



## Odwrotna transkryptaza jako enzym odpowiedzialny za niezwykłą zmienność genetyczną ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (HIV)

Anna Kurzyńska-Kokorniak<sup>1</sup>, Mariusz Jaskólski<sup>1,2</sup>, Marek Figlerowicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

<sup>2</sup>Zakład Krystalografii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

### Reverse transcriptase as the enzyme responsible for the genetic variability of human immunodeficiency virus (HIV)

#### Summary

Human immunodeficiency virus (HIV), the causative agent of AIDS, belongs to the particularly dangerous and, as a result, the most extensively studied viruses. Until now no effective method protecting against this pathogen has been developed. The major problem is the unusual genetic variability of HIV, which helps the virus to escape from immunological response and to produce drug-resistant mutants. Most of the collected data suggest that HIV-encoded reverse transcriptase (HIV RT) is the main factor responsible for the continuous generation of new viral variants. There are two primary mechanisms involved in the generation of HIV mutants: high error prone replication and genetic RNA recombination. In this article both processes are discussed in detail.

#### Key words:

human immunodeficiency virus – HIV, reverse transcriptase, error prone replication, genetic RNA recombination, copy choice hypothesis.

#### Adres do korespondencji

Marek Figlerowicz,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej PAN,  
Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań;  
e-mail:  
marekf@ibch.poznan.pl

### 1. Wstęp

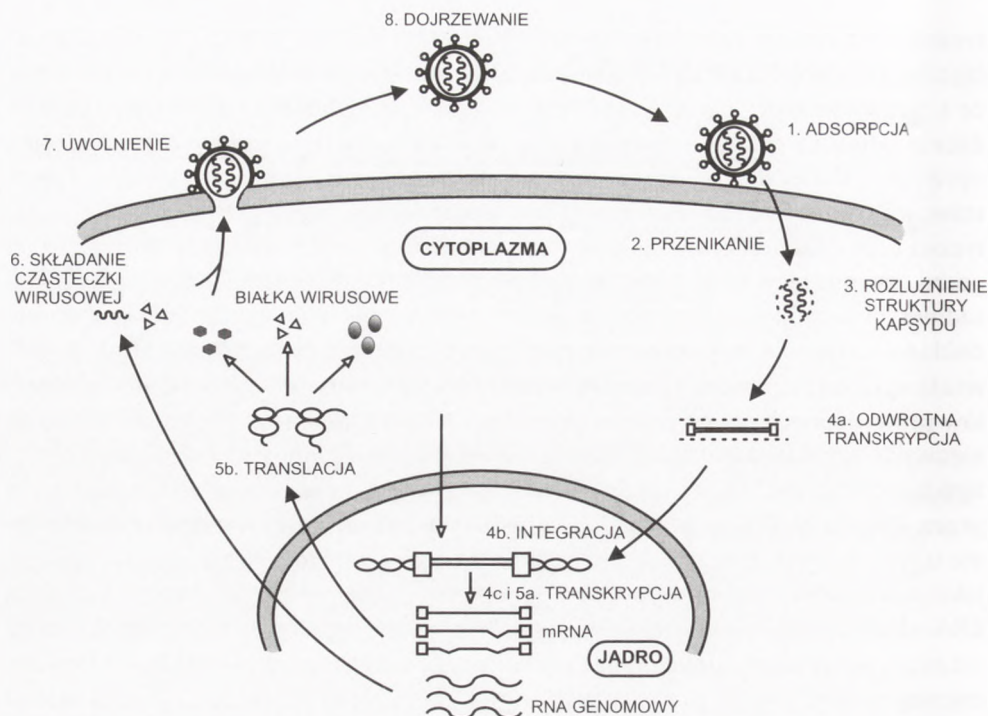
Spośród różnych zakażeń jakie mogą być wywoływane przez znane nam obecnie czynniki chorobotwórcze, infekcje wirusowe charakteryzują się szczególną opornością na wszelkie metody

terapii. Fakt ten nie zawsze jest przez nas dostrzegany ze względu na stosunkowo łagodny przebieg licznych chorób wirusowych. Niestety, obok łagodnych istnieją także i niezwykle groźne wirusy, do których z pewnością należy ludzki wirus upośledzenia odporności (HIV – *human immunodeficiency virus*). Nie udało się, jak dotąd, opracować skutecznego leku czy szczepionki chroniącej przed infekcją HIV (1). Podstawową trudnością, na jaką napotykać badacze, jest niezwykła zmienność genetyczna tego drobnoustroju (2,3). Stwierdzono, że HIV potrzebuje zaledwie kilku tygodni czy miesięcy, by stać się opornym na każdy środek przeciwwirusowy (4). Zasadniczym warunkiem znalezienia skutecznych metod jego zwalczania jest zatem dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie nowych, niewrażliwych na stosowane preparaty wariantów HIV. Stąd też jednym z głównych celów prowadzonych obecnie badań jest ustalenie, w jaki sposób dochodzi może do niezwykle szybkiej modyfikacji genomu wirusowego. Zgodnie z centralnym dogmatem biologii molekularnej przepływ informacji genetycznej odbywa się od DNA poprzez RNA do białka. W przypadku wirusów zasada ta znajduje zastosowanie jedynie u tych, których genom zbudowany jest z DNA. U wirusów wykorzystujących RNA jako podstawowy nośnik informacji genetycznej schemat ten ulega uproszczeniu: RNA→białko, względnie rozbudowaniu: RNA→DNA→RNA→białko. Zgodnie z tym ostatnim schematem funkcjonują retrowirusy, a zatem także HIV będący obiektem prezentowanych w tej pracy rozważań. Ich zasadnicza część poświęcona została szczegółowemu omówieniu mechanizmów decydujących o zmienności genetycznej tego wirusa.

## 2. Replikacja HIV

HIV jest wirusem sferycznym o średnicy ok. 110 nm. W zewnętrznej otoczce osłaniającej ikozaedralny nukleokapsyd (o średnicy ok. 100 nm) zakotwiczone są białka odpowiedzialne za specyficzne wiązanie wirusa do receptorów komórkowych (5,6). We wnętrzu nukleokapsydu znajdują się dwie identyczne lub prawie identyczne genomowe cząsteczki RNA o długości ok. 10 kb i polarności mRNA (7). Można zatem powiedzieć, że HIV jest drobnoustrojem „pseudodiploidalnym”. Infekuje on głównie komórki układu odpornościowego człowieka posiadające na swojej powierzchni receptory CD4, czyli limfocyty pomocnicze T i makrofagi (8). Obecność wirusa zaobserwowano także w komórkach mikrogleju oraz w komórkach endotelium (śródbłona) w mózgu.

Infekcja rozpoczyna się wówczas gdy wirus zostaje przyłączony do powierzchni wrażliwej komórki. Wniknięcie nukleokapsydu do cytoplazmy następuje najczęściej w wyniku fuzji błony komórkowej gospodarza i otoczki wirusowej. W przypadku makrofagów może ono zachodzić także na drodze endocytozy (9,10). We wnętrzu komórki struktura nukleokapsydu ulega rozluźnieniu, równocześnie zainicjowany zostaje kilkietapowy proces replikacji genomu wirusowego (11,12). Prawie wszyst-



Rys. 1. Replikacja HIV. 1. Adsorpcja cząstek wirusa na wrażliwych komórkach posiadających receptory CD4. 2. Przenikanie wirusa do cytoplazmy gospodarza. 3. Rozluźnienie struktury kapsydu. 4. Replikacja genomu wirusowego: a) przepisywanie genomowego RNA na dsDNA (odwrotna transkrypcja), b) integracja z genomem gospodarza, c) powielenie materiału genetycznego (głównie poprzez transkrypcję). 5. Ekspresja genów: a) transkrypcja, b) translacja. 6. Składanie cząstek potomnych wirusa. 7. Opuszczanie komórki gospodarza. 8. Dojrzewanie.

kie składniki niezbędne do jego przebiegu znajdują się w cząstce wirusowej (wirionie). Są to: dwie kopie genomowego RNA, odwrotna transkryptaza, integraza i starter, którego rolę pełni tRNA lizynowy, gdyż synteza DNA nie może zachodzić *de novo*. Niezbędne w procesie syntezy DNA trójfosforany deoksyrybonukleozydów (dNTP), występują w wysokim stężeniu w cytoplazmie gospodarza i bez przeszkód przenikają do wnętrza nukleokapsydu. Pierwszy etap replikacji polega na przepisaniu wirusowego, genomowego RNA na dwuniciowy DNA (dsDNA) (13,14). Katalizowana przez odwrotną transkryptazę (RT) reakcja przebiega w obrębie cytoplazmy chociaż kontakt wirusowego aparatu replikacyjnego z czynnikami komórkowymi jest wyraźnie ograniczony przez białka kapsydowe. Nadal jednak pozostaje zagadką, jakiego sygnału używa HIV do zapoczątkowania procesu replikacji cząstek genomowych (15,16).

W kolejnym etapie cyklu życiowego HIV, produkt odwrotnej transkrypcji – liniowy dsDNA, zostaje przeniesiony do jądra komórkowego, gdzie ulega integracji

z genomem gospodarza. Na podstawie zebranych dotychczas danych przypuszcza się, że miejsce włączenia wirusowego DNA wybierane jest w sposób całkowicie przypadkowy. W wyniku integracji HIV staje się prowirusem co oznacza, że jego materiał genetyczny powielany jest wraz z DNA komórkowym (17,18).

Ekspresja genów wirusowych jest procesem złożonym, wymaga obecności białek wirusowych działających w układzie cis i trans oraz białek gospodarza (19,20). Transkrypcja zintegrowanego wirusowego DNA zachodzi w jądrze i prowadzi do powstawania genomowych cząsteczek HIV oraz wirusowych mRNA. Proces ten katalizuje komórkowa polimeraza RNA II. Rozpoznaje ona sekwencję promotorową zlokalizowaną na końcu 5' wirusowego dsDNA (w rejonie zwanym długim powtórzeniem końcowym, LTR – *long terminal repeat*) (21,22). Początkowo syntetyzowane są tzw. białka „wczesne”, które pełnią funkcje regulatorowe i umożliwiają powstanie genomowego RNA oraz pozostałych białek funkcjonalnych i strukturalnych (białek „późnych”) (23,24). Te ostatnie w formie polipeptydów transportowane są do błony komórkowej, gdzie utworzone zostają wiriony potomne. W procesie tym istotną rolę odgrywa wirusowa proteaza przekształcająca prekursorowe polipeptydy w funkcjonalne składniki nukleokapsydu. Po opłaszczeniu, wirusowe cząstki potomne opuszczają komórkę gospodarza i rozpoczynają inwazję kolejnych komórek podatnych na infekcję (rys. 1) (25,26).

### 3. Molekularne podstawy zmienności genetycznej HIV

Systematyczna analiza wirusów powstających w zainfekowanym organizmie umożliwiła identyfikację wielu mniej lub bardziej skomplikowanych modyfikacji występujących w obrębie genomu HIV. Najogólniej wyróżnić można ich dwa podstawowe typy: mutacje punktowe oraz bardziej skomplikowane rearanżacje cząsteczek genomowych (27). Pierwsze wprowadzane są zarówno w trakcie procesu replikacji genomu wirusowego jak i po jego zakończeniu, podczas gdy drugie są produktem rekombinacji RNA (28). Podstawowe mechanizmy odpowiedzialne za ich powstawanie zostały krótko przedstawione w dalszej części pracy.

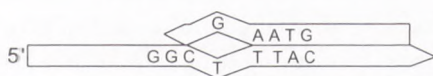
#### 3.1. Mutacje punktowe

Mutacje punktowe mogą pojawiać się w cząsteczkach genomowych wirusa w wyniku działania bardzo różnych czynników. Niektóre wprowadzane są podczas procesu zwanego edycją RNA. Najczęściej polega on na deaminacji adenozyliny lub cytozyny przez specyficzne enzymy komórkowe (deaminazy) (28-31). Inne zmiany wprowadzane są na drodze fizycznej lub chemicznej mutagenezy, np. w wyniku naświetlania promieniami UV, działania promieniowania jonizującego, stosowania analogów nukleozydowych, traktowania związkami modyfikującymi zasady purynowe czy pirymidynowe.

W warunkach fizjologicznych ilość tego typu mutacji jest jednak nieporównywalnie mała wobec ilości zmian wprowadzanych podczas nieprecyzyjnego kopiowania cząsteczek genomowych. Wspomnieliśmy już, że cykl życiowy HIV wymaga wielokrotnego powielenia materiału genetycznego zanim dojdzie do wytworzenia wirionów potomnych (32). Na wstępie genomowy RNA zostaje przepisany na jednoniciowy DNA (ssDNA), który w kolejnym etapie służy jako matryca do syntezy dwuniciowego DNA (dsDNA). Oba procesy katalizowane są przez odwrotną transkryptazę retrowirusa (HIV RT), będącą zarówno RNA- jak i DNA-zależną polimerazą DNA (28). Po włączeniu do genomu komórkowego, prowirusowy DNA jest kopiowany wraz z całym genomem gospodarza przez komórkowe kompleksy replikacyjne. W ostatniej fazie potomne cząsteczki genomowe transkrybowane są przez komórkową polimerazę RNA. Powstaje zatem pytanie, który z czterech wymienionych procesów (synteza DNA zależna od RNA, synteza DNA zależna od DNA, replikacja bądź transkrypcja) odpowiedzialny jest za wprowadzanie punktowych modyfikacji do materiału genetycznego HIV. Z pewnością nie jest nim replikacja genomu komórkowego, w trakcie której częstość mutacji wynosi zaledwie  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  (33), możemy ją zatem pominąć w naszych dalszych rozważaniach. W przeciwieństwie do kompleksów replikujących komórkowy DNA, odwrotne transkryptazy, podobnie jak polimerazy RNA, pozbawione są aktywności naprawczej (*proofreading activity*), stąd też katalizowane przez nie reakcje będą głównym źródłem mutacji (28,34,35). Z zebranych dotąd danych wynika, że odwrotne transkryptazy kopiuje cząsteczki genomowe z podobną dokładnością, z jaką w jądrze komórkowym syntetyzowany jest RNA. Na podstawie przeprowadzonych badań dowiedziano ponadto, że HIV RT wprowadza podobną ilość modyfikacji podczas RNA-zależnej, jak i DNA-zależnej syntezy DNA. Można zatem przyjąć, że wszystkie trzy procesy w jednakowym stopniu generują zmienność genetyczną HIV. Dwa pierwsze (synteza ssDNA i dsDNA) katalizowane są przez HIV RT. Enzym ten odpowiedzialny jest zatem za wprowadzenie około 70% punktowych mutacji (28).

Szacuje się, że częstość z jaką HIV RT wprowadza mutacje do nowo syntetyzowanej nici potomnej wynosi od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$ . Oznacza to, że aż 100 nukleotydów może zostać nieprawidłowo włączonych podczas jednego cyklu replikacyjnego genomu o długości ok.  $10^4$  zasad. Częstość mutacji uzależniona jest jednak od struktury pierwszo- i drugorzędowej RNA (36). Po uwzględnieniu tych czynników ustalono prawdopodobne tempo mutacji HIV *in vivo*, zmierzone przez częstość inaktywacji genu reporterowego *lacZ*. Wynosi ono ok.  $3 \times 10^{-5}$  /pz./ cykl replikacyjny (37-39). W układach *in vitro* częstość mutacji wprowadzanych przez HIV RT jest ok. 20-krotnie wyższa, co wskazuje na istnienie hipotetycznego czynnika komórkowego zwiększającego dokładność replikacji (40). Najczęściej pojawiającymi się mutacjami są substytucje nukleotydowe (tranzycje i transwersje – ok. 81% mutacji), zdecydowanie rzadziej dochodzi do zmiany ramki odczytu (ok. 13% mutacji). Pozostałe mutacje to proste delecje (ok. 4%) oraz delecje z insercjami (ok. 2%). Nie obserwuje się natomiast duplikacji (27). Prawdopodobny mechanizm wprowadzania niektórych typów mutacji przedstawiony został na rysunku 2.

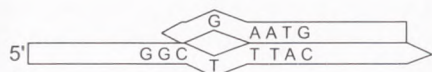
**Substytucja nukleotydoma**



a) wynikająca z błędnego przyłączenia nukleotydu



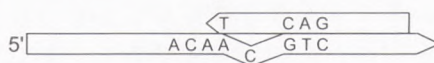
b) wynikająca z utworzenia chwilowego wybrzuszenia nukleotydoma w matrycy



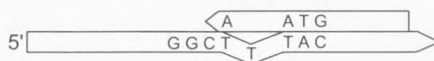
**Zmiana ramki odczytu**



c) wynikająca z błędnego przyłączenia nukleotydu, a następnie utworzenia miejscowego wybrzuszenia



d) wynikająca z tzw. ślizgania się polimerazy



Rys. 2. Dokładność kopiowania części genomych zależy od ich struktury oraz właściwości odwrotnej transkryptazy (RT). Odwrotne transkryptazy nie posiadają aktywności naprawczej; błędnie wprowadzone nukleotydy pozostają zatem w nowo zsyntetyzowanej nici. Dodatkowo występowanie charakterystycznych sekwencji – traktów poli-A lub poli-T może powodować tzw. ślizganie się enzymu wzdłuż matrycy (*polymerase slippage*). Jeżeli pomimo włączenia niewłaściwego nukleotydu utworzy się słaba para zasad, np. G:T, enzym może kontynuować syntezę nici potomnej; w przypadku gdy nie dochodzi do utworzenia poprawnych wiązań, synteza nici potomnej zostaje zatrzymana. Najczęściej występującymi mutacjami są substytucje nukleotydoma i zmiany ramki odczytu. Powstawanie substytucji nukleotydoma może być spowodowane: a) błędnym przyłączeniem nukleotydu lub b) utworzeniem chwilowego wybrzuszenia w miejscu niesparowania matrycy i nici potomnej. Do zmiany ramki odczytu może dochodzić: c) w przypadku nieprawidłowego wprowadzenia nukleotydu przez RT, a następnie powstawania miejscowego wybrzuszenia, w celu utworzenia prawidłowych wiązań typu Watsona-Cricka lub d) poprzez ślizganie się enzymu wzdłuż matrycy.

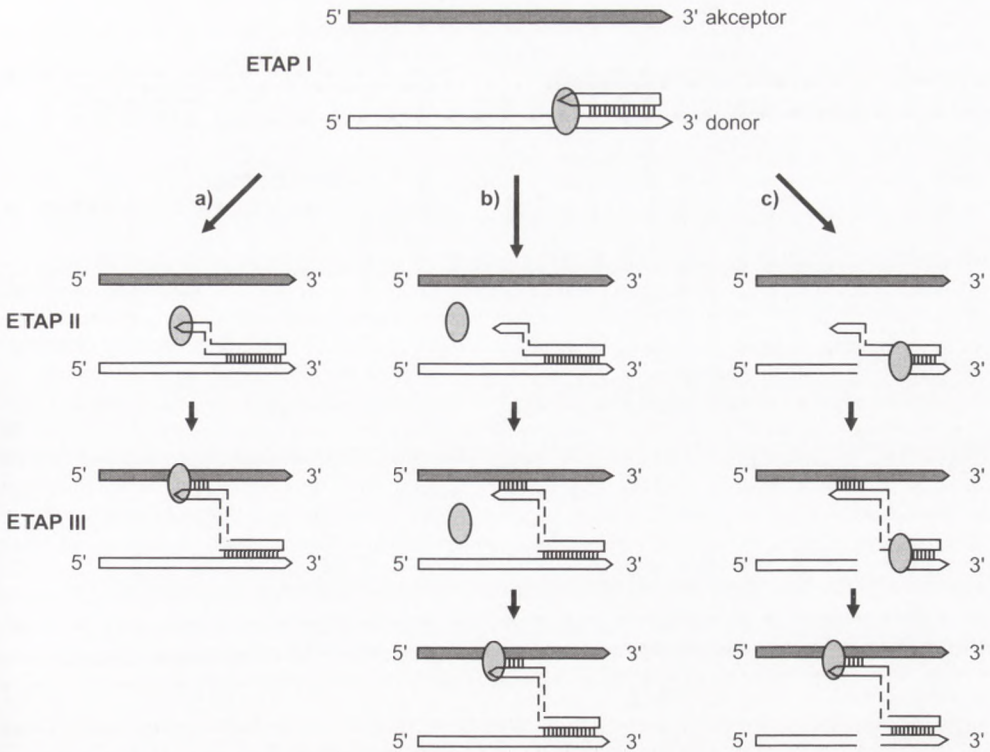
**3.2. Rearanżacje genomu wirusowego – rekombinacja RNA**

Jedną z najbardziej osobliwych cech retrowirusów jest wysoka częstość z jaką ich materiał genetyczny ulega rekombinacji (41). Do tej pory nie znaleziono innych naturalnie występujących układów biologicznych o tak dużej zdolności do wymiany materiału genetycznego (27). Zjawisko genetycznej rekombinacji RNA zdefiniować można jako proces tworzenia nowych części genomych w oparciu na fragmentach już istniejących genomów. Na podstawie wstępnych wyników badań zaproponowano dwa całkowicie różne mechanizmy tłumaczące w jaki sposób tworzone są rekombinanty wirusowe. W pierwszym zakłada się, że powstają one przez rozerwanie i ponowne połączenie części kwasu nukleinowego. Mechanizm ten wy-

korzystywany jest w rekombinacji DNA (42). W drugim zakłada się, że rekombinacja ma miejsce podczas replikacji genomu wirusowego, kiedy zaangażowana w ten proces polimeraza przenosi się z jednej cząsteczki matrycowej na drugą. Nazwano go mechanizmem wybiórczego kopiowania (*copy choice*) (43,44). Obecnie przeważa pogląd, że rekombinacja RNA zachodzi zgodnie z założeniami hipotezy wybiórczego kopiowania. Istnieją jednak pojedyncze doniesienia wskazujące, że w pewnych specyficznych sytuacjach obowiązywać może alternatywny mechanizm rekombinacji (45).

Chociaż hipoteza wybiórczego kopiowania nie wyjaśnia molekularnych podstaw procesu rekombinacji, pozwala jednak wyróżnić jego trzy podstawowe etapy (rys. 3). Podczas pierwszego, synteza nici potomnej na matrycy zwanej cząsteczką donorową zostaje zahamowana. Rolę cząsteczki donorowej pełnić może zarówno genomowy RNA jak i powstały w procesie odwrotnej transkrypcji ssDNA. Wiele jest przyczyn, dla których HIV RT ulega zatrzymaniu na cząsteczce donorowej. Najczęściej obserwowane to: brak ciągłości matrycy, obecność specyficznych sekwencji czy motywów strukturalnych, błędne wprowadzenie nukleotydu lub oddziaływania genomowego RNA z białkiem nie uczestniczącym w replikacji (np. białkiem kapsydomym). W drugim etapie kompleks HIV RT z nicią potomną zostaje uwolniony z donorowego RNA/ssDNA lub też sama tylko HIV RT cofa się na matrycy, uwalniając koniec 3' nowo syntetyzowanej nici. Ostatni etap polega na przeniesieniu HIV RT wraz z cząsteczką potomną na nową matrycę zwaną akceptorem (genomowy RNA lub ssDNA). Scenariusz, według którego zachodzi ten proces, uzależniony jest od przebiegu etapu drugiego. Jeżeli HIV RT oraz nić potomna zostały uwolnione z cząsteczki donorowej jako kompleks, mogą być w całości przeniesione na cząsteczkę akceptorową. Czynnikiem umożliwiającym zajście tego procesu jest hybrydyzacja nici potomnej do sekwencji komplementarnej występującej w akceptorowym RNA/ssDNA lub wiązanie HIV RT do sekwencji promotorowej czy imitującej promotor, obecnej również w akceptorowym RNA/ssDNA. Jeżeli po oddysocjowaniu z cząsteczki donorowej kompleks HIV RT z nicią potomną uległ rozpadowi, musi on zostać odtworzony na innej matrycy. Najprostszym rozwiązaniem w tej sytuacji jest hybrydyzacja kilku nukleotydów z końca 3' nici potomnej do akceptorowego RNA/ssDNA. Następnie koniec ten może służyć HIV RT jako starter. Jeżeli w drugim etapie doszło do cofnięcia HIV RT na cząsteczce donorowej, wówczas matrycowy RNA/ssDNA może ulec degradacji (np. w skutek działania rybonukleazy H stanowiącej część odwrotnej transkryptazy lub innej nukleazy specyficznej dla ssDNA) w wyniku czego uwolniony zostaje koniec 3' nici potomnej. Hybryduje on do sekwencji komplementarnej obecnej w cząsteczce akceptorowej, umożliwiając przeskok HIV RT na nową matrycę.

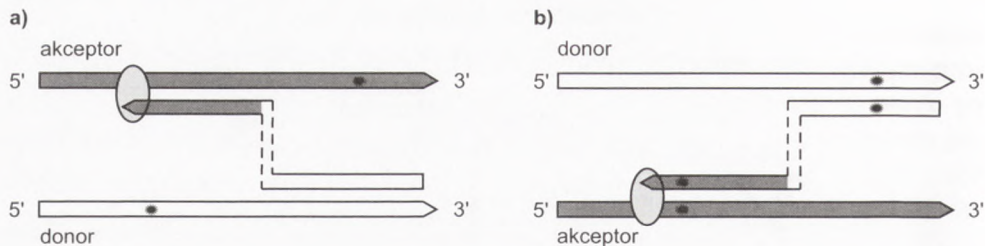
Wymiana informacji genetycznej najczęściej ma miejsce w obrębie tej samej populacji wirusowej, aczkolwiek znane są przypadki rekombinacji pomiędzy różnymi wirusami, czy nawet pomiędzy RNA wirusowym a RNA pochodzącym z komórki gospodarza. Jeżeli w rekombinacji uczestniczą dwie identyczne lub prawie identyczne cząsteczki kwasu nukleinowego mówimy, że jest ona homologiczna, natomiast jeśli do wymiany dochodzi między różnymi cząsteczkami, nazywamy ją niehomologiczną (46).



Rys. 3. Proponowane mechanizmy rekombinacji zachodzącej zgodnie z hipotezą wybiórczego kopiowania. Zgodnie z hipotezą wybiórczego kopiowania proces rekombinacji genetycznej można podzielić na trzy podstawowe etapy. Na podstawie zebranych dotychczas danych przypuszcza się, że przeniesienie kompleksu HIV RT–nici potomna z cząsteczki donorowej na akceptorową może przebiegać według co najmniej trzech różnych scenariuszy. Etap I – zahamowanie syntezy nici potomnej na matrycy donorowej (zaznaczona kolorem białym) – jest wspólny dla wszystkich trzech scenariuszy. Scenariusz a) Etap II – kompleks HIV RT (zaznaczona szarym owalem) z nicią potomną zostaje uwolniony z cząsteczki donorowej (jako całość). Etap III – przeniesienie HIV RT wraz z nicią potomną na matrycę akceptorową (zaznaczona kolorem szarym) i kontynuacja syntezy. Scenariusz b) Etap II – HIV RT i nić potomna zostają osobno uwolnione z cząsteczki donorowej. Etap III – koniec 3' nowo syntetyzowanej nici zostaje przeniesiony na matrycę akceptorową, następnie do powstałego dupleksu przyłącza się HIV RT. Po odtworzeniu kompleksu replikazowego synteza nici potomnej może zostać wznowiona. Scenariusz c) Etap II – HIV RT cofa się na matrycy uwalniając koniec 3' nowo syntetyzowanej nici, równocześnie degradując fragment cząsteczki donorowej (sytuacja taka może mieć miejsce, gdy cząsteczką matrycową jest RNA, ponieważ HIV RT posiada aktywność RNazy H). Etap III – uwolniony koniec 3' nowo syntetyzowanej nici hybrydyzuje z sekwencją komplementarną, obecną w cząsteczce akceptorowej. RT może przeskoczyć na nową matrycę i kontynuować syntezę DNA zależną od RNA bądź DNA.

Rekombinacja homologiczna może prowadzić zarówno do stabilizacji, jak i destabilizacji genomu wirusowego. Z jednej strony, dzięki zajściu rekombinacji homologicznej naprawie może ulec uszkodzony lub błędnie zsintetyzowany fragment genu (rys. 4a), z drugiej, rekombinacja homologiczna może pogłębiać proces różni-





Rys. 4. Rekombinacja homologiczna może zarówno stabilizować (a) jak i destabilizować (b) genom wirusowy. Załóżmy, że mamy dwie pule cząsteczek genomowych – pierwszą stanowią cząsteczki posiadające mutację na końcu 3', a drugą cząsteczki z mutacją na końcu 5' (mutacje oznaczono gwiazdkami) - oraz, że przeskoki rekombinacyjne zachodzą w części centralnej cząsteczek; a) jeżeli polimeraza (zaznaczona szarym owalem) rozpocznie syntezę na matrycy nie posiadającej mutacji na końcu 3' (nić donorowa, zaznaczona kolorem białym), a następnie przeskoczy na matrycę nie posiadającą mutacji na końcu 5' (nić akceptorowa, zaznaczona kolorem szarym), utworzona cząsteczka potomna będzie typu dzikiego; b) jeżeli polimeraza rozpocznie syntezę na matrycy posiadającej mutację na końcu 3' (w tym przypadku jest to nić donorowa, oznaczona kolorem białym), a następnie przeskoczy na matrycę akceptorową (oznaczona kolorem szarym), posiadającą mutację na końcu 5', nowo powstała cząsteczka zakumuluje mutacje obecne w obu matrycach.

cowania cząsteczek genomowych (rys. 4b). Dodatkowo rekombinację homologiczną podzielić można na precyzyjną i nieprecyzyjną. O precyzyjnej mówimy, wówczas gdy miejsca przeskoczków rekombinacyjnych ulokowane są dokładnie na odpowiadających sobie nukleotydach. W wyniku zajścia tego typu rekombinacji odtworzone zostają cząsteczki rodzicielskie. Inaczej dzieje się w przypadku nieprecyzyjnej rekombinacji homologicznej, to znaczy gdy miejsca przeskoku rekombinacyjnego położone są w różnych rejonach cząsteczek rodzicielskich. Wówczas pewne fragmenty genomu wirusowego ulegają duplikacji lub delecji (46).

Zachodząca pomiędzy różnymi cząsteczkami RNA rekombinacja niehomologiczna prowadzi do największego zróżnicowania wirusów, odgrywa zatem istotną rolę w ich adaptacji i ewolucji. Powstawanie tysięcy wariantów umożliwia wyselekcjonowanie i powielenie tych najlepiej przystosowanych, dzięki którym wirus może przetrwać w niekorzystnych dla siebie warunkach (47).

#### 4. Podsumowanie

Genom HIV, podobnie jak i innych retrowirusów, stanowi stosunkowo długą i mało trwałą pojedynczą cząsteczkę RNA. Można by sądzić, że posiadający niestabilny genom mikroorganizm jest z góry skazany na zagładę. Tymczasem wirus wykorzystuje swoją najsłabszą stronę jako atut w walce o przetrwanie. Najistotniejszym elementem w zastosowanej strategii jest odwrotna transkryptaza odpowie-

działna zarówno za nieprecyzyjne kopiowanie cząsteczek genomowych jak i za wysoką częstość ich rekombinacji (35,36).

Szacunkowe dane wskazują, że podczas jednego tylko dnia w organizmie chorego powstaje około  $10^4$ - $10^5$  punktowych mutacji w każdej pozycji nukleotydowej genomu HIV. Pozwala to przypuszczać, że warianty odporne na potencjalnie zastosowany lek istnieją w populacji wirusowej już przed rozpoczęciem terapii.

Obserwowana u HIV wysoka częstość rekombinacji, jak się wydaje, ma ścisły związek z faktem, że HIV RT posiada naturalną zdolność do przeskakiwania pomiędzy cząsteczkami genomowymi (37,48). Wiadomo bowiem, że proces replikacji genomu wirusowego wymaga, by kompleks: odwrotna transkryptaza-nić potomna co najmniej dwukrotnie zmienił cząsteczkę matrycową. Pierwszy przeskok – przeniesienie nowo zsyntetyzowanego (-)ssDNA z końca 5' genomu wirusa na koniec 3', jest możliwy dzięki identycznym sekwencjom powtórzonym na obu końcach wirusowego RNA (sekwencje R). Drugi przeskok: przeniesienie nowo zsyntetyzowanego (+)ssDNA wymaga obecności drugiego rejonu homologii, którego rolę pełnią sekwencje wiążące starter (PBS – *primer-binding site*). W każdym wirionie HIV zapakowane są dwie cząsteczki (+)RNA, stąd przeskoki rekombinacyjne mogą mieć charakter wewnątrz- lub międzycząsteczkowy (27).

Na podstawie dotychczas zebranych danych badacze sugerują, że rekombinacja była jednym z podstawowych czynników umożliwiających powstanie HIV. Człowiek nie jest naturalnym gospodarzem tego wirusa (47). HIV-1 najprawdopodobniej wyewoluował z podobnego wirusa – SIV (*simian immunodeficiency virus*), infekującego małpy nieczłekokształtne (32). Uzyskane w ostatnim czasie wyniki pozwalają przypuszczać, że przodek HIV pokonał barierę międzygatunkową pomiędzy naczelnymi nieczłekokształtnymi a człowiekiem na początku XX wieku. Aby przystosować się do nowego gospodarza, musiał przekształcić swój genom, wykorzystując najprawdopodobniej strategię rekombinacji niehomologicznej (47,49).

Ogromna plastyczność genetyczna retrowirusów oraz brak dostatecznej adaptacji do gospodarza, którego organizm wywiera ogromną presję selekcyjną na wirusa, decyduje o ogromnym potencjale ewolucyjnym i wysokiej patogenności HIV. Są to niestety też przyczyny utrudniające opracowanie skutecznej szczepionki przeciwwirusowej.

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych – projekt badawczy nr 6 P04A 038 19.

## Literatura:

1. Richman D. D., (2001), *Nature*, 410, 995-1001.
2. Ho D. D., Neumann A. U., Perelson A. S., Chen W., Leonard J. M., Markowitz M., (1995), *Nature*, 373, 123-126.
3. Wei X. S., Ghosh S. K., Taylor M. E., Johnson V. A., Emini E. A., Deutsch P., Lifson J. D., Bonhoeffer S., Nowak M. A., Hahn B. H., Sag M. S., Shaw G. M., (1995), *Nature*, 373, 117-122.

4. Coffin J. M., (1995), *Science*, 267, 483-489.
5. Marks P. A., Munn R. J., Joy K. I., (1988), *Lab. Invest.*, 58, 112-118.
6. Nermut M. V., Grief C., Hashmi S., Hockley D. J., (1993), *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 9, 929-938.
7. Marquet R., Baudin F., Gabus C., Darlix J. L., Mougél M., Ehresman C., Ehresman B., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 2349-2357.
8. Weiss C. D., König B., Müller H.-J., Seidel H., Goody R. S., (1992), *Gene*, 111, 183-197.
9. Stein B. S., Gowda S. D., Lifson J. D., Penhallow R. C., Bensch K. G., Engleman E. G., (1987), *Cell*, 49, 659-668.
10. Maddon P. J., McDougal J. S., Clapham P. R., Dalgliesh A. G., Jamal S., Weiss R. A., Axel R., (1988), *Cell*, 54, 865-874.
11. Bowerman B., Brown P. O., Bishop J. M., Varmus H. E., (1989), *Genes Dev.*, 3, 469-478.
12. Farnet C. M., Haseltine W. A., (1991), *J. Virol.*, 65, 1910-1915.
13. Peliska J. A., Benkovic S. J., (1992), *Science*, 258, 1112-1118.
14. Whitcomb J. M., Kumar R., Hughes S. H., (1990), *J. Virol.*, 64, 4903-4906.
15. Goff S. J., Skalka A. M., (1993), in: *Reverse transcriptase*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. Varmus H., Brown P., (1989), in: *Mobile DNA*, Eds. Howe M., Berg D., Washington, ASM, 53-108.
17. Goff S., (1992), *Annu. Rev. Genet.*, 26, 527-544.
18. Whitcomb J. M., Huges S. M., (1992), *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8, 275-306.
19. Antoni B. A., Stein S. B., Rabson A. B., (1994), *Adv. Virus. Res.*, 43, 53-145.
20. Jones K. A., Peterlin B. M., (1994), *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 717-743.
21. Cherrington J., Ganem D., (1992), *EMBO J.*, 11, 1513-1524.
22. DeZazzo J. D., Scott J. M., Imperiale M. J., (1992), *Mol. Cell Biol.*, 12, 5555-5562.
23. Cullen B. R., Greene W. C., (1989), *Cell*, 58, 423-426.
24. Pomerantz R. J., Bagasra O., Baltimore D., (1992), *Curr. Opin. Immunol.*, 4, 475-480.
25. Wills J. W., Craven R. C., (1991), *AIDS*, 5, 639-654.
26. Bolognesi D. P., Montelaro R. C., Frank H., Schafer W., (1978), *Science*, 199, 183-186.
27. Pathak V. K., Hu W.-S., (1997), *Seminars in Virology*, 8, 141-150.
28. Kim T., Mudry R. A. Jr., Rexrode C. A., Pathak V. K., (1996), *J. Virol.*, 70, 7594-7602.
29. Felder M.-P., Laughier D., Yatsula B., Dezelee P., Calothy G., Marx M., (1994), *J. Virol.*, 68, 4759-4767.
30. Hajjar A. M., Linial M. L., (1995), *J. Virol.*, 69, 5878-5882.
31. Cattaneo R., (1994), *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 4, 895-900.
32. Overbaugh J., Bangham Ch. R., (2001), *Science*, 292, 1106-1109.
33. Glickman B. W., Saddi V. A., Curry J., (1994), *Mutat. Res.*, 304, 19-32.
34. Barklis E., Mulligan R. C., Jaenisch R., (1986), *Cell*, 47, 391-399.
35. Williams K. J., Løeb L. A., (1992), *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 176, 165-180.
36. Bebenek K., Kunkel T. A., (1993), in: *Reverse transcriptase*, Eds. Skalka A. M., Goff S. P., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 85-102.
37. Bebenek K., Abbotts J., Roberts J. D., Wilson S. H., Kunkel T., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 16948-16956.
38. Ricchetti M., Buc H., (1990), *EMBO J.*, 9, 1583.
39. Pathak V. K., Temin H. M., (1992), *J. Virol.*, 66, 3093-3100.
40. Manky L. M., Temin H. M., (1995), *J. Virol.*, 69, 5087-5094.
41. Rous P., Murphy J. B., (1913), *J. Exp. Med.*, 17, 219-231.
42. Chetverin A. B., Chetverina H. V., Demidenko A. A., Ugarov V. I., (1997), *Cell*, 88, 503-513.
43. Vogt P. K., (1971), in: *Possible Episomes in Eukaryotes*, Ed. Sylvestri L., North-Holland, Amsterdam, 35-41.
44. Coffin J. M., (1979), *J. Gen. Virol.*, 199, 47-59.
45. Chetverin A. B., (1997), *Seminars in Virology*, 8, 121-129.
46. Figlerowicz M., Bujarski J. J., (1997), *Postępy Biochemii*, 43(4), 257-266.
47. Hahn H., Shaw G. M., de Cock K.M., Sharp P. M., (2000), *Science*, 287, 607-614.
48. Temin H. M., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6900-6903.
49. Zimmer C., (2001), *Science*, 292, 1090-1093.