The College of Graduate Studies and the College of Medicine & Health Sciences Cordially Invite You to a

PhD Dissertation Defense

Entitled

MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS (MMTV) GENOMIC RNA (GRNA) PACKAGING: SELECTIVE GRNA ENCAPSIDATION IS FACILITATED BY LONG-RANGE INTERACTIONS (LRIS) THAT FACILITATE SPECIFIC GAG BINDING

By

Suresha G Prabhu

ID: 201990164

Faculty Advisor

Prof. Tahir A. Rizvi

College of Medicine & Health Sciences (CMHS), Department of Microbiology & Immunology

Date & Venue

1:00 to 2:00 pm

Tuesday, 12 November 2024

Location: Yannah Theater, Second Floor, Block C (2C010), Male Side, CMHS

Online

Join with ZOOM or 823 4888 5742

Abstract

Mouse mammary tumor virus (MMTV) is a betaretrovirus that induces breast cancer and sporadically, T-cell lymphomas in mice. MMTV serves as a pertinent model for elucidating the mechanism(s) of oncogenesis and the genetics associated with the development of mammary tumors. Being a rodent retrovirus, MMTV is phylogenetically distant from human and other primate retroviruses; thus, positioning it ideally as a potential vector of choice for human gene therapy. This may circumvent safety concerns such as recombination with other related endogenous human retroviruses. In addition, MMTV is distinct from most other retroviruses, but similar to lentiviruses, in that it has the ability to infect non-dividing cells. Furthermore, MMTV contains multiple steroid responsive promoters, making it not only “switchable” but also “tissue-specific” since they turn on gene expression only in cells with receptors for steroid hormones. These unique features have led to increasing interest in developing MMTV-based vectors for “targeted” and “inducible” human gene therapy, especially for breast tissue. Therefore, it is crucial that the molecular mechanisms of the pertinent aspects of MMTV life cycle be better understood to develop safer, more efficient vectors for gene delivery.

Earlier studies have suggested that MMTV harbors sequences known as packaging sequences (*Psi*) responsible for genomic RNA (gRNA) packaging at the 5’ end of its genome. This region has been predicted to assume a higher order structure which was validated biochemically employing hSHAPE (high throughput selective 2' hydroxyl acylation analyzed by primer extension) and shown to have four RNA-RNA long range interactions (LRIs) harboring complementary sequences. Three of these LRIs involve complementary sequences between the U5/Gag (LRIs I-III), while one LRI (LRI-IV) involves complementary sequences within U5/U5 region that are 291 and 190 nucleotides apart, respectively.

In addition to *Psi*, the packaging of gRNA into retroviral particles relies on its specific recognition by the Gag precursor. However, it remains unclear whether the binding of Gag to *Psi* alone is enough to promote RNA packaging and what role LRIs play in this process. In this study, using MMTV as a model, we investigated the effects of mutations in the four proposed LRIs on the gRNA structure and function. Our findings reveal the presence of an unpredicted extended LRI, and hSHAPE showed that maintaining a *Psi* structure like the wild type is crucial for efficient RNA packaging. Surprisingly, filter binding assays demonstrated that most mutants, regardless of their packaging capability, exhibited significant binding to $Pr77^{Gag}$, suggesting that Gag binding to *Psi* is insufficient for efficient packaging. Further footprinting experiments indicated that efficient RNA packaging is promoted when $Pr77^{Gag}$ binds to two specific sites within *Psi*, whereas binding elsewhere in *Psi* does not lead to efficient packaging. Taken together, these results reveal that the three-dimensional structure of the *Psi*/$Pr77^{Gag}$ complex regulates the assembly of viral particles around gRNA, enabling effective discrimination against other viral and cellular RNA species that may also bind Gag efficiently

Keywords: Retroviruses, Mouse mammary tumor virus (MMTV), RNA Packaging, $Pr77^{Gag}$, hSHAPE, Gag/RNA interactions, Filter binding assay, Foot printing.

تتشرف كلية الدراسات العليا و كلية الطب والعلوم الصحية بدعوتكم لحضور
مناقشة أطروحة الدكتوراه

العنوان

تغليف الحمض النووي الريبي الجينومي (gRNA) لفيروس ورم الثدي الفأري (MMTV): تسهيل انتقائية تغليف gRNA من خلال تفاعلات طويلة المدى (LRIs) التي تسهل الارتباط المحدد بالبروتين Gag

للطالب
سوريش ج برابو
الرقم الجامعي: 201990164
المشرف
د. طاهر رزفي
قسم علم الميكروبيولوجيا و المناعة
كلية الطب و العلوم الصحية

المكان والزمان

1:00 الى 2:00 مساء
12 نوفمبر 2024
مسرح يناح, الطابق الثاني, المبنى c (2C010), CMHS
Join with ZOOM أو 823 4888 5742

الملخص

يعد فيروس ورم الثدي الفأري (MMTV) من الفيروسات الارتجاعية (Retroviruses) من النوع بيتا، والذي يسبب سرطان الثدي وفي حالات نادرة، الأورام اللمفاوية للخلايا التائية في الفئران. ويعتبر MMTV نموذجًا مهمًا لفهم آليات التسرطن والجينات المرتبطة بتطور أورام الثدي. وباعتباره فيروسًا ارتجاعياً للقوارض، فإن MMTV بعيد نسبيًا من الناحية التطورية عن الفيروسات الارتجاعية البشرية وغيرها من الرئيسيات، مما يجعله مرشحًا مثاليًا للاستخدام كناقل جيني للعلاج الجيني البشري. قد يساعد هذا على تجنب المخاوف المتعلقة بالسلامة مثل إعادة الاتحاد مع الفيروسات الارتجاعية البشرية الذاتية. بالإضافة إلى ذلك، يتميز MMTV عن معظم الفيروسات الارتجاعية الأخرى، ولكنه يشبه الفيروسات البطيئة (Lentiviruses) في قدرته على إصابة الخلايا غير المنقسمة. كما يحتوي MMTV على محفزات حساسة للهرمونات الستيرويدية، مما يجعله "قابلًا للتشغيل" و"محددًا للأنسجة" حيث يُفَعل التعبير الجيني فقط في الخلايا التي تحتوي على مستقبلات للهرمونات الستيرويدية. أدت هذه الميزات الفريدة إلى زيادة الاهتمام بتطوير ناقلات تعتمد على MMTV للعلاج الجيني البشري "الموجه" و"القابل للتنشيط"، خاصة في أنسجة الثدي. وبالتالي، من الضروري فهم الآليات الجزيئية للجوانب المهمة من دورة حياة MMTV لتطوير ناقلات أكثر أمانًا وكفاءة للتوصيل الجيني.

أشارت الدراسات السابقة إلى أن MMTV يحتوي على تسلسلات تُعرف بتسلسلات التغليف (*Psi*) وهي مسؤولة عن تغليف الحمض النووي الريبي الجينومي (gRNA) في نهاية الجينوم 5'. وتم التنبؤ بأن هذه المنطقة تأخذ بنية ثلاثية الأبعاد تم التحقق منها كيميائيًا باستخدام تقنية hSHAPE (تحليل الارتباط الانتقائي السريع بواسطة الامتداد التمهيدي) وأظهرت وجود أربعة تفاعلات طويلة المدى (LRIs) تحتوي على تسلسلات تكميلية. ثلاثة من هذه التفاعلات (LRIs I-III) تشمل تسلسلات تكميلية بين منطقتي U5 و Gag، في حين أن التفاعل الرابع (LRI-IV) يشمل تسلسلات تكميلية بين منطقتي U5/U5 بفاصل 291 و 190 نوكليوتيداً.

إضافةً إلى تسلسل *Psi*، يعتمد تغليف ال gRNA في الجسيمات الفيروسية الارتجاعية على تعرفه المحدد من قِبل بروتين Gag غير الناضج ($Pr77^{Gag}$). ومع ذلك، لا يزال من غير الواضح ما إذا كان ارتباط Gag بتسلسل *Psi* وحده كافياً لتعزيز تغليف الحمض النووي الريبي وما هو دور التفاعلات الطويلة المدى في هذه العملية. في هذه الدراسة، استخدمنا MMTV كنموذج للتحقيق في تأثير الطفرات في التفاعلات الأربعة المقترحة (LRIs) على بنية ووظيفة ال gRNA. أظهرت نتائجنا وجود تفاعل طويل المدى غير متوقع، وأظهرت تقنية hSHAPE أن الحفاظ على بنية *Psi* المشابهة للنمط البري أمر ضروري لتغليف الحمض النووي الريبي بكفاءة. ومن المدهش أن اختبارات الربط باستخدام الفلاتر أوضحت أن معظم الطفرات، بغض النظر عن قدرتها على التغليف، أظهرت ارتباطًا قويًا بالبروتين $Pr77^{Gag}$، مما يشير إلى أن ارتباط Gag بتسلسل *Psi* وحده ليس كافياً لتغليف الحمض النووي الريبي بكفاءة. كما أظهرت تجارب أخرى أن تغليف الحمض النووي الريبي يتم بشكل فعال عندما يرتبط البروتين $Pr77^{Gag}$ بموقعين محددين داخل تسلسل *Psi*، بينما لا يؤدي ارتباطه في مواقع أخرى إلى تغليف فعال. بشكل عام، تكشف هذه النتائج أن البنية ثلاثية الأبعاد لمركب *Psi*/$Pr77^{Gag}$ تنظم تجميع الجسيمات الفيروسية حول الحمض النووي الريبي الجينومي، مما يمكنه من التمييز الفعال ضد جزيئات الحمض النووي الريبي الفيروسي والخلوية الأخرى التي قد ترتبط بـ Gag بكفاءة أيضًا.

كلمات البحث الرئيسية: فيروسات ارتجاعية، فيروس ورم الثدي الفأري (MMTV)، تغليف الحمض النووي الريبي، $Pr77^{Gag}$، hSHAPE، تفاعلات Gag/الحمض النووي الريبي، اختبار الربط باستخدام الفلاتر، تقنيات التتبع (Footprinting).