

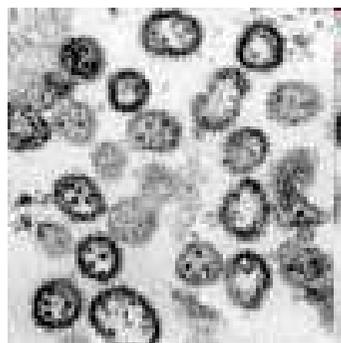
ВИРУСОЛОГИЯ

Лекция № 5

Лекции для студентов III курса
Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Вирусы с двусмысленной (ambisense) РНК (ambis РНК)

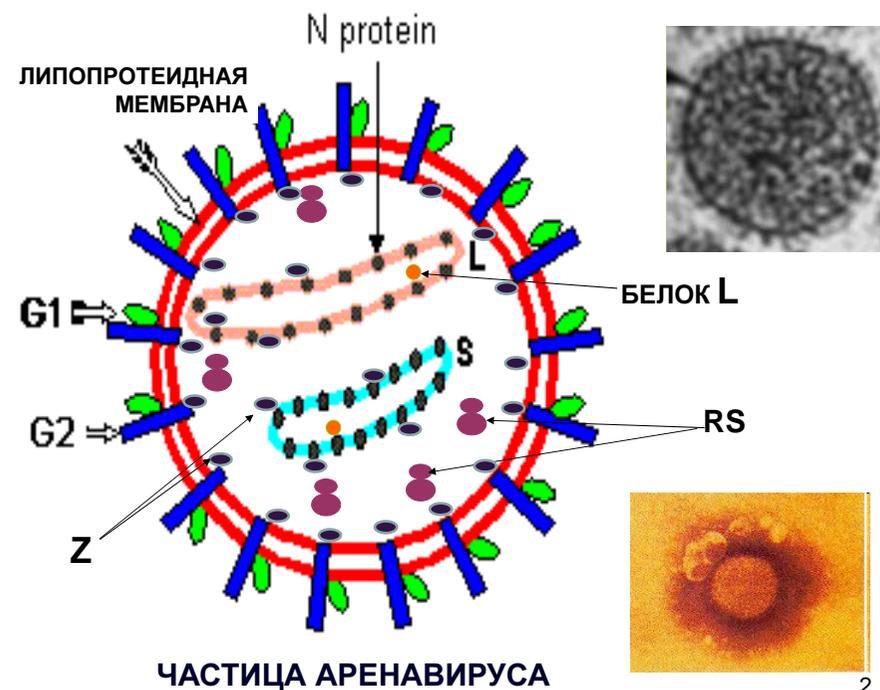
Вирусы с двусмысленной (ambisense) геномной РНК



- Сем. *Arenaviridae*
сегментированный геном
(2 молекулы ambisense РНК).
Сферические полиморфные частицы
d 60 - 300 нм, покрыты липидной
оболочкой
- Сем. *Bunyaviridae*,
род. *Phlebovirus* и *Tospovirus*
3 молекулы РНК, одна или две из
которых представляют собой
(-)РНК, а остальные – ambisense
РНК.
Полиморфные частицы d 80 - 120 нм
покрыты липидной оболочкой

В вирион упакована вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза
Группа V

1



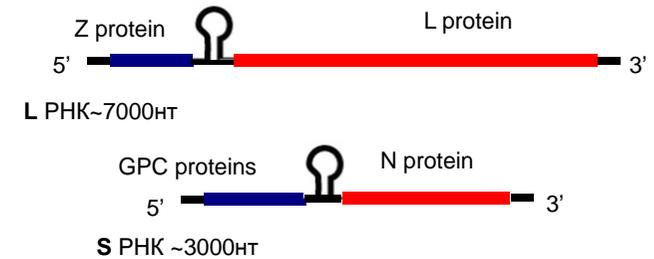
2

Геном Аренавирусов

- Каждый вирион содержит два сегмента линейной ssРНК
 - 1) L (large) 7.0-7.3kb
 - 2) S (small) 3.4 kb
- Двусмысленный (Ambisense) Геном
 - Большая часть генома отрицательной полярности за исключением 5' концов L- и S- сегментов
- S (Smaller) РНК кодирует структурные компоненты вириона
 - Белок-предшественник гликопротеинов (GPC → GP1+GP2) и Структурный белок (N)
- L (Larger) РНК кодирует
 - Zinc Binding Protein (Z) и РНК-полимеразу (L)
- Концы обеих РНК содержат высококонсервативные комплементарные последовательности длиной 17-19 нуклеотидов, что обеспечивает возможность циркуляризации сегментов

3

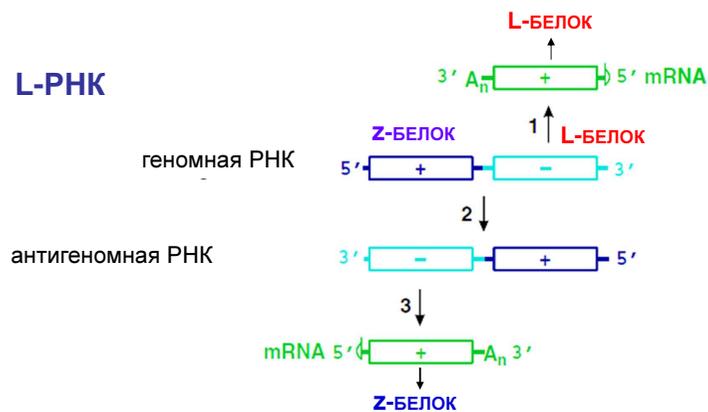
сем. *Arenaviridae* СТРУКТУРА ГЕНОМА



Участки РНК, кодирующие белки N и L, обладают (-) полярностью, а 5'-концевые участки РНК, кодирующие белки GPC и Z, обладают (+) полярностью.
 ⚡ - нетранслируемая последовательность со сложной вторичной структурой - «шпилька»

4

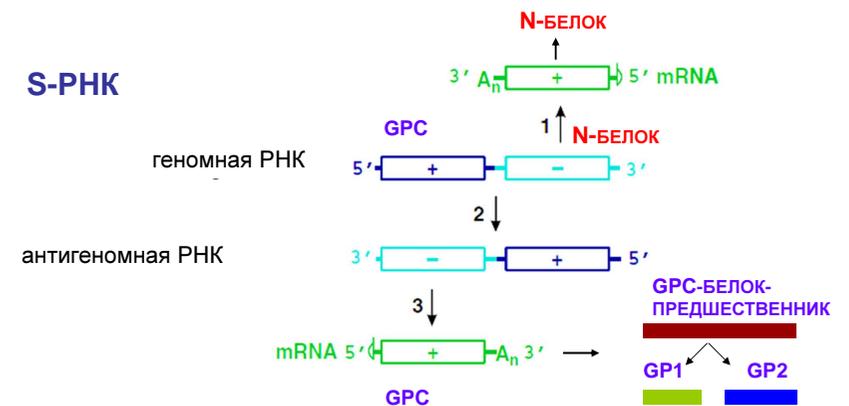
Принцип репликации вирусов с «двусмысленной» (ambisense) РНК.



1. Транскрипция гена с (-) полярностью и образование мРНК.
2. Репликация всего генома с образованием комплементарной РНК.
3. Транскрипция с комплементарной РНК гена с (+) полярностью.

5

Принцип репликации вирусов с «двусмысленной» (ambisense) РНК.



1. Транскрипция гена с (-) полярностью и образование мРНК.
2. Репликация всего генома с образованием комплементарной РНК.
3. Транскрипция с комплементарной РНК гена с (+) полярностью.

5а

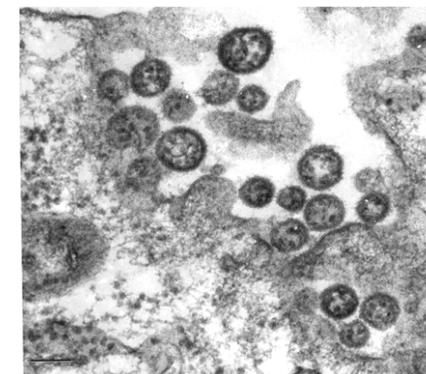
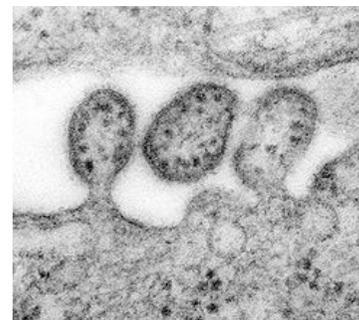
Стратегия репликации аренавирусов



- Проникновение в клетку путем эндоцитоза и образование внутриклеточной вакуоли
- Освобождение вирусного генома
- Транскрипция (-) 3'-концевой части S РНК → Образование мРНК для N – белка
- Транскрипция (-) 3'-концевой части L РНК → Образование мРНК для РНК-полимеразы (L– белок)
- Транскрипция terminates с помощью шпильки, расположенной в центре S и L РНК
- Кэпирование транскриптов с помощью ферментативного аппарата клетки
- Трансляция белков N и L происходит до репликации генома
- Репликация генома (антигеномная РНК)
- Транскрипция мРНК для гликопротеинов (GPC → GP1, GP2) и Zinc-binding protein (Z)
- Трансляция GPC и Z – белков
- Сборка нуклеокапсида
- Почкование вирусных частиц от клеточной мембраны (вирус не убивает клетку)

6

Почкование аренавирусов от клеточной мембраны



6a

Вирусы с двунитовой геномной РНК (dsРНК)

7

Группа Диплорнавирусы

- ds РНК не может функционировать как мРНК.
- нуждается в упаковке в вирион RDRP, для синтеза м РНК.
- обнаружены у представителей всех царств живого: бактерий, грибов, растений, простейших, беспозвоночных и позвоночных животных .
- 6 семейств
 - Reoviridae
 - Partitiviridae
 - Chrysoviridae
 - Totiviridae
 - Cystoviridae
 - Birnaviridae

ГРУППА III

7a

Вирусы с геномной dsРНК

сем. *Reoviridae*

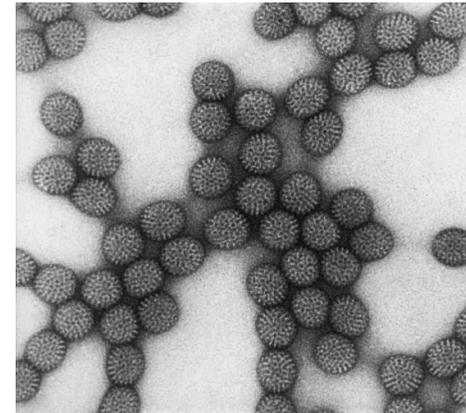
- 9 родов, заражают млекопитающих, беспозвоночных и растения.
- были изолированы из дыхательного и кишечного тракта животных и человека и, на тот момент, не были связаны с каким-либо заболеванием
- Реовирусы человека – респираторные заболевания (дети). Род *Rotavirus* - диарея у детей.
- Вирус синюхи языка животных (*Bluetongue virus*)
- Реовирусы растений
 - *Rice dwarf virus*
 - *Wound tumor virus*
- Реовирусы грибов

Reo -“*r*espiratory *e*nteric *o*rphan”-

7в

Вирусы с геномной dsРНК

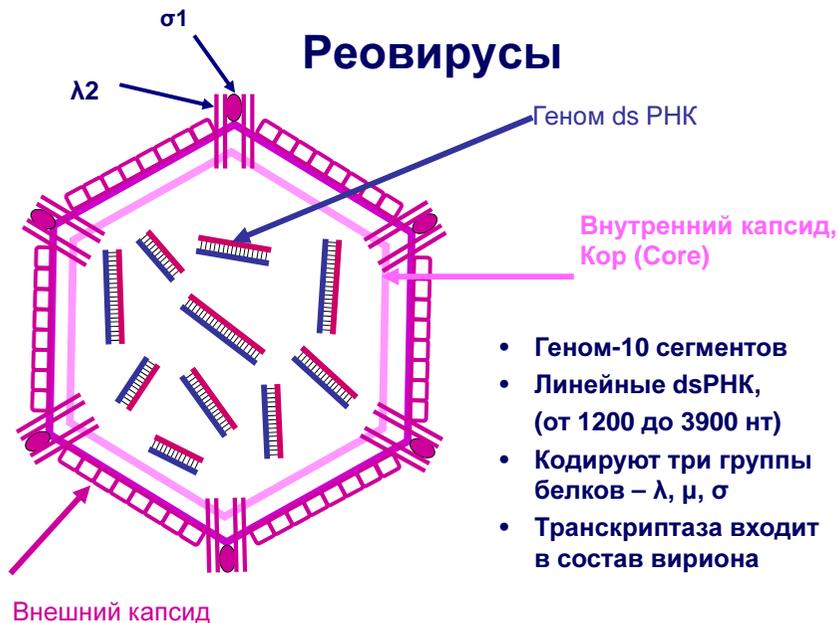
сем. *Reoviridae*



- Липопротеидной оболочки нет.
- Геном сегментирован (10-12)
- Транскриптаза входит в состав вириона
- Капсид вириона реовирусов образован двумя концентрическими белковыми слоями - внешним икосаэдрическим капсидом (80 нм) и внутренним (60 нм)
- Размножается в цитоплазме

8

Реовирусы



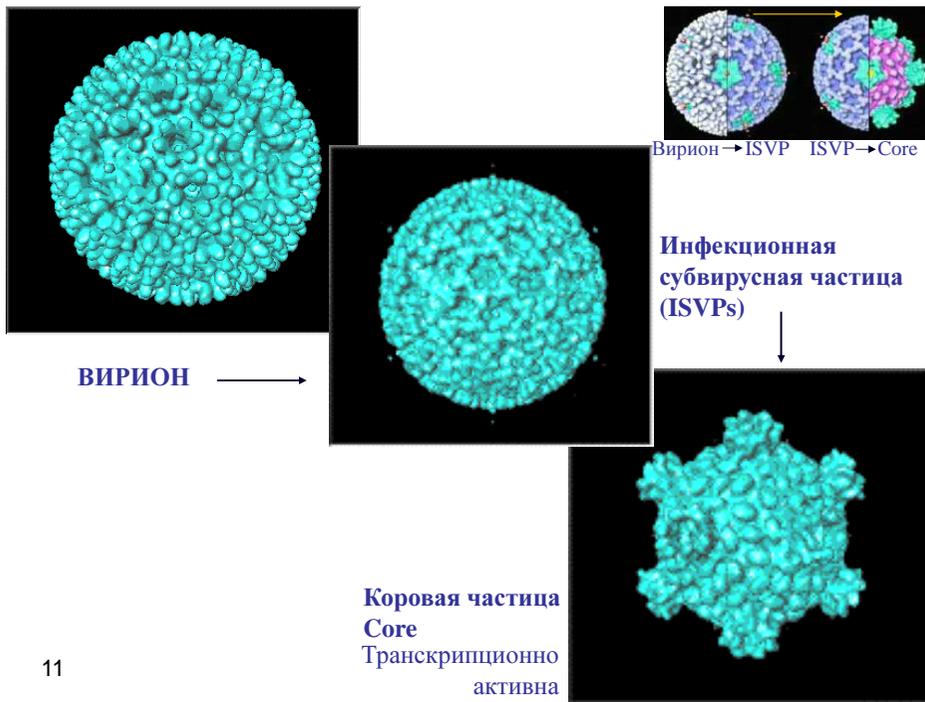
- Геном-10 сегментов
- Линейные dsРНК, (от 1200 до 3900 нт)
- Кодировать три группы белков – λ, μ, σ
- Транскриптаза входит в состав вириона

9

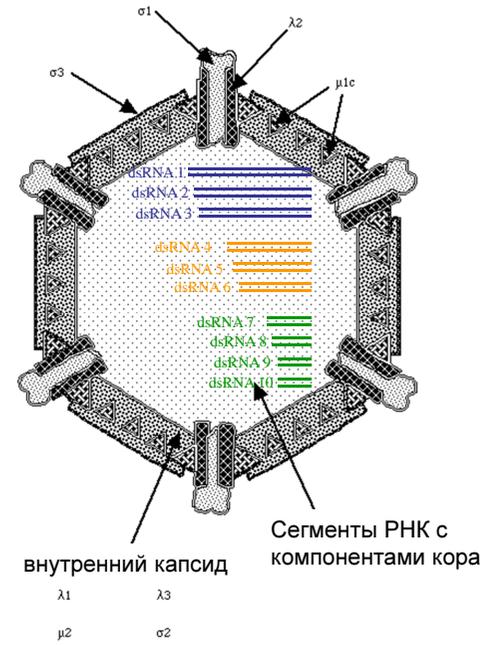
Вирусы с двунитевой геномной РНК (dsРНК)

- Вирус попадает в клетку посредством эндоцитоза .
- В результате протеолиза вирусная частица превращается в т.н. субвирусную частицу, устойчивую к протеазам и способную проникать через мембрану эндолизосомы в цитоплазму.
- В цитоплазме происходит окончательная структурная перестройка и превращение субвирусной частицы в т.н. коровую частицу, в которой активируется транскриптазный комплекс, локализованный на вершинах икосаэдра, открывается вершинный канал и начинается первичная транскрипция.

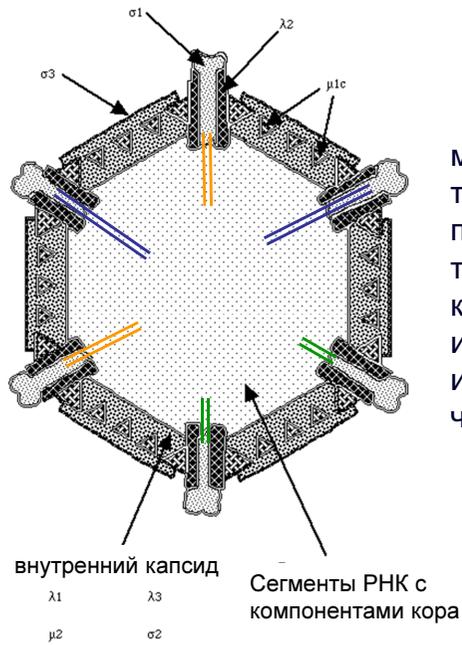
10



11

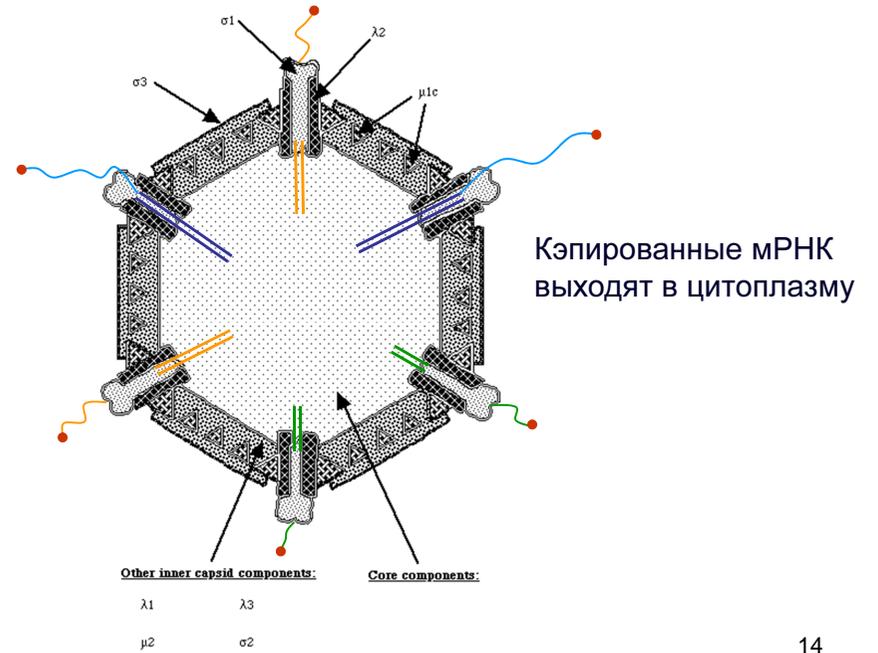


12

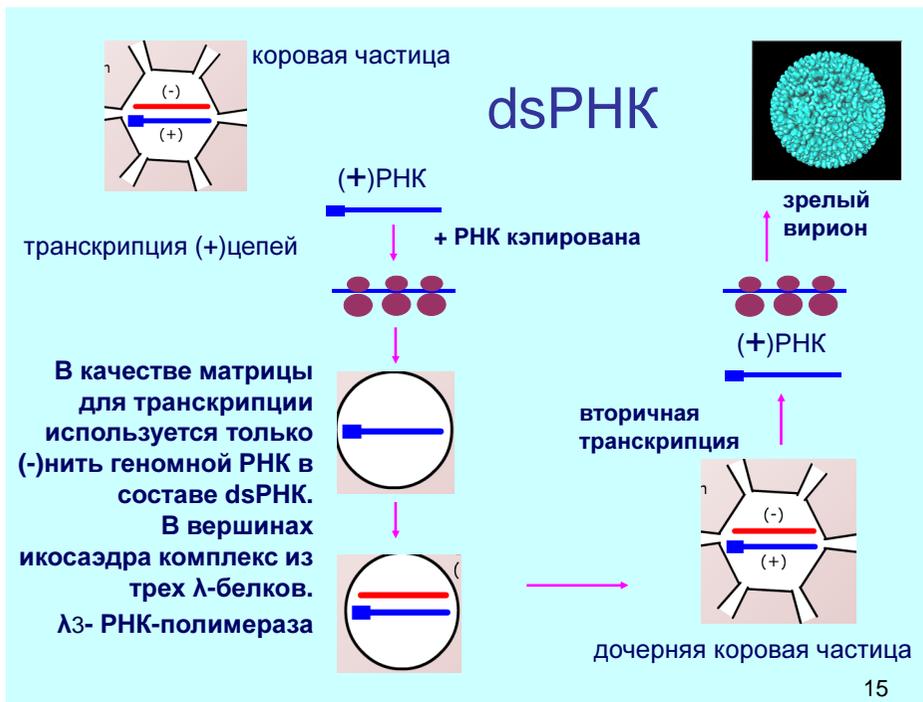


мРНК, вероятно, транскрибируется с помощью транскрипционного комплекса в каждой из 12 вершин икосаэдра (коревой частицы)

13

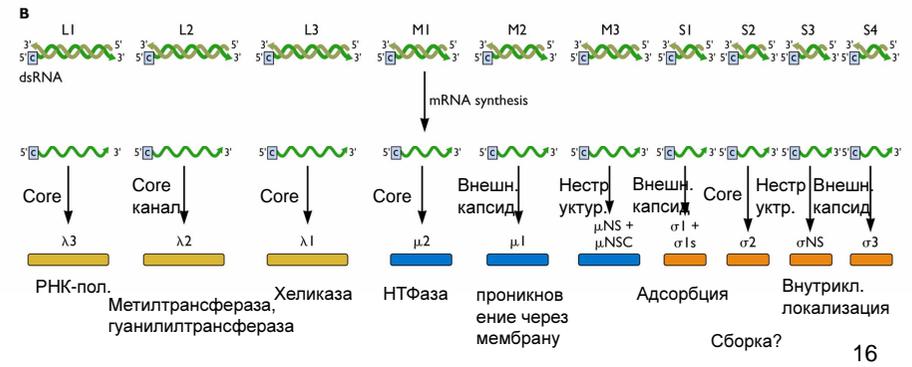


14

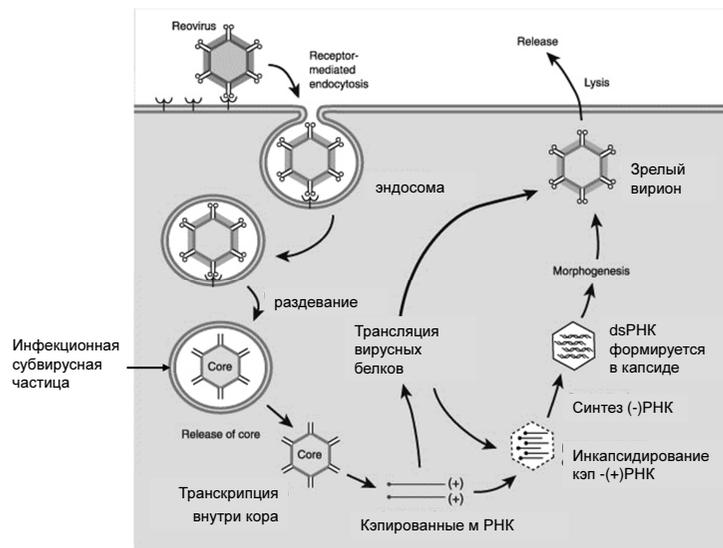


Реовирусы – организация генома

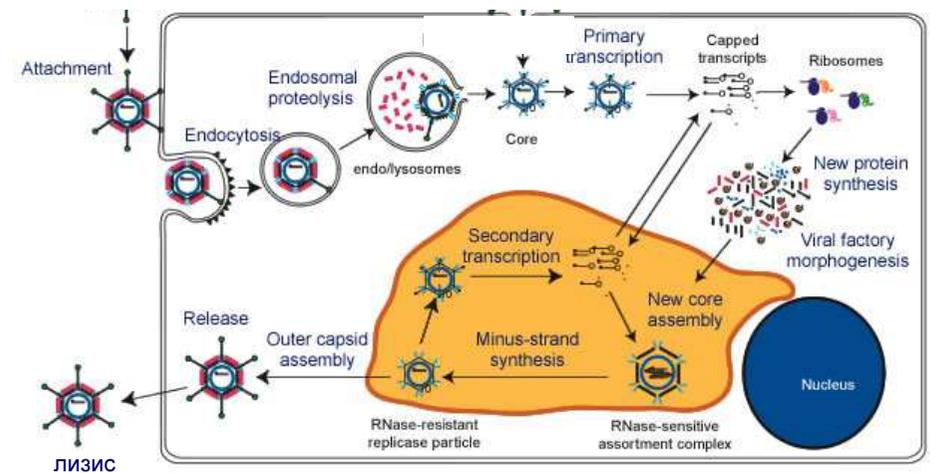
В одной вирусной частице находится одна копия каждого сегмента dsРНК



Цикл репликации реовирусов



Цикл репликации реовирусов



Реовирусы: сборка и выход потомства из клетки

Сборка

- Механизм, ответственный за распределение различных сегментов генома между дочерними частицами неизвестен
- Частицы собираются в цитоплазме через 6-7 часов после начала инфекции (тельца включения)

Выход из клетки

- Выход частиц из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму клетки
- Накопление
- Лизис клетки

17в

РЕТРОВИРУСЫ

РНК-содержащие вирусы, которые синтезируют ДНК на матрице РНК.

18

Ретровирусы

- **Ретровирусы** (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

Reverse transcription

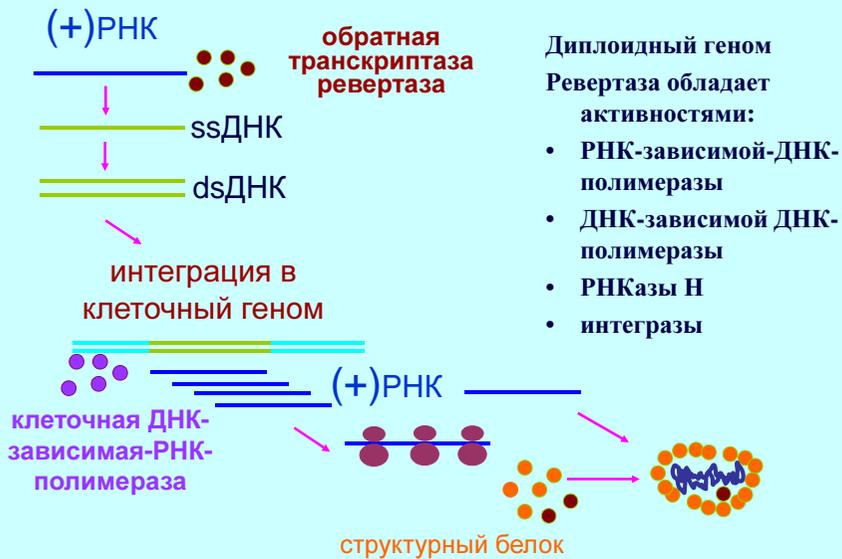
18а

Семейство *Retroviridae*

Род	Виды
1. <i>Alpharetrovirus</i>	Вирус лейкоза птиц, саркомы Рауса(RSV)
2. <i>Betaretrovirus</i>	Вирус молочных желез мышей
3. <i>Gammaretrovirus</i>	Вирус лейкоза мышей (Moloney, Harvey)
4. <i>Deltaretrovirus</i>	Вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус Т-клеточного лейкоза взрослых людей(HTLV)
5. <i>Epsilonretrovirus</i>	Вирус дермальной саркомы
6. <i>Lentivirus</i>	Вирус иммунодефицита человека I (HIV), вирус висна, вирус инфекционной анемии лошадей
7. <i>Spumavirus</i>	обезьяний пенный вирус

19

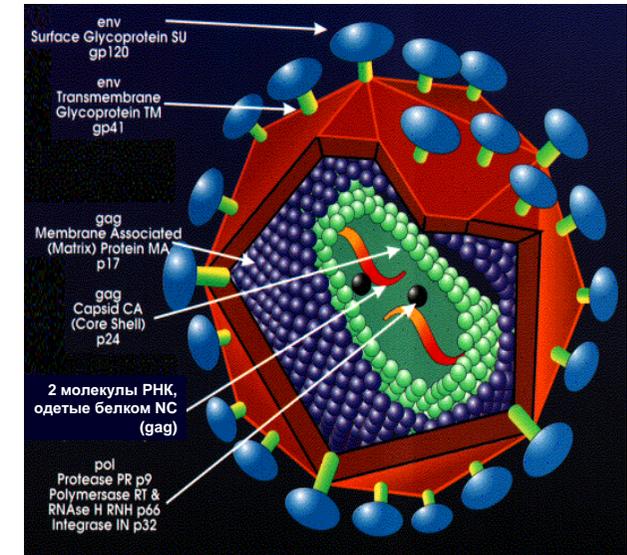
Ретровирусы (+) ssРНК



20

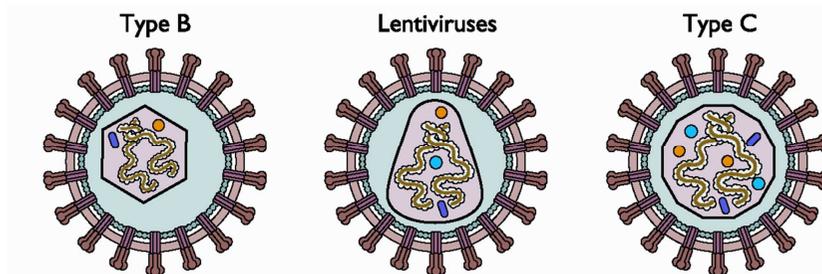
Структура вириона ретровируса.

Сферический вирион (d ~100 нм) покрыт липидной мембраной с трансмембранным гликопротеином (ТМ) и гликопротеином SU, с помощью которого вирус распознает клеточный рецептор.



21

Структура ретровирусов



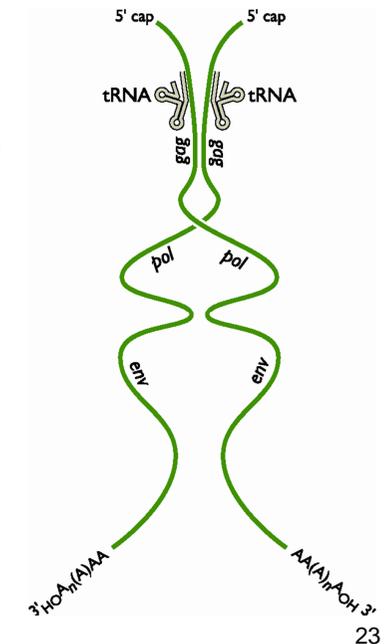
Нуклеокапсид (белок CA) ретровирусов может иметь различную форму и занимать разное положение внутри вирусной частицы.

- Тип В- нецентрированный икосаэдрический капсид (вирус лейкоза мышей)
- Лентивирусы – капсид в виде конуса (ВИЧ)
- Тип С – капсид занимает центральное положение(вирус лейкоза птиц, вирус саркомы Рауса)

22

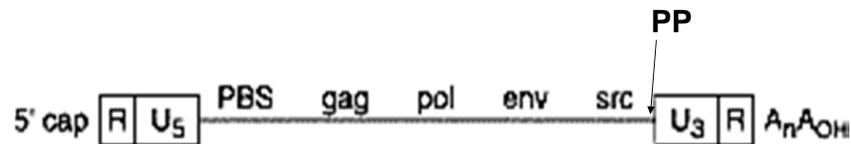
Геном ретровирусов

- 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



23

ГЕНОМ РЕТРОВИРУСА (вирус саркомы Рауса).



R – прямой повтор (12-235нт);

U₅-уникальная последовательность (80 – 200 нт), играющая важную роль в инициации обратной транскрипции и в интеграции провирусной ДНК в хромосому.

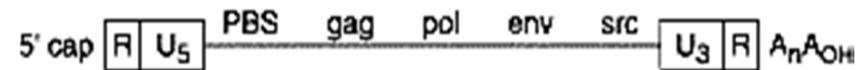
PBS (PB) – primer binding site(18 нт);

PP -Полипуриновый тракт ~9 нт А и G -затравка для синтеза (+) ДНК

U₃-уникальная последовательность

24

ГЕНОМ РЕТРОВИРУСА (вирус саркомы Рауса).



Gag (белки капсида):

MA, матриксный; CA, капсидный; NC, нуклеокапсидный.

Pol (каталитические белки):

RT, pol (обратная транскриптаза); Prot, протеаза; Int, интеграна.

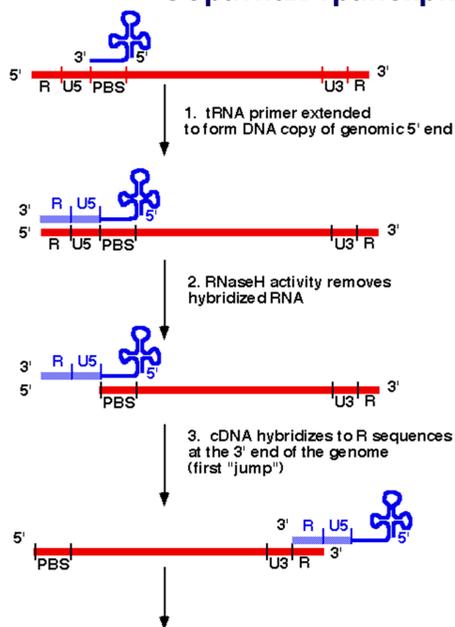
Env (белки, гликопротеиды внешней мембраны):

белок, связывающий рецепторы SU; трансмембранный белок TM.

Src (онкоген).

25

Обратная транскрипция геномной РНК



•Затравкой для ревертазы служит тРНК, которая, комплементарно связана восемнадцатью 3'-концевыми нт с участком PBS геномной РНК

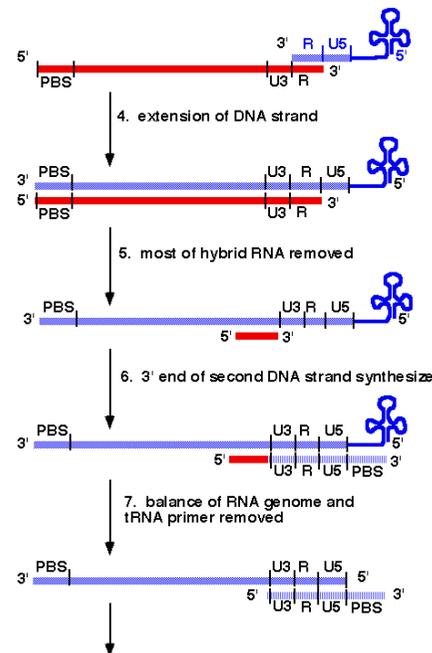
•Нарастивая 3'-конец затравки, ревертаза доходит до 5'-конца матрицы РНК, синтезируя фрагмент ДНК длиной около сотни нуклеотидов

•РНКаза Н удаляет РНК в составе гетеродуплекса с ДНК, кроме участка связывания тРНК

• 3'-конец фрагмента ДНК (R) комплементарен другому концу молекулы РНК, происходит гибридизация этих участков, называемая первым прыжком полимеразы

26

Обратная транскрипция геномной РНК

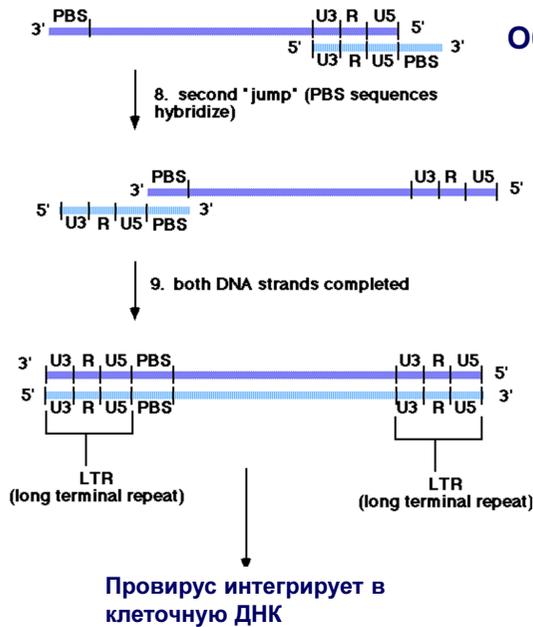


Реввертаза в качестве затравки использует свободный 3'-конец фрагмента ДНК и синтезирует длинный фрагмент ДНК, включая область, комплементарную PBS .

РНКаза Н удаляет РНК кроме PP, который становится затравкой для синтеза второй нити ДНК.

РНКаза Н удаляет PP и тРНК.

27



Обратная транскрипция геномной РНК

•Второй прыжок полимеразы - синтезированный фрагмент второй нити ДНК «перепрыгивает» на 3'-конец первой нити ДНК (участок PBS).

•Достраиваются обе нити ДНК и образуется линейная двуниевая ДНК (провирус)

•Провирус длиннее геномной РНК ретровируса за счет U3, U5 и комплементарных им последовательностей на концах обеих нитей ДНК.

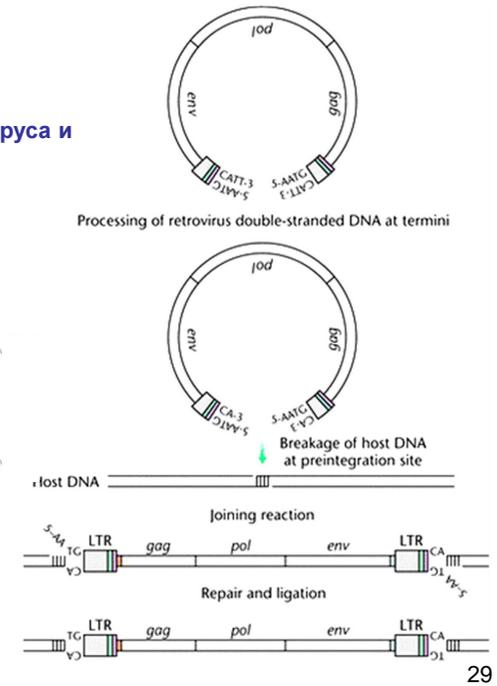
•U3, R и U5 – LTR

28

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 (ТТ).



ПРЯМОЙ ПОВТОР

3'TTCCGGAATA-----TTCCGGAATA5'
5'AAGGCCTTAT-----AAGGCCTTAT3'

ИНВЕРТИРОВАННЫЙ ПОВТОР

3'TTCCGGAATA-----TATTCGGAA5'
5'AAGGCCTTAT-----ATAAGGCCTT3'

3'TTAC-----GTAA5'
5'AATG-----CATT3'

↓ ИНТЕГРАЗА

3' - - AC-----GTAA5'
5' AATG-----CA - -3'

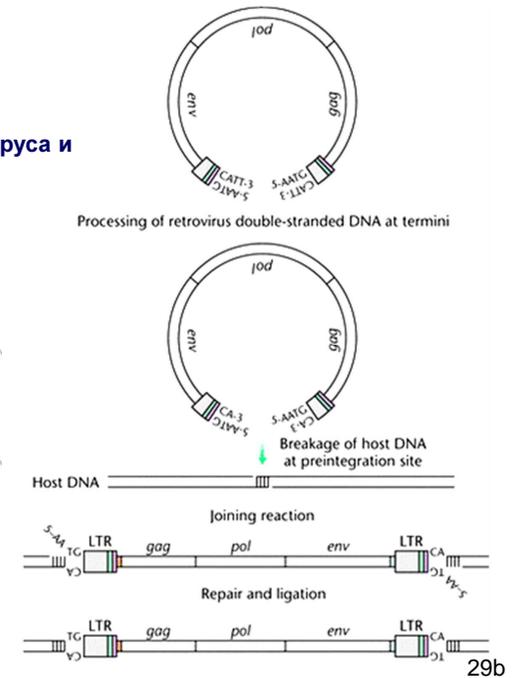
29a

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 (ТТ).

Интеграза вносит разрывы в ДНК хозяина на расстоянии в 4 - 6 нуклеотидов один от другого и объединяет 3'-концы ДНК провируса с 5'-концами кл ДНК. Клеточные системы репарации ДНК заполняют бреши в обеих нитях ДНК, удаляют 2 неспаренных нт провирусной ДНК и лигируют разрывы.



В РЕЗУЛЬТАТЕ:

- ДНК провируса укорачивается на 2 терминальных нуклеотида LTR по сравнению с неинтегрированной формой провируса;
- Концы интегрированного провируса всегда имеют одну и ту же последовательность 5'-TG....CA - 3';
- От 4 до 6 нуклеотидов клеточной ДНК, фланкирующих интегрированный провирус, дуплицированы.

29c

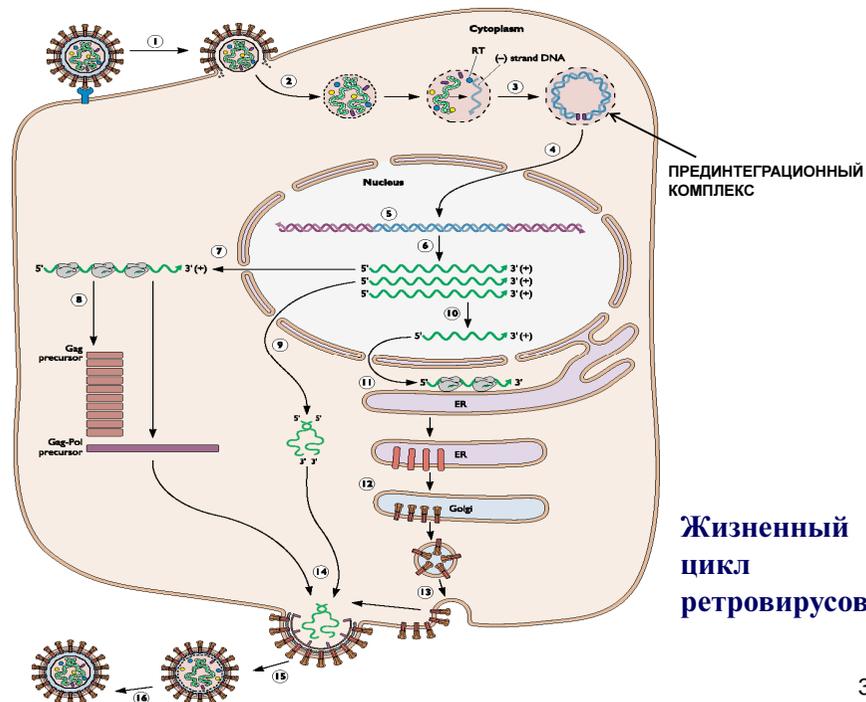
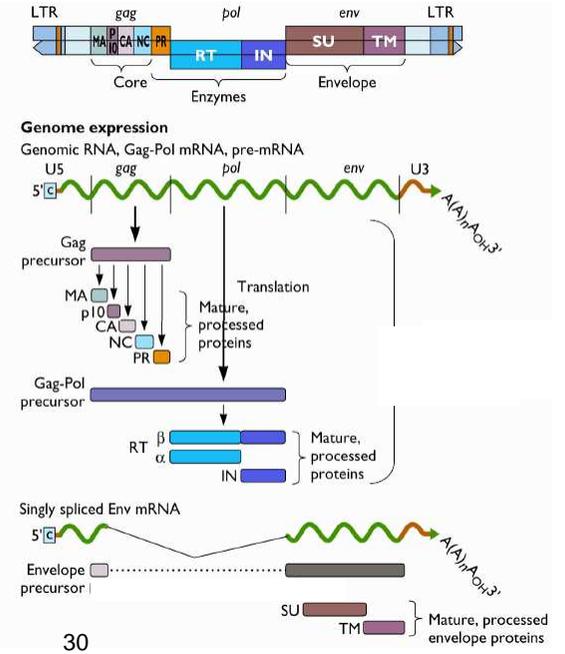
Транскрипция провируса и трансляция белков

Транскрипция осуществляет-ся кл РНК-полимеразой II

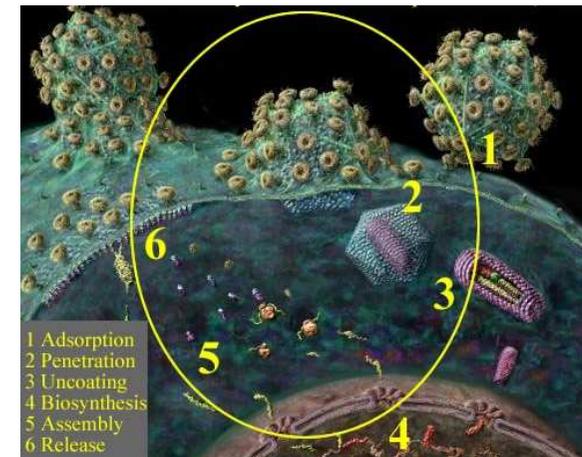
При транскрипции провируса образуется два (три) вида мРНК: полноразмерная мРНК вируса и 1 (2) субгеномных РНК

При трансляции полноразмерной мРНК образуется единый полипротеин gag-pol, которые протеиназа нарезает впоследствии на отдельные белки.

Гены env (src) экспрессируются за счет альтернативного сплайсинга полноразмерной мРНК, образуется субгеномная РНК.



31



Жизненный цикл ретровирусов

31a

РНК-содержащие вирусы

Геном	РНК-зависимая РНК-полимераза (транскриптаза) в вирионе	Инфекционность РНК	Первое событие в инфицированной клетке
(+) РНК	нет	инфекционна	трансляция
(-) РНК	да	нет	транскрипция
ambis РНК	да	нет	транскрипция
ds РНК	да	нет	транскрипция

(+) РНК ретровирусы	РНК-зависимая ДНК-полимераза	нет	обратная транскрипция
----------------------------	------------------------------	-----	-----------------------