



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА



teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ВИРУСОЛОГИЯ

КАРПОВА
ОЛЬГА ВЯЧЕСЛАВОВНА

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТКУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
ДРУЖИНИНУ ДАРЬЮ ВИКТОРОВНУ



Оглавление

Лекция 1	7
Постулаты Коха	8
Хронология развития вирусологии	9
Теории происхождения вирусов	12
Классификация вирусов	14
Типы вирусного генома	19
Икосаэдрические (квазисферические) капсиды	21
Лекция 2	23
Спиральные капсиды	24
Капсиды простых вирусов	25
Сложные вирусы	25
Вирус бешенства	28
Эбола	28
Первые этапы инфекции. Взаимодействие вируса с клеткой	29
Сборка вирусных капсидов	32
Типы вирусных инфекций. Выход вирусного потомства из зараженной клетки	34
Лекция 3	36
Классификация вирусов	36
Наименование вирусов	37
Классификация по Балтимору	37
Общие схемы репликации вирусов	39
Некоторые ферменты полимеразного типа	39
Стратегия репликации у вирусов с dsДНК	40
Стратегия репликации у вирусов с ssДНК	41
Стратегия репликации у вирусов с ssРНК	42
Стратегия репликации у ретровирусов с (+) ssРНК	43
(+) РНК-содержащие вирусы	44
РНК-содержащие бактериофаги	45
Лекция 4	51
(+) РНК-содержащие вирусы эукариот	51
Пикорнавирусы	53

Проникновение в клетку	54
Структура генома пикорнавирусов. Синтез белков	55
Цитопатогенный эффект	57
Цикл репликации в семействе Picornaviridae	60
Основные моменты.....	60
(+) РНК-содержащие вирусы растений	61
Структура генома ВТМ.....	62
Ближний транспорт вируса	64
Дальний транспорт вируса.....	65
Цикл репликации ВТМ	65
Безбелковая инфекция тобравирюсов.....	66
Диантовирюс	67
Бромовирюс.....	67
(-) РНК-содержащие вирусы.....	68
Ключевые особенности (-) РНК содержащих вирусов.....	68
Классификация (-) РНК содержащих вирусов	68
Общая схема транскрипции и репликации семейства Mononegavirales	70
Семейство Rhabdoviridae	70
Лекция 5	72
Rhabdoviridae. Вирус везикулярного стоматита (ВВС)	72
Начало инфекции у вируса везикулярного стоматита.....	73
Схема транскрипции и репликации рабдовирусов.....	75
Созревание и выход вирионов ВВС из клетки.....	76
Инфекционный цикл рабдовирусов	77
Особенности репликации группы вирусов с непрерывными (-)РНК на примере ВВС	77
Семейство Paramyxoviridae	77
Семейство Filoviridae	79
Классификация Orthomyxoviridae	80
Вирус гриппа А	82
Структура генома вируса гриппа А	83
Проникновение вируса гриппа А в клетку	83
Лекция 6	86
Структура вирионной РНК, мРНК и (+)РНК-матрицы	86
Репликация РНК вируса гриппа А	88

«Судьба» синтезированных вирусных белков	88
Упаковка генома вируса гриппа А	90
Эпидемиология гриппа	91
Противогриппозные вакцины.....	92
Ретровирусы (reverse transcription).....	93
Геном ретровирусов на примере вируса саркомы Рауса.....	95
Обратная транскрипция геномной РНК	97
Лекция 7	99
Ретровирусы	99
Транскрипция вирусных последовательностей	99
Жизненный цикл ретровирусов.....	101
Ретроидные (параретро) вирусы.....	102
Онкогенные вирусы. Вирусной канцерогенез.	104
Вирусный канцерогенез	104
Вирусная трансформация клеток	105
ДНК-содержащие онкогенные вирусы	105
Семейство Polyomaviridae.....	106
Ранняя транскрипция гена	109
Репликация ДНК SV40.....	109
Поздняя транскрипция генов.....	111
Сборка вирионов.....	112
Основные моменты.....	114
Семейство Adenoviridae	114
Лекция 8.....	115
Семейство Аденовирусов (Adenoviridae)	115
Литический цикл	116
Репликация ДНК аденовирусов.....	118
Основные моменты.....	121
Семейство Герпесвирусы (Herpesviridae).....	121
Литический цикл репликации герпесвирусов.....	123
Основные моменты.....	124
Лекция 9	125
Семейства бактериофагов с кольцевой однонитевой (ss)ДНК.....	125
Принципы репликации бактериофагов.....	125

Структура генома фага фХ174.....	126
Репликация генома	127
Семейства бактериофагов с двунитевой геномной ДНК	132
Семейство Podoviridae (бактериофаг Т7)	133
Стратегии транскрипций генома.....	135
Регуляция транскрипций бактериофага Т7	136
Семейство Myoviridae (бактериофаг Т4).....	138
Транскрипция генов и модификация клеточной РНК-полимеразы при заражении фагом Т4	139
Лекция 10	141
Субвирусные инфекционные агенты	141
Вироиды	141
Систематика вироидов	144
Структура вироидов	146
Ферменты, необходимые для репликации вироидов.....	147
Распространение вироидов	148
Версии происхождения вироидов	149
Версии причины патогенности вироидов.....	149
Сателлиты.....	149
Сателлитные вирусы	151
Одноцепочечные линейные сателлитные РНК (большие).....	151
Одноцепочечные линейные сателлитные РНК (малые).....	152
Одноцепочечные кольцевые сателлитные РНК (вирусоиды).....	152
Общие свойства сателлитов.....	153
Вирус гепатита дельта.....	154
Прионы	155
Прионы (история вопроса).....	157
Прионы грибов.....	160

Лекция 1

Учебник Алана Канна.

Науке вирусологии 85-100 лет. Раньше люди были прекрасно осведомлены о существовании вирусных инфекций. Первое упоминание датируется 3700 до н.э., Мемфис.



Рис. 1 Жрец в древнем Египте с последствиями полиомиелита

На камне изображен жрец, у которого видны симптомы паралича, вызванного вирусом полиомиелита. Так же встречались и мумии с изменениями, вызванными полиомиелитом (конское копыто).

Мумия фараона Рамсеса V (умер в 1196 до н.э.). В районе лица видны пустулы, говорящие о том, что фараон переболел оспой.

В Месопотамии (1000 до н.э.) накладывался штраф на людей, которые держали собак, болеющих бешенством. В это же время зафиксировали эпидемию вируса оспы и выявили, что у людей после болезни вырабатывается стойкий иммунитет. Тогда же и провели вакцинацию (вариоляция) от variola (лат.) оспа. Пустулы оспы, растертые в порошок, направлялись в дыхательные пути человека через трубочку. Позже пустулы заносились через порез на руке.

В Голландии в середине 17ого века была «Тюльпаномания». За луковицы тюльпанов можно было купить тонны круп, скот, мебель. Тюльпан «Вечный август» были заражены потивирусом (вирус полосатости). Именно такая окраска была ценной.

14 мая 1796 была проведена первая вакцинация против оспы Эдвардом Дженнером. Он взял содержимое пузырьков у крестьянки Сары Нэмис, которая у него работала. Джеймс Фиппс получил вакцинацию. Далее врач 1 июля заразил мальчика натуральной оспой и три дня ждал. Мальчик выжил.

Вакцинация (лат. Васса – корова). Все началось с молочницы, которая заразилась от коровы оспой.

«Теория микробного происхождения болезней» создана Робертом Кохом и Луи Пастером, 1880е. Так же они создали прибор «свечи Шамберлена» - фарфоровые фильтры, задерживающие клетки микроорганизмов. Жидкость переставала быть заразной после пропускания ее через этот прибор.

Постулаты Коха (сформулированы учеными вместе)

— это утверждения, которые можно сделать относительно микроорганизма, доказывающие, что он является возбудителем некоторой болезни:

1. Микроорганизм регулярно выявляется при определенном заболевании
2. Микроорганизм должен быть выделен в чистой культуре
3. При заражении чистой культурой организм (или животное) заболевает
4. Микроорганизм снова будет обнаруживаться в организме

Первые три постулата известны также под названием **триады Коха**.



Рис. 2 Растение, зараженное ВТМ

Кох ввел понятие вируса. Причем вирусом он назвал такой инфекционный агент, как вирус бешенства. Полностью был уверен, что это микроорганизм. Назвал от латинского *vīrus* – яд.

В 1892, 12 февраля **Дмитрий Ивановский**, ученый ботаник, выступил с докладом по вирусу табачной мозаики, который он изучал в Крыму и Бессарабии. Он показал, что

экстракт растений, зараженных данным вирусом и пропущенных через свечи Шамберлена, оставался зараженным. Был сделан вывод, что это токсин. Тем не менее, 1892 год считается годом начала вирусологии.

Современник Ивановского **Мартинус Бейейнк** независимо от него также проводил эксперименты с растениями, зараженными вирусами табачной мозаики. Он утверждал, что жидкость, проходящая через фильтры – инфекционна. При разведении инфекционность падает. Если растение заразить этой жидкостью, то начинается инфекционный процесс, растения заболевают. Таким образом, данный агент может размножаться только в живом организме. После этого Мартинус ввел понятие «фильтрующегося агента». И дал название “contagium vivium fluidum” (т.е. «заразное жидкое начало»).

После было обнаружено, что большое количество заболеваний растений и животных также вызваны такими агентами. В то время абсолютно все микроорганизмы, вызывающие какие-либо заболевания назывались вирусами.

Хронология развития вирусологии

- 1898**, Freidrich Loeffler & Paul Frosch - открыт первый вирус животных – вирус ящура.
- 1900**, Walter Reed (по некоторым данным 1901) – обнаружен первый вирус человека на Кубе - вирус желтой лихорадки – и показана возможность его передачи комарами.
- 1908**, Эллерман и Банг – здоровых кур можно заразить лейкемией, вводя бесклеточный фильтрат крови больных лейкемией кур
- 1909**, Landsteiner & Popper - показали, что полиомиелит вызывается «фильтрующимися агентами».
- 1911**, Peyton Rous - обнаружил «фильтрующийся агент», вызывающий опухоли у кур – вирус саркомы Рауса (начало части вирусологии - вирусного канцерогенеза)
- 1915**, Frederick Twort & 1917, Felix d'Herelle - независимо друг от друга открыли возможность заражения бактерий «фильтрующимися агентами» (бактериофаги).
- 1932**, Richard E. Shope - у кроликов обнаружен первый ДНК-содержащий опухолеродный вирус - вирус папилломы Шоупа
- 1933**, Wilson Smith, Christopher Andrews and Patrick Laidlow - вирус гриппа человека (вирус гриппа птиц был уже известен на тот момент)

Frederick Twort (1915)

- первым выделил вирус, инфицирующий бактерии, и назвал его бактериофагом.

Felix d'Herelle (1917)

- Установил существование бактериофагов
- Разработал метод определения числа фагов в растворе
- Продемонстрировал, что фаги способны репродуцироваться в живых бактериях
- Предположил, что бактериофаги могут быть использованы для лечения заболеваний



Рис. 3 Бактериальный газон с негативными бляшками

Бляшка – зона лизиса бактерий (см. рис. 3)

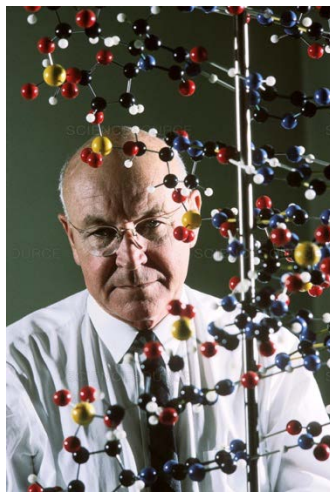


Рис. 4 Wendell Stanley

Долгое время для ученых, занимающихся фильтрующимися агентами, важнейшим экспериментальным объектом оставался вирус табачной мозаики (ВТМ). Он был удобен тем, что очень быстро накапливался (10 г вируса/1 кг зеленой массы).

До 1935 года о природе вирусов ничего не было известно. Ранее считалось, что вирус представляет собой белок и фермент, один из которых способен размножаться. Данная версия казалась адекватной, так как изучение нуклеиновых кислот только начиналось. В 1935 году химик **Wendell Stanley** (см. рис. 4), используя метод осаждения белка с

помощью сульфата аммония, благодаря нескольким циклам осаждения смог получить первый очищенный ВТМ. Этот препарат оказался инфекционным, постулаты Коха выполнялись: инфекционный агент выделялся из больного организма, вызывал заражение здорового организма и выделялся из вновь зараженного организма. В связи с этим, 1935 год так же можно считать началом вирусологии.

Однако Стэнли считал ВТМ глобулярным белком.

В том же году Боуден и Пири обнаружили, что в препарате, который выделяется по методике Стэнли, каждый раз присутствует 5 % РНК. Таким образом была установлена химическая природа ВТМ.

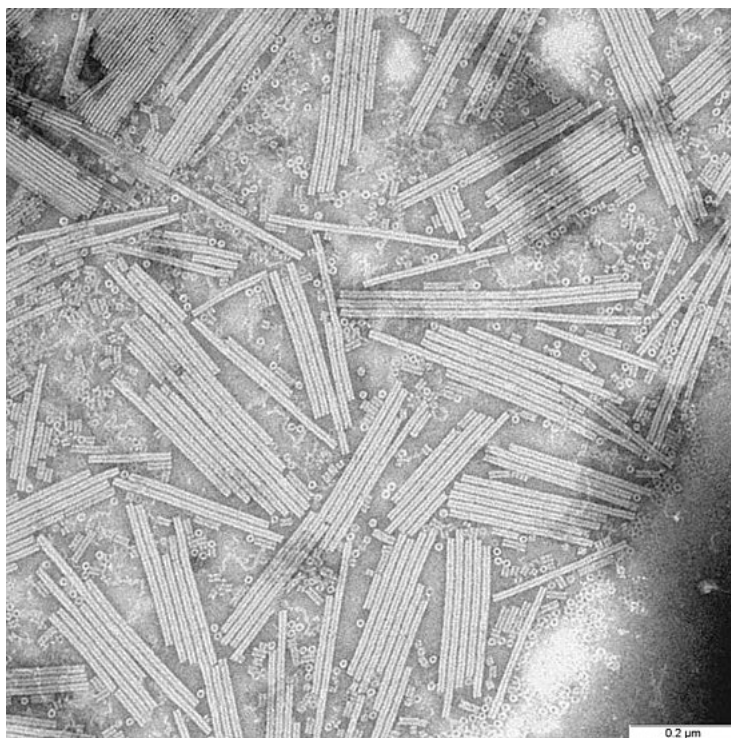


Рис. 5 ВТМ. Электронная микроскопия

ВТМ – макромолекулярный комплекс, состоящий из белка и нуклеиновой кислоты.

До конца 30-х годов вирусы оставались невидимыми. В 1939 было получено первое электро-микроскопическое изображение ВТМ. Вирус представляет собой палочку размером 300 нм, диаметром 18 нм.

Инфекционность вирусов определяется их нуклеиновой кислотой.

В начале изучали вирусность белка. Однако со временем становилось понятно, что именно нуклеиновая часть определяет инфекционность вируса.

Решающие эксперименты были выполнены в 1952 году супружеской парой **Alfred Day Hershey & Martha Chase**. Они показали, что в клетки бактерий проникает только нуклеиновая кислота бактериофага Т2, и, следовательно, информация необходимая для инфекции и воспроизводства фаговых частиц, закодирована в нуклеиновой кислоте вируса – фаговой ДНК.

Позже **Heinz Ludwig Fraenkel-Conrat** (1956) получил очищенный препарат РНК ВТМ и показал его инфекционность для растений в отсутствие вирусного белка.

Таким образом, окончательно была установлена роль нуклеиновой кислоты в инфекционности вирусных частиц.

История вирусологии

- Вирусы - представители отдельного царства живого.
- Вирусы являются возбудителями многих заболеваний человека (оспа, желтая лихорадка, полиомиелит, корь, свинка, простуда и др.)
- Установлена химическая природа вирусов как нуклеопротеидов определённой структуры, характерной для каждого вида вирусов.
- Доказано, что свойства вирусов определяются их нуклеиновой кислотой.

Теории происхождения вирусов

- **Регрессивная эволюция**
дегенеративная форма жизни, потерявшая в ходе эволюции многие функции, оставив лишь генетическую информацию, необходимую для паразитической формы существования.
- **Клеточное происхождение**
субклеточный комплекс макромолекул, который смог стать автономным в определённой степени от клетки и покинул её.
- **Доклеточные генетические элементы. Независимый путь эволюции**
вирусы развивались параллельным курсом с клеточными организмами из самореплицирующихся молекул (древний РНК- мир).

На данный момент все больше сторонников у теории «доклеточных генетических элементов». Доводы следующие:

- Разнообразие способов хранения, репликации и экспрессии генетической информации у вирусов отсутствующее у клеточных организмов, – серьезный довод против гипотезы о происхождении вирусов путем упрощения генетических систем клетки.
- У большинства вирусов есть вирус специфические гены, отсутствующие у клеточных организмов

“The tree of life and its root are immersed in a viral ocean” (Bamford, 2003)

В итоге: вирусология изучает вирусы – комплексы, состоящие из нуклеиновых кислот и белка, обладающих способностью реплицироваться в клетках животных, растений и бактерий.

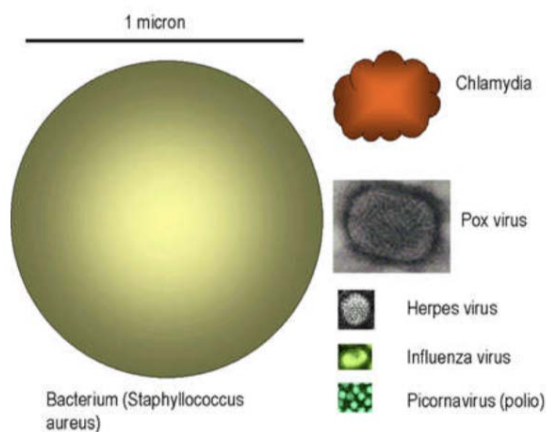


Рис. 6 Сравнение размеров вирусов и бактерий

Для репликации вирусы узурпируют репликативный аппарат клетки, на котором паразитируют. Эта узурпация приводит к изменениям в самой клетке. Меняются антигенные свойства, переориентируется метаболизм, и вся клетка сконцентрирована на продукции вирусных частиц. Это может стать причиной серьезных изменений клетки или ее смерти.

Индукцируемая вирусом клеточная смерть, изменения антигенности и ответ клетки хозяина на присутствие вируса и приводит к проявлению вирусных заболеваний.

В отличие от вируса бактерии – самостоятельный организм со своим собственным метаболизмом. Геном бактерий кодирует все ферменты для ее существования. Даже при катализе схожих реакций, бактериальные ферменты отличаются от эукариотических гомологов.

В составе вирусов рибосом нет. Но существуют **аренавирусы** (не будут рассматриваться в рамках данного курса). Когда они формируются внутри зараженной клетки, они механически захватывают в свой состав вирусной частицы рибосомы этой клетки. Рибосомы не функциональны.

Классификация вирусов

Вирусы прокариот никогда не смогут заразить эукариот.

Деление вирусов есть по типу:

1. клеток, которые они заражают (вирусы эукариот, архей, прокариот или бактериофаги)
2. по геному (ДНК-дезоксивирусы, РНК-рибовирус) ss – single strand, ds – double strand
3. простые или сложные

Простые вирусы состоят из генома нуклеиновой кислоты и белковой оболочки.

Сложные вирусы еще захватывают клеточную мембрану у клетки, в которой образуются.

Отличительной чертой этих вирусов является то, что они «декорируют» клеточную мембрану своими белками, поверхностными гликопротеинами.

Простой: SV-40 – обезьяний вирус 40 (см. рис 7)

Сложный: вирус кори (см. рис 7)

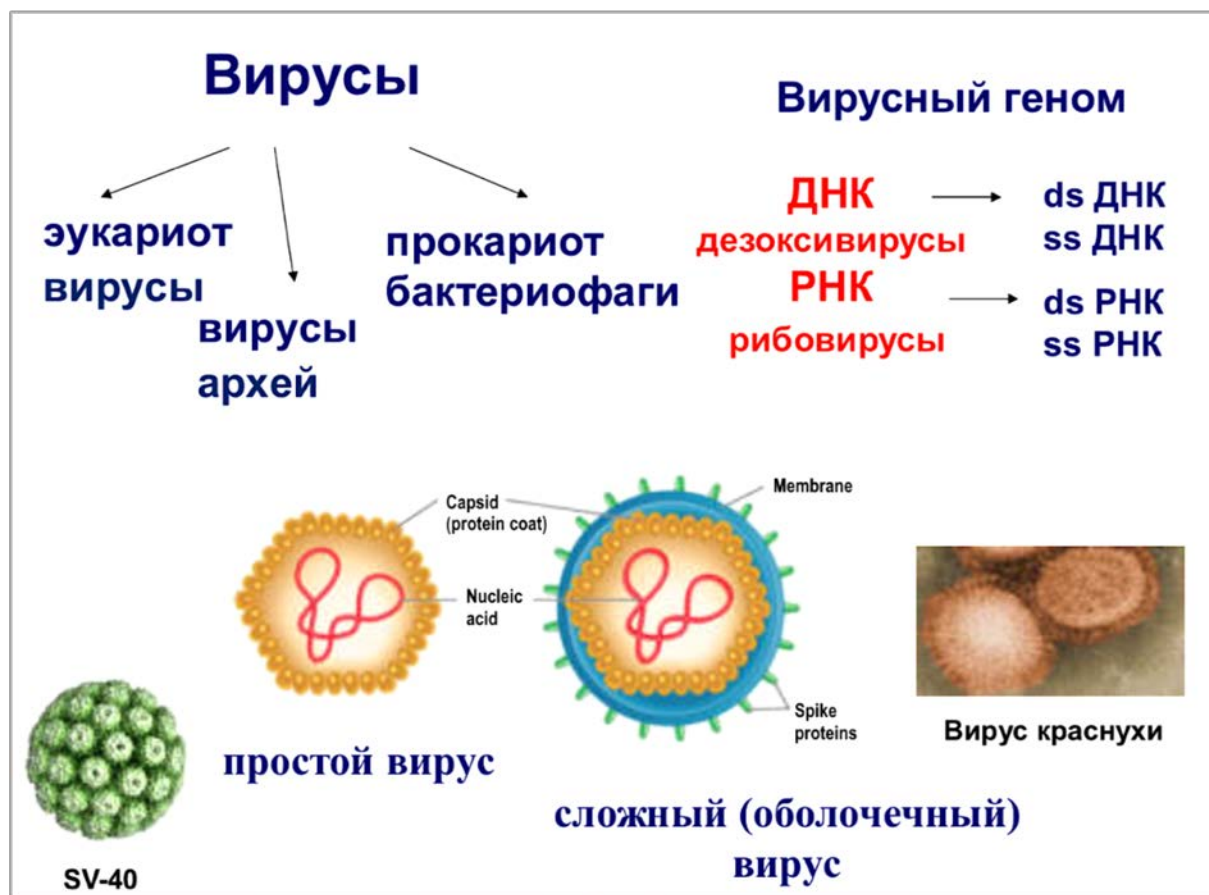


Рис. 7 Классификация вирусов

РНК:

ss – одноцепочечная. Может быть кольцевой или линейной.

ds – двухцепочечная. Известна только линейная.

ДНК:

ss – одноцепочечная. Кольцевая и линейная.

ds – двухцепочечная. Кольцевая и линейная.

У клеток только ds ДНК, кольцевая и линейная.

Вирuс Гепатита В частично двухцепочечной и частично кольцевой. Один виток ДНК, полностью соответствующей размеру генома и есть, вторая нить, которая меньшего размера и перекрывает не весь геном.

РАЗНООБРАЗИЕ РАЗМЕРОВ ГЕНОМОВ.			
Дезоксивирусы - ДНК-ВИРУСЫ.			
двунитевые ДНК (ds ДНК)			
Мимивирус	~1000 генов;	500 млн.Da,	1182 kbp .
Вирус оспы	150- 300 генов;	160млн. Da,	150-300 kbp.
Бактериофаг Т4	300 генов;	120 млн. Da,	169 kbp.
Вирус герпеса	70 генов;	100млн. Da,	120 kbp.
Аденовирус	40 генов;	25 млн.Da,	26-46 kbp.
Папилломавирус	8 генов;	3.2 млн.Da,	7.0-8.4 kbp.
Вирус гепатита В	4 гена;		3.2kbp.
однонитевые ДНК (ss ДНК)			
Бактериофаг М13	10 генов;		8 kb.
Парвовирус	6 генов;	1.5 млн. Da;	5 kb.
Агерорум coil-shaped virus	~ 50 генов;		24,9 kb

Рис. 8 Размеры геномов некоторых вирусов

Parovaviridae – устаревший термин. В эту группу раньше включали папиллома-вирусы и полиомавирусы.

Нерадnaviridae – гепатиты.

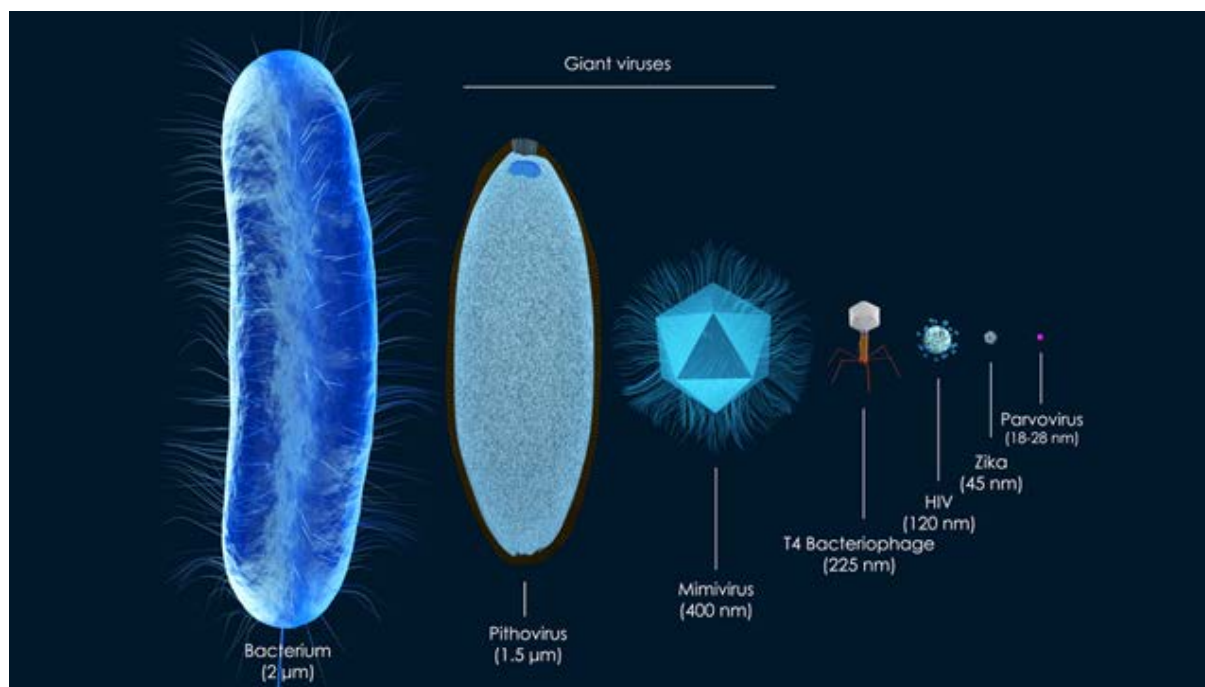


Рис. 9 Сравнение размеров вирусов с бактерией

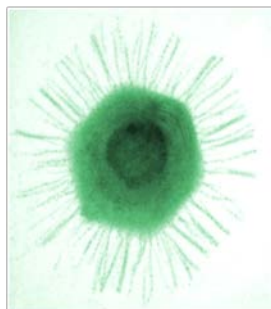


Рис. 10 Мимивирус

Мимивирус (mimicking microbes) – первый открытый гигантский вирус. Нашли в Великобритании в ТЭЦ и сначала отнесли к бактериям. Дидье Рауль и профессор Клавьер обнаружили его в средиземном море и выпустили статью в 2003 году о том, что этот объект (диаметр внутренней части 400 нм, вместе с отростками 800 нм) является вирусом и заражает акантамеб. Геном у него в виде двухцепочечной линейной ДНК, длина генома 1 182 000 пар нуклеотидов. Геном потенциально может кодировать 979 белков.

В 2008 году был обнаружен **Маммовирус** той же группой в ТЭЦ в Париже. Геном был 1 191 693 пар нуклеотида, потенциально кодирует 1023 белка. Частица этого вируса была 390 нм в диаметре, отростки 120 нм.

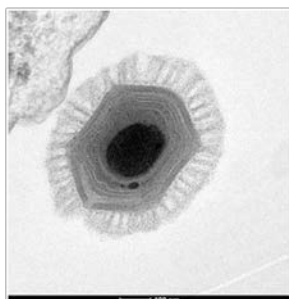


Рис. 11 Мегавирус

Мегавирус обнаружен был в образце воды в Чили. Диаметр 440 нм, с отростками 600 нм, двухцепочечная ДНК, 1 259 000 пар нуклеотидов, кодирует предположительно 1120 белков.

Все эти вирусы заражают акантамеб. При инфекции мегавирусом акантамебы (позже это было доказано и для остальных гигантских вирусов) появляется некий объект в зараженных клетках, который похож на самостоятельный вирус - частица диаметром 18 нм и небольшая двухцепочечная ДНК (3000 нуклеотидов). Считалось, что это новый биологический класс объектов. Другими словами – **виорофаг**. Поскольку во время

возникновения этих частиц симптомы инфекции приглушались. Так же гигантские вирусы имели аномальное строение капсида (при которых развивались вирофаги), скорость лизиса амёб также снижалась в 3 раза.

Сателлитизм. Существует вирусы хозяева и вирусы сателлиты, которые размножаются параллельно с вирусами хозяевами, используя их потенциал. Очень часто нивелируют симптомы от хозяина и будто приглушают инфекцию.



Рис. 12 Пандоравирус

В 2013 году эта же группа исследователей обнаружила группу **Pandoravirus**. Размеры достигали 1 мкм в длину и 0,5 мкм в ширину. От 1 900 000 до 2 500 000 пар нуклеотидов, потенциально кодирует 2556 белков. В этот род входит два вида вирусов. Так же заражают акантамеб. Но при этом известно, что 93% кодирующих нуклеотидных последовательностей этого вируса не имеют сходства с известными последовательностями других организмов, в том числе вирусов. Никакого филогенетического сходства с вирусами нет. Согласно мифам, Пандора (от греч. – подарок) – женщина, которую создал Зевс в наказание людям, за огонь, который похитил Прометей. Она была любопытна, открыла ящик, который дал ей Зевс и выпустила наружу беды. Тут же его захлопнув, она оставила на дне надежду.

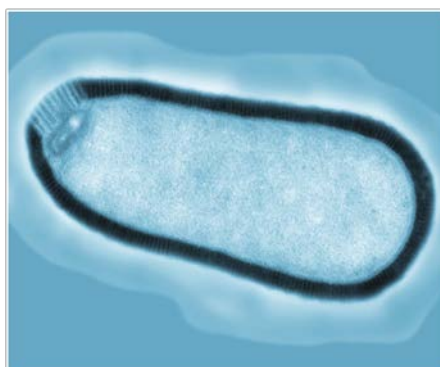


Рис. 13 Питовирус

Pithovirus (от греч. pithoi – кувшин) в длину 1,5мкм и шириной 0,5мкм. Двухцепочечная **кольцевая** ДНК. Геном при этом меньше – 610 000 пар нуклеотидов, предположительно кодируют 467 белков. Есть апикальная пора, похожая на соты. Через эту пору

генетический материал попадает в амебу. Эти вирусы были выделены из многолетней мерзлоты, взятой на глубине 30 метров русскими учеными. Возраст оценивался в 30 тыс. лет. Когда образец разморозили и добавили к живой культуре амеб, все амебы умерли. Таким образом вирусы остались жизнеспособными и инфекционными. Вирус описали Клавье и его помощница.

Была высказана идея, что все гигантские вирусы являются остатками крупной группы вирусов, паразитировавших на организмах много лет назад.

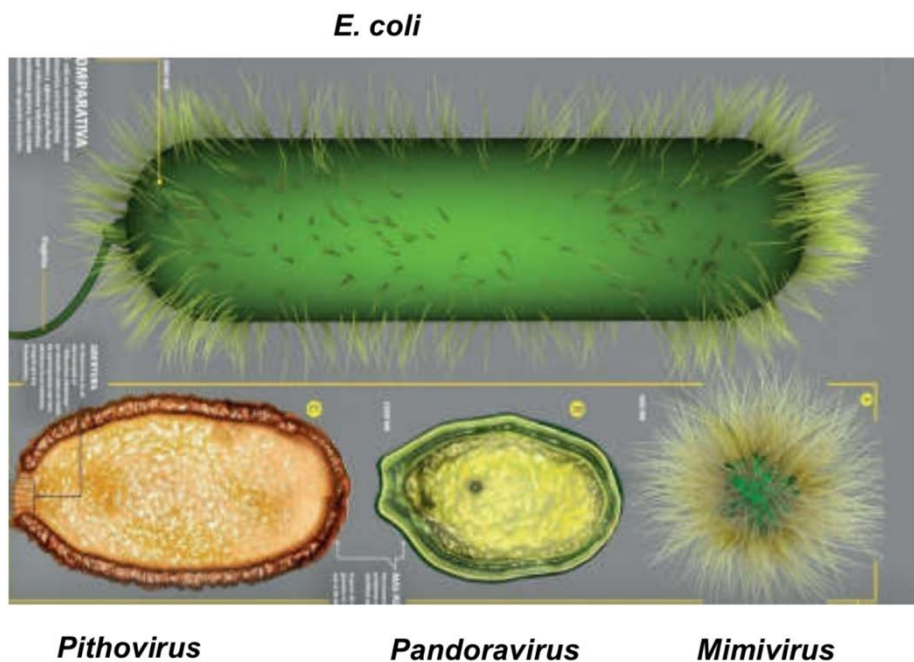


Рис. 14 Сравнение гигантских вирусов с бактерией *E. coli*

Типы вирусного генома

1. Сегментированным или фрагментированным – представленным более, чем одной молекулой ДНК или РНК.

Вирус гриппа содержит 8 разных молекул ssРНК.

Вирусный геном, как правило, гаплоидный. Исключение – ретровирусы – группа, обычно, онкогенных вирусов. Ретровирусы представлены двумя одинаковыми молекулами ss РНК, т.е. тоже могут обладать диплоидным геномом.

2. Разделенным

Каждый сегмент генома вируса может «одеваться» отдельно в белковую оболочку (инкапсулируется в белок). Для того, чтобы произошла инфекция в клетку должны попасть частицы, содержащие все сегменты генома.

3. У РНК-содержащих вирусов геном может быть представлен нитями РНК различной полярности (+ и – РНК, или позитивные и негативные РНК).

+РНК: Последовательность нуклеотидов напрямую кодирует последовательность вирус-специфических белков. Этот геном, попадая в клетку, сразу может становиться матрицей для трансляции вирус-специфических белков.

-РНК: Первый акт инфекции не трансляция, так как эта РНК не несет информацию о белках. Сначала должна пройти транскрипция этого генома и образоваться информационная матрица.

В клетке нет фермента ф, поэтому те вирусы, геном которых представлен -РНК должны внести с собой в клетку свой вирус-специфический фермент.

4. Двусмысленная или ambisense-РНК

Геном представлен двусмысленной РНК. То есть одна и та же молекула РНК частично положительная (может направлять синтез вирусных белков), а частично отрицательная (с нее должна происходить транскрипция). Например, ареновирус, который в ходе инфекций захватывает рибосомы.

Ортомиксовирусы – вирусы гриппа. Обозначение S- говорит о том, что геном сегментирован, а полярность отрицательна.

Рабдовирусы – вирус бешенства. Геном (NS-) не сегментирован, полярность отрицательна.

Пикорнавирусы – вирус полиомиелита. Геном (NS+) не сегментирован, полярность положительна, то есть эта РНК сразу после проникновения в клетку может направлять синтез белков.

Реовирусы – ротавирусы. Геном (s, ds) сегментирован, состоит из двух цепочек РНК.

У гигантских вирусов количество генов могут быть в разы больше геномов бактерий.

Концевые структуры вирусных нуклеиновых кислот:

1. 5'-терминальные белки. Белки ковалентно связаны с 5' концевыми нуклеотидами геномов вирусов, нужны для репликации. Например, аденовирусы и пикорновирусы.

2. 5'-концы модифицированы присоединением «кэпа» (только РНК-вирусы). Используются трансляционные механизмы клетки, вирус максимально маскируется под матрицу, привычную для клеточного аппарата трансляции.
3. 3'-конец РНК (только РНК-вирусы): polyA – мимикрия под нормальную клеточную информационную РНК; тРНК-подобная структура – многофункциональная структура, играет роль в репликации, транскрипции, трансляции, способна играть важную роль при сборке вирусных частиц.
4. Прямые и инвертированные концевые повторы (РНК и ДНК, чаще ДНК).

В геномах вирусов отсутствуют протяженные межгенные последовательности. Обычно идет перекрывание кодирующих или регуляторных последовательностей разных генов. Часто со сдвигом рамки считывания. Так же вирусы используют механизм альтернативного сплайсинга – одна и та же рамка считывания используется для кодирования белков с различной функциональной активностью.

Вирус – это нуклеопротеид, нуклеиновая кислота заключена в оболочку из вирусных белков, кодируемых геномом вируса. Эта оболочка называется **капсид**.

Капсид (от лат. capsula – ящик) — белковая оболочка вируса, защищает вирусный геном от воздействия внешних факторов и обеспечивает его проникновение в клетку. Построен из идентичных повторяющихся субъединиц – **капсомер**. Капсомер может быть образован одной или несколькими молекулами белка. Образуют структуры с высокой степенью симметрии. Строятся за счет белок-белкового взаимодействия, гидрофобных взаимодействий и водородных связей. Капсиды бывают сферической и палочкообразной формы. Капсиды образуются в процессе самосборки.

Икосаэдрические (квазисферические) капсиды



Рис. 15 Икосаэдрические капсиды. Краткая информация

Капсиды многих вирусов практически идентичны сфере (правильные многогранники). Красные кружочки (см. рис.15) – это белковые молекулы, которые могут организоваться в такие структуры. Минимальное количество для построения такой структуры – 60 субъединиц, т.е. грань построена из трех молекул белка.

Число новых треугольников называется **триангуляционным числом**. Число (Т) характеризует размеры икосаэдрических капсидов вирусов. Если грань разбили на 4 треугольника, то число (Т) = 4.

Капсомеры, которые окружают вершину икосаэдрической капсиды, называются **пентоны**, так как взаимодействуют с пятью соседними белковыми капсомерами.

Капсомеры, которые располагаются на грани икосаэдра и взаимодействуют с шестью другими белковыми капсомерами, называются **гексоны**. Футбольный мяч состоит из пентонов (черный) и гексонов (белый).

Вирус мозаики костра, сем. *Bromoviridae*, является примером икосаэдра. Диаметр 30 нм. Каждая грань поделена на три равносторонних треугольника и каждый треугольник образован тремя ассиметричными молекулами белка. Его триангуляционное число (Т) 3. Геном представлен одноцепочечной позитивной РНК. Обладает фрагментированным и разделенным геномом, т.е. геном представлен одной субгеномной и тремя геномными РНК и все эти молекулы инкапсидируются отдельно.

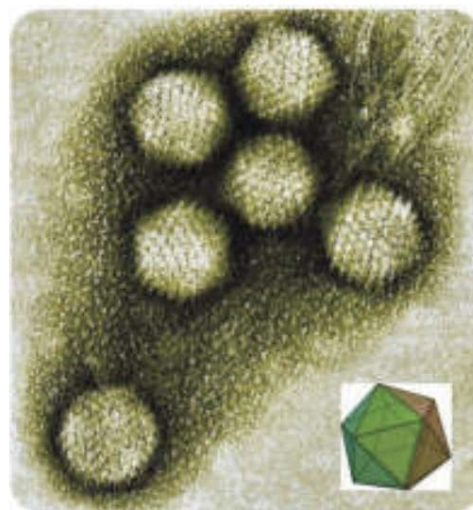
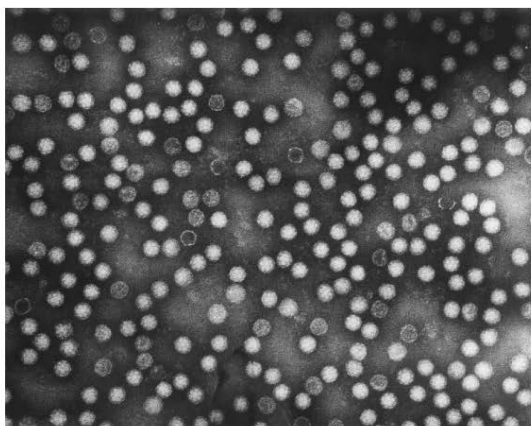


Рис. 16 Электронная микрофотография икосаэдрических капсид вирусов

Лекция 2

Когда мы говорим о вирусе мозаики костра, это один белок, он же капсомер, он же пентон, и он же гексон. В случае, если вирус должен быть большего объема, происходит деление граней на большее число треугольников, то есть объем икосаэдра увеличивается.

Например, сложный (есть липопротеидная оболочка) вирус герпеса с диаметром 100нм. Состоит из двух типов капсомеров. Пентоны образуются белом VP5, всего 12. Гексоны образуются двумя видами полипептидных цепей: белком VP5 с присоединённым белком VP6.

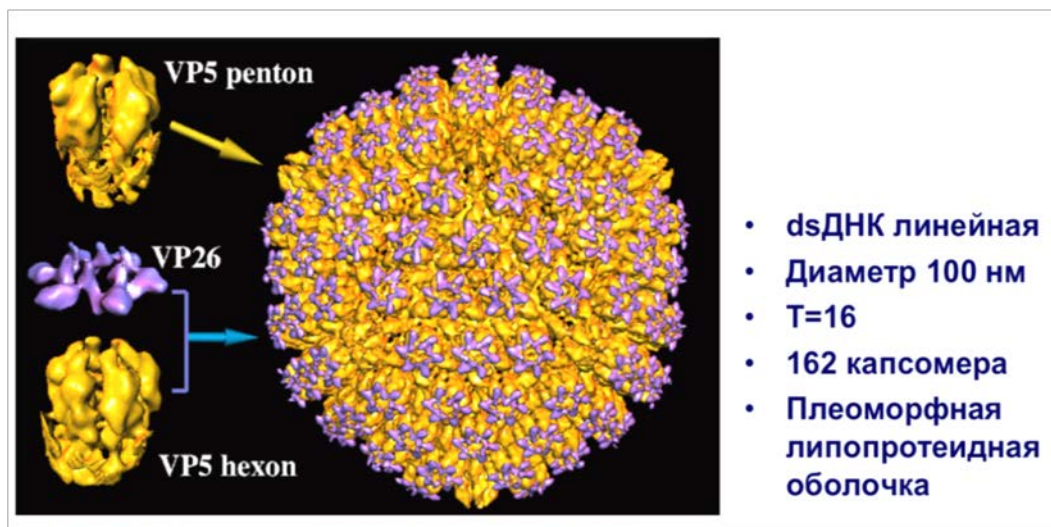


Рис. 17 Характеристика Аденовируса (двухцепочечная линейная ДНК)

Вирус герпеса HSV-1 (см. рис. 17) обладает двухцепочечной линейной ДНК, то есть дезоксивирус. Триангуляционное число 16, 162 капсомера – 12 пентонов и 150 гексонов.



Рис. 18 Характеристика вируса герпеса HSV-1

Спиральные капсиды

– построены из одного типа белковых субъединиц. Нуклеиновая кислота располагается в центре белковой спирали. Размер нуклеиновой кислоты определяет размер капсида. Вирусом данной группы является ВТМ.

Капсида ВТМ состоит из 2130 субъединиц белка оболочки, уложенных в спираль (шаг 2,3 нм), диаметр внутреннего канала 2 нм. В этот канал помещена нуклеиновая кислота. Такая частица имеет 1 ось симметрии, приходящую вдоль частицы. Для витка спирали нужно 49 молекул белка оболочки.

Размеры спиральных капсидов могут быть от 100 нм до 2000 нм. Частицы. Длина которых 300 нм и меньше – жесткие палочки, больше – выглядят гибкими нитями. Гибкость напрямую зависит от длины.

X вирус картофеля – нитчатый вирус (500 нм в длину, диаметр 13 нм) геном представлен одноцепочечной позитивной молекулой РНК. Одна ось симметрии.

Спиральным типом симметрии так же обладает бактериофаг М13. В длину 900 нм, диаметр 9 нм, одноцепочечная кольцевая ДНК.

Простых (безоболочечных) вирусов животных со спиральным типом симметрии не обнаружены.

Капсиды простых вирусов

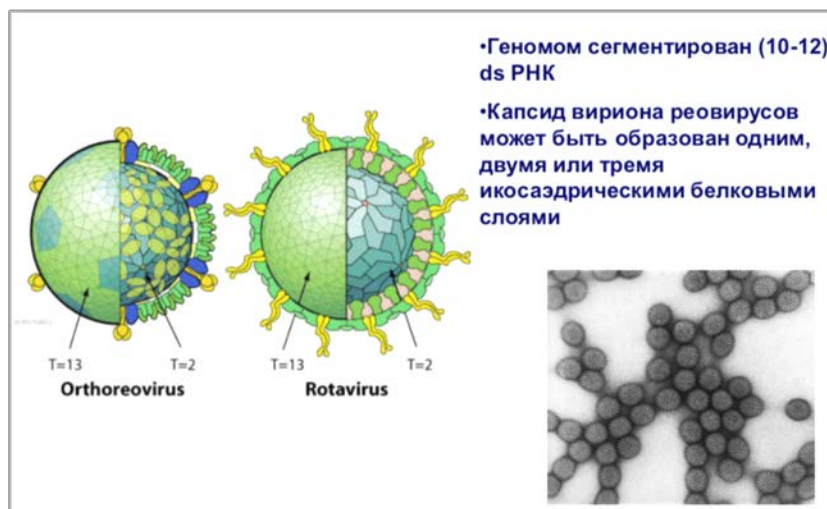


Рис. 19 Орто- и ротавирусы с характеристикой

Сем. Reoviridae

Безоболочечные частицы представляют собой вложенные один в другой два икосаэдрических капсида или даже три. Капсиды могут обладать разными (Т) числами.

Геном в икосаэдрических структурах уложен очень плотно.

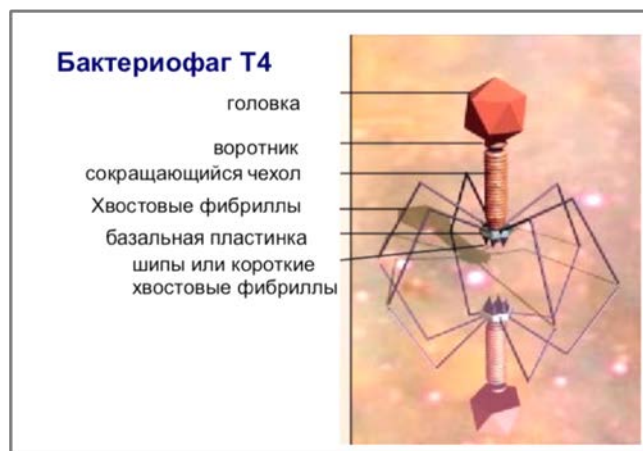


Рис. 20 Структура бактериофага Т4

Бактериофаг состоит из икосаэдрической вытянутой головки, воротника, сокращающегося чехла со стрежнем, базальной пластинки, шипов и хвостовых фибрилл.

Сложные вирусы

— состоят из белковой оболочки, генома и билипидного слоя, который вирус забирает у клетки, в которой он развивался. Мембрану он декорирует своими гликопротеидами. У этих белков можно выделить три домена: внешний, трансмембранный и так же иногда

бывает небольшой гидрофобный участок белковой молекулы, который погружен внутрь вирусной частицы.

Функции гликопротеидов:

- являются вирусными рецепторами, определяющими присоединение вириона к клетке
- обеспечивают проникновение капсида или всего вириона в клетку
- гликопротеины некоторых семейств вирусов обладают нейраминидазной активностью, которая атакует клеточные гликопротеины и гликолипидов при выходе дочерних вирусных частиц из клетки
- поверхностные гликопротеины являются антигенами, на которые вырабатывается иммунный ответ в инфицированном организме

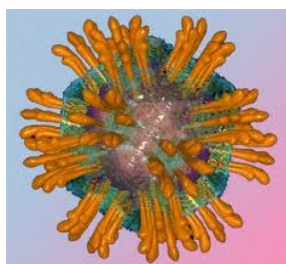


Рис. 21 Вирус Гепатита С

Между белковым капсидом и билипидной оболочкой может присутствовать хорошо растворимый вирус-специфический белок — матриксный белок. Он обеспечивает взаимодействие капсида вируса и билипидной мембраны, часто обладает ферментативной функцией, обычно РНК-зависимая-РНК-полимеразная активность.

Примером оболочечного вируса является вирус Гепатита С из сем. *Flaviviridae*, род. *Hepacivirus*. Отростки – белок Е. Геном одноцепочечный, позитивный, диаметр 50 нм, липопротеидная мембрана. Матриксного белка нет.

Существует два типа вирусов:

1. Внутренний белковый капсид — икосаэдр с нуклеиновой кислотой
2. Внутренний капсид — спиральная структура, взаимодействующая с нуклеиновой кислотой и укладывающаяся в спираль.

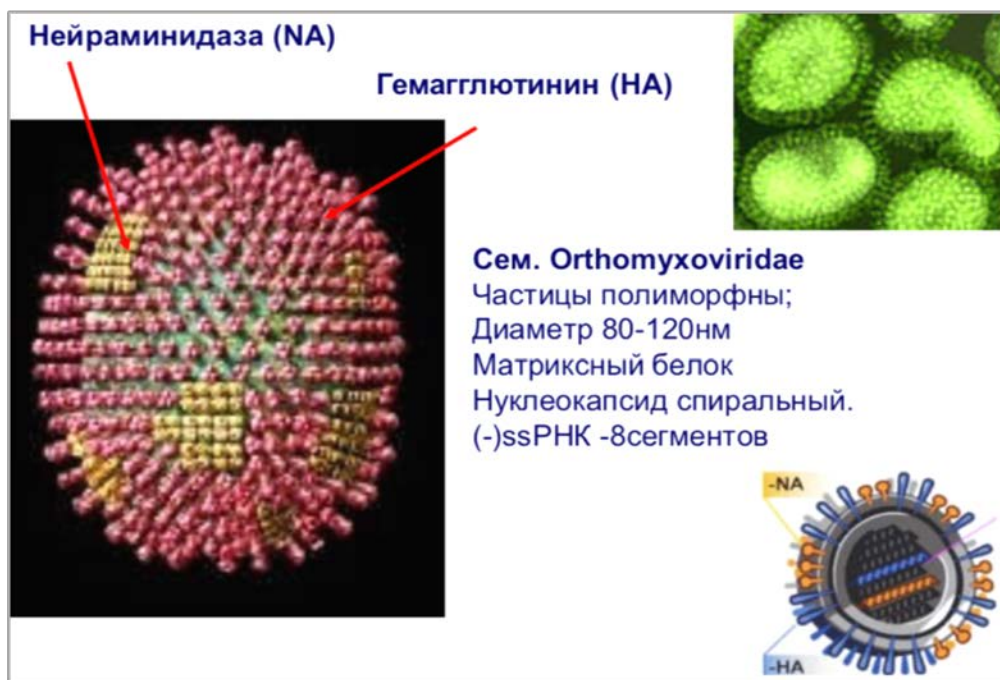


Рис. 22 Вирус гриппа А

Примером второго типа является вирус гриппа А (вирус гриппа человека). Мембрана покрыта двумя типами гликопротеидов: гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). Эти белки покрывают мембраны неравномерно.

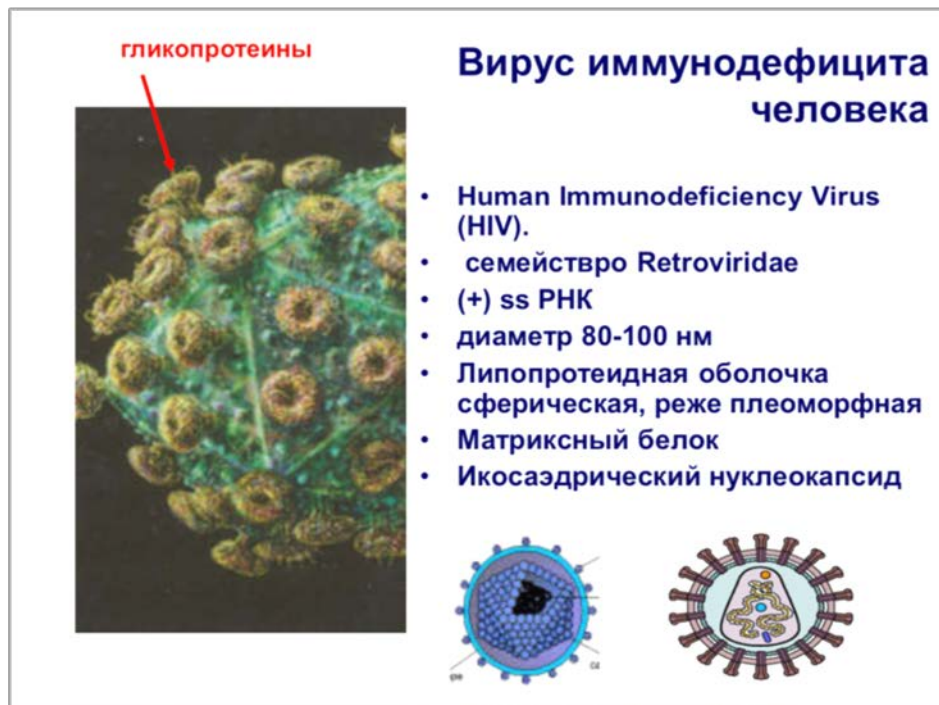


Рис. 23 ВИЧ характеристика

Внутри частицы 8-спиралевидных фрагментов. Геном вируса неразделенный, содержит 8 сегментов негативной одноцепочечной РНК. Каждая молекула РНК образует спиральную структуру с внутренним нуклео-капсидным белком.

Семейство ретровирусов необычно тем, что у них есть обратная транскрипция – образование РНК на матрице ДНК. Представитель — ВИЧ. Имеет положительную двухцепочечную РНК, две одинаковых молекулы РНК. Внутренний капсид ретровирусов представляет собой **икосаэдр грушевидной формы** (см. рис. 23), характерной именно для ВИЧ, мембрана декорирована одним видом гликопротеидов в отличие от вируса гриппа А.

Вирус бешенства

Вирионы рабдовирусов по форме напоминают пулю. Внутренний нуклео-капсид имеет спиралевидную форму. Длина 120-450 нм, диаметр 45-100 нм. Геном представляет собой одноцепочечную негативную РНК. Так же один тип гликопротеидов – гликопротеин G. Присутствует матриксный белок М.

Эбола

Имеет нитевидную форму. Диаметр 80 нм, длина 1,4 мкм. Геном негативной ss ДНК. Капсид образован рядом белков.

Вирус архей — *Betalipothrixvirus*. Частица веретеновидной формы, покрытая липидной мембраной. Длина 2мкм, диаметр 24 нм, двухцепочечная линейная ДНК. Внутренний, нуклео-капсид (или кор) имеет спиралевидную форму.

Все вирусные частицы поделены на 5 основных структурных форм:

1. Простой вирус с оболочкой в виде икосаэдра
полиовирусы, аденовирусы, вирус гепатита А, вирус мозаики костра
2. Спиральный простой вирус
ВТМ, бактериофаг М13 и др.
3. Оболочечный вирус, внутренний капсид – икосаэдр
вирус герпеса, краснухи, желтой лихорадки
4. Оболочечный вирус с спиралевидным кором.
вирус бешенства, гриппа, свинки
5. Комплексная симметрия
Бактериофаги Т4, вирус оспы (поксивирус)

Вирусная частица образуется в клетке и с помощью определенных механизмов, которые позволяют вирусу проворачиваться в цитоплазме и заворачиваться во внутренние мембранные структуры клетки.

*Катушечно-нитчатый вирус.

Палочка с отростками. Геном вируса – одноцепочечная кольцевая ДНК. Кольцо ДНК взаимодействует с белком оболочки вируса и образуются бусы. После кольцо сворачивается в спираль и наматывается, как нитки на катушку.

Первые этапы инфекции. Взаимодействие вируса с клеткой

I стадия: прикрепление вируса к клеточной стенке — адсорбция — специфическое взаимодействие вирусного белка, экспонированного на поверхности вириона, с клеточными рецепторами (гликопротеины или их углеводные остатки, гликолипиды). До определенного момента адсорбция обратима.

Многие крупные вирусы могут иметь более одного рецептора. На этапе адсорбции контролируется спектр хозяев. Например, вирус полиомиелита заражает только приматов и не заражает мышей. Но, если клетки мыши трансформировать так, чтобы на их поверхности появились специфические гликопротеины, то эти клетки будут заражаться вирусом.

II стадия: проникновение вируса в клетку

Есть два механизма преодоления вирусом клеточной мембраны:

1. эндоцитоз и образование внутриклеточной вакуоли

Этот путь используют простые вирусы без оболочки. Такие вирусы реплицируются в цитоплазме.

2. слияние липидной оболочки вируса с клеточной мембраной

Классический путь проникновения для оболочечных вирусов, но покрытые липидной оболочкой вирусы, тоже могут проникать в клетку путем эндоцитоза. Нуклео-капсид будет в цитоплазме в результате слияния липидной мембраны вируса и мембраны внутриклеточной вакуоли – эндолизосомы.

У бактерий есть специфические ферменты, которые могут взаимодействовать с клеточной стенкой и образовывать пору для проникновения нуклеиновой кислоты бактериофага. У растений такого нет. Фитовирусы не имеют рецепторов и не кодируют белков, которые могут разрушать клеточную стенку. Чтобы вирус растений проник в растительную клетку, необходимы микротравмы. Либо нужны вироформные насекомые, которые переносят вирусы растений на своем стилете (см. рис. 24).

Простой, безоболочечный (полиовирус): белок на поверхности капсида взаимодействует с рецептором, далее происходит образование эндосомы, в результате изменения pH, происходит структурная перестройка вирусной частицы и реализация генетического материала в цитоплазму клетки.

Оболочечный вирус (ретровирусы, псевдобешенство): поверхностные гликопротеиды взаимодействуют с рецепторами, находящимися на мембране клетки, происходит слияние мембраны вируса с мембраной клетки и реализация генетического материала нуклео-капсида в цитоплазму клетки.

Оболочечный вирус: взаимодействие с рецепторами, образование эндосомы с двойной липидной мембраной (вокруг мембрана клетки). Далее в результате ряда процессов (изменение pH, протеолитические воздействия ферментов на частицу) происходит слияние мембраны вируса с мембраной эндосомы и реализация генетического материала в цитоплазму.

Вариант для растительной клетки: трипса протыкает стилетом стенку и мембрану, вирусная частица в цитоплазме.

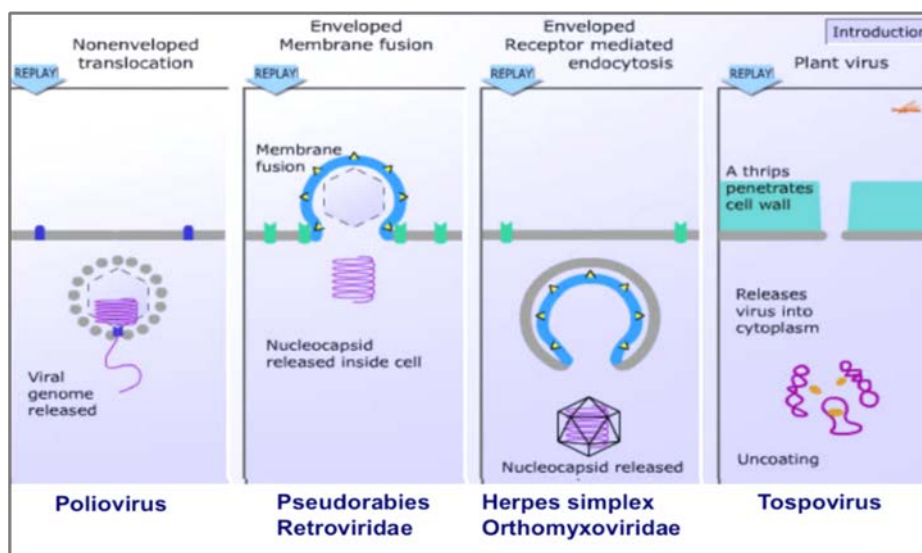


Рис. 24 Варианты проникновения вируса в клетку

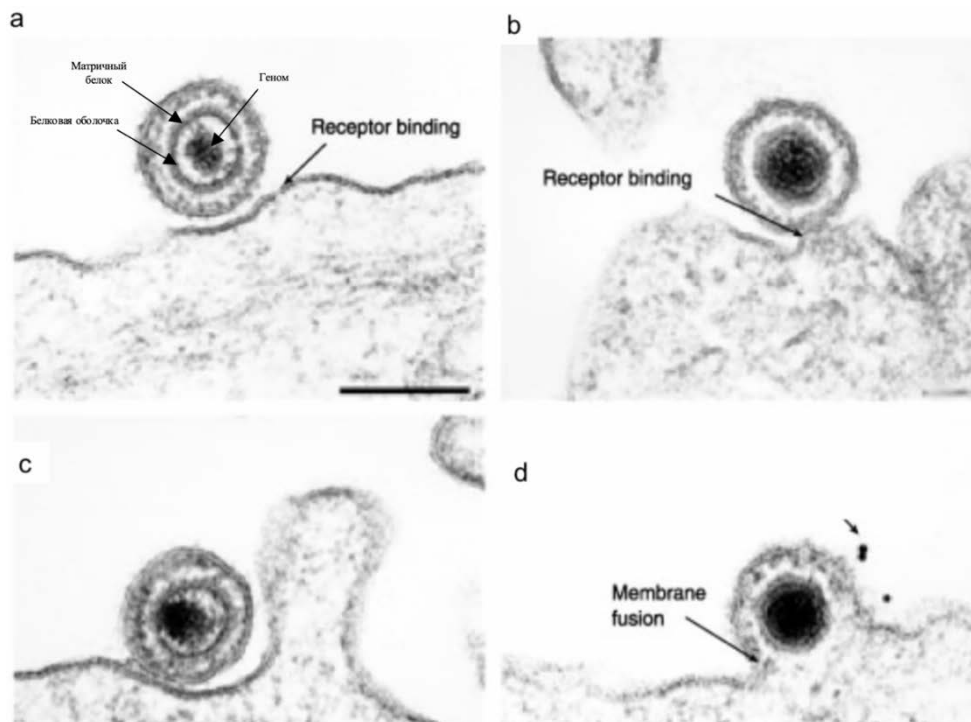


Рис. 25 Процесс слияние вирусной частицы с мембраной клетки

При слиянии мембран на поверхности клетки остаются гликопротеины вируса. Таким образом вирус дает сигнал, что клетка уже занята.

Существует так же ряд особенностей, характерных для проникновения вируса в клетку, независимых от условий проникновения.

- является энергозависимым процессом, поэтому вирусы проникают только в метаболически активные клетки.
- во время проникновения происходит структурная перестройка вириона, которая начинается после взаимодействия вируса с клеточным рецептором (на этапе адсорбции)
- радикальное изменение структуры вириона у многих вирусов происходит в эндолизосоме в результате воздействия кислых рН и(или) протеиназ эндолизосомы.

Бактериофаги используют активный механизм преодоления клеточной стенки. Они способны к перфорации, так как в состав вириона входят ферменты, расщепляющие компоненты клеточной стенки и образующие поры в ней. При этом все клеточные структуры бактериофага остаются на поверхности клетки, проникает только нуклеиновая кислота. На этапе адсорбции у бактериофага взаимодействуют с рецепторами только фибриллы. Когда шипы начинают взаимодействовать с

поверхностью клетки, взаимодействие уже необратимо, происходит конформационная перестройка базальной пластинки, которая состоит из белков 20 видов, в том числе лизоцима. После перестройки происходит активация лизоцима, образуется пора, происходит сокращение чехла и стержень бактериофага проникает в пору. После этого ДНК устремляется в клетку.

Сборка вирусных капсидов

У простых спиральных вирусов при взаимодействии белков с геномом образуется спиральная оболочка.

В случае икосаэдрических капсидов в зависимости от размеров и видов вируса может быть два варианта сборки

1. У небольших икосаэдрических вирусов нуклеиновая кислота взаимодействует с белком оболочки, не менее чем с димерами, иногда с капсомерами, состоящими из нескольких белков. Вокруг нуклеиновой кислоты выстраивается вирусная оболочка. Здесь нуклеиновая кислота выступает в роли шаперона сборки белковой капсиды.
2. Более сложные частицы собираются иначе. Механизм идет с использованием белков-лесов (строительные леса), которые потом не входят в состав зрелой частицы, они являются основой, на которой собирается капсида. **Scaffold** белки собираются первыми и на них образуется структура, которая станет в будущем прокапсидом – белковой оболочкой без нуклеиновой кислоты. Вокруг скаффолд белков образуется прокапсид, скаффолд белки протеолитически удаляются, в капсид входит нуклеиновая кислота и образуется зрелая вирусная частица.

Для плотной упаковки нуклеиновой кислоты нужна нейтрализация ее отрицательного заряда с помощью вирус-специфических нуклеокапсидных белков. Так происходит у РНК содержащих вирусов. У некрупных ДНК содержащих вирусов роль нейтрализации выполняют клеточные гистоны.

Независимо от степени сложности устройства вирусной частицы, структура вириона стабилизирована главным образом электростатическими и гидрофобными связями между ее компонентами. Практически не бывает ковалентной связи между нуклеиновой кислотой и субъединицами белка оболочки.

Для сборки крупных или сложно устроенных вирусов помимо скаффолд белков существует еще один сценарий. У бактериофагов сначала собираются преформированные белковые блоки – отдельные морфологические единицы оболочки вириона, которые позже соберутся в частицу. У бактериофага Т4 сначала выстраивается головка из скаффолд белков и белков, которые далее будут содержаться в зрелом

вирионе. В эту головку встраивается ДНК вируса, скаффолд белки уходят, а белки, которые войдут в вирусную частицу меняют свою конформацию, икосаэдр вытягивается (характерно для бактериофага Т4). Параллельно с этим пластина с микрофибриллами взаимодействует со стержнем. Далее на эту структуру надевается чехол и этот преформированный блок с микрофибриллами взаимодействует с головкой бактериофага. На последнем этапе идет взаимодействие с длинными фибриллами.

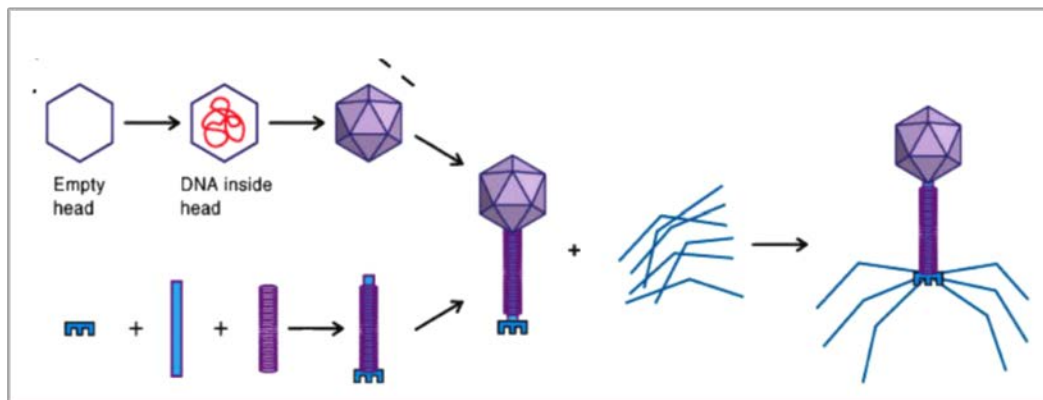


Рис. 26 Сборка Бактериофага Т4

На данный момент лучше всего изучен процесс сборки у ВТМ.

Молекулы белка оболочки вируса взаимодействуют между собой и собираются в комплексы, состоящие из тримеров – А-белки, которые образуют диск с каналом внутри. Один диск взаимодействует с другим, и они образуют новый двухслойный диск. Далее эта структура взаимодействует с origin of assembly – участком генома ВТМ. Такие участки первыми взаимодействуют с белковыми структурами при сборке вируса. Он расположен в тысячи нуклеотидов с 3'-конца молекулы. Далее этот участок просовывается внутрь двухслойного диска. При взаимодействии нуклеиновой кислоты с двухслойным диском происходят конформационные белковые изменения: диски поворачиваются один относительно другого (шайба Гровера). Далее новый двухслойный диск надевается сверху на эту петлю, снова взаимодействуя с участком. Так образовывается частица. В какой-то момент почти вся нуклеиновая кислота оказывается внутри белковой спирали ВТМ. Но остается не одетым 3'-конец, он достраивается А-белком так, что вся кислота оказывается защищенной белковой оболочкой.

Такая сборка может происходить в пробирке, в воде или в буфере. Так вирионы получается использовать в нано технологиях. Такие частицы можно получить и без нуклеиновой кислоты в определенных условиях.

Есть опыт, где собирался капсид ВТМ *in vitro* без нуклеиновой кислоты. Поворот слоев и образование спирали происходит благодаря изменению pH, дальше стопки дисков собираются один над другим и образуется частица, неотличимая по морфологии от вирусной частицы.

Типы вирусных инфекций. Выход вирусного потомства из зараженной клетки

В зависимости от того, каким способ выходят вирусные частицы из зараженной клетки инфекции делятся на разные виды.

1. Продуктивная инфекция

При такой инфекции в клетке сначала появляется вирусная нуклеиновая кислота, инициируется синтез вирус-специфических белков, репликация вирусного генома. Вирусный и клеточный геномы функционируют совместно, в результате чего вирус размножается с образованием дочерних частиц. Все это называется **жизненным циклом вируса**. У разных групп разное время с момента проникновения вируса в клетку до момента образования дочерних вирионов. У бактериофага Т4 это 20-30 минут. У вируса полиомиелита – 6-8 часов. У вируса герпеса - 40 часов.

Литическая продуктивная инфекция: дочерние вирионы высвобождаются в результате лизиса клетки хозяина. Предположительно, в условиях дефицита питательного субстрата и/или непермиссивной температуры более вероятно развитие лизогенного цикла, в хороших ростовых условиях – литического.

Персистирующая продуктивная инфекция: нуклеиновая кислота взаимодействует с капсидными белками – образуется рибонуклеопротеид. Матриксный белок выстилает с внутренней стороны мембраны тот участок, от которого будет отпочковываться вирус. Рибонуклеопротеид (будущий нуклеокапсид), состоящий из вирусного генома и капсидных белков, взаимодействует с матриксным белком. Тот же участок мембраны, который выстилает матриксный белок, будет декорироваться вирусными гликопротеидами. Далее происходит выпячивание этого участка и отшнуровывание зрелой вирусной частицы.

2. Абортивная инфекция

Нуклеиновая кислота попадает в клетку, но зрелые вирусные частицы не образуются. Прерывание жизненного цикла вируса может происходить на любой стадии.

3. Интегративная форма продуктивной инфекции

Происходит взаимодействие вирусного и клеточного генома. Геном вируса ковалентно связывается с частью генома клетки хозяина и реплицируется вместе с клеточной ДНК. Лизиса клеток нет, дочерние вирусные частицы не образуются – лизогения. (бактериофаг лямбда).

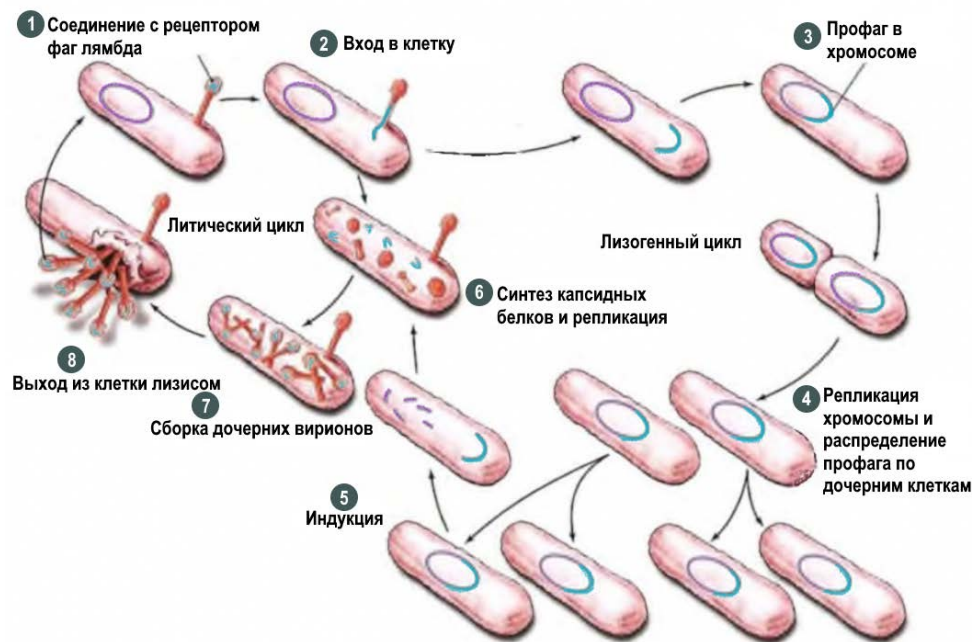


Рис. 27 Схема литического и лизогенного циклов Бактериофага лямбда

4. Интегративно-продуктивная инфекция

Интеграция вирусного и клеточного генома с трансформацией зараженной клетки, иногда после трансформации клетки происходит образование дочерних вирусных частиц. Пример: ретровирус «вирус саркомы Рауса».

**Вирусы растений действуют иначе. Дочерние частицы вируса проникают в соседние клетки по плазмодесмам и по сосудам флоэмы, постепенно распространяясь по всему растению. Во внешнюю среду они выходят только после гибели растения.*

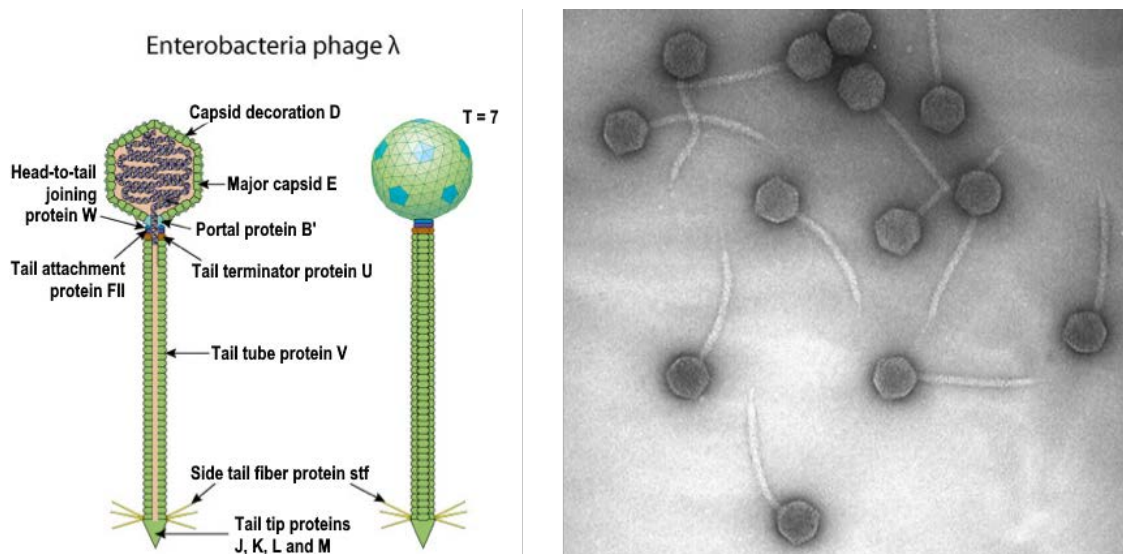


Рис. 28 Схема строения бактериофага лямбда слева и фотография бактериофага лямбда справа

Лекция 3

Классификация вирусов

В 1966 году в Москве Международный Микробиологический конгресс создал МКТВ — Международный комитет по номенклатуре вирусов (позже переименован в Международный комитет по таксономии вирусов, International Committee of Viruses – ICTV).

Задача: подготовка и издание докладов по принятой на данный момент таксономии и номенклатуре вирусов. Правило, которые устанавливаются новейшим докладом обязательны для всех научных работ. Система классификации вирусов стремительно меняется. Девятый доклад вышел в 2011 году, было определено, что существует более 2200 видов вирусов и около 87 семейств. В 2005 году было 73 семейства. Все равно остаются вирусы не систематизированные до сих пор. В 2017 году вышел десятый доклад, где количество известных видов вирусов составило 4404. Между выпусками репортов выходят таксономические листы.

Основная характеристика, используемая в классификации – природа генома и структура вириона.

Табл. 1 Классификация вирусов

Нуклеиновая кислота	• ДНК или РНК • одно- или двухцепочечная нуклеиновая кислота • сегментированный геном или нет • линейный или кольцевой • если РНК – какой полярности • диплоидный геном (ретровирусы)
Структура вириона	• икосаэдрическая, спиральная или комплексная симметрия • наличие липопротеидной оболочки • число капсомеров

Квазивид – дочерняя частица, образовавшаяся при ошибке в репликации генома, не является идентичной родительской частице. Может оказаться устойчивой к последней репликации.

Процесс видообразования идет непрерывно, поэтому не всегда легко определить, является ли обнаруженная частица новым видом или это штамм уже известного вируса.

Вирусный вид является политипической категорией (классом) вирусов, которая составляет реплицирующуюся линию и занимает особую экологическую нишу.

У систематики вирусов нет филогенетических основ. Это связано и с молодостью науки, и с недостатком экспериментальных данных о происхождении видов.

Наименование вирусов

- Вирусы классифицируют по порядкам, семействам, родам и видам
- Порядки имеют латинское название с суффиксом -virales; семейства и подсемейства – с суффиксами, соответственно, –viridae и -virinae
- Названия родов оканчиваются суффиксом – virus
- В порядки сгруппированы далеко не все вирусы

Бинарной номенклатуры для названия вида вируса не применяется, вместо этого используют английские названия, так же названия основываются на данных, полученных в момент открытия вируса.

➤ Заболевание, вызываемое вирусом:

Вирус оспы, Вирус гепатита, ВИЧ, Вирус кори

➤ Патология клетки, возникающая при протекании инфекции:

Респираторный синцитиальный вирус человека, Цитомегаловирус

➤ Местоположение инфекции:

Аденовирусы, Энтеровирусы, Риновирусы

➤ Место открытия, имя ученого, открывшего вирус и т.д.:

Вирус Эпштейна-Барр, Вирус саркомы Рауса, Вирус лихорадки долины Рифт

➤ Биохимические, морфологические свойства:

Ретровирусы, Пикорновирусы

Классификация по Балтимору

В 1971 Дэвид Балтимор предложил классификацию согласно **генетическому материалу** (типу нуклеиновой кислоты) и выделил 6 групп, позже выделили еще две:

- (I) вирусы, содержащие двунитевую - dsДНК;
- (II) вирусы, содержащие однонитевую - ssДНК;
- (III) вирусы, содержащие двунитевую - dsРНК;
- (IV) вирусы, содержащие однонитевую ss(+) РНК;
- (V) вирусы, содержащие однонитевую ss(-) РНК;
- (VI) РНК-содержащие вирусы, жизненный цикл которых включает стадию обратной транскрипции;
- (VII) ДНК-содержащие вирусы, жизненный цикл которых включает стадию обратной транскрипции;
- (VIII) субвирусные агенты
(вириды, вирусы-сателлиты, сателлитные нуклеиновые кислоты и прионы)

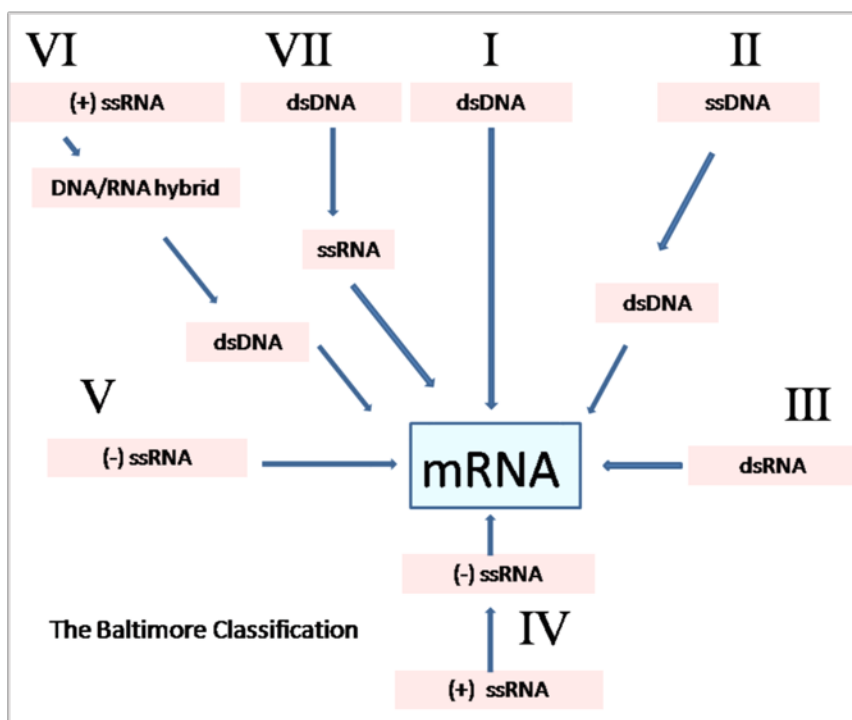


Рис. 29 Схема классификации вирусов по Балтимору

- (I) Двухцепочечная ДНК dsDNA, матричная РНК образуется на самом геноме.
- (II) Для одноцепочечного генома ssDNA нужен интермедиат (промежуточная форма), то есть на одноцепочечной ssДНК должна образоваться комплементарная цепь, двухцепочечная репликативная форма dsДНК станет матрицей для образования РНК, которая уже будет способна направлять вирус специфические белки.

- (III) На двуцепочечной dsRNA напрямую может образовываться информационная РНК вируса.
- (IV) Если геном – позитивная (+) RNA, то она сама способна направлять синтез вирус специфических белков, тем не менее для образования матричной РНК в процессе инфекционного цикла должна образоваться промежуточная репликативная форма – комплементарная геномной РНК антигеномная минус ssРНК.
- (V) Геном - негативная (-)RNA, прямо на ней по принципу комплементарного синтеза могут образовываться информационные вирусные РНК.
- (VI) Геном представлен одноцепочечной положительной (+)RNA, но в репликативном цикле участвует образование ДНК на РНК, то есть идет процесс обратный транскрипции. На РНК образовывается одноцепочечная ДНК, далее на этой одноцепочечной ДНК образуется двуцепочечная ДНК, и только с нее уже могут образовываться информационные вирусные РНК.
- (VII) Ретроидные вирусы или параретровирусы. Геном - двуцепочечная ДНК, так же присутствует интермедиат – ssRNA, который является матрицей для образования информационной РНК.

Общие схемы репликации вирусов

Процесс проникновения вируса в клетку завершается появлением внутри клетки его нуклеиновой кислоты. Дальнейшая стратегия размножения вируса определяется природой его генома. После проникновения в клетку вирусу нужно:

1. Обеспечить репликацию вирусного генома. Нужно синтезировать матричные РНК, которые смогут транслироваться с образованием вирус специфических белков с использованием аппарата трансляции клетки хозяина.
2. Обеспечить упаковку дочерних молекул генома, вирион и выход, то есть продукцию дочерних вирионов.
3. Влиять на структуру и функцию клетки хозяина.

Некоторые ферменты полимеразного типа

- **ДНК-зависимая ДНК-полимераза** – осуществляет синтез ДНК на матрице ДНК (нужна затравка)- DNApol. Добавляет свободные нуклеотиды к 3'-концу собираемой цепочки, это приводит к элонгации цепочки от 5' к 3' концу. Ни одна из известных ДНК полимераз не может сделать цепочку с нуля. Обязательно нужен праймер, свободный 3'-гидроксил. У вирусов большое разнообразие

праймеров для репликации ДНК-геномов. Это могут быть РНК-затравки, ДНК-затравки, то есть состоящие из нескольких нуклеотидов РНК и далее из нуклеотидов ДНК. У вирусов существуют белковые затравки, то есть затравкой является молекула белка.

- **ДНК-зависимая РНК-полимераза** – осуществляет синтез мРНК на матрице ДНК - RNAPol. У прокариот существует два типа таких полимераз. У эукариот все типы клеточных РНК синтезируются разными ДНК-зависимыми РНК-полимеразами.
- **РНК-зависимая РНК-полимераза** – осуществляет синтез РНК на матрице РНК. Выполняет функции транскриптазы и репликазы - **RdRp, REP**. В клетке такого фермента нет, он там не нужен. Этот фермент может одновременно выполнять функцию, как транскриптазы, так и репликазы.
- **РНК-зависимая ДНК-полимераза** (обратная транскриптаза, ревертаза) – осуществляет синтез ДНК на матрице РНК. Присутствует только у вирусов. Осуществляет синтез ДНК на матрице РНК. Этому ферменту так же необходима затравка. Может обладать другими ферментативными активностями: активность РНКазы Н. Фермент способен разрушать РНК в гетеродуплексе ДНК/РНК. Другая активность – интеграз, способствует встраиванию генома ретровирусов в геном клетки.

Стратегия репликации у вирусов с dsДНК

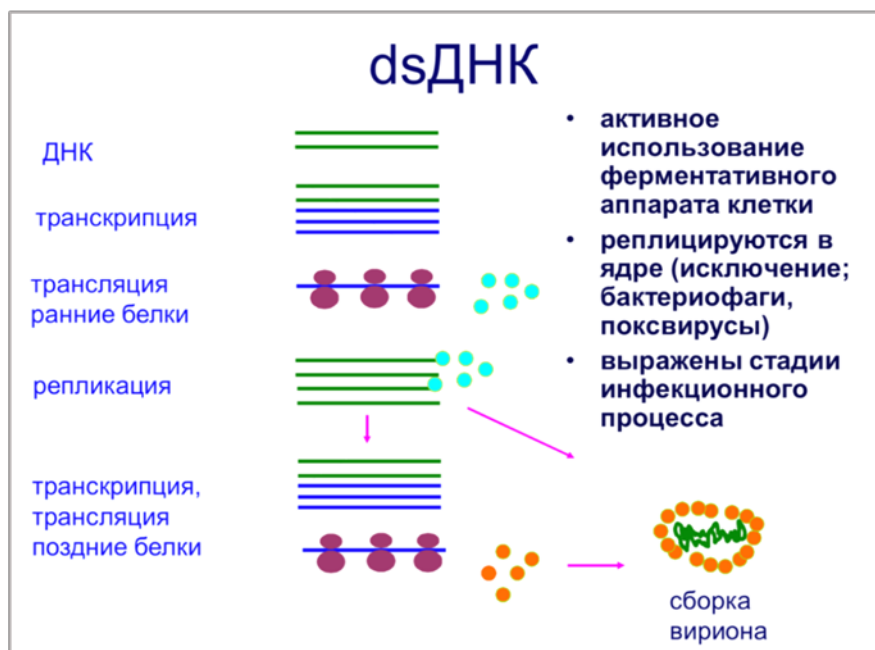


Рис. 30 Общая схема репликации у вирусов с двуцепочечной ДНК

1. Транскрипция. На двуцепочечной ДНК образуются вирус специфические транскрипты. Синий цвет (см. рис. 30) – РНК способны направлять синтез белков.
2. Трансляция. Транскрипты транслируются с образованием белков, которые являются не структурными, а функциональными, то есть белки с ферментативной активностью.
3. Репликация. С помощью вирус специфических белков происходит репликация генома, при этом одновременно часть молекул дочерних уходит в сборку. Другая часть двуцепочечной ДНК является матрицей для образования транскриптов, которые направляют синтез уже структурных белков, которые будут образовывать созревшую вирусную частицу. В итоге мы имеем дочернюю ДНК, структурные белки и из этого далее образуется вирион.

У двуцепочечных ДНК репликативный цикл четко делится на раннюю и позднюю стадию. До репликации – ранняя стадия инфекции, после – поздняя. Транскрипты соответственно бывают ранними и поздними. Такие вирусы активно используют ферментативный аппарат клетки, реплицируются в ядре (за исключением бактериофагов; поксвирусов, которые реплицируются в цитоплазме).

Стратегия репликации у вирусов с ssДНК

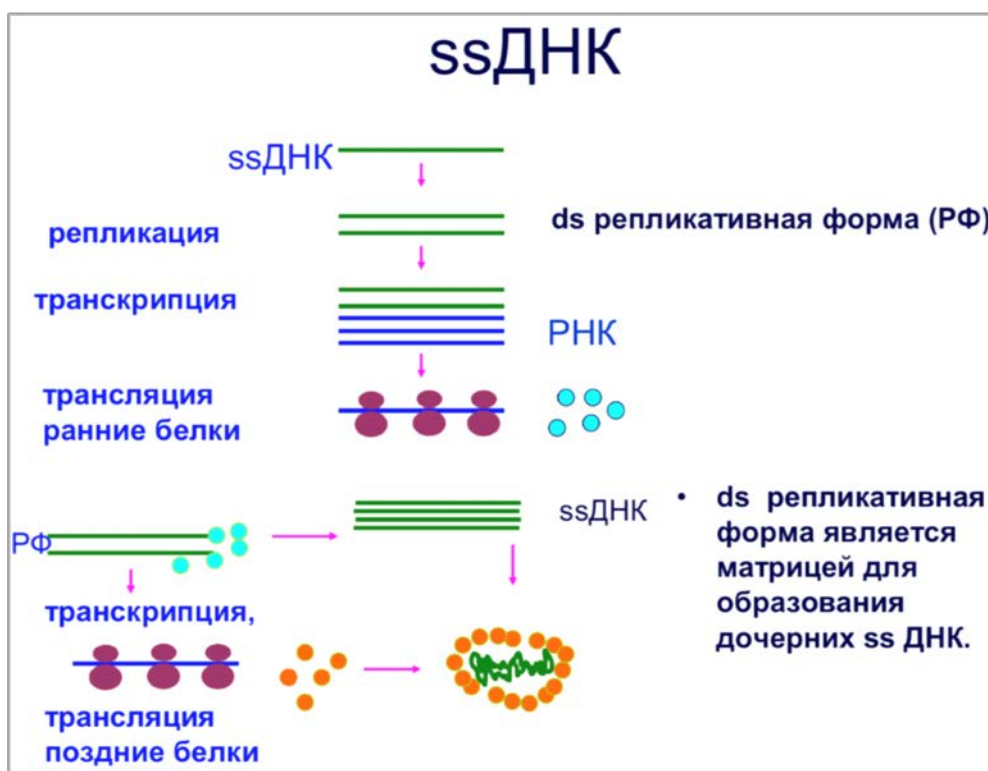


Рис. 31 Общая схема репликации у вирусов с одноцепочечной ДНК

Репликации одноцепочечной ДНК очень похожа с репликацией двуцепочечной ДНК. Разница есть в первом этапе. Вместо транскрипции первой будет **дупликация генома**

(см. рис. 31). Образование на одноцепочечном геноме комплементарной цепочки, новая двуцепочечная форма будет называться репликативной, так как с нее будет происходить

1. Считывание ранних транскриптов
2. Трансляция транскриптов с образованием ранних функциональных белков
3. Образование дочерних одноцепочечных геномов.
4. Поздняя транскрипция с образованием поздних транскриптов
5. Трансляция поздних транскриптов → образование структурных белков → вирусная частица

Стратегия репликации у вирусов с ssРНК

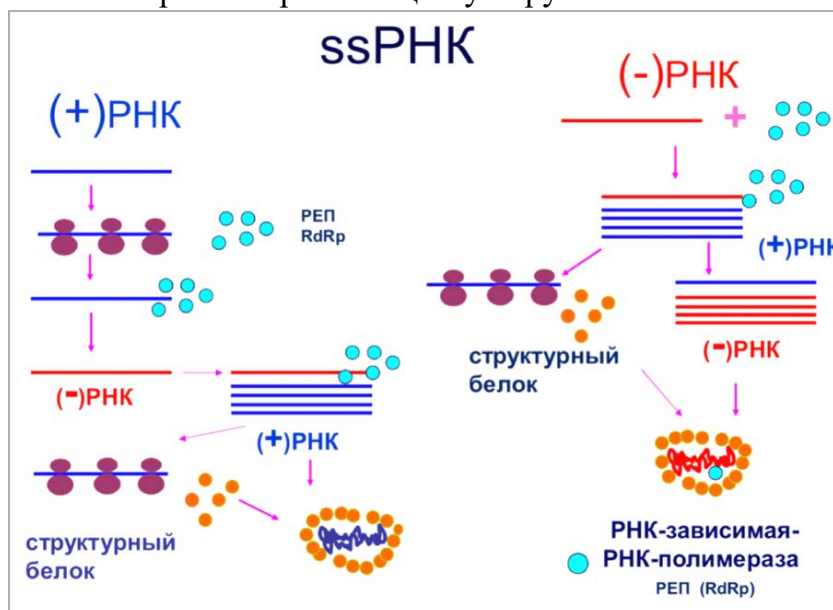


Рис. 32 Общая схема репликации у вирусов с одноцепочечной РНК

Геном синего цвета – это (+)РНК, способна направлять синтез белков (см. рис. 32), геном красный – это (-)РНК, не может транслироваться.

Если геном – позитивная РНК, то первым этапом идет синтез фермента РЕП или **РНК-зависимой РНК-полимеразы**, так как без этого фермента инфекционного цикла вируса не будет. Далее на матриксе генома начинается образование антигеномной (-)РНК. На этой РНК с использованием фермента образуются путем комплементарного синтеза дочерние геномы (+) РНК. Эти молекулы (+)РНК одновременно являются геномами в созревших частицах и используются вирусом для трансляции структурных белков, которые входят в состав частиц.

В случае с (-)РНК в клетку сразу вносится фермент. Первым актом будет синтез (+)РНК с помощью фермента и матрицы генома вируса. Эта (+)РНК потом будет направлять синтез структурных и функциональных белков, так же она является основой для

репликации дочерних геномов. Далее идет сборка дочерних геномов и структурных белков и в частице обязательно должна быть хотя бы одна молекула фермента.

Ферментативной активностью обладают неструктурные белки.

Стратегия репликации у ретровирусов с (+) ssРНК

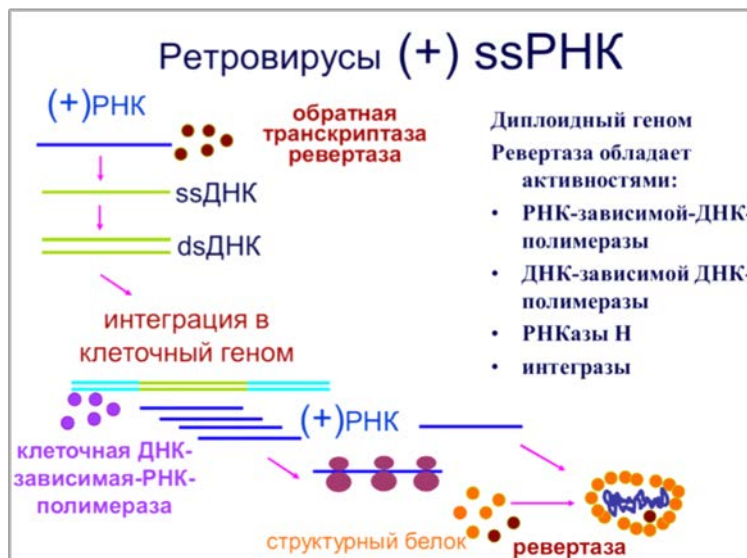


Рис. 33 Общая схема репликации у ретровирусов с положительной одноцепочечной РНК

РНК в клетку должна попасть с ферментом транскриптазой и ревертазой.

1. На матрице (+)РНК с помощью фермента образуется одноцепочечная ДНК. Это же фермент обеспечивает синтез второй цепочки на одноцепочечной. Образуется dsДНК и интегрирует в клеточный геном.
2. Клеточная ДНК-зависимая-РНК-полимераза может транскрибировать клеточный геном с другими генами клетки, образуются матричные (+)РНК. Они будут направлять синтез вирус специфических белков.
3. В вирусную частицу обязательно входит фермент



Рис. 34 Ретроидные вирусы

К ретроидным вирусам относится вирус гепатита В

(+) РНК-содержащие вирусы

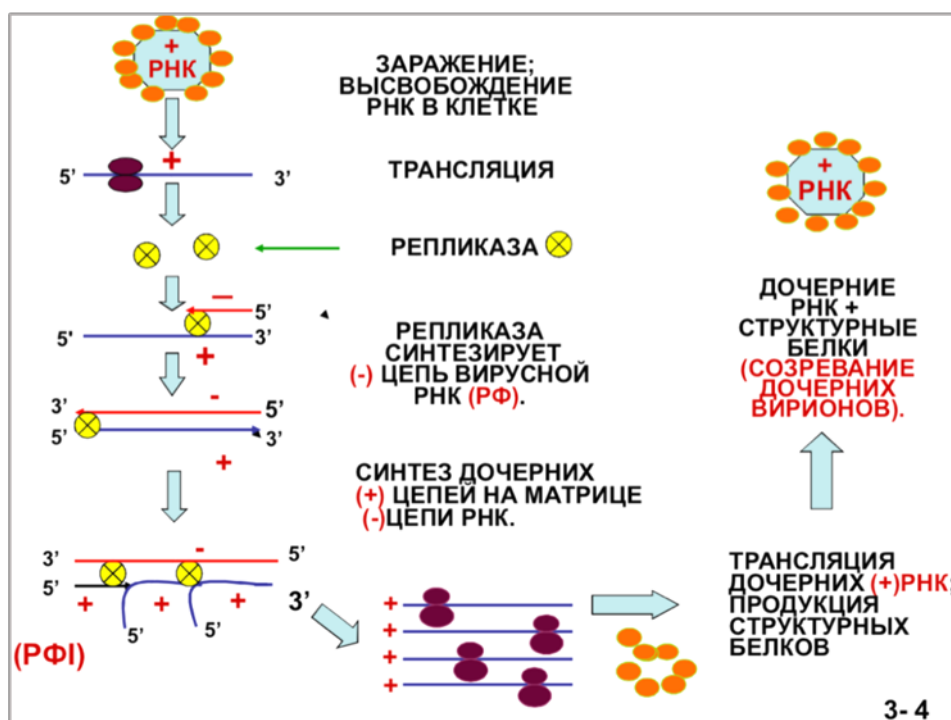


Рис. 35 Общие принципы репликации (+)РНК содержащих вирусов

На (+)РНК может одновременно образовываться несколько (-)РНК, аналогично и обратное.

Хвостатая структура, где матрица (-)РНК – Репликативная Форма I (РФИ)

Где матрица (+)РНК – РФ II

РНК-содержащие бактериофаги

- Семейство: **Leviviridae**
- Группа IV
- (+) ss РНК (3600-4200 нт)
- Род *Levivirus* (бактериофаг MS2)
- Род *Allolevivirus* (бактериофаг Q β) позволил открыть триплетный код

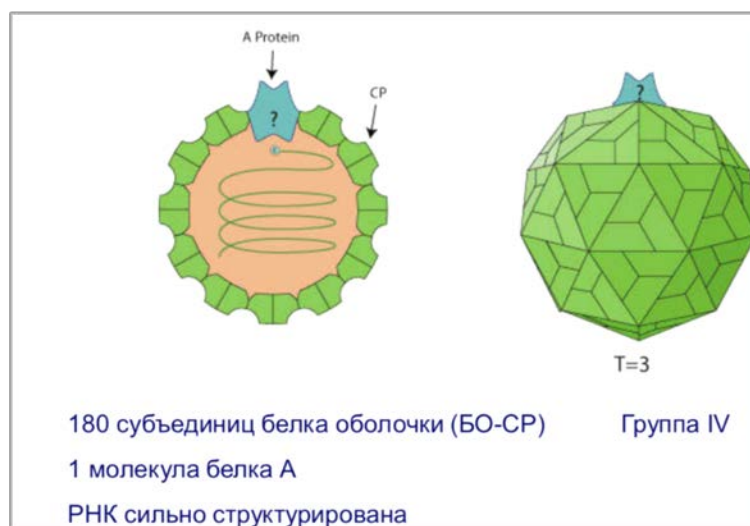


Рис. 36 Схематическое изображение РНК-бактериофагов семейства *Leviviridae*

У *E. coli* атакует только мужские клетки, содержащие f-плазмиду, прикрепляясь А-белком к клеточному рецептору на боковой поверхности полового пиле.

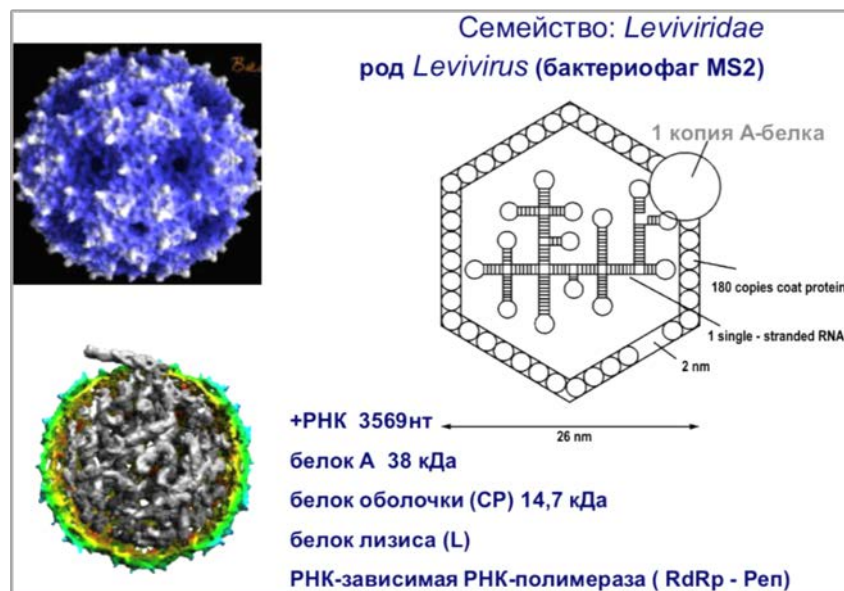


Рис. 37 Краткая информация о бактериофаге MS2



Рис. 38 Структура генома бактериофага MS2

Активно используется перекрывание. На 5'-конце находится ген белка А, далее белок оболочки, в конце ген репликазы. Начало гена лизиса в конце БО, конец приходится на начало РЕП. На участок между БО и РЕП есть участок, для которого существует регуляторная шпилька (см. рис. 38), играющая важную роль при сборке вирусной частицы.

Как идентифицировать клеточные белки среди вирусных белков?

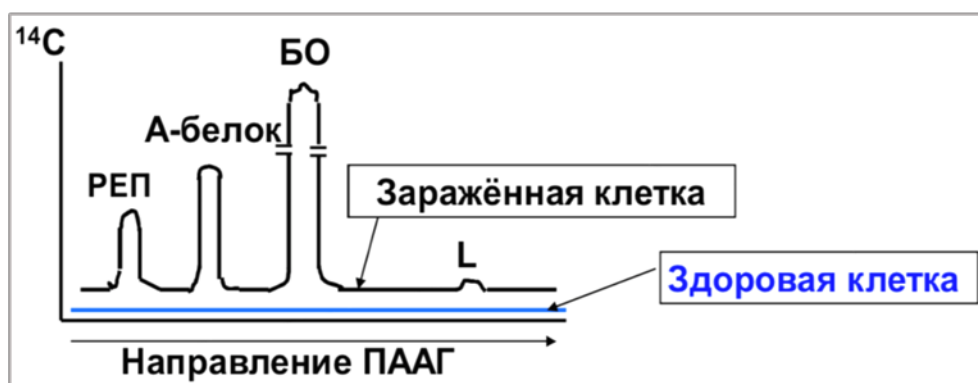


Рис. 39 Синтез вирус-специфических продуктов при подавлении синтеза клеточных белков

Иногда вирус сам подавляет синтез вирусных белков, можно искусственно добавить антибиотики в среду или облучить бактерии UV. В следствие э того прекратится транскрипция клеточных мРНК и прекратится трансляция, так как синтезированные мРНК быстро распадаются. Вирусные РНК продолжают транслироваться и реплицироваться, используя клеточные ресурсы. То есть, если добавить меченые кислоты, они будут включаться в вирус специфические белки, которые можно выявить с помощью электрофореза в ПААГ.

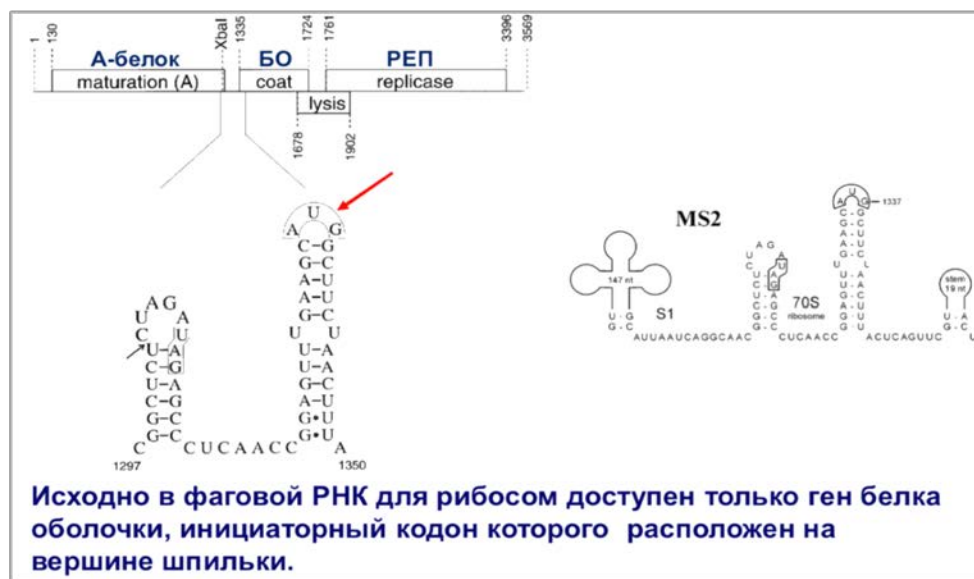


Рис. 40 Структура генома бактериофага MS2

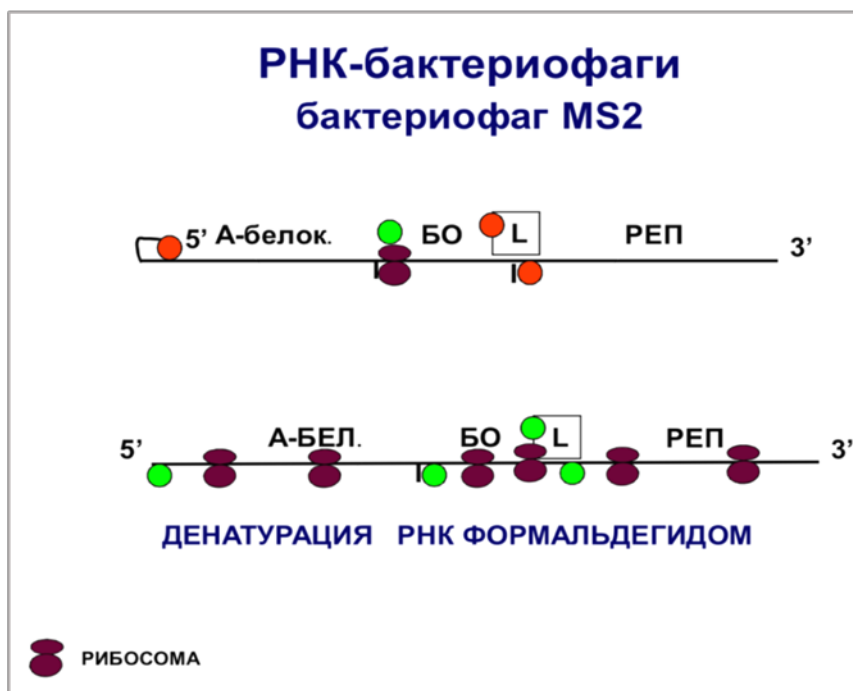


Рис. 41 Схема синтеза белков бактериофага MS2

Красным показаны стоп-коды в AUG кодонах А в белках (см. рис. 41), зеленым свет дан трансляции БО бактериофага MS2.

РНК обработали формальдегидом и полностью разрушили вторичную и третичную структуры молекулы. При добавлении такой матрицы в бесклеточную белоксинтезирующую систему одновременно начинают транслироваться все 4 гена бактериофага.

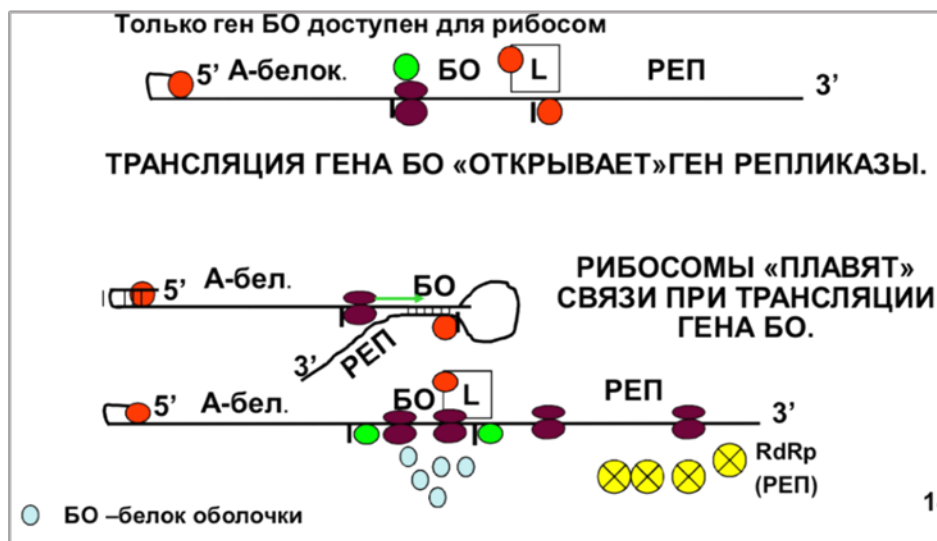


Рис. 42 Трансляция генов бактериофага MS2

Если провести сайт-направленный мутагенез и вставить в середину БО стоп-кодон, чтобы рибосоме не удавалось прочесть БО до конца, то трансляция полимеразы не начиналась.

Если же просто заменить ряд кислотных остатков в составе белка, то белок не собирался в вирусные частицы. Оказалось, что:

- БО обладает сродством к инициаторному участку гена РЕП, специфически связывается с ним и блокирует считывание гена рибосомой.
- Вскоре после начала инфекции трансляция гена РЕП оказывается подавленной.
- БО фага выполняет две функции: он является структурным белком и репрессором трансляции.

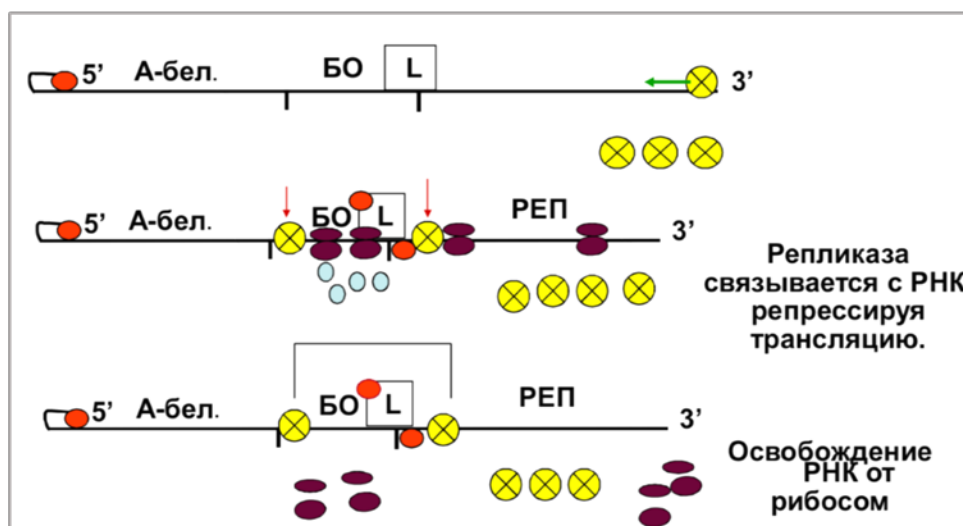


Рис. 43 Репликация бактериофага MS2

Репликаза, которая имеет сродство к 3'-концу (+)РНК молекулы, связывается с ним и реплицирует геном бактериофага. Репликаза связывается со стартом гена БО и гена репликазы и останавливает синтез этих белков. Далее происходит переключение с трансляции на репликацию. Репликаза едет и «скидывает» рибосомы с РНК.

- Репликаза (RdRp-Реп) фага выполняет две функции: она является собственно репликазой и репрессором трансляции БО и Реп.
- Репликаза убирает конкуренцию между трансляцией и транскрипцией.
- Для образования активного РНК –полимеразного комплекса Репликаза должна связаться с белками клетки-хозяина (рибосомальный белок S1, факторы элонгации трансляции EF-Tu и EF-Ts).

Частота связывания репликазы с (-)РНК выше, чем с (+)РНК, так как вторых нужно больше для успешной репликации в клетке.

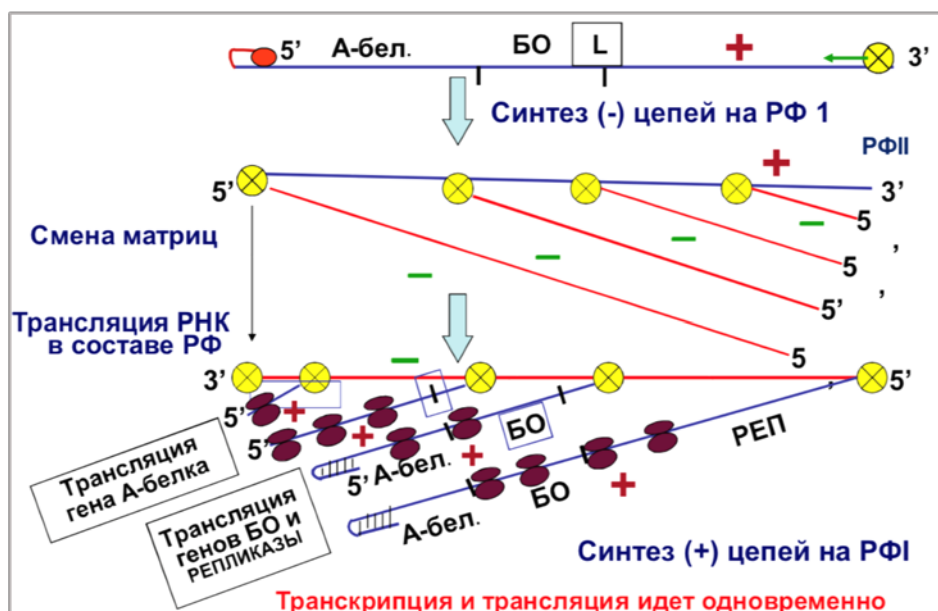


Рис. 44 Репликация бактериофага MS2. Схема

На (-)РНК начинается синтез (+)РНК. Когда только начинается образование 5'-конца (+)РНК в этот момент вторичная структура, присутствующая на 5'-конце геномной молекулы и закрывающая AUG-кодон А белка еще не создана. Рибосомы могут взаимодействовать с AUG-кодомом белка А, находящимся на 5'-конце (+)РНК. Начинается трансляция белка А. Идет трансляция, наращивается цепочка (+)РНК, начался синтез БО. В момент, когда есть достаточно нуклеотидов происходит схлопывание 5'-конца (+)РНК молекулы и трансляция белка А прекращается.

На одну вирусную часть 1 молекула белка А. В репликативном цикле образуется столько же, сколько образуется дочерних (+)РНК.

Доступен и ген лизиса, который работает только после трансляции гена БО.

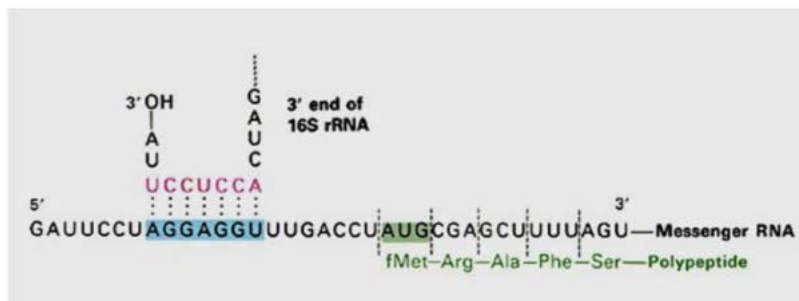


Рис. 45 Последовательность Шайна-Дальгарно

У гена белка лизиса последовательности Шайна-Дальгарно нет. Эффективность синтеза мала.



Рис. 46 Перекрывание рамок трансляции. Ген лизиса

- После накопления (+)РНК, БО и А-белка начинается образование дочерних частиц.
- Белок А образует комплекс с (+) нитью РНК фага. Комплекс является матрицей для формирования вокруг него капсида из БО
- БО связывается с регуляторной шпилькой на РНК
- Вокруг РНК происходит формирование (сборка) капсида из белка оболочки
- Лизис клетки, реализация дочерних вирусных частиц

За час образуется до 10тыс дочерних частиц.

- У фага РНК-содержащих бактериофагов наблюдается четкая временная регуляция экспрессии генов.
- Определяющую роль играет вторичная структура РНК.
- Процесс транскрипции сопряжен с процессом трансляции.
- БО – ингибитор трансляции гена РЕП.
- РЕП – ингибитор трансляции гена БО и гена РЕП.

Лекция 4

Геном MS2 полицистронный, значит в одной молекуле закодировано несколько генов (ген БО, лизиса, репликазы, белка А).

У эукариот моноцистронный геном, инициации трансляций начинается на первом AUG кодоне с 5'-конца. Вирус сталкивается с проблемой, так как в клетке эукариот аппарат трансляций способен экспрессировать только 5' дистальные гены.

(+) РНК-содержащие вирусы эукариот
Синтез белка у (+)РНК-содержащих вирусов эукариот



Рис. 47 Трансляция вирусных мРНК в эукариотических клетках

На рис. 47 изображена вирусная бицистронная матрица.

Субъединицы рибосомы образуют комплекс идет сканирование матрицы до первого АУГ, синтез первого 5'-дистального гена вируса и рибосома уходит, часть информации считываться не должна. Но вирус придумал, как экспрессировать 3'-дистальные гены:

1. Транскрибировать специальные РНК для трансляции вирусных белков (субгеномные РНК – сг РНК);
2. Транслировать большой белок –предшественник и разрезать его на меньшие протеины;
3. Создать сайт внутренней посадки рибосомы;

1. Транскрибирование субгеномных РНК

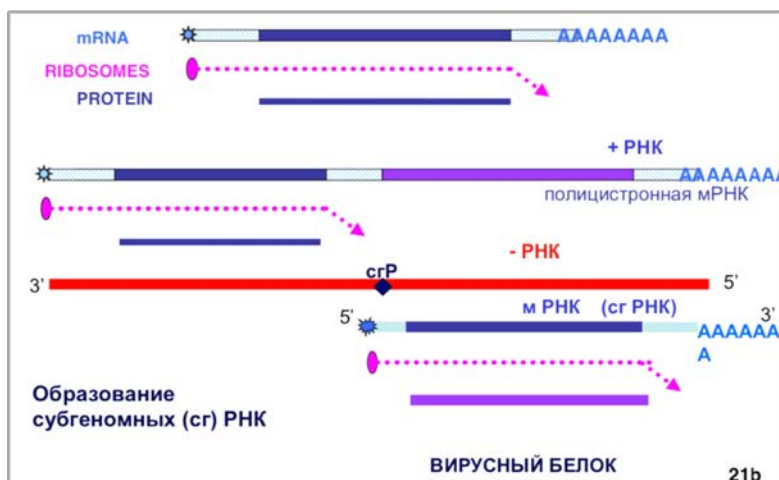


Рис. 48 Транскрибирование субгеномных РНК

Имеется полицистронная матрица, образовался протеин, соответствующий гену, который находится на 5'-конце матрицы. Далее фермент РНК-зависимая РНК-полимераза запускает репликацию всего генома вируса. На (+)РНК образуется (-)РНК. В составе (-)РНК матрицы существует участок субгеномный промотор. Фермент РНК-зависимая РНК-полимераза имеет сродство к этому промотору и может реплицировать (-)РНК не только полноразмерную, но и кусок, соответствующий 3'-концу молекулы. Образуется (+)РНК матрица, в ее составе есть 3'-дистальный ген. Тогда рибосомы эукариотической клетки взаимодействуют с 5'-концом, образуется инициаторный комплекс и считывается информация 3'-дистального гена.

2. Трансляция большого белка –предшественника и разрезание его на меньшие протенины

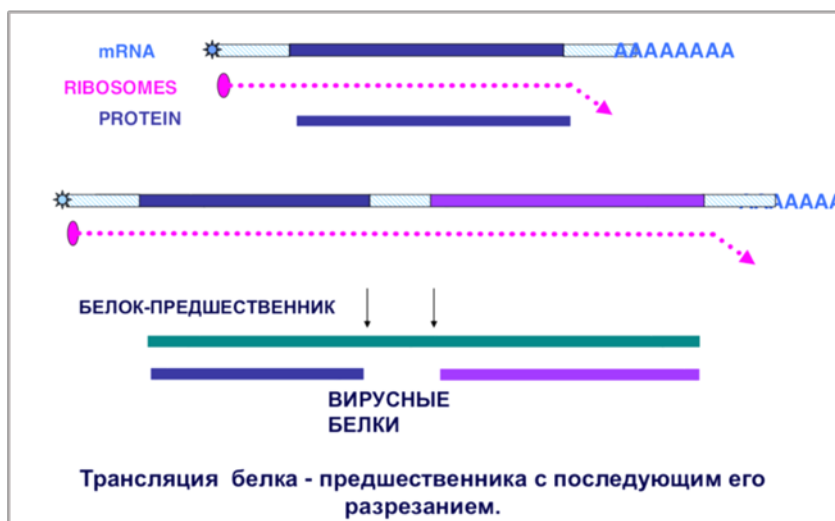


Рис. 49 Трансляция белка-предшественника с разрезанием

Рибосома взаимодействует с 5'-концом бицистронной матрицы, образуется инициаторный комплекс и рибосома считывает всю информацию, находящуюся на молекуле геномной РНК. Образуется крупный нефункциональный полипротеин и разрезается автокаталитически на функциональные протеины, соответствующие генам.

3. Создание сайта внутренней посадки рибосомы

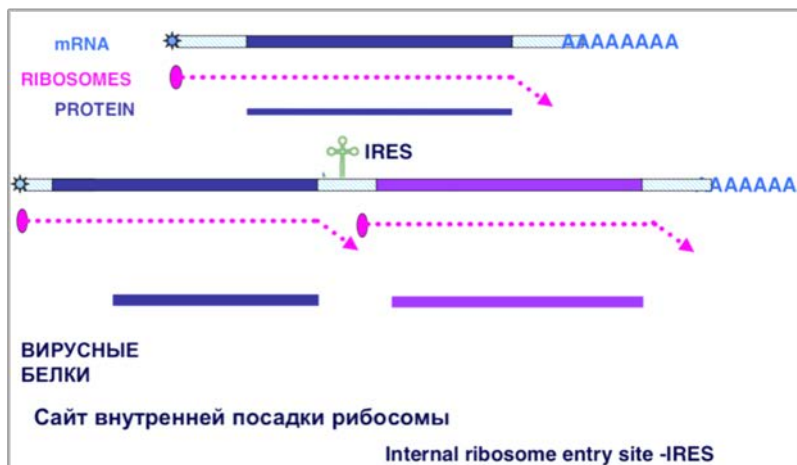


Рис. 50 Создание сайта внутренней посадки рибосомы

В бицистронной матрице между двумя вирус специфическими генами образуется вторичная структура (клеверный лист или набор шпилек), которая может взаимодействовать с рибосомой, образовывать инициаторный комплекс, после чего считывание начинается с внутреннего АУГ.

Все 3 способа используются, когда вирусы полицистронны, а эукариотические рибосомы не способны экспрессировать 3'-дистальные гены в полицистронных матрицах.

Пикорнавирусы

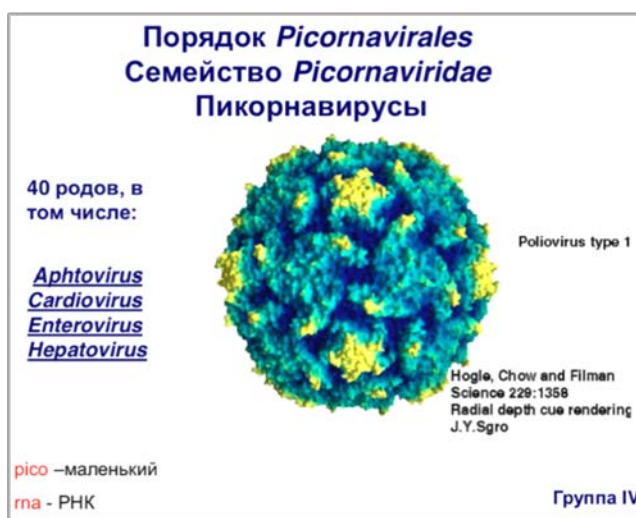


Рис. 51 Пикорнавирус. Краткая информация

Одно из самых больших семейств, более 230 видов, размещены между 40 родами. Большая часть родов включает один вид.

В группу Гепатовирусов входит вирус гепатита А, в группу Энтеровирусов входит большое количество риновирусов, вирус полиомиелита (энтеровирус С). В Афтовирусы входит вирус ящура. В кардиовирусы входит вирус энцефаломиокардита КРС и свиней, модельный вирус миокардита мышей (кардиовирусы В).



Рис. 52 Пикорнавирус. Проникновение в клетку

Проникновение в клетку

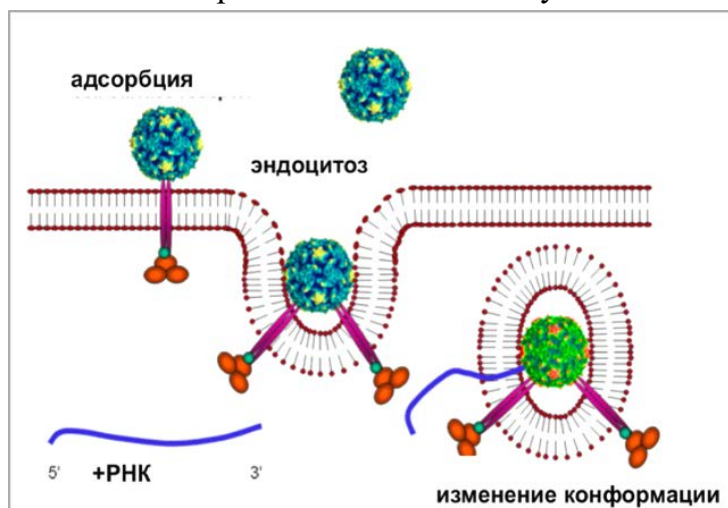


Рис. 53 Пикорнавирусы. Строение частицы, краткая информация

Пикорнавирус взаимодействует с рецептором на мембране клетки (опосредует видовую специфичность вируса). После взаимодействия рецептора и белков капсида, происходят конформационные изменения в капсиде. Далее начинается эндоцитоз. Вирус

оказывается внутри эндосомы. Далее за счет кислотной среды происходит перестройка капсида и освобождение во внешнюю среду генома (+)РНК, так как на рис. 53.

Структура генома пикорнавирусов. Синтез белков



Рис. 54 Структура генома пикорнавируса

В геноме присутствует IRES на 5'-конце и ковалентно связанный с геномом белок VPg. Так же есть нетранслируемая область (у вирусов различается по длине ,00-1200нт), нетранслируемая последовательность на 3'-конце и основная часть. Белков от 10 до 14, в зависимости от вида, Весь геном поделен на три домена: P1, P2, P3

Участок P1:

гены структурных белков с лидерным белком, который есть не у всех пикорнавирусов

Участок P2:

закодированы вирус специфические протеазы

Участок P3:

закодированы функционально-активные белки;

ген VPg4, ковалентно связанный с 5'-концом;

РНК-зависимая РНК-полимераза

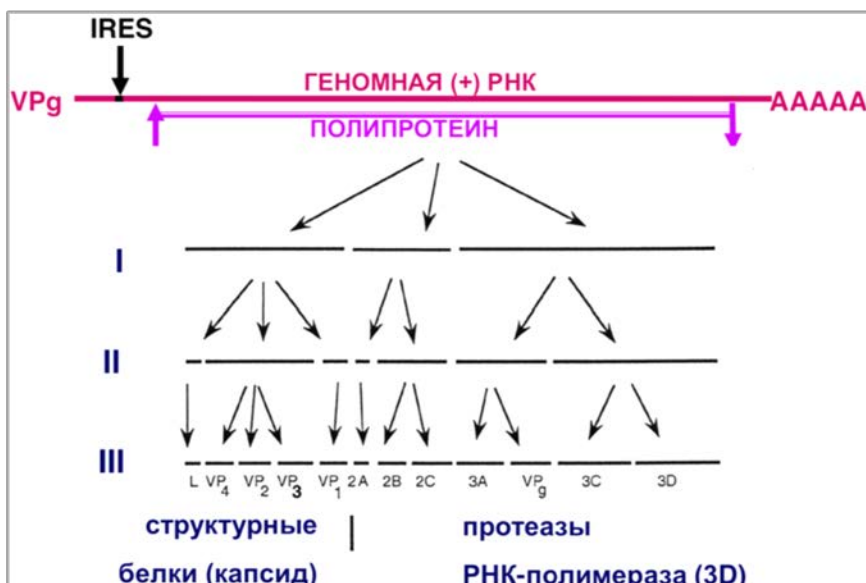


Рис. 55 Трансляция у пикорнавирусов. Семейство Picornaviridae

Анализ динамики пикорнавирусной инфекции показал, что трансляция в вирусной РНК непрерывна, в зараженной клетке синтезируется один гигантский полипептид с массой 450 кДа, через некоторое время он исчезает. Выяснилось, что полипептид специфически нарезается, автокаталитически на ряд индивидуальных функциональных белков. Сначала образуются три фрагмента полипротеина. Далее постепенно происходит в два этапа разрезание полипротеина на функциональные белки. Разрезание осуществляют продукты трансляции вирусной ДНК. Они автокаталитически вырезают из полипротеина полифрагменты, которые видны на рис. 55. У пикорнавирусов нет понятия «ген» и рамка считывания не совпадает с понятием ген. В геномной РНК существует одна огромная рамка считывания, границы генов определяются местами разрезания полипротеина.

Белок L – лидирующий. Не гомологичен у всех пикорновирусов. У афтовирусов белок обладает активностью протеазы, у кардиовируса нет энзиматической активности, у некоторых просто отсутствует.

Поймать полипротеин *in vivo* сложно из-за того, что автокатализ начинается еще при трансляции полипротеина, а заканчивается при упаковке РНК в капсиду.

IRES нужен для инициации синтеза 3'-дистальных генов, здесь он такой же по структуре, и находится на 5'-конце, но выполняет другие функции. Благодаря наличию IRES пикорнавирусы вызывают **цитопатогенный эффект**: в зараженных клетках через полчаса после начала инфекции почти до нуля подавляется синтез клеточных белков. Синтез белков с вирусных матриц не подавляется.

Цитопатогенный эффект

— это подавление синтеза клеточных белков

Протеолиз клеточных факторов инициации транскрипции и трансляции вирус специфическими протеазами:

- протеаза 3С пикорнавирусов инактивирует фактор инициации транскрипции клеточных мРНК;
- вирусная протеаза 2А расщепляет фактор инициации трансляции eIF4G;
- вирусные протеазы расщепляют клеточный поли(А)- связывающий белок, необходимый для инициации трансляции клеточных мРНК.



Рис. 56 Репликация генома

Одним из продуктов трансляции вирусного генома является белок, закодированный в гене 3D РНК-зависимая РНК-полимераза, которая копирует (+)-нить геномной вирусной РНК с образованием комплементарной нити. Процесс связан с образованием в зараженной клетке системы мембранных пузырьков (см. рис. 56). На пузырьках, как на подложке, происходит «заякоривание» (+)РНК и образовавшихся (-)РНК, другими словами происходит репликация генома пикорнавирусов. При том образуются эти пузырьки специально для этого из ЭПР. Прежде, чем начинается репликация вирусного генома, пузырьки модифицируются, с ними связываются несколько неструктурных вирусных белков. Прежде всего белок 2С и белок 3АВ, прежде всего не расщепленный, частью которого является белок VPg (протеолиз полностью не пришел). Белок 2С и 3АВ как бы приносят, заякоривают на этих пузырьках для начала зависимую РНК-полимеразу, продукт белка 3D. Этот же белок 2С заякоривает геномную (+)РНК на поверхности пузырьков. В этом процессе так же активно участвуют белки клетки хозяина. Образуется сложный многокомпонентный репликативный комплекс. Из всех белков из этого комплекса является структурным – VPg, позже войдет в состав вирусной

частицы. Процесс репликации идет стандартным образом: на (+)РНК может образоваться дуплекс, на дуплексе будут образовываться дочерние РНК-цепи. Эти цепи с одной стороны геномы дочерних вирусных частиц, матрицы для дальнейшей репликации и образования дополнительных (+)РНК и эти же РНК могут быть матрицей для трансляций.

Существует две модели, которые описывают инициацию синтеза (-)РНК на (+)РНК.

1. К полиатракту на 3'-конце приближается праймер, затравка, состоящий из polyU и белка VPg и с помощью RdRP, белка-продукта гена 3D, начинается синтез (-)РНК.
2. VPg не участвует в этом процессе. Участвует клеточный фактор, который использует polyU последовательность, присоединяет к polyA материнской (+)РНК-молекулы, далее синтез (-)РНК. VPg присоединяется позже.

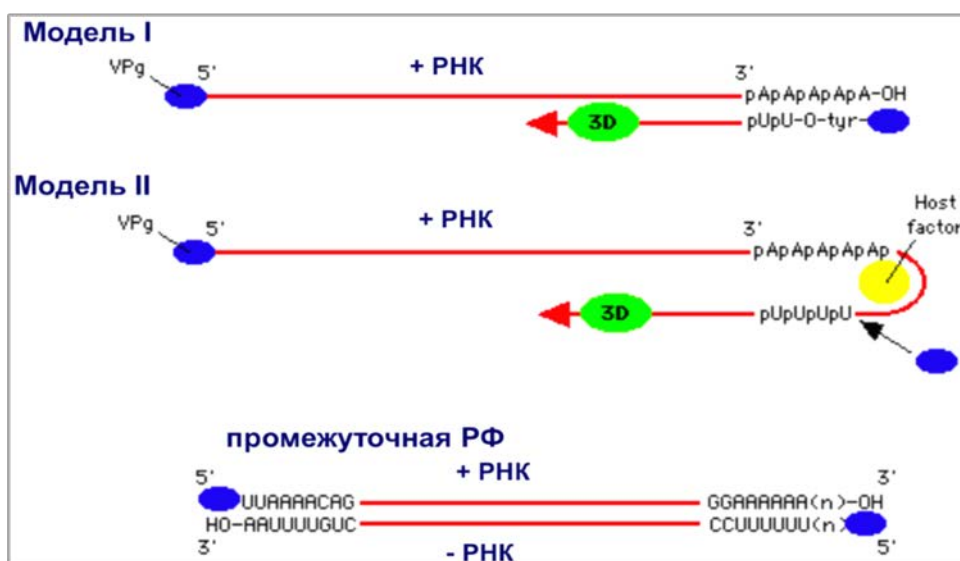


Рис. 57 Инициация репликации генома

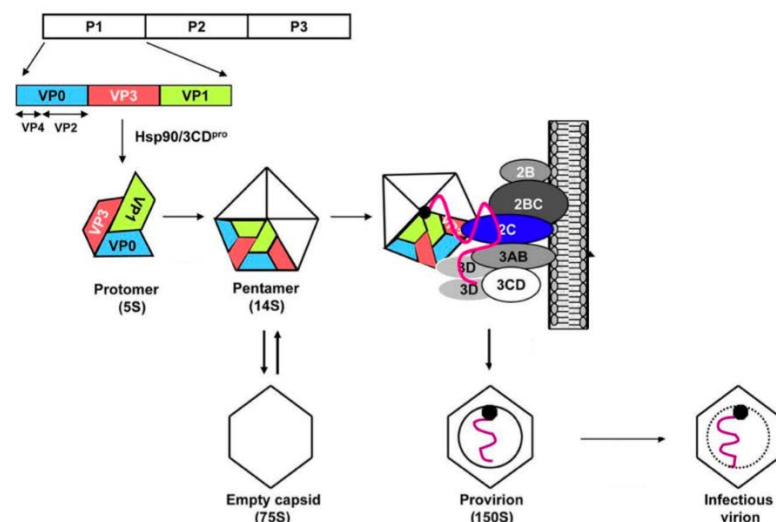
В любой модели в клетке идентифицируются структуры – промежуточно-репликативные формы (см. рис. 57). VPg участвует и присоединен к 5'-концу (-)РНК и (+)РНК.

В отличие от клеточных мРНК полиаденилатная последовательность воспроизводится путем матричного синтеза, а не наращивания polyA с помощью специальной ферментативной системы, как это происходит у клеточных молекул.

Часть дочерних (+)РНК, образующихся на вытянутых везикулах уходит в трансляцию, часть идет на образование вирусных частиц. Предполагается, что у пикорнавирусов упаковка РНК происходит в заранее предсуществующую частицу – прокапсид, которая образуется из трех белков: VP1, VP3, VP0. Белок VP0 – протеин, состоящий из двух функциональных белков VP2 и VP4. Расщепление VP0 на два функциональных белка в

момент упаковки генома в прокапсид еще не произошло. Автокаталитическое расщепление полипротеина происходит на протяжении всего репликативного цикла. Начинается до завершения синтеза полипротеина и заканчивается при упаковке РНК вируса в прокапсид.

Семейство Picornaviridae, сборка вириона



Дочерние вирусные частицы высвобождаются в результате лизиса хозяйской клетки

Рис. 58 Семейство Picornaviridae. Детальная схема сборки вириона

Протимер – небольшой белковый комплекс, являющийся капсомером, из которого образуются капсиды. Они образуют структуру икосаэдрической формы – пустой прокапсид. В образовании капсомера участвуют белки, например шаперон-90. В прокапсиде VP0 не расщеплен, такие капсиды могут оставаться пустыми. Эти частицы можно обнаружить в клетках, зараженных пикорнавирусами.

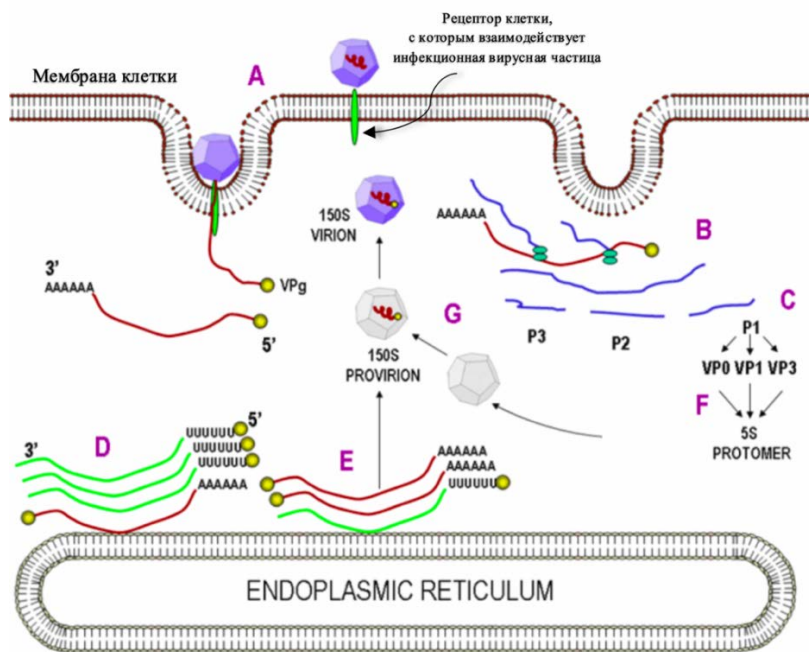
Прокапсид взаимодействует с РНК, связанный ковалентно с VPg, белки пикорнавирусов заякорены на мембране пузырьков, обеспечивают репликацию генома. На этом моменте происходит вход нуклеиновой кислоты в прокапсид. После образуется капсид, состоящий из белков VP1, VP2, VP3, VP4, и происходит протеолиз VP0.

На рис. 58 изображен провирион с РНК и белком VPg. Это провирион, так как происходят конформационные перестройки белков до того, как частица превратится в созревший инфекционный капсид.

В домене генома P1 закодированы структурные белки. Они образуют протимер (капсомер), на рис. 58 он показан в константах седиментации – **единицах Сведберга**. Это понятие используют в вирусологии, чтобы оценить размеры белковых образований.

Цикл репликации в семействе Picornaviridae

Семейство Picornaviridae, цикл репликации.



- A: впячивание и образование эндосомы, в результате перестройки вириона в эндосоме освобождается геном вируса, ковалентно связанный с VPg.
- B: одновременно с A происходит трансляция этой молекулы с образованием вирус специфических белков, участок P3, P2, P1.
- C: P1- структурные белки.
- D: с помощью этих белков происходит заякоривание молекулы РНК на вытянутых везикулах, полученных из ЭПР.
- E: процесс репликации генома
- F: из структурных белков образуются прокапсиды.
- G: происходит встраивание генома вируса в прокапсид и образуется созревший вирион.

Основные моменты

1. Жизненный цикл происходит в цитоплазме
2. Нет деления на раннюю и позднюю стадию инфекции, репликация и трансляция идут параллельно
3. Регуляция экспрессии генома на уровне трансляции (цитопатогенный эффект, активная трансляция вирус специфических белков)
4. Единый полипептид — предшественник; разрезание протеазой на функциональные белки (автокатализ)

5. Модификация 5' – ковалентно-связанный вирус специфический белок VPg и 3' – конца - poly(A)
6. IRES – внутренний сайт посадки рибосом

(+) РНК-содержащие вирусы растений



Рис. 60 ВТМ. Краткая информация

К роду относится около 37 видов различных вирусов. Группа IV по классификации Балтимора.

**Вирус табачной мозаики
ВТМ**

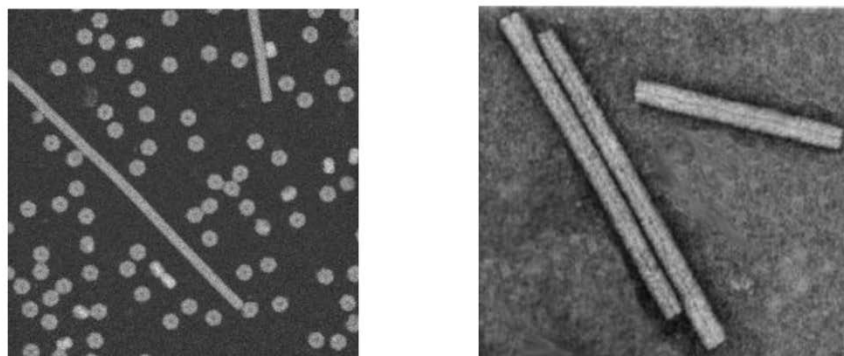


Рис. 61 ВТМ. 20s диски слева и жесткие палочки справа



РНК 6400 нт

БО (белок оболочки) – структурный белок;

ТБ – транспортный белок;

Реп – полимеразный домен, Хел – хеликазный домен;

МТ – метилтрансферазный домен;

★ – Кэп –структура - m⁷GpppG;

— тРНК-подобная структура;

▼ –проскок слабого терминатора.

Рис. 62 Структура генома ВТМ

Структура генома ВТМ

На 5'-конце находится Кэп-структура. На 3'-конце находится т-РНК подобная структура, данная модификация характерна только для вирусов. Эта структура способна акцептировать аминокислоты. Это всегда одна аминокислота для одного вида вирусов, в частности у ВТМ структура способна акцептировать гистидин.

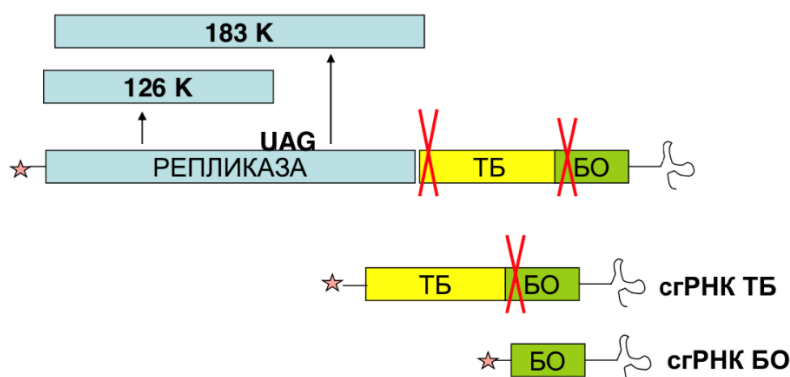
Геном содержит три открытых рамки считывания. БО – одна рамка считывания, структурный белок вируса.

Транспортный белок вируса – вторая открытая рамка считывания.

На 5'-конце – рамка считывания, которая кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу. Здесь три домена: метилтрансферазный, хеликазный и полимеразный домены.

При взаимодействии рибосомы растительной клетки с Кэп-структурой, считывается только 5'-дистальный ген. Особенность у ВТМ: на расстоянии 2/3 от 5'-конца в последовательности гена присутствует слабый терминирующий кодон. В результате при остановке трансляции на слабом терминирующем кодоне образуется белок с молекулярной массой 126 кДа, включающей метилтрансферазный и хеликазный домены. При проскоке слабого терминатора образуется белок с m=183кДа.

Функционально активная РНК-зависимая РНК-полимераза – димер двух этих белков.



РЕПЛИКАЗА СИНТЕЗИРУЕТ СУБГЕНОМНЫЕ (cr) РНК ДЛЯ ТБ И БО.

Рис. 63 Образование субгеномных (сг) РНК ВТМ

Образуется репликаза: два белка (183 и 126 кДа). Но с этой матрицы, ни транспортный белок, ни БО считываться не будут. Рибосома эукариотической клетки не способна инициировать трансляцию не на одном из существующих инициаторных кодонов.

ВТМ образует 2 субгеномных РНК. Одна из них бицистронна, на 5'-конце Кэп, на 3'-конце тРНК подобная структура. На 5'-конце присутствует ген транспортного белка, который может взаимодействовать с рибосомами. Транспортный белок экспрессируется и транслируется с субгеномной РНК.

БО молчит в бицистронной субгеномной РНК. Для выражения БО вируса, необходим еще один вид субгеномных РНК, моноцистронный, который кодирует только белок оболочки вируса. Данная субгеномная РНК кэпирована и так же имеет тРНК подобную структуру на 3'-конце. Для экспрессии двух 3'-дистальных генов (ген транспортного белка и ген БО), необходимо образование двух субгеномных РНК.

Еще в составе частицы 5'-конец РНК ВТМ может взаимодействовать с субъединицей рибосомы и образовывать инициаторный комплекс. Рибосома начинает транслировать репликазу вируса и скидывает с геномной РНК БО ВТМ. Так вирус раздевается на $\frac{3}{4}$. Большая часть генома освобождается от БО. При трансляции рибосома побеждает и частично раздевает вирусную РНК. Образуется РНК-зависимая РНК-полимераза, которая взаимодействует с 3'-концом РНК ВТМ и, реплицируя в направлении 5'-конца, скидывает оставшийся БО с геномной РНК ВТМ.

На геномной (+)РНК может образовываться репликативная промежуточная форма (почти двуцепочечная, содержащая и + и -). Часто встречаются хвостатые структуры – на одной молекуле (-)РНК одновременно синтезируются несколько молекул (+)РНК.

Транспорт вируса по растению можно разделить на ближний и дальний транспорт. Ближний – перемещение генома вирусов растений из клетки в клетку, идет по плазмодесмам. Дальний - по сосудистой системе.

Ближний транспорт вируса

Плазмодесмы соединяют клетки растений между собой. Пропускная способность – 1кДа. Те плазмодесмы, что открываются в ситовидные элементы флоэмы, могут пропускать макромолекулярные комплексы до 10кДа. Перемещение по плазмодесмам – активный процесс. Основную роль играет транспортный белок вируса. Этот белок обладает РНК связывающими свойствами и способен образовывать комплексы с геномными (дочерними) молекулами РНК генома ВТМ.

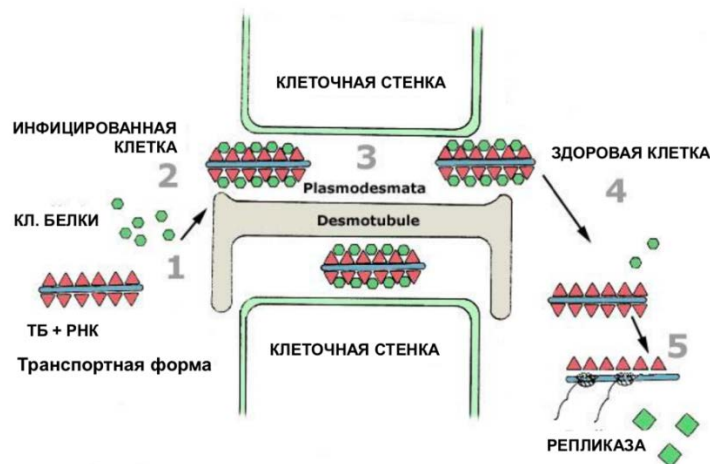


Рис. 64 Ближний транспорт ВТМ

В инфицированной клетке образовались дочерние РНК молекулы и связались с транспортным белком в рибонуклеопротеидный комплекс - транспортную форму. Она может перемещаться через плазмодесмы благодаря тому, что транспортный белок не только связывает РНК (он ее выпрямляет и делает более удобной для транспортировки), но и взаимодействует с определенными белками, например, он расширяет плазмодесмы при взаимодействии с ферментом КС пектин-метил-эстераза до 17 кДа. Транспортные белки могут менять пропускную способность плазмодесмы. Красные треугольники – транспортные белки, зеленые кружочки – клеточные белки, необходимые для процесса (см. рис. 64). Комплекс попадает в здоровую клетку. Клеточные белки отходят, транспортный белок скидывается с молекулы РНК рибосомами, которые начинают трансляцию и происходит образование репликаз.

Дальний транспорт вируса

Перемещение идет по сосудистой системе растения нужен БО. Существует теория, что дальний транспорт осуществляется не в виде рибонуклеопротеида, состоящего из РНК и транспортного белка, а в виде сообразной вирусной частицы.

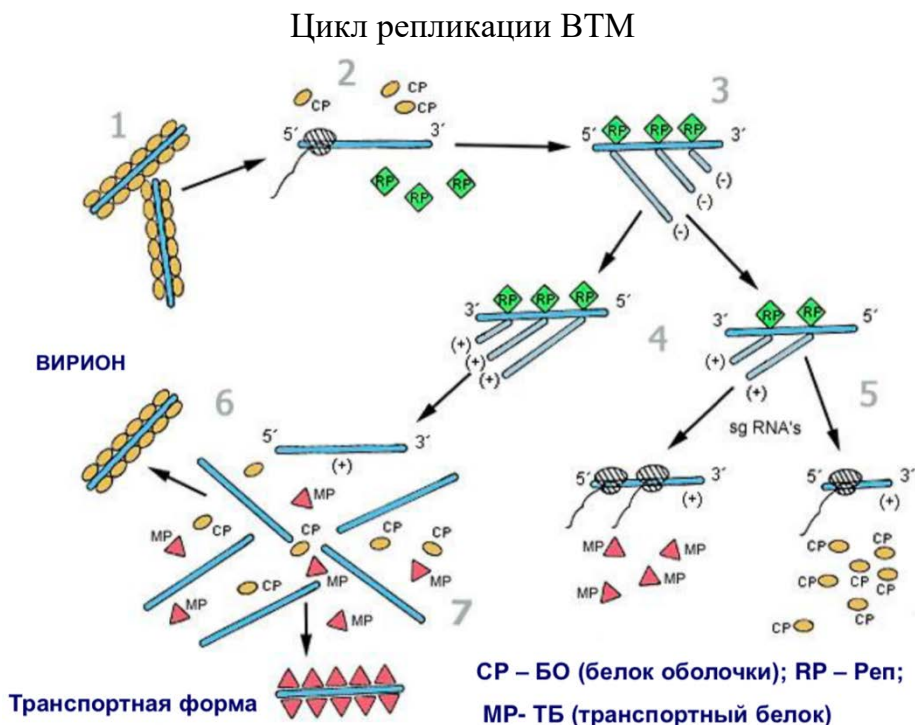


Рис. 65 Цикл репликации ВТМ

1. Вирусные частицы, попавшие в первично зараженную клетку (РНК + БО)
2. Рибосома садится на доступный 5'-конец и скидывает БО с частицы и транслируется 5'-дистальный ген, в котором закодирована РНК-зависимая РНК-полимераза.
3. РНК-зависимая РНК-полимераза начинает реплицировать материнскую молекулу РНК, образуются (-)РНК. При этом идет дополнительное разделение частицы, т.е. РНК-зависимая РНК-полимераза скидывает БО с 3'-конца, который остался после трансляции 5'-дистального гена.
4. Происходит репликация молекулы. Образование (-)РНК и (+)РНК на матрице (-)РНК
5. При репликации (-) молекулы образуются субгеномные РНК. За счет существующих специальных промоторов субгеномных РНК, которые доступны для РНК-зависимой РНК-полимеразы на (-)РНК молекуле. Образуются два типа субгеномных РНК: бицистронная субгеномная РНК, у которой на 5'-конце находится ген транспортного белка и этот белок

транслируется именно с этой субгеномной РНК. Моноцистронная субгеномная РНК, с которой транслируется белок оболочки.

6. Имеется пул дочерних (+)РНК, транспортного белка (красные треугольники, см. рис. 65) и БО (желтые эллипсы). Транспортный белок может взаимодействовать с дочерними (+)РНК и образовывать транспортную форму, которая перемещается по плазмодесмам в соседнюю клетку. БО так же может взаимодействовать с дочерними РНК, и в клетке будут образовываться созревшие вирусные частицы, которые в зависимости от положения клетки либо будут распространяться дальше по сосудистой системе растения, либо ждать гибели растения, чтобы выйти во внешнюю среду.

Ряд вирусов имеет геном, схожий с ВТМ. Есть группа тобравирусов. Его геном состоит из двух молекул (+) РНК – сегментированный геном. Так же он разделенный. Для полноценной инфекции нужно два вида частиц тобравирусов – частица с длинной РНК из двух генов и частица с геном БО. Для экспрессии ТБ необходимо образование субгеномной моноцистронной тРНК для трансляции ТБ.

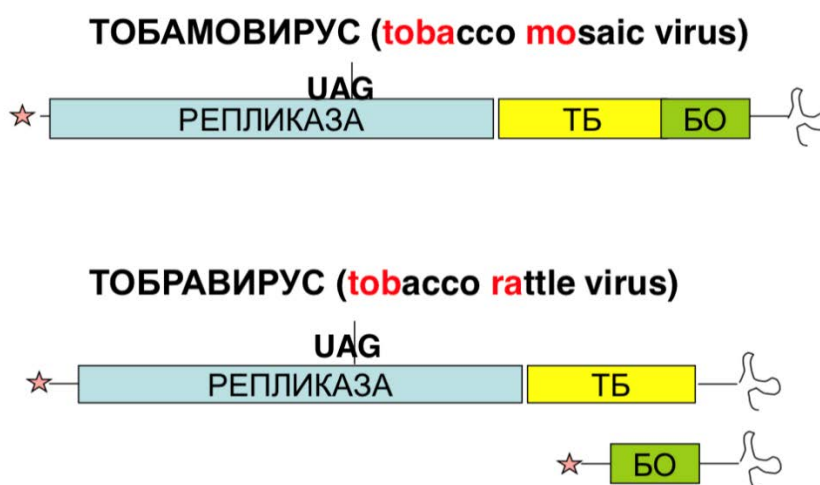


Рис. 66 Геном тобамовирусов и тобравирусов

Безбелковая инфекция тобравирусов

Происходит, когда в клетку попадет только один вариант генома. Если это будет длинный вариант генома, то рибосомы считают с 5'-конца тобравируса ген репликазы, вирус специфическая РНК-зависимая репликаза начнет реплицировать матрицу и с (-)РНК матрицы будет образовываться субгеномная РНК ТБ. Будут образовываться транспортные рибонуклеопротеиды, но БО взяться неоткуда. Геном будет распространяться из клетки в клетку (ближний транспорт), но вирусные частицы образовываться не будут.

Если в клетку попадет частица, где будет только ген БО, то не будет происходить ничего, так как в клетке нет РНК-зависимой-РНК-полимеразы.

Диантовироз

Заражает гвоздики. Один сегмент содержит гены репликазы и БО + моноцистронная РНК, в которой закодирован ТБ. Геном сегментированный и разделенный.

Если в клетке окажется длинный вариант генома: есть репликаза, будет реплицироваться геном и образовываться субгеномная РНК для 3'-дистального белка оболочки вируса. В клетке будут накапливаться вирусные частицы, ближнего транспорта не будет, так как ТБ нет.

Бромовирус

Геном распределен между тремя молекулами РНК. Две – моноцистронные РНК, кодируют компоненты репликазы. Вторая - бицистронная РНК, содержит два гена: транспортный (ген 3a) и ген БО. С геномной РНК транслируется только ТБ, для экспрессии гена БО нужно образование субгеномной молекулы РНК, которая будет нести информацию только о БО. Все молекулы экпированы, на 3'-конце есть характерная для вирусов растений 3'-концевую структур – тРНК подобная. Здесь эта структура может акцептировать тирозин.

Все молекулы могут одеваться в БО вируса (4 вида частиц). Для инфекции не нужна частица только с БО.

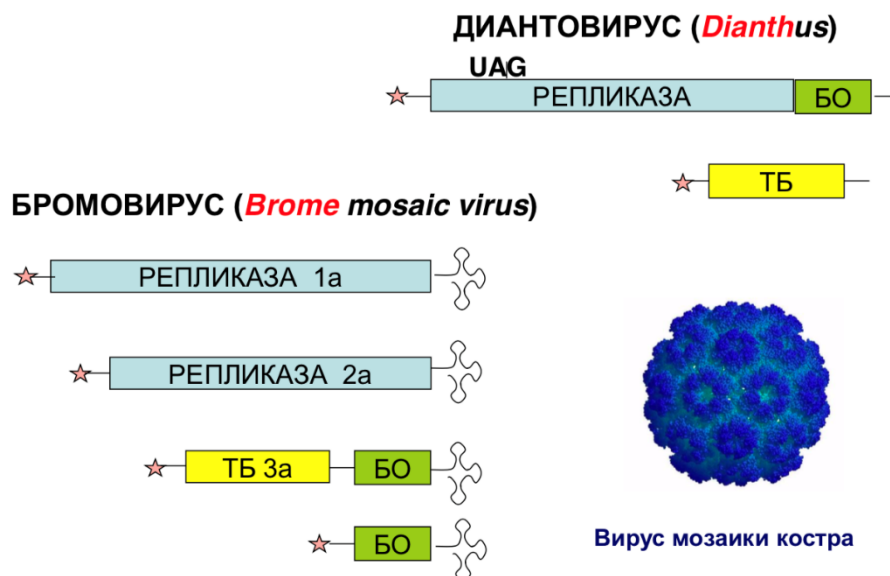


Рис. 67 Структура генома дианто- и бромовирусов

(-) РНК-содержащие вирусы

РНК-полимераза (RdRp - ⊗) должна
быть упакована в вирион.

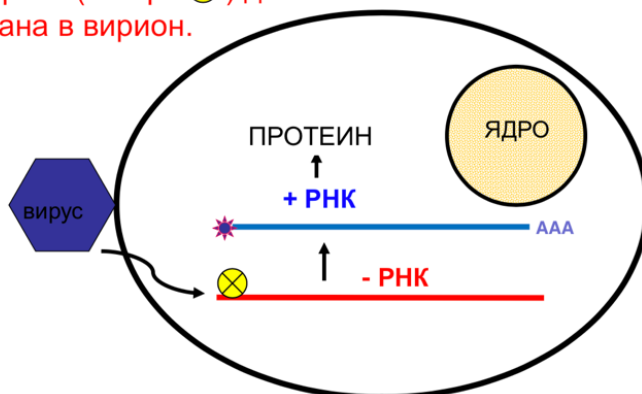


Рис. 68 Геномная РНК с негативной полярностью. Общая схема

Есть вирус, где геном – не инфекционная (-) цепь РНК. Например, вирус бешенства, кори. Если (-)РНК попадет в одиночку в клетку – инфекции не будет, так как РНК-зависимой РНК-полимеразы нет и (-)РНК не может направлять синтез. Поэтому в клетку (-)РНК должна попасть в комплексе с ферментом, который в этом случае будет структурным белком (см. рис. 68). Здесь фермент и репликазы и транскриптаза.

Ключевые особенности (-) РНК содержащих вирусов:

1. РНК - геном с отрицательной полярностью: геномная РНК не транслируется
2. Вирионная РНК транскрибируется с образованием (+) мРНК
3. Вирион содержит РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA dependent RNA polymerase –RdRp)
4. РНК не инфекционна в отсутствие RdRp
5. Липопротеидная оболочка
6. Группа V по Балтимору

Классификация (-) РНК содержащих вирусов

(-) РНК-содержащие вирусы можно разделить на две большие группы с непрерывным (-)РНК геномом и сегментированным (-)РНК геномом.

1. Непрерывный (-)РНК геном

Порядок Mononegavirales – 11 семейств

- RHABDOVIRIDAE – вирус бешенства, вирус везикулярного стоматита, вирусы растений.
- PARAMYXOVIRIDAE – вирус свинки, кори, вирусы парагриппа.
- FILOVIRIDAE – вирус Эбола, вирус Марбурга

- BORNAVIRIDAE – вирус болезни Борна и другие вирусы, вызывающие неврологические заболевания человека и животных.
- NYAMIVIRIDAE – Nyamanini virus, Midway virus, заражают клещей и птиц.

2. Сегментированный (-)РНК геном

Порядок Articulavirales – 2 семейства

- ORTHOMYXOVIRIDAE – вирус гриппа
- TILAPINEVIRUS – заражают рыб
- BUNYAVIRIDAE (один или два сегмента – классические РНК геномы, 1-2 молекулы ambisense геномами)



Рис. 69 (-)РНК содержащие вирусы

Общая схема транскрипции и репликации семейства Mononegavirales

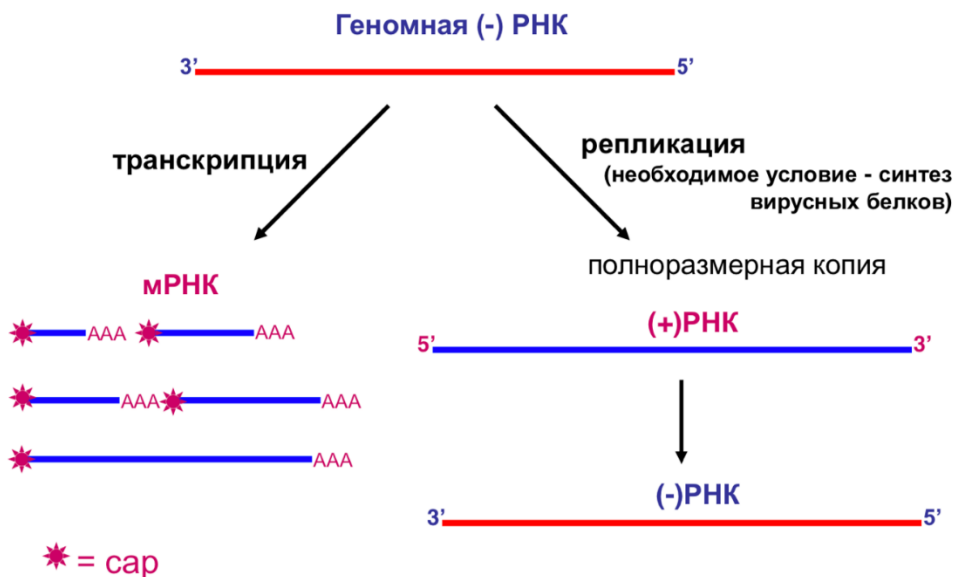


Рис. 70 Общая схема транскрипции и репликации семейства Mononegavirales с непрерывным геномом

Обозначения концов молекулы от (+)РНК отличаются – слева 3'-конец молекулы (см. рис. 70). После проникновения геномной РНК в цитоплазму РНК-зависимая РНК-репликаза (транскриптаза) транскрибирует геномную РНК с образованием множества матричных РНК, обычно моноцистронных. После синтеза вирус специфических белков начинается репликация (-)РНК генома. Образуется полноразмерная (+)РНК копия и с нее образуется (-)РНК дочерний молекулы.

Семейство Rhabdoviridae

- 45-100 X 100-430 nm, бацилло- или пулеподобная форма
- билипидная мембрана содержит один вид гликопротеинов (G)
- спиральный нуклеокапсид (в раскрученном виде 20 X 700 nm)
- геномная РНК -1 сегмент, 10-14kb
- 5-10 генов кодируют 5-10 белков
- в семейство входит более 200 видов
- заражают позвоночных, беспозвоночных и растения
- распространяются среди растений и позвоночных с помощью векторов – насекомых, в организме которых способны размножаться
- Группа V Балтимору

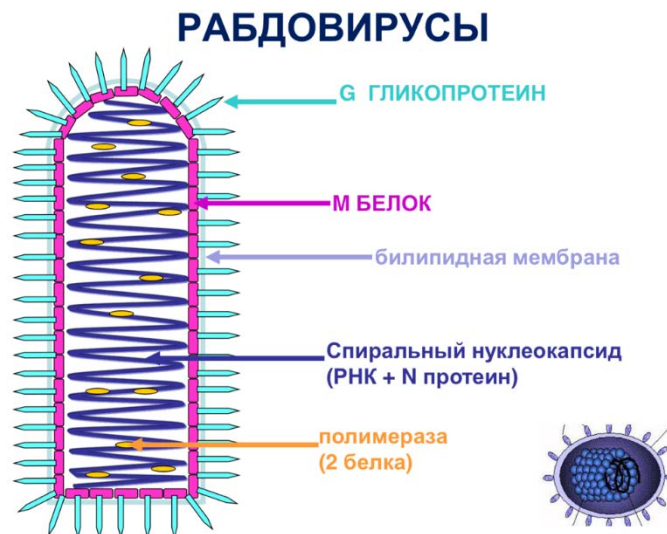
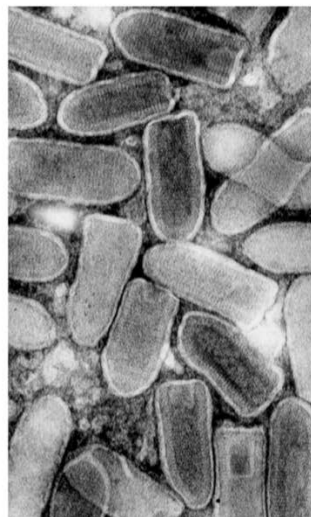


Рис. 71 Общая схема строения рабдовируса

Лекция 5

Первый акт инфекции – транскрипция генома (-)РНК содержащего вируса.

Rhabdoviridae. Вирус везикулярного стоматита (ВВС)



L- 180 нм d- 70нм

Липопротеидная оболочка

Группа V

Матриксный белок

bullet-shaped – «пулевидная» форма

Репликация в цитоплазме

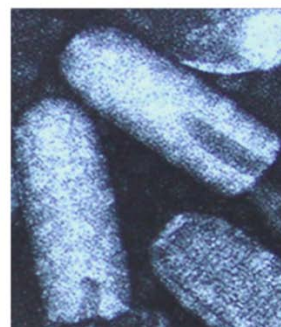
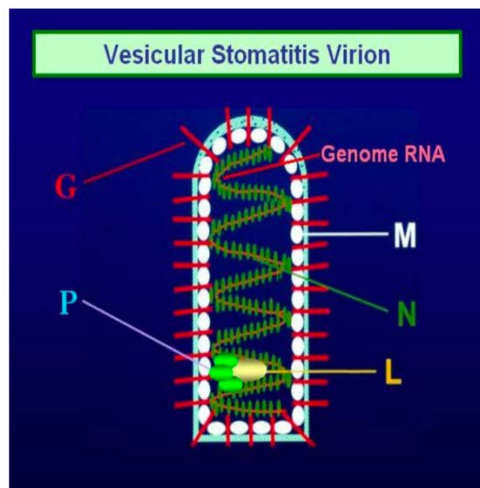


Рис. 72 ВВС, краткая информация



- Гликопротеин **G** обладает гемагглютинирующей активностью, распознает рецепторы клетки
- M** – матриксный белок
- Нуклеокапсид, уложенный в спираль, состоит из геномной РНК 15 kb, покрытой белком **N**
- В состав нуклеокапсида в качестве структурного компонента входят белки **L** и **P** (компоненты транскриптазы)

Рис. 73 Краткая информация о строении ВВС

Белок L – собственно РНК-зависимая РНК-полимераза

Белок Р – фосфопротеин, который входит, как компонент в репликазу транскриптазу и участвует в регуляции этого фермента.

Начало инфекции у вируса везикулярного стоматита

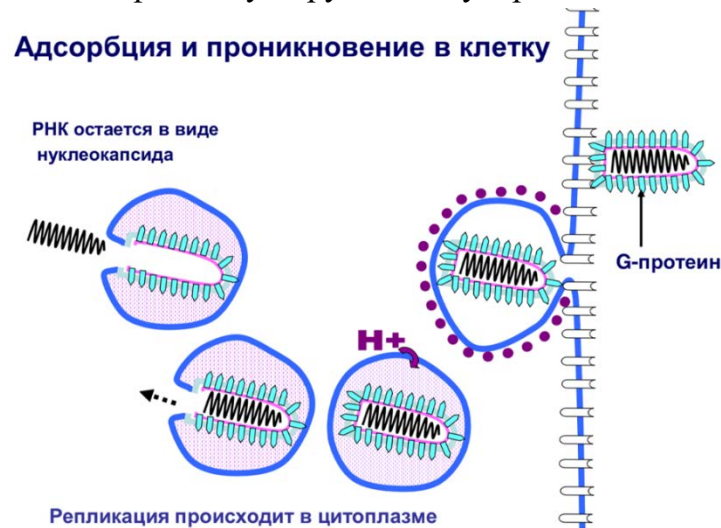
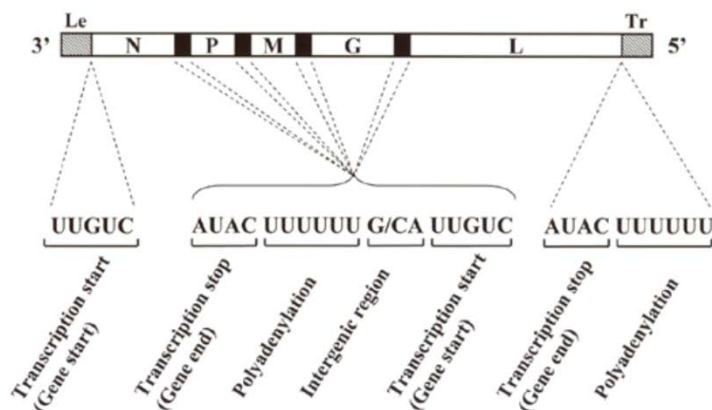


Рис. 74 Схема инфекции при заражении ВВС

1. Адсорбция частицы ВВС на поверхности клетки (см. рис. 74). G-протеин взаимодействует с рецепторами клетки.
2. Образуется эндосома, отшнуровывается от мембраны внутрь клетки. Изменения pH внутри эндосомы приводят к тому, что происходит слияние мембраны вируса с мембраной эндосомы. В этом процессе принимает участие поверхностный гликопротеин G, функции которого: адсорбция на поверхности клетки, способствование слиянию мембраны вируса с мембраной эндосомы, обладает гемагглютинирующей способностью.
3. После слияния РНК реализуется в цитоплазму в виде нуклеокапсида. Разделение от белка N не происходит. Все процессы идут в составе нуклеокапсида.



N - нуклеопротеин, **P**- фосфопротеин, **M** - матриксный белок, **G** - гликопротеин и **L** – полимераз.

Le- лидерная последовательность (50 нт) – промотор транскрипции и сигнал для одевания РНК белком **N**.

Tr-(trailer) - промотор репликации геномной РНК

Межгенные регуляторные последовательности, содержащие «старт» и «стоп» - сигналы транскрипции и сигналы полиаденилирования мРНК.

Рис. 75 Структура генома ВВС

Схема ориентируется по-другому, так как это (-)РНК: слева 3'-конец (см. рис. 75). На 3'-конце находится лидерная последовательность **Le**. В комплементарной (+)РНК геномной нити ВВС такой последовательности нет. Взаимодействия нуклеокапсидного белка **N** с (+)РНК не происходит.

На рис. 75 показан увеличенный участок межгенных участков. Рассмотрим последовательность между **N** и **P**. Сначала идет «стоп» - последовательность для транскрипции. Далее polyU – белок будет аденилирован на матричной основе. Далее идет межгенный участок, состоящий из 2- 3 нуклеотидов и далее сигнал старта белка **P**. Транскрипция с геномной РНК ВВС и остальных рабдовирусов осуществляется по механизму «старт-стоп транскрипция».

Схема транскрипции и репликации рабдовирусов

Транскрипция и репликация рабдовирусов

На примере ВВС

Гены транскрибируются последовательно, по принципу «старт - стоп»

После аккумуляции N-белка и изменения уровня фосфорилирования Р-белка происходит переключение с процесса транскрипции на процесс репликации

Полноразмерная антигеномная (+ РНК) является матрицей для репликации геномной (-) РНК

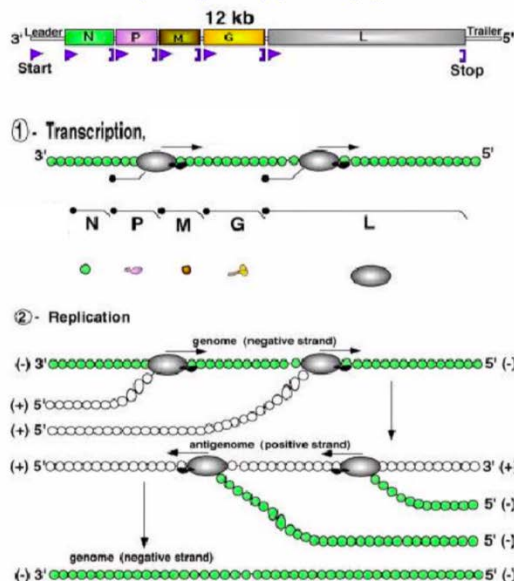


Рис. 76 Транскрипция и репликация рабдовирусов

1. Происходит транскрипция 5 генов по принципу «старт-стоп».
 2. Образуется 5 индивидуальных матричных РНК для каждого гена. Они копируются, в этом участвует белок L и именно он обеспечивает копирование матричных транскрипций. Начинается трансляция вирус специфических иРНК с образование вирус специфических белков N, P, M, G, L.
 3. Далее должна быть репликация генома. Белок N взаимодействует с лидерной последовательностью (-)РНК и, вероятно, меняет ее конформацию таким образом, что стоп-сигналы не читаются, читается первый старт-сигнал и последний стоп. И начинается образование (+)РНК на матрице (-)РНК.
 4. Помимо аккумуляции и связывания белка N с материнской (-)РНК, нужно еще, чтобы модифицировался репликазно-транскрипционный комплекс. У комплекса, состоящего из белка L и трех белков Р, меняется функция (что он будет транскрибировать или реплицировать) в зависимости от уровня фосфорилирования белка Р. Этот белок фосфорилируется клеточными киназами. Белок L тоже обладает киназной активностью и влияет на этот процесс. Если белок Р дефосфорилирован будет происходить репликация. Есть еще один фактор, влияющий на эффективность процесса – количество молекул L и Р белка в репликазно-транскрипционном комплексе.
- (+)РНК называется антигеномной матрицей и на ней образуется дочерний геном.

Созревание и выход вирионов ВВС из клетки

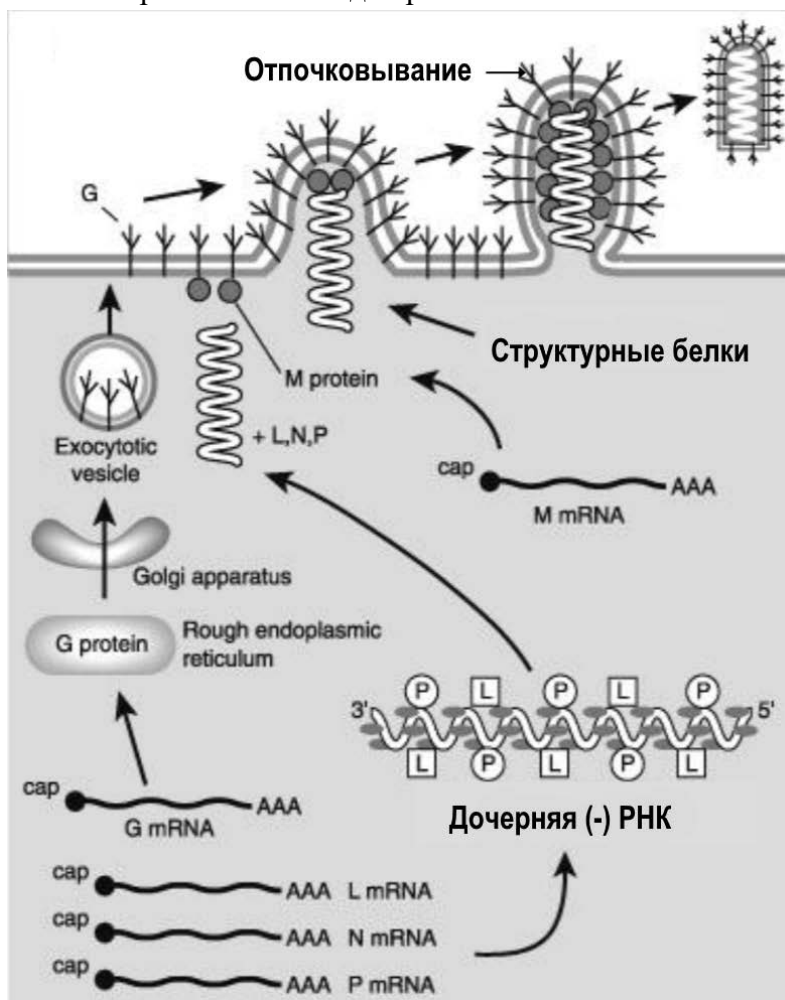


Рис. 77 Схема созревания и выхода вирионов ВВС из клетки

Имеются матричные РНК для вирус специфических белков (см. рис. 77). Начнем с мРНК, кодирующей последовательность для белка G. Идет синтез белка G на поверхности везикул аппарат Гольджи таким образом, что G-белок сразу встраивается в мембрану и декорирует мембрану везикул. Везикулы транспортируются к поверхности зараженной клетки, мембрана везикул сливается с мембраной клетки. Белок гликопротеин G оказывается на поверхности клетки, от которой будет отпочковываться ВВС.

Другие матричные РНК транслируются с образованием белков и связываются с дочерними (-)РНК. Матричный белок выполняет две функции: связывается с рибонуклеопротеидами дочерними и одновременно связывается с участками белка G, обращенными внутрь клетки. Тогда белок М конденсирует рибонуклеопротеид и транспортируется к поверхности клетки. Дальше идет взаимодействие всех компонентов вируса, начинается впячивание мембраны. Позже созревшая частица отшнуровывается от поверхности клетки.

Инфекционный цикл рабдовирусов

1. Связывание с рецепторами, проникновение путем эндоцитоза
- 2-3. Слияние мембран и освобождение нуклеокапсид
- 4-6. Транскрипция и трансляция мРНК
- 7-8. Накопление нуклеокапсидного белка (N) и переключение с транскрипции на репликацию
- 5,9,10. Гликопротеин (G) встраивается в плазматическую мембрану
- 11,12. Нуклеокапсид, ассоциированный с фосфопротеином (P) и РНК-полимеразой (L) собирается с помощью М белка
13. Частица отпочковывается, захватывая мембрану, модифицированную белком G

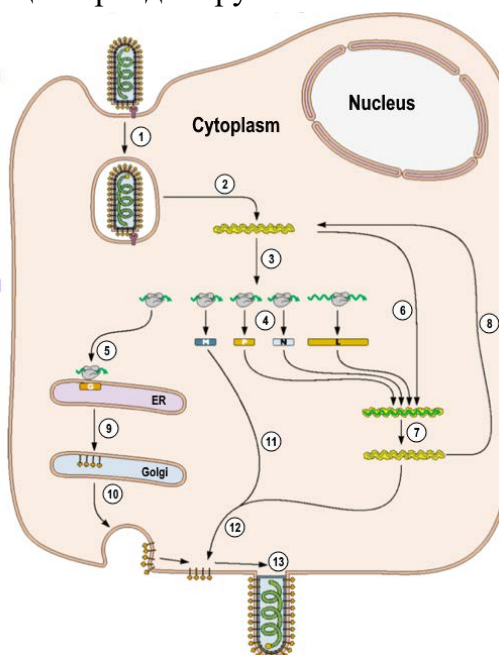


Рис. 78 Описание инфекционного цикла рабдовирусов

Особенности репликации группы вирусов с непрерывными (-)РНК на примере ВВС

- Жизненный цикл происходит в цитоплазме
- Полимеразный комплекс (белки L и P) входит в состав вириона
- Гены транскрибируются последовательно, по принципу «старт - стоп»
- Образуются моноцистронные субгеномные РНК, кэпированные и полиаденилированные
- Переключение с транскрипции на репликацию происходит в результате изменения уровня фосфорилирования белка Р и накопления белка N
- Дочерние частицы отпочковываются, захватывая клеточную мембрану, модифицированную белком G

Семейство Paramyxoviridae

Схема репликации практически аналогична рабдовирусам. Морфология ближе к ортомиксовирусам (вирусу гриппа).

- Плеоморфная или сферическая форма, d-150-250nm
- Два типа вирусных белков, модифицирующих липопротеидную мембрану
- Спиральный (нитевидный) нуклеокапсид

15-16 kb геномная (-)ssRNA ; 6-8 генов кодируют 6-12 полипептидов

- Обнаружены только у позвоночных, передается воздушно-капельным путем (горизонтальная трансмиссия)
- Вызывают серьезные заболевания человека и животных (корь, свинка, чумка собак и др.)

Респираторный синцитиальный вирус теперь относится к отдельному семейству *pneumoviridae*. Этот вирус является причиной заболевания «смерть в колыбели». Клеточная ткань из-за вируса превращается в синцитий.

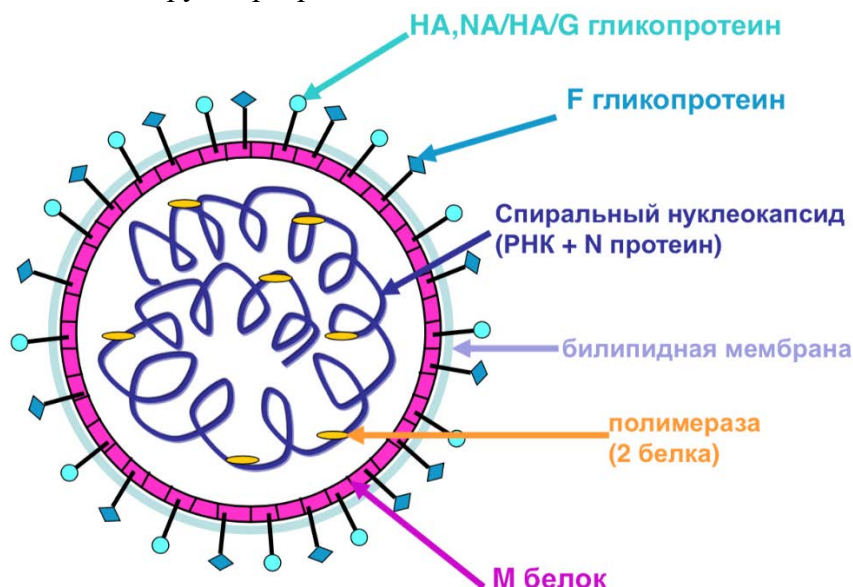


Рис. 79 Общая схема строения парамиксовирусов

У парамиксовирусов поверхностных гликопротеина два (см. рис. 79). Один из них — F-гликопротеин (от англ. Fusion — слияние). Он играет основную роль при реализации нуклеокапсида в цитоплазме клетки и обеспечивает слияние мембраны эндосомы с мембраной вируса. Другие гликопротеины могут нести разные функции: может быть просто гликопротеин G, отвечающий за адсорбцию. В другом варианте белок обозначается, как НА, так как он гемагглютинин (и адсорбционный белок тоже). Третий вариант: белок обладает двумя функциями — функцией белка НА и является белком нейраминидазой. Нейраминидаза позволяет эффективно отпочковываться вирусам от слизистой оболочки, ферментативно расщепляя остатки сиаловой кислоты и не давая вирусам слипаться на поверхности носоглотки или других слизистых тканей и реализовываться во внешнее пространство.

У вируса кори гликопротеин G обладает только адсорбционной функцией.

Семейство Filoviridae

семейство *Filoviridae*

два вируса – вирус Эбола и вирус Марбурга
частицы 6-, U- подобной или нитевидной формы

- Вирус Эбола
- Лихорадка Эбола
- Нитевидная форма
- Липопротеидная оболочка
диаметр 80 нм,
длина 1400 нм
- реплицируются в цитоплазме
- нуклеокапсид спиральный
(-)ss РНК – 19kb
- кодирует 7 белков

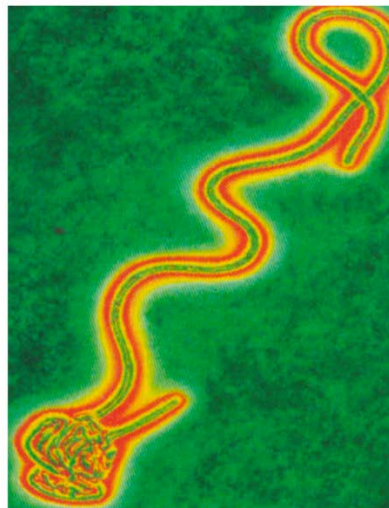
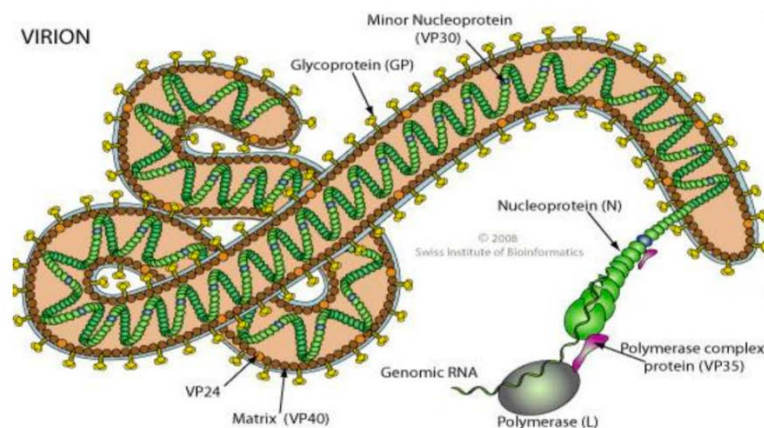


Рис. 80 Краткая информация о семействе Filoviridae

Летальность от вируса Марбурга в отличие от вируса Эболы 35-37%. Первое заболевание, вызванное вирусом Марбурга было зарегистрировано в 1967 году, были эпидемии в Болгария и Германии (заражены от 10 до 100 человек). Симптом – геморрагическая лихорадка. В Марбург завезли бессимптомных носителей вируса, зеленых мартышек, для экспериментальной работы.



Белки нуклеокапсида – N и VP30 (минорный)
Матриксные белки – М (VP40) и минорный VP24
Полимеразный комплекс – белок L и VP35 (фосфопротеин)
Поверхностный гликопротеин - G

Рис. 81 Структура вируса Эбола

У вируса Эболы летальность 86-87%. Вирус Марбурга встречался 15 раз на уровне вспышек на территории восточной Европы и Германии. У Эболы же все проходили на африканском континенте. Вывод: вероятно, дело в экономическо-социальном положении. Так же, есть информация, что это связано с особенностями погребальных обрядов. Матриксных белков и белков нуклеокапсида два – мажорный и минорный (см. рис. 81)

Изображение вируса Эбола (spaghetti-like filaments) на поверхности клеток, секретирующих белок CD317, полученного с помощью сканирующего микроскопа.

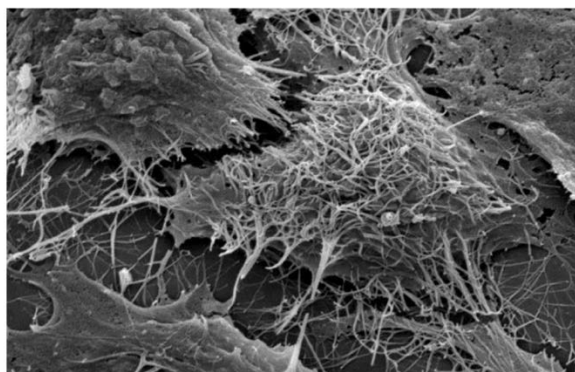


Рис. 82 Электронная микрофотография зараженной вирусом Эболы клетки и здоровых соседних клеток

Классификация Orthomyxoviridae

(-) РНК-содержащие вирусы с сегментированным геномом
Группа V по Балтимору

- Orthomyxoviridae (“orthos”- настоящий “мухо” – слизь)

Вирусы гриппа

Род Alphainfluenzavirus, Influenza A virus – 8 геномных сегментов

Род Betainfluenzavirus Influenza B virus - 8 геномных сегментов

Род Deltainfluenzavirus Influenza D virus - 7 геномных сегментов (заражает свиней и КРС)

Род Gammainfluenzavirus Influenza C virus - 7 геномных сегментов, нет нейраминидазы

Вирусы, передаваемые насекомыми

Род Thogotovirus - 6 геномных сегментов (заражает позвоночных, в том числе людей)

- Thogoto thogotovirus

- Dhori thogotovirus

Род Quaranjavirus – 6 геномных сегментов

- Johnston Atoll quaranjavirus

Род Isavirus - 8 геномных сегментов

- Вирус инфекционной анемии лосося

Частицы ортомиксовирусов могут быть различных форм. Самые типичные представлены на рис. 83

ORTHOMYXOVIRUSES
ПЛЕОМОРФНЫЕ ЧАСТИЦЫ

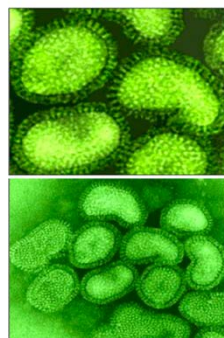
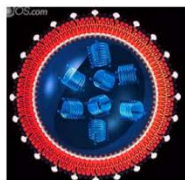
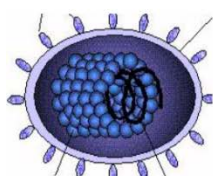
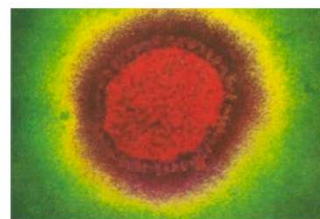
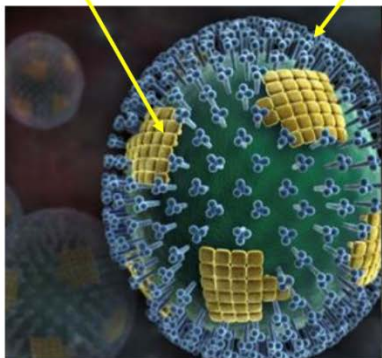


Рис. 83 Плеоморфные части ортомиксовирусов

Нейраминидаза
NA

Гемагглютинин
HA



- **Сем. Orthomyxoviridae**
- Частицы плеоморфны
- Диаметр 80-120нм
- Матриксный белок
- Нуклеокапсид спиральный.
- (-)ssРНК -8 сегментов, всего 13kb
- Репликация в ядре, сборка в цитоплазме

Рис. 84 Краткая информация о вирусе гриппа А

Вирус гриппа А

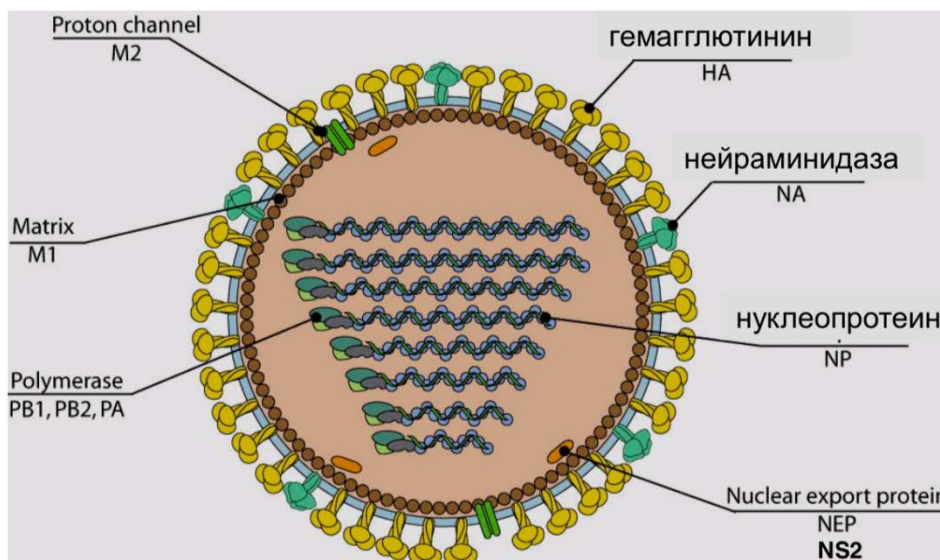


Рис. 85 Структура вируса гриппа А

Гемагглютинин находится на поверхности частицы в виде гомотримера (три молекулы). Нейраминидаза в виде тетрамера. Так же есть поверхностный гликопротеин с названием белок M2. Это трансмембранный белок, пронизывающий мембрану вируса, он играет важную роль при реализации генетической информации в клетку вируса. Белка M2 нет у вирусов гриппа В и С.

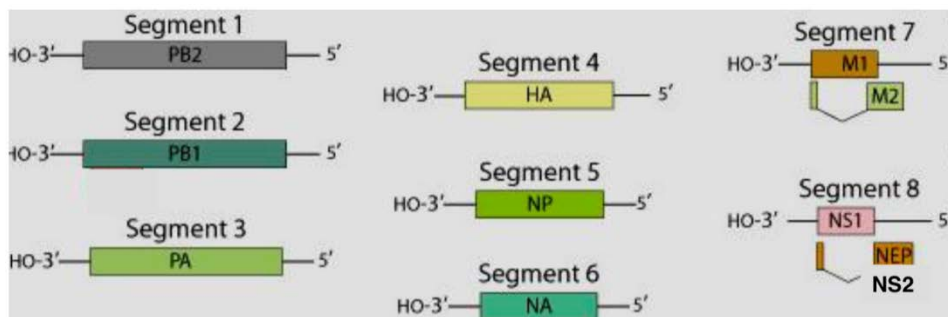
Нуклеиновая кислота находится в комплексе с белком NP. 3'-конец молекулы РНК, находящийся в составе комплекса с белком NP, связан транскриптазно-репликасным комплексом (см. рис. 85). В этот комплекс входят три типа молекул полимеразы (PB1, PB2, PA). P – полимеразы, B – basic, A – acidic.

Так же в состав частицы входит структурный белок NEP или NS2. Раньше считалось, что он неструктурный, поэтому название звучало, как Nonstructural 2 (есть еще и первый). NEP – связано с локализацией в ядре nuclear export.

У гемагглютинина основная функция адсорбция и присоединение. Он опосредует присоединение вирусной частицы к клеточному рецептору. Так же он участвует в слиянии липидной оболочки вируса с мембраной эндосомы.

Нейраминидаза играет важную роль при почковании дочерних вирусных частиц из зараженной клетки. Нейраминидаза так же является ферментом, который играет роль в отщеплении остатков сиаловой кислоты, что способствует отделению зрелого вириона. По такому принципу работает тамифлю. Он блокирует работу нейраминидазы и ограничивает распространение вирусной инфекции.

Структура генома вируса гриппа А



•8 вирусных РНК (от 890 до 2341 нт) обеспечивают синтез 10 вирусных белков.

•При транскрипции сегментов 7 и 8 образуются по 2 мРНК за счет альтернативного сплайсинга.

Рис. 86 Структура генома вируса гриппа А

Сегмент 1-3 кодируют компоненты РНК-зависимой РНК-полимеразы (см. рис. 86). Эти три белка организуются в транскриптазно-репликационный комплекс. Сегмент 4 кодирует гемагглютинин, сегмент 5 кодирует нуклеопротеин нуклеокапсид. Сегмент 6 кодирует нейраминидазу.

Сегмент 8 кодирует одновременно NS1 и NS2 белок. Вирус использует ферменты альтернативного сплайсинга клетки. Из кодирующего потенциала сегмента 8 кусочек с 5'- и 3'-концов образуется белок NS2. На 5'-конце закодирован (без участия ферментов альтернативного сплайсинга) белок NS1.

Проникновение вируса гриппа А в клетку

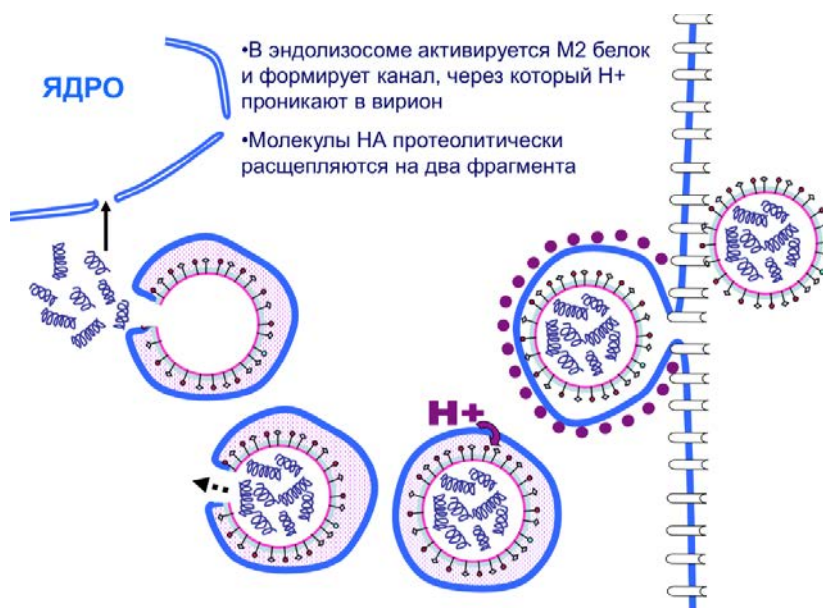


Рис. 87 Проникновение вируса гриппа А в клетку

Гемагглютинин вируса взаимодействует с рецепторами на поверхности клетки. Образуется эндосома, отшнуровывается от мембраны клетки и попадает в цитоплазму. Далее в кислой среде эндосомы активизируется белок М2 и формирует канал, по которому протоны проникают внутрь вириона. Идет закисление внутри вирусной частицы. В результате изменения рН происходит нарушение межбелкового взаимодействия внутри частицы, начинается частичная дезинтеграция вириона. В этот момент от матричного белка М1 отделяются фрагменты и происходит расщепление молекулы гемагглютинина.

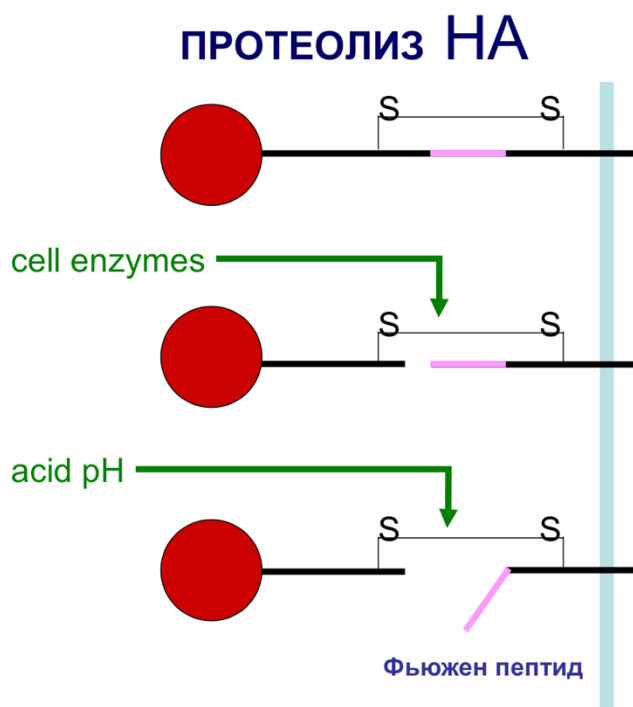


Рис. 88 Схема протеолиза НА вируса гриппа А

На рис. 88 справа изображена вертикальной чертой мембрана вируса. Горизонтальной – молекула гемагглютинина. С-конец молекулы частично находится внутри вирусной частицы. Участок пересечения молекулы НА и мембраны вируса называется трансмембранным доменом НА. N- и С- концы связаны дисульфидным мостиком. Из-за изменения рН активируются эндосомные протеазы и происходит расщепление молекулы НА. Розовый участок, на котором идет расщепление называется **фьюжн пептид**. Молекула остается почти целой из-за дисульфидного мостика. Из-за кислого рН конформация фьюжн пептида меняется так, что он отделяется от молекулы и становится острым концом. Множество фьюжн пептидов интеркалируют мембрану эндосомы. Это и приводит к слиянию мембраны эндосомы с мембраной вирусной частицы.

Протеолиз НА необходим для инфекционного процесса вируса гриппа.

Момент расщепления клеточными протеазами НА вируса видоспецифический. Протеазы человека не смогут разрезать НА птиц. Поэтому в норме вирусы птичьего гриппа и других животных не заражают человека. Видоспецифические протеазы, необходимые при заражении вирусом гриппа человека, имеют ткане-специфическую лизацию и находятся только в эпителиальных клетках носоглотки и легких. Оказавшись в цитоплазме, фрагменты нуклеокапсида проникают в ядро через ядерные поры. Здесь играет роль сигнал ядерной локализации, который присутствует в белке NP. Размер ядерных пор недостаточно велик для транслокации вирусного нуклеокапсида, поэтому его проникновение энергозависимое. Вирусу гриппа необходима транспортировка в ядро.

Лекция 6

В ходе репликации и транскрипции на каждой геномной РНК синтезируются два типа РНК – полноразмерная (+) нить РНК, которая служит матрицей для синтеза дочерних (-) РНК, и матричная РНК для синтеза вирусных белков. Эти продукты матричного синтеза сильно отличаются друг от друга.

Структура вирионной РНК, мРНК и (+)РНК-матрицы для синтеза дочерних (-) нитей геномной РНК

На рис. 89:

1. Все восемь вирионных РНК содержат на 3'- и 5'-концах одинаковые нуклеотидные последовательности длиной 12 и 13 нуклеотидов. 3'- и 5'- концы вирионной РНК частично взаимодополнительны
2. Вирусспецифические мРНК содержат на 5'-конце КЭП и еще 10 – 13 нуклеотидов клеточного происхождения.
3. На 3'-конце вирусные мРНК содержат полиаденилатную последовательность, которая присоединяется к растущей нити мРНК после сигнала полиаденилирования, локализованного за 15 – 22 нуклеотида до 5'-конца вирионной РНК
4. Полноразмерная (+)нить РНК комплементарна (-)нити вирионной РНК .

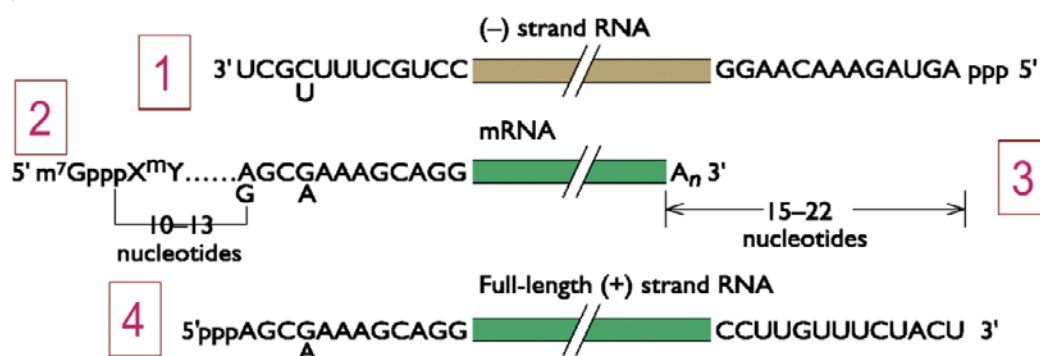


Рис. 89 Структура вирионной РНК, мРНК и (+)РНК-матрицы для синтеза дочерних (-) нитей геномной РНК

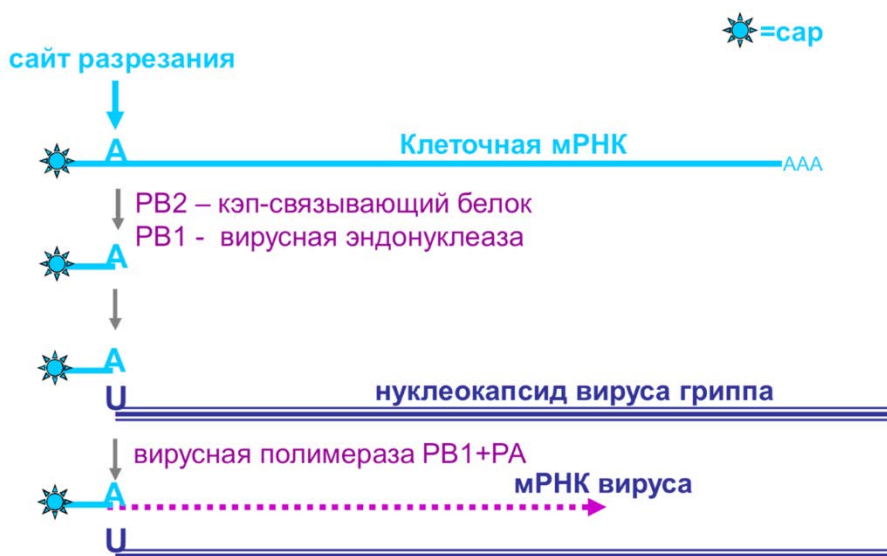


Рис. 90 Транскрипция (синтез мРНК)

Помимо репликазной и транскриптазной активности белки PB2, PB1 и PA обладают и другими активностями, которые необходимы при транскрипции. Транскриптазный комплекс активизируется при связывании со специфическими 3'- и 5'- терминальными олигонуклеотидными последовательностями. Далее в ядре белок PB2 связывается с клеточной мРНК. К нему присоединяется белок PB1, который, помимо транскриптазной активности, обладает активностью вирусной эндонуклеазы.

Вместе они связываются с клеточной мРНК, синтез которой идет в ядре, и отщепляют от клеточной мРНК 12-13 нуклеотидов с 5'-конца вместе с кэп. На конце фрагмента есть остаток аденина (см. рис, 91). На 3'-конце молекулы геномной РНК есть остаток урацила. Происходит взаимодействие и кусок молекулы мРНК клетки является затравкой для синтеза комплементарной (-)РНК антигеномной (+)РНК. При этом синтез осуществляют белки PB1 и PA. В итоге образуется мРНК вируса. При этом олигонуклеотид мРНК клетки остается в составе вирус специфической иРНК.

Этот типичный пример молекулярного каннибализма и является важным фактором патогенности вируса. Известно, что не экпированные мРНК в клетке не транслируются, таким образом инактивируются клеточные иРНК и прекращается синтез клеточных белков.

Синтез идет на мРНК до сигналов полиаденилирования. Полиаденилирование осуществляют белки PB1 и PA. Далее идет образование транскриптов и их транспортировка в цитоплазму. Начинается синтез белков. В ядре дальше происходит репликация вирусного генома.

Репликация РНК вируса гриппа А

- Происходит в ядре
- Механизм переключения с одного вида синтеза на другой неясен (NP, NS2, вирусиндуцир. кл. белки)
- Образуется полная копия геномной РНК
- Репликационную и транскрипционную функции выполняют одни и те же вирусные белки
- Вновь синтезированные (+) и (-) нити РНК сразу же связываются с белком NP (в отличие от мРНК)
- Нет четко выраженных ранней и поздней стадии инфекции

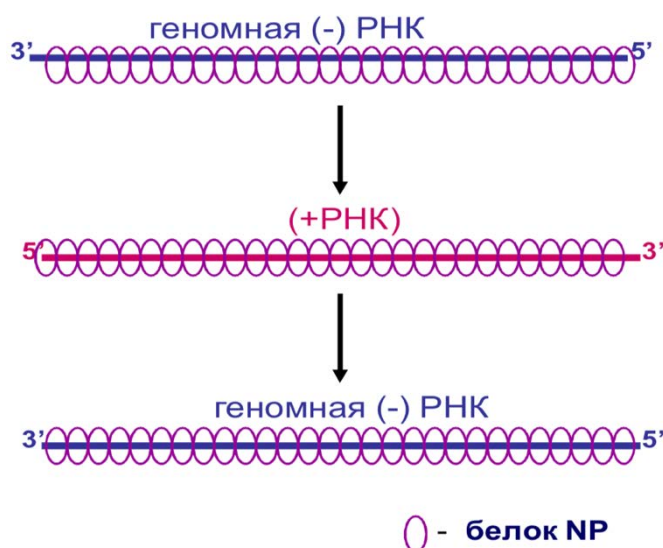


Рис. 91 Репликация РНК вируса гриппа А

«Судьба» синтезированных вирусных белков

M1, PB1, PB2, PA, NP, NS1 и NS2 транслируются в ядро для формирования вирусных рибонуклеопротеидов (см. рис. 91)

HA, NA и M2 синтезируются на ЭР и встраиваются в мембрану

NP связываясь с новыми вирусспецифическими РНК и переправляет их в цитоплазму M1 и NS2 (NEP) также связываются с дочерними геномными РНК, прекращают синтез РНК

РНП в комплексе с PB1, PB2, PA транспортируются в цитоплазму

NS1 в состав вирусной частицы не входит, регулирует экспрессию хозяйских генов, репрессор синтеза интерферона (связывает ds РНК).

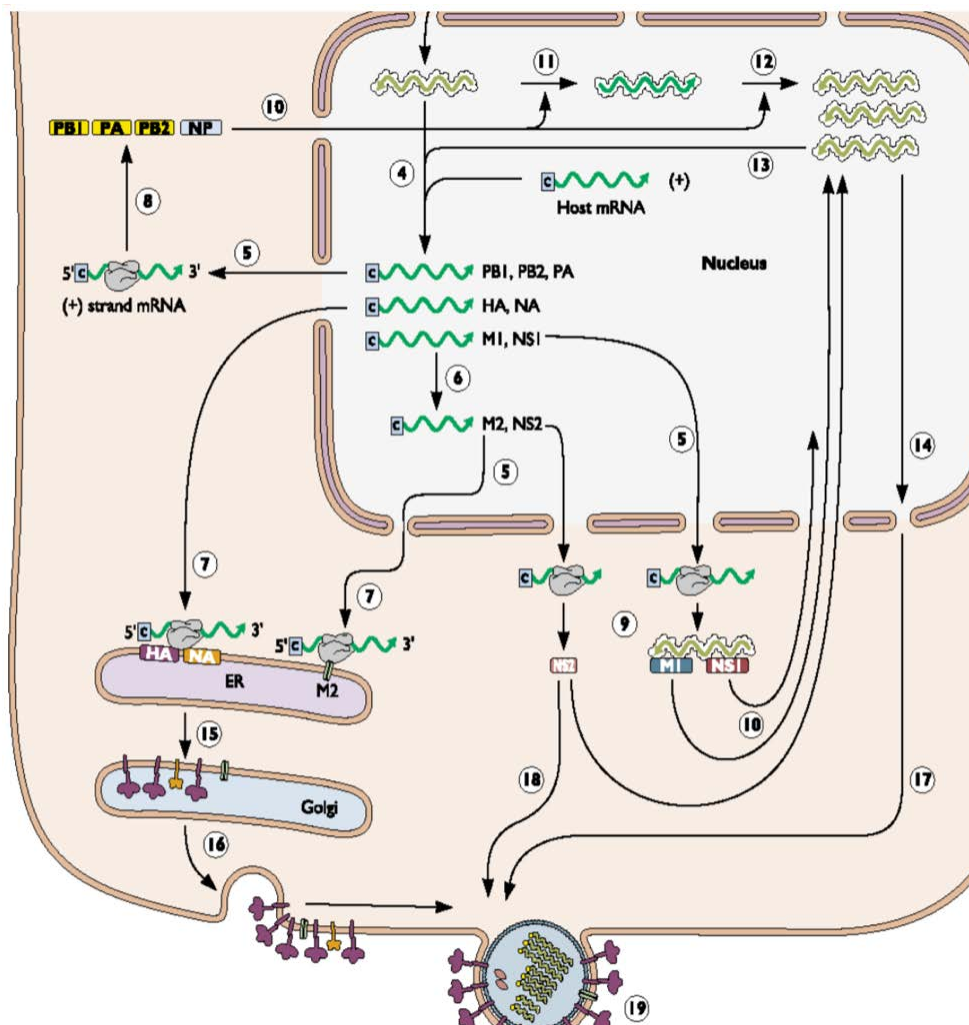


Рис. 92 Общая схема репликации вируса гриппа А в клетке

Инфекционный цикл вируса гриппа А

- a. HA связывает кл. рецепторы.
- b. Эндоцитоз, освобождение нуклеокапсида, который мигрирует в ядро
- c. Синтез м РНК и их экспорт в цитоплазму
- d. Трансляция мембранных белков на ЭР
Трансляция других вирусных белков и их импорт в ядро.
- f. Репликация геномной РНК в ядре
M1 и NS2 белки связываются с дочерними геномными РНК. Прекращают синтез РНК. РНП транспортируется в цитоплазму.
- g. Структурные белки вируса и нуклеокапсид собираются на плазматической мембране. Полностью собранный вирион отпочковывается от клеточной мембраны(важная роль NA).

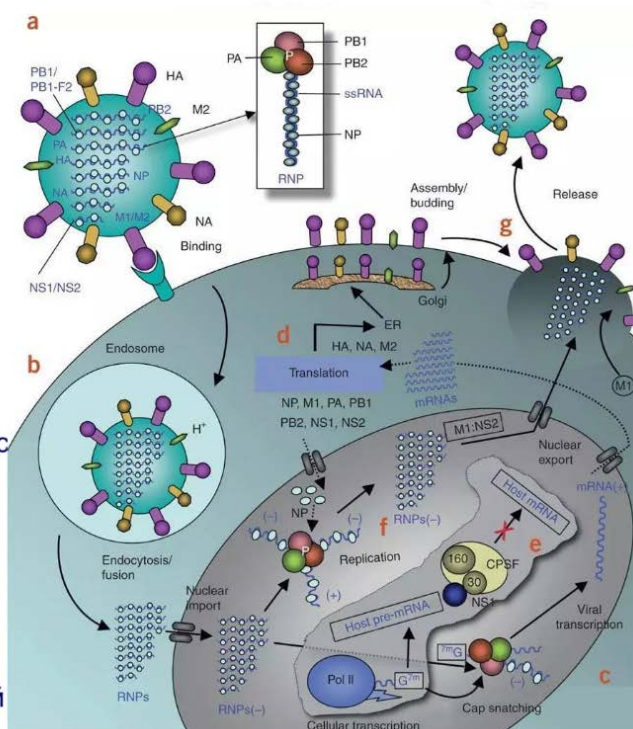


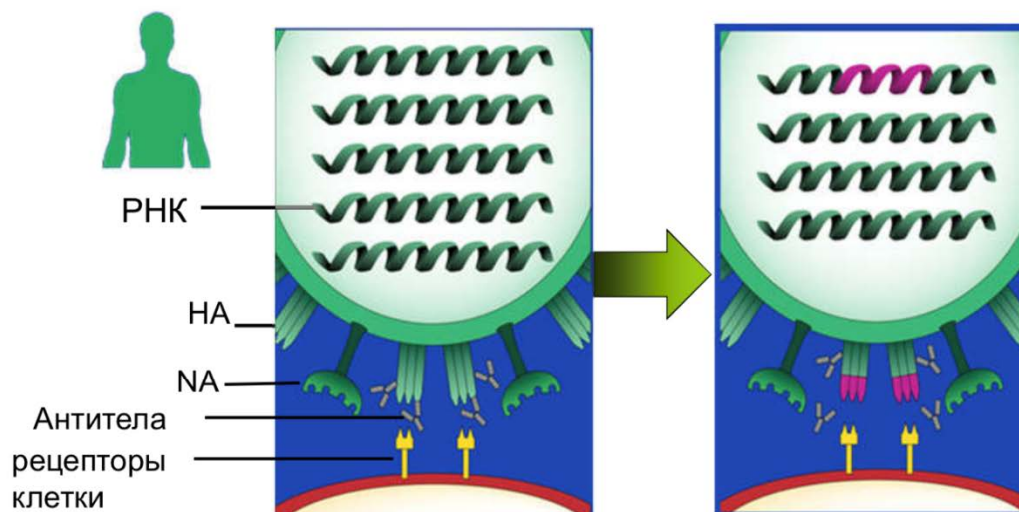
Рис. 93 Инфекционный цикл вируса гриппа А

Упаковка генома вируса гриппа А

Существует несколько версий.

1. Количество сегментов попадает в вирусную дочернюю частицу статистически.
2. В частицу попадает более 8 сегментов.
3. Процесс организован и частицы генома неслучайно попадают к месту отпочковывания – специфическая упаковка 7+1. Считается, что компонентом, который представляет из себя основу для организованной упаковки, является сегмент, который кодирует компонент транскриптазы PB2. Именно он обозначен при специфической упаковке по правилам 7+1 единицей. В этом участвуют комплементарные 5'- и 3'-концевые последовательности, которые одинаковы и присутствуют у всех геномных РНК.

Вирус гриппа А обладает высокой изменчивостью. Есть два типа изменчивости. В обоих случаях основную роль играет изменение в молекуле HA, меньше NA. Один из видов изменчивости называется **антигенный дрейф**.



Непрерывные частичные изменения антигенной структуры НА и NA, называемые **антигенным дрейфом, приводят к появлению новых эпитопов в этих молекулах.**

Рис. 94 Антигенный дрейф вируса гриппа А

На поверхности клетки есть рецепторы для НА. В виде «подсолнуха» показаны молекулы НА (см. рис. 94). Если в организме есть антитела, то они экранируют НА и не дают ему взаимодействовать с рецепторами клеток. Если же с предыдущей эпидемии произошли изменения в сегменте, который кодирует НА, то антитела не подействуют.

Помимо антигенного дрейфа есть еще **антигенный шифт**. Он приводит к возникновению пандемий. Это внезапное появление нового патогена штамма или субтипа вируса гриппа А. Происходит это следующим образом: есть вирус гриппа животных и птиц. Есть животное, которое подвержено и вирусу животных, и вирусу птиц. Они (как правило свиньи) являются местом реассортации вируса гриппа. Это значит, что если свинья заражена двумя вирусами, образуются частицы, содержащие геномные компоненты вируса человека и вируса птиц.

Эпидемиология гриппа

- Вирус гриппа А широко распространен
– Птицы, морские млекопитающие, лошади, свиньи, человек
- Штаммы характеризуются по антигенным свойствам НА и NA, которые обозначаются номерами (H1N1, H2N3, H5N1)
- В настоящее время у вируса гриппа А известно 18 вариантов НА (H1-18) и 9 NA (N1-9)
- Пандемии типичны для вирусов гриппа А, но не В и С. Вирусы В и С поражают только человека.
- У вируса гриппа В - один вариант НА и NA, у вируса гриппа С нет гена NA

У вирусов гриппа человека, как правило 3 варианта НА. Пандемии типичны только для вирусов гриппа А.

Хронология эпидемий

1889 – 1890гг. («Русский грипп», вызванная вирусом H2N2)
1918–1920гг. ("Испанка", вызванная вирусом H1N1)
1957–1958гг. ("Азиатский грипп", вызванный вирусом H2N2)
1968–1969гг. ("Гонконгский грипп", вызванный вирусом H3N2)
1977–1978гг. ("Русский грипп", вызванный вирусом гриппа H1N1)
1990-1991гг. ("Гонконгский грипп", вызванный вирусом H3N8)
1999г. («Птичий грипп», вызванный вирусом H5N1)
с 2009г. («Свиной грипп», вызванный вирусом H1N1)

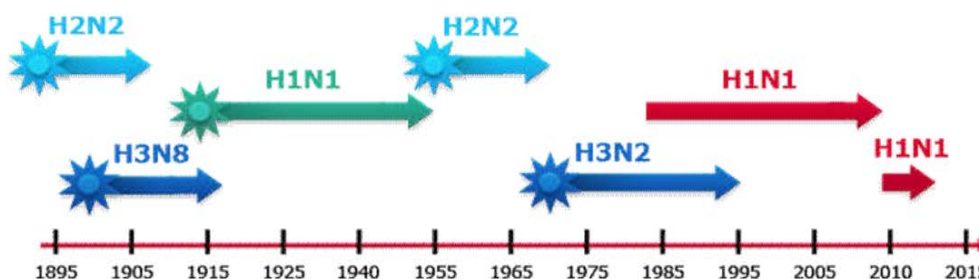


Рис. 95 Хронология эпидемий гриппа

Грипп Калифорния 04/2009 или Мексиканский свиной грипп H1N1

- Ежегодно в мире сезонным гриппом заболевает около миллиарда человек. Умирает 3 миллион (по другим данным: 500 тыс. – 2 млн).
- В США за год с сезонным гриппом госпитализируют 226 тысяч человек. Умирает 36 тысяч.
- По данным ВОЗ, за 5 месяцев свиным гриппом в мире заболели 285 138 человек. Умерли 3635.

Существует информация, что ВОЗ использовала вспышку гриппа для продвижения тамифлю.

Противогриппозные вакцины

В современных вакцинах присутствуют не только антигенные детерминанты вируса гриппа А, но и гриппа В. Часто весеннее ОРЗ обусловлено вирусом гриппа В.

- Используются живая (**аттенуированная** - в основе лежат вирусные частицы, которые пассируются в непермиссивных условиях и, свойства которых изменяются так, что остаются поверхностные гликопротеины, идентичные нормальному вирусу гриппа. Остальные компоненты вирусной частицы не

вызывают заболевания) и **инактивированная** (частицы вируса убивают) вакцины

- 70-80% эффективность (инактивированная вакцина)
- Вакцины: 1) целые вирионы; 2) сплит-вакцины (вирусная частица разрушена, инъекция осуществляется компонентами вирусной частицы, которые вызывают выработку антител); 3) субъединичные вакцины (поверхностные антигены)
- Возможность предсказать штамм или штаммы, которые могут вызвать эпидемию в текущем году является критически важной для производства вакцин

– ВОЗ дважды в год дает рекомендации о том, какой штамм (штаммы) ожидается.

Ретровирусы (reverse transcription)

- поp.Ortervirales, сем. Retroviridae
- ss (+) RNA, липопротеидная оболочка
- В жизненном цикле присутствует стадия транскрипции ДНК на матрице геномной вирусной РНК с помощью вирусного фермента обратной транскриптазы (ревертазы)
- Большое уникальное семейство, включающее вирусы, вызывающие онкологические заболевания, заболевания, поражающие иммунную систему и связанные с дегенеративными и неврологическими синдромами
- Группа VI по Балтимору

Табл. 2 Классификация Orthoretroviridae

Подсемейство Orthoretrovirinae	Виды
1. род <i>Alpharetrovirus</i>	Вирус лейкоза птиц, вирус саркомы Рауса (RSV)
2. род <i>Betaretrovirus</i>	Вирус опухоли молочных желез мышей
3. род <i>Gammaretrovirus</i>	Вирус лейкоза мышей (Moloney, Harvey)
4. род <i>Deltaretrovirus</i>	Вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус Т-клеточного лейкоза человека (HTLV)
5. род <i>Epsilonretrovirus</i>	Вирус дермальной саркомы
6. род <i>Lentivirus</i>	Вирус иммунодефицита человека I (HIV), вирус висна, вирус инфекционной анемии лошадей
Подсемейство Spumaretrovirinae (5 родов)	Обезьяний пенистый вирус, спумавирус человека

19

Структура вириона ретровируса

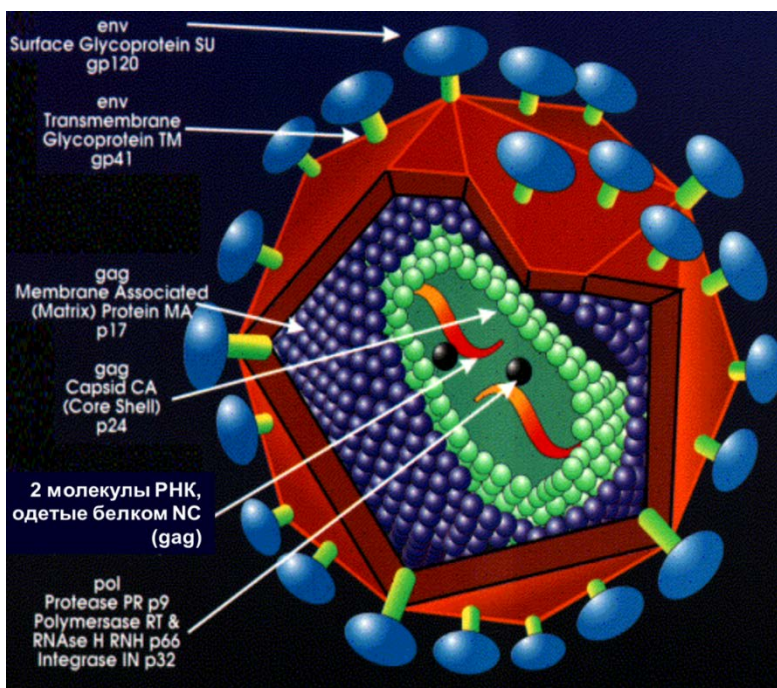


Рис. 96 Структура вириона вируса

Сферический вирион ($d \sim 100$ нм) покрыт липидной мембраной (см. рис. 96) с трансмембранным гликопротеином (TM) и гликопротеином SU, с помощью которого вирус распознает клеточный рецептор. МА – матриксный белок. СА – капсидный белок. NC – нуклеокапсидный белок в комплексе с нуклеиновой кислотой. Есть 2 молекулы РНК, которые находятся в комплексе с набором белков, обладающих ферментативной активностью.

На рис. 96 нуклеокапсид имеет вытянутую форму. На самом деле у ретровирусов белок СА может образовывать капсиды разной формы и этот капсид может быть по-разному расположен внутри вирусной частицы. В связи с этим структура ретровирусов делится на три типа:

1. Тип В - нецентрированный икосаэдрический капсид (вирус лейкоза мышей)
2. Lentiviruses - капсид в виде конуса (ВИЧ)
3. Тип С - капсид занимает центральное положение (вирус лейкоза птиц, вирус саркомы Рауса)

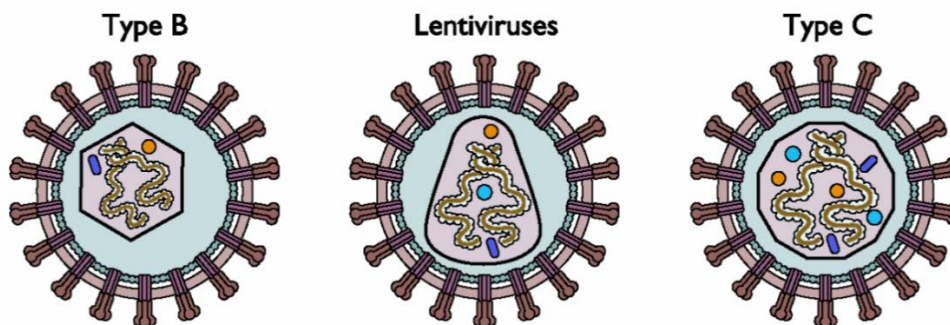


Рис. 97 Типы ретровирусов

Геном ретровирусов

- содержит две копии геномной РНК (диплоидный геном), около 10 000 нт
- РНК комплекс включает две молекулы тРНК - праймеры для обратной транскрипции
- PBS - primer binding site

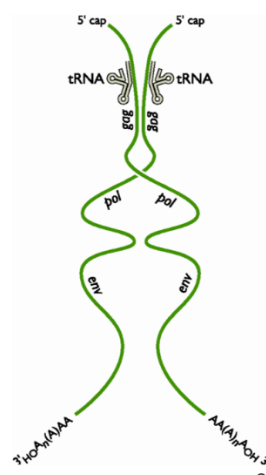


Рис. 98 Структура генома ретровирусов и краткая информация

У различных видов ретровирусов с геномом связаны различные виды клеточных тРНК. У вируса саркомы Рауса триптофановая тРНК.

Две одинаковые молекулы РНК кэпированы и полиаденилированы. На 5'-конце, на участке PBS прикреплены водородными связями тРНК. У вируса саркомы Рауса это транспортные триптофановые РНК.

Геном ретровирусов на примере вируса саркомы Рауса

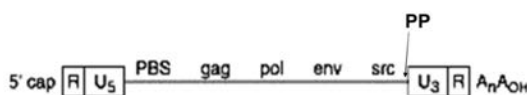


Рис. 99 Структура генома вируса саркомы Рауса

На 5'-конце сразу за кэпом (см. рис. 99) находится R – прямой повтор (12-235нт). Точно такой же повтор есть перед polyA на 3'-конце. На 5'-конце к повтору R примыкает уникальная последовательность U5 (80 – 200 нт). Эта последовательность играет ведущую роль при инициации обратной транскрипции и интеграции провирусной ДНК в хромосому. После U5 расположен сайт PBS (PB) – primer binding site (18 нт), который

тоже играет важную роль в регуляции обратной транскрипции и репликации генома. Показано, что этот участок играет роль в регуляции упаковки генома РНК в вирусные частицы. На 3'-конце за последним геном, находящимся в геноме, начинается последовательность, состоящая из 9 остатков аденина и гуанина, которые обозначаются РР и служат затравкой для инициации синтеза нити (+)РНК. Далее идет уникальная последовательность U3. Все регуляторные последовательности генома ретровирусов расположены на концах генома. Внутри молекулы находятся только белок кодирующие последовательности (гены).

Всю кодирующую последовательность можно разделить на 4 участка.

1. Gag (белки капсида):
МА, матриксный; СА, капсидный; NC, нуклеокапсидный
2. Pol (каталитические белки):
RT, pol (обратная транскриптаза); Prot, протеаза; Int, интеграза.
3. Env (белки, гликопротеиды внешней мембраны):
белок, связывающий рецепторы SU; трансмембранный белок TM
4. Src (онкоген) – есть не у всех.

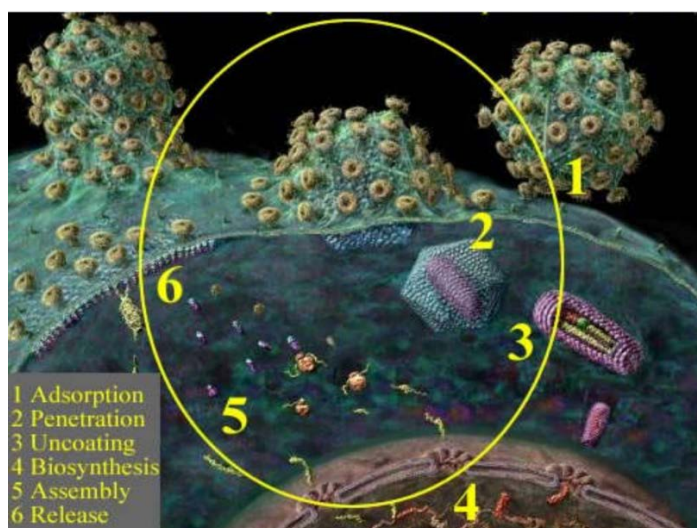


Рис. 100 Схема цикла репродукции ретровируса

SU участок взаимодействует с рецептором клетки, поверхностная мембрана вируса сливается с мембраной клетки. Капсид реализуется в цитоплазму.

Внутри капсида начинается обратная транскрипция. Синтез первой нити ДНК на матрице геномной РНК. Синтез осуществляет ревертаза, которая обычно обладает несколькими активностями: является собственно ревертазой – синтезирует ДНК на матрице РНК. Фермент обладает активностью рибонуклеазы H, то есть расщепляет РНК в составе гетеродуплекса РНК-ЛНК. Ревертаза обладает ДНК-полимеразной активностью, способностью катализировать синтез

ДНК на ДНК. Третья активность, которая может либо входить в состав, либо быть отдельным белком – активность интегразы.

Обратная транскрипция геномной РНК



Рис. 101 Обратная транскрипция геномной РНК ретровирусов с описанием

На рис. 101-103 ДНК красного цвета, РНК синего или голубого.

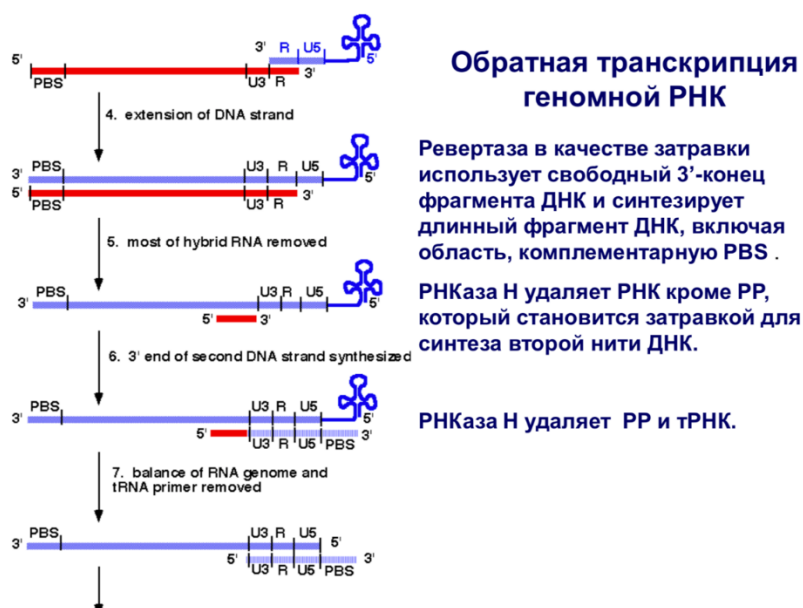


Рис. 102 Обратная транскрипция геномной РНК ретровирусов с описанием (б)



Рис. 103 Обратная транскрипция геномной РНК ретровирусов с описанием (в)

Интеграция провируса в геном клетки

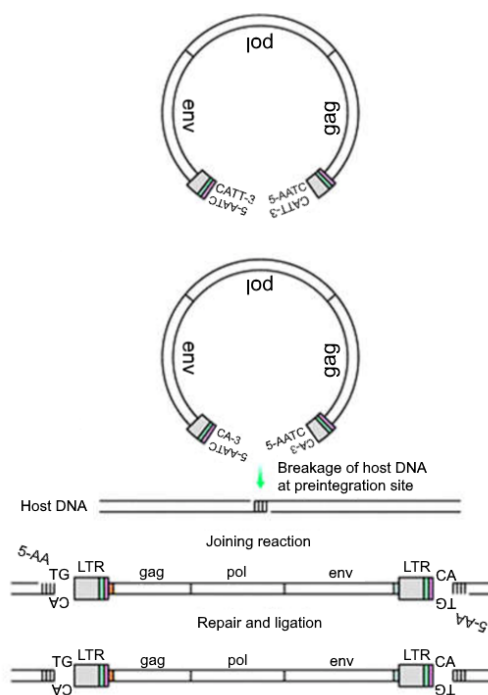


Рис. 104 Интеграция провируса в геном клетки

Осуществляется интегразой вируса и происходит неспецифически. На концах ds ДНК провируса находятся инвертированные повторы (2 - 10 нт). Интеграза удаляет по два терминальных нуклеотида, вносит разрывы в ДНК клетки и объединяет 3'- концы ДНК провируса с 5'- концами кл ДНК. Клеточные системы репарации ДНК заполняют бреши в обеих нитях ДНК, и лигируют разрывы.

Лекция 7

Ретровирусы

Интеграция провируса в геном клетки – происходит неспецифически, провирус может встраиваться в любое место клетки, независимо от нуклеотидной последовательности мишени.

В результате интеграции происходят следующие события:

- ДНК провируса укорачивается на 2 терминальных нуклеотида последовательности LTR
- Концы интегрированного провируса всегда имеют одну и ту же последовательность
- Клеточная ДНК претерпевает дупликацию на 4-6 нуклеотидов

Транскрипция вирусных последовательностей

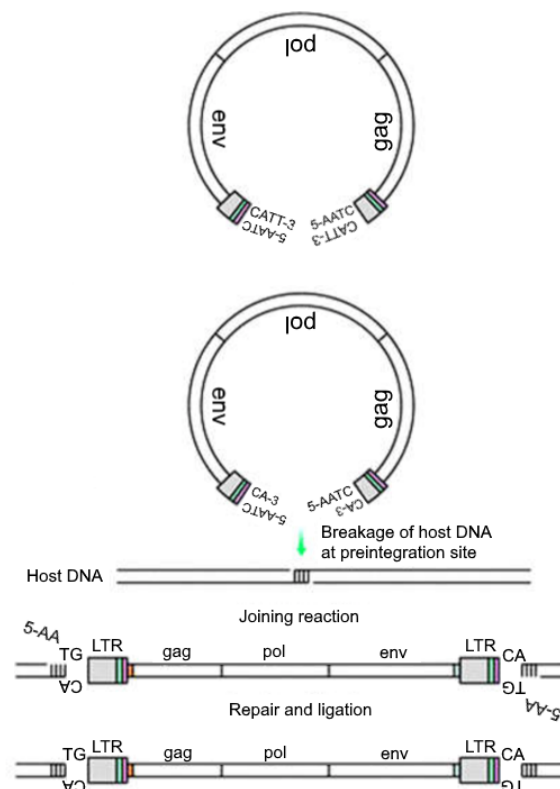


Рис. 105 Интеграция провируса в геном клетки.

Провирус находится в интегрированном состоянии на протяжении времени жизни клетки (зараженная клетка не может быть излечена) и размножается при репликации клеточной ДНК.

После интеграции провирус ведет себя также, как обычные клеточные гены, и закодированная в нем генетическая информация выражается при транскрипции клеточной ДНК (для этого используется клеточный фермент РНК-полимераза II).

Участки LTR фланкированы слева и справа в схеме генома провируса. Внутри расположены участки gag, pol и env (отсутствует ген sark).

Транскрипция осуществляется клеточной РНК-полимеразой и инициируется на левом LTR (участок функционирует как регулятор транскрипции провируса). Терминаторы транскрипции вирусных последовательностей находятся в правом LTR фрагменте. В процессе транскрипции провируса образуются 3 вида матричных РНК:

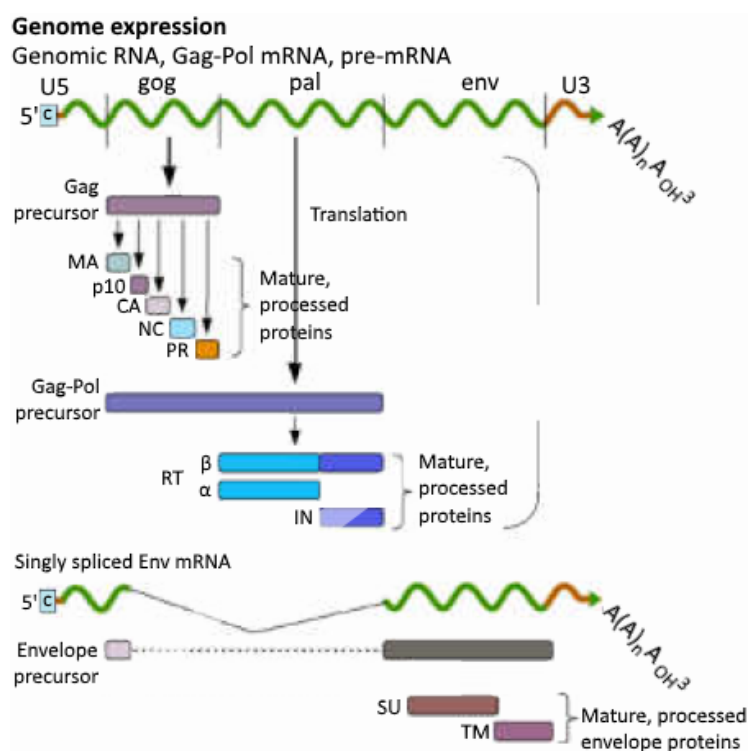


Рис. 106 Транскрипция вирусных последовательностей

1. Полноразмерная РНК (соответствует последовательности всего провируса, в ней закодированы гены gag, pol, env и sark (если он имеется), с этой матричной РНК считываются 2 полипротеина: gag и gag-pol):
 - а. Gag – при созревании вирусной частицы разрезается на функциональные белки (МА – матриксный, p10, NC – нуклеокапсидный, PR – фермент протеаза)

- b. Gag-Pol – при созревании вирусной частицы разрезается на компоненты обратной транскриптазы и интегразы
 - c. Гены env (src) экспрессируются за счет альтернативного сплайсинга полноразмерной мРНК, образуется субгеномная РНК (образуется полипротеин, который при созревании разрезается на два поверхностных полипротеида: SU – поверхностный, TM – трансмембранный)
2. Два субгеномных РНК

Жизненный цикл ретровирусов

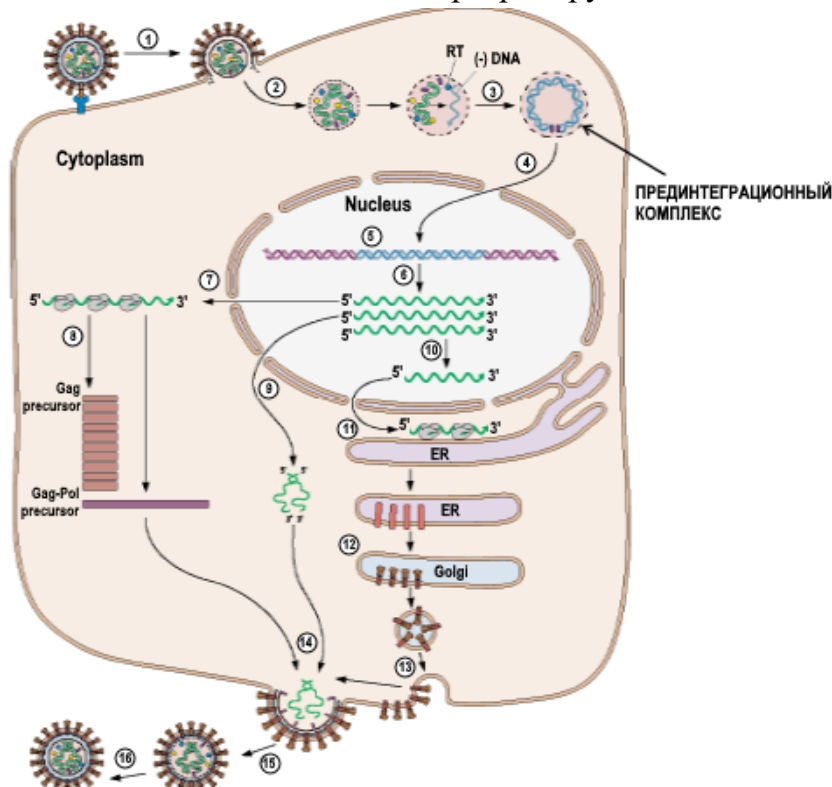


Рис. 107 Жизненный цикл клетки

Взаимодействие белка SU с поверхностным рецептором. Слияние мембраны вируса с мембраной клетки.

1. Реализация капсида (внутри находится нуклеокапсид) в цитоплазму. Внутри капсида начинается процесс, обратный транскрипции.
2. Образование провируса (двухцепочечная ДНК, фланкированная регуляторными последовательностями LTR и содержащая всю генетическую информацию вируса)
3. Провирус интегрируется в ядро клетки (в процессе митоза в отсутствие ядерной оболочки)

- Ретровирусы могут использовать не только поверхностную плазматическую мембрану, но и другие мембраны клетки (например, от аппарата Гольджи).

Ретроидные (параретро) вирусы (группа VII по Балтимору) – в качестве генома содержат двуцепочечную ДНК (цепи имеют различную длину), но кодируют обратную транскриптазу. К этой группе относится вирус Гепатита В.

$$(\pm \text{ДНК}) \xrightarrow{\text{прегеномная РНК}} (+\text{РНК}) \xrightarrow{\quad} (\pm \text{ДНК})$$

Рис. 108 Репликация ретровирусов

Схема репликации ретровирусов:



Рис. 109 Репликация ретровирусов

У ретровирусов РНК транскрибируется на ДНК не только для синтеза белков, но и для репликации самого генома.

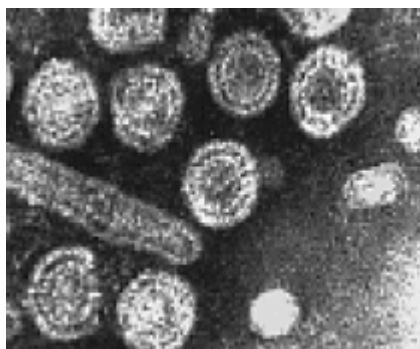


Рис. 110 Вирус гепатита В

Функции прегеномной РНК:

- При трансляции продуцирует вирусспецифические белки
- Служит матрицей для обратной транскрипции при синтезе ДНК

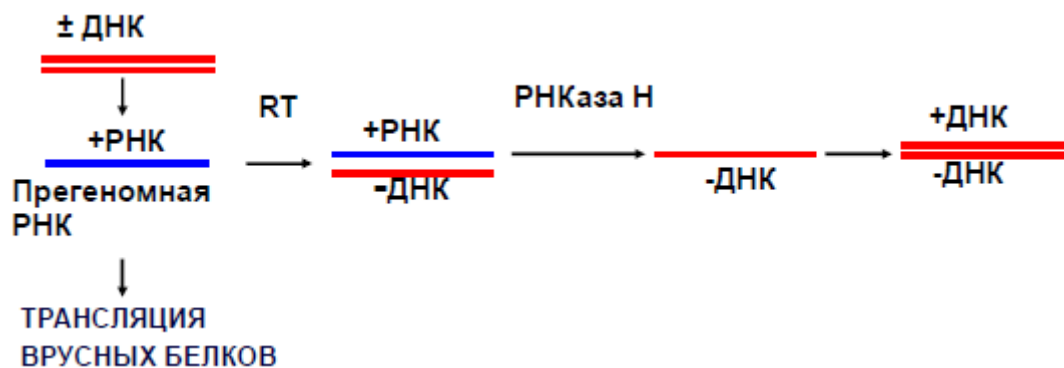


Рис. 111 Схема размножения ретровирусов

Пара ретро/ретровирусов образует прегеномную РНК:

1. Отправляет синтез вирусспецифических белков
2. Фермент RT (входящий в состав вирусной частицы) на (+)РНК образует (-)ДНК генома
3. Далее РНКазы Н удаляют из гетеродуплекса (+)РНК и (-)РНК РНК и на (-)ДНК с помощью активности того же фермента – образуется вторая цепь генома.

Онкогенные вирусы. Вирусной канцерогенез.

Четверть из известных вирусов животных обладают онкогенным потенциалом – могут вызывать вид клеточной пролиферации, ведущий к опухоли. Такой способностью обладают и РНК, и ДНК содержащие вирусы. У РНК содержащих вирусов есть две группы, обладающие онкогенным потенциалом: ретровирусы и флавивирусы (вирус гепатита С). У ДНК вирусов из шести известных групп четыре обладают потенциалом.

Вирусный канцерогенез

Вирусные инфекции ответственны за развитие 15-20% опухолей у людей и большинства новообразований у сельскохозяйственных животных. Про диких животных информации нет. Исследование экспериментального вирусного канцерогенеза внесло огромный вклад в понимание молекулярных механизмов неопластической трансформации (открытие вирусных и клеточных онкогенов и т.д.)

В клетке существует около 40 генов, мутации в которых приводят к неограниченному росту клеток. Эти гены можно поделить на два класса.

(а) гены, которые стимулируют рост и являются причиной появления опухолей при их суперэкспрессии (онкогены)

(б) гены, продукты которых способны ингибировать неконтролируемое деление клеток. Могут быть причиной возникновения неоплазии с случае отключения их экспрессии (**антионкогены** или **супрессоры опухолей**); p53, pRb

Онкогены – это гены, экспрессия которых приводит к неконтролируемой пролиферации клеток. Также онкогеном можно назвать участок вирусного генома (ДНК или РНК), который является причиной опухоли. Первым обнаруженным онкогеном был онкоген вируса саркомы Рауса – src. Если онкоген не экспрессируется сам, то он может вызвать неконтролируемую пролиферацию с помощью активации клеточного гомолога – **протоонкогена**. Протоонкогены присутствуют в клетках и в норме они не экспрессируются или экспрессируется на очень низком уровне. Они контролируют нормальную пролиферацию клеток, в результате внесения вирусного онкогена, соматической мутации или транспозиции могут превращаться в клеточный онкоген.

Супрессоры опухолей (антионкогены) осуществляют негативный контроль клеточной пролиферации. Подавляют активность онкогенов и контролируют активность протоонкогенов.

p53

– «страж генома», участвует в системе, контролирующей любые повреждения и

нарушения хромосом, фактор транскрипции, регулирует экспрессию белков, ответственных за активацию различных супрессорных систем.

pRb

– протоонкогены и антионкогены образуют сложную систему позитивно-негативного контроля клеточной пролиферации и дифференцировки. Злокачественная трансформация реализуется через нарушение этой системы.

Вирусная трансформация клеток

Из-за участия вирусных генов в регуляции процессов в клетке происходят изменения биологических функций клетки. То есть вирусы придают инфицированной клетке определенные свойства, характеризующие неоплазию, т.е. опухоль. Эти изменения часто (но не всегда) являются результатом интеграции вирусного генома в геном клетки-хозяина. Трансформация может быть индуцирована другими факторами помимо вируса.

Истинные вирусные онкогены – онкогены ДНК-содержащих онкогенных вирусов. Нет гомологов в клетке.

ДНК-содержащие онкогенные вирусы

При попадании в клетку может быть два сценария развития инфекции. В пермиссивных клетках экспрессируется весь геном вируса, происходит репликация генома и образование вирусного потомства. Выход наружу с помощью лизиса клетки.

В непермиссивных клетках лизиса не будет. Геном или его часть случайным образом экспрессируется в клетке и иногда встраивается в состав генома. В любом случае будет трансформация.

ДНК-содержащие онкогенные вирусы являются модельной системой для исследования молекулярной биологии эукариотической клетки: репликация генома и экспрессия генов ДНК-содержащих вирусов идет с использованием механизмов и ферментативного аппарата клетки.

Говорить будем о двух группах, обладающих онкогенным потенциалом: Polyomaviridae и Adenoviridae. Их сходства:

- Хорошо изученные ДНК-содержащие вирусы, индуцирующие опухоли

- В природных хозяевах, в перmissive клетках, инфекционный процесс приводит к репликации вируса, лизису зараженных клеток и освобождению вирусного потомства
- Используют один и тот же механизм трансформации клеток и являются экспериментальными моделями для изучения причин образования опухолей
- Ранее считалось, что аденовирусы и полиомавирусы не связаны с онкологическими заболеваниями человека. Недавно было доказано, что **Human polyomavirus 5** является причиной возникновения рака клеток Меркель.

Понять, является ли вирус причиной возникновения опухолей сложно, так как есть понятие «вирус, ассоциированный с опухолью». После возникновения трансформаций и появления новообразования эти ткани могут быть заражены вирусами (полиомавирус В, как причина рака простаты).

Семейство Polyomaviridae

сем. Polyomaviridae
род Betapolyomavirus
Simian Virus (SV40)

Alphapolyomavirus

(42 видов)

Betapolyomavirus

(34 видов)

Deltapolyomavirus

(4 вида)

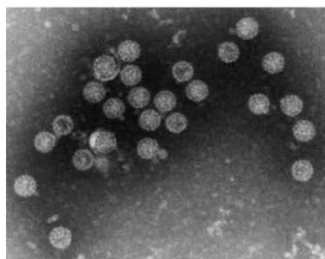
Gamma polyomavirus

(9 видов)

Не включены

(9 вида)

Macaca mulatta polyomavirus 1



Обезьяний вирус -40

Simian Vacuolating Agent 40

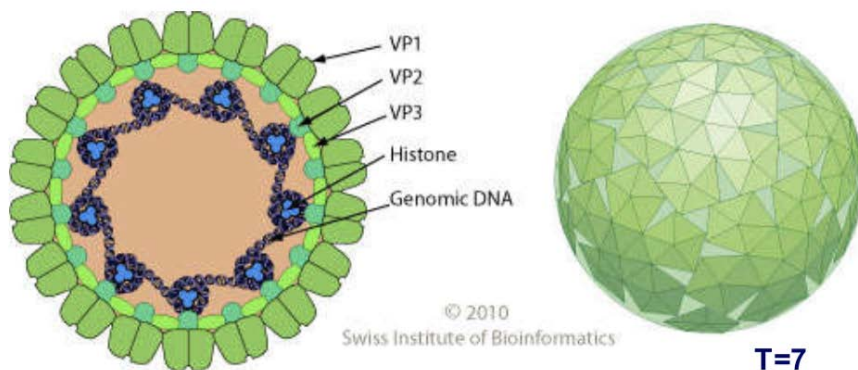
Реплицируются в ядре

Рис. 112 Семейство Polyomaviridae. Краткая информация

Вирус был найден в 1960 году в культуре почек резуса макаки, которые использовались для получения полиовакцины. Назвали SV 40, так как он вызывал вакуолизацию в культуре клеток зеленой мартышки, где продуцировалась вакцина против полиомиелита.

Обезьяний вирус - 40 (SV-40)

- Икосаэдр, 72 капсомера (12 пентомеров, 60 гексамеров)
- Три структурных белка VP1 (40 kD), VP2 (38kD), VP3 (27kD);
- Замкнутая кольцевая ds ДНК 5243 пн связана с клеточными гистонами H2a и b, H3, H4 (минихромосома)



- Неструктурные регуляторные белки большой **T-антиген** (82 kD) и малый **t-антиген** (17kD)

Рис. 113 Структура обезьяньего вируса. Краткая информация

T=7. Для упаковки генома вируса в частицу белковую, он должен быть конденсирован. Для конденсации надо нейтрализовать отрицательный заряд. Вирусы используют клеточные и вирус специфические белки. В данном случае используются клеточные гистоны. Другими словами, молекулярная биология ДНК-содержащего вируса близка к молекулярной биологии клетки.

Неструктурные регуляционные белки (см. рис. 113) являются истинными вирусными, именно экспрессируются при трансформации клетки. При попадании вирусной частицы в перmissive клетки идет продуктивный цикл (клетки обезьяны) с лизисом клетки. При непродуктивной инфекции вирусный геном встраивается в состав клеточного генома, либо весь, либо тот участок, в котором закодирован T-антиген, либо t-антиген. После идет трансформация клеток.

Процесс экспрессии вирусных белков делится на две фазы раннюю и позднюю

- **РАННИЕ** гены кодируют ферменты и регуляторные белки, необходимые для начала репликации
- **ПОЗДНИЕ** гены кодируют структурные белки, необходимые для сборки и созревания вируса.

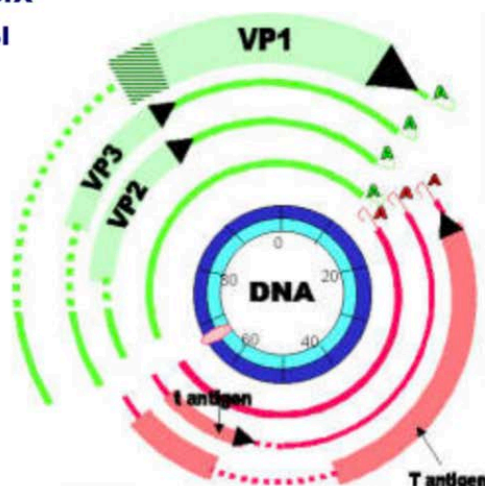
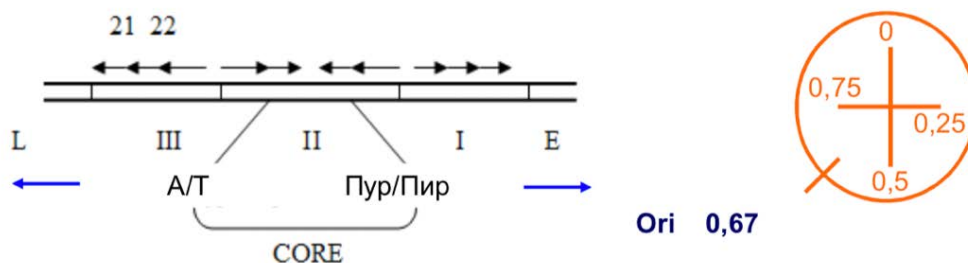


Рис. 114 Структура генома SV 40

Для ориентации в положении генов геном делят либо на 100 частей, либо на единицу. Поэтому либо доля от ста, либо от единицы показывает положение гена. На схеме структуры генома SV 40 зеленым отмечены места, где закодированы структурные белки, красным – где регуляторные.

Старт транскрипции для всех типов генов находится в одной точке. В 100 балльном делении эта точка 67. Участок называется **Ori**.



- (I) пентануклеотидные последовательности **GAGGC**, организованные как инвертированный повтор и узнаваемые Т-антигеном.
 - (II) **CORE** длиной 64 пн (Core Ori Recognition Element) состоит из центрального участка, с которым связывается Т-антиген, и фланкирован с одной стороны А/Т богатым участком, с другой - Пур/Пир последовательностью.
 - (III) участке находятся повторы 21,22 п.н. –участок переключения с ранней на позднюю стадию транскрипции
- Общая длина **Ori** со всеми прилегающими участками – 170 п.н.

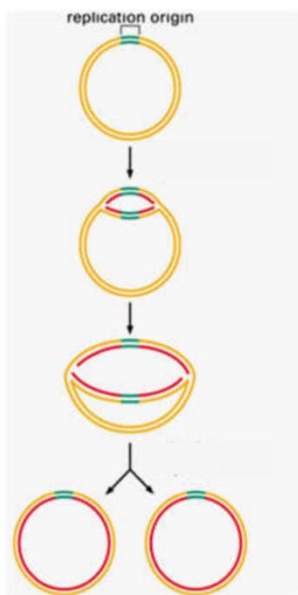
Рис. 115 Структура Ori

Ранняя транскрипция гена

Осуществляется клеточной РНК-полимеразой. Все посттранскрипционные модификации осуществляются аппаратом клетки. Образуется первичный транскрипт и подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого образуются мРНК для малого t- и большого Т-антигена (белки имеют общий N-конец и различные С-концы полипептидной цепи), мРНК транслируется в цитоплазме. После образования белков оба транспортируются в ядро. Здесь кончается ранняя стадия.

Поздняя фаза литического цикла начинается с репликации вирусного генома. Вирусный геном образует комплекс с клеточными гистонами – минихромосому, неотличимую от клеточного хроматина. Вирус использует клеточный аппарат репликации ДНК. Механизм репликации ДНК SV40 сходен с репликацией клеточной ДНК.

Репликация ДНК SV40



- Репликация ДНК по схеме Кернса происходит в ядре
- Т-антиген необходим
- Т-антиген изменяет локальную структуру Ori
- Т-антиген взаимодействует с праймазой, образуется нуклеотидная затравка
- Клеточная ДНК-полимераза узнает Ori – участок начала репликации, только, если с ним связан Т-антиген

Рис. 116 Репликация ДНК SV40

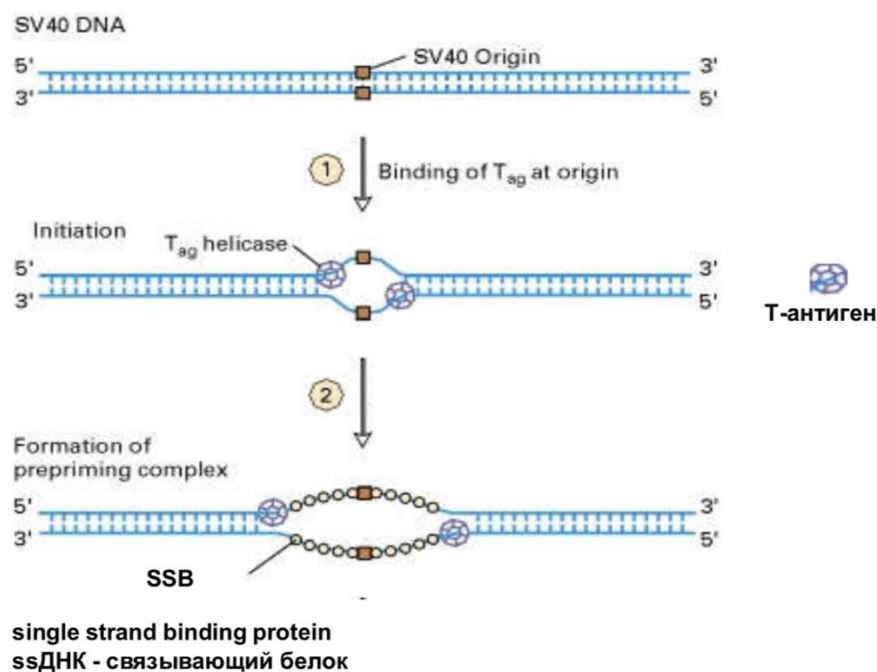


Рис. 117 Схема репликации ДНК SV40

К участку Ори подходят комплексы из Т-антигена по 4 молекулы, тетрамер. Т-антиген работает как хеликаза – расплетает двуцепочечную ДНК, там, где находится Origin. В этот момент нужен клеточный белок, который связывает одноцепочечные участки ДНК. Хеликазная активность расплетающего две цепочки и связывание одноцепочечных участков с белком SSB позволяет к участку подойти белкам, которые необходимы для образования полимеразного комплекса.

Для начала репликации нужны: праймаза, которая будет синтезировать затравку, необходимую для работы ДНК-полимеразы. Затравка будет состоять из короткого олигорибо (10нт) и короткой олигодезокси (20нт). Далее нужен белок SSB, ДНК-полимераза II, которая взаимодействует с антигеном и рядом других клеточных белков, необходимых для репликации. Есть данные, что Т-антиген полностью не справляется и для дальнейшего расплетения цепей необходима еще клеточная репликаза. Есть две лидирующие и две отстающих цепи.

Репликация ДНК проходит в **двух направлениях**: циркулярный геном образует **две репликативных вилки**. Образуется лидирующая и отстающая цепи по принципу образования фрагментов Оказаки с последующими сшиванием ДНК-лигазой этих фрагментов.

Клеточные белки:
ss-ДНК- связывающий белок, топоизомеразы, хеликаза, лигаза

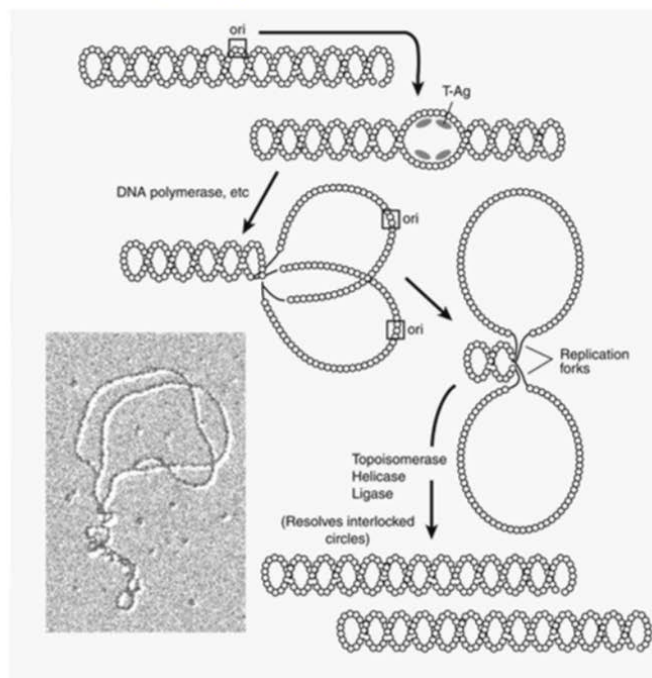


Рис. 118 Репликация ДНК SV 40. Краткая информация

Т-антиген (tumor) – мультифункциональный ДНК-связывающий белок (фосфопротеин). Одна молекула Т-антигена связывается с каждым из 4-х пентамеров GAGGC, изменяет локальную структуру ori. Т-антиген является АТФ-зависимой хеликазой: способен входить в дуплекс и раскручивать две цепи ДНК. Так же он является фактором транскрипции: авторегуляция ранней транскрипции, индукция поздней транскрипции вирусных генов. Т-антиген определяет круг хозяев. Самое главное – это истинный онкоген, который индуцирует трансформацию в непермиссивных клетках. Т-антиген может связывать p53 и влиять на образование неоплазии.

t- антиген взаимодействует с клеточными белками с фосфатазой-протеиназой Па. Он может активировать экспрессию ряда клеточных белков, которые ассоциированы с переходом клеточного цикла в S-фазу. Для SV40 t-антиген не является онкогеном, но может влиять на трансформационную активность Т-антигена.

Поздняя транскрипция генов

Только после репликации используются вновь образованные молекулы. Одновременно ранняя транскрипция может продолжаться, но на низком уровне. мРНК для VP1,2 и 3 образуются из первичного транскрипта, который подвергается альтернативному сплайсингу. Старт транскрипции идет с ориджина. Т-антиген регулирует возрастание транскрипции с поздних промоторов и понижение уровня транскрипции с ранних промоторов.

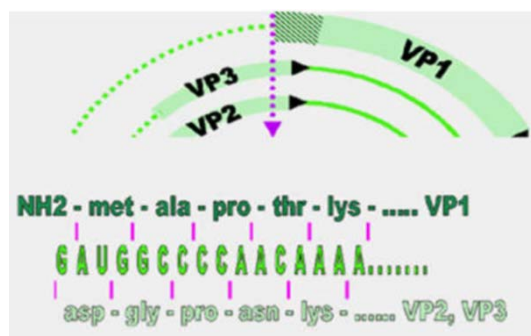


Рис. 119 Транскрипция генов. Перекрывание рамок считывания

У VP1 с N-конца кодируется определенный набор аминокислот. У VP2 и VP3 идет сдвиг рамки и последовательность белка VP2 и VP3 на С-конце полностью отличается от аминокислотной последовательности N-конца VP1.

Сборка вирионов

VP1,2 и 3 образуются в цитоплазме, белки транспортируются к ядру. Вирусная частица, состоящая из капсида и вирусной ДНК, ассоциированной с клеточными гистонами, собирается в ядре. Большое количество частиц аккумулируется в ядре и формирует тельца включений. Вирионы освобождаются в результате лизиса клетки.

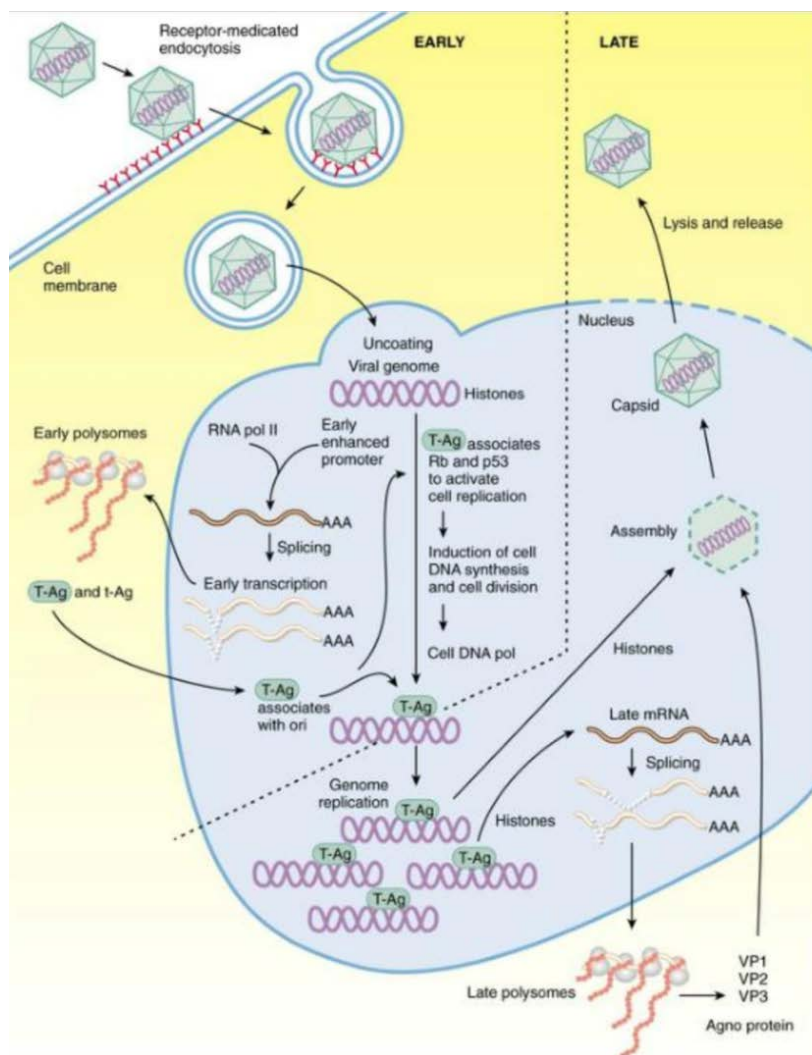


Рис. 120 Литический цикл репликации SV40

ДНК, ассоциированная с гистонами идет в ядро. В ранней части инфекции образуются мРНК на Т- и t-антигенов, перемещаются в цитоплазму. Образуются регуляторные белки, которые возвращаются в ядро. После начинается репликация ДНК с активным участием Т-антигена. Дочерние образовавшиеся молекулы могут служить матрицей для образования поздних транскриптов. Начинается поздняя часть транскрипции. Образуются мРНК для структурных белков, они поступают в цитоплазму, образуются белки VP1,2,3, которые мигрируют обратно в ядро. Образуются вирусные дочерние частицы. Происходит лизис клетки.

Ранняя фаза: 20-25 часов

Поздняя фаза: 25-35 часов

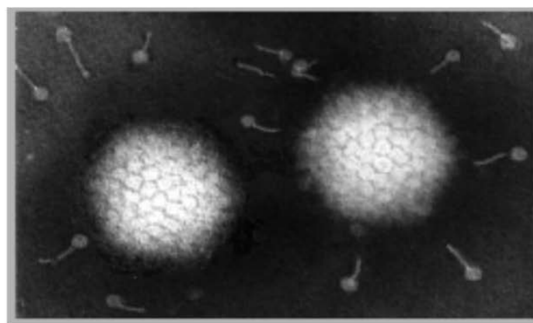
Весь цикл: 45-60 час

Основные моменты

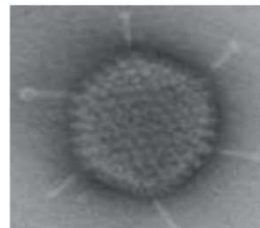
- Четко выраженные ранние и поздние этапы инфекционного процесса
- Небольшой геном – кодирует ограниченное число белков
- Множественное использование одной и той же последовательности ДНК (альтернативный сплайсинг, перекрывающиеся открытые рамки считывания)
- Мультифункциональный белок Т-антиген
- Используются клеточные механизмы синтеза и посттранскрипционной модификации РНК, клеточный аппарат синтеза ДНК, клеточные гистоны для упаковки вирусной ДНК.

Семейство Adenoviridae

- Диаметр 80-100 нм
- Нет внешней оболочки
- Икосаэдрический вирус с отростками (20-30 нм), которые расположены на каждой из 12 вершин икосаэдра; играют важную роль в инициации инфекции.



- Геном линейная ds ДНК, связанная с вирусными основными белками, около 40 000 пн



Группа I

Рис. 121 Семейство Adenoviridae. Краткая информация

У человека вызывают коклюш, ОРЗ, конъюнктивит. В силу размера вирус может позволить себе собственные белки для конденсации генома.

сем. Adenoviridae

- род Mastadenovirus- заражают млекопитающих , 6 видов (А-Е) –человека. Human mastadenovirus C
- род Aviadenovirus – аденовирус птиц (А-Е) Fowl aviadenovirus A
- род Atadenovirus – аденовирус овец Ovine atadenovirus D
- род Siadenovirus – аденовирус лягушек Frog siadenovirus A
- род Ichtadenovirus – аденовирус рыб Sturgeon ichtadenovirus A

Лекция 8

Семейство Аденовирусов (Adenoviridae)

Частица аденовируса – простой вирус, который состоит из 1500 белковых субъединиц (252 капсомера: 12 пентонов – субъединицы, состоящие из пентона основания, стебля и узелка, и 240 гексонов). Триангуляционное число аденовирусов = 25.

Белки, входящие в вирион, можно разделить на белки капсида и белки кора (сердцевины).

Белки капсида

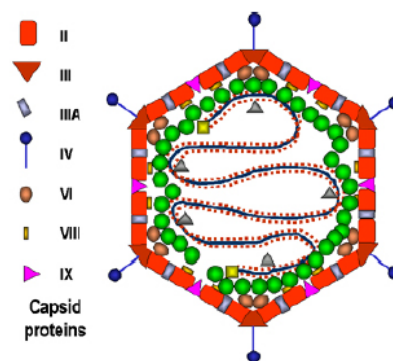


Рис. 122 Структура капсида

Обозначения на рис. 122:

- II – образует гексоны (основной белок гексонов)
- III – образует пентоны
- IIIa – входит в состав гексона, окружающего пентон основания
- IV – отросток (тример)
- VI, VIII, IX – белки ассоциированные с гексонами

Таким образом, в капсид аденовируса входит 7 белков.

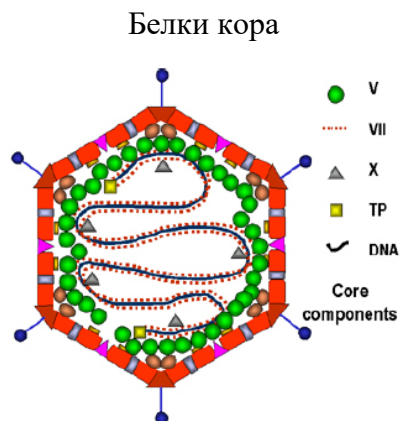


Рис. 123 Структура кора

Обозначения на рис. 123:

- V – выстилает капсид, является основой кора, не контактирует с ДНК
- VII – главный белок кора (функциональный аналог гистонов)
- TP – терминальный белок (связан с 5'-концами двуцепочечного генома и играет большую роль в репликации генома)
- 2 молекулы на вирион
- X – минорный белок, связанный с ДНК

Литический цикл

Первые этапы литического цикла

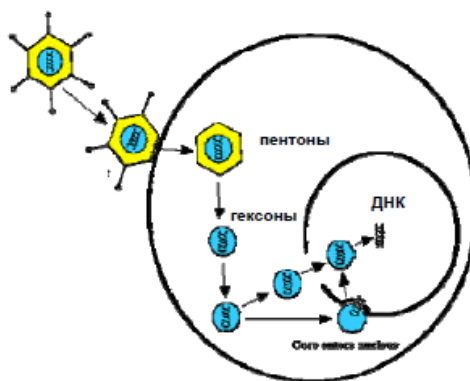


Рис. 124 Инфицирование эпителиальных клеток частицами Аденовируса

Отростки аденовирусов взаимодействуют с рецепторами и вирус поглощается клеткой путем эндоцитоза. Далее происходит постепенное разделение вирусной частицы при ее миграции к ядру. Отростки отделяются при поступлении в эндосому, затем уходят пентоны и остается геном, ассоциированный с гексонами и др. белками кора. В конце концов в клетке оказывается ДНК в комплексе с белком №7 (основным белком, который нейтрализует заряд ДНК).

Литический цикл репликации аденовирусов (~24 часа) можно разделить на:

- Ранняя фаза (6-8 часов)
 - Ранняя транскрипция
 - Истинно ранняя
 - Отсрочено ранняя
 - Замедленно раннюю

В результате образуются неструктурные регуляторные белки

- Поздняя фаза
 - Начинается с репликации ДНК (ранняя стадия)
 - Поздняя транскрипция и образование структурных белков
 - Заканчивается с появлением вирусного потомства

Ранняя и поздняя транскрипции происходят с помощью клеточной РНК-полимеразы II.

Транскрипция происходит одновременно с двух цепей вирусной ДНК (не характерно для клеточных ДНК), с удаленных друг от друга районов. Цепи условно делятся на R и L. Над геномом расположены транскрипты, которые образуются с цепи R и транскрипция идет справа-налево. Остальные транскрипты образуются с цепи L (транскрипция идет слева- направо).

Истинно ранние гены:

- Область E1A:

Кодирует два полифункциональных белка, которые контролируют транскрипцию всех реплицирующихся клеточных и вирусных генов, этот белок не связывается непосредственно с ДНК, но связывается с большим числом транскрипционных факторов. Белок E1A существует в длинной и укороченной формах
- Область E1B:

В ходе ранней транскрипции транскрибируется область E1B. Здесь образуются 2 матричные РНК, 2 белка: 55K и 19K, которые влияют на продвижение клетки по циклу и подавляют апоптоз
- Белки E1A и E1B:

Т-антигены (онкогены), в непермиссивных клетках именно эти белки отвечают за трансформацию клеток. У полиомавируса существует только один основной истинный вирусный онкоген. Онкогены имеют общий промотор, подвергаются альтернативному сплайсингу, после чего образуется мРНК для экспрессии различных областей генома
- Область E2A и 2B:

Общий промотор, мРНК образуются в результате альтернативного сплайсинга. Образуются DBP – ДНК-связывающий белок, ДНК-

полимераза и предшественник TP (80 kD превращается в 55 kD в процессе сборки)

- Область E3:
Несколько видов мРНК, несколько белков, располагаются на поверхности клетки и участвуют в защите зараженных клеток от лимфоцитов
- Область E4:
6 мРНК и 6 полипептидов. Функции: влияют на сплайсинг вирусных РНК, транспорт вирусных мРНК в цитоплазму, защита от апоптоза

Замедленно ранние гены (IX и Iva2):

- Область E1B и E2B:
Активаторы поздней транскрипции

Особое внимание необходимо обратить на следующие продукты ранних транскриптов:

- E1A – контролируют транскрипцию всех реплицирующихся клеточных и вирусных генов
- E1A+E1B – онкогены (играют определяющую роль при трансформации клеток)
- E2A – DBP – ДНК-связывающий белок
- E2B – вирусная ДНК-полимераза, предшественник белка TP

Поздняя стадия литического цикла (начинается с репликации вирусной ДНК):

- Репликация проходит в ядре. Необходимо, чтобы клетка находилась в S-фазе клеточного цикла
- Чтобы произошла репликация ДНК, нужна собственная ДНК-полимераза (продукт области E2B)
- На концах ДНК имеются инвертированные повторы длиной 100-200 пн
- С 5'-концами цепи ковалентно связан TP



Рис. 125 Геном аденовируса

Репликация ДНК аденовирусов

Общая схема репликации ДНК аденовирусов – механизм замещения. Фрагменты Оказки не образуются, обе цепи синтезируются по непрерывному механизму.

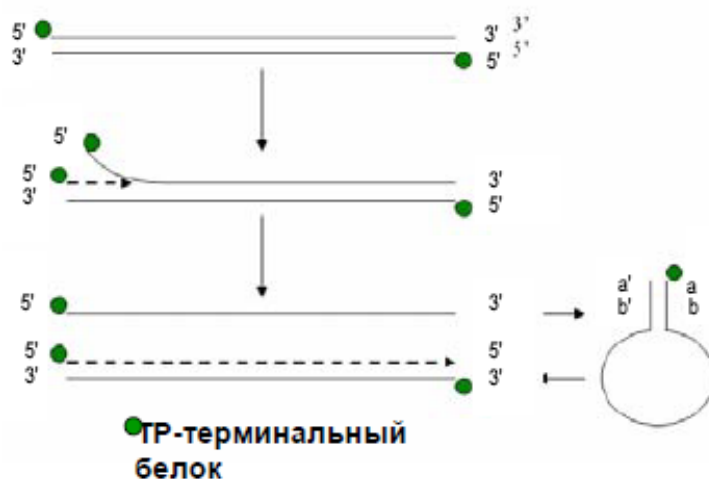


Рис. 126 Общая схема репликации ДНК аденовирусов.

- На дуплексе ДНК синтезируется дочерняя цепь с вытеснением материнской цепи.
- В результате образуется двуцепочечная молекула, в которой присутствуют материнская и дочерняя цепь и освобождается одна из материнских цепей, т.е. каждая последующая двуцепочечная ДНК наследует одну родительскую цепь и одну новую (такой метод репликации называется полуконсервативным).
- Освободившая цепь за счет инвертированных повторов образует структуру типа «сковородки с ручкой». Тогда инициация синтеза второй цепи может происходить на «ручке сковородки».

Любой фермент ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (независимо, клеточной или вирусной природы) может работать только при наличии свободного 3'-гидроксила, т.е. для репликации обязательно необходимо, чтобы был синтезирован праймер. У аденовирусов праймером является нуклеотид-белковая затравка.

Эта затравка состоит из терминального белка, который связан фосфодиэфирной связью с цитидинтрифосфатом через серин, т.е. получается терминальный белок сериндезоксцитидилфосфат.

Инициация синтеза ДНК:

- Нуклеотид-белковая затравка (праймер – TP+dCTP) взаимодействует с геномом аденовируса (связанного с терминальными белками). В результате белок-белковых взаимодействий происходит сближение нового терминального белка с белком, уже связанным с материнскими цепями.
- Происходит взаимодействие дезоксицитидина с дезоксигуанозином и начинается синтез дочерней цепи.
- В результате такого синтеза образуется цепь, в которой присутствует материнская цепь и вновь образовавшаяся, содержащая на своем конце терминальный белок

из затравки. Также с использованием этой белок-нуклеотидной затравки начинается синтез новой дочерней цепи.

Для инициации синтеза ДНК необходимо наличие вирусной ДНК-полимеразы, ТР, dСТР, клеточных ядерных факторов (NF1 и NF2, чтобы стабилизировать весь получившийся комплекс), DBP - ДНК связывающего белка (Е2А)

Элонгация репликации: осуществляется вирусной ДНК-полимеразой с вытеснением цепи, процесс не требует участия хеликазы, нужен вирусный ДНК-связывающий белок.

Терминация репликации (или процесс run-off терминации репликации ДНК): достигнув конца матрицы, полимеразы «уходит» с матрицы.

После завершения репликации ДНК продолжается процесс поздней части литического цикла. Следующий шаг – поздняя транскрипция.

Поздняя транскрипция (образование поздних белков):

- Для включения поздней транскрипции обязательна репликация ДНК. Поздняя транскрипция идет только с одной цепи двуцепочечной ДНК аденовирусов, с R-цепи
- Один общий сильный промотор (MLP) для всех поздних транскриптов
- Механизм, в результате которого происходит переключение на позднюю транскрипцию, ясен не до конца
- MLP активируется Е1А, также нужны замедленно ранние гены IX и IVa2, клеточные транскрипционные факторы и продукт «раннего» позднего гена L1
- Поздние мРНК – транскрипты кодируют преимущественно структурные белки
- Образуется один первичный транскрипт, который подвергается процессингу (моноцистронные мРНК)

Поздние мРНК – транскрипты кодируют преимущественно структурные белки

Поздняя транскрипция:

- Область L1:
первый поздний ген, кодирует структурный белок IIIa – входит в состав гексона, окружающего пентон и неструктурный 52/55K – активатор поздней транскрипции
- Область L2:
белок V – выстилает капсид, VII-гл. белок кора, III-пентоны, X – минорный белок, связанный с ДНК
- Область L3:
II- гексоны, VI – белок, ассоциированный с гексонами, протеаза (32K)
- Область L4:

VIII– белок, ассоциированный с гексонами, 110K белок –усиление транспорта вирусных mРНК

- Область L5:
IV-отросток

Сборка аденовируса:

- Синтез структурных белков происходит в цитоплазме
- В цитоплазме образуются капсомеры: гексоны и пентоны и переходят в ядро.
- Сборка частиц аденовирусов происходит в ядре. ДНК входит в сформированный не до конца белковый капсид.
- Происходит дальнейшее созревание капсида.
- После лизиса клетки вирионы выходят наружу.

Когда происходит аденовирусная инфекция, в ядрах зараженных клеток часто можно увидеть пустые капсиды, т.е. вирус производит значительно больше структурных белков, чем необходимо для формирования вирионов.

Основные моменты

- Аденовирусы больше по размерам и устроены сложнее, чем полиомавирусы
- Ранние и поздние этапы инфекционного процесса
- Кодируют свою собственную ДНК-полимеразу, ДНК - связывающий белок и белки, участвующие в упаковке ДНК
- Остальные белки, необходимые для репликации ДНК - клеточные
- Используются клеточные механизмы синтеза и посттранскрипционной модификации РНК
- E1A+E1B истинные вирусные онкогены аденовируса

Семейство Герпесвирусы (Herpesviridae)

Герпесвирусы – единственное семейство вирусов, для которого реально существует противовирусный препарат – Ацикловир (за его создание была выдана Нобелевская премия)

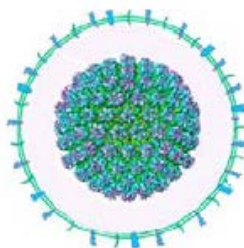


Рис. 127 Молекула герпесвируса

Герпесвирусы (herpes (греч.) – ползучий; группа I по Балтимору) – крупный оболочечный вирус ($d \sim 180\text{-}200$ нт), липопротеидная оболочка декорирована более 20 типами поверхностных гликопротеидов (пепломеры), внутри находится икосаэдрический капсид, структура между капсидом и гликопротеидной мембраной – тегумент (аморфная масса, содержащая вирус-специфические белки, которые являются регуляторными и часть из них строго необходимыми на ранней стадии размножения вируса). Тегумент попадает в цитоплазму вместе с капсидом, часть его белков модулирует репликативный цикл клетки, часть – являются инициаторами вирусной транскрипции (в соответствии с этим – часть белков тегумента достигает вирусного ядра).

Герпесвирус содержит большой геном – линейная dsДНК (120-300 тыс. п.н., концевые повторы).

Существует приблизительно 80 видов вирусов, которые заражают животных, 8 из них – зафиксированы как патогены человека; по разным данным герпесвирусами инфицированы от 95% до 100% людей; все высшие эукариоты подвержены заражению герпесвирусами; во второй половине жизни практически все люди имеют антитела к большинству человеческих герпес-вирусов.

Если человек инфицирован герпесвирусом, то излечение от него невозможно. Существует целый ряд независимых данных, сообщающих о том, что есть онкологические заболевания человека, вызываемые этими вирусами. У животных очень много опухолей возникает в результате заражения герпесвирусами.

Герпесвирусы интегрируются в геном при заражении по специфическим сайтам и приводят к нарушению целостности хромосом и не только. Герпесвирусы могут дать толчок другим механизмам онкогенеза (иногда происходят в результате экспрессии ранних белков).

Герпесвирусы с точно доказанным онкогенным потенциалом для человека:

- Вирус Эпштейна-Барр – в результате возникает лимфома Беркитта
- Герпесвирус человека VIII – является причиной саркомы Капоши

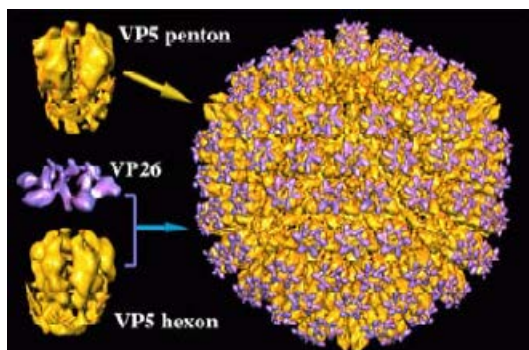


Рис. 128 Нуклеокапсид

Нуклеокапсид герпесвируса (HSV-1):

- Состоит из двух типов капсомеров: пентоны образуются белком VP5, а гексоны состоят из белков VP5 и VP26
- 162 капсомера
- Триангуляционное число = 16
- Плеоморфная липопротеидная оболочка
- $d \sim 100$ нм
- Кодировать около 8 белков, которые разделяются на 3 класса:
 - Группа альфа (истинно ранние белки) – регуляторы иммунного ответа клетки и инициаторы синтеза бета-транскриптов (ранних транскриптом)
 - Группа бета (ранние белки) – важнейшие вирус-специфические ферментативные активности; набор этих активностей значительно шире, чем у аденовирусов
 - Группа гамма (поздние белки) – пепломеры, структурные белки нуклеокапсида и белки тегумента

Литический цикл репликации герпесвирусов

Цикл репликации начинается с адсорбции вируса при взаимодействии с несколькими пепломерами. Оболочка вируса сливается с оболочкой клеточной мембраны и оставляет отпечаток на ее поверхности. В цитоплазме происходит постепенное раздевание вирусов, которые транспортируются к ядерным порам и проникают в ядро вместе с вирус-специфическими белками. До начала репликации образуются альфа-транскрипты и бета-транскрипты. Вирус кодирует специальный белок VP16, который связывается с клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой, модифицирует ее, в результате чего клеточный фермент транскрибирует только специфические гены. Этот белок входит в состав вириона и вместе с ДНК вируса должен оказаться в ядре.

Далее начинается истинно ранняя транскрипция, образование альфа-транскриптов. Они мигрируют в цитоплазму, образуются альфа-белки. Затем они возвращаются в ядро и являются регуляторами синтеза бета-транскриптов (ДНК-полимераза, ДНК-связывающий белок, рибонуклеотидредуктаза и тд), которые транскрибируются и транспортируются снова в цитоплазму.

Бета-белки возвращаются в ядро и наступает поздняя стадия репликации вируса герпеса, она начинается с репликации ДНК. Продуктом этой репликации является конкатемер молекул (тандемы, повторы геномов герпесвирусов, сцепленных голова к хвосту). Их образование происходит за счет концевых повторов, которые присутствуют в геноме. Разрезание конкатемеров на индивидуальные геномы происходит при упаковке в ядре в собранные капсиды генома.

Затем начинается поздняя транскрипция гамма-транскриптов, которые транслируются в цитоплазме и возвращаются в ядро. Сборка вирусной частицы происходит в ядре – формируется капсид (туда входит ДНК) и оболочка вируса созревает в несколько этапов (при этом отпочковывание иногда может происходить не на поверхности мембраны, а от лизосом). Помимо структурных белков, гамма-белок VP16 должен обязательно входить в вирусную частицу.

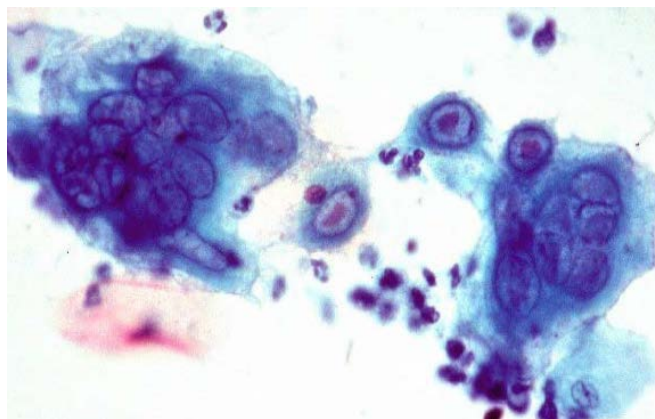


Рис. 129 Клетки, зараженные вирусом герпеса

Основные моменты

- Герпесвирусы больше по размерам и устроены сложнее, чем адено- и полиомавирусы
- Ранние и поздние этапы инфекционного процесса
- Кодируют большой набор вирусспецифических ферментов (ДНК-полимеразу, ДНК - связывающий белок, тимидинкиназу, рибонуклеотидредуктазу и др.). Более независимы от клеточных механизмов, чем адено- и полиомавирусы
- VP16 (кл. РНК-полимераза II)
- Не обнаружен факт подавления транскрипции ранних генов
- Кодирует ряд истинных вирусных онкогенов (гены группы EBNA, LMP)

Исходя из всего вышесказанного, можно утверждать, что герпесвирус является действительно хорошим решением для вирус-специфических лекарств. Пока это единственная победа человечества в получении настоящего противовирусного лекарства.

Лекция 9

Семейства бактериофагов с кольцевой однонитевой (ss)ДНК

- Семейство Microviridae (группа II по классификации Балтимора):
 - Бактериофаги ϕ X174, S13, G4 – икосаэдрический белковый капсид ($d \sim 30$ нм), внутри находится кольцевая ssДНК ~ 6000 нт, лизируют бактериальную клетку при выходе из нее

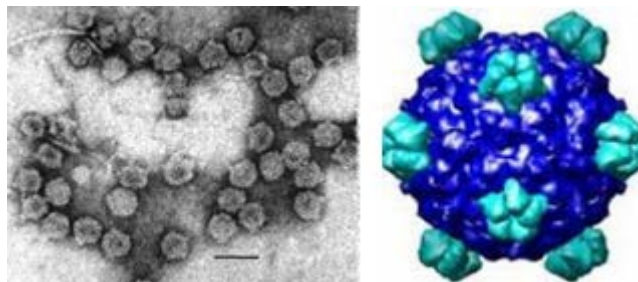


Рис. 130 Бактериофаг ϕ X174 и его компьютерная модель

- Семейство Inoviridae (группа II по классификации Балтимора):
 - Бактериофаги M13, fd – нитевидный капсид, спиральная симметрия ($l \sim 1000$ нм; $d \sim 6-9$ нм), внутри находится кольцевая ssДНК ~ 6500 нт, не лизируют бактериальную клетку при выходе из нее

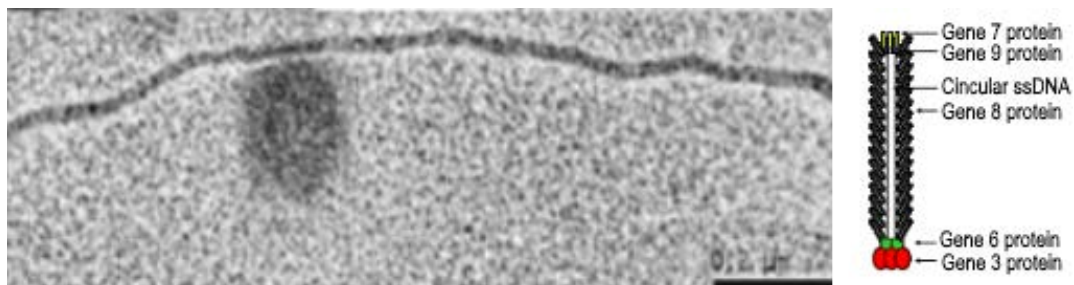


Рис. 131 Бактериофаг M13 и его компьютерная модель

Принципы репликации бактериофагов

Независимо от семейства принципы репликации для бактериофагов одинаковы, поэтому можем рассмотреть данный процесс на примере любого бактериофага. Например, бактериофаг ϕ X174 (икосаэдрический фаг с триангуляционным числом 1)

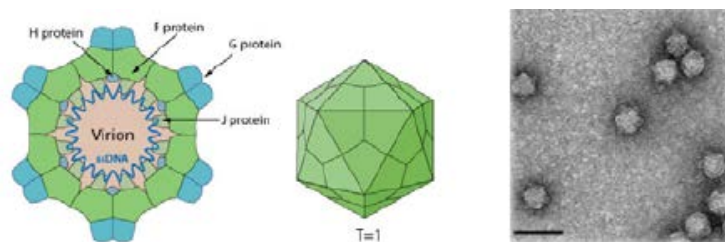


Рис. 132 Бактериофаг $\phi X174$

На рис. 132 на схеме слева обозначены следующие белки:

- Белок F – грани икосаэдра (60 мол. в капсиде, 3 - на грань)
- Белок G – вершины икосаэдра (5 мол. на вершину)
- Белок H – вершины икосаэдра (1 мол. на вершину)
- Белок J – внутренний белок, нейтрализует отрицательный заряд молекулы геномной ДНК и позволяет ей конденсировано войти икосаэдрический капсид

Структура генома фага $\phi X174$

Договоримся, что с точки зрения мессенджер-РНК ДНК генома имеет заряд «+».

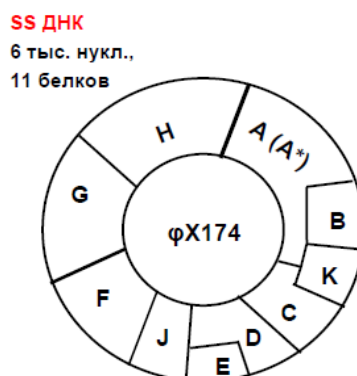


Рис. 133 Структура генома фага $\phi X174$

На рис. 133:

- Белки F, H, G, J – структурные белки, образуют капсиду (остальные белки – не структурные)
- Белок A – репликация ДНК, основной регуляторный белок бактериофага
- Белок A* – подавление синтеза клеточной ДНК, считается благодаря альтернативной инициации трансляции с другого инициаторного AUG-кодона, расположенного внутри гена белка A
- Белки B, C, D – образование вириона (прокапсиды), являются скаффолд белками (белками-лесами, благодаря которым строится вирусный капсид)
- Белок E – лизис клетки

- Белок К – повышает выход фага, предположительно влияет на повышение урожайности дочерних вирусных частиц

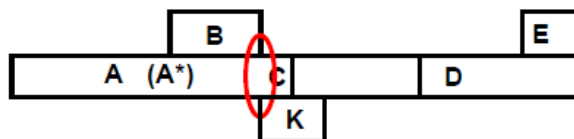


Рис. 134 Часть развернутого кольца с предыдущей схемы

В выделенной на рис. 134 области нуклеотидная последовательность TTCTGATGAAA является компонентом и участвует в кодировании 3-х белков (В в положении п-1, А в положении п, К – в положении п+1). Использование 3-х рамок считывания – уязвимый момент, т.к. одна точечная замена нуклеотида в этой области может вызвать мутации сразу в 3-х генах, но это не мешает существованию бактериофагов.

Репликация генома

Общая схема репликации вирусов, у которых геном представлен вирусом одноцепочечной ДНК (кольцевой и линейной):

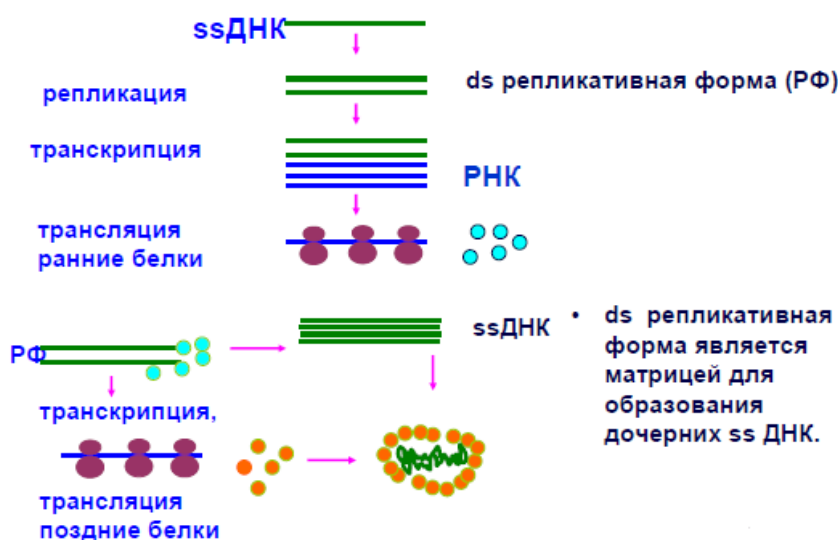


Рис. 135 Общая схема репликации вирусов, у которых геном представлен одноцепочечной ДНК

Описание данной схемы было подробно представлено в **Лекции 3**.

Первый этап репликации генома («Репликация кольцевой ssДНК») на примере фага G4.

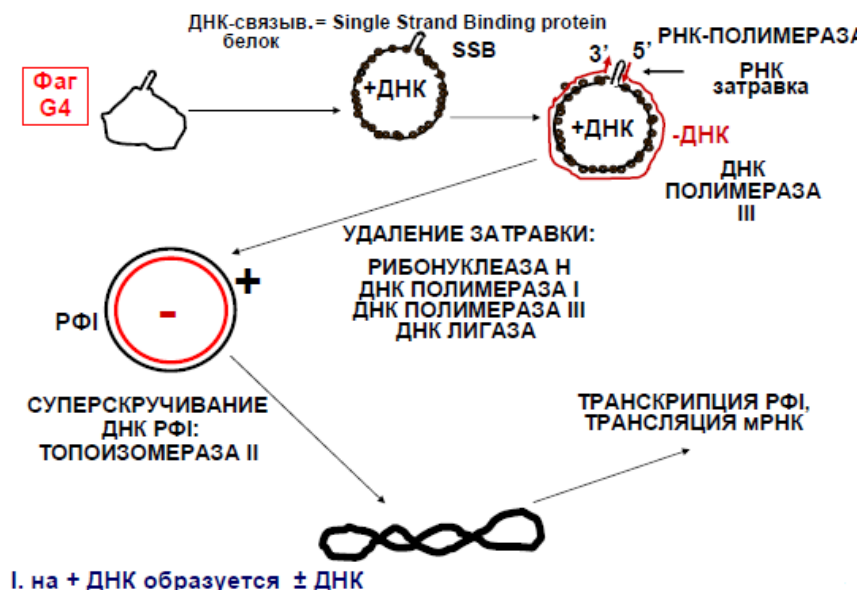


Рис. 136 Первый этап репликации генома G4: «Репликация кольцевой ssДНК»

Первый акт: связывание одноцепочечной ДНК с ДНК-связывающим белком SSB (Single Strand Binding protein), имеет большое сродство к одонитевым участкам ДНК и способен к олигомеризации. Этот белок расправляет фаговую ДНК.

Второй акт: для начала синтеза комплементарной ДНК на геномной матрице нужна затравка (т.к. все ферменты на первой стадии инфекционного цикла – клеточные). У фага G4 остается небольшая петля, не связанная с ДНК-связывающим белком. Именно на нем клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза синтезирует короткую РНК-затравку. Благодаря этому ДНК-полимераза III может начать синтез 2-й ДНК. Используя РНК-затравку ДНК полимеразы III синтезирует полную цепь.

Третий акт: в ходе элонгации наступает момент, когда ДНК полимеразы упирается в затравку, она должна быть удалена, чтобы был завершен синтез (-)цепи. Удалением РНК-затравки занимается клеточный фермент рибонуклеаза Н. В данном случае этот фермент не способен удалить последний рибонуклеотид затравки, связанный с дезоксирибонуклеотидом – ДНК. Этот рибонуклеотид удаляется ДНК-полимеразой I, который обладает 3'5' и 5'3' экзонуклеазной активностью. Брешы, образующиеся после удаления затравок, застраивает ДНК-полимераза III и клеточная лигаза сшивает концы ДНК. В результате образуется двуцепочечная репликативная форма.

Четвертый акт: суперспирализация двунитевой кольцевой ДНК. ДНК спирализуется под действием топоизомеразы II или гиразы. Данный этап – показатель качества синтеза ДНК, сигнал окончания репликации, а также облегчает расплетание двойной спирали за счет ослабления связи между нуклеотидами.

Пятый акт: сформирована суперскрученная двуцепочечная форма, которая является репликативной. Это хороший субстрат для транскрипции. Со суперспирализованной

репликативной формой происходит транскрипция и образования вирус-специфических мРНК, с которых транслируются соответствующие белки. Образовавшиеся белки играют важную роль в следующих этапах репликации генома одноцепочечных ДНК-содержащих бактериофагов.

Мы рассмотрели акты первого этапа репликации генома. **На этом этапе на +ДНК образуется двуцепочечная $\pm$ ДНК.**

Второй этап реализация генома: «Репликация родительских и продукция дочерних репликативных форм (РФ)»

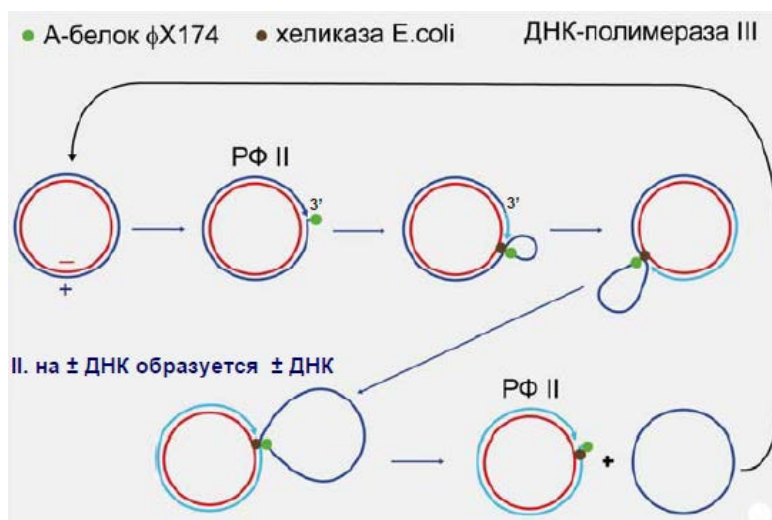


Рис. 137 Второй этап репликации генома: "Репликация родительских и продукция дочерних репликативных форм".

В этом процессе участвует вирус-специфический А-белок фX174 и 2 клеточных белка: хеликаза E.coli и ДНК-полимераза III.

Первый акт: А-белок, который обладает ДНК-связывающей эндонуклеазной активностью, движется по (+)цепи репликативной формы, находит определенную специфическую последовательность и вносит разрыв в (+)цепь репликативной формы. При разрыве образуется фосфодиэфирная связь между тирозином А-белка и 5'-фосфатом концевой нуклеотида так, что А-белок оказывается ковалентно связанным с 5'-концом (+)нити ДНК.

Второй акт: для полного освобождения 5'-конца требуется еще один белок – клеточная хеликаза. Они образуют комплекс, который движется по репликативной форме, расплетая двойную спираль ДНК и освобождая (+)нить ДНК из дуплекса. В результате освобождается 3'-гидроксильный конец, который начинает наращиваться клеточной ДНК-полимеразой III путем комплементарного синтеза. Выплетливается +ДНК, наращивается дочерняя +ДНК на матрице –ДНК-репликативной формы.

Третий акт: происходит репликации по механизму разматывающегося рулона

Четвертый акт: как только хеликаза вытесняет участок (+)нити ДНК, который А-белок узнает (нуклеотид-специфическая последовательность), он тут же вносит разрыв в нить ДНК и ковалентно присоединяется к вновь образовавшейся нити ДНК. А-белок покидает старую +ДНК и связывается с вновь образовавшейся +ДНК.

Пятый акт: в результате образуется новая репликативная форма, где 5'-конец связан с А-белком и хеликазой. Далее образовавшаяся одноцепочечная ДНК может поступать в процесс формирования новой (-)цепи (этап, рассмотренный ранее), а другая часть по принципу разматывающегося рулона продолжает синтез дочерних молекул.

Таким образом, у бактериофагов присутствует симметричный синтез. В качестве матрицы для синтеза используется как –ДНК, так и +ДНК. **На этом этапе репликации на двуцепочечной $\pm$ ДНК образуется двуцепочечная $\pm$ ДНК.**

Белки, участвующие в репликации:

- **ФАГОВЫЙ:**
 - А-белок (белок II у M13 и fd)
- **КЛЕТОЧНЫЕ:**
 - SSB (ДСБ)
 - РНК-полимераза II (M13 и G4) или праймосома (фX174)
 - ДНК-полимераза III
 - рибонуклеаза H и ДНК-полимераза I
 - ДНК-лигаза
 - хеликаза
 - топоизомераза II

Завершение второго этапа репликации:

- накопление структурных вирусных белков (прежде всего белка J)
- белок J связывает дочерние (+)цепи ДНК, тем самым выводя их из репликативного цикла
- начинается упаковка дочерних цепей в вирионы

СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ: F, G, H, J
НЕСТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ: A, B, C, D, E, K, A*

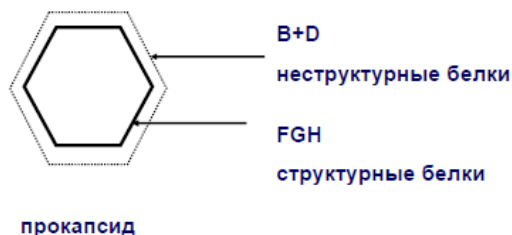


Рис. 138 Упрощенная схема сборки вириона фX174

В сборке вириона фX174 белки В и D выполняют роль скаффолд-белков (или белков-лесов). После проникновения в прокапсид геномной ДНК в комплексе с белком J, неструктурные скаффолд-белки покидают прокапсид и происходит созревание вириона.

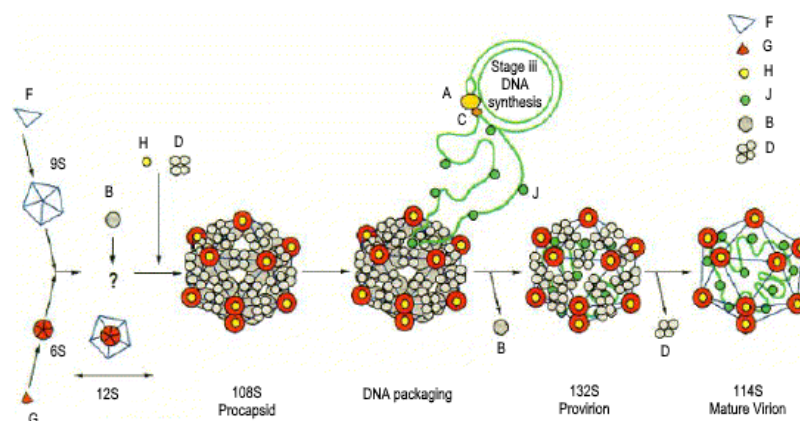


Рис. 139 Подробная схема сборки вириона фX174

Первый акт: белок F образует пентамер (9S), G тоже организуется в пентамер (6S). Они организуются в капсомер (будущие капсиды, 12S). К этой структуре присоединяются 2 скаффолд-белка: белок В в виде мономера и белок D в виде тетрамера вместе с белком H. В итоге образуется прокапсида (108S).

Второй акт: в эту прокапсиду начинает упаковываться двуцепочечная ДНК в комплексе с белком J. В этом процессе также принимают участие белок А и скаффолд-белок С.

Третий акт: после того, как из разматывающегося рулона отделяется одноцепочечная +ДНК в комплексе с белком J и начинает входить в прокапсиду, сначала отделяется скаффолд-белок В. После полного проникновения генома в прокапсиду получаем провирион.

Четвертый акт: уходят тетрамеры белка D и получается полностью собранная и созревшая фага фX174.

Одновременно с процессом сборки вириона происходит **третий этап** репликации генома:

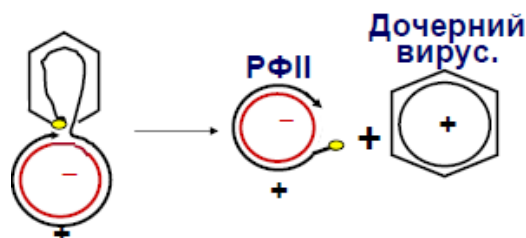


Рис. 140 Третий этап репликации генома

На этом этапе репликации на -ДНК образуется только +ДНК.

Таким образом, процесс репликации генома можно разделить на 3 этапа:

1. на +ДНК образуется двуцепочечная $\pm$ ДНК
2. на двуцепочечной $\pm$ ДНК образуется двуцепочечная $\pm$ ДНК
3. на -ДНК образуется только +ДНК

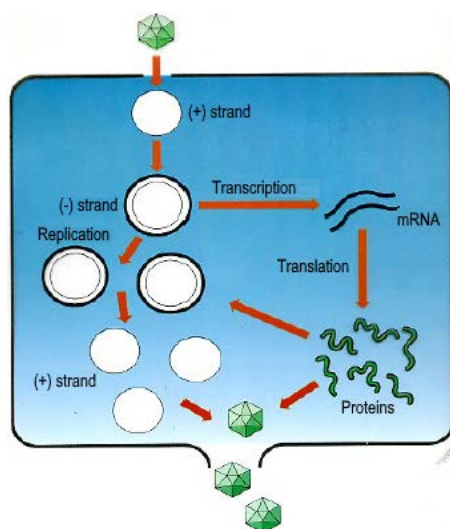


Рис. 141 Репликативный цикл

Семейства бактериофагов с двунитевой геномной ДНК

Бактериофаги организованы в порядок Caudovirales (cauda (лат.) – хвост)

- Сем. Podoviridae (podus (греч.) – нога; группа I по классификации Балтимора):
 - T7, T3-подобные бактериофаги;
 - N4- подобные бактериофаги и др.

- Сем. Myoviridae (myos (греч.) – мышца-аналогия с сокращающимся хвостовым отростком фага; группа I по классификации Балтимора):
 - T4-подобные бактериофаги и др.
- Сем. Siphoviridae (группа I по классификации Балтимора):
 - бактериофаг лямбда
- Еще 2 семейства, которые в данном курсе не рассматриваются

Семейство Podoviridae (бактериофаг T7)

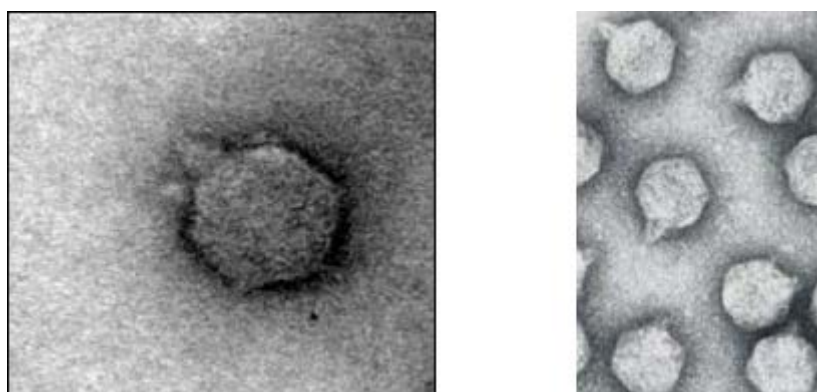


Рис. 142 Электронные микрофотографии бактериофага T7

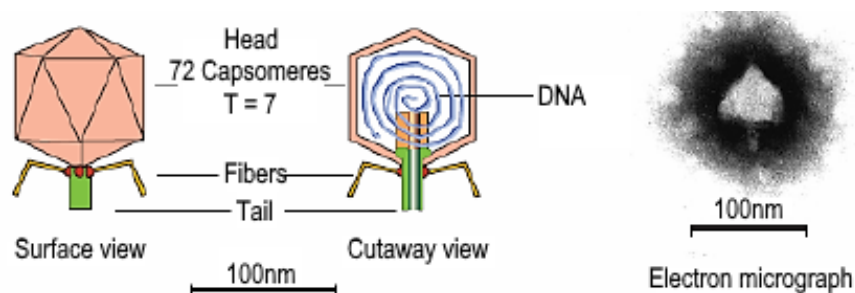


Рис. 143 Бактериофаг T7

Бактериофаг T7 (нечетный бактериофаг):

- Вирион T7:
 - имеет икосаэдрическую головку (72 капсомера, триангуляционное число = 7), хвост и фибриллы
 - диаметр – 50 нм
 - полный отросток – 15 нм (не способный к сокращению), заканчивается 6-угольной базальной пластиной, к каждой из вершин которой крепятся длинные фибриллы (с их помощью адсорбируется на клеточной стенке бактерии)
- Геном T7:

- Двунитевая линейная ДНК (~40 тыс. нукл. пар)
- Прямые концевые повторы 160 пар нукл.
- Организован в 3 группы генов (поделен на 3 оперона)
 - Истинно ранние (early) гены: 0,3 – 1,3 (экспрессируются 4-8 мин с начала инфекции) – приходится 20% генома
 - Отложено ранние (delayed early) гены: 2,0-6,0 (экспрессируются 6-15 мин с начала инфекции) – приходится 25% генома
 - Поздние (late) гены: 7,0-19,0 (экспрессируются 8-30 мин с начала инфекции) – приходится 55% генома

T7 проникает в клетку по внутреннему каналу отростка.

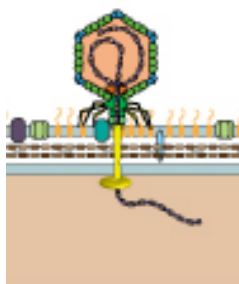


Рис. 144 Проникновение бактериофага в клетку

Бактериофаг пробивает бактериальную клеточную стенку и ДНК поступает в клетку.

В начале инфекции в клетке оказывается очень небольшой участок геномной ДНК (относится к **истинно ранним** генам – 15% всей фаговой ДНК). Этот участок очень активно транскрибируется клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой и в результате трансляции этого гена (ген 0,3) кодируется белок имитирует структуру трех витков бета-формы ДНК и связывает активные центры эндонуклеаз и таким образом подавляет их активность. Синтез белка, закодированного в гене 0,3, предотвращает деградацию фаговой ДНК. Если произойдет мутация в гене 0,3, инфекции не будет.

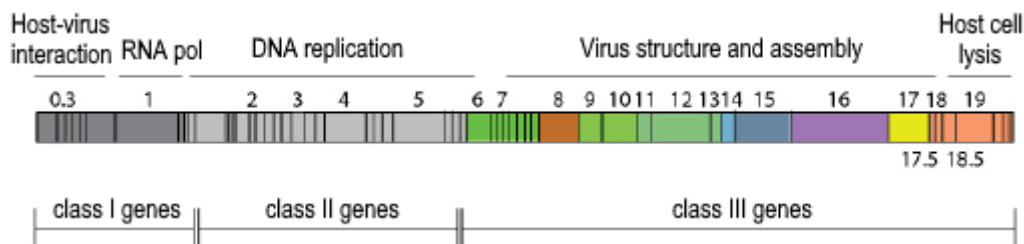


Рис. 145 Генетическая карта бактериофага T7

Истинно ранние гены:

- 0,3 – антирестрикция
- 0,7 – протеинкиназа (способен фосфорилировать и тем самым инактивировать клеточную ДНК-зависимую РНК-полимеразу, благодаря ей происходит

накопление белка антирестрикции и обеспечивается безопасность генома, попавшего в клетку)

- 1,0 – T7 РНК-полимераза (вирус-специфическая ДНК-зависимая РНК-полимераза, однокомпонентный фермент, который транскрибирует фаговую ДНК при распознавании отложено ранних и поздних промоторов)
- 1,3 – ДНК лигаза (вирус-специфическая ДНК лигаза, не является абсолютно необходимым, нет летальных мутантов, поскольку в случае мутации может достаточно эффективно быть использована клеточная ДНК-лигаза)

Отложено ранние гены:

- 2,0 – ингибитор (белок транскрипции ранних генов)
- 3,0 – эндонуклеаза
- 4,0 – хеликаза-праймаза (вирус-специфическая хеликаза-праймаза)
- 5,0 – T7 ДНК-полимераза (вирус-специфический компонент ДНК-полимеразного комплекса (также входят клеточные белки и, прежде всего, белок TRX тиоредоксина), необходимого для репликации ДНК)
- 6,0 – экзонуклеаза

Поздние гены:

- 7,0-19,0 – белки головки, хвостового отростка, белки созревания и выхода вириона

Стратегии транскрипций генома

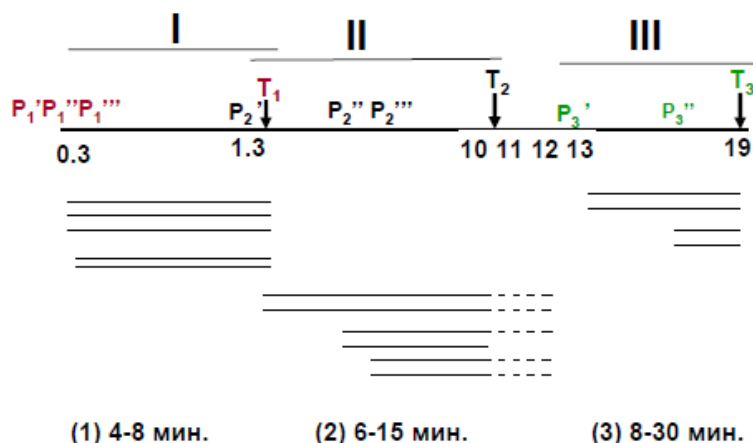


Рис. 146 Транскрипция генов бактериофага T7

- На первых этапах используется клеточный фермент
- Далее нечетные бактериофаги (например, бактериофаг T7) полностью замещает клеточный фермент своим собственным

- Стратегия четных бактериофагов заключается в том, что среди продуктов ранних генов появляются белки, которые способны модифицировать клеточную ДНК-зависимую РНК-полимеразу, после чего она начинает узнавать средние и поздние промоторы (только фагоспецифические)

С оперонов I, II и III синтезируется набор транскриптов. Оперон I продуцирует практически все необходимые вирус-специфические транскрипты в течение 4-8 минут, II оперон – за 6-15 минут, III оперон – за 8-30 минут.

Регуляция транскрипций бактериофага T7

1. Клеточная РНК-полимераза узнает группу промоторов P_1 (P_1' , P_1'' , P_1''') – очень эффективные промоторы, именно с них осуществляется синтез транскриптов для белка антирестрикции. Терминатор T_1 расположен после гена 1,3.
2. В результате экспрессии начального участка генома образуется продукт гена 0,7, в результате чего образуется продукт гена 1,0, который начинает транскрипцию с группы P_2 промоторов. Для второй группы генов в регуляции участвует и терминатор T_2 , потому как гены 11 и 12, относящиеся ко 2 классу генов, находятся после терминатора этого участка генома.
3. Гены 3й группы также считываются ферментом фага-специфической ДНК-зависимой РНК-полимеразой и кодируют в основном структурные белки. Регуляция транскрипции средних и поздних генов осуществляется за счет разной силы средних и поздних промоторов.
4. Репликация фаговой ДНК происходит, потому что в результате транскрипции и трансляции появляются вирус-специфические белки, обеспечивающие эту репликацию. Это, прежде всего, продукт гена 5,0, продукт гена 4,0, продукт гена 3,0.



Рис. 147 Репликативная вилка

Репликативная вилка была описана в лекциях ранее.

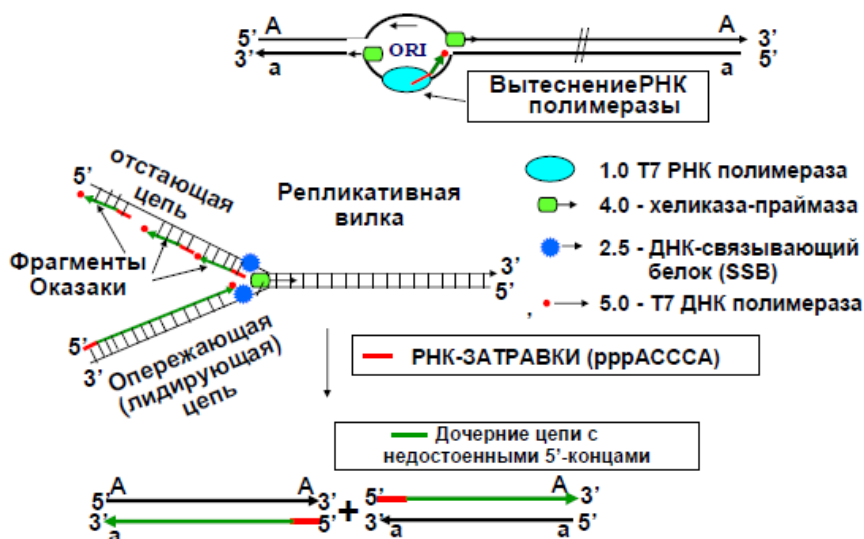


Рис. 148 Репликация ДНК бактериофага Т7

В верхней части рис. 148 расположен геном бактериофага Т7. ORI – участок начала репликации, расположен ассиметрично в геноме, ближе к левому концу молекулы (в районе гена 1,1).

Репликация начинается с того, что РНК-полимераза фага открывает промотор и синтезирует комплементарную РНК длиной несколько десятков нт. Именно это РНК – затравка для ДНК-полимеразы. Как только ДНК-полимераза подходит к затравке, она вытесняет Т7 РНК полимеразу фага.

Далее начинается синтез ДНК. Во всех дальнейших процессах активное участие принимает вирус-специфическая хеликаза-праймаза, которая одновременно расплетает цепи и синтезирует все остальные затравки для отстающей цепи.

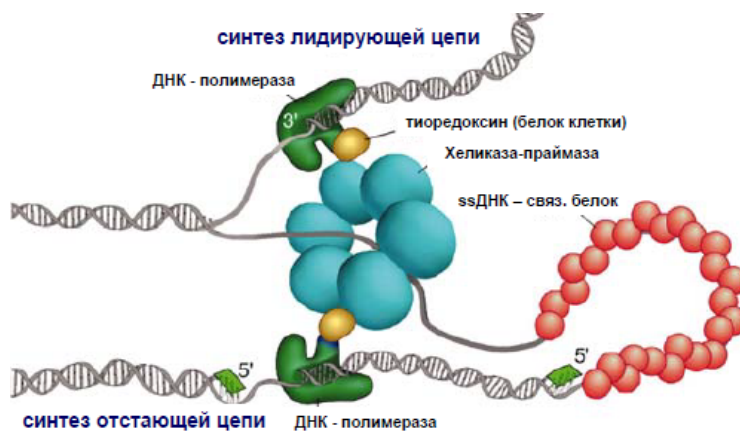


Рис. 149 Ферментативный комплекс репликативной вилки

Далее после прочтения всей последовательности материнской ДНК, образуется 2 молекулы (нижняя часть рис. 149): (1) вновь образовавшаяся молекула с РНК-затравкой и дочерняя молекула и (2) молекула с абсолютно такой же структурой. Затравка

удаляется и в результате получается 2 молекулы, у одной из которых конец тупой, а у другой – остается недореплицированным. Эта проблема возникает при репликации любых двунитевых ДНК, когда в качестве затравки используется олигорибонуклеотид. Как эти молекулы могут быть достроены?

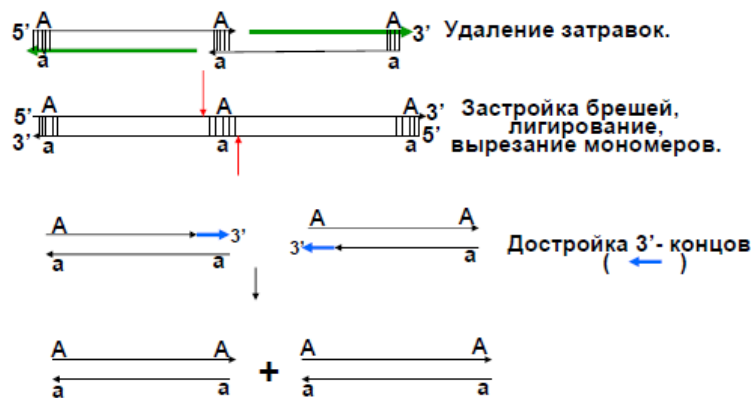


Рис. 150 Достраивание молекул

После удаления РНК-затравок, за счет прямых кольцевых повторов на концах молекулы образуются липкие концы, и молекула отжигается (рис. 150 – первая схема). Затем происходит внесение разрезов (рис. 150 – вторая схема). Образуется свободный 3'-гидроксил и достройка молекул (рис. 150 – третья схема). В результате образуется 2 генома, соответствующих по длине материнским (рис. 150 – четвертая схема).

Семейство Myoviridae (бактериофаг Т4)

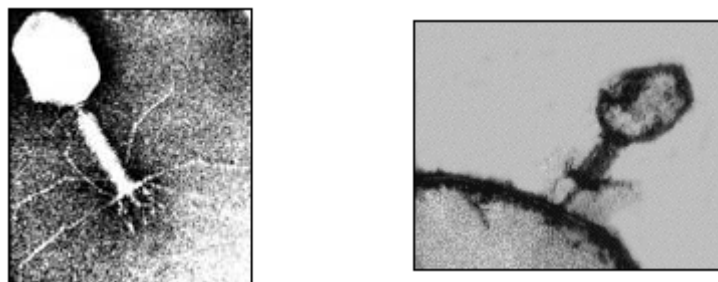


Рис. 151 Электронные микрофотографии бактериофага Т4

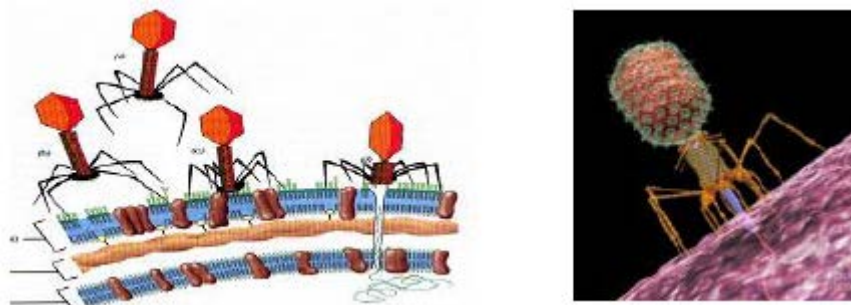


Рис. 152 Компьютерная модель бактериофага T4

Особенности генома четных бактериофагов (в частности, бактериофага T4):

- модификация нт оснований (модифицирован цитозин – превращен в гидроксил метил цитозин с целью защиты от клеточных ферментов и от фаговых эндонуклеаз)
- концевая избыточность
- кольцевые перестановки (в икосаэдрическую головку бактериофага упаковывается 103% единиц генома, т.е. длина генома больше, чем это необходимо)
- следствие упаковки дочерних геномов по механизму HEAD-FULL

Пример:

Если представить геном фага T4 в виде последовательности цифр:

123456789012345678901234567890123456789, то:

123456789012 – уложено в головку бактериофага

345678901234 – уложено в головку бактериофага

567890123456 – уложено в головку бактериофага

Транскрипция генов и модификация клеточной РНК-полимеразы при заражении фагом T4

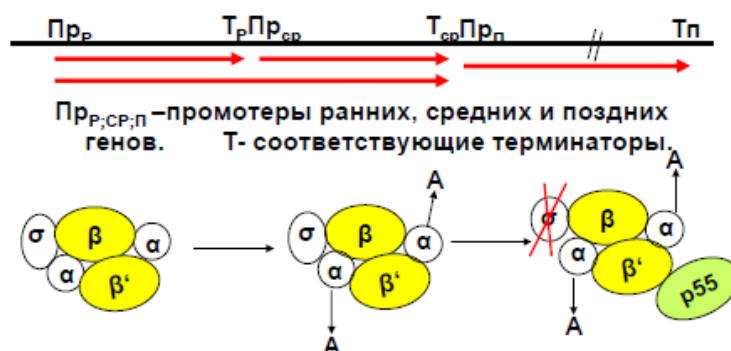


Рис. 153 Схема транскрипции генов и модификации клеточной РНК-полимеразы при заражении фагом T4

Первый транскрипт образуется в результате использования клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы (состоит из субъединиц альфа, бета, сигма).

Среди ранних белков находится один, который позволяет аденилировать альфа-субъединицу клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Вирус, используя свою систему, модифицирует альфа-субъединицы клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. В результате измененный белок прекращает распознавать ранние промоторы, начинает распознавать средние и таким образом экспрессировать транскрипты для средних генов.

На позднем этапе, когда нужно экспрессировать поздние белки, из фермента уходит сигма-субъединица и в комплекс ДНК-зависимой РНК-полимеразы входит вирус-специфический белок р55. Получившийся комплекс начинает экспрессировать поздние гены бактериофага Т4.

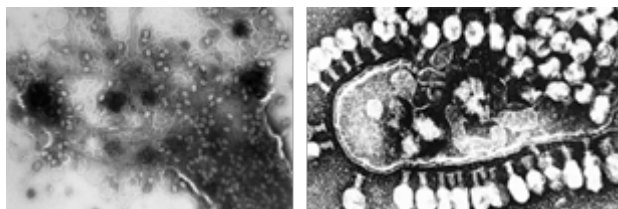


Рис. 154 Лизис клетки E. coli бактериофагом Т4

Лекция 10

Субвирусные инфекционные агенты

Субвирусные инфекционные агенты (группа 8 по Балтимору) можно разделить на следующие группы:

- Вироиды
- Сателлиты:
 - Вирусы сателлиты
 - Сателлитные нуклеиновые кислоты
- Прионы (белковые инфекционные агенты)

Вироиды



Рис. 155 Вироид

Вироиды – ssРНК, маленькие кольцевые однонитевые РНК с очень выраженной вторичной структурой. Размер виридов от 246нт (каданг-каданг) до 399нт (хлоротическая крапчатость хризантемы).

Первый вириод открыл, описал и определил Теодор Дайнер в 1971 г. Первым открытым вириодом был вириод веретеновидности клубней картофеля (PSTVd, рис. 160). Данное открытие было открытием нового биологического объекта.

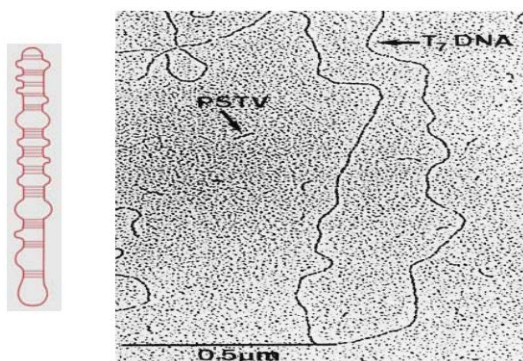


Рис. 156 Электронная микрофотография смеси очищенных препаратов РНК Potato spindle tuber viroid (PSTVd) ДНК бактериофага T7

- Не кодируют белки
- Заражают высшие цветковые растения
- Не нужен вирус-помощник (самостоятельный автономный инфекционный агент)
- Реплицируется в ядре или хлоропластах
- Необходима кл.ДНК-зависимая РНК полимераз
- Может быть рибозимом и осуществлять автокатализ РНК (например, вирус солнечной пятнистости авокадо)

Если вириод – рибозим, то никакие другие клеточные ферменты для репликации ему не нужны, но некоторые вириоды, не обладающие рибозимной активностью, используют некий набор других клеточных ферментов.

Выражение заболевания растений различными вириодами:

- Вириод веретеновидности клубней картофеля (Potato spindle tuber viroid)



Рис. 157 Клубни картофеля, зараженные вириодом PSTVd



Рис. 158 Томаты: слева - здоровый; справа - зараженный вириодом PSTVd

- Вириод солнечной пятнистости авокадо (Avocado sun blotch viroid)

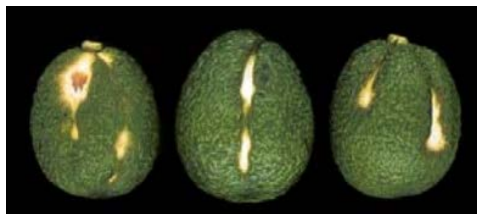


Рис. 159 Авокадо, зараженный виroidом *Avocado sun blotch viroid*

- Вириод сморщенности плодов яблок (*Apple crinkle fruit viroid*)



Рис. 160 Яблоки: слева - здоровое, справа - зараженное виroidом *Apple crinkle fruit viroid*

- Вириод разрастания экзокортиса (экзокорки) цитрусовых (*Citrus exocortis viroid*)



Рис. 161 Лимон зараженный виroidом *Citrus exocortis viroid*

- Вириод хлоротической пятнистости (крапчатости) хризантем (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid – CChMVd*):



Рис. 162 Хризантемы: слева - здоровые, справа - зараженные виroidом *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*

- Вироид задержки роста хмеля (Hop stunt viroid - HSVd):



Рис. 163 Сливы, зараженные HSVd

- Вироид каданг-каданг кокосовых пальм (Coconut cadang-cadang viroid - CCCVd):



Рис. 164 Пальма, зараженная CCCVd

Известно, что порядка 15 заболеваний растений вызываются виридами.

Выделены латентные формы виридов (присутствуют в растениях, но не вызывают никакой симптоматики), например, латентный вириод хмеля, латентный вириод винограда. Предположительно, существует еще множество неизвестных науке виридов.

Систематика виридов

Систематика виридов представляет собой деление на 2 семейства, названных по «титულным» виридам этих семейств:

- Pospiviroidae (от **P**otato **s**pindle tuber **vi**roid – вириод веретеновидности клубней картофеля) – 28 виридов, принадлежащие следующим 5 родам:
 - Pospiviroid (типовой вид: **P**otato **s**pindle tuber **vi**roid)
 - Hostuviroid (типовой вид: **H**op stunt **vi**roid)
 - Cocadviroid (типовой вид: **C**oconut **c**adang-cadang **vi**roid)
 - Apscaviroid (типовой вид: **A**pple **s**car skin **vi**roid)
 - Coleviroid (типовой вид: **C**oleus blumei **vi**roid 1)
- Avsunviroidae (от **A**vocado **s**un blotch **vi**roid – вириод солнечной пятнистости авокадо) – 4 вирида, принадлежащие следующим 3 родам:
 - Avsunviroid (типовой вид: **A**vocado **s**unblotch **vi**roid)
 - Pelamoviroid (типовой вид: **P**each **l**atent **m**osaic **vi**roid)

○ Elaviroid (типовой вид: Eggplant **latent viroid**)

Основа для классификации виридов – определение первичной нуклеотидной последовательности. Существует несколько неклассифицированных виридов, которые по разным признакам не соответствуют ни одному из семейств.

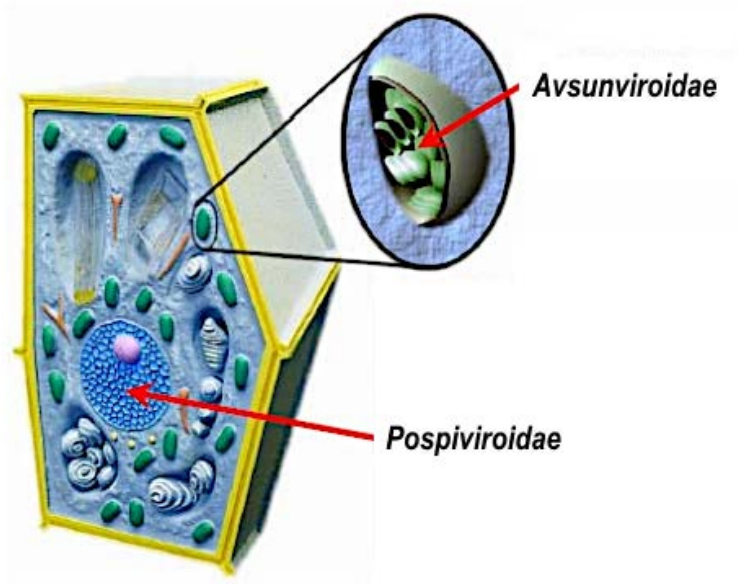


Рис. 165 Локализация виридов в клетке

Важные отличия семейств виридов:

- Локализация в клетке:
 - Avsunviroidae – в протопластах
 - Pospiviroidae – в ядре клетки
- Рибозимная активность:
 - Практически все вириды из семейства Avsunviroidae – обладают рибозимной активностью
 - Pospiviroidae – не обладают, из-за чего им нужен значительно более широкий фермент клетки
- Использование ферментов в синтезе белка:
 - Avsunviroidae – достаточно использовать ДНК-зависимую РНК полимеразу, все остальные ферментативные реакции катализирует рибозимный участок молекулы
 - Pospiviroidae – кроме использования ДНК-зависимой РНК полимеразы используют эндонуклеазы или газы

Интересная особенность заключается в том, что Pospiviroidae реплицируются в ядре, поэтому используют ядерную ДНК-зависимую РНК полимеразу, но в

хлоропластах также присутствует пластидная ДНК-зависимая РНК полимеразы, но она вириоидам не подходит

- Вторичная структура:
 - Pospiviroidae – имеют вид сильно структурированной палочки
 - Avsunviroidae – имеют определенные «выпетливания» в структуре молекулы, они являются hammerhead мотивами, которые обладают рибозимной активностью. Максимум активности рибозимов приходится на низкие температуры, т.е. эти участки молекулы обеспечивают низкотемпературный катализ.

Структура вириодов

Структура вириода веретеновидности клубней картофеля (PSTVd):

- «С» - центральный консервативный домен - 95 нт. Большинство мутаций летально. Играет высокую роль в репликации вириода и определении круга хозяев патогена.
- «Р» - изменения приводят к изменению симптомов. Присутствуют последовательности, обогащенные пуринами (особенно, аденином).
- «V»- менее 50% гомологии между доменами близкородственных вириодов
- «Т» - терминальные слабоконсервативные домены, образуют выпетливания, играют роль в транспорте вириода по растениям. Наиболее гомологичны между близко родственными вириоидами.

Структура вириодов из семейства Avsunviroid аналогична Pospiviroid, однако у них отсутствует домен «С».

Вириод – автономный, не нуждающийся в помощниках инфекционный агент, но при этом РНК вириодов не кодирует белки, т.к.:

- Не обнаружено никаких вириод-специфичных полипептидов в зараженных тканях.
- Большинство вириодных РНК не содержат ни одного инициаторного AUG-кодона.
- Не обнаружена трансляционная активность различных вириодных РНК in vitro
- НО: вириодные РНК способны к репликации, которая осуществляется ферментами клетки хозяина (клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза II).

Ферменты, необходимые для репликации виридов

- ДНК-зависимая РНК-полимераза II ядерного происхождения (даже если репликация идет в протопластах)
- Инициация репликации виридной РНК сайт-специфична (РНК полимераза узнает определенную РНК-структуру, напоминающую промотор на клеточной ДНК и начинает синтез комплементарной цепи. Идентифицированы 2 промотора в последовательности виридов: левонаправленный – локализован на границе С и V доменов, а правонаправленный – на границе Т и Р доменов)
- Репликация виридной РНК осуществляется по механизму «разматывающегося рулона»

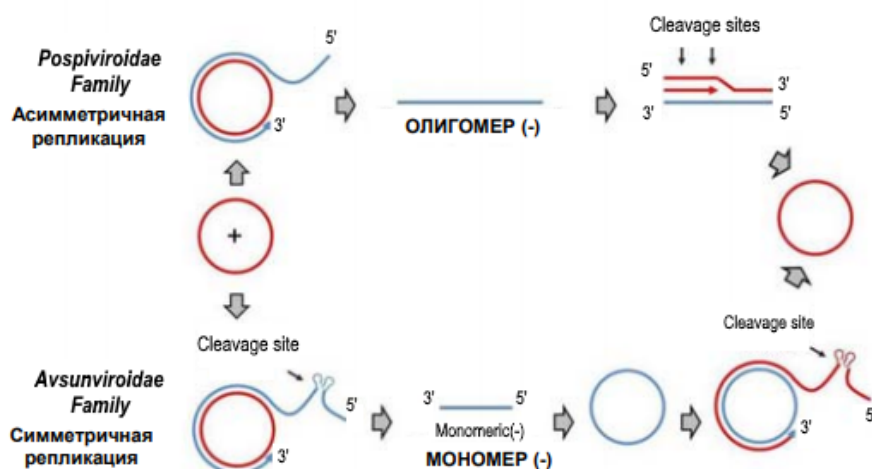


Рис. 166 Репликация виридов

Термином (+)цепь принято обозначать виридную РНК. Соответственно, комплементарную ей РНК называют (-)цепью.

Pospiviroidae – асимметричная репликация (все ферменты, участвующие в процессе – клеточные):

1. Процесс начинается с сайт-специфического промотора, который напоминает промоторы на ДНК. (+)РНК (обозначен на схеме красным) – инфекционный агент, который попал в клетку. На нем начинается синтез (-)цепи с помощью ядерной клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы.
2. При разматывании рулона образуется линейный олигомер (содержит несколько последовательностей вирида с минус-ориентацией).
3. На линейном олигомере может начаться синтез дочерних (+)цепей. Может образовываться двуцепочечная структура. Уже образовавшаяся (+)цепь будет вытесняться вновь инициацией синтеза (+)цепи на этом олигомере.

4. С использованием клеточной РНКазы олигомер будет разрезаться на мономеры, соответствующие геному *Pospiviroidae* и с помощью клеточной РНК-лигазы он будет образовывать замкнутое кольцо.

Avsunviroidae – симметричная репликация (участвует только один клеточный фермент, остальное может катализироваться рибозимной активностью):

1. Сайт-специфический старт (-)цепи на (+)цепи вириона с помощью ядерной ДНК-зависимой РНК-полимеразой
2. В ходе разматывания рулона в момент образования полноразмерного (-)РНК, соответствующего вириониду, происходит отщепление мономера с помощью рибозимной активности *Avsunviroidae*, т.е. образуется линейный мономер.
3. Линейный мономер сшивается в кольцо. Есть расхождения в понимании данного шага репликации: этот процесс может катализировать hammerhead мотив, но возможно участвует и клеточная РНК-лигаза.

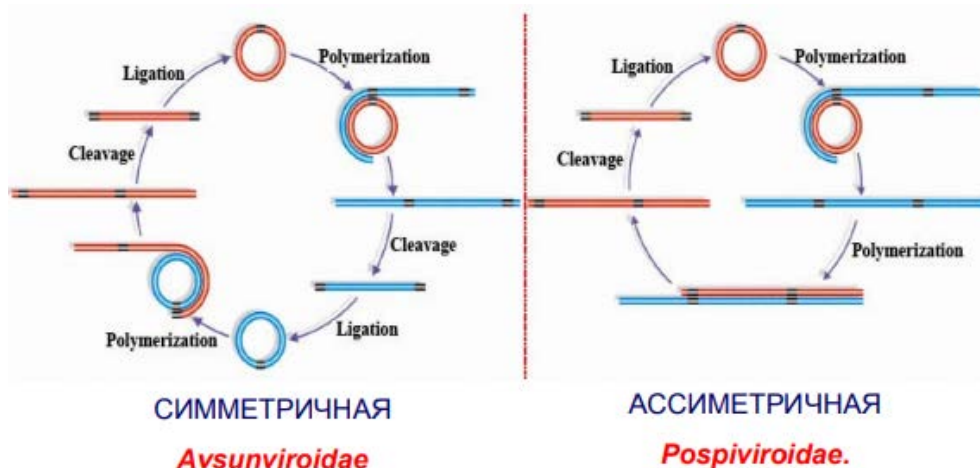


Рис. 167 Сравнение ассиметричной и симметричной схем репликации вирионов

4. На кольце (-)РНК, комплементарном вириониду, с помощью механизма разматывания рулона синтезируется дочерний (+)РНК вирионов. Отрезание каждого мономера происходит с помощью hammerhead мотива, рибозимной активности вирионов из семейства *Avsunviroidae*.

Распространение вирионов

- Ближний (межклеточный) транспорт – через плазмодесмы. Плазмодесмы проникают в соседние клетки.
- Дальний транспорт – по флоэме.
- От растения к растению:
 - вегетативным путем (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*)
 - при механических повреждениях (*Citrus exocortis viroid*, HSVd)

- пыльца, семена (Avocado sun blotch viroid)

Как и в случае вирусов, межклеточный и дальний транспорт представляют собой активный процесс и опосредуется различными структурными мотивами вирионов (у Pospiviroidae – мотив Т).

Версии происхождения вирионов

- Остатки древнего РНК-мира.
Вирион – не выродившийся вирус.
- «Одичавшие» интроны.
Вирионы – интроны, избежавшие дегенерации. Основана на том, что в ходе репликации РНК проявляет активность рибозимов.
- Латентное состояние в природных хозяевах
Все растения заражены вирионами. Проявляются только при смене хозяина.

Версии причины патогенности вирионов

- Негативное влияние на процесс сплайсинга
- Нарушение синтеза рибосомной РНК. Предположение основано на том, что вирионная РНК обнаруживается преимущественно в ядрышке.
- Нарушение структуры хроматина. Вирионы могут взаимодействовать с премодулирующими комплексами.
- Нарушение котрансляционного транспорта белков. Существует структурное сходство вирионной РНК и малой цитоплазматической 7s РНК, т.е. нуклеотидная последовательность вириона комплементарна этой 7s эукариотической клетке, а 7s РНК входит составной частью в очень сложный РНК-белковый комплекс (SRP-комплекс), ответственный за узнавание N-концевой лидерной последовательности, определяющей синтез белка на шероховатом ЭПР и его перемещение внутрь. Вирионная РНК либо образует комплекс с 7s РНК, либо гидролизует ее за счет своей рибозимной активности.

Сателлиты

В зараженной клетке помимо репликации собственного вируса обнаруживают репликации небольших молекул нуклеиновых кислот, которые не являются фрагментами вирусного генома и не имеют отношения к нуклеиновым кислотам клетки. Эти нуклеиновые кислоты сопутствуют основной вирусной инфекции – они называются сателлитами.

Сателлиты – субвирусные агенты, неспособные заражать хозяйские клетки без вируса–помощника, реплицируются на матрице собственной нуклеиновой кислоты с использованием фермента вируса-помощника

Способы инкапсидации нуклеиновой кислоты:

- В белок оболочки вируса-помощника вместе с вирусным геномом
- В свой собственный белок, который закодирован в нуклеиновой сателлитной кислоте – вирусы-сателлиты
- Вирус гепатита дельта – является оболочечным вирусом и использует в качестве поверхностных гликопротеидов белки, которые кодируют вирус гепатита В



Рис. 168 Схема представления всех видов сателлитов

Согласно схеме на рис. 168, сателлиты делятся на Сателлитные вирусы и Сателлитные нуклеиновые кислоты:

- Сателлитные вирусы одеваются в собственный белок оболочки, закодированный в сателлитный ssPHK.
- Сателлитные нуклеиновые кислоты можно поделить в зависимости от того, чем они представлены:
 - dsДНК (двуцепочечная линейная ДНК) – сателлиты гиминивирuсов, не кодируют белков, длина 600-700нт
 - ssДНК (одноцепочечная линейная ДНК) – сателлиты бактериофагов Р2 и Р4, также присутствуют у вируса скручивания листьев томатов, кодирует белок (участвует в супрессии посттранскрипционного у молчания генов во время вирусной инфекции), длина 1200нт
 - dsPHK (двуцепочечная РНК) – сателлит вируса дрожжей М, длина ~500нт
 - ssPHK (одноцепочечная РНК) – линейные (большие и малые) и кольцевые

Сателлитные вирусы

Вирус некроза табака (ВНТ) – семейство Tombusviridae, $d = 30\text{ нм}$, (+)РНК длиной 3764нт, одета в белок полипептид одного типа, который имеет молекулярную массу 30кДа. При фракционировании препарата ВНТ в градиенте концентрации сахарозы и при изучении сока растения, зараженного этим вирусом, были обнаружены более мелкие частицы – вирус-сателлиты некроза табака.

Вирус-сателлит некроза табака (ВСНТ) – икосаэдрическая частица, в которую помещена сильно структурированная (+)РНК длиной 1239нт, белок оболочки имеет молекулярную массу 21кДа

Белок ВСНТ и белок ВНТ не имеют ничего общего (ни по последовательности, ни по антигенным свойствам).

РНК ВСНТ реплицируется с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразой ВНТ. На (+)РНК образуется (-)РНК, на нее реплицируются дочерние (+)РНК. Более того, ВСНТ использует транспортный белок для межклеточного перемещения.

При этом в бесклеточной системе при добавлении одновременном РНК ВНТ и РНК ВСНТ – транслироваться будет в основном РНК сателлита. Даже если значительно увеличить пропорцию в пользу РНК ВНТ – преимущество все равно останется за ВСНТ. Это происходит из-за того, что 3'- и 5'-концевые последовательности ВСНТ имеют большее сродство к РНК-зависимой РНК-полимеразе ВНТ, т.е. сателлит угнетает размножение ВНТ и ослабляет его симптомы.

Одноцепочечные линейные сателлитные РНК (большие)

Одноцепочечные линейные сателлитные РНК (ss(+))РНК, большие – т.к. длина 700 - 1500нт):

- Кодируют белки (неструктурные, обычно они влияют на модуляцию процесса инфекции)
- Ассоциированы с непо- и потексвирусами
- Ослабляют симптомы вируса-хозяина

Существует определенная гомология в 3'- и 5'-концевых участках одноцепочечных линейных сателлитных РНК и геномных РНК. Это необходимо, чтобы сателлитные РНК имели возможность использовать ферментативный аппарат вируса.

Примеры:

- Сателлитная РНК черной кольцевой пятнистости томатов (РНК 1498нт, кодирует белок – 48кДа (репликация)). Структурное сходство концевых нетранслируемых участков РНК сателлита и вируса-помощника.
- Сателлитная РНК вируса желтой пятнистости цикория
- Сателлитная РНК вируса мозаики бамбука
- Сателлитная РНК латентного вируса болгарского винограда

Одноцепочечные линейные сателлитные РНК (малые)

Одноцепочечные линейные сателлитные РНК (малые – т.к. длина менее 700 нт):

- Не кодируют белки
- Ассоциированы с кукумо-, томбус- и кармовирусами
- Как правило, ослабляют симптомы вируса-хозяина

Примеры:

- Сателлитная РНК вируса мозаики огурца, 330-390нт, комплементарна 5'-нетранслируемой лидерной последовательности геномных РНК 1 и 2 вируса помощника
- Сателлитная РНК вируса морщинистости турнепса
- Сателлитная РНК вируса задержки роста арахиса
- Сателлитная РНК вируса задержки роста томатов

Одноцепочечные кольцевые сателлитные РНК (вирусоиды)

Одноцепочечные кольцевые сателлитные РНК (или Вирусоиды, сильно структурированы, длина 220-450нт):

- Не могут реплицироваться без вируса-помощника
- Обладают выраженной вторичной структурой и рибозимной активностью
- Одеваются в белок вируса-помощника (собемо- и неповирусы)



Рис. 169 Вирусоид (Одноцепочечная кольцевая сателлитная РНК)

Принципиальное отличие вироида от вирусоида: если вироид – самостоятельный инфекционный агент, то вирусоид – не может реплицироваться без вируса-помощника (является сателлитной нуклеиновой кислотой).

Также вирусоид одевается вместе с геномом вируса-помощника в белок вируса-помощника. В отличие от вириона, он реплицируется в цитоплазме. Механизм репликации у вирионов и вирусоидов совпадает – механизм разматывающегося рулона.

Места, в которых происходит коинфекция с помощью вирусоидов сильно локализована – Океания, Австралия, Канада.

Примеры:

- Вирусоид желтой карликовости ячменя
- Вирусоид кратковременной штриховатости люцерны
- Вирусоид бархатистой крапчатости табака

Общие свойства сателлитов

- Генетический материал представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты (200-2000нт)
- Нуклеиновая кислота сателлита не является частью генома вируса-помощника, также, как правило, не гомологична ему
- Вирусы-сателлиты и сателлитные нуклеиновые кислоты не могут автономно реплицироваться и поэтому сами по себе неинфекционны
- Сателлитная РНК высоко структурирована, что повышает ее устойчивость к рибонуклеазам и обеспечивает выживание в клетке отсутствие вируса-помощника

Хотя сателлиты совсем не нужны вирусу помощнику для выражения его генома и сопутствующий синтез этих сателлитных РНК всех типов сказывается негативно на его репликации, они конкурируют с вирусом-помощником за репликазу. В результате, как правило, происходит смягчение симптомов заболевания. Это явление аттенуации симптомов может быть полезно вирусу-помощнику, т.к. повышает толерантность зараженных клеток вирусу, и, следовательно, способствует его выживанию и распространению.

Табл. 3 Сравнение РНК-содержащих сателлитов и вирионов

	Вирионы	Сателлитные вирусы	Сателлитные РНК	Вирусоиды
Вирус-помощник	Нет	Да	Да	Да
Собственные белки	Нет	Да	Малые – нет, большие – да	Нет
Место репликации	Ядро, протопласты	В зависимости от вируса-помощника	Цитоплазма	Цитоплазма

Вирус гепатита дельта

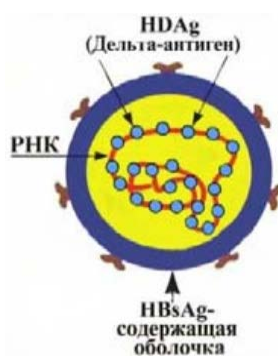


Рис. 170 Вирус гепатита дельта

Вирус гепатита дельта (геном: (-) О ssРНК, длина 1700нт) – дефектный вирус, может сам реплицировать свой геном, но вирус гепатита В представляет для него мембранные поверхностные белки (HBsAg), которые декорируют оболочку, в которую заключен геном и белок вируса гепатита дельта. Обнаруживается у больных гепатитом В исключительно при острой инфекции. РНК кодирует белок – антиген вируса гепатита дельта (HDaAg – hepatitis delta antigen) с молекулярной массой 27кДа, который образует комплекс с этой РНК. При репликации (-)РНК вируса гепатита дельта происходит процесс редактирования генома, в результате которого образуется еще один вирус-специфический белок вируса гепатита дельта с молекулярной массой 24кДа. Несмотря на то, что это сателлитный (-)РНК-содержащий вирус, в составе вирусной частицы нет фермента, необходимого РНК-зависимой РНК-полимеразе, потому что вирус гепатита дельта реплицируется в ядре с помощью клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

На рис.170 изображена молекула вируса гепатита дельта, которая состоит из:

- Липидной мембраны (HBsAg-содержащая оболочка)
- Поверхностные белки, декорирующие оболочку, предоставленные вирусом-помощником (вирусом гепатита В)
- Внутренность клетки – нуклеопротеид, состоящий из кольцевой (-)РНК и белка HDaAg.

Окончательно исследователями еще не утвержден формат взаимодействия между РНК и HDaAg: возможно, это хаотичный рибонуклеопротеид, но есть данные, что белок HDaAg организуется в изометрический капсид, а внутри него находится геном вируса гепатита дельта.

Вирус гепатита дельта – особый тип вируса с (-)РНК-геномом, который, в отличие от всех подобных вирусов, не содержит транскриптазы, а осуществляет особый вид репликации, который зависит от вируса-помощника (вируса гепатита В).

Прионы

Прионы (Prions – Proteinaceous Infectious Particles) – в клетке существует консервативный многофункциональный белок, который присутствует в основном в ЦНС, обозначается PrP^C. Если этот белок в силу каких-либо причин, не меняя свои аминокислотные последовательности, изменит свою конформацию, то он может превратиться в инфекционный агент PrP^{Sc} (Sc - scrapie, или «скрэпи» - первое описанное прионное заболевание). Эти агенты вызывают Губчатую (спонгиформную) энцефалопатию (Transmissible Spongiform Encephalopathy).

Губчатые (спонгиформные) энцефалопатии (TSE) человека:

- Куру – болеют аборигены Новой Гвинеи, на данный момент не регистрируется, симптомы: тремор, атаксия, нарушение двигательных функций и длительность болезни до летального исхода – от 3 до 6 месяцев.
- Болезнь Крейтцфельда-Якоба (СJB) – регистрируемое заболевание, наиболее широко изучается среди прионных заболеваний, было обнаружено в начале XX века, симптомы: депрессия, атаксия, деменция и длительность болезни до летального исхода – от 2 до 3 лет.
- Болезнь Крейтцфельда-Якоба имеет атипичную (вариабельную) форму vCJD, которая была зарегистрирована после эпизоотии коровьего бешенства в Великобритании в середине 1990-х годов. Это более серьезное заболевание, чем СJB, которым болеют преимущественно более молодые люди, чем зараженные СJB, и длительность этой болезни до летального исхода от 6 месяцев до 1 года. Возникло это заболевание благодаря тому, что, преодолев видовой барьер, коровье бешенство передалось людям через желатин в гамбургерах.
- Болезнь Герстмана-Штрауслера-Шенкера (GSS) – обнаружена в середине XX века, симптомы: атаксия, деменция и длительность болезни до летального исхода – около 5 лет.
- Фатальная семейная инсомния (FFI) – наследственное заболевание, симптомы: инсомния, фобия, деменция и длительность болезни до летального исхода – около 1,5 лет

Все эти заболевания летальны и не излечимы, но встречаются они крайне редко: в зависимости от заболевания это 1 случай на 1-10 млн людей.

Губчатые (спонгиформные) энцефалопатии (TSE) животных:

- Скрейпи (scrapie) – было обнаружено в 1732 г., заражаются овцы.
- Коровье бешенство (BSE – bovine spongiforme encephalopathie) – заражается крупный рогатый скот, эпидемия этого заболевания поразила Великобританию в 1995-1996 годах.
- Хроническая истощающая болезнь – заражаются лоси, олени.

Механизм действия прионов на клеточном уровне, независимо от переносчика болезни (люди или животные) – вакуолизация и гибель нейронов.

Все эти заболевания были объединены в одну группу и начали систематически исследоваться благодаря тому, что в какой-то момент было выяснено, что при патологоанатомическом исследовании мозга человека или животного, погибшего от этих заболеваний, наблюдается похожая картинка – губкообразная гистология мозга.

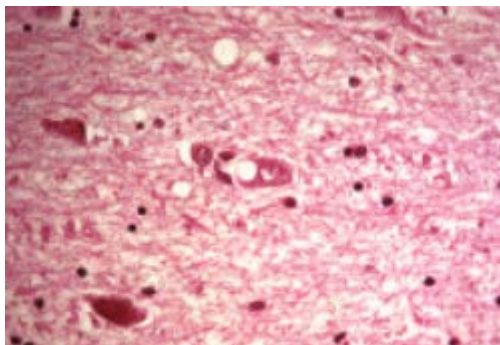


Рис. 171 Болезнь Крейтцфельдта-Якоба (человек)

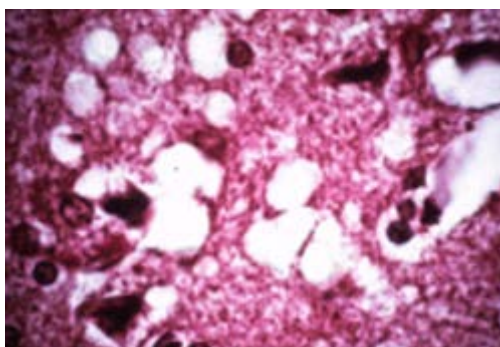


Рис. 172 Куру (человек)

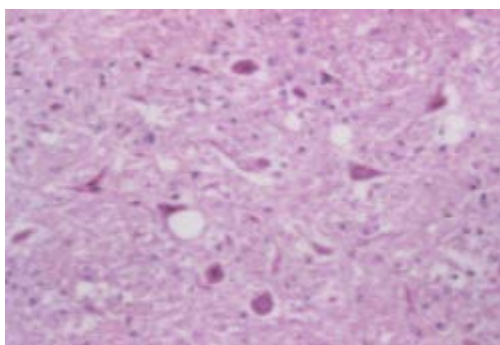


Рис. 173 Коровье бешенство

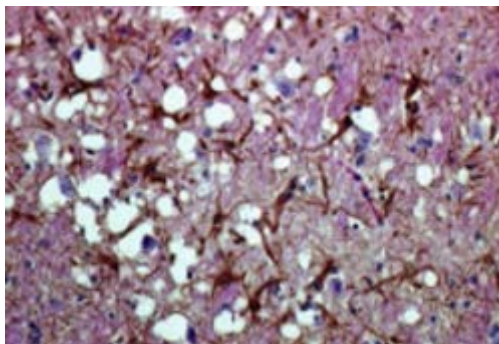


Рис. 174 Скрейпи (овцы))

На данный момент все эти болезни практически невозможно диагностировать при жизни пациента. Чаще всего оно определяется уже после вскрытия патологоанатомом.

Прионы (история вопроса)

- 1732 г. – описано заболевание овец Скрейпи (Scrapie), так называли эту болезнь фермеры, столкнувшиеся с заражением своего скота, т.к. заболевшие ею овцы начинали стонать, сильно чесаться и буквально соскребали с себя почти всю шерсть об заборы и погибали
- Середина 1950-х г.г. – D.Gajdusek (Гайдушек) описал редкое заболевание человека – Куру – «смеющаяся смерть» у жителей Новой Гвинеи
- 1963 г. – D.Gajdusek (Нобелевская премия 1976 г.) смог заразить шимпанзе куру, причем первые признаки проявились только через 2 года. Шимпанзе были заражены гомогенатом мозга человека, погибшего от куру. Именно благодаря этому данные инфекции начали называть «медленными» инфекциями.
- 1976 г. – D.Gajdusek получил Нобелевскую премию за открытие новой группы заболеваний.
- 1982 г. – Стенли Прузинер (сотрудник Калифорнийского университета) выдвинул гипотезу, что инфекционным началом куру, скрейпи, болезни Крейтцфельдта-Якоба и т.д. является просто белок. Прузинер выделил белок PrP^{Sc} в чистом виде, экспериментируя с зараженными скрейпи сирийскими хомячками, и дал ему название «прион».
- 1985 г. – открыт ген PRNP (обнаружен у всех млекопитающих), в котором была записана информация о белке PrP^C (определена его аминокислотная последовательность).
- 1997 г. – Стенли Прузинер получил Нобелевскую премию «за открытие прионов – нового биологического типа инфекций»
- В результате работы Стенли Прузинера была сформулирована прионная теория, включающая в себя следующие понятия:

- Инфекционный белок PrP^{Sc} возникает путем модификации пространственной структуры из обычного клеточного белка PrP^C (автокаталитический процесс)
- PrP^{Sc} нерастворимые высокомолекулярные агрегаты, устойчивые к протеазам
- PrP^C растворимый белок
- PrP^{Sc} и PrP^C Имеют одинаковую аминокислотную последовательность (254 ак), но различаются по вторичной и третичной структуре
- PrP^C – это Сиалогликопротеин (гликозилфосфатидил инозитол (GPI)-связанный гликопротеид), молекулярная масса 33-35 кДа, 254 ак. Его основной функцией является стабилизация миелиновой оболочки нервных волокон

У каждого человека есть ген PRNP, который кодирует полипептид длиной 254 ак. В зависимости от того, как этот полипептид сложится во вторичную, третичную структуру, может быть получен субклеточный инфекционный агент, а может – клеточный белок, который жизненно необходим и эволюционно консервативен.

Изменение характера укладки полипептидной цепи при превращении белка PrP^C в прион PrP^{Sc}:

PrP^C – богат альфа-спиралями, содержит мало бетта-слоев (3%), а в PrP^{Sc} – альфа-слоев значительно меньше (43-44%), значительно больше бетта слоев (43%).

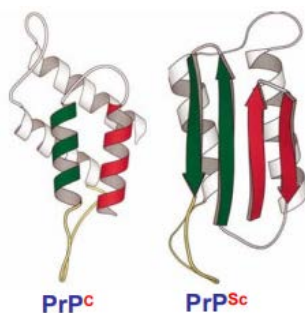


Рис. 175 Вторичная структура белков PrP^C и PrP^{Sc}

Данный белок у млекопитающих удается обнаружить в легких, селезенке, мышцах, слюнных железах, кишечнике, однако там этого белка в 10-15 раз меньше, чем в ЦНС (особенно в мозге).

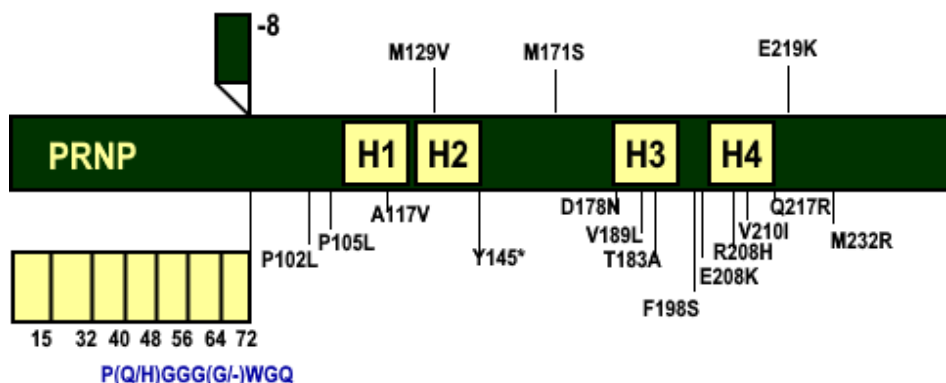


Рис. 176 Схематическое изображение гена PRNP человека

На рис. 176 в правой половине схемы над геном PRNP обозначены возможные нормальные варианты полиморфизма белка PrP^C, а под ним - обнаруженные мутационные замены, которые приводят к нейровегетативным заболеваниям. Т.е. в случае «нижних» замен – вероятность возникновения инфекционной конформации повышается в несколько раз.

На рис. 176 в левой половине схемы над геном расположены 5 повторов из 8 аминокислот (что является нормальным для данного белка). Если количество повторов увеличивается, то это приводит к конформационным изменениям и к образованию бета-слоев в белке, что способствует переходу функционального клеточного белка в патогенный (у болезни Крейтцфельда-Якоба – 12 повторов). Т.о. существуют наследственные варианты заболевания трансмиссивными губчатыми энцефалопатиями, т.е. мутации в гене PRNP ведут к тому, что белок PrP^C может превратиться в PrP^{Sc}.

Не только изменение нуклеотидной последовательности влияет на возможность возникновения патогенного белка. Инфекционный белок может возникнуть путем модификации своей структуры из обычного клеточного белка. В случае спонтанных и наследственных прионных болезней превращение нормального белка PrP^C в патогенный, судя по всему, происходит путем белок-белковых взаимодействий, при этом не имеет значения, попадает PrP^{Sc} в организм извне или возникает в нем спонтанно. Данный процесс называется механизмом копирования информации.

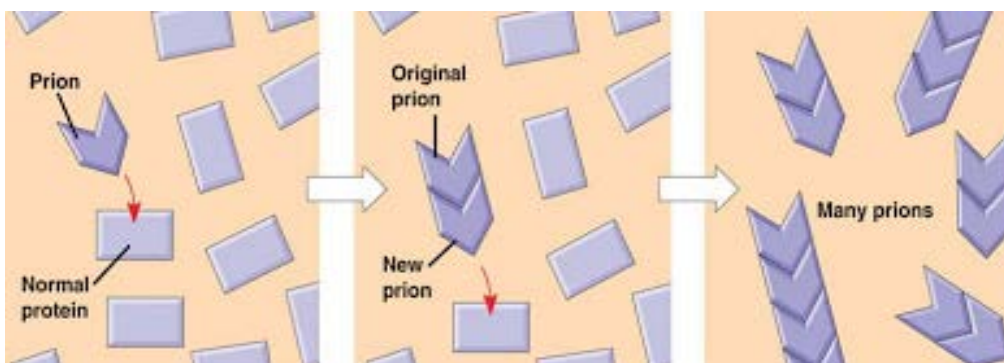


Рис. 177 Механизм копирования информации

На рис. 177 изображены функционально активные растворимые белки PrP^C (прямоугольники) и прионные белки PrP^{Sc} (стрелочки). Присоединяя нормальный белок к себе, прионный белок меняет его конформацию (альфа-спирали превратились в бетта-слои). В результате все PrP^C превращаются в PrP^{Sc}, причем получившиеся агрегаты (фибрилы) являются уже не растворимыми и не подверженными протеазам. Взаимодействуя между собой, агрегаты объединяются и превращаются в бляшки (plaque). Именно эти бляшки обычно обнаруживаются патологоанатомами при анализе тканей людей или животных погибших от трансмиссивных губчатых энцефалопатий.

Прионные заболевания человека могут быть:

- В 10%-12% случаев - Наследственными (Болезнь Крейтцфельдта-Якоба (CJD), Фатальная семейная инсомния (FFI), Синдром Герстмана-Штрауслера-Шэнкера (GSS))
- В 5% случаев – Инфекционными (CJD, Куру, Скрейпи, Коровье бешенство (BSE) и др.)
- В ~80% случаев – Спорадическими – болезнь возникает внезапно без каких-либо предпосылок (BSE, CJD ?)

Такой высокий процент спорадических заболеваний связан с тем, что, с учетом инкубационного периода данных заболеваний (измеряется годами), трудно зафиксировать факт инфекционного заболевания.

Прионы грибов

Прионы грибов (наиболее подробно исследованы у дрожжей, прионные белки представляют собой цитоплазматические наследственные детерминанты):

- 1994 г. – Wickner R.B. использовал концепцию прионов для объяснения природы двух цитоплазматических наследуемых детерминант дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [URE3] и [PSI⁺]
- «белки, проявляющие свойства генов» - способны хранить и передавать конформационную информацию
- Подобно прионам млекопитающих прионы грибов представляют собой конформационные варианты обычных клеточных белков
- При прионизации белка клетка или организм становятся дефектными по функции белка предшественника приона
- Клеточные белки могут спонтанно претерпевать конформационные перестройки, после чего они приобретают ряд новых свойств, прежде всего способность к агрегации (амилоиды)
- В отличие от прионов млекопитающих, прионы дрожжей не приводят к гибели клеток. Они могут повышать их выживаемость в неблагоприятных условиях.



Рис. 178 Psi- (слева) и Psi+ (справа)

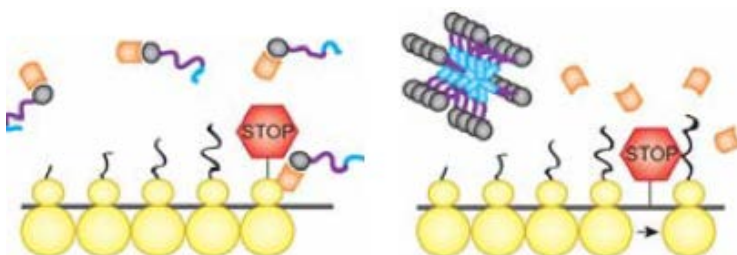


Рис. 179 Клетка с фенотипом [Psi-] (слева) и клетка с фенотипом [Psi+] (справа)

(Рис. 179 - слева) Клетка имеет фенотип [Psi-], ген Sup 35 (фактор терминации трансляции дрожжей – серый кружок, наследуется нехромосомно) взаимодействует с другим фактором терминации трансляции Sup 45 (оранжевый прямоугольник) и срабатывает как терминатор – останавливает синтез белка АД1, получается укороченный белок АД1. В результате дрожжи могут расти на среде без аденина и имеют красный цвет колоний.

(Рис. 179 - справа) Клетка имеет фенотип [Psi+] (может произойти в результате клеточного слияния), все белки, которые кодируются геном Sup 35, превращаются в высокомолекулярный агрегат (образование в левом верхнем углу), также плавают его котерминаторы (оранжевые прямоугольники). В результате терминации не происходит, образуется длинный полный функциональный белок АД1. Тогда дрожжи растут на среде без аденина и имеют белый цвет колоний.

Таким образом, мы видим приспособление, которое влияет на метаболизм азота в зависимости от того в прионной или неприонной форме находится один из белков – клетки либо могут употреблять определенный источник азота, либо не могут, т.е. в случае прионов грибов не приходится говорить о летальных исходах.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА



teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

