

ANDRZEJ PIEKAROWICZ

Instytut Mikrobiologii

Uniwersytetu Warszawskiego

Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

E-mail: anpiek@plearn.edu.pl

REKOMBINACJA GENETYCZNA WIRUSÓW

WSTĘP

Ewolucja biologiczna zależy od spontanicznej mutagenezy, naturalnej selekcji oraz izolacji reprodukcyjnej i geograficznej. Naturalna selekcja jest wywołana przez warunki życia na jakie napotyka dany organizm oraz przez środowisko fizyczno-chemiczne i aktywność innych organizmów w poszczególnych ekosystemach. Ponieważ warunki życia, a tym samym naturalna selekcja, zmieniają się z upływem czasu i w przestrzeni, najlepsze przystosowanie danego organizmu nie jest cechą stałą. Postęp w rozwoju ewolucyjnym zależy od pojawienia się w danej populacji organizmów wariantów genetycznych, które mogą poprawić kondycję danego gatunku w określonym środowisku. Postęp ewolucyjny jest więc ciągłym procesem adaptacji do zmieniających się warunków. Możliwość pojawiania się takich wariantów jest związana z istnieniem trzech wyraźnie różnych strategii zmienności. Pierwsza z nich obejmuje mechanizmy prowadzące do małych lokalnych zmian w sekwencjach genomowych kwasów nukleinowych, takich jak zmiany nukleotydów lub małych insercji i delecji. Drugą strategią jest rearanżacja (rekombinacja) materiału genetycz-

nego. Źródłem rekombinacyjnego przetasowania materiału genetycznego są enzymatyczne systemy transpozycji, rekombinacji-miejscowo specyficznej (niehomologicznej) jak również rekombinacji ogólnej obejmującej homologiczne sekwencje genomu. Rearanżacja materiału genetycznego może następować również w wyniku reperacji uszkodzeń wywołanych, na przykład przez działanie promieniowania. Trzecią strategią powstawania wariantów genetycznych jest nabywanie krótkich segmentów materiału genetycznego pochodzącego od innych organizmów poprzez poziome przekazywanie materiału genetycznego na drodze transformacji, koniugacji, transdukcji czy innych procesów. Takim samym procesom zmienności i adaptacji do zmieniających się warunków podlegają wirusy. W artykule tym omówione zostaną mechanizmy powstawania wariantów genetycznych wirusów na drodze rearanżacji materiału genetycznego. Ze względu na ograniczoność rozmiarów tego artykułu będzie to dotyczyć tylko wirusów rozwijających się w organizmach eukariotycznych.

RODZAJE REARANŻACJI GENETYCZNEJ WIRUSÓW

Rearanżacja wirusowego materiału genetycznego następuje w komórkach zainfekowanych dwoma typami wirusów. Wynikiem rearanżacji jest powstanie potomnych genomów zawierających informację genetyczną w innej kombinacji niż rodzicielska. Rearanżacja następuje w wyniku dwóch podstawowych mechanizmów zależnych od fizycznej organizacji geno-

mu wirusowego. U wirusów zawierających pojedynczą cząsteczkę genomową, w tym u wszystkich wirusów posiadających jako genom cząsteczkę DNA, oraz u szeregu grup wirusów posiadających jako genom RNA, powstający zmieniony genom zawiera kowalencyjnie połączone sekwencje nukleotydowe pochodzące od każdego z rodziców. Dla tego rodzaju rearanżacji

materiału genetycznego przyjęto stosować termin rekombinacji. W tym znaczeniu rekombinacja różni się od genetycznej reasortacji (wymieszania), terminu stosowanego w odniesieniu do wymiany chemicznie niepołączonych

elementów materiału genetycznego wirusów zawierających wielocłonowy genom, niezależnie od tego, czy składający się z ssRNA (jednoniciowego) czy z dsRNA (dwuniciowego) i zawierający od dwóch do 12 segmentów.

REKOMBINACJA HOMOLOGICZNA WIRUSÓW TYPU DNA

Zdolność do łączenia się dwóch homologicznych cząsteczek DNA i wymiany DNA pomiędzy nimi jest najistotniejszą częścią mechanizmu ogólnej rekombinacji. Proces ten zakłada wyszukiwanie podobieństwa sekwencyjnego pomiędzy dwoma cząsteczkami DNA, rozpoznania homologii i wzajemnej wymiany indywidualnych nici DNA. Kompleksowość tego procesu utrudnia w znacznym stopniu analizę jego mechanizmu, ale skoncentrowany wysiłek wielu laboratoriów doprowadził do uzyskania znacznego postępu w zrozumieniu tych procesów. Większość najistotniejszych informacji dotyczących tych procesów uzyskano z badań nad bakteriami i bakteriofagami (WEST 1992, KOWALCZYKOWSKI i EGGLESTON 1994). Mechanizm rekombinacji homologicznej u wirusów eukariotycznych nie był do tej pory intensywnie badany, chociaż w przypadku niektórych wirusów wykazano kodowanie specyficznych enzymów, które mogłyby brać udział w rekombinacji. Na przykład, z komórek zakażonych wirusem krowianki wyizolowano białka, które w warunkach *in vitro* przeprowadzały niezależną od ATP wymianę nici DNA. Aktywna frakcja białkowa zawierała trzy białka o ciężarze cząsteczkowym 110, 52 i 32 Kdal. Podobnie z komórek zakażonych wirusem herpes simplex oczyszczono białko o ciężarze cząsteczkowym 138 Kdal, które również kierowało wymianą nici i parowaniem homologicznych odcinków DNA (KOWALCZYKOWSKI i EGGLESTON 1994), jednak do tej pory nie udało się wyizolować mutantów ze specyficznymi defektami w rekombinacji co może wskazywać, że albo rekombinacja odgrywa tak istotną rolę w rozwoju wirusów, że nie można otrzymać nawet warunkowo-letalnych mutantów albo, co bardziej prawdopodobne, rekombinacja wirusowego DNA przeprowadzana jest przez systemy komórkowe (COEN i RAMIG 1996). Na podstawie analizy różnego typu krzyżówek wirusów typu DNA stwierdzono, że rekombinacja obejmuje pęknięcie nici DNA i ponowne wytworzenie wiązań kowalencyjnych prowadząc do powstania nierodzicielskich genomów (FENNER 1994). U adenowirusów stwierdzono, że rekombinacja wymaga replikacji wirusowego DNA, ale podobnie jak u innych grup

wirusów typu DNA nie kodują one żadnych białek odpowiedzialnych za ten proces. Chociaż nie znany jest mechanizm rekombinacji u adenowirusów to wiele danych przemawia za tym, że siłą prowadzącą do rekombinacji może być zdolność tworzonych w czasie replikacji cząsteczek jednoniciowego DNA do atakowania dwuniciowego DNA drugiej cząsteczki. W większości przypadków rekombinacja wirusów typu DNA osiąga wartość do 50% rekombinantów dzikiego typu w stosunku do liczby form rodzicielskich (COEN i RAMIG 1996). Zjawisko rekombinacji homologicznej stwierdza się nie tylko w warunkach laboratoryjnych, ale również w warunkach naturalnych, gdzie odgrywa ona istotną rolę w zmienności i ewolucji wirusów. Jednym z przykładów takiej zmienności może być powstanie na drodze rekombinacji pomiędzy wirusami należącymi do różnych grup serologicznych, adenowirusa typu Ad4, jedyne przedstawiciela podgrupy E adenowirusów (COEN i RAMIG, 1996). W rejonie E1A (0 do 5 jednostek mapy genetycznej) i w rejonie E2 (62 do 66 jednostki mapy) oraz w genie kodującym jedno z białek strukturalnych adenowirus Ad4 wykazuje sekwencyjne podobieństwo do podgrupy B adenowirusów. Z drugiej strony u adenowirusa Ad4 gen kodujący inne białko strukturalne (białko włókienek) i własności immunologiczne są podobne do podgrupy C adenowirusów. Biorąc pod uwagę mapę genetyczną adenowirusów, najprostszym wyjaśnieniem mechanizmu powstania adenowirusa AD4 jest przyjęcie, że powstał on w wyniku rekombinacji, jaka zaszła w rejonie pomiędzy genem E2 podgrupy B i rejonem w genomie wirusa podgrupy C, zawierającym gen kodujący zewnętrzne włókienka wirionu.

Rekombinacja homologiczna wirusów została szeroko wykorzystana w badaniach podstawowych, jak również znalazła zastosowanie do celów praktycznych. W badaniach podstawowych rekombinację homologiczną wykorzystano przede wszystkim do mapowania genomów wirusowych i stworzenia odpowiednich map genetycznych. Jednym z praktycznych zastosowań zjawiska rekombinacji homologicznej jest jej wykorzystanie do konstrukcji eukarioty-

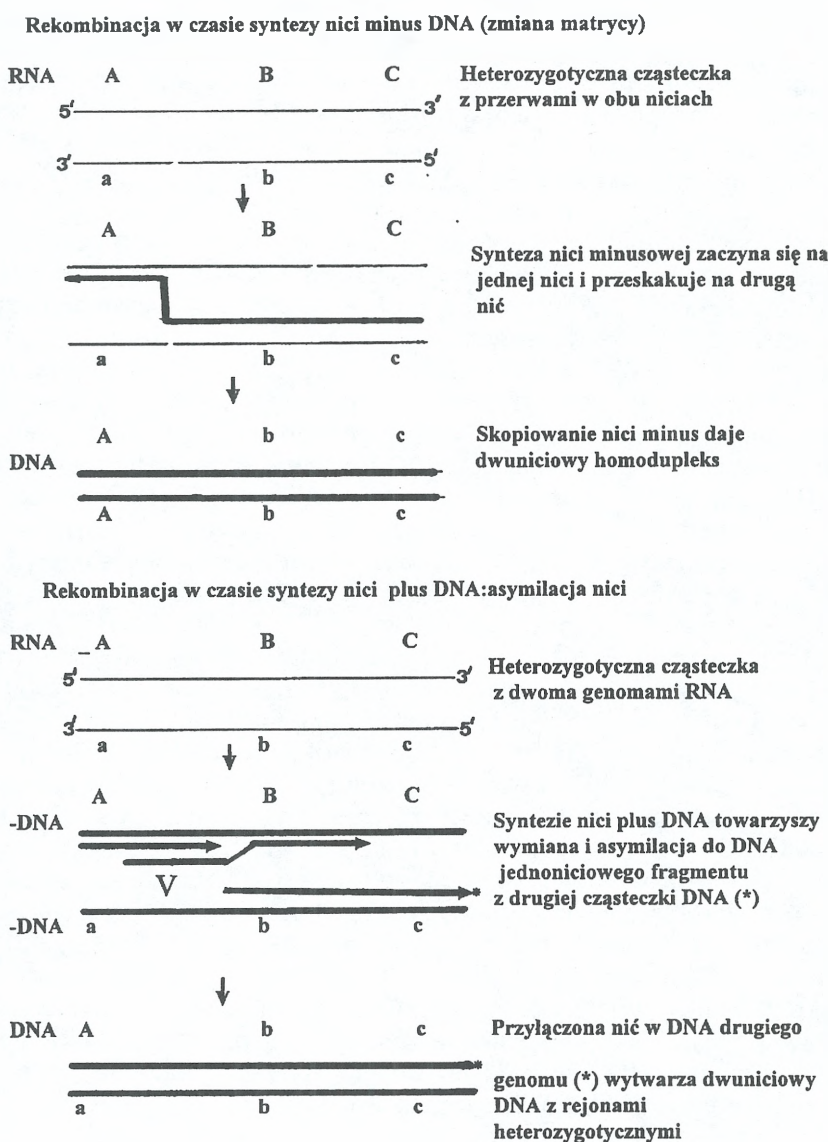
cznych systemów wirusowych do klonowania genów (GLORIOSO i współaut. 1995). Wektory takie opracowano między innymi dla takich

wirusów zwierzęcych jak adenowirusy, bakulowirusy, wirus herpes i wirus krowianki.

REKOMBINACJA RETROWIRUSÓW

Genom retrowirusów utworzony z dwóch cząsteczek RNA jest genomem heterozygotycznym (COFFIN, 1996). Cząsteczki te mogą być często przerwane w pojedynczych miejscach. Po zainfekowaniu komórki nowego gospodarza obie cząsteczki RNA (przynajmniej częściowo) są kopiowane do DNA przez odwrotną transkryptazę (RT) i na tym etapie dochodzi do rekombinacji (GOFF 1992, KATZ i SKALKA 1990). Dla wyjaśnienia rekombinacji proponowane są dwa modele (ryc. 1). Model „zmiany matrycy” zakłada, że w czasie tworzenia nici minusowej DNA na matrycy RNA, noworeplikująca się nić DNA zmienia matrycę z jednej cząsteczki RNA

na drugą. Wydaje się, że przeskok replikującej się nici DNA następuje w miejscu przerw w cząsteczce RNA. Model ten może wytłumaczyć w jaki sposób retrowirusy przeżywają pomimo obserwowanego faktu obecności wielu przerw w wirusowym genomowym RNA. Ponieważ takie przerwy są zlokalizowane w przypadkowych miejscach, tworząca się nić minus DNA przeskakując w czasie replikacji z jednej matrycy na drugą może doprowadzić do utworzenia pełnej nici. Poparciem dla tego modelu jest fakt, że w czasie normalnej syntezy DNA RT „przeskakuje” z jednej cząsteczki RNA na drugą. Model „pęknięcia i przyłączania” nici DNA zakłada, że



Ryc. 1. Modele rekombinacji DNA retrowirusów (patrz tekst dla wyjaśnienia szczegółów).

RNA zaznaczony został cienką linią; DNA grubą linią. Allele genów wirusowych *gag*, *pol* i *env* zaznaczono jako A/a, B/b i C/c. Pokazano tylko pojedyncze zdarzenie rekombinacyjne obejmujące gen *gag*. Miejsce rekombinacji zaznaczono literą V. Zgodnie z modelem „zmiany matrycy” przeskok w czasie syntezy DNA zachodzi w miejscach pęknięć w nici RNA. Model ten przewiduje powstawanie tylko jednego produktu DNA z obydwu nici RNA. W modelu rekombinacji zachodzącej w czasie syntezy nici plus, zainicjowanie syntezy DNA w miejscach leżących wewnątrz cząsteczki następuje od starterów RNA powstałych w wyniku częściowej hydrolizy wywołanej działaniem RNA-azy H. Model rekombinacji „przyłączania nici” zakłada syntezę DNA na dwóch matrycach i powstawanie w wyniku rekombinacji nici plus heterodupleksowego produktu. Dla uproszczenia pokazano powstawanie tylko jednego DNA.

do rekombinacji dochodzi w czasie tworzenia nici plus DNA na dwóch matrycach RNA. Model ten został sformułowany po wykryciu struktur replikującego się DNA w postaci litery H (widocznych w mikroskopie elektronowym) i szeregu innych obserwacji biochemicznych. Każdy z tych modeli zakłada inny typ końcowego produktu. Zgodnie z modelem „zmiany matrycy” pro-

duktem tym będzie homodupleks ponieważ rekombinacja pojawia się w czasie tworzenia pierwszego produktu czyli nici minus, zgodnie zaś z drugim modelem produktem będzie heterodupleks. Jednak interpretacja dostępnych danych genetycznych nie daje jednoznacznych wyników a tym samym nie pozwala na rozstrzygnięcie który z tych modeli jest prawdziwy.

REKOMBINACJA NIEHOMOLOGICZNA WIRUSÓW

Jak wspomniano poprzednio retrowirusy są grupą wirusów typu RNA, których materiał genetyczny w normalnym cyklu infekcyjnym jest przepisywany do DNA przy udziale wirusowo specyficznej RNA zależnej polimerazy DNA (RT). Jest to jednocześnie jedyna grupa wirusów, dla których integracja wytworzonego DNA do chromosomu komórki gospodarza jest absolutnie niezbędna dla przebiegu dalszych etapów cyklu infekcyjnego. W przypadku innych wirusów zdolnych do integracji do chromosomu gospodarza (na przykład jak to jest w przypadku adenowirusów lub papowawirusów) integracja może zachodzić tylko w niepermissywnych komórkach a sam proces integracji jest swojego rodzaju aberacją w normalnym procesie replikacji wirusa (DOEFFLER 1993).

Produktem działania RT jest liniowa dwuniciowa cząsteczka DNA zawierająca na swoich obydwu końcach powtórzone bloki sekwencji (LTR) zorientowane w tym samym kierunku (GOFF 1992). Zintegrowany prowirusowy DNA posiada charakterystyczną strukturę zawierającą krótką, odwrotnie zorientowaną, powtórzoną sekwencję na obu końcach połączoną z sekwencjami DNA gospodarza. Ułożenie genów w prowirusowym DNA jest takie same jak w niezintegrowanym DNA. W sekwencji prowirusowego DNA w porównaniu do niezintegrowanego DNA następuje utrata dwóch nukleotydów, w wyniku czego sekwencje prowirusowe połączone są zawsze dwunukleotydową sekwencją CA z sekwencjami DNA gospodarza, przy czym zawsze nukleotyd A jest połączony z sekwencjami gospodarza. W sekwencjach DNA gospodarza w wyniku integracji następuje duplikacja krótkiego odcinka DNA (4–6 nukleotydów (nt)) którego długość zależy od typu wirusa. Analiza różnego typu mutantów retrowirusów wykazała, że do integracji potrzebne są dwie funkcje wirusowe: kodowane przez wirusa białko IN (integrazy) oraz obecność na obydwu końcach cząsteczki DNA (w sekwencjach LTR) krótkich odwróconych sekwencji. Z punktu widzenia wirusowego DNA region potrzebny do

rekombinacji jest nie większy niż 10–15 nt, obejmujący końcowe odcinki DNA, a samo miejsce rekombinacji znajduje się pomiędzy drugim a trzecim końcowym nukleotydem. Wszystkie dane doświadczalne, zarówno *in vivo* jak i *in vitro* wskazują, że miejsce integracji w chromosomie gospodarza jest zupełnie przypadkowe, nie wykazujące ani sekwencyjnego ani strukturalnego podobieństwa. Tak więc integracja wirusowego DNA do DNA gospodarza jest rekombinacją typu rekombinacji niehomologicznej.

Opracowanie systemów *in vitro* integracji retrowirusowego DNA do DNA gospodarza pozwoliło na odtworzenie zdarzeń zachodzących w warunkach naturalnych (SANDMAYER i współaut. 1990, GOFF 1992). Po pierwsze wykazano niezbicie, wbrew wcześniejszym danym eksperymentalnym, że integracja wirusowego DNA zachodzi z jego formy liniowej a nie form kolistych jakie można stwierdzić w zainfekowanej komórce. Po drugie, stwierdzono, że jedynym białkiem wirusowym biorącym udział w tym procesie jest białko integrazy (IN), oraz, że białka komórkowe przeprowadzają ostatnie etapy integracji. Zgodnie z tymi danymi w zainfekowanej komórce w wirusowej formie preintegracyjnej dochodzi do wytworzenia dwuniciowego DNA i taka preintegracyjna struktura zawierająca białko kapsydu (CA), białko integrazy (IN) oraz białka łączące DNA z białkami kapsydu wnikają do jądra komórki. Model integracji (ryc. 2) obejmuje przyłączenie obydwu końców DNA do siebie poprzez ich połączenie z IN a następnie usunięcie dwóch nukleotydów z końcowych sekwencji wirusowego DNA przez aktywność endonukleolityczną tego białka. Powstające w ten sposób końce 3'OH DNA łączone są z powstającymi w wyniku działania IN wolnymi końcami 5' DNA gospodarza. Ta przejściowa struktura zawiera przerwy w sekwencji DNA gospodarza oraz dwie niesparowane zasady wirusowe (AA). Enzymy komórkowe usuwają niesparowane zasady, doreplikowują nukleotydy w miejscu przerw w DNA gospodarza i łączą kowalencyjnie obydwie cząsteczki DNA.

REKOMBINACJA RNA WIRUSÓW

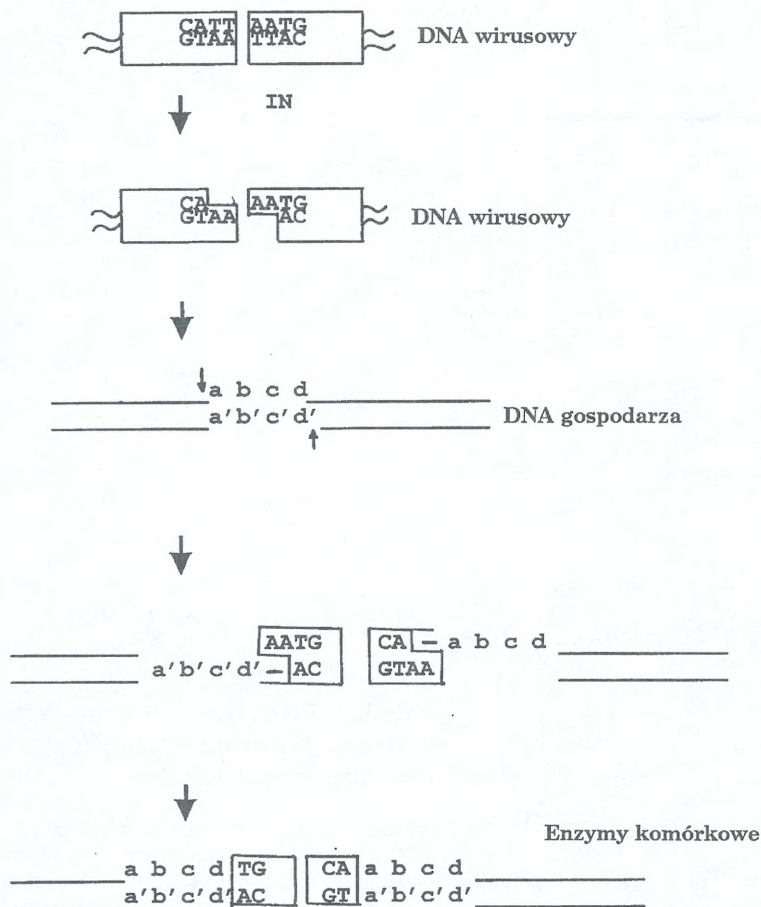
Po raz pierwszy zjawisko rekombinacji wśród RNA wirusów wykazano eksperymentalnie u wirusów polio. HIRST (1962) skrzyżował dwa typy szczepów wirusa polio typu 1 niosących pojedyncze mutacje uzyskując rekombinanty zawierające obydwa markery genetyczne. Podobne rezultaty otrzymane zostały przez innych autorów (WIMMER i współaut. 1993) z zastosowaniem innych typów mutacji. Szczególnie istotne były doświadczenia LEDINKO (1963), wykazujące, że podwójne rekombinanty powstają z podobną częstością jak rekombinanty pojedyncze. Wskazywało to, że rekombinanty powstają w wyniku prawdziwych zdarzeń rekombinacyjnych a nie w wyniku selekcji podwójnych mutantów powstających w mieszanej infekcji. Dopiero jednak uzyskanie bezpośred-

nich dowodów biochemicznych w pełni potwierdziło istnienie rekombinacji genetycznej w tej grupie wirusów. ROMANOVA i współaut. (1986) i TOLSKAYA i współaut. (1983) zastosowali technikę ograniczonej proteolizy i elektroforezy na żelach poliakrylamidowych dla porównania strukturalnych i niestrukturalnych białek dwóch różnych rodzicielskich typów serologicznych oraz wirusów zrekombinowanych, wykazując ich zróżnicowanie. Ostateczne dowody potwierdzające zjawisko rekombinacji RNA wirusów uzyskano sekwencjonując genomowy RNA szczepów rodzicielskich oraz rekombinantów. Stwierdzono, że rekombinacyjne RNA zawierały połączone kowalencyjnie sekwencje obecne w obu rodzicielskich typach wirusów.

MECHANIZM REKOMBINACJI RNA WIRUSÓW

Teoretycznie możliwe są dwa typy mechanizmów rekombinacji genomowego RNA; mechanizm „pęknięcia nici i ponownego połączenia”

oraz „zmiany matrycy”. W pierwszym przypadku mówimy o mechanizmie, w którym element genetyczny (RNA) jednego genomu ulega pod



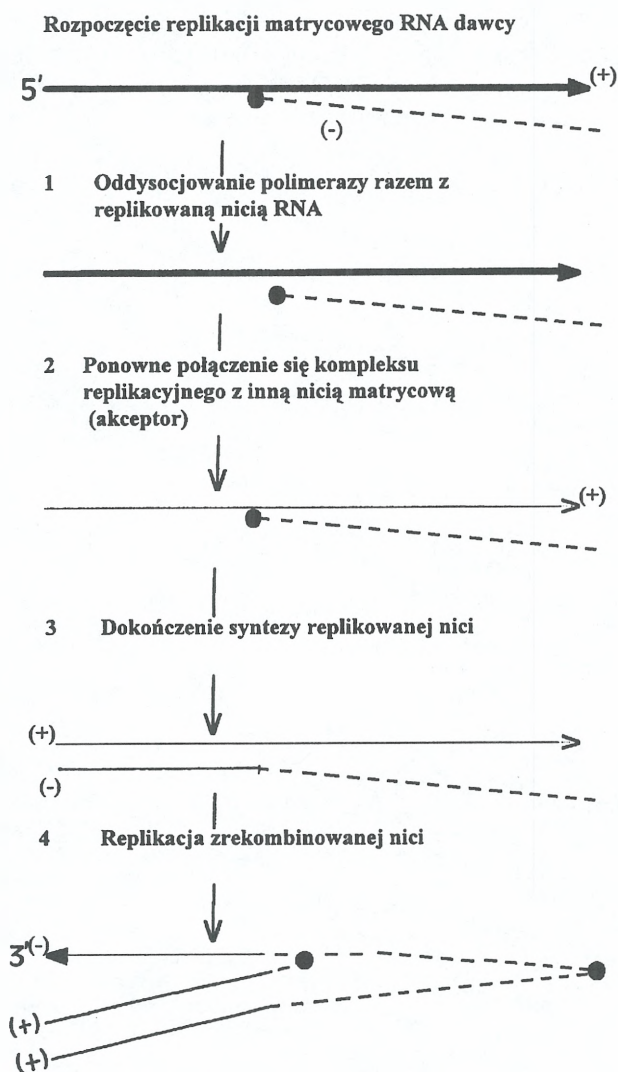
Ryc. 2. Integracja retrowirusowego DNA.

Końce liniowego DNA wirusowego są przybliżane do siebie w wyniku działania białka integrazy (IN). Aktywność endonukleolityczna tego białka usuwa dwie zasady i nacięcia chromosomowy DNA. Wytworzone końce 3'OH w wirusowym DNA zostają połączone z końcami 5' DNA gospodarza. W wytworzonej formie pośredniej enzymy komórkowe usuwają niesparowane zasady, wypełniają przerwy w sekwencji DNA i łączą kowalencyjnie obie cząsteczki DNA.

wpływem enzymów przerwaniu i połączeniu z elementami (RNA) genomowymi drugiego szczepu. Mogłoby to następować w momencie tworzenia się przejściowej dwuniciowej formy replikacyjnej RNA lub poprzez cięcie jednoniciowego RNA i połączeniu z heterologiczną nicią RNA.

Model „zmiany matrycy” zakłada, że w czasie replikacji nowopowstająca nić RNA zmienia matrycowy (donorowy) RNA kontynuując replikację z drugiej cząsteczki (akceptującej) RNA (ryc. 3). Szereg dowodów genetycznych i biochemicznych, z których najważniejszym było wykazanie, że do rekombinacji potrzebna jest jednoczesna replikacja RNA, silnie faworyzują model „zmiany matrycy”. Rekombinacja RNA wirusów może być rekombinacją homologiczną (typ 1), aberacyjnie homologiczną (typ 2) lub niehomologiczną (typ 2I). W typie 1 zmiana matrycy zachodzi w homologicznych sekwencjach nukleotydowych czyli, że przeskakiwanie replikującej się nici następuje dokładnie do tego samego nukleotydu w nici akceptującej. Powstający produkt nie zawiera żadnych delecji ani inser-

cji. W typie 2 zmiana matrycy zachodzi też w regionach o sekwencyjnej homologii, ale przeskakiwanie noworeplikującej się nici nie jest precyzyjne i prowadzi do powstania niewielkich delecji lub insercji. W typie 2I rekombinacja zachodzi w regionach niehomologicznych i prowadzi do powstania znacznie większych delecji lub insercji. Dostępne dane wskazują, że u wirusa polio rekombinacja jest rekombinacją typu 1. Najważniejsze wyniki uzyskano na podstawie sekwencjonowania rekombinacyjnych genomów. W żadnym przypadku nie stwierdzono aby zrekombinowana cząsteczka RNA zawierała delecje lub insercje (WIMMER i współaut. 1993). Takie same wyniki uzyskano analizując rekombinację zachodzącą w rejonie kodującym poliproteinę, gdzie selekcja mogłaby faworyzować powstawanie infekcyjnych cząsteczek RNA bez delecji lub insercji, jak i w przypadku rekombinacji zachodzącej w rejonach niekodujących tzn. w rejonie 5'NTR. Rejon ten obejmuje 154 nukleotydy przed kodonem inicjującym AUG i nie ma wpływu na namnażanie się wirusa a



Ryc. 3. Rekombinacja RNA wirusów według modelu zmiany matrycy (patrz tekst wyjaśniający szczegóły).

Linia grubą zaznaczono rodzicielską nić plus RNA; cienką linią zaznaczono nić plus RNA drugiej cząsteczki RNA (akceptora). Linią przerywaną oznaczono powstającą nić minus RNA.

mutanty delecyjne lub insercyjne zlokalizowane w tym rejonie są infekcyjne.

Częstość rekombinacji mierzona jako liczba powstających rekombinantów w stosunku do liczby form rodzicielskich jest wysoka i może osiągnąć wartość do 0.9 %. Częstość rekombinacji jest proporcjonalna do odległości pomiędzy markerami i na odległości 190 nt wynosi około 0.1 %. Model rekombinacji typu „zmiany matrycy” zakłada, że częstość rekombinacji powinna spadać przy mniejszej homologii rekombinujących cząsteczek RNA. Rzeczywiście, częstość rekombinacji pomiędzy różnymi typami serologicznymi wirusa polio (na przykład typu 1 × typ 3) wynosiła tylko 1×10^{-4} . Biorąc pod uwagę, że użyte w tych doświadczeniach markery były oddalone o 2500 nt daje to wartość 100× mniejszą niż dla analogicznych częstości rekombinacji z szczepami izogenicznymi.

Dotychczasowe dane wskazują, że rekombinacja może zachodzić w wielu miejscach genu. To jednak nie odpowiada na pytanie czy rekombinacja jest zupełnie przypadkowa czy też zachodzi w specyficznych pod względem sekwencji miejscach. Analiza ponad 40 wewnątrztypowych rekombinantów wykazała, że rekombinacja następuje najczęściej w rejonach o stabilnej lokalnej strukturze drugorzędowej, najczęściej po zreplikowaniu dwóch sąsiednich nukleotydów U (UU). Model rekombinacji typu „zmiany matrycy” najłatwiej można wytłumaczyć zakładając, że kompleks replikacyjny odłącza się od matrycowej nici minusowej w momencie napotkania na takie lokalne wewnętrzne struktury drugorzędowe lub powstające w wyniku hybrydyzacji homologicznych sekwencji dwóch nici matrycowego plusowego RNA. Zasadniczą trudnością w zrozumieniu mechanizmu rekombinacji u wirusa polio jest to, że nie znany jest dokładnie mechanizm replikacji RNA. W przypadku tego wirusa nie wykryto struktur zawierających szereg nici minus replikujących się jednocześnie na jednej matrycy nici plusowej RNA. Wydaje się więc, że w danym czasie tylko jedna nić minus może być replikowana na nici plus. Ten model replikacji i rekombinacji wyjaśniałby dlaczego zmiana matrycy następuje prawie wyłącznie podczas syntezy nici minus RNA. Niejasnym punktem jest wymagane w tym modelu czasowe zatrzymanie kompleksu replikacyjnego potrzebne do zmiany matrycy a nieobserwowane w warunkach doświadczalnych, być może ze względu na brak odpowiednich metod badawczych.

Rekombinacja wirusów RNA występuje nie tylko u wirusów zwierzęcych ale również u wirusów roślinnych (BUJARSKI i współaut. 1994). Najlepiej zjawisko to poznano w grupie bromo-

wirusów (BUJARSKI i współaut. 1994). Bromowirusy są to wirusy posiadające segmentowany genom składający się z trzech cząsteczek RNA; RNA1, RNA2, RNA3 pakowane w oddzielne wiriony oraz RNA4 będący subgenomowym RNA pochodzącym z RNA3 i pakowanym razem z RNA3. Replikacja cząsteczek genomowego RNA odbywa się przy udziale dwóch polimeraz wirusowych 1a i 2a kodowanych przez odpowiednio RNA1 i RNA2. RNA3 koduje białko kapsydu i niestrukturalne białko 3a. Ponieważ RNA3 nie koduje białek związanych z replikacją RNA, większość prac nad rekombinacją przeprowadzono z mutantami zlokalizowanymi w RNA3. W pierwszych pracach wykorzystano mutantą delecyjnego w 3' regionie RNA3. Jak wykazano, taka delecja mogła być reperowana w wyniku wymiany z sekwencjami innych cząsteczek RNA tego wirusa. Dalszy postęp w badaniach nad rekombinacją tej grupy wirusów uzyskano po opracowaniu przez BUJARSKIEGO i współaut. (1994) specjalnego systemu rekombinacyjnego. W systemie tym genomowy RNA bromowirusów został sklonowany jako cDNA w plazmidach bakteryjnych a następnie na drodze transkrypcji *in vitro* uzyskiwano odpowiednie cząsteczki RNA bromowirusów, którymi w sposób mechaniczny zakażano liście jęczmienia a potomne cząsteczki RNA analizowano przy pomocy techniki odwrotnej łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR-RT) i ich sekwencjonowania. System ten pozwala na wprowadzanie do cząsteczek genomowego RNA wirusa dowolnych mutacji. Badania te wykazały, że u bromowirusów może występować zarówno rekombinacja homologiczna jak i nie homologiczna. Miejsca występowania obydwu typów rekombinacji nie były przypadkowe co wskazuje, że struktura substratów rekombinacyjnych odgrywa ważną rolę. Rekombinacja homologiczna występowała tylko w jednym rejonie o długości 197 do 220 nt w 3' końcu RNA3 posiadającym odpowiednie homologiczne sekwencje w cząsteczkach RNA1 i RNA2. Rekombinacja niehomologiczna zachodziła w innych miejscach cząsteczki akceptującej. W przypadku rekombinacji niehomologicznej nie znaleziono wspólnej sekwencji dla miejsc, w których dochodziło do zmiany matrycy (miejsc crossing-over). Stwierdzono jednak komplementarność pomiędzy rekombinującymi nićmi wokół miejsc crossing-over. Wskazuje to, że tworzenie heterodupleksów ułatwia, bądź jest warunkiem niezbędnym do zajścia rekombinacji niehomologicznej. Analiza odpowiednio zlokalizowanych markerów genetycznych wskazuje, że rekombinacja niehomologiczna następuje na drodze „zmiany matrycy”. Potwierdzeniem takiego wniosku były również wy-

niki eksperymentów wskazujących, że do rekombinacji potrzebna jest replikacja RNA oraz

fakt, że mutacje w genach polimeraz RNA wpływają na zmianę miejsc crossing-over.

GENETYCZNA REASORTACJA

Inny typ rekombinacji genetycznej określaną nazwą genetycznej reasortacji występuje u wirusów posiadających segmentowany genom, niezależnie od tego czy występujący w postaci ssRNA czy dsRNA i niezależnie od liczby segmentów (FENNER 1994). Proces ten polega na tym, że w komórkach zainfekowanych jednocześnie dwoma wirionami w trakcie pakowania poszczególnych segmentów do jednego kapsydu, dochodzi do wymiany segmentów z wytworzeniem stabilnych reasortantów posiadających segmenty obydwu rodziców. Jeśli komórka zostanie zainfekowana różnymi szczepami wirusa wśród, powstającego potomstwa wystąpią wirusy będące genetyczną mozaiką koinfekujących szczepów. Obecność takich reasortantów jest identyfikowana albo na podstawie różnic genetycznych w stosunku do typów rodzicielskich albo przez wyznaczenie specyficznego wzoru segmentów genetycznych poprzez określenie ich ruchliwości w czasie elektroforezy w żelach poliakrylamidowych.

Proces pakowania poszczególnych segmentów do kapsydu jest bardzo precyzyjny i zachodzi w trakcie morfogenezy cząstek wirusowych. Ponieważ istnieje nie wiele danych doświadczalnych wyjaśniających proces morfogenezy tej grupy wirusów, nie wiele wiadomo również o mechanizmach kierujących wybieraniem poszczególnych segmentów z wewnątrzkomórkowej puli noworeplikujących się segmentów. Proces ten musi zapewnić wystąpienie w każdym powstającym wirionie wszystkich kodowanych przez danego wirusa segmentów w pojedynczej liczbie kopii.

Wśród wielu grup wirusów u których występuje zjawisko reasortacji (*Arenaviridae*, *Birnaviridae*, *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*) proces ten najlepiej poznany został u rotawirusów (RAMIG i WARD 1991) i wirusa grypy (WEBSTER 1994) posiadających odpowiednio 11 (ds RNA) i 8 segmentów (ssRNA) kodujących pojedyncze białka. Tworzenie reasortantów jest najbardziej wydajne dla szczepów blisko spokrewnionych, gdyż produkty białkowe kodowane przez takie wirusy muszą dostarczyć wszystkich funkcji wymaganych do powstania infekcyjnego wirusa. Przykładowo, dla rotawirusów stwierdzono, że w wyniku koinfekcji wirusami ludzkich szczepów należących do podgrupy serologicznej 1 i 3 blisko 50 % powstających wirusów było reasortantami, podczas, gdy

w koinfekcji między wirusami podgrupy 1 i 2 częstość ta była o wiele niższa, prawdopodobnie ze względu na większe różnice genetyczne. Możliwe jest również otrzymywanie stabilnych reasortantów pomiędzy szczepami wirusów należących do różnych typów zwierzęcych, na przykład między zwierzęcymi a ludzkimi rotawirusami. Z drugiej strony nigdy nie udało się otrzymać stabilnych reasortantów pomiędzy ssaczymi a ptasimi rotawirusami należącymi do grupy A rotawirusów. Nie udało się również otrzymać reasortantów pomiędzy rotawirusami należącymi do różnych grup, na przykład pomiędzy grupą A i grupą B, nawet należącymi do tego samego gatunku zwierzęcego.

Zjawisko reasortacji obserwowane jest nie tylko w warunkach *in vitro* (infekcji wirusowej w hodowlach tkankowych) ale również w warunkach *in vivo*. Jednym z takich przykładów jest tworzenie reasortantów pomiędzy małpimi wirusami SA11 i RRV którymi zainfekowano myszy. Doświadczenia te wykazały również, że chociaż wśród reasortantów obserwowano wymianę prawie każdego segmentu prowadzącą do powstania każdej możliwej kombinacji segmentów, to segmenty 3 i 5 wirusa SA11 były najczęściej wymieniane. Wskazuje to, że obecność tych segmentów daje powstającym wirionom znaczną przewagę selekcyjną.

W podobnych doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem dwóch szczepów reowirusów stwierdzono wśród 121 badanych reasortantów obecność tylko 5 różnych kombinacji segmentów, z czego 3 wystąpiły tylko jeden raz. Doświadczenia te wskazują wyraźnie, że reasortacja segmentów genomowych jest potencjalnym mechanizmem szybkiej i wydajnej ewolucji wirusów. Jest to najlepiej udokumentowane w przypadku wirusa grypy. Z pośród ośmiu segmentów ssRNA jakie wchodzi w skład genomu wirusa grypy, segment czwarty koduje białko hemoaglutyniny będące głównym białkiem antygenowym tego wirusa a jednocześnie białkiem receptorowym. Występujące w XX wieku co 10–20 lat pandemie grypy wywołane są pojawianiem się szczepów ludzkich wirusa grypy o zmienionym białku hemoaglutyniny. Zjawisko to nazywane skokiem antygenowym jest wywołane reasortacją segmentów pomiędzy ludzkimi a zwierzęcymi szczepami wirusa grypy. Na przykład, szczep wirusa nazwany Hong Kong jaki pojawił się w roku 1968 i zawierał

większość genów charakterystycznych dla szczepu azjatyckiego, krążącego w populacji ludzkiej od roku 1957, posiadał gen hemoaglutyniny bardzo podobny do genu wirusów typu ptasiego i świńskiego jakie pojawiły się w roku 1964. Uważa się więc, że pandemia grypy jaka

wystąpiła w roku 1968 była wynikiem reasortacji segmentów pomiędzy ludzkimi i ptasimi bądź zwierzęcymi (świńskimi) szczepami wirusa grypy jaka nastąpiła w wyniku koinfekcji jakiegoś gospodarza.

REKOMBINACJA WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWA

Jak wspomniano poprzednio rotawirusy posiadają genom w postaci 11 segmentów dsRNA, które można rozdzielić w czasie elektroforezy na żelach poliakrylamidowych jako specyficznie migrujące prążki RNA (DESSELBERGER 1996). Zauważono jednak, że genom rotawirusów izolowanych od przewlekle chorych wykazuje, oprócz charakterystycznego dla danego szczepu, profilu cząsteczek RNA, obecność dodatkowych prążków występujących w mniejszym stężeniu molarnym niż normalne prążki. Hybrydyzacja z użyciem sond molekularnych zawierających sekwencje charakterystyczne dla poszczególnych segmentów dsRNA wykazała, że te dodatkowe prążki zawierają informację genetyczną obecną w normalnych segmentach w formie kowalencyjnie połączonych form konkatamerycznych. Dalsze informacje dotyczące charakterystyki molekularnej tych dodatkowych segmentów otrzymano na drodze sekwencjonowania. Wyniki tych doświadczeń wykazały, że w większości przypadków dodatkowe segmenty charakteryzują się częściową duplikacją sekwencji tego samego segmentu. Duplikacja ta obejmuje część otwartej ramki odczytu (ORF)

zaczynającą się poza kodonem startowym aż do 3' końca normalnego genu. Rezultatem takiej duplikacji jest powstanie segmentu zawierającego normalny funkcjonalny gen i bardzo długi (o wielkości 1800–1900 bp) rejon 3' UTR (niekodujący). W niektórych jednak przypadkach rearanżacja segmentu może być bardziej skomplikowana. Niezależnie od typu takiej rearanżacji we wszystkich przypadkach, w których zmieniony segment został zsekwencjonowany, rearanżacja polegała na rekombinacji wewnątrzcząsteczkowej. W większości przypadków stwierdzono, że w miejscach rekombinacji występują sekwencje o charakterze sekwencji powtórzonych skierowanych w tym samym kierunku. Chociaż mechanizm rekombinacji będącej przyczyną rearanżacji segmentu nie był dokładnie badany, wszystkie dane eksperymentalne wskazują, że polega on na mechanizmie zmiany matrycy. Za takim wnioskiem przemawia przede wszystkim obraz z mikroskopu elektronowego pokazujące obecność dłuższych form replikacyjnych tylko tych segmentów, które ulegają duplikacji.

GENETIC RECOMBINATION IN VIRUSES

Summary

The evolutionary progress of viruses, as of all other organisms, depends on the availability within a specific population of genetic variants, some of which may allow the concerned species to improve its fitness. These variants can be generated by different strategies, one of which is rear-

rangement of the genomic nucleic acids: DNA or RNA. Recombinational reshuffling is mainly due to enzyme-mediated systems of homologous and non homologous recombination, site-specific recombination, genetic reassortment, reactivation and cross-reactivation.

LITERATURA

- BUJARSKI J. J., BAGY P. D., FLASINSKI S., 1994. *Molecular studies of genetic RNA-RNA recombination in brome mosaic virus*. *Adv. Virus Res.* 43, 275–302.
- COEN R., RAMIG R. F., 1996. *Principles of animal virus genetics*. [W:] FIELDS B. N. i KNIPPE D. M. (red.) *Fundamental Virology*. Raven Press New York, 165–170.
- COFFIN J., 1996. *Retroviruses*. [W:] FIELDS B. N. i KNIPPE D. M. (red.) *Fundamental Virology*. Raven Press New York, 650–682.
- DESSELBERGER U., 1996. *Genome rearrangements of rotaviruses*. *Advances in Virus Res.* 46, 69–95.
- DOEFFLER W., 1993. *Adenoviral DNA integration and changes in DNA methylation patterns: a different view of insertional mutagenesis*. *Progress in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 46, 4–36.
- FENNER F., 1994. *Genetics of animal viruses*. [W:] WEBSTER R. G., GRANOFF A. (red.) *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto, 524–531.
- GLORIOSO J. C., DELUCA N. A., FINK D. J., 1995. *Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy*. *Ann. Rev. Genet.* 29, 675–707.
- GOFF S. P., 1992. *Genetics of retroviral integration*. *Ann. Rev. Genet.* 26, 527–544.

- HIRST G. K., 1962. *Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus and influenza*. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 27, 303-308.
- KATZ R. A., SKALKA A. M., 1990. *Generation of diversity in retroviruses*. Ann. Rev. Genet. 24, 409-445.
- KOWALCZYKOWSKI S. C., EGGLESTON A. K., 1994. *Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins*. Ann. Rev. Biochem. 63, 991-1043.
- LEDINKO N., 1963. *Genetic recombination with polio virus type I, Studies of crosses between a normal horse serum resistant mutant and several guanidine resistant mutants of the same strain*. Virology, 20, 107-119.
- RAMIG R. F., WARD R. L., 1991. *Genomic segment reassortment in rotaviruses and other reoviridae*. Advances in Virus Res. 39, 163-207.
- ROMANOVA L. I., BLINOV V. M., TOLSKAYA E. A., VIKTOROVA E. G., KOLESNIKOVA M. S., 1986. *The primary structure of crossover regions of intratypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes*. Virology, 155, 202-213.
- TOLSKAYA E., ROMANOVA L., KOLESNIKOVA M., AGOL V. I., 1983. *Intertypic recombination in poliovirus: genetic and biochemical studies*. Virology 124, 121-132.
- SANDMAYER S. B., HANSEN L. J., CHALKER D. L., 1990. *Integration specificity of retrotransposons and retroviruses*. Ann. Rev. Genet., 24, 491-518.
- WEBSTER R. G., 1994. *Influenza virus*. [W:] WEBSTER R. G., GRANOFF A. (red.) *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto, 524-531.
- WEST S. C. 1992. *Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination*. Ann. Rev. Biochem. 61, 603-640.
- WIMMER E., HELLEN C. U. T., CAO X., 1993. *Genetics of poliovirus*. Ann. Rev. Genet. 27, 353-436.