

# МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ



# МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ



© Petr Ushakov, 2012



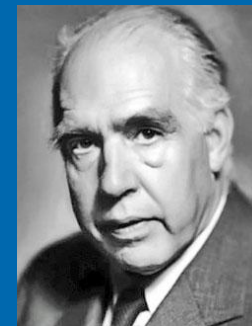
# МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ



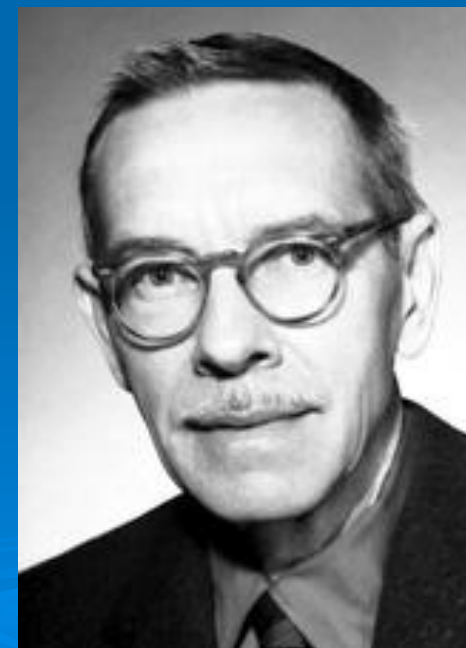
SL



MD



NB



AH

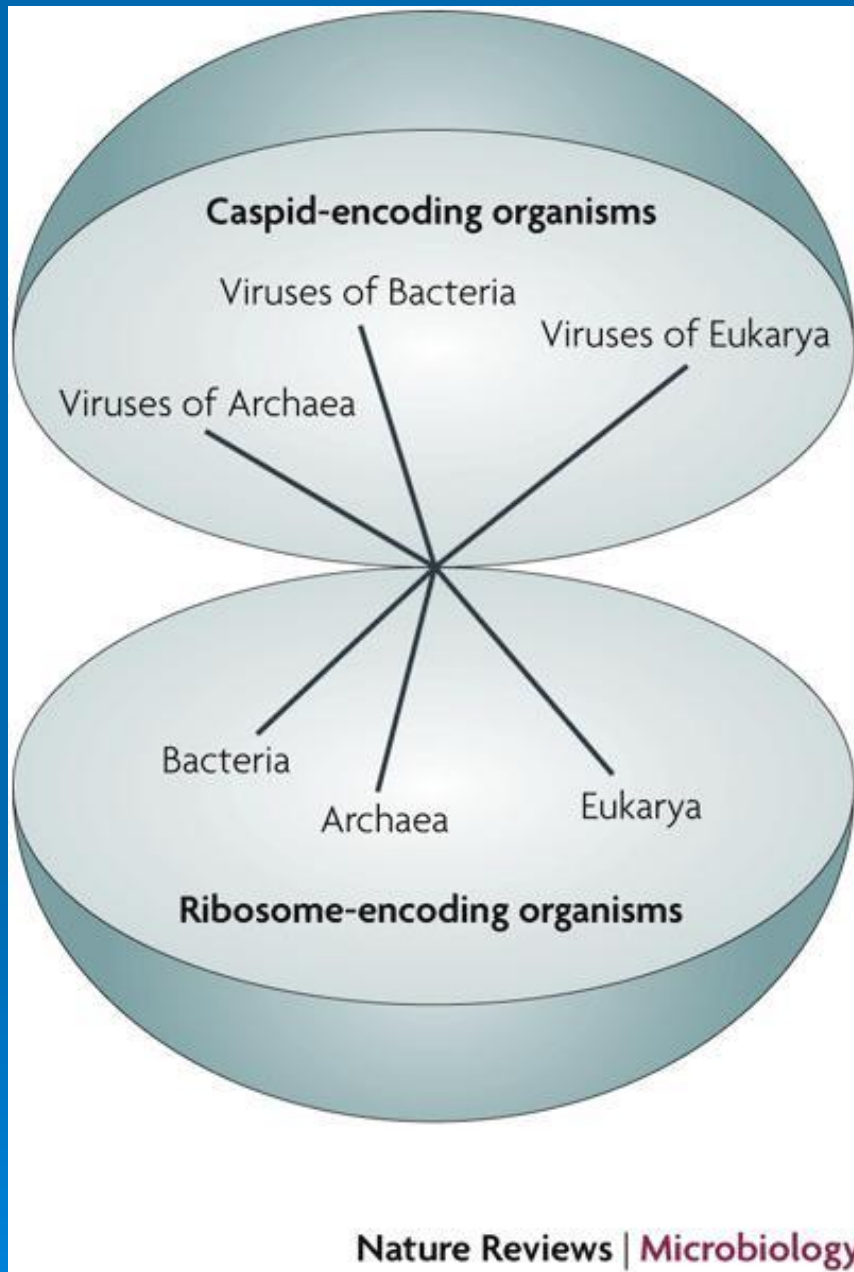


# Основні властивості вірусів

- **Можливість фільтрації через бактеріальні фільтри;**
- Існування у вірусів одного типу нуклеїнової кислоти (або ДНК або РНК);
- Відсутність властих білок — синтезуючих систем;
- **Внутрішньоклітинний паразитизм**
- Відсутність росту та диз'юнктивний спосіб збірки

***НЕКЛІТИННІ ФОРМИ ЖИТТЯ!!!***





# Визначення

“Віруси– облігатні внутрішньоклітинні паразити або симбіонти, які мають власні геноми, що кодують інформацію, необхідну для вірусної репродукції, і відповідно, мають певну супінь автономії від генетичних систем хазяїна, - але **не кодують всю систему трансляції та мембранного апарату.**

*(E. Koonin, 2012; Є. Кунін, 2014)*

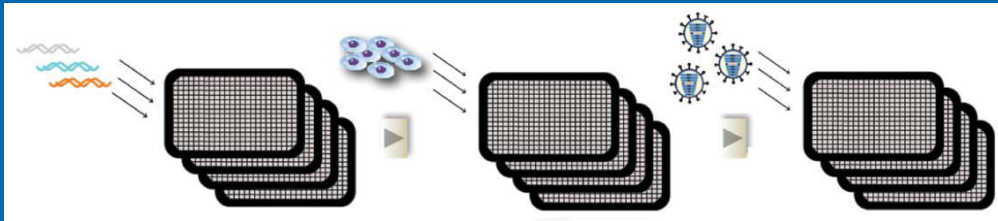


# Дві прості речі, які слід завжди пам'ятати щодо вірусів

- **1. Можливий будь-який варіант запису генетичної інформації ( РНК, ДНК, 1л, 2л, фрагментовна, амбісенсова etc)**
- **2. АЛЕ РЕАЛІЗУВАТИ ГЕНЕТИЧНУ ІНФОРМАЦІЮ ВІРУС МОЖЕ ТІЛЬКИ ЗАВДЯКИ КЛІТИНИМ МЕХАНІЗМАМ. (незалежно від варіанту запису генетичної інформації вірусів необхідна поява “стандартної” мРНК для синтезу білку.....)**

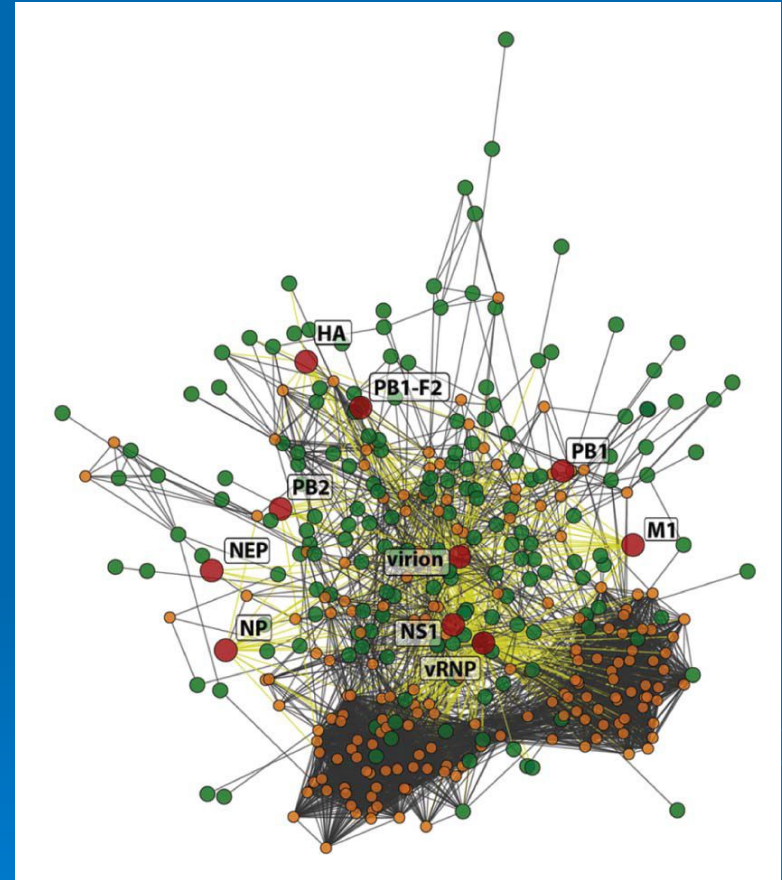


# Широкогеномний RNAi скринінг для пошуку клітинних факторів репродукції вірусу грипу



Виявлено 295 клітинних кофакторів, задіяних у ранній реплікації вірусів грипу. Крім цієї групи виявлено: фактори, що включені у кіназ-регулюючу передачу сигналу, убіквітазну та фосфатазну активність та 181 група факторів, що задіяні у високо-специфічну взаємодію вірус-господар. Більше того, було підтверджено, що 219 з 295 факторів є необхідними для ефективного росту вірусів грипу дикого типу (4266 взаємодій між вірусними чи клітинними білками).

*Nature February  
2010*





# Деякі основні питання молекулярної біології вірусів:

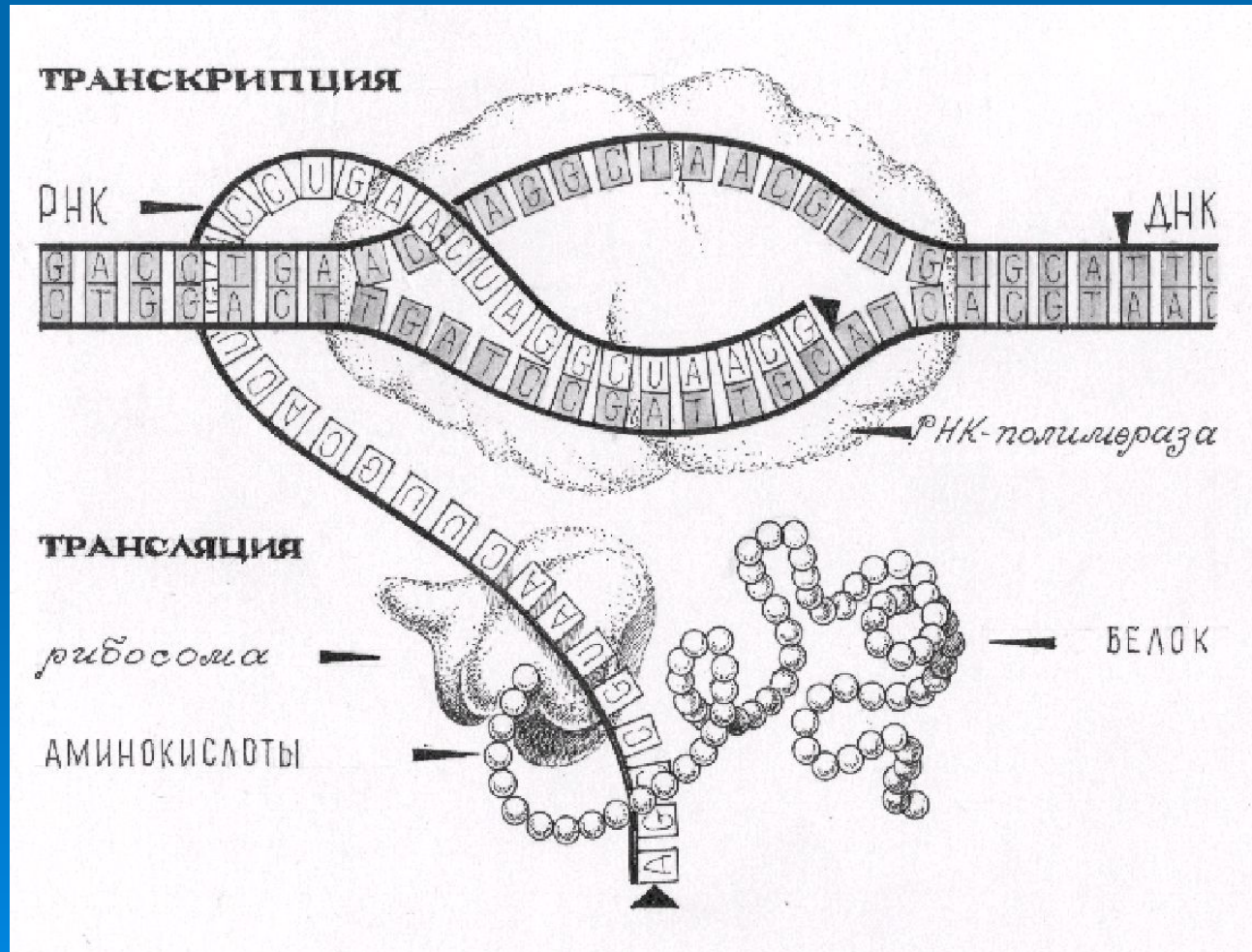
- *Механізми транскрипції вірусів та трансляції вірусних білків*
- *Механізми реплікації вірусів*
- *Молекулярні основи вірус-клітинних взаємодій*



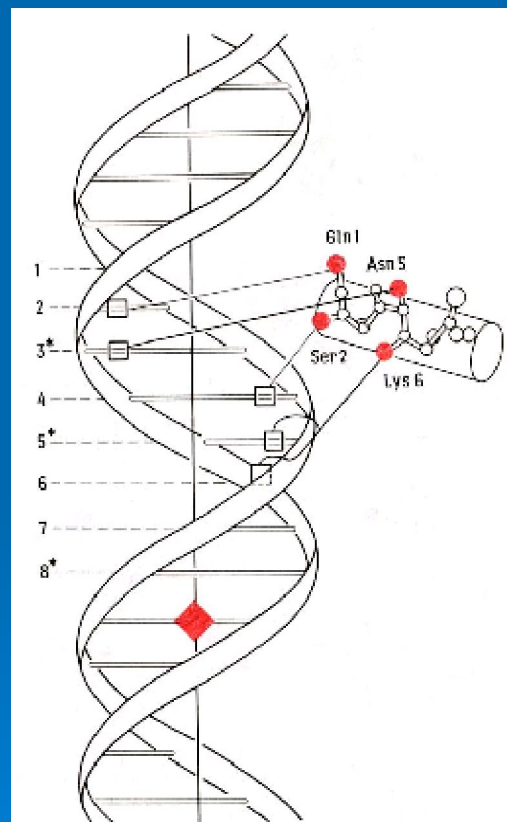
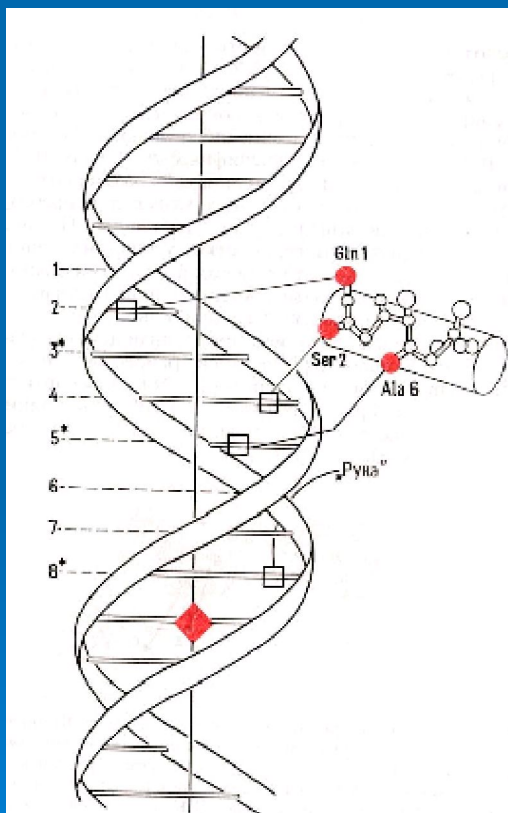
# Механізми транскрипції вірусів



# Транскрипція і трансляція в прокаріотах



# Білок-ДНКові взаємодії

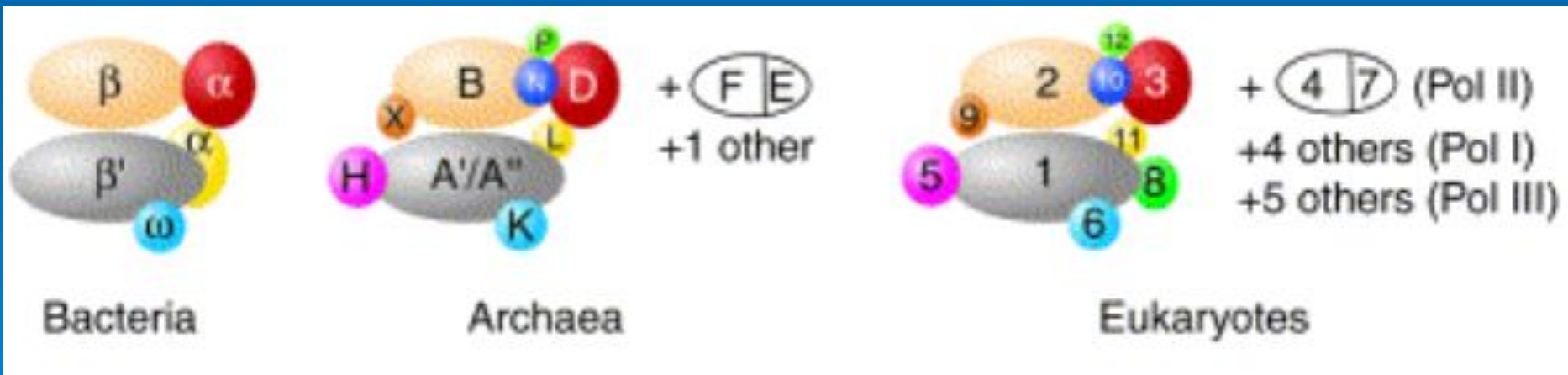


# Simple and complex DNA – dependent RNA polymerases

- Viral RNA polymerases (1 subunit)
- Prokaryotic RNA polymerases (4 different subunits)
- Eukaryotic and archeal RNA polymerases (at least 12 subunits)



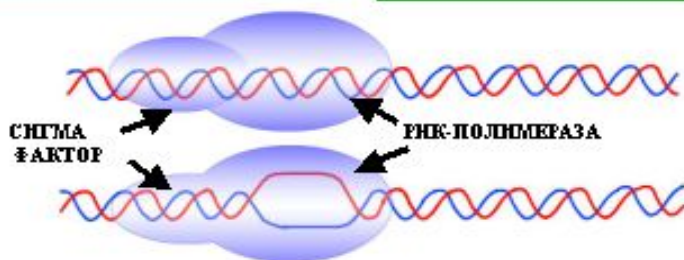
Viruses



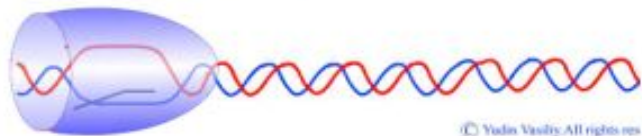
# Етапи транскрипції



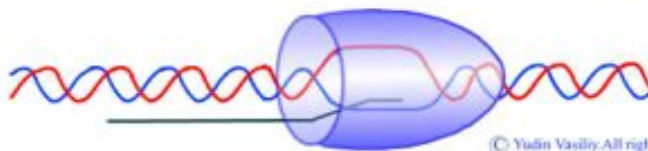
## Четыре этапа транскрипции:



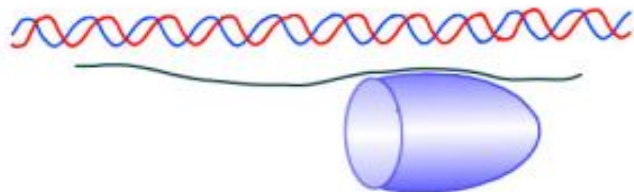
**РАСПОЗНАВАНИЕ МАТРИЦЫ:**  
при участии сигма фактора (у E.coli)  
РНК полимеразы связывается с ДНК и  
расплетает ДНК в точке инициации  
транскрипции



**ИНИЦИАЦИЯ:**  
сигма фактор отсоединился и синтезирована  
цель РНК  
(2-9 пар оснований)



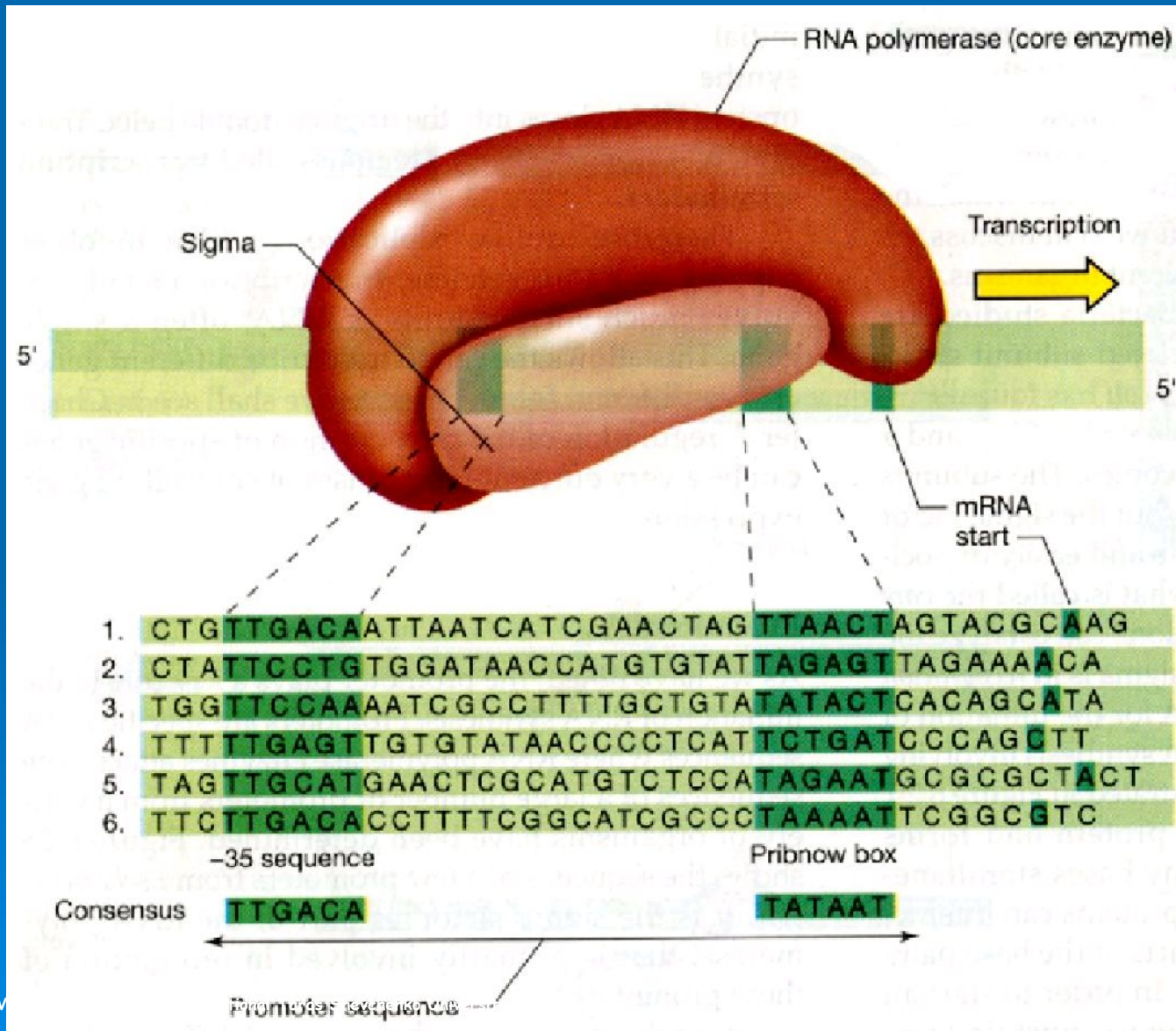
**ЭЛОНГАЦИЯ:**  
движение РНК полимеразы вдоль  
ДНК, расплетание ДНК, синтез РНК,  
заплетание ДНК



**ТЕРМИНАЦИЯ:** окончание  
транскрипции, распад комплекса  
ДНК-РНК-полимераза. Происходит  
после распознавания  
терминатора



# Ініціація транскрипції



# Субодиничний склад бактеріальної РНК-полімерази

## РНК полімераза

$\alpha_2\beta\beta'\sigma$

## Core-фермент

$\alpha$  40 kD

$\beta$  155 kD

$\beta'$  160 kD

## Факторы инициации

$\sigma$

70 kD основная  
20 kD транспорт железа  
28 kD флагелла  
32 kD тепловой шок  
54 kD метаболизм азота  
22 kD тепловой и окислительный шок  
38 kD ? экспрессия каталазы, эндонуклеазы III

## Ассоциированные факторы

**NusA** 55 kD фактор элонгации, паузы, антитерминация  $\lambda N$ , аттенюация, котранскрипционное сворачивание РНК

**NusG** 21 kD фактор элонгации, супрессирует паузы, антитерминация  $\lambda N$

**GreA** 18 kD разрезание транскрипта 2-3 н. в "арестованных" комплексах

**GreB** 19 kD разрезание транскрипта до 9 н. в "арестованных" комплексах

**Mfd** 130 kD освобождение РНК полимеразы, (TRCF) блокированной тиминным димером, активация UvrABC

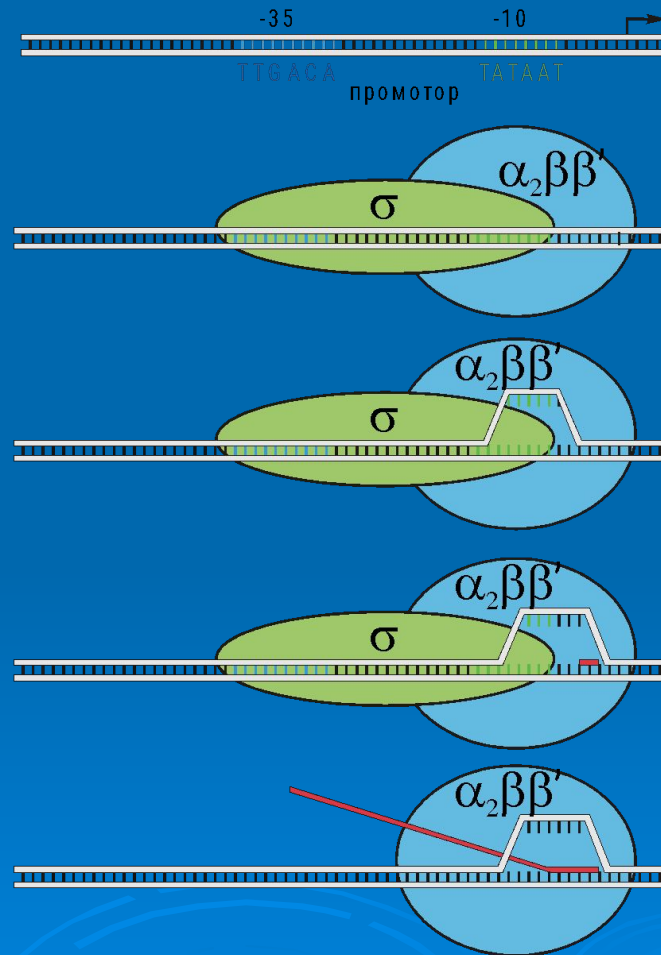
## Фактор терминации

$\rho$  47 kD, гексамер





# Послідовність подій ініціації транскрипції

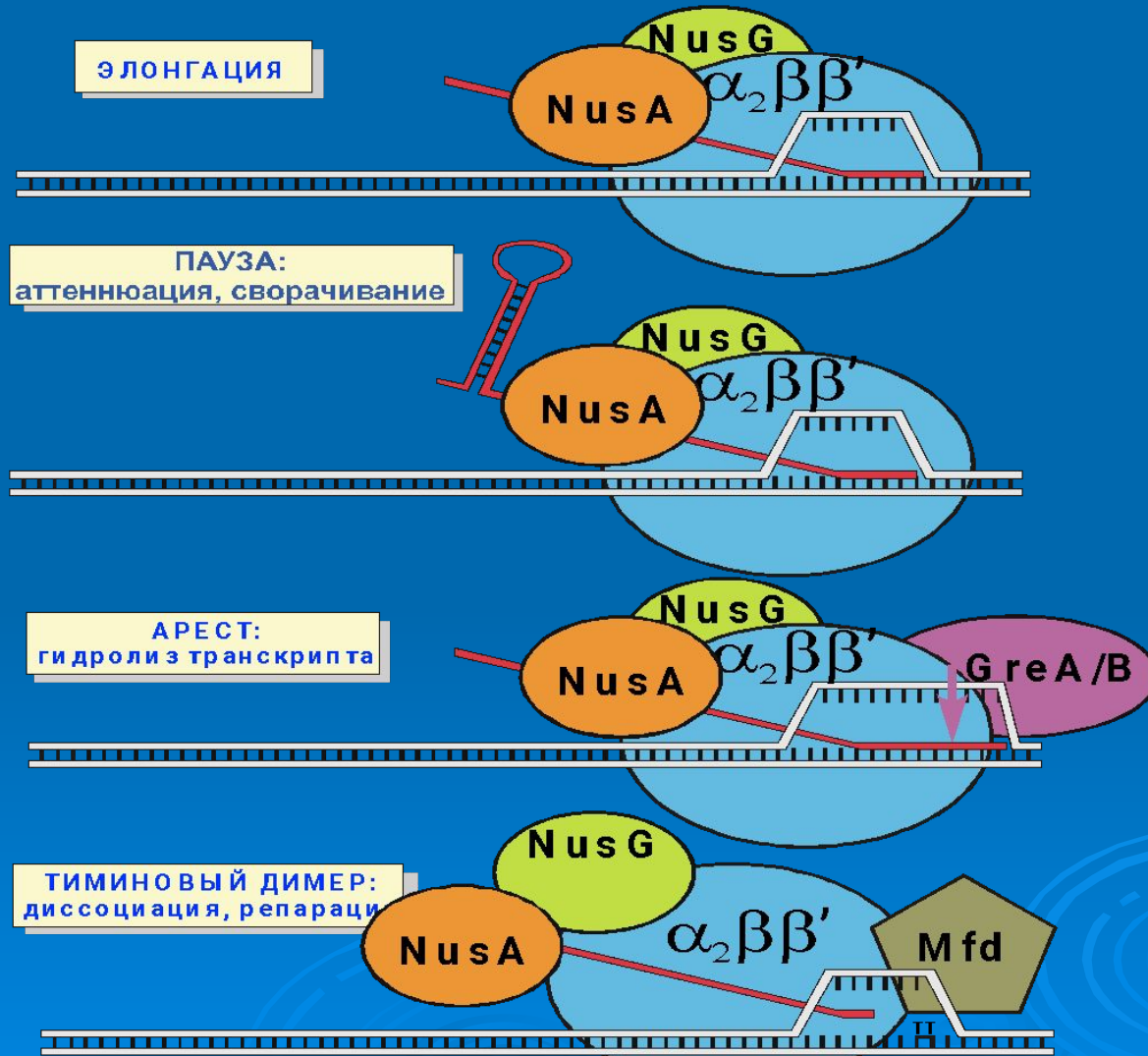


## Промоторні області, що пізнаються різними $\sigma$ -факторами

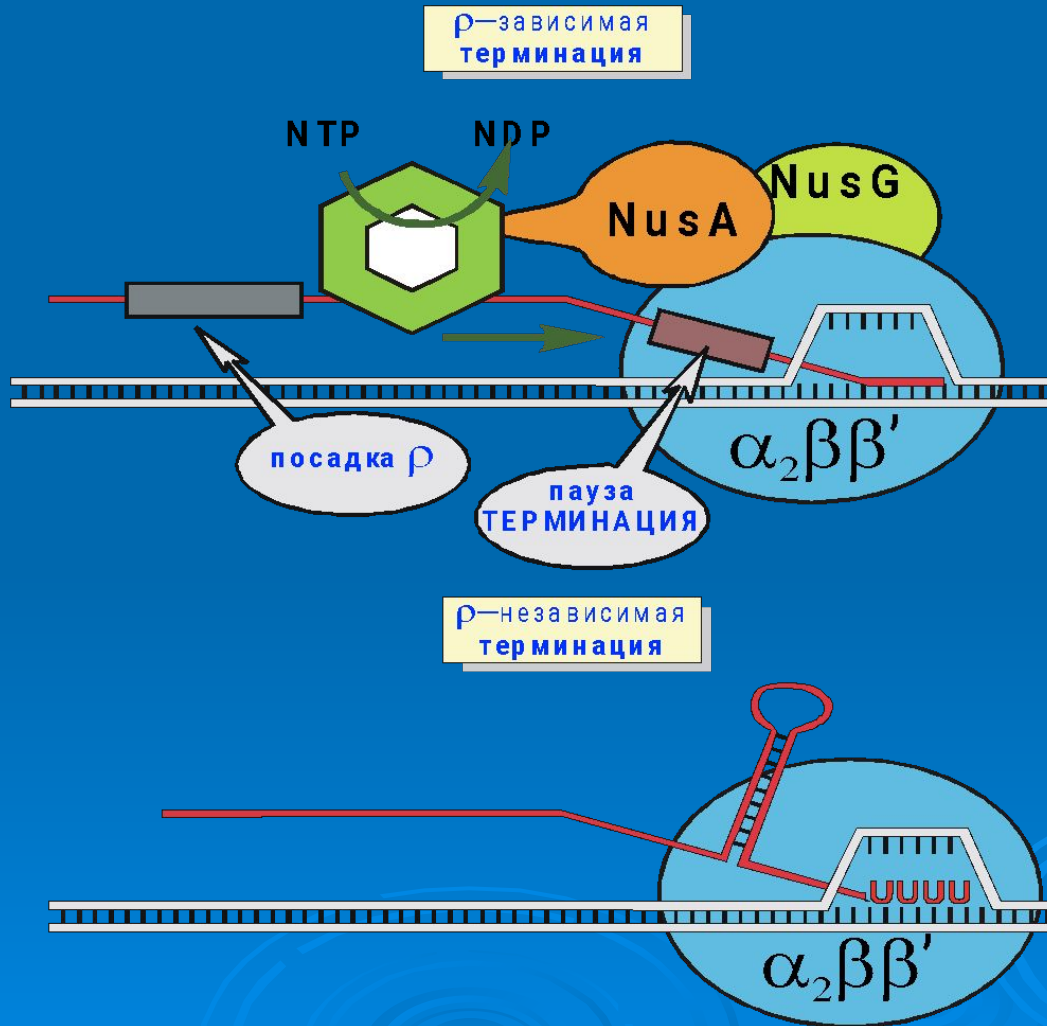
$\sigma$	-35	-10
<i>E. coli</i> $\sigma 70$	TTGACA	TATAAT
<i>E. coli</i> $\sigma 32$	TCTC-CCCTTGAA	CCCCAT-TA
<i>E. coli</i> $\sigma 54$	(-24)CTGG-A	(-12)TTGCA
<i>B. sub</i> $\sigma A$	TTGACA	TATAAT
<i>B. sub</i> $\sigma B$	AGGTTTAA	GGGTAT
<i>B. sub</i> $\sigma D$	CTAAA	CCGATAT
<i>B. sub</i> $\sigma E$	ATATT	ATACA
<i>B. sub</i> $\sigma K$	AC	CATA---T
<i>B. sub</i> $\sigma H$	CAGGA	GAATT—T
SPO1 $\sigma^{gp28}$	AGGAGA	TTT-TTT
T4 $\sigma^{gp55}$	-	TATAAATA



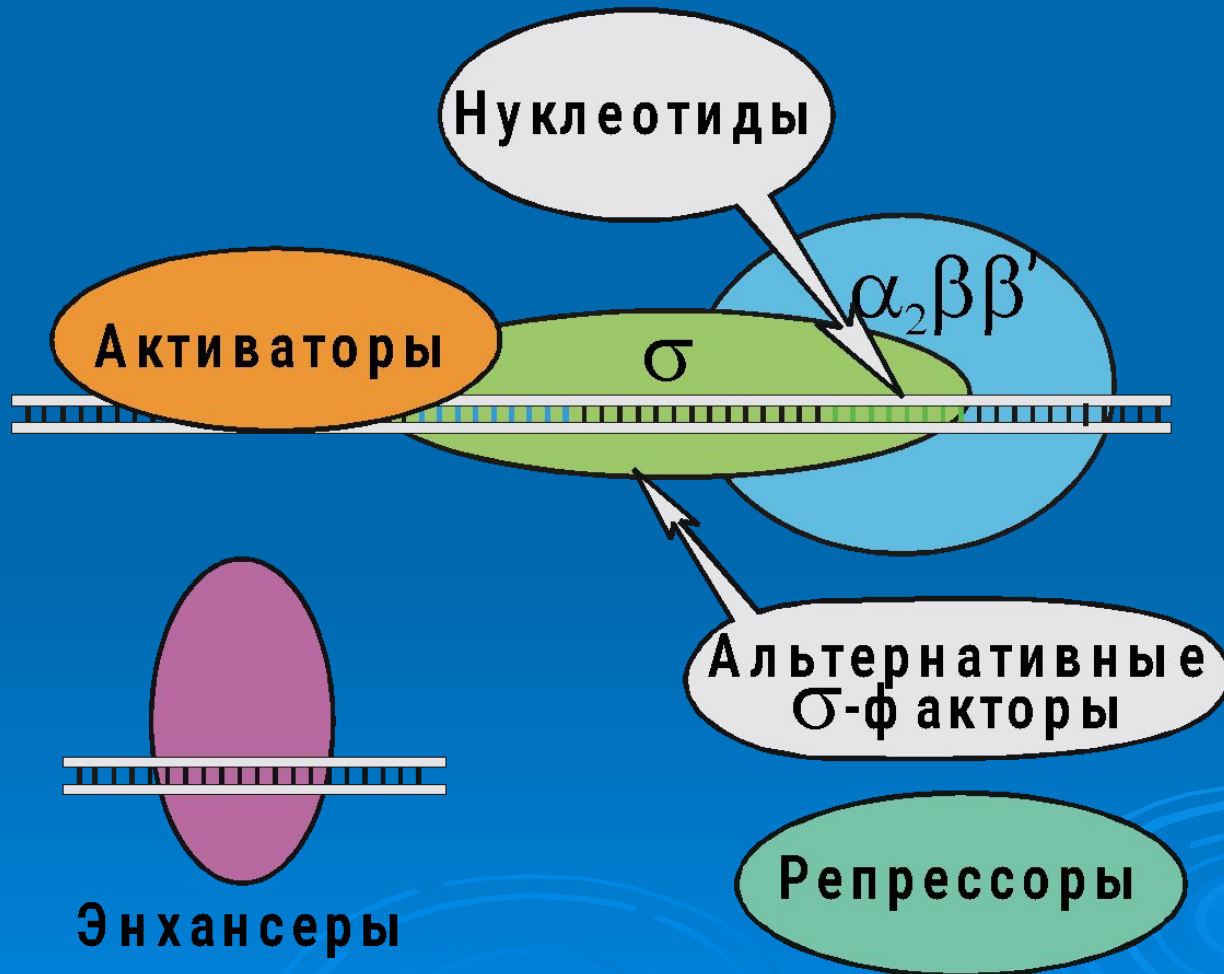
# Елонгація транскрипції бактеріальною РНК-полімеразою



# Альтернативні механізми термінації транскрипції прокариот

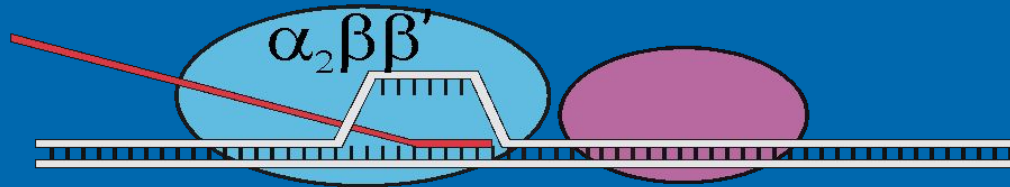


# Регуляція транскрипції на стадії ініціації.

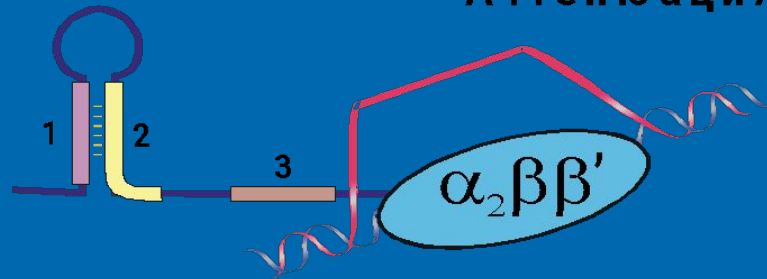


# Регуляція транскрипції на стадії елонгації і термінації

## Связывание репрессора

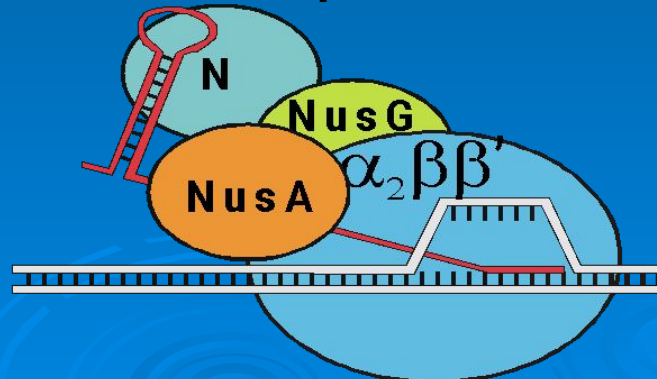


## Аттенюация

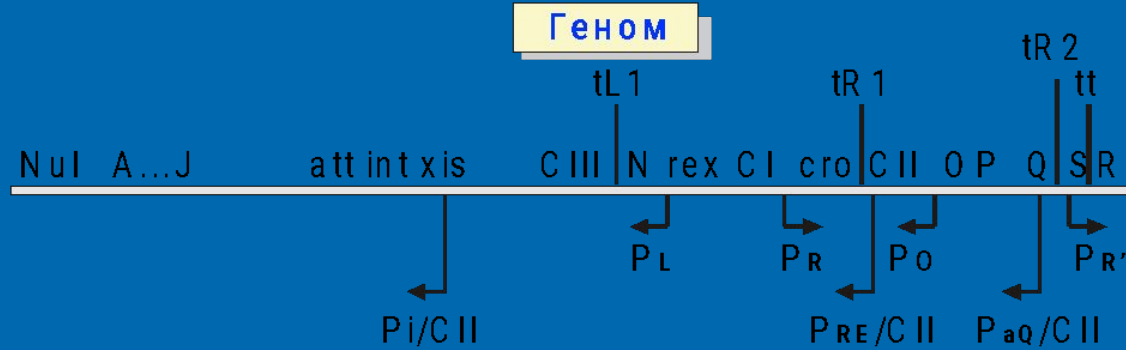


1. Скорость трансляции
2. Скорость транскрипции
3. Связывание белка

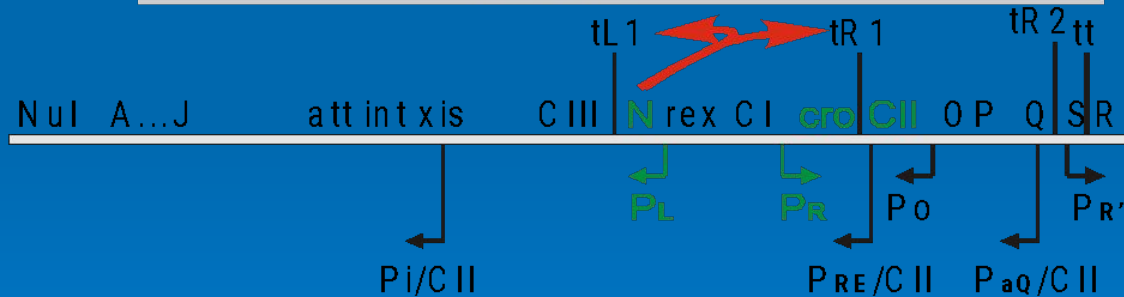
## Антитерминация



# Геном фагу лямбда



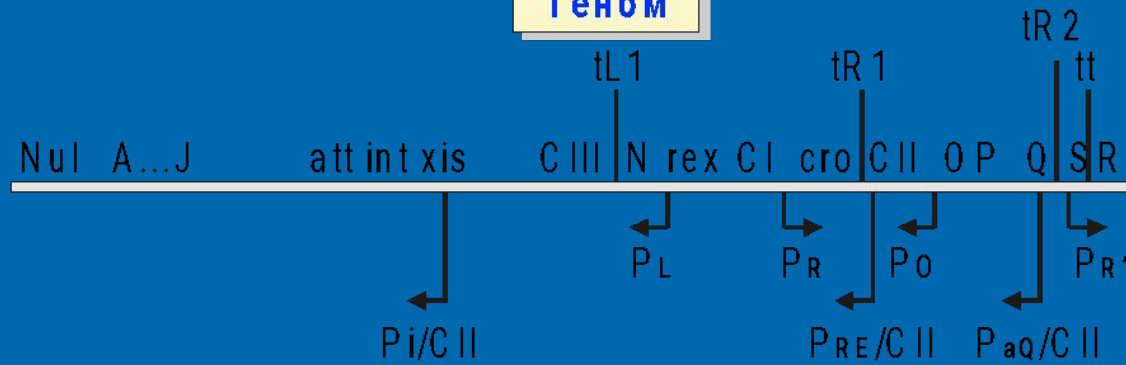
**Ранние гены:** *N* выключает терминаторы *tL1* и *tR1*



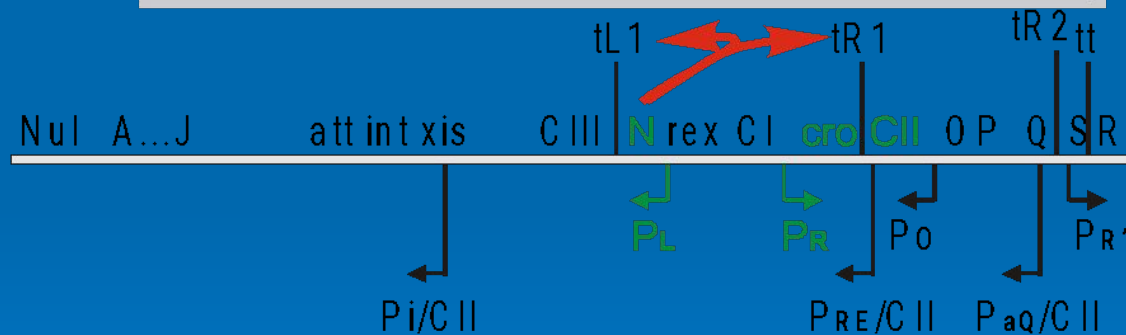
**Отсроченно ранние гены:** Приняты решения



## Геном



**Ранние гены:** *N* выключает терминаторы tL1 и tR1



**Отсроченно ранние гены:** Принятие решения

Голод

SAMP

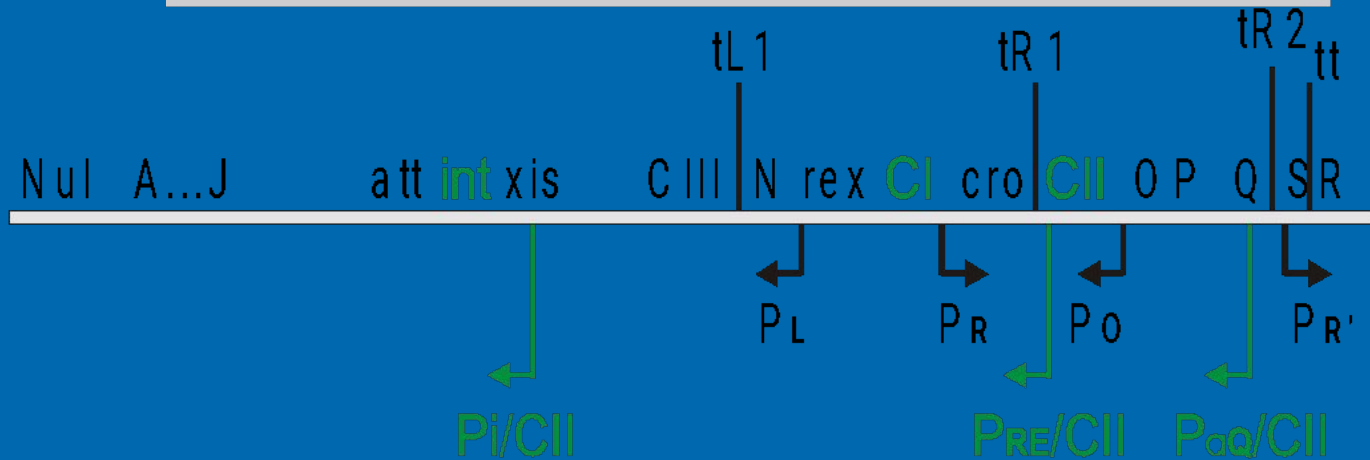
HflA

CII

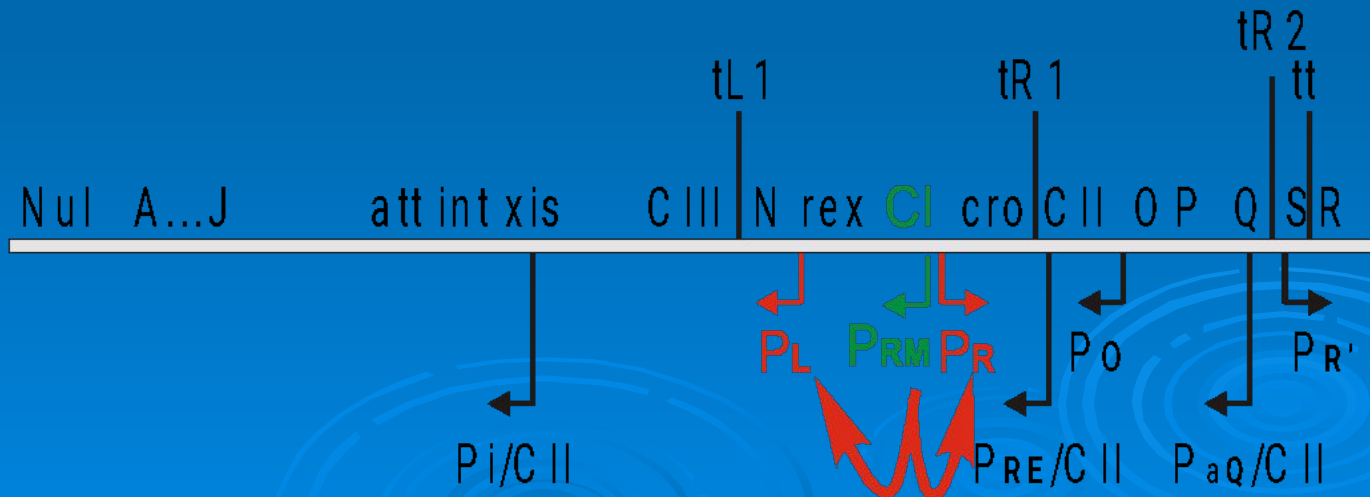
Лизогения



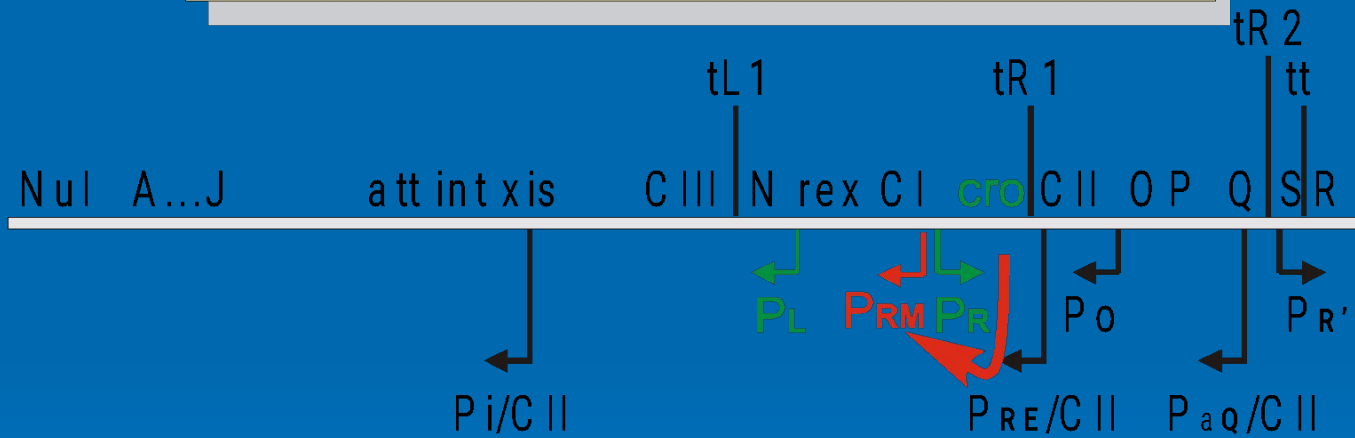
**Лизогения:** CII включает int, CI и ант исенс Q



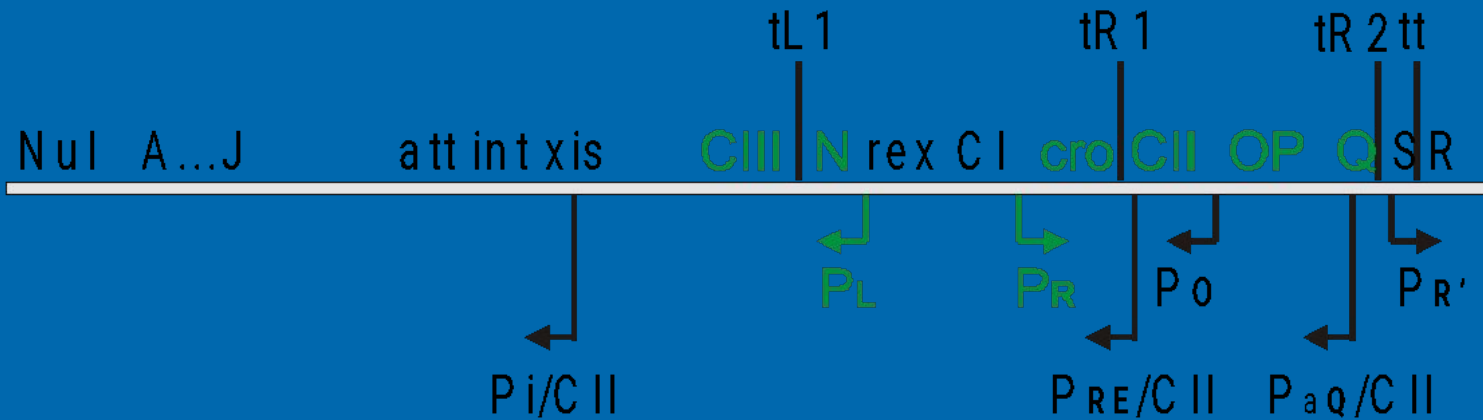
**Лизогения:** CI выключает все, кроме P<sub>RM</sub>



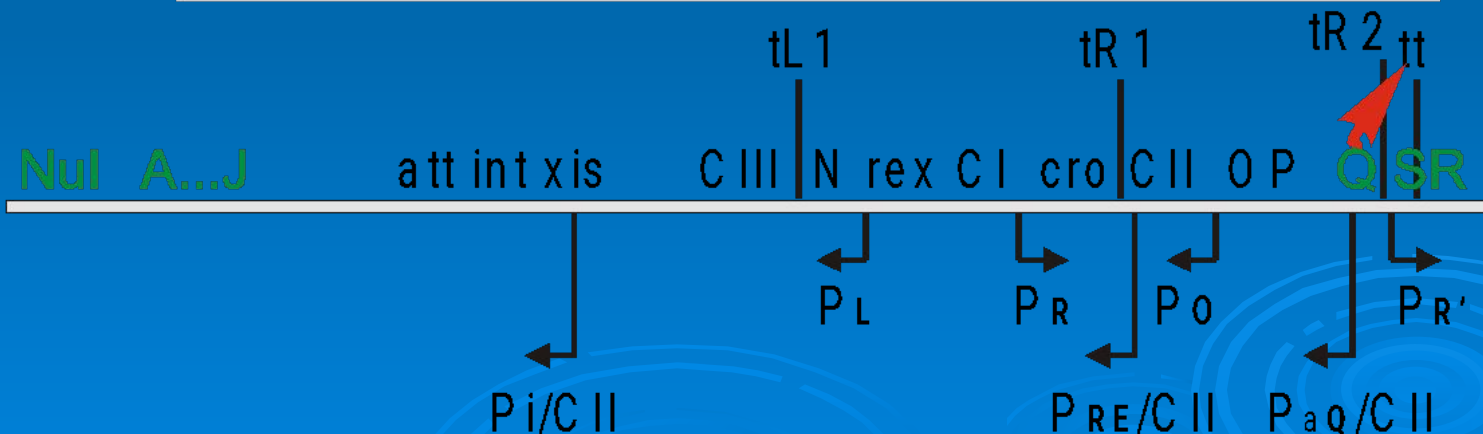
**Активация проф ага:**  
*C I* разрезает ся *ресА*, *cro* выключает *P<sub>RM</sub>*



**Лизис:** синтез репликативных генов

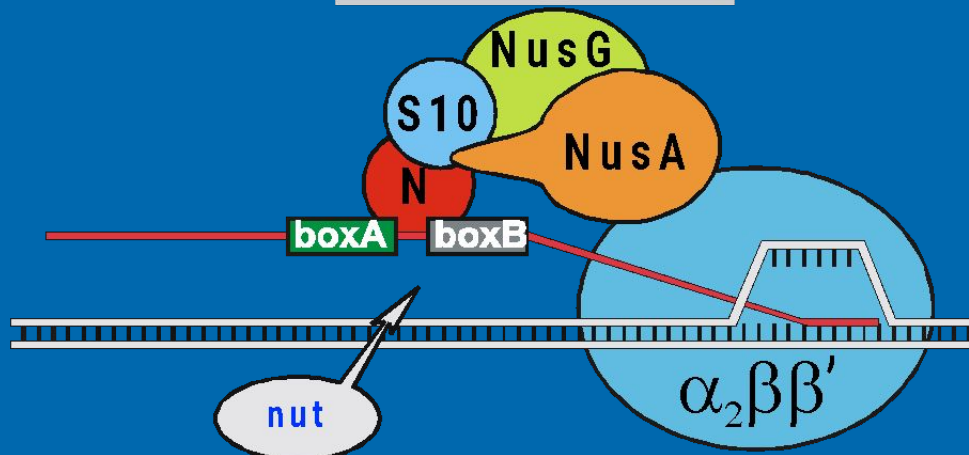


**Лизис:** Q выключает терминатор *op tt*

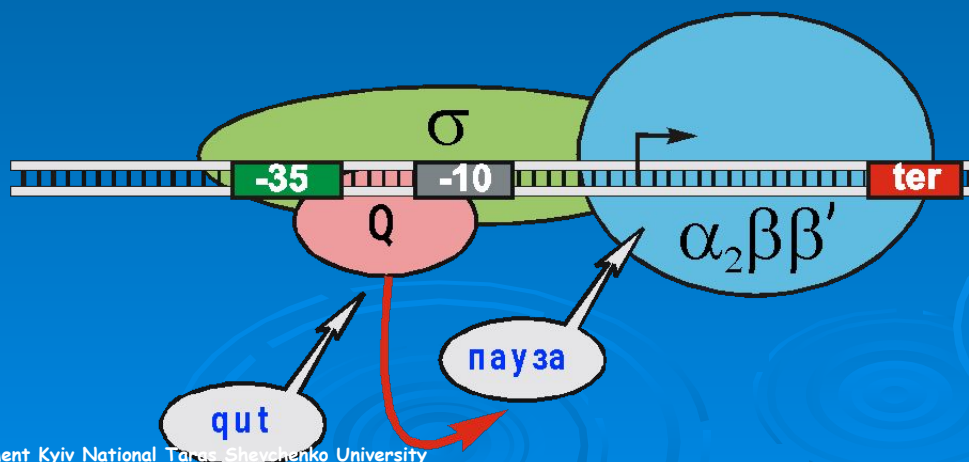


# Механізми антитермінації фага $\lambda$ .

## Антитермінація N

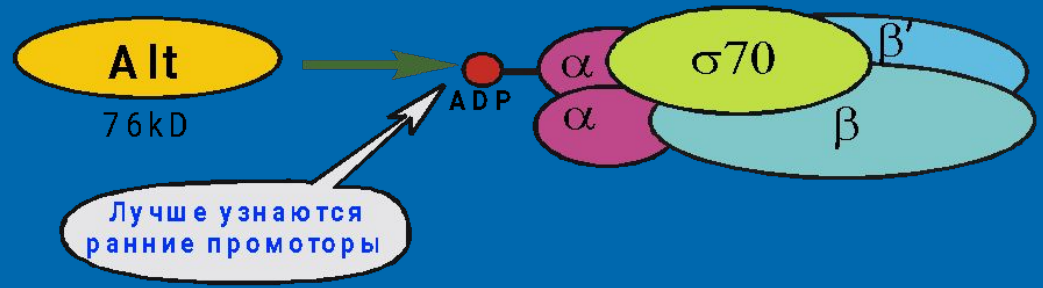


## Антитермінація Q

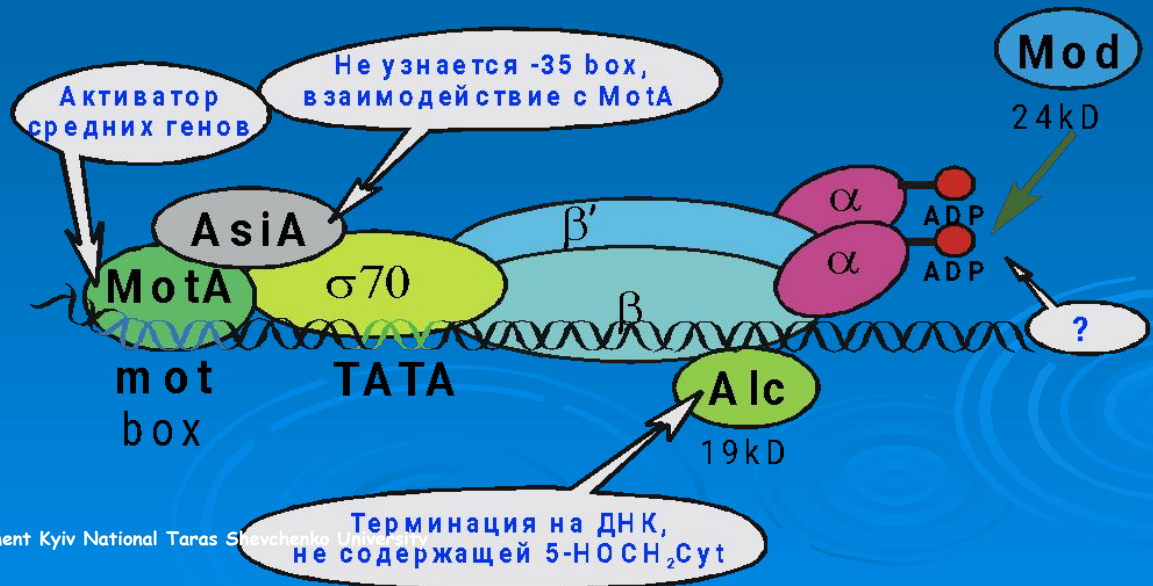


# Активация ранних та средних генов бактериофага T4.

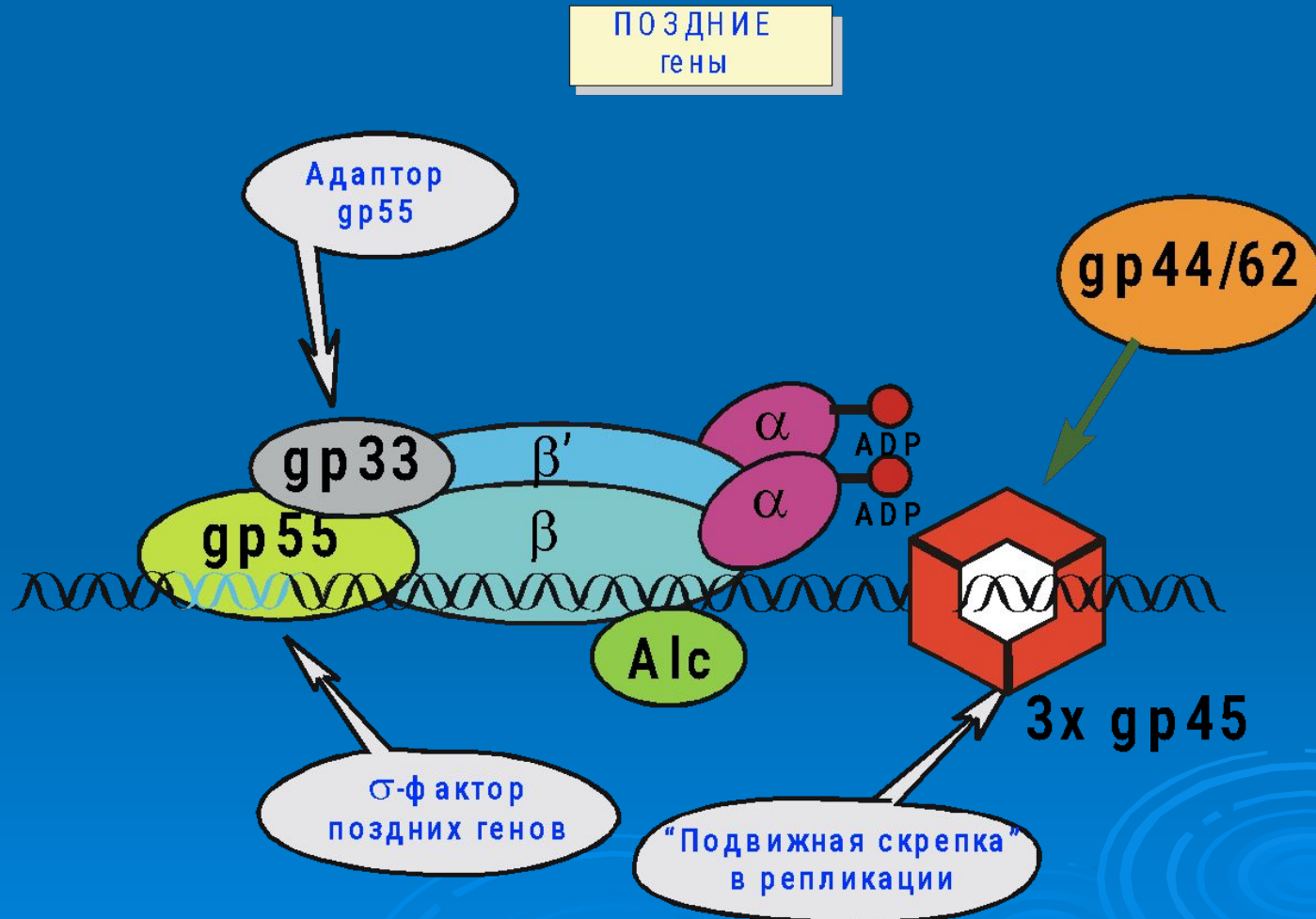
РАННИЕ  
гены



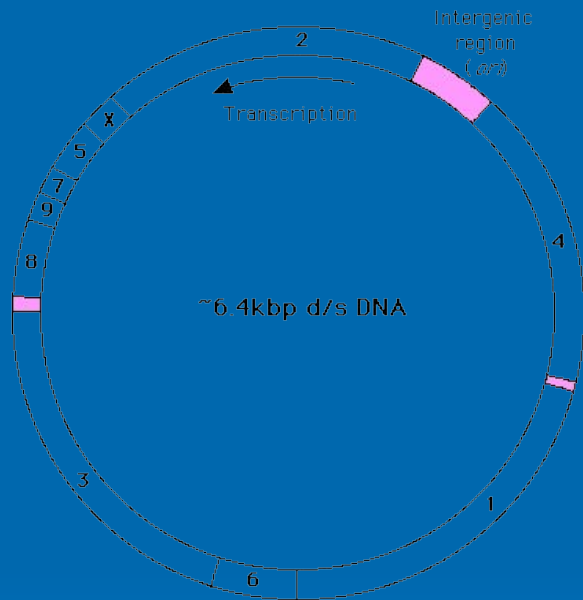
СРЕДНИЕ  
гены



# Активация поздних генов бактериофага T4.



# Геном М13



Gene:	Product Size:	Function:
1	35-40kd	NS membrane protein; few copies/cell; interacts with host <i>fip</i> gene product (thioredoxin); required for assembly
2	46kd	Site- & strand-specific endonuclease/topoisomerase; $\sim 10^3$ copies/cell; required for replication of RF
X (10)	12kd (111aa)	N-terminal fragment of gene 2; $\sim 500$ molecules/cell; required for replication of RF
3	42kd	5 copies at one end of particle; required for correct morphogenesis of unit-length particles; N-terminal domain binds to F pilus of host cell (receptor)
4	49kd	NS membrane protein; few copies/cell; required for assembly
5	10kd (87aa)	Major structural protein <u>during replication</u> ; $\sim 10^5$ copies/cell; controls expression of g2p; binds to DNA; replaced by g8p during assembly; controls switch from RF replication to progeny (+)stand synthesis
6	12kd (112aa)	$\sim 5$ copies at same end of particle to g3p; involved in attachment & morphogenesis
7/9	3.5kd	$\sim 5$ copies at opposite end of particle to g3p/g6p; involved in assembly
8	5kd (50aa)	Major coat protein: $\sim 2700-3000$ copies/virion



- Фаг T7 – синтезується власна ДНКзРНКп (+ продукт гену 2 – інгібітор клітинної ДНКзРНКп)  
! – поліцистронні мРНК ранніх генів розщепляться клітинно РНКазо III до моноцистронних
- Фаг N4 - власна ДНКзРНКп присутня в складі віріону (Мм 320 kDa) – транскрипція ранніх генів; + кодується друга ДНКзРНКп для середніх генів (3 субодиниці)





# Самостійна робота

- Скласти схему транскрипції фагу M13

