

РЕПЛІКАЦІЯ ВІРУСІВ У КЛІТИНІ ХАЗЯЇНА. 2.

Професор,
доктор біологічних наук
Олександр Ходосовцев

Херсон - 2020

План лекції

1. Реплікація геномів вірусів, які містять ДНК
2. Реплікація геномів вірусів, які містять РНК

1. Реплікація геномів вірусів,
які містять ДНК

Реплікація геномів ДНК-геномних вірусів (класи 1 і 2 за системою Д. Балтімора)

Усі відомі на сьогодні ДНК-полімерази здатні проводити синтез ДНК **ЛИШЕ** у напрямі $5' \rightarrow 3'$.

Синтез дочірнього ланцюга у напрямі $5' \rightarrow 3'$ відбувається безперервно на одному батьківському ланцюзі – **лідуючий ланцюгом**.

В той же час на протилежному ланцюзі (**ланцюг, що запізнюється**), синтез ДНК відбувається також у напрямі $5' \rightarrow 3'$, але переривчасто.

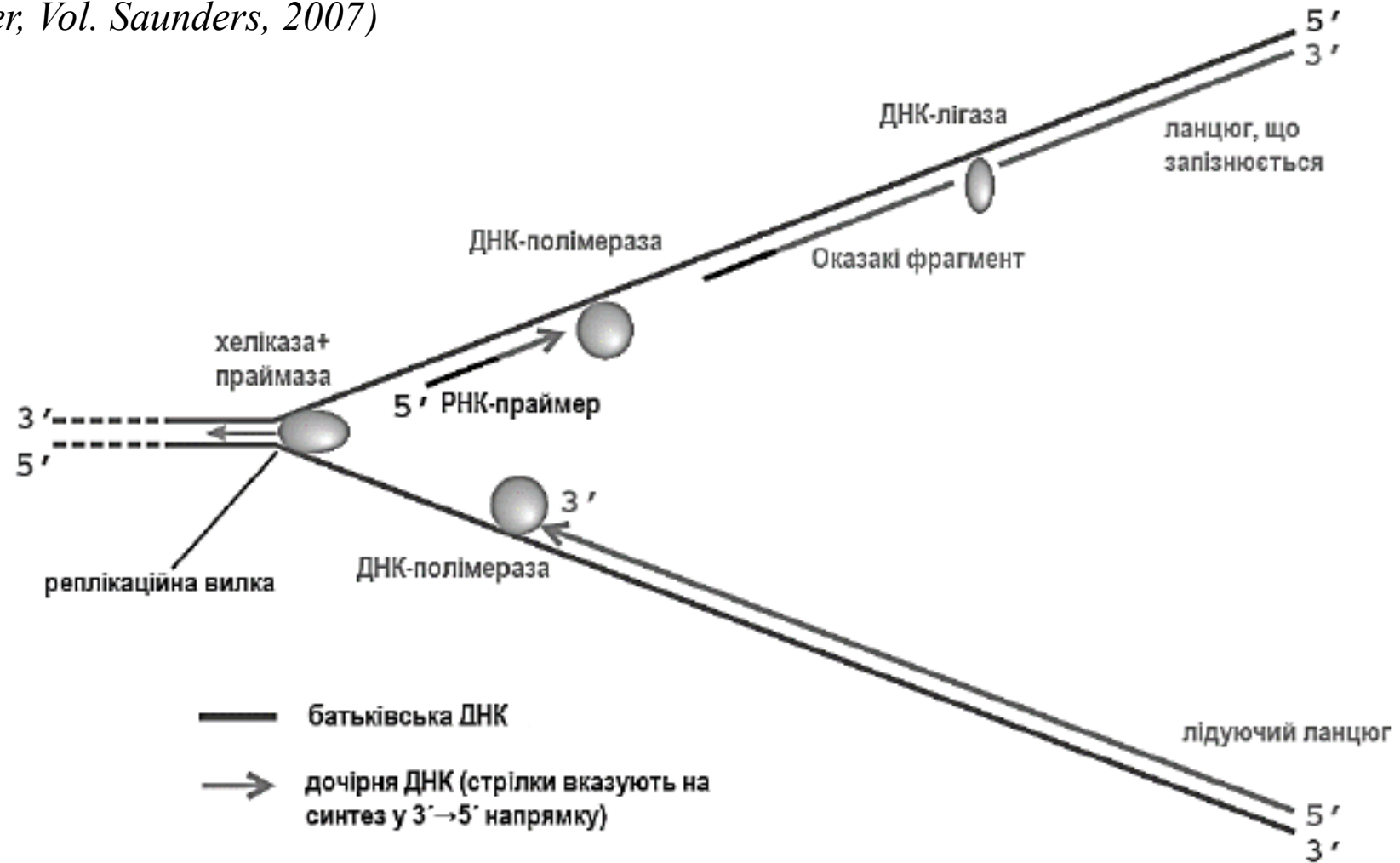
У 1968 р. відкрила механізм реплікації двох ланцюгів ДНК у бактеріофага (ДНК-вірус) в клітинах *Escherichia coli*.

Фрагменти Оказакі.



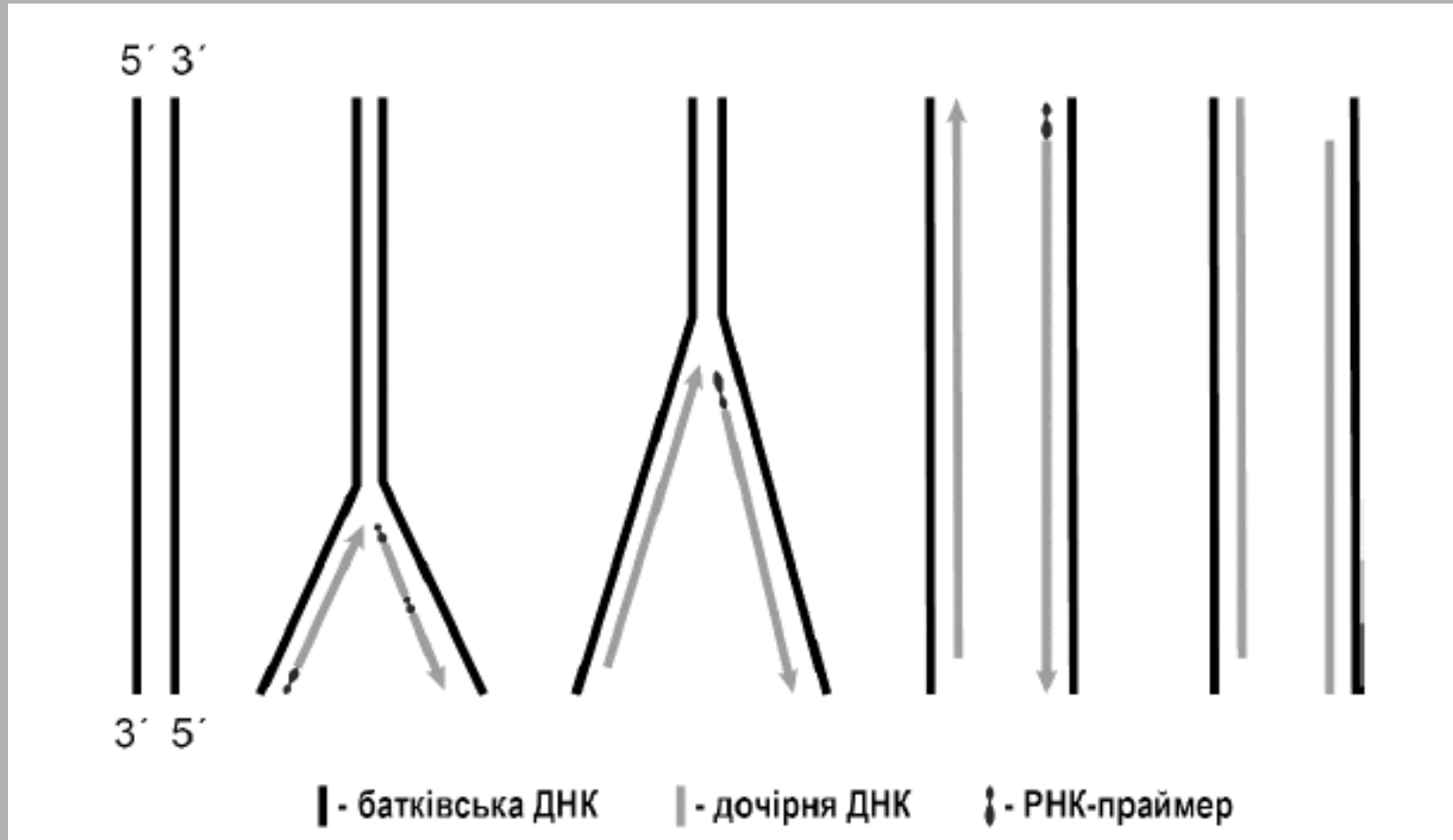
Tsuneko Okazaki (нар. 1933 р.)

(за J. Carter, Vol. Saunders, 2007)



Для ініціації синтезу використовується РНК-праймер, сшивка – ДНК-лігазами

Укорочення дочірніх ланцюгів ДНК на 5'-кінцях підчас реплікації лінійних молекул ДНК.



Існує спеціальний фермент – **теломераза**, який за допомогою власної РНК-матриці добудовує теломерні повтори і подовжує теломери в кожному циклі ділення.

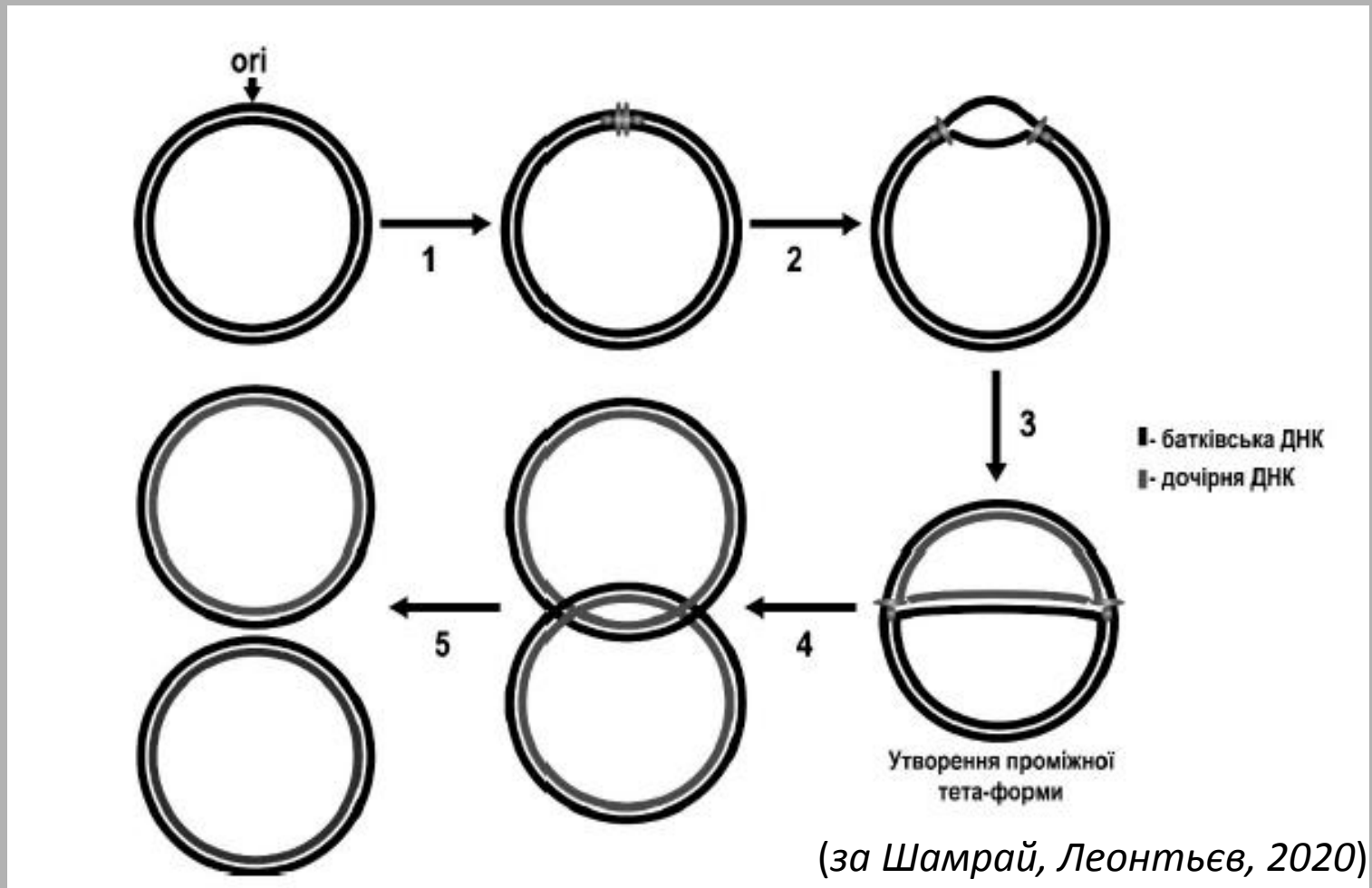


Схема реплікації кільцевої ДНК через тета-форму. ori – точка початку реплікації. 1 – розпізнавання реплікаційним комплексом точки початку реплікації; 2 – ініціація реплікації; 3, 4 – елонгація; 5 – розчеплення кілець.

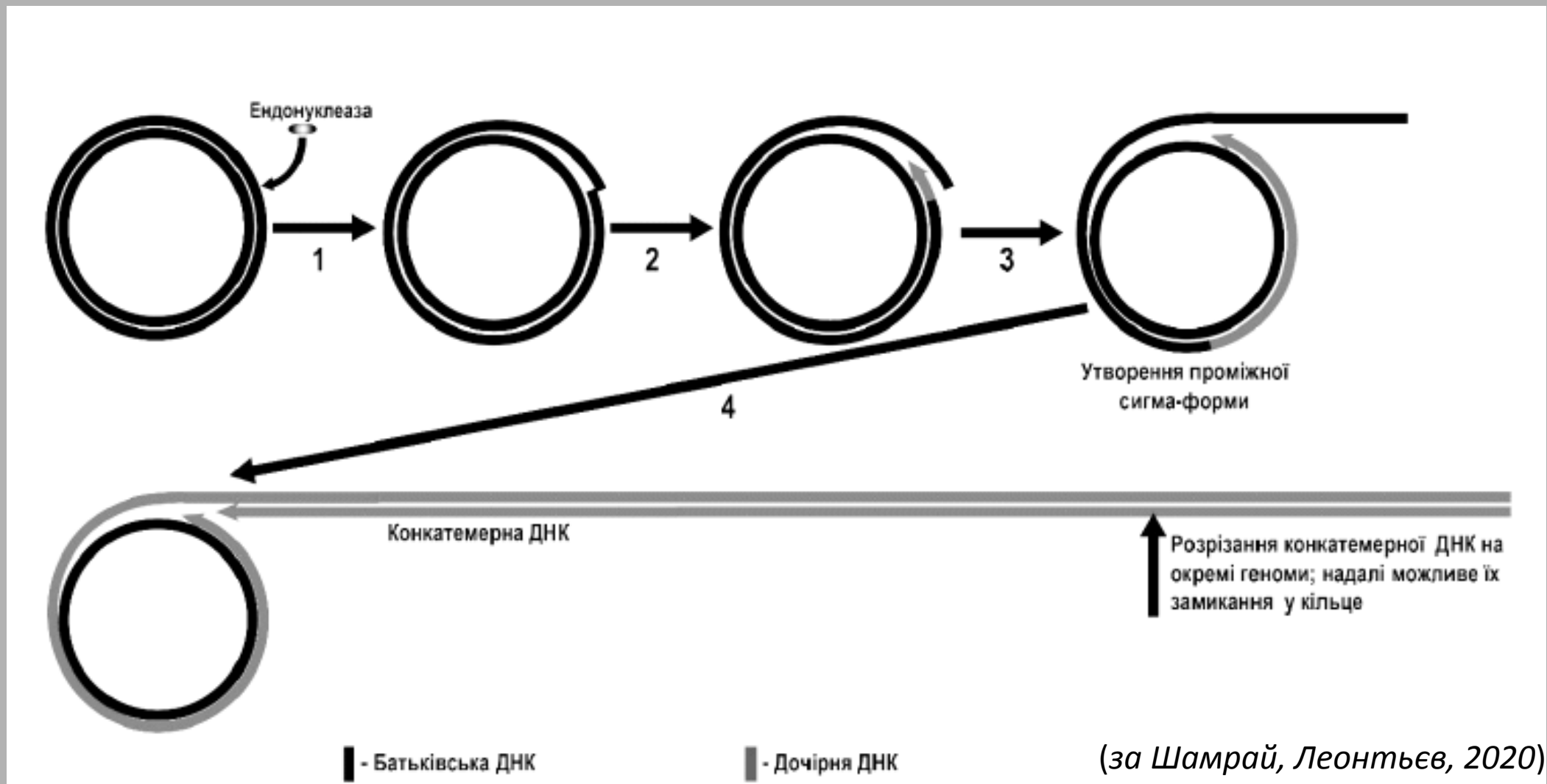
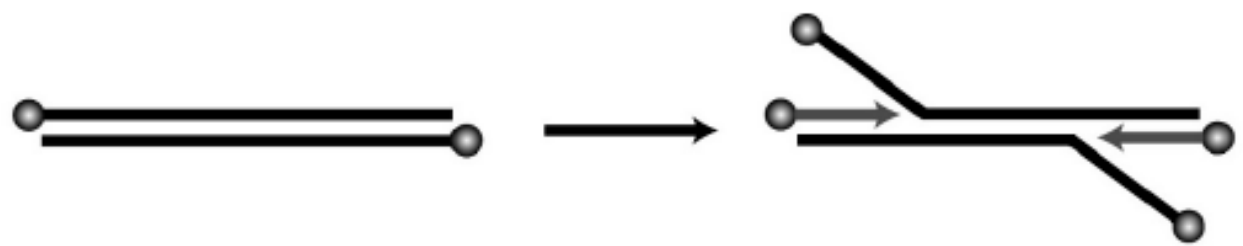


Схема реплікації кільцевої ДНК через сигма-форму. *ori* – точка початку реплікації. 1 – розрізання одного з ланцюгів ендонуклеазою 2 – ініціація реплікації; 3, 4 – елонгація з утворенням конкатемерної ДНК; 5 – розрізання конкатемерної ДНК на окремі геноми і замикання їх у кільце. Задля спрощення, білки реплікаційного комплексу не відображені.

Нерозрізаний кільцевий ланцюг, який є матрицею для синтезу ДНК через сигма-форму, на якому синтезуються безліч лінійних копій вихідної кільцевої ДНК, які пізніше розрізаються на фрагменти, називається **конкатемером**.

Розрізані фрагменти за принципом «голова-хвіст» з'єднуються в кільця.

а.



б.



■ - Батьківська ДНК

■ - Дочірня ДНК

● - Термінальний білок

(за Шамрай, Леонт'єв, 2020)

Схема реплікації лінійної ДНК вірусів:

а – в ролі праймера використовується попередник термінального білка, який у підсумку залишається ковалентно зв'язаним з кожним ланцюгом ДНК;

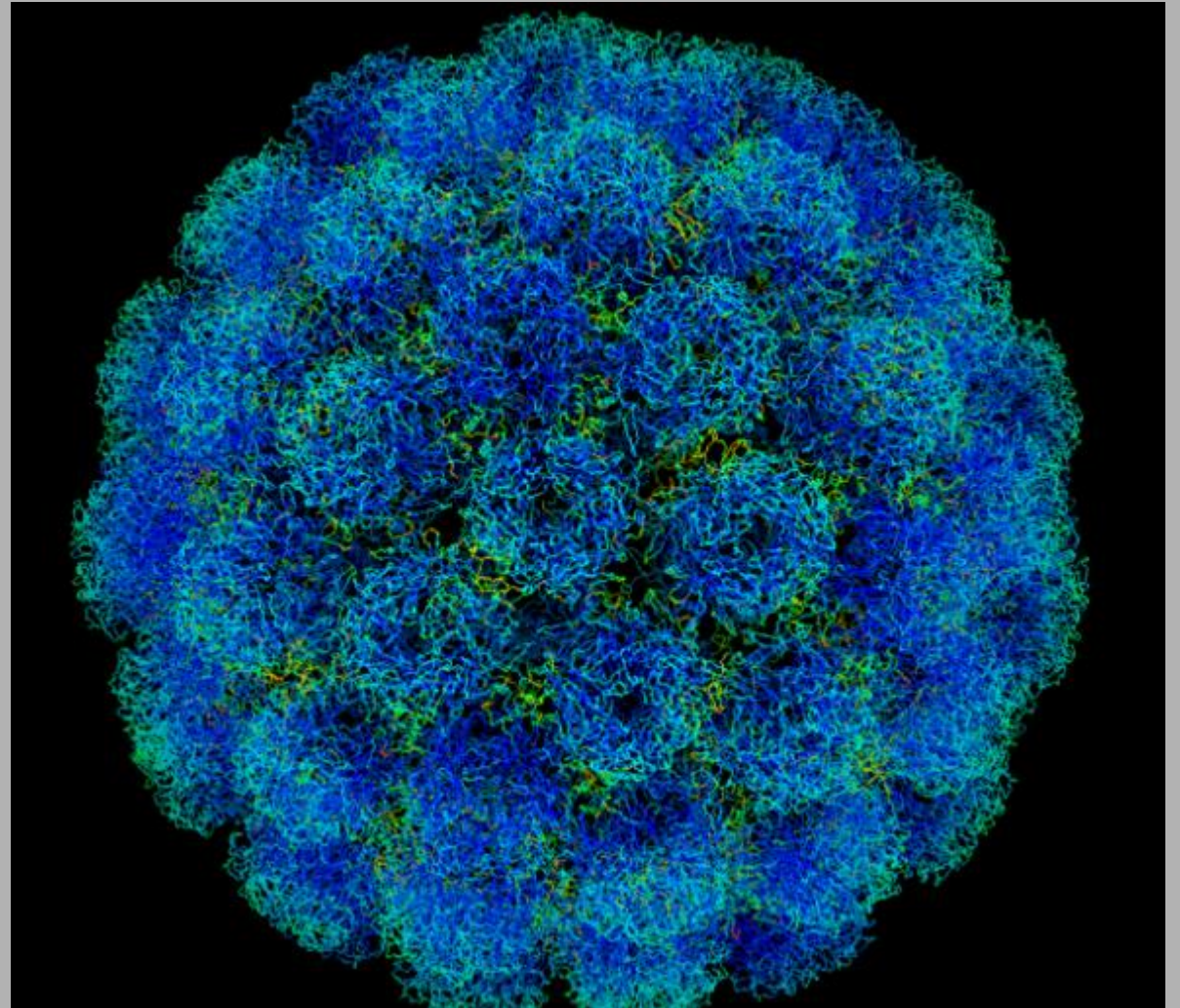
б – за праймер править сама ДНК (самопраймуння), що стає можливим завдяки утворенню шпильки на кінцях ДНК. Зображена шпилька, утворена на 3'-кінці геномної ДНК.

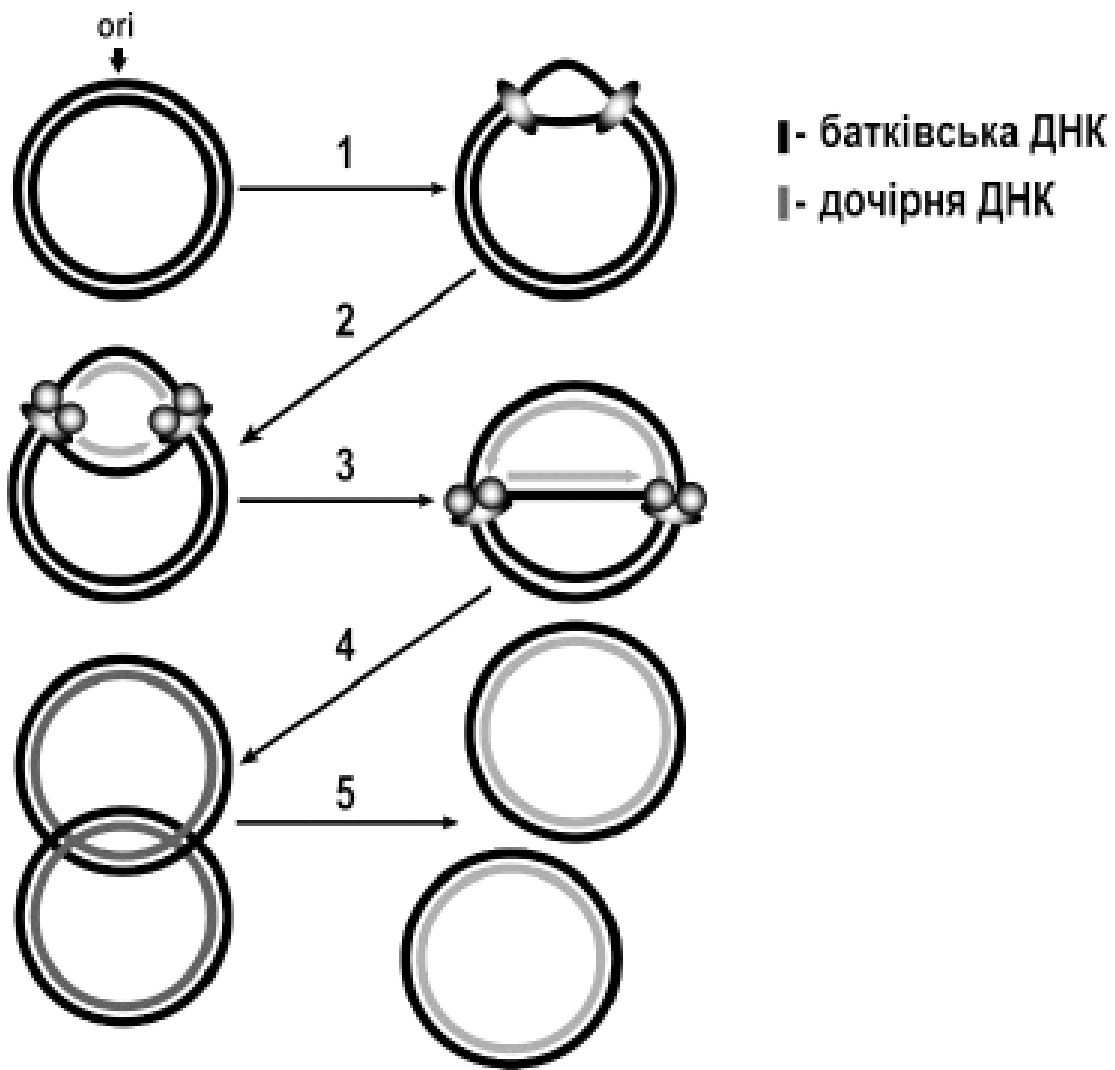
Реплікація геномів вірусів, які представлені кільцевою дволанцюговою ДНК

Macaca mulatta polyomavirus 1
(= *Simian virus 40, SV40*)

Polyomaviridae

P.S. Миллионы людей были инфицированы вирусом SV40, так как в 1960-х годах он содержался в вакцине против вируса полиомиелита





Polyomaviridae

Схема реплікації ДНК вірусу SV40. Ori – точка початку реплікації. 1 – розпізнавання T-антигеном точки початку реплікації; 2 – ініціація реплікації; 3, 4 – елонгація; 5 – розчеплення

9 факторів клітинних + 1 вірусний (T-антиген)

РНК-праймери

(за N. J. Dimmock et al., 2007)

Вірусний білок поліомавірусу SV40 (великий Т-антиген) виконує багато функцій:

- білком-ініціатор, необхідний для ініціації реплікації;
- він має ДНК-хеліказну активність, тобто розплітає ланцюги ДНК перед працюючою ДНК-полімеразою;
- забезпечує правильну взаємодію з ДНК ферментним комплексом, що синтезує праймери.

Реплікація в ядрі в S-фазі клітинного циклу.

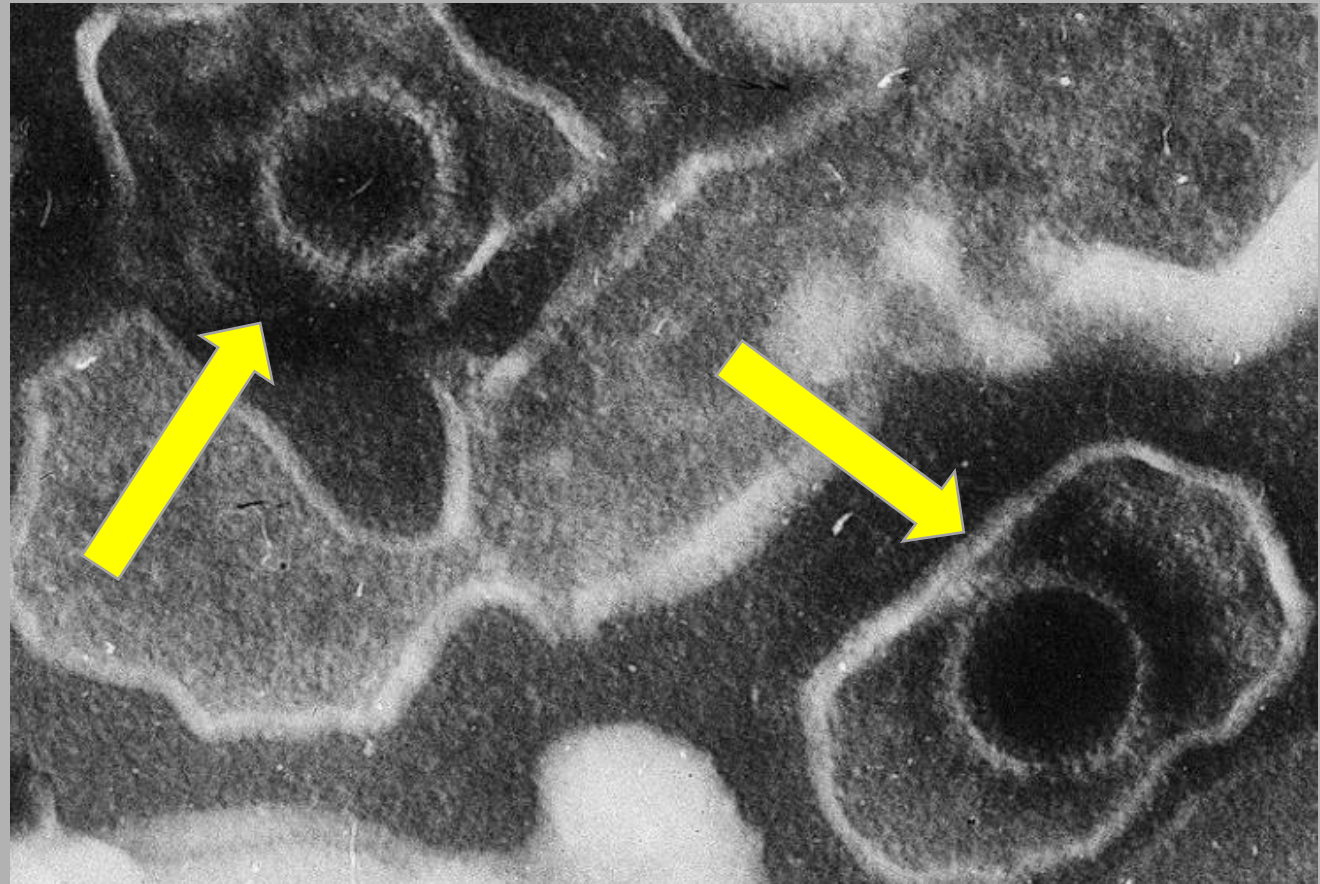
З 2016 року зареєстровано 13 видів поліомавірусів, що уражають людину

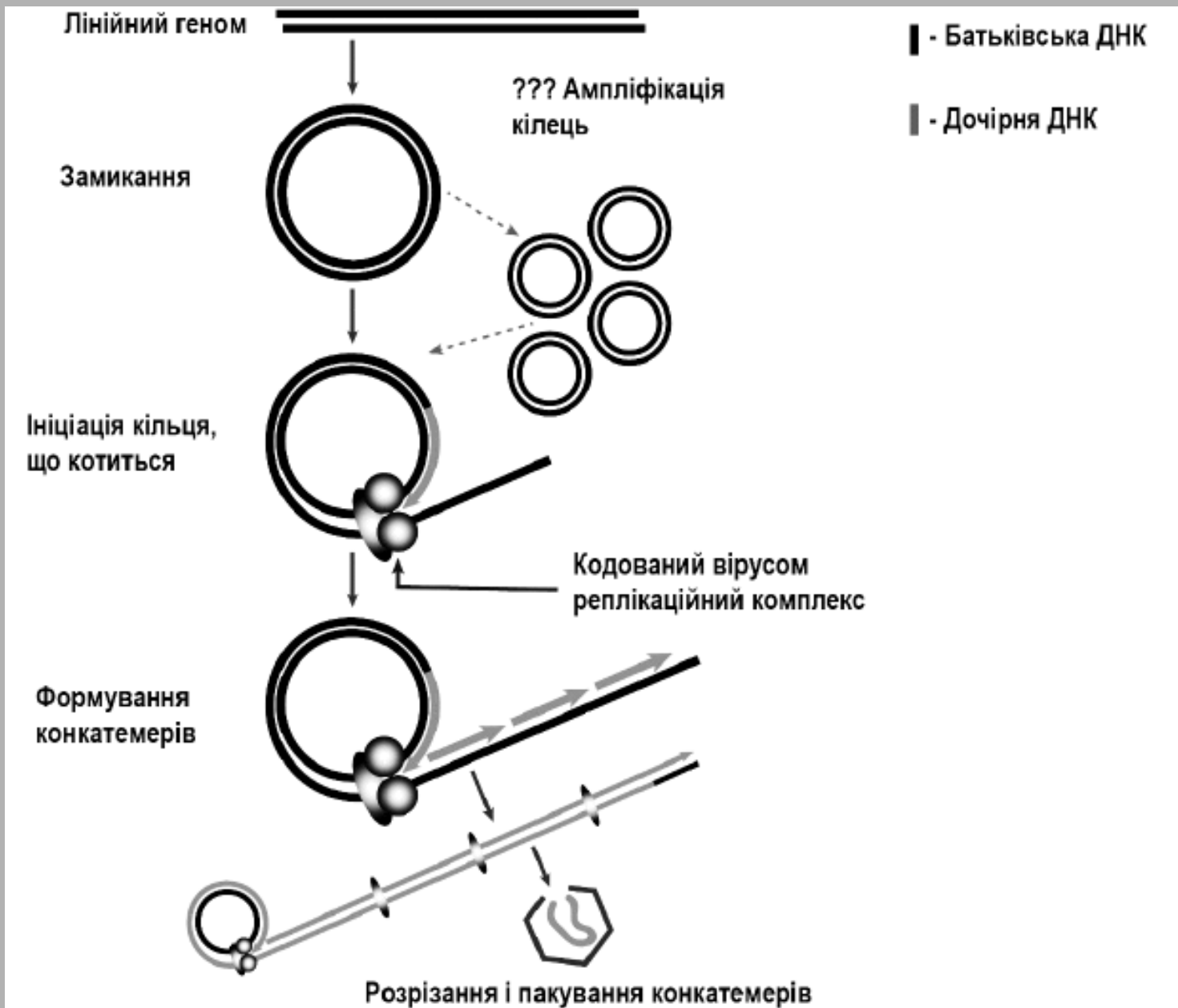
Реплікація геномів вірусів, які являють собою лінійну дволанцюгову ДНК, яка здатна замикатися в кільце

Віруси простого герпесу типу 1 і 2, вірус Епштейна-Барр, бактеріофаг λ

Human Herpesvirus 4
(= *Epstein Barr Virus*, HH4)

Викликає інфекційний мононуклеоз,
лімфома Беркітта





(за N. J. Dimmock et al., 2007)

Схема реплікації ДНК вірусу герпесу типу 1

Вірусні білки забезпечують:

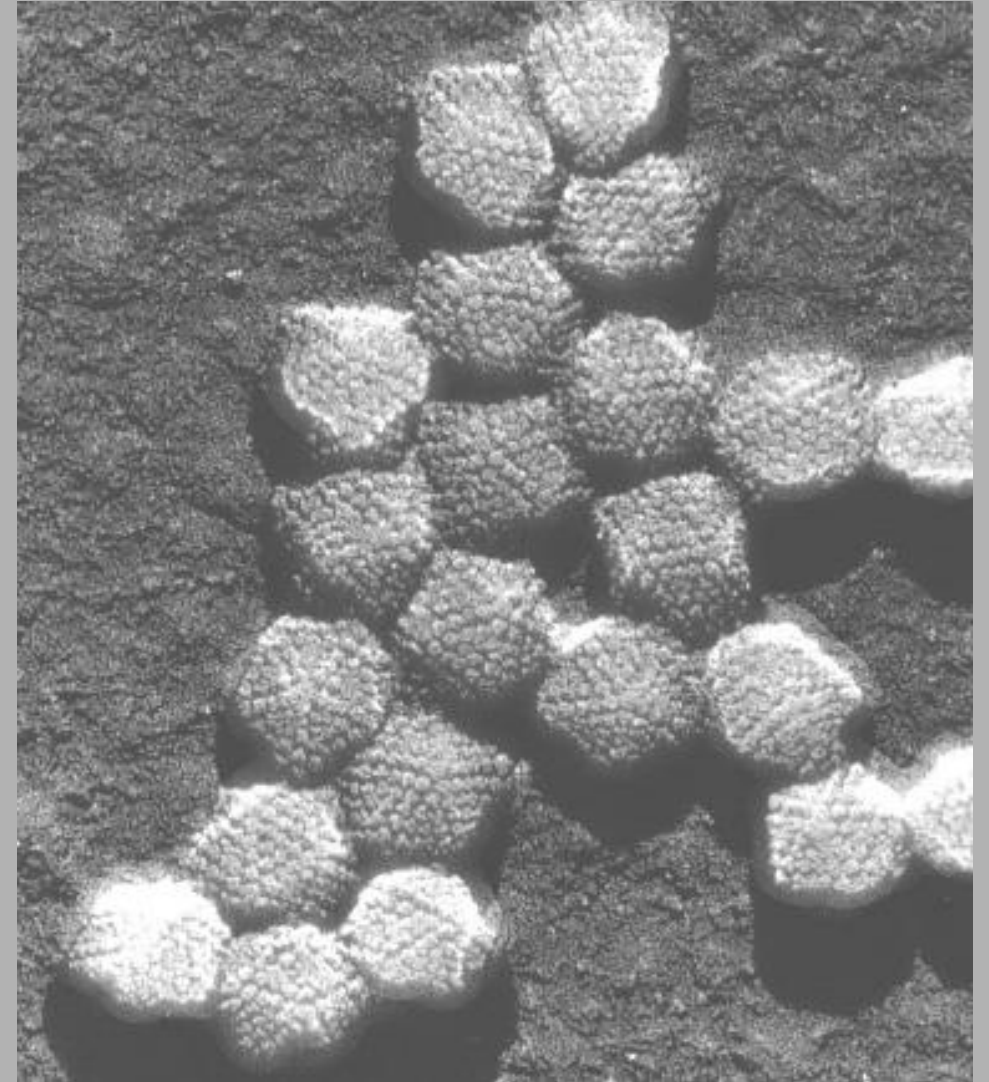
- розпізнавання точки початку реплікації;
- мають активність ДНК-гелікази (розділяють ланцюжки);
- зв'язують одноланцюгову ДНК;
- забезпечують синтез праймерів;
- синтез ДНК (ДНК-полімераза).

Клітинні білки:

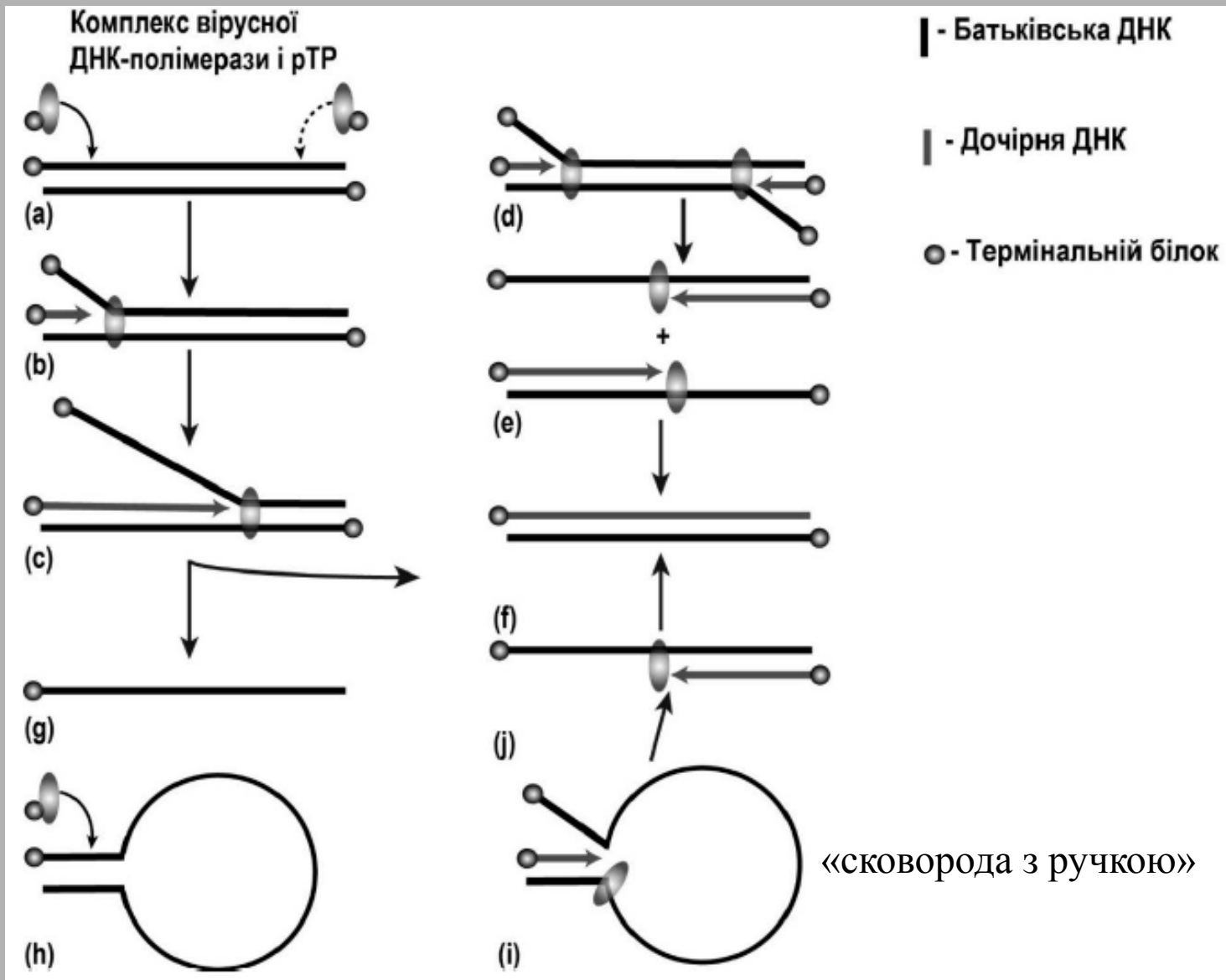
- топоізомерази.

**Реплікація геномів вірусів, які представлені лінійною
дволанцюговою ДНК, яка не здатна замикатися в кільце**

*Fowl aviadenovirus A
(= Avian adenovirus)*



Аденовірусні інфекції у людей та тварин



(за N. J. Dimmock et al., 2007)

На 3'-кінцях термінальні повтори ДНК (100–150 пар нуклеотидів), які містять точки початку реплікації. На 5'-кінцях кодований вірусом термінальний білок.

Два білки для ініціації транскрипції – клітинні.

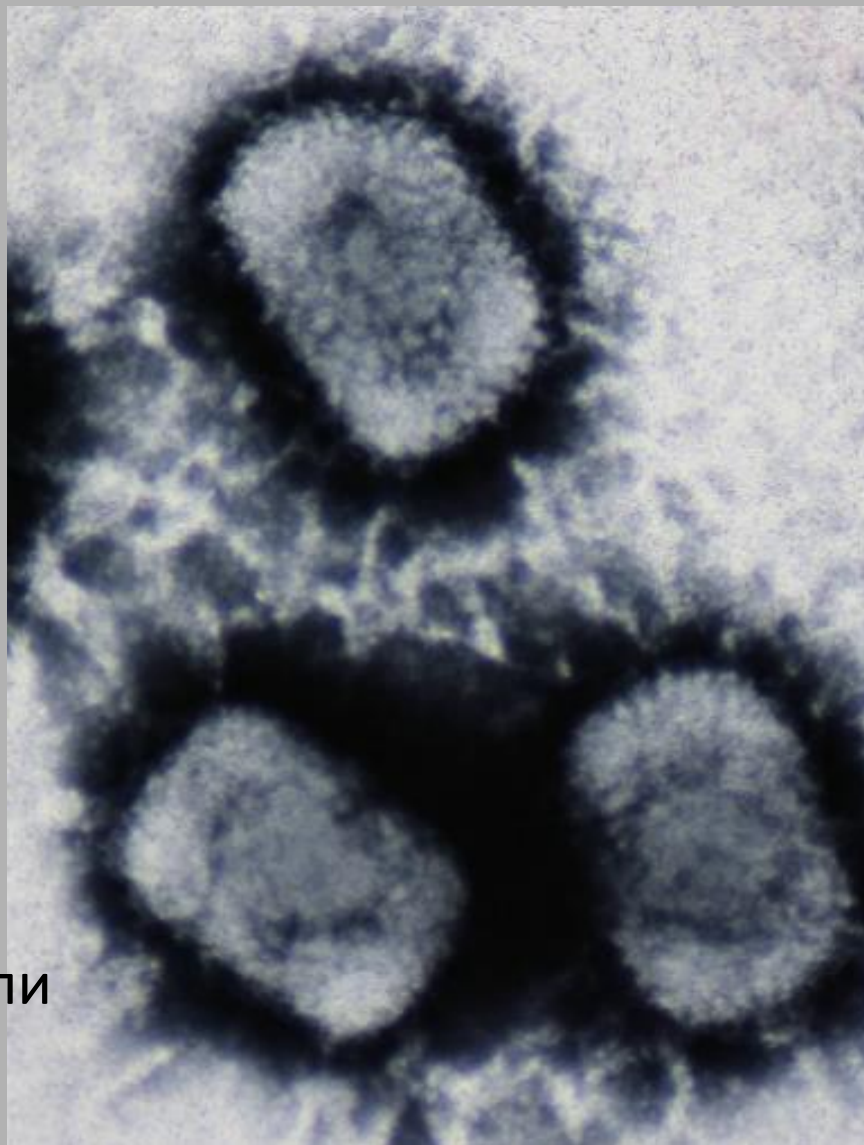
ДНК-полімераза + рТР (фактор транскрипції) - вірусні

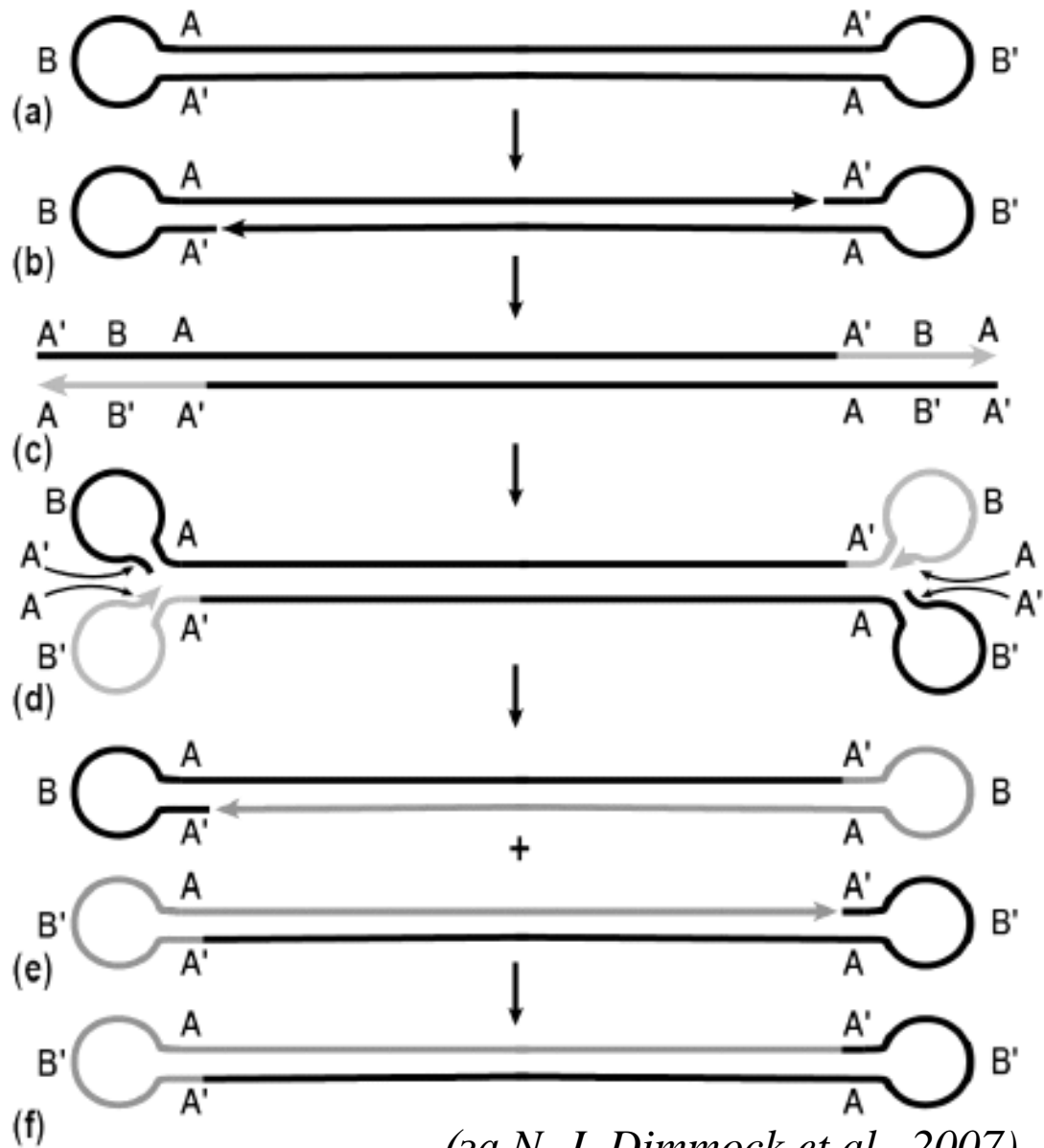
Роль праймера під час синтезу ДНК виконує білок, а не РНК, що є ключовою особливістю вирішення проблеми реплікації кінців у аденовірусів.

Cowpox virus
(Вірус коров'ячої віспи)

Poxviridae

Коров'яча віспа,
вакцини проти натуральної віспи





(за N. J. Dimmock et al., 2007)

Передбачувана схема реплікації ДНК поксвірусів. Чорним кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, сірим – щойно синтезована ДНК, стрілками позначені 3'-кінці.

Комплементарні послідовності позначені як A, A' і B, B'.

Дві альтернативні форми послідовностей термінальних петель, B і B', міняються з кожною реплікацією; окремі молекули можуть мати петлі або з ідентичними, або з комплементарними послідовностями.

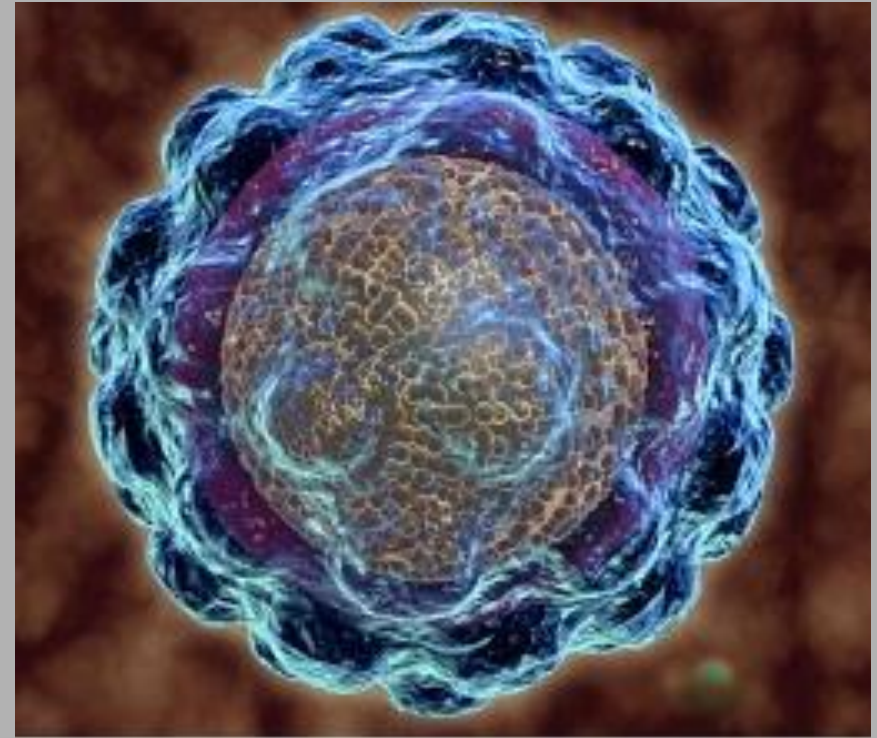
Важливо підкреслити, що процес реплікації ДНК вірусу здійснюється в цитоплазмі зараженої клітини, за участю виключно кодованих вірусом білків.

Реплікація геномів вірусів, які мають кільцеву одноланцюгову ДНК

Бактеріофаги φХ174 (Microviridae) і М13 (Inoviridae), які є широко використовуваними інструментами в молекулярній біології, а також вірус ТТ людини (Anelloviridae), який можливо викликає гепатит.

Transfusion Transmitted Virus

Anelloviridae



Першим етапом реплікації одноланцюгових ДНК-геномів є синтез комплементарного ланцюга

Після цього механізм реплікації стає подібним до реплікації дволанцюгових замкнених в кільце геномів

РНК-праймери

Реплікація геномів вірусів, які мають лінійну одноланцюгову ДНК

Primate erythroparvovirus 1

Parvoviridae

Інфекційна еритрема

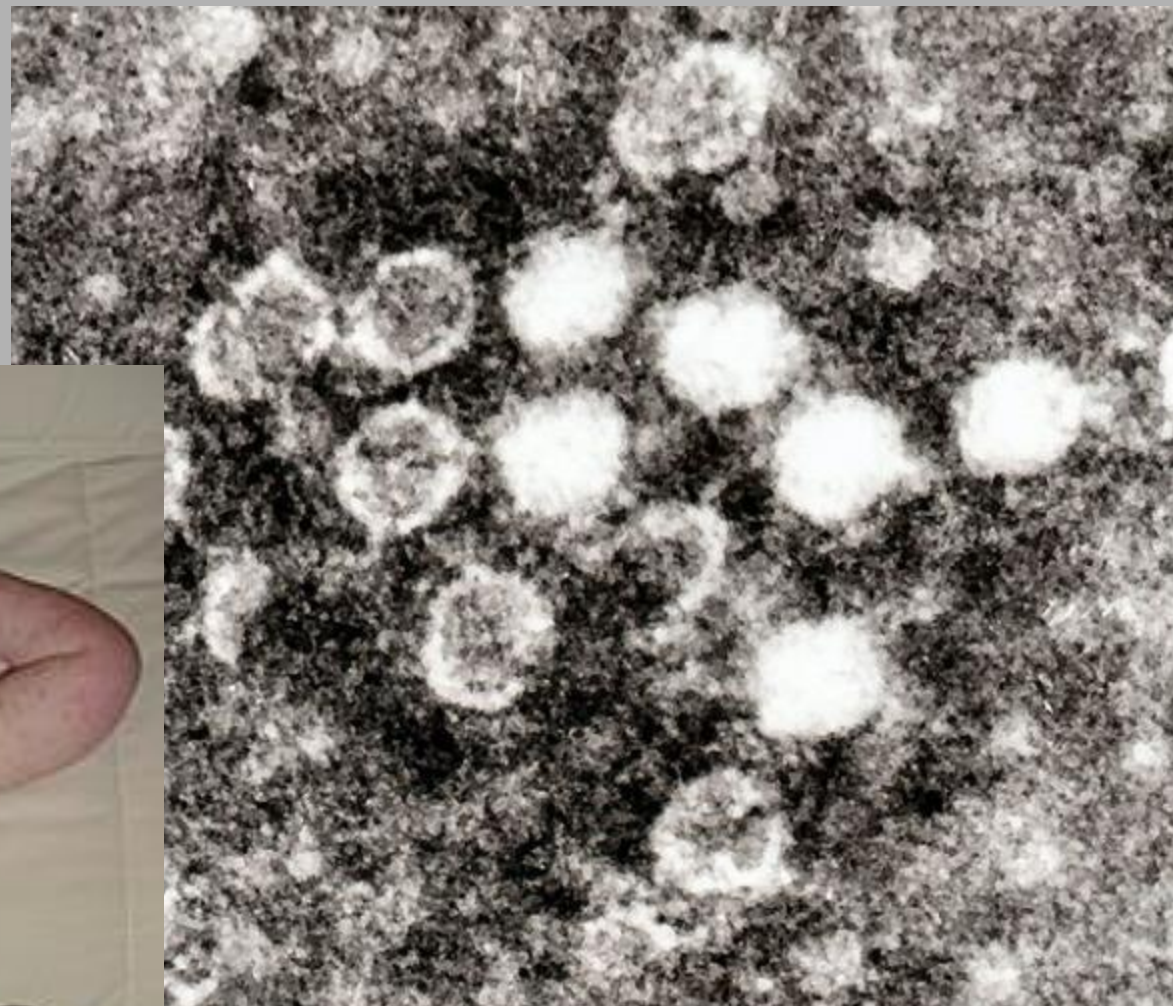
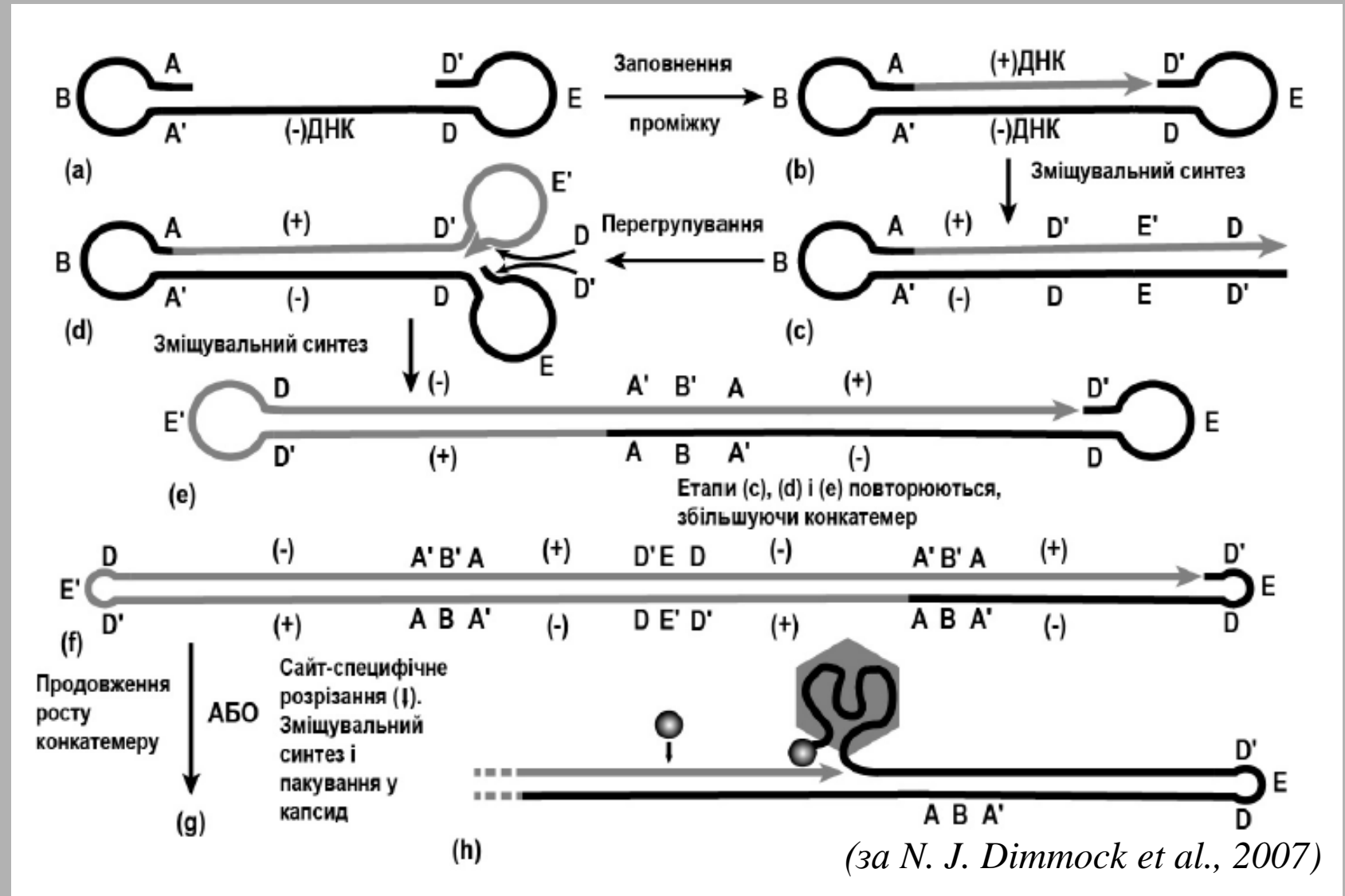


Схема реплікації ДНК парвовірусів

Важливим першим кроком реплікації парвовірусу є перетворення генома на дволанцюгову форму за допомогою заповнення проміжку

Самопраймування.

Зміщувальний синтез – це синтез ділянки ДНК при зміщенні спарених основ на 5'-кінці до досягнення його кінця.



Чорним кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, сірим – щойно синтезована ДНК, стрілками позначені 3'-кінці.

2. Реплікація геномів вірусів, які містять РНК

Загальні принципи

Реплікація РНК-геномів потребує активності РНК-залежної РНК-полімерази, яка повинна забезпечуватися вірусом.

Вірусні РНК-залежні РНК-полімерази часто називають «репліказами», щоб відрізнити їх від РНК-полімераз, задіяних в процесі транскрипції.

Усі ферменти, які беруть участь в синтезі РНК, вірусу або клітини-хазяїна, не здатні до так званого **пруфридингу**, тобто до виправлення помилок азотистих основ, які невірні спарувалися.

Відсутність пруфридингу означає, що РНК-геноми мутують набагато легше, ніж ДНК-геноми.

Регуляторні елементи синтезу вірусного РНК-генома

Для синтезу точної копії генома, РНК-залежні РНК-полімерази повинні починати синтез з 3'-термінального нуклеотиду матричного ланцюга. Тому 3'-кінець повинен містити сигнал ініціації синтезу.

Усі віруси з РНК-геномами повинні реплікуватися через проміжну дволанцюгову РНК.

У деяких РНК-вірусів послідовності на кінцях генома майже повністю комплементарні одна іншій, тобто є інвертованими повторами.

(+) РНК-геномні віруси, які належать до ретровірусів (клас VI по системі Д. Балтімора) в процесі реплікації на матриці РНК синтезують *провірусну* ДНК за участю ферменту зворотної транскриптази.

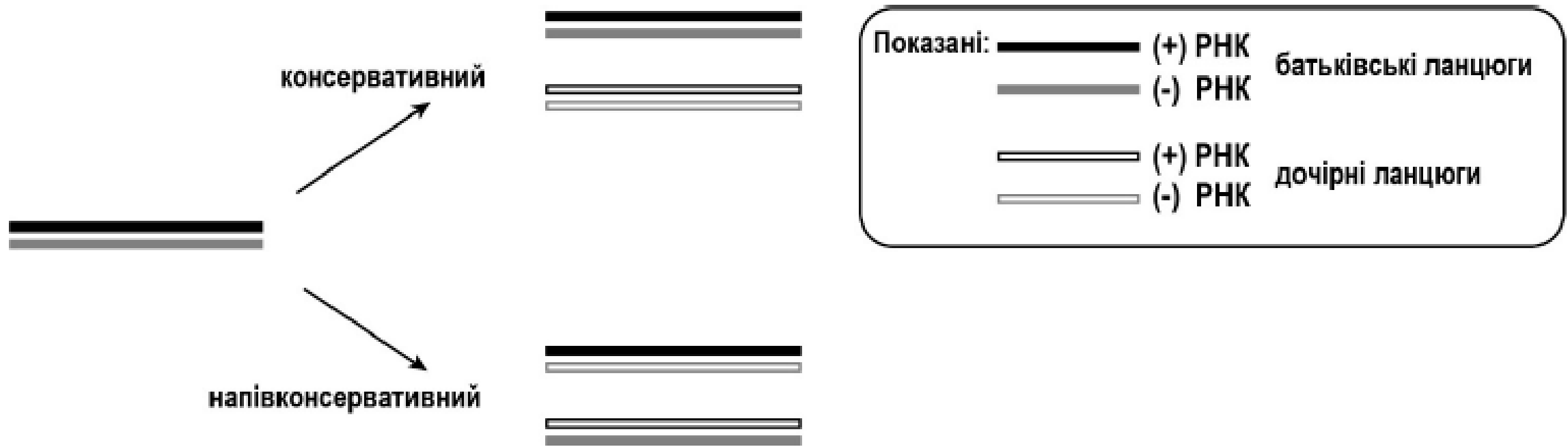
Реплікація геномів вірусів, представлених дволанцюговою РНК (клас 3 за класифікацією Д. Балтімора)

Rotavirus A

Reoviridae



Ретровірусна інфекція



(за Шамрай, Леонтьєв, 2020)

длРНК є потужним потенційним індуктором низки клітинних захисних механізмів, які включають глушіння (сайленсинг) РНК, утворення інтерферону і запрограмовану загибель клітин.

Більшість длРНК-геномних вірусів вирішують цю проблему таким чином, що вірусна дволанцюгова РНК завжди оточена білками вірусу у субвірусних частках і ніколи не виявляється у вільному вигляді у цитоплазмі, де вона могла б викликати імунні реакції.

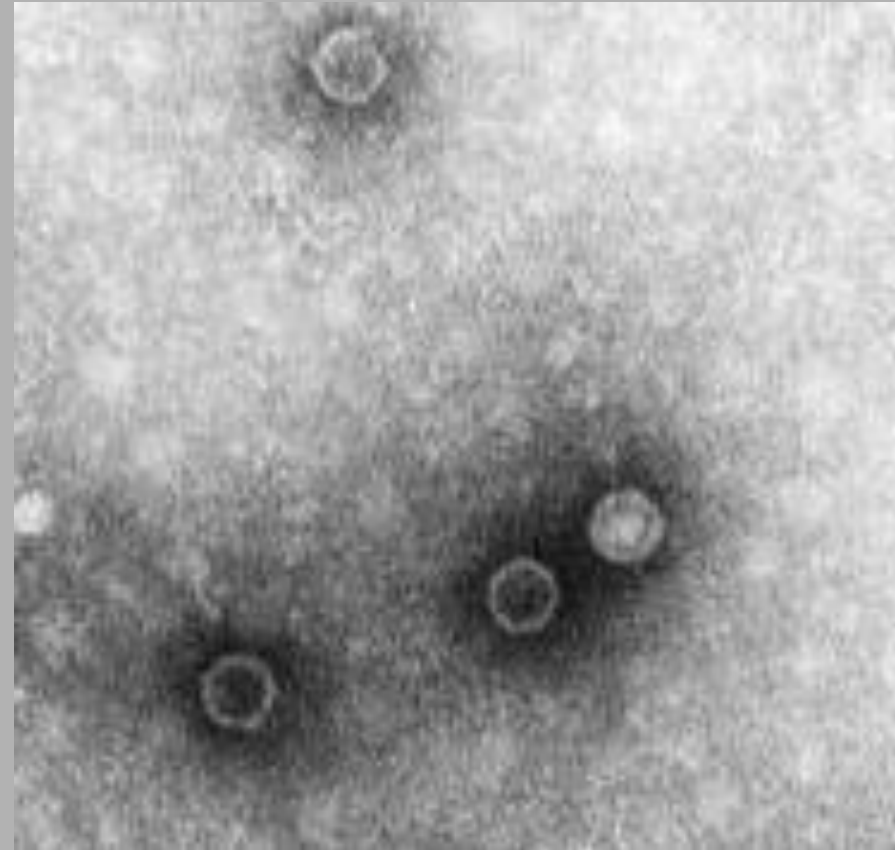
Дволанцюговий РНК-геном залишається усередині субвірусних часток і не покидає їх впродовж циклу реплікації. Єдиною РНК вірусу, знайденою в цитоплазмі поза зв'язком з субвірусними частками, є мРНК.

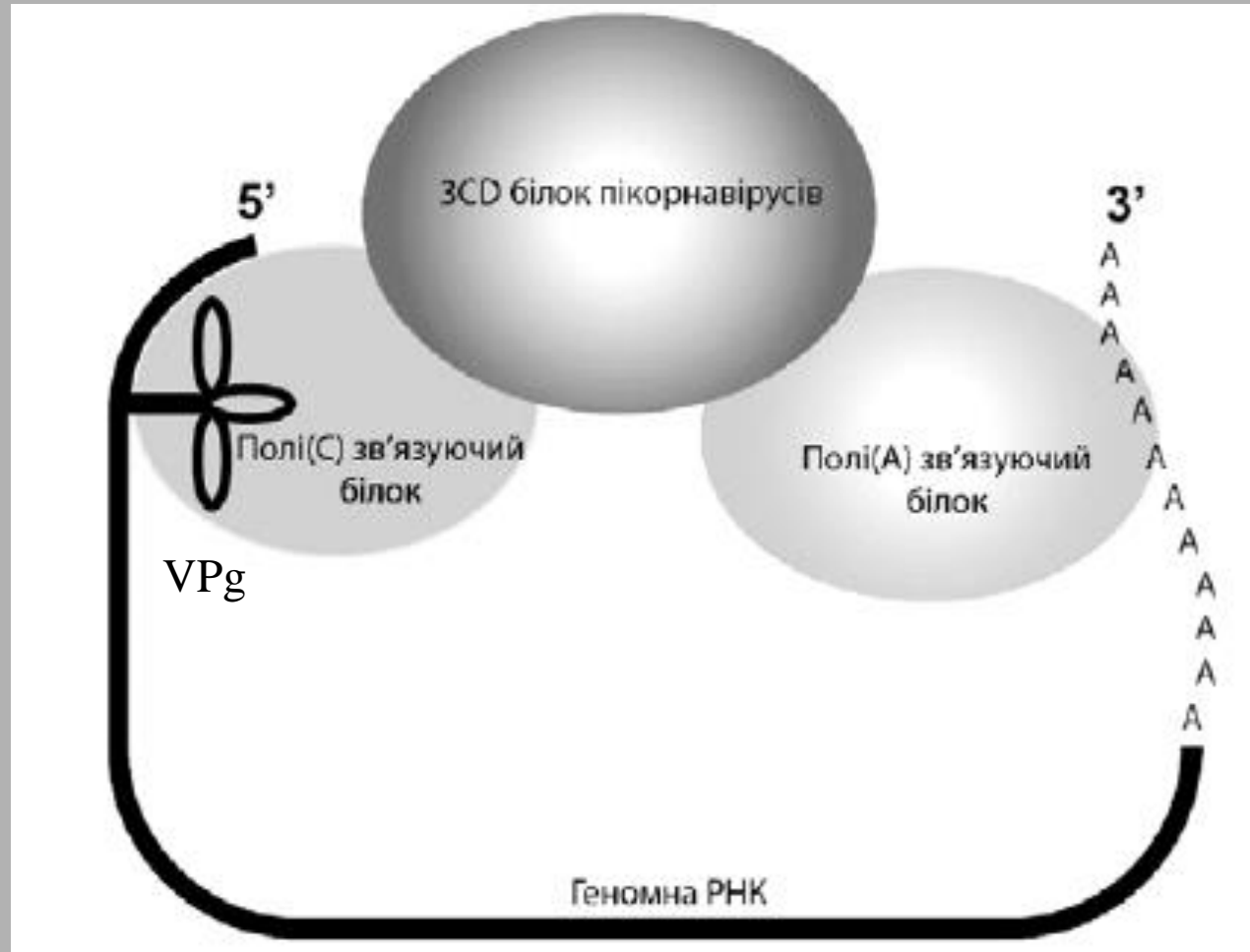
Реплікація геномів вірусів, представлених одноланцюговою (+)РНК (клас 4 за класифікацією Д. Балтімора)

Enterovirus C

Picornaviridae

Викликає поліомієліт





Трансляція є необхідним першим кроком інфекційного циклу, в результаті її синтезується РНК-залежна-РНК-полімераза, яка синтезуватиме нові геноми.

Реплікація включає утворення інтермедіата у вигляді дволанцюгової РНК.

Ініціація реплікації відбувається на 3'-кінці (+)РНК, який містить полі(А) хвіст, наявність якого є істотною для реплікації.

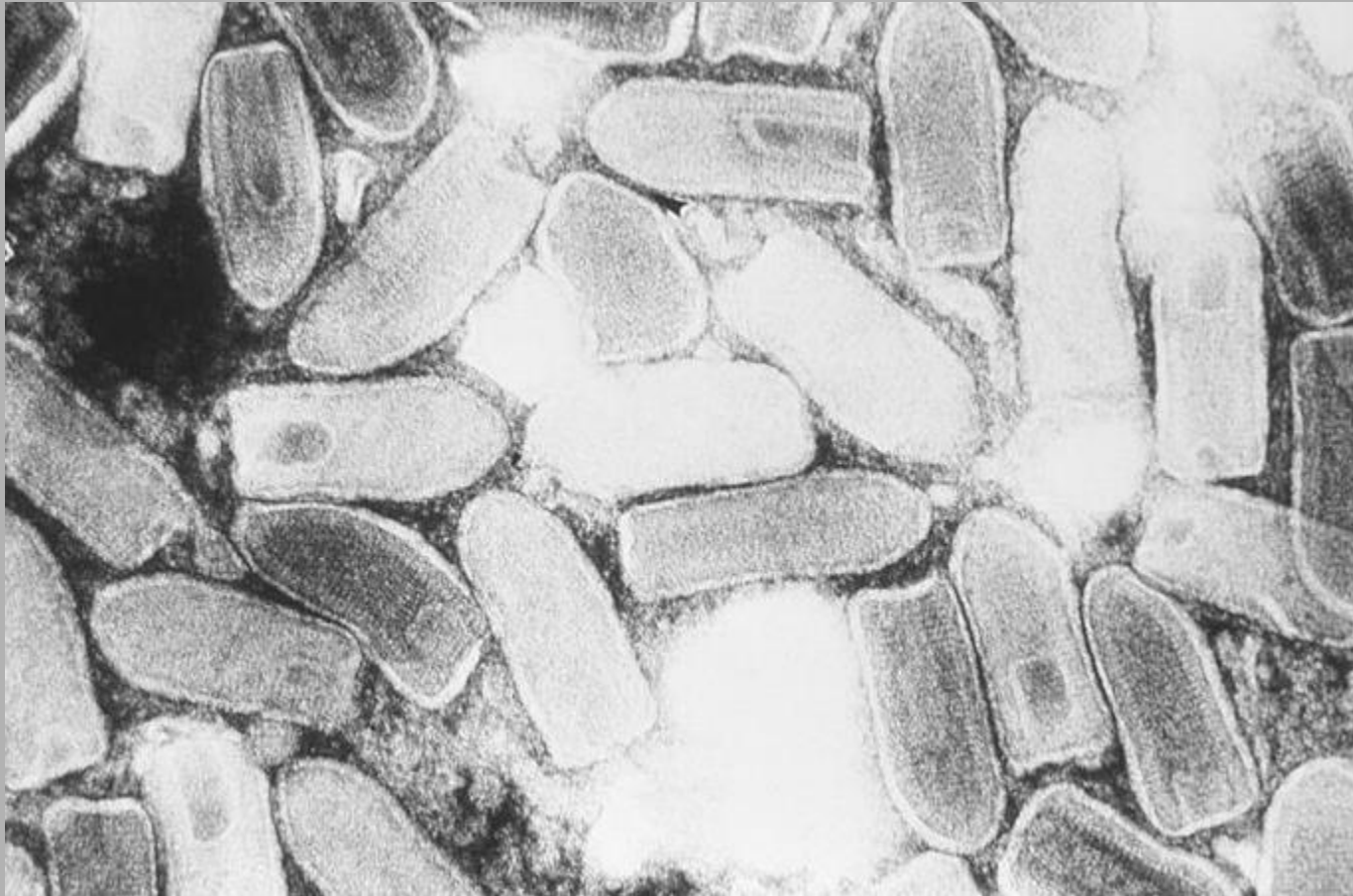
Особливістю реплікації пікорнавірусів є те, що геномна РНК утворює форму кола за рахунок дії білків клітини і вірусу

У інфікованій поліовірусами клітині синтезується 2500 молекул РНК за хвилину.

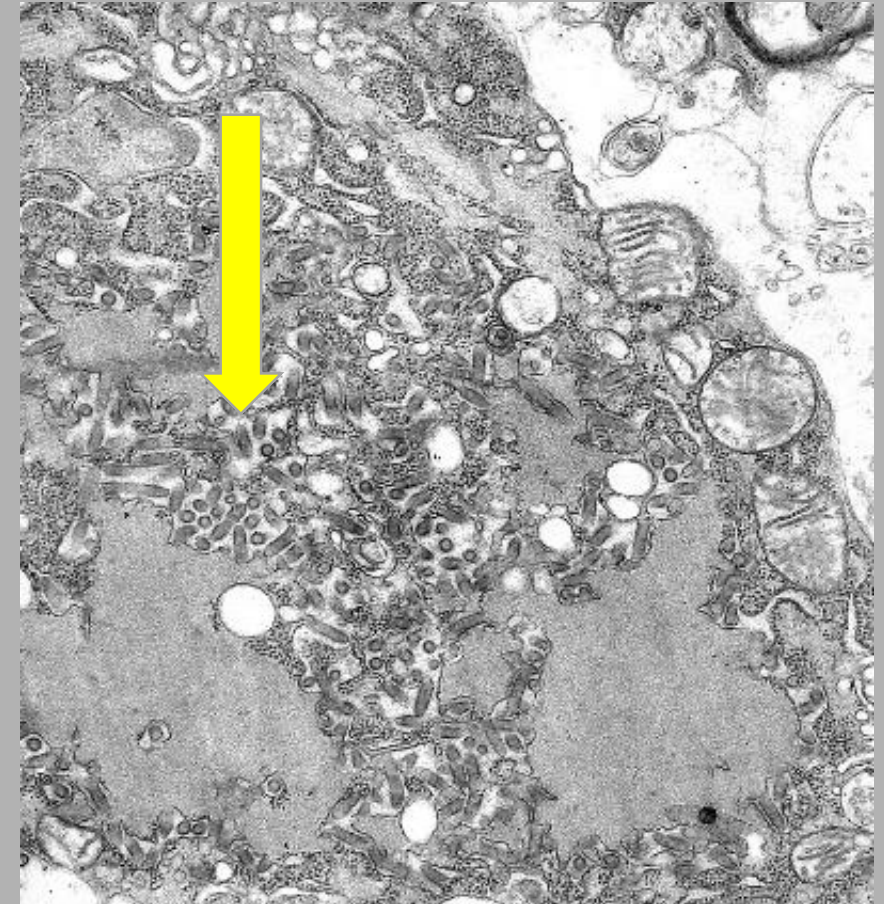
Вірус контролює процес синтезу РНК таким чином, що синтезується у 50 разів більше (+)РНК, ніж (-)РНК.

Реплікація геномів вірусів, представлених одноланцюговою (–)РНК (клас 5 за класифікацією Д. Балтімора)

Реплікація несегментованого РНК-генома у рабдовірусів (Rabdoviridae)



Vesiculovirus Викликає везикулярний стоматит



Rabies lyssavirus Викликає сказ

Геномна (–)РНК і антигеномна (+)РНК, утворювана в результаті реплікації, у ВВС завжди тісно пов'язані з трьома білками вірусу в спіральному комплексі:

нуклеопротеїн (NP);
фосфопротеїн (P),
великий білок (L).

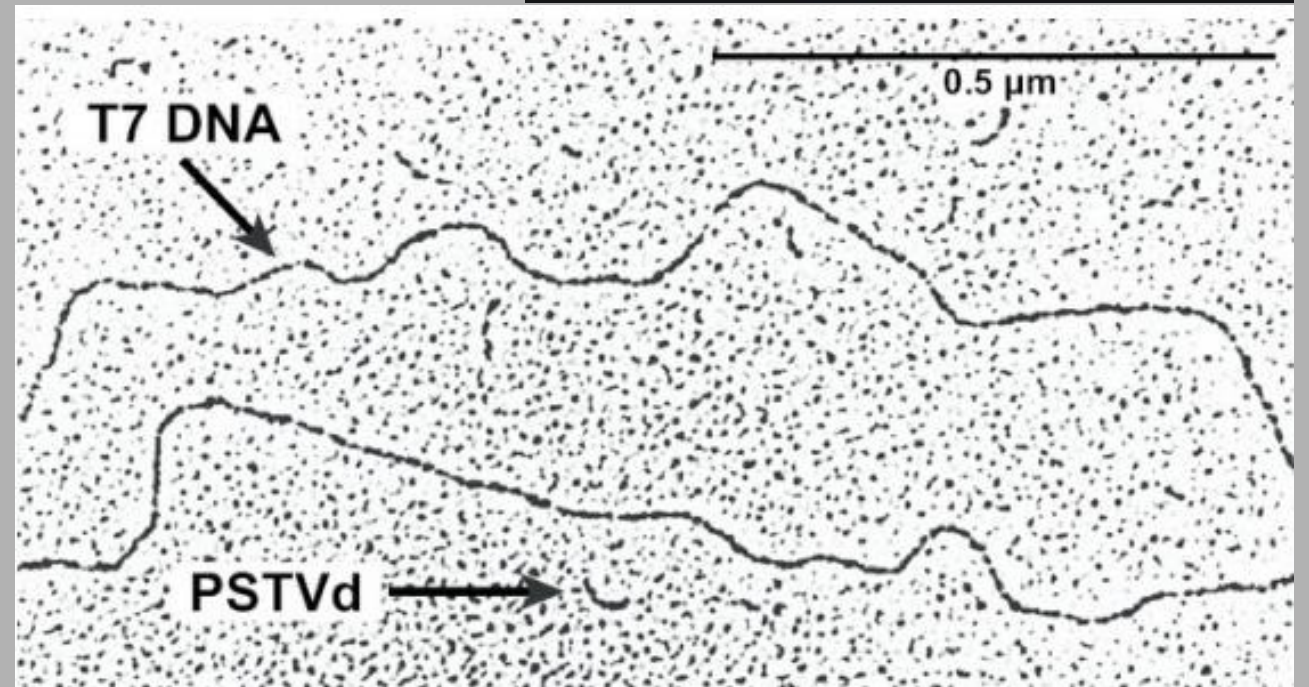
Цей комплекс здійснює як транскрипцію генома з утворенням мРНК, так і реплікацію геномної РНК.

Реплікація віроїдів

Potato spindle tuber viroid

Pospiviroidae

Викликає веретеноподібність
бульб картоплі



(за King et al., 2012)

Геном являє собою замкнені в кільце молекули РНК, які автономно реплікуються, механічно переносяться і мають розмір 246–399 нуклеотидів.

Ця РНК, на відміну від геномів вірусів, не кодує ніяких білків, тому для віроїдів не можна віднести геномну або комплементарну їй РНК до (+) або (–) типу.

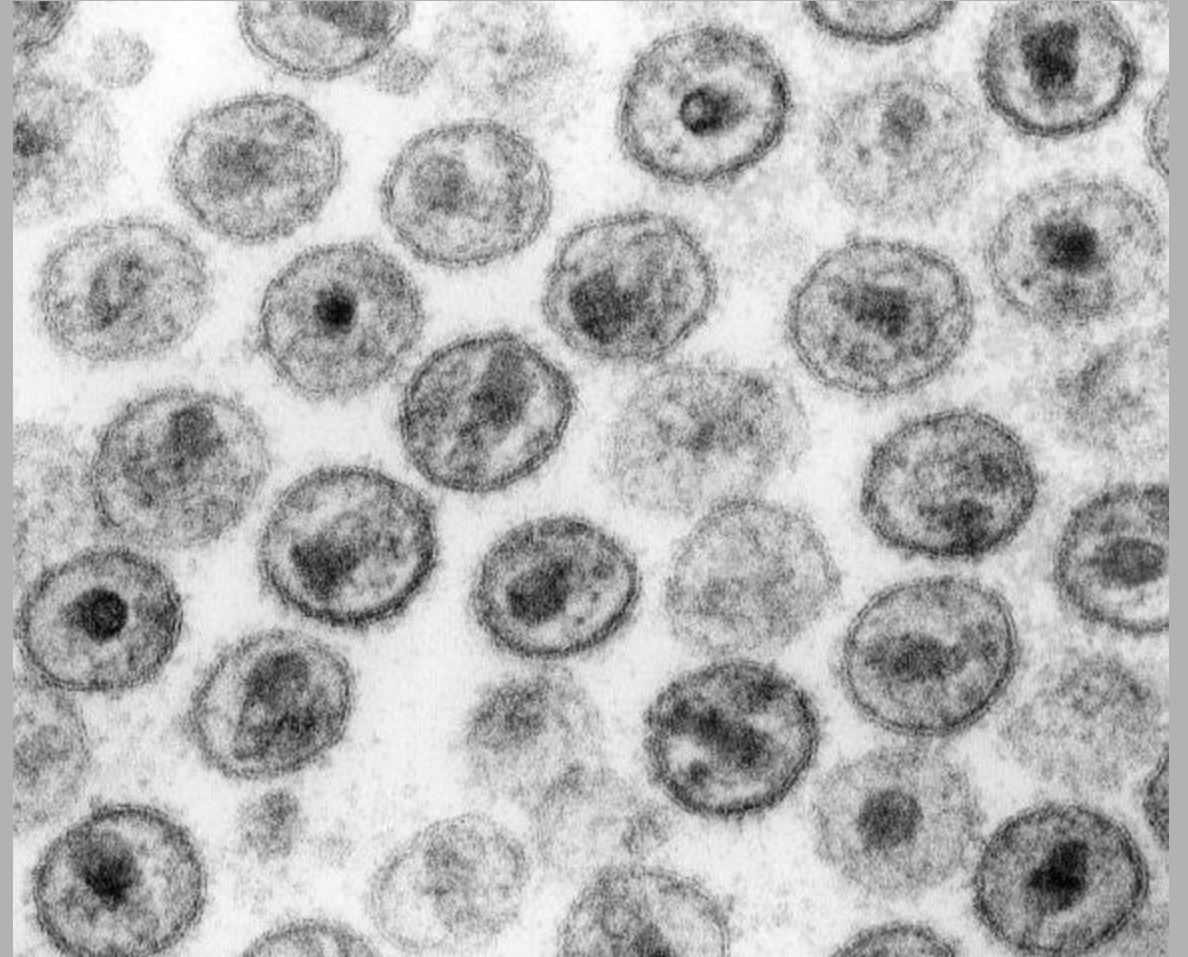
Однак, умовно її відносять до (+)РНК.

Pospiviroidae реплікуються в ядрі хазяїна, і віроїди цієї родини не здатні до саморозрізання.

Реплікація геномів ретровірусів (група IV по Д. Балтимору)

Human immunodeficiency virus 1

Retroviridae



РНК ВІЛ-1 мають послідовність з (+) сенсом, також вони мають характерні особливості мРНК еукаріотів, наприклад структуру кепу на 5'-кінці і полі(А) хвіст на 3'-кінці.

!!! Незважаючи на це, геномні РНК ніколи не транлюються після попадання вірусу в клітину.

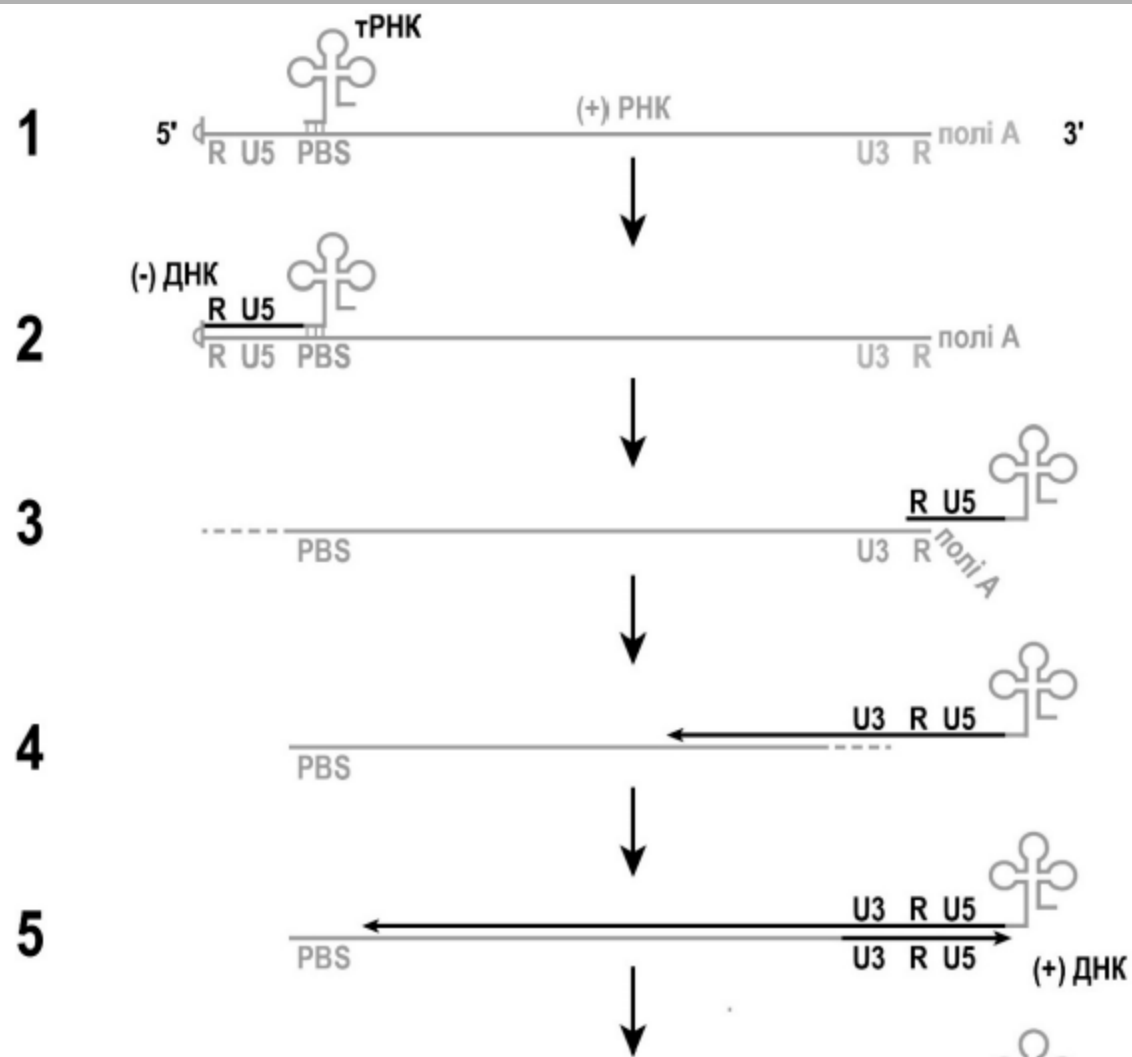
Замість цього, вони використовуються як матриці для синтезу дволанцюгових молекул ДНК.

Зворотна транскрипція виконується без повного роздягання вірусного генома.

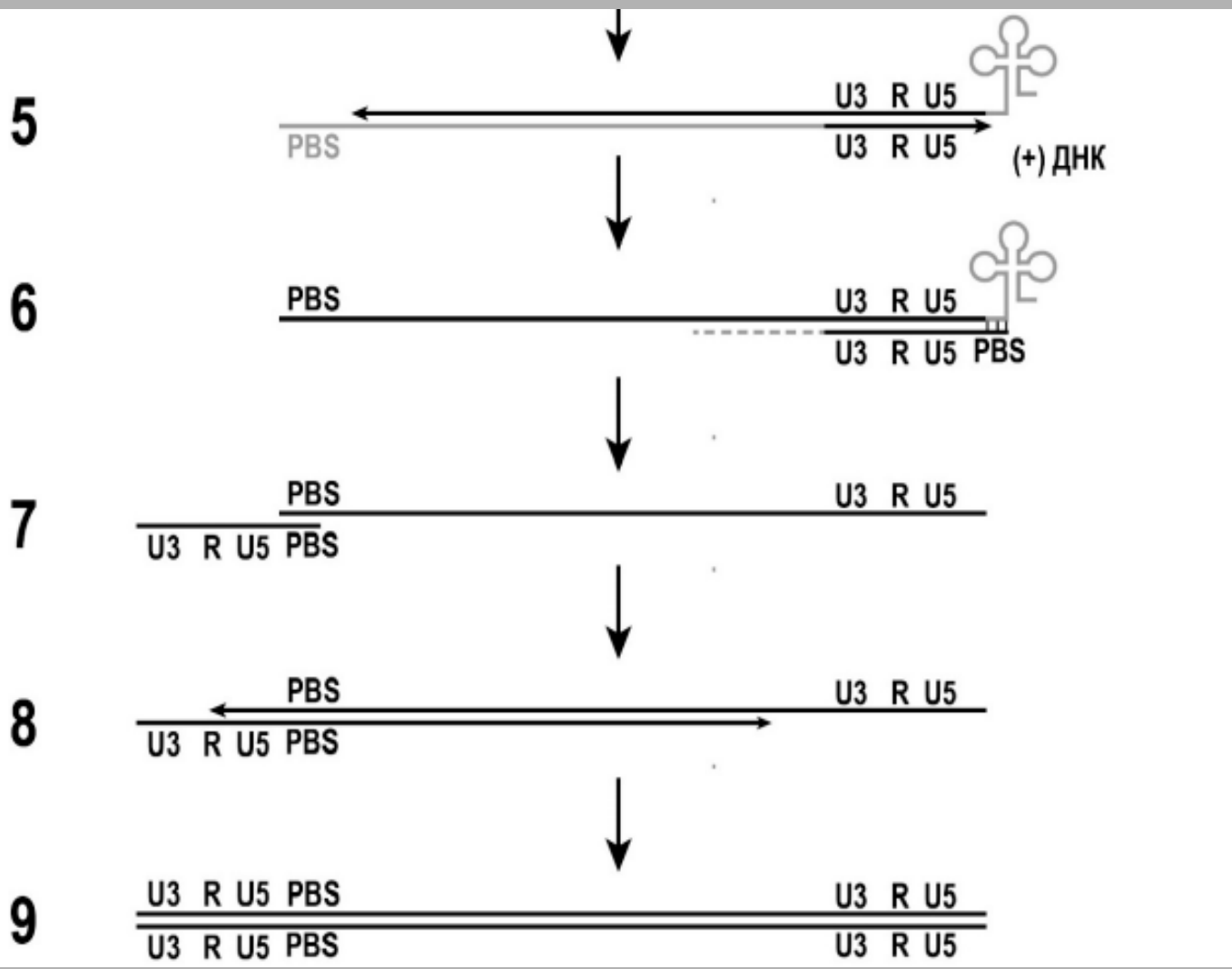
Провірусна ДНК синтезується в цитоплазмі у складі частково роздягнутої вірусної частки.

ДНК провірусу на своїх кінцях має довгі кінцеві повтори (long terminal repeats, LTRs), які важливі для інтеграції вірусу в геном хазяїна і **транскрипції**.

Механізм зворотної транскрипції



1. *tРНК зв'язується з геномною (+)РНК, яка має кап на 5'-кінці і полі(А) хвіст на 3'-кінці, з допомогою сайту приєднання праймера (primer-binding site, PBS).*
2. *3'-ОН група тРНК служить праймером для синтезу ДНК-копії 5'-кінця РНК.*
3. *РНКаза Н видаляє ланцюг РНК в дуплексі РНК:ДНК, потім відбувається перший стрибок: ДНК зв'язується з послідовністю повтору R на іншому кінці РНК.*
4. *Нарощування ланцюга ДНК і часткове видалення ланцюга РНК в дуплексі РНК:ДНК РНКазой Н.*
5. *Синтез 3'-кінця другого ланцюга ДНК.*



(за J. Carter, Vol. Saunders, 2007)

6. Видалення ланцюга РНК РНКазой Н.
 7. Другий стрибок: два ланцюги ДНК за рахунок спаровування комплементарних азотистих основ зв'язуються в сайті PBS.
 8. Завершення синтезу обох ланцюгів ДНК.
 9. Провірус, що складається з дволанцюгової ДНК.
- В результаті зворотної транскрипції утворюються молекули дволанцюгової ДНК з довгими (декілька сотень нуклеотидів) кінцевими повторами, що мають структуру U3RU5

Інтеграція провірусної ДНК в геном клітини

Інтеграція вимагає наявності ще одного вірусного білка (міститься у віріоні), що називається інтегразою.

Після попадання в ядро ДНК провірусу переходить в кільцеву форму.

В місцях стику LTR виникає короткий інвертований повтор, що виконує функцію специфічної ділянки інтеграції. Ця ділянка розпізнається інтегразою, яка вносить ступінчасті розриви в LTR і клітинній ДНК.

Інтеграза здійснює і з'єднання ланцюгів ДНК.

Заражені клітини в типовому випадку містять від 1 до 20 копій інтегрованої провірусної ДНК.

Вірусспецифічна ДНК реплікується разом з клітинною ДНК під час мітозу і передається в дочірні клітини.

Продукування дочірніх геномів ретровірусів

Нові РНК-геноми ретровірусів транскрибуються на інтегрованій провірусній ДНК.

Клітинна ДНК-залежна РНК-полімераза II транскрибує провірус, і первинний транскрипт кепується і поліаденілюється ферментами хазяїна.

Геноми потомства повинні точно відповідати батьківському геному, з якого був утворений провірус, інакше успішної реплікації вірусу не буде.

Це забезпечує LTR, який має ключове значення для правильної реплікації вірусної нуклеїнової кислоти.

Список рекомендованих джерел

Основна:

Шамрай С.М., Леонтьев Д.В. Вірусологія. – Х.: Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди, 2020. – 244 с.

Додаткова:

1. Скулачев М.В. Внутренняя инициация трансляции – разнообразие механизмов и возможная роль в жизнедеятельности клетки // Успехи биол. химии. 2005. Т. 45. С. 123–172.
2. Beck J., Nassal M. Hepatitis B virus replication // World J. Gastroenterol. 2007. Vol. 13, N. 1. P. 48–64.
3. Flores, R., Gago-Zachert, S., Serra, P., Sanjuán, R., Elena, S. F. Viroids: survivors from the RNA world? // Annual review of microbiology. 2014. Vol. 68. P. 395–414.
4. Marsh M., Helenius A. Virus entry: open sesame // Cell. 2006. Vol. 124, N. 4. P. 729–740.
5. Smith A.E., Helenius A. How viruses enter animal cells // Science. 2004. Vol. 304, №5668. P. 237–242.

Питання для самостійної роботи:

1. Загальні особливості реплікації ДНК-геномних вірусів.
2. Фрагменти Оказакі. Їх роль в процесах реплікації.
3. Які фактори використовуються для ініціації реплікації.
4. Чому відбувається укорочення ДНК-ланцюгів при використанні РНК-праймерів.
5. Назвіть основні етапи реплікації кільцевої ДНК через тета-форму.
6. Назвіть основні етапи реплікації кільцевої ДНК через сигма-форму.
7. Конкатемери: утворення та подальша трансформація.
8. Особливості реплікації лінійних молекул ДНК.
9. Основні етапи реплікація геномів вірусів, які представлені кільцевою дволанцюговою ДНК.
10. Роль великого Т-антигену поліомавірусу *Macaca mulatta polyomavirus 1* в процесах реплікації.
11. Основні етапи реплікація геномів вірусів, які мають лінійну дволанцюгову ДНК, що здатна замикатися в кільце.
12. Роль вірусних білків герпесвірусів (*Human Herpesvirus 1*) в процесах реалікації.
13. Основні етапи реплікації геномів вірусів, які представлені лінійною дволанцюговою ДНК, що не здатна замикатися в кільце.
14. В яких вірусах і у яких випадках утворюється форма ДНК «сковородка з ручкою».
15. Особливості реплікації ДНК у *Cowpox virus*.

16. Основні етапи реплікації геномів вірусів, які мають кільцеву одноланцюгову ДНК.
17. Особливості реплікація геномів вірусів, які мають лінійну одноланцюгову ДНК.
18. Поясніть механізм зміщувального синтезу в процесі реплікації у *Primate erythroparvovirus 1 (Parvoviridae)*.
19. Загальні риси реплікації геномів вірусів, що містять РНК.
20. Основні етапи реплікації геномів вірусів, представлених дволанцюговою РНК.
21. Основні етапи реплікації геномів вірусів, представлених одноланцюговою (+)РНК.
22. Роль білків вірусу *Enterovirus C* в реплікації РНК.
23. Особливості реплікації геномів вірусів, представлених одноланцюговою (-)РНК.
24. Роль білків вірусу *Vesiculovirus* в реплікації РНК.
25. Особливості реплікації віроїдів.
26. Основні етапи реплікації ретровірусів.
27. Роль білків *Human immunodeficiency virus 1* для в реплікації провірусної ДНК.
27. Етапи інтеграції провірусної ДНК *Human immunodeficiency virus 1* в ДНК хазяїна.
28. Особливості синтезу вірусних РНК *Human immunodeficiency virus 1*.
29. Основні етапи синтезу вірусних геномів групи VII по Д. Балтимору.
30. Особливості реплікації вірусу *Hepatitis C Virus*.