Віруси з + РНК геномом

Реплікація/транскрипція + РНК-вмісних вірусів

Одноланцюгові РНК-геноми

- + (смислові) або
- - (антисмислові) РНК-геноми

Позитивні
(смислові)

AUG GCA CGA → **met ala arg**

Негативні
(антисмислові)

UAC CGU GCU

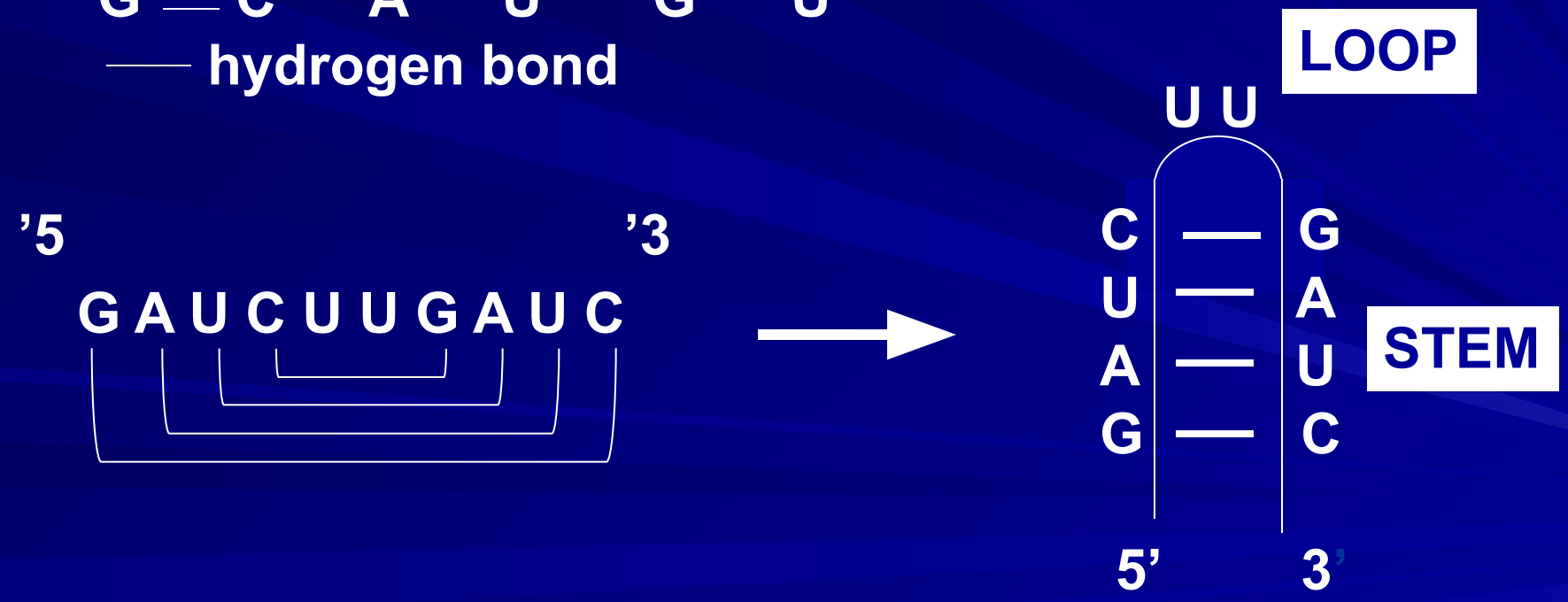
Генетичні карти РНК-вмісних вірусів

Вторинна структура РНК

- Молекула РНК «закривається» сама на себе
- Можливі віріанти з'єднання:

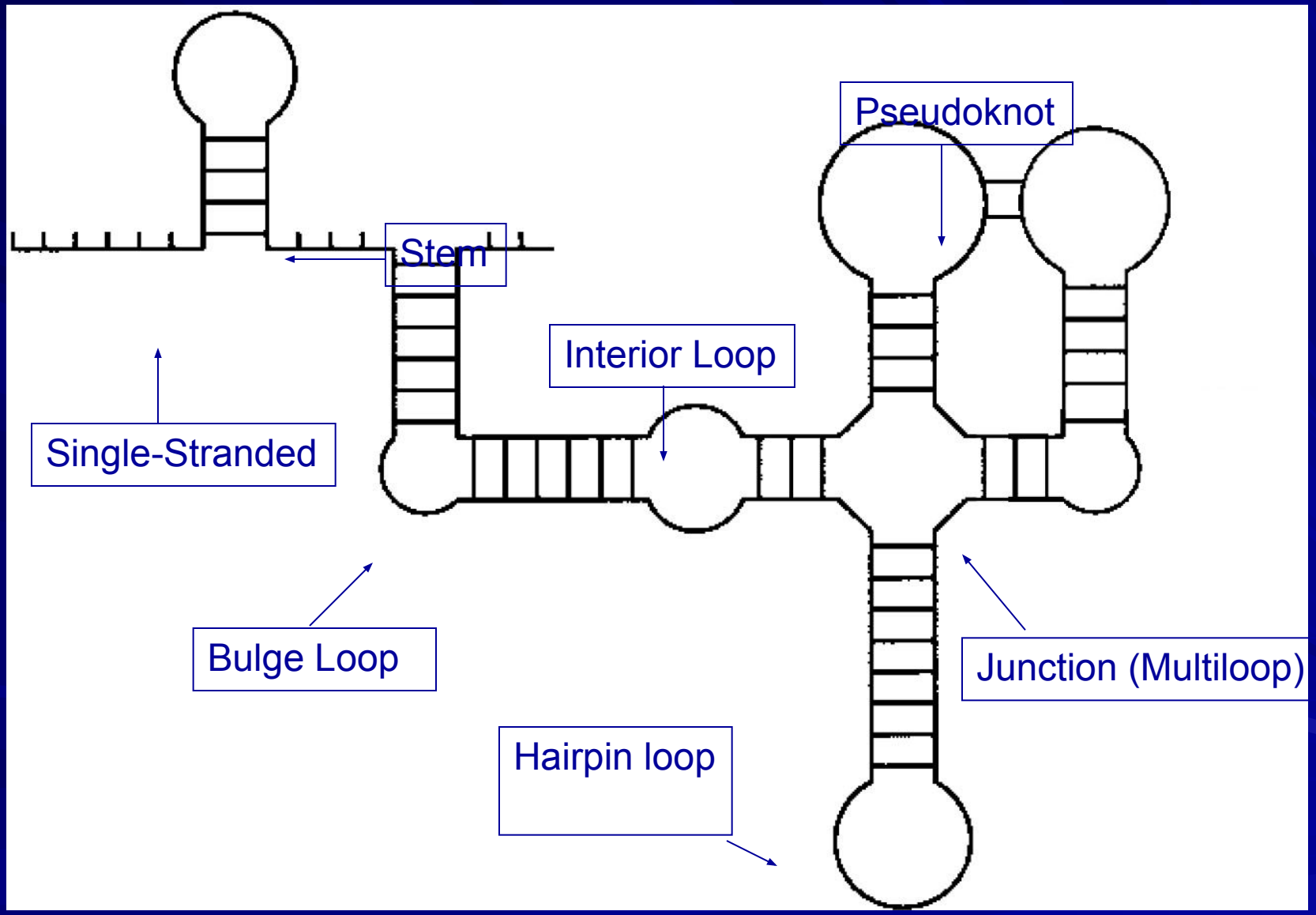
G ≡ C A = U G — U

— hydrogen bond

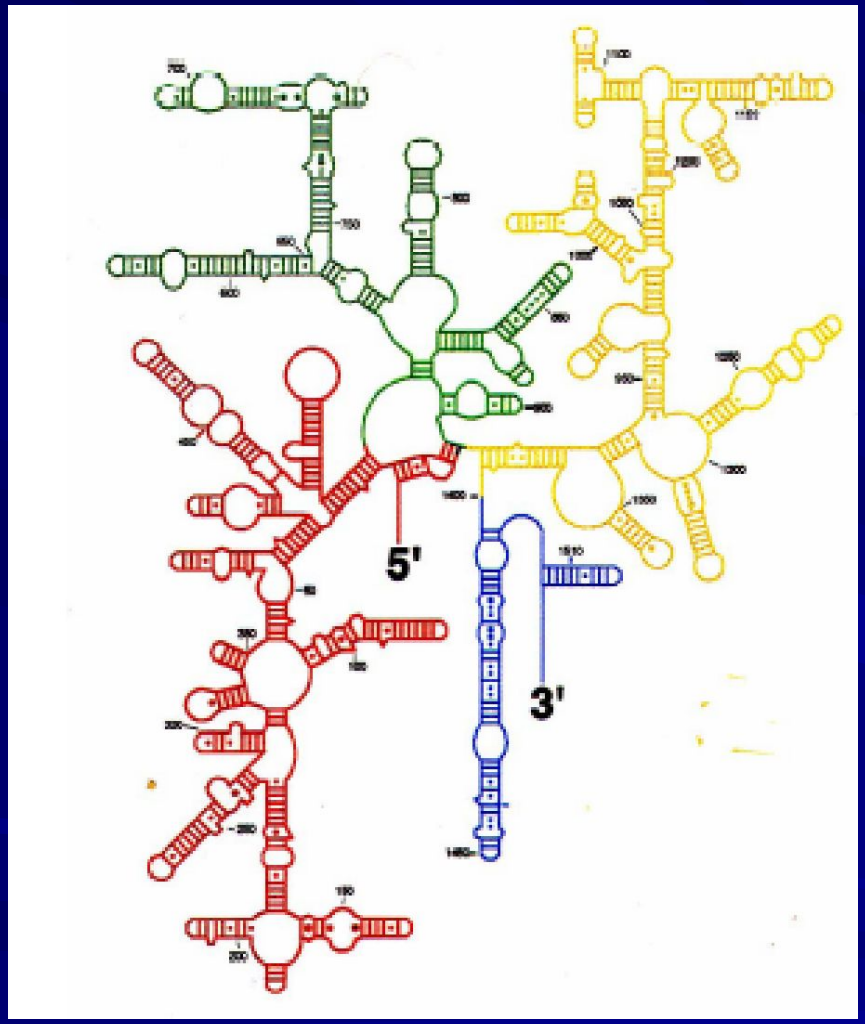


- Stem – “стовбур”
- Loop – “петля”
- Pseudoknot – “псевдовузол”

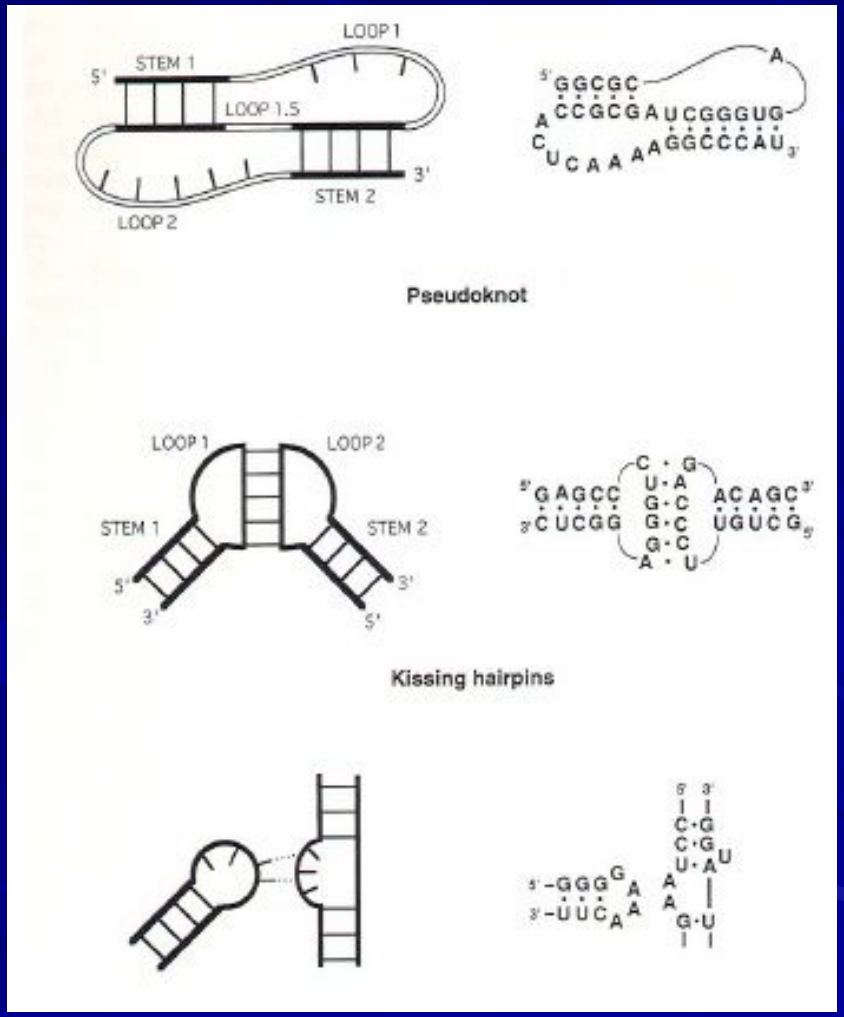
Вторинна структура РНК



Структура РНК



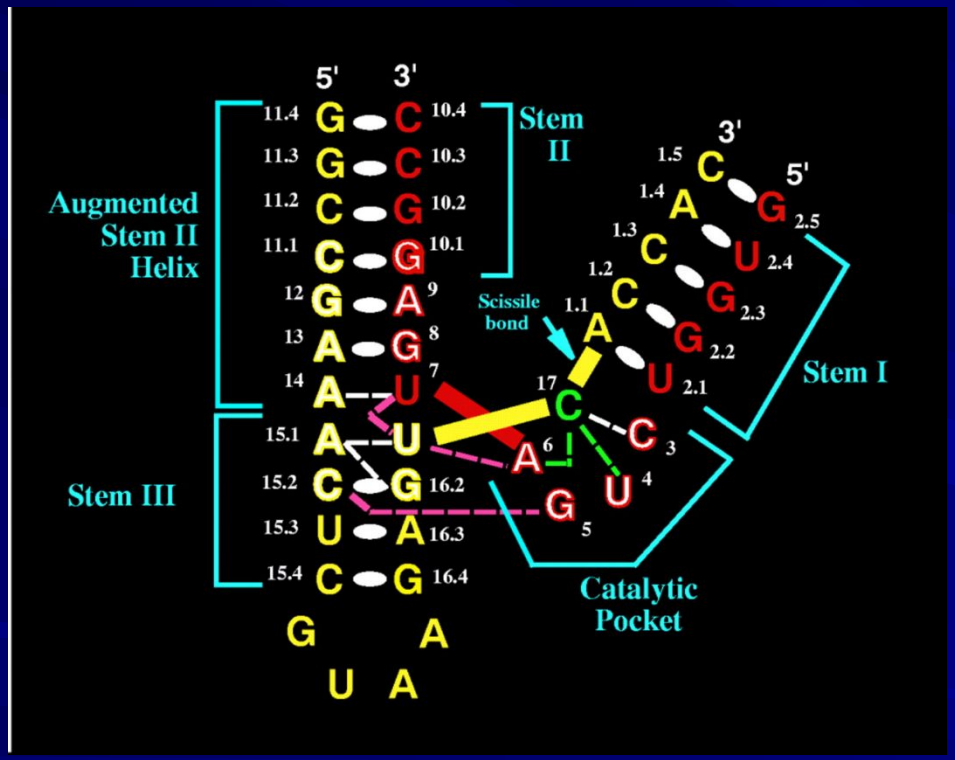
Рибосомальна РНК

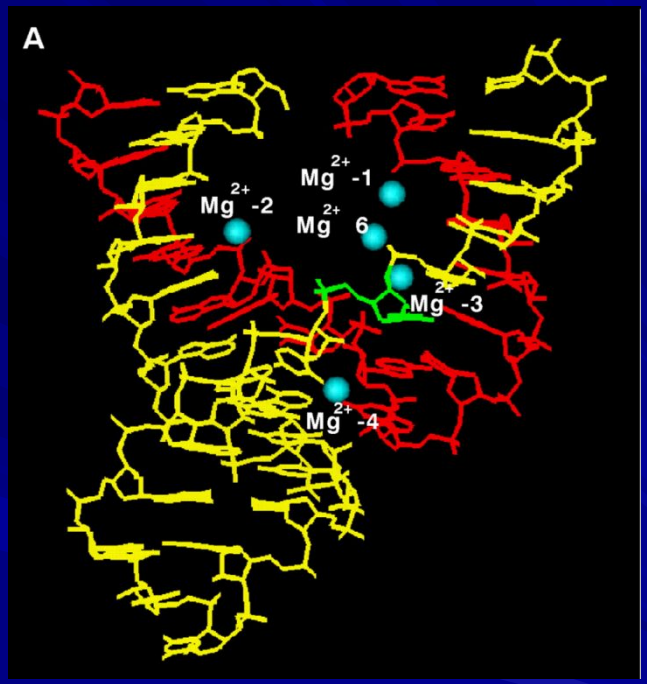


Варіанти третинної структури

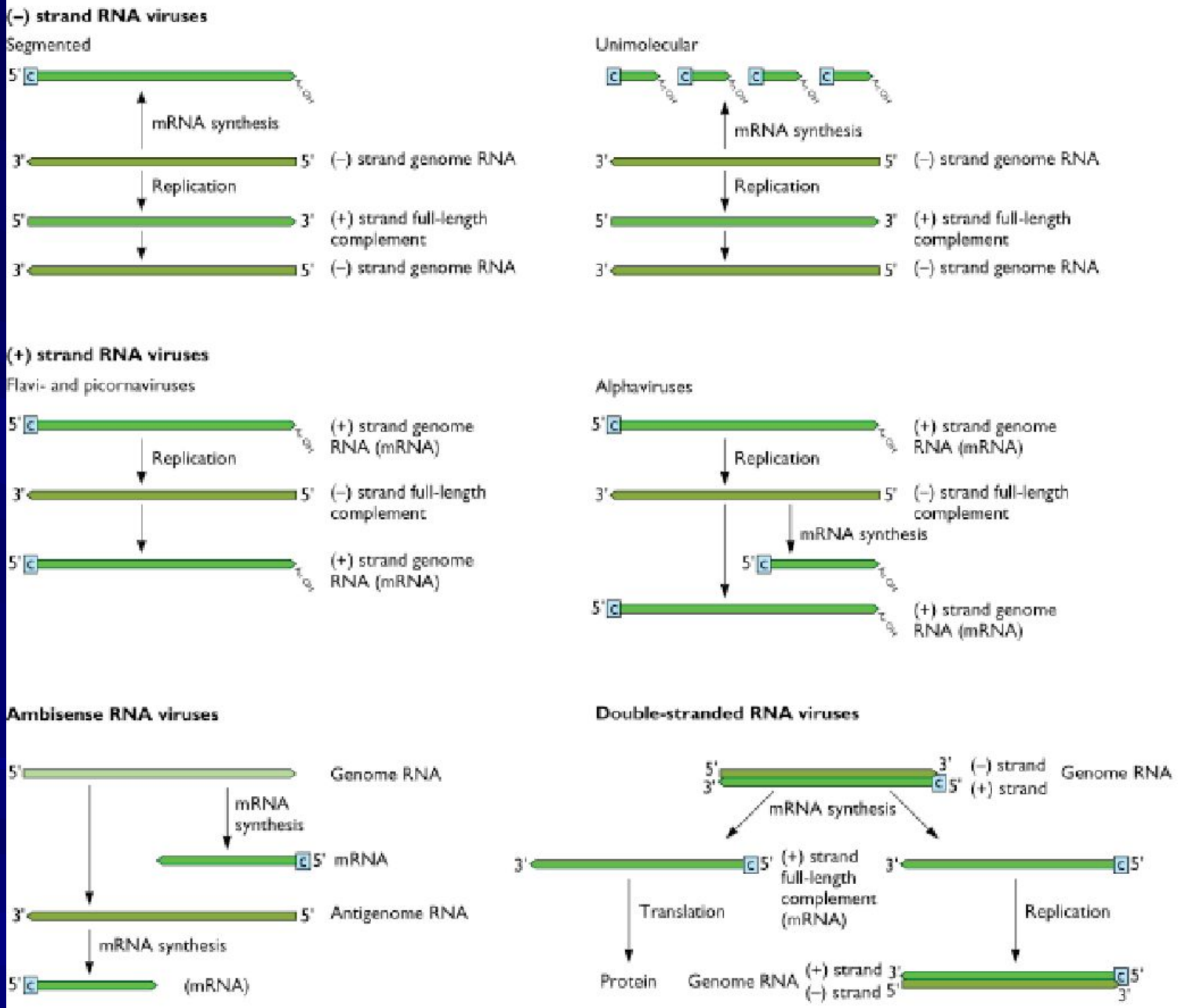
Рибозимна активність
(The hammerhead ribozyme (plant virus)

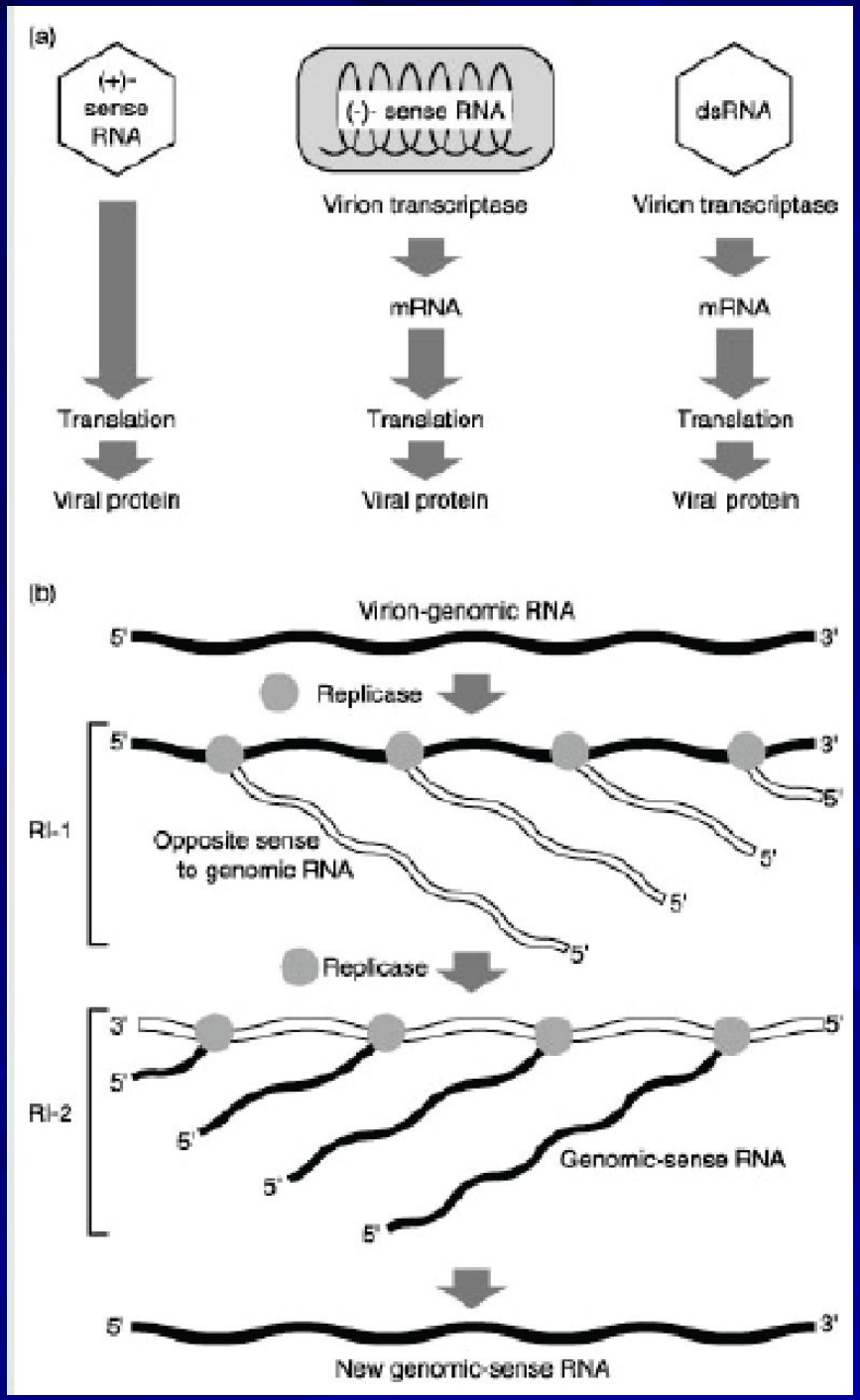
- tertiary structure

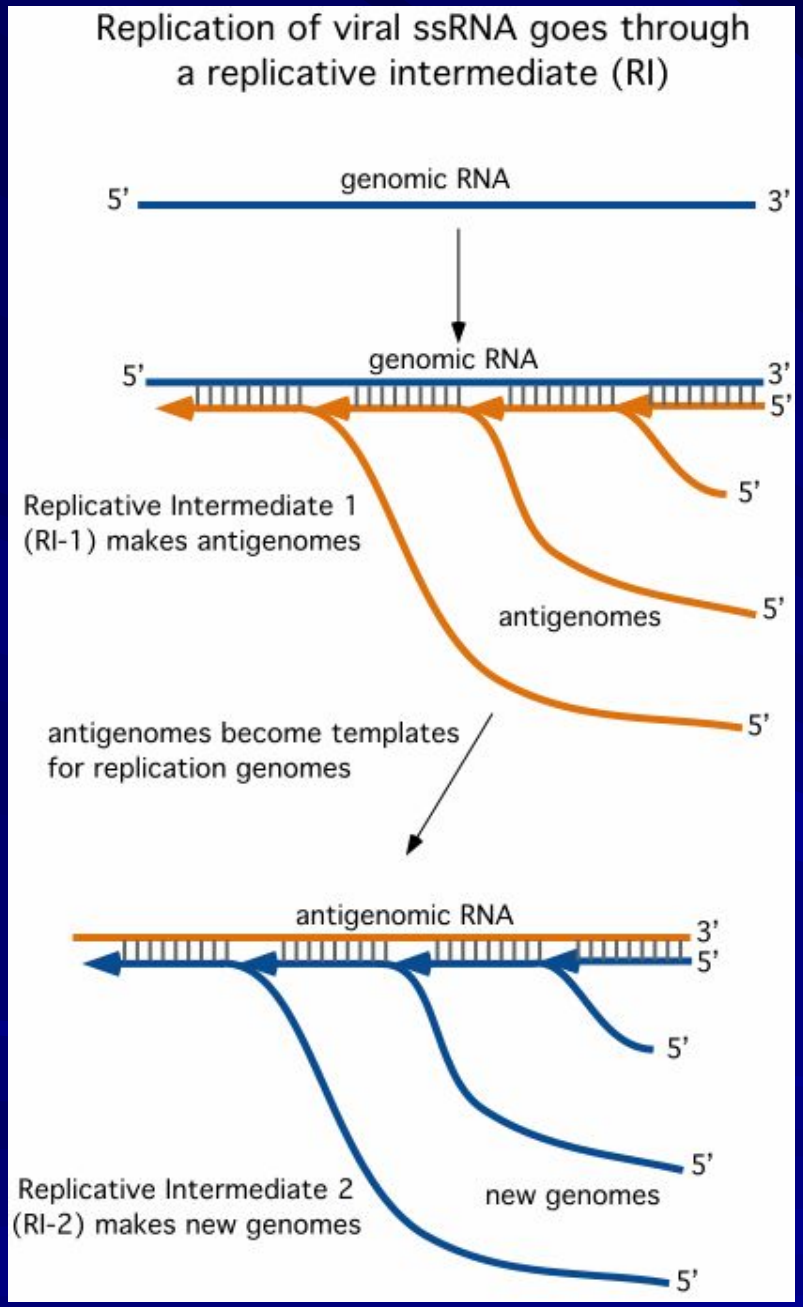


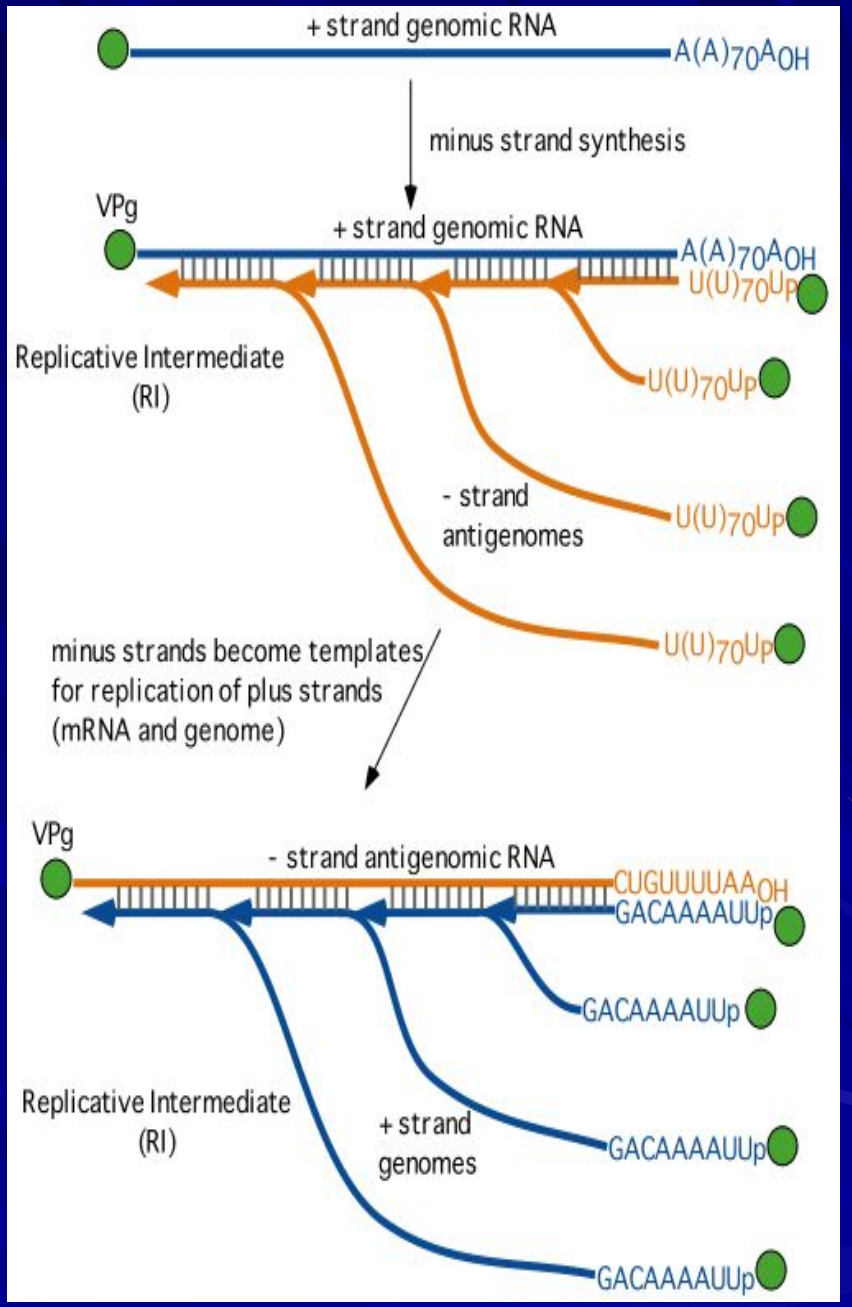


Scott et al and Klug, Science 1996

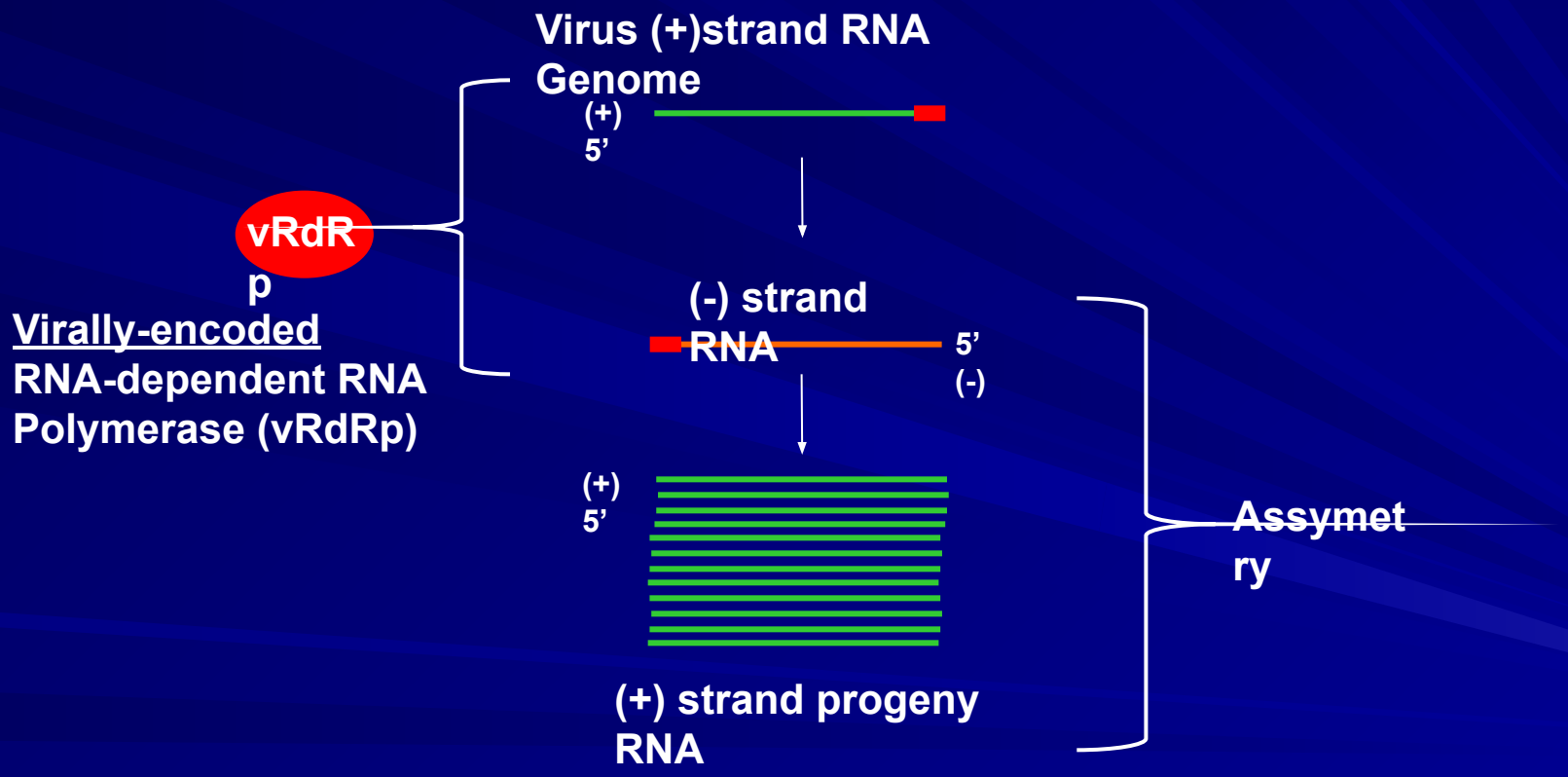

(–) strand RNA viruses
Segmented
5'
mRNA synthesis
3'
5'
(–) strand genome RNA
Replication
5'
3'
(+) strand full-length complement
3'
5'
(–) strand genome RNA
Unimolecular
mRNA synthesis
3'
5'
(–) strand genome RNA
Replication
5'
3'
(+) strand full-length complement
3'
5'
(–) strand genome RNA
(+) strand RNA viruses
Flavi- and picornaviruses
5'
(+) strand genome RNA (mRNA)
Replication
3'
5'
(–) strand full-length complement
5'
(+) strand genome RNA (mRNA)
Alphaviruses
5'
(+) strand genome RNA (mRNA)
Replication
3'
5'
(–) strand full-length complement
mRNA synthesis
5'
5'
(+) strand genome RNA (mRNA)
Ambisense RNA viruses
5'
Genome RNA
mRNA synthesis
5'
mRNA
3'
5'
Antigenome RNA
mRNA synthesis
5'
(mRNA)
Double-stranded RNA viruses
5'
3'
(–) strand
3'
5'
(+) strand
Genome RNA
mRNA synthesis
3'
5'
(+) strand full-length complement (mRNA)
3'
5'
Translation
Replication
Protein
Genome RNA
(+) strand
(–) strand
3'
5'
5'
3'


(a)
(+)- sense RNA
(-)- sense RNA
dsRNA
Virion transcriptase
Virion transcriptase
mRNA
mRNA
Translation
Translation
Translation
Viral protein
Viral protein
Viral protein
(b)
Virion-genomic RNA
5'
3'
Replicase
RI-1
Opposite sense to genomic RNA
Replicase
RI-2
Genomic-sense RNA
New genomic-sense RNA

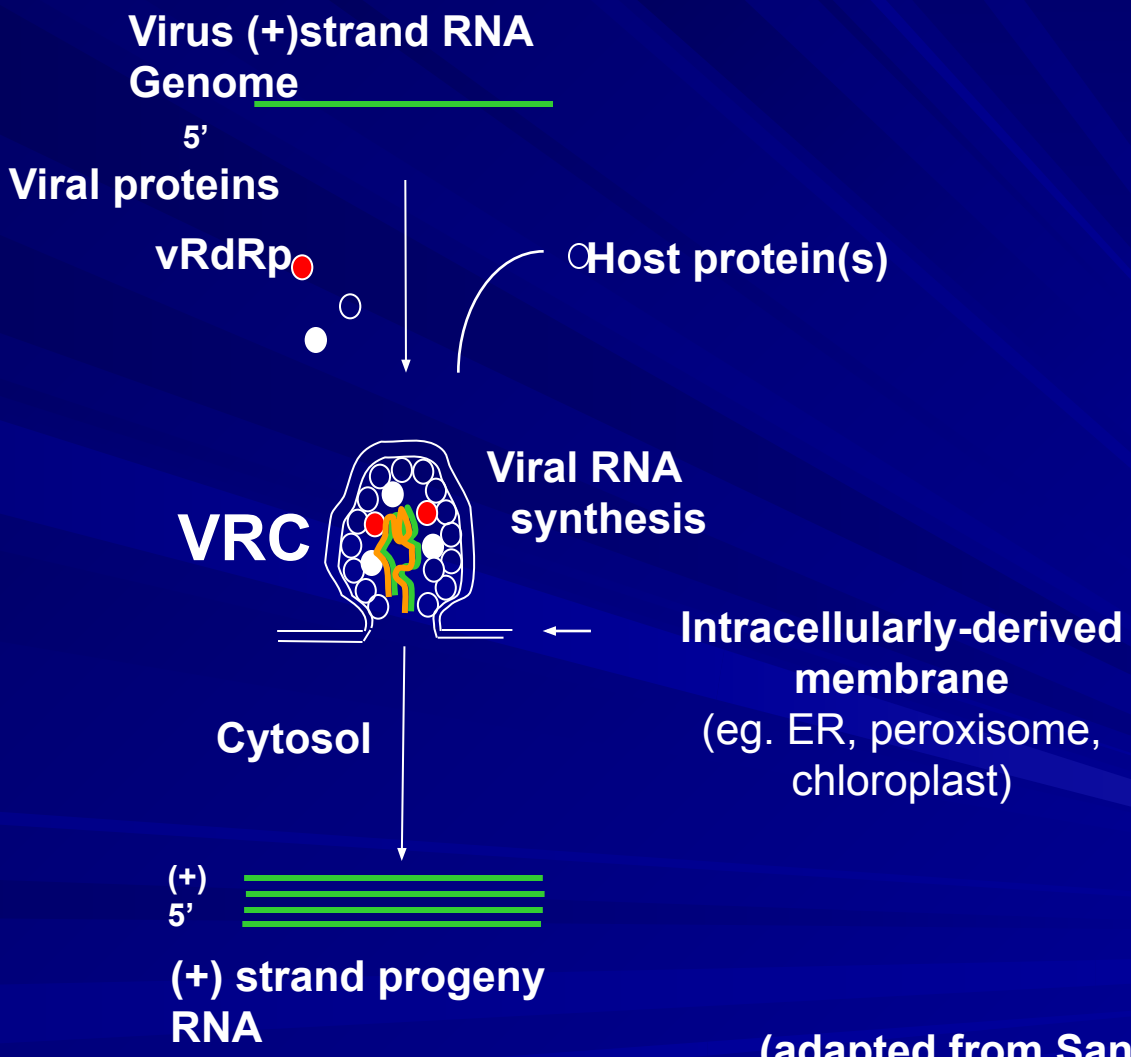

Replication of viral ssRNA goes through
a replicative intermediate (RI)
genomic RNA
5'
3'
genomic RNA
5'
3'
5'
Replicative Intermediate 1
(RI-1) makes antigenomes
5'
antigenomes
5'
5'
antigenomes become templates
for replication genomes
antigenomic RNA
3'
5'
5'
5'
Replicative Intermediate 2
(RI-2) makes new genomes
new genomes
5'


+ strand genomic RNA
A(A)70AOH
minus strand synthesis
VPg
+ strand genomic RNA
A(A)70AOH
U(U)70Up
Replicative Intermediate
(RI)
U(U)70Up
- strand
antigenomes
U(U)70Up
U(U)70Up
minus strands become templates
for replication of plus strands
(mRNA and genome)
VPg
- strand antigenomic RNA
CUGUUUUAAOH
GACAAAAUUp
GACAAAAUUp
Replicative Intermediate
(RI)
+ strand
genomes
GACAAAAUUp
GACAAAAUUp

Реплікаційна стратегія (+)-ланцюгових РНК вірусів

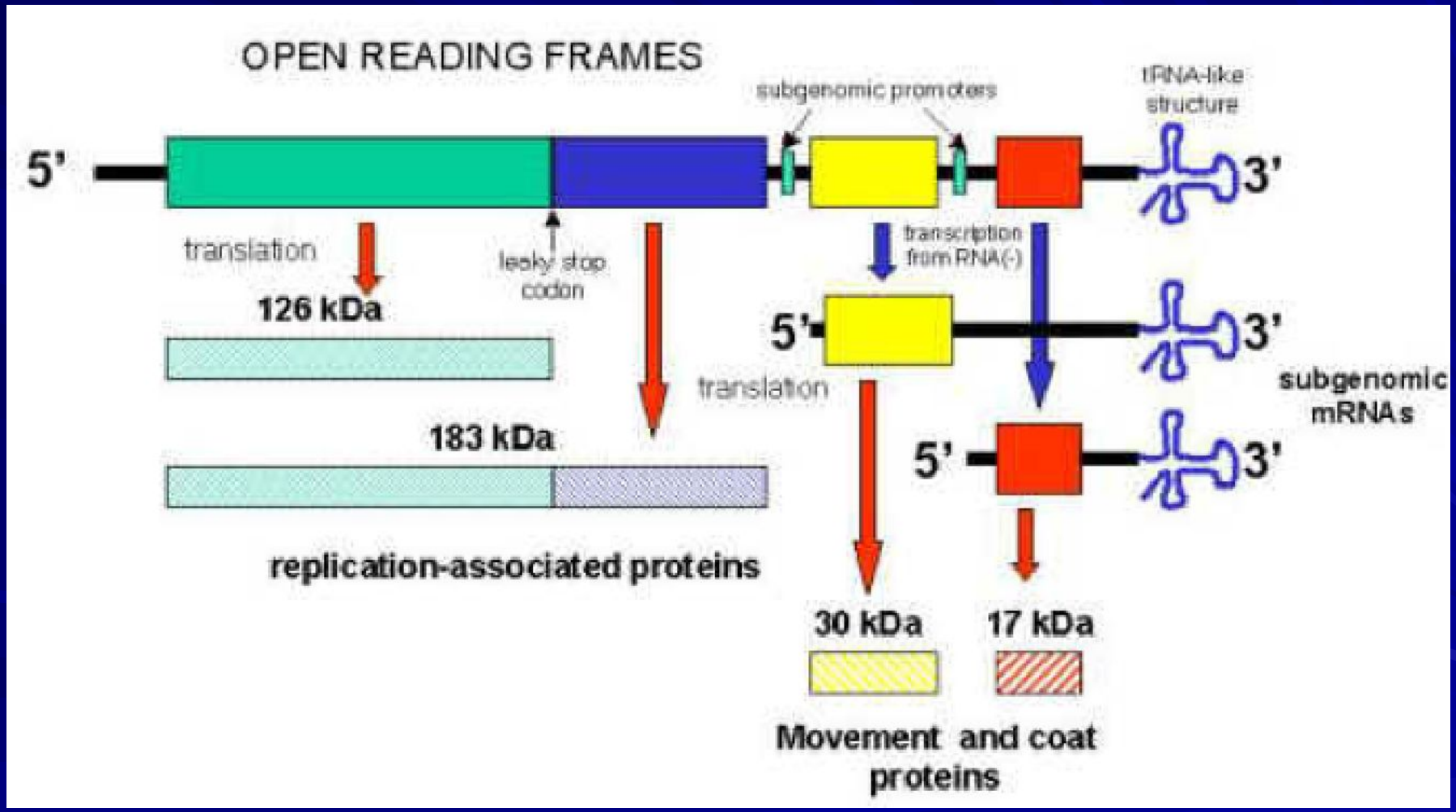


Вірусний реплікаційний комплекс (VRC)

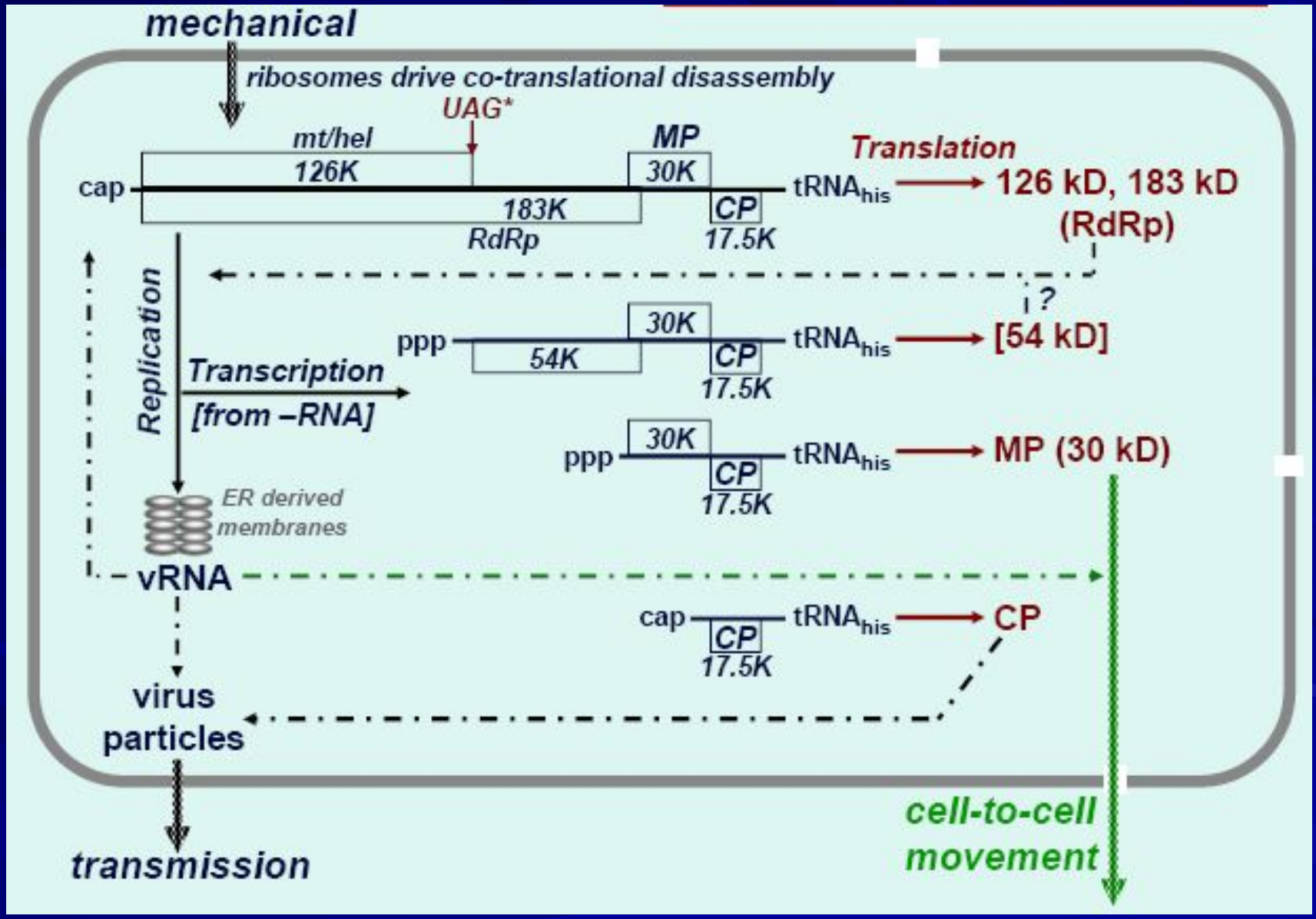


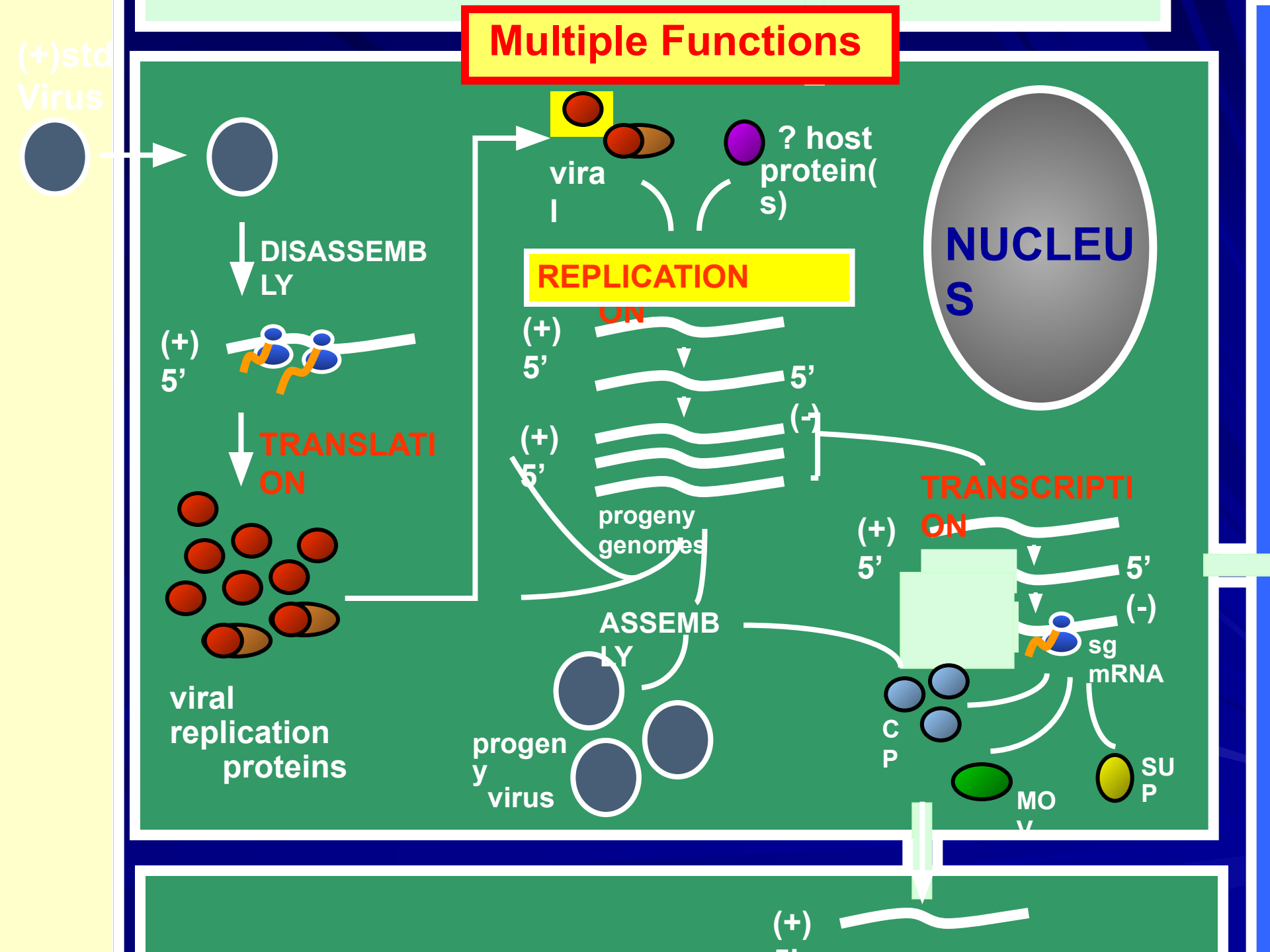
(adapted from Sanfacon, 2006)

Геном ВТМ *(6,3-6,6 тнп)*

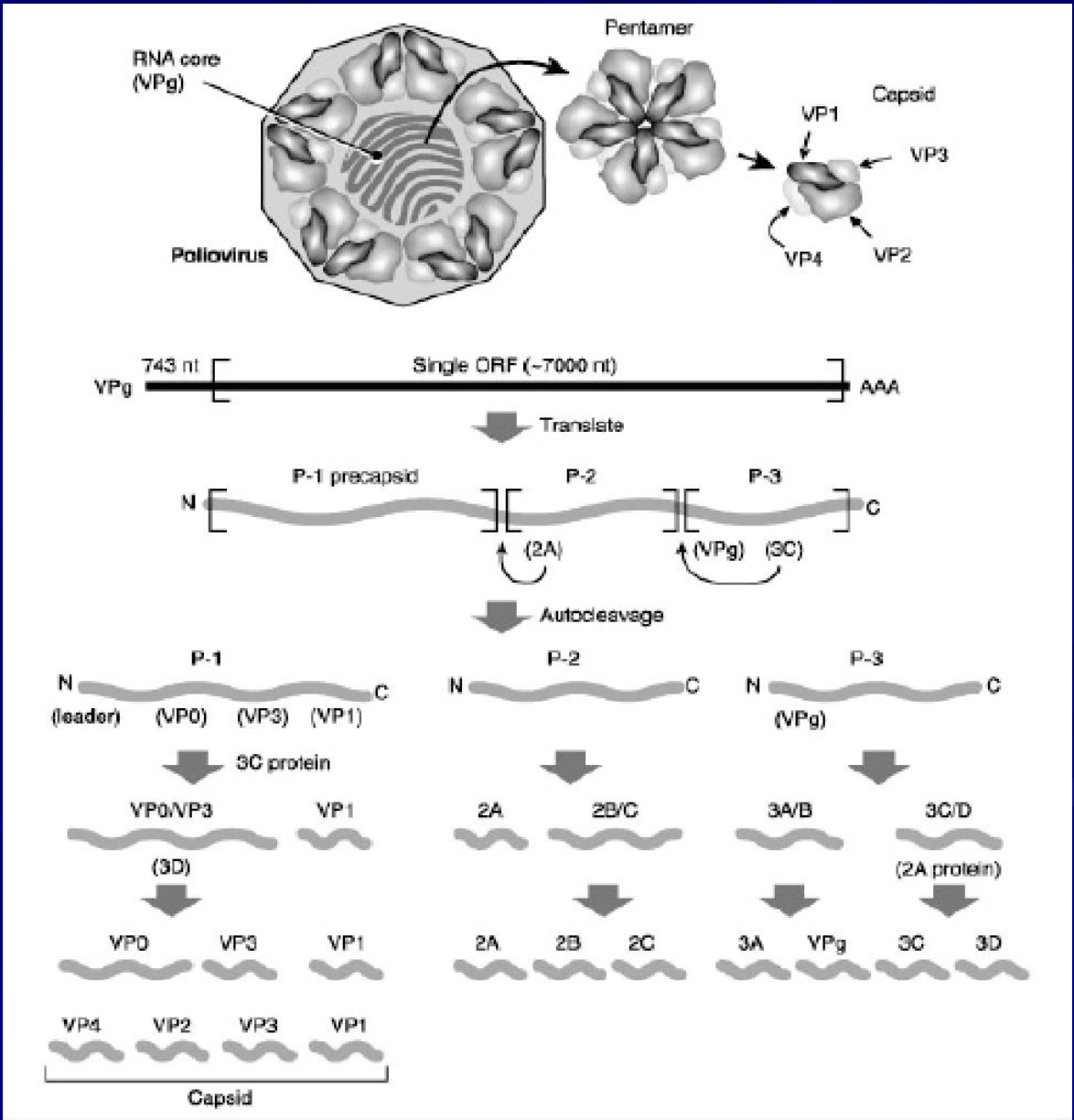


Експресія геному ВТМ

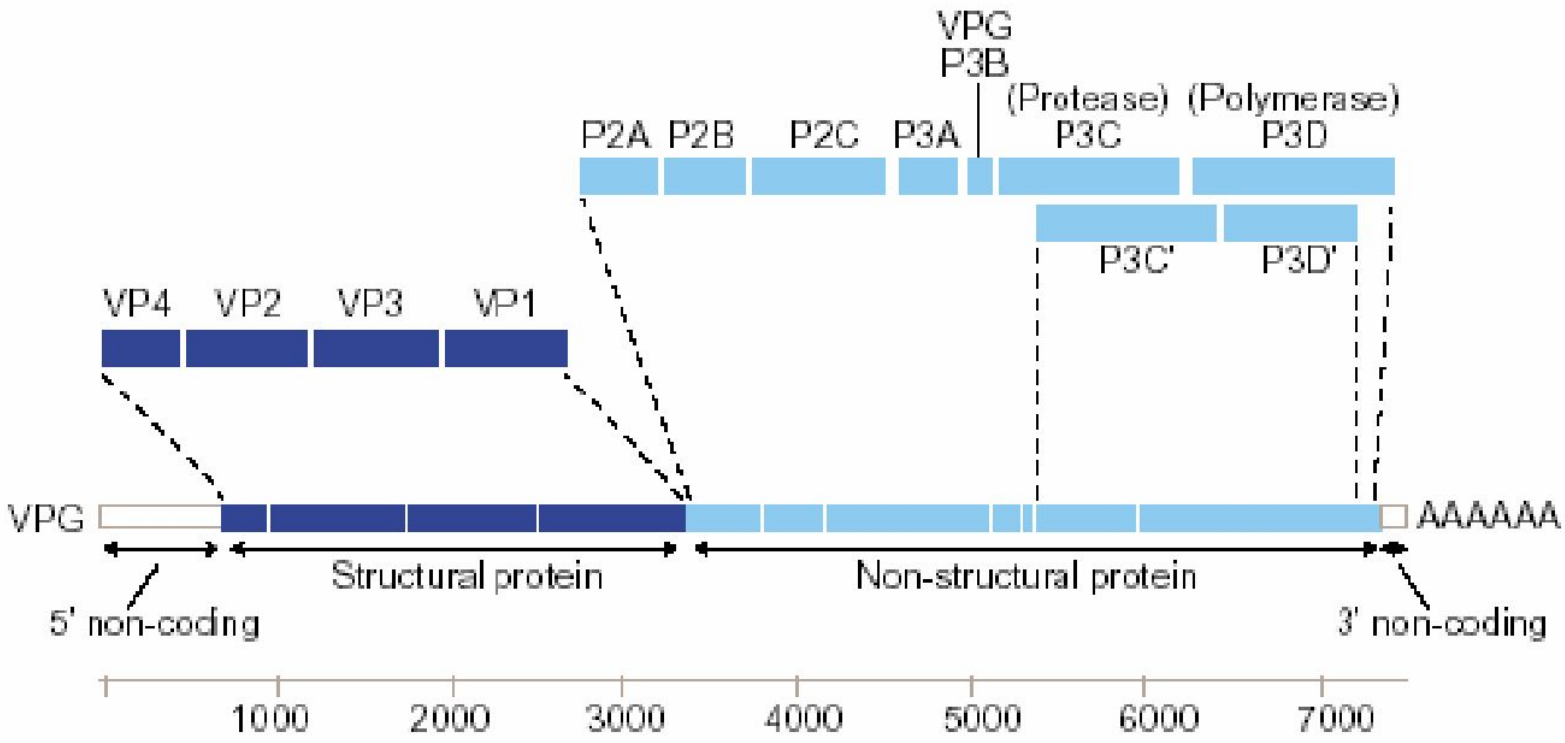



(+)std
Virus
Multiple Functions
DISASSEMB
LY
(+)
5’
TRANSLATI
ON
viral
replication
proteins
vira
l
? host
protein(
s)
NUCLEU
S
REPLICATION
(+)
5’
ON
5’
(-)
(+)
5’
progeny
genomes
TRANSCRIPTI
ON
(+)
5’
5’
(-)
sg
mRNA
ASSEMB
LY
progen
y
virus
C
P
SU
P
MO
V
(+)

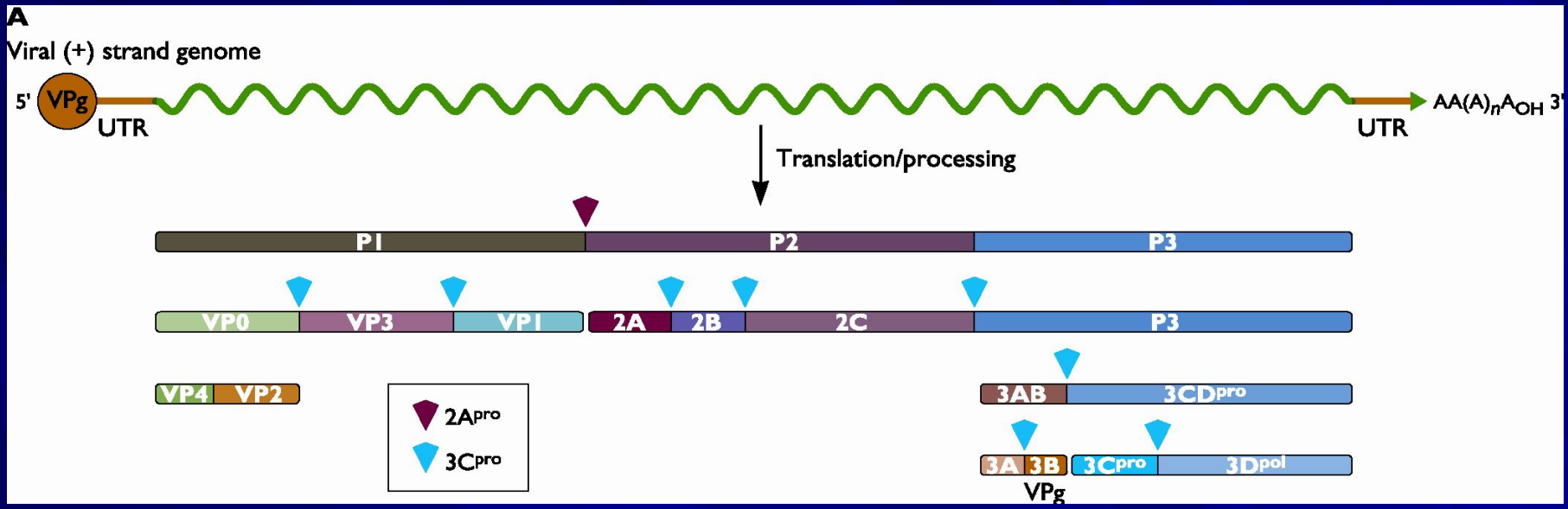
Експресія геному вірусу поліомієліту



Структура геному поліовірусу



Структура геному поліовірусу

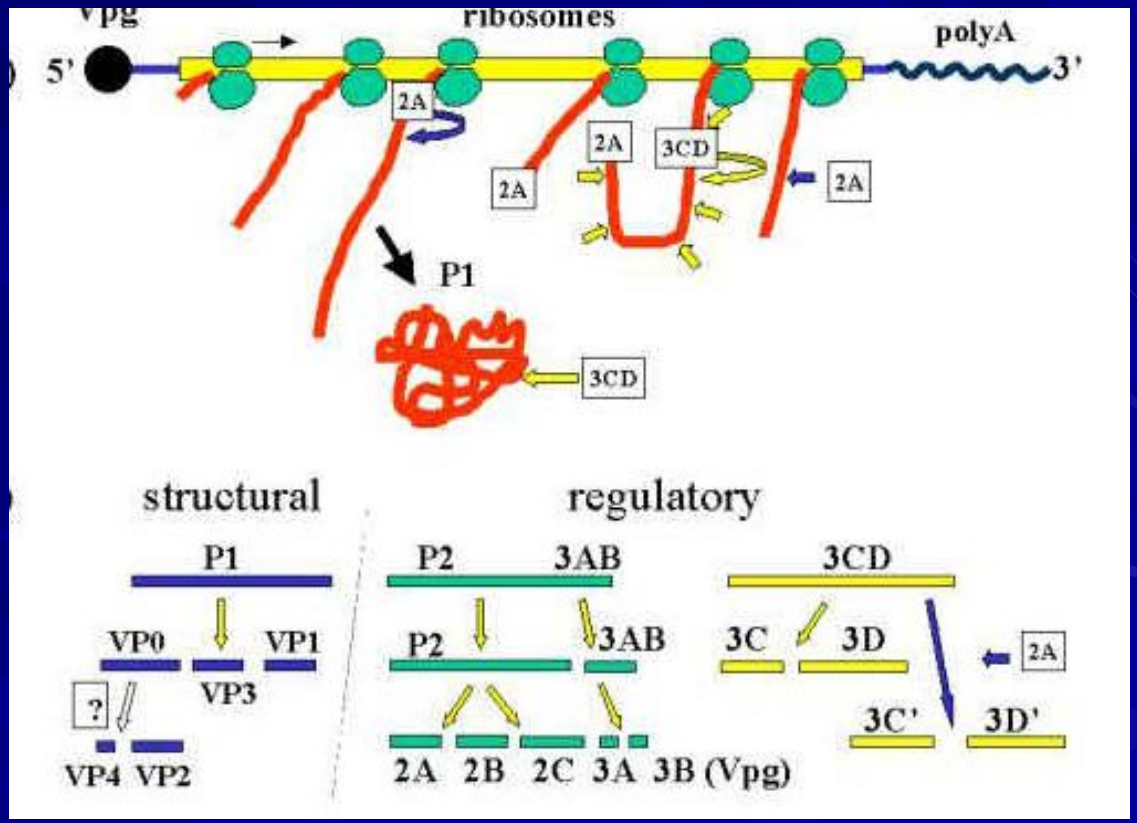


- Геном поліовірусу включає одну ORF, яка кодує 247 kD поліпротеїн. На 5'-кінці VPg, на 3'-кінці poly(A) тракт
- Процессінг йде в 3 етапи. Перший - розрізання P1 попередника капсидного білку, яке каталізує 2Apro
- Другий крок - процессінг некапсидних і капсидних попередників, що каталізується 3Cpro і 3CDpro
- Третій крок - перехід VP0 в VP4 і VP2

Протеолітичний процессінг

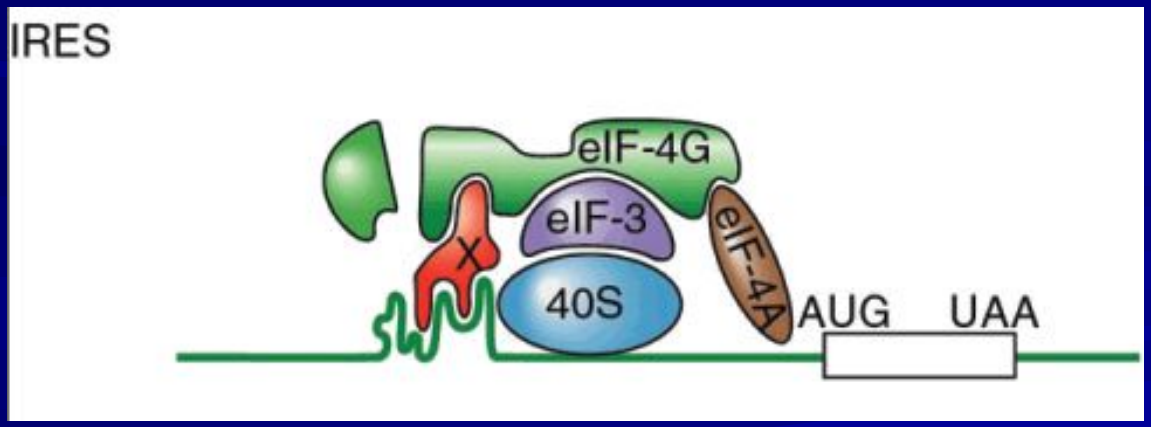
- Протягом трансляції 2А протеіназа активується відразу.
- Розрізання 2А протеїназою звільняє структурний поліпротеїн (Р1), який є прекурсором структурних білків.
- Протеіназа 3С та її прекурсор 3CD здійснюють остаточне розрізання поліпротеїнів.

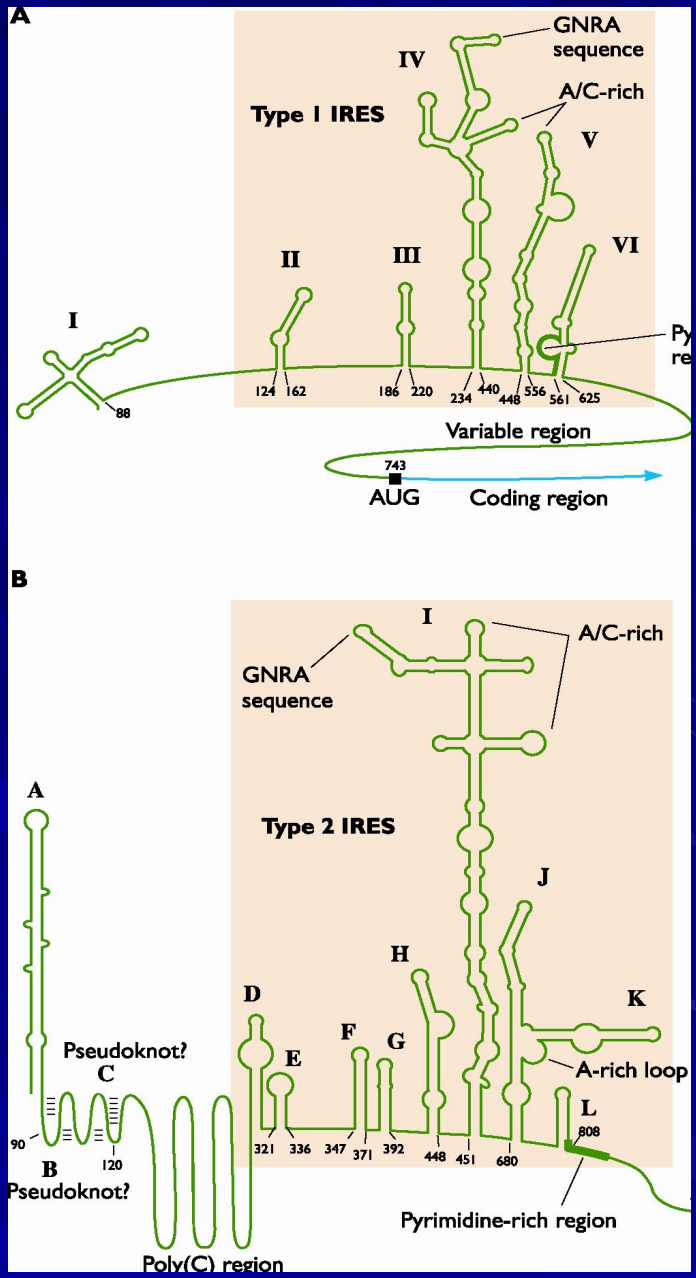
- 2В протеїн (визначає коло господарів), також залучається в синтез РНК
- 2С протеїн є висококонсервативним і також залучається в синтез РНК
- 3D протеїн є РНКзРНКп і має GDD полімеразний мотив
- 3В протеїн є VPg.



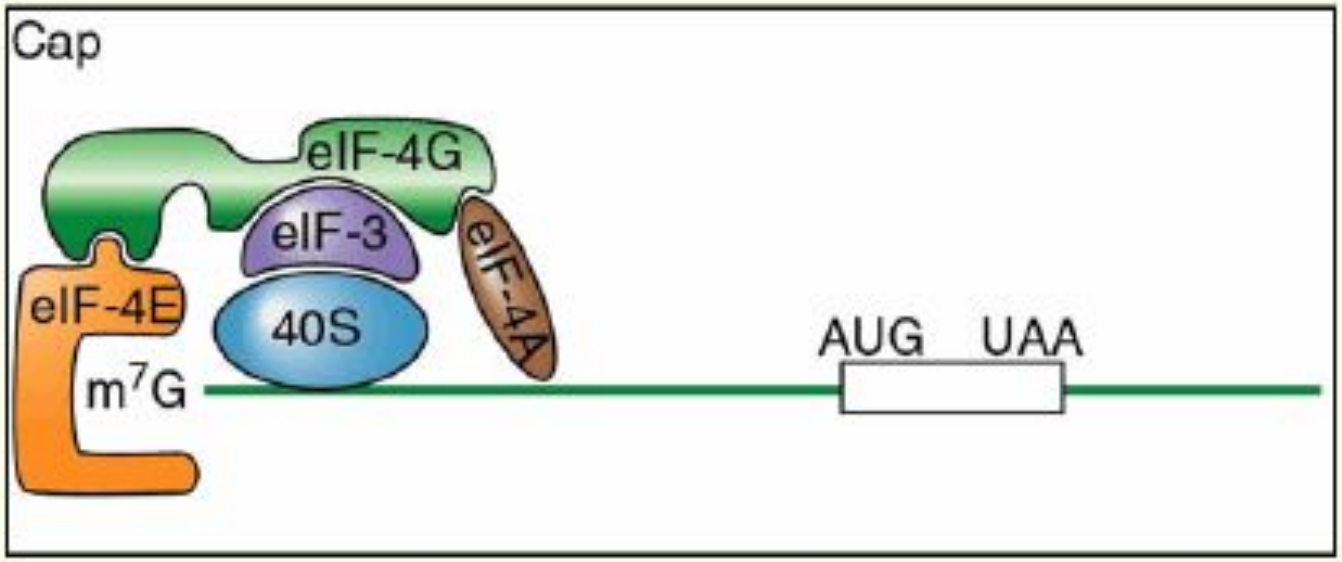
Трансляція

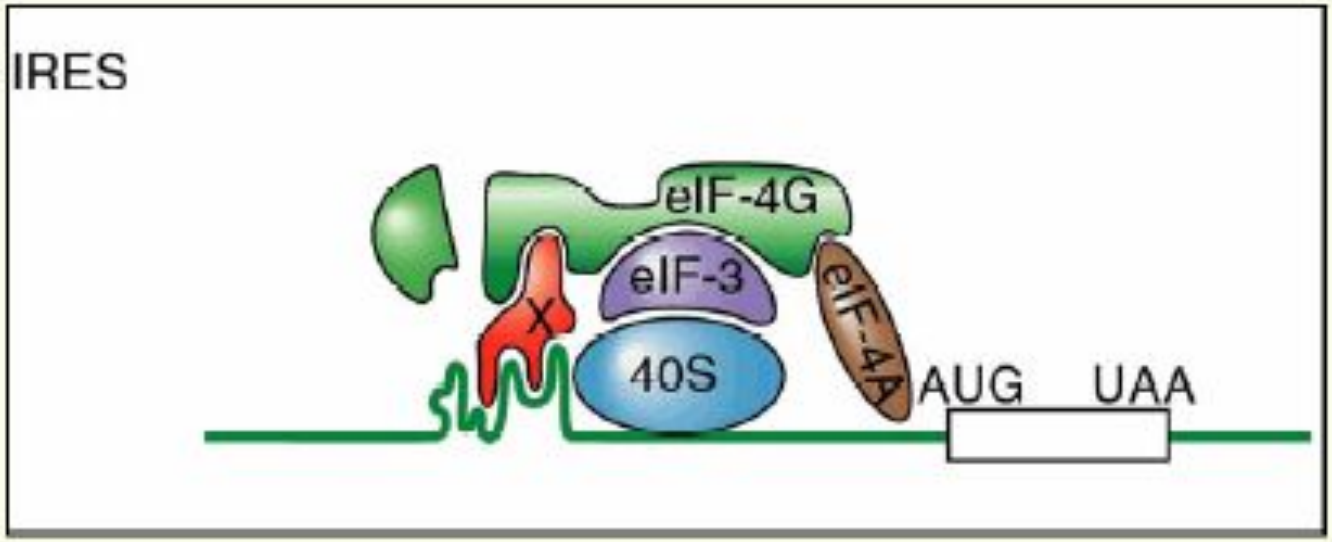
- Трансляція пікорнавірусів є *cap* незалежною
- мРНК пікорнавірусів не має *cap* (pUp) на її 5’ кінці
- Геном має довгу (743 nt) UTR нетрансльовану лідерну послідовність, що передує сайту ініціації трансляції.
- Зв'язування з рибосомою відбувається завдяки Internal Ribosomal Entry Sequence (IRES).
- IRES містить високий рівень вторинних структур в лідерній UTR послідовності, яка є посередником зв'язування з 40 S рибосомою.
- eIF-3, eIF-4G і eIF-4a допомагать збірці IRES. Також потрібний клітинний фактор X.

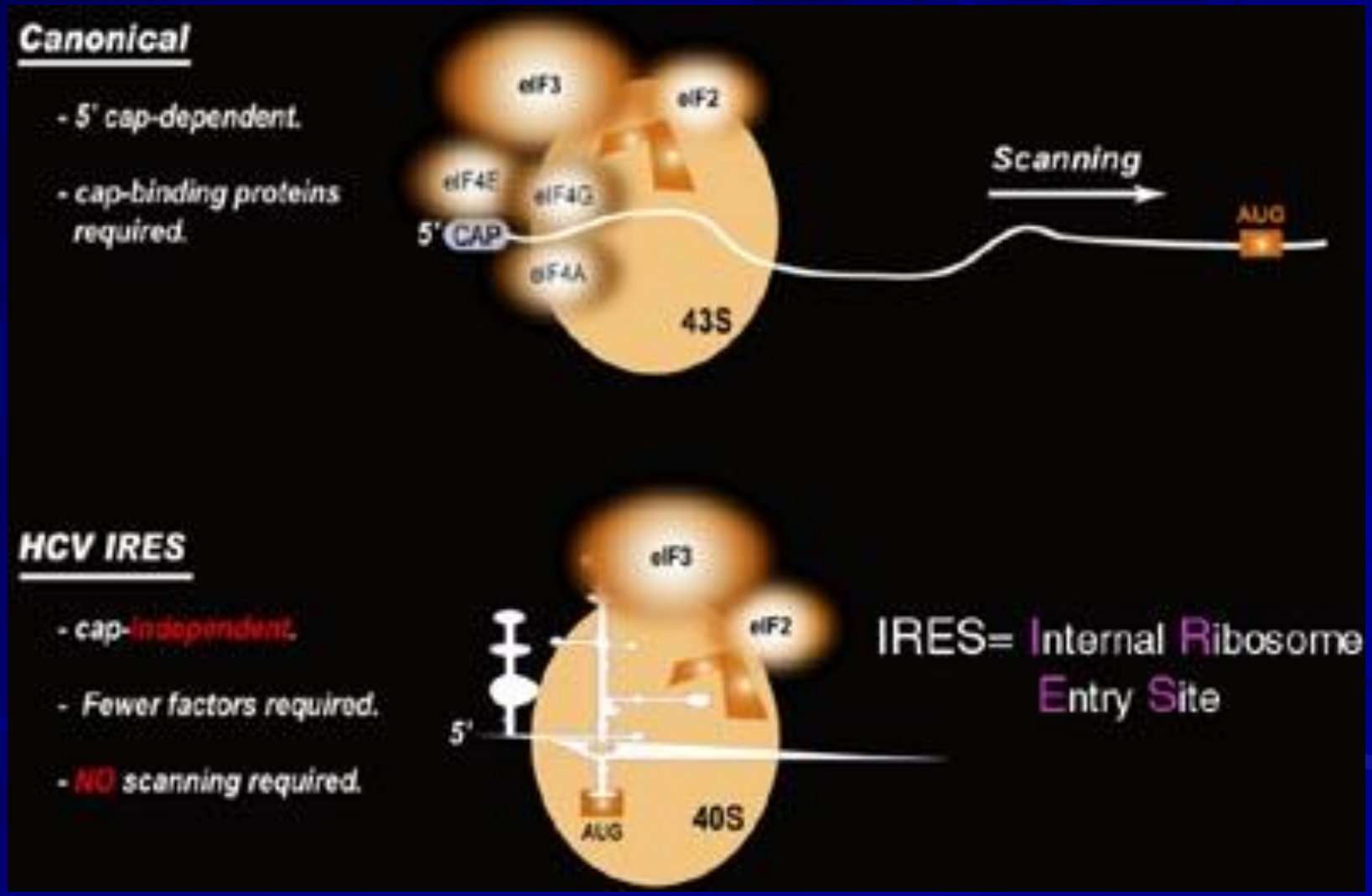




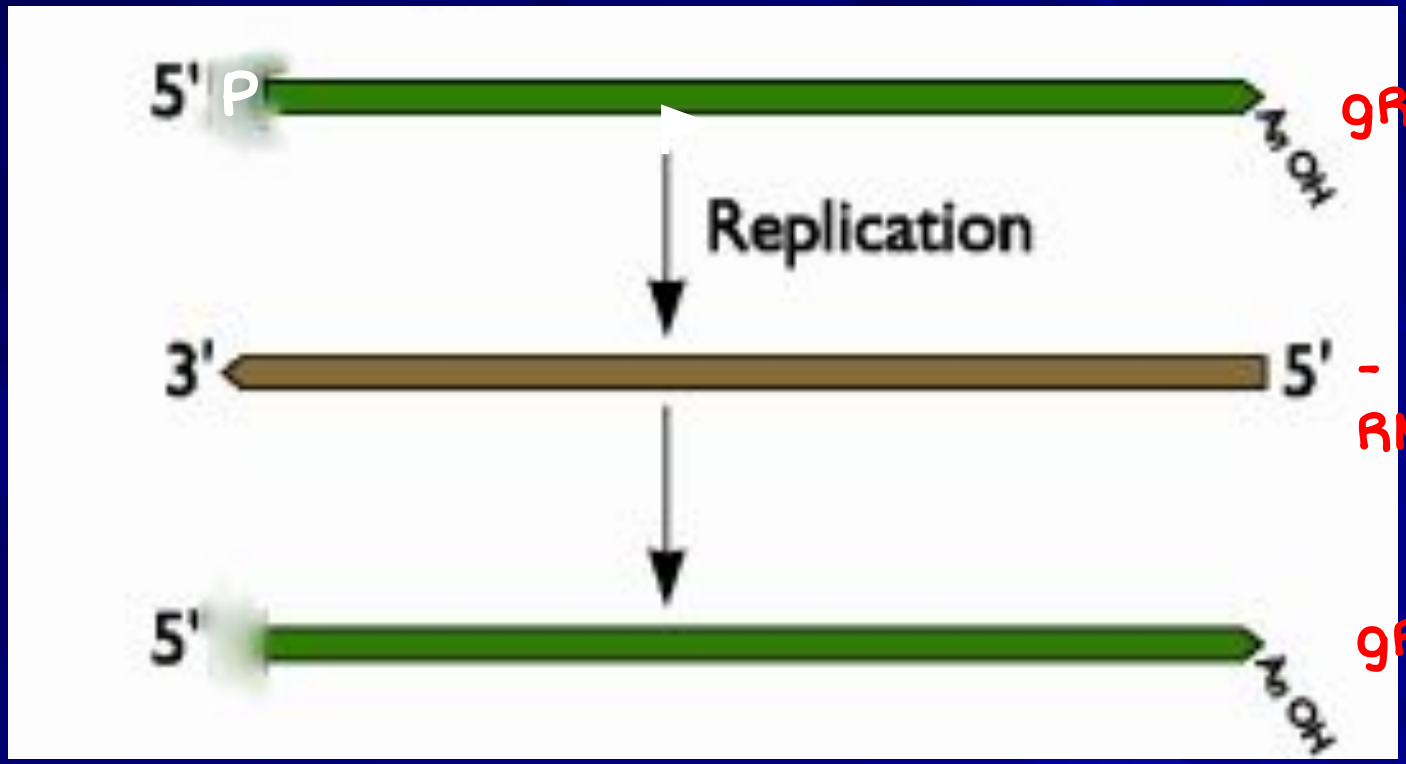
CAP vs IRES-Dependent Translation






Canonical
- 5' cap-dependent.
- cap-binding proteins required.
eIF3
eIF2
eIF4E
eIF4G
5'
CAP
eIF4A
43S
Scanning
AUG
HCV IRES
- cap-independent.
- Fewer factors required.
- NO scanning required.
eIF3
eIF2
5'
AUG
40S
IRES= Internal Ribosome Entry Site

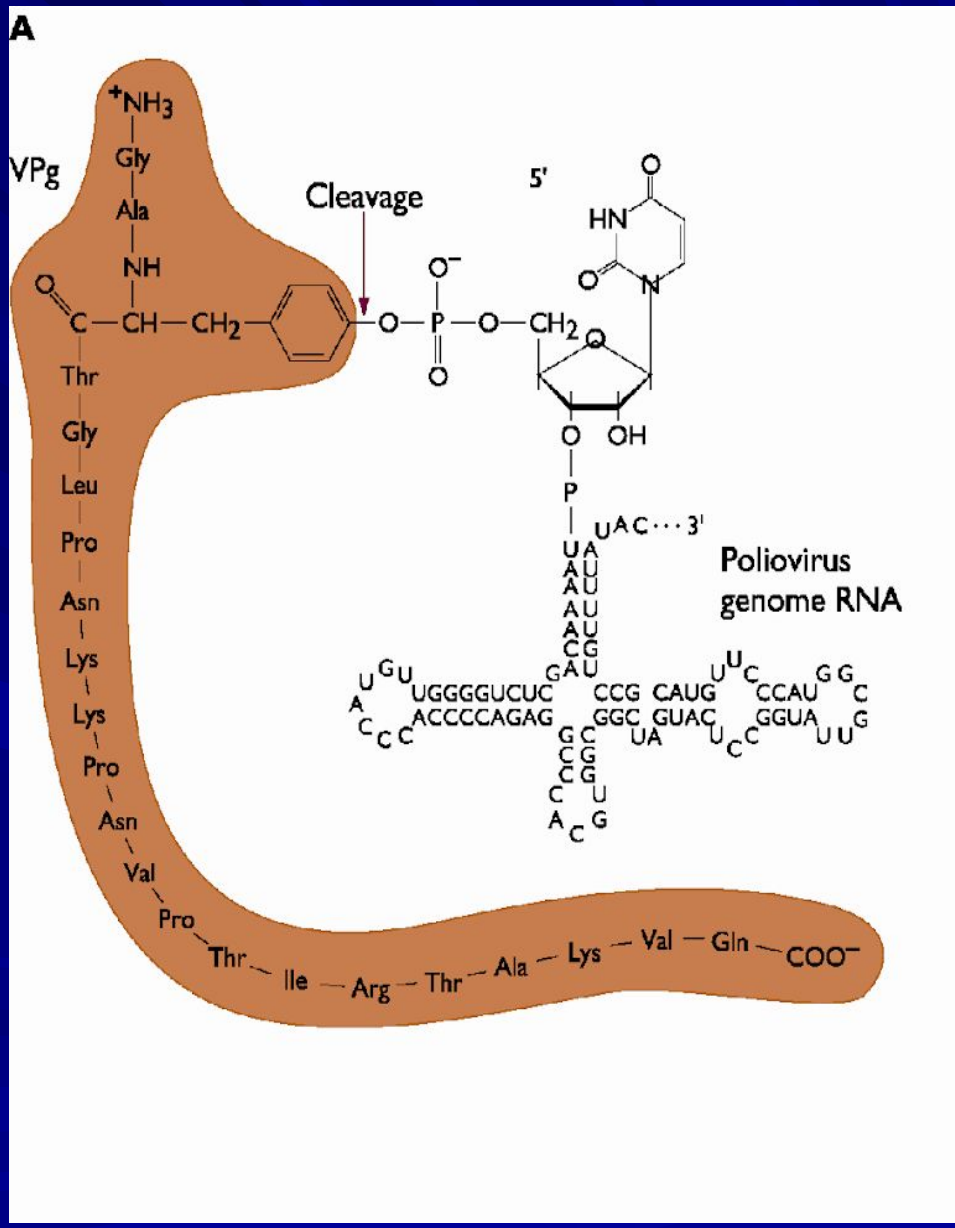
Реплікація



- Першим кроком реплікації є трансляція вірусної РНК
- Використовується РНК-РНК копіювальний механізм
- Реплікативна РНК має VPg, але mRNAs його не мають

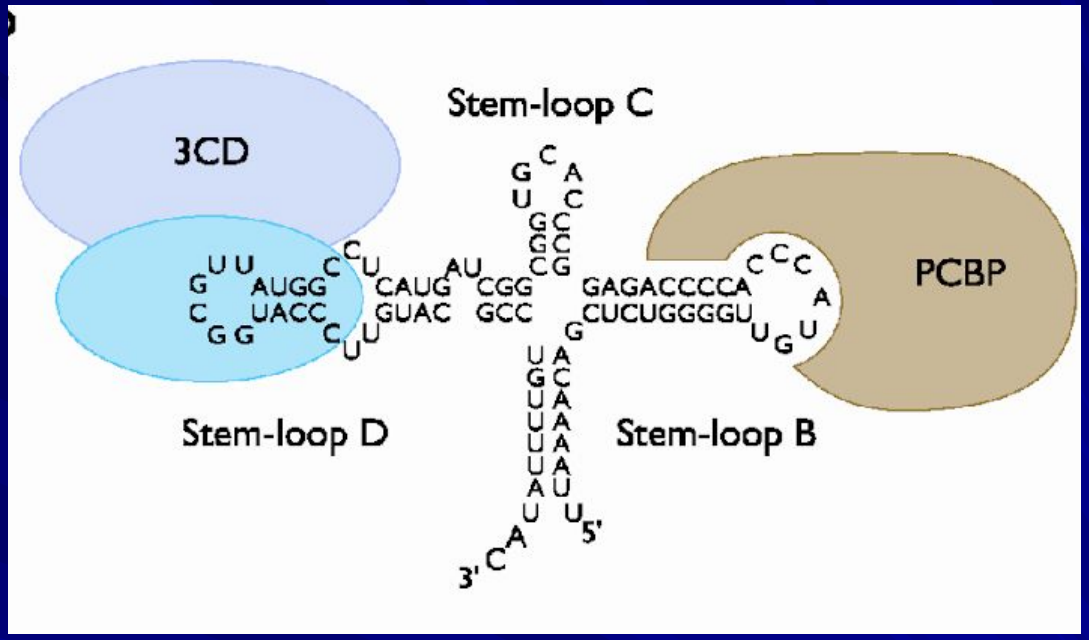
Реплікація

- РНК поліовірусу зв'язана з 22АК VPg через уридин-тирозиновий фосфодиефірний зв'язок
- Протягом реплікації відбувається розщеплення фосфодиефірного зв'язку клітинним ферментом для виробництва вірусних мРНК, що містять 5′термінальний Up
- Геномні РНК інкорпоруються в віріони з VPg на 5′-кінці.
- Ці етапи відбуваються в везикулах, що утворюються з гладкого ЕР



Реплікація

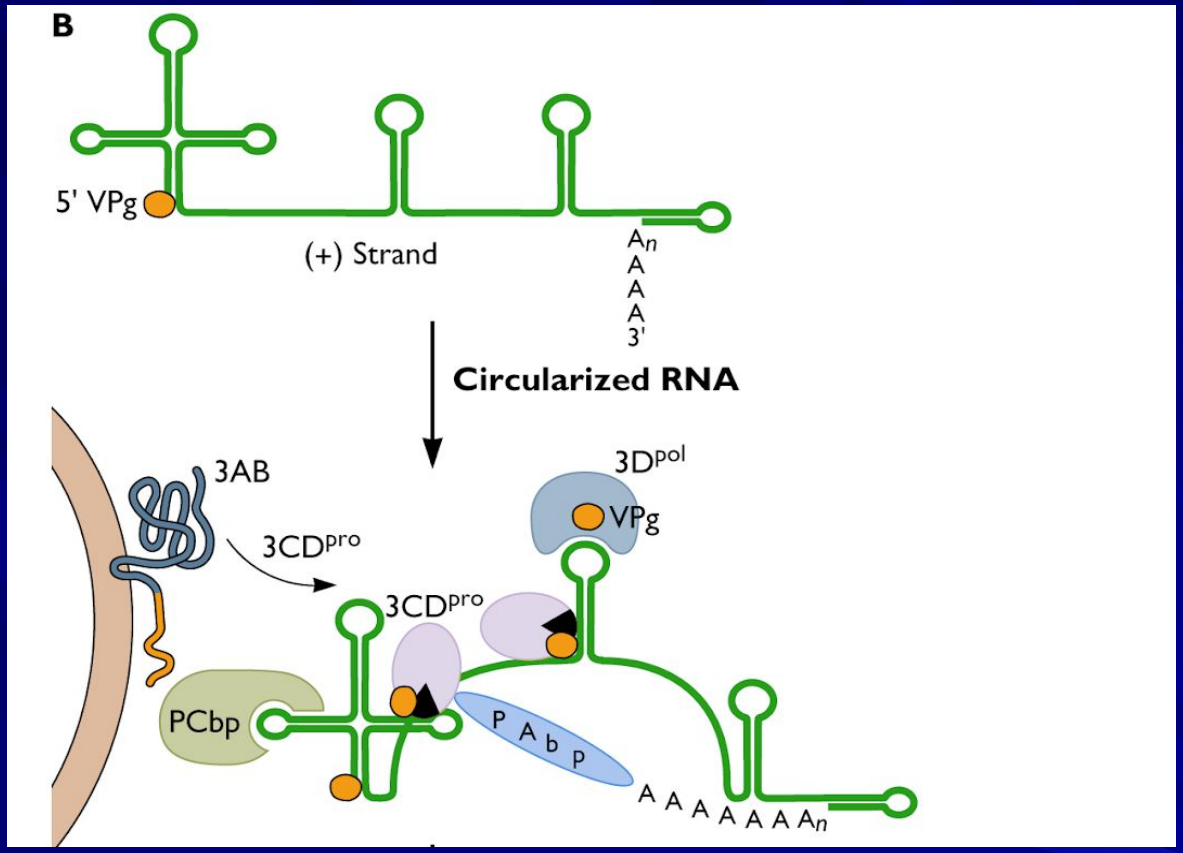
Високоспарена структура, сформована 108 нуклеотидами на 5’ кінці (+) ланцюга РНК, утворює "листок конюшини"



Вірусний протеїн 3CD і PCBP клітинний протеїн (PolyrC Binding Protein), взаємодіє з різними петлями cloverleaf. Ця взаємодія закінчується зближенням 5’і 3’ кінця. У цей момент VPg починає функцінувати як праймер

Після синтезу мінус-РНК подібний "лист конюшини" формується в 5’ кінці негативного ланцюга. Утворення цього рибонуклеопротеїнового комплексу потрібне для синтезу як плюс, так і мінус ланцюга РНК.

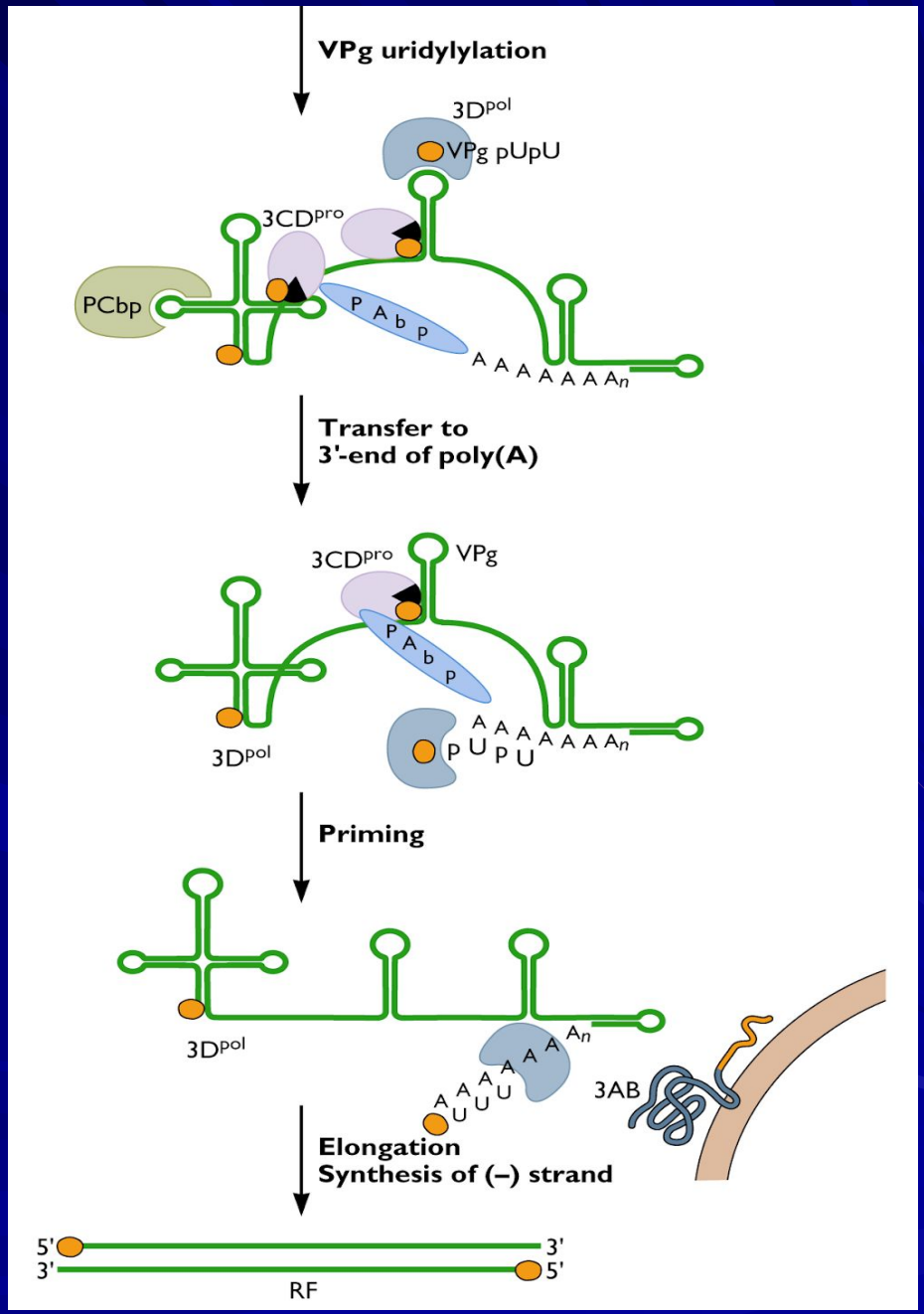
Синтез -РНК



- Прекурсор VPg, 3AB, служить донором VPg
- Рибонуклеопротеїновий комплекс сформований, коли PCbp і 3CDpro зв'язується з cloverleaf структурою
- Цей комплекс взаємодіє з PAbp1, продукуючи циркулярний геном

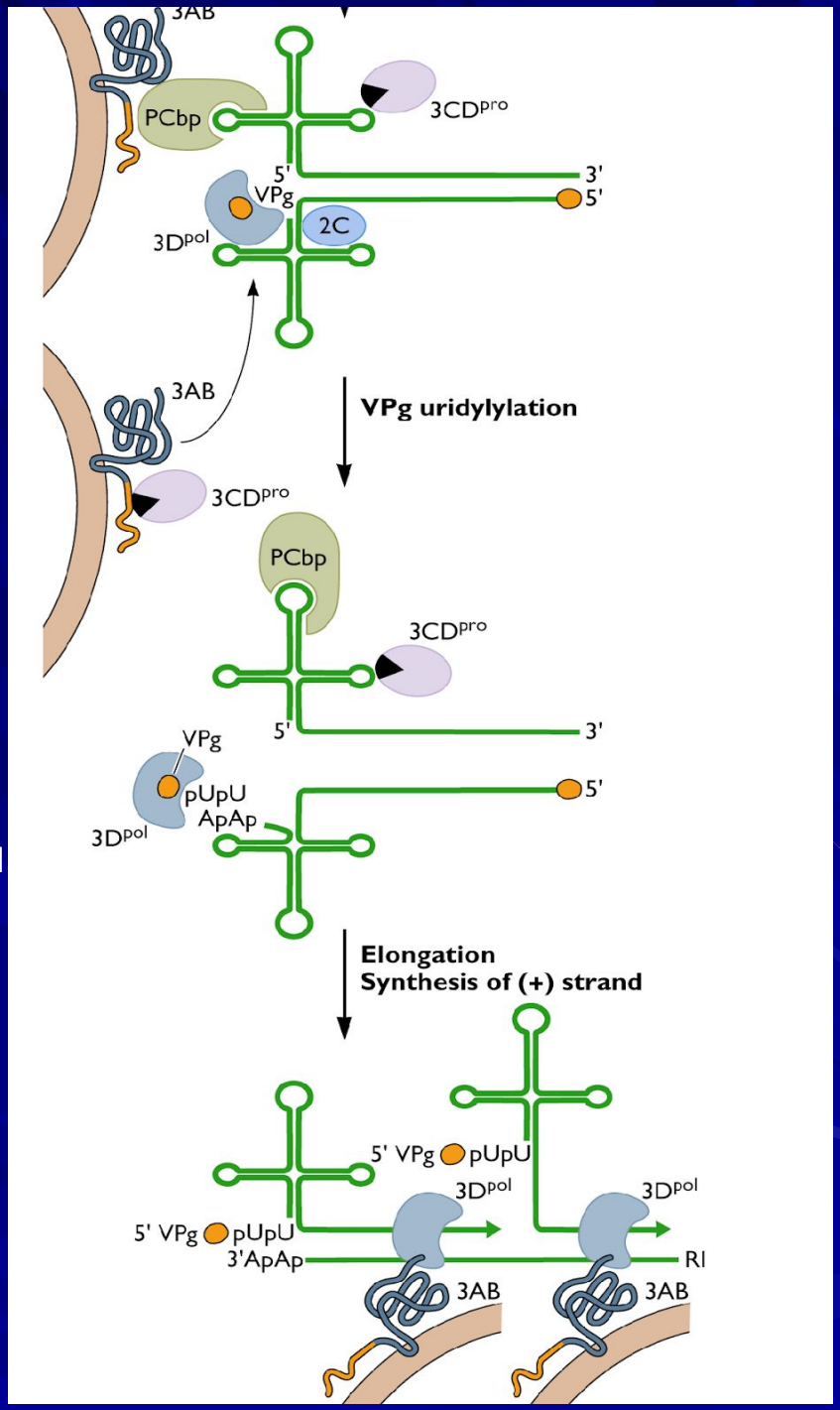
Синтез -РНК

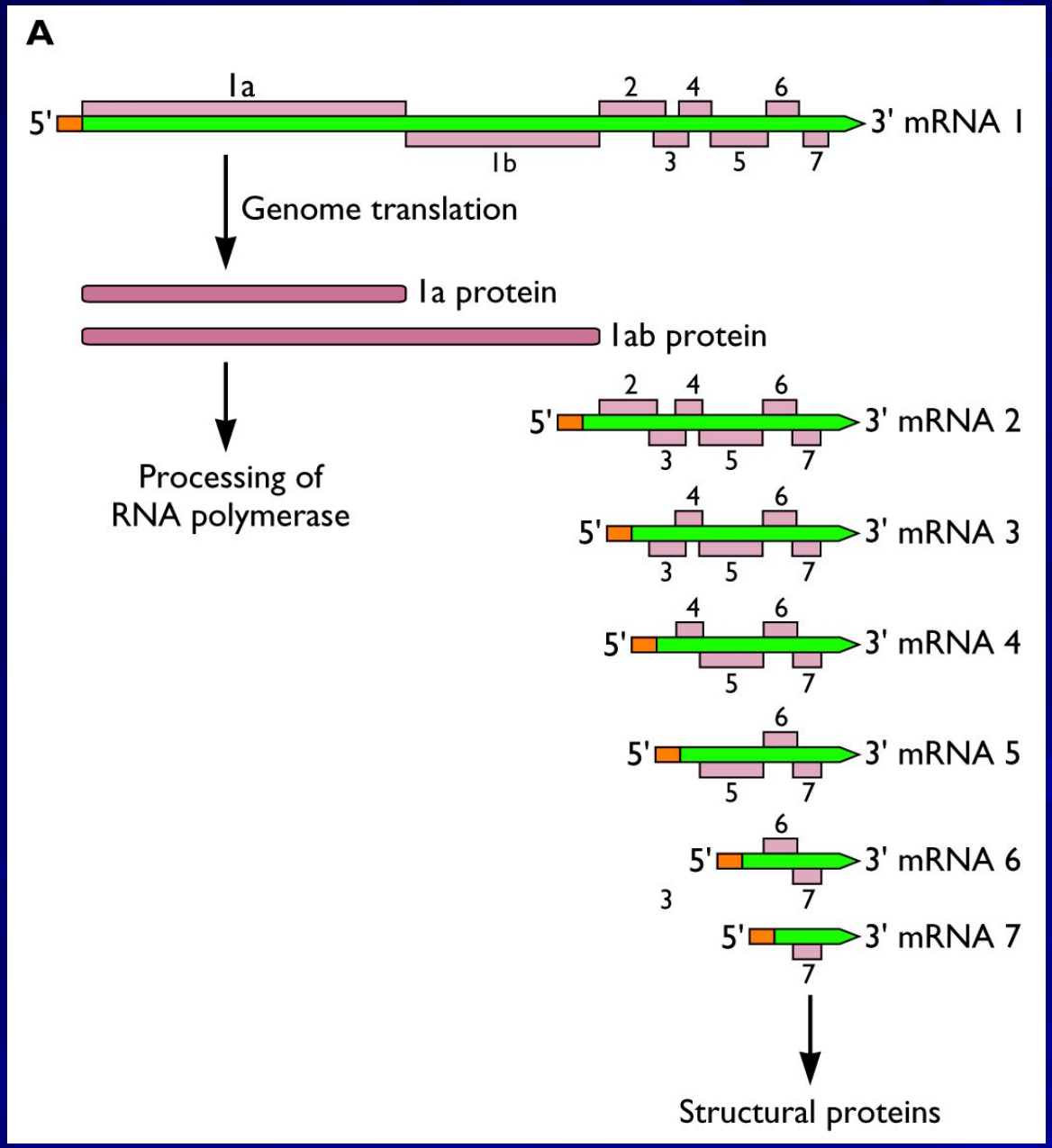
- Протеаза 3CDpro розрізає мембранний зв'язок 3AB для продукції VPg
- VPg, уридинильований 3Dpol, використовує cre послідовність як матрицю і переміщається в 3’ кінець генома
- 3D pol використовує uridylated VPg як праймер для синтезу (–) РНК



Синтез +РНК

- Вірусний білок 2С зв'язується з “cloverleaf” в (-) ланцюгу
- Мембранний зв'язок з 3AB розривається для продукції VPg
- VPg уридинилюється 3Dpol, використовуючи 3’ термінальні залишки А (–) ланцюга як матрицю
- Уридинильований VPg потім елонгується 3Dpol для синтезу (+)RNA





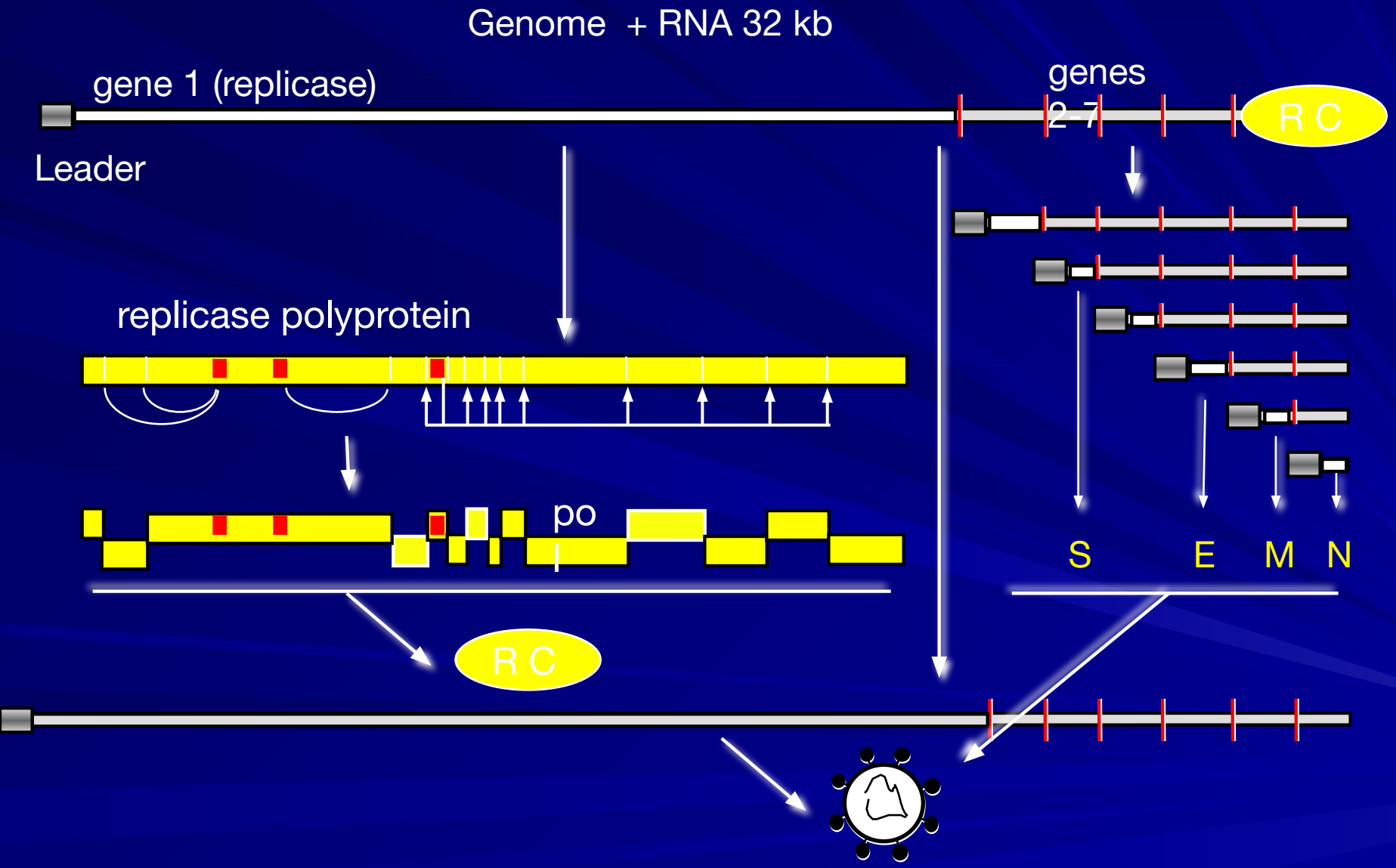
Субгеномні РНК Coronaviridae (6 класів)

Ідентичні як на 3”, так і на 5’-кінцях

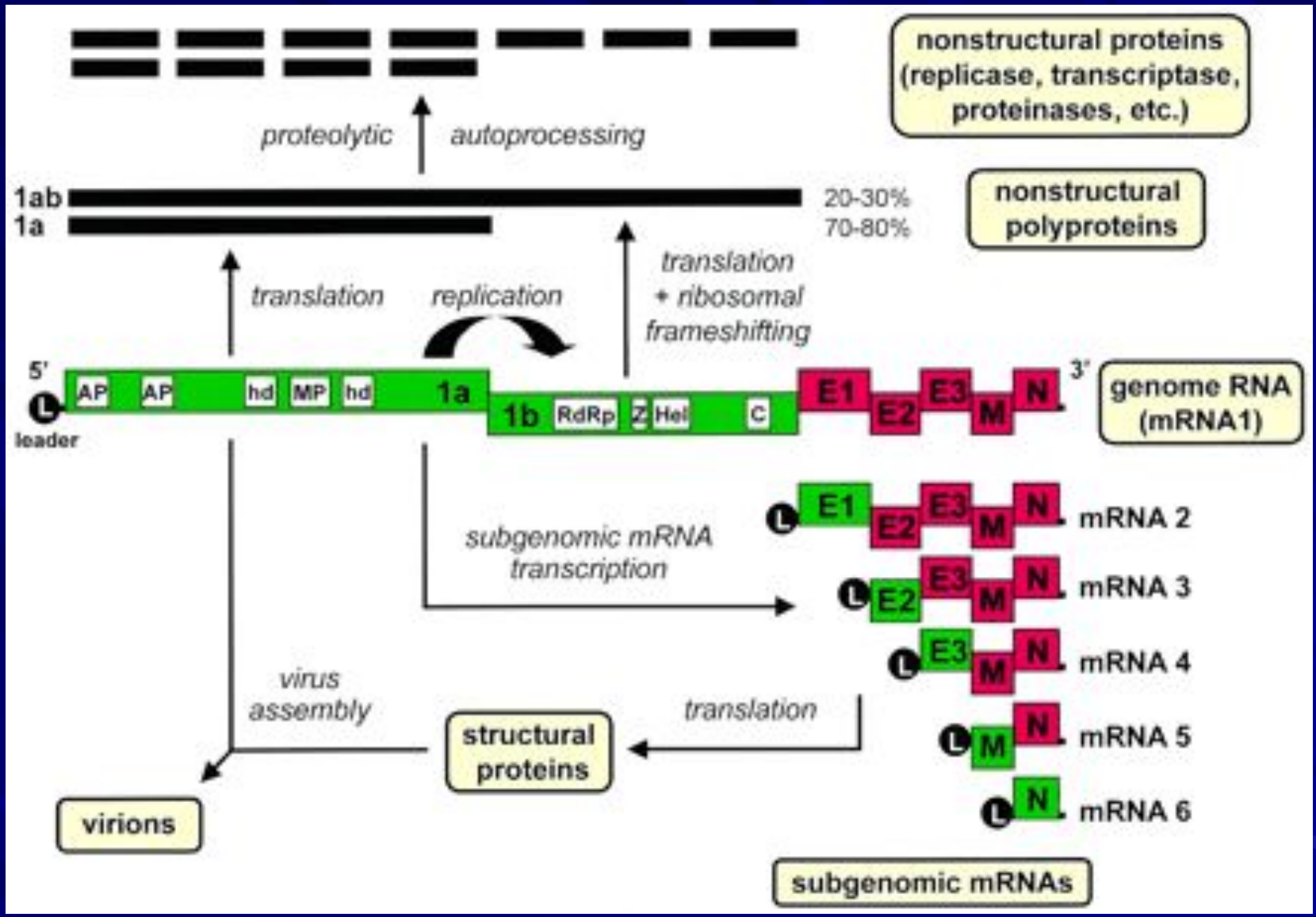
“лідер” – 70нп

“-” РНК на ранніх стадіях інфекційного циклу,
“+” РНК на пізніх

Геном і реплікація Coronavirus



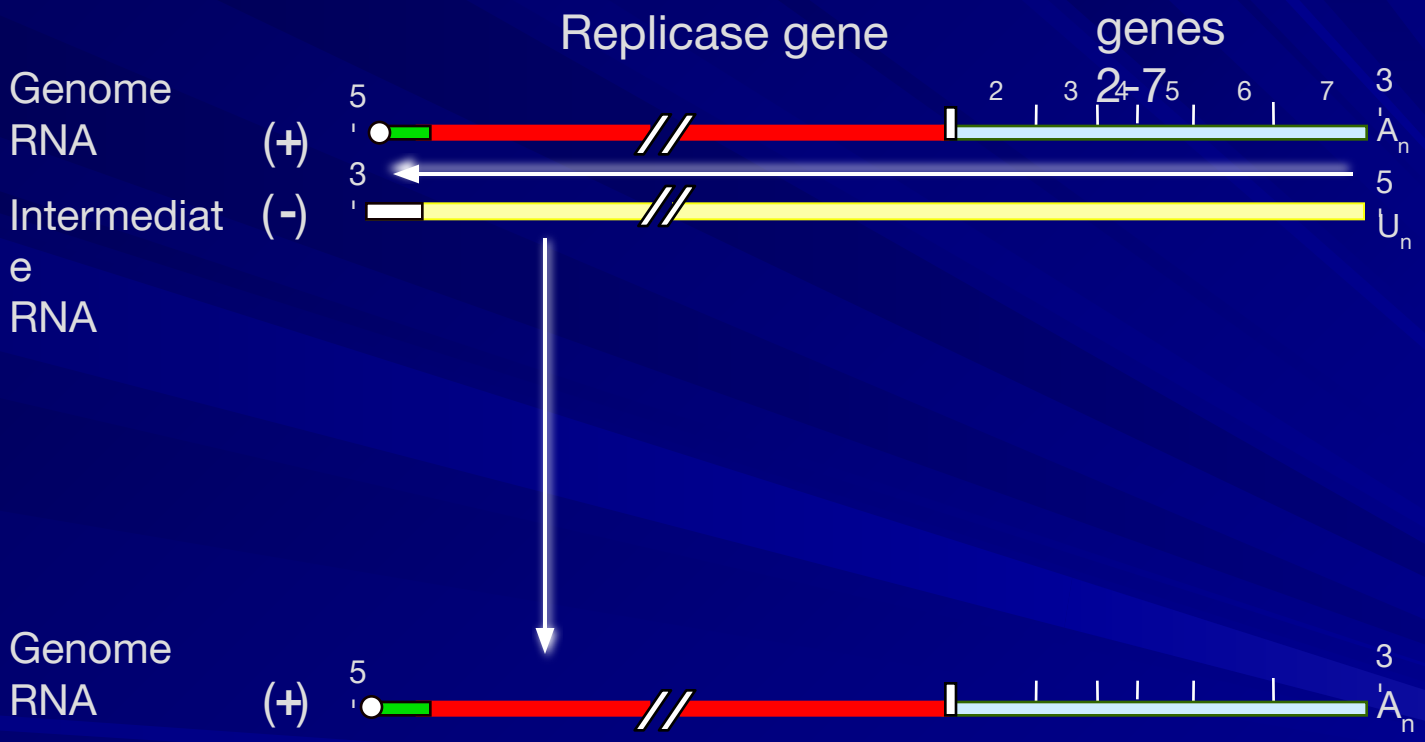
Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt


nonstructural proteins (replicase, transcriptase, proteinases, etc.)
proteolytic
autoprocessing
1ab
1a
20-30%
70-80%
nonstructural polyproteins
translation
replication
translation + ribosomal frameshifting
5'
AP
AP
hd
MP
hd
1a
1b
RdRp
Z
Hel
C
E1
E2
E3
M
N
3'
genome RNA (mRNA1)
leader
subgenomic mRNA transcription
mRNA 2
mRNA 3
mRNA 4
mRNA 5
mRNA 6
virus assembly
translation
structural proteins
virions
subgenomic mRNAs

Транскрипція і реплікація Coronavirus

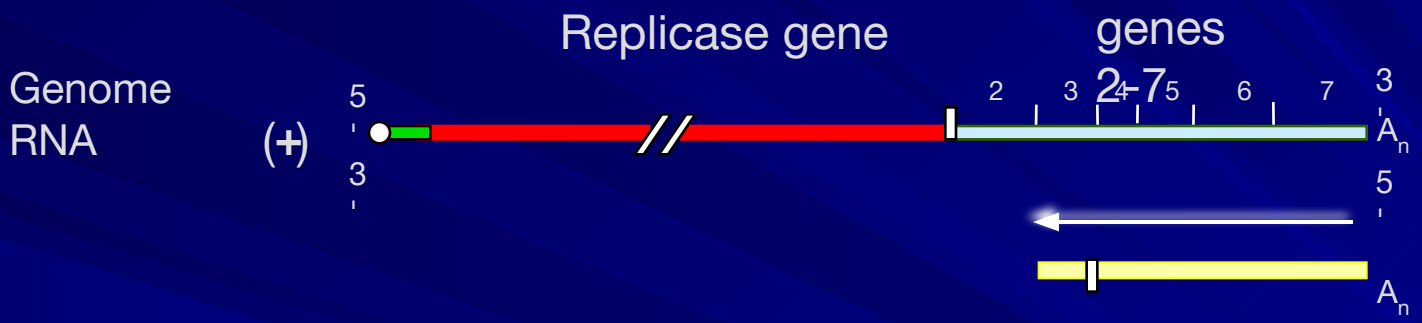
Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt

Транскрипція і реплікація Coronavirus



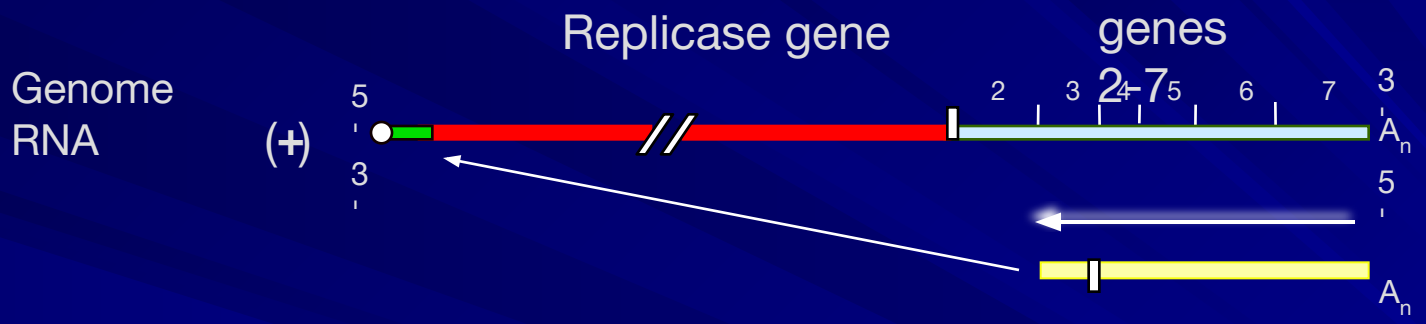
Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt

Транскрипція і реплікація Coronavirus



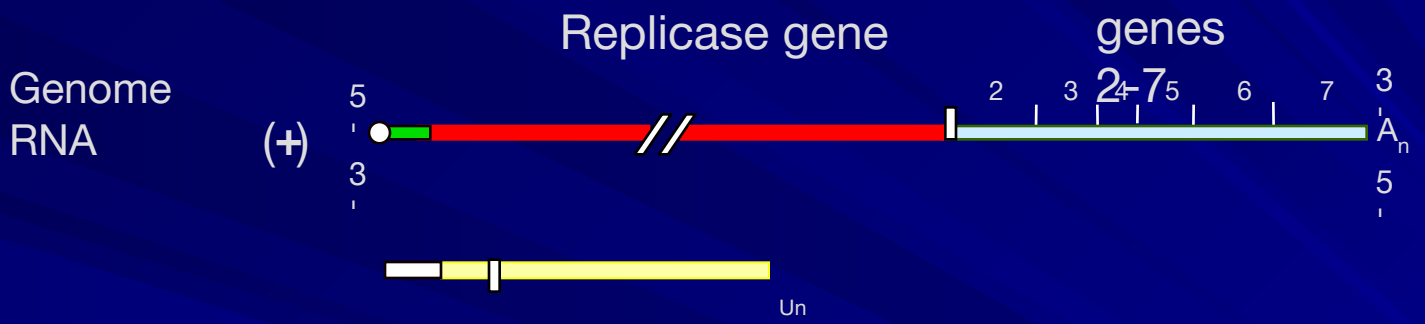
Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt

Транскрипція і реплікація Coronavirus



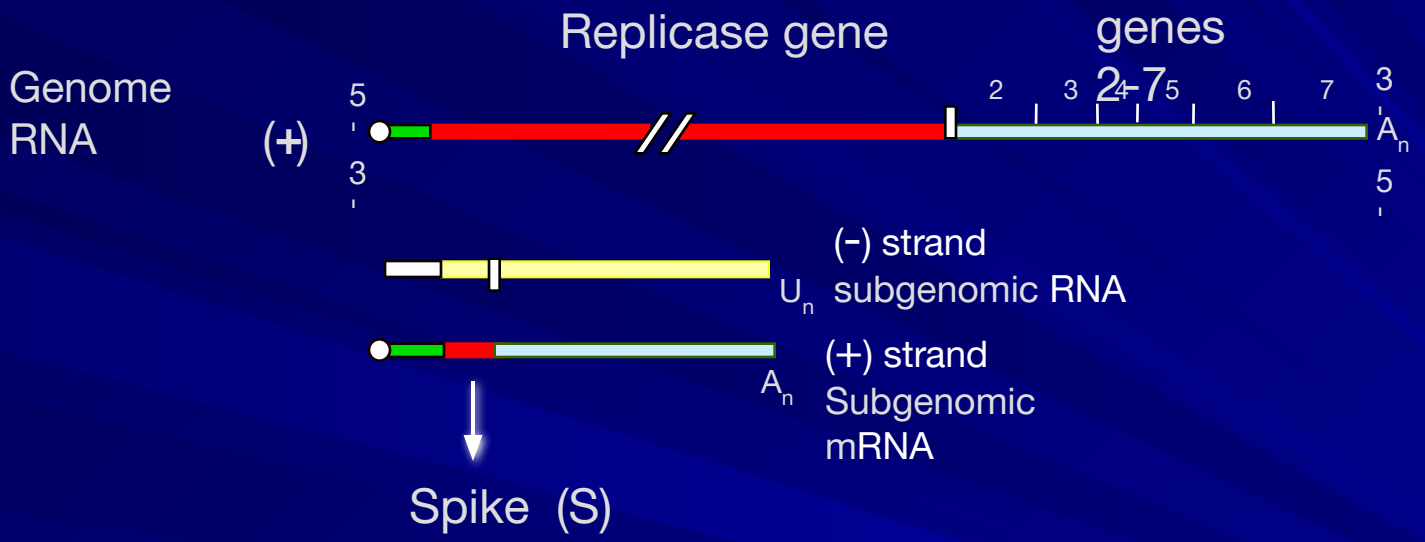
Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt

Транскрипція і реплікація Coronavirus



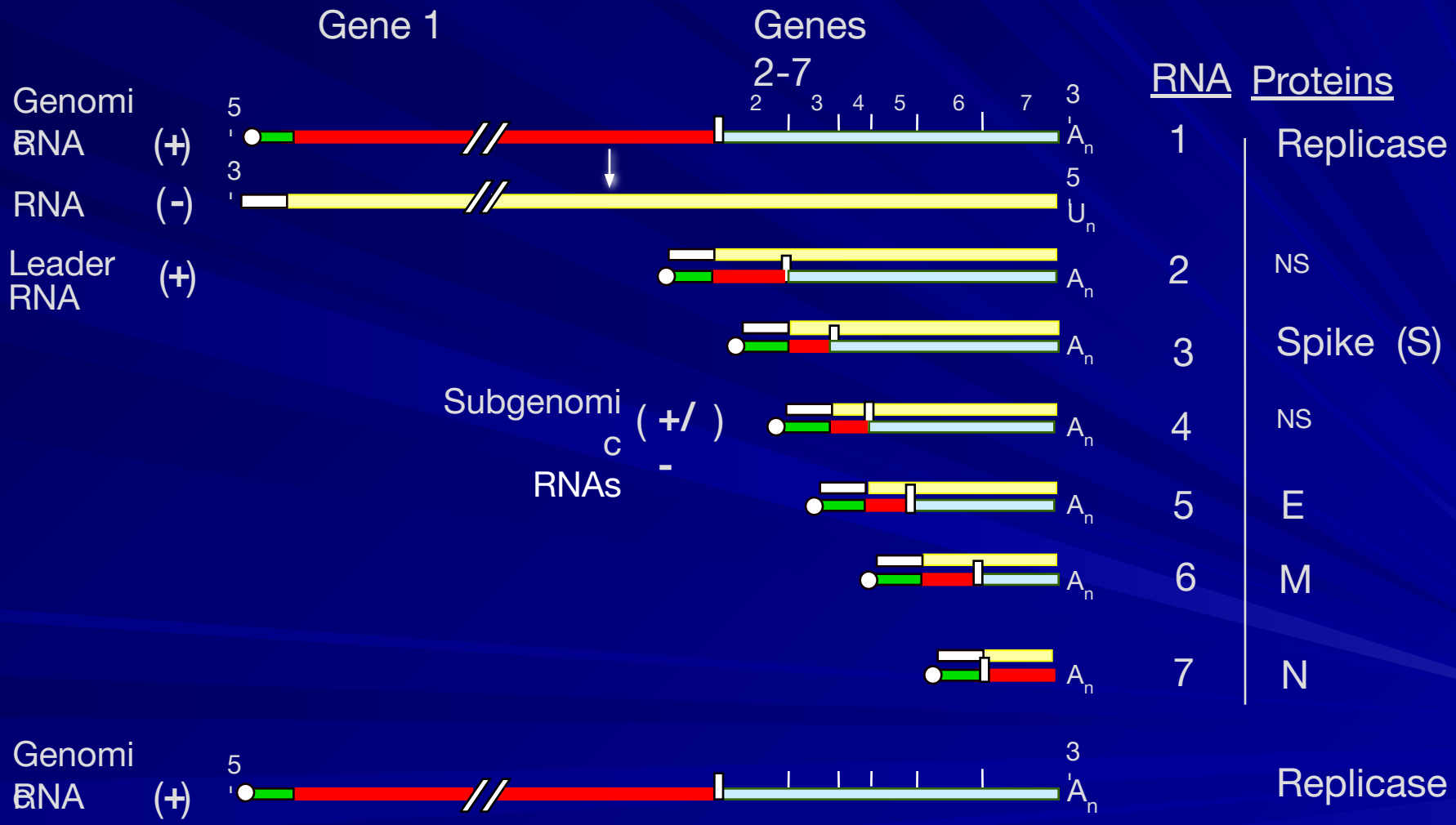
Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt

Транскрипція і реплікація Coronavirus



Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt

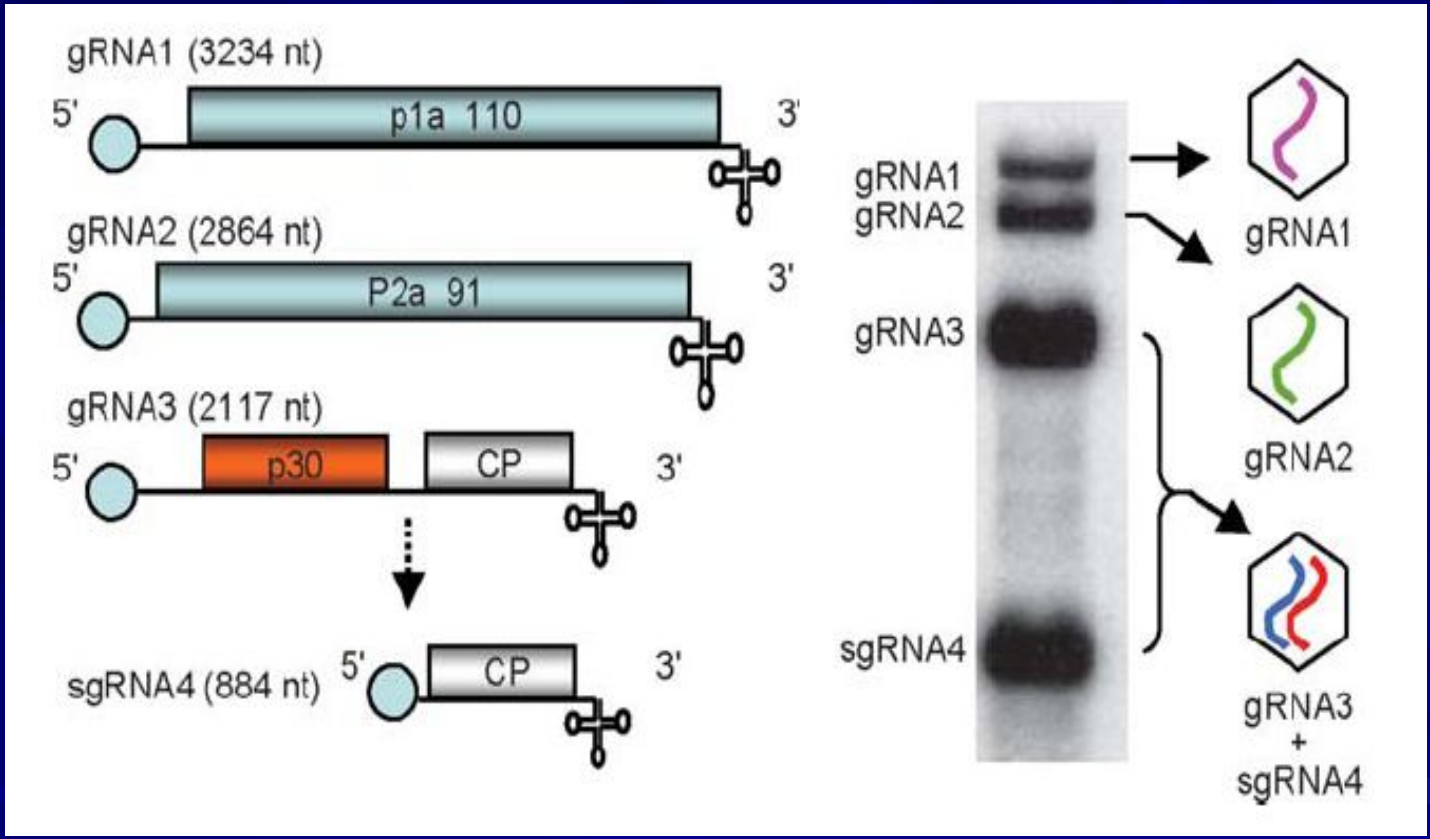
Транскрипція і реплікація Coronavirus



Borrowed from web file, Mark R. Denison, M.D., Vanderbilt

Вірус мозаїки бромусу

(Brome mosaic virus, BMV)

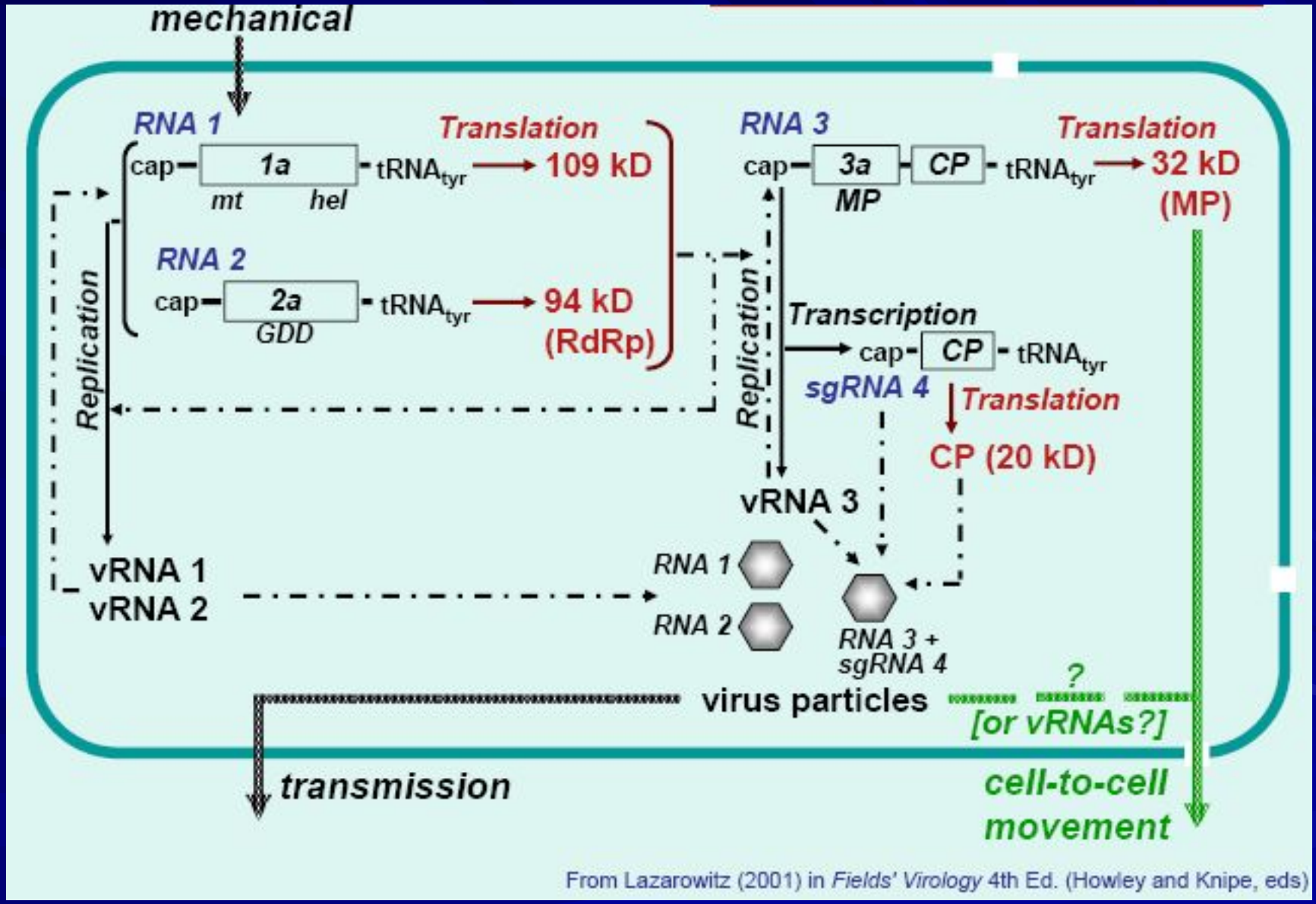


Протеїни реплікази BMV забезпечують специфічність упаковки

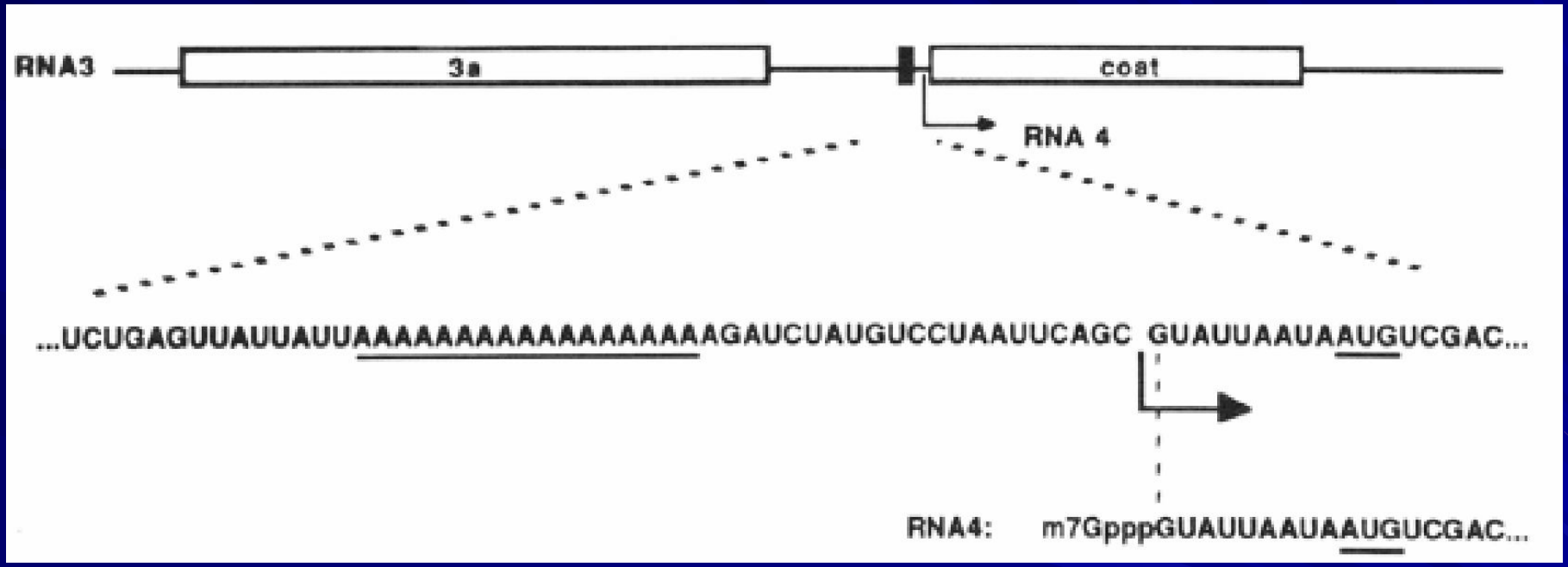
(Rao, 2006)

- 1а протеїн (РНК1) - метилтрансфераза, геліказа (110 кДа)
- 2а протеїн (РНК2) – РНКзРНКп (91 кДа)
- 3а протеїн (РНК3) – білок руху (МР) (30 кДа)
- СР (РНК3) – структурний білок (21 кДа)

Експресія геному БМВ



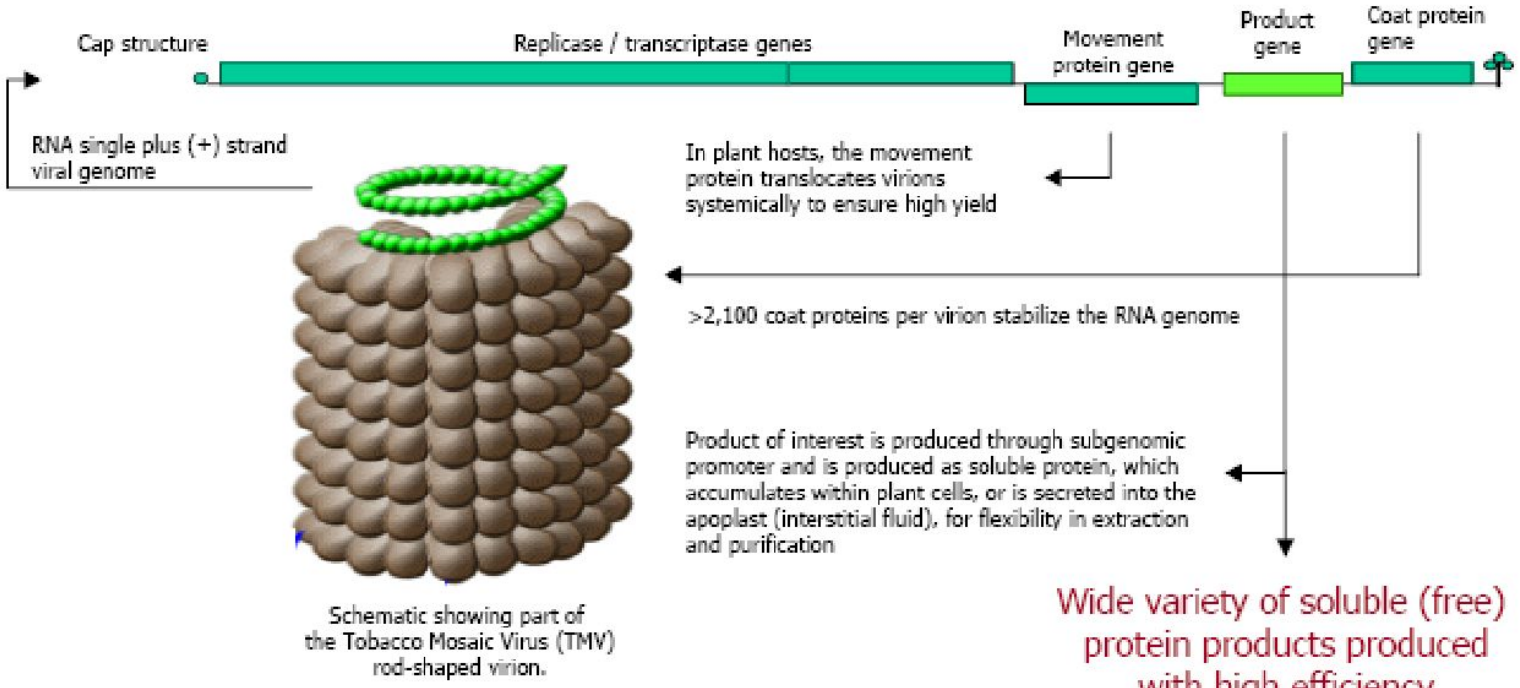
From Lazarowitz (2001) in *Fields' Virology* 4th Ed. (Howley and Knipe, eds)



Синтез субгеномної RNA вимагає взаємодії реплікази з послідовністю промотора в мінус-ланцюзі RNA3, який безпосередньо розташований «вгору за течією» від RNA4 ініціаторної послідовності

ВТМ як вектор

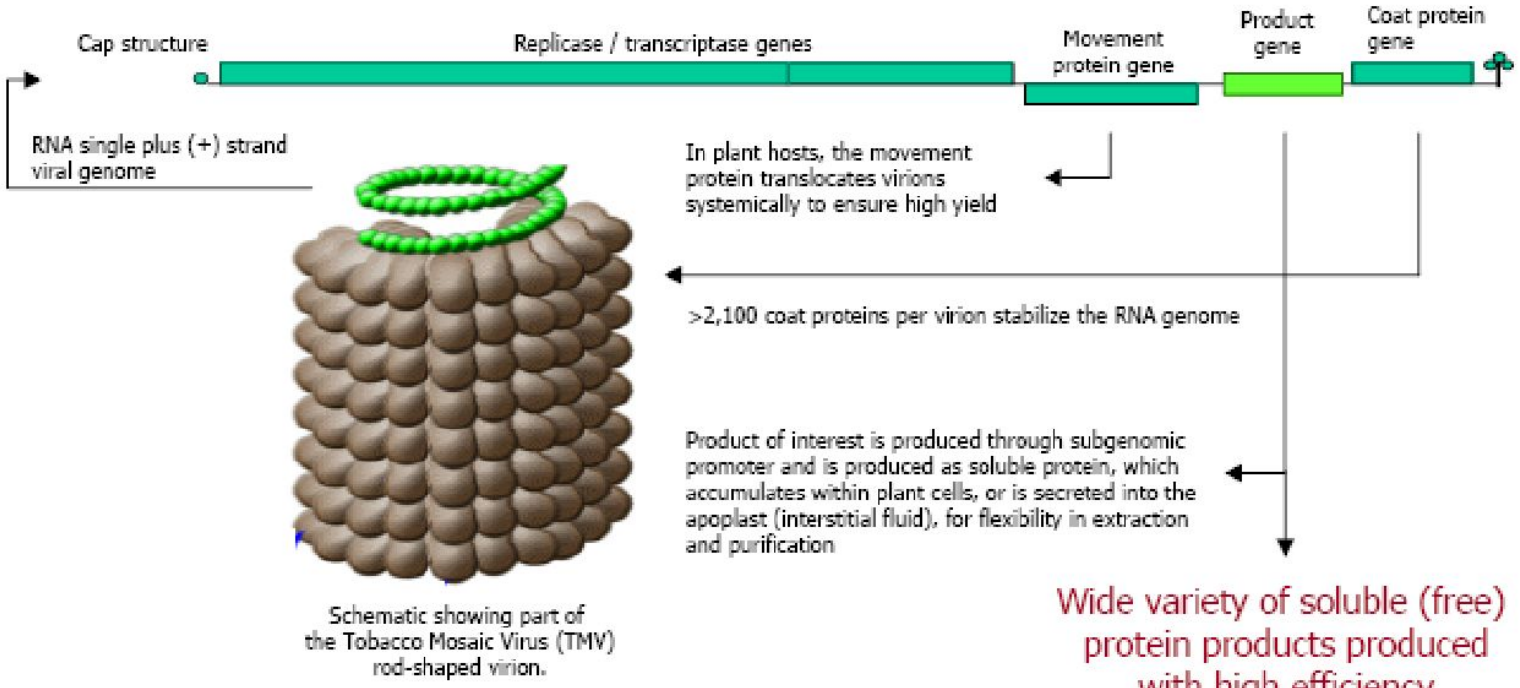
GENEWARE® Tobacco Mosaic Virus (TMV) Soluble (Free) Protein Viral Vector



2004 Large Scale Biology Corporation. All Rights Reserved Worldwide

ВТМ як вектор

GENEWARE® Tobacco Mosaic Virus (TMV) Soluble (Free) Protein Viral Vector



2004 Large Scale Biology Corporation. All Rights Reserved Worldwide