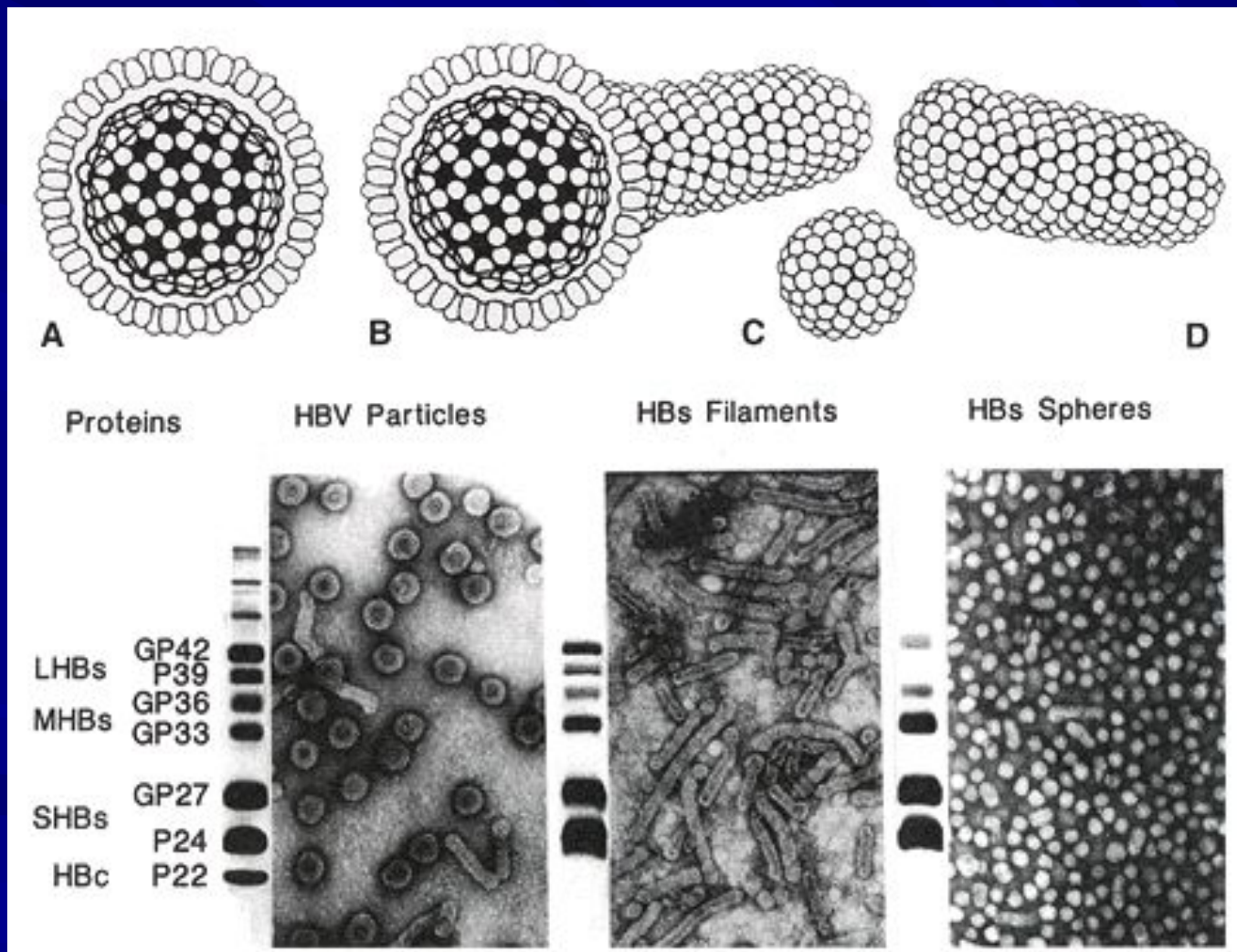


Параретровіруси

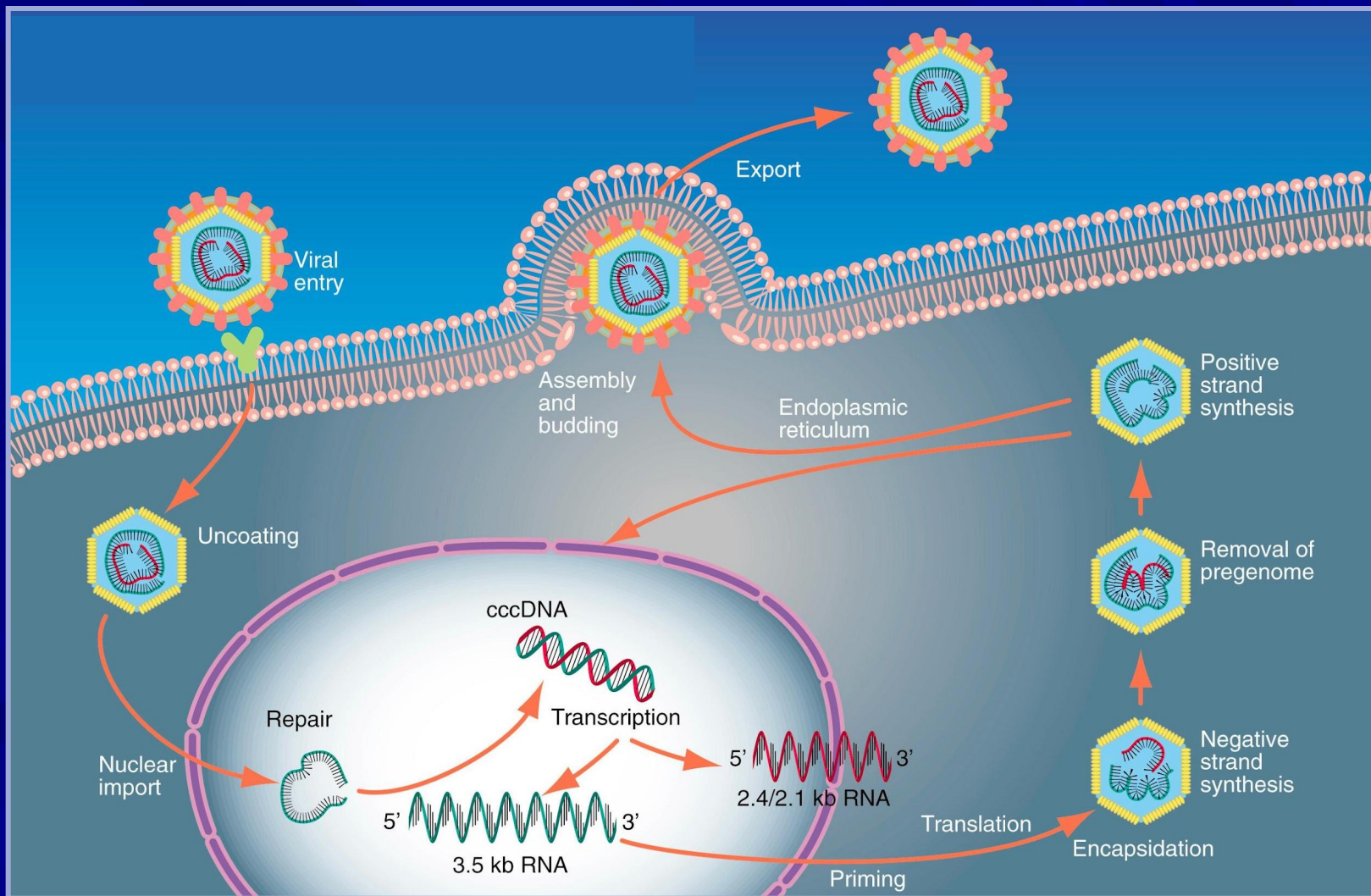
Pararetroviruses vs. Retroviruses

Characteristics	Pararetroviruses	Retroviruses
Enveloped particles	No/Yes	Yes
Genome nucleic acids	DNA	RNA
Encapsidation of reverse transcriptase	No	Yes
Replication intermediates	RNA	DNA
Integration into host chromosomes	No (usually)	Yes
Pregenomic RNA as polycistronic RNA	Transcription, splicing	Transcription, splicing
<i>Gag-pol</i> fusion protein	Yes	Yes
Full length transcripts with terminal repeats	Yes	Yes

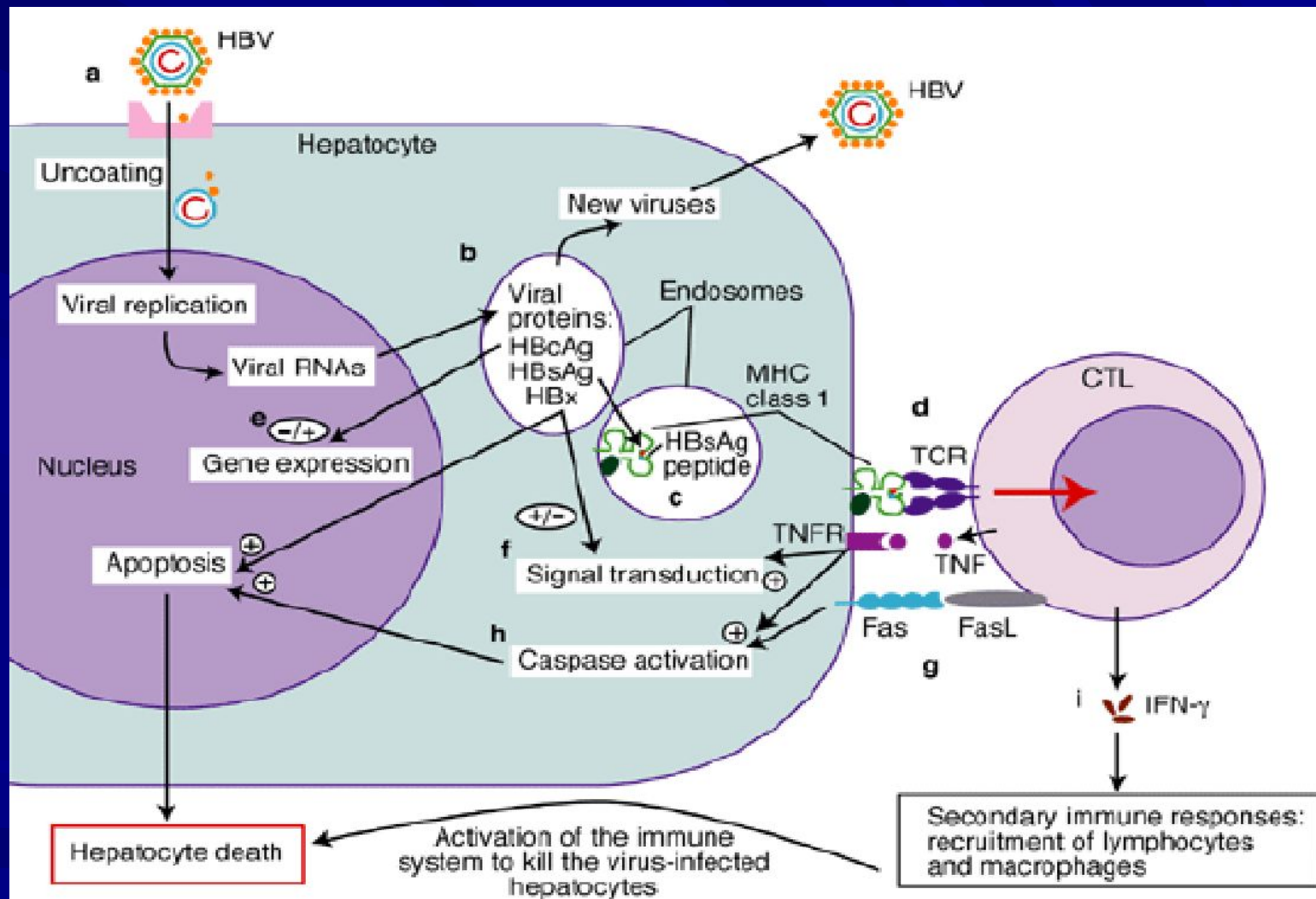
Вірус гепатиту В



Життєвий цикл ВГВ

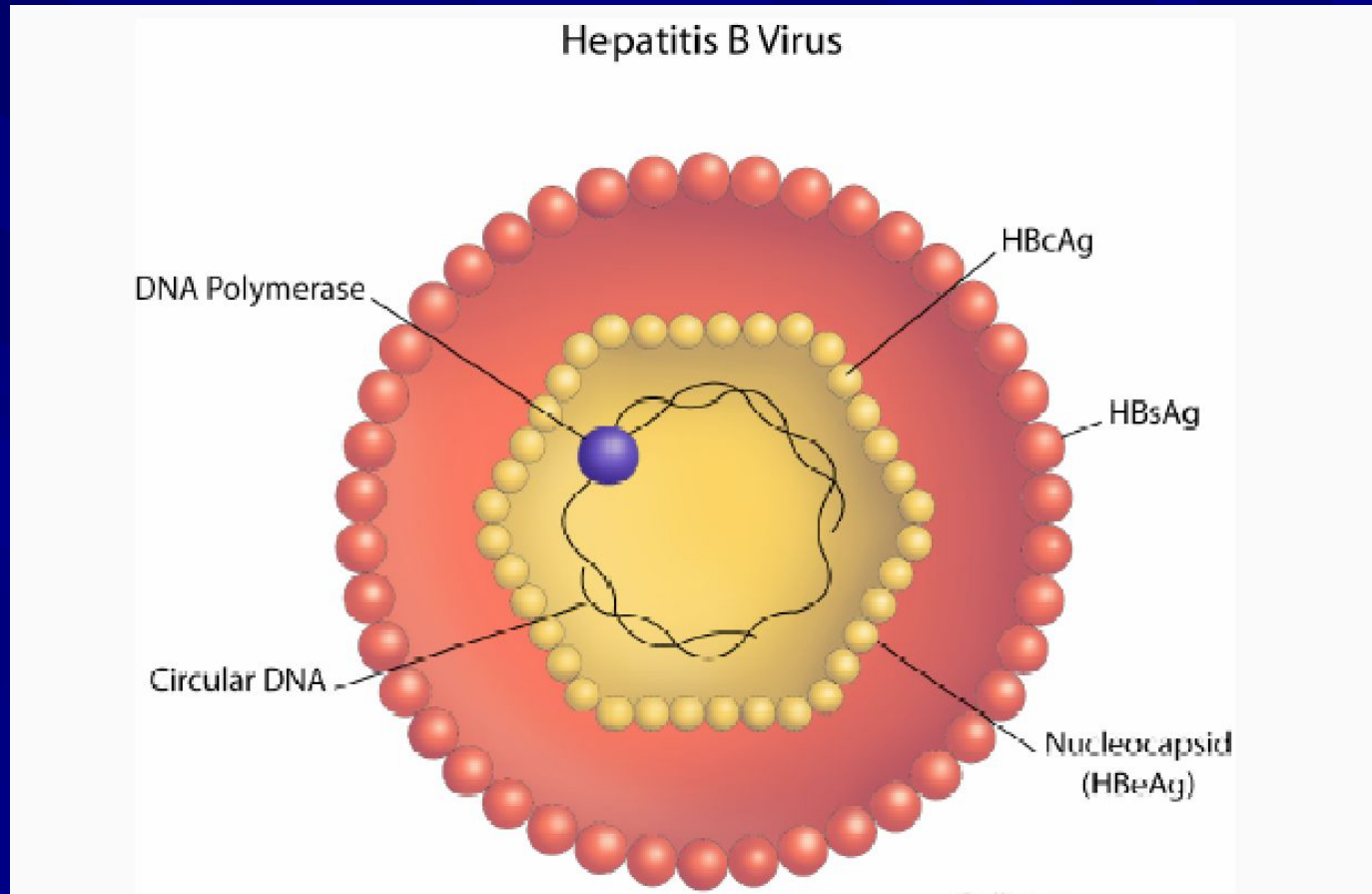


Життєвий цикл ВГВ



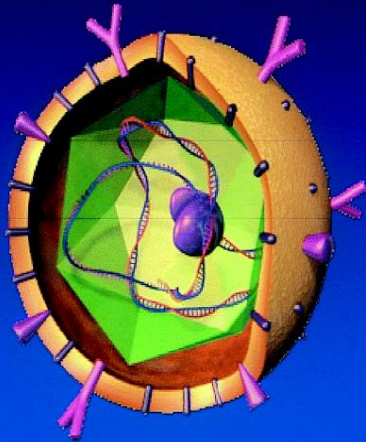
Virus-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses, and roles of proteins of hepatitis B virus

Вірус гепатиту В



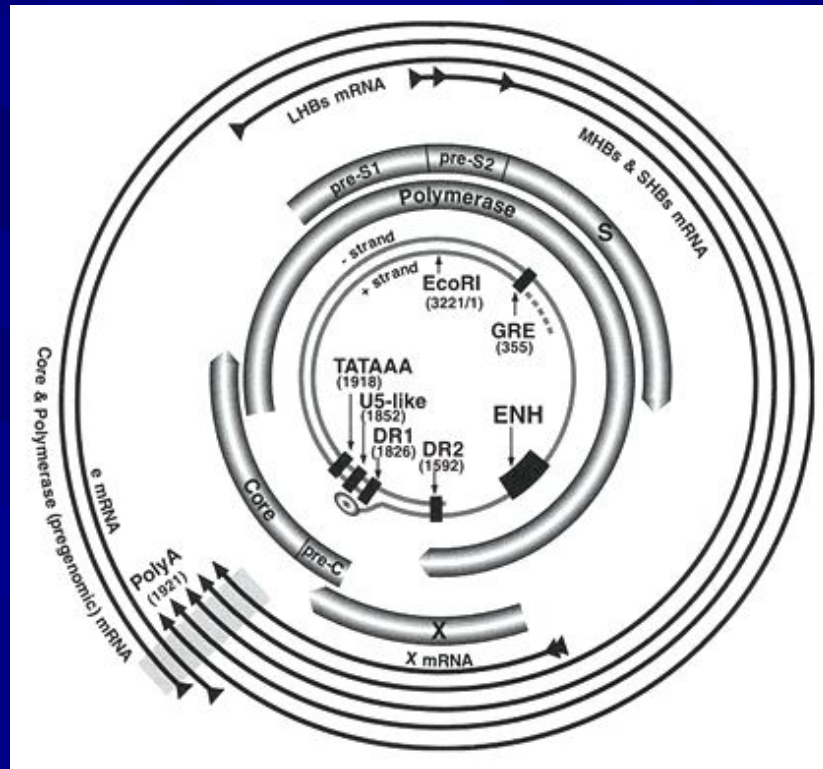
ВІРУС ГЕПАТИТУ В, ВГВ (Hepatitis B virus) - збудник гепатиту В, основний представник родини гепаднавірусів. ВГВ (частинка Дейна) - сферична частинка діаметром 42 нм, складається з ядра - нуклеоїда, що має форму ікосаедра діаметром 28 нм, усередині якого знаходиться дволанцюгова ДНК, кінцевий білок і фермент ДНК-полімераза. До складу нуклеоїдного білка - HBcAg входить HBeAg. Зовнішня оболонка (товщиною 7 нм) утворена поверхневим антигеном вірусу гепатиту В - HBsAg .

Вірус гепатиту В



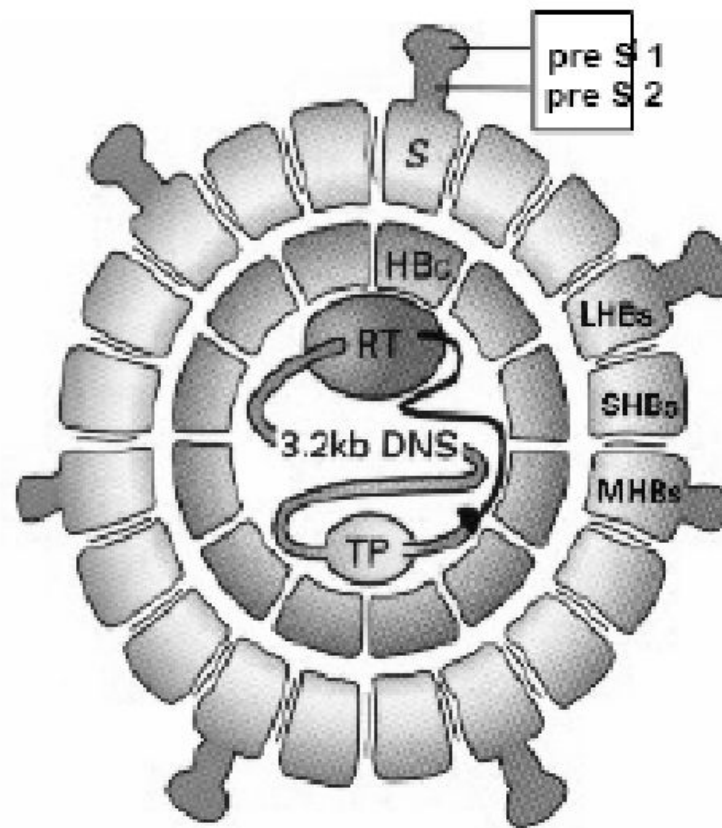
- 7 генотипів (А – G)
- 9 серотипів (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+*, *adrq-*)

Геном вірусу гепатиту В

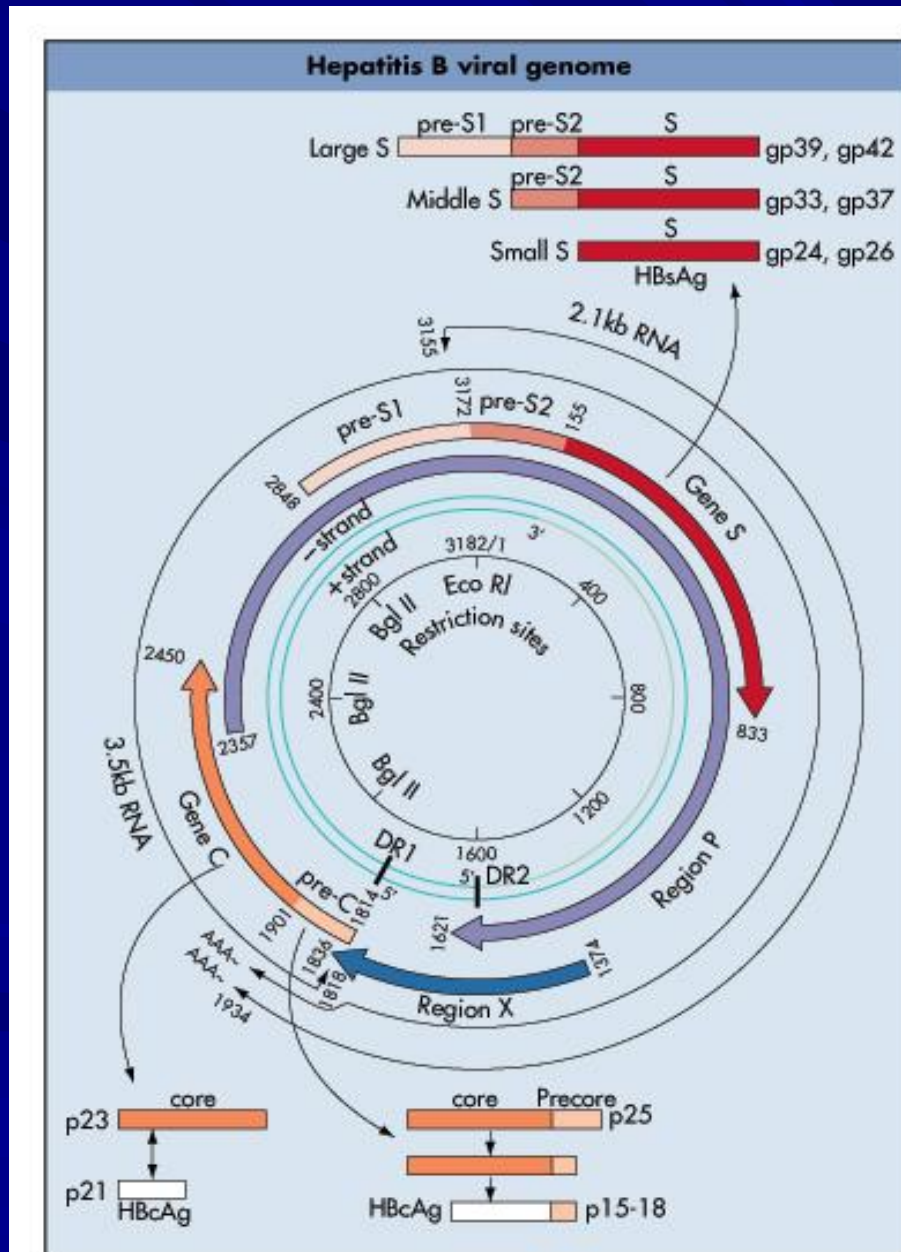


- Геном ВГВ представлений дволанцюговою кільцевою молекулою ДНК — однією з найменших зі всієї нині ідентифікованої ДНК у ДНК-вмісних вірусів. ДНК ВГВ складається приблизно з 3200 нуклеотидів, з коливаннями від 3182 до 3221 в різних ізолятах вірусу. Зовнішній мінус-ланцюг довший внутрішнього плюс-ланцюга на 15-45%. Мінус ланцюг в дволанцюговій частині має розрив в 5-кінці, до якого ковалентно приєднаний термінальний білок. У ДНК ВГВ ідентифіковано 4 гени (S, C, P, X). Крім того, в геномі вірусу визначені регуляторні послідовності ДНК, відповідальні за синтез білків і реплікацію вірусу. Відкриті рамки зчитування певних генів частково перекривають одна одну, що забезпечує високу інформаційну ємність генома ВГВ.

Hepatitis-B-Virus



Геном вірусу гепатиту В



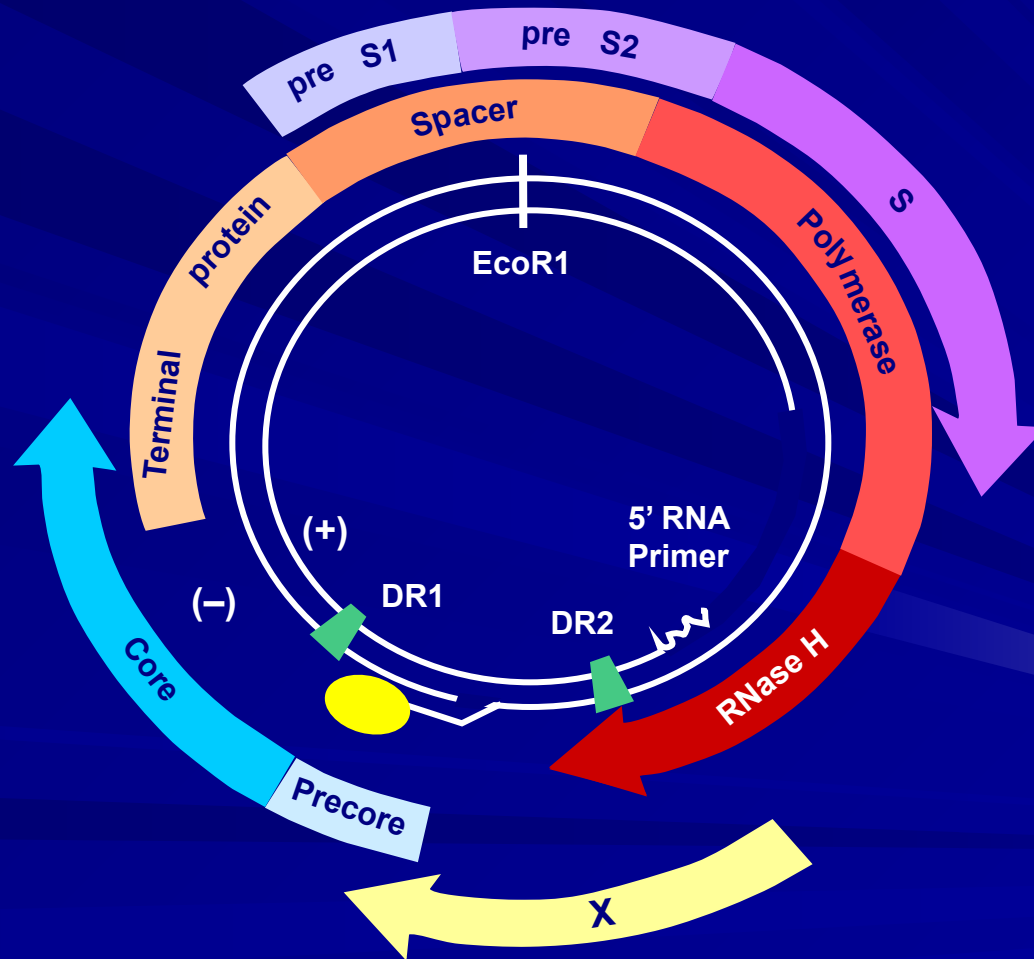
Геном вірусу гепатиту В

- Ген Р охоплює обширну зону протяжністю приблизно в 840—850 нуклеотидів, кодуючи білок з молекулярною масою 25000, що володіє ферментативною активністю (РНК-залежна ДНК-полімераза).
- Ген S містить інформацію про головний білок оболонки вірусу — HBsAg. Цьому гену передують дві зони: pre-S1 і pre-S2. Ген S і вказані дві зони кодують три білки: основний білок (ген S), що складається з 226 амінокислот, виявляється в глікозильованій (gp 27) і неглікозильованій формі (p 24); середній (ген S і pre-S2), такий, що існує в одно- і двічі глікозильованих формах (gp 33); великий (ген S, pre-S2, pre-S1) білок, що знаходиться в неглікозильованій (p 39) і одного разу глікозильованій (gp 42) формі. Область pre-S1 кодує білок, що прикріплюється до рецептора IGA на поверхні гепатоцита, тим самим сприяючи проникненню вірусу в клітину. Область гена pre-S2 несе інформацію про ділянку зв'язування з полімеризованим альбуміновим рецептором, локалізованим також на гепатоциті.

Геном вірусу гепатиту В

- Ген С, кодує білок нуклеокапсида – НВсАg, що складається з 183-185 амінокислот. Перед геном С розташована зона рге-соге; синтезований на її основі білок є регуляторним або сигнальним в синтезі ядерного антигена.
- Ген Х кодує білок, що складається з 154 амінокислот з молекулярною масою близько 16000, який активує експресію всіх генів вірусу гепатиту В.

Геном вірусу гепатиту В




Polymerase

Транскрипційно/Трансляційна організація

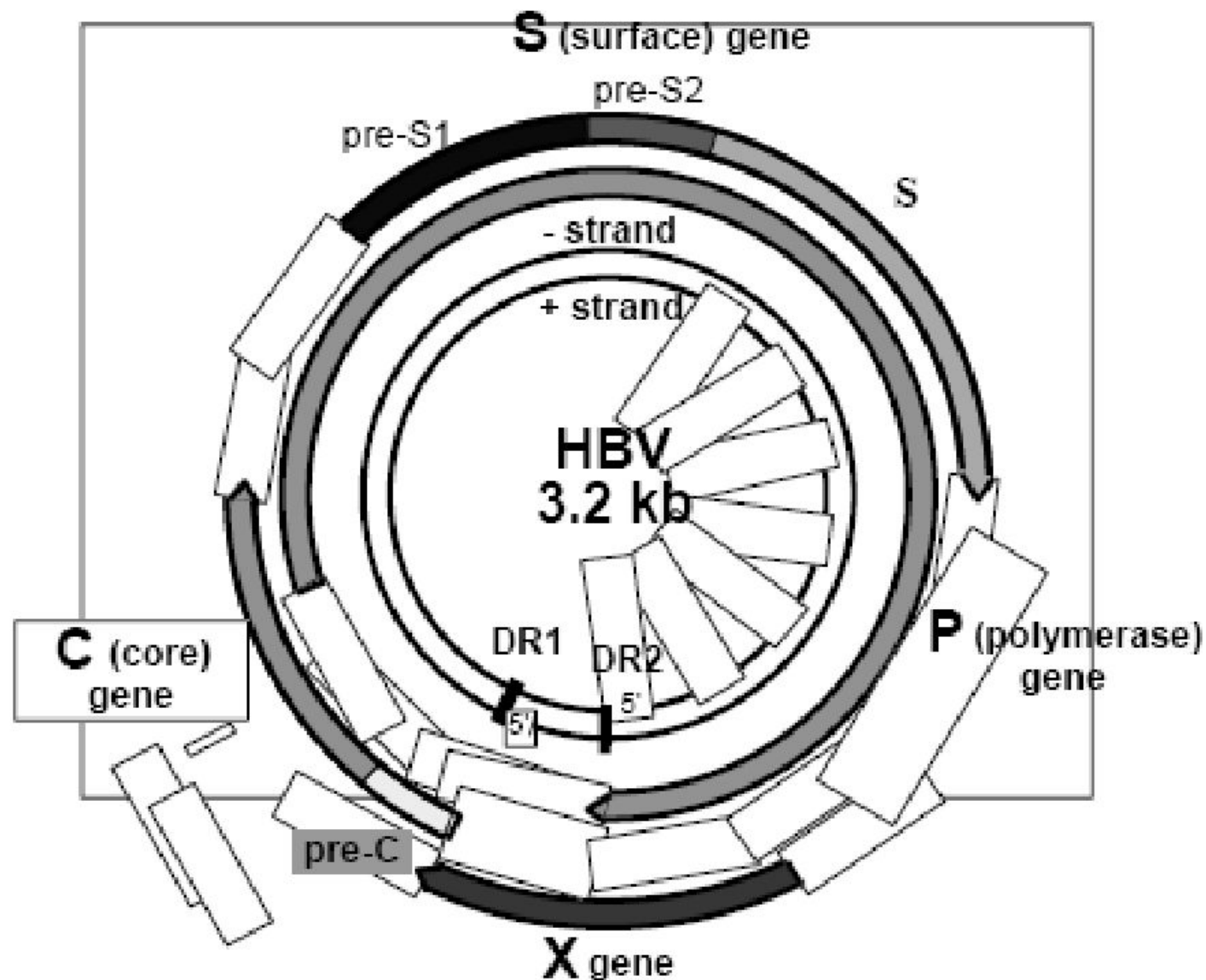
- 4 major RNA species ----- ~ 7 Proteins
- 3.5 kb
 - Pre-C/C
 - Pol
 - Pregenomic

Genome template
- 2.4 kb
 - Pre-S1
- 2.1 kb
 - Pre-S2/S
- 0.7 kb
- X

Viral Gene Products

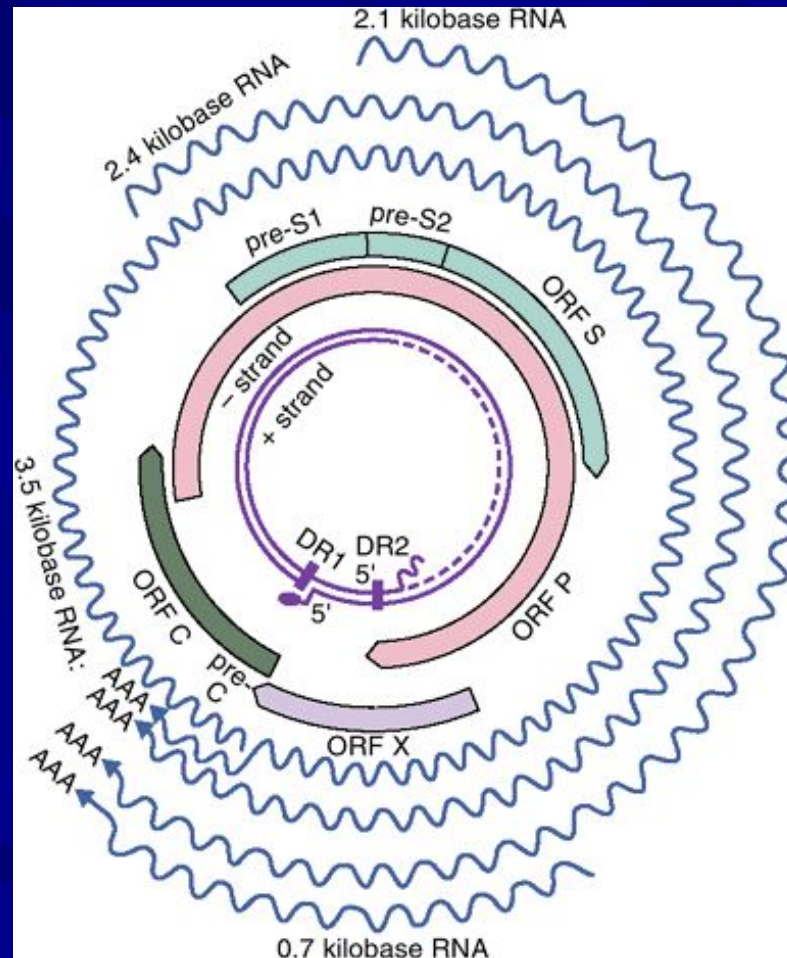
- S gene: Surface, Envelope, HBsAg
 - Envelope
 - Small, medium and large
 - Glycosylation
- C gene: Core (HBcAg), HBeAg
 - Core forms the nucleocapsid with viral RNA/DNA
 - e is processed to p16, p18, p20, secreted, decoy? toleragen?
- Pol gene: Polymerase
 - 4 Domains
 - RNA- & DNA-dependent DNA polymerase function
 - RNase
- X gene: X
 - 154 AA accessory protein
 - Multifunctional regulator of replication (transactivation)
 - Inactivates p53
 - Immunomodulatory effects

Hepatitis B virus gene organization

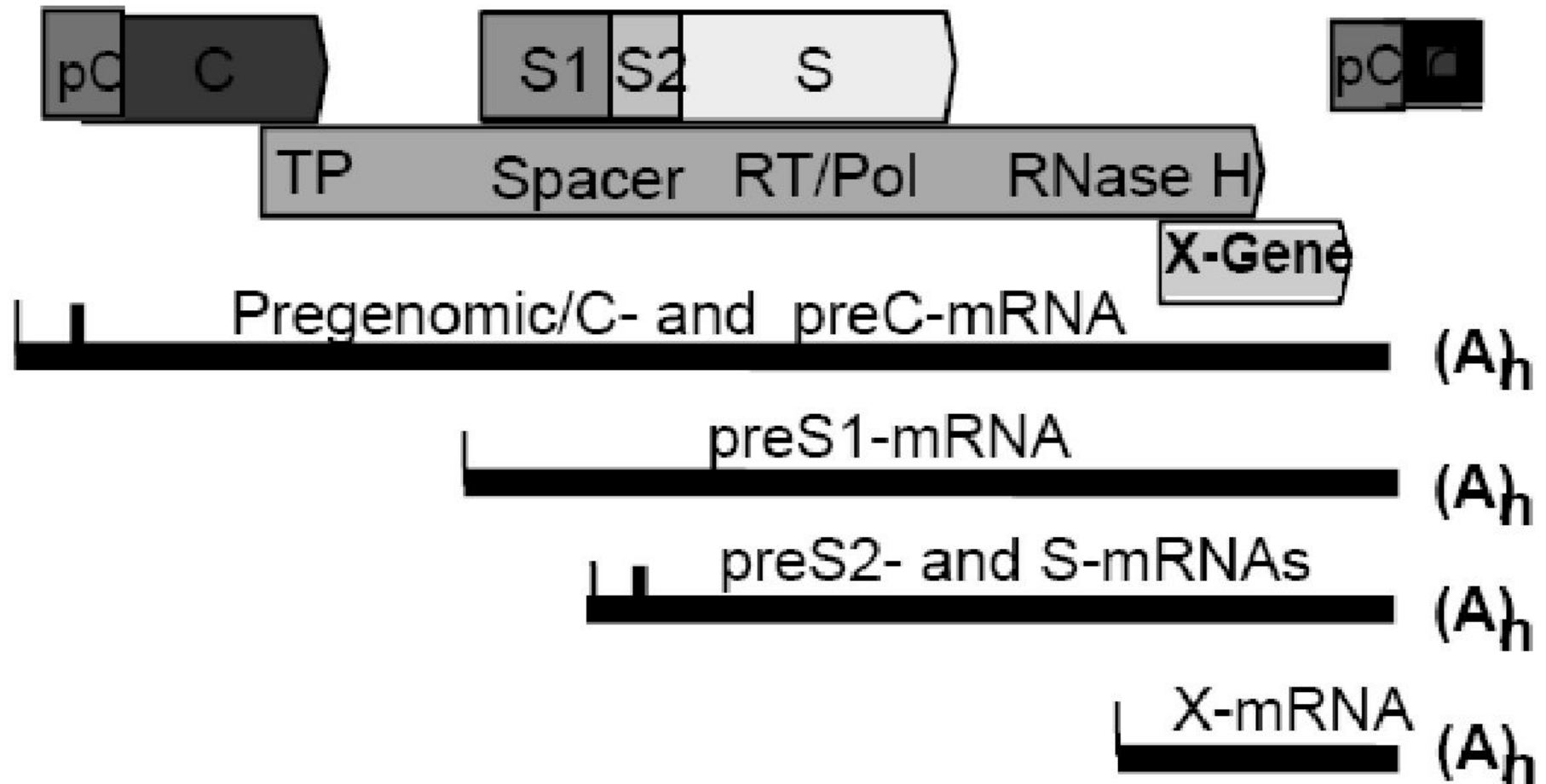


- Реплікація генома вірусу гепатиту В починається з проникнення віріона в гепатоцит з руйнуванням зовнішньої оболонки частинки Дейна. За допомогою ДНК-полімерази відбувається добудова одноланцюгових ділянок короткого ланцюга ДНК ВГВ з утворенням РНК-реплікативного посередника (прегенома) з одночасною транскрипцією і трансляцією, тобто з синтезом віруспецифічних білків. Пренуклеоїд, що утворився, включає прегеномну РНК- і ДНК-полімеразу.
- Наступним етапом реплікації є зворотна транскрипція, тобто синтез повного ланцюга ДНК на РНК матриці за допомогою віруспецифічної ДНК-полімерази, зворотної транскриптази (ревертази), що має функції РНКазы Н, з подальшим руйнуванням прегеномної РНК. Потім на мінус- ланцюгу ДНК ВГВ відбувається синтез неповного плюс-ланцюга ДНК ВГВ. Кільцева структура ДНК ВГВ, що утворилася, разом з ДНК-полімеразою включається в нуклеокапсид вірусу і мігрує в цитоплазму гепатоцита, де формується зовнішня оболонка вірусу, що складається з HBsAg і ліпідів клітини. Як тільки нова вірусна частинка виходить з гепатоцита, синтез плюс ланцюга ДНК ВГВ припиняється.
- Відмінності в часі виходу з гепатоцита вірусних частинок визначають варіабельність довжини плюс- ланцюга ДНК ВГВ. Окрім включення ДНК ВГВ до складу потомства вірусних частинок, вона може інтегруватися в геном гепатоцита.

Transcription of Hepatitis B virus



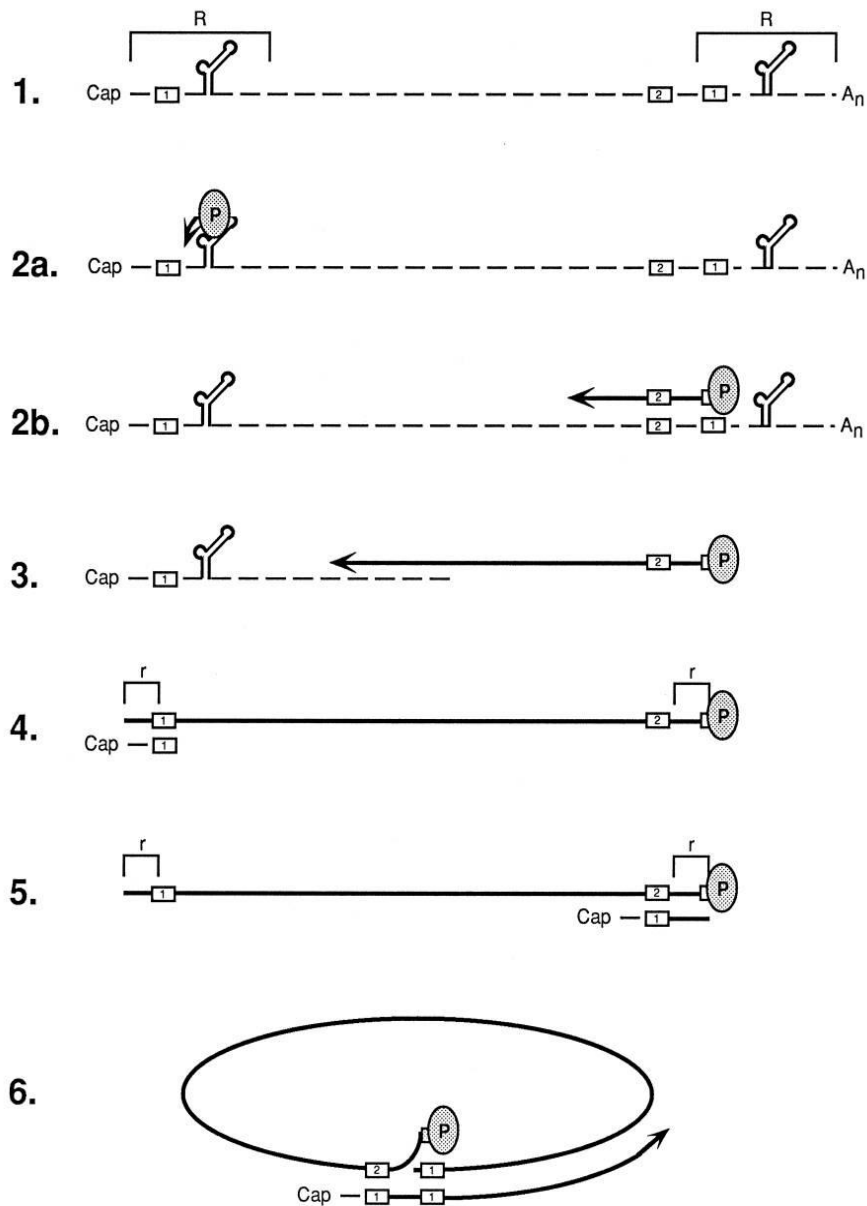
HBV Transcription



Регуляція синтезу білків ВГВ

- Синтез білків вірусу гепатиту В регулюється на рівні транскрипції і трансляції. Підсилювачі транскрипції активують експресію генів вірусу, діючи переважно в клітинах печінки. Впродовж тривалого часу вважалося, що гепатоцити є єдиними клітинами організму, де може відбуватися синтез вірусу гепатиту В. Ідентифікація послідовностей ДНК і білків вірусу в клітинах нирок, селезінки, підшлункової залози, шкіри, кісткового мозку і крові спростувала це положення. Разом з тим доведено, що максимальна експресія генів вірусу гепатиту В, і перш за все S-гена, відбувається тільки в печінці, можливо, під впливом стероїдних гормонів.

Механізм зворотної транскрипції ВГВ



Прегеномна РНК (штрихова лінія, крок 1) кепова і поліаденільована та має довгу термінальну надлишковість (R). Показано розташування прямих повторів 1 і 2 (DR1 і DR2) та петель.

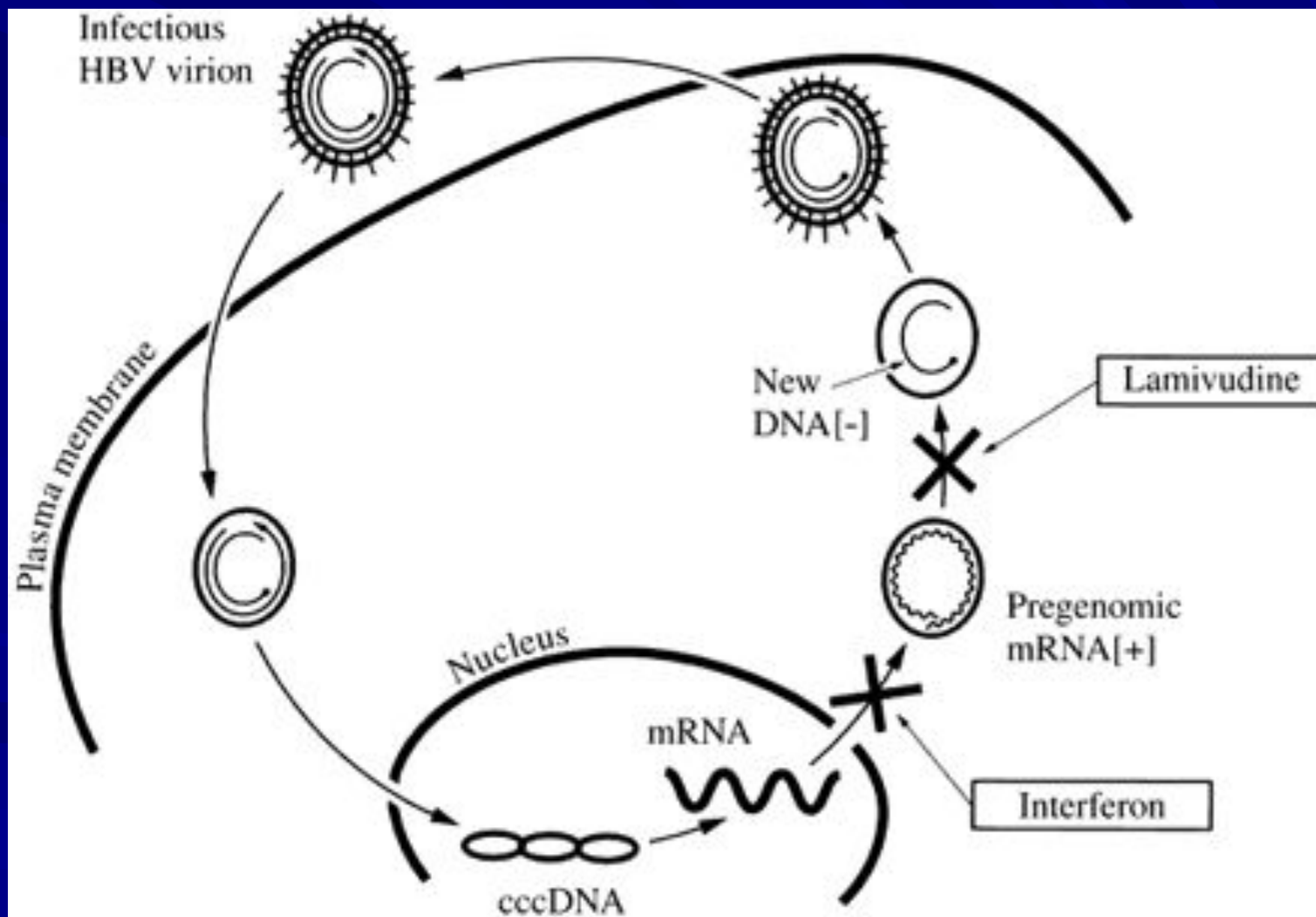
Прегеномна РНК, що упакована в корі, ініціює взаємодію протеїну Р з 5'-кінцем; білок Р ініціює зворотну транскрипцію з 5'-кінцевої петлі і синтезує -ланцюг ДНК (жирна лінія), довжиною від 3 до 4 нуклеотидів (крок 2a). Білок Р і ковалентно зв'язана новосинтезована -ДНК переносяться з DR1 на DR2 (крок 2b).

Під час елонгації -ланцюга ДНК прегеномна РНК деградує завдяки РНКазі-Н активності Р (крок 3). Коли Р досягає 5'-кінця, залишається олігомер прегеномної РНК, що складається з г плюс послідовності DR1 (крок 4).

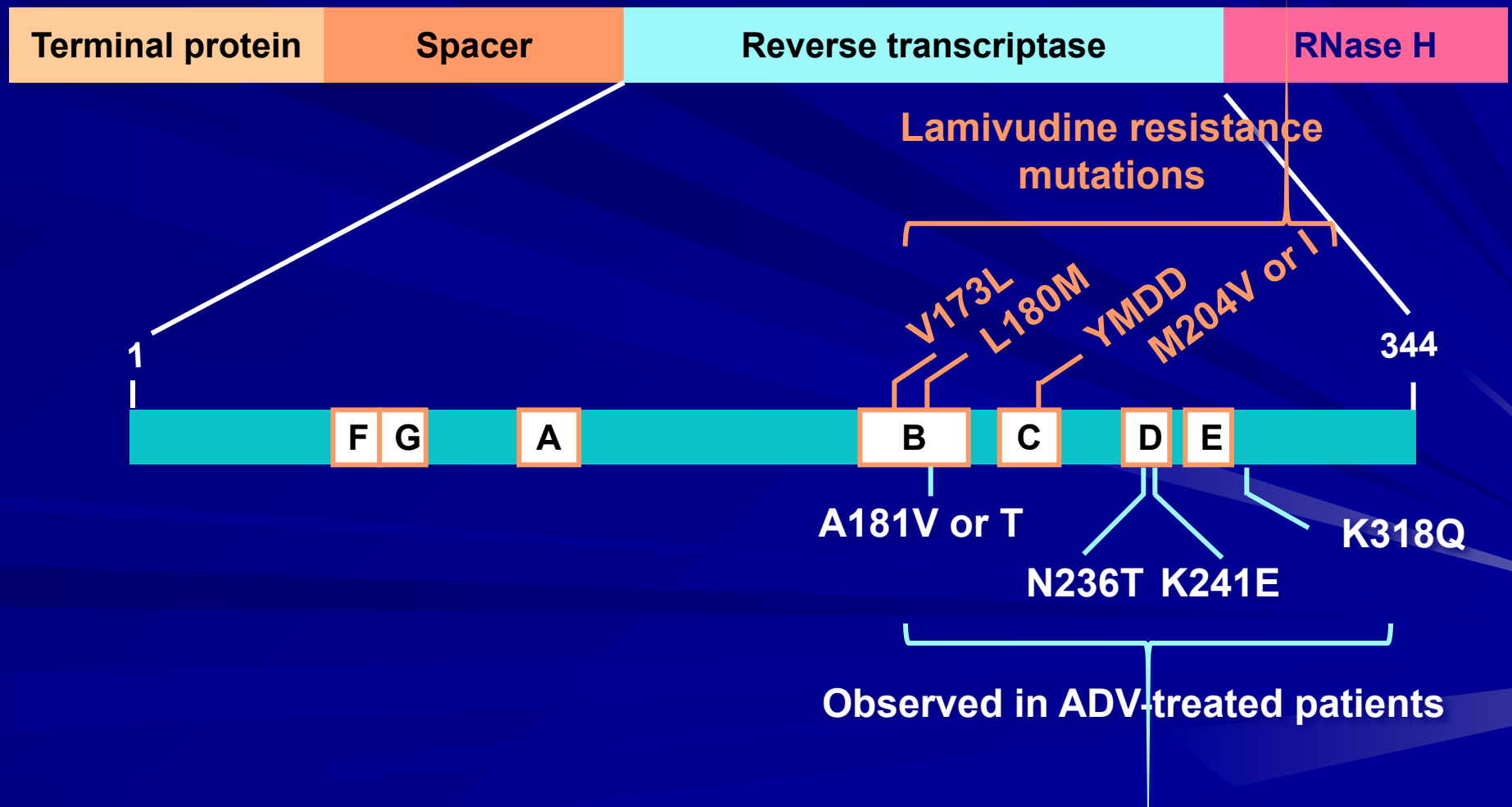
Цей олігомер РНК транслокується до DR2, де ініціює синтез +ланцюга ДНК (нижча жирна лінія, крок 5).

+ланцюг ДНК елонгується з 5'-кінця -ланцюга ДНК, включаючи послідовності, що позначені як г. Оскільки комплементарні г послідовності знайдено в 3'-кінці -ланцюга ДНК, утворюється циркулятивний геном. Позитивний ланцюг потім продовжується що приводить до утворення зрілої вірусної ДНК зі змінною довжиною +ланцюга ДНК (крок 6)

Реплікація HBV та мішені дії різних терапевтичних препаратів

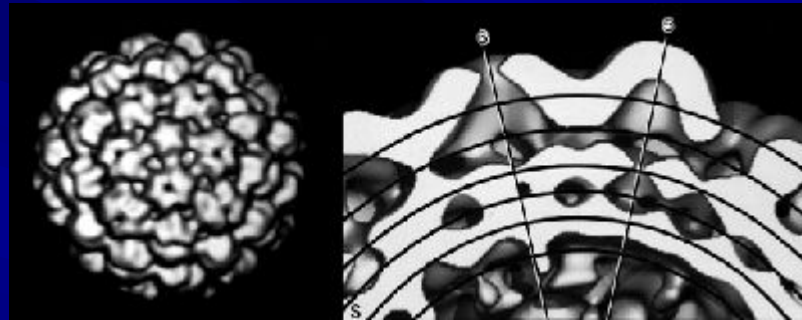


Мутації в геномі HBV приводять до появи резистентних штамів



Caulimoviridae

Caulimoviridae



Зліва. Реконструкція поверхнева структура вірусу (CaMV) мозаїки цвітної капусти, що показує $T = 7$ симетрію.

Справа. Зрізана зовнішня реконструкція, що показує багат шарову структуру.



- Електронні мікроснімки тонких зрізів сапімовірус-інфікованої тканини, що показує частинки вірусу 42-46 nm і включення.



(Photos courtesy of Dr. T.A. Chen)

Caulimoviridae

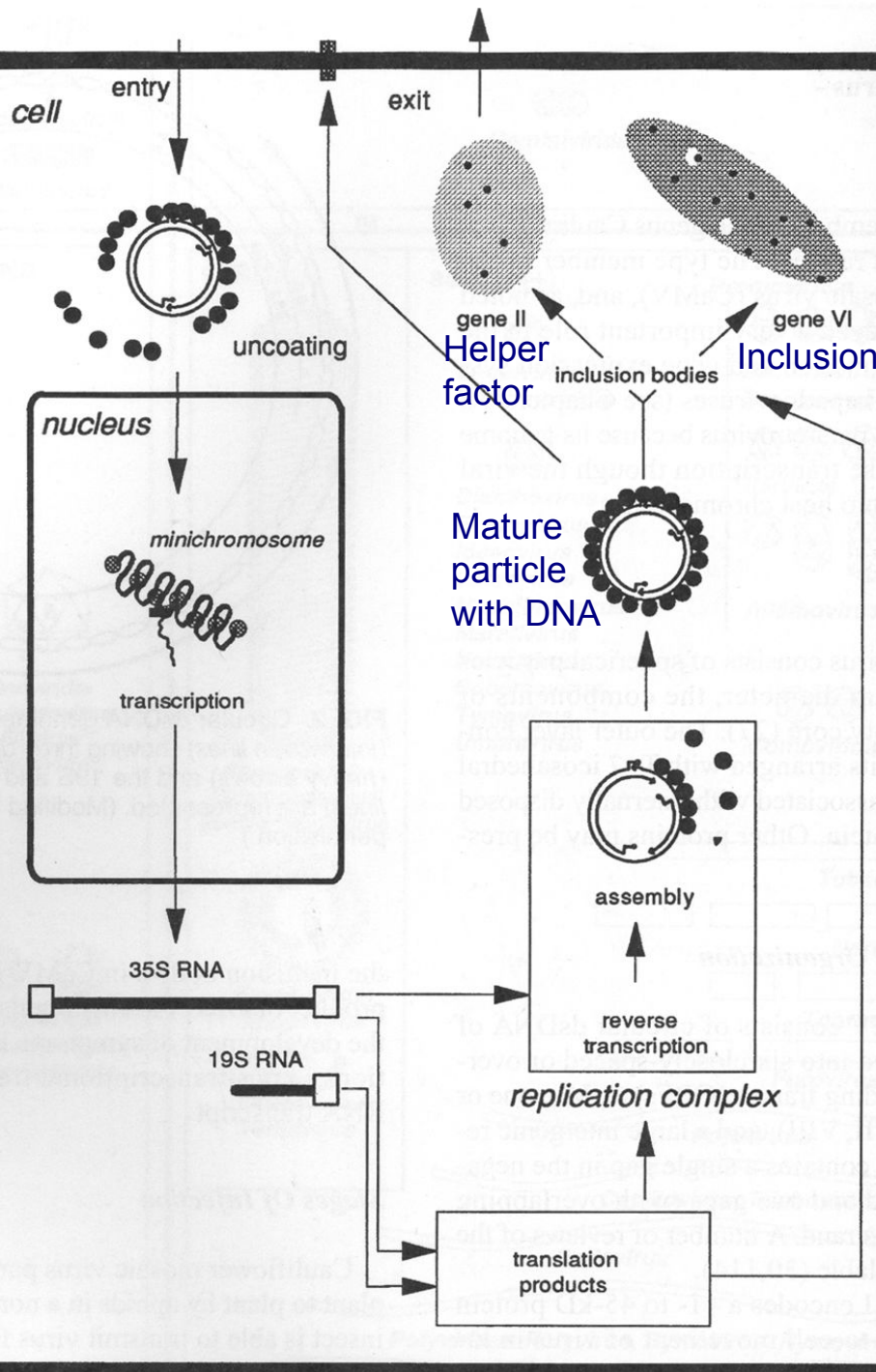
- Ізометричні 50 nm частинки з T=7 або бацилярні частинки;
- Дл ДНК геном ~ 8кб
- Перший вірус рослин, для якого описаний ДНК-геном
- Реплікація зі зворотною транскрипцією
- Транскрипція в ядрі; реплікація ДНК в цитоплазмі
- Скоріше за все, не інтегрують в геном клітини-хазяїна

Caulimoviridae

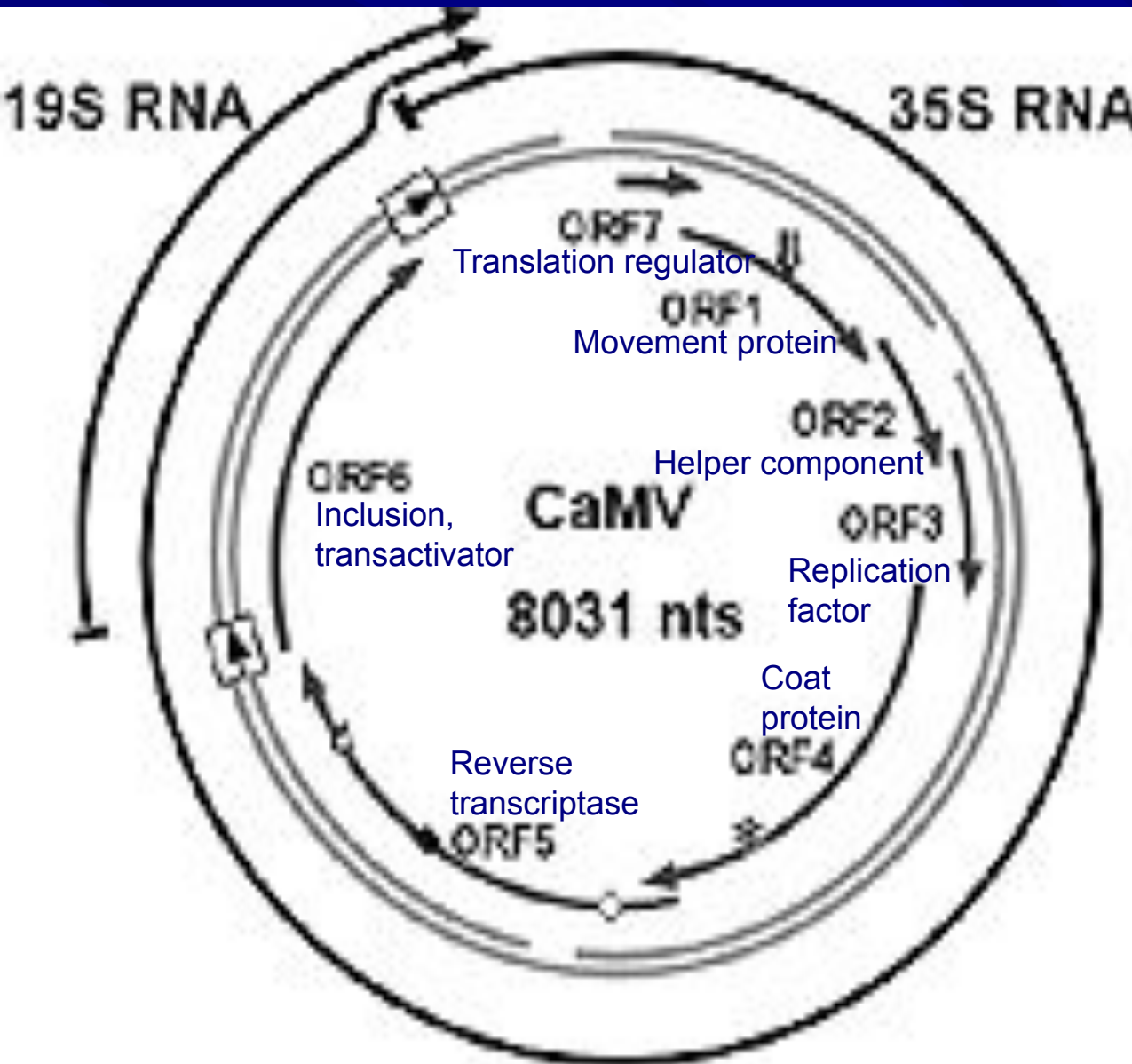
- Переважно вузьке коло господарів
- Переважно малозначні як патогени; виключення - *Rice tungro bacilliform virus* , частина важливого комплексу рисових вірусів
- Переважно передаються безхребетними
- Віруси не реплікуються у векторі; використовують кодований вірусом допоміжний протеїн, для взаємодії з вектором
- Промоторні елементи зазвичай використовуються в генетичній інженерії рослин
- Caulimoviruses не дуже зручні як вектори через пакувальні обмеження та нестійкість

Життєвий цикл Caulimovirus

- Вірус потрапляє до клітини, капсидний білок дисоціює
- длДНК мігрує в ядро; транскрибується 35S та 19S РНК
- В цитоплазмі 19S RNA транслюється в білок, який формує тільця-включення
- П'ять ORFs транслюються з 35S RNA в різноманітних комбінаціях
- Деякі копії 35S РНК підлягають зворотній транскрипції та пакуються в віріони у вигляді длДНК
- Віріони покидають клітину через плазмодесми або з попелицею



Cauliflower mosaic virus genome structure

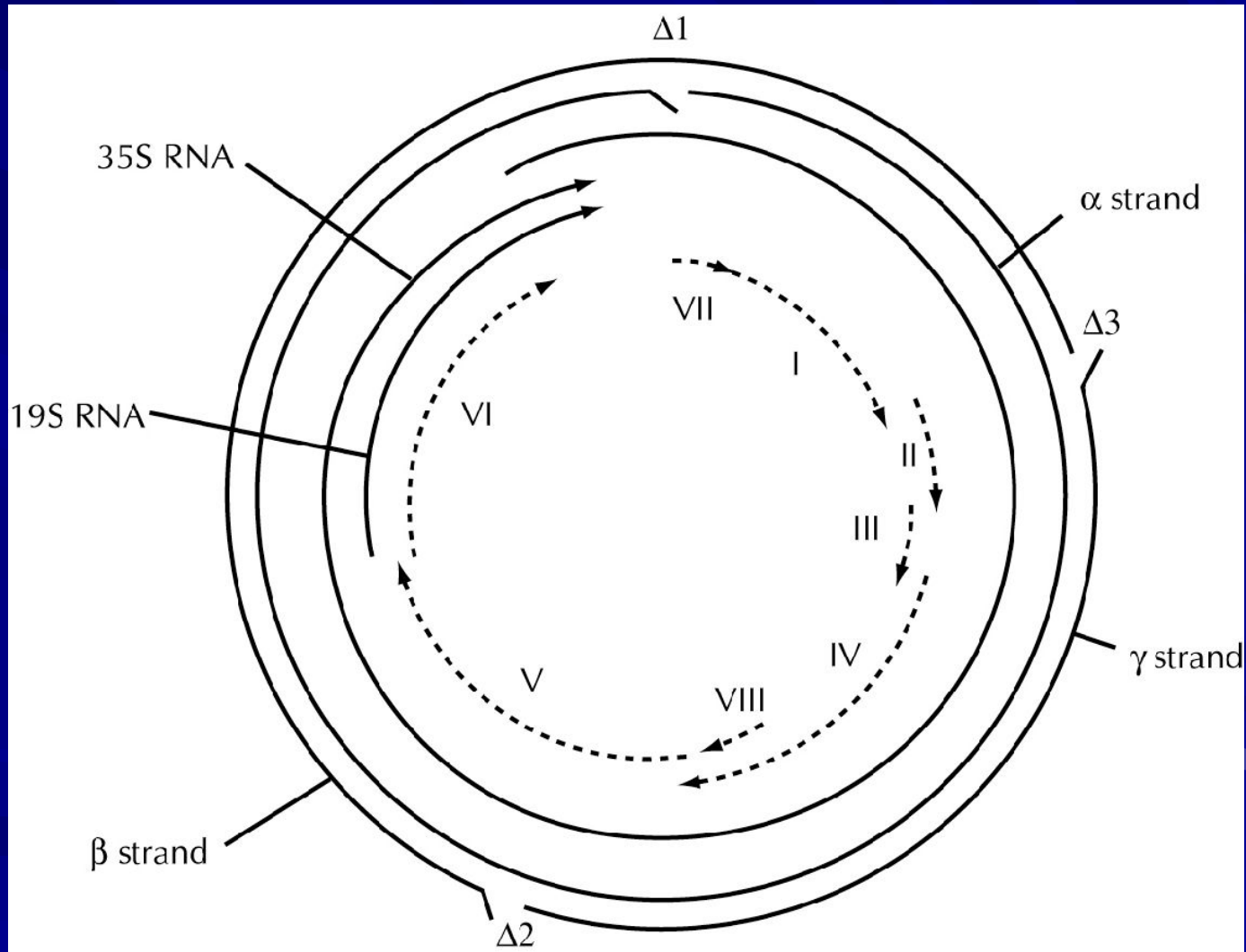


- Сім ORFs в геномі CaMV
- Транслюється 7 білків з 2х транскриптів
- ORF 2 є лише необов'язковим ORF
- ORFs 6 та 7 задіяні в регуляції трансляції
- Запакована геномна длДНК має розриви в обох ланцюгах
- Реплікується з використанням $tRNA^{met}$ як праймера

Cauliflower mosaic virus (CaMV)

- Кожен ланцюг нуклеїнової кислоти має розриви у специфічних місцях. Перший ланцюг – один розрив, а другий ланцюг – від одного до трьох розривів.
- Перший ланцюг ДНК є кодуючою послідовністю. Організація геному залежить від роду та є однією з найголовніших характеристик, що відрізняє один рід родини від іншого.

CaMV Genome



Genome Organization of *Caulimoviridae*

Petuvirus



Caulimoviruses



Soymoviruses



Cavemoviruses



Tungroviruses



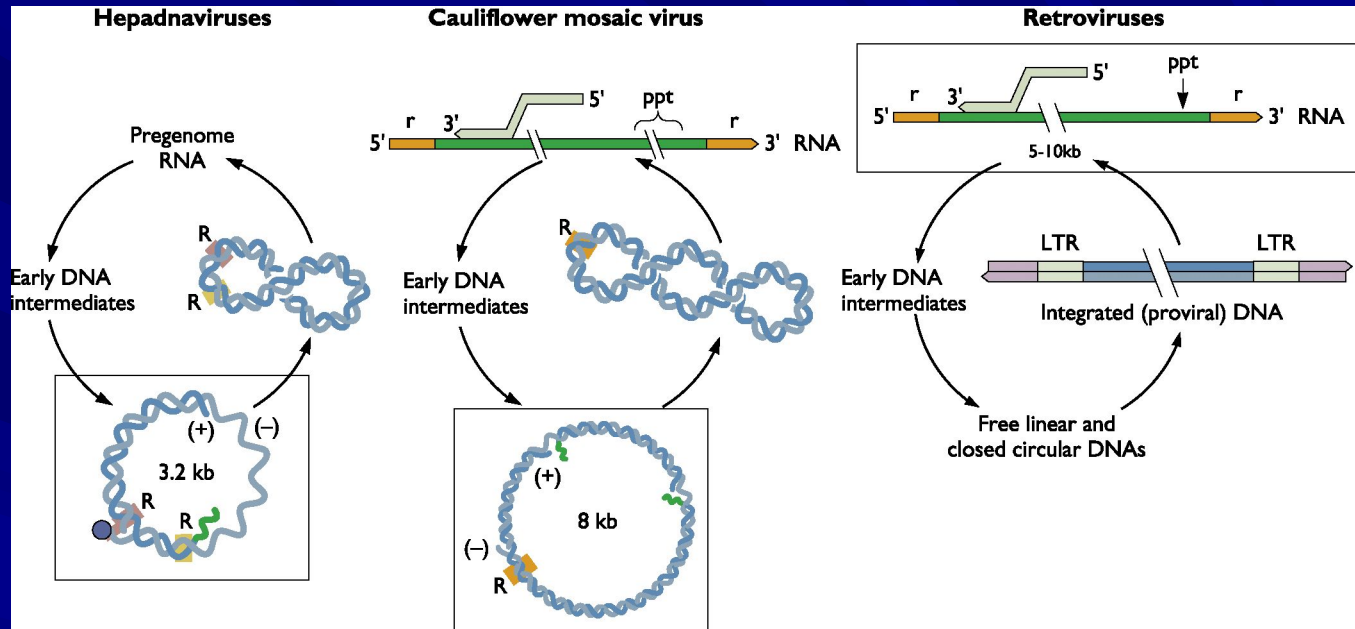
Badnaviruses



- Після потрапляння у клітину розриви в геномі «замуровуються» з подальшим формуванням суперспіралізованої ДНК, що створює мініхромосоми у ядрі. Вони асиметрично транскрибуються за допомогою ДНК-залежної РНК полімерази хазяїна у транскрипт 35S або 34S РНК, що за довжиною переважає геномну НК та має кінцеві надлишковості довжиною близько 35-270 нт (в залежності від виду). Даний транскрипт служить в якості матриці для зворотної транскрипції для формування негативної нитки ДНК, а також для експресії деяких ORFs. Види в роді *Caulimovirus* продукують специфічну мРНК (19S РНК) для ORF6, для вірусів груп посвітління жилок петунії, хлоротичної плямистості сої, мозаїки жилок каяви, не знайдено жодної субгеномної мРНК. ORF4 вірусу *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) експресується з РНК, сплайсованої з 35S РНК. Цикл реплікації, на відміну від такого у ретровірусів, є епісомальним, та не включає фазу інтеграції. Затравкою для синтезу негативної нитки ДНК є цитозольна тРНК met хазяїна. Синтез обидвох ланцюгів відбувається за допомогою вірусної зворотної транскриптази та рибонуклеази H. Сайт-специфічні розриви знаходяться на місцях затравок як для -, так я для + ланцюгу ДНК, та формуються ланцюгом, що рухається та заміщає існуючий ланцюг, та без лігації для формування замкненого кільця.

Hepadnavirus & Caulimovirus vs. Retrovirus RT

Replication

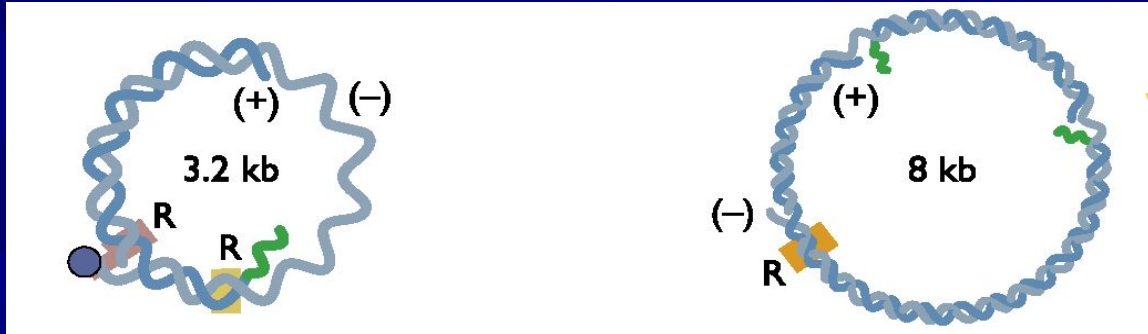


grey)

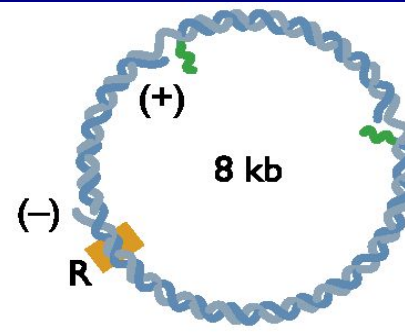
genome	dsDNA (incomplete circle)	dsDNA (complete, relaxed circle)	RNA (diploid)
template RNA	Synthesized by host pol pregenome RNA, mRNA	Synthesized by host pol pregenome RNA, mRNA	Synthesized by host pol genome RNA, mRNA
	redundant ends for template switch	redundant ends for template switch	redundant ends for template switch
viral enzyme	P (RT/RNase H, no IN function)	POL (RT/RNase H, no IN function)	RT/RNase H (with IN function)
DNA in nucleus	Nonintegrated episome	Nonintegrated episome	Integrated into host genome, provirus
Primer: strand 1 (-) strand 2 (+)	viral P derived from template RNA, terminal RNase H product (cap)	host tRNA derived from template RNA, internal RNase H product (ppt)	host tRNA derived from template RNA, internal RNase H product (ppt)
RT reaction	cytoplasm, subviral core in virion assembly	cytoplasm, assembled viral capsid	cytoplasm, subviral core in uncoating upon entry

Hepadnaviruses and Caulimoviruses: DNA Genomes Reverse Transcribed from a +RNA Template

**Hepatitis B
Virus (HBV)**



**Cauliflower Mosaic
Virus (CaMV)**



Геномна дл ДНК:

HBV: 1 повнорозмірний (–) і 1 неповнорозмірний (+) ланцюг

CaMV: 2 повнорозмірні ланцюги з розривами
(2 у + ланцюгу, 1 в – ланцюгу)

Кільце замикається перекриванням (надлишковістю) 5' кінців

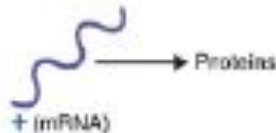
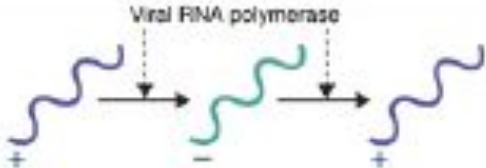
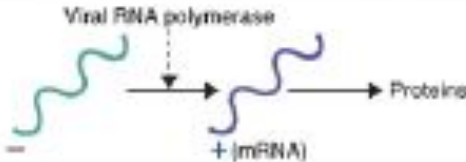
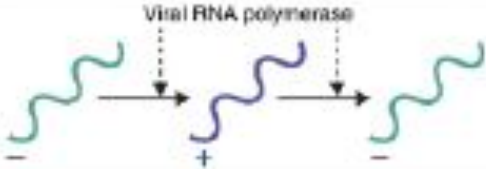
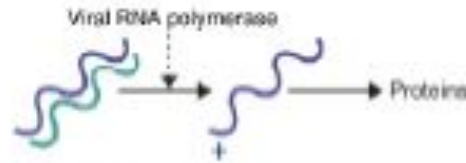
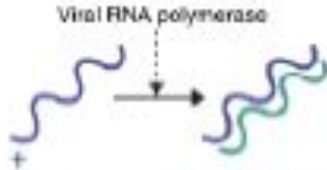
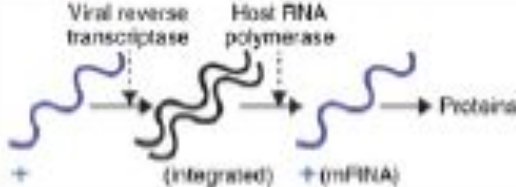
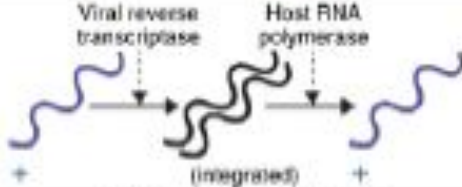
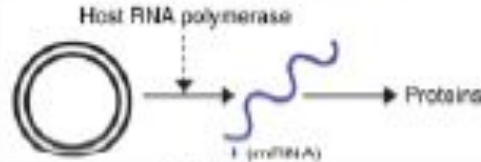
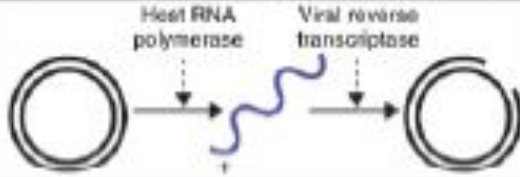
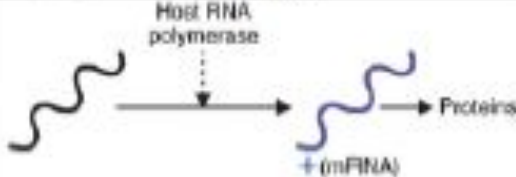
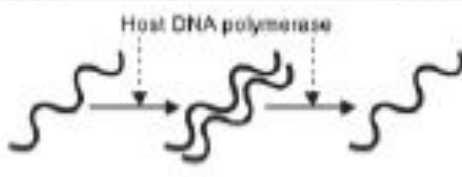
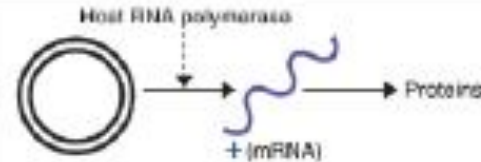
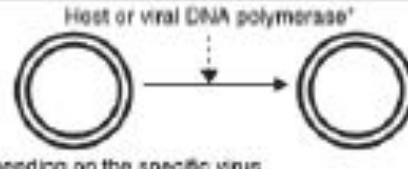
Полімерази (RT / РНКазы Н) у вірусної частинки

- **HBV: ковалентно приєднаним до 5' кінця –ДНК;**

РНК послідовності (S) на 5'-кінці (кінцях) + ланцюг

Структурні аномалії 'hallmarks' щодо стратегії реплікації

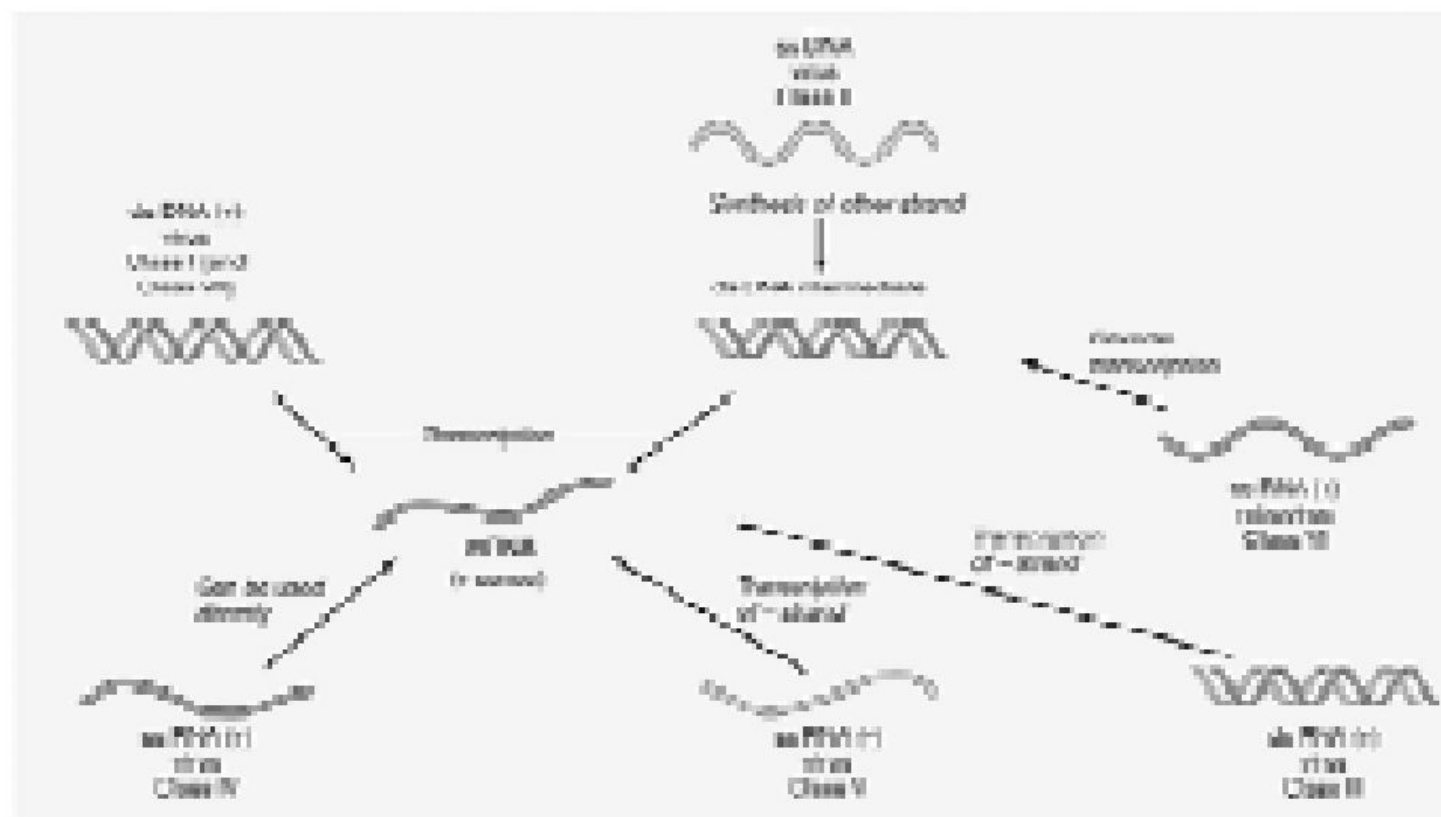
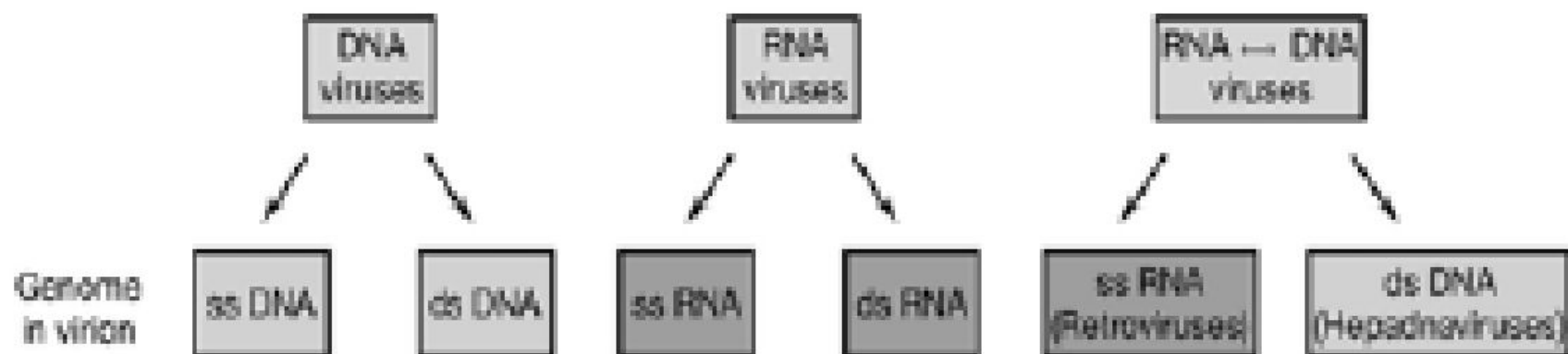
dsDNA → mRNA → dsDNA

Virus Type	Viral Protein Synthesis (using host cell translation machinery)	Viral Genome Replication
Single-stranded +RNA viruses (e.g., poliovirus, West Nile virus)		
Single-stranded -RNA viruses (e.g., influenza virus, measles virus)		
Double-stranded RNA viruses (e.g., rotavirus)		
Retroviruses (e.g., HIV)		
Hepadnaviruses (e.g., hepatitis B virus)		
Single-stranded DNA viruses (e.g., parvoviruses)		
Double-stranded DNA viruses (e.g., papillomaviruses, (circular genome) and herpesviruses (linear genome))		

— = mRNA plus strand

— = mRNA negative strand

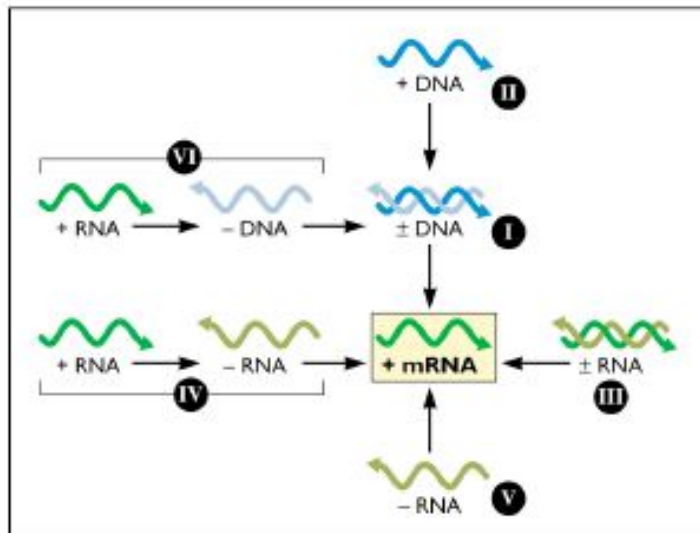
— = DNA



Baltimore Classification Scheme

Based on genetic system of each virus

Describes relationship between viral genome and its mRNA



mRNA = positive (+) sense
(also DNA of equivalent
polarity)

complement = negative (-) sense