

Mechanizmy ekspresji genomów wirusowych

# Mistrzowie kodowania



**Dr Adrianna Łoniewska-Lwowska** pracuje w Zakładzie Biosyntezy Białka IBB PAN nad uzyskaniem infekcyjnej kopii genomu wirusa ziemniaka Y (PVY) oraz nad określeniem elementów regulatorowych syntezy i wyrażania białek z subgenomowego RNA

**ADRIANNA ŁONIEWSKA-LWOWSKA**  
Instytut Biochemii i Biofizyki, Warszawa  
Polska Akademia Nauk  
adalon@ibb.waw.pl

**Genomy wirusów są bardzo małe, jednak dzięki kilku sprytnym mechanizmom mogą produkować wystarczającą liczbę potrzebnych im białek**

Każdy z nas zetknął się z wirusami, choćby pod postacią uprzykrzającego życie kataru. Niestety, aktywność wirusów nie ogranicza się tylko do chorób niegroźnych dla życia człowieka. Tak poważne choroby jak AIDS, wirusowe zapalenie wątroby czy

wścieklizna też są wywoływane przez wirusy. Rośliny również padają ofiarami wirusów, np. wirusa mozaiki tytoniu (TMV, ang. *tobacco mosaic virus*) – pierwszego poznanego wirusa, czy wirusa ziemniaka typu Y (PVY, ang. *potato virus Y*). Infekcje wirusowe istotnie obniżają plony ważnych roślin uprawnych. Wirusy atakują także bakterie. Te bardzo skomplikowane w strukturze wirusy, odkryte na początku XX wieku przez kanadyjskiego lekarza Féliksa Huberta d’Herelle, nazywamy bakteriofagami.

Nie ma chyba organizmu, któremu wirusy nie dawałyby się we znaki. Nie wszyscy zdają sobie sprawę z tego, że te groźne pasożyty w strukturalnej definicji życia nie są uważane za organizmy żywe. Nie mają struktury komórki, nie są zdolne do wzrostu czy namna-

Jack Dykinga, ARS Image Gallery



Liść zaatakowany wirusem mozaiki tytoniu – pierwszym poznany wirusem



żania się poza komórką gospodarza. Mają jednak geny i wykazują zdolność do ewolucji.

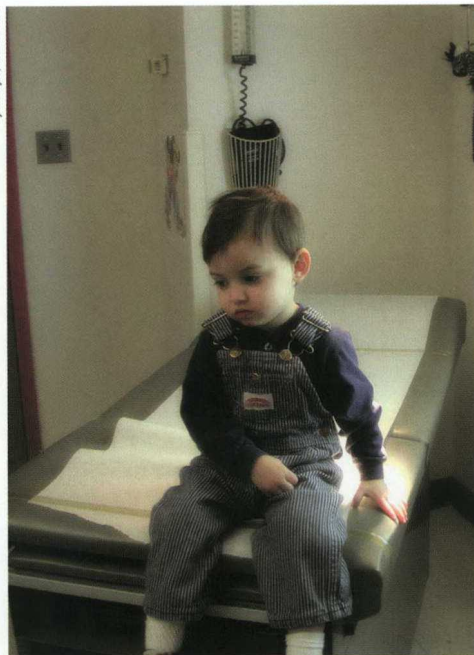
### Od zawsze z nami

Wirusy towarzyszyły ludzkości od zawsze. Pierwsze doniesienia opisujące człowieka z typowymi objawami poliomyelitis, lepiej znanej jako choroba Heinego-Medina, pochodzą sprzed około 1400 roku p.n.e. Wiemy też, że 1000 lat p.n.e. ospa była chorobą endemiczną w Chinach. W tamtych czasach podejmowano nawet pierwsze próby szczepień. Zanim jednak mogliśmy bliżej poznać i nauczyć się walczyć z tymi niewidzialnymi drapieżnikami, musiało upłynąć sporo czasu.

Dopiero w latach 40. XX w. – dzięki skonstruowaniu mikroskopu elektronowego – możliwe stało się bezpośrednio oglądanie cząstek wirusowych, ocenianie ich wielkości (do tego czasu pomiar wielkości cząstek wirusowych opierał się na określaniu ich przesączalności przez filtry bakteryjne) i ilości w badanym materiale oraz ich struktury.

Pojedynczą cząsteczkę wirusa nazywamy wirionem. Składa się on z dwóch elementów. Jednym jest genom – właściwy czynnik zakaźny – w postaci DNA (kwas dezoksyrybonukleinowy) lub RNA (kwas rybonukleinowy). Drugim elementem jest otoczka białkowa, zwana kapsydem lub płaszczem. Otoczka pełni funkcję ochronną dla materiału genetycznego. Niektóre wirusy na powierzchni kapsydu mają swoiste glikoproteiny lub lipidy. Pomagają one rozpoznać komórkę, która ma być zainfekowana, i ułatwiają fuzję błony kapsydu i plazmalemy komórki.

Na podstawie przestrzennej budowy kapsydu możemy wyróżnić dwa podstawowe typy wirionów, kuliste (ikosaedralne, np. wirus Heinego-Medina) oraz cylindryczne (heliakalne, np. TMV). Ciekawe, że jeśli zmieszamy kwas nukleinowy wirusa z kapsomerami, to nowe wiriony składają się samorzutnie, dając formy infekcyjne. Co więcej, kapsomery bez obecności materiału genetycznego są w stanie samodzielnie tworzyć tzw. cząsteczki wirusopodobne (VLP, ang. *viruslike particles*). Takie cząsteczki nie są w stanie wywołać infekcji wirusowej, bo nie posiadają wewnątrz materiału genetycznego, ale są zdolne do stymulacji produkcji przeciwciał w ludzkim organizmie. Dlatego mogą być i są wykorzystywane do produkcji szczepionek. Najbardziej skomplikowaną budowę mają wirusy ataku-



Jm Mejer, www.sxc.hu

Wirusy towarzyszą ludziom od zawsze. Większość chorób wieku dziecięcego jest wywołana przez wirusy

jące bakterie (bakteriofagi). Składają się one z główki osłaniającej materiał genetyczny oraz ogonka z kurczliwą pochwą, czasem zaopatrzonego we włókna. Ogonek, kurcząc się, przebija ścianę bakterii i wprowadza materiał genetyczny do wnętrza komórki.

### Skąpy genom

Przełomowym momentem w starciu ludzkości z wirusami był rozwój biologii molekularnej. Dzięki rozwinięciu technik rekombinacji DNA, sekwencjonowania, termocyklicznej reakcji łańcuchowej polimerazy PCR, analizy restrykcyjnej, a zwłaszcza technik „odwrotnej genetyki” udało się poznać budowę genów i genomów wirusowych. To zaś umożliwiło odpowiedź na pytanie, w jaki sposób geny odpowiadają za „akt wirusowej przemocy”.

Szczegółowe badania pozwoliły stwierdzić, że w porównaniu z genomami komórek prokariotycznych (bakterie) i eukariotycznych (organizmy jądrowe: rośliny i zwierzęta) genomy wirusów są stosunkowo niewielkie. Największy znany genom wirusa ma tylko 190 tysięcy nukleotydów (190 kb), natomiast genomy bakteryjne są rzędu 1000–9000 kb. Genom ludzki to aż 6 miliardów nukleotydów! Ze względu na tak małe rozmiary jest oczywiste, że genomy wirusowe mogą kodować ograniczoną liczbę białek. W zależności od typu wirusa jest to od pięciu do kilkuset białek. Niektóre z białek są wy-



## Mechanizmy ekspresji genomów wirusowych

Przełomowym momentem w starciu człowieka z wirusami był rozwój biologii molekularnej



PHOTOFANE/BEA/W

korzystywane do budowy płaszcza. Genomy wirusów kodują również własne polimerazy DNA i RNA, czyli białka enzymatyczne wytwarzające kopie potomne genomów wirusowych. Białka te są konieczne, ponieważ komórki gospodarzy nie zawierają ani polimeraz RNA niezbędnych do replikacji wirusowych genomów zbudowanych z RNA, ani odpowiednich polimeraz DNA i białek dodatkowych, koniecznych do replikacji niektórych wirusowych DNA. Genomy wirusowe kodują również białka odpowiedzialne za wywoływanie symptomów chorobowych, determinanty przenoszenia z gospodarza do gospodarza przez tzw. wektory, czyli np. owady.

### Genetyczna ekonomia

Mimo że genów wirusowych kodowanych przez ich genomy jest niewiele (w porównaniu z organizmami pro- i eukariotycznymi), to i tak zastanawiające było, w jaki sposób mieszczą się one w tak krótkich genomach. Dwie istotne cechy wirusowych genomów decydują o wysokiej kondensacji informacji genetycznej. Po pierwsze, w wirusowych genomach zdecydowana większość nukleotydów związana jest z kodowaniem białek. To oznacza, że genom wirusa zawiera bardzo mało sekwencji niekodujących. To całkowite przeciwieństwo tego, co spotykamy u wielu or-

ganizmów eukariotycznych, w tym człowieka, gdzie znaczny procent sekwencji nukleotydowych genomu nie jest zaangażowany w kodowanie białek (stanowi tzw. sekwencje niekodujące).

Po drugie, u wielu wirusów mamy do czynienia z rzadko spotykanym u organizmów eukariotycznych podwójnym wykorzystaniem informacji genetycznej. Istnienie genów zachodzących jest przykładem wykorzystania tej samej sekwencji do kodowania więcej niż jednego białka. W ten sposób potencjał kodujący wirusowego genomu może być znacznie większy, niż wynikałoby to z trójkowego kodu genetycznego. W jaki sposób jedna sekwencja może kodować kilka białek? Odpowiedź przyniosły lata badań. Odkryto wiele różnorodnych wykorzystywanych przez wirusy mechanizmów ekspresji, czyli przepisywania sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasową białek. Sekwencje kodujące geny posiadają sygnały typu „start” i „stop”, mówiące komórkowej maszynie translacyjnej, która tłumaczy sekwencję genów na sekwencję białek, skąd zacząć i gdzie skończyć. Czasem zdarza się, że w bliskim sąsiedztwie w sekwencji znajduje się kilka sygnałów „start”. Zgodnie z przyjętym modelem klasycznej translacji inicjacja zaczyna się od pierwsze-



go sygnału „start”. Czasem jednak zdarza się, że maszyna translacyjna syntetyzuje białka zarówno z pierwszego, jak i z drugiego sygnału „start”. W wyniku tego mogą powstawać dwie pule białek wirusowych: częściowo o takiej samej lub o zupełnie innej sekwencji aminokwasowej. Taki mechanizm to „przepuszczający skaning” (ang. *leaky scanning*). Jest wykorzystywany chociażby przez wirusa niedoboru odporności człowieka (HIV) czy wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV).

### Na czerwonym świetle

Innym często używanym mechanizmem ekspresji, zachodzącym tylko w sprzyjających warunkach, jest „odczytywanie kodonu terminacyjnego” (ang. *read through*). To tak jakby aparat translacyjny nie zauważał czerwonego światła. Tyle że w tym wypadku nie dochodzi do katastrofy – oprócz białka o krótszej sekwencji powstaje po prostu drugie białko o dłuższej, częściowo identycznej sekwencji.

Wiele wirusów, aby zwiększyć wydajność genomu, angażuje mechanizm prowadzący do zmiany ramki odczytu. Polega on na wykorzystaniu tej samej sekwencji nukleotydowej dwa razy, ale w innej fazie. Przy czym od miejsca, w którym doszło do zmiany ramki odczytu, dwa powstające białka mają zupełnie odmienną sekwencję aminokwasową.

Czasem zdarza się, że ze względu na budowę genomu wirusy są niejako zmuszone dosyntetyzować dodatkowe klasy RNA (tzw. subgenomowe RNA). Dzięki temu geny, które w układzie genomowym nie były dostępne dla maszyny translacyjnej, są teraz efektywnie wyrażane. Spotyka się to u wielu wirusów zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych.

Możliwości występowania wszystkich tych mechanizmów są zależne od sekwencji, które regulują wirusowe procesy. Mogą to być powstające w obrębie genomu elementy strukturalne lub sekwencyjne (np. promotory).

### Wirus liściozwoju

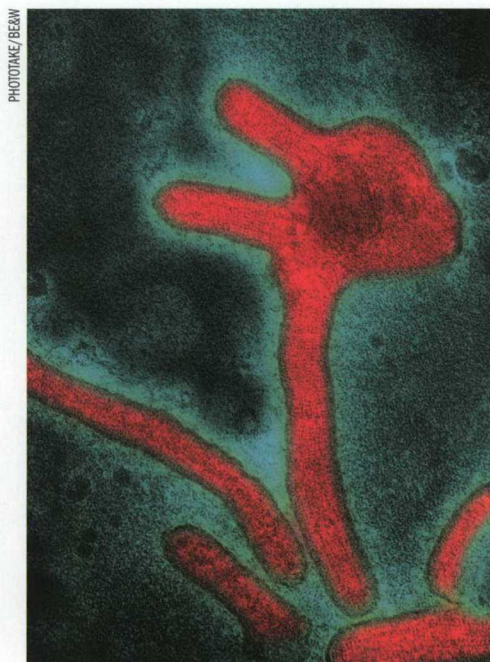
Obiektem moich badań jest wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV, ang. *potato leafroll virus*). Jest to patogen roślinny o stosunkowo niewielkim genomie (około 6 tys. nukleotydów) w postaci jednoniciowego (+) RNA, w którego obrębie wyróżniono 8 genów. Wyrażane są z nich białka funkcjonalne i strukturalne. Te pierwsze biorą udział w replikacji wirusa (polime-

raza) i w jego przemieszczaniu w roślinie (MP ang. *movement protein*). Drugie budują jego kapsyd (CP ang. *coat protein*).

Do wyrażenia tych białek wirus angażuje wiele opisanych mechanizmów ekspresji. Sekwencje regulatorowe, ich umiejscowienie i rodzaj długo pozostawały nieznane. W trakcie przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów udało się ustalić lokalizację zarówno sekwencji promotorowej subgenomowego RNA1, jak i lokalizację regionu odpowiadającego za syntezę białek tej cząsteczki. Oba regiony regulatorowe zlokalizowane są w obrębie sekwencji kodujących białka, czyli mamy tu do czynienia z nałożeniem się w obrębie jednej sekwencji dwóch funkcji: regulatorowej i kodującej. To oczywiście otwiera dyskusję odnośnie do koewolucji sekwencji i wymagań stawianych przez naturę genomom wirusowym. Jedno jest pewne: PLRV znakomicie wpisuje się w regułę ekonomii informacji genetycznej, idealnie wykorzystując to, co dała mu natura – skąpy genom. ■

#### Chcesz wiedzieć więcej?

- Piekarowicz A. (2004). *Podstawy wirusologii molekularnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Bernardi F., Haenni A.L. (1998). Viruses: exquisite models for cell strategies. *Biochimie. Dec, 80 (12)*, 1035-41.
- Maia I.G., Séron K., Haenni A.L., Bernardi F. (1996). Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol Biol. Oct, 32 (1-2)*, 367-91.



Wirusy wykorzystują różne mechanizmy, by ominąć problem małego genomu. Na zdjęciu wirus Marburga powodujący gorączkę krwotoczną