

# **Molekularna biologija virusov**

Voet 3: poglavje 33

Tropp: poglavje 17

„Virusi so paraziti, sestavljeni iz nukleinskih kislin v zaščitnem ovoju. Razmnožujejo se z uporabo encimskih sistemov gostiteljskih celic.“

- nimajo lastnega metabolizma
- jih ne prištevamo med živa bitja
- nukl. kisline so DNA ali RNA
- ‚genom‘ zapisuje za 1 ali več proteinov (do več sto)
- gostitelji so arheje, bakterije, glive, rastline ali živali
- posamezen tip virusa ima ozek nabor gostiteljskih organizmov

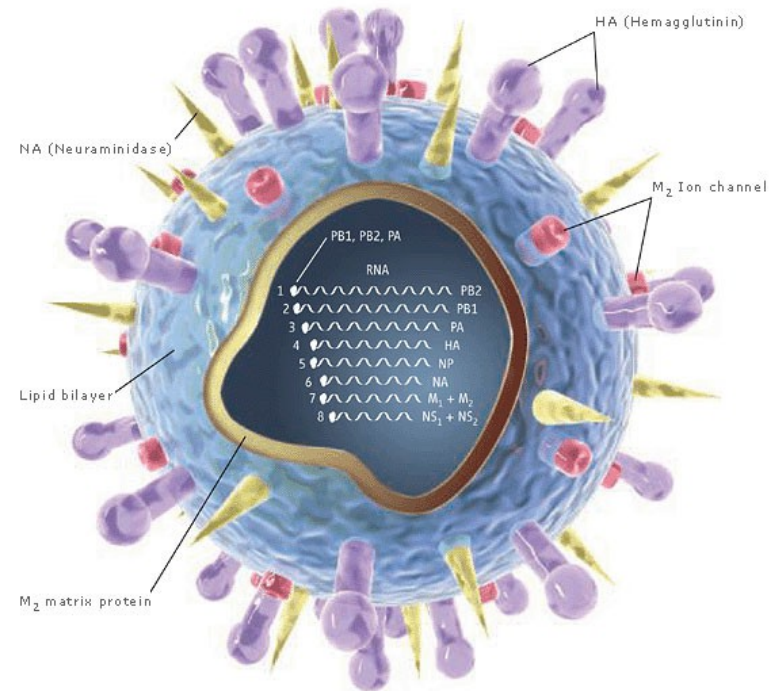
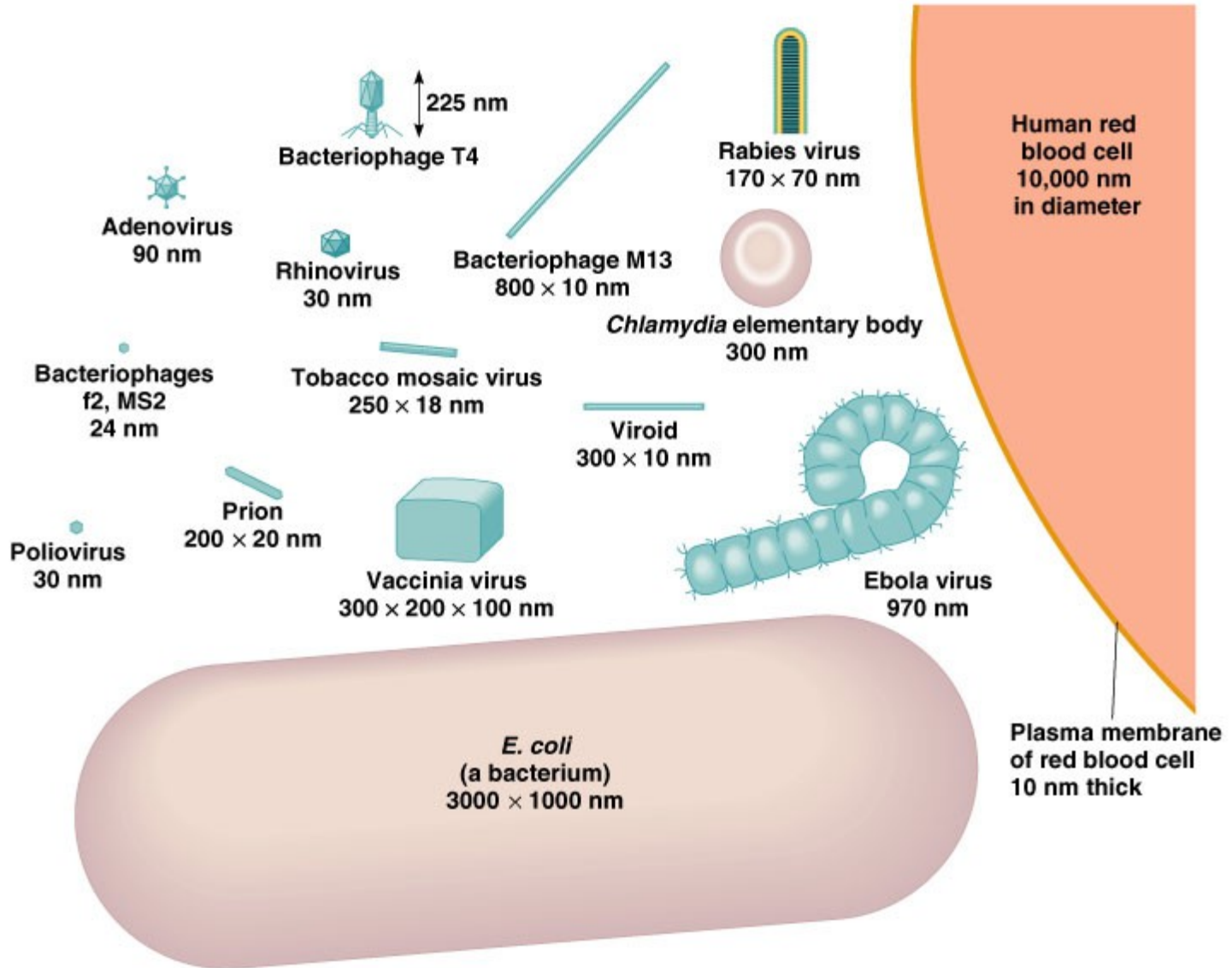
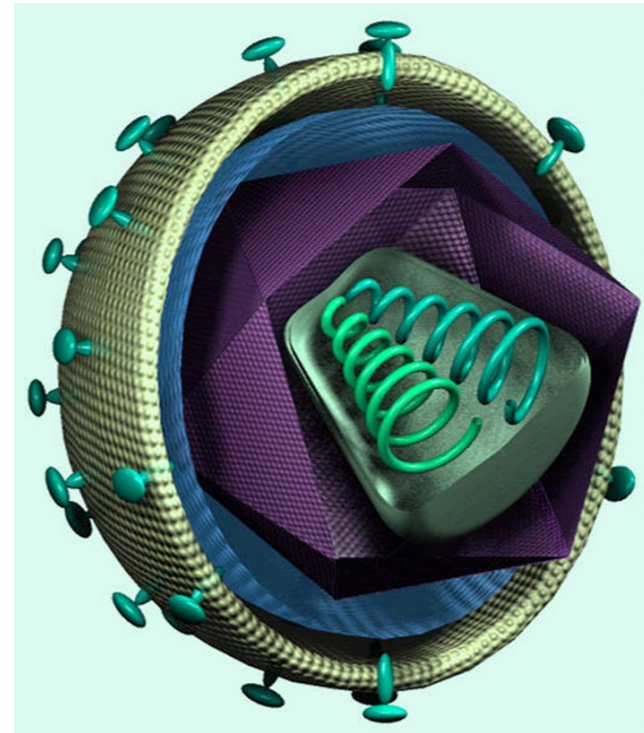
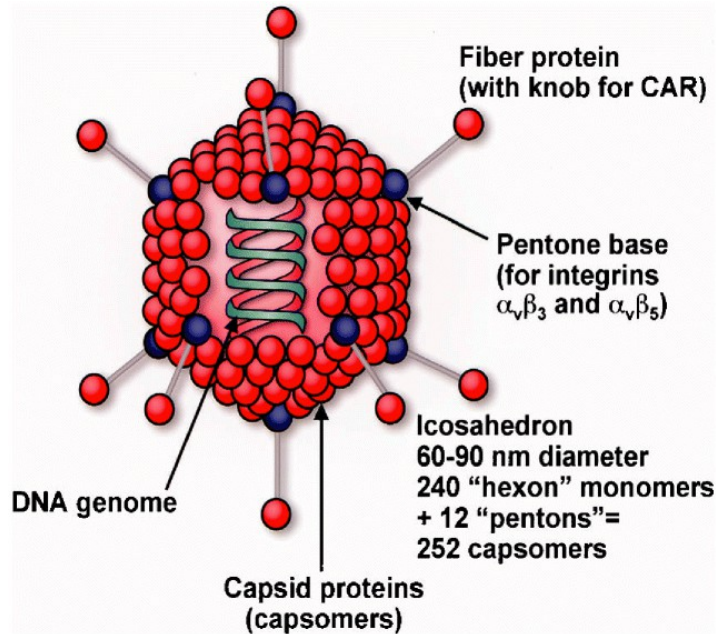


Illustration: Chris Bickel/Science. Reprinted with permission from Science Vol. 312, page 380 (21 April 2006) © 2006 by AAAS



Virion = virusni delec = (nukleinska kislina + proteinska kapsida)  
Kapsidni proteini (kapsomeri) so lahko vsi enaki, lahko pa so različni.

kompleksni virioni imajo kapsido obdano z ovojnico, ki izhaja iz membrane gostiteljskih celic



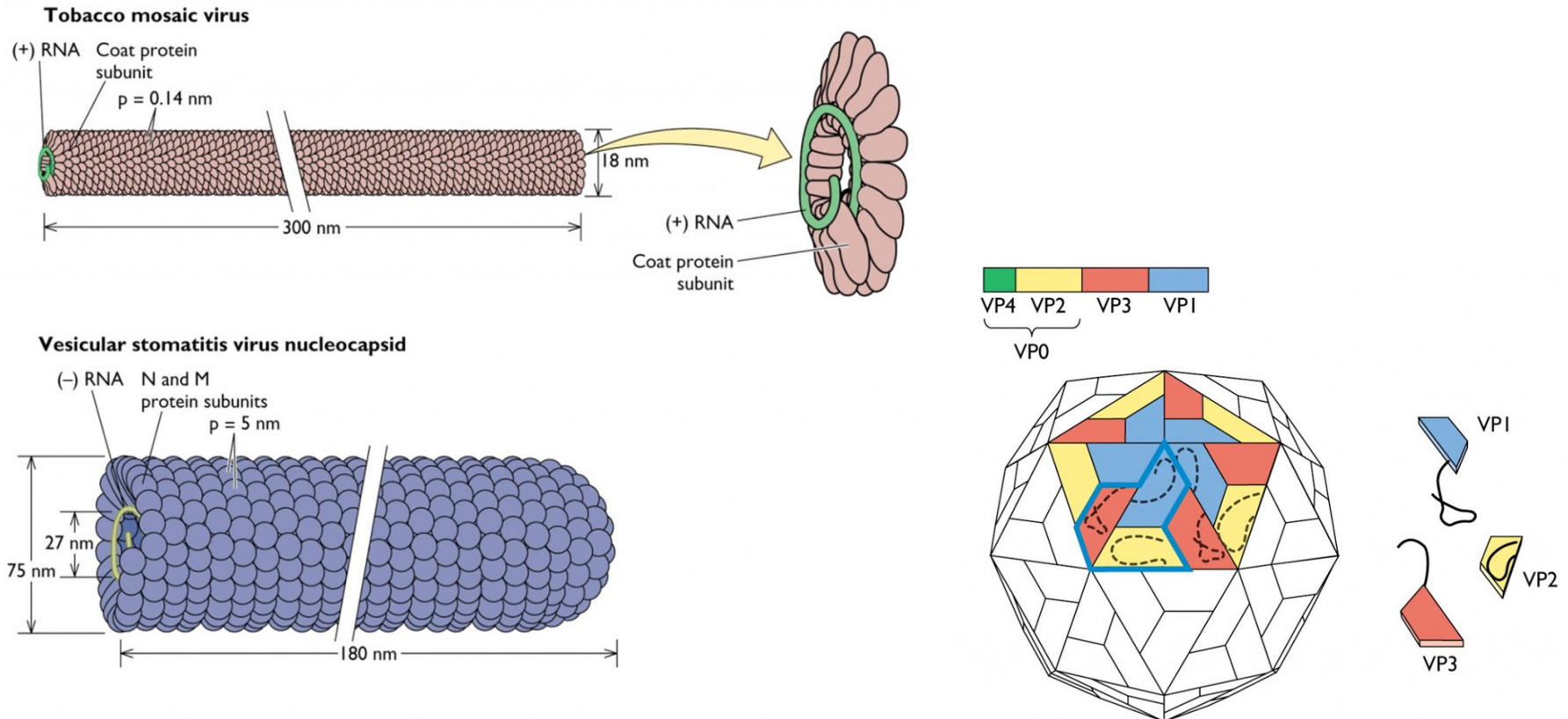
<http://homepages.ed.ac.uk/eang09/LeighBrownGroup.html>

Adenovirusni virion

Glede na strukturo kapside (ki je sestavljena iz enoličnih proteinov) razlikujemo:

- helikalne viruse
- ikozaedralne (kroglaste) viruse
- (- kompleksne viruse)

Med osnovnimi proteinskimi molekulami plašča (kapside) so lahko umeščeni drugi proteini → bodice in repi, ki sodelujejo pri prepoznavanju gostiteljskih celic in vezavi nanje.





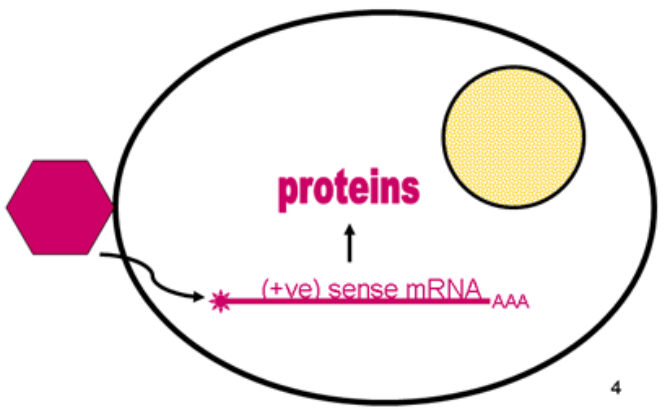
Nukleinska kislina je vedno v sredini viriona.

Lahko je ss ali ds, DNA ali RNA → zelo različni načini podvojevanja genoma.

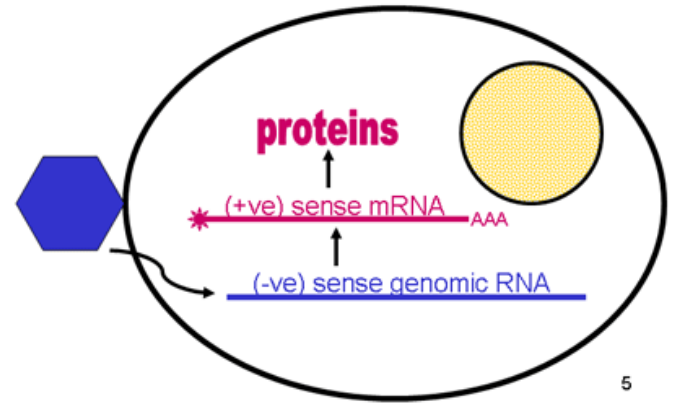
- DNA-virusi lahko nukl. kislino podvojujejo avtonomno ali pa jo vgradijo v gostiteljsko DNA (pri evkariontih torej v citoplazmi ali v jedru).
- Pri RNA-virusih se RNA podvojuje direktno ali preko DNA.
- ssRNA-virusi imajo genom kot + (ekvivalent mRNA) ali – verigo (komplementarna mRNA).

## Need to make mRNA

### PLUS (POSITIVE) SENSE RNA GENOMES

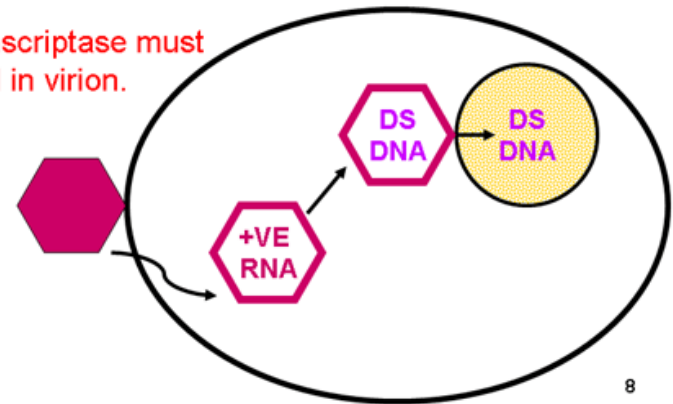


### MINUS (NEGATIVE) SENSE RNA GENOMES



### RETROVIRUSES

Reverse transcriptase must be packaged in virion.



# RNA VIRUS STRATEGIES

## RNA → RNA

RNA-dependent RNA polymerase

## RNA → DNA

RNA-dependent DNA polymerase  
- reverse transcriptase

## Host cell DNA → mRNA

DNA-dependent RNA polymerase

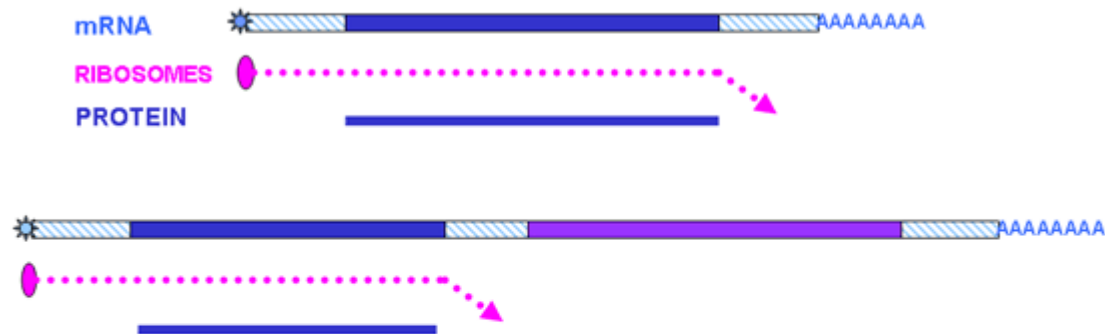
## RETROVIRUSES

Genome	DNA-dependent RNA polymerase (=reverse transcriptase) in virion	Infectivity of RNA	Initial event in cell
Plus-stranded RNA	Yes	Non-infectious	Reverse transcription

## RNA viruses that do NOT have DNA phase

Genome	RNA-dependent RNA polymerase (=transcriptase) IN VIRION	Infectivity of RNA	Initial event in cell
Plus-stranded RNA	No	Infectious	Translation
Negative-stranded RNA	Yes	Non-infectious	Transcription
Double-stranded RNA	Yes	Non-infectious	Transcription

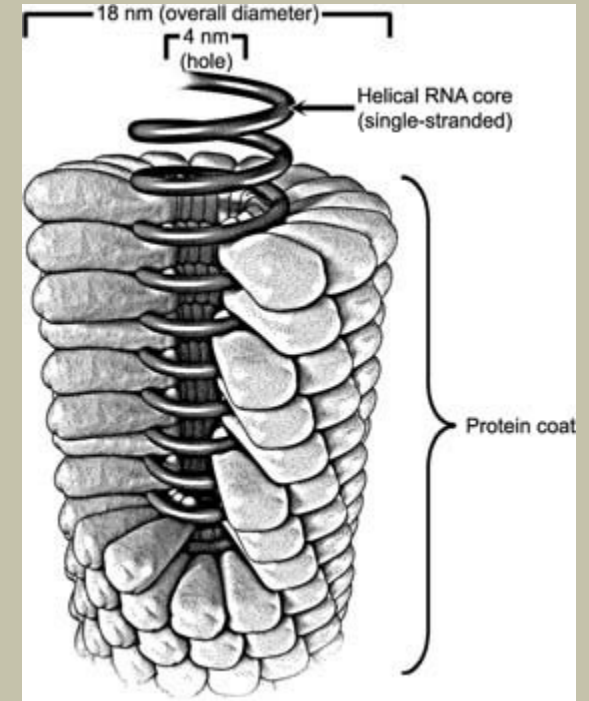
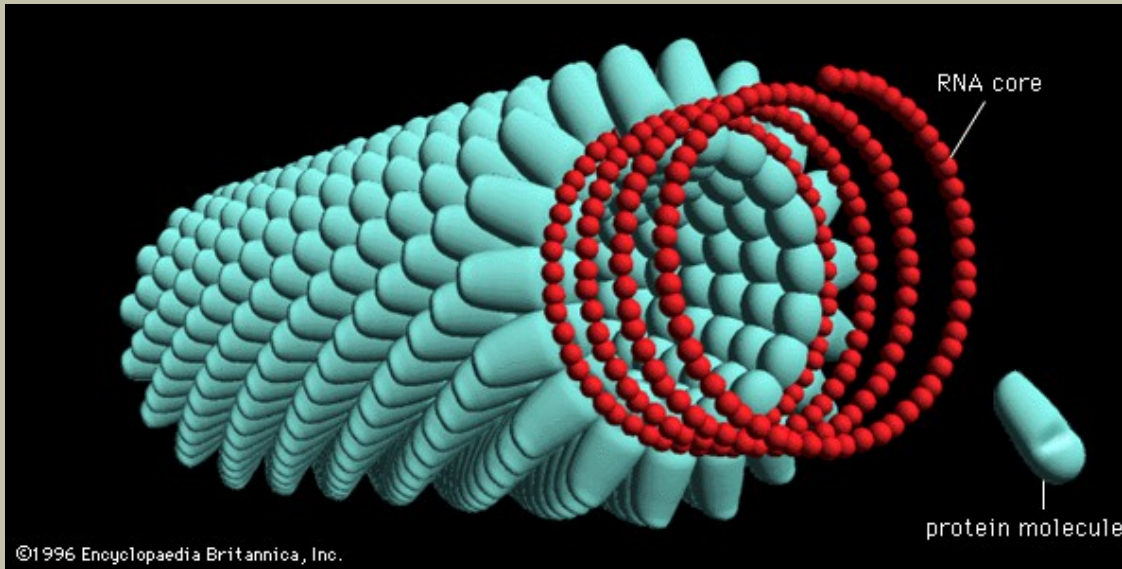
# The monocistronic mRNA problem



- Make one monocistronic mRNA per protein
- Make a primary transcript and use alternative splicing
- Make a large protein and then cut it into smaller proteins
- Find a way to make mRNAs function in a polycistronic fashion
- etc (viruses have come up with some other solutions)



# Virus mozaika tobaka (TMV)



Vikram K. Mulligan

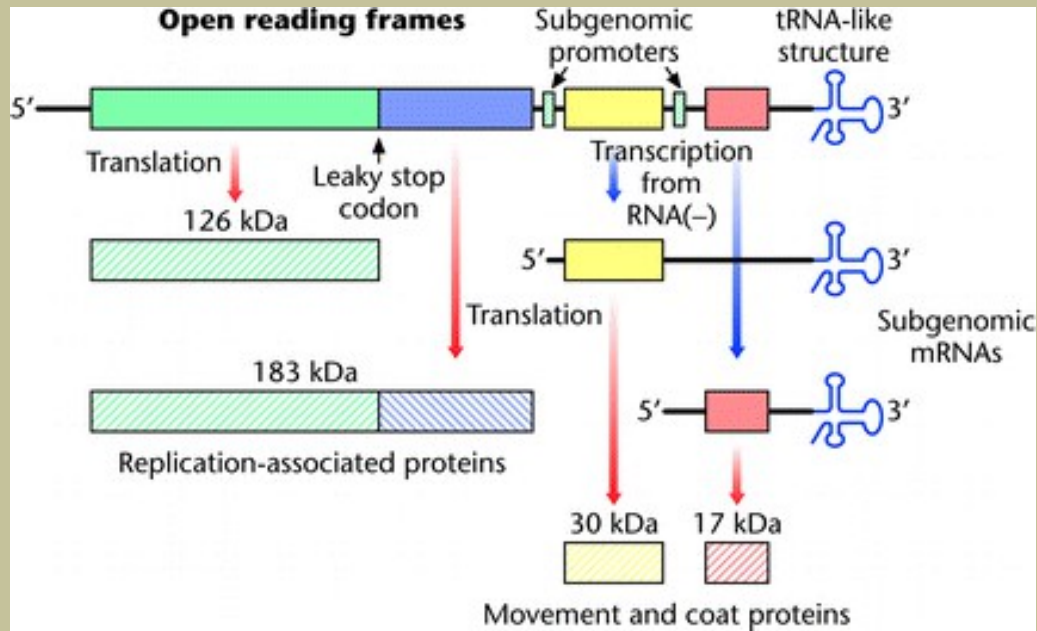
RNA+, 6400 nt (2 MDa), kapa, 4 ORF

protein ovojnice: 158 AK (17,5 kDa), veže 3 nt, 17 podenot na zavoj RNA, 2130-mer (129 zavojev)

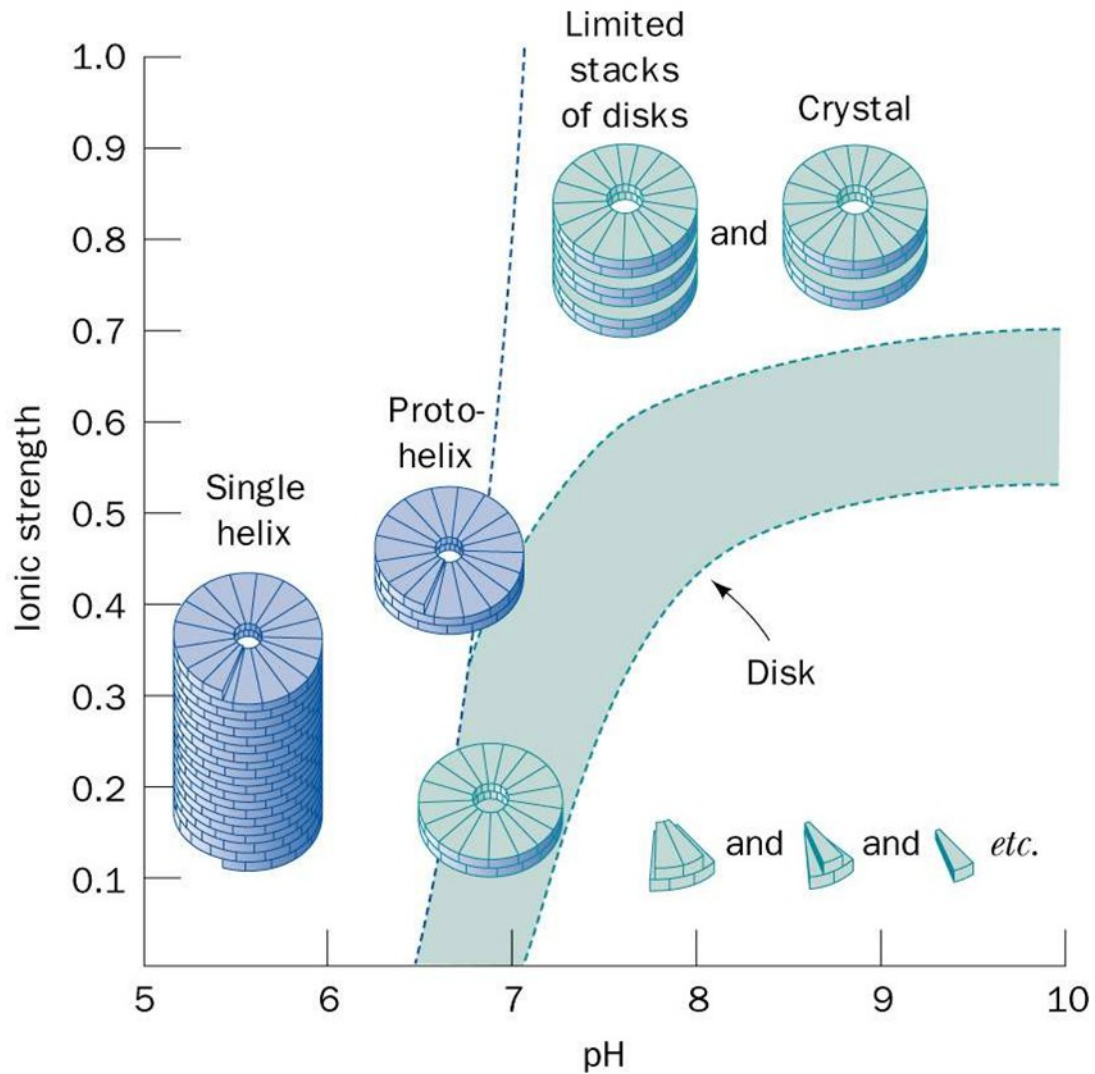
ORF1/2: 126/183 kDa, od RNA odvisna RNA-polimeraza

ORF3: 30 kDa, transportni protein za virione (preko plazmodezem v rastlinski steni)

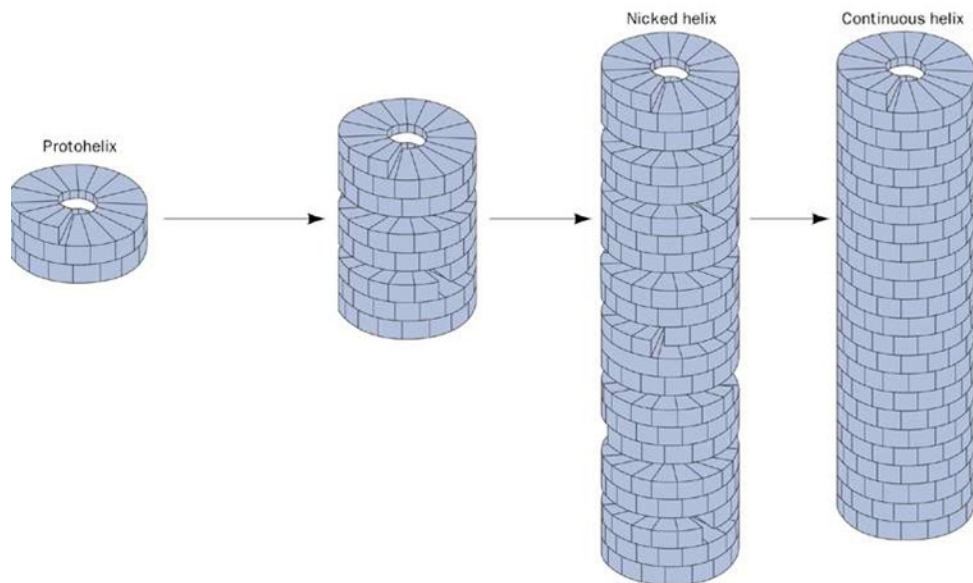
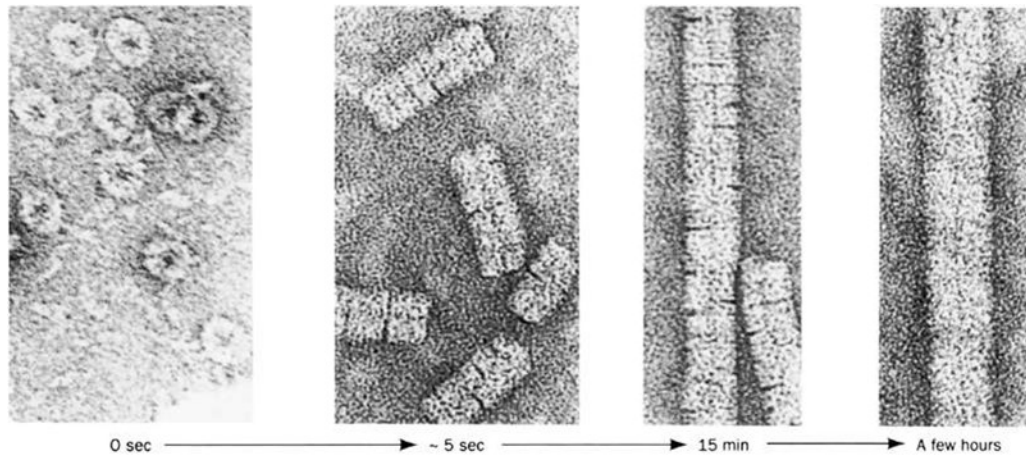
skupaj 40 MDa



DOI: 10.1038/npg.els.0001086

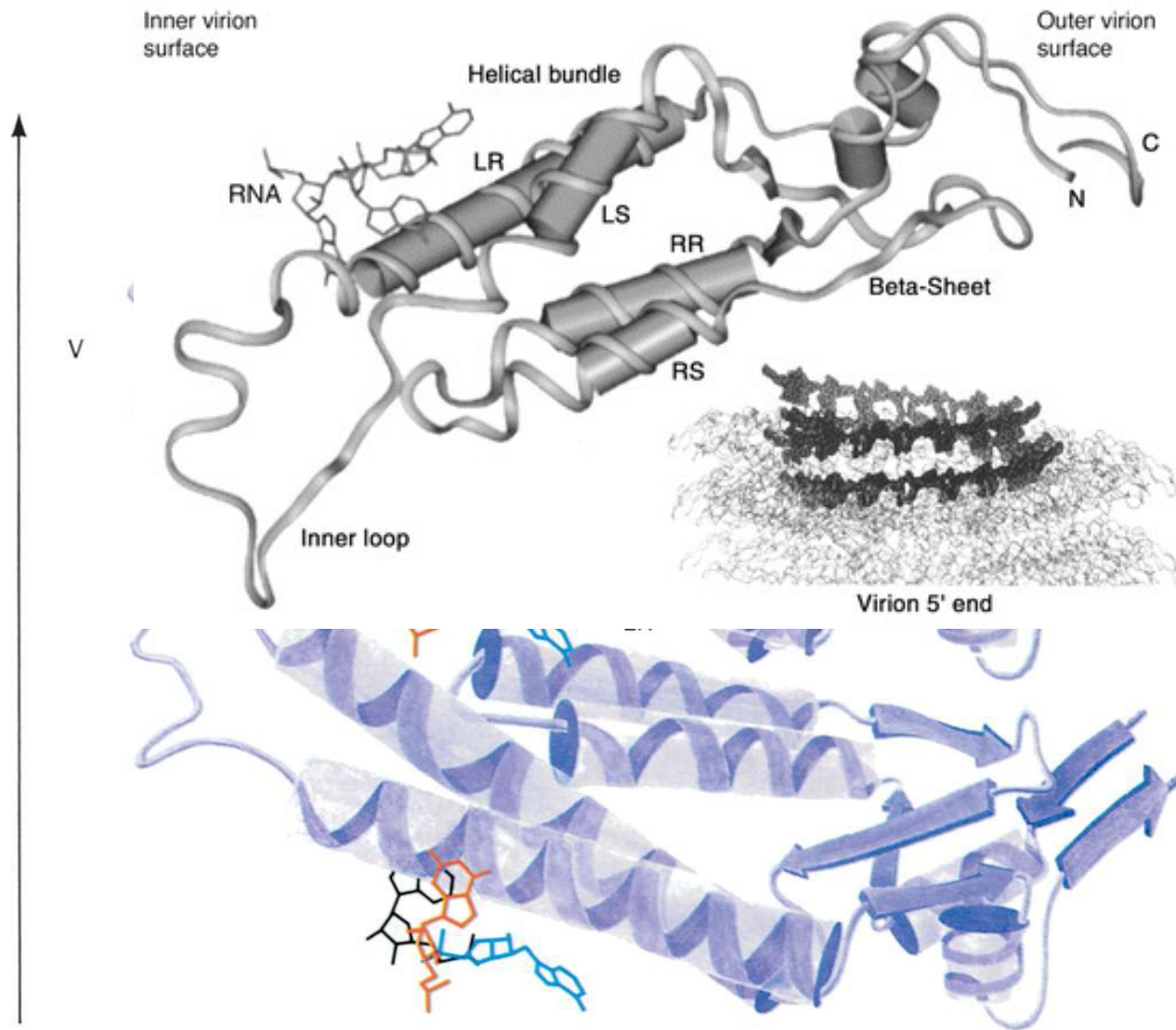


Sestavljanje ovojničnih proteinskih podenot TMV v odvisnosti od pH in ionske moči



Courtesy of Aaron Klug, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K.

Rast paličastih ovojníc TMV ob prehodu pH 5 → 7 in nizki ionski moči



Dve podenoti ovojnice TMV na osnovi rentgenske strukture (2,9 Å) paralelno orientiranih virusnih ovojnic, ki oblikujejo gel, s prikazanimi 3 nt RNA.

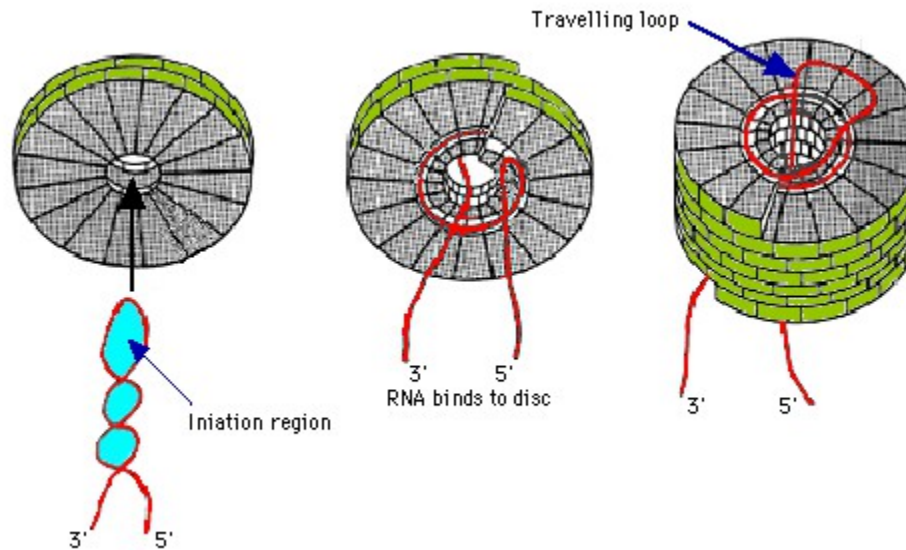


## Sestavljanje viriona:

- nukleacija
- rast strukture

Nukleacijski kompleks: RNA + proteinske podenote

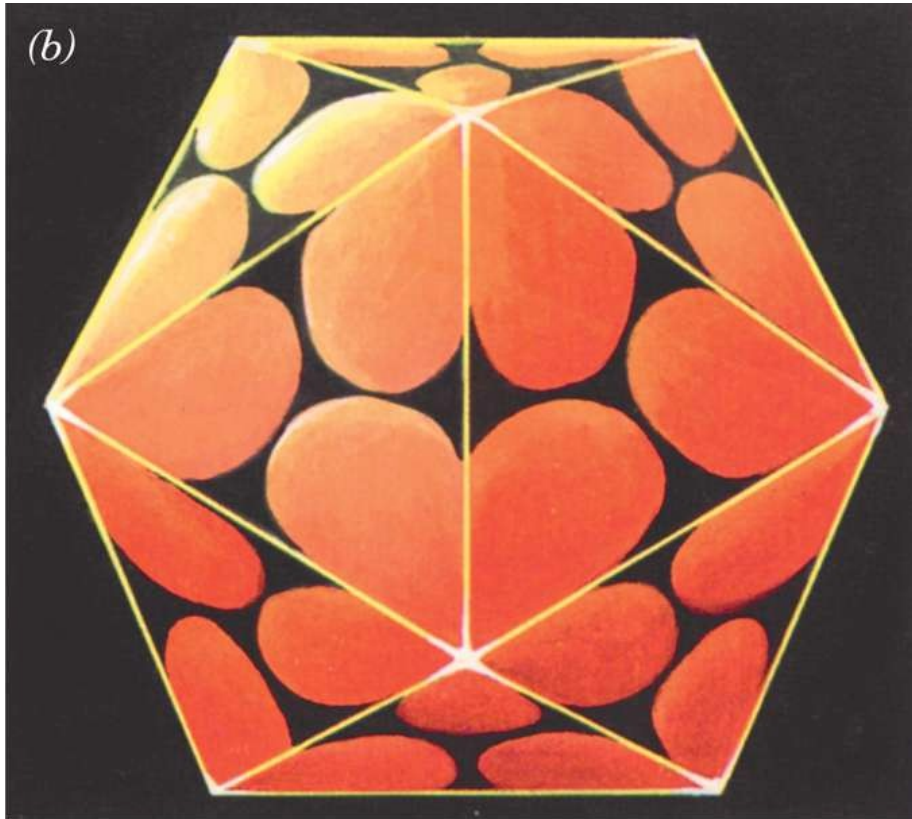
V pogojih *in vivo* poteka interakcija med RNA in protoheliksi



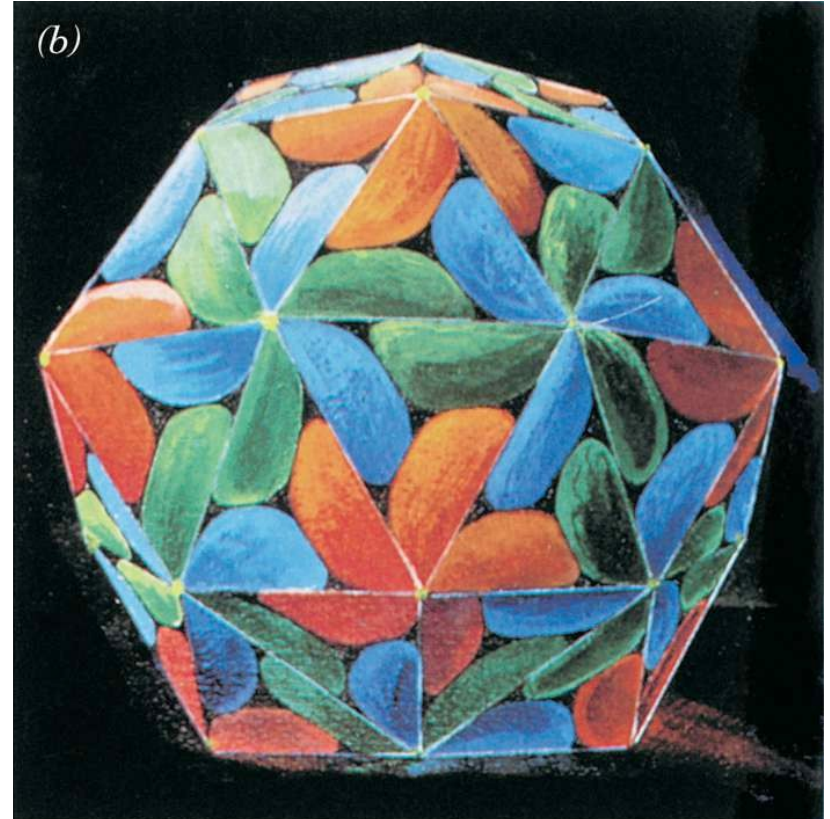




Ikozaeder: 20 enakih ploskev (enakostraničnih trikotnikov), pri čemer vsaka omogoča po tri ekvivalentna mesta (skupaj 60 enakovrednih elementov). V naravi virusni ikozaedri niso idealni, saj so proteinske podenote lahko razporejene nekoliko nesimetrično.



Illustration, Irving Geis/Geis Archives Trust, Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission



Illustration, Irving Geis/Geis Archives Trust, Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission

# Struktura TBSV

RNA-virus (4800 nt), ikozaeder ( $2r = 175 \text{ \AA}$ ), kapsida iz 180 x 43 kDa (386 AK)  
Razen (+) verige RNA kapsida ovija še 1 kopijo proteina z 85 kDa.

Rentgenska struktura (1978): prva struktura virusa z visoko ločljivostjo.

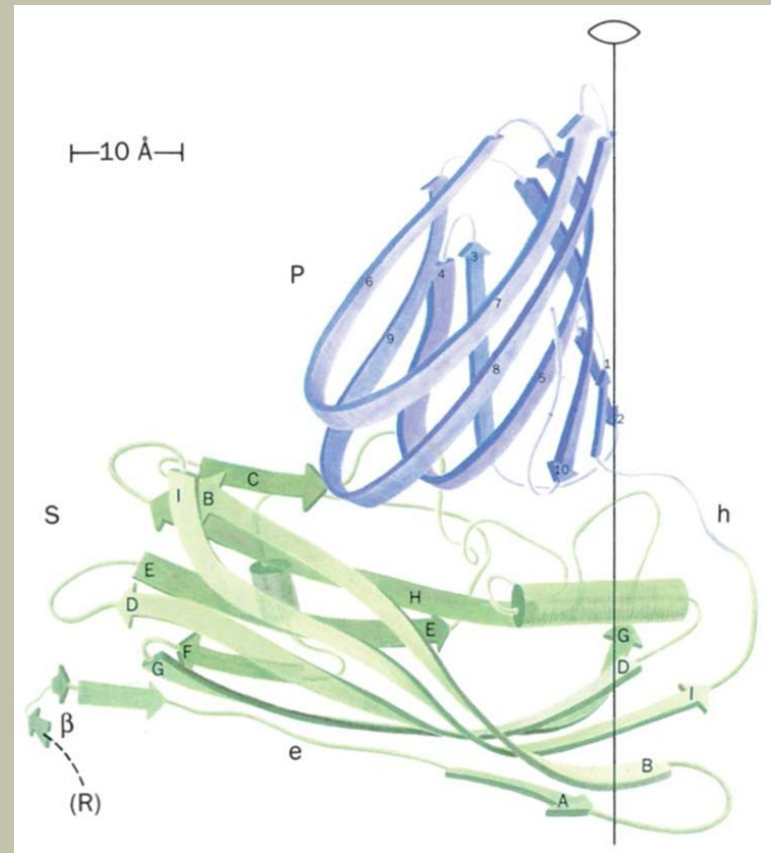
Protein ovojnice ima tri domene: P, S in R:

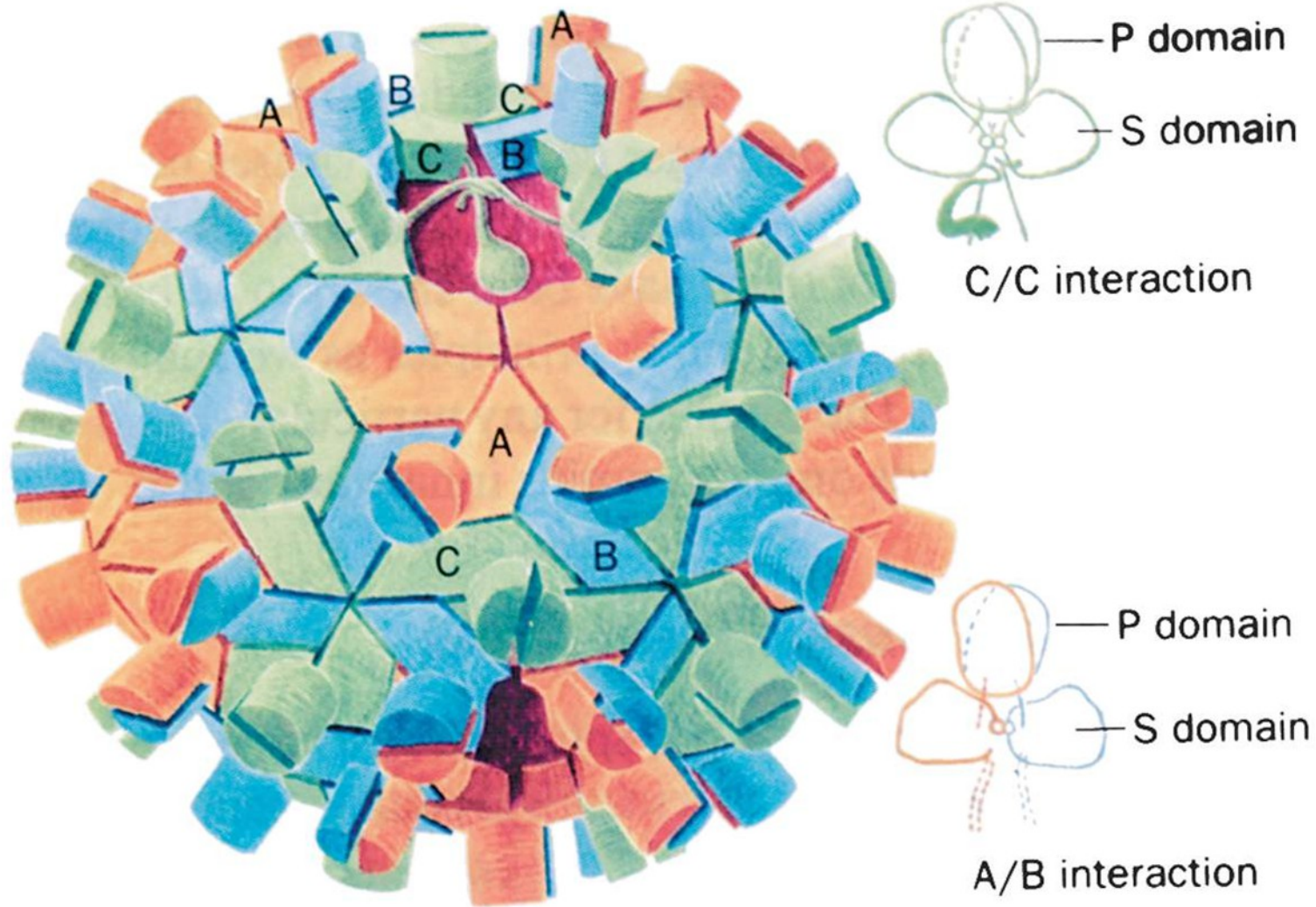
P: gleda iz strukture kapside, C-končna,

S: oblikuje osnovno površino kapside,

R: notranja, veže RNA preko Arg/Lys, N-končna.

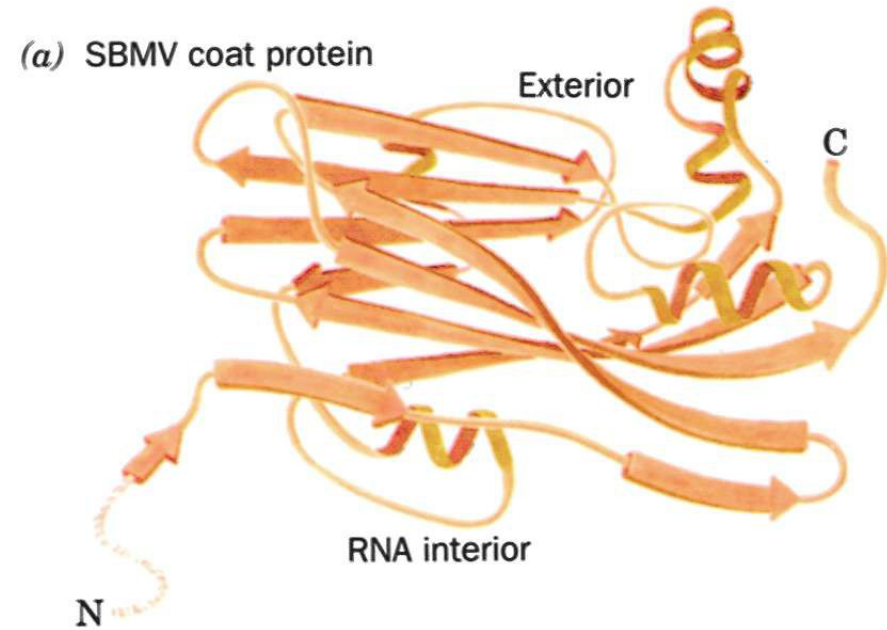
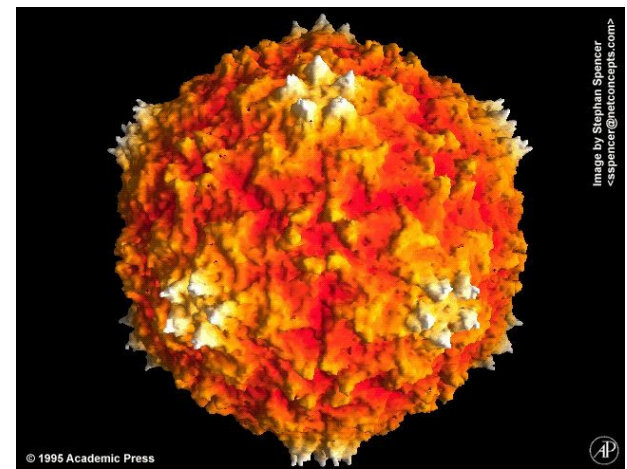
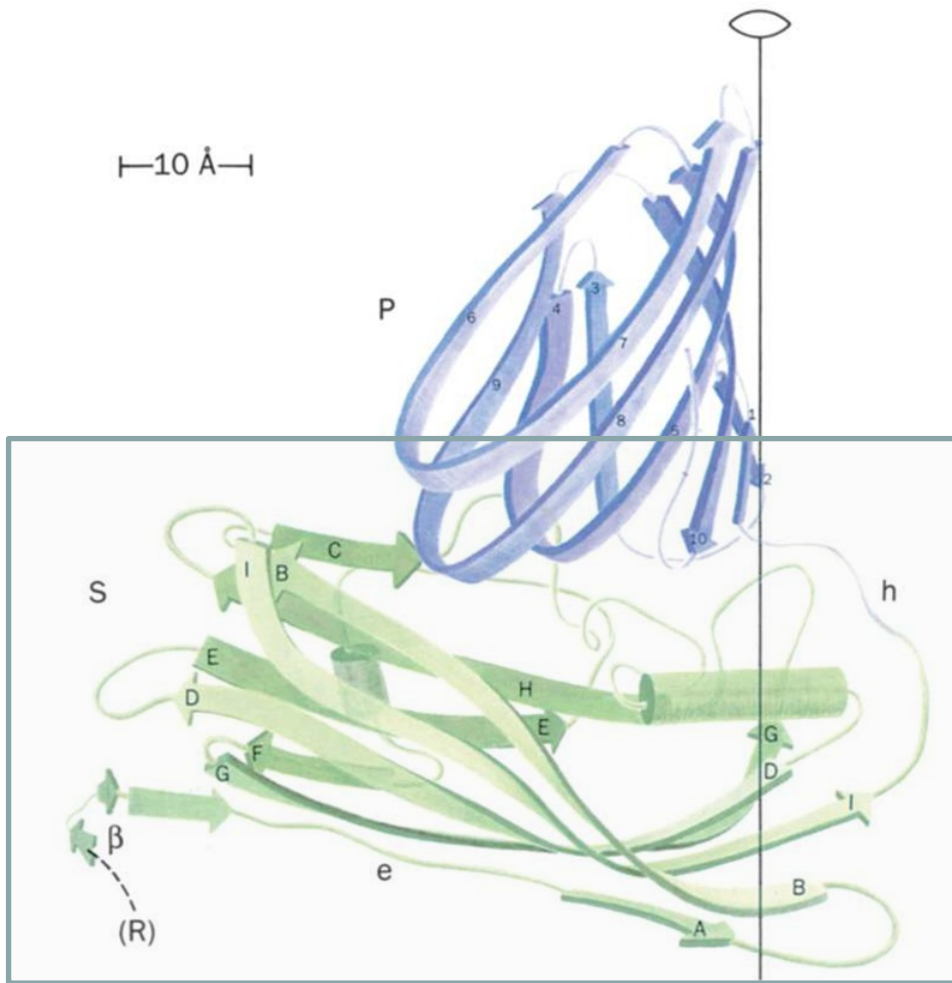
Domeno S sestavlja antiparalelni beta-sodček (topologija rolade): taka struktura je pogosta pri večini proteinov plašča ikozaedrskih virusov.





Stiki med podenotami so raznoliki zaradi razmestitve podenot v simetričnih ploskvah ikozaedra (60 orientacij A, 60 B, 60 C).

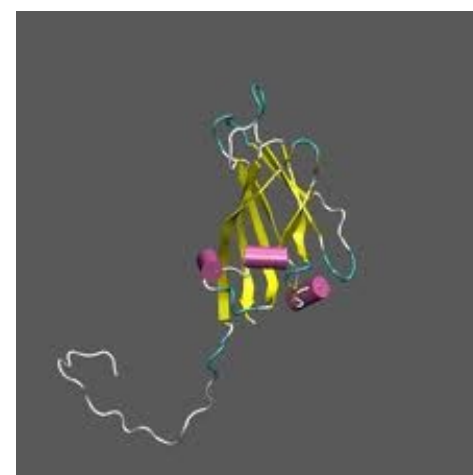
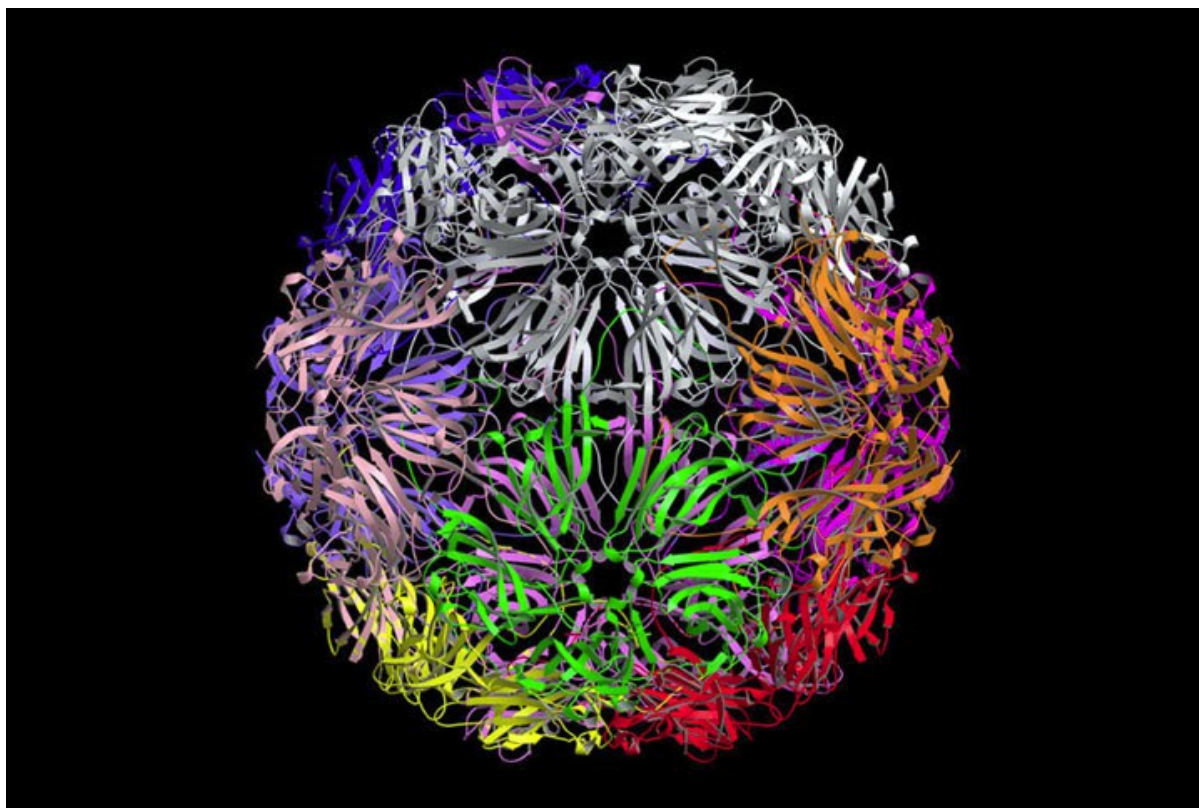




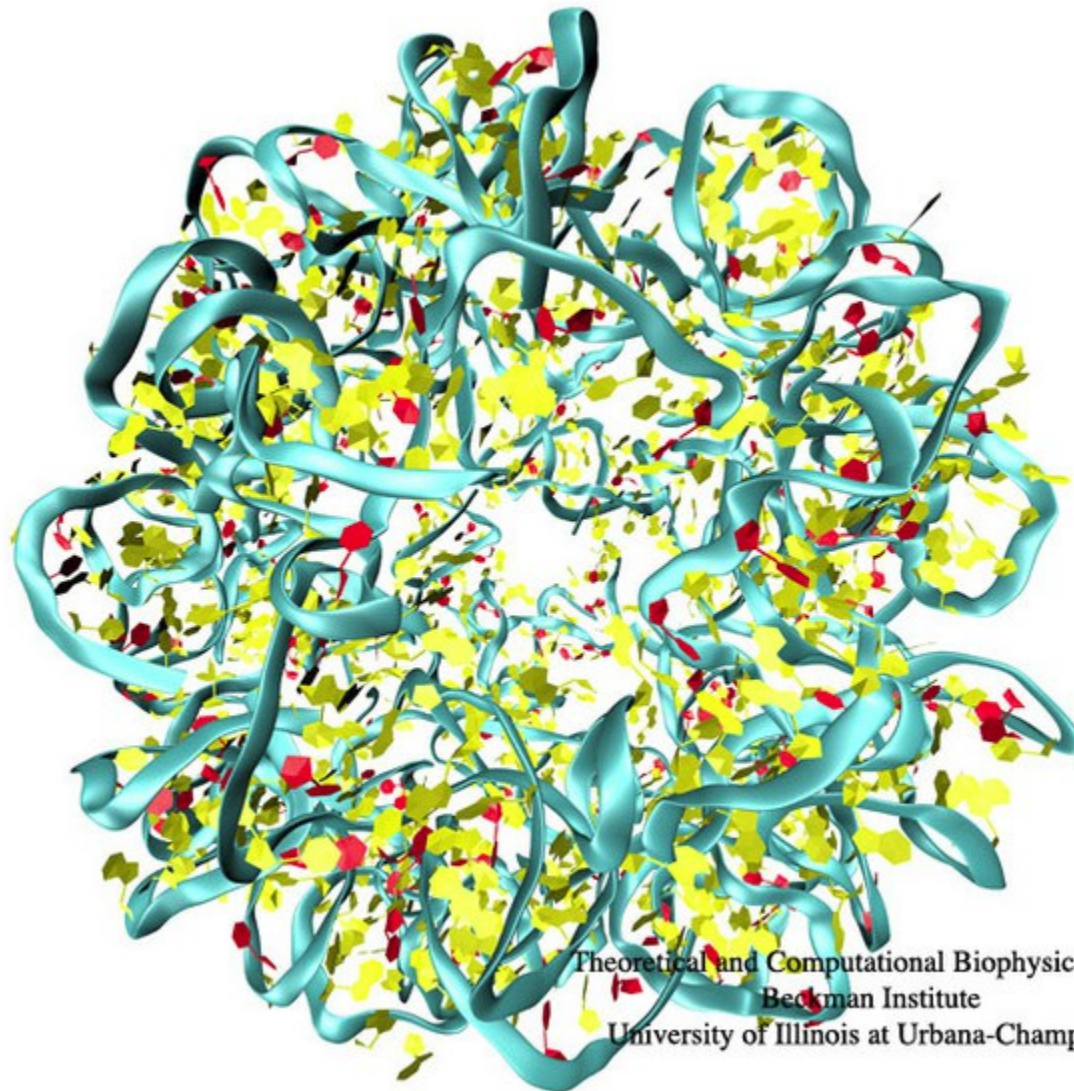
Primerjava struktur domene S plaščnega proteina TBSV in SBMV (virusa mozaika južnega fižola).

## Satelitni virus mozaika tobaka (STMV)

Ikozaedrski virus, ki lahko spremlja okužbo z virusom mozaika tobaka (TMV; nitast). Eden od najmanjših virusnih genomov (RNA, 1063 nt), 1 ORF (za protein ovojnice). Sistem za razmnoževanje prevzame od gostiteljske celice in TMV. Protein ovojnice nastopa v 60 kopijah.





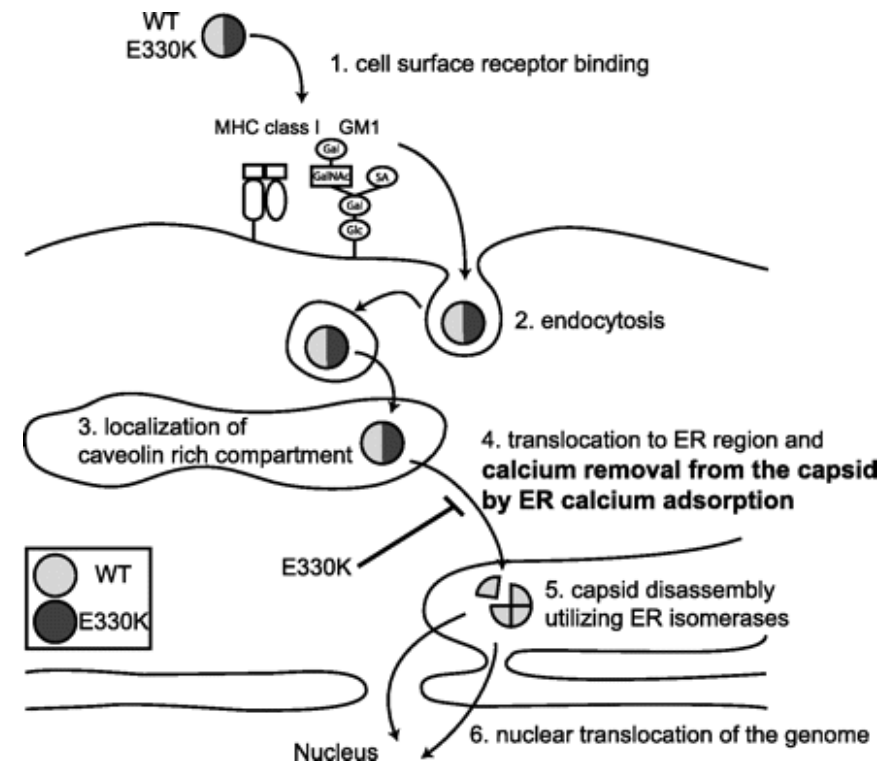
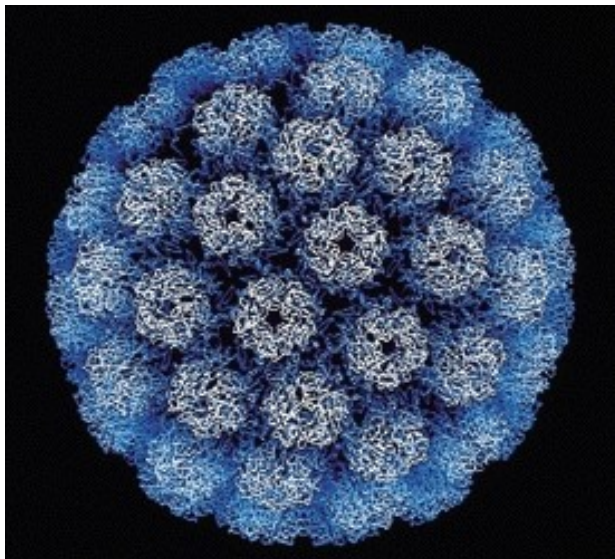


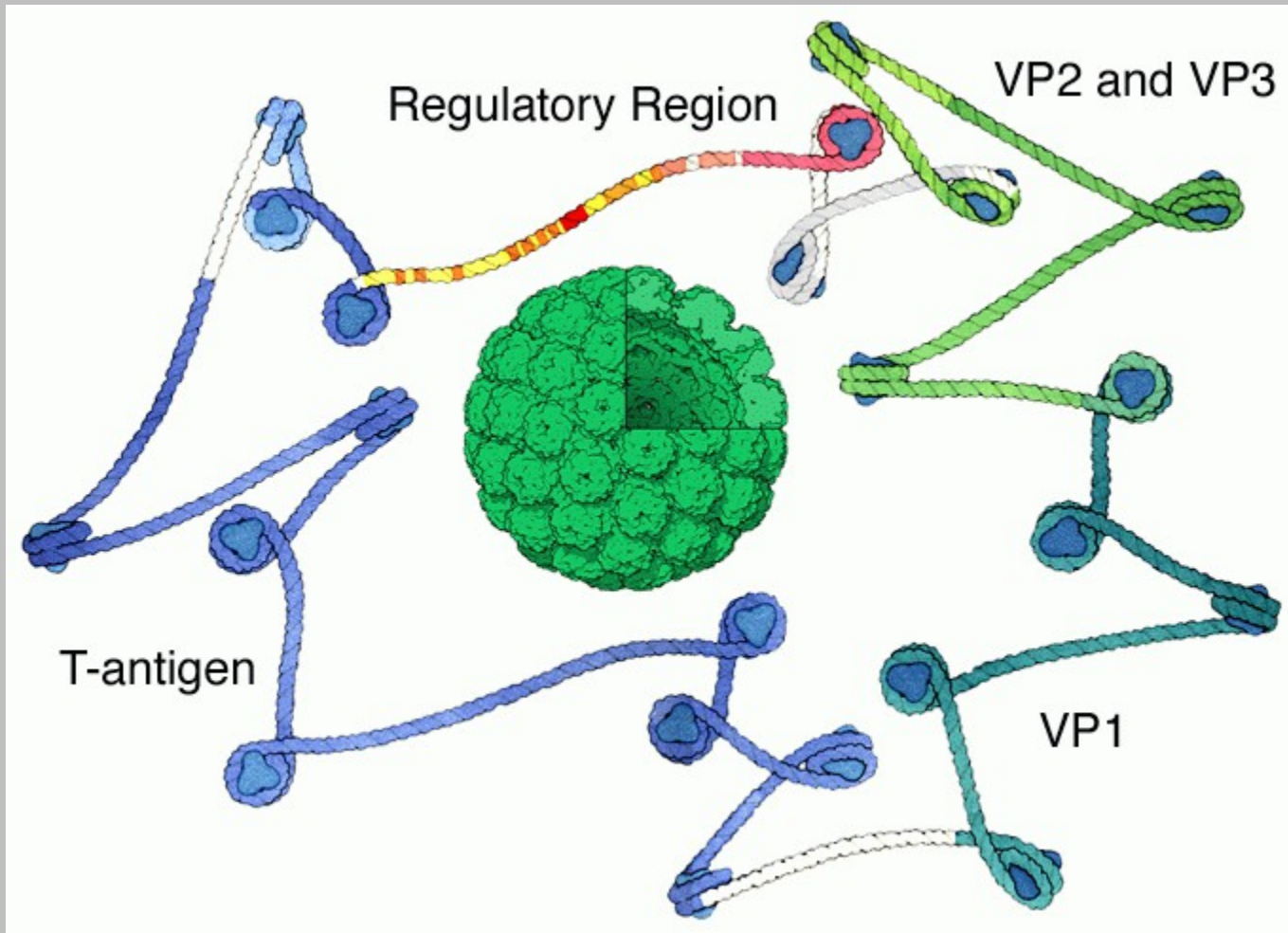
Theoretical and Computational Biophysics Group  
Beckman Institute  
University of Illinois at Urbana-Champaign

Zvitje RNA znotraj virusnega delca STMV

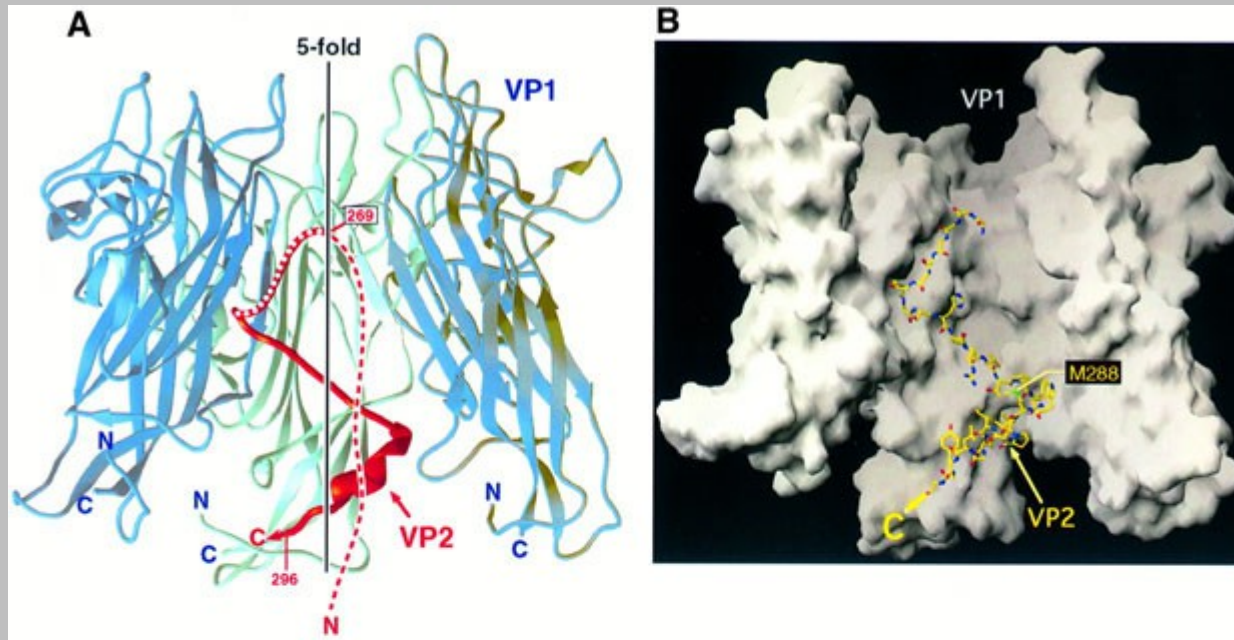
# Opičji virus 40 (SV40)

- skupina poliomavirusov
- napade predvsem opice in človeka, lahko povzroča tumorje, a je običajno latenten
- ikozaedrski, 2r~50 nm
- dsDNA, 5243 bp, krožni ‚minikromosom‘ vsebuje tudi histone
- kapsida je iz proteinov VP1, VP2 in VP3
- 360 kopij VP1 (361 AK), razmeščenih v 72 pentamerov
- VP1 je glikoprotein
- SV40 okuži celice, ki imajo na površini receptor za VP1



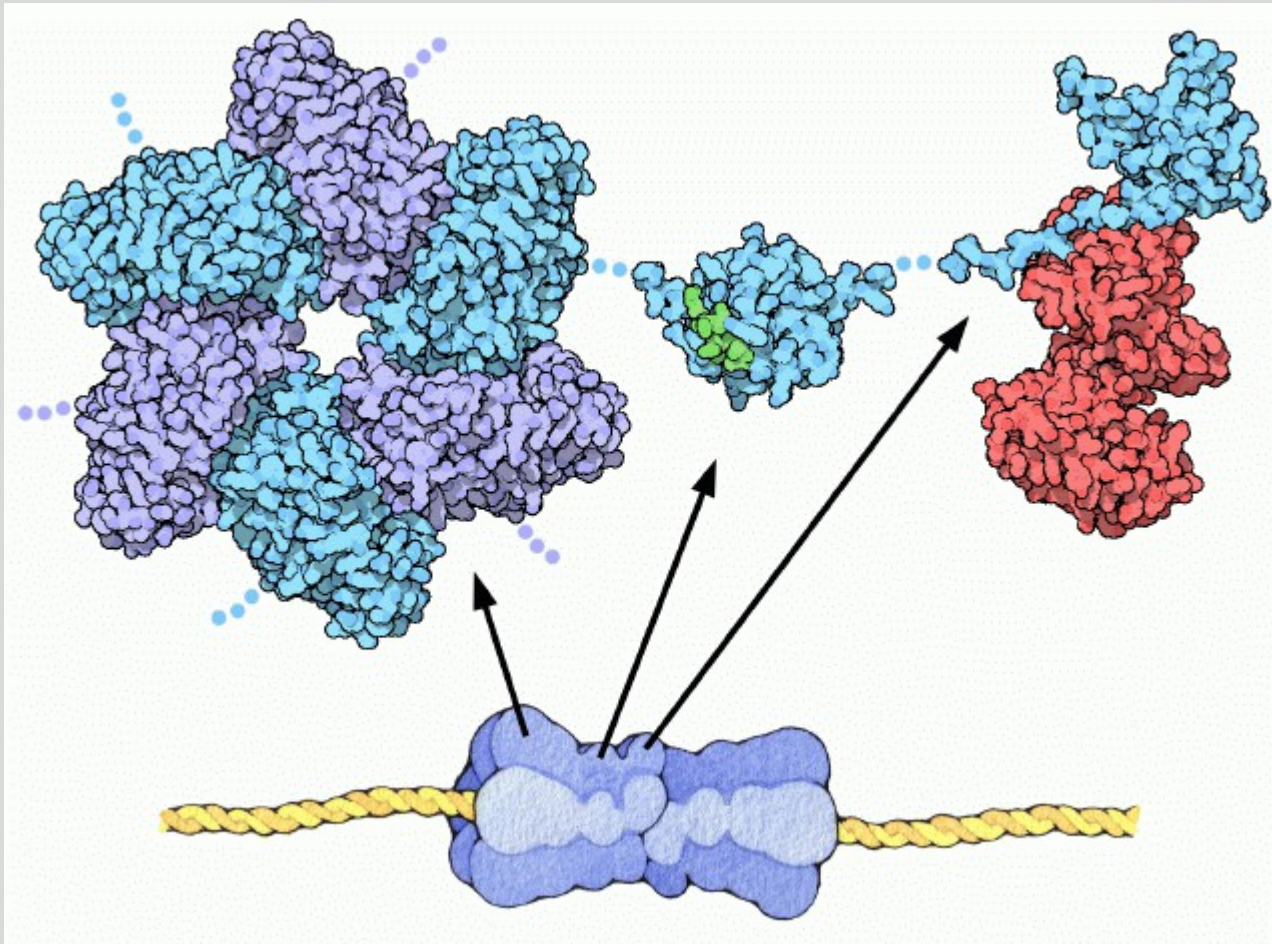






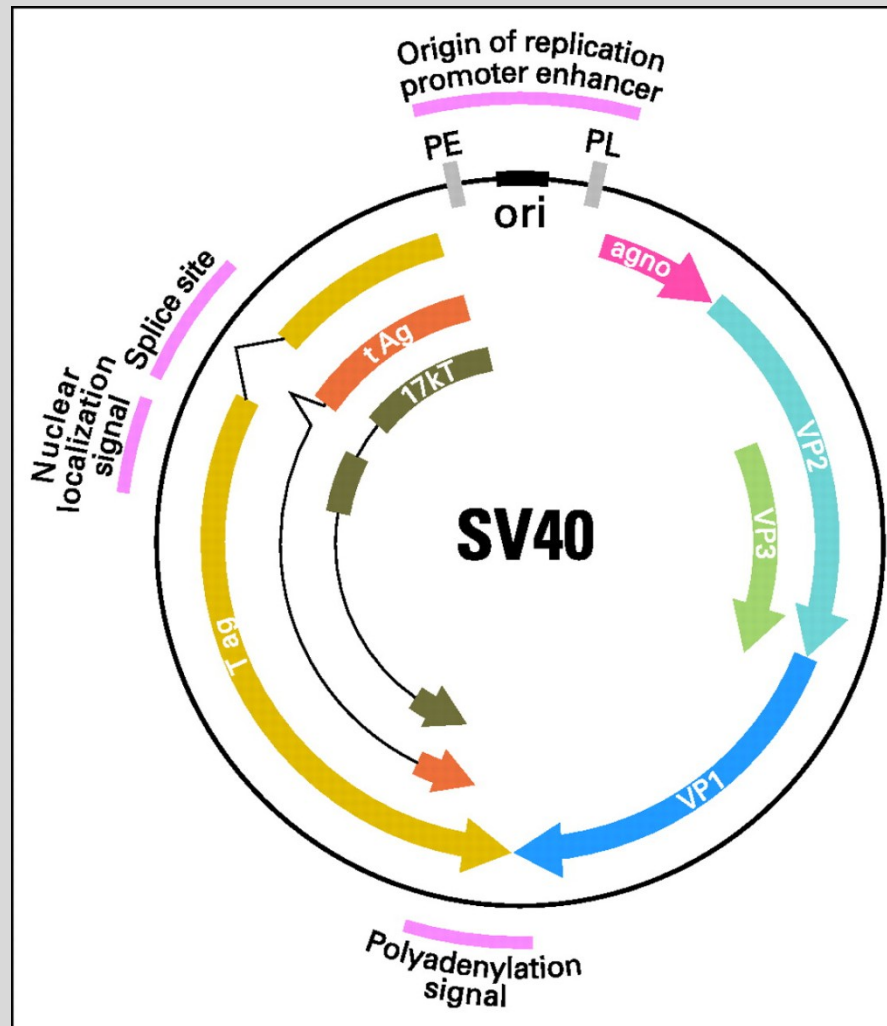
EMBO J. (1998) 17, 3233 - 3240

Na pentamer VP1 se veže VP2 ali VP3, ki sta večinoma umaknjena pod površino kapside. C-končne ročice segajo v območje sosednjih pentamerov in stabilizirajo kapsido.



<http://www.pdb.org/>

Strukturni elementi T-antigena: helikaza, vezavna domena za regulatorno regijo na lastnem genomu in interakcijska domena za celične proteine (uravnavanje življenjskega cikla). 12 podenot T-antigena se sestavi vzdolž DNA v obliki cevi.



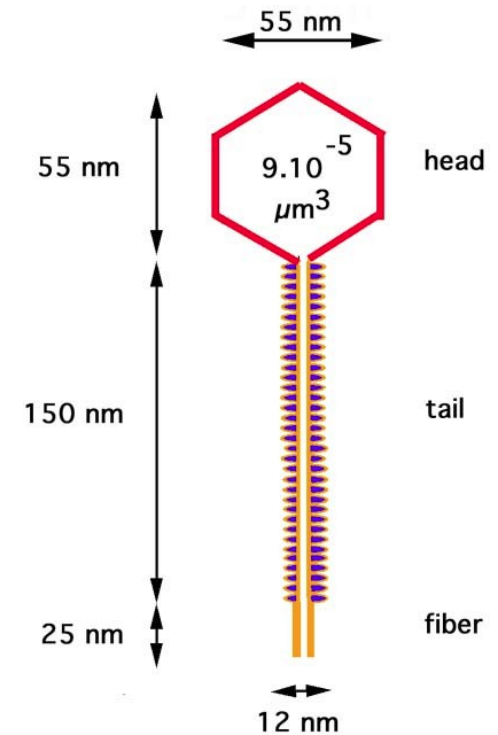
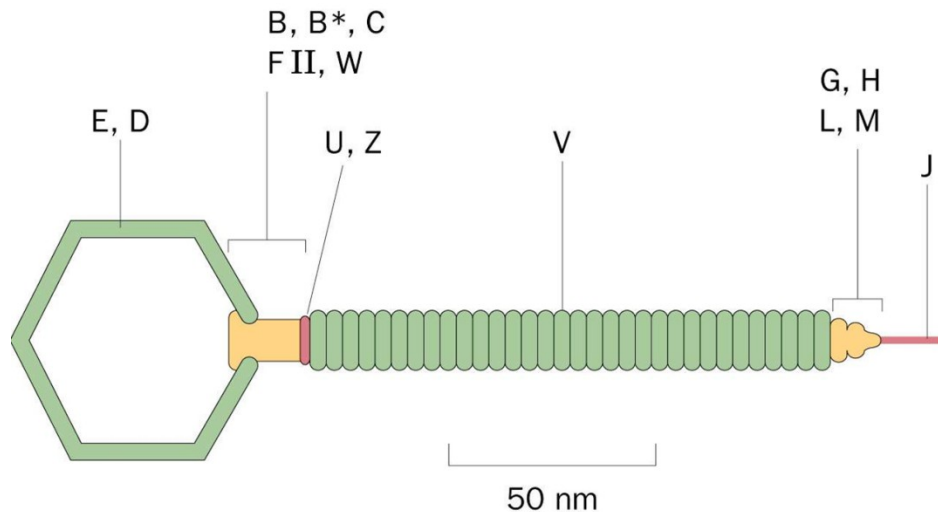
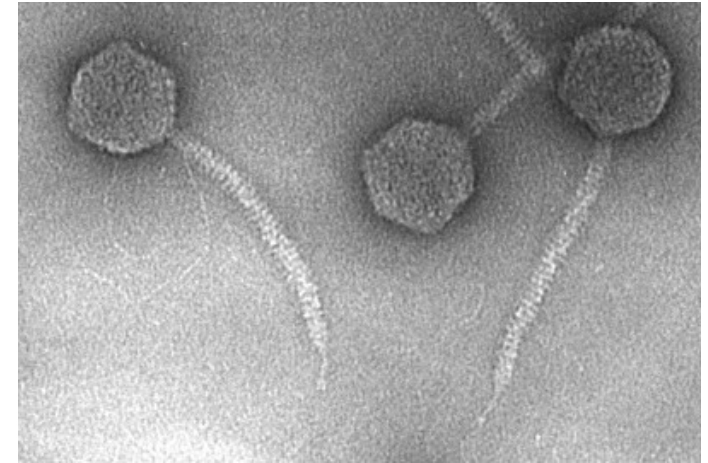
J. Clin. Oncol. 24, 4356-4365 (2006)

Genska karta minikromosoma SV40



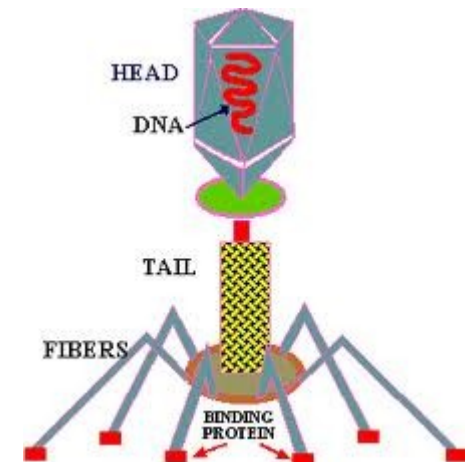
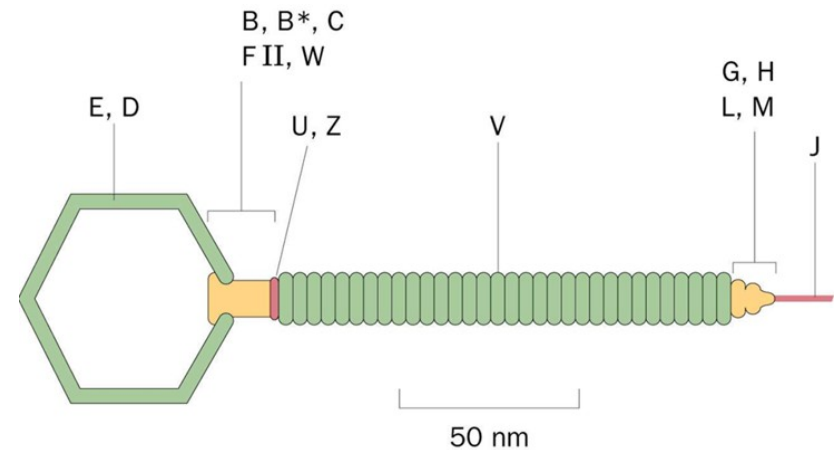
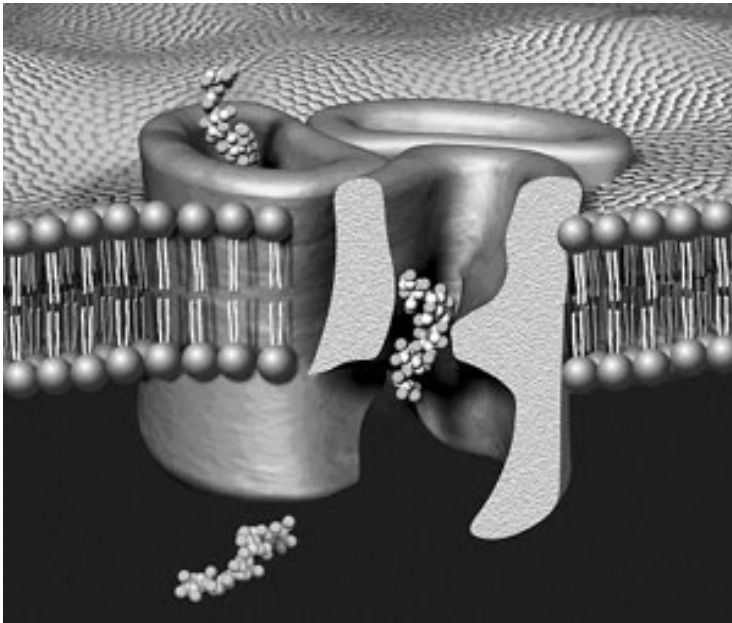
# Bakteriofag lambda

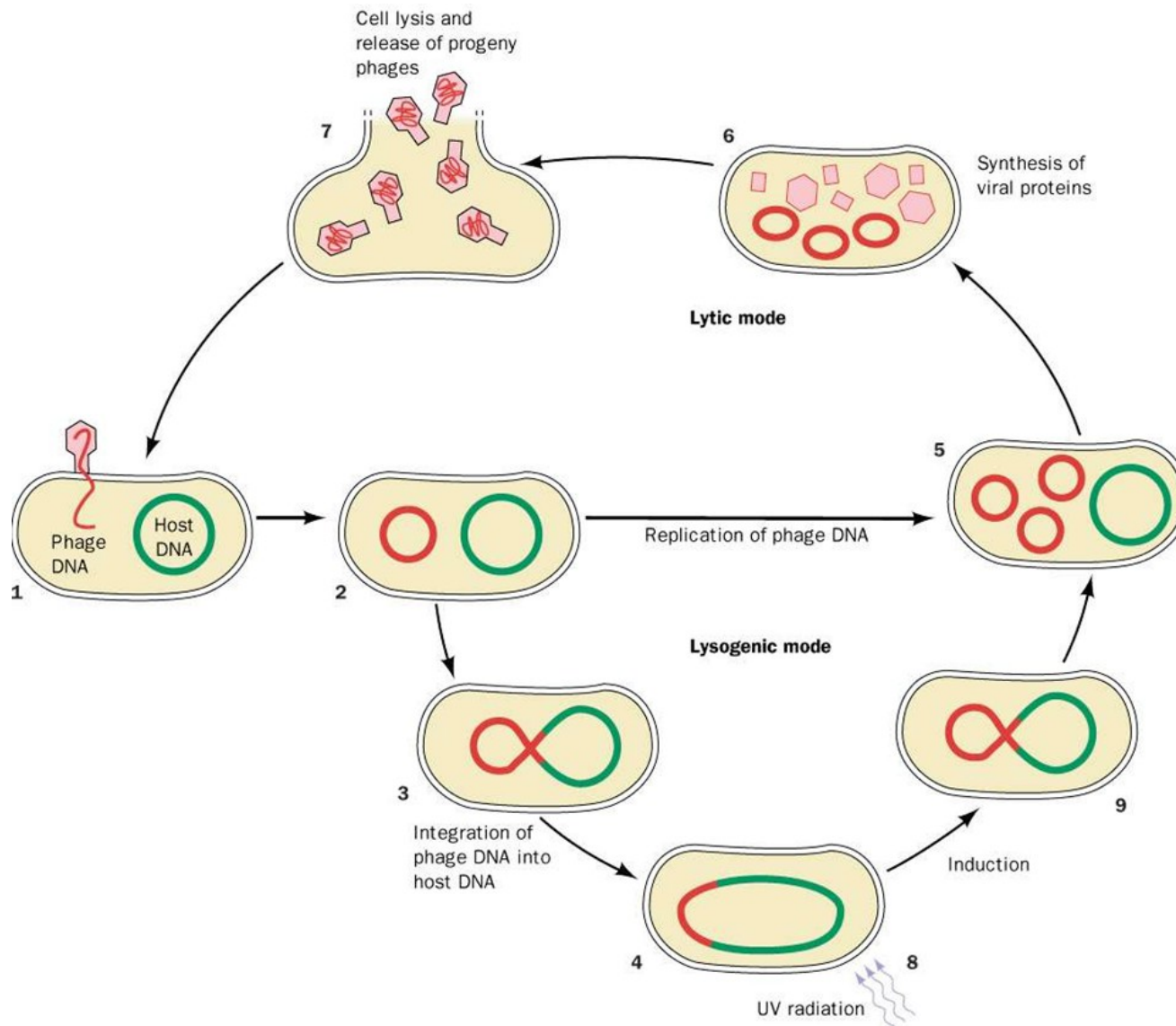
- kolifag z ikozaedrsko glavo in fleksibilnim repom
- linearna dsDNA, 48.502 bp, ~50 ORF
- eden najbolj raziskanih kompleksnih virusov
- uporaben tudi v DNA-tehnologiji kot vektor
- zapleten življenjski cikel
- temperatni fag (obstaja v dveh življenjskih oblikah)



## Vezava viriona in vstop DNA

Fag  $\lambda$  se s proteinom J adsorbira na protein LamB (receptor) v zunanji membrani *E. coli*. Protein LamB je trimerni porin, ki je receptor tudi za nekatere druge fage. Skozi notranjo membrano DNA potuje s posredovanjem proteina PtsG (sicer transporter za manozo).

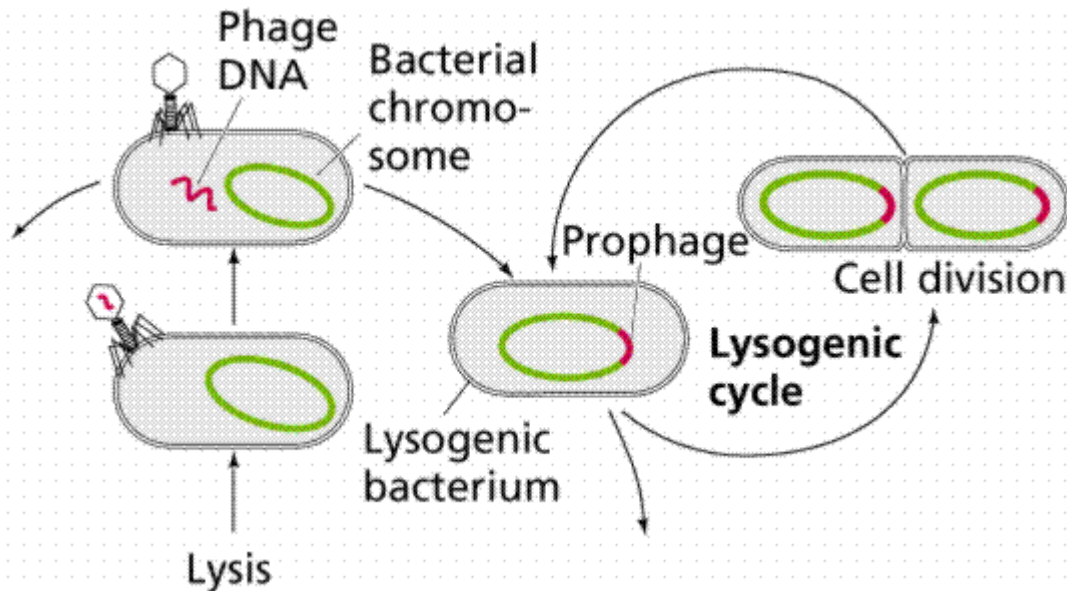
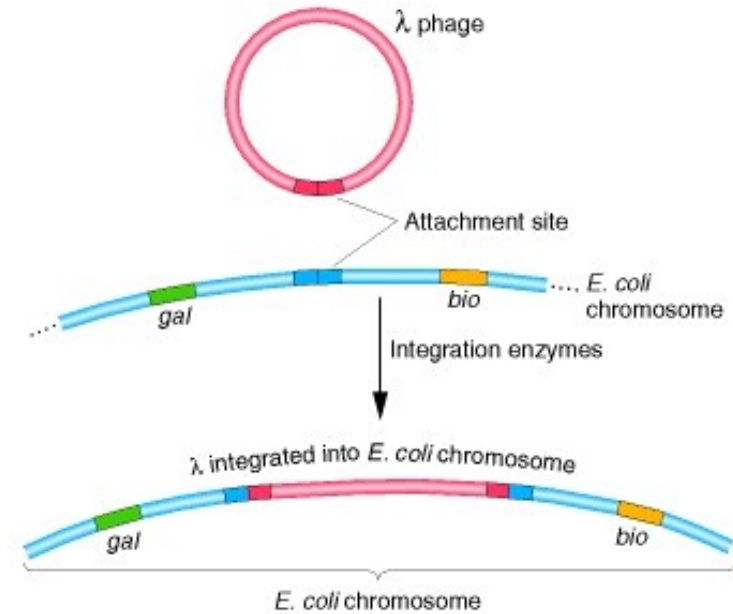


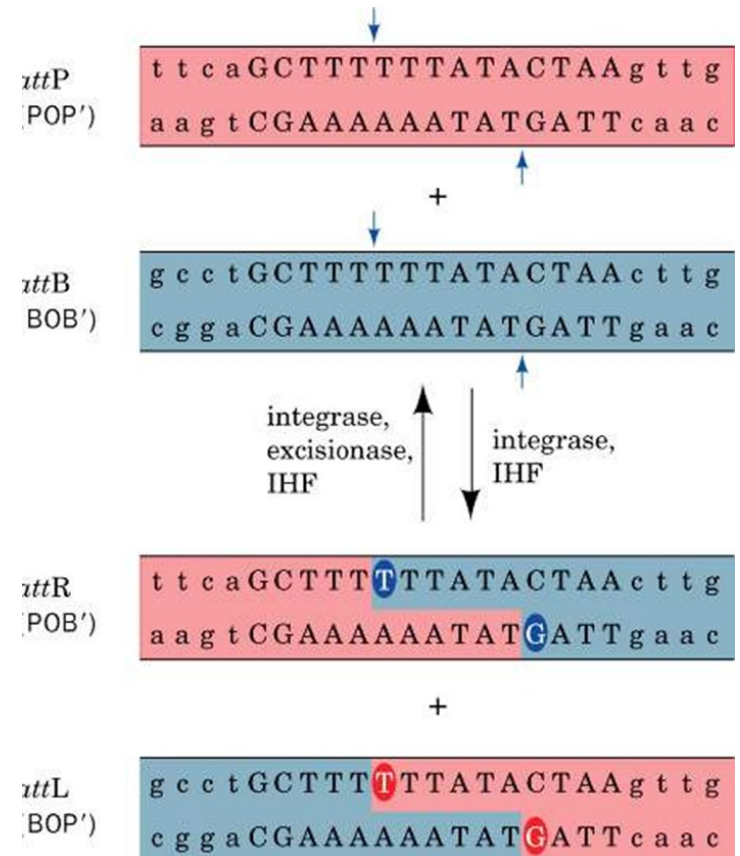
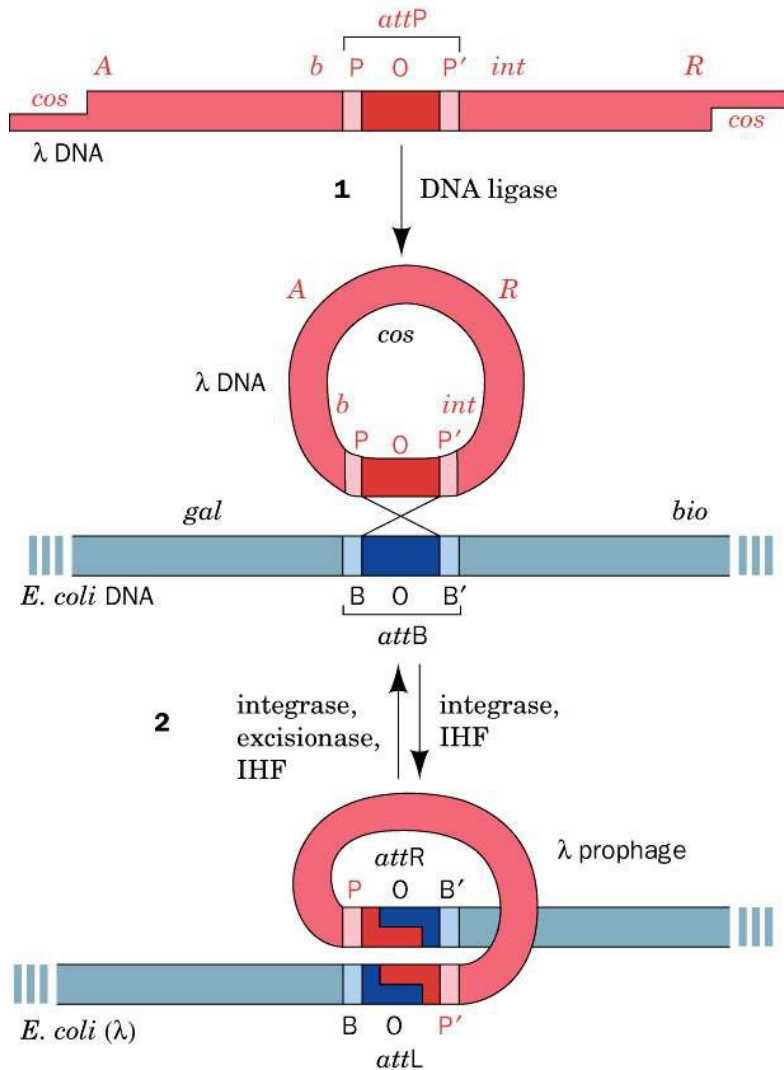


Lizogeni in litični del življenjskega cikla faga lambda

**profag:** fagna DNA vključena v kromosom

**lizogen:** gostiteljski kromosom (organizem) za profag





Integracija profaga lambda v lizogenem ciklu

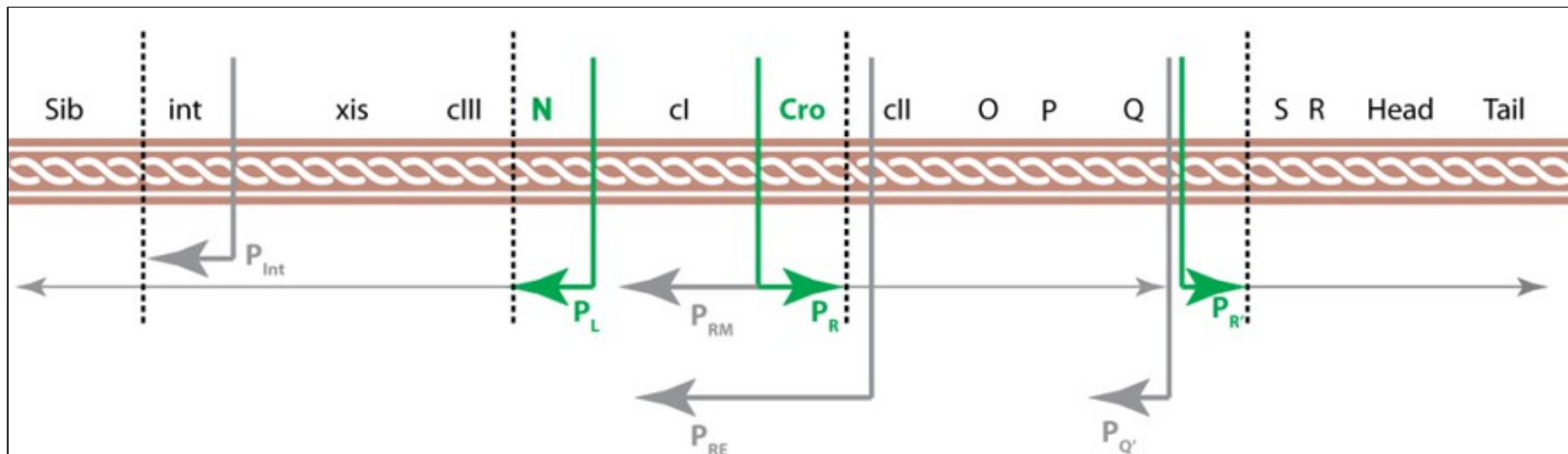
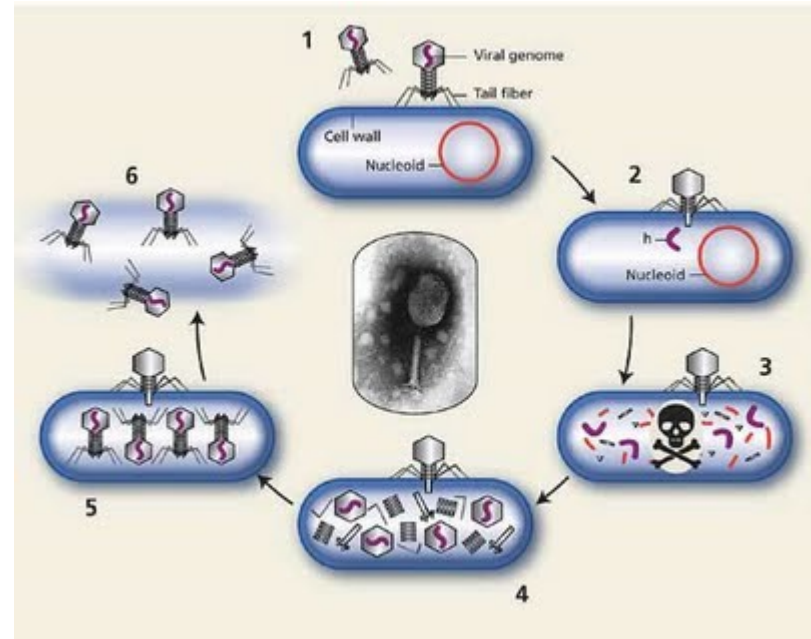


## Litični cikel

3-stopenjski proces: zgodnja, zapoznela zgodnja in pozna faza transkripcije

### zgodnja faza:

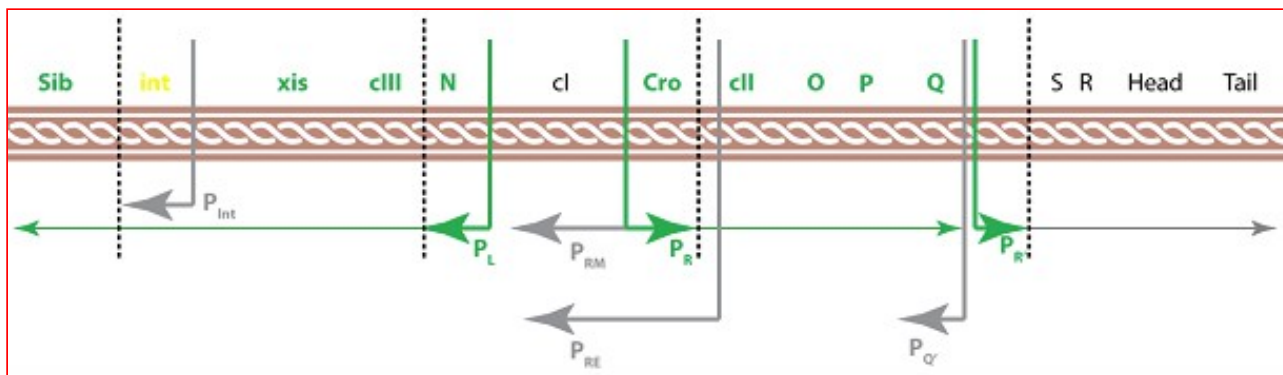
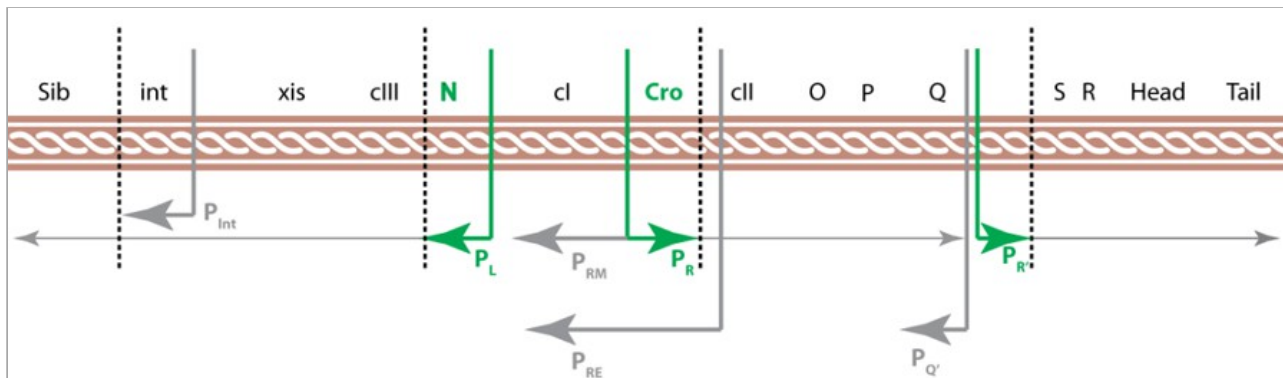
transkripcija se začne na treh promotorjih,  $p_L$  (gen  $N$ ),  $p_R$  (geni  $cro$ , delno pa tudi  $cII$ ,  $O$ ,  $P$ ) in  $p'_R$  ( $R4$ ), in se konča pri različnih terminatorjih





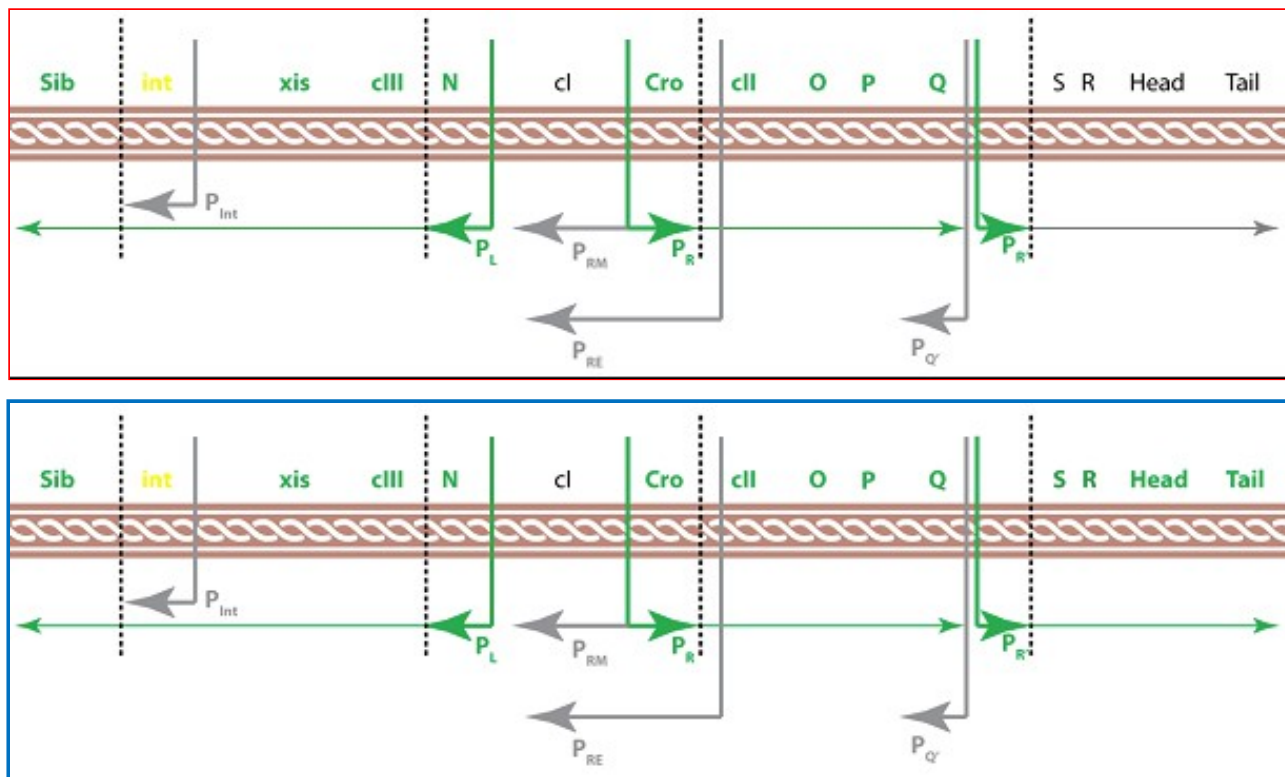
## zapoznala zgodnja faza:

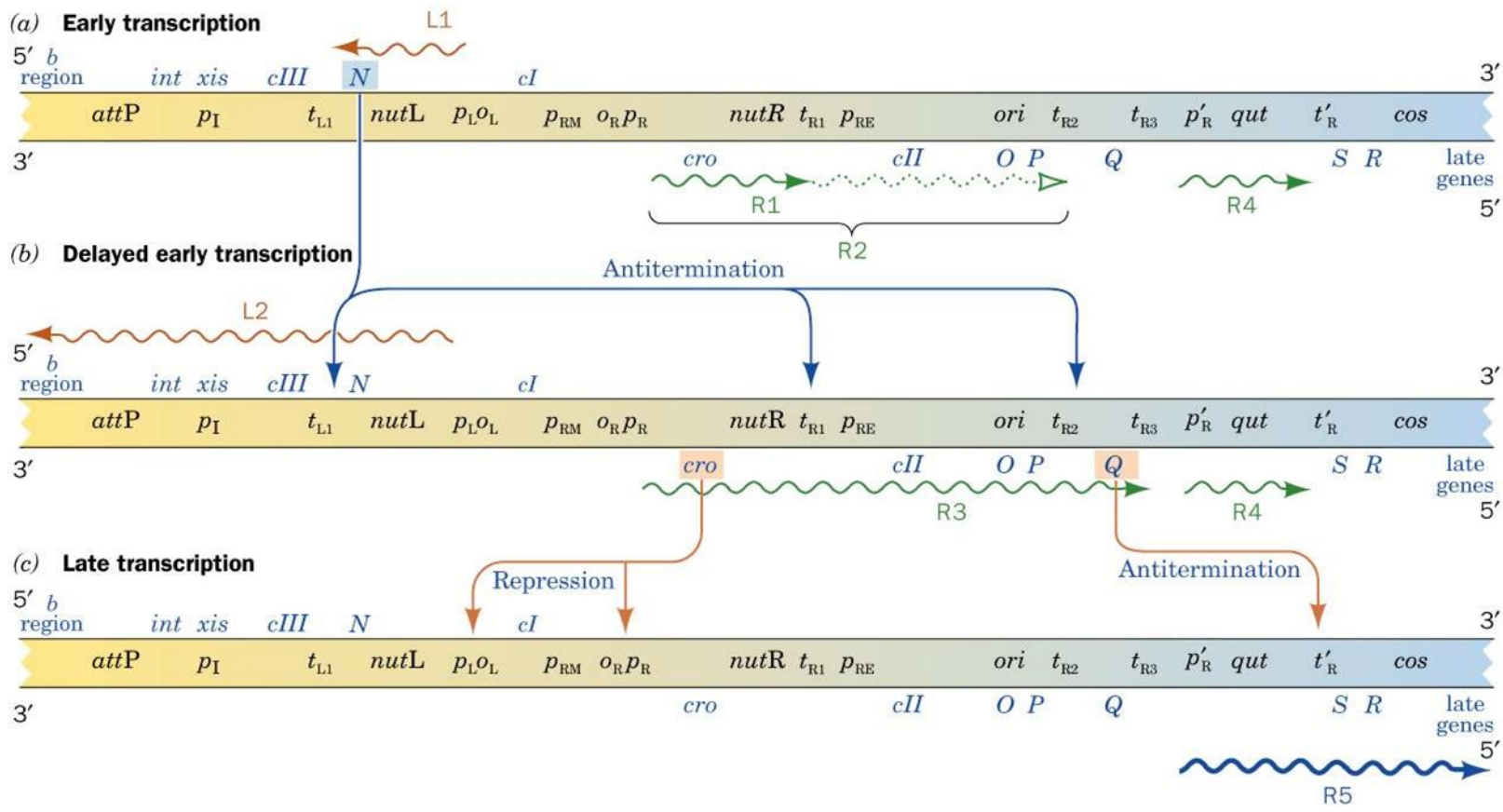
- ko se je sintetiziralo dovolj proteina N (deluje kot antiterminator), nastajajo daljši transkripti s promotorjev pL (*cIII*, *xis*, *int* + geni regije b) in pR (*O*, *P*, *Q*)
- faza traja do ~15. min po okužbi in se konča, ko se sintetizira dovolj proteina Cro, ki je represor promotorjev pL in pR



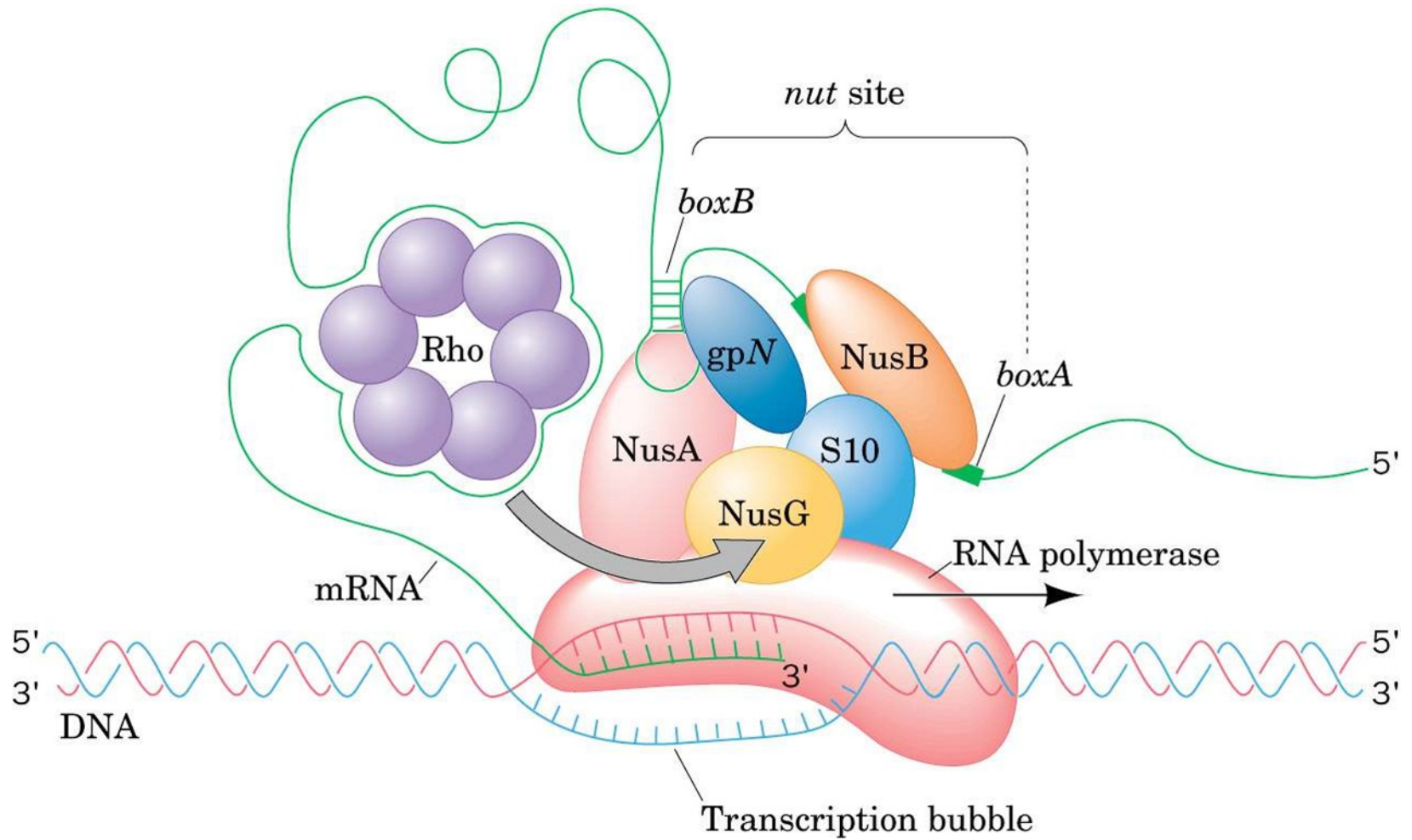
## pozna faza:

- antiterminator Q povzroči podaljšanje transkripta s promotorja p'R do R5 in S (liziranje celic)
- hkrati se sintetizira že ~30 kopij DNA, kar pospeši sintezo proteinov glave in repa
- prvi fagi se sestavijo po ~22. min



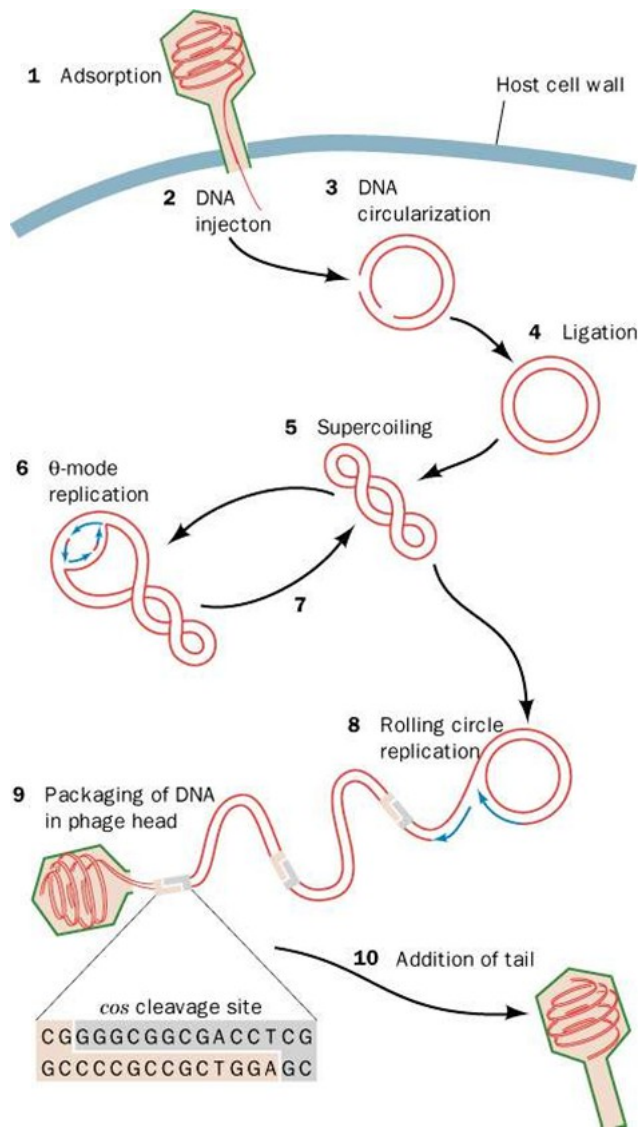


Transkripcijski procesi v litičnem ciklu bakteriofaga lambda

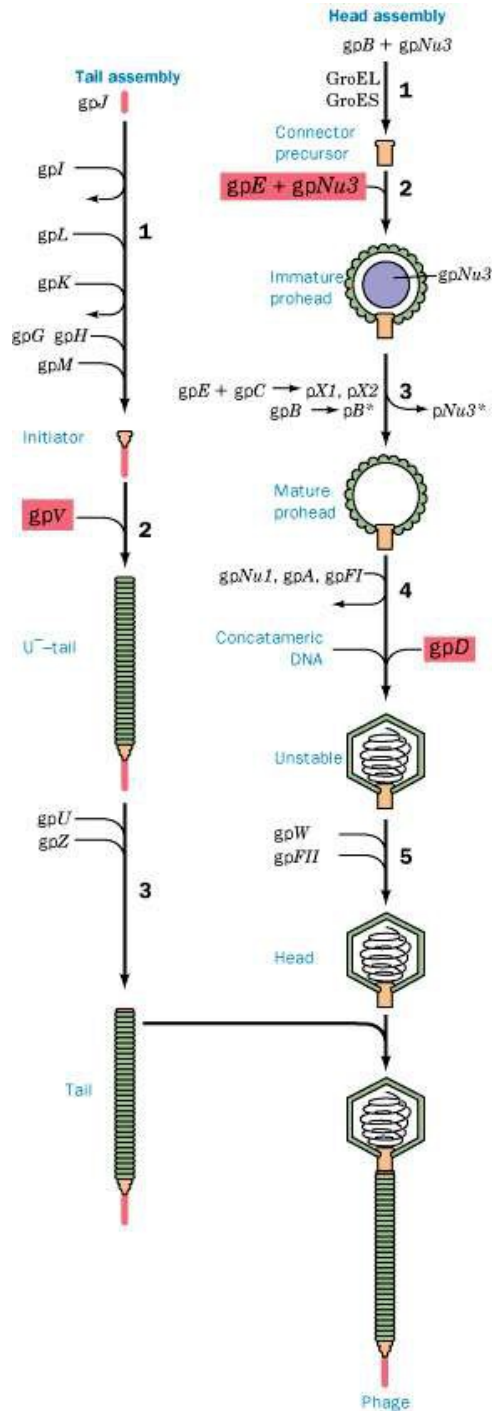


Antiterminacijski kompleks in vloga proteina N





Replikacija fagne DNA v litičnem ciklu bakteriofaga lambda



Sestavljanje fagnega delca pri bakteriofagu lambda

# Virofagi

- Virus Sputnik se naseli znotraj mimivirusa (Nature, 2008)
- satelitski virus, v evoluciji prevzel nekatere gene 'gostitelja'
- dsDNA, 21 ORF
- ikozaedrska kapsida, 50 nm

