrindinius apoptozės mechanizmo komponentus.



5 pav. Išorinis ir vidinis (mitochondrinis) apoptozės keliai. Išoriniame apoptozės kelyje aktyvuojami mirties receptoriai, o tolesnė kaspazių kaskada įvykdo mirties nuosprendį. Vidinį apoptozės kelią aktyvuoja skirtingi veiksniai, sukiantys mitochondrijų membranos pralaidumą (MMP). Įvykus MMP, tarpmembraninės erdvės baltymai patenka į citozolį, mitochondrijų tarpmembraninis potencialas ($\Delta\Psi_m$) išnyksta, o mitochondrijų bioenergetinės bei redokso detoksikacijos funkcijos susilpnėja. Bioenergetinė ir redokso krizės aktyvuoja kaip su kaspazėmis susijusius, taip ir su jomis nesusijusius apoptozės mechanizmus, nulemiančius ląstelės mirtį. Du kelius jungia tik Bid baltymas, kurio kaspazės-8 sutrumpinta forma (tBid) keliauja į mitochondrijas ir sukelia MMP. DISC, mirtį sukiantis signalinis kompleksas; ET, endoplazminis tinklas. Pagal [37].

Per pastarąjį dešimtmetį nustatyta, kad daugybė virusinių baltymų teigiamai arba neigiamai, tiesiogiai arba netiesiogiai veikia šeimininko ląstelių apoptozinį atsaką į infekciją (**lentelės 5 ir 6**). Pagal tai virusiniai veiksniai gali būti skirstomi į vieną iš keturių grupių: proapoptoziniai baltymai, (1) įsiterpiantys į mitochondrijų membranas ir sukiantys MMP veikdami savo amfipatiniais α -spiralių domenais arba (2) aktyvuojantys šeimininko koduojamus veiksnius ir sukiantys MMP netiesiogiai (**lentelė 5**) ir priešapoptoziniai baltymai, (3) turintys sekos ar struktūrinio panašumo su Bcl-2 šeimos narių multidomenu BH1-4 (taip vadinami virusiniai Bcl-2 baltymai [vBcl-2]) arba (4) kitais būdais slopinantys apoptozę (**lentelė 6**).

Pažymėtina, kad kai kurie virusiniai baltymai pasižymi įvairiomis poveikio į apoptozę funkcijomis, todėl negali būti vienareikšmiškai priskiriami aukščiau aprašytoms grupėms.

Lentelė 5. Virusiniai baltymai, aktyvuojantys mitochondrinę apoptozės kelią

Virusas	Veiksny	Ląstelės-taikiniai	Veikimas
Tiesioginiai MMP sukėlėjai			
AEV	2C	CEB ir Cos-7 ląstelės	Apoptozę sukeliančios kaspazių kaskados indukcija
	VP3	Skirtingos ląstelių linijos	Apoptozę sukeliančios kaspazių kaskados indukcija
BLV	G4	HeLa ir mielių ląstelės	Mitochondrijų morfologijos pakeitimas; sąveikauja su FPPS
HBV	HBx	Hepatocitai	VDAC $\Delta\Psi_m$ netekimas ir nuo MMP priklausoma apoptozė
HCV	NS4A	Hepatocitai	Kaupimasis mitochondrijose, $\Delta\Psi_m$ netekimas, Cyt c išleidimas, kaspazės-3 aktyvavimas
ŽIV-1	Vpr	CD4 ⁺ limfocitai	$\Delta\Psi_m$ netekimas, MTE baltymų išleidimas, kaspazių kaskados aktyvavimas
ŽTLV-1	p13(II)	Limfocitai	Staigus K ⁺ ir Ca ²⁺ perėjimas per IM, brinkimas, $\Delta\Psi_m$ išnykimas ir fragmentacija
ŽPV	E1E4	Keratinocitai	Atpalaiduoja mitochondrijas nuo mikrovamzdelių
GAV	PB1-F2	Plaučių ląstelės	Sąveika su ANT3 ir VDAC1
PLV	Nežinomas	Neuronai, kaulų čiulpai, limfos ląstelės	JNK aktyvavimas, Cyt c išleidimas, $\Delta\Psi_m$ netekimas, Bax aktyvavimas
	2B 3A	Inkstų ląstelės	Mitochondrijų kaupimasis prie branduolio ir ultrastruktūros pokyčiai, $\Delta\Psi_m$ netekimas
WDSV	AsrC	Epitelio ląstelės	Mitochondrijų kaupimasis prie branduolio, $\Delta\Psi_m$ netekimas, dalinis Cyt c išleidimas, apoptozės požymiai
Netiesioginiai MMP sukėlėjai			
AdV	E1A E4asr6	Epitelio ląstelės	PP2A slopinimas, PARP hiperaktyvavimas, AIF perkėlimas; jautrumo TNF- α ir Fas padidėjimas; BH3-tiktai baltymų raiška
EBV	BALF1	Limfos ląstelės	BHRF1 antagonizmas(?)
FMDV	Nežinomas	Skydliaukės ląstelės, inkstų ląstelės, dendritinės ląstelės	Bcl-2 koncentracijos sumažėjimas, kaspazių aktyvavimas, Cyt c išleidimas iš mitochondrijų
HCV	NS3	Hepatocitai	Kaspazės-8 sukelta apoptozė
ŽIV-1	Env	CD4 ⁺ limfocitai	Bax raiškos skatinimas, Cyt c išleidimas, kaspazių aktyvavimas; Cdk1, mTOR, p53 ir NF- κ B įtraukimas
	Nef	Limfocitai	Lizosominis membranų pralaidumas, katepsino D išleidimas, Bax aktyvavimas, MMP sąlygota ląstelių mirtis
	Proteazė	Limfocitai	Bcl-2 sumažėjimas, NF- κ B aktyvavimas; kaspazės-8 aktyvavimas, Bid skaidymas, Cyt c išleidimas, kaspazių-9 ir -3 aktyvavimas, DFF ir PARP skaidymas

	Tat	Neuronų tubulinas	Kaupimasis mitochondrijose, $\Delta\Psi_m$ netekimas, ROS perprodukcija, kaspazių aktyvavimas; MAP2 degradavimas; Bim aktyvavimas; p53, Bax ir Bcl-2 reguliavimas
ŽPV	E6	Epitelio ląstelės	Ląsteles daro jautrias įvairiems apoptoziniams stimulams, priklausomiems arba nepriklausomiems nuo p53
	E7	Epitelio ląstelės	Ląsteles daro jautrias augimo veiksnių netekimo, chemoterapinių preparatų ir UV spindulių sukeliamai apoptozei.
PLV	2Apro 3Cpro	HeLa ląstelės	Nuo kaspazių priklausoma apoptozė
SARS-CoV	7a	Įvairios ląstelių linijos	Bcl-X _L slopinimas
VSV	M	Vero ląstelės	Bcl-X _L koncentracijos sumažėjimas; kaspazių aktyvavimas
WNV	P	Pelėnų ląstelės	Nežinomi mechanizmai
	Kapsidės NS2B/NS3	Neuronai	UPR, Bid ir Bax persikėlimas į mitochondrijas, $\Delta\Psi_m$ netekimas, Cyt c išleidimas, kaspazių aktyvavimas

Sutrumpinimai: *AEV*, paukščių encefalomielito virusas; *AIF*, apoptozę indukuojantis veiksnys; *ANT*, adenino nukleotido translokazė; *BH3*, Bcl-2 homologijos domenas 3; *BLV*, karvių leukemijos virusas; *Casp*, kaspazė; *Cdk1*, nuo ciklino priklausoma kinazė 1; *CEB*, viščiukų embrionų smegenys; *Cyt c*, citochromas c; $\Delta\Psi_m$, mitochondrijų tarpmembraninis potencialas; *DFP*, DNR fragmentacijos veiksnys; *Env*, apvalkalo glikoproteino kompleksas; *FMDV*, snukio ir nagų ligos virusas; *FPPS*, farnezilo pirofosfato sintetazė; *HBx*, HBV X baltymas, *GAV*, gripo A virusas; *MTE*, mitochondrijų tarpmembraninė erdvė; *JNK*, c-Jun N-galo kinazė; *M*, matrikso baltymas; *MAP2*, su mikrovamzdeliais susijęs baltymas 2; *MMP*, mitochondrinės membranos pralaidumas; *mTOR*, rapamicino taikinyš žinduoliuose; *NS*, nestruktūrinis baltymas; *P*, fosfobaltymas P; *PARP*, poli(ADP-ribozės) polimerazė; *PLV*, poliovirusas; *PP2A*, baltymų fosfatazė 2A; *ROS*, reaktyvios deguonies formos; *SARS-CoV*, sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas; *UPR*, atsakas į išsivyniojusius baltymus; *UV*, ultravioletas; *VDAC*, nuo įtampos priklausomas anijonų kanalas; *Vpr*, virusinis baltymas R; *WDSV*, Walleye odos sarkomos virusas; *WNV*, Vest Nilo virusas. Pagal [37].

Lentelė 6. Apoptozę slopinantys virusiniai baltymai

Virusas	Veiksnys	Taikiniai	Veikimas
Virusiniai Bcl-2 homologai (vBcl-2)			
AdV	E1B-19K	Epitelio ląstelės	Suriša daugelį proapoptotinių į Bcl-2 panašių baltymų ir p53; slopina daugelio stimulų sukeltą apoptozę
ASFV	A179L (5-HL)	Limfos ląstelės	Slopina augimo veiksnių netekimo ir chemoterapinių preparatų sukeltą apoptozę
CMV	pUL37x1 (vMIA)	Epitelio ląstelės	Bax slopinimas, keičia ET Ca ²⁺ išleidimą ir ATP koncentraciją; mitochondrijų fragmentacija; sąveikauja su ANT
EBV	BALF1	Limfos ląstelės	Sąveikauja su Bak/Bax; apsaugo nuo serumo netekimo
	BHRF1	Limfos ląstelės	Blokuoja mirties receptorių, <i>c-myc</i> , granzimo B, DNR pažaidų, infekcijos, radio- ir chemoterapijos sukeltą apoptozę
FPV	FPV039	Fibroblastai	Neutralizuoja Bak

γHV-68	M11	Žmogaus, pelių ir mielių ląstelės	Žinduolių ląstelėse slopina Fas ir TNF-α sukeltą apoptozę; apsaugo mielių ląsteles nuo Bax toksiškumo
ŽHV-8	KsBcl-2	FL5.12 ląstelės	vBcl-2, nesąveikaujantys su Bcl-2 šeimos baltymais (pvz., Bax, Bak)
	K7	Limfos ląstelės	Slopina kaspazę-3 susiedamas ją su Bcl-2, keičia viduląstelinę Ca ²⁺ koncentraciją ir proteasomų aktyvumą
HPN	hpnBHRF1	Limfos ląstelės	Apsaugo nuo serumo pašalinimo, etopozido ir UV radiacijos sukeltos apoptozės
HPO	hpoBHRF1	Keratinocitai	Apsaugo nuo cisplatino sukeltos apoptozės
HVS	ASR16	T ląstelės	Heterodimerinasi su Bax ir Bak
MXV	M11L	Odos ląstelės	Struktūrinis vBcl-2; sąveikaudamas su PBR blokuoja nuo Bak/Bax priklausomą MOMP ir MPT
PPVO	ASRV125	Odos ląstelės	Slopina Bak/Bax aktyvumą; blokuoja UV sukeltą apoptozę
VV	F1L	Odos ląstelės	Sąveikauja su Bak ir Bim; slopina Bax aktyvumą ankstyvuosiuose etapuose
	N1L	Odos ląstelės	Struktūrinis vBcl-2; slopina daugybę proapoptotinių į Bcl-2 panašių baltymų (pvz., Bid, Bax, Bak, Bad)
Kitos priešapoptozinės virusų priemonės			
AdV	E3-10.4K/14.5K (RID)	Epitelio ląstelės	Slopina išorinį apoptozės kelią skatindamas mirties receptorių įtraukimą ir degradavimą
ASFV	A224L (vIAP)	Makrofagai	Kaspazės-3 slopinimas; NF-κB aktyvavimas
BCV	p35	Dauguma ląstelių tipų	Plataus poveikio kaspazių slopiklis; taip pat slopina oksidantų sukeltą apoptozę prieš įsijungiant kaspazėms
	vIAP	Vabzdžių ląstelės	Tiesioginis kaspazių slopiklis
CMV	UL36 (vICA)	Epitelio ląstelės	Slopina kaspazę-8
EBV	EBNA3A, EBNA3C	Limfos ląstelės	Bim raiškos slopinimas
	EBNA-LP	Limfos ląstelės	Sąveikauja su Bcl-2 per HAX-1
γHV-68	vMAP	Skirtingi ląstelių tipai	Bcl-2 telkimas mitochondrijose, Cyt c išleidimo slopinimas sąveikaujant su VDAC1
HCV	E2	Hepatocitai	TRAIL sukeltos apoptozės slopinimas
	NS2	Hepatocitai	MMP ir CIDE-B sukeltos apoptozės slopinimas
	NS5A	Hepatocitai	NF-κB aktyvavimas, sąveika su FKBP38
ŽHV-8	K13 (vFLIP)	Limfos ląstelės	NF-κB aktyvavimas
	K15	Limfos ląstelės	Priešapoptozinis veikimas sąveikaujant su HAX-1
VV	CrmA	Keletas ląstelių linijų	Serpinas, tiesioginis kaspazių slopiklis

Sutrumpinimai: *ANT*, adenino nukleotido translokazė; *BCV*, bakulovirusas; *Casp*, kaspazė; *CIDE-B*, į DFF-45 panašus ląstelės mirtį sukeliantis veiksnys B; $\Delta\Psi_m$, mitochondrijų tarpmembraninis potencialas; *EBNA*, Epšteino-Bar viruso branduolio antigenas; *ET*, endoplazminis tinklas; *FKBP38*, 38 kDa FK506 surišantis baltymas; *FPV*, vištų poksivirusas;

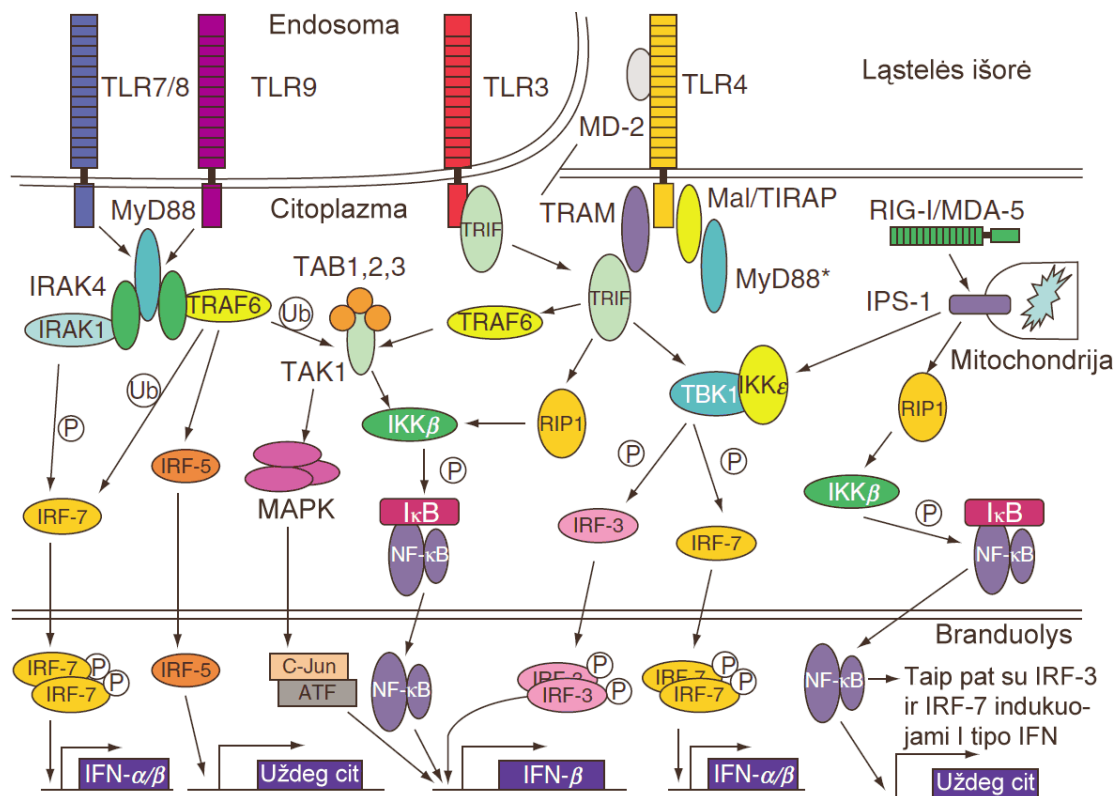
γHV-68, γ -herpeso virusas 68; *HAX-1*, su HS1 susijęs baltymas X-1; *KsBcl-2*, Kapoši sarkomos viruso Bcl-2; *MMP*, mitochondrinės membranos pralaidumas; *MOMP*, mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas; *MPT*, mitochondrijų pralaidumo pokytis; *MYXV*, mikšomos virusas; *HPN*, herpeso virusas pan; *HPO*, herpeso virusas papio; *PBR*, periferinio tipo benzodiazepino receptorių; *PPVO*, parapoksiviruso ASR; *RID*, receptorių įtraukimo ir degradavimo kompleksas; *UV*, ultravioletas; *vBcl-2*, virusinis Bcl-2; *VDAC*, nuo įtampos priklausomas anijonų kanalas; *vFLIP*, su Fas susijęs į mirties domeną panašus interleukiną 1 β konvertuojantį fermentą (FLICE) slopinantis virusinis baltymas; *vIAP*, virusinis apoptozę slopinantis baltymas; *vICA*, kaspazės-8 aktyvavimo virusinis slopiklis; *vMAP*, virusinis mitochondrijų priešapoptozinis baltymas; *vMIA*, virusinis mitochondrijose esantis apoptozės slopiklis. Pagal [37]

Nors daugelio apoptozę reguliuojančių baltymų veikimo mechanizmai nustatyti gana tiksliai, pilnų virusinių genomų raiškos daromo bendro poveikio aiškesnį vaizdą padeda susikurti tik pastarojo meto transkriptominiai ir proteominiai tyrimai. Tolesniuose tyrimuose reikės atsižvelgti ir į šeimininko ląstelių bei jų aplinkos (pvz. vietinio uždegimo, oksidacinio streso) kintamumą, kadangi šie veiksniai smarkiai koreguoja ląstelių atsaką į skirtingus patogenus. Gautos žinios leis geriau prognozuoti atskiros ligos eigą ir kurti naujus medikamentus.

1.3.2. Virusų aptikimo ir interferoninio atsako sistemų įtakojimas

Įgimta imuninė sistema virusus aptinka panaudodama keletą ląstelės receptorių, atpažįstančių virusų nukleorūgštis ar jų membraninius glikoproteinus. Šias funkcijas atliekantys baltymai vadinami „į *toll* panašiais receptoriais“ (TLR). TLR yra evoliuciškai konservatyvūs membraniniai baltymai, gausiausiai sintetinami imuninės sistemos ir epitelio ląstelėse, o jų raišką įtakoja stresas ir citokinai. Jiems susirišus su specifiniu virusiniu ligandu, aktyvuojami antivirsinį bei uždegiminį atsaką sukeliantys signaliniai keliai. Žinduoliuose aptikta 12 skirtingų TLR: TLR3, TLR7/8 ir TLR9 atpažįsta virusų nukleorūgštis ir gausiausiai aptinkami endosomose, o kiti TLR atpažįsta lipidus, lipopolisacharidus ir virusinius glikoproteinus, jie aptinkami ląstelės paviršiuje. Susirišę su ligandu TLR trimerinasi, sąveikauja su adaptoriniu baltymu MyD88, vėliau signalą perduoda kiti adaptoriniai baltymai (MAL/TIRAP, TRIF/TICAM, TRAM, IRAK1/4, TRAF6, TAB1-3 ir kt.), ir

galiausiai aktyvuojami transkripcijos veiksniai, reguliuojantys interferonų (IFN) bei uždegiminių genų raišką. Kartu su TLR virusų aptikime dalyvauja ir citoplazminiai baltymai RIG-I bei MDA-5 – jie atpažįsta tarpinį kai kurių virusų replikacijos produktą – dvigrandę RNR – ir toliau signalą perduoda per IPS-1 bei IKKε baltymus (6 pav.).



6 pav. Kaip ląstelės aptinka virusus. Virusines nukleorūgštis endosomose atpažįsta receptoriai TLR3, TLR7/8 ir TLR9; virusinius glikoproteinus ląstelės paviršiuje atpažįsta TLR4 ir TLR2, o citozolyje esantys RIG-I ir MDA-5 atpažįsta dvigrandę RNR – tarpinį kai kurių virusų replikacijos produktą. Kai aktyvuojami TLR7/8 ir TLR9, jie sąveikauja su MyD88, kuris savo ruožtu sąveikauja su IRAK4 ir TRAF6. TRAF6 ubikvitilimo būdu aktyvuoja TAK1, o šis kartu su TAB1, TAB2 ir TAB3 aktyvuoja MAP kinazes, aktyvuojančias transkripcijos veiksnį ATF2/c-Jun. TAK1/TAB taip pat gali aktyvuoti IKKα, IKKβ ir IKKγ/NEMO, kas nulemia IκB fosforilinimą ir degradavimą bei transkripcijos veiksnio NF-κB persikėlimą į branduolį. Neseniai pasiūlytas dar vienas uždegiminių citokinų signalinis kelias, kuriame MyD88 ir TRAF6 aktyvuoja IRF-5. Visi šie signaliniai keliai reguliuoja uždegiminių citokinų raišką. IRAK4 taip pat gali sąveikauti su IRAK1 ir TRAF6 ir tokiu būdu aktyvuoti IRF-7 bei sužadinti I-o tipo interferonų genų raišką. Nuo MyD88 nepriklausančiame kelyje aktyvuotas TLR3 sukelia TRIF ir TRAM sąveiką. TRIF per TBK1/IKKε gali aktyvuoti IRF-3 ir, kartu su NF-κB, aktyvuotu per RIP-1 arba TRAF6 kelią, gali sužadinti IFN-β genų raišką. TRIF ir TBK1/IKKε taip pat gali aktyvuoti IRF-7 ir sukelti I-o tipo interferonų genų raišką, o veikdami per TRAF6, TAK1 ir MAP kinazes – ir uždegiminių citokinų raišką. TLR4 gali perduoti signalą tokiu pat būdu kaip ir TLR3 – naudodamasis TRIF ir TRAM, arba nuo MyD88 priklausomu keliu, naudodamas adaptorinį baltymą TIRAP/MAL (pažymėta *). Dvigrandės RNR jutikliai RIG-I/MDA-5 savo CARD domenais sąveikauja su IPS-1, ir ši sąveika aktyvuoja IRF-3 bei IRF-7 fosforilinius juos TBK1/IKKε. NF-κB gali būti aktyvuojamas ir FADD bei RIP-1 keliu. Pagal [86].

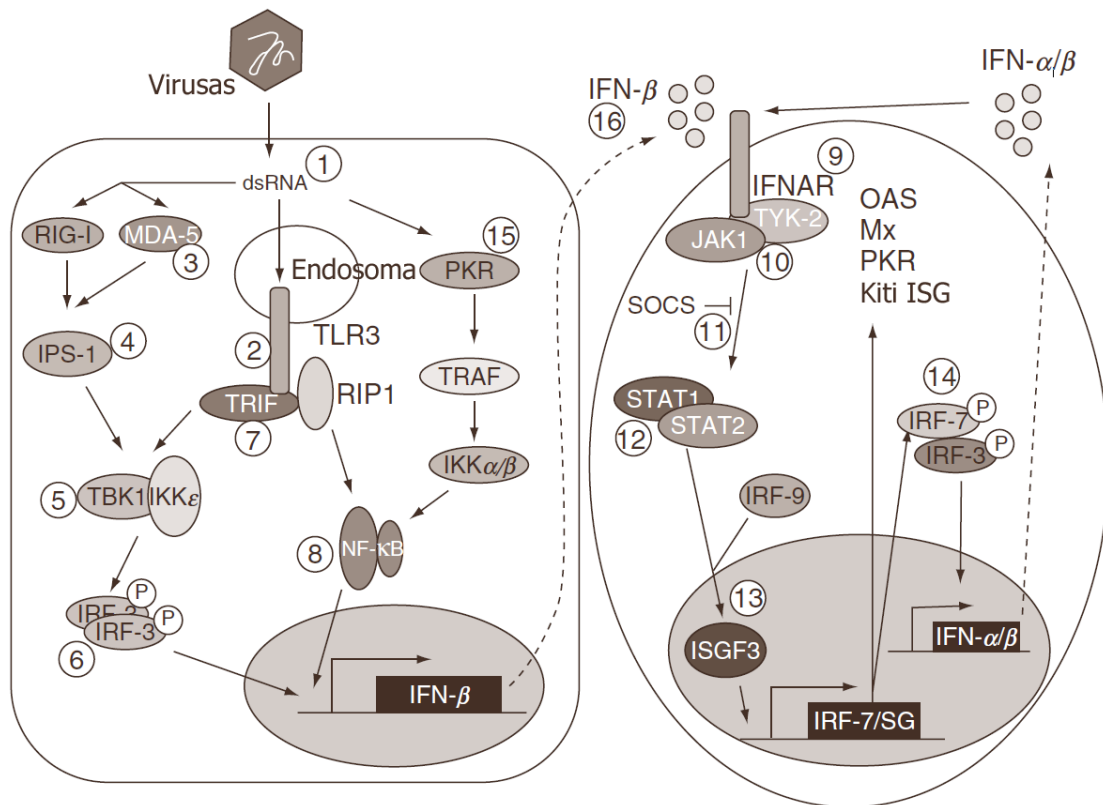
Lentelė 7. Virusų poveikis įgimtam imuniniam atsakui

Virusas	Baltymas	Veikimas	
Adv	VA	Slopina PKR	
	E1A	Slopina STAT1, Slopina IRF-3 sąveikaudamas su p300/CBP	
CMV	IE1	Blokuoja ISGF3 sąveiką su chromatinu	
	?	Slopina IRF-1 ir IRF-4 sužadiniimą	
EBV	BZLF-1	Slopina IRF-7	
	EBER	Suriša PKR	
	LMP-1	Reguliuoja STAT1 fosforilinimą per NF-κB	
ŽPV-16	E6	Slopina IRF-3	
	E7	Slopina IRF-1 per histono acetilazę	
ŽPV-18	E6	Slopina Tyk2, STAT1 ir STAT2 fosforilinimą	
	E7	Slopina IRF-1	
HSV-1	ICP27	Slopina IRF-3 ir NF-κB	
	ICP0	Blokuoja IRF-3 ir IRF-7 vykdomą ISG aktyvavimą	
	UL13 ir UL41	Aktyvuoja SOCS3	
HSV-2	vhs	Reguliuoja IFN-α/β nuo PKR nepriklausomu keliu	
KSHV	vIRF-1	Suriša ląstelinius IRF, Blokuoja IRF-3 ir p300/CBP sąveiką	
	vIRF-2	Slopina PKR aktyvavimą	
	vIRF-3	Slopina IRF-1 ir IRF-3 vykdomą IFN-β aktyvavimą Slopina NF-κB patekimą į branduolį	
	vIRF-4	Blokuoja IRF-3 ir IRF-7 aktyvavimą	
	RTA	Nukreipia IRF-7 degradavimui	
VV	E3L	Blokuoja dvigrandę RNR Blokuoja IRF-3 ir IRF-7 fosforilinimą Slopina RNazės L 20,50-OAS sistemą	
	K3L	Slopina PKR	
	B18R	Tirpus ir ląstelės paviršiaus I-o tipo IFN receptorių	
	A46R	TIR homologas, trukdantis MyD88, TRIF ir TRAM	
	A52R	TIR homologas blokuojantis NF-κB per IRAK2 ir TRAF6	
Ebola	VP35	Slopina IRF-3 aktyvavimą	
FluV	NS1	Slopina IRF-3 aktyvavimą Slopina NF-κB aktyvavimą	
		Blokuoja dvigrandę RNR	
HCV	NS5a	Slopina IRF-1 ir PKR	
	E1	Slopina NF-κB patekimą į branduolį	
	NS3/4a	Slopina IRF-3 Suriša TBK1 Suskaido TRIF Degraduoja STAT1 Suskaido IPS-1	
		Šerdies balt.	Degraduoja STAT1 Aktyvuoja SOCS3
Hendra virusas	V	Neleidžia STAT1 ir STAT2 patekti į branduolį	
HPiV2	V	Degraduoja STAT2	
Tymų virusas	V	Trukdo STAT1–STAT3 fosforilinimui	
Kiaulytės virusas	V	Slopina ir degraduoja STAT1	
		Degraduoja STAT3	
Nipah virusas	V	Trukdo STAT1 ir STAT2 patekti į branduolį	

Paramiksovirusai	V, W, P	Suriša STAT1 branduolyje ir citoplazmoje
Poliovirusai	V	Slopina MDA-5
	3A	Slopina IFN- β sekreciją
	3C	Skaido NF- κ B p65-RelA subvienetą
	P	Slopina TBK1 vykdomą IRF-3 fosforilinimą
Rinovirusas 14	?	Fosforilintus STAT1/2 užlaiko citoplazmoje
RSV	NS1/NS2	Užlaiko IRF-3 dimerinimąsi
	NS2	Slopina IFN aktyvavimą
SARS	?	Degraduoja STAT2
VSV	M	Slopina IRF-3 aktyvavimą
		Slopina TFIID, sukeldamas IFN- β transkripcijos slopinimą

Pagal [86]

Siekdami apsisaugoti nuo šeimininko įgimto imuninio atsako, virusai naudoja įvairias strategijas (**7 lentelė**). Dažniausią daugelio virusų tarpinį replikacijos produktą – dvigrandę RNR – atpažįsta keletas ląstelės jutiklių, kurie po to aktyvuoja signalinius kelius, interferonų bei interferonų stimuliuojamų genų (ISG) raišką, ir taip koordinuoja antivirusinį atsaką. Daug virusų koduoja baltymus, specifiskai slopinančius interferono indukcijos kelius (**7 pav.**). Dauguma tokių slopiklių nėra virusinę dalelę sudarantys struktūriniai baltymai, bet dažnai jie nulemia viruso patogeniškumą. Susidūrę su šeimininko interferoniniu atsaku, neturintys šių genų mutantiniai virusai dažnai nebesugeba replikuotis. Jau aptikta beveik kiekvieną interferoninio atsako etapą blokuojančių virusinių baltymų, ir šis sąrašas pastoviai ilgėja. Daugelis tokių baltymų slopina interferoninį atsaką iš karto keliuose etapuose. Kai kurie virusai, pavyzdžiui hepatito C virusas, herpeso virusai ir paramiksovirusai koduoja net po keletą interferono antagonistų.



7 pav. Virusų vykdomas įgimto interferoninio atsako slopinimas. Virusų vykdomas antivirusinio atsako slopinimas vyksta keliuose lygiuose – ir IFN sužadinimo etape, ir paskesnio ISG sužadinimo etape. Įvairių virusų koduojamų slopinklių veikimo vieta pažymėta prie viruso sužadinto IFN- α/β atsako. 1: Dvigrandė RNR: FluV, VV, SeV. 2: TIR mėgdžiojimas: VV. 3: MDA-5 slopinimas: paramiksovirusai. 4: IPS-1 slopinimas: HCV. 5: TBK1/IKK ϵ slopinimas: SeV, Ebola virusas, rotavirusas, FluV, HCV. 6: IRF-3 slopinimas: rinovirusas, ŽPV-16, KSHV, Adv. 7: TRIF degradavimas: HCV. 8: NF- κ B slopinimas: FluV, KSHV, poliovirusas. 9: IFNAR: VV. 10: JAK1/Tyk2 slopinimas: ŽPV-18, tymų virusas. 11: SOCS3 sužadinimas: HCV, HSV-1. 12: STAT slopinimas: HCV, kiaulytės virusas, Nipah virusas, RSV, paragripo virusas 2, Hendra virusas, LCMV. 13: ISGF3 trukdymas: CMV. 14: IRF-7 slopinimas: KSHV, EBV, VV. 15: PKR slopinimas: HCV, EBV, KSHV, VV, reovirusas, AdeV, FluV, ŽIV-1. 16: IFN- β sekrecija: poliovirusas. Pagal [86]

1.3.3. Virusinių baltymų įtaka NF- κ B signaliniam keliui

Eukariotinių branduolio transkripcijos veiksnį kapa B (NF- κ B) aptiko Sen ir Baltimore daugiau nei prieš 20 metų [108]. Greitai paaiškėjo, kad šis veiksnys yra pagrindinis įgimtojo ir įgytojo imuniteto bei uždegiminio atsako reguliatorius (6 ir 7 pav.). Nustatyta, kad NF- κ B sintetinamas įvairiuose ląstelių tipuose, o NF- κ B surišimo sekos (κ B) aptiktos daugybėje indukuojamų genų. NF- κ B aktyvumą reguliuoja gausūs ir labai skirtingi biologiniai bei aplinkos veiksniai. Pastebėta, kad su NF- κ B aktyvavimo sutrikimais susiję vėžys, aterosklerozė, autoimuninės ir kitos dažnos ligos (plačiau NF- κ B

reguliuojamas aprašytas eksperimentinėje dalyje ir pavaizduotas **25 pav.**).

Lentelė 8. Virusiniai baltymai, įtakojantys NF- κ B aktyvumą

Virusas	Baltymas	Veikimas
A. NF-κB aktyvumo skatintojai		
ASFV	A224L	Į IAP panašus IKK skatintojas
BTV	VP2, VP5	Kapsidės baltymai aktyvuoja NF- κ B
EBV	LMP-1	Mėgdžioja CD40 receptorių
	EBNA-2	NF- κ B transkripcijos skatintojas
EMCV	Kapsidės baltymas	Aktyvuoja Mda-5
HBV	HBx	Src, MAPK kaskados ir NF- κ B skatintojas
HCV	Šerdies baltymas	Paleidžia IFN atsaką
HVS	Tip	LCK adaptorius, aktyvuojantis NF- κ B
ŽCMV	IE1	Reguliuoja NF- κ B indukuojamus genus
	US28	Aktyvuoja pastovų tarpmembraninio receptoriaus signalą per G baltymo q (Gq)/fosfolipazės C kelią
	NS5A	Sustiprina pilno ilgio šerdies baltymo sukeltą NF- κ B aktyvavimą
	NS5B	Reguliuoja TNF signalo perdavimą, veikdamas IKK
	StpC	Sąveikauja su TRAF2
ŽHV-8	ASR74	Su G baltymu susijęs chemokinių receptorių
	vFLIP	Sąveikauja su IKK ir jį aktyvuoja
	K7	Sąveikauja su PLIC1 ir sukelia I κ B degradavimą
	K15	Dalyvauja TRAF2 sukeltame NF- κ B indukcijoje
ŽIV-1	Tat	Sustiprina NF- κ B sukeltą LTR aktyvavimą
	Nef	Stimuliuoja ŽIV-1 LTR, aktyvuodamas NF- κ B
	Gp120	Sąveikauja su CD40 receptoriais
ŽTLV-1	Tax	IKK γ adaptorius
Gripo A virusas	HA, M ir NP	Aktyvuoja IKK
	NS1, NS2	Aktyvuoja RIG-I
MMLV ir FeLV	U3-LTR	Trumpoji RNR aktyvuoja NF- κ B ir TLR-3
Pelių CMV	M33	Konstitutyvus membraninis receptorių
RSV	M2-1	Sąveikauja su Rel-A
Rev-T	v-Rel	Aktyvuoja c-Rel
Rotavirusas	Kapsidės balt. VP4	Aktyvuoja IKK
SARS	Nukleokapsidė	Daug funkcijų (RIG-I kelio aktyvavimas?)
VSV	Ribonukleoproteinas	Aktyvuoja TBK-1
B. NF-κB aktyvumo slopikliai		
Adenovirusai	E1A	Slopina IKK aktyvumą ir I κ B degradavimą
	E1B	Slopina NF- κ B aktyvumą
	E3-14.7K	Sąveikauja su IKK ir p50
	E3-10.4/14.5K	Fas reguliatorius, slopina TNF- α sukeltą NF- κ B aktyvumą
ASFV	A238L	Blokuoja I κ B degradavimą
HCV	NS5A	Slopina TRAF2 sukeltą NF- κ B aktyvavimą
	Šerdies baltymas	Slopina IKK kompleksą
	NS3-4A	Proteazė nuskelia MAVS nuo mitochondrijos ir suardo RIG-I signalo perdavimą
ŽHV-8	K1	Tirozino kinazės imunoreceptorių konstitutyviai aktyvuoja Lyn kinazę
ŽIV-1	Nef	Indukuoja I κ B α

ŽPV	E7	Neleidžia aktyvuoti NF-κB, susirišdamas su IKK
Gripo A virusas	NS1	Susiriša su dgRNR ir blokuoja IFN aktyvavimą
MdBV	H4, N5	Į IκB panašūs baltymai
MCV	MC159	Slopina IκB degradavimą
	MC160	Destabilizuoja IKKα
Kiaulytės virusas	SH baltymas	Blokuoja TNF sukeltą NF-κB aktyvavimą
MYXV	MNF	Į IκB panašūs baltymas slopina NF-κB
Poliovirusas	3C proteazė	Skelia RelA
Sendai virusas	V ir C baltymai	Blokuoja NF-κB aktyvavimą
VV	K1L	Slopina IκB degradavimą
	A46R	Slopina TLR3 kelią per į TIR panašų domeną

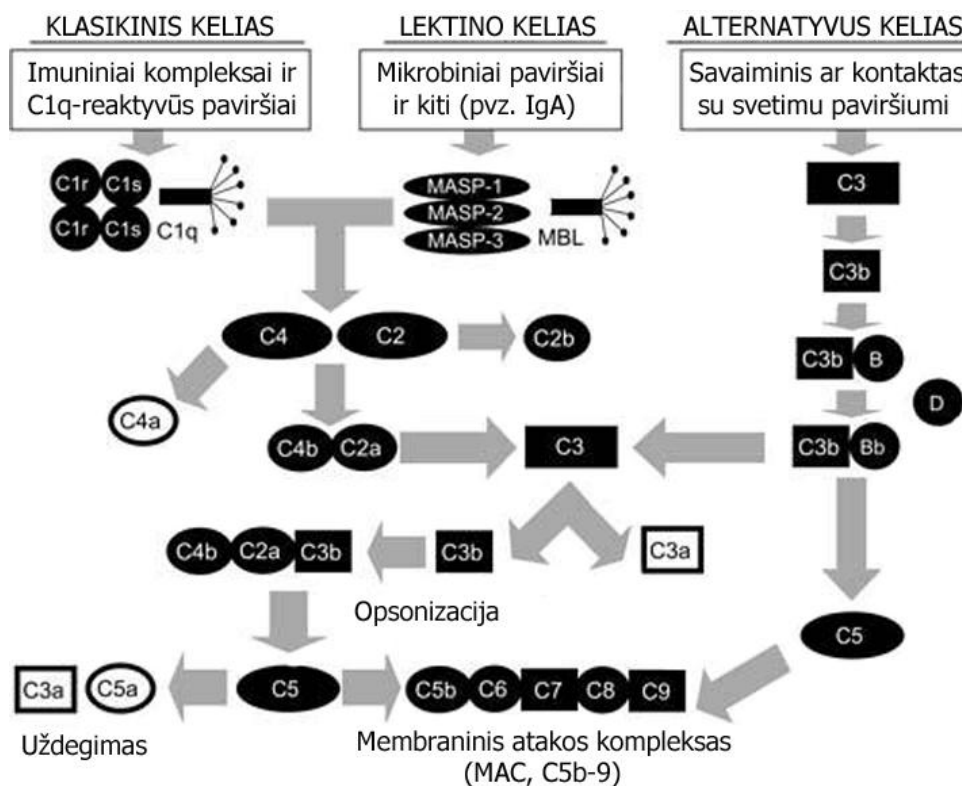
Sutrumpinimai: *IKK*, IκB kinazė; *BTV*, mėlynojo liežuvio ligos virusas; *LMP*, latentinis membranos baltymas; *EMVC*, encefalomiokardito virusas; *MAPK*, mitogenų aktyvuojama baltymų kinazė; *PLIC1*, baltymus surišantis, su integrinu ir citoskeletu susijęs baltymas 1; *TRAF*, su auglių nekrozės veiksnio receptoriais susijęs veiksnys; *MMLV*, Moloney pelių leukemijos virusas; *FeLV*, kačių leukemijos virusas; *MdBV*, vapsvos žudikės brakovirusas; *MCV*, odos moliuskos virusas; *MYXV*, mikšomos virusas. Pagal [47]

Kadangi NF-κB aktyvavimas yra kertinis žingsnis kylant ankstyvajam imuninio atsako etapui, šis signalinis kelias tapo vienu pagrindinių virusinių baltymų taikiniu. Dažnai įgimtą imuninį atsakui ir NF-κB aktyvavimui trukdo daugiaviečiai virusiniai baltymai, sąveikaujantys su specifiniais NF-κB kelio komponentais (**8 lentelė, A**). Kita vertus, kai kurie virusai, tarp jų ŽIV-1, žmogaus T ląstelių limfotropinis virusas 1 (ŽTLV-1), Žmogaus herpeso virusas 8 ir Epštein-Bar virusas patys įgijo tam tikrų NF-κB kelio komponentų savybių, ir įvairiose savo dauginimosi ciklo stadijose stimuliuoja šio veiksnio aktyvumą. NF-κB aktyvumas tuomet skatina viruso replikaciją, slopina apoptozės mechanizmus ir aktyvuoja ląstelės dalijimosi signalinius kelius (**8 lentelė, B**). Virusinės infekcijos sąlygotas pastovus NF-κB aktyvavimas gali skatinti uždegiminiuosius procesus arba sukelti vėžinius susirgimus. Virusų sąveikos su NF-κB signalinio kelio komponentais tyrimuose aptinkami potencialūs antivirusinės intervencijos taikiniai, todėl pastaruosiu metu tokie tyrimai tapo svarbia molekulinės virusologijos sritimi.

1.3.4. Virusų įtaka komplemento sistemos veikimui

Komplementas yra vienas pagrindinių įgimtojo imuniteto komponentų, jis aktyvuojamas ankstyvame virusinės infekcijos etape ir skatina virusinių

dalelių suardymą bei uždegiminį atsaką. Komplemento sistemą aktyvuoja organizmo kontaktas su patogenu, o sveikas ląsteles nuo jo apsaugo komplemento aktyvumą slopinančios paviršiaus molekulės. Pastaruoju metu nustatyta, kad komplementas ir komplemento receptoriai atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant kaip įgimtąjį, taip ir įgytąjį imuninį atsaką. Komplementą sudaro daugiau nei 30 serumo baltymų ir ląstelės paviršiaus receptorių, dalyvaujančių gynyboje prieš patogenus ir įtakojančių opsonizaciją, chemotaksį, ląstelių lizę bei leukocitų aktyvavimą. Yra trys komplemento aktyvavimo būdai: klasikinis, lektino ir alternatyvusis kelias (**8 pav.**).



8 pav. Komplemento aktyvavimo keliai. Klasikinį kelią aktyvuoja C1q susirišimas su agreguotais IgG, imuniniais kompleksais arba C1q-reaktyviais paviršiais (pvz. ŽIV gp41). Po to aktyvuojamas tetramerinis C1r-C1s proteazių kompleksas, skaidomi C4 ir C2 bei susiformuoja klasikinio kelio konvertazė C3 (C4bC2a). **Lektino** kelias aktyvuojamas kai MBL susiriša su mikrobiniiais lektiniais ir aktyvuoja MASP baltymus. Šios lektino kelio proteazės C4 ir C2 verčia į konvertazę C4b2a C3 taip pat kaip ir klasikinio kelio atveju. Po to C3 konvertazė C3 skaido į C3b, kuris kaupiasi ląstelės ar mikrobo paviršiuje (opsonizacija) ir sąlygoja C5 suskaidymą. C3 ir C5 suskaidymas atpalaiduoja anafilotoksinus C3a ir C5a, kurie prie uždegimo vietos pritraukia imunines ląsteles. C5 skaidymas į C5b yra svarbus formuojant membraninį atakos kompleksą (MAC), susidedantį iš C5b ir C6–C9. **Alternatyvų** kelią aktyvuoja savaiminė C3 hidrolizė į C3b ir C3a. Nesant svetimų paviršių, šie produktai inaktyvuojami juos toliau skaidant. Bet svetimuose paviršiuose susikaupęs C3b suriša veiksnį B. Toliau veiksnys D suskaido veiksnį B į Bb ir suformuojama alternatyviojo kelio C3 konvertazė C3bBb, skatinanti kitų komplemento kelių aktyvavimą toliau skaidant C3 ir C5. Pagal [24].

Lentelė 9. Komplemento išvengimas ir pasinaudojimas juo

Šeiminingo ląstelės komplemento receptorių raiškos reguliavimas		
<i>Virusas</i>	<i>Veikimas</i>	
ŽTLV-1	CR2 skatinimas	
ŽIV	CD46, CD59 slopinimas; CR3, CR4 slopinimas	
HSV-1	CR1 skatinimas	
ŽHV-6	CD46 slopinimas	
Tymų virusas	CD46 slopinimas	
ŽHV-7	CD46, CD59 skatinimas	
CMV	CD46, CD55 skatinimas	
Virusų koduojami komplemento reguliatorių homologai		
<i>Virusinis baltymas</i>	<i>Veikimas</i>	
HVS CCPH	Skaidymą skatinantis veiksnys, kofaktoriaus aktyvumas	
KSHV KCP	Skaidymą skatinantis veiksnys, kofaktoriaus aktyvumas	
VV VCP	Skaidymą skatinantis veiksnys, kofaktoriaus aktyvumas	
Raupų viruso SPICE	Skaidymą skatinantis veiksnys, kofaktoriaus aktyvumas	
Beždžionių rauų MOPICE	Kofaktoriaus aktyvumas	
HVS-1 5	CD59 homologas, komplemento slopiklis	
Virusų koduojami funkciniai komplemento reguliatoriai		
<i>Virusinis baltymas</i>	<i>Suriša</i>	<i>Veikimas</i>
HSV-1 gC	C3b	Skaidymą skatinantis aktyvumas
HSV-2 gC	C3b	Apsaugo nuo C vykdomo neutralizavimo
Komplemento receptorių surišimas		
<i>Virusas ar baltymas</i>	<i>Receptorius</i>	
EBV gp350/220	CR2	
Adenovirusai	CD46	
ŽHV-6	CD46	
Tymų virusas	CD46	
Echovirusas	CD55	
Koksaki virusas	CD55	
HCV šerdies baltymas	gC1qR	
HBV	gC1qR	
ŽIV Tat	gC1qR	
ŽIV Rev	gC1qR	
EBV EBNA-1	gC1qR	
CMV	gC1qR	
HSV	gC1qR	
Receptorių ir reguliatorių įtraukimas į virusinį apvalkalą		
<i>Virusas</i>	<i>Įtrauktas receptorius</i>	
ŽIV	CD46, CD55 ir CD59	
VV	CD46, CD55 ir CD59	
ŽTLV	CD55 ir CD59	
ŽCMV	CD55 ir CD59	
Viruso paviršiaus padengimas komplemento reguliaciniais baltymais		
<i>Virusas</i>	<i>Komplemento baltymas</i>	
Vest Nilo virusas	Veiksnys H	
ŽIV	Veiksnys H	

Pagal [24].

Atsižvelgiant į esminį komplemento vaidmenį imuninės sistemos aktyvavime nenuostabu, kad daugelis virusų sukūrė mechanizmus, padedančius išvengti

komplemento sistemos ar netgi panaudoti ją savo reikmėms. Virusų komplemento išvengimo mechanizmai yra šie: (1) reguliacinių komplemento baltymų įjungimas į virusinį apvalkalą; (2) virusinių baltymų, struktūriškai ar funkciškai panašių į komplemento reguliacinius baltymus, sintezė; (3) atsparumo komplemento sukeltai lizei didinimas, aktyvuojant reguliacinių šeimininko ląstelės paviršiaus baltymų sintezę. Kai kurie virusai ląstelės paviršiuje esančius komplemento sistemos receptorius naudoja patekimui į ląstelę. Komplemento receptorių ir virusinių baltymų sąveika taip pat suteikia galimybę sužadinti šių receptorių sukeltus imunomoduliuojančius signalus. Membranose esantys komplemento reguliaciniai baltymai CD46 (MCP), CD55 (DAF) ir CD59 riboja komplemento aktyvumą ir MAC formavimąsi ląstelių paviršiuose, taip jas apsaugodami nuo komplemento sukeltos atakos. Taigi, šių baltymų įtraukimas į tam tikrų virusų apvalkalą gali padėti išvengti virusinės infekcijos sukeltos ląstelės lizės. Tokiu būdu nuo komplemento ginasi ŽIV, citomegalo (CMV) ir keletas kitų virusų. Vest Nilo virusas ir ŽIV nuo komplemento apsaugo sąveikaudami su komplemento veiksniumi H. Virusinė infekcija gali įtakoti ir komplemento receptorių raišką šeimininko ląstelėse. Herpeso virusai skatina receptorių, reguliuojančių komplemento funkciją, raišką; CMV skatina CD46 ir CD55 raišką; žmogaus herpeso virusas 7 skatina ląstelės paviršiaus baltymų CD46 ir CD59 raišką ir taip virusu apkrėstas ląsteles apsaugo nuo komplemento sukeltos atakos (**9 lentelė**).

Kai kurie virusai ne tik reguliuoja šeimininko komplemento baltymų raišką ir jų pasiskirstymą, bet ir patys sintetina funkcinis komplemento reguliatorių homologus. Pavyzdžiui herpeso viruso saimiri (HVS) ir su Kapoši sarkoma susijusio herpeso viruso (KSHV) infekcijai pagelbėja virusų koduojamų komplemento reguliatorių, atitinkamai komplemento kontrolinio baltymo homologo (CCPH) ir KSHV komplemento kontrolinio baltymo (KCP) sintezė. Šių baltymų kofaktorinis aktyvumas skatina C3b ir C4b degradavimą, taip pagreitindamas klasikinio ir lektino komplemento aktyvavimo kelių C3 konvertazių suardymą. HVS taip pat koduoja CD59 homologą, galintį trukdyti

MAC formavimuisi ir virusų užkrėstų ląstelių lizei. Paprastojo herpeso viruso glikoproteinas C veikia kaip C3b receptorius, trukdantis komplemento opsonizacijai ir konvertazės C5 formavimuisi. Komplemento reguliacinius baltymus koduoja ir kai kurie poksivirusai bei kiti virusai (**9 lentelė**).

Virusinių baltymų sąveika su komplemento receptoriais kartais palengvina ir jų patekimą į ląsteles. Tymų virusas ir kai kurios adenovirusų padermės naudojami CD46 receptoriumi, o tymų virusas tokiu būdu dar ir sukelia imuninę toleranciją savo infekcijai. ŽIV sąveika su dendritinių ląstelių paviršiuje esančiu CR3 leidžia jam patekti į šias ląsteles ir palengvina vėlesnę CD4 T ląstelių užkrėtimą. Epšteino-Bar virusas (EBV) patekimui į ląstelę naudojami gp350/220 sąveika su CR2, o kai kurie enterovirusai tuo tikslu sąveikauja su CD55 (**9 lentelė**).

Akivaizdu, kad evoliuciškai sena komplemento sistema atlieka svarbų vaidmenį kaip įgimtojoje, taip ir įgytoje imuninėje sistemoje, tad geresnis virusų manipuliavimo šia sistema supratimas pasitarnaus antivirusinių priemonių kūrimui.

1.3.5. Virusų apsisaugojimas nuo NK ląstelių

Natūraliosios žudikės (NK ląstelės) kontroliuoja virusų dauginimąsi iki specifinio įgytojo imuniteto susiformavimo. NK ląsteles aktyvuoja tirpūs tarpininkai arba tiesioginiai ląstelių kontaktai, o sąveikaudamos su dendritinėmis ląstelėmis jos dalyvauja ir įgytojo imuniteto reguliavime. NK ląstelės infekciją kontroliuoja citolizės būdu arba sekretuodamos uždegiminius citokinus. Šių ląstelių aktyvumą reguliuoja keleto slopinančių ir aktyvuojančių receptorių derinys, daugelis jų kaip ligandus naudoja I ar II klasės molekules panašius baltymus. Siekdamas išlaikyti pilną funkcionalumą ontogenezės metu, atskiros NK ląstelės privalo naudoti autoreaktyvumą slopinančius receptorius, specifinius atitinkamos klasės MHC molekulėms. I klasės MHC molekules kaip ligandus naudojančios NK ląstelių receptoriai yra I Ig panašių žmogaus NK ląstelių receptorių (KIR) šeima, pelių

Ly49 šeima, žmogaus ir pelių CD94/NKG2 heterodimerai ir leukocitų į Ig panašūs receptoriai (LIR). Kiti NK ląsteles aktyvuojantys receptoriai yra natūralūs citotoksiškumo receptoriai (NCR) ir NKG2D. Normalūs ląsteliniai NCR ligandai iki šiol nežinomi, o NKG2D receptoriai atpažįsta keletą skirtingų ligandų, kuriuos indukuoja ląstelės stresas ir infekcija.

Lentelė 10. Virusų apsisaugojimas nuo NK ląstelių.

Virusas	Baltymas	Veikimas
Veikimas prieš "Tapatybės trūkumą"		
ŽCMV	UL18	Sąveika su NK ląstelių slopinančiuoju receptoriumi LIR-1
Pelių CMV	m144	Nežinomas
	m157	Sąveika su Ly49I
Žiurkių CMV	r144	Nežinomas
	RCTL	Sąveika su slopinančiuoju receptoriumi Nkrp1b
Skirtingas I klasės MHC reguliavimas		
ŽCMV	US2, US11	Slopina HLA-A, bet ne HLA-E; kitas HLA molekules veikia įvairiai
	UL40	UL40 lyderinis peptidas rišasi su HLA-E ir NK ląstelėms siunčia slopinimo signalą
Pelių CMV	m04/gp34	Susiriša su I klasės MHC ir išlaiko juos ląstelių paviršiuje, galimas NK ląstelių jaukas
KSHV	K5	Slopina HLA-A ir HLA-B, bei šiek tiek HLA-C, bet neįtakoja HLA-E
ŽIV	Nef	Slopina HLA-A ir HLA -B
Trukdymas NK ląstelių receptorių aktyvuojantiems ligandams		
ŽCMV	UL16	Slopina ULBP-1, ULBP-2 ir MICB
	UL141	Slopina CD155
	UL142	Slopina pilno ilgio MICA
	miR-UL112	Trukdo MICB iRNR transliacijai
	UL83/pp65	Trukdo aktyvavimui per NKp30, atsiedamas adaptorinę molekulę CD3ζ
Pelių CMV	m138	Virusinis FcγR, slopina MULT-1 ir H60, trukdo nuo klatrino priklausomai endocitozei
	m145	Slopina MULT-1
	m152/gp40	Slopina RAE-1 šeimos narius
	m155	Slopina H60
KSHV	K5	Skatina CD86 ir CD54 endocitozę
ZPXV	OMCP	Konkurenciškai rišasi su NKG2D
Kiti mechanizmai		
Pelių CMV	m157	Rišasi su Ly49H ir aktyvuoja NK ląsteles
	nežinomas	Aktyvuoja Ly49P kartu su H-2D ^k
Gripo virusas	HA	Rišasi su NKp46
HCV	E2	Rišasi su CD81
ŽTLV	p12I	Slopina ICAM-1 ir ICAM -2 bei susilpnina NK ląstelių sukibimą su ŽTLV infekuotomis CD4 ⁺ T ląstelėmis

ZPXV, zoonotinis ortopoksivirusas. Pagal [56].

Kad nebūtų atpažinti CD8⁺ T ląstelių, virusai slopina MHC I klasės paviršiaus molekulių raišką. Bet „tapatybės trūkumo“ hipotezė teigia, kad ląsteles, neturinčias MHC I klasės molekulių, atakuoja NK ląstelės. Siekdami išvengti NK ląstelių vykdomos kontrolės, virusai koduoja pakaitinius ligandus slopinantiems NK ląstelių receptoriams ir/arba gali pasirinktinai reguliuoti MHC I klasės molekulių raišką. Tokiu atveju slopinamos tos MHC I klasės molekulės, kurios virusinius peptidus pristato CD8⁺ T ląstelėms, bet išsaugomos tos, kurios sąveikauja su slopinančiais NK ląstelių receptoriais. Virusai sukūrė daugybę mechanizmų, padedančių išvengti NK ląstelių imuninės priežiūros ar ją įtakoti. Jie ne tik kliudo NK ląstelių receptoriams ir jų ligandams, bet ir veikia NK ląstelių atsaką reguliuodami apoptozę, įtakodami citokinų ir chemokinų sekreciją bei slopindami dendritinių ląstelių funkcionavimą. Lentelėje susistemintos unikalios sąveikos tarp NK ląstelių ir virusų, didžiausią dėmesį kreipiant į virusų vykdomą NK receptorių ligandų raiškos slopinimą (**10 lentelė**).

1.3.6. Virusų naudojami įgytojo imuninio atsako išvengimo mechanizmai

Virusams specifinis imuninis atsakas prasideda nuo virusinės kilmės produktų pristatymo CD8⁺ T ir CD4⁺ T ląstelėms, pagrindiniams įgytojo imuninio atsako reguliatoriams. Šį pristatymą vykdo MHC I-os ir II-os klasės baltymai, surišantys į antigeninius peptidus suskaidytus virusinius baltymus ir juos pateikdami atitinkamai CD8⁺ T ir CD4⁺ T limfocitams. Antra būtina T ląstelių aktyvavimo sąlyga – citokinų, reguliuojančių jų aktyvumą, gamyba. Virusai įvairiomis priemonėmis trukdo abiemis įgytojo imuniteto aktyvavimo procesams – slopina antigenų skaidymą bei pristatymą arba trikdo citokinų gamybą bei jų funkcijas.

Virusai, trukdantys MHC I atliekamam antigenų pristatymui, slopina šiems antigenams specifiskų CD8⁺ T ląstelių aktyvavimą ir tuo būdu apsisaugo nuo užkrėstų ląstelių atpažinimo bei sunaikinimo. Galima trikdyti praktiškai

kiekvieną MHC I vykdomo peptidų pristatymo etapą, tad kai kurie virusai koduoja net po keletą baltymų, veikiančių skirtingas šio proceso stadijas: (1) slopina MHC I molekulių sintezę, (2) trukdo antigenus skaidyti į peptidus, (3) trikdo antigeninių peptidų transportą į paskirties vietą, (4) slopina MHC I baltymų eksponavimą ląstelės paviršiuje. Visus šiuos etapus atskiri virusai bando paveikti ir MHC II baltymų atveju, nors tai daro rečiau.

Pavyzdžiui žmogaus citomegalo virusas (ŽCMV) slopina abi metaloproteazes, skaidančias antigenus į MHC molekulėms tinkamus peptidus: CD10 (endopeptidazė) slopinama transkripcijos arba transliacijos lygyje, o CD13 (aminopeptidazė N) užlaikoma endoplazminiame tinkle. Peptidus iš citoplazmos į ET, kuriame jie susiejami su MHC I baltymais, gabena peptidų transporteris TAP. ŽCMV koduoja ET baltymą US6, kuris sąveikauja su TAP, blokuodamas nukleotidų surišimų domenų ir tokiu būdu trukdydamas ATP hidrolizei bei peptidų transportui. HSV polipeptidas ICP47 sąveikauja su TAP baltymo peptido surišimo sritimi, dėl ko endoplazminiame tinkle su MHC I baltymais susiriša mažesnis kiekis peptidų.

MHC I molekulių raiškos reguliavimą vykdo mažiausiai trys virusų grupės – adenovirusai, ŽCMV ir HSV. ŽCMV US3 baltymas trukdo MHC I baltymų brendimui, užlaikydamas juos ET. To paties viruso US2 ir US11 baltymai MHC I baltymus nukreipia degradavimui. Adenoviruso sintetinamas ET baltymas E3/19K sąveikauja su pelių MHC I molekulėmis A2, K^d, L^d, bet ne su K^k ar D^d ir užlaiko jas ET. Tai sąlygoja silpnesnę MHC I raišką ir susilpnina citotoksinių limfocitų atpažinimo funkciją. HSV geno ICP47 koduojamas baltymas trukdo peptidų transportui iš citoplazmos į ET, tokiu būdu MHC I molekules užlaikydamas ET ir jas destabilizuodamas. Virusų vykdomas MHC baltymų veiklos trikdymas apibendrintas lentelėje (**11 lentelė**).

Citokinai – tai sekretuojami polipeptidai, koordinuojantys uždegiminiuosius procesus ir imuninių ląstelių aktyvavimą, dalijimąsi, diferenciaciją bei chemotaksį. Jie yra vieni pirmųjų virusinės infekcijos aktyvuojamų veiksmų, diriguojančių įgimtą ir įgytąjį imuninius atsakus. Šios molekulės tiesiogiai

atsakingos už daugelio virusinių infekcijų sukeltus pirmuosius ligos simptomus: raumenų skausmus, pakilusią temperatūrą, galvos skausmą ir mieguistumą. Citokinai ir patys yra galingi antivirusiniai tarpininkai, daugeliu atvejų galintys sustabdyti virusinę infekciją, todėl jų funkcijų slopinimas labai padidina patogenų virulentiškumą. Citokinų veikimą virusai įtakoja keturiais pagrindiniais būdais: (1) įvairiais būdais slopina jų sintezę, (2) koduoja su atitinkamais receptoriais sąveikaujančius citokinų homologus, (3) koduoja į citokinų receptorių panašius antigenus ir (4) koduoja kitus baltymus, surišančius citokinus. Virusinių baltymų poveikis citokinų funkcijoms apibendrintas lentelėje (**12 lentelė**).

Lentelė 11. Virusinių baltymų vykdomas MHC baltymų funkcijų trikdymas

Virusas	Baltymas	Veikimas
AdV	E3/19K	MHC I baltymus užlaiko ET
	E1A	Trukdo IFN- γ vykdomam MHC II raiškos skatinimui
EBV	EBNA-1	Trikdo proteolizę
	BZLF2	Trikdo MHC II vykdomą antigenų pristatymą
	vIL-10	Blokuoja TAP
ŽHV-8	K3, K4	Skatina MHC I ir CD4 endocitozę
ŽCMV	Pp65	Slopina 72 kDa transkripcijos veiksnio skaidymą į antigeninius peptidus
	US2	MHC I baltymų sunkiąsias grandines nukreipia degradavimui
	US3	MHC I baltymus užlaiko ET
	US6	Blokuoja TAP
	US11	MHC I molekulių sunkiąsias grandines nukreipia degraduoti
	UL18	Apsaugo nuo NK ląstelių vykdomos lizės (MHC I homologas)
	IE/E produktas	Trukdo IFN- γ vykdomam MHC II raiškos skatinimui
	ŽIV	Nef
Vpu		Destabilizuoja naujai susintetintus MHC I baltymus, CD4 nukreipia degraduoti
ŽPV	E5	Trikdo MHC II baltymų brendimą
	E6	Trikdo MHC II baltymų brendimą
HSV	ICP-47	Blokuoja TAP
HSV-1	nežinomas	Trikdo MHC II vykdomą antigenų pristatymą
MCV	MC080R	Apsaugo nuo NK ląstelių vykdomos lizės (MHC I homologas)
Pelių CMV	m152	MHC I baltymus užlaiko ERGIC
	m4/gp34	Suriša MHC I baltymus
	m6/gp48	MHC I baltymus nukreipia į lizosomas degraduoti
	m144	Apsaugo nuo NK ląstelių vykdomos lizės (MHC I homologas)
Žiurkių CMV	r144	Apsaugo nuo NK ląstelių vykdomos lizės (MHC I homologas)

MCV, odos moliusko virusas. Pagal [117].

Lentelė 12. Virusinių baltymų poveikis citokinų sistemai

Taikinys	Virusas	Baltymas	Veikimas
TNF receptorius	VV	CrmB	Sekretuojamas, blokuoja TNF- α ir LT α
		CrmC	Sekretuojamas, blokuoja LT α
	Šoupo fibromos virusas	SFV T2	Sekretuojamas, suriša ir blokuoja TNF
	MYXV	MT-2	Sekretuojamas, suriša ir blokuoja TNF
	ŽCMV	UL144	Viduląstelinis, nežinomas veikimas
Interleukinas-1β	VV	B15R	Sekretuojamas, suriša ir blokuoja IL-1 β
		B13R	Slopina keletą kaspazių, tarp jų ir IL-1 β konvertazę (ICE)
I tipo interferonai	VV	CrmA/Spi-2	Slopina keletą kaspazių, tarp jų ir ICE
		B18R	Sekretuojamas I tipo interferonų receptoriaus homologas, suriša ir blokuoja IFN- α
	AdV	E1A	Blokuoja interferonų indukuojamą JAK/STAT signalinį kelią; blokuoja ISGF3 transkripcijos aktyvavimo funkciją
	HBV	X	Blokuoja interferonų signalinę funkciją
	HSV	γ_1 34.5	Pašalina interferonų sukeltą transliacijos blokadą
	ŽHV-8	vIRF-2	Reguliuoja ankstyvųjų uždegiminių genų raišką
	EBV	EBNA-2	Slopina interferonų stimuliuojamą transkripciją
PKR ir RNazė L	AdV	VAI RNR	Blokuoja PKR aktyvumą
	EBV	EBER I	Blokuoja PKR aktyvumą
	HCV	E2	Slopina I tipo interferono vykdomą PKR aktyvumą
	ŽIV-1	TAR RNA	Sąveikauja su ląstelinio PKR slopikliu TRBP
	VV	K3L	eIF2a homologas, slopina PKR
	HSV	2'-5' (A)	RNR analogas, slopina RNazę L
		E3L	Kaupia dvigrandę RNR ir apsaugo nuo PKR aktyvavimo
Interferonas γ	MYXV	M-T7	Sekretuojamas II tipo interferonų receptoriaus homologas, suriša IFN-c ir išbalansuoja chemokinių gradientus
	VV	B8R	Sekretuojamas II tipo interferonų receptoriaus homologas, suriša IFN-c
	Tanapoks virusas	35-kDa	Sekretuojamas baltymas, suriša IFN-c (taip pat IL-2 ir IL-5)
Interleukinas 12	Gripo virusas	Hemaglutininas	Suriša CD46, slopina IL-12 gamybą
Chemokinių receptoriai	Avių ir ožkų raupų virusas	Q2/3L	Su G baltymais susijęs chemokinių receptoriaus homologas
	VV,	p35	Sekretuojamas, suriša CC chemokinus
	VAR,		
	RPV		
	EBV	BARF1	Sekretuojamas, suriša CSF-1
ŽCMV	US28	CC chemokinių receptoriaus, suriša chemokinus ir sužadina signalinį kelią	

		US27	G baltymo homologas, veikimo būdas nežinomas
		UL33	Chemokinių receptoriaus homologas, veikimas nežinomas
	Žiurkių CMV, pelių CMV	R33, M33	UL33 homologas, dalyvauja replikacijoje
	ŽHV-6,7	U12	CC chemokinių receptorių
	ŽHV-8	U51	Numanomas chemokinių receptorių
		ASR74	Pastoviai aktyvus receptorių, slopinamas SDF, IP-10 ir vMIP-II
	HVS	ECRF3	CXC chemokinių receptorių
	MYXV	M-T1	Sekretuojamas, suriša CC chemokinus
	SPV	K2R	Chemokinių receptorių
Virusų koduojami citokinai ir chemokinai	EBV	BCRF1	IL-10 homologas, Th1 atsako antagonistas
	EHV-2	EHVIL-10	IL-10 homologas, Th1 atsako antagonistas
	Orf virusas	OV IL10	IL-10 homologas, Th1 atsako antagonistas
	ŽHV-6	U83	CC arba CX3C chemokinas
		vIL6	Skatina angiogenezę ir hematopoezę
	ŽHV-8	vMIP-I	CCR8 agonistas, Th2 cheminis pritraukiklis
		vMIP-II	Th2 cheminis pritraukiklis, chemokinių receptorių antagonistas
		vMIP-III	Veikimas nežinomas
	MCV	MC148P	MIP-1b homologas, chemokinių receptorių antagonistas
	Pelių CMV	MCK-1/ MCK-2	Chemokinių homologas, skatina virusų sklaidimą
HVS	vIL-17	T ląstelių mitogenas	
VV	A39R	Rišasi su semaforino receptoriumi VESPR, skatina ICAM-1 ir citokinių gamybą monocituose	

Sutrumpinimai: VAR, raupų (*variola*) virusas; *RPV*, triušų raupų virusas; *MYXV*, Miksomos virusas; *SPV*, kiaulių raupų virusas; *EHV-2*, Arklių herpeso virusas 2; *MCV*, odos moliusko virusas. Pagal [117].

Iš pateiktų duomenų matoma, kad selektyvus imuninės sistemos spaudimas privertė virusus sukurti daugybę įvairių jo išvengimo būdų. Šių mechanizmų išaiškinimas padeda geriau suprasti virusų dauginimosi bei patogenezės mechanizmus ir sėkmingiau kovoti su virusinėmis infekcijomis. Bet šios žinios gali pasitarnauti ir kitoje svarbioje srityje. Kaip žinoma, imuninė sistema kontroliuoja ir ankstyvos stadijos vėžinių ląstelių plitimą bei dauginimąsi, taigi šios ląstelės patiria tokį pat imuninės sistemos spaudimą kaip ir virusai. Visiškai tikėtina, kad siekdamas išvengti imuninės sistemos kontrolės vėžinės

ląstelės naudoja tokius pat ar panašius mechanizmus kaip ir virusai. Ir iš tikrųjų, daugelio vėžinių ląstelių paviršiuje yra mažiau MHC I molekulių, daug jų yra atsparios apoptozei, pastebima ir kitų virusais užkrėstoms ląstelėms būdingų savybių. Todėl virusų naudojamų imuninės sistemos išvengimo mechanizmų supratimas gali padėti spręsti ir vėžio bei kitas su imunine sistema susijusias sveikatos problemas.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Amersham Biosciences (JAV):

Glutationo-agarozės rutuliukai, IPTG, ožkos antikūnai specifiniai GST baltymui.

Amresco (JAV):

Agarozė, glicinas, YNB, magnio chloridas, Tris, DNR gryninimo iš agarozės gelio rinkinys *Cyclo-pure gel extraction kit*.

Applichem (Vokietija):

Druskos rūgštis, galaktozė, natrio dihidrofosfatas.

Biomedicininų tyrimų ir studijų centras (Latvijos universitetas, Latvija):

Monokloninis pelės antikūnas 14E11, specifinis HBc ir HBe baltymui [94].

Bio-rad (JAV):

NDS; su krienų peroksidaze konjuguoti antikūnai, specifiniai pelės IgG baltymams; su krienų peroksidaze konjuguoti antikūnai, specifiniai ožkos IgG baltymams; su krienų peroksidaze konjuguoti antikūnai, specifiniai triušio IgG baltymams.

Clinical Science products (JAV):

TMB

Fermentas (Lietuva):

Veršelio žarnų šarminė fosfatazė, krevečių šarminė fosfatazė, DNR polimerazės, T4 DNR ligazė, T4 polinukleotidkinazė, ribonukleazė A, visos darbe naudotos restrikcijos endonukleazės, plazmidžių skyrimo rinkinys *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*; DNR fragmentų agarozės gelyje standartai *GeneRuler™ DNA Ladder Mix*, *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus*, *MassRuler™ DNA Ladder Mix*; baltymų molekulinės masės standartai *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, *Prestained Protein Molecular Weight*

Marker, Unstained Protein Molecular Weight Marker.

Fluka (Šveicarija):

Natrio chloridas, sacharozė, TEMED, vandenilio peroksidas.

Macherey-Nagel (Vokietija):

Plazmidžių skyrimo rinkinys *Nucleospin Plasmid*.

Millipore (JAV):

PVDF membrana

Reachim (Rusija):

Gliukozė, kalio chloridas, natrio karbonatas.

Carl Roth (Vokietija):

Akrilamidas, amonio persulfatas, amonio sulfatas, ampicilinas, Bradford reagentas, glicerolis, guanidino hidrochloridas, jaučio serumo albuminas, mielių ekstraktas, natrio hidrofosfatas, peptonas, PMSF, šlapalas.

Sigma-Aldrich (JAV):

Bisakrilamidas, chloronaftolis, EDTA, etidžio bromidas, fenolis, Kumasil brilliantinio mėlis, ličio acetatas, magnio sulfatas, merkaptoetanolis, PEG, TMB, Tween-20, HA epitopui specifiniai triušio monokloniniai antikūnai.

Standard (Lenkija):

Acto rūgštis, chloroformas, natrio šarmas, pieno miltai, sieros rūgštis.

Vilniaus degtinė (Lietuva):

Etanolis.

2.1.2. Oligonukleotidai

Nukleotidų sekos nustatymo pradmenys (Fermentas, Lietuva):

M13/pUC dir	5'-GTAAAACGACGGCCAGT
M13/pUC rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC
T7-prom	5'-TAATACGACTCACTATAGGG
T7-term	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Pradmenys plazmidės pB42AD intarpo padauginimui ir sekavimui (Clontech, JAV):

AD-dir 5'-CGATACCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATG

AD-rev 5'-GATTGGAGACTTGACCAAACCTCTGGC

Pradmenys NF- κ B aktyvumui nustatyti EMSA metodu (Metabion, Vokietija):

oNF κ B1 5'-CGAGCCTAACGGGACTTTCCAAG

oNF κ B2 5'-TCGAGCTCGGATTGCCCTGAAAGGTTTCAGCT

Pradmenys plazmidžių konstravimui (Metabion, Vokietija; MWG Biotech, Vokietija)

Raiškos vektoriams su įterptu HA epitopu konstruoti:

QMN1 5'-GATCCCAATTGCCCGGGCCCGTCGACCTGCA

QMN2 5'-GGTCGACGGGCCCCGGGCAATTGG

HAP1 5'-CTAGACCACCATGGTATACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTG

HAP2 5'-GGTGGTACCATATGGGTATGCTACAAGGTCTAATGCGACCTAG

HAP3 5'-ATCCAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATACCATGGTGGT

Restrikcijos endonukleazių taikiniams į HbC galus įvesti:

2H1 5'-GCCAATTCGACATTGATCCTTATAAAGAA

2H2 5'-GCCTCGAGCTAACATTGAGATTCCCGAG

CON1 5'-ACCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTTG

HbC iškritoms įvesti:

CoreDD2 5'-GGCCTAAAATTCAGGCAACTATTG

2053 5'-ATAACTGACTACTAGGTCCCTG

2054 5'-GTTGACATAACTGACTACTAGGTCC

HbC C galo pakeitimams:

CCS2A 5'-GCCTCGAGCTAACATTGAGCTTCCCGAG

CCC0A 5'-GCCTCGAGCTAAGCTTGAGATTCCCGAG

CCD1 5'-TGGAATTCCCGGAGACTACTGTTGTTAGAC

CCR1 5'-CTCGAGCTAGCGCGCATTTGGTGGTCTATAAGC

CCR2 5'-CTCGAGCTAGCGCGCTTGAGATCTTCTGCGACGCG

IKKγ geno pakeitimams :

2051 5'-CACTCGAGTTACTGCGCCGGCCCTACTC
IKKD2 5'-GGAATTCAGGAAGCTGGCCCAGTTGCAG
IKKD3 5'-GGAATTCGTGGGCAGTGAGCGGAAGCG
IKKD4 5'-GGAATTCAGGCGGATATCTACAAGGCG
IKKR1 5'-GCTCGAGCTACGCCTGGGCCTTCAGCACCG
IKKR2 5'-CCTCGAGCTACCGCTTCCTCATGTCCTCG

GIPC1 geno pakeitimams :

GC1R1 5'-GCTCGAGCTAGTAGCGGCCGACCTTGG
GC1D1 5'-GGAATTCGAAGAGAAGGCCATTGAGAAGG
GC1D2 5'-GGAATTCGCCCACGTGAAGGGGCAG
GC1R2 5'-GCTCGAGCTAGCCACCCGCTGAACGCTGGC

GIPC2 geno pakeitimams :

GC2R1 5'-CTCGAGTCATAATCCTCTTCGTTTGGC
GC2D1 5'-GGAATTCGGTCCTGCCACCGTGGAAG
GC2D2 5'-GAATTCGGAGGACAACACTAGGACTAGAAG
GC2R3 5'-CTCGAGTCACTTCATAGTAAAGAGTTCCTC

FLJ20850 baltymo geno pakeitimams :

A1R1 5'-CTCGAGCCGCCATCACTCGGCAG
A1D2 5'-GAATTCGCGCGCTACCGGAGC
A1R2 5'-CTCGAGTCAGCCCAGCCGCGTCTGCTCC
A1D4 5'-GAATTCCTGCAGTGCCTGCTGC

2.1.3. Mikroorganizmų kamienai

E.coli DH5α F⁻ (ϕ 80dlacZ Δ M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(r_k⁻ m_k⁺) *supE44 relA1 deoR E.coli* Δ (*lacZYA-argF*) U169;
E.coli BL21(DE3) F⁻ *ompT hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm gal* (DE3); turi profagą λ DE3 su T7 RNR polimerazės genu (*Novagen*, JAV);
E.coli KC8 *hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lac Δ X74, strA, galU, K* (*Clontech*, JAV);

S.cerevisiae EGY48 MAT α , *ura3*, *his3*, *trp1*, LexAop(x6)-LEU2 (*Clontech*, JAV).

2.1.4. Plazmidės

pUC57	klonavimo vektorius (<i>Fermentas</i>);
pTZ57R	klonavimo vektorius (<i>Fermentas</i>);
pGex-5x	vektorius, skirtas su GST (<i>Schistosoma japonicum</i> 26-kDa glutationo S-transferazės domenas) sulietų genų raiškai bakterijose (<i>Amersham</i>)
pET-HA	vektorius, skirtas su HA (gripo viruso hemaglutinino HA epitopas) sulietų genų raiškai bakterijose (sukonstruotas autoriaus)
pHB320	plazmidė su pilnu HBV ayw subtipo genomu (gauta iš prof. Paul Pumpens, Biomedicininių tyrimų ir studijų centras, Latvijos universitetas, Latvija);
pC19	plazmidė su HBV C genu, turinčiu 86-93 ar. iškritą (gauta iš dr. Helga Meisel Virusologijos Institutas, Charité universitetinė ligoninė, Berlynas, Vokietija);
W1207co	plazmidė su HBV C genu, turinčiu 77-93 ar. iškritą (gauta iš dr. Helga Meisel);
pB42AD	mielių/bakterijų vektorius, skirtas galaktozės indukuojamai su b42 domenu sulietų genų raiškai mielėse (<i>Clontech</i>);
pLexA	mielių/bakterijų vektorius, skirtas pastoviai su <i>lexA</i> domenu sulietų genų raiškai mielėse (<i>Clontech</i>);
p8op-lacZ	mielių/bakterijų vektorius, skirtas LexA operatoriaus kontroliuojamai β -galaktozidazės geno raiškai mielėse (<i>Clontech</i>);
pB42AD-T	SV40 viruso didysis T antigenas, sulietas su b42 domenu vektoriuje pB42AD;
pLexA-Lam	žmogaus laminas C, sulietas su <i>lexA</i> domenu vektoriuje pLexA.

2.1.5. Tirpalai

Jeigu nenurodyta kitaip, visų tirpalų paruošimui medžiagos tirpintos vandenyje.

Tirpalai DNR elektroforezei

<i>TAE buferinis tirpalas (pH 8,3):</i>	0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA.
<i>Agarozė (1%):</i>	1% agarozės TAE buferiniame tirpale.
<i>Etidžio bromido tirpalas:</i>	10 mg/ml etidžio bromido.
<i>DNR dažas:</i>	0,04% bromfenolio mėlio, 0,04% ksilolcianolio, 30% glicerolio.

DNR išskyrimo tirpalai

<i>NaOH-NDS tirpalas:</i>	1% NDS, 0,2 M NaOH.
<i>NaOAc (pH 4,8 arba pH 7,0):</i>	3 M natrio acetato, pH 4,8 arba pH 7,0.
<i>RNazės A tirpalas:</i>	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl, 10 mg/ml kasos ribonukleazės A.
<i>Glikogeno tirpalas:</i>	20 mg/ml glikogeno.

E.coli ir mielių kompetentinių ląstelių ruošimo tirpalai

<i>NaCl tirpalas:</i>	5 mM Tris-HCl (pH 7,4-8,0), 5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl.
<i>CaCl₂ tirpalas:</i>	5 mM Tris-HCl (pH 7,4-8,0), 5 mM MgCl ₂ , 100 mM CaCl ₂ .
<i>TE:</i>	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA.
<i>TE-LiAc:</i>	0,1 M CH ₃ COOLi tirpalas TE.
<i>TE-PEG:</i>	50% (w/v) PEG 4000 tirpalas TE.

Visi transformacijai naudojami tirpalai turi būti sterilūs.

Tirpalai baltymų elektroforezei poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Akrilamido/bisakrilamido tirpalas: 30% (w/v) akrilamido, 0,8% N, N'-metilenbisakrilamido.

4×Tris-HCl/NDS (pH 6,8): 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) NDS.

4×Tris-HCl/NDS (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) NDS.

Amonio persulfato tirpalas: 10% (NH₄)₂S₂O₈.

Koncentruojančio gelio tirpalas: 13% (v/v) akrilamido/bisakrilamido tirpalo, 25% 4×Tris-HCl/NDS (pH 6,8), 0,5% amonio persulfato tirpalo, 0,1% TEMED.

Skirstomojo gelio tirpalas (12% akrilamido): 40% (v/v)

akrilamido/bisakrilamido tirpalo, 25% 4×Tris-HCl/NDS (pH 8,8), 0,33% amonio persulfato tirpalo, 0,066% TEMED.

2×dažo buferinis tirpalas: 25% 4×Tris-HCl/NDS (pH 6,8), 20% (w/v) glicerolio, 4% (w/v) NDS, 0,001% (w/v) bromfenolio mėlio, 2% (v/v) merkaptoetanolio.

Tris-glicino/NDS elektroforezės buferinis tirpalas (pH 8,3): 25 mM Tris, 0,2 M glicino, 0,1% NDS.

Kumasi mėlio tirpalas: 50% (v/v) etanolio (arba metanolio), 0,05% (v/v)

Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% (v/v) acto rūgšties.

Gelių plovimo tirpalas: 5% (v/v) acto rūgšties.

Imunoblotingo tirpalai

PBS: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,2), 100 mM NaCl.

Baltymų pernašos buferinis tirpalas (PTB): 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1,13% glicino, 10% etanolio.

Plovimo tirpalas I (PBS-T): 0,1% Tween 20 ištirpinta PBS.

Plovimo tirpalas II (TBS): 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 140 mM NaCl.

Blokavimo tirpalas: 5% pieno baltymų ištirpinta PBS-T.

Ryškinimo tirpalas: 0,05% 4-chlornaftolis, 16% etanolio, 0,02% šalto H₂O₂ ištirpinta TBS.

GST ištraukimo metode naudoti tirpalai

Bakterijų ardymo tirpalas: 2 mM PMSF, 1 mM EDTA tirpalas PBS (pH 7.2).

Sąveikos tirpalas: 0.5% NP40, 2 mM PMSF, 1 mM EDTA tirpalas PBS (pH 7.2).

Tirpalai β -galaktozidazės aktyvumo nustatymui

X-gal tirpalas: 20 mg X-gal mililitre N,N-dimetilformamido.

Z buferinis tirpalas: 100 mM NaPi, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.

Mielių ardymo tirpalas: 0.2 mM PMSF ir 0.3% β -merkaptoetanolio ištirpinta Z tirpale.

ONPG tirpalas: 4 mg/ml ONPG ištirpinta Z tirpale.

Papildomi tirpalai mielių ir bakterijų mitybinėms terpėms

BU druskų tirpalas: 70 g Na₂HPO₄•7H₂O ir 30 g NaH₂PO₄ litre vandens.

DO tirpalas: 200 mg/l L-adenino hemisulfato druskos, 200 mg/l L-arginino HCl, 300 mg/l L-izoleucino, 300 mg/l L-lizino HCl, 200 mg/l L-metionino, 500 mg/l L-fenilalanino, 2000 mg/l L-treonino, 300 mg/l L-tirozino 1500 mg/l, L-valino.

Leu tirpalas: 1000 mg/l L-leucino.

His tirpalas: 200 mg/l L-histidino HCl monohidrato.

Trp tirpalas: 200 mg/l L-triptofano.

Ura tirpalas: 200 mg/l L-uracilo.

EMSA tyrimo tirpalai

Buferis A: 100 μ l HEPES (1M, pH 7,9), 100 μ l KCl (1M), 10 μ l EDTA (0,1 M), 10 μ l EGTA (0,1 M), 100 μ l DTT (10 mM), 50 μ l PMSF (10 mM), vandens iki 10 ml.

Buferis B: 20 μ l HEPES (1M, pH 7,9), 133 μ l KCl (3M), 1 μ l EDTA (0,1 M), 1 μ l EGTA (0,1 M), 10 μ l DTT (10 mM), 10 μ l PMSF (10 mM), vandens iki 1 ml.

EMSA reakcijos tirpalas: 10 mM HEPES (pH 7.9), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM spermidino, 10% glicerino.

2.1.6. Mitybinės terpės

Bakterijų auginimo terpės

LB terpė: 1% peptono, 0.5% mielių ekstrakto, 1% NaCl.

Agarizuota LB terpė: LB terpė su 2% agaru.

M9 terpė: 1x M9 druskos (5x M9: 64 g Na₂HPO₄×7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl ir 5 g NH₄Cl ištirpinama 1l vandens), 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,4% gliukozės.

Agarizuota M9 terpė: M9 terpė su 2,5% agaru.

E.coli ląstelės buvo auginamos agarizuotoje arba skystoje terpėje 37°C temperatūroje. Antibiotikams atsparūs kamienai auginti terpėse, į kurias pridėta 50 μg/ml ampicilino arba kanamicino tirpalo. Prieš užpilant lėkšteles transformantų atrankai ir auginimui, šie antibiotikai buvo pridedami į išlydytą ir atšaldytą iki 55°C agarizuotą terpę. Auginant kamieno KC8 transformantus, į agarizuotą M9 terpę papildomai pridedama amino rūgščių His, Leu arba Ura.

Mielių auginimo terpės

YPD terpė: 1% mielių ekstrakto, 2% peptono, 2% gliukozės.

Agarizuota YPD terpė: YPD terpė su 2% agaru.

SD-DO terpė: 0.67% YNB, 1% kazeino hidrolizato, 2% gliukozės, 10% DO tirpalo, 10% Leu tirpalo.

Agarizuota SD-DO terpė: SD terpė su 2,5% agaru, 10% Leu tirpalo.

Agarizuota SD-DO/Gal/Leu/X-gal terpė: 0.67% YNB, 1% kazeino hidrolizato, 3% galaktozės, 10% DO tirpalo, 80 mg/L X-gal, 10% Leu tirpalo, 2,5% agaru, 10% BU druskų tirpalo.

Agarizuota SD-DO/Gal terpė: 0.67% YNB, 1% kazeino hidrolizato, 3% galaktozės, 10% DO tirpalo, 2,5% agaru.

Mielių ląstelės buvo auginamos agarizuotoje arba skystoje terpėje 28-30°C temperatūroje. Auginant skirtingus mielių transformantus, į SD terpes papildomai pridedama po 10% His, Trp arba Ura tirpalų.

2.2. Metodai

2.2.1. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė buvo vykdoma į Tris-acetatinį buferinį tirpalą panardintuose 0,6% - 1% horizontaliuose agarozės geliuose esant 10 V/cm

įtampai. Pasibaigus elektroforetiniam frakcionavimui geliai dažyti 5-10 min. etidžio bromido tirpale (1 µg/ml), nesurištas dažas nuplautas tekančio vandens srovėje ir geliai analizuojami transiliuminatoriaus („Herolab“) UV šviesoje.

2.2.2. DNR hidrolizė ir ligavimas

DNR hidrolizės reakcijos mišinyje naudota ne didesnė nei 50 µg/ml DNR koncentracija. Buferiniai tirpalai bei inkubacijos temperatūra buvo parenkami pagal *UAB Fermentas* rekomendacijas. Jei restrikcijos endonukleaze hidrolizuota DNR buvo naudojama kitose fermentinėse reakcijose, reakcijos mišinys ekstrahuotas fenolio - chloroformo mišiniu bei chloroformu, DNR iš vandeninės frakcijos buvo išsodinama izopropanoliu (pridėjus NaOAc, pH 5,2 iki 0,3 M koncentracijos), nuosėdos praplaunamos 70% etanolio tirpalu, išdžiovinamos ir ištirpinamos reikiamame vandens kiekyje. Jei reakcijai naudotas buferinis tirpalas netrukdė sekančiai fermentinei reakcijai, restrikcijos endonukleazės aktyvumas buvo panaikinamas reakcijos mišinį 20 min. pakaitinus 65°C temperatūroje (taikyta tik jautriems temperatūrai fermentams).

DNR 5'-galinių fosfatų pašalinimui buvo naudojama šarminė fosfatazė iš veršiuko žarnų arba krevečių. PGR pradmenų 5'-galams fosforilinti vykdyta bakteriofago T4 polinukleotidkinazės katalizuojama reakcija.

DNR ligavimo reakcija buvo vykdoma ligavimo buferyje vienam µg DNR pridedant T4 DNR ligazės vienetą. DNR fragmentų koncentracija ligavimo mišinyje: fragmentų su „lipniais“ galais sujungimui - 50-100 µg/ml; fragmentų su bukais galais sujungimui - 150-300 µg/ml. Vektoriaus ir DNR fragmentų molekulių santykiai ligavimo mišinyje: nuo 1:1 iki 1:3.

2.2.3. Polimerazės grandininė reakcija

PGR buvo atliekama naudojant *UAB Fermentas* buferinius tirpalus, dNTP

mišinį, termostabilias Taq arba Pfu DNR polimerazes ir vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

2.2.4. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

Skiriant DNR iš agarozės gelio, buvo paruošiamas specialus gelis su plačiomis duobutėmis, į kurias įnešami DNR mėginiai. Kai reikalingas DNR fragmentas elektroforezės metu pakankamai atsiskirdavo nuo kitų, reikiama gelio sritis buvo išpjauinama skalpeliu, susmulkinama ir patalpinama į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlį. Toliau DNR fragmentų skyrimui buvo naudojamas *Cyclo-Pure™* (*Amresco*) rinkinys.

2.2.5. Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinė DNR buvo skiriama šarminės lizės metodu [2, 104]. Priklausomai nuo eksperimento tikslo buvo naudojamos įvairios šio metodo atmainos.

Skiriant mažus plazmidinės DNR kiekius transformuota bakterijų kolonija buvo užsėjama į 4 ml LB terpės su ampicilinu ir inkubuojama per naktį 37°C temperatūroje kratytuve. Kultūra buvo nucentrifuguojama 10 min. 2000 aps./min. greičiu (*Eppendorf* 5810R centrifuga), ląstelės suspenduojamos 200 µl TE buferinio tirpalo, pridedami 2 tūriai NaOH-NDS tirpalo ir švelniai sumaišoma. Po to buvo pridedama 1,5 tūrio natrio acetato (pH 4.8) tirpalo ir sumaišoma. Pridėjus 500 µl chloroformo ir sumaišius, mėginiai centrifuguojami 10 min. 2000 aps./min. (*Eppendorf* 5810R centrifuga) greičiu. Vandens fazė buvo nusiurbama į *Eppendorf* mėgintuvėlius, plazmidė išsodinama izopropanoliu (0.7-0.8 supernatanto tūrio), praplaunama 70% etanoliu, išdžiovinama ir ištirpinama vandenyje.

Skiriant didelius plazmidinės DNR kiekius transformuota kolonija buvo užsėjama į 50-1000 ml skystos LB terpės ir auginama 16-20 val. 37°C kratytuve. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant ir suspenduojamos TE buferiniame tirpale (1 g biomasės - 10 ml TE). Prie gautos ląstelių suspensijos pridėjus 2 tūrius NaOH-NDS tirpalo mišinys buvo švelniai sumaišomas,

palaikomas 5 min. kambario temperatūroje ir pridedama 1,5 tūrio NaOAc (pH 4,8) tirpalo. Po to mėginiai atsargiai suplakami ir centrifuguojami 15 min. 6000 aps./min. greičiu 4°C temperatūroje (Beckman J2-21 centrifuga, JA-10 arba JA-14 rotorius). DNR iš supernatanto buvo išsodinama pridedant izopropanolio (0,7-0,8 supernatanto tūrio) ir surenkama centrifuguojant 15 min. 10 000 aps./min. greičiu (Beckman J2-21 centrifuga, JA-10 arba JA-14 rotorius). DNR ištirpinama 5 kartus mažesniame vandens tūryje. RNR hidrolizei buvo naudojama kasos ribonukleazė, reakcija vykdoma 15 min. kambario temperatūroje. Baltymų pašalinimas buvo atliekamas ekstrahuojant lygiu tūriu fenolio/chloroformo (1:1) mišiniu tris kartus, po to chloroformu vieną kartą. DNR iš vandens fazės išsodinama dviem tūriais etanolio ir surenkama centrifuguojant Eppendorf 5415D stalinėje centrifugoje. Gautos nuosėdos buvo tirpinamos vandenyje.

Plazmidinės DNR skyrimui buvo naudojami ir *Macherey-Nagel* bei *UAB Fermentas* firmų rinkiniai.

2.2.6. *E.coli* kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija

Į 5 ml LB terpės buvo pridedama 50 μl naktinės *E.coli* recipientinio kamieno kultūros, ląstelės auginamos 37°C temperatūroje kratyklėje kol ląstelių kultūros optinis tankis (bangos ilgis 550 nm) pasiekdavo 0,3 optinius vienetus (po 2-3 val.). Visos tolesnės procedūros atliekamos ledo vonioje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 4°C temperatūroje 10 min. 2500 aps./min. (Eppendorf 5810R centrifuga) ir praplaunamos 3 ml 4°C temperatūros NaCl tirpalu. Nucentrifugavus tomis pačiomis sąlygomis, ląstelės suspenduojamos 3 ml 0°C temperatūros CaCl₂ tirpalo ir patalpinamos 30-60 min. ledo vonioje. Po to ląstelės buvo nusodinamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 200 μl CaCl₂ tirpalo ir naudojamos transformacijai.

Transformuojant kompetentines ląsteles ligavimo mišiniu, 5-10 μg DNR (20 μl ligavimo mišinio) buvo įdedama į 0,2 ml ląstelių suspensijos. Transformuojant

plazmidėmis naudojama 0,1 µg/ml DNR koncentracija. Kompetentinių ląstelių ir DNR mišinys 30 min. patalpinamas į ledo vonią, po to dviem minutėms pernešamas į 42°C vandens vonią. Po temperatūrinio šoko DNR ir ląstelių mišinys buvo užpilamas kambario temperatūros LB terpe santykiu 1:5 ir kratomas 0,5 val. 37°C. Po to ląstelės surenkamos centrifuguojant, išsėjamos ant agarizuotos mitybinės terpės su reikiamu antibiotiku ir auginamos 37°C termostate.

2.2.7. Plazmidžių konstravimas

pET-HA

Atlikto darbo metu buvo tiriami įvairūs žmogaus baltymai ir įvairių baltymų sutrumpintos formos, daugumai jų dar nėra sukurta specifinių antikūnų. Siekiant aptikti tokius baltymus ir išvengti rezultatų dviprasmiškumo dėl nevienodo įvairių antikūnų specifiškumo ir sukibimo stiprumo, prie visų tiriamų baltymų galima prikabinti trumpą amino rūgščių seką (žymę), kurios aptikimui galima naudoti gerai apibūdintus komercinius antikūnus. Šiam tikslui pasirinktas gripo viruso hemaglutinino baltymo HA epitopas. Susintetinti komplementarūs vienas kitam pradmenys HAP1 ir HAP2, kurie susiporavę koduoja HA žymę bei turi galus, atsirandančius po hidrolizės XbaI ir BamHI restrikcijos endonukleazėmis. Tokia DNR seka įterpta į plazmidę pQM-NTag-A (*Quattromed, Estija*), perkirptą minėtomis endonukleazėmis, ir gauta plazmidė pQM-HA, kurioje transliacijos pradžios taškas, HA žymę koduojanti seka ir už jos esanti daugybinio klonavimo seka yra įterpta tarp ekspresijai žinduolių ląstelėse reikalingų sekų. Analogiška plazmidė ekspresijai bakterijose pET-HA gauta į plazmidę pET16b (*Novagen, JAV*), perkirptą restrikcijos endonukleazėmis NcoI ir BamHI, įterpus NcoI-BglII fragmentą iš plazmidės pQM-HA.

Plazmidės su laukinio tipo bei mutantiniais HBc genais ir įvairiomis šių genų modifikacijomis

HBc geno pakeitimai

Pilno ilgio wt ir mutantiniai HBc genai buvo padauginami PGR būdu naudojant pradmenis 2H1 bei 2H2 ir klonuoti į plazmidę pTZ57R. Patikrinta įterptų fragmentų nukleotidų seka, jie iškirpti restrikcijos endonukleazėmis EcoRI ir XhoI bei įterpti į atitinkamai perskeltas plazmides pLexA, pB42AD, pGex-5x ir pET-HA. Gautos plazmidės yra skirtos sulietų genų raiškai mielėse bei bakterijose ir buvo naudojamos baltymų sąveikos tyrimuose. Kadangi visiems genų fragmentams padauginami skirtų pradmenų galuose įvesti EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazių atpažinimo taikiniai, analogiškai sukonstruoti ir kitų baltymų raiškos vektoriai.

HBc genas, kurio 181 pozicijoje esantis serinas pakeistas alaninu, gautas panaudojus PGR ir pradmenis 2H1 bei CCS2A; 183 pozicijoje esantis cisteinas pakeistas alaninu panaudojus pradmenis 2H1 ir CCC0A; 144-183 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys CCD1 ir 2H2; 1-177 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys 2H1 ir CCR2. Hibridiniai Wt-c1 ir c1-Wt genai sukonstruoti iškirpus Kpn2I ir XhoI 3' fragmentą iš vieno geno ir pakeitus jį analogišku kito geno fragmentu. HBc genas su 5 ar. iškrita Wt-5 sukonstruotas pUC57 plazmidę su įterptu wt HBc genu padauginus naudojant pradmenis CoreDD2 bei 2053 ir gautą fragmentą ligazės pagalba pavertus į žiedinę formą.

GIPC1 geno pakeitimai

GIPC1 fragmentas 124-228 gautas PGR būdu naudojant pradmenis GC1D2 ir GC1R2; 124-333 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys GC1D2 ir GC1R1; 261-333 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys GC1D1 ir GC1R2.

GIPC2 geno pakeitimai

GIPC2 98-315 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys GC2D2 ir GC2R1; 98-194 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys GC2D2 ir GC2R3; 231-315 ar.

fragmentui gauti naudoti pradmenys GC2D1 ir GC2R1.

FLJ20850 geno pakeitimai

FLJ20850 12-201 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys A1D4 ir A1R1; 12-150 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys A1D4 ir A1R2; 97-201 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys A1D2 ir A1R1; 97-150 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys A1D2 ir A1R2.

IKKy geno pakeitimai

IKKy 225-419 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys IKKD2 ir 2051; 250-419 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys IKKD3 ir 2051; 250-305 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys IKKD3 ir IKKR1; 304-419 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys IKKD4 ir 2051; 250-359 ar. fragmentui gauti naudoti pradmenys IKKD3 ir IKKR2.

2.2.8. Rekombinantinių baltymų sintezė *E.coli* ląstelėse

Transformuotos *E.coli* BL21 (DE3) ląstelės buvo auginamos 37°C temperatūroje iki optinio tankio 0,5-0,7 (bangos ilgis 600 nm) 200 ml LB terpėje su ampicilinu. Pridėjus 1mM IPTG bakterijos toliau augintos kambario temperatūroje 16 val. Po to ląstelės buvo išsodinamos centrifuguojant ir suspenduojamos 3 ml PBS (pH 7.2) su 2 mM PMSF ir 1 mM EDTA. Ląstelės suardomos pridėjus 3 g stiklo rutuliukų (0.5 mm diametro) ir 4 min. stipriai purtant 4°C temperatūroje. Gauti ląstelių ekstraktai buvo denatūruojami ir pernešami ant PVDF membranų arba vykdoma jų elektroforezė 12-15% SDS-PAA geliuose.

2.2.9. Baltymų elektroforezė PAA gelyje ir dažymas

Ruošiant mėginius NDS-PAGE elektroforetinei analizei, 10-20 µl tiriamo baltymų tirpalo (ar suspensijos) buvo sumaišoma su tokio pat tūriu elektroforezės dažo. Mėginiai 10 min. denatūruoti 95-100°C temperatūroje. Iš

skiriamosios (10–15%) ir koncentruojančios dalies sudarytame poliakrilamido gelyje elektroforezė buvo vykdoma vertikaliai esant 60 mA nuolatinės srovės stiprumui ir 200 V įtampai. Po elektroforezės poliakrilamidinis gelis buvo naudojamas imunoblotingui arba dažomas. Baltymus dažant gelis buvo įmerkiamas į vonelę su Kumasi brilantinio mėlio dažu ir švelniai kratomas 30-45 min. purtyklėje. Dažą nupylus gelis buvo užpilamas ~100 ml gelių plovimo tirpalu. Plovimas truko 1-2 val. keičiant plovimo tirpalą kas 30 min.

2.2.10. Imunoblotingas

Denatūruojančiuose poliakrilamido geliuose elektroforetiškai išfrakcionuoti baltymai pusiau sausu būdu (horizontali elektroforezė) buvo pernešami ant PVDF membranos, kuri po to blokuota blokavimo tirpalu. Membrana buvo praplaunama PBS-T, patalpinama į specialų „Biometra“ cilindrą ir užpilama 3–4 ml PBS-T tirpalu su specifiniais antikūnais. Po to cilindras su membrana buvo įstatomas į besisukantį rotorių ir inkubuojamas kambario temperatūroje. Po 2 val. membrana buvo plaunama buferiu PBS-T 2 kartus po 15 min. ir vieną kartą 5 min. Po to buvo vykdoma hibridizacija su peroksidaze konjuguotais antikūnais, specifiniais pelės, triušio ar ožkos IgG ir inkubuojama dar 1-2 val. Tada membrana buvo plaunama PBS-T dukart po 10 min. ir vieną kartą TBS. Membranos ryškinimui buvo naudoti 4-chlornaftolio tirpalas su vandenilio peroksidu arba TMB ryškalas.

2.2.11. Baltymų sąveikos nustatymas „GST ištraukimo“ metodu

Šiam metodui buvo naudojami su GST ir su HA sulieti baltymai, susintetinti *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse. 300 µl bakterijų lizato, turinčio bent 100 µg su GST sulietų baltymų, sumaišomi su 25 µl glutationo-agarozės rutuliukų ir švelniai maišomi 1 val. 4°C temperatūroje. Po to rutuliukai tris kartus plaunami 1 ml 4°C PBS (pH 7.2), užpilami 500 µl sąveikos buferio, pridedama mažiausiai 50 µg su HA sulietų baltymų ir švelniai maišoma 4 val. 4°C temperatūroje.

Rutuliukus keturis kartus praplovus 1 ml sąveikos buferio iš jų ruošiami mėginiai denatūruojantys baltymų elektroforezei. Forezė buvo vykdoma 12% arba 15% PAA geliuose, baltymai pernešami ant PVDF membranų ir sąveikaujantys baltymai aptinkami naudojant antikūnus, specifinius HA arba GST.

2.2.12. Mielių *S.cerevisiae* transformacija

Į 5 ml YPD (arba SD-DO, jeigu transformuojami jau turintys plazmidžių kamienai) terpės buvo užsėjamas reikiamas mielių kamienas ir auginamas per naktį 30°C kratytuve. Naktinė kultūra 50 kartų praskiedžiama ta pačia terpe ir inkubuojama 30°C kratytuve iki optinio tankio 0,5-0,7 (bangos ilgis 600 nm). Ląstelės buvo centrifuguojamos 2 min. 3000 aps./min. greičiu (Eppendorf 5810R centrifuga) ir praplaunamos 2 ml distiliuoto vandens. Po to ląstelės suspenduojamos TE-LiAc tirpale ir patalpinamos 1 val. 30°C termostate. Tada jos nusodinamos centrifuguojant ir suspenduojamos 400 µl TE-LiAc tirpale. Buvo imama 85-90 µl kompetentinės kultūros, pridedama 10 µl 96% etanolio, 0,1-1 µg plazmidinės DNR, 50 µg viengrandės DNR ir 30 min. inkubuojama 30°C termostate. Po to buvo pridedama 300 µl 50% TE-PEG, 1 val. laikoma 30°C termostate ir 20-25 min. perkeliama į 42°C temperatūros vandens vonią. Ląstelės nusodinamos centrifuguojant, suspenduojamos vandenyje ir išsėjamos į lėkšteles su reikiama SD-DO terpe.

Mielės buvo transformuojamos ir greituoju būdu. Šiame metode naudojami visi aukščiau aprašyti tirpalai ir atliekamos tokios pačios procedūros, tik transformuojamos mielės auginamos ne skystoje terpėje, o nugraibomos nuo iš vakaro užsėtų lėkštelių.

2.2.13. Mielių dviejų hibridų metodas ir *MATCHMAKER LexA* sistema

Dviejų hibridų metodas, sukurtas Stanley Fields ir bendradarbių [33] yra mielių genetinis tyrimas, siekiant nustatyti baltymų tarpusavio sąveikas *in*

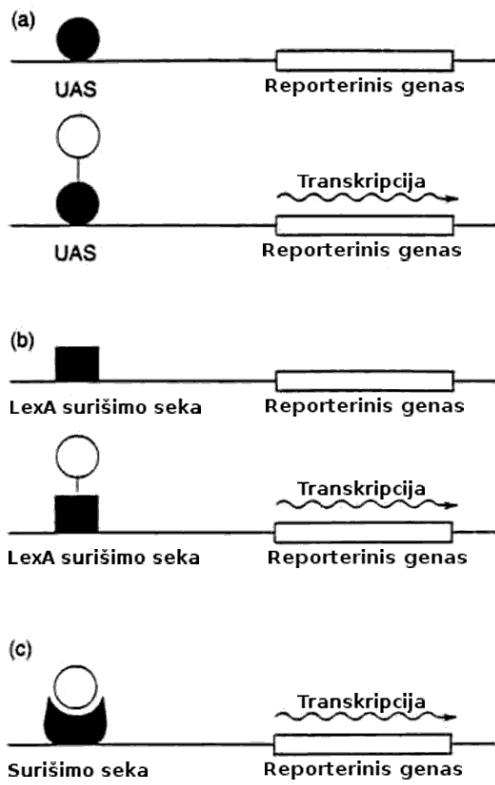
vivo. Šis metodas turi kai kurių pranašumų, lyginant su kitais baltymų tarpusavio sąveikos tyrimo metodais (baltymų afinine chromatografija, imunoprecipitacija, baltymų kovalentiniu surišimu ir kt.). Dviejų hibridų metodu galima ne tik nustatyti sąveikaujančius baltymus, bet ir atrinkti klonuotus tokių baltymų genus. Be to, šiuo metodu galima aptikti ir silpnas bei trumpalaikes baltymų sąveikas, būdingas dideliems ląstelės baltymų kompleksams. Dviejų hibridų sistemoje nereikia tiriamų baltymų išgryninti ir nebūtini antikūnai prieš juos. Kadangi tyrimas atliekamas *in vivo*, yra didesnė tikimybė, kad tiriami baltymai bus savo natūralioje konformacijoje. Dviejų hibridų metodu galima tirti dviejų žinomų baltymų tarpusavio sąveiką arba ieškoti baltymų, sąveikaujančių su tiriamuoju.

Daugelis eukariotinių transkripcijos reguliatorių yra sudaryti iš fiziškai atskiriamų, funkciškai nepriklausomų domenų. Tokie reguliatoriai turi DNR surišantį domeną (DNA-BD – binding domain), kuris rišasi su specifine promotoriaus seka, ir aktyvuojantį domeną (AD – activating domain), kuris sąveikauja su RNR polimerazės II kompleksu, nukreipdamas jį šalia esančio geno nuskaitymui [70]. Abu genų aktyvavimui reikalingi domenai visada yra viename polipeptide. Pavyzdžiu gali būti mielių GAL4 transkripcijos veiksnys. Naudojant genų inžinerijos metodus, šiuos domenų galima fiziškai atskirti ir nepriklausomai sintetinti vienoje ląstelėje. Fiziškai atskirti DNA-BD ir AD peptidai tiesiogiai nesąveikauja tarpusavyje ir transkripcijos neaktyvuoja, nors DNA-DB domenas ir susiriša su promotoriumi. Tačiau jeigu AD peptidas kokiu nors būdu prijungiamas prie DNA-BD peptido, susiformavęs kompleksas sugeba aktyvuoti transkripciją. Eksperimentai parodė, kad bet kuris AD domenas gali būti suporuotas su bet kuriuo DNA-BD domenu ir aktyvuoti geno, prie kurio rišasi DNA-BD domenas, transkripciją (**9 pav.**).

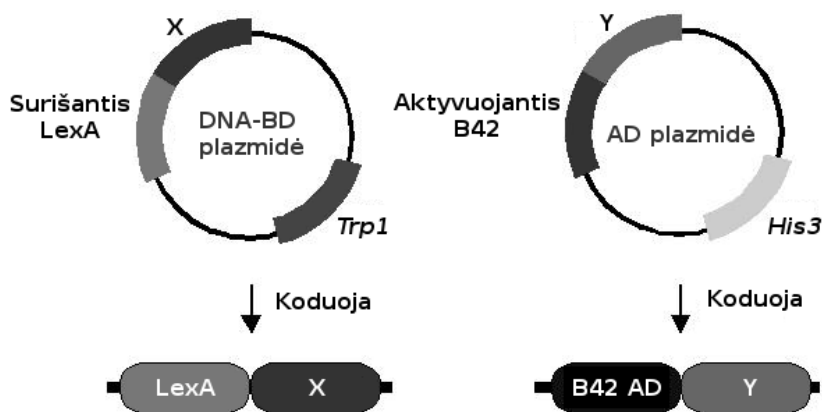
Dviejų hibridų sistemoje BD vektorius naudojamas BD domeno ir baltymo X (“masalo”) sulieto baltymo konstravimui, o vektorius AD – domeno AD prijungimui prie baltymo Y (“grobio”) (**10 pav.**). Gali būti sukonstruota visa sulietų su AD genų biblioteka, skirta naujų, dar nežinomų baltymų,

sąveikaujančių su “masalu”, paieškai. Įvykus sąveikai tarp “masalo” X ir baltymo Y, du funkciniai domenai, atsakingi už DNR surišimą ir transkripcijos aktyvavimą, atsiduria vienas šalia kito ir atkurama geno aktyvavimo funkcija. Kai šie hibridai sintetinami mielių ląstelėse, jau turinčiose patogius reporterinius genus (pvz. *LacZ* ir *LEU2*), prieš kurių promotorius įterptos DNA-BD domeno surišamos sekos, reporterinių genų raiška parodo sąveiką tarp “masalo” ir kito hibridinio baltymo (**11 pav.**).

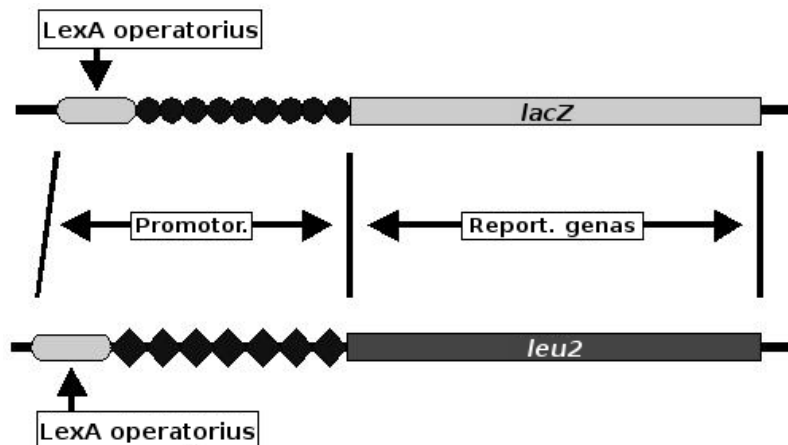
Projekte naudojamoje komercinėje *MATCHMAKER LexA* dviejų hibridų sistemoje BD domenas paimtas iš prokariotinio LexA baltymo, kurio įprastinė funkcija yra SOS genų represija *E.coli* ląstelėse sąveikaujant su LexA operatoriaus seka. AD domenas yra rūgštinis peptidas B42, aktyvuojantis transkripciją mielėse. Šioje sistemoje naudojami du skirtingi klonavimo vektoriai pLexA ir pB42AD, skirti genų, koduojančių potencialiai sąveikaujančius tarpusavyje baltymus, suliejimui su minėtais domenais ir tolesnei hibridinių baltymų sintezei mielėse (**12 pav.**). Sulieto su BD domenu ir sulieto su AD domenu baltymų sąveika aktyvuoja reporterinių genų, savo promotoriuje turinčių LexA operatoriaus sekas, transkripciją. Tokiu būdu baltymų sąveika ląstelei suteikia naują fenotipinį požymį – aktyvuojama lengvai aptinkama geno raiška. Jeigu du hibridiniai baltymai nesąveikauja vienas su kitu, reporterinių genų raiška nevyksta ir mielių ląstelės neįgauna naujų fenotipinių požymių. *MATCHMAKER LexA* sistema naudoja du skirtingus reporterinius genus *LEU2* ir *lacZ*, reguliuojamus keleto LexA operatorių. Jeigu mielių ląstelėse sintetinami hibridiniai baltymai sąveikauja, integruotas į *Leu*-auksotrofinio mielių kamieno EGY48 genomą reporterinis *LEU2* genas tampa aktyvus ir leidžia joms augti SD-DO indukuojančioje terpėje be leucino. Dėl plazmidėje p8op-*lacZ* esančio reporterinio *lacZ* geno raiškos tokiose ląstelėse sintetinamas fermentas beta-galaktozidazė, kurios aktyvumas gali būti stebimas keliais skirtingais būdais. Matuojant šio fermento aktyvumą, galima gauti kiekybinį įvertinimą, kuris leidžia palyginti kelių hibridų porų sąveikos santykinį stiprumą.



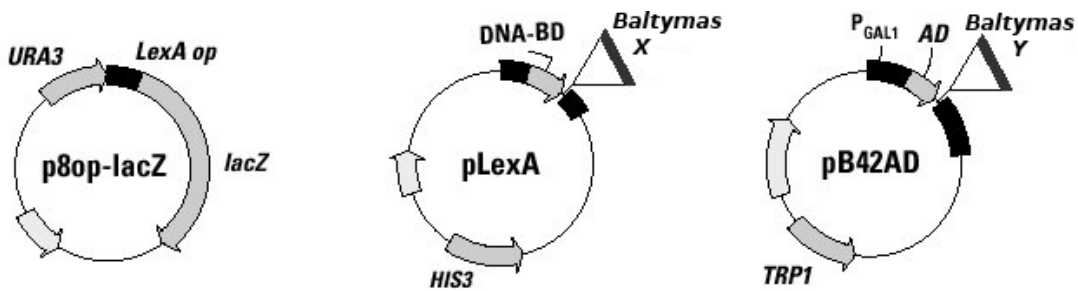
9 pav. Transkripcijos aktyvatorių domeninė struktūra. Transkripcijos aktyvatorių galima atkurti sujungus skirtingų baltymų domenus (a, b), taip pat ir iš nekovalentiškai sujungtų, tačiau tarpusavyje sąveikaujančių domenų (c).



10 pav. DNA-BD ir AD plazmidžių pavyzdžiai su sukonstruotais sulietais baltymais



11 pav. Reporterinių genų struktūra.



12 pav. Plazmidės, naudojamos MATCHMAKER LexA dviejų hibridų sistemoje.

2.2.14. Sąveikaujančių baltymų atranka naudojant mielių dviejų hibridų metodą

Viena šviežia *S.cerevisiae* EGY48 mielių kamieno kolonija, transformuota plazmidėmis p8op-lacZ ir pLexA su tiriamu sulietu genu, buvo užsėta į 150 ml SD-DO/+Trp/+Leu terpės ir kratoma 250 aps./min. 30°C temperatūroje per nakt. 100 ml naktinės kultūros praskiesta 1 l SD-DO/+Trp/+Leu terpės ir kratoma 30°C temperatūroje iki optinio tankio ~0,5 (bangos ilgis 600 nm). Ląstelės išsodintos centrifuguojant, praplautos steriliu vandeniu, suspenduotos 8 ml TE-LiAc tirpalo ir laikytos 60 min. 30°C temperatūroje. Po to pridėta 0.5 mg plazmidinės kDNR bibliotekos, 20 mg viengrandės DNR, ląstelės palaikytos 30 min 30°C temperatūroje, pridėta 60 ml TE-PEG ir mišinys inkubuotas 45 min 30°C temperatūroje. Šiluminis šokas atliktas 25 min. 42°C vandens vonioje ir ląstelės išsėtos į lėkšteles su SD-DO/Gal terpe. Po 3-5 parų inkubacijos 30°C išaugusios kolonijos buvo perkeltos į lėkšteles su SD-DO/Gal/Leu/X-gal terpe. Po paros atrinktos mėlynos kolonijos ir nuo jų vykdoma PGR panaudojant pradmenis ADdir ir ADrev. Padauginti fragmentai hidrolizuoti keturių nukleotidų seką atpažįstančiomis restrikcijos endonukleazėmis HpaII bei RsaI, ir pagal gautų restrikcijos fragmentų “piešinių” kolonijos suskirstytos į grupes, turinčias identiškų kDNR intarpus. Iš kiekvienos grupės kolonijų buvo išskirta plazmidinė DNR ir transformuota į *E.coli* kamieną KC8. Kadangi atrinktos mielės turėjo tris skirtingas plazmides, transformuotos bakterijos išsėtos ant M9 terpės su ampicilinu, kanamicinu ir amino rūgščių mišiniu, bet be triptofano – tokiu būdu atrinktos kolonijos, turinčios pB42AD plazmides su kDNR intarpais. Iš transformuotų bakterijų

kolonijų išskirta plazmidinė DNR ir nustatytos jose esančių kDNR sekos.

2.2.15. Reporterinių genų raiškos įvertinimas

Aštuonios *S.cerevisiae* EGY48 mielių kolonijos, transformuojamos reporterine plazmide p8op-lacZ ir tuo pačiu dviejų hibridų sistemos plazmidžių deriniu, atskirais taškeliais užsėjamos į lėkšteles su SD-DO terpe, pernakt inkubuojamos 30°C temperatūroje ir paraleliai perkeliamos ant terpių SD-DO/Gal/Leu/X-gal bei SD-DO/Gal. Po 24-48 val. inkubacijos 30°C temperatūroje analizuojama reporterinių genų raiška. Terpėje be leucino auga tik mielių kolonijos su sąveikaujančiais dviejų hibridų sistemos baltymais, o terpėje su X-gal tokios kolonijos nusidažo mėlynai. Pagal kolonijų dydį ar spalvos intensyvumą galima spręsti ir apie baltymų sąveikos stiprumą.

Kai kuriais atvejais buvo vykdomas ir kiekybinis vieno iš reporterinių genų – β -galaktozidazės – įvertinimas. Tuo tikslu transformuotos mielės auginamos indukuojančioje terpėje (SD-DO/Gal), praplaunamos distiliuotu vandeniu, suspenduojamos 300 μ l mielių ardymo tirpalo, užšaldomos skystame azote ir suardomos kratant su stiklo rutuliukais. Į 100 μ l lizato įpilama 700 μ l mielių ardymo tirpalo, 160 μ l ONPG tirpalo, o išryškėjus geltonai spalvai reakcija stabdoma pridedant 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ tirpalo. Fiksuojamas kiekvieno mėginio inkubavimo su ONPG tirpalu laikas ir optinis tankis (bangos ilgis 420 nm). Rezultatai, patenkantys į linijinio optinio tankio didėjimo ribas, išreiškiami ONPG mikromoliais, kuriuos hidrolizuoja 1 mg ląstelės baltymo per minutę. Siekiant užtikrinti kuo geresnį rezultatų patikimumą, tiriamos keturios skirtingos tomis pačiomis plazmidėmis transformuotos mielių kolonijos, kiekviena tris kartus.

2.2.16. NF- κ B aktyvumo nustatymas matuojant CAT aktyvumą

Granulocitų-monocitų pirmtakų ląstelių linija HL-60 buvo auginama skystoje RPMI 1640 terpėje su 10% jaučio vaisiaus serumo esant 37°C, 5% CO₂ ir aukštai drėgmei. pRR55 plazmidė, kurioje CAT genas sulietas su ŽCMV

ankstyvuoju promotoriumi, ir plazmidės HBc genų raiškai transfekuotos naudojant DEAE dekstrano metodą [104]. Į dalį ląstelių 2 h prieš ardant buvo pridėta 5 ng/ml TNF- α . Ląstelės surinktos centrifuguojant, suardytos daugkartinio užšaldymo-atšildymo būdu, nustatytas mėginiuose esantis baltymo kiekis. Vienodas kiekvieno mėginio baltymo kiekis buvo naudojamas CAT aktyvumo nustatymui. Ląstelių lizatai inkubuoti su [14C]chloramfenikolu, o acetilintų produktų kiekis nustatytas skaitikliu, mėginius išskleidus plonasluoksnės chromatografijos būdu.

2.2.17. NF- κ B aktyvumo nustatymas EMSA metodu

Žmogaus kepenų ląstelių linija Huh7 transfekuota HBc genų raiškai skirtomis plazmidėmis naudojant *Effectene (Qiagen)* arba *ExGen 500 (Fermentas)* transfekcijos reagentus. Ląstelės parą augintos 6 cm skersmens lėkštelėse, 2 h iki suardymo į dalį kiekvienos grupės ląstelių pridėta 5 ng/mL TNF- α . Po to ląstelės surinktos, praplautos lediniu PBS, suspenduotos 1,5 ml buferio A ir 15 min. laikomos lede. Į mėginį įlašinta 80 μ L buferio A su 10% *Triton X* ir purtoma 5 min. Centrifugavimo būdu surinktos tąsios nuosėdos, praplautos 2-3 mL buferio A ir suspenduotos 100 μ L buferio B. Po 30 min. purtymo 0-4 $^{\circ}$ C branduolių baltymų ekstraktas atskirtas centrifuguojant. Į kiekvieną mėginį su 10 μ g branduolio baltymų ekstrakto pridėta 20 μ L EMSA reakcijos tirpalo su 1,2 μ g poly(dI-dC) ir 0,5-1 ng P^{32} žymėtos DNR, sudarytos iš oligonukleotidų oNF κ B1 ir oNF κ B2. Mėginiai 20 min. inkubuoti kambario temperatūroje ir reakcijos produktai atskirti 5% nedenatūruojančiame PAA gelyje TBE buferyje.

2.2.18. Bioinformatinė analizė

Sukonstruotų plazmidžių ir kDNR intarpų sekos buvo tiriamos Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre naudojant *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* reagentų rinkinį ir *Gene Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, JAV)* genų analizatorių. DNR ir nuspėtų amino rūgščių sekų

homologijos paieškos atliktos naudojantis NCBI BLAST žiniatinklio serverio paslaugomis. Baltymų motyvų paieškos atliktos naudojantis EMBL SMART ir *Welcome Trust Sanger* instituto PFAM žiniatinklio tarnybų paslaugomis. Egzonų ir intronų struktūrų nuspėjimas genomo sekose atliktas naudojant MIT (Masačiusetso technologijų institutas) GENSCAN serverį. Baltymų spiralinių sričių nuspėjimas atliktas *Coil* serveryje, o daugelio baltymų palyginys atliktas *TCofee* serveryje, abi paslaugas teikia Šveicarijos bioinformatikos institutas.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. HBV šerdies baltymų ir jų mutantinių formų sąveika mielių dviejų hibridų sistemoje

Hepatito B viruso infekcija gali sukelti įvairaus sunkumo negalavimus – nuo besimptomės infekcijos iki aštraus, fulminantinio hepatito arba lėtinės infekcijos su galimu kepenų cirozės ar vėžio išsivystymu. Manoma, kad pagrindinį vaidmenį HBV patogenezėje atlieka šeimininko imuninis atsakas [20]. Eksperimentuojant su HBV užkrėsta transgenine pele nustatyta, kad virusas iš organizmo gali būti pašalinamas necitopatiniu, citokinų valdomu procesų būdu [41]. Nors laukinio tipo HBV tiesiogiai nekenkia kepenų ląstelėms, HBV mutantai, turintys pakitusius struktūrinius genus, gali tai daryti. Parodyta, kad HBV mutantai, turintys iškritas centrinėje šerdies (core) geno dalyje, gali kauptis inkstų persodinimą patyrusių ir dėl to imunosupresuojamų pacientų organizmuose. Daugeliui pacientų, kurių organizmuose šie mutantai išlieka 1-2 metus, išsivysto greitai progresuojanti kepenų liga [42]. Nors minėti mutantai gali sudaryti iki 90% visų virusų [92], pacientų organizmuose visada aptinkamas ir natyvus HBV [9, 53]. Tokie mutantai nesugeba savarankiškai daugintis, bet prarastą replikacijos sugebėjimą eksperimentinėse sistemose atstato ląstelėje esantis wt virusas arba plazmidė, nuo kurios sintetinamas sveikas Hbc baltymas [43, 53, 73, 84]. Remiantis šiais duomenimis iškelta prielaida, kad natyvus HBV kompensuoja mutantinių virusų nesugebėjimą formuoti šerdies daleles ir tokiu būdu leidžia jiems daugintis. Siekiant patikrinti šią prielaidą, reikia nustatyti ar mutantiniai šerdies baltymai sugeba savarankiškai formuoti daleles. Taip pat pastebėta, kad tokių mutantų kaupimasis susijęs su wt viruso replikacijos slopinimu [52, 74]. Nustatyta, kad mutantinius Hbc baltymus greitai degraduoja žmogaus ląstelių proteasomos [13], todėl natyvaus viruso replikaciją galėtų slopinti mutantinių baltymų gebėjimas sąveikauti su wt Hbc baltymu. Dėl tokios

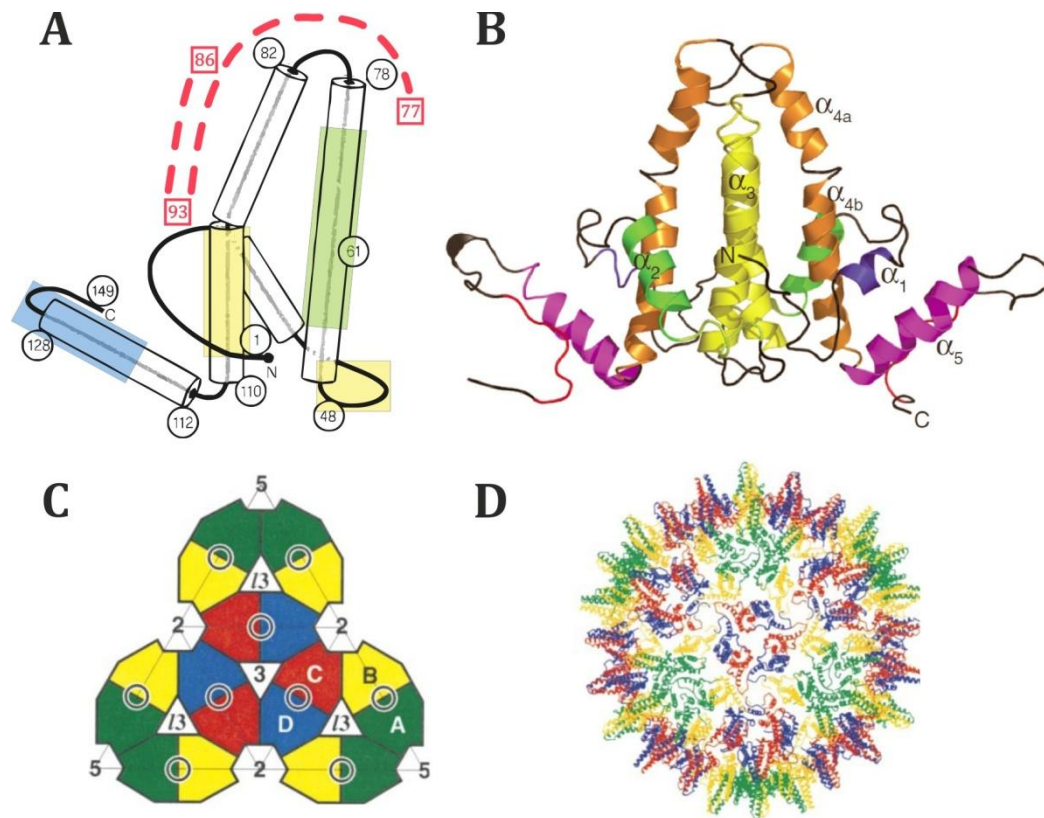
sąveikos galėtų formuotis netaisyklingos ar greitai degraduojamos mozaikinės dalelės. Norint patikrinti šią prielaidą, reikia nustatyti ar mutantiniai šerdies baltymai sugeba formuoti daleles kartu su nepakitusiais baltymais.

Lentelė 13. Tirti HBV mutantai

Mutantas	HBc1	HBc2	HBc3	HBc4	HBc5	HBc6	HBc7
Iškrita	86-93	77-93	82-111	75-95	45-46, 86-93	85-93, 102-113	45-51
Diagnozė	GSKL	GSKL	GSKL	GSKL	GSKL	LH	GSKL

Sutrumpinimai: GSKL – Galutinės stadijos kepenų liga, LH – lėtinis hepatitas; nurodytos trūkstumų amino rūgščių pozicijos mutantiniuose baltymuose.

Šiame darbe buvo tiriama aštuoni Vokietijoje išskirti HBV mutantai, turintys įvairaus dydžio šerdies geno iškritas [90]. Mutantų aprašymai pateikti lentelėje (13 lentelė). Norint suprasti, kaip šios iškritos gali paveikti mutantinių baltymų struktūrą ir funkcijas, naudinga panagrinėti natyvaus HBc struktūrą. HBV šerdies baltymas yra 183-185 ar. polipeptidas, turintis du domenų – šerdies domeną (1–140 ar.) ir „protamino“ domeną (150–183 ar.). Tarp šių domenų yra jungiamasis polipeptidas (141–149 ar.). Šerdies domenai geba formuoti kapsides, o trumpesnis nei 138 ar. baltymas šį gebėjimą praranda [8, 75, 112]. Manoma, kad protamino domenai, kuriame yra daug arginino, ir kuris beveik visuose struktūros modeliuose yra dalelės viduje, suriša viruso genomą. Bet šiuo metu sukaupta pakankamai įrodymų, kad C-galas yra labai dinamiškas ir kartais būna kapsidės paviršiuje [46]. Toks mobilumas šerdies baltymui gali padėti atlikti daugybę funkcijų įvairiose viruso dauginimosi stadijose. Sintetinamas *E.coli* ląstelėse HBc baltymas formuoja dimerus, po to iš 90 arba 120 dimerų susirenka ikosaedrinės dalelės, kurių trianguliacijos skaičius atitinkamai $T = 3$ arba $T = 4$ [23] (13 pav.). HBc baltymas be C-galo žymiai geriau sintetinamas *E.coli* ląstelėse, todėl struktūriniai tyrimai atlikti naudojant iš sutrumpinto baltymo sudarytas $T = 4$ kapsides.



13 pav. Hepatito B viruso šerdies baltymo ir jo sudaromų dalelių struktūra. A. 149 ar. ilgio HBc baltymo struktūra. Cilindrai žymi α -spirales. Apskritimuose esantys skaičiai žymi svarbių ar. pozicijas – N- ir C- galus, α -spiralių ribas ir Cys61, dalyvaujantį dimerinės jungties susidaryme. Raudonais brūkšneliais pažymėtos dviejų išsamiausiai darbe tirtų mutantų iškritos. Nuspalvintos sritys: geltonos – būtinos baltymo erdvinės struktūros formavimui; žalia – dalyvauja dimerų formavime; mėlyna – reikalinga sąveikai tarp dimerų. Pagal Bottcher ir kt. [11]. **B.** HBc 1-149 dimero struktūra. Skirtingomis spalvomis paryškintų α -spiralių ribos: α_1 (13–17), α_2 (27–43), α_3 (50–73), α_{4A} (79–90), α_{4B} (92–110) ir α_5 (112–127). Pagal Freund ir kt. [36]. **C.** Schematinis subvienetų išsidėstymo pavaizdavimas T = 4 kapsidėje. Struktūrų iš keturių subvienetų centrai pažymėti apskritimais. Parodyta viena ikosaedro trikampė plokštelė. **D.** Visos T = 4 kapsidės schema. Pagal Wynne ir kt. [124].

Kaip matoma iš lentelės (13 lentelė) ir paveikslėlio (13 pav.), mutantų HBc3, HBc6, HBc7 ir iš dalies HBc4 bei HBc5 iškritos apima sritis, svarbias baltymo erdvinės struktūros formavimuisi. Kitos iškritos iš esmės nepaliečia nei sričių, reikalingų dimerų formavimuisi, nei sričių, reikalingų dimerų tarpusavio sąveikai bei dalelių formavimuisi. Nepaisant to, išlieka galimybė, kad šios iškritos gali pakeisti baltymų struktūrą tiek, kad jie prarastų gebėjimą sudaryti dimerus ar kapsides. Taip pat negalima atmesti galimybės, kad mutantai, turintys iškritas srityse, reikalingose teisingos erdvinės struktūros formavimuisi, gali ir toliau sąveikauti su laukinio tipo baltymais ar vienas su kitu. Tokią galimybę padidina ir nepažeista dimerų formavimuisi reikalinga α_3

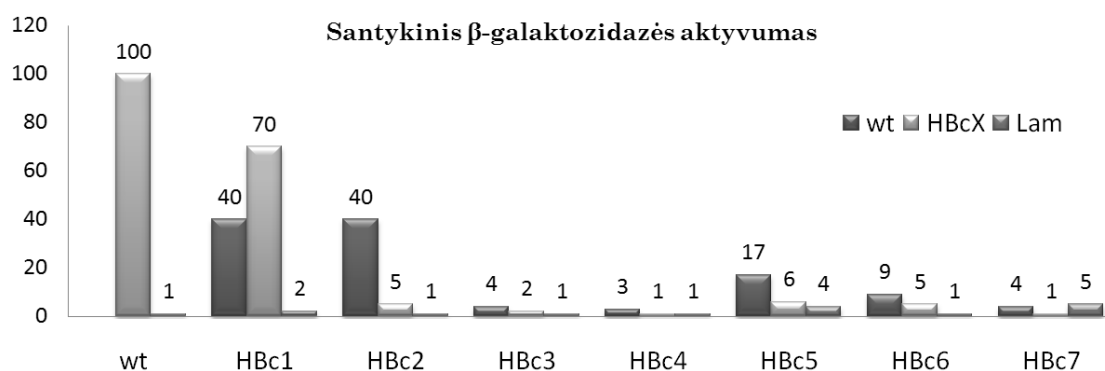
spiralė. Tad į klausimą, kurie mutantai sąveikauja su laukinio tipo baltymais, o kurie ne, gali atsakyti tik atliktų eksperimentų rezultatai.

Mutantinių baltymų tarpusavio sąveikai tirti panaudota mielių dviejų-hibridų sistema. Šios sistemos pagalba kiekybiškai įvertinta laukinio tipo ir mutuočių šerdies baltymų tarpusavio sąveika. Wt-wt aktyvumas prilygintas 100%, o kitos reikšmės pateiktos tokio standartinio aktyvumo procentais. Siekiant įsitikinti, kad hibridiniai HBc baltymai pavieniui neaktyvuoja reporterinių genų ir sąveikauja specifiskai, buvo panaudotos kontrolinės plazmidės pLexA-Lam – joje žmogaus lamino C baltymo genas sulietas su plazmidėje pLexA esančiu DNR surišančiu domenu (transformuota kartu su HBc genais, esančiais plazmidėje pB42AD) ir pB42AD-T – joje SV40 viruso antigenas T sulietas su plazmidėje pB42AD esančiu DNR transkripcijos aktyvavimo domenu (transformuota kartu su HBc genais, esančiais plazmidėje pLexA). Įvairių HBc atmainų sąveikos indukuoto β -galaktozidazės aktyvumo reikšmės pateikiamos diagramoje (**14 pav.**).

Iš šių eksperimentų rezultatų galima spręsti, kad su wt HBc baltymu sąveikauja mutantai HBc1 ir HBc2, daug silpniau sąveikauja ir mutantai HBc5 bei HBc6. Šie rezultatai paremia prielaidą, kad kai kurios mutantinės HBc atmainos gali slopinti wt viruso dauginimąsi, sąveikaudamos su wt HBc baltymais. Tokią galimybę paremia ir duomenys, kad mutantinių virusų genomuose pasitaikančios C geno promotoriaus mutacijos kompensuoja mutantinių C genų vykdomą wt virusų slopinimą [74]. Taip pat nustatyta, kad beveik visi mutantiniai baltymai (išskyrus HBc1) nesugeba sąveikauti vieni su kitais, taigi, neturėtų formuoti ir dalelių. Šie rezultatai atitinka prielaidą, teigiančią, kad dauguma mutantinių HBV virusų nesugeba daugintis be natyvių virusų pagalbos todėl, kad jų šerdies baltymai nesugeba suformuoti pilnaverčių dalelių.

Gauti duomenys rodo, kad šerdies baltymo mutantai HBc1 gana stipriai sąveikauja tarpusavyje bei su natyviu šerdies baltymu ir tikėtina, kad jie gali susirinkti į daleles patys bei sudaryti chimerines daleles su natyviu baltymu.

Mutantai HBc2 daug stipriau sąveikauja su natyviu šerdies baltymu nei tarpusavyje, todėl tikėtina, kad jie sudaro tik chimerines daleles su natyviu HBc. Šių HBc mutantų savybės tyrinėtos ir bakterijų bei žmogaus ląstelėse. Sintetinant tas pačias HBc atmainas *E.coli* ląstelėse nustatyta, kad daleles gali formuoti tik HBc1 mutantas, o mutantas HBc2 įgauna silpną dalelių formavimo aktyvumą tik tada, kai sintetinama sutrumpinta jo forma. Abu šie mutantai gali formuoti mozaikines daleles kartu su wt baltymu [59, 90-91]. Taigi, mielių dviejų hibridų eksperimentų rezultatai visiškai atitinka tų pačių baltymų sintezės bakterijose rezultatus. Toks rezultatų atitikimas ir tai, kad kontroliniai baltymai nesąveikauja nė su vienu HBc baltymu, parodė, kad mielių dviejų hibridų sistema yra tinkamas metodas tirti HBc baltymų ir jų mutantinių formų sąveikas. Tolesnis uždavinys buvo bandyti išaiškinti ląstelės komponentus – mutantinių virusinių baltymų taikinius.



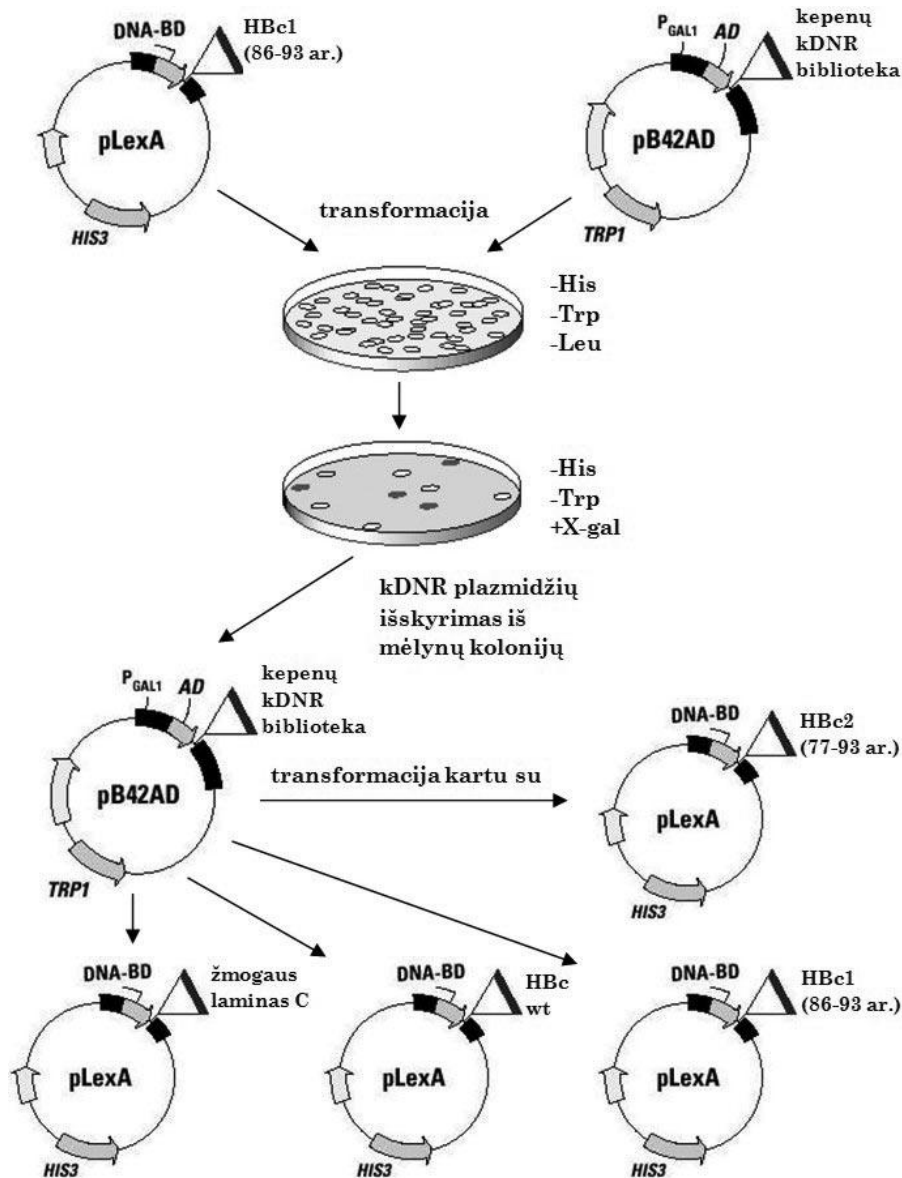
14 pav. Mutantinių HBc baltymų sąveika tarpusavyje ir su wt baltymu. Pateiktas visų tirtų mutantinių HBc baltymų sąveikos su natyviu HBc (wt), tokiu pat mutantu (HBcX) ir kontroliniu žmogaus lamino (Lam) baltymu kiekybinis įvertinimas. Dviejų wt HBc baltymų sąveikos indukuojamas β -galaktozidazės aktyvumas buvo laikomas standartiniu, o visi kiti aktyvumai pateikti standartinio aktyvumo procentais.

3.2. Žmogaus baltymų, sąveikaujančių su HBV šerdies baltymais ir jų mutantinėmis formomis, paieška

Kaip jau minėta, HBV virusai paprastai nesuardo žmogaus kepenų ląstelių, o kepenys dažniausiai pažeidžiami dėl imuninės sistemos atakos prieš virusą. Tačiau imunosupresuotiems pacientams, kurių organizmuose aptikti tiriami mutantiniai virusai, per trumpą laiką išsivystė sunkios hepatito formos, nors jų

imunitetas ir buvo slopinamas. Nustačius šių virusų pirminę nukleotidų seką, paaiškėjo, kad pagrindiniai pakitimai (išskritos) yra šių virusų šerdies gene [42, 72]. Tuo remiantis iškelta hipotezė, kad citopatinius efektus ligonių hepatocituose sukelia būtent pakitę šerdies baltymai. Bet iki šiol neaišku, kaip mutantiniai HBc baltymai sukelia kepenų ligos paūmėjimą. Vienas iš būdų galėtų būti tiesioginis šių HBc mutantų citotoksiškumas. Įprastinės patologinės sąveikos paprastai padeda susilpninti šeimininko antivirusinį atsaką ar pasinaudoti šeimininko ląstelės ištekiais, reikalingais viruso dauginimuisi užtikrinti. Bet smarkiai mutavusių, normaliomis sąlygomis savarankiškai nesugebančių daugintis virusų baltymai galėtų sąveikauti su viruso dauginimuisi nesusijusiais baltymais ir tokiu būdu sukelti nelauktos žalos šeimininko ląstelėms. Nustačius, su kuriais hepatocitų baltymais sąveikauja mutantiniai HBc baltymai, galėtų paaiškėti mutantinių virusų patogenezės mechanizmai, o atrastos sąveikos ilgainiui galėtų tarnauti taikniais kuriant naujus vaistus ir gydymo būdus.

Mutantinių HBc ir žmogaus baltymų sąveikų aptikimui buvo panaudota mielių dviejų hibridų sistema. Mielės, turinčios dviejų hibridų plazmidės reporterinių genų raiškai (p8op-lacZ) ir sulieto su *lexA* HBc1 baltymo raiškai (pLexA-HBc1), transformuotos žmogaus kepenų kDNR biblioteka, sulieto su B42 domenu plazmidėje pB42AD. Beveik trys milijonai transformuotų ląstelių išsėti į lėkšteles su mielių terpe be leucino, o išaugusios kolonijos perkeltos ant terpės, spalviškai išryškinančios β -galaktozidazės sintezę. Abu reporteriniai genai buvo aktyvūs daugiau nei šimte kolonijų. Tokiose kolonijose esantys kDNR fragmentai padauginėti PGR būdu ir hidrolizuoti restrikcijos endonukleazėmis *RsaI* ir *HpaII*. Pagal restrikcijos fragmentų piešinį visos kolonijos buvo suskirstytos į grupes, turinčias identišką kDNR. Po to iš kiekvienos grupės kolonijų buvo išskirtos pB42AD plazmidės, turinčios hepatocitų kDNR intarpą, ir vėl transformuotos į mielių kamieną EGY48 su plazmidėmis p8op-lacZ ir pLexA-H1 siekiant patvirtinti, kad būtent šių plazmidžių dėka aktyvuojama reporterinių genų raiška.

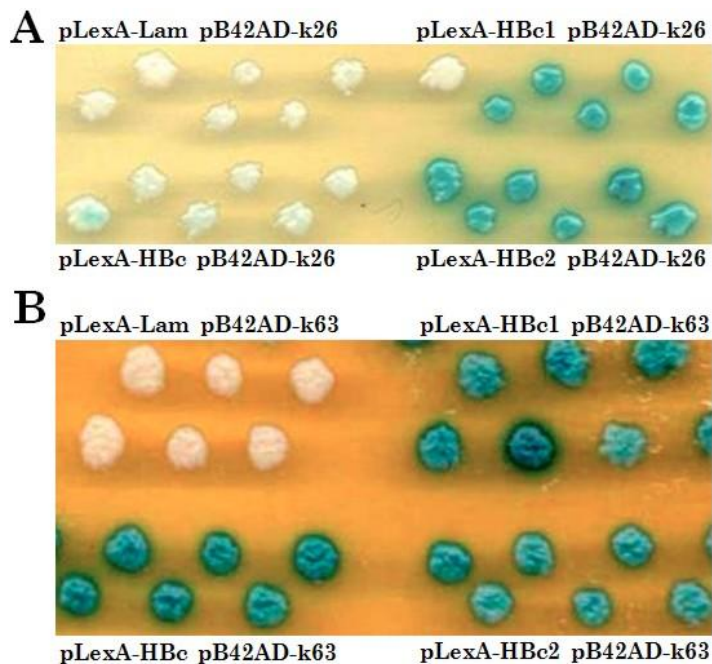


15 pav. Su HBc baltymais sąveikaujančių žmogaus baltymų atrankos schema.

Paraleliai šios plazmidės transformuotos į mielių EGY48 kamieną, turintį plazmidės p8op-lacZ ir pLexA-Lam, siekiant patikrinti, ar reporterinių genų raiška indukuojama specifiskai. Bibliotekos plazmidės, klaidingai ar silpnai indukavusios reporterinių genų raišką, toliau tyrinėjamos nebuvo.

Antrame atrankos etape buvo tikrinamas pirmame etape atrinktų kDNR klonų koduojamų baltymų gebėjimas sąveikauti su laukinio tipo HBc. Iš daugiau kaip 50 pirmame etape atrinktų kDNR, apie 20 indukavo reporterinius genus ir transformuotos kartu su wt HBc. Su HBc baltymais sąveikaujančių žmogaus baltymų atranka pavaizduota schemoje (15 pav.). Nustatyta, kad visos kDNR,

kurios reporterinius genus aktyvavo kartu su mutantu HBc1, juos aktyvavo ir transformuotos kartu su didesnę iškritą turinčiu mutantu HBc2. Tokiu būdu visos atrinktos žmogaus kDNR suskirstytos į dvi grupes – tos, kurių produktai sąveikauja tik su mutantiniais HBc ir tos, kurių produktai sąveikauja tiek su mutantiniais, tiek ir su natyviu HBc (**16 pav.**).



16 pav. Dvi atrinktų žmogaus kDNR klonų grupės. A. Žmogaus kDNR klonas, kurio koduojamas baltymas sąveikauja tik su mutantiniais HBc baltymais. **B.** Žmogaus kDNR klonas, kurio koduojamas baltymas sąveikauja ir su mutantiniais, ir su laukinio tipo HBc baltymais. pLexA-Lam, pLexA-HBc, pLexA-HBc1 ir pLexA-HBc2 – pLexA plazmidės, kuriose lexA domenas sulietas atitinkamai su žmogaus lamino C baltymu, HBc wt baltymu, mutantais HBc1 (86-93 ar. iškrita) ir HBc2 (77-93 ar. iškrita). pB42AD-k26 ir pB42AD-k63 – skirtingi žmogaus kDNR fragmentai, sulieti su b42 domenu plazmidėje pB42AD.

Buvo nustatyta visų atrinktų plazmidžių kDNR intarpų nukleotidų sekos. Gautas sekas NCBI BLAST serverio pagalba palyginus su genų bankuose esančiomis sekomis nustatyta, kad su mutantiniais ir su laukinio tipo HBc baltymais sąveikavo GIPC1, GIPC2, ribosominis baltymas L5 ir fibrinogeno polipeptidai alfa bei gama (**14 lentelė**). Tik su mutantiniais HBc baltymais sąveikavo įvairūs motoriniai ir reguliaciniai baltymai: kinezinų šeimos narys 13A, NOTCH2NL, fumarato hidratazė, IKK γ /NEMO ir nežinomos funkcijos baltymai CASKIN2 bei FLJ20850 (**15 lentelė**).

Lentelė 14. Žmogaus baltymai, sąveikaujantys ir su mutantiniais, ir su wt HBc baltymais

Baltymas	kDNR pilnumas	Aprašymas
GIPC1	N-gale trūksta 60 ar., C-galas pilnas, viso 273 ar. Nustatytos dviejų skirtingų kDNR sekos.	Baltymas, susiejantis kitus baltymus su miozino VI judėjimu išilgai aktino skaidulų. Detalesni šio baltymo tyrimai ir aprašymas pateikti žemiau.
GIPC2	N-gale trūksta 48 ar., C-galas pilnas, viso 267 ar. Nustatyta vienos kDNR seka.	Funkcija nežinoma, homologiškas GIPC1. Detalesni šio baltymo tyrimai pateikti žemiau.
RPL5	N-gale trūksta apie 100 ar., C-galas pilnas, iš viso 181 ar. Nustatytos dviejų skirtingų kDNR sekos.	L5 baltymas yra pagrindinis 5S ribosominės RNR transporto iš branduolio komponentas. Nustatyta, kad jis sąveikauja su eukariotų translacijos iniciacijos veiksniu 5A, kuris savo ruožtu sąveikauja su ŽIV baltymu Rev ir taip įtakoja viruso iRNR transportą per branduolio apvaskalą. Padidinta baltymo L5 sintezė pagerina, o šio baltymo slopinimas stabdo viruso iRNR transportą ir jo dauginimąsi [105]. HBc, kuris suriša viruso genomą ir gali surišti RNR molekules, sąveika su žmogaus L5 baltymu galėtų atlikti panašias funkcijas ir įtakoti HBc pernašą per branduolio apvaskalą. L5 baltymas taip pat dalyvauja ląstelių vėžinėje transformacijoje, formuoja kompleksus su Mdm2 ir p53 baltymais.
Fibrinogenas γ	N-gale trūksta apie 315 ar., C-galas pilnas, iš viso 122 ar. Nustatytos dviejų skirtingų kDNR sekos, atrinkta dar keletas.	Su γ - ir α - fibrinogenais HBc wt sąveikauja stipriau nei mutantiniai baltymai. Fibrinogenai – kraujo baltymai, kurių pagrindinė funkcija – kraujo krešėjimas. Žinoma kad ligoniai, sergantys virusiniais hepatitais, dažnai kenčia nuo fibrino formavimosi ir kraujo krešėjimo sutrikimų [22]. Labiausiai tikėtina, kad šiuos sutrikimus didžiąja dalimi nulemia kepenų, kuriose gaminama daug kraujo baltymų, pažeidimai. Bet šiuos sutrikimus galėtų įtakoti ir šiame darbe aptikta HBc sąveika su fibrinogenu, tuo labiau kad dideli kiekiai kitos šerdies baltymo formos – e antigeno (HBeAg) – aptinkami užsikrėtusiųjų hepatitu B kraujyje.
Fibrinogenas α	N-gale trūksta apie 86 ar., C-galas pilnas, 558 ar. Nustatyta vienos kDNR seka, atrinka dar keletas.	Tinka aprašymas, skirtas fibrinogeno α baltymui

Lentelė 15. Žmogaus baltymai, sąveikaujantys tik su mutantiniais HBc baltymais

Baltymas	kDNR pilnumas	Aprašymas
IKKγ/NEMO	N-gale trūksta apie 224 ar., C-galas pilnas, iš viso 195 ar. Nustatyta vienos kDNR seka.	NF- κ B signalinio kelio baltymas. Detalesni šio baltymo tyrimai ir aprašymas pateikti žemiau.
FLJ20850	N-gale trūksta 8 ar., C-galas pilnas, 171 ar. Nustatyta vienos kDNR seka.	Nežinomos funkcijos baltymas. Detalesni šio baltymo tyrimai ir aprašymas pateikti žemiau.
KIF13A	Klonuota kDNR koduoja 1757 ar. ilgio KIF13A baltymo N-dalį, kurioje yra kinezi- no motorinis domenas (~600 ar.). N-gale trūksta 195 ar. Nustatyta vienos kDNR seka.	Tai kinezinų šeimos baltymas. KIF13A baltymas dalyvauja periferiniame ląstelės transporte [26]. Kinezinai – motoriniai baltymai, kurie juda išilgai mikrovamzdelių hidrolizuodami ATP. Virusų genomo ir baltymų kompleksui reikalingas aktyvus transportas citoplazmoje, ir tam panaudojami mikrovamzdeliais judantys motoriniai baltymai. Su motoriniais baltymais sąveikaujantys mutantiniai virusų baltymai galėtų sutrikdyti svarbias ląstelės transporto sistemas arba tiesiog nukelti į ląstelės vietas, kuriose pasireiškia jų patogeniškumas.
NOTCH2NL	N-gale trūksta 124 ar., C-galas pilnas, 112 ar. Nustatyta vienos kDNR seka.	Žmogaus NOTCH2NL (Notch homolog 2 N-terminal like) [30] yra ląstelės Notch signalinio kelio [116] baltymų šeimos narys. Šio signalinio kelio sutrikimai ir jo genų mutacijos siejamos su leukemija, krūties, prostatos, gimdos kaklelio ir kitomis vėžio rūšimis [98], baltymas siejamas ir su Alzheimerio liga [125]. Nustatyta ir Notch baltymų sąveika su virusais. Epšteino-Bar viruso EBNA2 baltymo sąveika su Notch1 ir Notch2 sukelia B limfocitų vėžinę transformaciją, su Notch signalinio kelio baltymais sąveikauja ir Kapoši sarkomos bei Žmogaus papilomos virusai [44]. NOTCH2NL baltymas apibūdintas neseniai ir kol kas žinoma, kad <i>in vitro</i> jis slopina Notch genų transkripcinius aktyvumus.
Fumarazė	N-gale trūksta 199 ar., C-galas pilnas, 311 ar. Nustatyta vienos kDNR seka.	Fumarazė (fumarato hidratazė) – vienas iš Krebso ciklo fermentų. Fumarazės trūkumas – retas recesyvinis autosominis susirgimas, sąlygojantis smarkius neurologinius ir kepenų pažeidimus. Fumarazės mutacijos siejamos su įvairiais vėžiniais susirgimais [39].
CASKIN2	N-gale trūksta 863 ar., C-galas pilnas, 257 ar. Nustatytos dviejų kDNR sekos.	CASKIN2 (cask-interacting protein 2) baltymas apibūdintas neseniai [114]. CASK baltymas dalyvauja viename iš ląstelės signalinių kelių, perduodančių signalus iš sinapsės [48], bet jo sąveika su CASKIN2 nenustatyta, o pastarasis baltymas savo pavadinimą gavo dėl homologijos su CASKIN1, kuris sąveikauja su CASK. Tad CASKIN2 baltymui iki šiol nepriskirta jokia funkcija ir nenustatytos sąveikos su kitais baltymais.

Buvo tikrinama visų atrinktų baltymų tarpusavio sąveika bei sąveikos su wt arba mutantiniais HBc baltymais stiprumas. Paaiškėjo, kad kai kurie atrinkti baltymai sąveikauja su kai kuriais kitais atrinktais žmogaus baltymais arba daug silpniau nei kiti sąveikauja su HBc baltymais. Buvo nuspręsta, kad tokie baltymai su HBc sąveikauja nepakankamai specifiskai ar stipriai, todėl toliau jie nebuvo tiriami. Tolesniems tyrimams pasirinkti stipriai ir specifiskai su HBc arba jo mutantinėmis formomis sąveikaujantys GIPC1, GIPC2, IKK γ /NEMO ir FLJ20850.

3.3. Žmogaus baltymai, sąveikaujantys ir su laukinio tipo, ir su mutantiniais HBV šerdies baltymais

3.3.1. GIPC1

GIPC1 (taip pat vadinamas GIPC, TIP-2, GLUT1CBP, RGS19IP1, sinektinu, SEMCAP, NIP, ir IIP-1) yra žmogaus baltymas, sąveikaujantis su kitais ląstelės baltymais [16, 18, 25, 119] ir keliais virusiniais baltymais [32, 100]. GIPC1 baltyme išskirti du domenai – PDZ ir acilą pernešančio baltymo (ACP) motyvas. PDZ (pavadintas pagal tipiškas pasikartojančias sekas, pirmą kartą aptiktas baltymuose PSD-95, Dlg ir ZO-1 [60]) yra gerai žinomas baltymų sąveikos domenai, dalyvaujantis visose išskyrus vieną GIPC1 sąveikose. Tik su mioziniu VI sąveikauja ne PDZ domenai, o N- ir C- GIPC1 baltymo sritys [97]. PDZ domenai paprastai sudaro 80-100 ar. seka, sąveikaujanti su kitų baltymų C-galo sekomis arba su kitais PDZ domenais [55].

Vykdamas sąveikaujančių baltymų paiešką mielių dviejų hibridų sistemoje, atrinktos beveik pilno ilgio GIPC1 kDNR atkarpos, turinčios pilnus PDZ domenai. Siekiant patikrinti ar PDZ baltymai dalyvauja sąveikoje su HBc, buvo sukonstruotos dviejų hibridų plazmidės vien su PDZ domenu (124–228 ar.), su PDZ domenu ir C-galo seka (124–333 ar.) ir vien su C-galo seka (260–333). Su LexA sulieti GIPC1 61–333, GIPC1 124–333 ir GIPC1 124–228 sąveikavo su šerdies baltymo–AD domeno hibridu, tuo tarpu GIPC1 260–333 nesąveikavo

(17 pav.). Šie rezultatai rodo, kad sąveiką su HBV šerdies baltymu apsprendžia PDZ domenas.

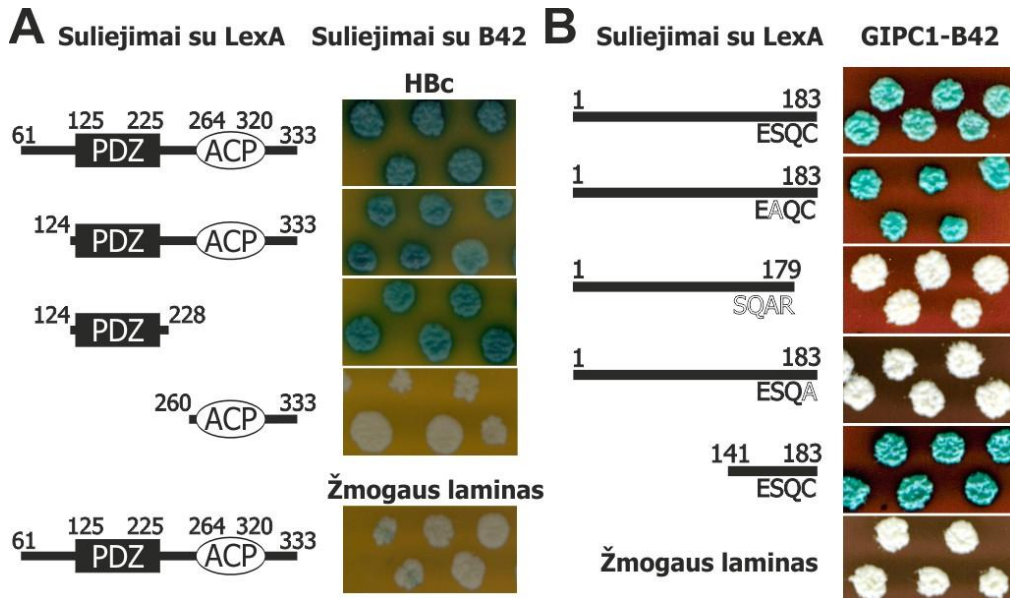
Lentelė 16. Su žmogaus GIPC1 PDZ domenu sąveikaujančios sekos

Sąveikaujantis baltymas	C-galo seka*
I PSM klasė	<i>Ser/Thr-X-Ψ-COOH</i>
GLUT1	...Asp-Ser-Gln-Val
KIF-1B	...Glu-Thr-Thr-Val
α-Aktininas	...Glu-Ser-Asp-Leu
RGS-GAIP	...Ser-Ser-Glu-Ala
Neuropilinas	...Tyr-Ser-Glu-Ala
SemF	...Glu-Ser-Ser-Val
SemC	...Asp-Ser-Val-Val
GP75(Trp-1)	...Glu-Thr-Glu-Val
Megalinas (LDLR)	...Gln-Ser-Val-Val
5T4	...Asp-Ser-Glu-Val
Integrinas α6A	...Xxx-Ser-Asp-Val
Integrinas α6B	...Thr-Ser-Asp-Ala
TGF-βIII receptorius	...Glu-Ser-Tyr-Ser
α-Adrenerginis receptorius	...Ser-Ser-Thr-Ala
ŽIV-1 Tax	...Glu-Ser-Lys-Val
ŽPV-16 E6	...Glu-Thr-Gln-Leu
II PSM klasė	<i>Ψ-X-Ψ-COOH</i>
Sindekanas-4	...Glu-Phe-Tyr-Ala
Sindekanas-2	...Glu-Phe-Tyr-Ala
III PSM klasė	<i>X-X-Cys-COOH</i>
IGF-1 receptorius	...Ser-Ser-Thr-Cys
Žmogaus LH receptorius	...Tyr-Thr-Glu-Cys
Dopamino D2 receptorius	...Ile-Leu-His-Cys
Dopamino D3 receptorius	...Ile-Leu-Ser-Cys
Žiurkės TOM-L1	...His-Ser-Glu-Cys
CD93	...Gly-Thr-Asp-Cys
<u>HBC</u>	<u>...Glu-Ser-Gln-Cys</u>
<u>HBC mod</u>	<u>...Glu-Leu-Gln-Cys</u>

* X, bet kokia amino rūgštis; Ψ, hidrofobinė. Kursyvu paryškinti virusiniai baltymai.

PDZ domenai paprastai sąveikauja su trimis ar keturiomis kitų baltymų C-galo amino rūgštimis, todėl iškelta prielaida, kad GIPC1 sąveikauja su šerdies baltymo C-galu. Siekiant tai patikrinti, sukonstruotos dviejų hibridų sistemos plazmidės, koduojančios Hbc baltymo 141–183 amino rūgštis. Eksperimentų rezultatai parodė, kad šerdies baltymo C-galo visiškai pakanka sąveikai su

GIPC1 (**17 pav. B**). Siekiant nustatyti, ar iš tikrųjų keletu galinių HBc baltymo amino rūgščių seka yra svarbi jo sąveikai su GIPC1, buvo pašalintos keturios C-gale esančios amino rūgštys. Taip pakeisto HBc C-galo seka (Ser-Gln-Ala-Arg-COOH) nepanaši nė į vieną žinomą PDZ domenų atpažįstamų sekų motyvą (PSM), ir toks baltymas nesąveikavo su GIPC1 (**17 pav. B**).



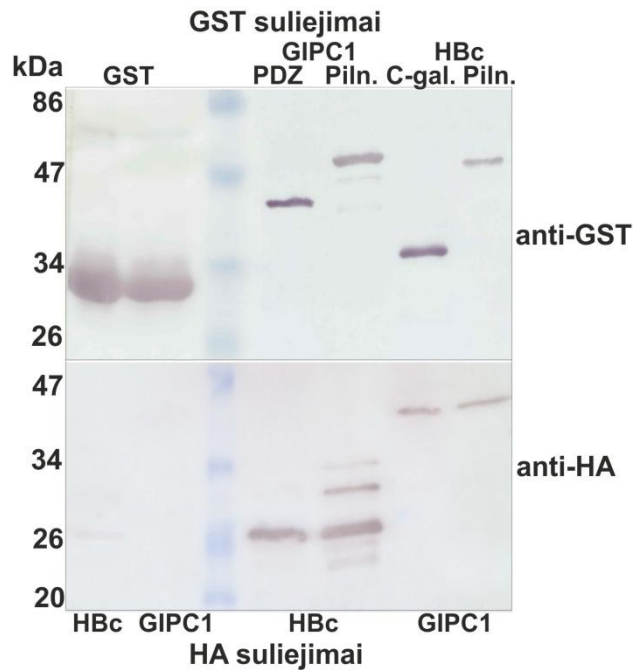
17 pav. GIPC1 sąveika su HBV šerdies baltymu mielių dviejų hibridų sistemoje. A: GIPC1 sąveikos srities nustatymas. Tikrinta sutrumpintų GIPC1 atmainų ir žmogaus lamino C (neigiama kontrolė) sąveika su HBc. **B:** HBc sąveikos srities nustatymas. Tikrinta beveik pilno ilgio GIPC1 (61–333) sąveika su įvairiomis HBc modifikacijomis ir žmogaus laminu C.

Pagal surišamas sekas PDZ domenai suskirstyti į tris klases. I-os klasės domenai atpažįsta konsensuso seką Ser/Thr-X-Ψ-COOH (kur X yra bet kokia amino rūgštis, o Ψ – hidrofobinė ar.), II-os klasės domenai suriša seką Ψ-X-Ψ-COOH, o III-os klasės domenai suriša Asp/Glu-X-Ψ-COOH [82]. Anksčiau GIPC1 PDZ domeno specifiškumas buvo apibūdintas kaip I-os klasės [119]. Eksperimentiškai nustatyta, kad kai kurių baltymų PSM sekos -2 padėtyje esantį seriną ar treoniną pakeitus kita amino rūgštimi, jie nebesąveikavo su GIPC1 [115]. (Pagal susitarimą PDZ ligandų C-gale esančios amino rūgštys pozicija žymima 0, o sekančios link N-galo artėjančios amino rūgštys žymimos -1, -2 ir taip toliau [1].) Bet HBc, kurio -2 serinas buvo pakeistas į alaniną, ir toliau sąveikavo su GIPC1 (**17 pav. B**). Taip pakeistas HBV šerdies baltymo C-galas (Glu-Ala-Gln-Cys-COOH) panašus į kitų su GIPC1 sąveikaujančių baltymų

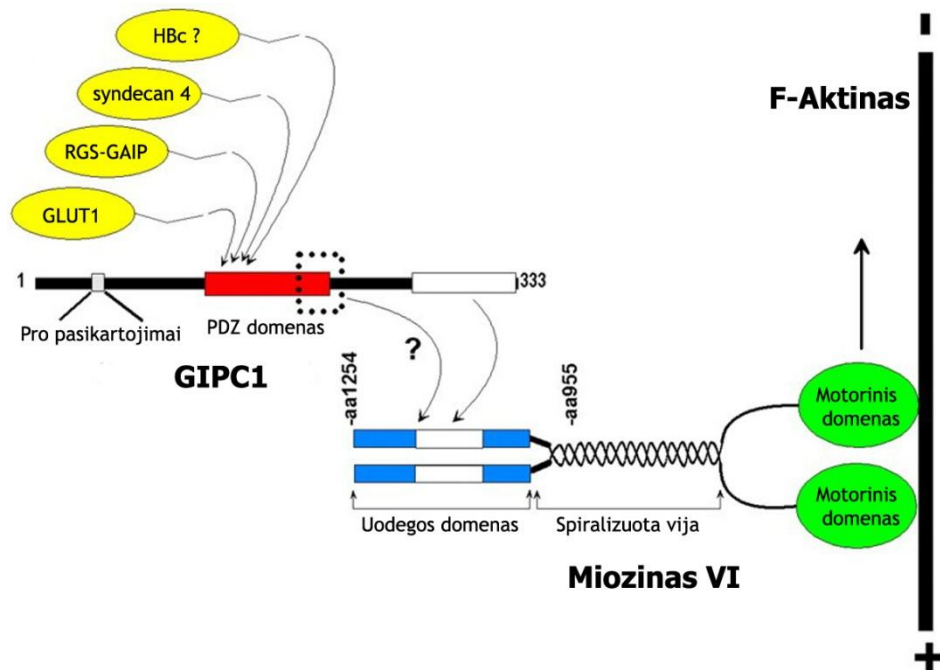
galus – dopamino receptorių D2 (Ile-Leu-His-Cys-COOH) ir D3 (Ile-Leu-Ser-Cys-COOH) [54] – abiejuose šiuose baltymuose -2 pozicijoje vietoje treonino ar serino yra leucinas. Susikaupus daugiau duomenų tapo aišku, kad GIPC1 PDZ domenas suriša visų trijų PSM klasių sekas [97]. Naujoje, šiek tiek pakeistoje PSM klasifikacijoje, III-ios klasės motyvas apibrėžtas kaip X-X-Cys-COOH (**16 lentelė**). Ir natyvaus HBc galinė seka Glu-Ser-Gln-Cys-COOH, ir pakeista seka Glu-Ala-Gln-Cys-COOH atitinka šį motyvą. HBc, kurio galinis cisteinas buvo pakeistas į alaniną, nesąveikavo su GIPC1 (**17 pav. B**).

Siekiant patvirtinti dviejų hibridų metodu nustatytas sąveikas, buvo panaudotas GST „ištraukimo“ *in vitro* metodas. Įvairūs HBV šerdies baltymo ir GIPC1 fragmentai sulieti su GST genu bakterijų raiškos vektoriuje. Siekiant užtikrinti vienodą sąveikaujančių baltymų aptikimą, tie patys genų fragmentai jų 5'-galuose buvo sulieti su gripo viruso hemaglutinino HA epitopą koduojančiomis sekomis. Bakterijose buvo sintetinami skirtingi su GST ar HA sulietų baltymų kiekiai, jų tirpumas taip pat smarkiai skyrėsi, todėl ne su visomis konstrukcijomis galima buvo atlikti eksperimentus. Natyvus GST baltymas, tipinė neigiama kontrolė tokiuose eksperimentuose, buvo daug tirpesnis ir kabinosi prie rutuliukų su glutationu daug efektyviau nei bet kuris sulietas baltymas.

Po įvairių optimizavimų pavyko GST ir jo hibridus su pilno ilgio HBc ar HBc 141–183 imobilizuoti ant rutuliukų su glutationu ir išbandyti jų sąveika su HA pažymėtu GIPC1 61–333 baltymu. Rutuliukus nuplovus, vienoduose jų kiekiuose ieškota HA pažymėtų baltymų. GIPC1 rastas tik ant rutuliukų, prie kurių prieš tai buvo prikabinti HBV šerdies baltymo turintys sulieti baltymai. Taip pat ir su GST sulieti GIPC1 124–228 ir GIPC1 124–333, bet ne nesulietas GST, rišosi su HA pažymėtu pilno ilgio šerdies baltymu (**18 pav.**). Šie rezultatai patvirtina, kad GIPC1 baltymo PDZ domenas sąveikauja su HBV šerdies baltymu.



18 pav. GST ištraukimo eksperimentas. GST (neigiama kontrolė) ir su GST sulieti baltymai buvo prikabinti prie to paties glutationo-agarozės rutuliukų kiekio ir palikti sąveikauti su HA-pažymėtais baltymais. Pavyzdžiai kruopščiai nuplauti ir analizuoti imunoblotingo pagalba naudojant anti-GST (viršuje) ir anti-HA (apačioje) antikūnus. **1** takelis: GST + HA-HBc; **2**: GST + HA-GIPC1; **3**: Baltymų molekulinės masės standartas; **4**: GST-GIPC1(124–228) + HA-HBc; **5**: GST-GIPC1(124–333) + HA-HBc; **6**: GST- HBc(141–183) + HA-GIPC1; **7**: GST-HBc + HA-GIPC1.



19 pav. Spėjamas GIPC1 veikimo modelis. GIPC1 baltymo PDZ domenas (raudonas) suriša kitų baltymų (geltoni) C-galus. Toks kompleksas susiriša su miozino VI, GIPC1 baltymo C-galui sąveikaujant su miozino „uodega“ (mėlyna). Abiejų baltymų sąveikaujančios sritys apibrėžtos baltais stačiakampiais. Potencialus antrinis GIPC1 sąveikos su miozino VI domenas apibrėžtas stačiakampiu iš taškų. Miozino VI motoriniai domenai (žali) katalizuoja viso komplekso judėjimą link F-aktino siūlų „minus“ galo. Pagal Reed ir kt. [97].

Kaip jau minėta, laukinio tipo HBc baltymai formuoja homodimerus ir susirenka į kapsides. Siekiant nustatyti ar dviejų hibridų sistemoje naudoti sulieti baltymai formuoja panašias daleles, mielių lizatai su sulietais HBc baltymais buvo analizuojamai elektroninio mikroskopo pagalba, bet dalelių neaptikta. Tikėtina, kad dalelės nesusidarė dėl pridėto lexA domeno ar mažos sulietų baltymų koncentracijos. Nors manoma, kad HBc baltymo C-gale esanti daug arginino turinti sritis virusinės dalelės viduje sąveikauja su jo genomu, o sulietų baltymų formuojamų dalelių aptikti nepavyko, vis tiek išlieka galimybė, kad su GIPC1 baltymu gali sąveikauti ne tik HBc baltymai, bet ir iš jų suformuotos kapsidės. Mokslinėje literatūroje yra duomenų, rodančių kad bent jau tam tikras kiekis C-gale esančių sekų yra išoriniame dalelės paviršiuje. Pavyzdžiui, gausi arginino šerdies baltymo sritis nulemia nukleokapsidžių prisitvirtinimą prie ląstelių paviršiuje esančio heparano sulfato [118]; su šia sritimi sąveikaujantis monokloninis antikūnas rišasi ir su nepažeistomis HBV kapsidėmis; tripsinas gali nuskelti šią sritį nuo rekombinantinių HBV kapsidžių [15]. Buvo iškelta prielaida, kad tarp dalelės susirinkimui būtino šerdies domeno ir su nukleorūgštimis sąveikaujančio domeno esantis peptidas formuoja mobilią struktūrą ir apsprendžia labai didelį C-galinio domeno judrumą [120].

Kokį vaidmenį šerdies baltymo gebėjimas sąveikauti su žmogaus GIPC1 atlieka HBV dauginimosi cikle, dar reikia nustatyti. Kadangi didesnių molekulių difuzija citoplazmoje smarkiai apribota, virusinių baltymų ir jų bei geno kompleksų kryptingam judėjimui reikalingas aktyvus membraninis ar citozolinis transportas. Jau nustatyta, kad HBV kapsidės aktyviai transportuojamos link branduolio dalyvaujant ląstelės mikrovamzdelių transporto sistemai [95]. Tuo tarpu kai didelis atstumas tarp ląstelės periferijos ir branduolio įveikiamas panaudojant mikrovamzdelių transporto sistemą, ląstelės pakraščiuose ir, galbūt, branduolyje transportas vyksta pasinaudojant aktino siūlais [96]. Besikaupiantys duomenys rodo, kad GIPC1 ląstelės baltymus susieja su miozino VI judėjimu [81]. O pats miozinas VI

dalyvauja endocitoziniame transporte ir yra vienintelis link aktino siūlų „minus“ galo judantis molekulinis motoras [45, 121]. GIPC1 baltymo C-galo sritis sąveikauja su miozino VI „uodega“ ir išilgai aktino siūlų tempia su PDZ domenu susietus baltymus (**19 pav.**). Taigi, viena iš galimų HBc ir GIPC1 sąveikos funkcijų galėtų būti šerdies baltymų ar kapsidžių viduląstelinis transportas ląstelės pakraščiuose ar branduolyje.

GIPC1 sąveikauja mažiausiai su dviem kitais virusiniais baltymais – ŽTLV1 Tax [100] ir Žmogaus papilomos viruso 18 (ŽPV-18) E6 [32], bet tikslios šių sąveikų funkcijos nežinomos. Žinoma, kad su GIPC1 sąveikaujantys žmogaus baltymai GLUT1 ir NRP1 dalyvauja ŽTLV1 viruso patekime į ląstelę [38]. ŽTLV1 viruso genome pašalinus Tax PSM koduojančią seką, mutantinis virusas nesugebėjo sukelti ilgiau trunkančios triušių infekcijos. Iš dviejų labai giminingų virusų ŽTLV1 ir ŽTLV2 tik pirmasis tvirtai siejamas su suaugusiųjų T-ląstelių leukemija ir uždegiminėmis nervų ligomis. Ir tik Tax1, bet ne Tax2 baltymo C-gale yra PDZ surišimo motyvas [126]. Taip pat ir aukštos rizikos ŽPV padermių E6 onkobaltymuose yra PDZ surišimo motyvai, o žemos rizikos padermių analogiškuose baltymuose šis motyvas neaptinkamas. Nustatyta, kad GIPC1 raiška stipriai padidėjusi kasos ir krūties vėžio ląstelėse [76, 101], o blokuojant šį baltymą buvo sustabdytas pelių kasos vėžio augimas [77]. Tad tikėtina kad ir HBc sąveikos su PDZ domeną turinčiais baltymais gali būti svarbios HBV patogeniškumui ar jo patekimui į ląstelę.

3.3.2. GIPC2

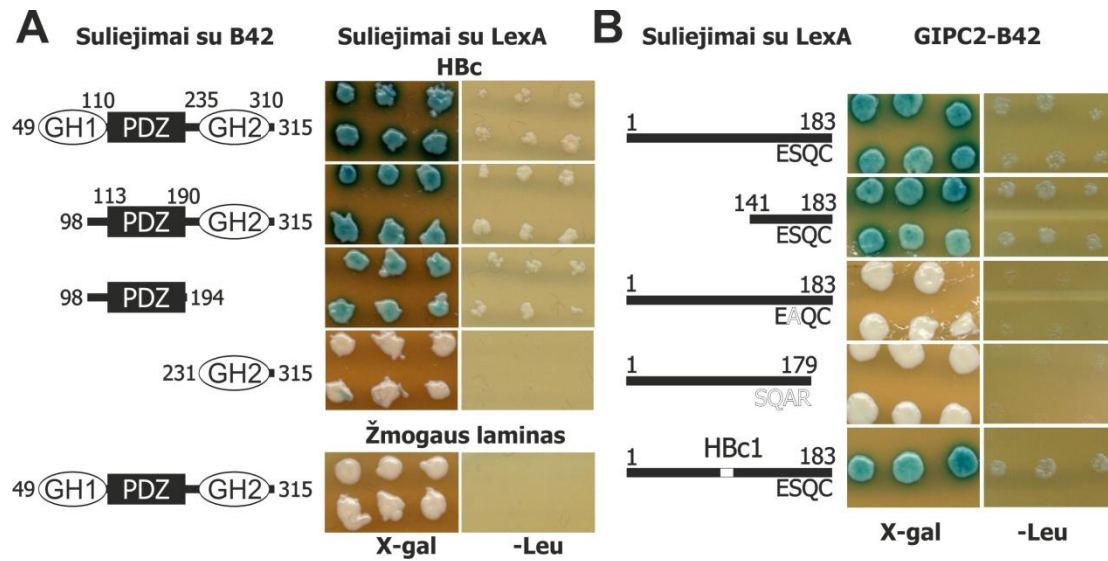
Kitas, silpniau nei GIPC1 su visomis tirtomis HBc atmainomis sąveikaujantis baltymas, yra žmogaus GIPC2. Apie šį baltymą ir jo funkcijas dar labai mažai žinoma, pavadinimas jam duotas dėl pirminės sekos ir domeninės organizacijos panašumo į GIPC1 baltymą (kuris iki tol buvo, o ir toliau dažniausiai vadinamas tiesiog GIPC). GIPC2 – tai 315 ar. ilgio baltymas, bioinformatiniais metodais aptiktas ir apibūdintas beveik tuo pat metu, kai jis buvo atrinktas ir aprašomuose eksperimentuose [62]. Tuo pat metu

bioinformatiniais metodais apibūdintas ir trečias panašus baltymas – GIPC3 [103]. GIPC2 baltymas turi 62,0% identiškų ar. su GIPC1 baltymu ir 55,3% identiškų ar. su GIPC3, o GIPC1 su GIPC3 turi 59,9% identiškų amino rūgščių. GIPC2, kaip ir GIPC1 genas, sudarytas iš šešių egzonų, o bendra abiejų genų egzonų-intronų struktūra labai panaši. GIPC2 raiška stipriausia gaubtinėje žarnoje, šiek tiek silpnesnė inkstuose ir kasoje, taip pat gana žymi kepenyse. Visi GIPC baltymai turi tokią pačią domeninę sandarą – centrinėje dalyje yra PDZ domenas, o jų N- ir C-galuose išskirti nauji nežinomos funkcijos domenai GH1 ir GH2 (GIPC homologijos domenai) [58].

Dviejų hibridų eksperimentuose atrinktos kDNR 5'-gale trūksta sekos, koduojančios pirmąsias 48 ar., bet nė vienas baltymo domenas nepažeistas. Kadangi pagrindinė PDZ domeno funkcija – sąveika su kitais baltymais ir šiame darbe jau nustatyta, kad GIPC1 baltymo PDZ domenas sąveikauja su Hbc baltymais, padaryta prielaida, kad ir GIPC2 baltymo sąveiką su Hbc baltymais irgi apsprendžia PDZ domenas. Siekiant tai patikrinti, buvo sukonstruotos dviejų hibridų plazmidės, turinčios GIPC2 baltymo PDZ ir GH2 domenus (98-315 ar.), vien tik PDZ domeną (98-194 ar.) bei vien tik GH2 domeną (231-315 ar.). Atlikus eksperimentus paaiškėjo, kad sąveikai su Hbc baltymais pakanka vien PDZ domeno, nors jis sąveikavo šiek tiek silpniau nei 98-256 ar. turintis baltymas (**20 pav., A**).

Toliau buvo bandoma nustatyti, kuri Hbc baltymo vieta sąveikauja su GIPC2 baltymu. Kadangi GIPC2 baltymo struktūra panaši į GIPC1 baltymo ir jau nustatyta, kad su Hbc sąveikauja GIPC2 PDZ domenas, buvo tiriama Hbc baltymo C-galo ir jo amino rūgščių sekos įtaka tiriamai sąveikai. Šiems eksperimentams buvo panaudoti sulieti Hbc baltymai, sukonstruoti Hbc sąveikos su GIPC1 tyrimams. Eksperimentai parodė, kad sąveikai su GIPC2 užtenka vien Hbc baltymo C-galo (141-183 ar.), o C-gale sutrumpintas (1-179 ar.) ir turintis kitą galinių ar. seką (Ser-Gln-Ala-Arg-COOH) Hbc su GIPC2 nesąveikavo. Nustatyta, kad pilnas Hbc baltymas, kurio -2 pozicijoje esantis serinas pakeistas į alaniną, nesąveikauja su GIPC2, nors taip pakeistas Hbc

sąveikavo su GIPC1 (20 pav., B).



20 pav. GIPC2 sąveika su HBV šerdies baltymu mielių dviejų hibridų sistemoje. A: GIPC2 sąveikos srities nustatymas. Tikrinta sutrumpintų GIPC2 atmainų ir žmogaus lamino C (neigiama kontrolė) sąveika su HBc. **B:** HBc sąveikos srities nustatymas. Tikrinta beveik pilno ilgio GIPC2 (49–315) sąveika su įvairiomis HBc modifikacijomis ir mutantu HBc1.

Baltymų sąveikos duomenų bazėse yra įrašų, kad GIPC2 sąveikauja su keletu kitų žmogaus baltymų. Su ląstelių diferenciaciją įtakojančiu ir vėžinėje transformacijoje dalyvaujančiu baltymu Frizzled-3 sąveikauja visi trys GIPC baltymai [58]. Frizzled-3 C-galinė seka atitinka tipišką PSM I-os klasės motyvą, o tai rodo, kad visi GIPC baltymai sugeba sąveikauti su šios klasės sekomis. Bet kitų su GIPC2 sąveikaujančių baltymų – pleotropino, UNC119, SETDB1 ir IGSF21 C-gale esančios sekos neatitinka jokio žinomo PSM motyvo. Sunkiai tikėtina, kad visi šie baltymai sąveikautų ne su GIPC2 baltymo PDZ domenu, o su GH1 ar GH2 domenais, kai iš daugiau nei trisdešimties baltymų, sąveikaujančių su tokios pačios domeninės struktūros GIPC1 baltymu, vien tik miozinas VI sąveikauja ne su PDZ domenu. Gali būti, kad ne visos šios sąveikos patikimos, nes jos buvo aptiktos plataus masto žmogaus baltymų tarpusavio sąveikos tyrime, panaudojant mielių dviejų hibridų sistemą ir detaliau netirtos [111].

Norint tiksliau nustatyti visų GIPC baltymų specifiškumą reikalingi didesnio masto sąveikos tyrimai panaudojant atsitiktinių C-galo sekų biblioteką. Tokią biblioteką galima būtų sulieti su šiame darbe sukonstruotu HBc 1-179 ar.

baltymu, kuris nesąveikauja su GIPC1 ir GIPC2, o tuo tarpu laukinio tipo HBc, kuris skiriasi tik C-gale esančiomis papildomomis 4-iomis PSM motyvą atitinkančiomis ar., su GIPC baltymais sąveikauja. Tokie tyrimai su trimis homologiškais PDZ domenais prisidėtų prie intensyviai vykstančių PDZ struktūros – sąveikaujančių PSM sekų dėsningumą tyrimo. Vykdamas sąveikaujančių su GIPC baltymų GH2 ar GH1 domenais baltymų paiešką, galima būtų tikėtis aptikti sąveikaujančius su jais miozinius ar kitus transportinius baltymus. Tokiu būdu būtų paspartintas šių mažai ištirtų baltymų funkcijos nustatymas.

O kad GIPC2 baltymo vaidmuo gali būti svarbus, rodo jo dalyvavimas vėžinėje transformacijoje. Nustatyta, kad šio baltymo iRNR raiška prislopinta inkstų bei gaubtinės žarnos vėžio ląstelėse ir padidėjusi kai kurių skrandžio vėžio tipų ląstelėse [63]; aštrios limfocitinės leukemijos ląstelėse šis genas yra metilintas [65]. Bet siekiant išsiaiškinti koku būdu šis genas dalyvauja vėžinėje transformacijoje, koks apskritai jo vaidmuo ląstelėje, kokią įtaką jo sąveika su HBc daro HBV dauginimosi ciklui ir jo patogenezei, reikalingi tolimesni tyrimai.

3.4. Žmogaus baltymai, sąveikaujantys su mutantiniais HBV šerdies baltymais

3.4.1. Nenustatytos funkcijos baltymas FLJ20850

Vienos iš atrinktų kDNR sekų palyginimas NCBI BLAST serveryje atskleidė, kad tai *Homo sapiens* 19-os chromosomos atviras skaitymo rėmelis 60 (C19orf60). Ilgiausios klonuotos kDNR koduojanti seka buvo 516 nt ilgio. Jai trūksta 24 bp 5'-gale lyginant su nukleorūgščių duomenų bazėse esančiomis homologiškais sekomis (pavyzdžiui, **BC012078.1**). Daugelis GenBank duomenų bazėje esančių homologiškų žmogaus sekų yra neteisingo splaisingo produktai, neturintys pilnų atviro skaitymo rėmelių. Dauguma žmogaus ir šimpanzės sekų turi papildomus 66 nukleotidus netoli 5'-galo. Išanalizavus

Homo sapiens 19-os chromosomos sekų gretinį (GenBank priėjimo numeris **NT 011295**), paaiškėjo kad šios kDNR skiriasi trečio egzono ilgiu. Kai kurios splaisingo nuspėjimo programos randa dvi antro introno pabaigos vietas, o populiarius genų struktūros nuspėjimo serveris GENSCAN [17] nuspėja trumpesnę koduojančios sekos formą, kuri ir atrinkta šiame tyrime (**21 pav.**). Trumpesnė splaisingo atmaina – vienintelė sekuota kitų gyvūnų rūšių šios kDNR forma.

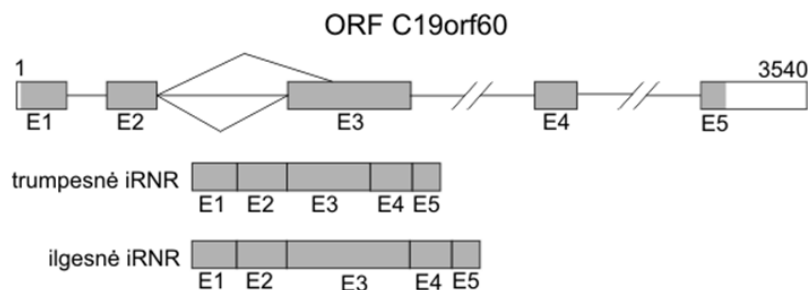
```

M I T E T A A E P T V P A V P A A E E A T E A R G R E E P A
atgatcaccgagaccgcccggagcctacgggtccctgcagtgctgctgctgaggaggccaccgaagctcggggacgcgaggagccggcg 90

W P W K D A P I R T L V Q R I H Q L Q A E R A Q G F R R L E
tggccctggaagacgccccgatccggacgctggtgcagcgcatccaccagctgcaggctgagcgcgcgagggttccgccaactggag 180
Egzonas 1▲ Egzonas 2
E W L A P V Q G L R A W G R G L R V P T C R R G H R Q Y L R
gagtggtggcgcgggtgcagggcctgagagcctgggggcggcctcagggtccccacatgccgcagaggccaccgcatcctgcgc 270
▲ Egzonas 3 Intronas 3 ▲ Egzonas 3
S G P D Y D F A R Y R S T V H G V T Q A F A A A S R E V L A
agcggccctgactacgttcgcgctaccggagcacagtgacgggggtgaccaggccttcgcccgcctcgcgggaggtgctggcg 360

V E A E L G G P R R Q P L L A G H V R S L Q E L E Q T R L G
gtggaagcagagctggcgggcctcgcagggcagccgctgctcgcggccaagtgcgcagcctgcaggagctggagcagacgcccggc 450
T V A L L Q L M E T P E L A G Q E D A V R M Q Q L K M K V I
acggtgccctgctgcagttgatggagacgccagagctggcggggcaggaggacgctgtacggatgcagcagctgaaaatgaaggtaatt 540
▲ Egzonas 4 Egzonas 4 ▲
K T M E A I S E V L Q D L R F D A E S A E *
aaaaccatggaggcagcagaggttctccaggaccttaggtttgatgcggaatctgccgagtga 606
Egzonas 5

```



21 pav. Nukleotidų, spėjama amino rūgščių seka ir FLJ20850 geno struktūra. Klonuotoje sekoje nesantys fragmentai pritamsinti. Trikampiai parodo egzonų ribas. Alternatyvaus splaisingo taškas yra pilkas.

Šio ASR koduojamas produktas duomenų bazėse pavadintas hipotetiniu baltymu FLJ20850. Ilgesnioji baltymo forma yra 201 ar. ilgio, o trumpesnioji – 179 ar. ilgio. Labai panašios sekos aptiktos ir kitose žinduolių rūšyse. Šimpanzės atitikmuo yra 98% tapatus žmogaus sekai; šuns, jaučio ir arklio sekos atitinka daugiau kaip 80%; žiurkės ir pelės sekos žmogaus sekai atitinka daugiau kaip 70%. Skirtingesnės yra vištos ir dryžuotosios danijos sekos, kurių sekos daugiau nei 40% identiškios žmogaus sekai (**22 pav.**). Nors šis baltymas

yra labai konservatyvus žinduolių rūšyse, ieškant žinomų domenų ir struktūrinių motyvų PFAM [34], SMART [67] ir kitose duomenų bazėse neaptikta reikšmingų homologijų nė su vienu domenu ar struktūriniu motyvu. Žmogaus baltymų nuorodų duomenų bazėje (HPRD, Human Protein Reference Database) [87] šio baltymo klasė, funkcija, dalyvavimas biologiniame procese ir raiškos vieta nenurodyta. Vis tik šios iRNR raiška įvairiuose žmogaus audiniuose gali būti įvertinta analizuojant sekų žymenų raiškos (EST, Expressed Sequence Tags) ir mikrogardelių duomenų bazes (17 lentelė). Analizė atskleidė, kad FLJ20850 iRNR raiška vyksta daugelyje žmogaus audinių. Baltymų sąveikos duomenų bazėje BioGRID [14] nurodyta viena FLJ20850 sąveika su kitu baltymu. Sąveika su žmogaus MyoD baltymų šeimos slopintoju (MyoD family inhibitor) aptikta mielių dviejų hibridų sistemos pagalba. Nustatyta, kad FLJ20850 genas yra viena iš hepatito B sukeltos kepenų karcinomos ląstelių genomo vietų, į kurią įsiterpia HBV genomas [79].

Hsa	MIT-ETAAEPTVPAVPAEEATEARGREEPAWPWKDAPIRILVQRIHQLOAERAQGFRRLE	60
Ptr	MIT-ETAAERTVPAVPAEEATEARGREEPAWPWKDAPIRILVQRIHQLOAERAQGFRRLE	60
Eca	MTAAEAAQSAIPAVPGAAGVSEEEPAWPWKDAPIRALVQRIHQLOAERAQAFRRLE	61
Bta	MITAAEASESTVPAVPGDTAATGVPEEELVWPWKDAPIRELVQRIHQLOAERAQAFRRLE	61
Cfa	MITSKAVEDSAVPSVPGTAGAAGVPEREEPAWPWKDAPIRALVQRIHQLOAERAQAFRRLE	61
Mmu	MTAAT-E-----VLAADGPGSAEAWAWRDAPIATLVQRIQQQONERAQAFRRLD	51
Rno	MTAAT-E-----VLAADGPGSAEETWAWRDAPIATLVQRIQQQONERAQAFRRLD	51
Gga	MDLWRRCRVA-PCSAP-AGPARSAPYREKPG--HTDEALRALQRFYALQGERVETVRLFE	57
Dre	M-----AP-----SDFKSLVRRFFYVLQSERVEAYKLFEE	28
Hsa	EGHROYLRSGPDYDFARYRSTVHVCTQAFAAASREVLAVEAELGGPRRQPLLAGHVRSLQEQ	121
Ptr	EGHROYLRSGPDYDFARYRSTVHVCTQAFAAASREVLAVEAELGGPRRQPLLAGHVRSLQEQ	121
Eca	EGHROYLRSGPEYDFPRYRSTVHVCTQAFAAASREVLAVEAELAGRRRAQPLLAGHVRSLQQ	122
Bta	EGHROYLRSGPEYDFPRYRSTVHVCTQAFAAASREVLAVEAELAGPRAQPLLAGHVRSLQQ	122
Cfa	EGHROYLRSGPEYDFPRYRSTVHVCTQAFAAASREVLAVEAELAGPRAQPLLAGHVRSLQQ	122
Mmu	QAHROYLLSGQHYDFPSYRSVVHEVTQAFAAASREVLAVEAELAGPRAQPLLAGHVRSLQEQ	112
Rno	QAHROYLLSDLHDFPSYRSVVHEVTQAFAAASCEVLAVEAELAGPRAQPLLAGHVRSLQEQ	112
Gga	EGHRAVYLSAPHYDFPRYRQVHEVTAAFSCTISREVLQIQGRIRGELGRPDLAGHLTRLQEQ	118
Dre	EGHEAYLRTGPHYDFEYHQLVHEITKAFCCGISKEVLTIKQQIHQDFDRFDLSEHIDKLCIQE	89
Hsa	LEQTRLGTVALLQLMETPELAGQE---DAVRMQLKMKVIKTMEATSEVLQDLRFDAESAE	179
Ptr	LEQTRLGTVALLQLMETPELAGQE---DAVRMQLKMKVIKTMEATSEVLQDLRFDAESAE	179
Eca	LEETRLATVALLQLMGAPELTGQE---DPLQMHQKMKVIKTMEATSEVLQDLRFDAESSE	180
Bta	LEETRLITVALLQLMGTPELTGQE---DSLQMHQKMKVIKTMEATSEVLQDLRFDAESAE	180
Cfa	LEQTRLATVALLQLMGAPELTGQE---NTLEMHQKMKVIKTMEATSEVLQDLRFDAESAE	180
Mmu	LEQTRLATVALLQVMGTFGVSEQ----DPEKLIHQKIKVIKTMEATSEVLQDLRFDAESAE	169
Rno	LEQTRLATVALLQVMGTFGVSEQ----DPEKLIHQKIKVIKTMEATSEVLQDLRFDAESAE	169
Gga	REQEKLLQTLAQQLARQRAQDEPSVDTHQEQVRELKH---RSDAVLSACYRGQRLFSICHF	176
Dre	KEKELLETAKLQLTRQSAQDHPDEDFOEKVREIKQEIKNTALSEILQDFKFDSEEFEE	150

22 pav. Žmogaus baltymo FLJ20850 ir kitų organizmų homologiškų sekų palyginys. Rūšių sutrumpinimai: Hsa, Homo sapiens; Ptr, Pan troglodytes; Eca, Equus caballus; Bta, Bos taurus; Cfa, Canis lupus familiaris; Mmu, Mus musculus; Rno, Rattus norvegicus; Gga, Gallus gallus; Dre, Danio rerio. Pateiktos Homo sapiens ir Pan troglodytes sekų trumpesniosios splaisingo atmainos. Gallus gallus seka sutrumpinta.

Lentelė 17. FLJ20850 iRNR raiška skirtinguose žmogaus audiniuose.

Audinys	EST profilis (tpm)	Mikrogardelių raiškos duomenys		
		Gene Atlas	GeneNote	BOE
inkstai	98	+	+	+
prostata	94	++	++	++
kiaušidės	87	+	ND	+
blužnis	73	ND	++	++
širdis	66	++	++	+
kasa	60	+	+	+
antinksčiai	60	+	ND	+
kepenys	38	++	+	+
smegenys	34	++	++	++
plaučiai	32	++	++	++
placenta	31	+	ND	+
žarnos	25	ND	ND	++
užkrūčio l.	24	+	++	++
raumenys	9	++	++	++
sėklidės	3	+	ND	+

Paaškinimai: EST profilis: apytiksliai genų raiškos dydžiai, surinkti iš EST kiekio ir kDNR bibliotekų šaltinių, pateikti transkriptais milijone (duomenys iš NCBI). Gene Atlas: *Novartis Gene Expression Atlas projektas*; duomenys imti iš GEO [5] GDS596 ir ArrayExpress [85] E-AFMX-5 duomenų rinkinių. GeneNote: *Gene Normal Tissue Expression projektas*; duomenys iš GEO GDS423 duomenų rinkinio. BOE: *Genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues projektas*; duomenys iš GEO GDS1096 ir ArrayExpress E-GEOD-2361 duomenų rinkinių. ++: raiška aukštesnė nei vidutinė; +: raiška mažesnė nei vidutinė; ND – nėra duomenų.

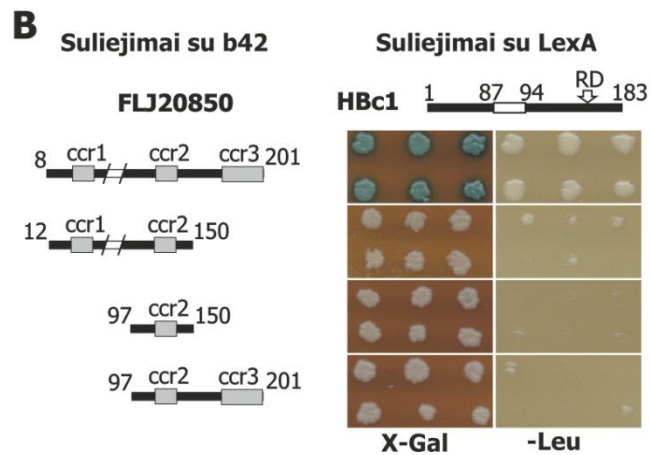
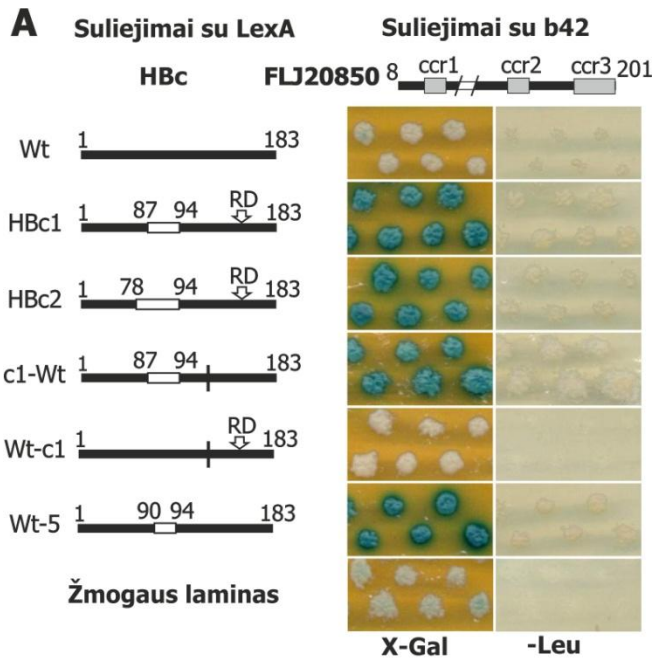
Bioinformatinė FLJ20850 baltymo analizė neaptiko jokių žinomų domenu, taigi ir nedavė peno prielaidoms apie potencialias baltymo sąveikos sritis. Kadangi šio baltymo seka neturi bent kiek didesnio panašumo su jokia kitu baltymu, neįmanoma modeliuoti ir šio baltymo erdvinės struktūros. Baltymo antrinės struktūros analizė nuspėjo tris galimas spiralizuotų vijų (coiled-coil) sritis, todėl nuspręsta patikrinti, kurios iš šių sričių būtinos FLJ20850 sąveikai su HBV šerdies baltymo mutantais. Buvo sukonstruotos sutrumpintos baltymo formos, turinčios pirmą ir antrą, tik antrą, antrą ir trečią spiralizuotų vijų sritis ir patikrinta jų sąveika su mutantu HBc1. Eksperimentų rezultatai parodė, kad nė viena iš sutrumpintų formų negali sąveikauti su HBc1 (**23 pav.**). Tai gali reikšti, kad visos sritys dalyvauja sąveikoje, arba kad vienos srities netekimas pakeičia baltymo struktūrą taip, kad likusios sąveikauti nebesugeba.

Taipogi neaišku kuri šerdies baltymo mutantų sritis sąveikauja su FLJ20850. Sąveikauti galėtų iškritą turinti sritis, nes tik ji savo pirmine struktūra skiriasi

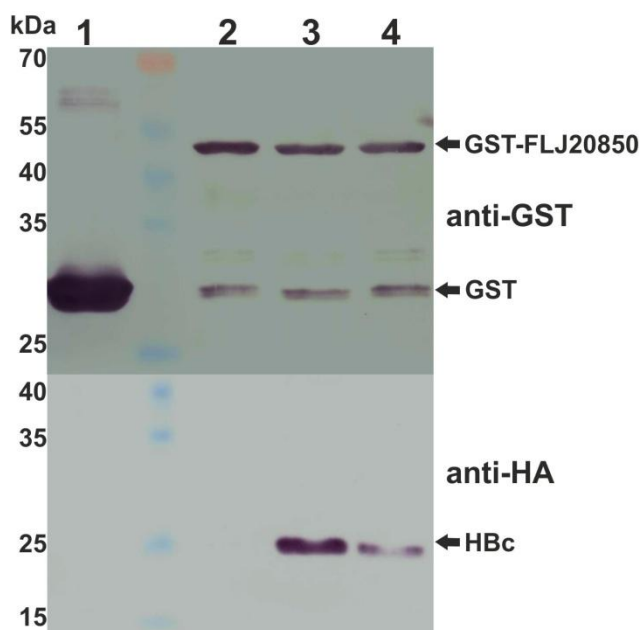
nuo nesąveikaujančio laukinio tipo baltymo. Bet negalima atmesti ir galimybės, kad iškritos kažkiek pakeičia erdvinę baltymo struktūrą ar jos stabilumą ir atveria sąveikai iki tol neprieinamas baltymo sritis. Be to, tirti HBc mutantai priklauso HBV viruso genotipui A ir skiriasi nuo eksperimentuose naudoto genotipo D laukinio tipo viruso baltymo [7] papildomomis arginino ir asparagino amino rūgštimis, įsiterpusiomis už 151 pozicijoje esančios amino rūgšties.

Siekiant patikrinti kuri mutantinio šerdies baltymo sritis dalyvauja baltymų sąveikoje, buvo sukonstruoti hibridiniai baltymai, kurių vienas turi wt šerdies baltymo N-galo dalį, sulietą su HBc1 baltymo C-galo dalimi (Wt-c1), o antras turi HBc1 baltymo N-galo dalį, sulietą su wt baltymo C-galo dalimi (c1-Wt). Patikrinus tokių baltymų sąveiką su FLJ20850 baltymu paaiškėjo, kad sąveiką apsprendžia iškritą turinti HBc1 baltymo dalis, o dvi A genotipui būdingos C-dalyje esančios papildomos amino rūgštys šios sąveikos neįtakoja (**23 pav. A**). Siekiant įrodyti, kad iškritų įvedimas suteikia baltymui galimybę sąveikauti, buvo sukonstruotas wt šerdies baltymas su 89-93 ar. iškrita, ir toks mutantas iš tikrųjų sąveikavo su FLJ20850 (**23 pav. A**). Taigi, dviejų hibridų eksperimentai parodė, kad iškritos HBc centrinėje dalyje suteikia jam gebėjimą sąveikauti su FLJ20850 baltymu, bet taip ir lieka neaišku, kurios abiejų baltymų amino rūgštys tiesiogiai dalyvauja šioje sąveikoje.

Hepatito B šerdies mutantų ir FLJ20850 sąveika buvo tiriama ir GST ištraukimo metodu. Sintetinant su GST arba HA sulietus FLJ20850 baltymus *E.coli* ląstelėse, gauti laukiamo dydžio baltymai. Su FLJ20850 sulieti GST baltymai žymiai blogiau kabinosi prie agarozės-glutationo rutuliukų nei nesulieti baltymai, ką galima paaiškinti ir pastebėta daline GST-FLJ20850 baltymų degradacija. Atlikti GST ištraukimo tyrimai patvirtino, kad abu HBV šerdies baltymo mutantai, bet ne laukinio tipo HBV, gali sąveikauti su žmogaus FLJ20850 baltymu (**24 pav.**).



23 pav. Sąveika tarp HBV šerdies baltymo mutantų ir FLJ20850 baltymo. **A:** Bandymas nustatyti HBV šerdies baltymo mutantų sąveikos sritis. Wt: laukinio tipo HBV šerdies baltymas; HBc1 ir HBc2: HBV šerdies baltymo mutantai; c1-Wt: hibridinis šerdies baltymas, turintis HBc1 mutanto N-galą ir Wt baltymo C-galą (vertikalus brūkšnelis parodo sujungimo vietą); Wt-c1: hibridinis šerdies baltymas iš Wt baltymo N-galo ir HBc1 mutanto C-galo; Wt-5: Wt HBc su įvesta penkių amino rūgščių iškrita centrinėje dalyje. RD: dvi papildomos amino rūgštys, kurių nėra Wt baltyme. Balta sritis žymi iškritą. **B:** Bandymas nustatyti FLJ20850 baltymo sąveikos sritis. Balta sritis žymi amino rūgščių seką, esančią ilgesnėje baltymo atmainoje; ccr: spėjamos spiralizuotų vijų sritys.



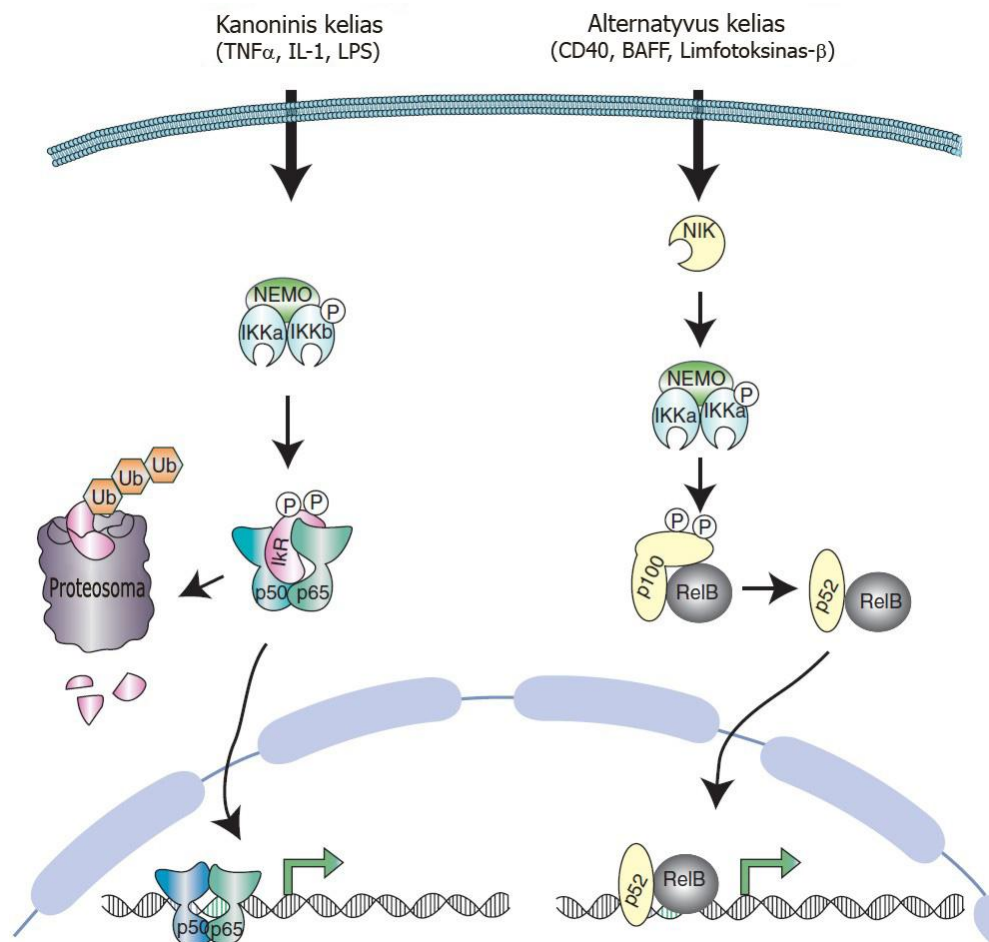
24 pav. Sąveika tarp HBV šerdies baltymo mutantų ir FLJ20850 baltymo GST ištraukimo eksperimente. GST (neigiama kontrolė) ir su GST sulieti baltymai prikabinti prie to paties kiekio glutationo-agarozės rutuliukų ir palikti sąveikauti su HA-pažymėtais baltymais. Mėginiai kruopščiai atplauti ir analizuoti imunoblotingo pagalba naudojant anti-GST (viršuje) ir anti-HA (apačioje) antikūnus. 1: GST + HBc1; 2: GST-FLJ20850 + Wt; 3: GST-FLJ20850 + HBc1; 4: GST-FLJ20850 + HBc2. Wt: laukinio tipo HBV šerdies baltymas; HBc1: šerdies baltymo mutantas, turintis 86-93 ar. iškritą; HBc2: šerdies baltymo mutantas su 77-93 ar. iškrita.

Apibendrinant FLJ20850 baltymo tyrimus galima teigti, kad panaudojant mielių dviejų hibridų sistemą atrinktas nežinomos funkcijos ir neturintis reikšmingos homologijos su kitais baltymais, bet gana konservatyvus tarp žinduolių rūšių baltymas FLJ20850. Šis daugelyje žmogaus audinių aptinkamas baltymas gali sąveikauti su HBc mutantais, turinčiais iškritas centrinėje baltymo dalyje, bet ne su laukinio tipo šerdies baltymu. Nustatyta, kad šią sąveiką apsprendžia mutantinių šerdies baltymų dalis, kurioje yra iškritos, o bet koks žymesnis FLJ20850 baltymo sutrumpinimas šiai sąveikai trukdo. Kokią funkciją ląstelėje atlieka aptiktas baltymas ir kokią vaidmenį jo sąveika su HBc šerdies mutantais atlieka padidintoje mutantinių virusų patogenezėje, dar reikia nustatyti.

3.4.2. IKK γ (NEMO)

Kitas tirtas tik su mutantiniais HBc sąveikaujantis baltymas – IKK γ (IkB kinazės komplekso gama subvienetas), dar vadinamas NEMO (angl. *NF- κ B essential modulator*, NF- κ B esminis modulatorius) – būtinas IKK komplekso, reguliuojančio transkripcijos veiksnio NF- κ B aktyvumą, susidarymui [50, 99]. Transkripcijos veiksnys NF- κ B atlieka esminį vaidmenį įgimto ir įgyto imuninio atsako reguliavime, uždegiminiuose, apoptozės ir vėžiniuose procesuose [107]. Neaktyvioje būsenoje NF- κ B yra susietas su mažais citoplazminiais baltymais IkB. Įvairūs veiksniai, pavyzdžiui TNF- α (navikų nekrozės veiksnys alfa), bakterijų lipopolisacharidai ar antigenų receptoriai per įvairius tarpinius baltymus aktyvuoja IKK kompleksą, kuris fosforilina du IkB baltymų serinus. Taip pažymėti IkB baltymai degraduojami proteasomose ir nebeblokuoja į branduolį nukreipiančios NF- κ B baltymų sekos, todėl šie keliauja į branduolį ir ten aktyvuoja įvairių prouždegiminių ir priešapoptozinių genų raišką. Transgeninių pelių su neveikliais IKK α arba IKK β genais tyrimai atskleidė, kad IKK β subvienetas daugiausia reguliuoja aprašytąjį kanoninį NF- κ B aktyvavimo kelią, o IKK α svarbus antrajam, alternatyviam NF- κ B

aktyvavimo keliui, kurio metu atsiranda aktyvūs RelB-p52 heterodimerai. Kanoniniam aktyvavimo keliui yra būtinas IKK γ , tuo tarpu alternatyvus kelias gali be jo apsieiti, bet jam reikalinga kinazė NIK (25 pav.). Vis tik nauji duomenys rodo, kad tarp šių kelių nėra griežtos takoskyros, ir abiejuose keliuose dalyvauja abi kinazės, tik šiek tiek skirtingu lygiu.



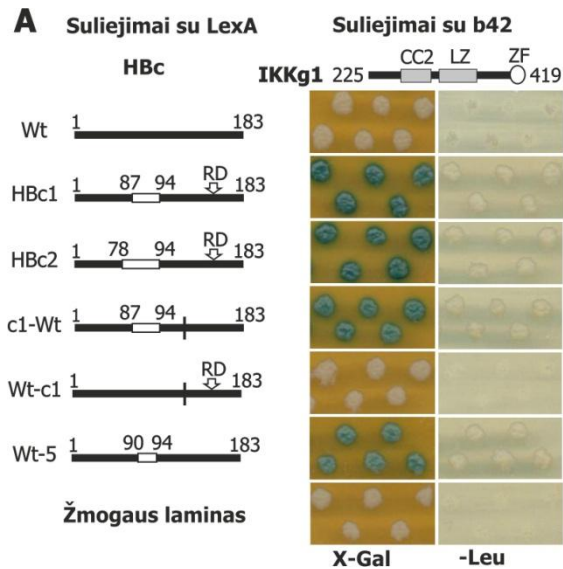
25 pav. Kanoninis ir alternatyvus NF- κ B aktyvavimo keliai. Kanoninį kelią sužadina TNF- α , IL-1 ar LPS, o įvairūs tarpiniai baltymai per IKK γ (NEMO) aktyvuoja IKK. Aktyvuota kinazė IKK β fosforilina tam tikrus I κ B serinus, šis slopiklis ubikvitilinas ir degraduojamas proteasomose. Atsilaisvinęs NF- κ B dimeras transportuojamas į branduolį ir sužadina tikslinių genų raišką. Alternatyviam keliui reikalingas NIK (NF- κ B indukuojanti kinazė) vykdomas IKK α aktyvavimas. IKK α fosforilina NF- κ B subvienetą p100, šis skaidomas į p52. Tokiu būdu susidaro aktyvus transkripcijos veiksnys iš p52-RelB dimerų, aktyvuojantis tikslinius genus. Pagal Oeckinghaus ir Ghosh [83].

Buvo bandoma nustatyti, kuri HBc mutantinių baltymų sritis sąveikauja su IKK γ baltymu. Čia, kaip ir FLJ20850 baltymo atveju, sąveikauti galėtų ne tik iškritą turinti sritis, bet ir sveikame baltyme neprieinamos sritys, atsivėrusios dėl iškritos pakitus baltymo erdvinei struktūrai ar jos stabilumui. Taip pat

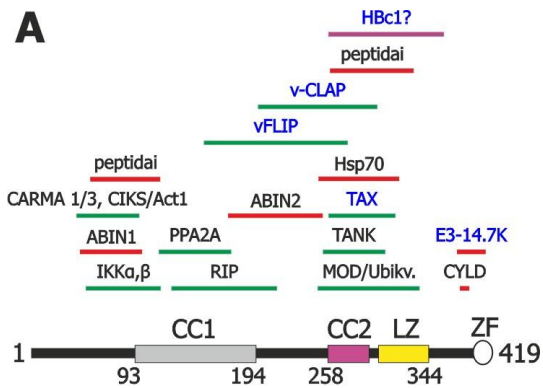
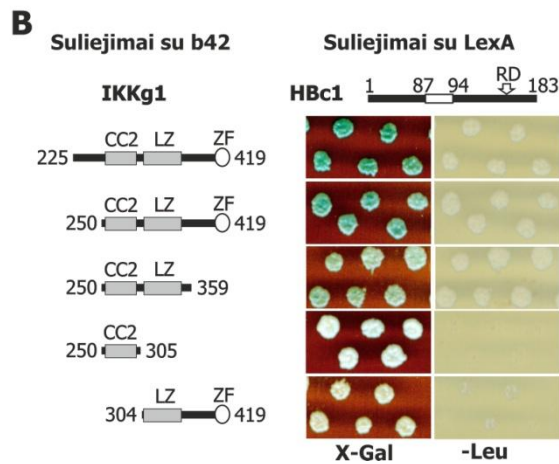
reikėjo nustatyti ar genotipui A priklausančiuose HBc mutantuose 152-153 pozicijose esančios papildomos arginino ir asparagino amino rūgštys neįtakoja jų sąveikos su IKK γ , kadangi su IKK γ nesąveikaujantis genotipui D priklausantis laukinio tipo HBc baltymas šių amino rūgščių neturi.

Šiems baltymų sąveikos eksperimentams atlikti buvo panaudotos sąveikai su FLJ20850 baltymu tirti sukonstruotos HBc baltymų formos. Laukinio tipo HBc šerdies baltymo N-galo dalis sulieta su HBc1 baltymo C-galo dalimi (Wt-c1) nesąveikavo su IKK γ , o HBc1 šerdies baltymo N-galo dalis sulieta su wt HBc baltymo C-galo dalimi (c1-Wt) sąveikavo su IKK γ . Šie rezultatai rodo, kad sąveiką apsprendžia iškritą turinti HBc1 baltymo dalis, o ne dvi A genotipui būdingos C-dalyje esančios papildomos amino rūgštys (**26 pav. A**). Siekiant nustatyti ar iškritų įvedimas padaro wt HBc baltymą sąveikaujančiu su IKK γ , buvo panaudota wt HBc baltymo konstrukcija su 89-93 ar. iškrita ir nustatyta, kad toks HBc mutantas sąveikuoja su IKK γ (**26 pav. A**). Taigi, iškritos HBc centrinėje dalyje suteikia šiam baltymui gebėjimą sąveikauti su IKK γ , bet, kaip ir sąveikos su FLJ20850 baltymu atveju, lieka neaišku, kurios mutantinių HBc baltymų amino rūgštys tiesiogiai dalyvauja šioje sąveikoje.

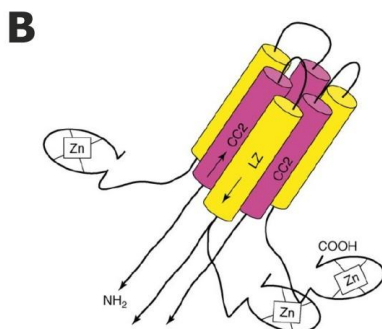
IKK γ yra 419 ar. ilgio labai konservatyvus baltymas, kuriame išskirta keletas domenų ir nustatyta keletas funkciškai svarbių sričių. Šiame darbe klonuota kDNR seka koduoja 195 C-galo IKK γ baltymo amino rūgštis, kurios apima antrąją spiralizuotų vijų sritį, leucino užtrauktuko ir cinko piršto domenų. Siekiant nustatyti, kurios IKK γ baltymo sritys reikalingos sąveikai su mutantiniais HBc, buvo sukonstruotos sutrumpintos baltymo formos, turinčios visus tris domenų (250-419 ar.), antrąją spiralizuotų vijų sritį ir leucino užtrauktuko domeną (250-359 ar.), leucino užtrauktuko domeną ir cinko pirštų domeną (304-419 ar.), vien antrąją spiralizuotų vijų sritį (250-305 ar.). Eksperimentai mielių dviejų hibridų sistemoje parodė, kad sąveikai reikalinga antroji spiralizuotų vijų sritis ir leucino užtrauktuko domenas, nors visas už 250 ar. esantis baltymo C-galas sąveikuoja šiek tiek stipriau nei sutrumpintas (**26 pav. B**).



26 pav. HBV šerdies baltymo mutantų sąveika su IKK γ baltymu. **A:** Bandymas nustatyti HBV šerdies baltymo mutantų sąveikos sritis. Wt: laukinio tipo HBV šerdies baltymas; Hbc1 ir Hbc2: HBV šerdies baltymo mutantai; c1-Wt: hibridinis šerdies baltymas, turintis Hbc1 mutanto N-galą ir Wt baltymo C-galą (vertikalus brūkšnelis parodo sujungimo vietą); Wt-c1: hibridinis šerdies baltymas iš Wt baltymo N-galo ir Hbc1 mutanto C-galo; Wt-5: Wt Hbc su įvesta penkių amino rūgščių iškrita centrinėje dalyje. RD: dvi papildomos amino rūgštys, kurių nėra Wt baltyme. Balta sritis žymi iškritą. **B:** Bandymas nustatyti IKK γ baltymo sąveikos sritis. CC2: antroji spiralizuotų vijų sritis; LZ – leucino užtrauktuko domenai; ZF – cinko pirštų domenai.



27 pav. IKK γ /NEMO baltymo schema. **A:** Nemo baltymo domeninė struktūra ir baltymo sritys, su kuriomis sąveikauja kiti baltymai. CC1 ir CC2 – spiralizuotų vijų sritys, LZ – leucino užtrauktuko domenai, ZF – cinko pirštų domenai. Žaliais brūkšneliais pažymėtos aktyvuojančių baltymų sąveikos vietos, raudonais – slopinančių aktyvavimą baltymų sąveikos vietos. Virusinių baltymų pavadinimai užrašyti mėlynais rašmenimis. **B:** Aktyvaus IKK γ trimero C-galo schema.



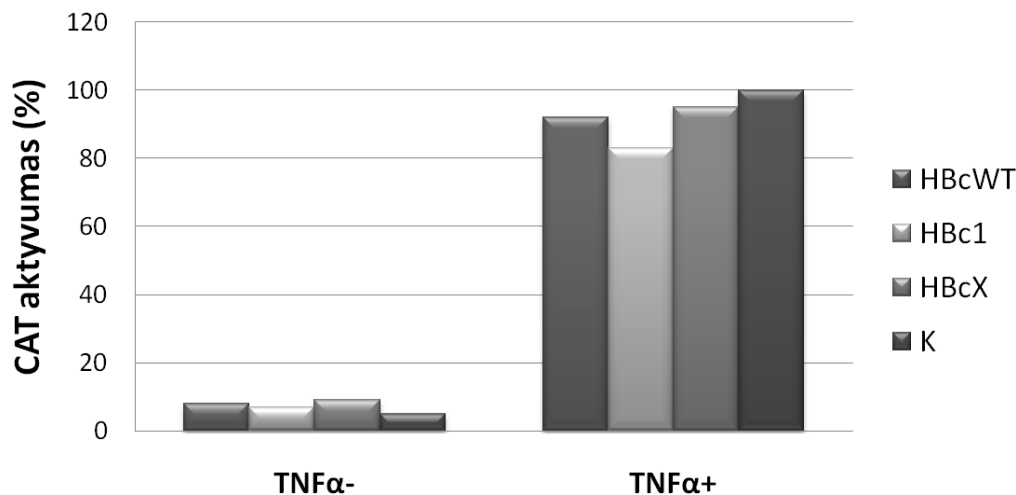
Nors tikslus IKK aktyvavimo mechanizmas nenustatytas, jau aišku kad jame naudojamos įvairios skirtingų IKK subvienetų potransliacinės modifikacijos – fosforilinami du IKK α ir IKK β serinai, kartais ubikvitilinas ir įvairiose vietose fosforilinamas IKK γ [31]. Nustatyta kad aktyvus yra IKK γ trimeras arba tetrameras [35], o jo oligomerizaciją paprastai sukelia signalą perduodantis ląstelės baltymas RIP [88]. IKK γ oligomerizaciją apsprendžia du domenai – minimalus oligomerizacijos domenas (MOD) yra C-gale (250–360 ar.), o N-gale yra kitas domenas, persidengiantis su sritimi, sąveikaujanti su kitomis IKK kinazėmis. Pastebėta, kad peptidai, trukdantys N-galo sąveikai su kitomis IKK komplekso kinazėmis [4] arba C-galo apsprendžiamai oligomerizacijai [123], slopina išorinio signalo sukeliama NF- κ B aktyvavimą. Dėl savo svarbaus vaidmens imuninio atsako reguliavime, NF- κ B kelias yra įvairių virusinių baltymų taikinyje, kai kurie iš jų šį signalinį kelią įtakoja sąveikaudami su IKK γ . ŽTLV1 Tax baltymas [61], Kapoši sarkomos herpeso viruso vFLIP baltymas [3] ir arklių herpeso viruso 2 baltymas vCLAP [89] aktyvuoja IKK kompleksą ir NF- κ B, sukeldami IKK γ oligomerizaciją. Antro tipo adenovirusų E3-14.7K baltymo [51] ir karvės raupų viruso virulentiškumo veiksnio B14 [19] sąveika su IKK γ trukdo komplekso aktyvavimui. Surinkti duomenys rodo, kad įvairūs su skirtingomis IKK γ sritimis sąveikaujantys baltymai gali arba aktyvuoti IKK kompleksą, arba trukdyti jo aktyvavimui (27 pav.). Vieni baltymai, sąveikaudami su ta pačia IKK γ sritimi kaip ir mutantiniai HBc baltymai – antrąją spiralizuotų vijų sritimi ir leucino užtrauktuko domenu – aktyvuoja IKK kompleksą, kiti jį slopina. Taigi, ir mutantiniai HBc baltymai IKK γ aktyvumą galėtų įtakoti dviem visiškai priešingais būdais – sukelti jo oligomerizaciją ir taip aktyvuoti, arba trukdyti oligomerizacijai ir tuo pačiu išorinių veiksnių sužadinamam aktyvavimui.

Apie IKK komplekso aktyvavimą paprastai sprendžiama netiesiogiai – įvertinant NF- κ B aktyvumą. O NF- κ B aktyvumas įvertinamas dviem pagrindiniais būdais. Pirmuoju būdu išgryninami ląstelių branduoliai ir bandoma juose aptikti pačius NF- κ B baltymus arba nustatyti branduolių

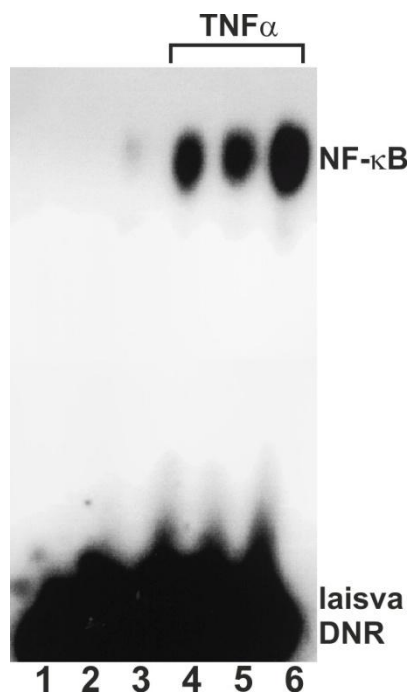
ekstraktais paveiktų radioaktyvių oligonukleotidų, turinčių NF- κ B surišamą seką, elektroforetinio judėjimo sulėtėjimą. Antruoju būdu naudojama plazmidė, kurioje tam tikro reporterinio geno raišką valdo NF- κ B reguliuojamos sekos. Siekiant nustatyti, kaip mutantiniai HBc baltymai įtakoja IKK kompleksą, buvo panaudoti abu metodai. Šie darbai atlikti Humbolto universiteto Medicininės virusologijos institute (Berlynas, Vokietija).

Pirmame eksperimente buvo panaudotos žmogaus granulocitų-monocitų pirmtakų ląstelių linija HL-60 ir plazmidė pRR55, kurioje chloramfenikolo acetiltransferazės (CAT) genas yra valdomas ŽCMV ankstyvojo promotoriaus. Nustatyta, kad šį promotorių mažai specializuotose ląstelėse reguliuoja NF- κ B. Ląstelės buvo transfekuotos plazmidėmis, kuriose su ŽCMV ankstyvuoju promotoriumi sulieti HBc wt genas (pRL-CMV-HBc), mutantas HBc1 (pRL-CMV-HBc1) ir kontrolinė plazmidė, kurioje įterptas apverstas HBc wt genas (pRL-CMV-HBcX). Dalis kiekvienos grupės transfekuotų ląstelių prieš CAT aktyvumo nustatymą buvo paveikta TNF- α , sužadinančio kanoninį NF- κ B aktyvavimo kelią. Išmatavus kiekvieno mėginio CAT aktyvumą paaiškėjo, kad nė viena plazmidė neaktyvavo NF- κ B, bet taip pat nepastebėta ir žymesnio TNF- α sukkelto NF- κ B aktyvumo slopinimo (**28 pav.**).

Kito eksperimento metu panaudotas EMSA (elektroforetinio judrumo poslinkio tyrimas). Žmogaus hepatocitų ląstelių linija Huh7 buvo transfekuota jau aprašytomis plazmidėmis pRL-CMV-HBc ir pRL-CMV-HBc1. Prieš ląstelių suardymą dalis kiekvienos grupės ląstelių buvo paveikta TNF- α , po to išgryninti jų branduoliai. Išgrynintų branduolių baltymų ekstraktai buvo sumaišyti su radioaktyviai pažymėtais NF- κ B atpažinimo seką turinčiais oligonukleotidais bei nespecifiniais nepažymėtais oligonukleotidais. Buvo vykdoma reakcijos mėginių elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir autoradiografijos būdu analizuojamas žymėtų oligonukleotidų judrumo poslinkis. Kaip ir praeitame eksperimente, nustatyta kad nė viena plazmidė neaktyvavo NF- κ B, nepastebėta ir ryškaus TNF- α aktyvuoto NF- κ B aktyvumo slopinimo (**29 pav.**).



28 pav. HBc baltymų įtakos NF-κB aktyvumui nustatymas įvertinant NF-κB reguliuojamo promotoriaus aktyvumą. Mažai diferencijuotos žmogaus ląstelės HL-60 buvo transfekuotos plazmidėmis pRR55 (joje CAT genas sulietas su NF-κB reguliuojamu ŽCMV promotoriumi) ir pRL-CMV-HBcWT, pRL-CMV-HBc1 arba pRL-CMV-HBcX, kuriose su ŽCMV promotoriumi sulieti atitinkamai HBc wt, mutanto HBc1 arba apverstas HBc wt genai. K – kontrolinės, vien plazmide pRR55 transfekuotos ląstelės. Viena grupė ląstelių valandą prieš suardymą paveikta TNF-α. CAT aktyvumas įvertintas procentais, prilyginant transfekuotų vien pRR55 plazmide ir paveiktų TNF-α ląstelių aktyvumą 100%.



29 pav. HBc baltymų įtakos NF-κB aktyvumui nustatymas EMSA metodu. Žmogaus hepatocitų ląstelių linija Huh7 buvo transfekuota plazmidėmis pRL-CMV-HBc (1 ir 4 takeliai) ir pRL-CMV-HBc1 (2 ir 5 takeliai), kuriose su ŽCMV promotoriumi sulieti atitinkamai HBc wt ir mutantas HBc1. Takeliuose 3 ir 6 – netransfekuotų Huh7 ląstelių mėginiai. Viena grupė ląstelių (4-6 takeliai) valandą prieš suardymą paveikta TNF-α. Susirišę su branduolių ekstraktuose esančiais baltymais NF-κB atpažinimo seką turintys oligonukleotidai matomi viršuje, o laisvi – apačioje.

Remiantis dviem aprašytais eksperimentais galima būtų teigti, kad mutantas HBc1 savarankiškai neaktyvuoja NF-κB, bet negalima tvirtai teigti, kad jis netrukdo NF-κB aktyvavimui. Visų pirma, nors buvo naudojamas vienas stipriausių žmogaus ląstelėse veikiančių promotorių, HBc baltymų sintezė, ypač mutantinių formų, žmogaus ląstelėse buvo silpna. Be to, kadangi tiriamų

Hbc genų raiškai naudojamas promotorius turi NF-κB surišimo sekų, trukdydamas NF-κB aktyvavimui mutantas Hbc1 galėtų slopinti ir savo paties sintezę. Taip pat yra galimybė, kad TNF-α gali aktyvuoti NF-κB ir apeidamas IKKγ, nes neseniai nustatyta, kad TNF-α baltymas IKK kompleksą aktyvuoja dviem nepriklausomais būdais – tarpiniai signaliniai baltymai MAP3K fosforilina IKKβ, o kitas tarpinis baltymas TRAF2 kol kas nenustatytu būdu sukelia IKKγ ubikvitilinimą [68]. Tad reikėtų iširti ir mutantinių Hbc įtaką kitų signalų sužadynamam NF-κB aktyvavimui, taip pat Hbc baltymų raiškai žmogaus ląstelėse reikėtų bandyti panaudoti kitus promotorius ar kitas ląstelių linijas.

Nors dar neaišku, kaip NF-κB aktyvumą ar kitus ląstelės procesus įtakoja Hbc1 sąveika su IKKγ, tikėtina, kad ji gali būti svarbi mutantinių HBV virusų sukeliams kepenų pažeidimams. Pastebėta, kad IKKγ geno neturinčios transgenines pelės žūna embriono stadijoje daugiausia dėl masinės hepatocitų žūties ir kepenų neišsivystymo [102]. Buvo sukurtos ir pelės, kurios neturi IKKγ geno tik kepenyse – jų kepenys irgi buvo smarkiai pažeistos [6]. Transkripcijos veiksnys NF-κB suaugusio žmogaus kepenyse paprastai nėra labai aktyvus, bet atlieka svarbią funkciją įvairiuose patologiniuose procesuose. Pastebėta, kad jis yra pastoviai aktyvuotas kepenų karcinomos ląstelėse, jo aktyvumas reikalingas kepenų regeneracijos procesuose, vykstančiuose hepatitų metu [80]. Slopinant NF-κB aktyvumą galima prislopinti vėžinių ląstelių dauginimąsi, bet jo aktyvumo slopinimas ląstelėse, kurias veikia TNF-α, sukelia šių ląstelių žūtį. NF-κB aktyvumą aktyviai reguliuoja žmogaus hepatito virusai B bei C, ir tas reguliavimas glaudžiai susijęs su jų sukeliamais patogeniniais procesais. Aktyviausiai tai daro patogeniškesnis C virusas, kurio bent keli baltymai reguliuoja NF-κB aktyvumą, o aktyviausiai – šerdies baltymas [113]. Aptikti ir hepatito C viruso mutantai, skirtingai veikiantys NF-κB aktyvumą [71].

Hepatito B infekcijos metu NF-κB veiksnį aktyvuoja virusinis X baltymas [21].

Kadangi HBV viruso genome yra NF- κ B surišimo sekos, X baltymas tokiu būdu skatina HBV dauginimąsi. Jei mutantiniai HBc genai slopina kitų veiksnių sukeltą NF- κ B aktyvumą, šis slopinimas galėtų sukelti hepatocitų žūtį ir taip įtakoti bent kai kuriuos su mutantiniais HBc baltymais siejamus patogeninius pokyčius.

3.5. Rezultatų apibendrinimas

Šiame darbe buvo tyrinėjami HBV šerdies baltymų ir padidinto patogeniškumo mutantų tarpusavio sąveika bei jų visų sąveika su žmogaus kepenų baltymais. Naudojant mielių dviejų hibridų sistemą nustatyta, kad dauguma mutantinių HBc baltymų negali sąveikauti tarpusavyje. Šis rezultatas paremia prielaidą, kad pacientų organizmuose šalia mutantinių virusų visada aptinkami laukinio tipo virusai reikalingi dėl pirmųjų nesugebėjimo suformuoti pilnavertes šerdies daleles. Taip pat nustatyta, kad kai kurių mutantinių virusų pakitę HBc baltymai gali sąveikauti su laukinio tipo HBc. Šis rezultatas paremia prielaidą, kad prie šių mutantinių virusų vykdomo laukinio tipo HBV replikacijos slopinimo gali prisidėti ir pakitusių HBc baltymų sąveika su laukinio tipo HBc, taip galimai suformuojant netaisyklingas, greitai degraduojamas daleles.

Žmogaus kepenų kDNR bibliotekoje dviejų hibridų metodu ieškant baltymų, sąveikaujančių su laukinio tipo arba mutantiniais HBc baltymais, atrinkti dviejų tipų žmogaus baltymai – sąveikaujantys vien su mutantais HBc1 bei HBc2 ir sąveikaujantys tiek su mutantiniais, tiek ir su laukinio tipo HBc baltymais. Su visomis tirtomis HBc atmainomis sąveikavo GIPC1, GIPC2, ribosominis baltymas L5 ir fibrinogenai alfa bei gama. Detaliau tiriant HBc baltymų sąveiką su GIPC1 baltymu nustatyta, kad tarpusavyje sąveikauja HBc baltymo C-galas ir GIPC1 baltymo PDZ domenas. HBc baltymo C-gale aptiktas PDZ domenų atpažįstamos sekos motyvas ir parodyta, kad šios sekos pokyčiai įtakoja HBc sąveiką su GIPC1. HBc ir GIPC1 sąveika patvirtinta GST ištraukimo metodu. Detaliau tiriant HBc ir GIPC2 sąveiką nustatyta, kad šiuo atveju taip pat sąveikauja HBc C-galas ir GIPC2 PDZ domenas, o galinių HBc baltymo amino rūgščių seka įtakoja šių baltymų tarpusavio sąveiką.

Vien su mutantais HBc1 ir HBc2 sąveikavo žmogaus baltymai FLJ20850, IKKγ (NEMO), KIF13A, NOTCH2NL, fumarazė ir CASKIN2. Pirmą kartą aprašomo nežinomos funkcijos žmogaus baltymo FLJ20850 raiška ir geno struktūra

apibūdinta pasinaudojant bioinformatinėmis duomenų bazėmis. Detaliau tiriant HBc mutantų ir FLJ20850 sąveiką nustatyta, kad šiai sąveikai vykti reikalinga natūraliai aptinkama arba dirbtinai įvesta HBc centrinės dalies iškrita, o pašalinus pasirinktas FLJ20850 sritis ši sąveika nevyko. Mutanto HBc1 ir FLJ20850 sąveika patvirtinta GST ištraukimo metodu. Detaliau tiriant HBc mutantų ir IKK γ sąveiką nustatyta, kad šiai sąveikai vykti reikalinga natūraliai aptinkama arba dirbtinai įvesta HBc centrinės dalies iškrita, o IKK γ baltyme šią sąveiką apsprendžia antroji spiralizuotų vijų sritis ir leucino užtrauktuko domenai. Gerai žinoma, kad IKK γ baltymo reguliuojamo transkripcijos veiksnio NF- κ B aktyvumą įtakoja daugelis virusų, šis transkripcijos reguliatorius labai svarbus ir kepenų patogenezėje. Bet mutanto HBc1 vykdomo NF- κ B aktyvavimo ar žymesnio jo slopinimo žmogaus ląstelėse naudotais metodais aptikti nepavyko.

Darbo metu gauti rezultatai nurodo naujas laukinio tipo ir mutantinių HBV sąveikos su šeimininko ląstele tyrimų kryptis ir parodo potencialiai svarbius šiai sąveikai žmogaus baltymus. Detalus šių baltymų reikšmės HBV replikacijos ciklui ir įvairių viruso atmainų patogeniškumui ištyrimas, kai kurių aptiktų baltymų funkcijos ląstelėje nustatymas, galėtų praplėsti virusų biologijos ir patogeniškumo supratimą bei padėtų kurti naujas kovos su jais priemones.

4. IŠVADOS

1. Panaudojant mielių dviejų hibridų sistemą atrinkti žmogaus baltymai GIPC1, GIPC2, RPL5 ir fibrinogenai alfa bei gama, sąveikaujantys su hepatito B viruso šerdies baltymu.
2. Atrinkti žmogaus baltymai FLJ20850, IKK γ (NEMO), KIF13A, NOTCH2NL, fumarazė ir CASKIN2, sąveikaujantys su padidinto patogeniškumo mutantu, bet ne su laukinio tipo HBc.
3. GIPC1 sąveiką su HBc apsprendžia GIPC1 baltymo PDZ domenas ir HBc baltymo C-galas, kuriame aptikta tipinė PDZ domenų atpažinimo seka, ir parodyta, kad šios sekos amino rūgščių sudėtis įtakoja baltymų tarpusavio sąveiką.
4. GIPC2 baltymo PDZ domenas sąveikauja su HBc baltymo C-gale aptikta tipine PDZ domenų atpažinimo seka.
5. Nežinomos funkcijos baltymo FLJ20850 ir mutanto HBc1 sąveiką apsprendžia natūraliai atsiradusi arba dirbtinai įvesta iškrita centrinėje HBc baltymo dalyje. Naudojantis duomenų bazėmis, preliminariai apibūdintas FLJ20850 baltymo genas ir jo raiška skirtinguose audiniuose.
6. IKK γ sąveiką su mutantu HBc1 apsprendžia IKK γ baltymo antroji spiralizuotų vijų sritis ir leucino užtrauktuko domenas bei natūraliai atsiradusi arba dirbtinai įvesta iškrita centrinėje HBc baltymo dalyje. Tirta HBc1 baltymo įtaka transkripcijos veiksnio NF- κ B aktyvumui žmogaus ląstelėse, bet nei NF- κ B aktyvavimo, nei reikšmingesnio jo slopinimo neaptikta.

PADĒKA

Esu dēkingas darbo vadovui Prof. habil. dr. Kęstučiui Sasnauskui už galimybę dirbti, tyrimų organizavimą ir vertingas idėjas.

Taip pat dēkingas prof. Paul Pumpens (Biomedicīninių tyrimų ir studijų centras, Latvijas universitetas, Ryga, Latvija) už suteiktus genus, antikūnus, eksperimentų idėjas, bei vertingas diskusijas.

Dēkingas ir dr. Helga Meisel bei dr. Susanna Prosch (Virusologijos institutas, Universitetinė Charité ligoninė, Berlynas, Vokietija) už suteiktus genus, diskusijas ir galimybę atlikti eksperimentus.

Dėkoju Eukariotų genų inžinerijos laboratorijos kolektyvui už pagalbą darbe ir diskusijas.

Šių darbų vykdymui finansinė parama buvo gauta iš ES INCO-COPERNICUS projekto IC15-CT98-0319 "Molecular monitoring and pathological role of HCV, HGV and altered HBV genomes in Baltic countries" (1999-2001 m.).

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Su disertacijoje pateikta medžiaga susijusios publikacijos:

Razanskas R, Sasnauskas K. 2010. Interaction of hepatitis B virus core protein with human GIPC1. *Archives of Virology*. 155(2):247-50.

Razanskas R, Sasnauskas K. 2009. A novel human protein is able to interact with hepatitis B virus core deletion mutant but not with the wild-type protein. *Virus Research*. 146(1-2):130-4.

Ražanskas R, Sasnauskas K. 2003. Human proteins interacting with human hepatitis B core antigen. *Biologija*. 1:59-61.

Su disertacija nesusijusios publikacijos:

Pumpens P, **Razanskas R**, Pushko P, Renhof R, Gusars I, Skrastina D, Ose V, Borisova G, Sominskaya I, Petrovskis I, Jansons J, Sasnauskas K. 2002. Evaluation of HBs, HBc, and frCP Virus-Like Particles for Expression of Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Epitopes. *Intervirology*. 45(1):24-32.

Ražanskas R, Pumpens P, Pushko P, Sasnauskas K. 2000. Immunogenicity of chimeric HBsAg-HPV16 E7 viral protein. *Biologija*. 1:42-44.

Sasnauskas K, Buzaitė O, Vogel F, Jandrig B, **Razanskas R**, Staniulis J, Scherneck S, Krüger DH and Ulrich R. 1999. Yeast cells allow the high-level expression and formation of polyomavirus - virus like particles. *Biological Chemistry*. 380:381-386.

Razanskas R. 1997. Construction and expression of hybrid genes carrying HBV HBs and HPV type 16 E7 coding sequences in yeast. *Biologija*. 1:44-46.

Ražanskas R, Pumpens P, Sasnauskas K. 1996. Construction and expression in yeast hybrid genes carrying HIV1 gp120 V3-loop coding sequence. *Biologija* 2:45-47.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aasland R, Abrams C, Ampe C, Ball LJ, Bedford MT, Cesareni G, Gimona M, Hurley JH, Jarchau T, Lehto VP ir kt. **Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains.** *FEBS Lett.* 2002; 513(1): 141-144.
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., red. **Short protocols in molecular Biology.** New York: Wiley; 1999.
3. Bagneris C, Ageichik AV, Cronin N, Wallace B, Collins M, Boshoff C, Waksman G, Barrett T. **Crystal structure of a vFlip-IKKgamma complex: insights into viral activation of the IKK signalosome.** *Mol Cell.* 2008; 30(5): 620-631.
4. Baima ET, Guzova JA, Mathialagan S, Nagiec EE, Hardy MM, Song LR, Bonar SL, Weinberg RA, Selness SR, Woodard SS ir kt. **Novel insights into the cellular mechanisms of the anti-inflammatory effects of NF-[kappa]B essential modulator (NEMO)binding domain peptides.** *J Biol Chem.* 2010.
5. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Marshall KA ir kt. **NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data.** *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(Database issue): D885-890.
6. Beraza N, Malato Y, Sander LE, Al-Masaoudi M, Freimuth J, Riethmacher D, Gores GJ, Roskams T, Liedtke C, Trautwein C. **Hepatocyte-specific NEMO deletion promotes NK/NKT cell- and TRAIL-dependent liver damage.** *J Exp Med.* 2009; 206(8): 1727-1737.
7. Bichko V, Pushko P, Dreilina D, Pumpen P, Gren E. **Subtype ayw variant of hepatitis B virus. DNA primary structure analysis.** *FEBS Lett.* 1985; 185(1): 208-212.
8. Birnbaum F, Nassal M. **Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein.** *J Virol.* 1990; 64(7): 3319-3330.
9. Bock CT, Buerke B, Tillmann HL, Tacke F, Kliem V, Manns MP, Trautwein C. **Relevance of hepatitis B core gene deletions in patients after kidney transplantation.** *Gastroenterology.* 2003; 124(7): 1809-1820.
10. Bomsel M, Alfsen A. **Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(1): 57-68.
11. Bottcher B, Wynne SA, Crowther RA. **Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy.** *Nature.* 1997; 386(6620): 88-91.
12. Bouchard MJ, Schneider RJ. **The enigmatic X gene of hepatitis B virus.** *J Virol.* 2004; 78(23): 12725-12734.
13. Braun S, Zajakina A, Aleksejeva J, Sharipo A, Bruvere R, Ose V, Pumpens

- P, Garoff H, Meisel H, Kozlovska T. **Proteasomal degradation of core protein variants from chronic hepatitis B patients.** *J Med Virol.* 2007; 79(9): 1312-1321.
14. Breitkreutz BJ, Stark C, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Livstone M, Oughtred R, Lackner DH, Bahler J, Wood V et al. **The BioGRID Interaction Database: 2008 update.** *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Database issue): D637-640.
 15. Bruss V. **Hepatitis B virus morphogenesis.** *World J Gastroenterol.* 2007; 13(1): 65-73.
 16. Bunn RC, Jensen MA, Reed BC. **Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton.** *Mol Biol Cell.* 1999; 10(4): 819-832.
 17. Burge C, Karlin S. **Prediction of complete gene structures in human genomic DNA.** *J Mol Biol.* 1997; 268(1): 78-94.
 18. Cai H, Reed RR. **Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1.** *J Neurosci.* 1999; 19(15): 6519-6527.
 19. Chen RA, Ryzhakov G, Cooray S, Randow F, Smith GL. **Inhibition of IκappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14.** *PLoS Pathog.* 2008; 4(2): e22.
 20. Chisari FV, Ferrari C. **Hepatitis B virus immunopathogenesis.** *Annu Rev Immunol.* 1995; 13: 29-60.
 21. Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. **Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF-κappaB and the mitochondrial permeability transition pore.** *J Virol.* 2009; 83(10): 4718-4731.
 22. Cosgriff TM. **Viruses and hemostasis.** *Rev Infect Dis.* 1989; 11 Suppl 4: S672-688.
 23. Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. **Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy.** *Cell.* 1994; 77(6): 943-950.
 24. Cummings KL, Waggoner SN, Tacke R, Hahn YS. **Role of complement in immune regulation and its exploitation by virus.** *Viral Immunol.* 2007; 20(4): 505-524.
 25. De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farquhar MG. **GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(21): 12340-12345.
 26. Delevoye C, Hurbain I, Tenza D, Sibarita JB, Uzan-Gafsou S, Ohno H, Geerts WJ, Verkleij AJ, Salamero J, Marks MS et al. **AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis.** *J Cell Biol.* 2009; 187(2): 247-264.
 27. Dienstag JL. **Hepatitis B virus infection.** *N Engl J Med.* 2008; 359(14):

- 1486-1500.
28. Dyer MD, Murali TM, Sobral BW. **The landscape of human proteins interacting with viruses and other pathogens.** *PLoS Pathog.* 2008; 4(2): e32.
 29. Dohner K, Nagel CH, Sodeik B. **Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins.** *Trends Microbiol.* 2005; 13(7): 320-327.
 30. Duan Z, Li FQ, Wechsler J, Meade-White K, Williams K, Benson KF, Horwitz M. **A novel notch protein, N2N, targeted by neutrophil elastase and implicated in hereditary neutropenia.** *Mol Cell Biol.* 2004; 24(1): 58-70.
 31. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. **Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO.** *Mol Cell.* 2006; 22(2): 245-257.
 32. Favre-Bonvin A, Reynaud C, Kretz-Remy C, Jalinot P. **Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in transforming growth factor beta signaling and triggers its degradation by the proteasome.** *J Virol.* 2005; 79(7): 4229-4237.
 33. Fields S, Song O. **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature.* 1989; 340(6230): 245-246.
 34. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coggill PC, Sammut SJ, Hotz HR, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL et al. **The Pfam protein families database.** *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Database issue): D281-288.
 35. Fontan E, Traincard F, Levy SG, Yamaoka S, Veron M, Agou F. **NEMO oligomerization in the dynamic assembly of the I κ B kinase core complex.** *FEBS J.* 2007; 274(10): 2540-2551.
 36. Freund SM, Johnson CM, Jaulent AM, Ferguson N. **Moving towards high-resolution descriptions of the molecular interactions and structural rearrangements of the human hepatitis B core protein.** *J Mol Biol.* 2008; 384(5): 1301-1313.
 37. Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. **Viral control of mitochondrial apoptosis.** *PLoS Pathog.* 2008; 4(5): e1000018.
 38. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau JM, Blot V, Janvier S, Arnulf B, van Endert PM, Heveker N, Pique C et al. **Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry.** *J Virol.* 2006; 80(14): 6844-6854.
 39. Gottlieb E, Tomlinson IP. **Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update.** *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(11): 857-866.
 40. Greber UF, Way M. **A superhighway to virus infection.** *Cell.* 2006; 124(4): 741-754.
 41. Guidotti LG, Chisari FV. **To kill or to cure: options in host defense against viral infection.** *Curr Opin Immunol.* 1996; 8(4): 478-483.
 42. Gunther S, Baginski S, Kissel H, Reinke P, Kruger DH, Will H, Meisel H.

- Accumulation and persistence of hepatitis B virus core gene deletion mutants in renal transplant patients are associated with end-stage liver disease.** *Hepatology*. 1996; 24(4): 751-758.
43. Gunther S. **Naturally occurring mutations of hepatitis B virus and outcome of chronic infection: is there an association?** *Eur J Clin Invest*. 2000; 30(9): 751-753.
 44. Hayward SD. **Viral interactions with the Notch pathway.** *Semin Cancer Biol*. 2004; 14(5): 387-396.
 45. Hasson T. **Myosin VI: two distinct roles in endocytosis.** *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 17): 3453-3461.
 46. Hilmer JK, Zlotnick A, Bothner B. **Conformational equilibria and rates of localized motion within hepatitis B virus capsids.** *J Mol Biol*. 2008; 375(2): 581-594.
 47. Hiscott J, Nguyen TL, Arguello M, Nakhaei P, Paz S. **Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses.** *Oncogene*. 2006; 25(51): 6844-6867.
 48. Hsueh YP. **The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function.** *Curr Med Chem*. 2006; 13(16): 1915-1927.
 49. Irshad M, Dhar I. **Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications.** *Med Princ Pract*. 2006; 15(6): 405-416.
 50. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A. **Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation.** *Cell*. 1998; 93(7): 1231-1240.
 51. Ye J, Xie X, Tarassishin L, Horwitz MS. **Regulation of the NF-kappaB activation pathway by isolated domains of FIP3/IKKgamma, a component of the IkappaB-alpha kinase complex.** *J Biol Chem*. 2000; 275(13): 9882-9889.
 52. Yuan TT, Lin MH, Chen DS, Shih C. **A defective interference-like phenomenon of human hepatitis B virus in chronic carriers.** *J Virol*. 1998; 72(1): 578-584.
 53. Yuan TT, Lin MH, Qiu SM, Shih C. **Functional characterization of naturally occurring variants of human hepatitis B virus containing the core internal deletion mutation.** *J Virol*. 1998; 72(3): 2168-2176.
 54. Jeanneteau F, Diaz J, Sokoloff P, Griffon N. **Interactions of GIPC with dopamine D2, D3 but not D4 receptors define a novel mode of regulation of G protein-coupled receptors.** *Mol Biol Cell*. 2004; 15(2): 696-705.
 55. Jelen F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J. **PDZ domains - common players in the cell signaling.** *Acta Biochim Pol*. 2003; 50(4): 985-1017.
 56. Jonjic S, Babic M, Polic B, Krmpotic A. **Immune evasion of natural killer cells by viruses.** *Curr Opin Immunol*. 2008; 20(1): 30-38.
 57. Kann M, Schmitz A, Rabe B. **Intracellular transport of hepatitis B**

- virus. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(1): 39-47.
58. Katoh M. **GIPC gene family (Review)**. *Int J Mol Med*. 2002; 9(6): 585-589.
 59. Kazaks A, Dishlers A, Pumpens P, Ulrich R, Kruger DH, Meisel H. **Mosaic particles formed by wild-type hepatitis B virus core protein and its deletion variants consist of both homo- and heterodimers**. *FEBS Lett*. 2003; 549(1-3): 157-162.
 60. Kennedy MB. **Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains**. *Trends Biochem Sci*. 1995; 20(9): 350.
 61. Kfoury Y, Nasr R, Hermine O, de The H, Bazarbachi A. **Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF-kappaB pathway**. *Cell Death Differ*. 2005; 12 Suppl 1: 871-877.
 62. Kirikoshi H, Katoh M. **Molecular cloning and characterization of human GIPC2, a novel gene homologous to human GIPC1 and Xenopus Kermit**. *Int J Oncol*. 2002; 20(3): 571-576.
 63. Kirikoshi H, Katoh M. **Up-regulation of GIPC2 in human gastric cancer**. *Int J Oncol*. 2002; 20(6): 1183-1187.
 64. Knipe DM, Howley PM, red. *Fields Virology*. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
 65. Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G. **Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia**. *Leukemia*. 2008; 22(8): 1529-1538.
 66. Leopold PL, Pfister KK. **Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules**. *Traffic*. 2006; 7(5): 516-523.
 67. Letunic I, Doerks T, Bork P. **SMART 6: recent updates and new developments**. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(Database issue): D229-232.
 68. Li H, Lin X. **Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation**. *Cytokine*. 2008; 41(1): 1-8.
 69. Liang TJ. **Hepatitis B: the virus and disease**. *Hepatology*. 2009; 49(5 Suppl): S13-21.
 70. Ma J, Ptashne M. **A new class of yeast transcriptional activators**. *Cell*. 1987; 51(1): 113-119.
 71. Mann EA, Stanford S, Sherman KE. **Prevalence of mutations in hepatitis C virus core protein associated with alteration of NF-kappaB activation**. *Virus Res*. 2006; 121(1): 51-57.
 72. Marinos G, Torre F, Gunther S, Thomas MG, Will H, Williams R, Naoumov NV. **Hepatitis B virus variants with core gene deletions in the evolution of chronic hepatitis B infection**. *Gastroenterology*. 1996; 111(1): 183-192.
 73. Marschenz S, Endres AS, Brinckmann A, Heise T, Kristiansen G, Nurnberg P, Kruger DH, Gunther S, Meisel H. **Functional analysis of complex hepatitis B virus variants associated with development of liver cirrhosis**. *Gastroenterology*. 2006; 131(3): 765-780.
 74. Marschenz S, Brinckmann A, Nurnberg P, Kruger DH, Gunther S, Meisel

- H. **Co-replication analyses of naturally occurring defective hepatitis B virus variants with wild-type.** *Virology*. 2008; 372(2): 247-259.
75. Metzger K, Bringas R. **Proline-138 is essential for the assembly of hepatitis B virus core protein.** *J Gen Virol*. 1998; 79 (Pt 3): 587-590.
76. Muders MH, Dutta SK, Wang L, Lau JS, Bhattacharya R, Smyrk TC, Chari ST, Datta K, Mukhopadhyay D. **Expression and regulatory role of GAIP-interacting protein GIPC in pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Res*. 2006; 66(21): 10264-10268.
77. Muders MH, Vohra PK, Dutta SK, Wang E, Ikeda Y, Wang L, Udugamasooriya DG, Memic A, Rupasinghe CN, Baretton GB ir kt. **Targeting GIPC/synectin in pancreatic cancer inhibits tumor growth.** *Clin Cancer Res*. 2009; 15(12): 4095-4103.
78. Mudhakar D, Harashima H. **Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus.** *AAPS J*. 2009; 11(1): 65-77.
79. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanou T, Brechot C, Paterlini-Brechot P. **Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas.** *Gut*. 2005; 54(8): 1162-1168.
80. Muriel P. **NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy.** *J Appl Toxicol*. 2009; 29(2): 91-100.
81. Naccache SN, Hasson T, Horowitz A. **Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(34): 12735-12740.
82. Nourry C, Grant SG, Borg JP. **PDZ domain proteins: plug and play!** *Sci STKE*. 2003; 2003(179): RE7.
83. Oeckinghaus A, Ghosh S. **The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1(4): a000034.
84. Okamoto H, Wang Y, Tanaka T, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M. **Trans-complementation among naturally occurring deletion mutants of hepatitis B virus and integrated viral DNA for the production of viral particles with mutant genomes in hepatoma cell lines.** *J Gen Virol*. 1993; 74 (Pt 3): 407-414.
85. Parkinson H, Kapushesky M, Shojatalab M, Abeygunawardena N, Coulson R, Farne A, Holloway E, Kolesnykov N, Lilja P, Lukk M ir kt. **ArrayExpress--a public database of microarray experiments and gene expression profiles.** *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(Database issue): D747-750.
86. Paun A, Pitha PM. **The innate antiviral response: new insights into a continuing story.** *Adv Virus Res*. 2007; 69: 1-66.
87. Peri S, Navarro JD, Amanchy R, Kristiansen TZ, Jonnalagadda CK, Surendranath V, Niranjana V, Muthusamy B, Gandhi TK, Gronborg M ir

- kt. **Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans.** *Genome Res.* 2003; 13(10): 2363-2371.
88. Poyet JL, Srinivasula SM, Lin JH, Fernandes-Alnemri T, Yamaoka S, Tsichlis PN, Alnemri ES. **Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma /NEMO-mediated oligomerization.** *J Biol Chem.* 2000; 275(48): 37966-37977.
89. Poyet JL, Srinivasula SM, Alnemri ES. **vCLAP, a caspase-recruitment domain-containing protein of equine Herpesvirus-2, persistently activates the Ikappa B kinases through oligomerization of IKKgamma.** *J Biol Chem.* 2001; 276(5): 3183-3187.
90. Preikschat P, Borisova G, Borschukova O, Dislers A, Mezule G, Grens E, Kruger DH, Pumpens P, Meisel H. **Expression, assembly competence and antigenic properties of hepatitis B virus core gene deletion variants from infected liver cells.** *J Gen Virol.* 1999; 80 (Pt 7): 1777-1788.
91. Preikschat P, Kazaks A, Dishlers A, Pumpens P, Kruger DH, Meisel H. **Interaction of wild-type and naturally occurring deleted variants of hepatitis B virus core polypeptides leads to formation of mosaic particles.** *FEBS Lett.* 2000; 478(1-2): 127-132.
92. Preikschat P, Gunther S, Reinhold S, Will H, Budde K, Neumayer HH, Kruger DH, Meisel H. **Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients.** *Hepatology.* 2002; 35(2): 466-477.
93. Ptak RG, Fu W, Sanders-Bear BE, Dickerson JE, Pinney JW, Robertson DL, Rozanov MN, Katz KS, Maglott DR, Pruitt KD ir kt. **Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network.** *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008; 24(12): 1497-1502.
94. Pushko P, Sallberg M, Borisova G, Ruden U, Bichko V, Wahren B, Pumpens P, Magnus L. **Identification of hepatitis B virus core protein regions exposed or internalized at the surface of HBcAg particles by scanning with monoclonal antibodies.** *Virology.* 1994; 202(2): 912-920.
95. Rabe B, Glebe D, Kann M. **Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events.** *J Virol.* 2006; 80(11): 5465-5473.
96. Radtke K, Dohner K, Sodeik B. **Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell.** *Cell Microbiol.* 2006; 8(3): 387-400.
97. Reed BC, Cefalu C, Bellaire BH, Cardelli JA, Louis T, Salamon J, Bloecher MA, Bunn RC. **GLUT1CBP(TIP2/GIPC1) interactions with GLUT1 and myosin VI: evidence supporting an adapter function for GLUT1CBP.** *Mol Biol Cell.* 2005; 16(9): 4183-4201.

98. Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L. **Rational targeting of Notch signaling in cancer.** *Oncogene*. 2008; 27(38): 5124-5131.
99. Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. **IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkkappaB kinase complex.** *Nature*. 1998; 395(6699): 297-300.
100. Rousset R, Fabre S, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P. **The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins.** *Oncogene*. 1998; 16(5): 643-654.
101. Rudchenko S, Scanlan M, Kalantarov G, Yavelsky V, Levy C, Estabrook A, Old L, Chan GL, Lobel L, Trakht I. **A human monoclonal autoantibody to breast cancer identifies the PDZ domain containing protein GIPC1 as a novel breast cancer-associated antigen.** *BMC Cancer*. 2008; 8: 248.
102. Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW. **Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice.** *Genes Dev*. 2000; 14(7): 854-862.
103. Saitoh T, Mine T, Katoh M. **Molecular cloning and characterization of human GIPC3, a novel gene homologous to human GIPC1 and GIPC2.** *Int J Oncol*. 2002; 20(3): 577-582.
104. Sambrook J, Russell, D. W., red. ***Molecular cloning, A Laboratory manual.*** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
105. Schatz O, Oft M, Dascher C, Schebesta M, Rosorius O, Jaksche H, Dobrovnik M, Bevec D, Hauber J. **Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(4): 1607-1612.
106. Schneider-Schaulies J. **Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis.** *J Gen Virol*. 2000; 81(Pt 6): 1413-1429.
107. Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. **Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B.** *Immunity*. 2006; 25(5): 701-715.
108. Sen R, Baltimore D. **Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.** *Cell*. 1986; 46(5): 705-716.
109. Smith AE, Helenius A. **How viruses enter animal cells.** *Science*. 2004; 304(5668): 237-242.
110. Sodeik B. **Mechanisms of viral transport in the cytoplasm.** *Trends Microbiol*. 2000; 8(10): 465-472.
111. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S et al. **A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome.** *Cell*. 2005; 122(6): 957-968.
112. Steven AC, Conway JF, Cheng N, Watts NR, Belnap DM, Harris A, Stahl SJ, Wingfield PT. **Structure, assembly, and antigenicity of hepatitis B virus capsid proteins.** *Adv Virus Res*. 2005; 64: 125-164.
113. Sun B, Karin M. **NF-kappaB signaling, liver disease and**

- hepatoprotective agents.** *Oncogene*. 2008; 27(48): 6228-6244.
114. Tabuchi K, Biederer T, Butz S, Sudhof TC. **CASK participates in alternative tripartite complexes in which Mint 1 competes for binding with caskin 1, a novel CASK-binding protein.** *J Neurosci*. 2002; 22(11): 4264-4273.
 115. Tani TT, Mercurio AM. **PDZ interaction sites in integrin alpha subunits. T14853, TIP/GIPC binds to a type I recognition sequence in alpha 6A/alpha 5 and a novel sequence in alpha 6B.** *J Biol Chem*. 2001; 276(39): 36535-36542.
 116. Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. **A Notch updated.** *J Cell Biol*. 2009; 184(5): 621-629.
 117. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. **Viral subversion of the immune system.** *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 861-926.
 118. Vanlandschoot P, Van Houtte F, Serruys B, Leroux-Roels G. **The arginine-rich carboxy-terminal domain of the hepatitis B virus core protein mediates attachment of nucleocapsids to cell-surface-expressed heparan sulfate.** *J Gen Virol*. 2005; 86(Pt 1): 75-84.
 119. Wang LH, Kalb RG, Strittmatter SM. **A PDZ protein regulates the distribution of the transmembrane semaphorin, M-SemF.** *J Biol Chem*. 1999; 274(20): 14137-14146.
 120. Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, Wingfield PT. **The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface.** *Embo J*. 2002; 21(5): 876-884.
 121. Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL. **Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards.** *Nature*. 1999; 401(6752): 505-508.
 122. Whittaker GR, Kann M, Helenius A. **Viral entry into the nucleus.** *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000; 16: 627-651.
 123. Wyler E, Kaminska M, Coic YM, Baleux F, Veron M, Agou F. **Inhibition of NF-kappaB activation with designed ankyrin-repeat proteins targeting the ubiquitin-binding/oligomerization domain of NEMO.** *Protein Sci*. 2007; 16(9): 2013-2022.
 124. Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG. **The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid.** *Mol Cell*. 1999; 3(6): 771-780.
 125. Woo HN, Park JS, Gwon AR, Arumugam TV, Jo DG. **Alzheimer's disease and Notch signaling.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 390(4): 1093-1097.
 126. Xie L, Yamamoto B, Haoudi A, Semmes OJ, Green PL. **PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo.** *Blood*. 2006; 107(5): 1980-1988.