

Віруси з + РНК геномом

Реплікація/транскрипція + РНК-вмісних вірусів

Одноланцюгові РНК-геноми

- + (сми́слові) або
- - (антисми́слові) РНК-геноми

Позитивні
(сми́слові)

AUG GCA CGA

met ala arg

Негативні
(антисми́слові)

UAC CGU GCU



Генетичні карти РНК-вмісних вірусів

Positive-Stranded Viruses

Families:

Picornaviruses, Potyviruses (non-segmented)

Coronaviruses, Nepoviruses (segmented)



Sindbis Virus-Like

Families:

Togaviruses, Tobraviruses, Tobamoviruses (non-segmented)

Bromoviruses (segmented)

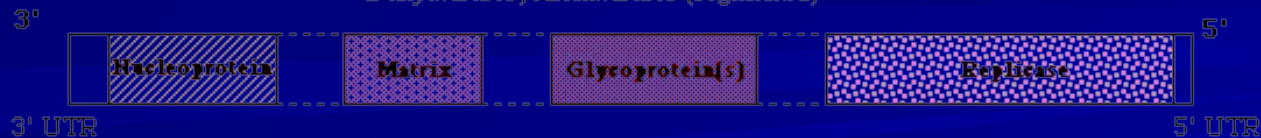


Negative-Stranded Viruses

Families:

Paramyxoviruses, Rhabdoviruses (non-segmented)

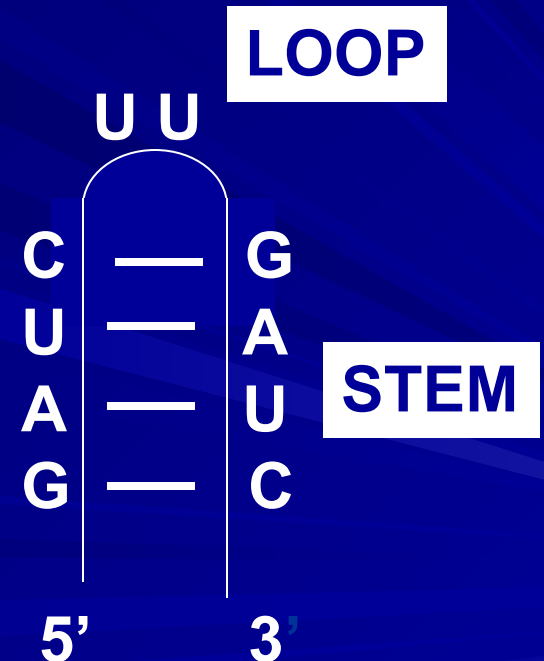
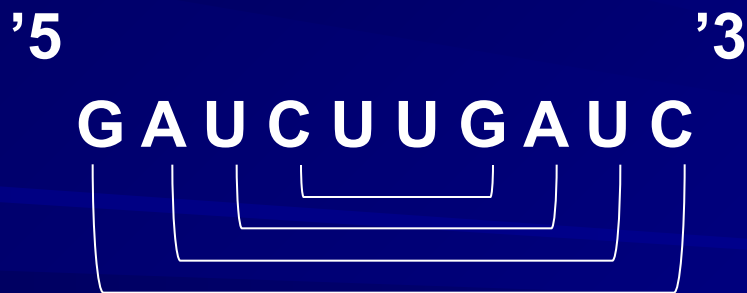
Bunyaviruses, Arenaviruses (segmented)



Вторинна структура РНК

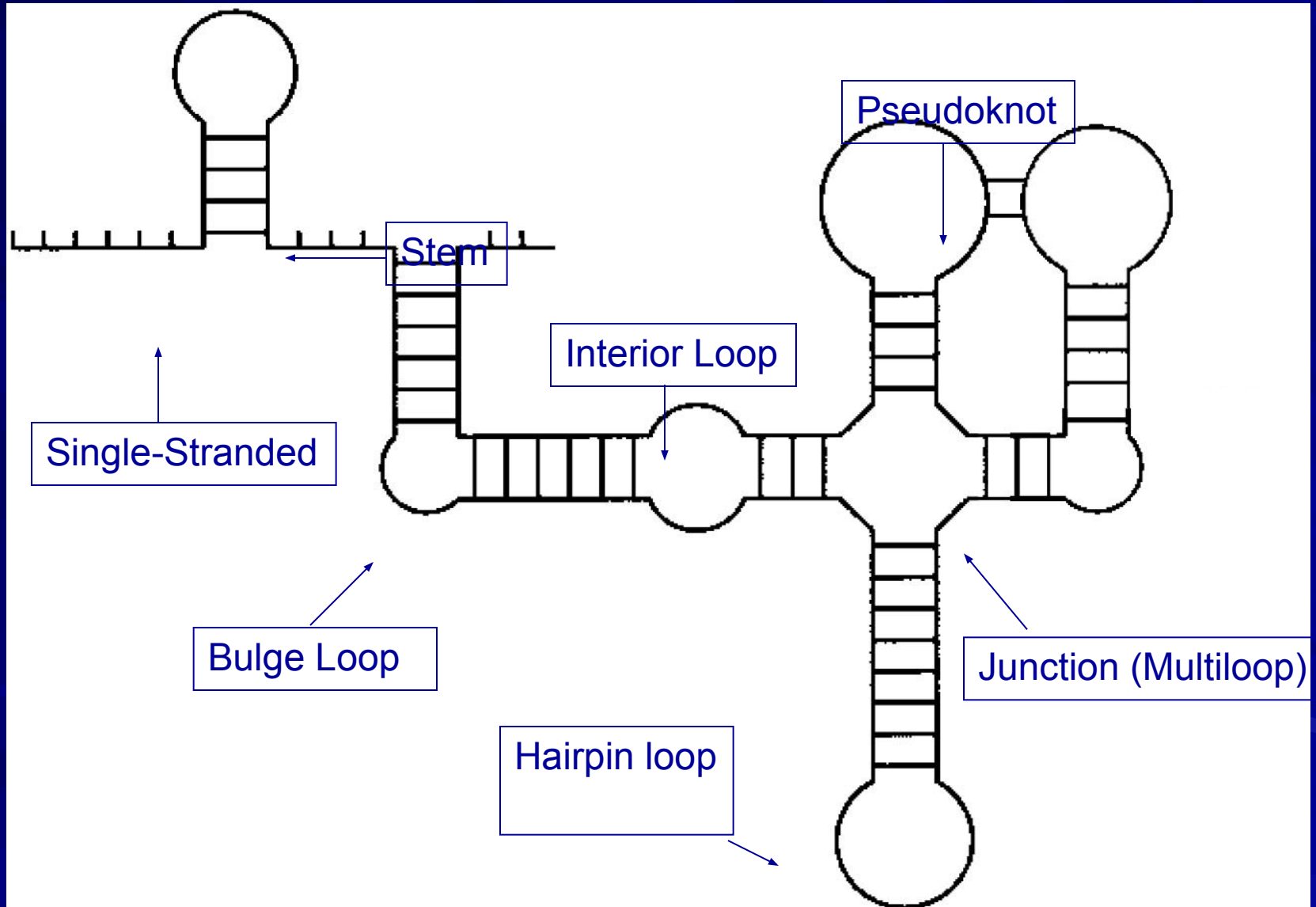
- Молекула РНК «закривається» сама на себе
- Можливі варіанти з'єднання:

G ≡ C A = U G — U
— hydrogen bond

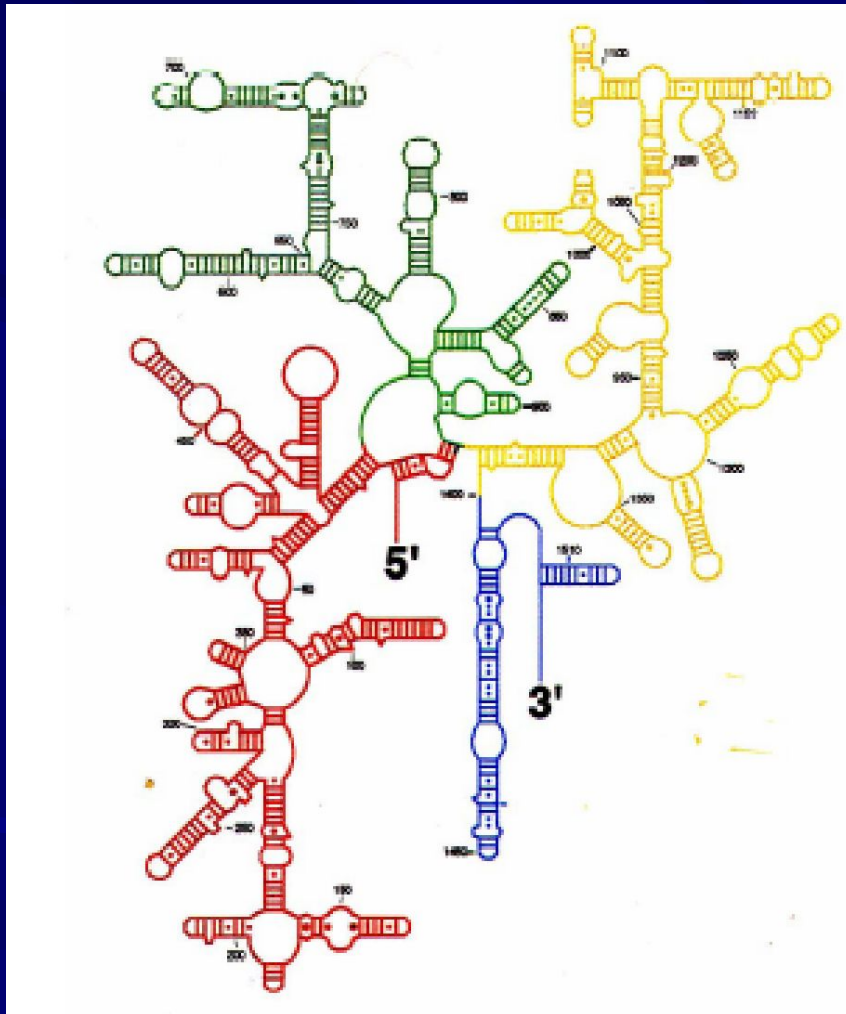


- Stem – “стовбур”
- Loop – “петля”
- Pseudoknot – “псевдовузол”

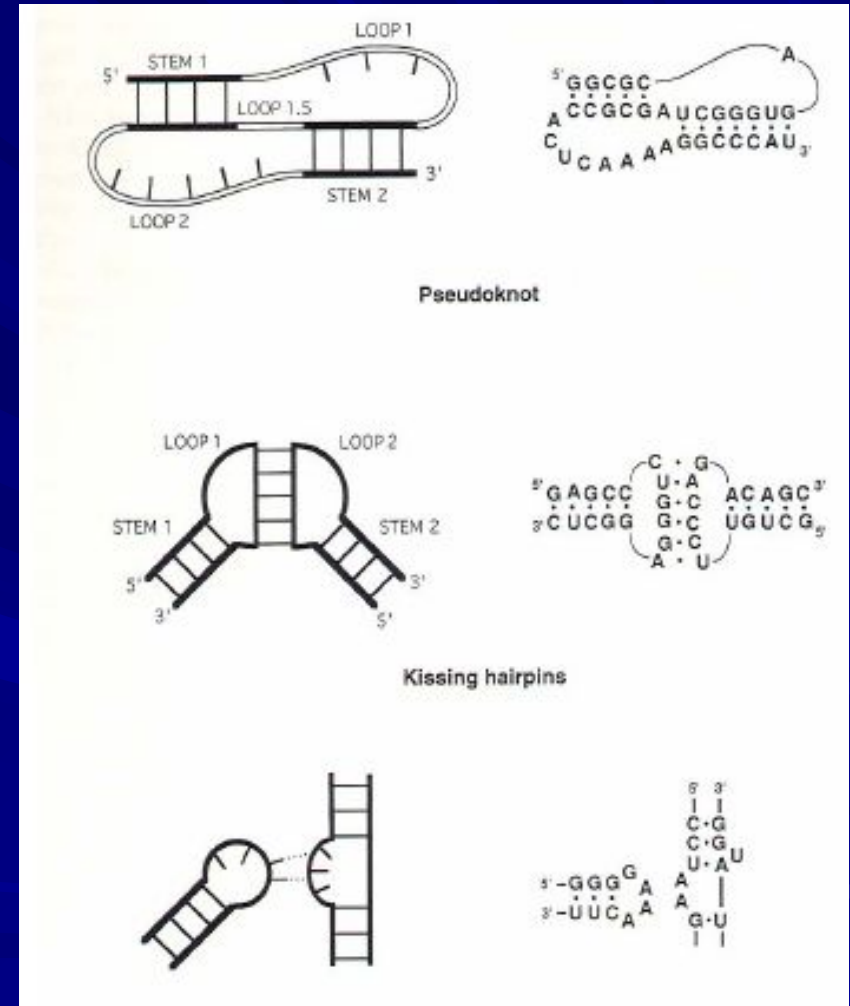
Вторинна структура РНК



Структура РНК



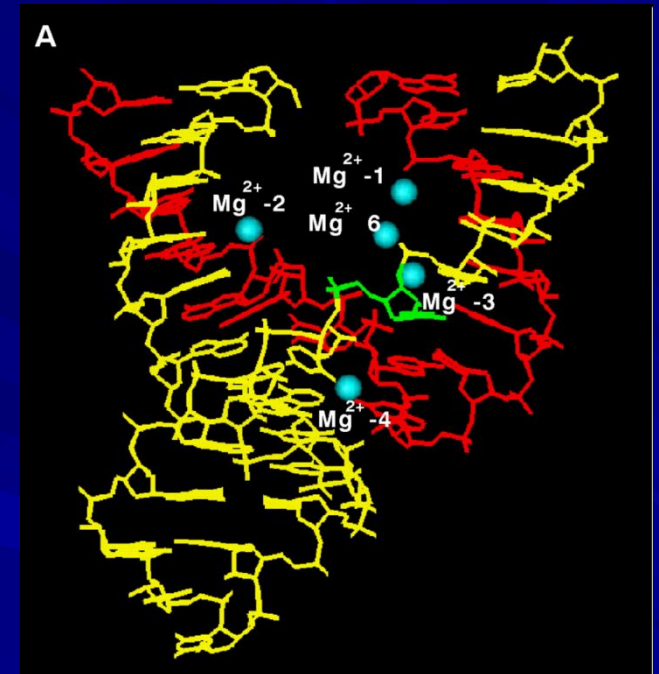
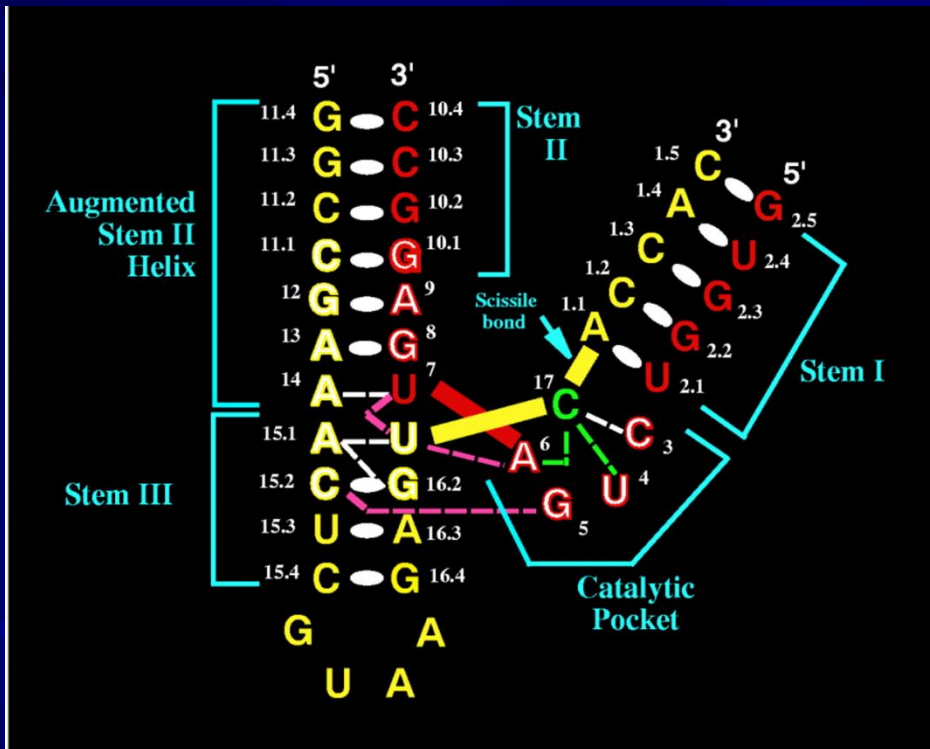
Рибосомальна РНК



Варіанти третинної структури

Рибозимна активність (*The hammerhead ribozyme (plant virus)*)

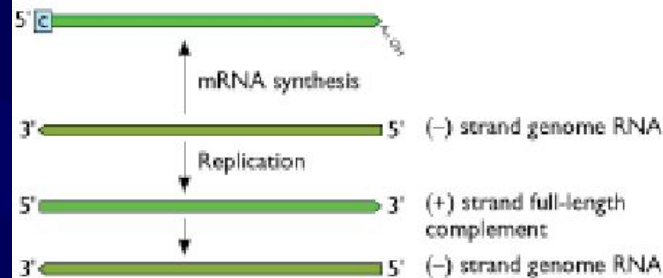
- tertiary structure



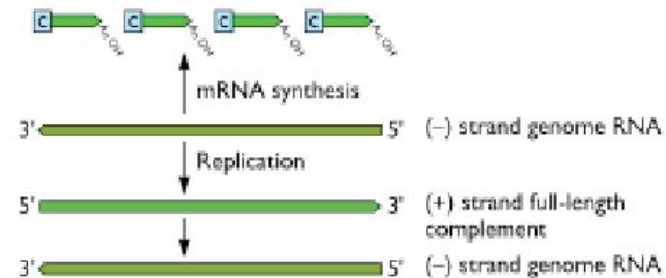
Scott et al and Klug, Science 1996

(-) strand RNA viruses

Segmented

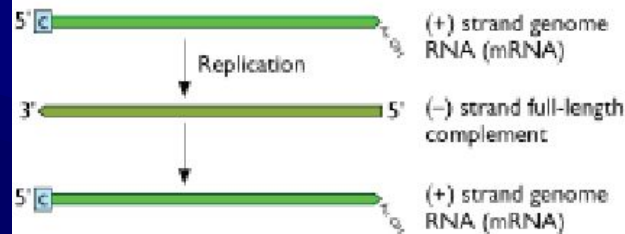


Unimolecular

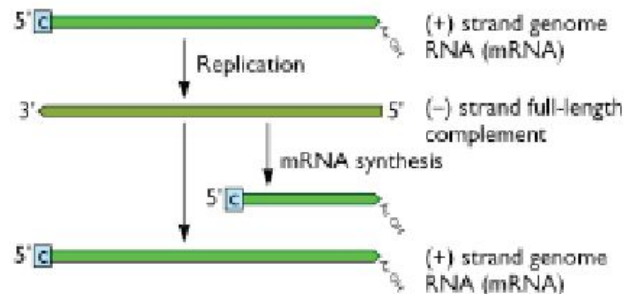


(+) strand RNA viruses

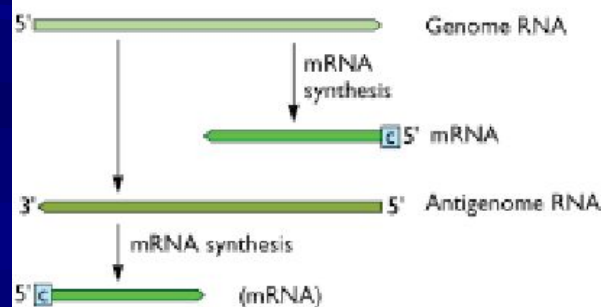
Flavi- and picornaviruses



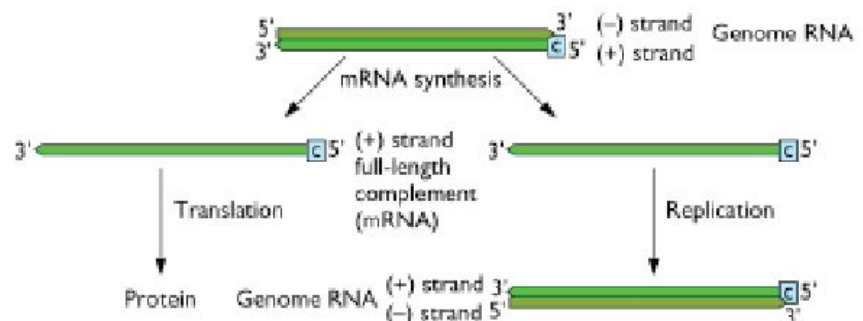
Alphaviruses

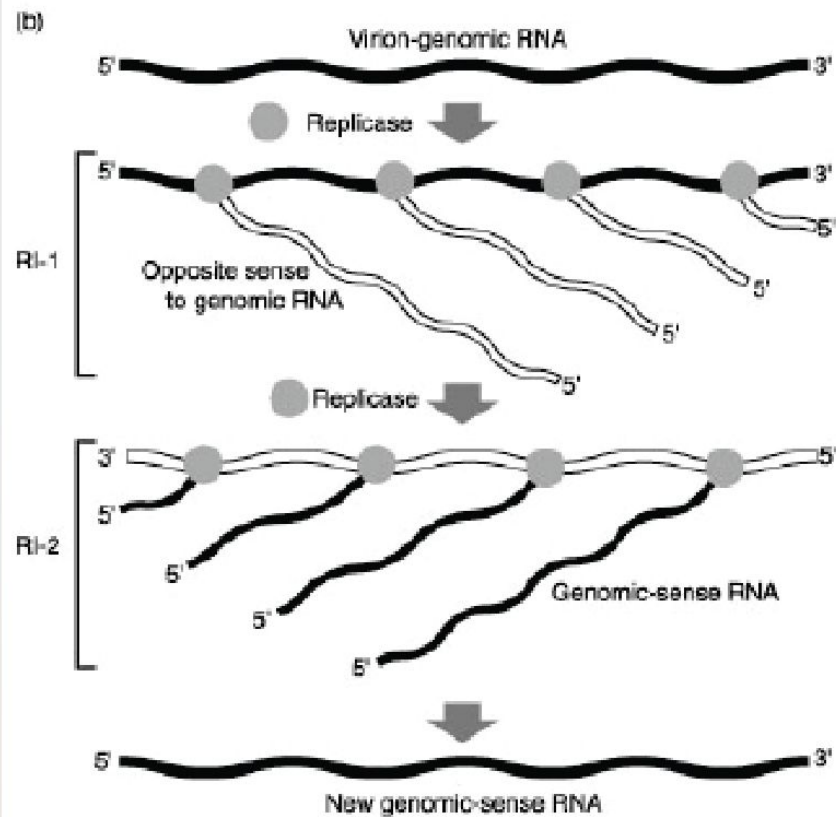
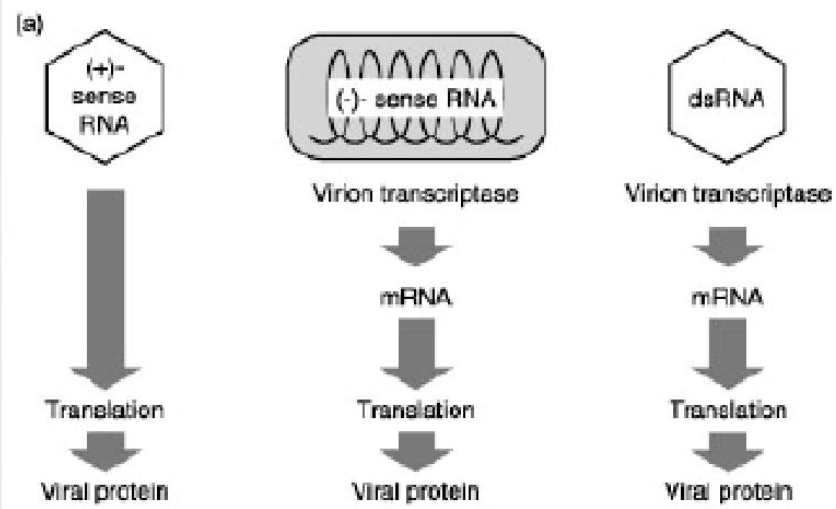


Ambisense RNA viruses

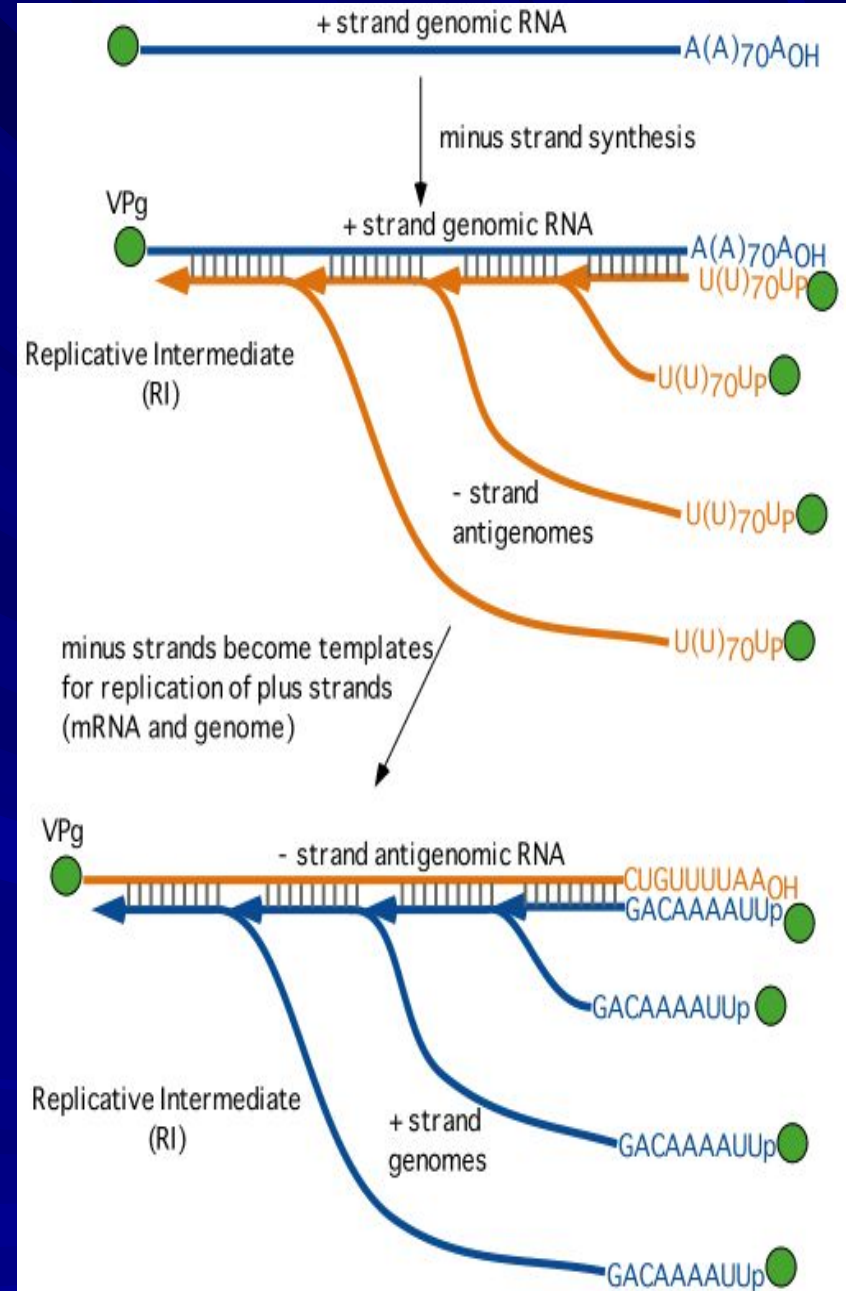
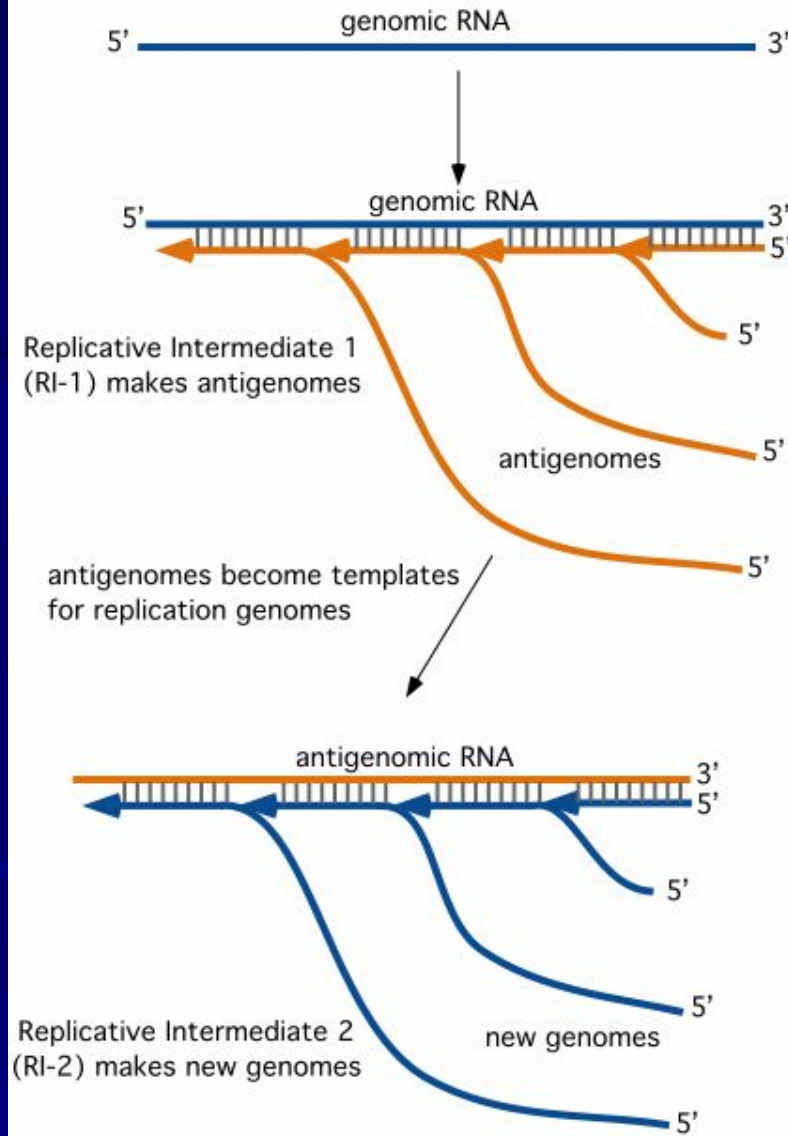


Double-stranded RNA viruses

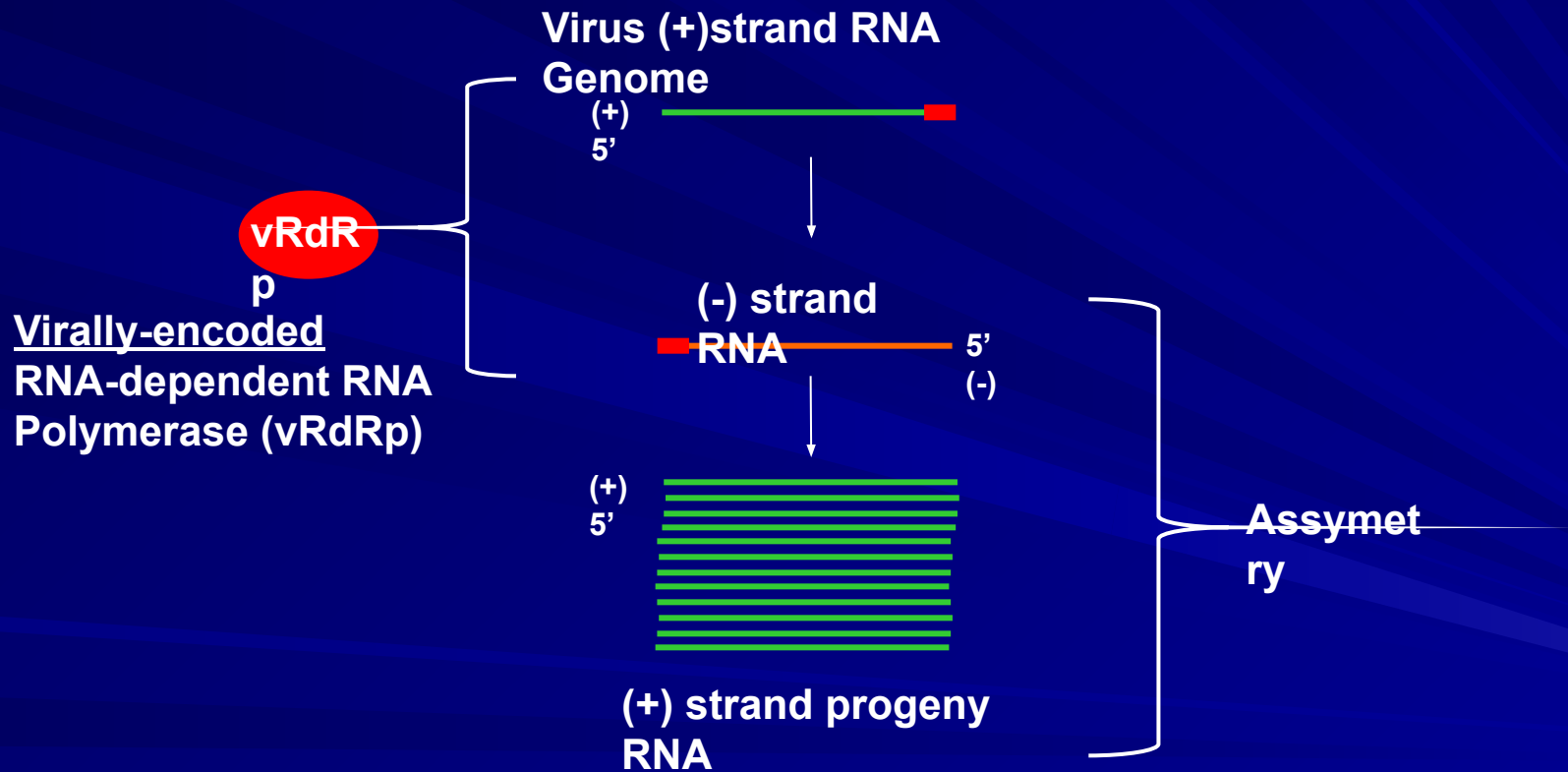




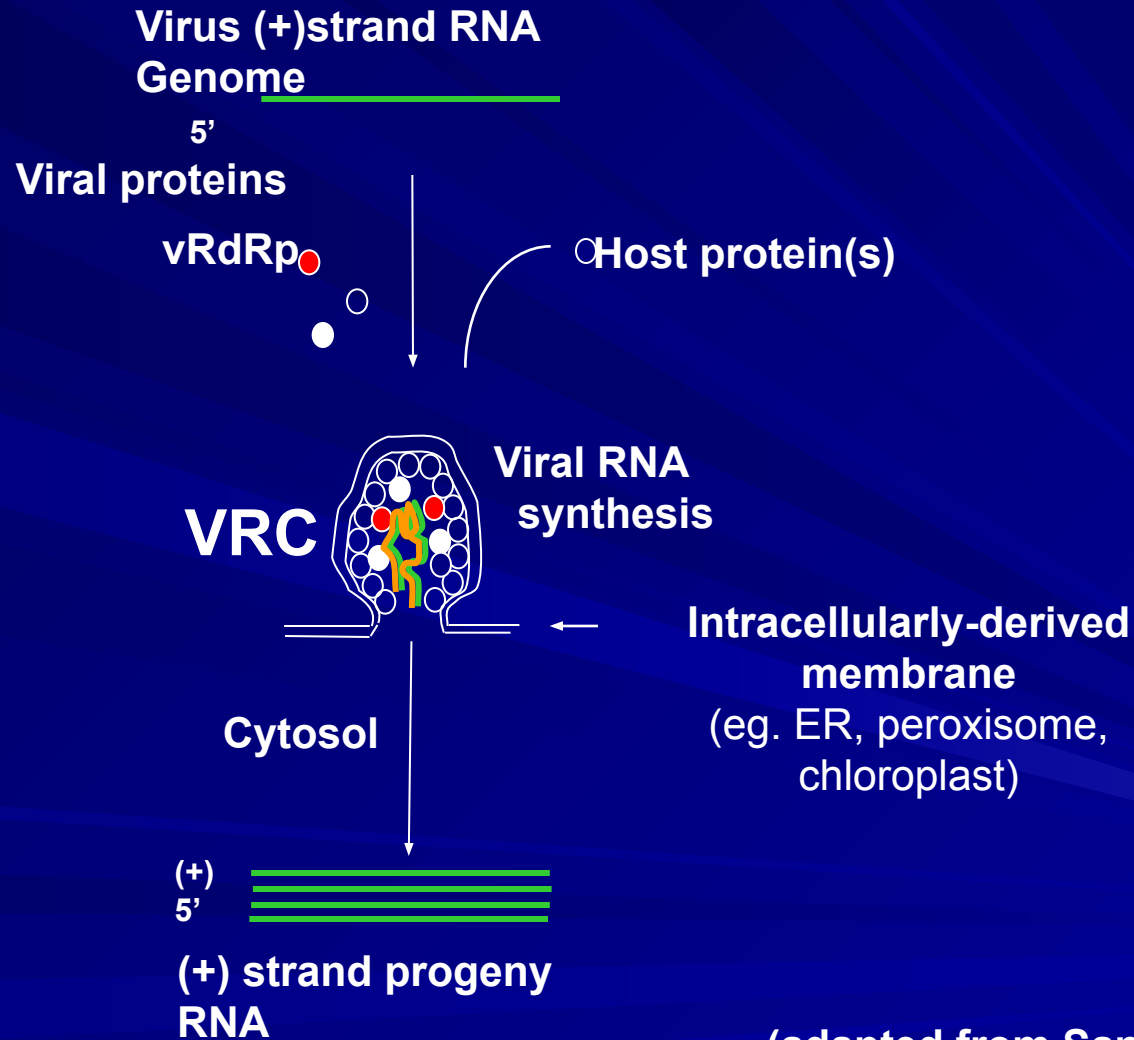
Replication of viral ssRNA goes through a replicative intermediate (RI)



Реплікаційна стратегія (+)-ланцюгових РНК вірусів



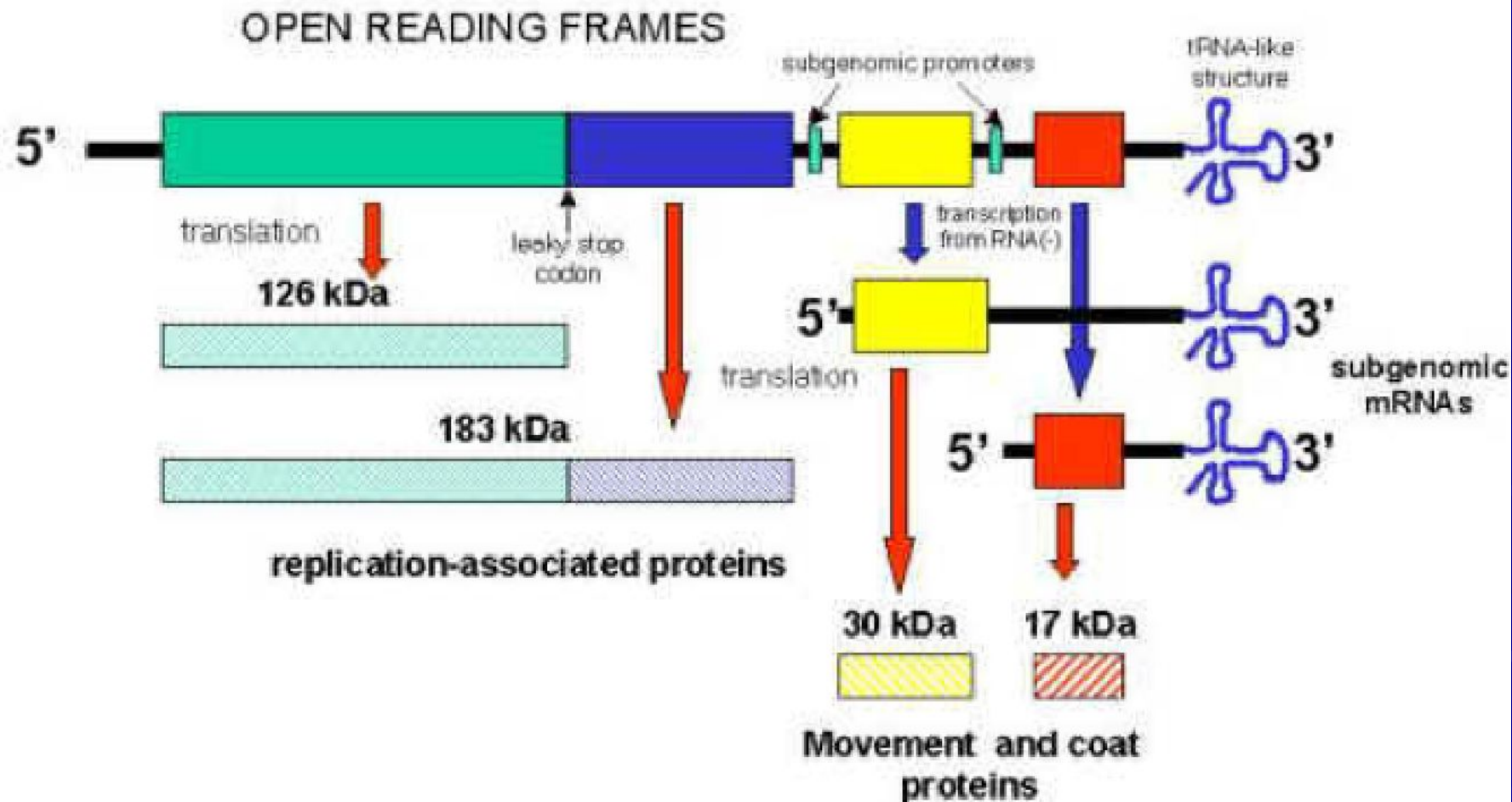
Вірусний реплікаційний комплекс (VRC)



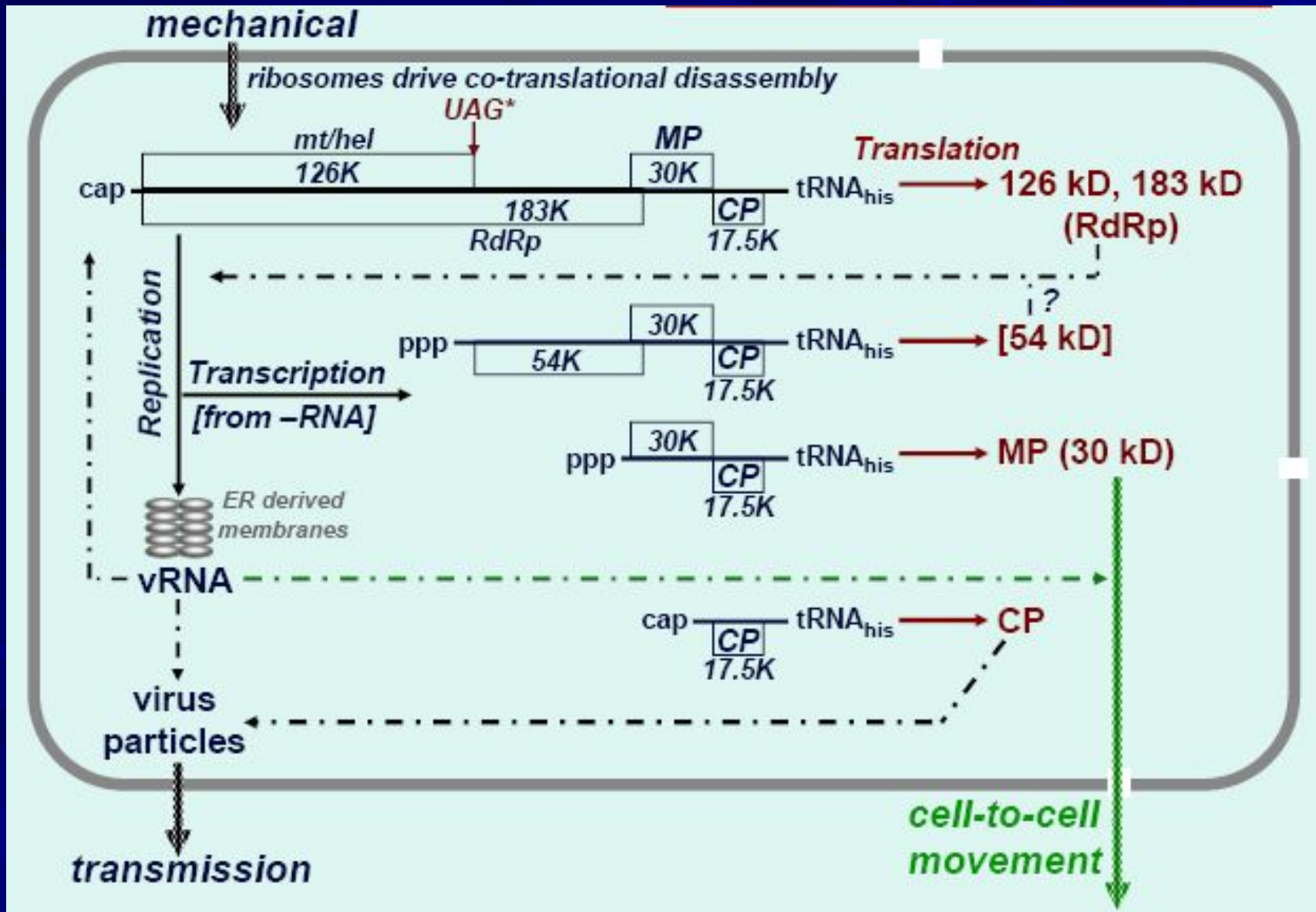
(adapted from Sanfacon,
2006)

Геном ВТМ

(6,3-6,6 млн)

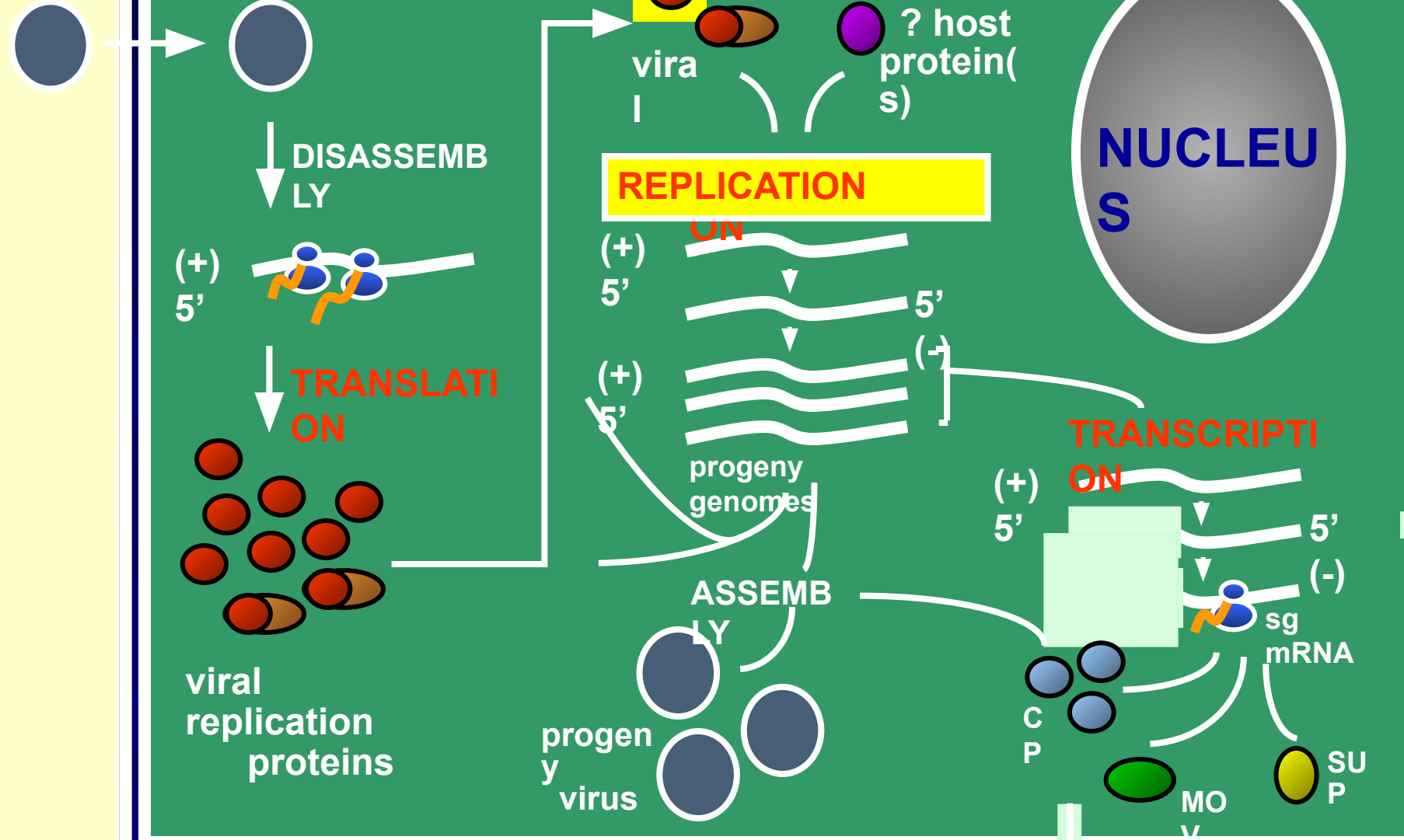


Експресія геному ВТМ

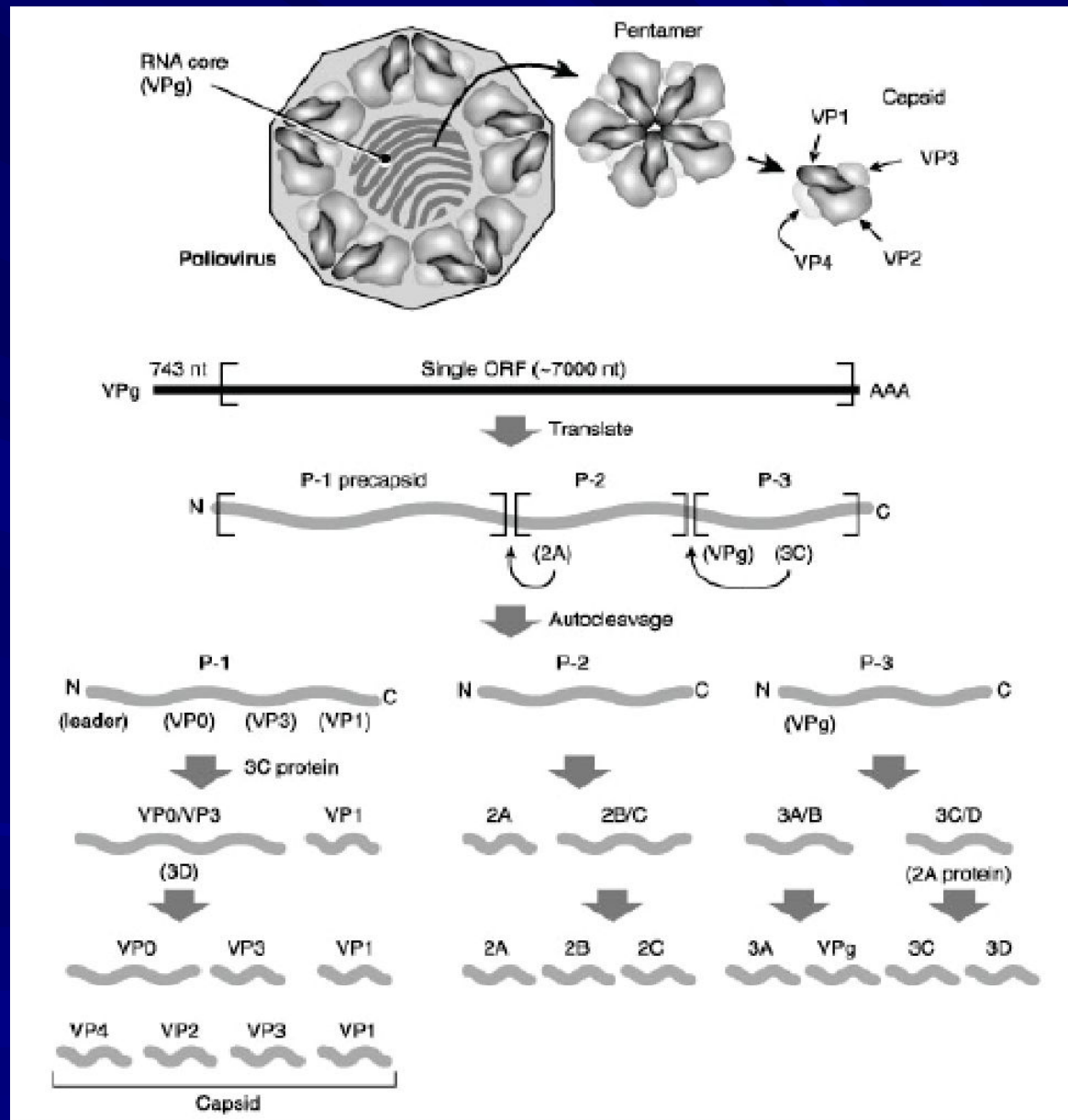


Multiple Functions

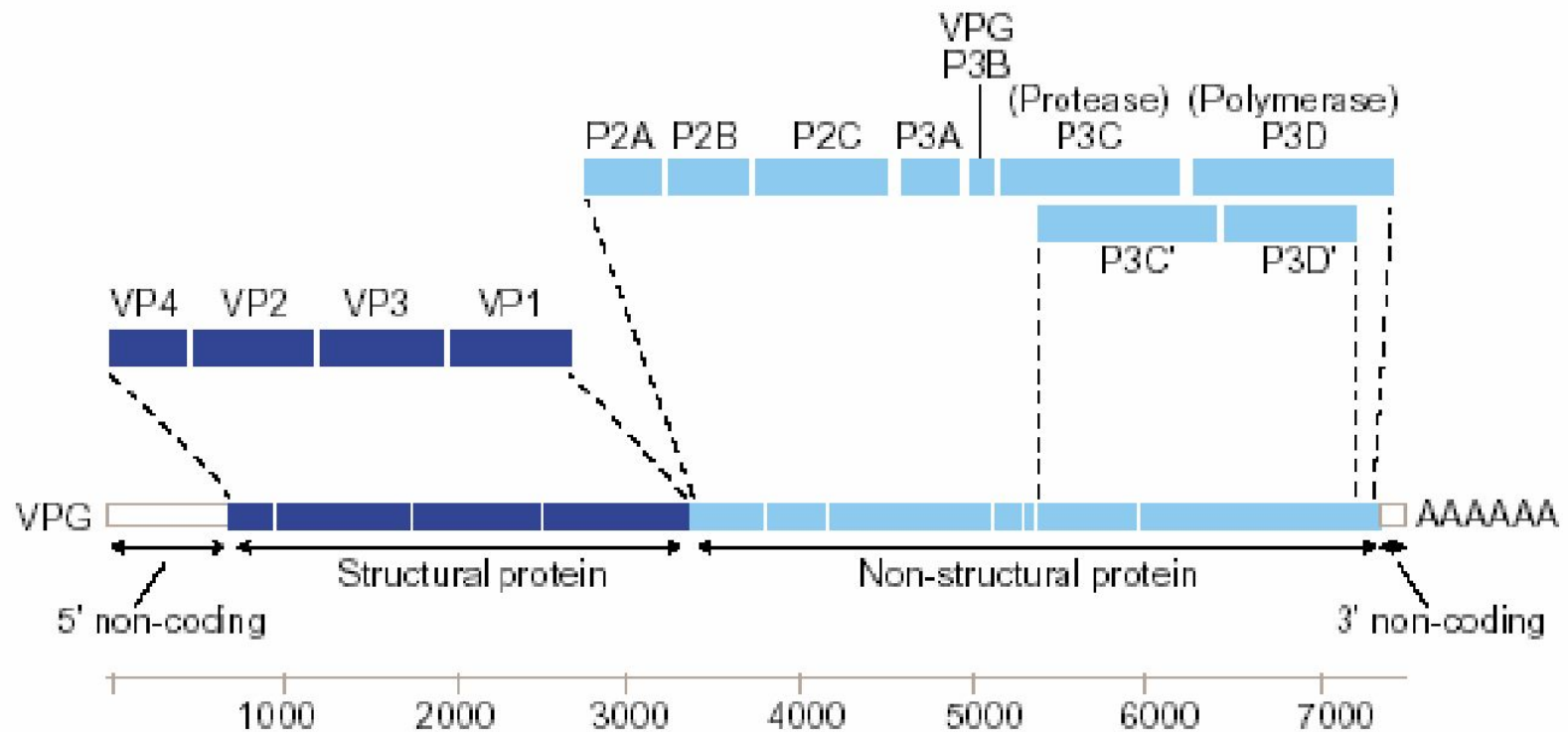
(+)std
Virus



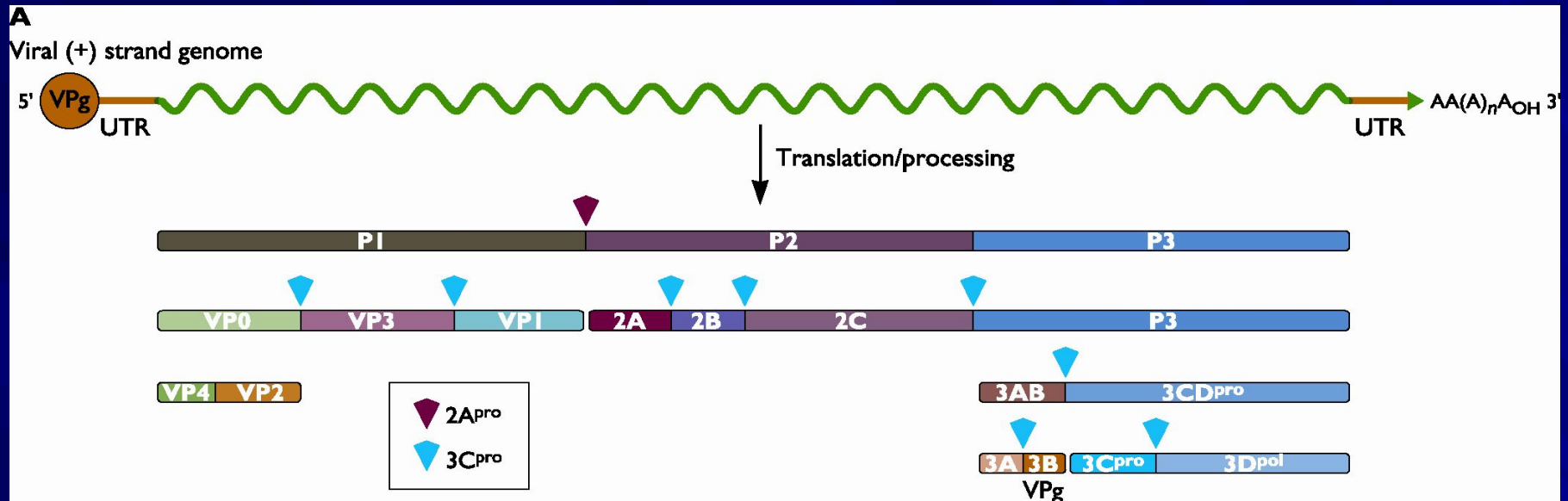
Експресія геному вірусу поліомієліту



Структура геному поліовірусу



Структура геному поліовірусу

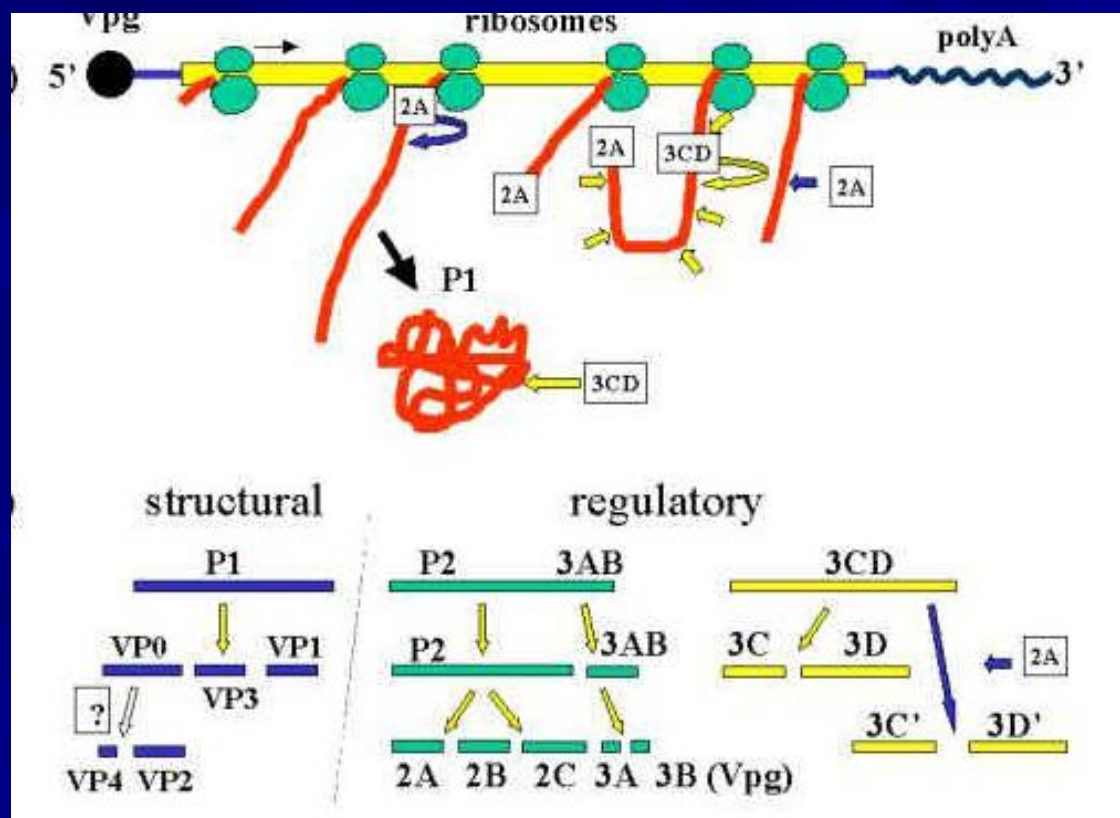


- Геном поліовірусу включає одну ORF, яка кодує 247 kD поліпротеїн. На 5'-кінці VPg, на 3'-кінці poly(A) тракт
- Процесінг йде в 3 етапи. Перший - розрізання P1 попередника капсидного білку, яке каталізує 2A_{pro}
- Другий крок - процесінг некапсидних і капсидних попередників, що каталізується 3C_{pro} і 3CD_{pro}
- Третій крок - перехід VP0 в VP4 і VP2

Протеолітичний процесінг

- Протягом трансляції 2A протеїназа активується відразу.
- Розрізання 2A протеїназою звільняє структурний поліпротеїн (P1), який є прекурсором структурних білків.
- Протеїназа 3C та її прекурсор 3CD здійснюють остаточне розрізання поліпротеїнів.

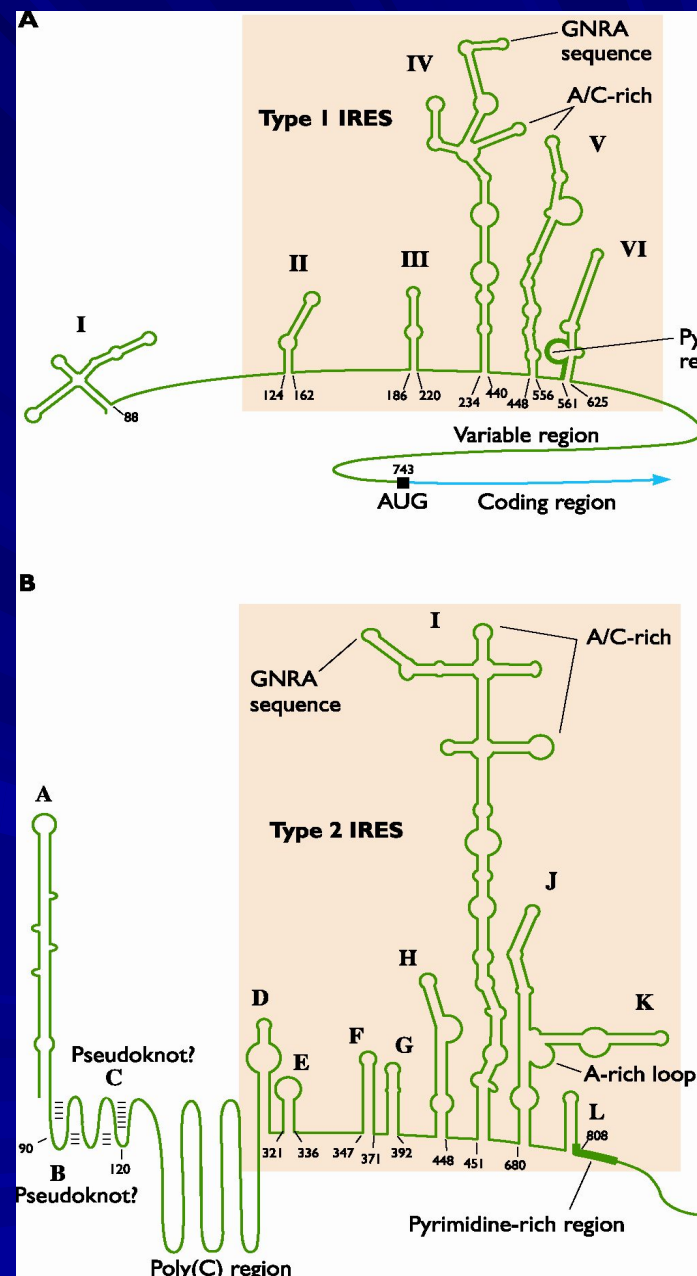
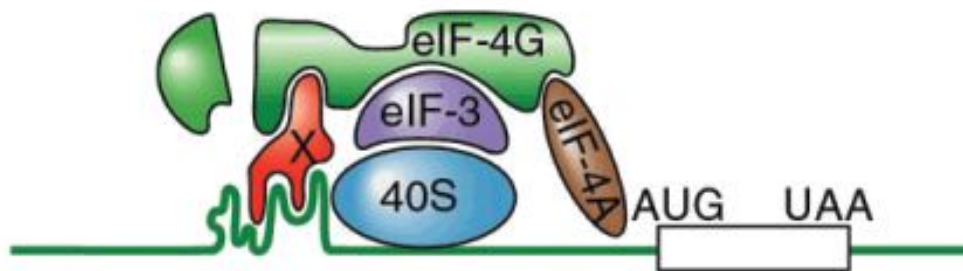
- 2B протеїн (визначає коло господарів), також залучається в синтез РНК
- 2C протеїн є висококонсервативним і також залучається в синтез РНК
- 3D протеїн є РНКзРНКп і має GDD полімеразний мотив
- 3B протеїн є VPg.



Трансляція

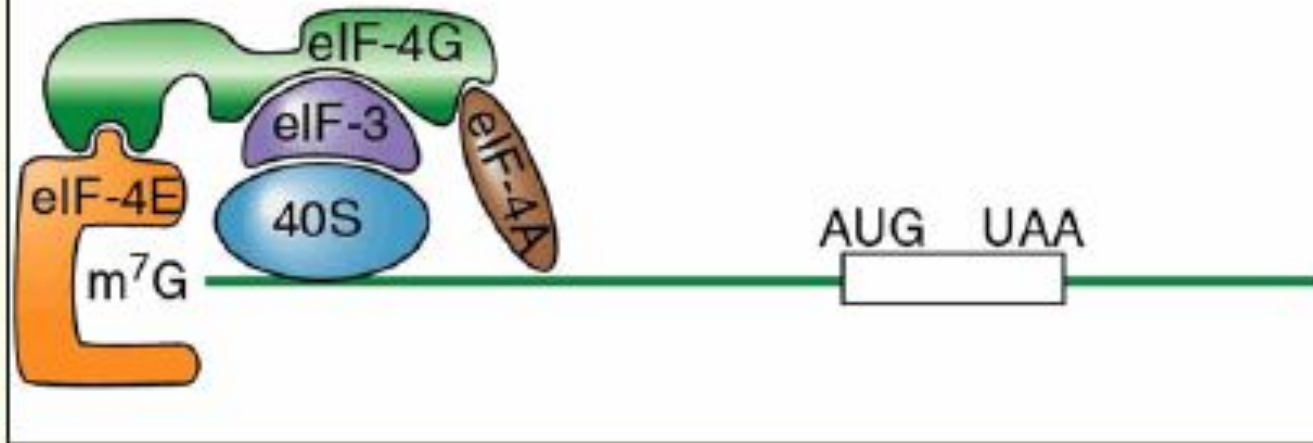
- Трансляція пікорнавірусів є *cap* незалежною
- мРНК пікорнавірусів не має *cap* (pUp) на її 5' кінці
- Генوم має довгу (743 nt) UTR нетрансльовану лідерну послідовність, що передус сайту ініціації трансляції.
- Зв'язування з рибосомою відбувається завдяки Internal Ribosomal Entry Sequence (IRES).
- 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 допомагають збірці IRES. Також потрібний клітинний фактор X.

IRES

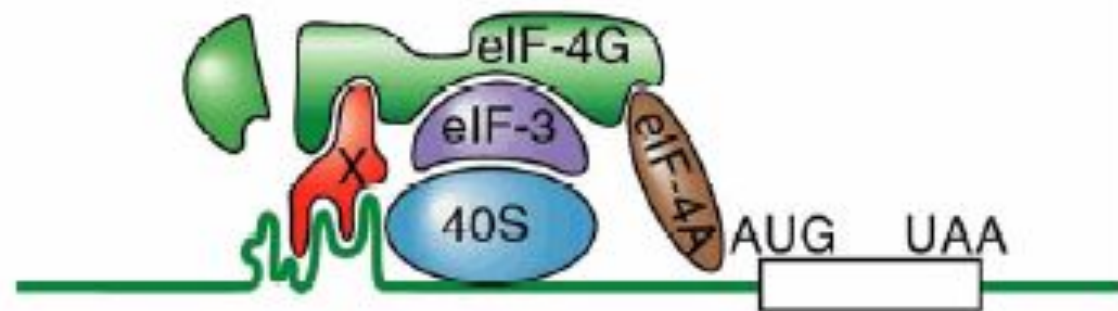


CAP vs IRES-Dependent Translation

Cap



IRES



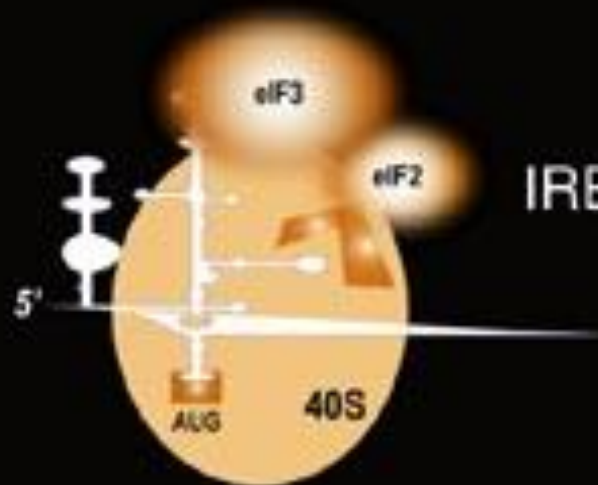
Canonical

- 5' cap-dependent.
- cap-binding proteins required.



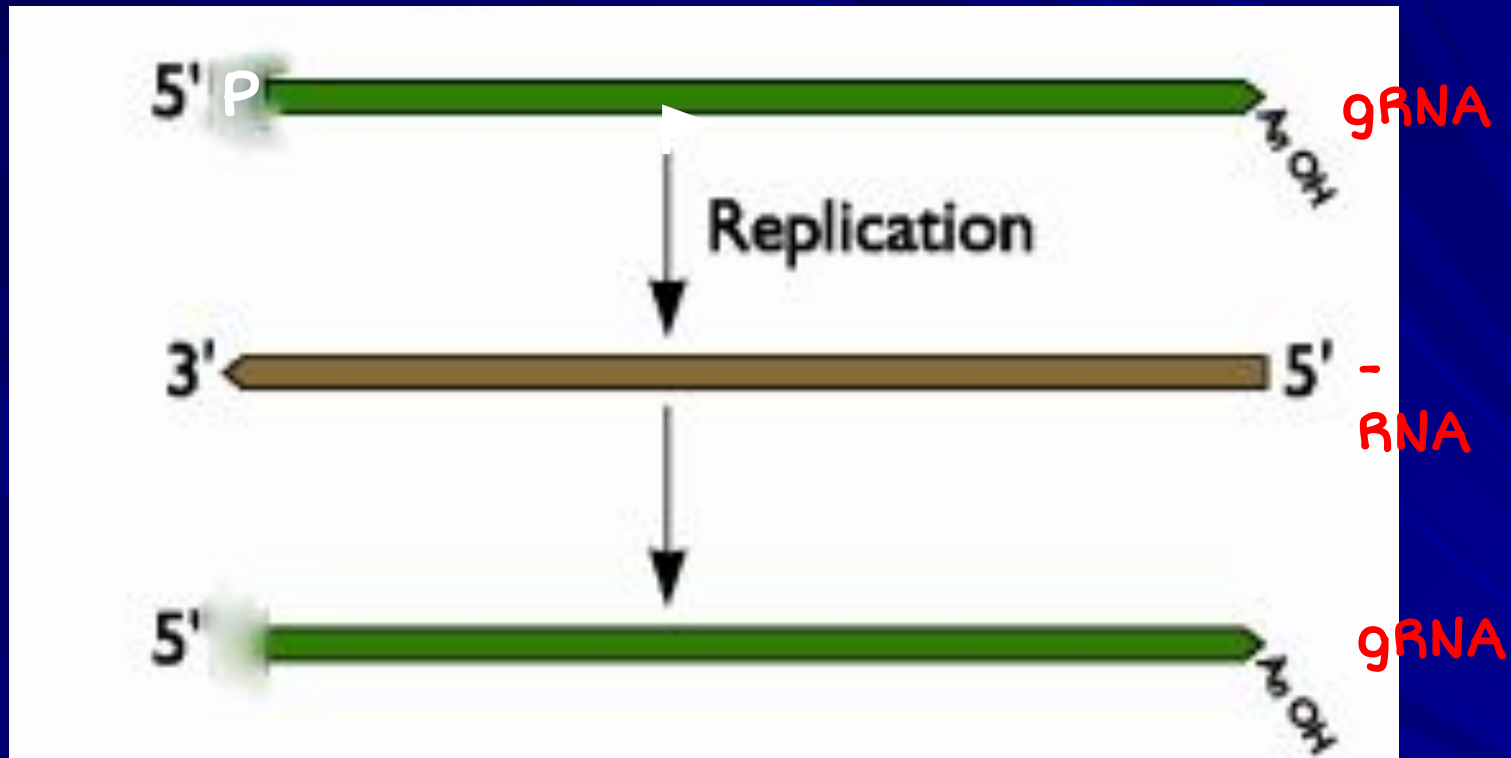
HCV IRES

- cap-independent.
- Fewer factors required.
- **NO** scanning required.



IRES= Internal Ribosome
Entry Site

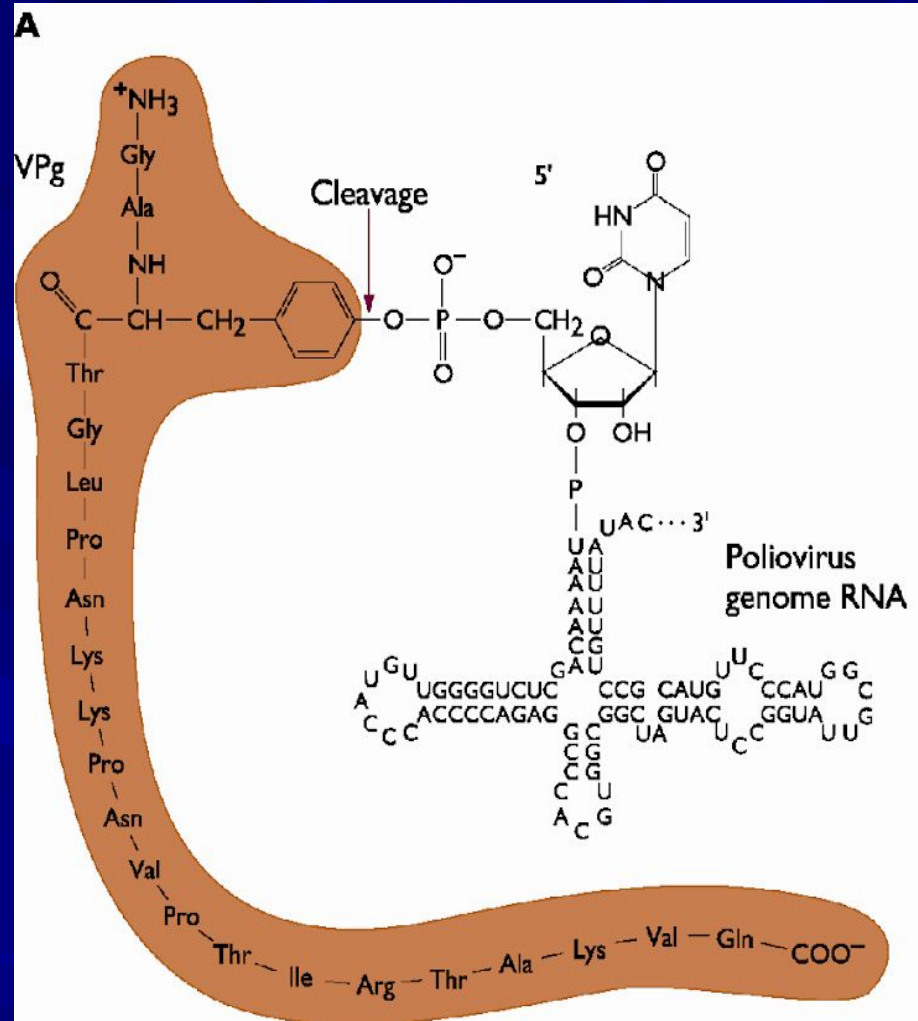
Реплікація



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

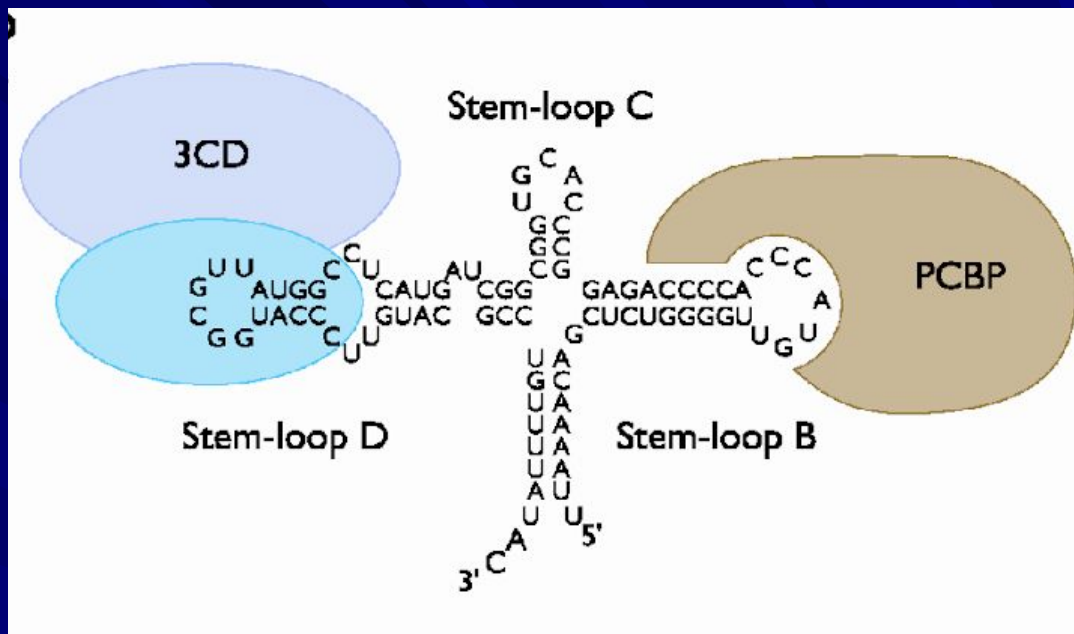
Реплікація

- 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 Ur
- Геномні РНК інкорпорується в віріони з VPg на 5'-кінці.
- Ці етапи відбуваються в везикулах, що утворюються з гладкого ЕР



Реплікація

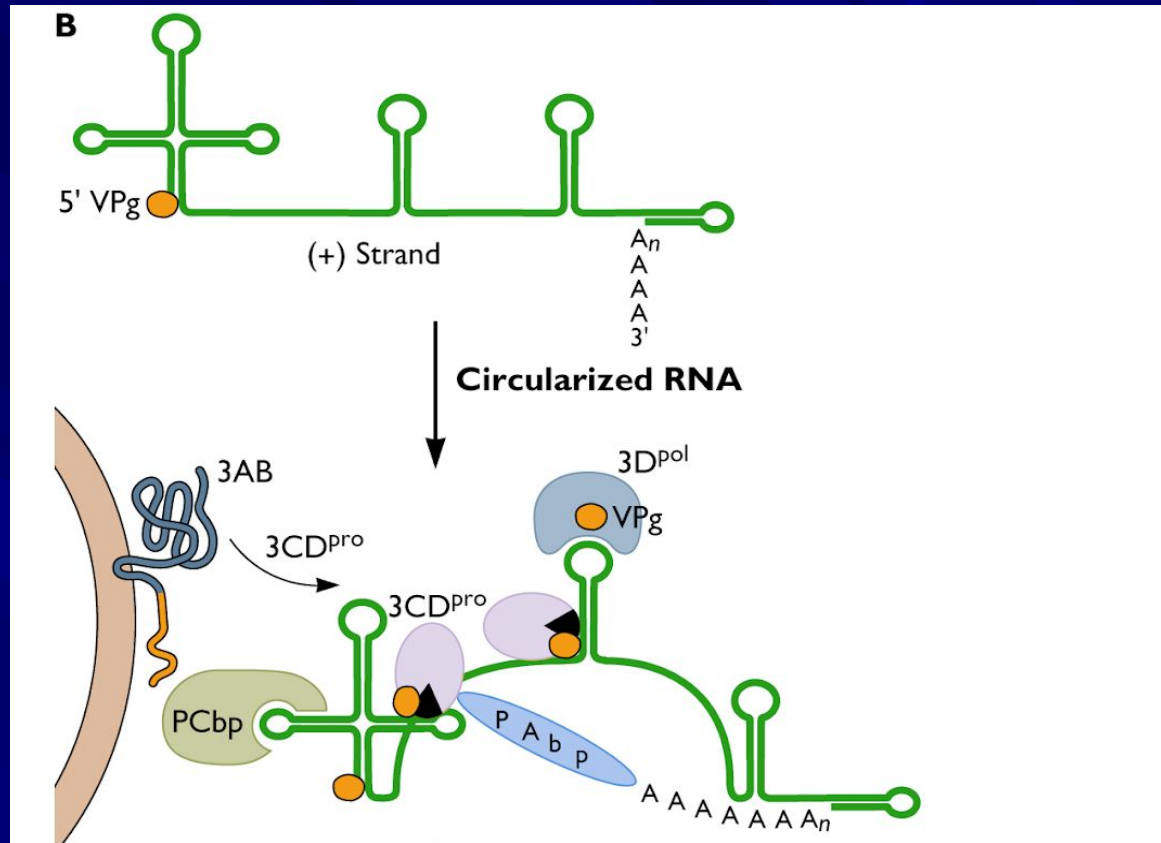
**Високоспарена структура,
сформована 108
нуклеотидами на 5' кінці (+)
ланцюга РНК, утворює
"листок конюшини"**



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 функціонувати як праймер

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

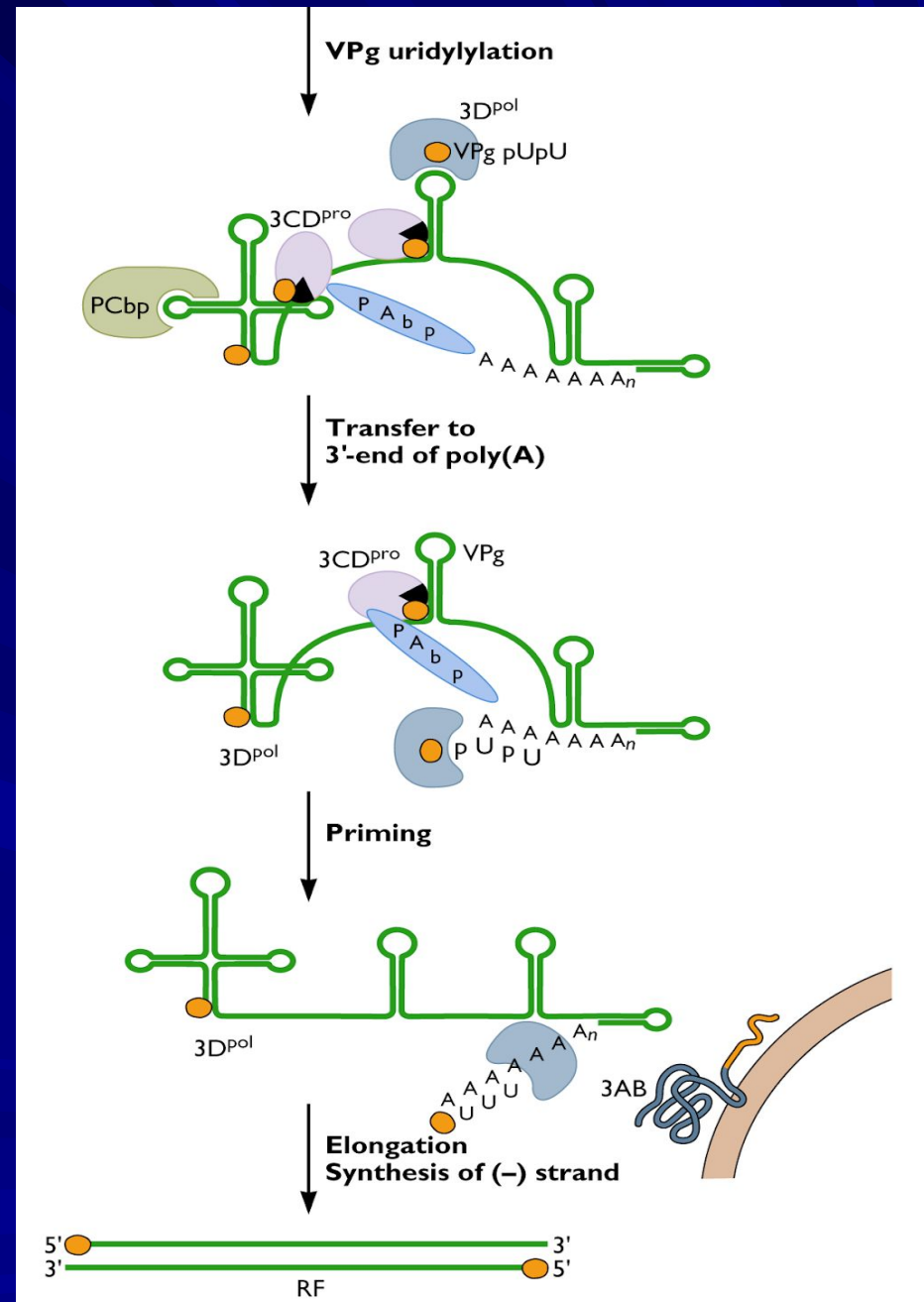
Синтез -РНК



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

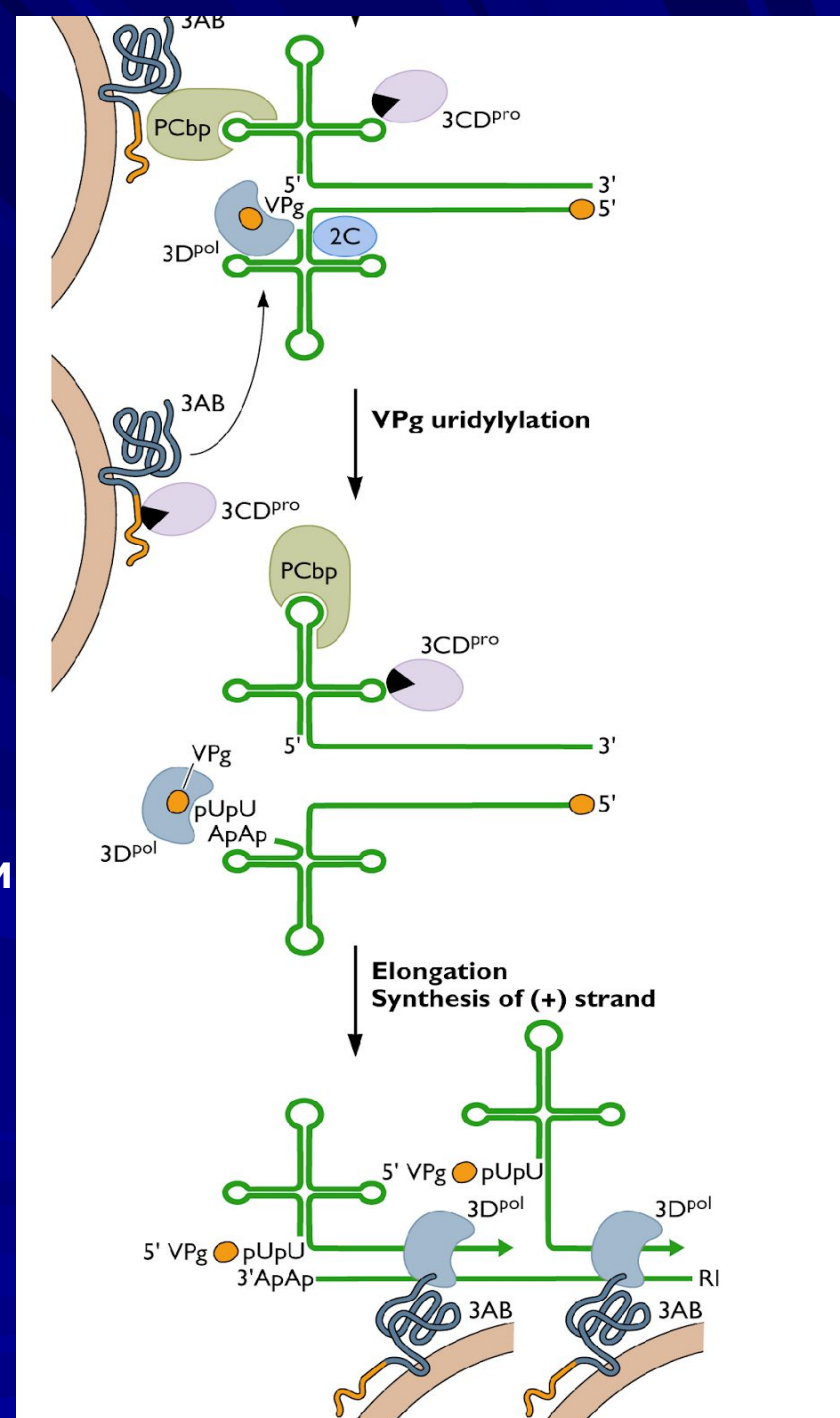
Синтез -РНК

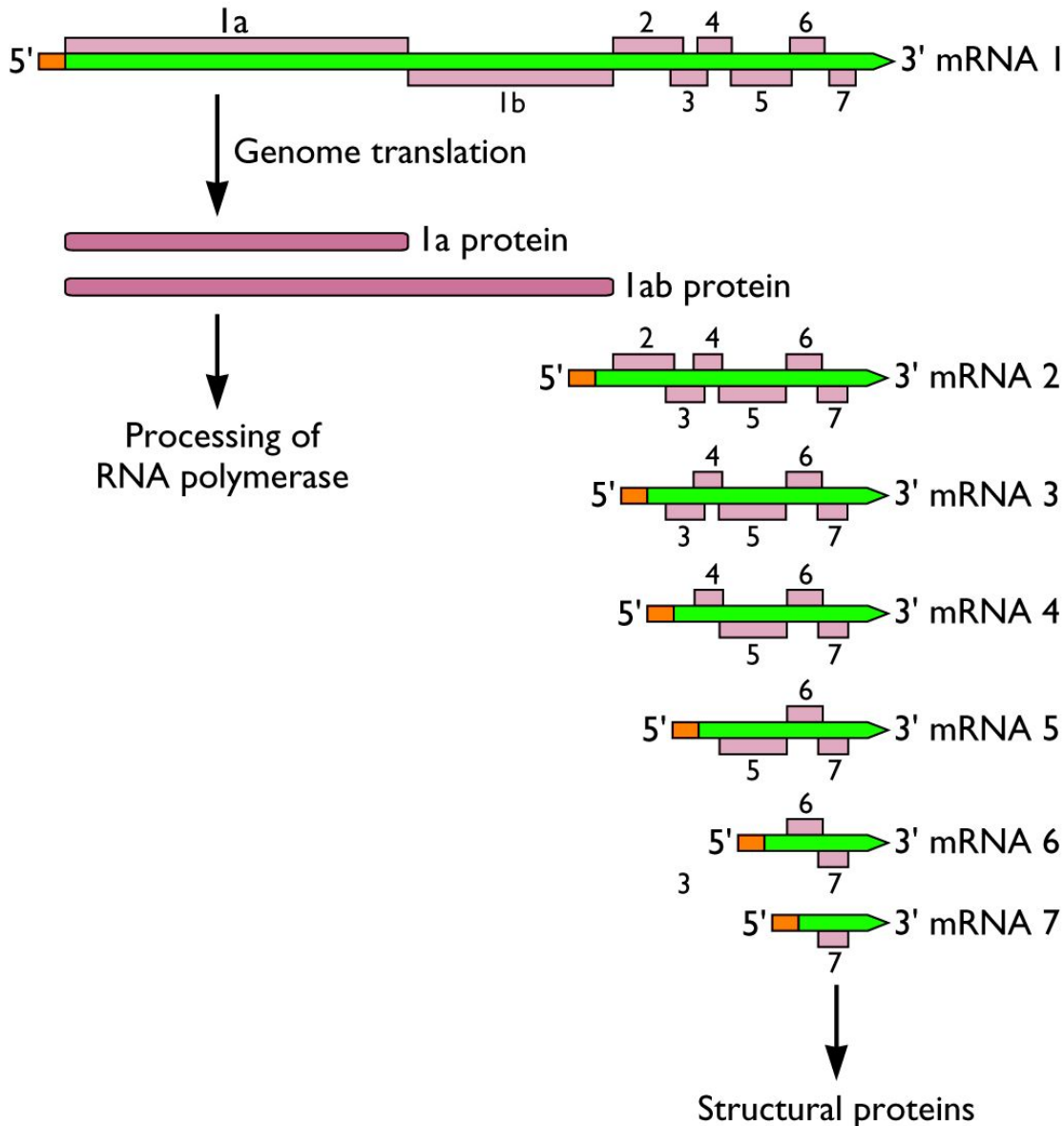
- Протеаза 3CDpro розрізає мембранний зв'язок 3AB для продукції VPg
- VPg, уридинильований 3Dpol, використовує се послідовність як матрицю і переміщається в 3' кінець генома
- 3D pol використовує uridylyated VPg як праймер для синтезу (-) РНК



Синтез +РНК

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



A

Субгеномні РНК
Coronaviridae
(6 класів)

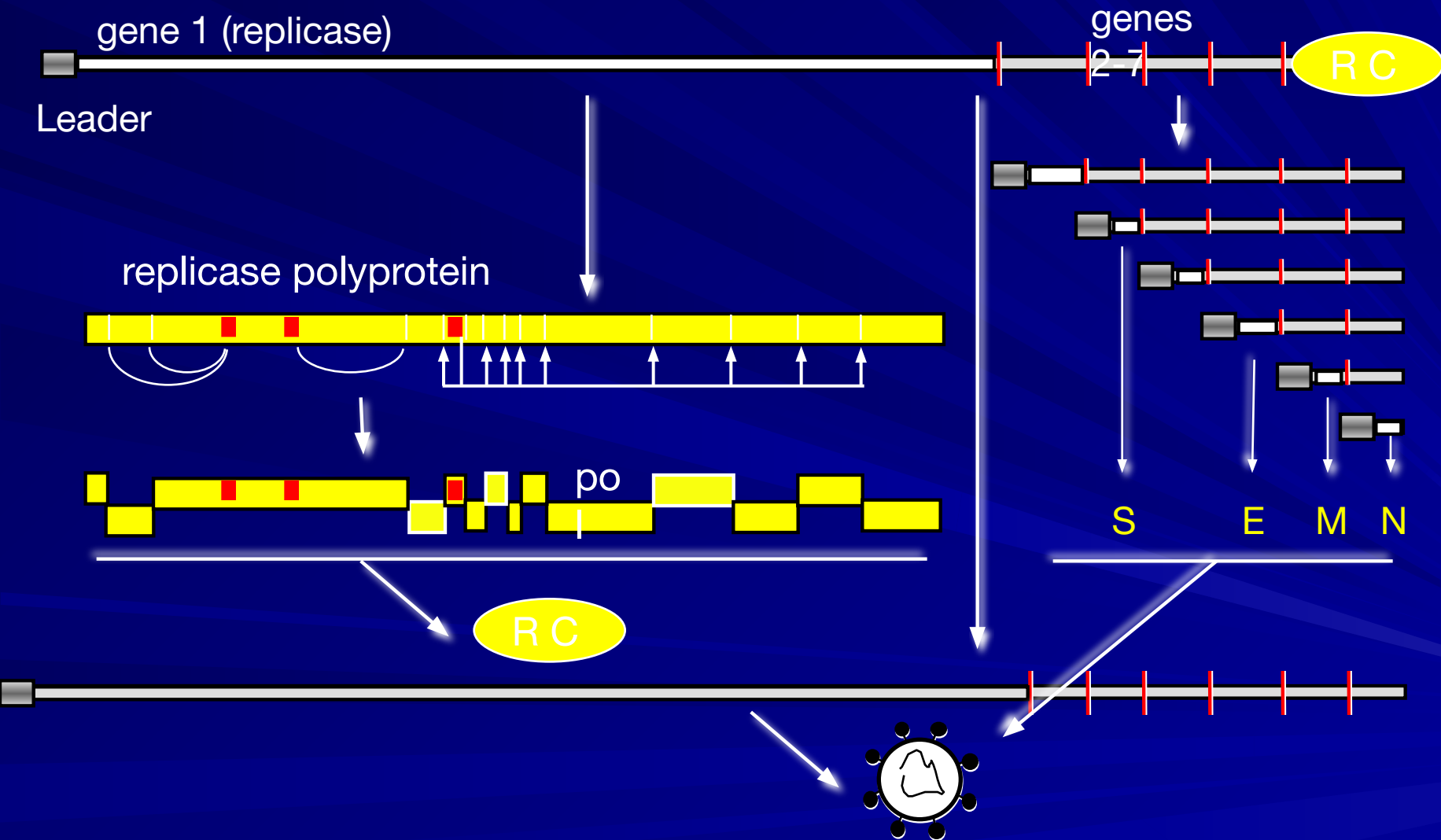
Ідентичні як на 3",
так і на 5'-кінцях

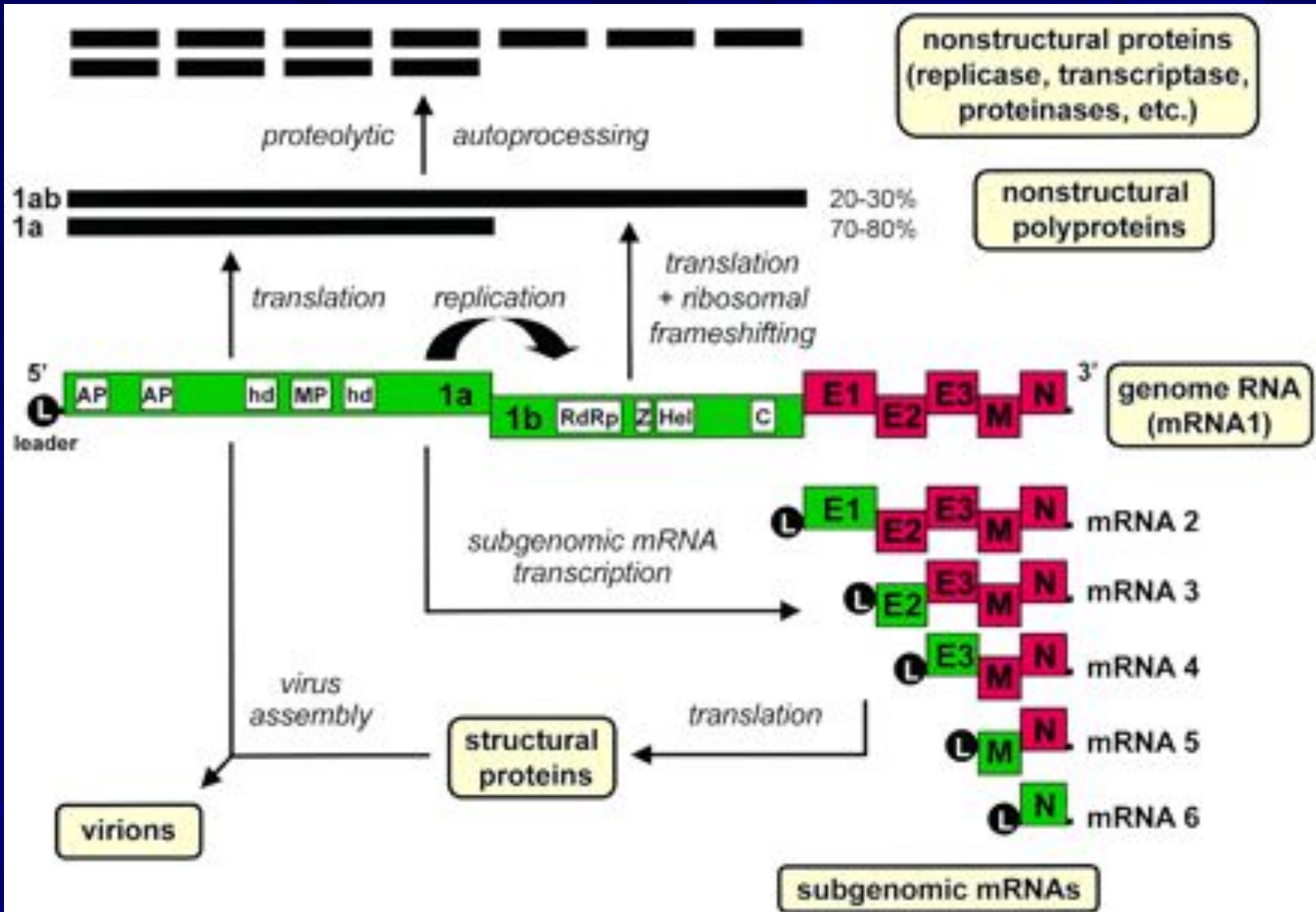
“лідер” – 70нп

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

Геном і реплікація **Coronavirus**

Genome + RNA 32 kb

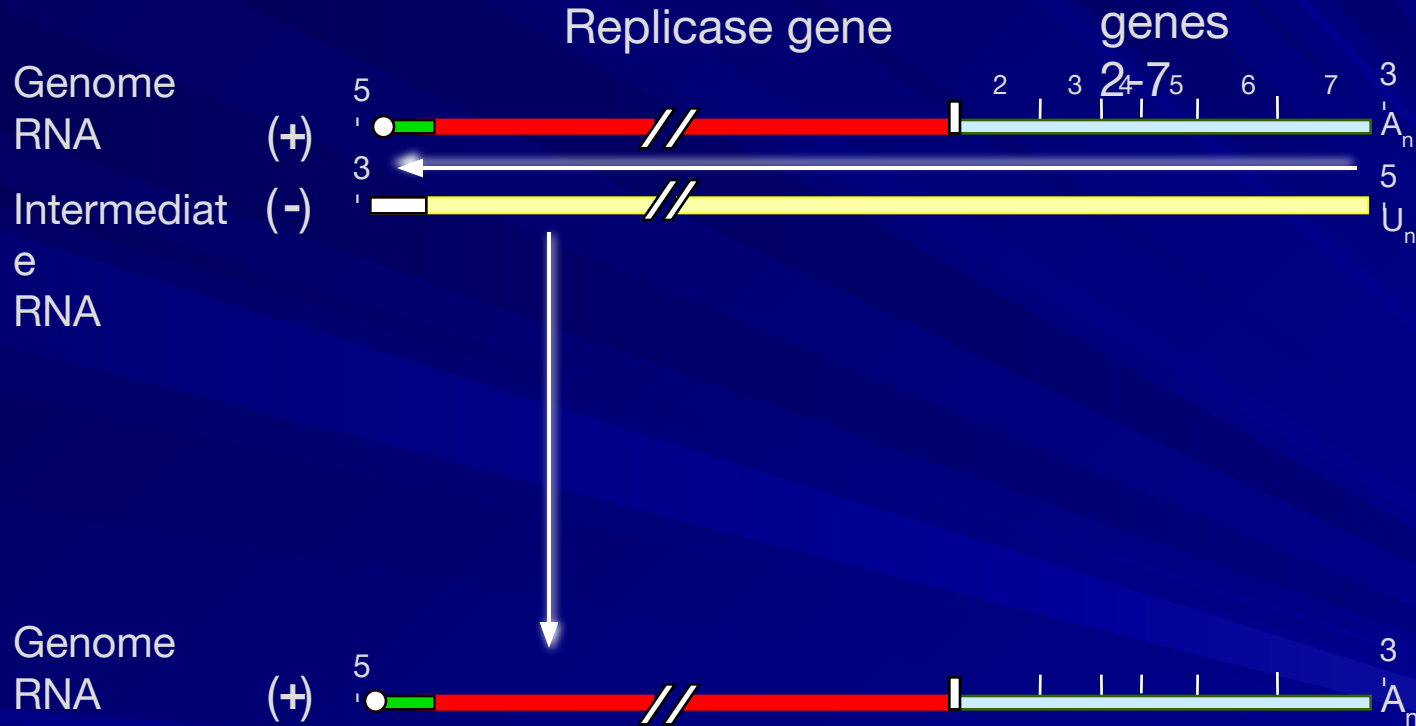




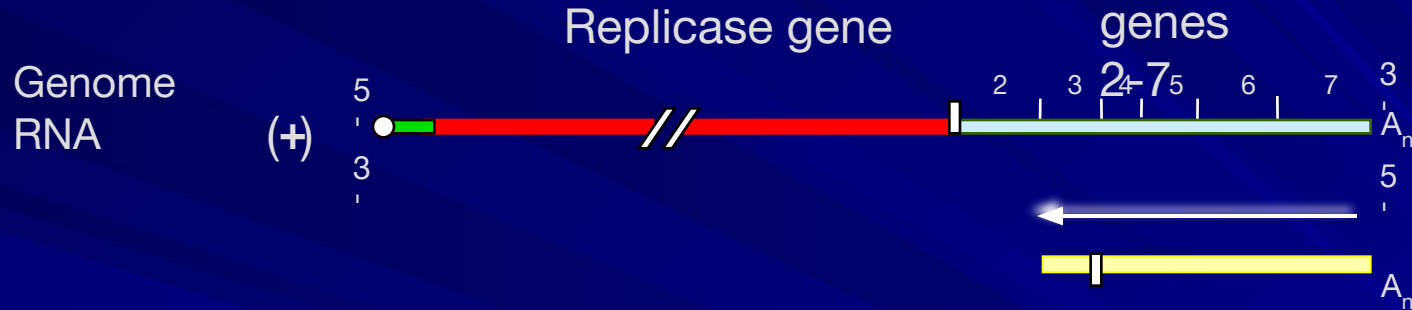
Транскрипція і реплікація Coronavirus



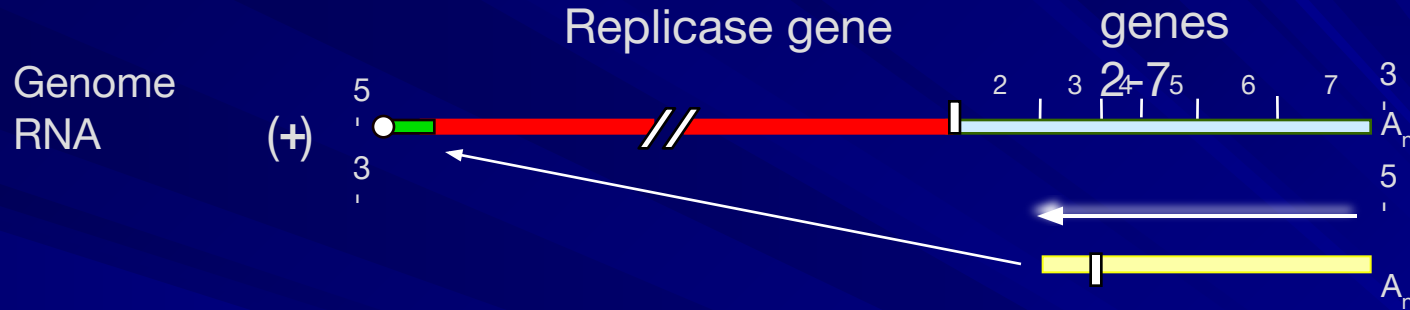
Транскрипція і реплікація Coronavirus



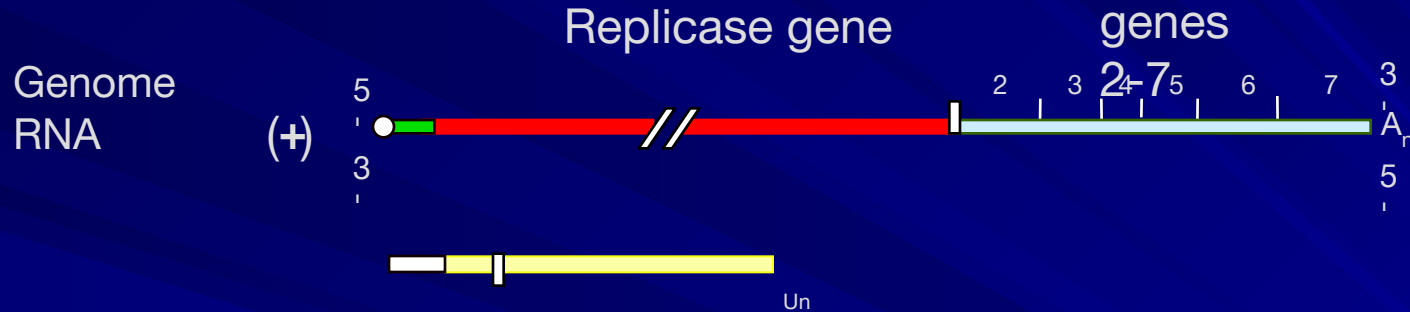
Транскрипція і реплікація Coronavirus



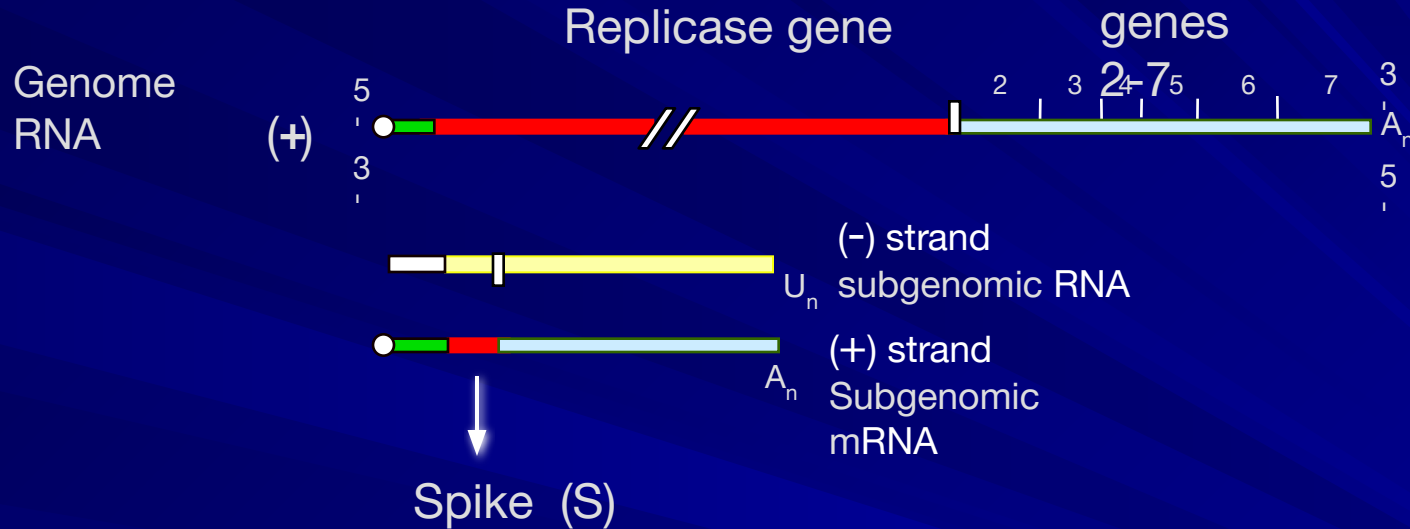
Транскрипція і реплікація Coronavirus



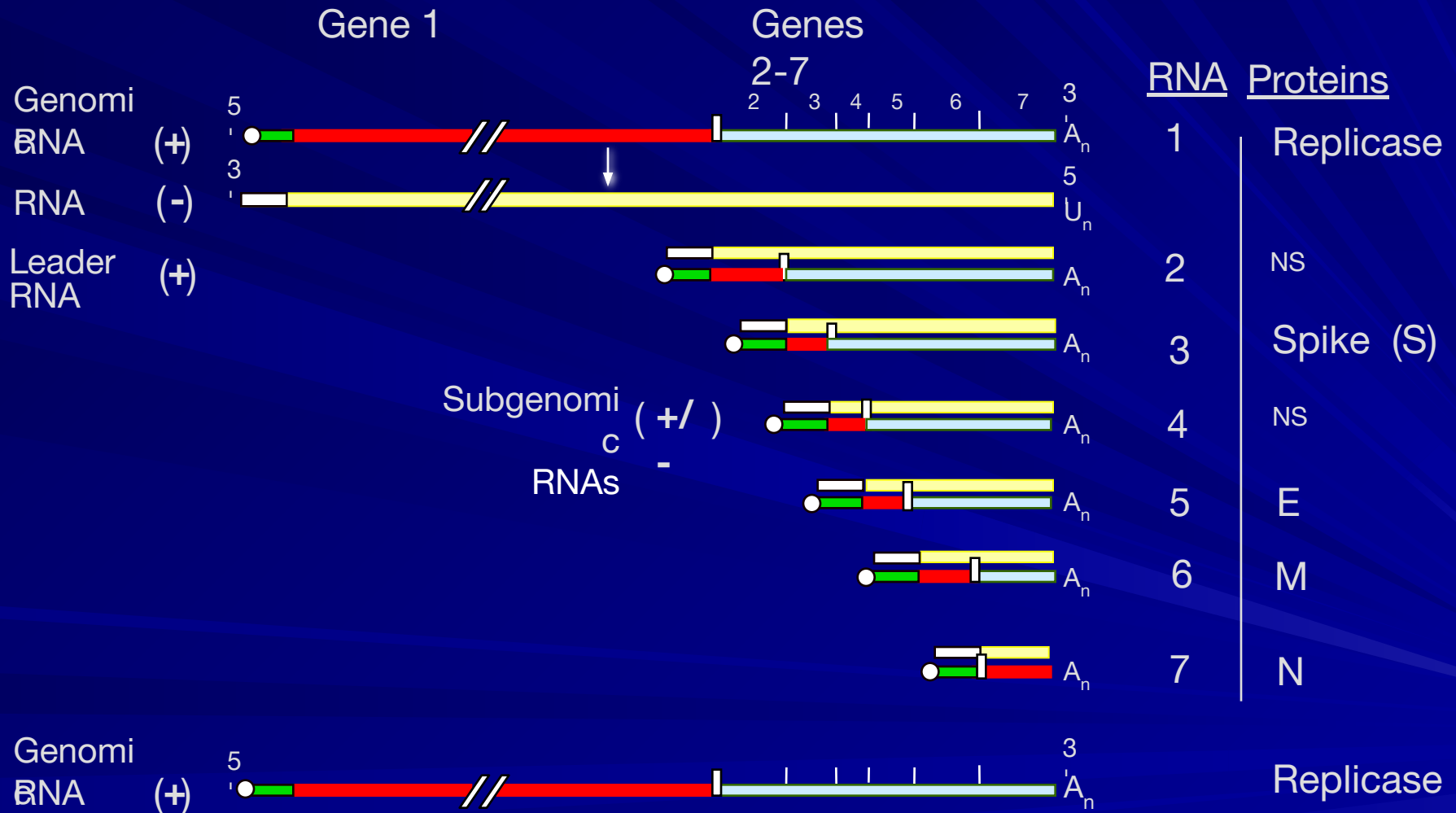
Транскрипція і реплікація Coronavirus



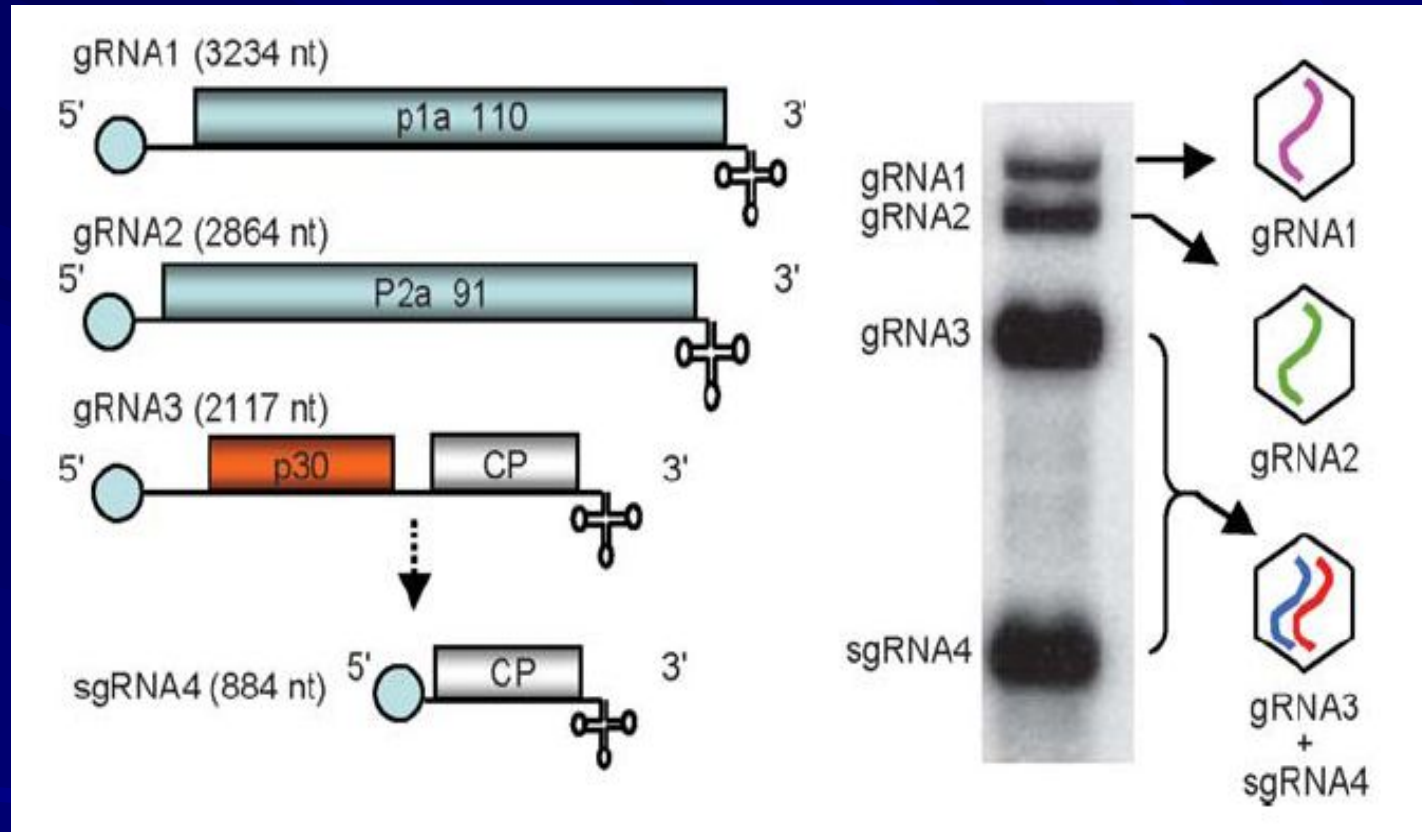
Транскрипція і реплікація Coronavirus



Транскрипція і реплікація Coronavirus



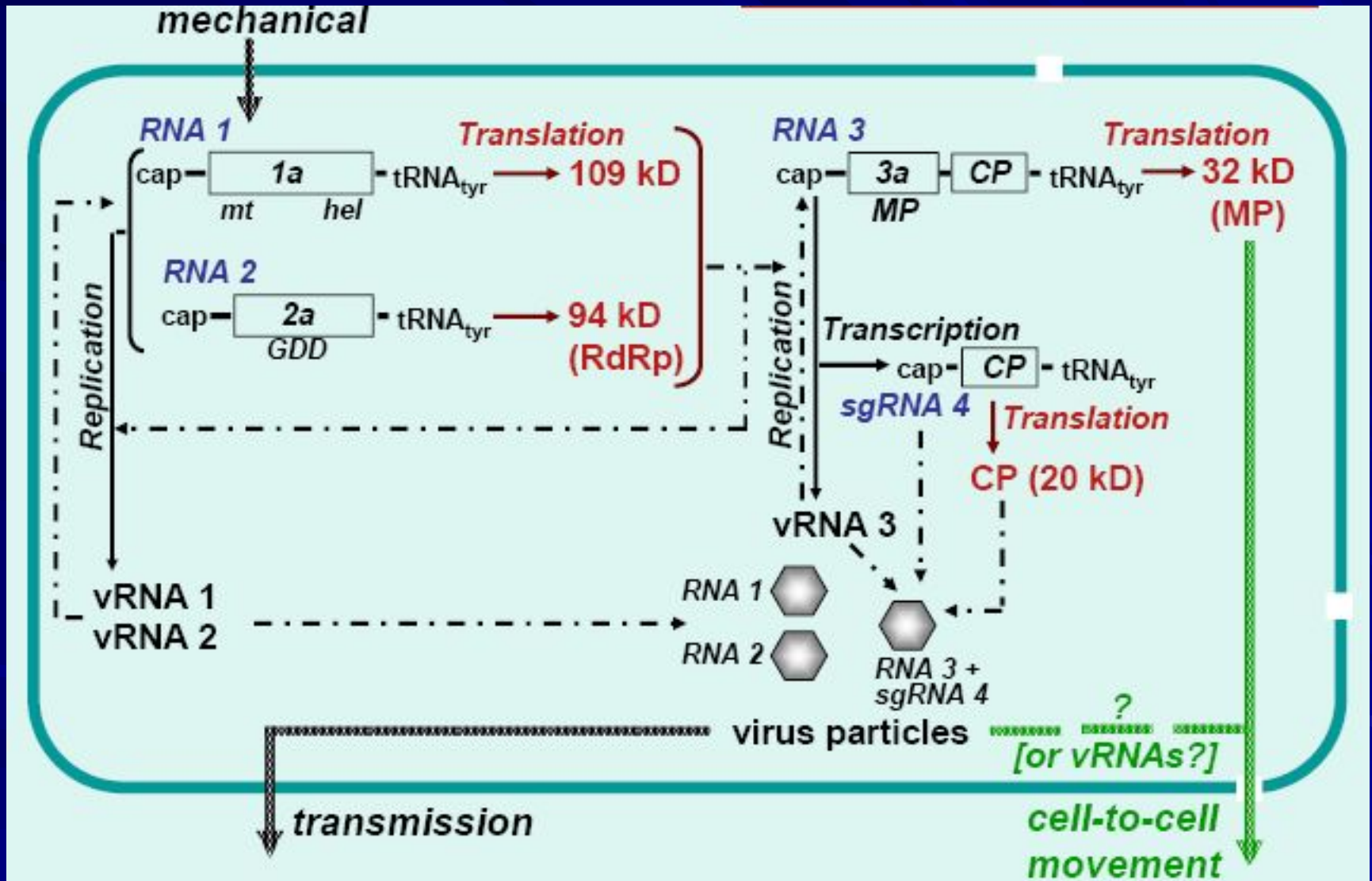
Вірус мозаїки бромусу (Brome mosaic virus, BMV)

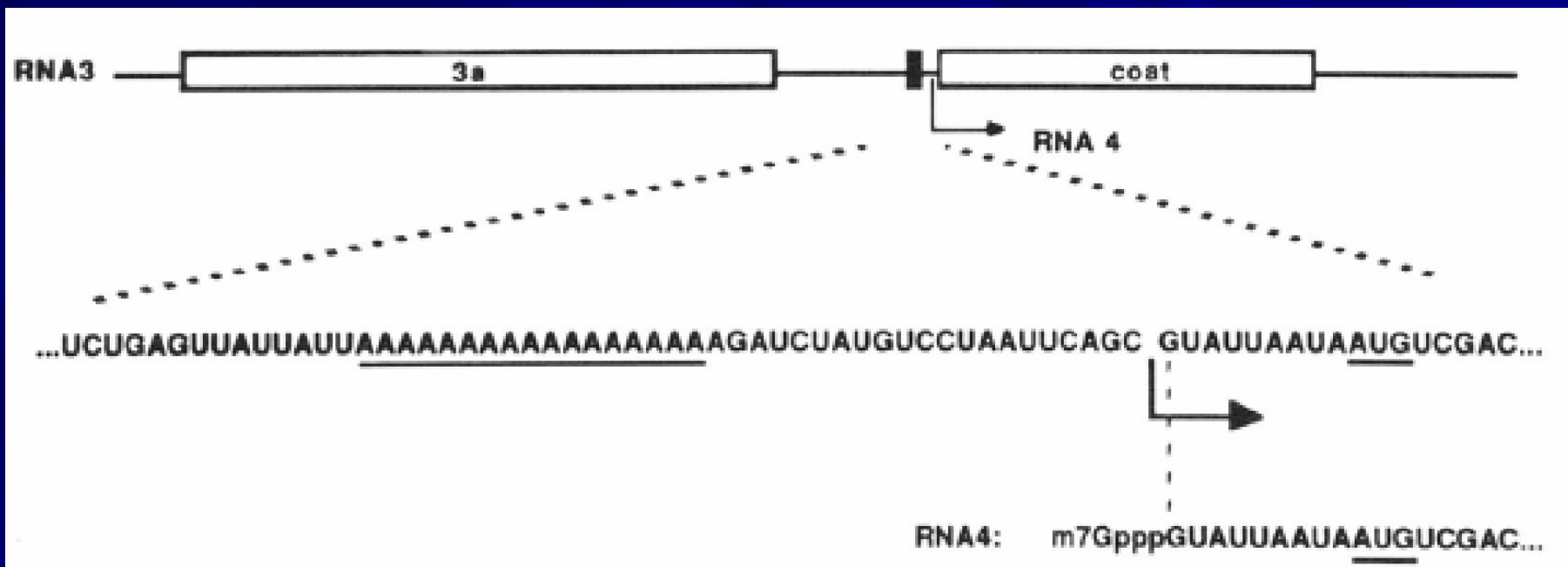


Протеїни реплікази BMV забезпечують специфічність упаковки

- 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)

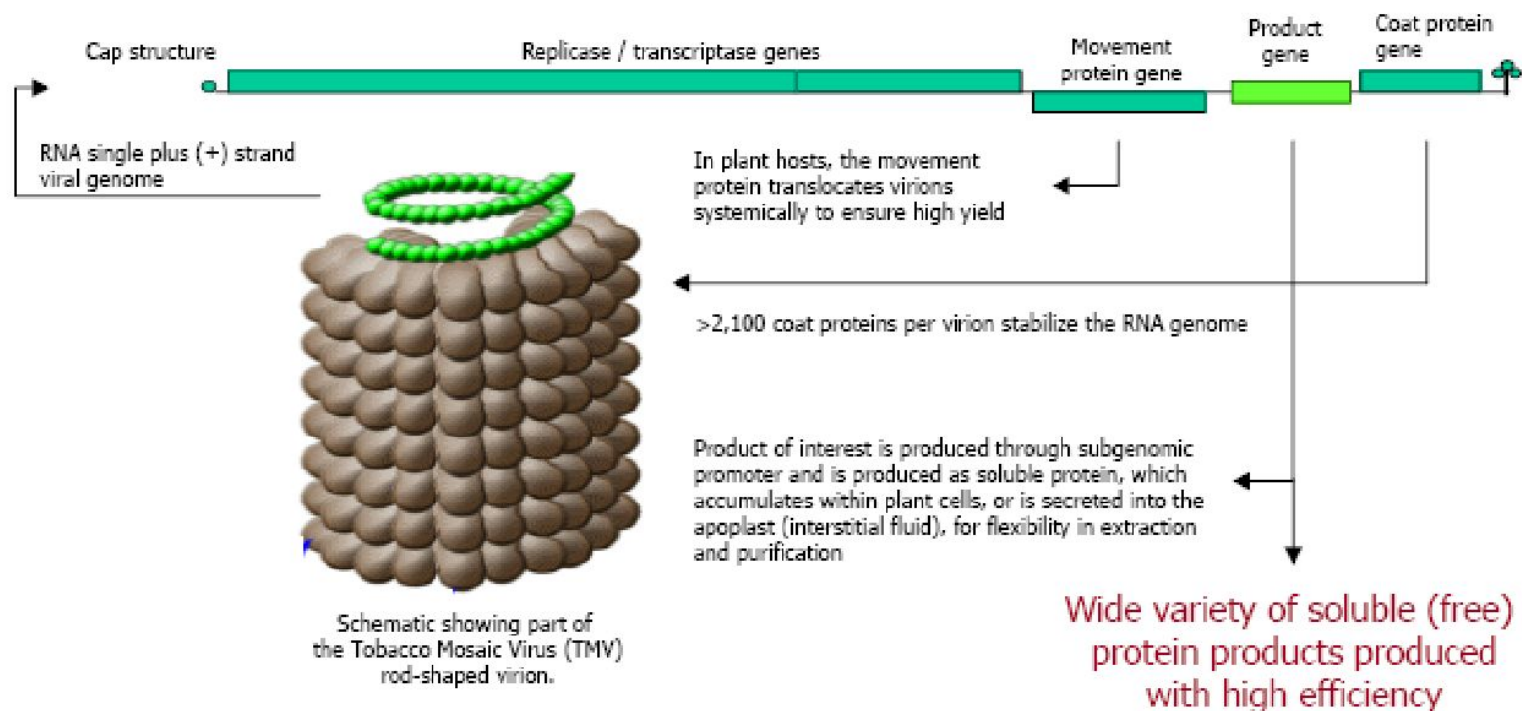
Експресія геному БМВ





ВТМ як вектор

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



ВТМ як вектор

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

