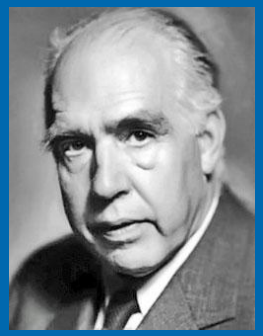
МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ

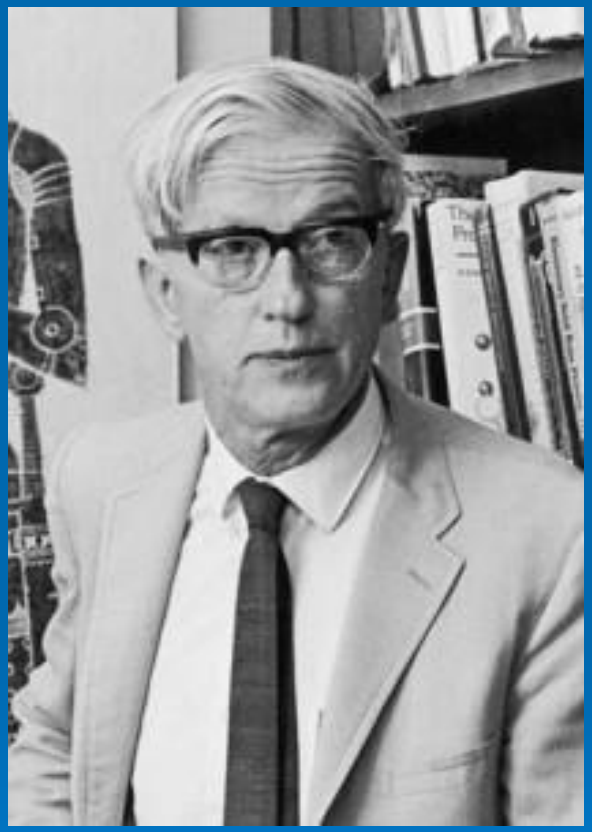
МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ

Valeriy Polischuk Virology Department Kyiv National Taras Shevchenko University

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ

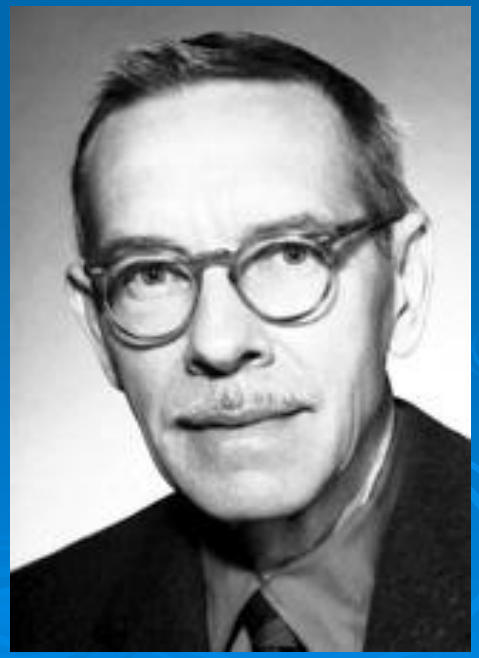


NB

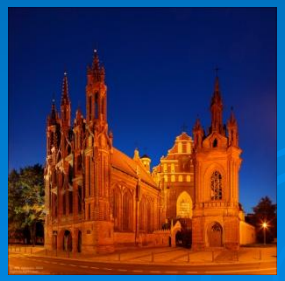


MD

SL



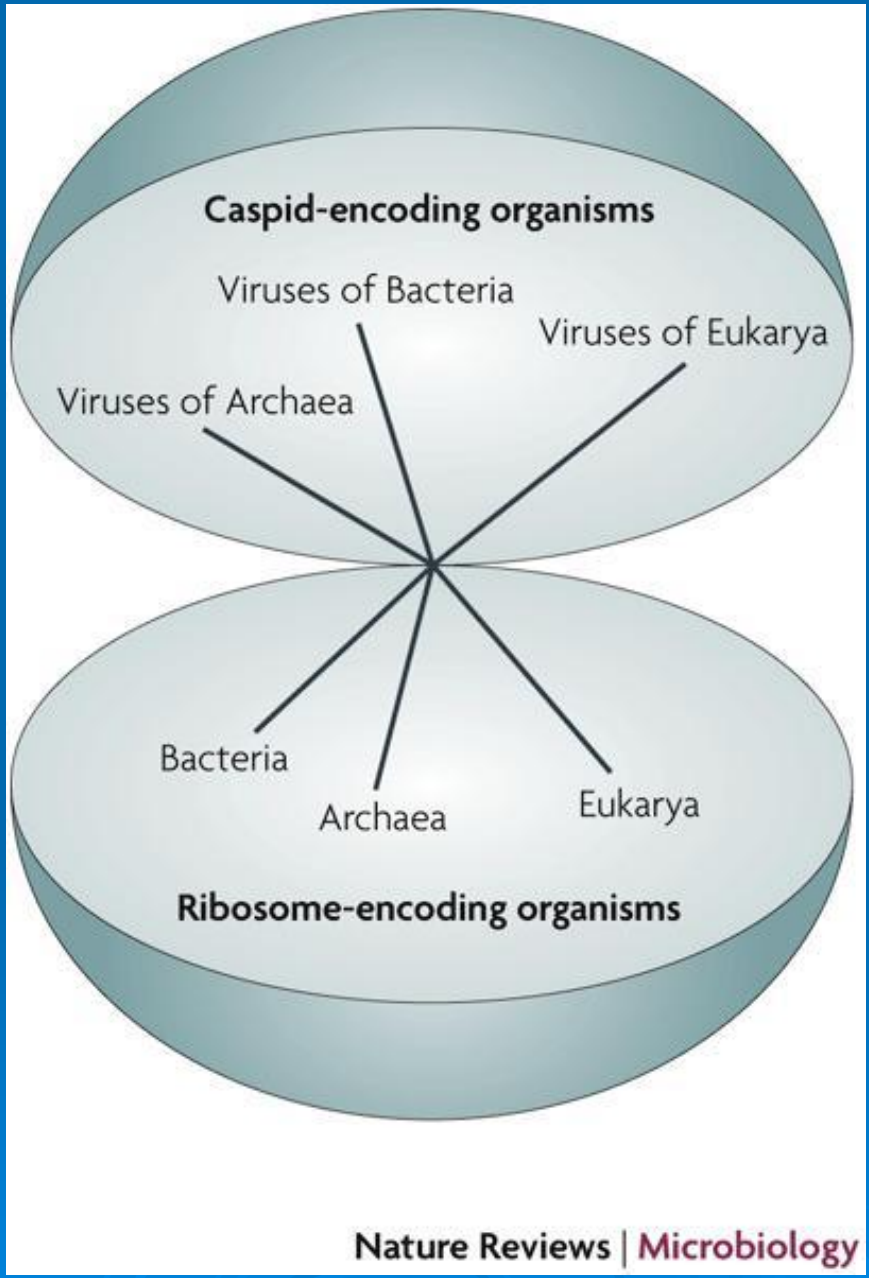
AH



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!!!


Caspid-encoding organisms
Viruses of Bacteria
Viruses of Eukarya
Viruses of Archaea
Bacteria
Archaea
Eukarya
Ribosome-encoding organisms
Nature Reviews | Microbiology

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.

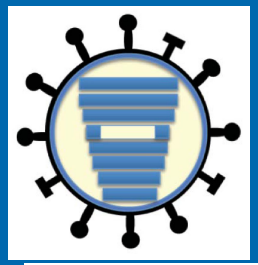
(E. Koonin, 2012; Є. Кунін, 2014)

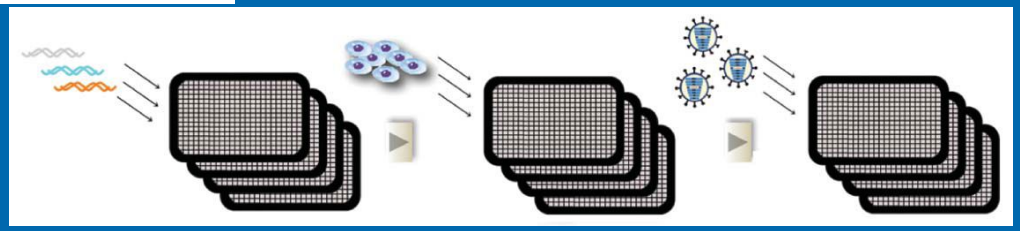
Дві прості речі, які слід завжди пам’ятати щодо вірусів

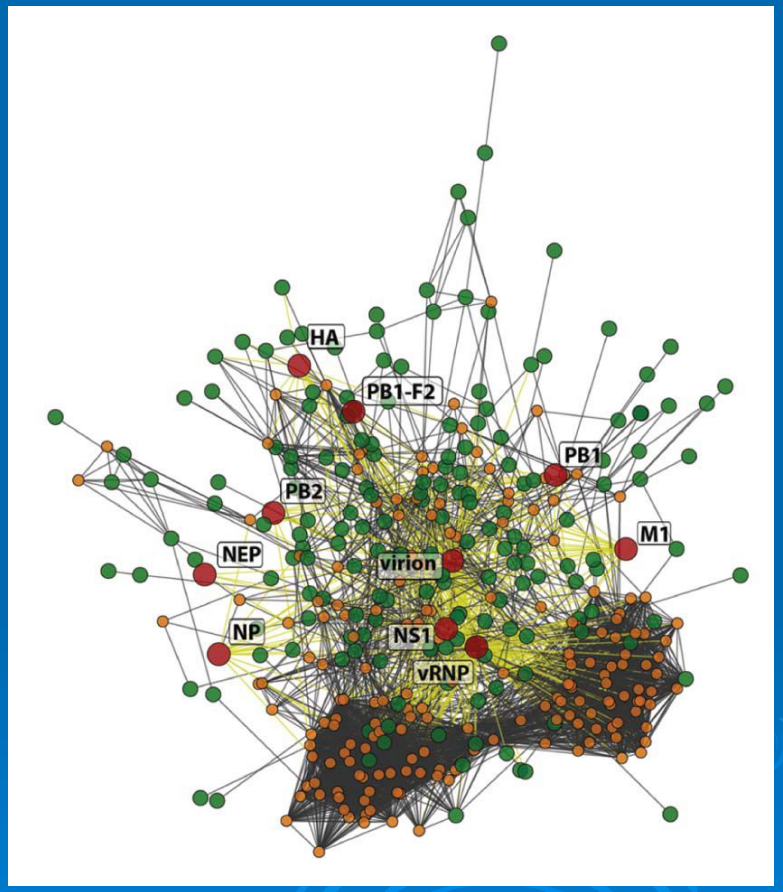
- **1. Можливий будь-який варіант запису генетичної інфомації (РНК, ДНК, 1л, 2л, фрагментовна, амбісенсова etc)**

- **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:

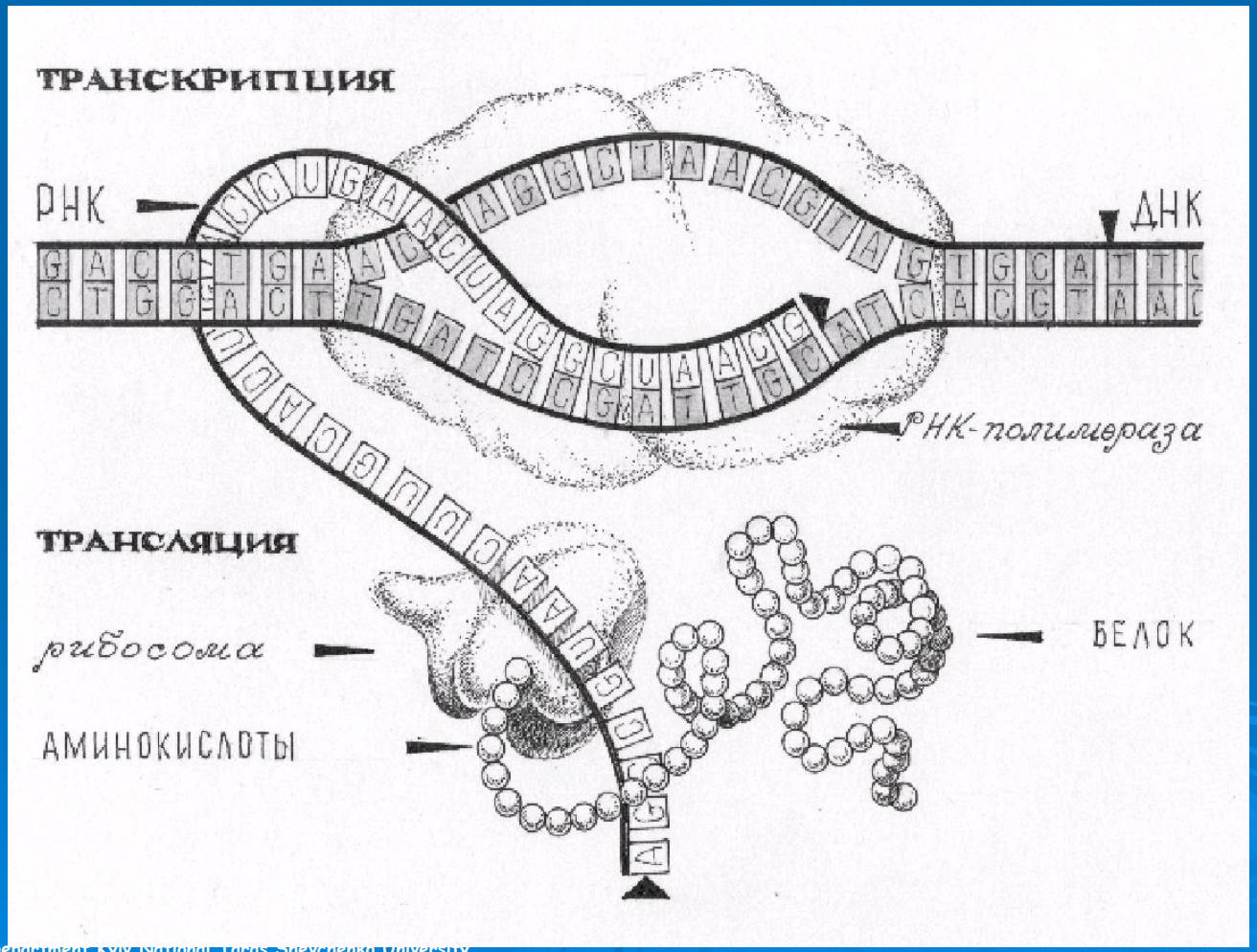
- Механізми транскрипції вірусів та трансляції вірусних білків

- Механізми реплікації вірусів

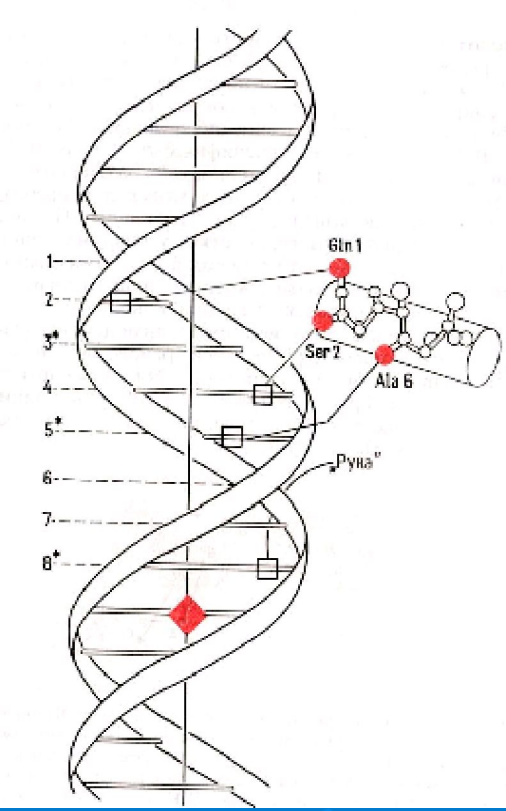
- Молекулярні основи вірус-клітинних взаємодій

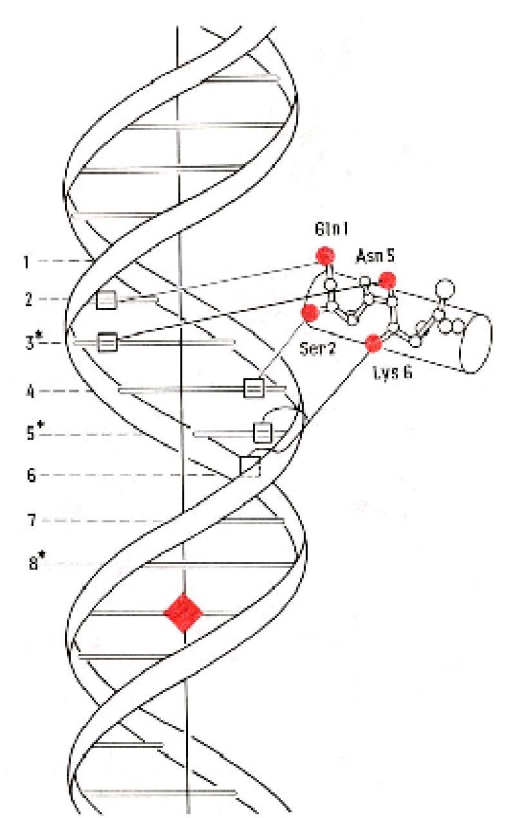
Механізми транскрипції вірусів

Транскрипція і трансляція в прокаріотах



Білок-ДНКові взаємодії

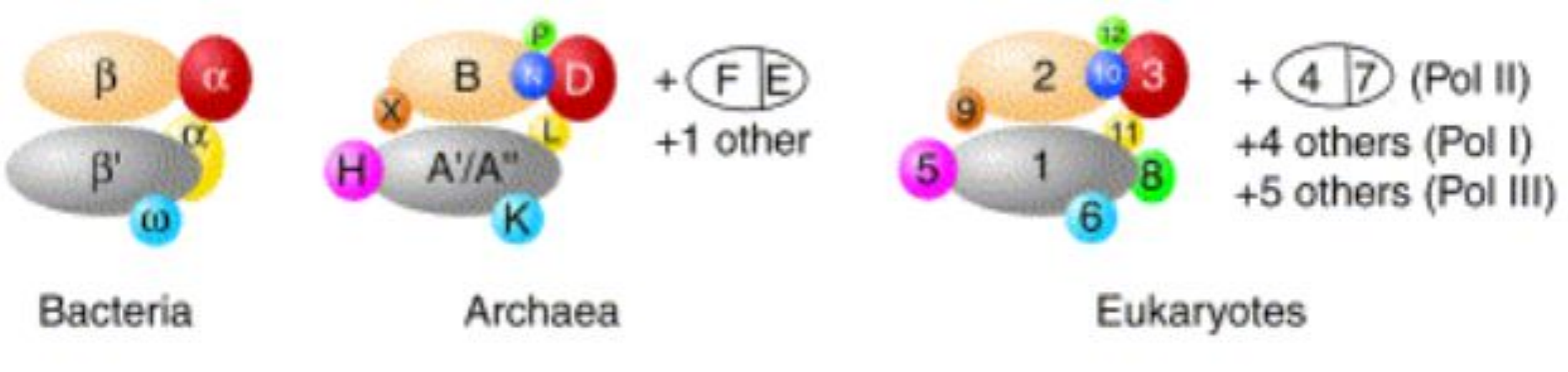




Simple and complex DNA – dependent RNA polymerases

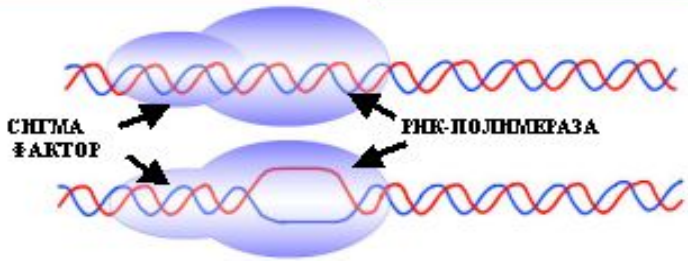
- Viral RNA polymerases (1 subunit)
- Prokaryotic RNA polymerases (4 different subunits)
- Eukaryotic and archeal RNA polymerases (at least 12 subunits)

Viruses

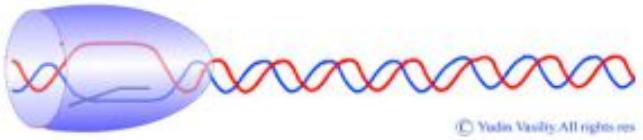


Етапи транскрипції

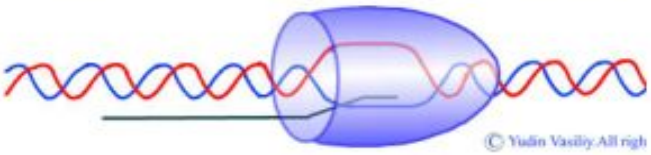
Четыре этапа транскрипции:



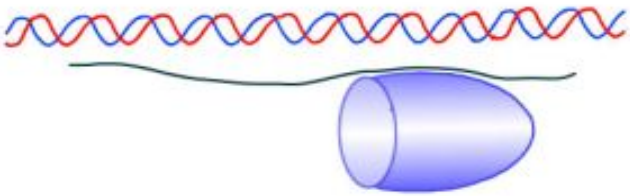
РАСПОЗНАВАНИЕ МАТРИЦЫ:
при участии сигма фактора (у E.coli) РНК полимераза связывается с ДНК и расплетает ДНК в точке инициации транскрипции



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

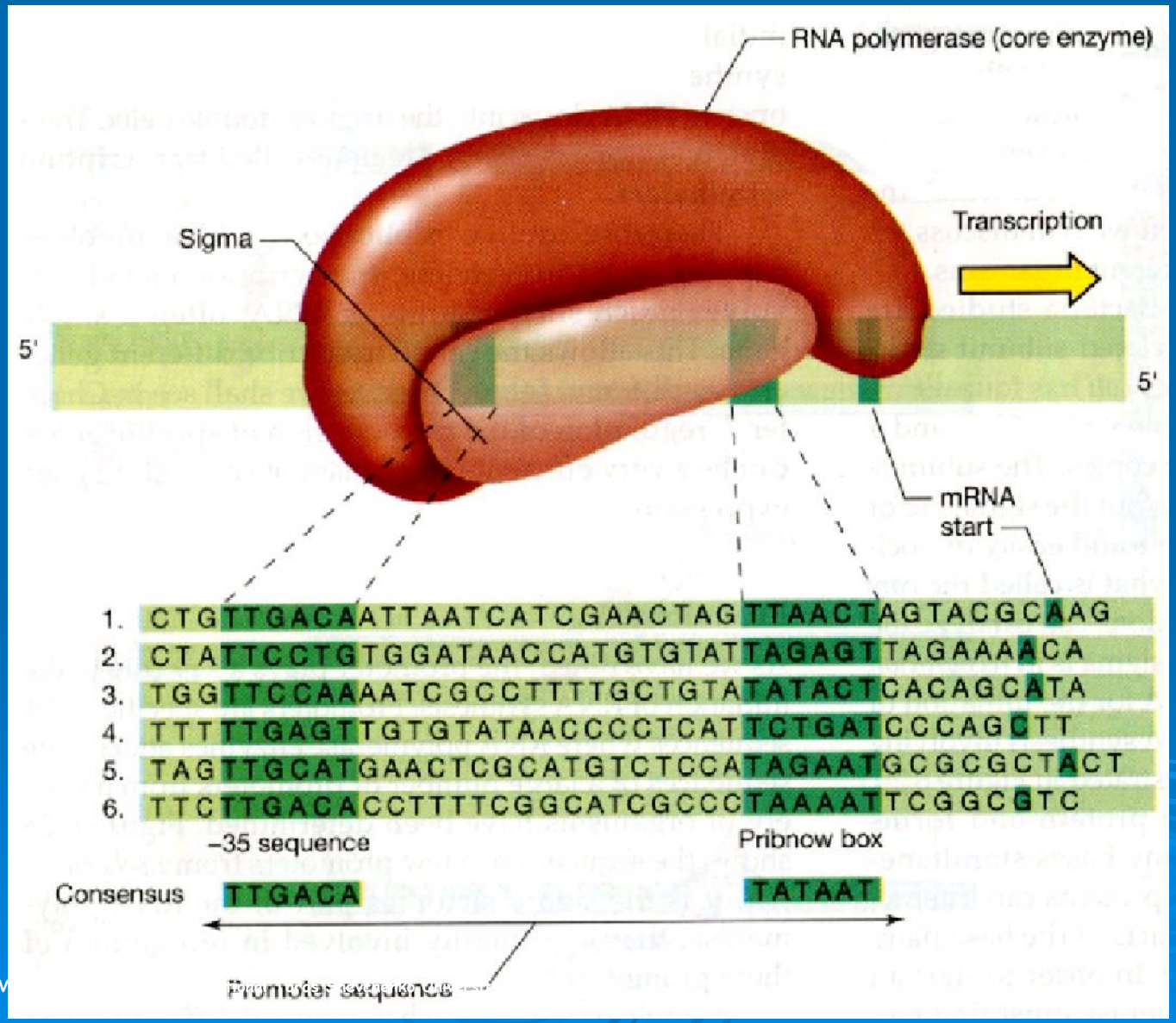


ЭЛОНГАЦИЯ:
движение РНК полимеразы вдоль ДНК, расплетание ДНК, синтез РНК, заплетание ДНК



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

Ініціація транскрипції



Субодиничний склад бактеріальної РНК-полімерази

РНК полимераза

$\alpha_2\beta\beta'\sigma$

Core-фермент

α 40kD

β 155kD

β' 160kD

Факторы инициации

σ

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

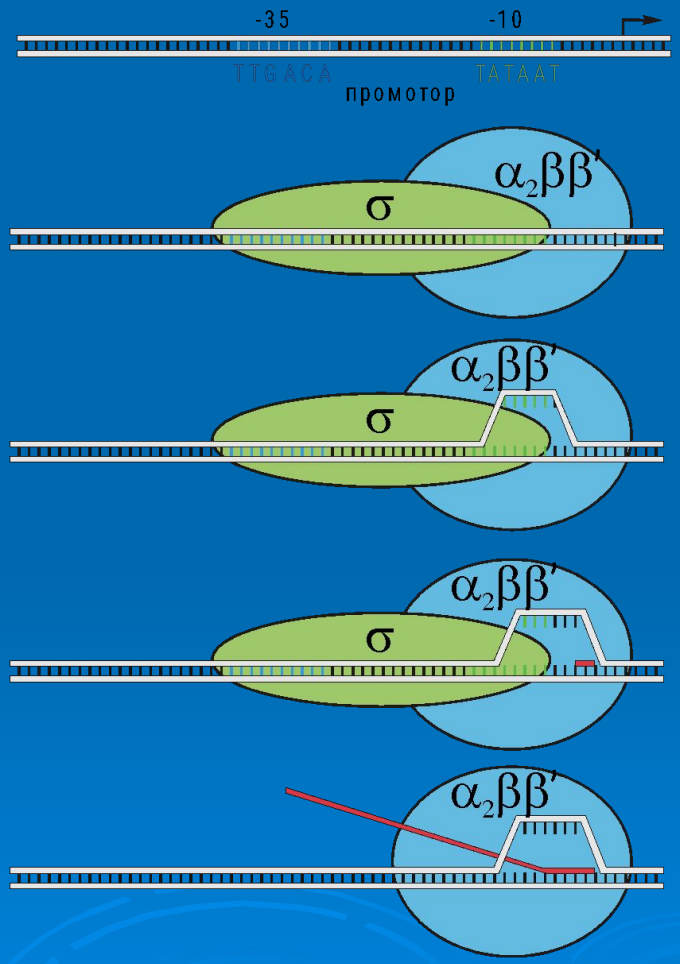
Ассоциированные факторы

NusA	55kD	фактор элонгации, паузы, антитерминация λN, аттенюация, котранскрипционное сворачивание РНК
NusG	21kD	фактор элонгации, супрессирует паузы, антитерминация λN
GreA	18kD	разрезание транскрипта 2-3н. в "арестованных" комплексах
GreB	19kD	разрезание транскрипта до 9н. в "арестованных" комплексах
Mfd (TRCF)	130kD	освобождение РНК полимеразы, блокированной тиминовым димером, активация UvrABC

Фактор терминации

ρ 47 kD, гексамер

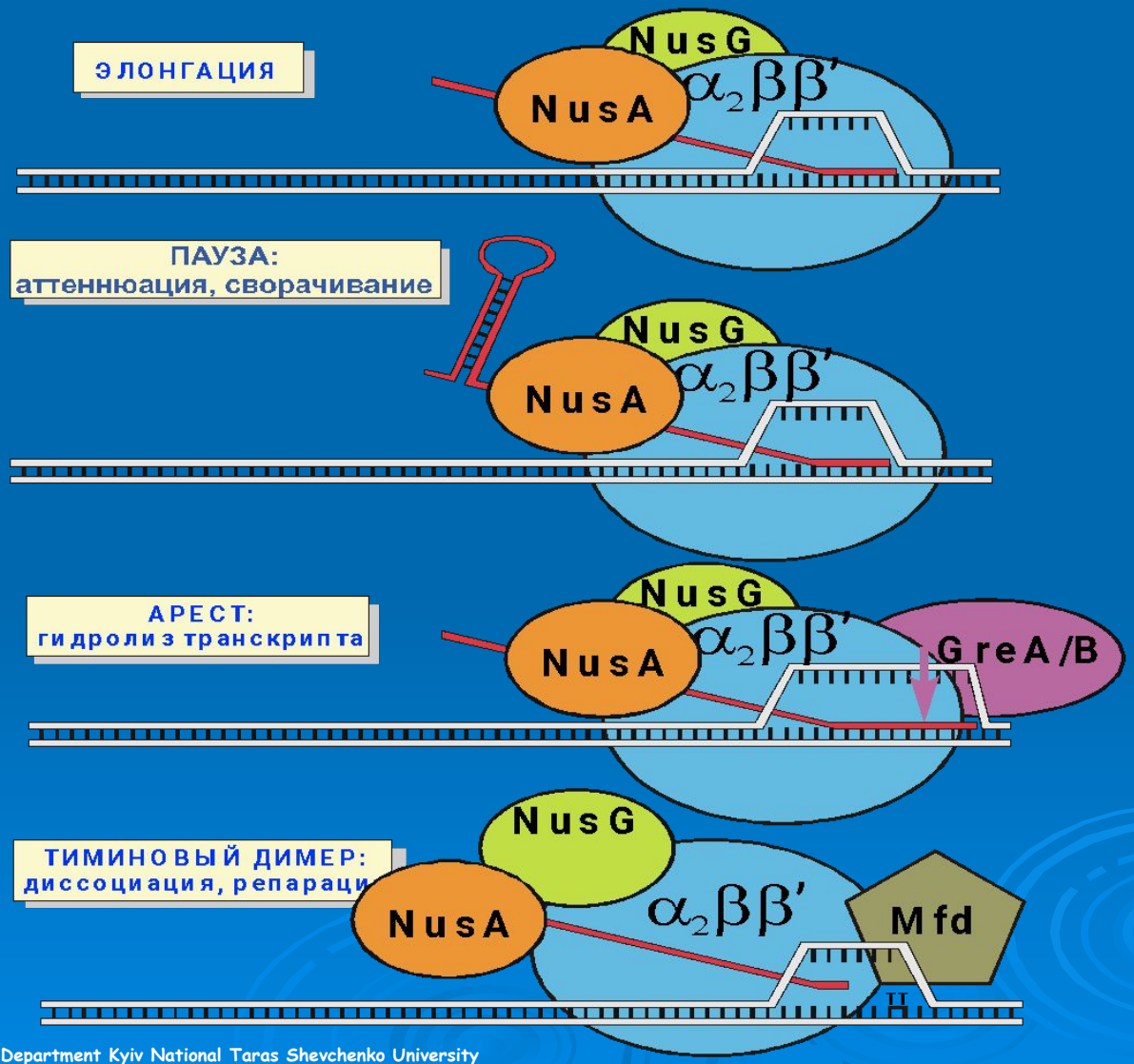
Послідовність подій ініціації транскрипції



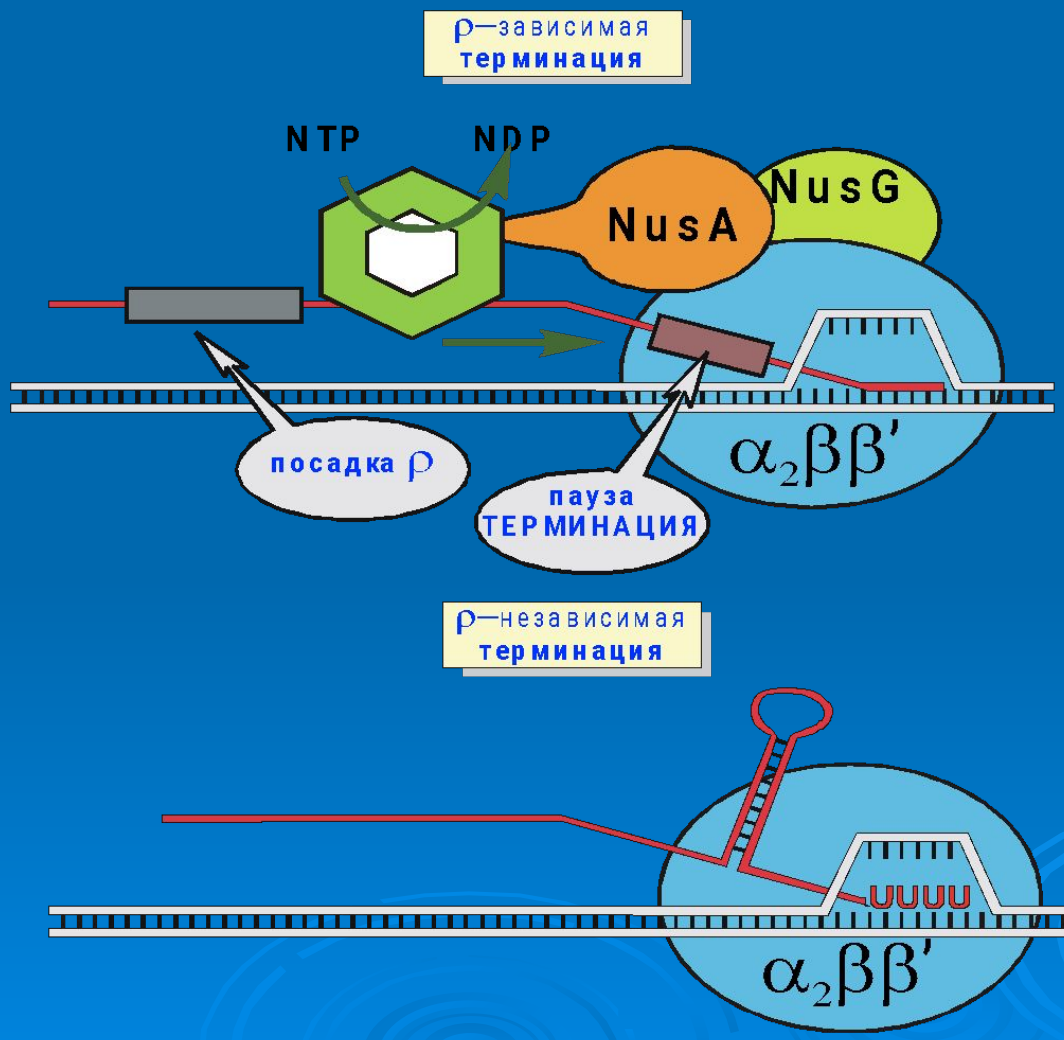
Промоторні області, що пізнаються різними -факторами

σ	-35	-10
E.coli σ70	TTGACA	TATAAT
E.coli σ32	TCTC-CCCTTGAA	CCCCAT-TA
E.coli σ54	(-24)CTGG-A	(-12)TTGCA
B. sub σA	TTGACA	TATAAT
B. sub σB	AGGTTTAA	GGGTAT
B. sub σD	CTAAA	CCGATAT
B. sub σE	ATATT	ATACA
B. sub σK	AC	CATA---T
B. sub σH	CAGGA	GAATT—T
SPO1σ^{gp28}	AGGAGA	TTT-TTT
T4σ^{gp55}	-	TATAAATA

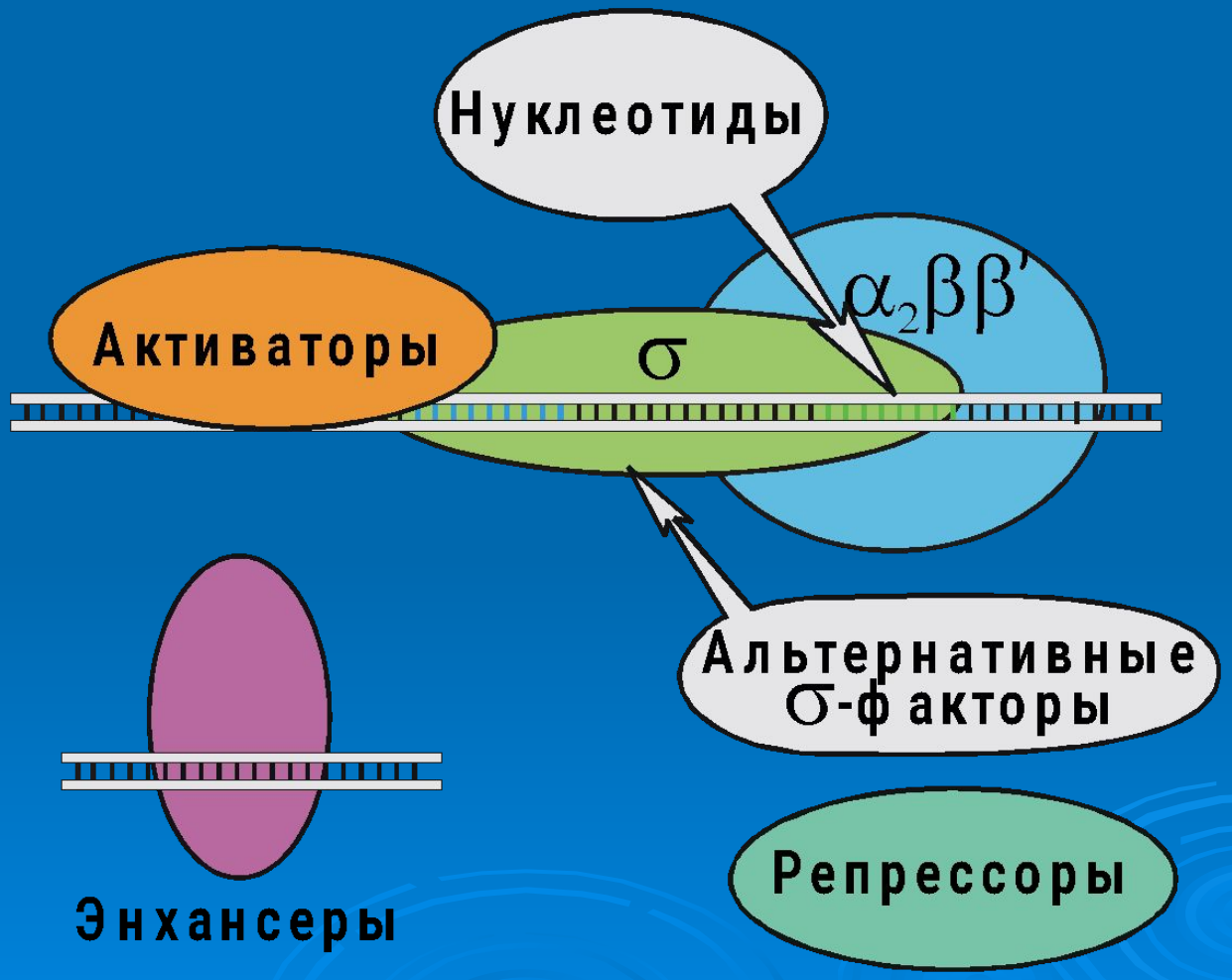
Елонгація транскрипції бактеріальною РНК-полимеразою



Альтернативні механізми термінації транскрипції прокаріот

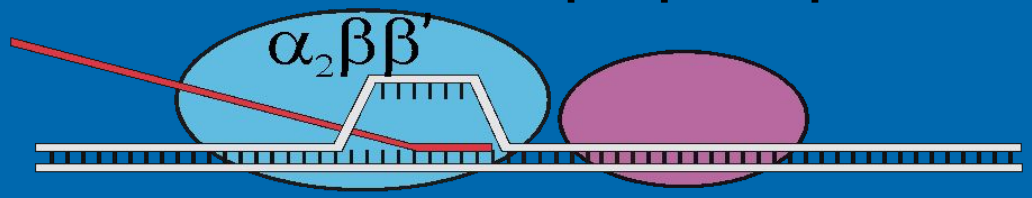


Регуляція транскрипції на стадії ініціації.

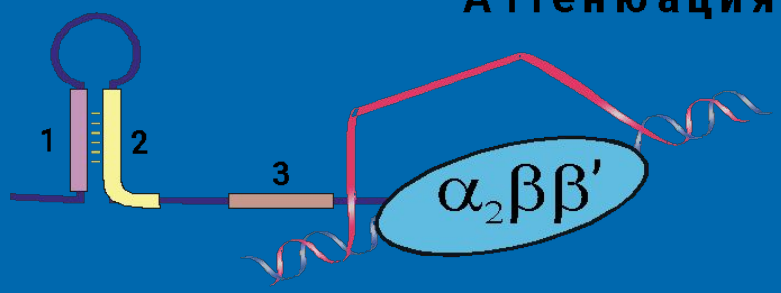


Регуляція транскрипції на стадії елонгації і термінації

Связывание репрессора

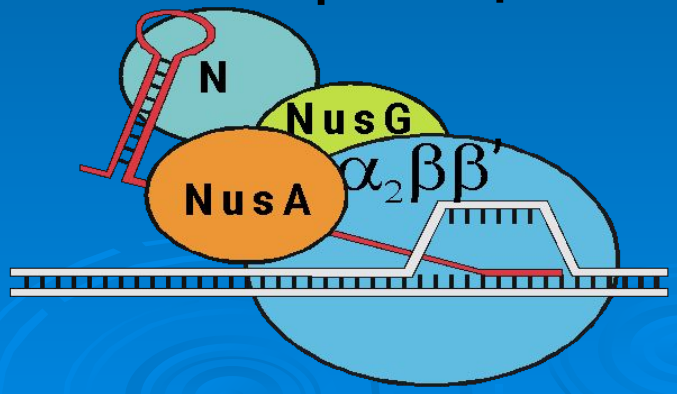


Аттенюация

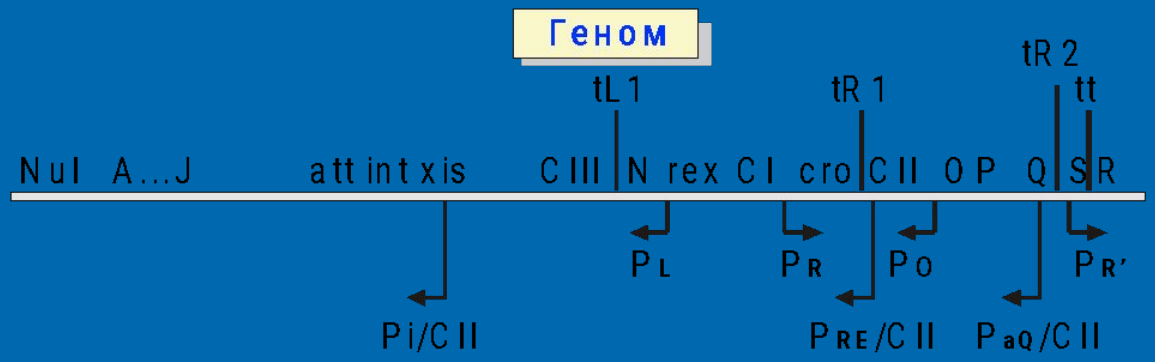


1. Скорость трансляции
2. Скорость транскрипции
3. Связывание белка

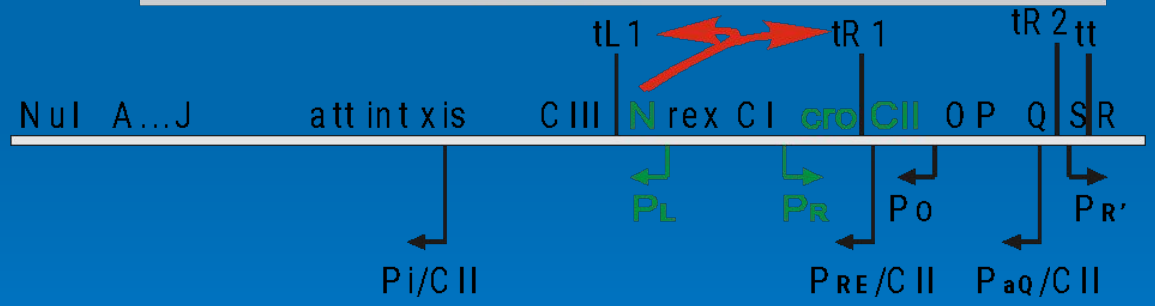
Антитерминация



Геном фагу лямбда



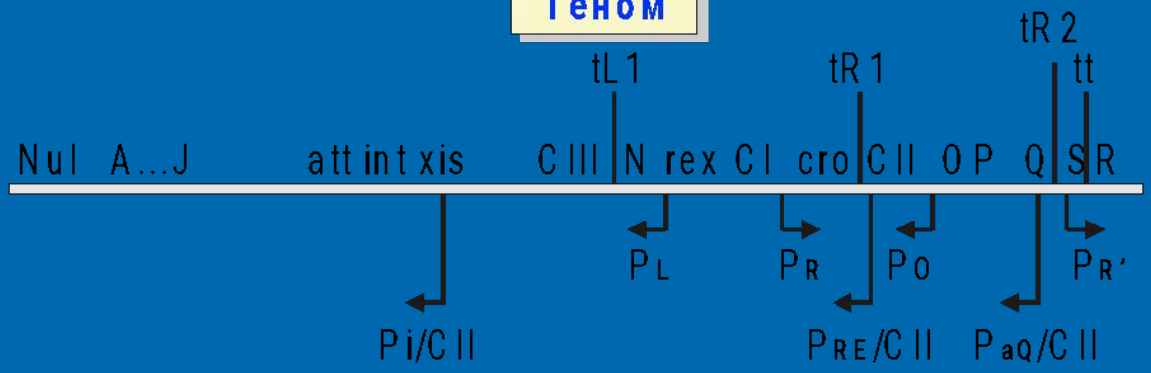
Ранние гены: *N выключает терминаторы tL1 и tR1*



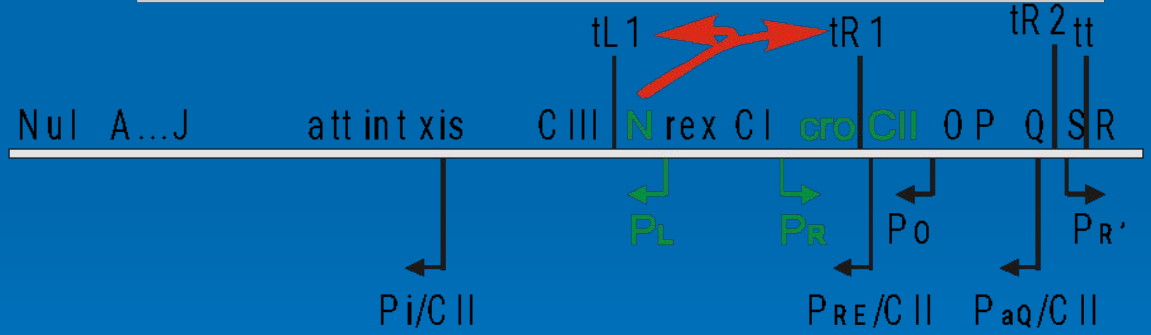
Отсроченно ранние гены: *Принятие решения*

Голод → cAMP → HflA → CII → Лизогения

Геном



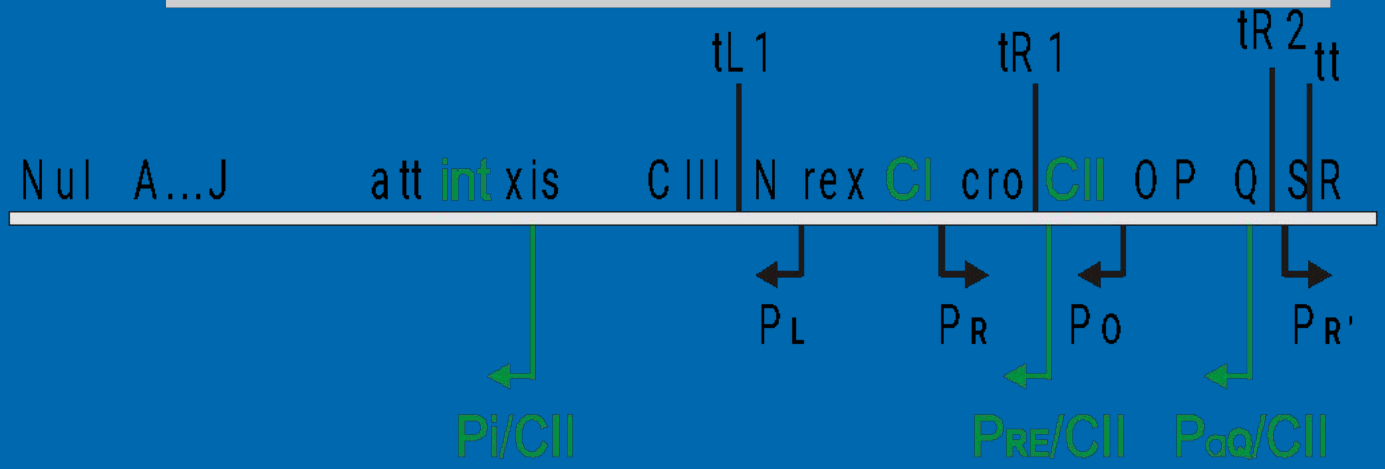
Ранние гены: *N выключает терминаторы tL1 и tR1*



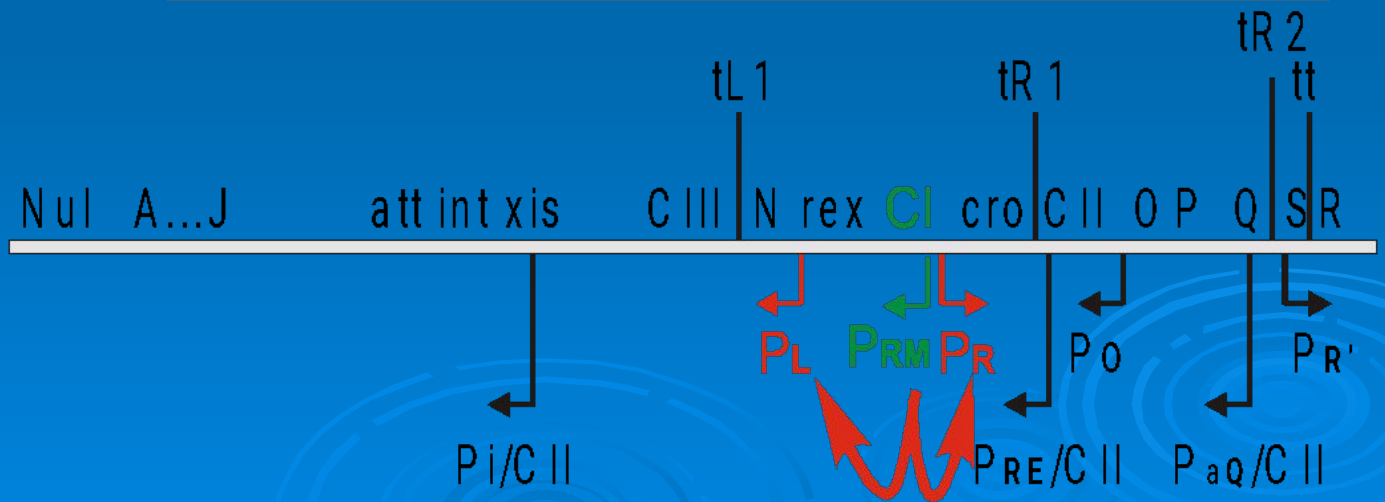
Отсроченно ранние гены: *Принятие решения*

Голод → cAMP → HflA → CII → Лизогения

Лизогения: CII включает int, CI и антисенс Q

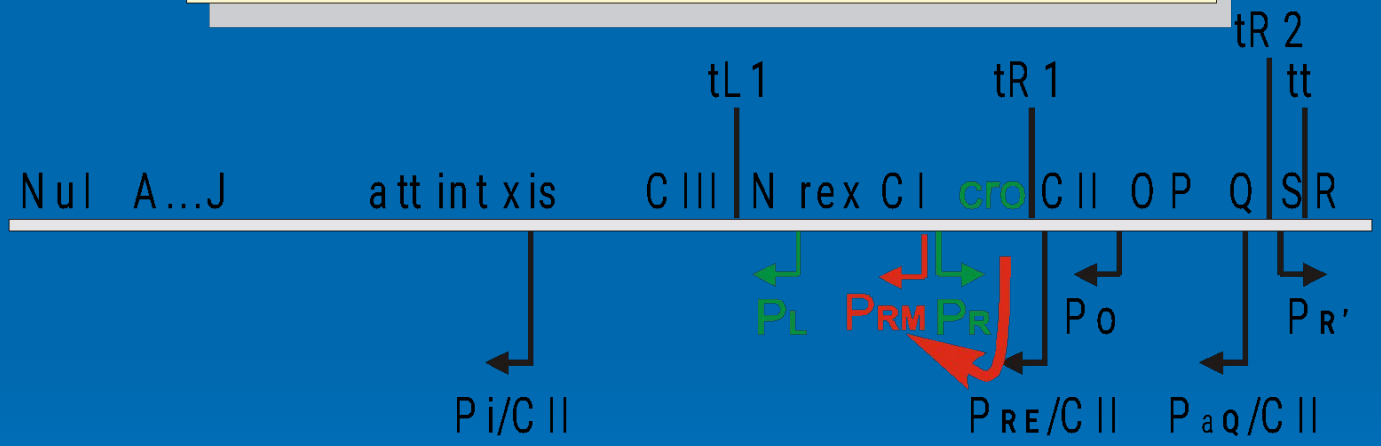


Лизогения: CI выключает все, кроме PRM

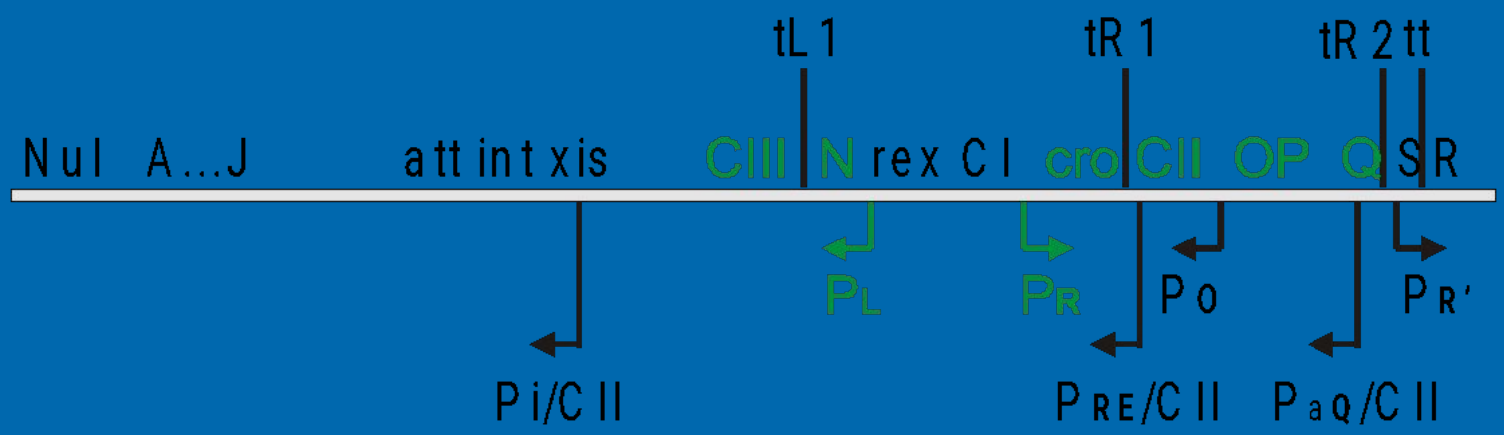


Активация профага:

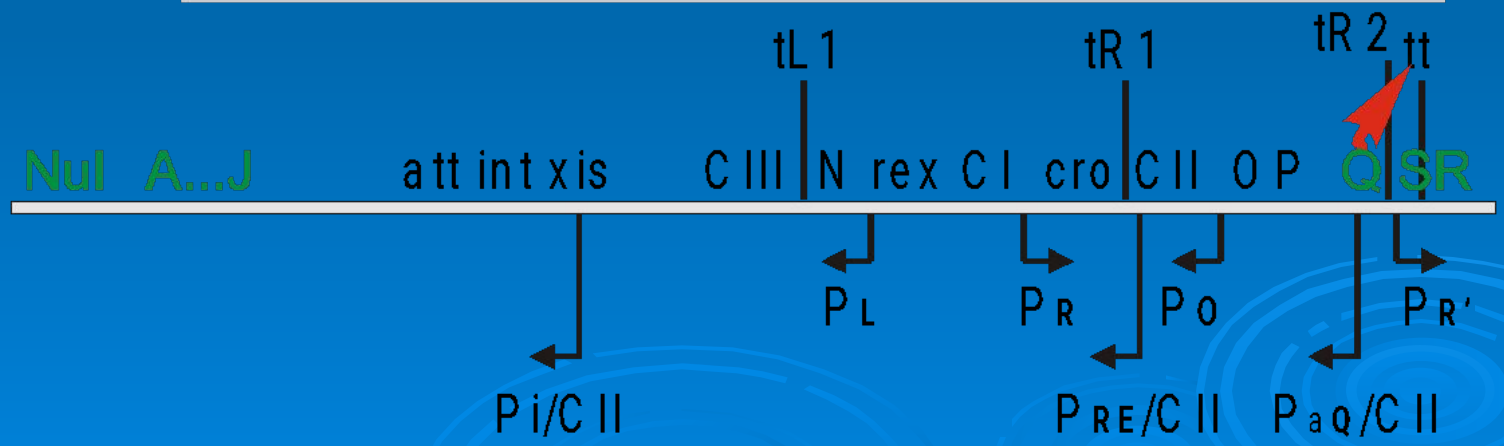
CI разрезается recA, cro выключает P_{RM}



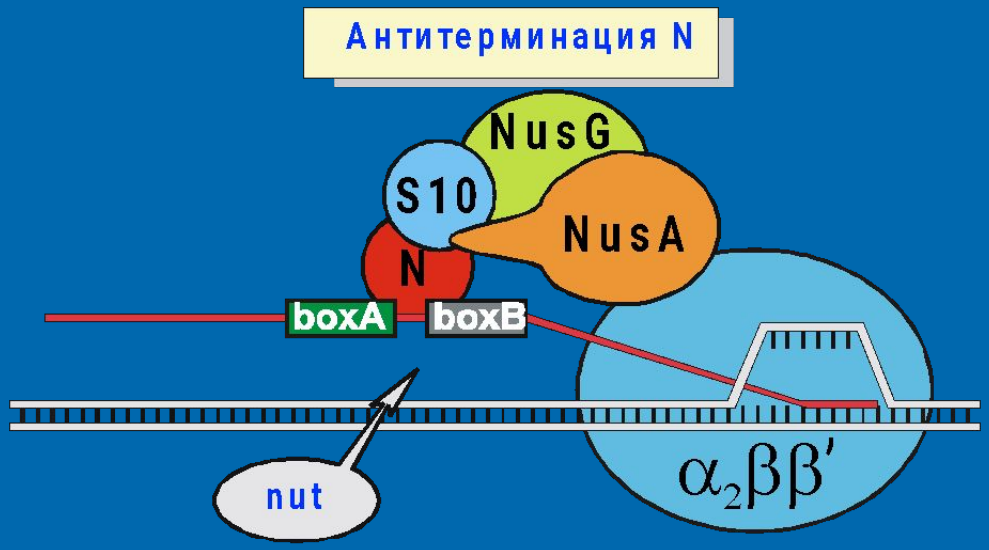
Лизис: синтез репликативных генов

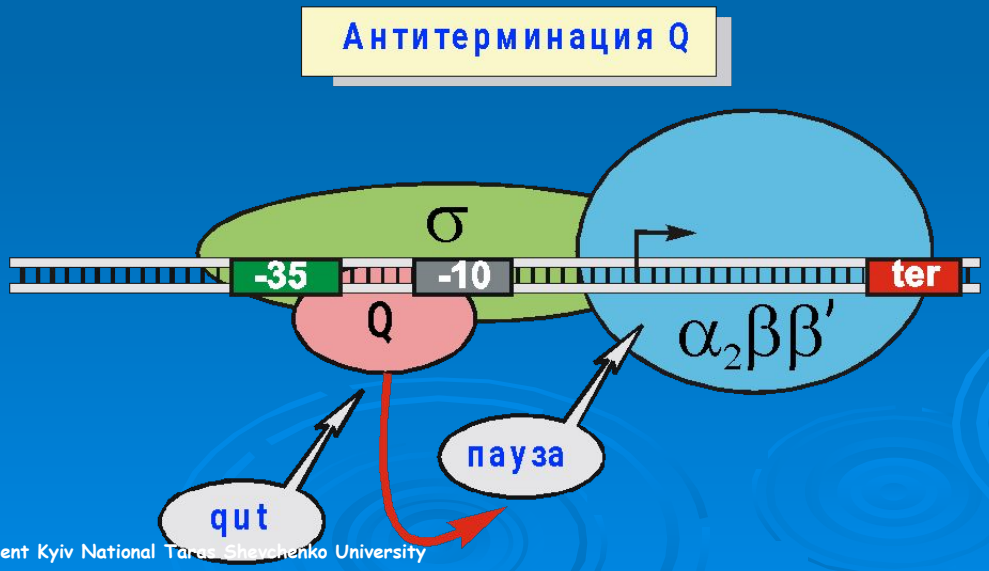


Лизис: Q выключает терминатор tt

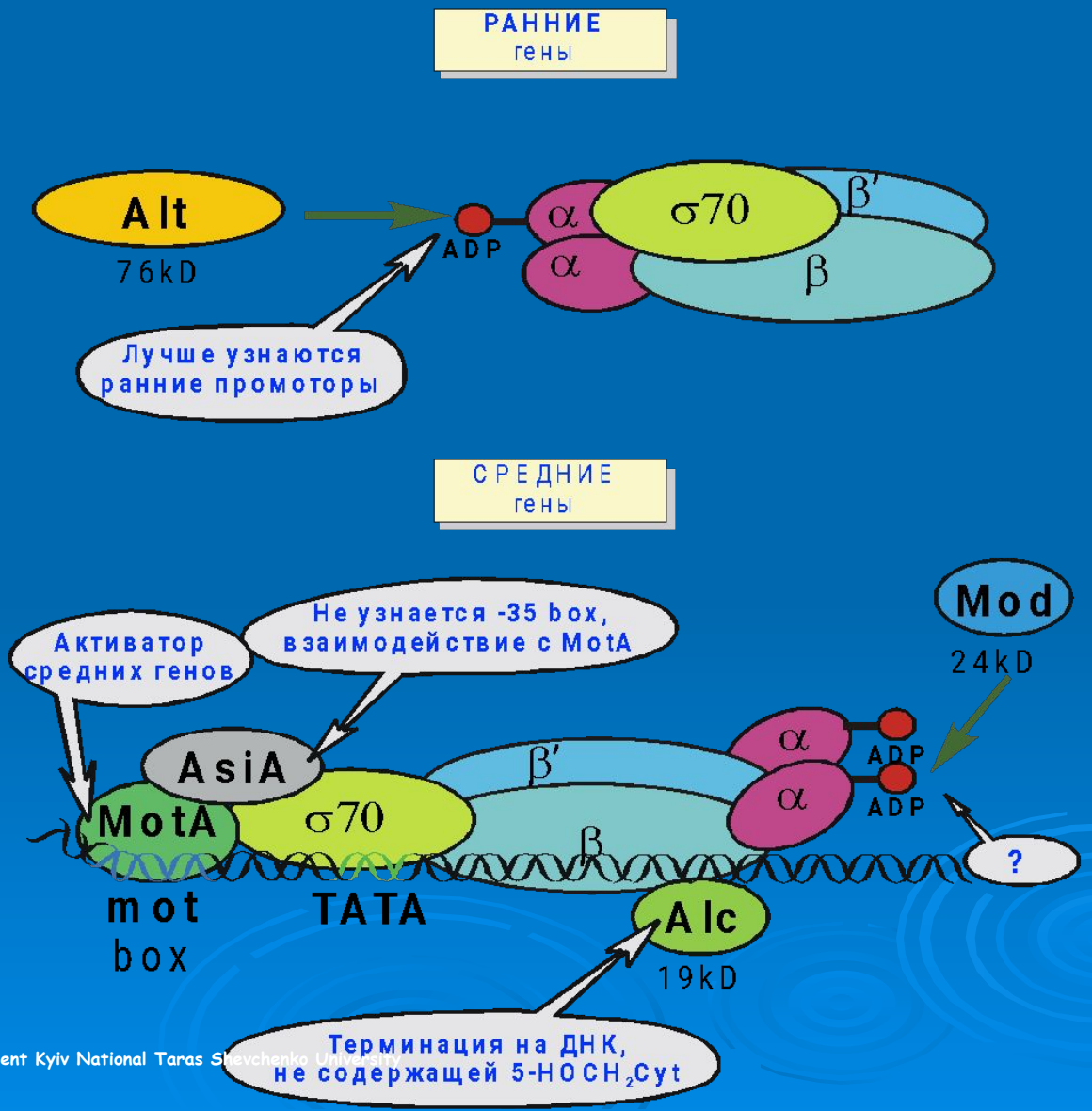


Механізми антитермінації фага λ.

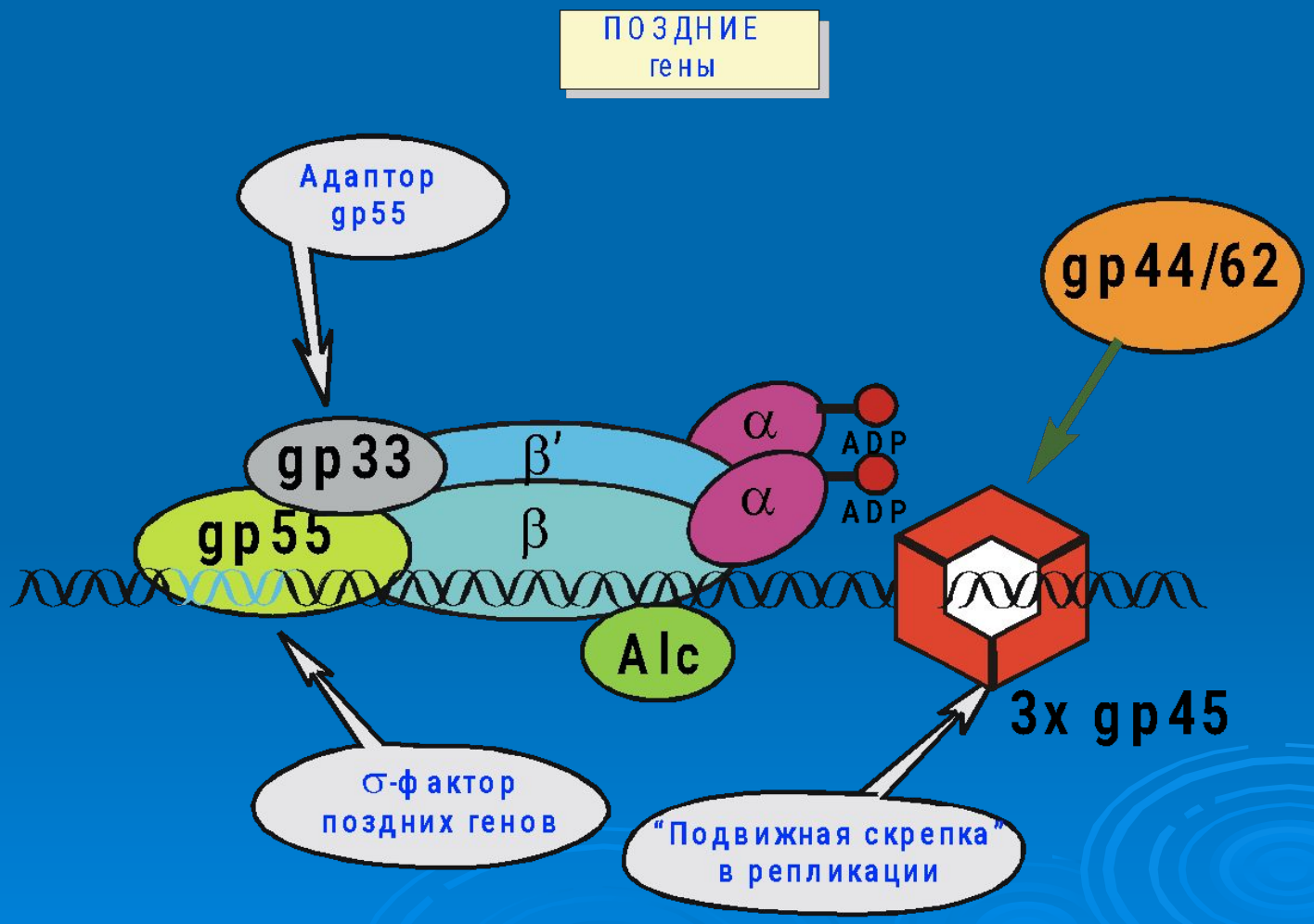




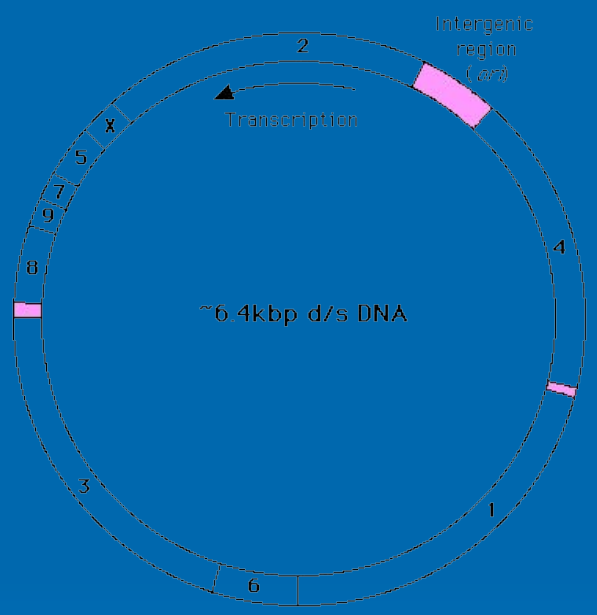
Активація ранніх та середніх генів бактеріофагу Т4.



Активація пізніх генів бактеріофагу Т4.



Геном M13



Gene:	Product Size:	Function:
1	35-40kd	NS membrane protein; few copies/cell; interacts with host *fip* gene product (thioredoxin); required for assembly
2	46kd	Site- & strand-specific endonuclease/topoisomerase; ~10^3 copies/cell; required for replication of RF
X (10)	12kd (111aa)	N-terminal fragment of gene 2; ~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>; ~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)	~5 copies at same end of particle to g3p; involved in attachment & morphogenesis
7/9	3.5kd	~5 copies at opposite end of particle to g3p/g6p; involved in assembly
8	5kd (50aa)	Major coat protein: ~2700-3000 copies/virion

- Фаг Т7 – синтезується власна ДНКзРНКп (+ прдукт 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 М13