

Реплікація/транскрипція  
да РНК-вмісних вірусів та вірусів з  
амбісенсовим геномом

# Родини длРНК вірусів

- Reoviridae – велика родина, мають 10-12 сегментів, інфікує хребетних, безхребетних, рослини і гриби
- Partitiviridae – 2 або 3 сегменти, генетично прості віруси, інфікує рослини і гриби
- Chrysoviridae – 4 сегменти, інфікує гриби
- Totiviridae – 1 або 2 сегменти, інфікує гриби і нижчих еукаріот
- Cystoviridae – 3 сегменти, віріони з суперкапсидом, інфікують бактерії
- Birnaviridae – 2 або 3 сегменти, інфікують хребетних, безхребетних.

# Family *Reoviridae*

Genus	Segments	Host	Vector	
<i>Orthoreovirus</i>	10	Mammals	None	
<i>Orbivirus</i>	11	Mammals	Mosquitoes, flies	
<i>Rotavirus</i>	11	Mammals	None	
<i>Coltivirus</i>	12	Mammals	Ticks	
<i>Seadornavirus</i>	12	Mammals	Ticks	
<i>Aquareovirus</i>	11	Fish	None	
<i>Idnoreovirus</i>	10	Mammals	None	
<i>Cypovirus</i>	10	Insect	None	
<i>Fijivirus</i>	10	Plant	Planthopper	
<i>Phytoreovirus</i>	12	Plant	Leafhopper	
<i>Oryzavirus</i>	10	Plant	Planthopper	
<i>Mycoreovirus</i>	11 or 12	Fungi	None?	

# Геном Reovirus

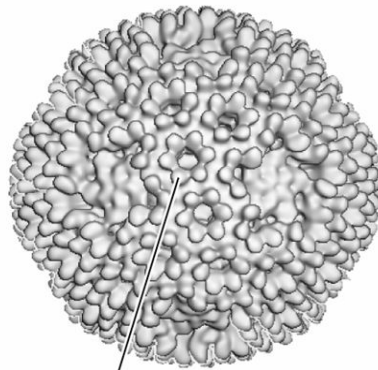
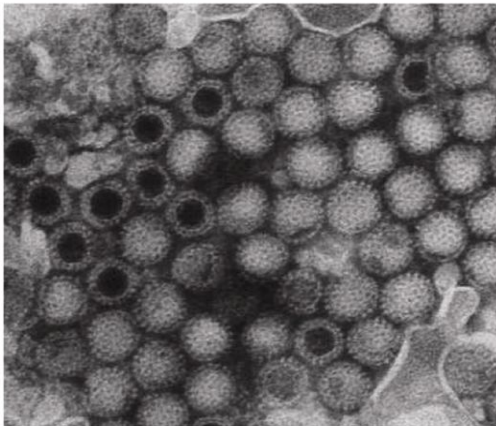
- 10-12 сегментів dsRNA
- Пакується 1 копія в віріон
- Загальний розмір геному 22-28 kb (0.8-4.5 kb кожен сегмент)
- Транскрипти представляють повнорозмірну геномну mRNAs
- Більшість геномів моноцистронні, тільки в деяких вірусів геноми бі – або трицистронні
- Сегменти геномів можуть реасорувати між подібними штаммами і видами вірусу
- Мають короткі 5' та 3' кінцеві некодуючі регіони

## Консервативні кінцеві послідовності сегментів геномів роду *Orbivirus* (+ ланцюг)

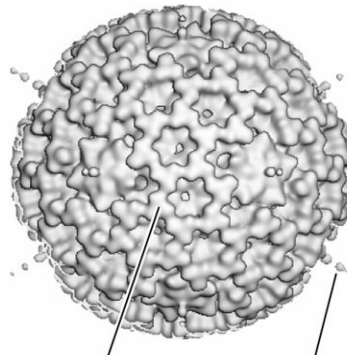
- BTV5      5-GUUAAA.....ACUUAC-3
- EHDV      5 -GUUAAA.....A/GCUUAC-3
- AHSV      5 -UUA/UAA/U.....ACA/UUAC-3
- GIV(BRDV)      5 -GUAAAA.....AA/GGAUAC-3
- PALV(CHUV)      5 -GUA/UAAA.....A/GCUUAC-3

# Структура і організація геному Mammalian orthoreovirus 3

**A**

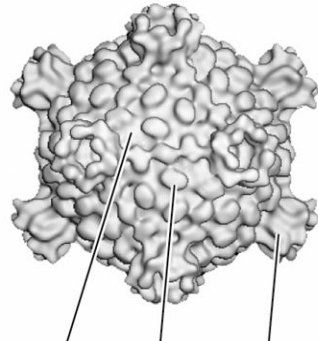


$\sigma 3$



$\mu 1$

$\sigma 1$

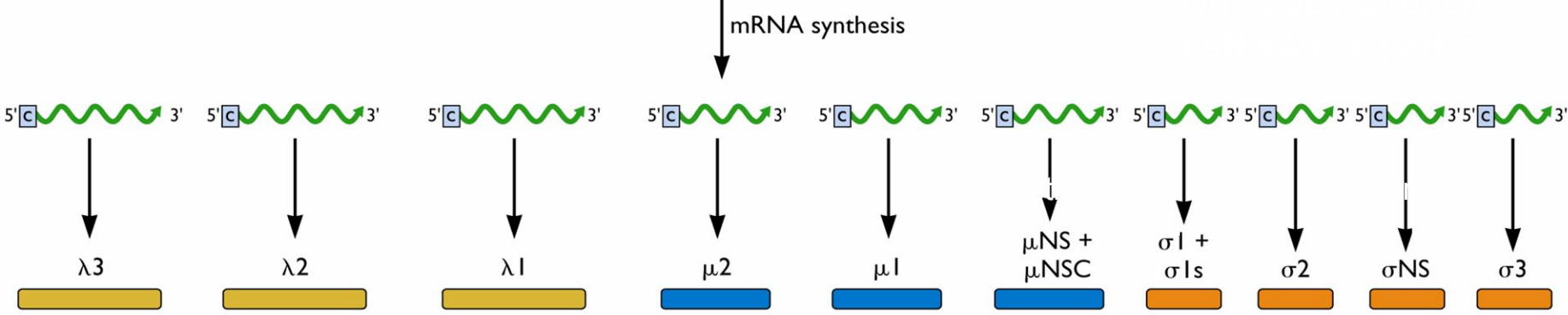
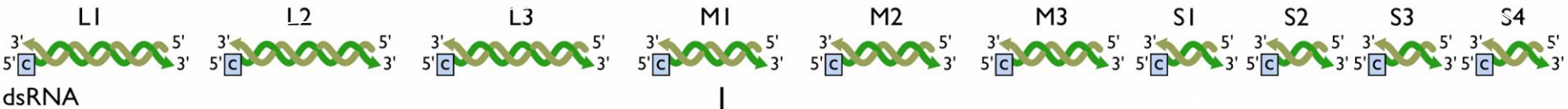


$\lambda 1$

$\sigma 2$

$\lambda 2$

**B**



RdRp	Methyltransferase, guanylyltransferase	Helicase	NTPase	Membrane penetration	Attachment	Assembly?	Subcellular localization
------	--	----------	--------	----------------------	------------	-----------	--------------------------

# Structural and nonstructural proteins encoded by Mammalian reovirus 1

## Reovirus

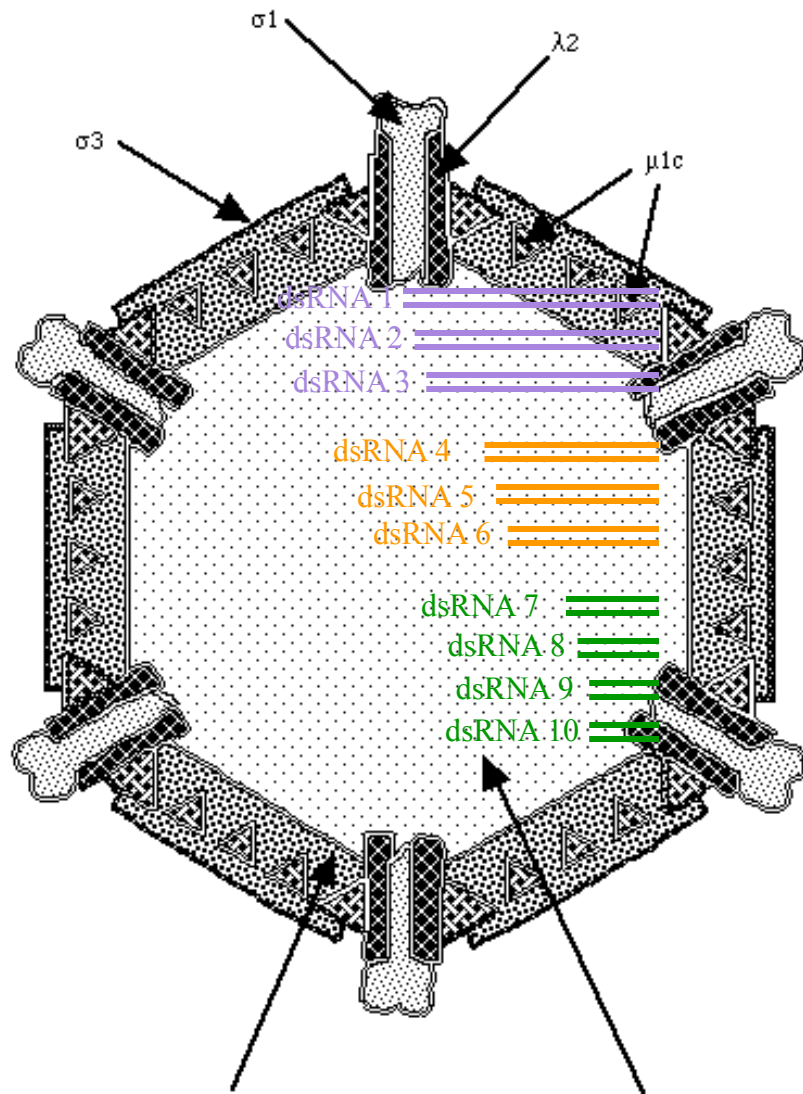
TABLE 4. *Reovirus* proteins<sup>a</sup>

Encoding segment	Protein	Mass (kd)	Copy number per virion	Location in virions	Presence in particle forms	Function or property
L1	λ3	142	12 <sup>b</sup>	Inner capsid	VIC	RNA-dependent RNA polymerase
L2	λ2	145	60	Outer capsid, core spike	VIC	Guanylyltransferase, methyltransferase?
L3	λ1	137(143) <sup>b</sup>	120	Inner capsid	VIC	Binds dsRNA, zinc metalloprotein
M1	μ2	83(78) <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	Inner capsid	VIC	Unknown
M2	μ1	76	600	Outer capsid	VI	N-myristoylated, cleaved into fragments, role in penetration, role in transcriptase activation
M3	μNS	80	0	Nonstructural	—	Binds ssRNA, associates with cytoskeleton, role in assortment, role in secondary transcription
S1	σ1	49	36–48 <sup>b</sup>	Outer capsid	VI	Cell-attachment protein, hemagglutinin, primary serotype determinant
	σ1s	14	0	Nonstructural	—	Unknown
S2	σ2	47	120–180 <sup>b</sup>	Inner capsid	VIC	Binds dsRNA
S3	σNS	41	0	Nonstructural	—	Binds ssRNA, role in assortment
S4	σ3	41	600	Outer capsid	V	Sensitive to protease degradation, binds dsRNA, zinc metalloprotein, effects on translation

<sup>a</sup> See text for references.

<sup>b</sup> Uncertainties in these values are discussed in the text.

V, virion; I, ISVP; C, core.



**Other inner capsid components:**

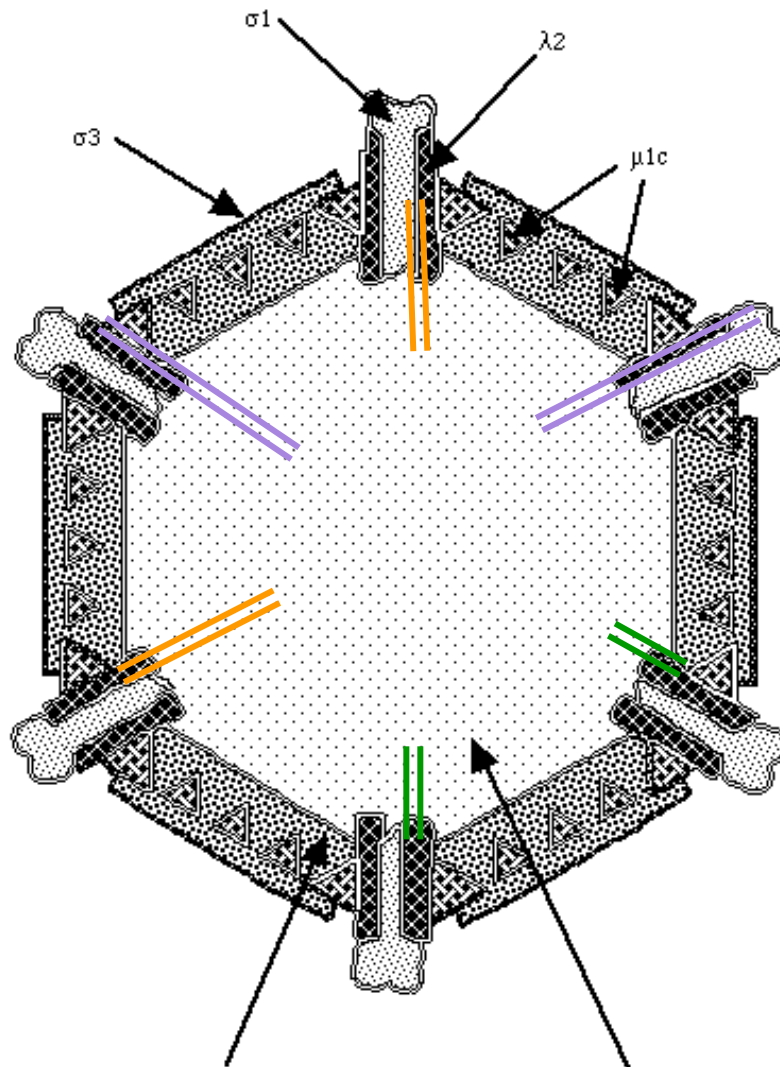
$\lambda 1$        $\lambda 3$   
 $\mu 2$        $\sigma 2$

**Core components:**

$\mu NS1$        $\mu NS2$

Reoviruses містять тільки по одному сегменту кожного з 10-12 сегментів dsRNA, які визначають повний вірусний геном, енкапсидований в єдиній складній вірусній частці, що складається з 6-8 протеїнів





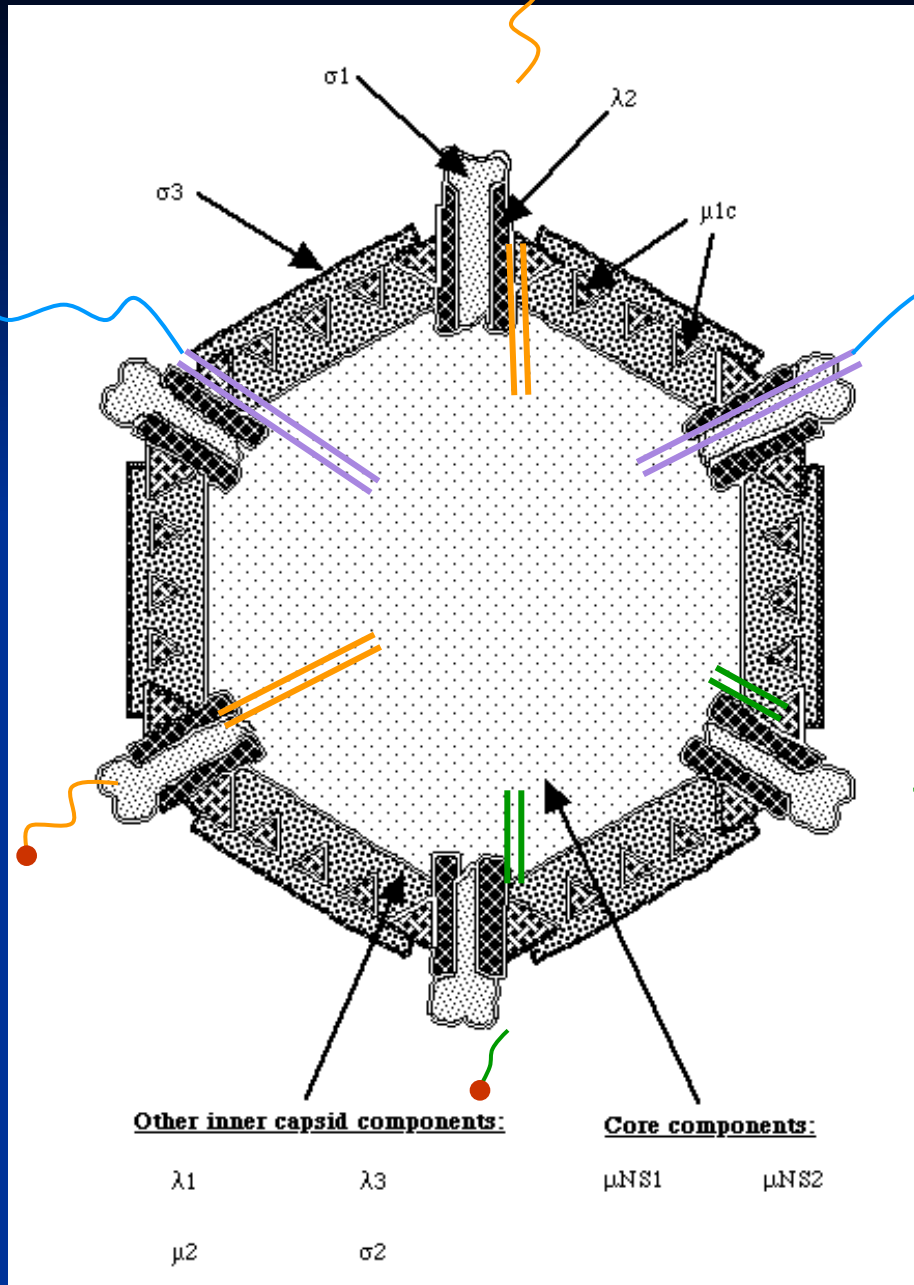
**Other inner capsid components:**

λ1      λ3  
 μ2      σ2

**Core components:**

μNS1      μNS2

mRNAs, ймовірно, переписуються в комплексах транскрипції в кожному з 12 незалежних фрагментів двадцятигранника



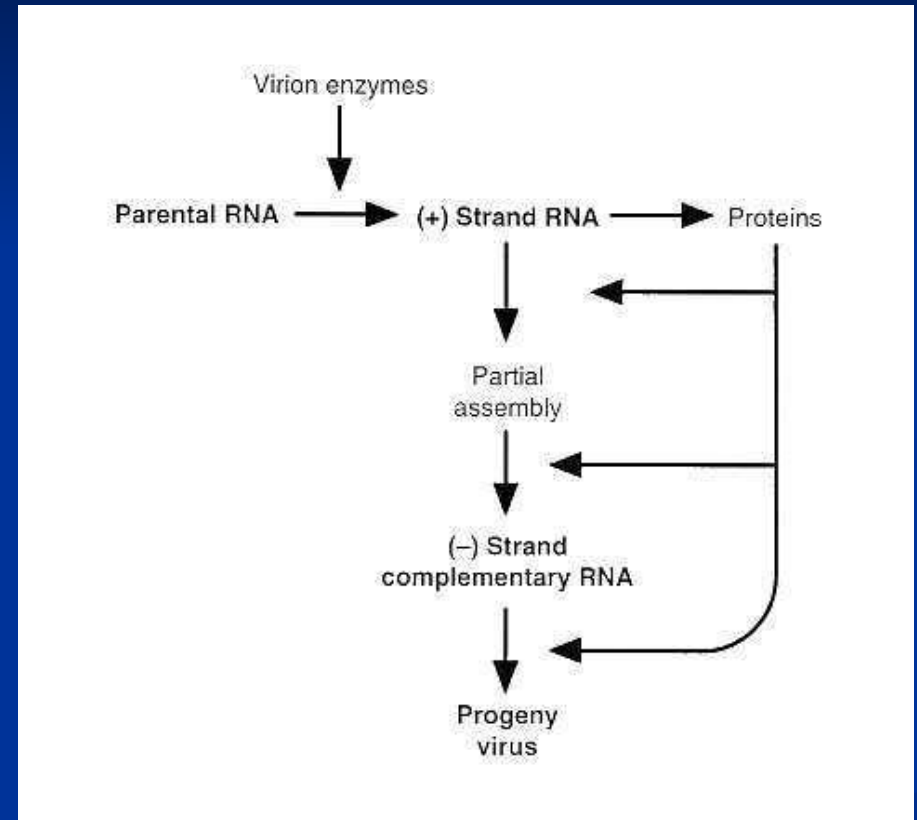
Кепування та метилювання mRNAs при транскрипції відбувається в корі реовірусної часточки

# Транскрипція/Реплікація:

- RNA транскрибується консервативно:
  - Використовується тільки (-)смиловий ланцюг;
  - В результаті синтезується (+)смилова mRNAs,
  - Кепування відбувається в корі;
  - mRNAs не поліаденілюється;
- 5 ферментних активностей задіяно (присутньо) в реовірусних частках для реалізації процесу
  - не обов'язково це окремі пептиди

## ■ RNA реплікація

- Геном реплікується в цитоплазмі за консервативним механізмом
- Виробляється надлишок (+) сенсових ланцюгів, які виступають як
  - А) пізні mRNA
  - Б) матриці для синтезу (-) сенсових ланцюгів
- кожен (-) ланцюг слугує матрицею для синтезу багатьох (+) ланцюгів, а не виключно один-для-одного, як у напів-консервативному копіюванні



# Reovirus: dsRNA Virus Strategy

Протеоліз під час входу через лізосоми активізує синтез RNA

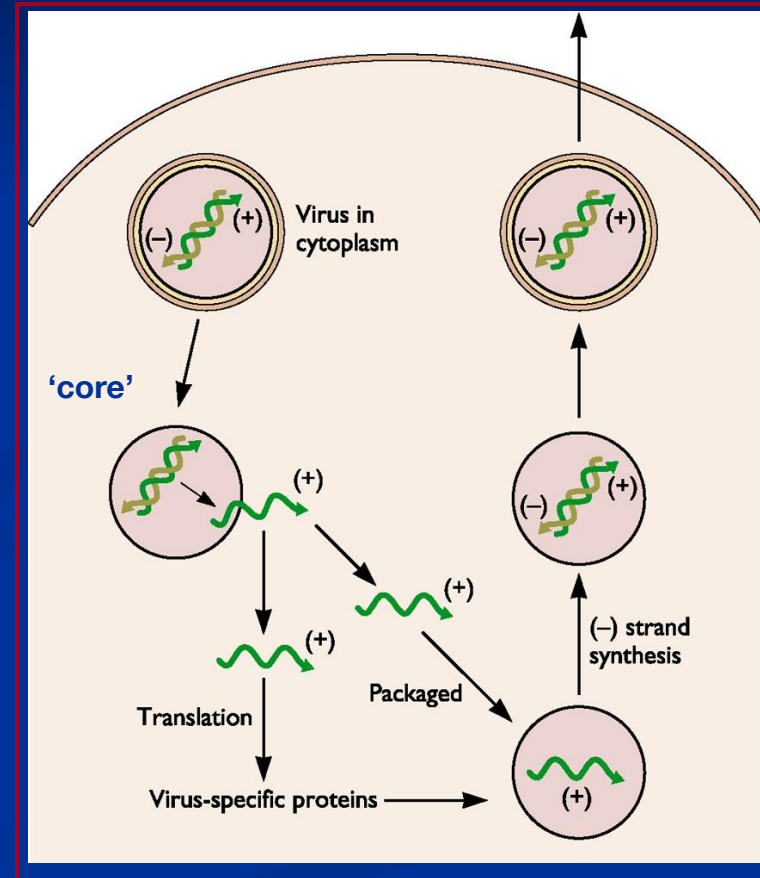
Субвірусні часточки в цитоплазмі є місцями синтезу mRNA

RdRP: присутня в віріоні

mRNA витісняється в цитоплазму через канали в вершинах вісі симетрії 5 порядку

Трансляція mRNA в цитоплазмі

Упаковка в нових субвірусних частках: +РНК - матриці для синтезу нових dsRNAs

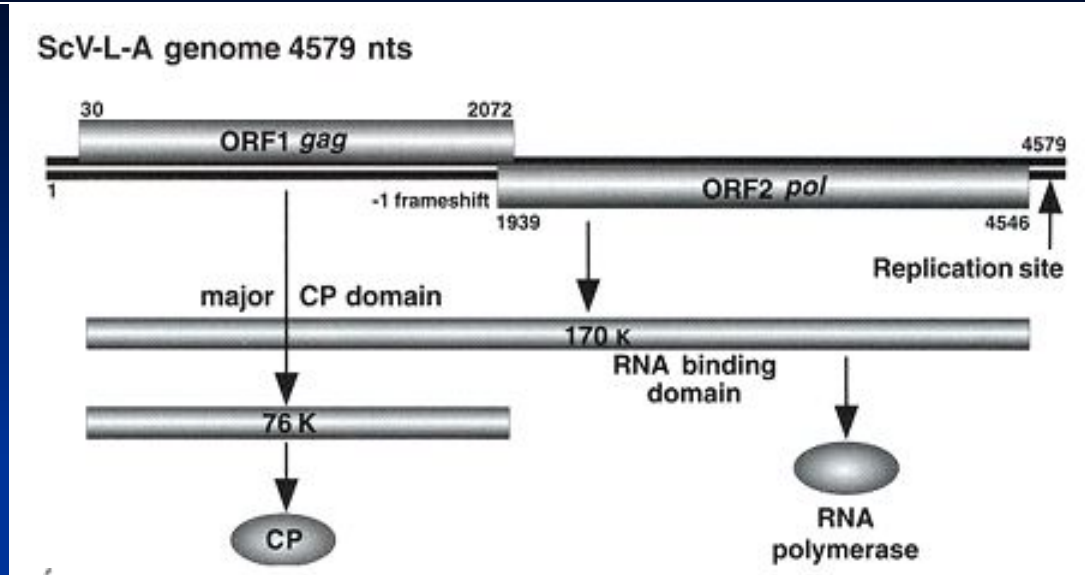


# *Totiviridae*

## віруси - “killer” фунгі

- Members of the family *Totiviridae*
- Не викликає інфекції в заражених клітинах
- Може включати 1 (non-killer) або 2 (killer) сегменти dsRNA, в різних віріонах
  - Сегмент 1 (L або сегмент L-A) містить інформацію, потрібну для копіювання і упаковки; може лише копіюватися.
  - Сегмент 2 (M., M.1, M.2, т.п.), при умові присутності містить ген для yeast-specific токсину і ген імунності до цього токсину; потребує сегменту 1 для копіювання і упаковки

# Totiviridae



**Figure 2** Genome organization of *Saccharomyces cerevisiae virus L-A* (ScV-L-A). The virion-associated RNA polymerase catalyzes *in vitro* end-to-end transcription of dsRNA by a conservative mechanism to produce mRNA for capsid proteins. In the case of ScV-L-A, all of the positive strand transcripts are extruded from the particles. The positive strand of satellite RNA  $M_1$ , or deletion mutants of L-A or  $M_1$ , on the other hand, often remain within the particle where they are replicated to give two or more dsRNA molecules per particle (headful replication). The positive ssRNA of ScV-L-A is the species encapsidated to form progeny virus particles. The encapsidation signal on ScV-L-A or  $M_1$  positive sense ssRNA is a 24 b stem-loop sequence located 400 nts from the 3' -end in each case. The *Gag* protein must be acetylated (by the cellular Mak3p) for assembly and packaging to proceed. These particles have a replicase activity that synthesizes the negative strand on the positive strand template to produce dsRNA, thus completing the replication cycle. Replication requires an internal site overlapping with the packaging signal, and a specific 3' -end sequence and secondary/tertiary structure. Virions accumulate in the cytoplasm.

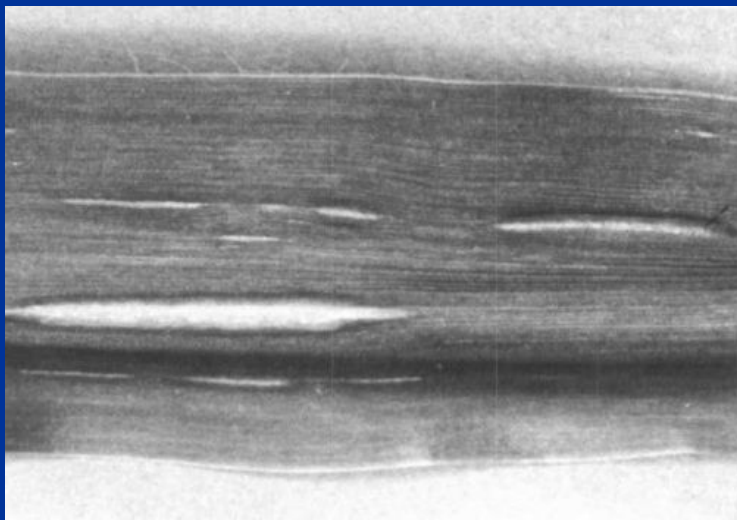
# Рослинні Reoviruses

Три головних роди відрізняються 5' і 3' кінцевими ділянками і в кодованих протеїнах. Мають 10 або 12 dsRNAs.

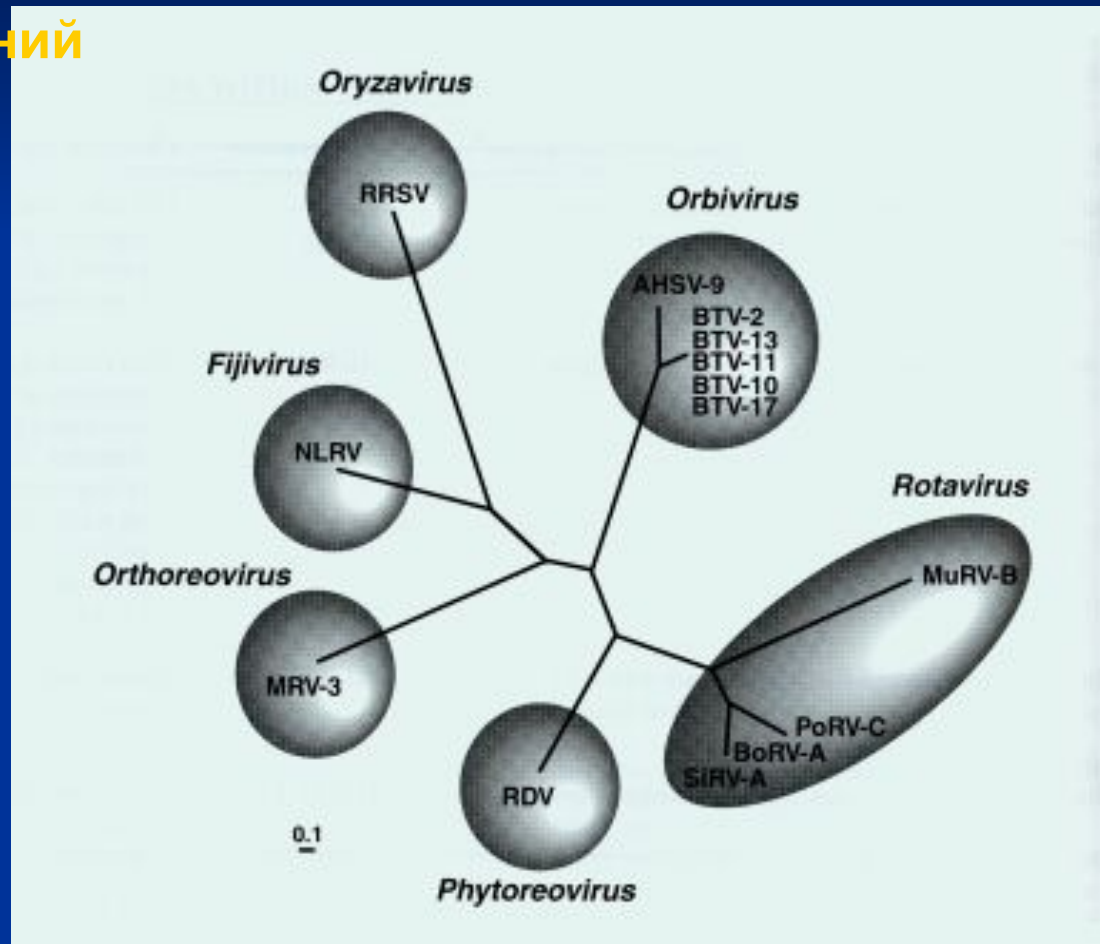
Індукують пухлини, що з'являються як аномальний розвиток флоєми

Передаються цикадами

Віруси розмножуються в векторах



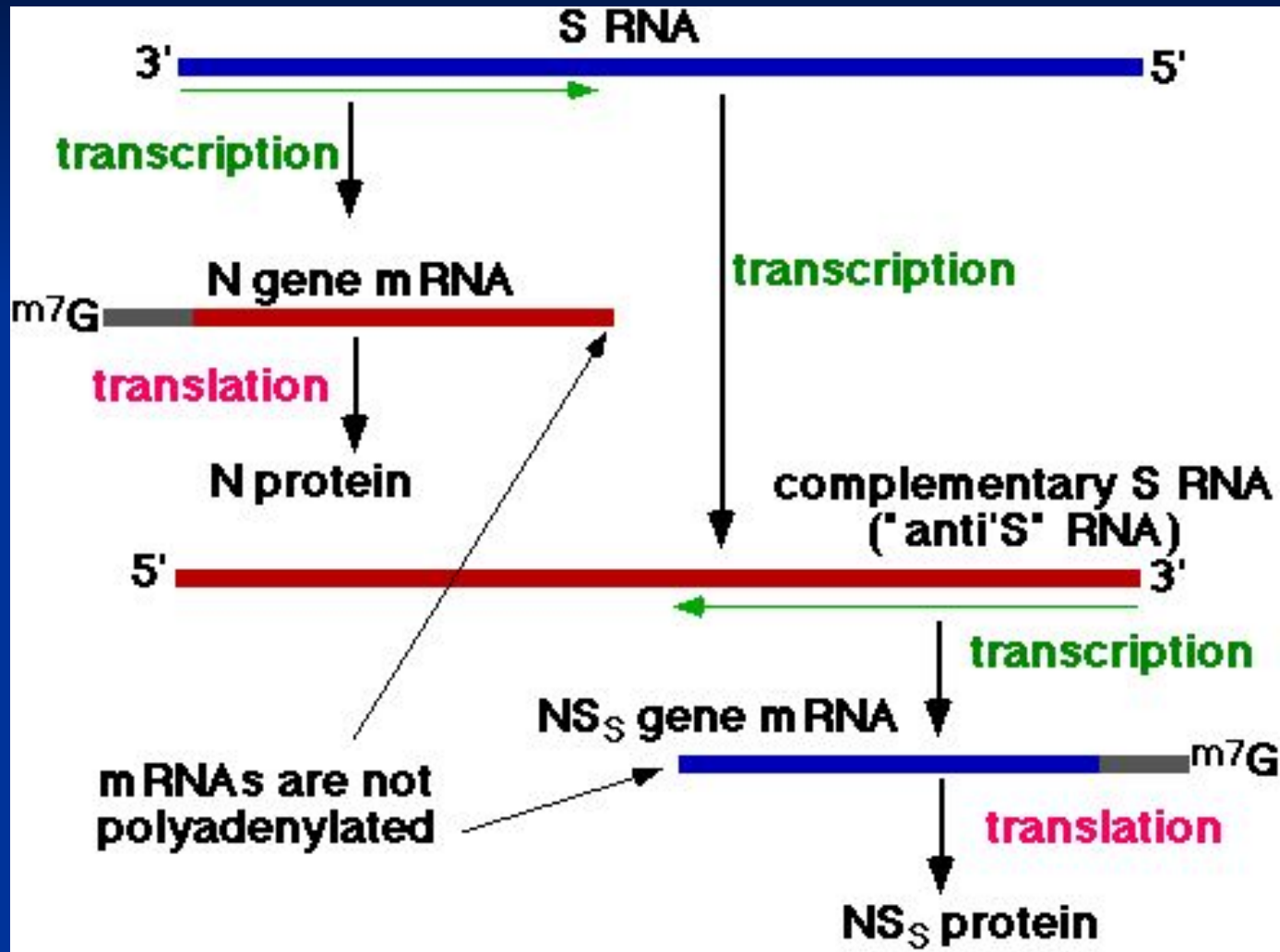
Fiji Disease Virus  
Tumor



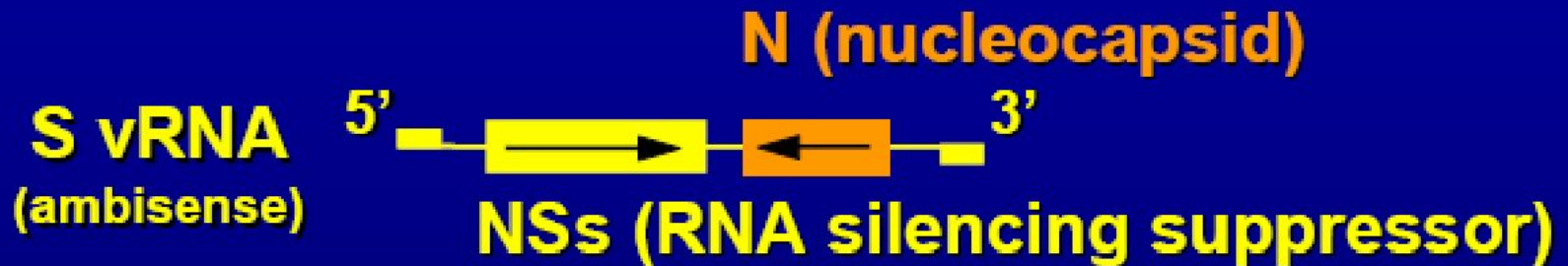
Філогенетичне дерево  
PhytoReovirus



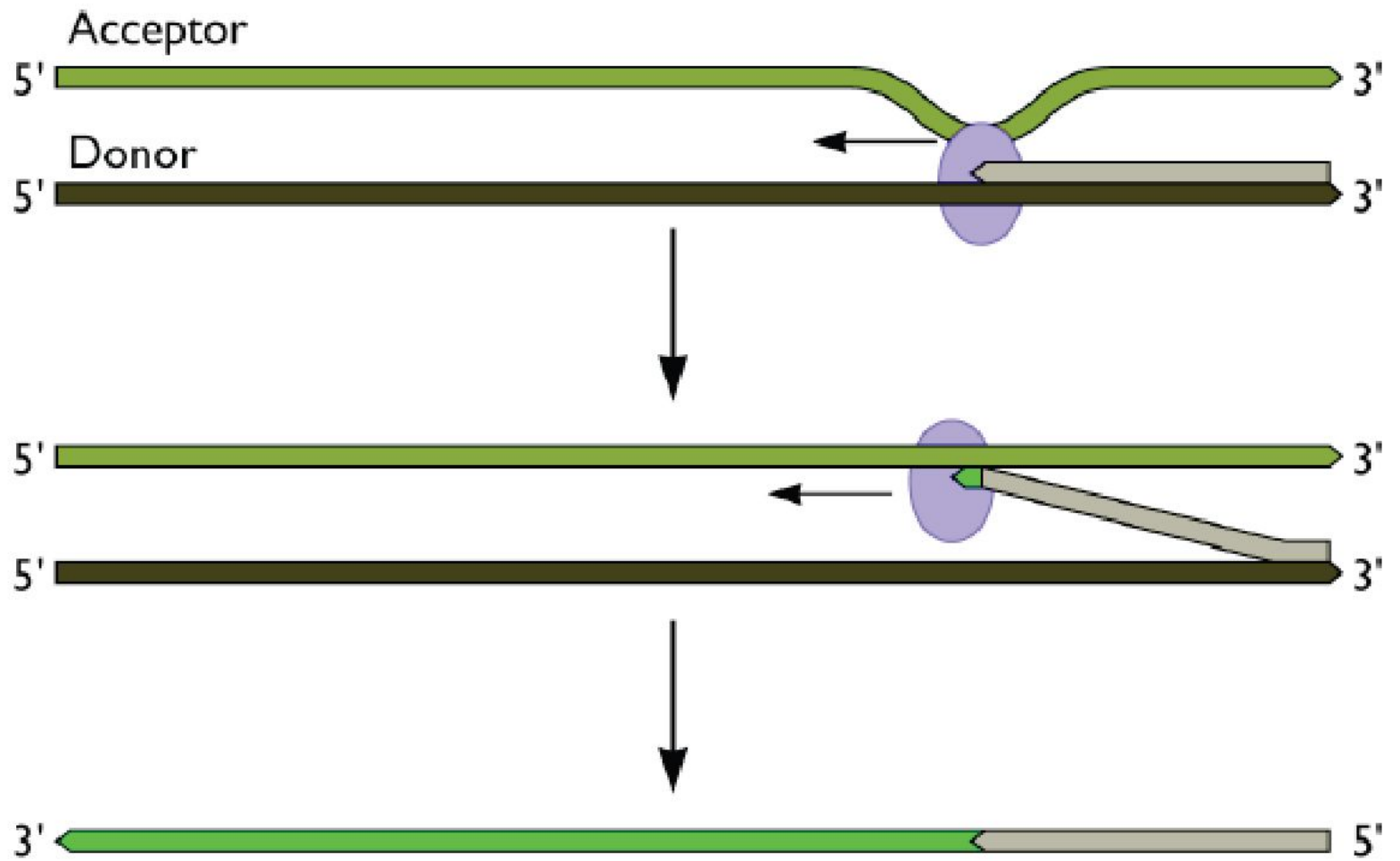
# Ambisense genomes



# Організація геному ВПЗТ

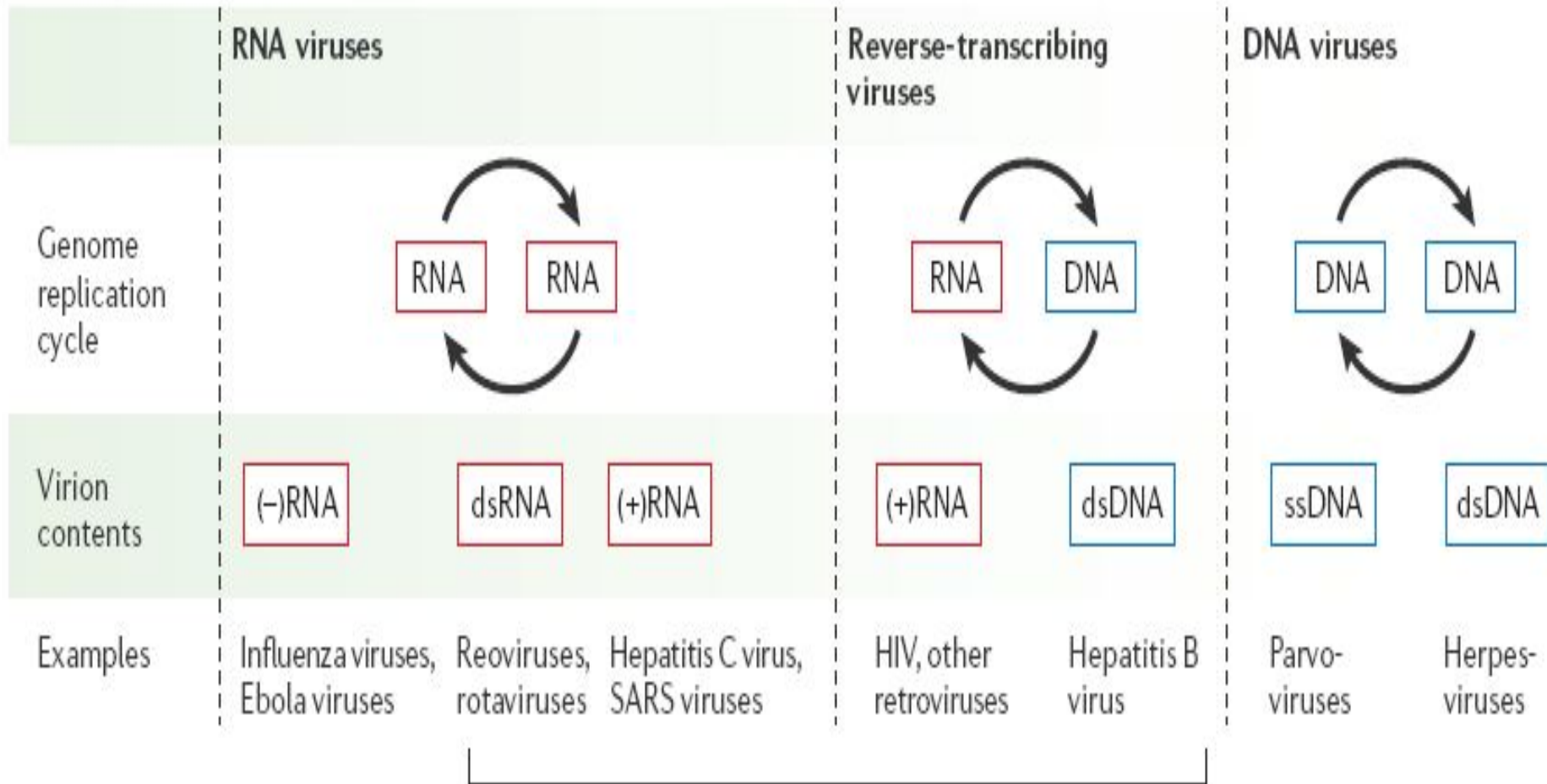


# RNA recombination

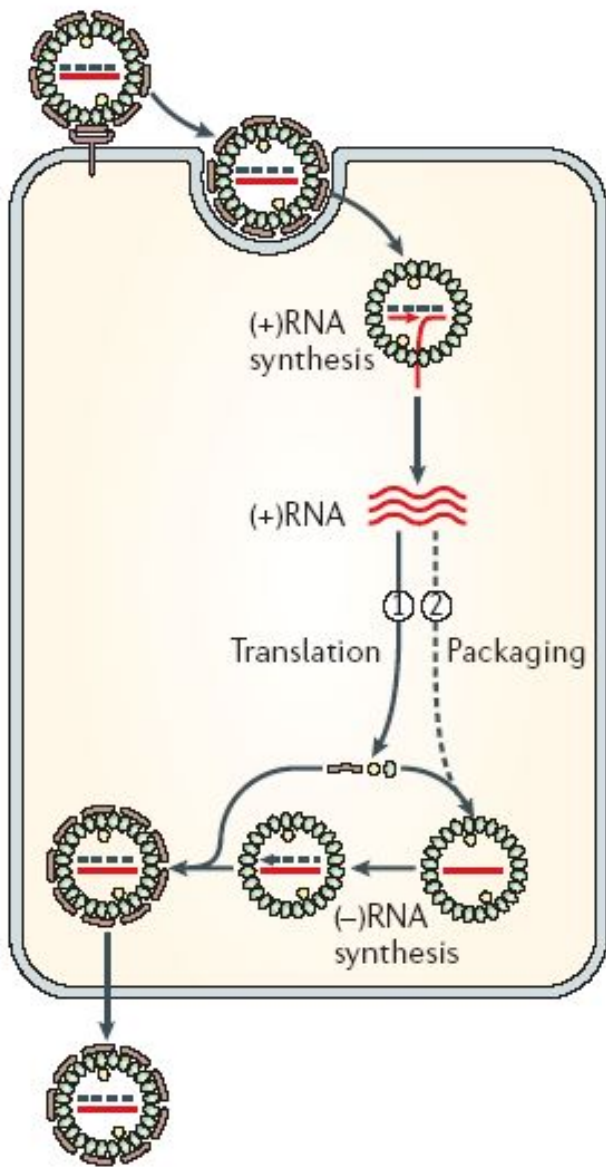


Подібності реплікативного процесу  
у (+) РНК вірусів, дРНК вірусів і  
зворотньо-транскрибуючих вірусів

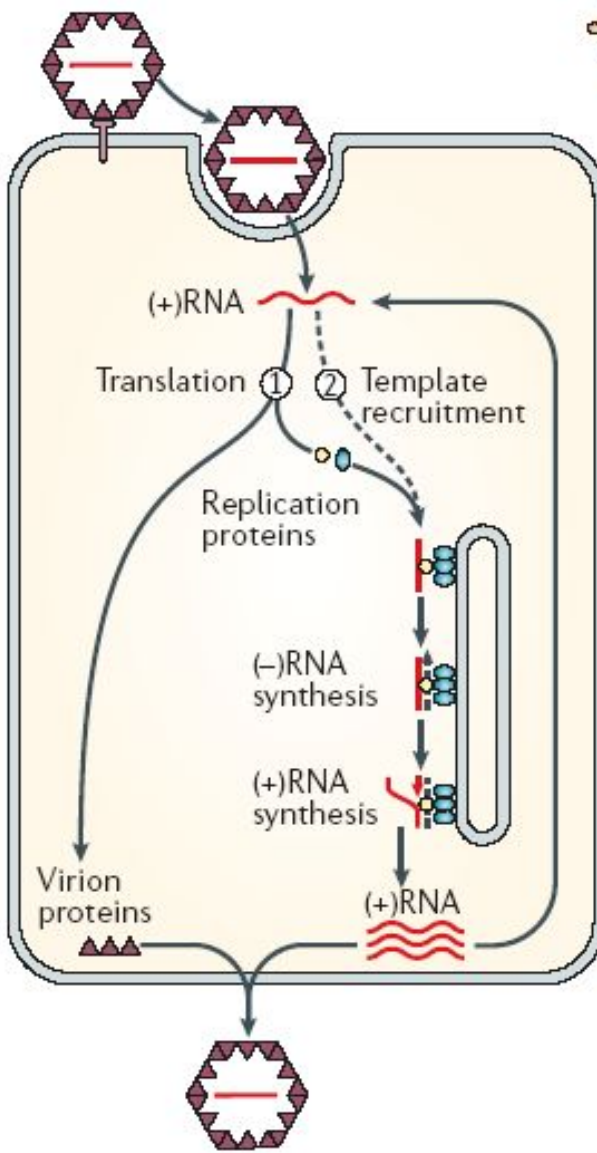
# 7 класів вірусів за стратегією реплікації геному та енкапсидатії



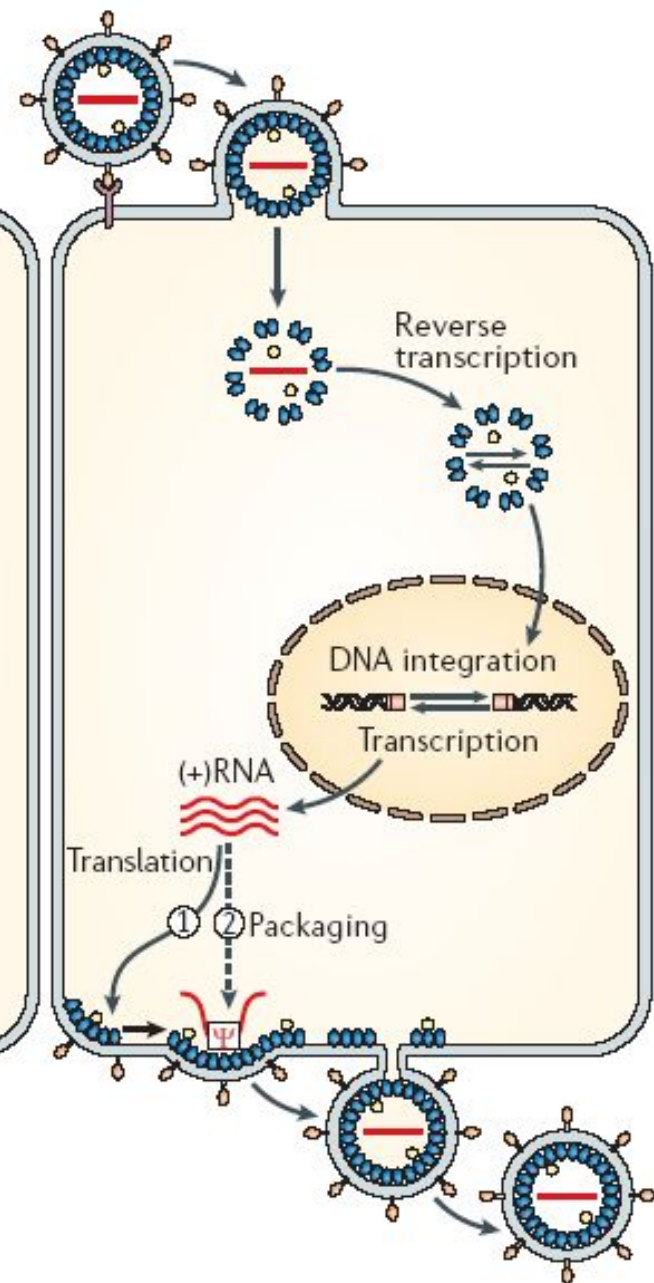
**a dsRNA virus**



**b (+)RNA virus**



**c Retrovirus**



# Фундаментальні зв'язки між класами

Виявлено паралелі у процесі реплікації геному між:

- 1) (+) РНК вірусів,
- 2) дЛРНК вірусів,
- 3) зворотньо-транскрибуючих вірусів

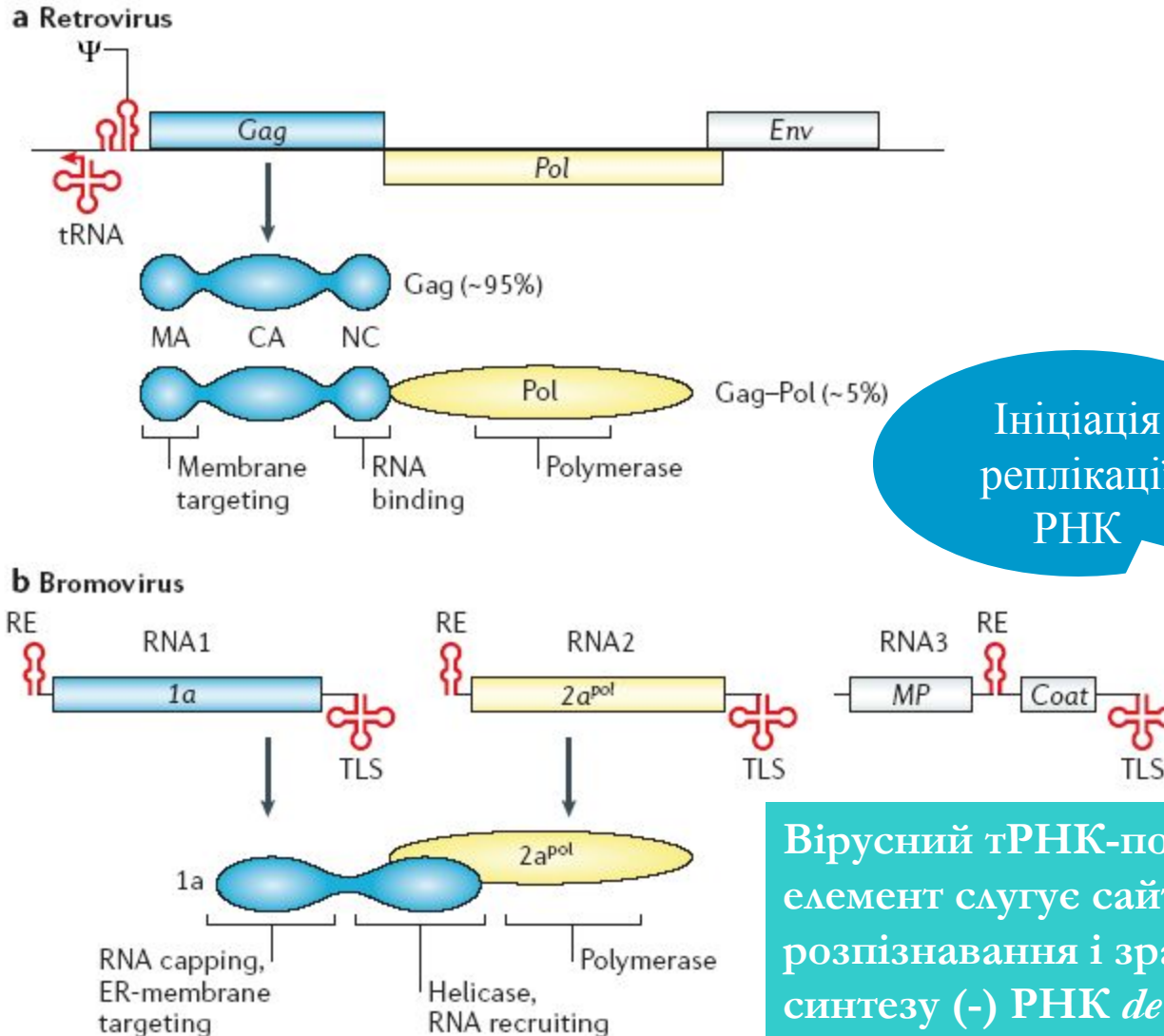
Внутрішньоклітинні РНК-реплікуючі комплекси деяких (+) РНК вірусів подібні до таких у дЛРНК і зворотньо-транскрибуючих вірусів.

# Паралелі між (+) РНК вірусами і ретровірусами: роль тРНК-послідовностей в ініціації синтезу (-) ланцюга

Ініціація зворотньої транскрипції

Клітинна т-РНК ковалентно праймує синтез (-) кДНК

Ініціація реплікації РНК

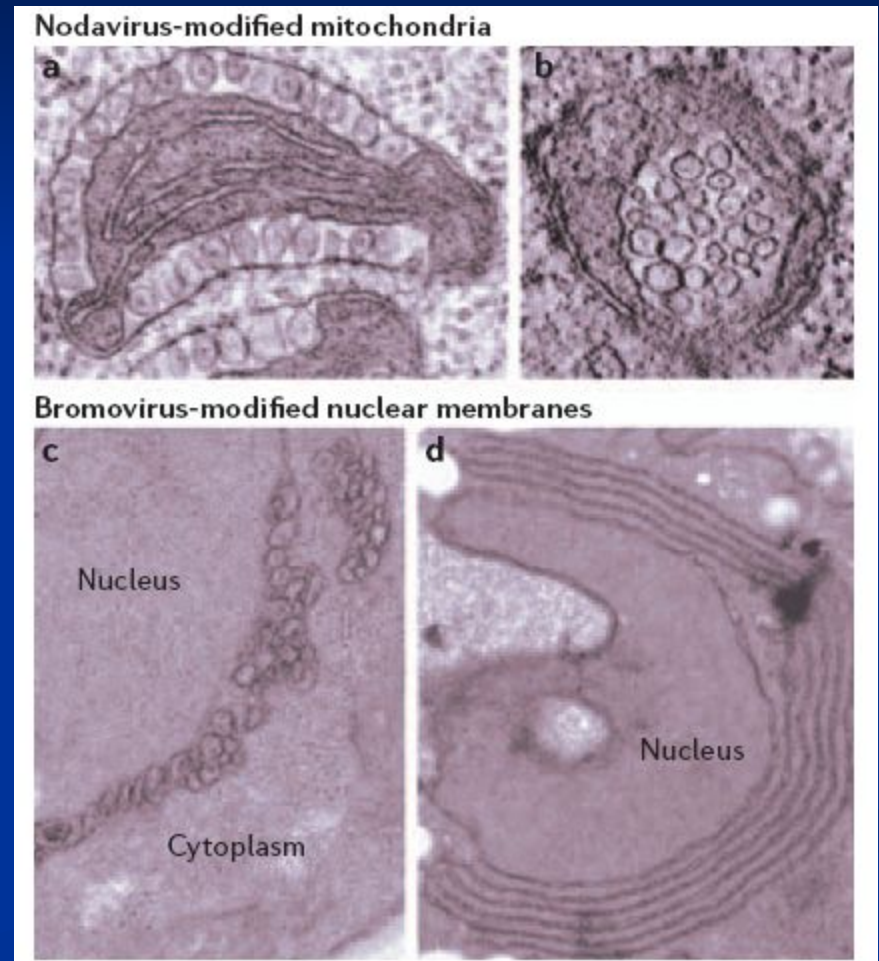


Вірусний тРНК-подібний елемент слугує сайтом розпізнавання і зразком для синтезу (-) РНК *de novo*, без праймеру



# Паралелі між (+) РНК вірусами і ретровірусами: комплекси реплікації РНК та капсиди

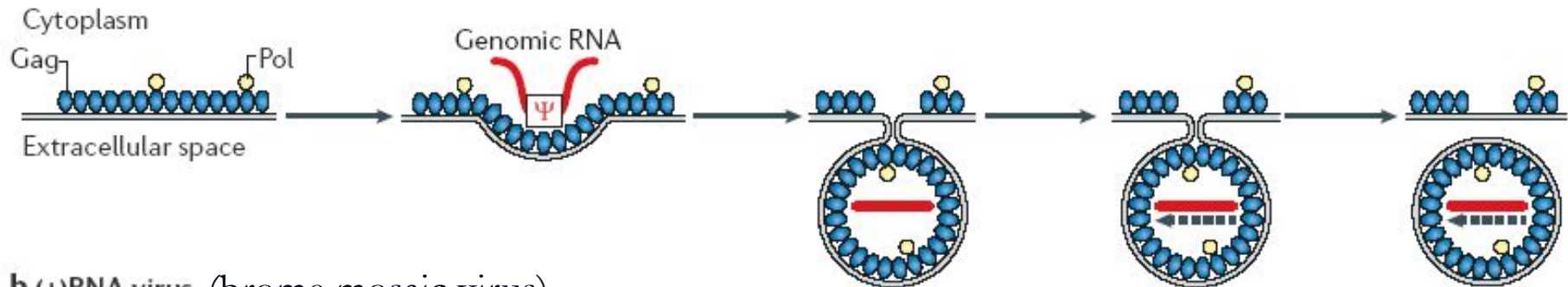
- Реплікація (+) РНК вірусів відбувається у внутрішньоклітинних мембранах (мітохондрії, ЕР, ендосоми, хлоропласти) і тісно пов'язана з перебудовами мембран: інвагінаціями, везикулами, сферулами та ін.



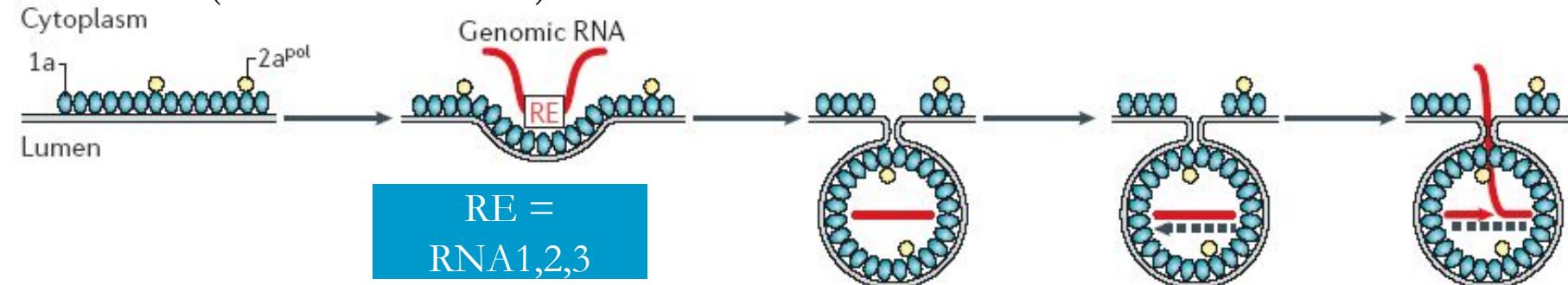
Не відбувається пакування полімераз у віріони

# Паралелі між (+) РНК вірусами і ретровірусами: формування сферул та капсидів

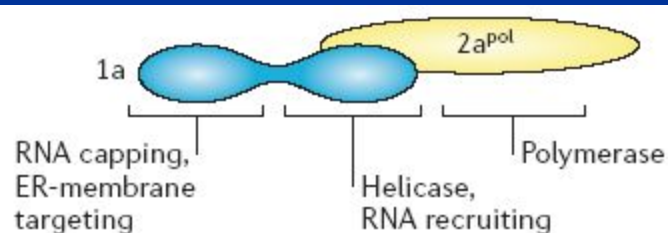
## a Retrovirus



## b (+)RNA virus (brome mosaic virus)



RE =  
RNA<sub>1,2,3</sub>

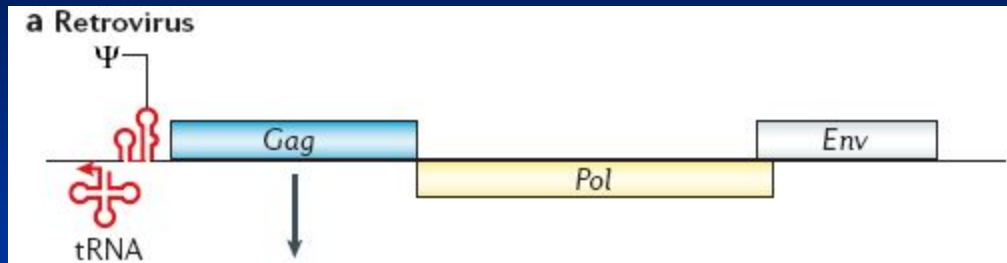


1a – мультифункціональний протеїн:

1) за відсутності інших вірусних факторів розташовується на мембрані ЕР, індукуює інвагінацію, рекрутує 2a pol до мембран ЕР,

2) індукуює перехід геномних РНК у новий мембраноасоційований, стійкий до нуклеаз стан.

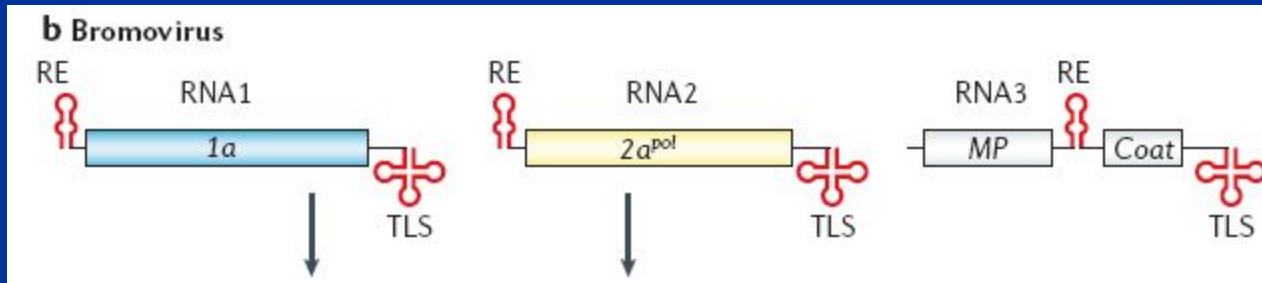
# Регуляція Pol у ретровірусів та (+) РНК вірусів



Трансляційний зсув рамки зчитування або трансляційна 'readthrough' подія

$Gag/Gag-Pol = 20$   
Зменшення співвідношення інгібує збірку віріону ретровіруса, його вихід

Як з протеїнами Gag і Pol, збільшена експресія злитих протеїнів, що містять полімеразу, інгібує реплікацію тобамовірусів та альфавірусів



# Паралелі між ΔРНК вірусами і (+) РНК вірусами: фактори реплікації

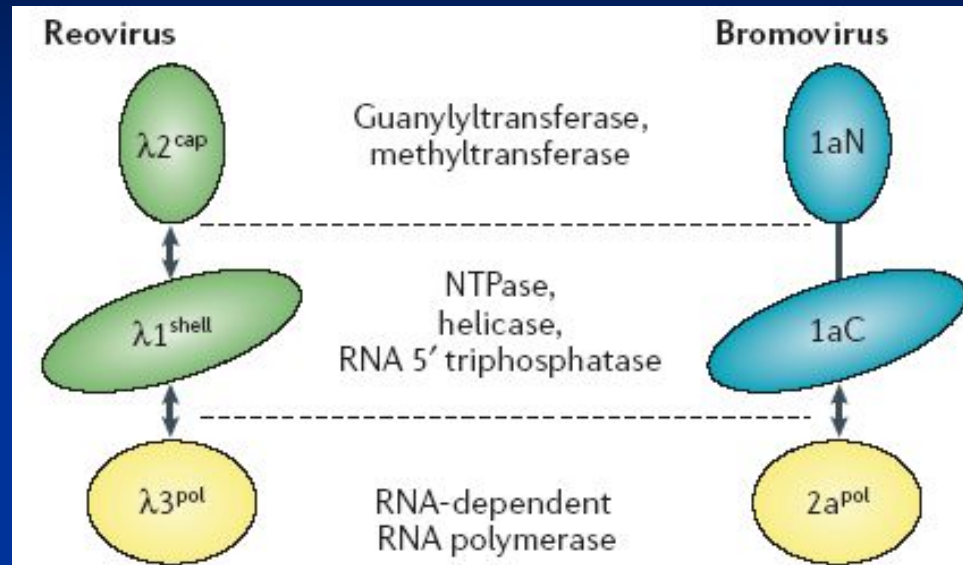


Figure 5 | **Structure–function parallels between reovirus and bromovirus RNA-replication factors.** The schematics illustrate similarities between interaction and function of reovirus core shell-forming protein  $\lambda 1$ , RNA-capping protein  $\lambda 2$  and RNA-dependent polymerase  $\lambda 3$ , and the interactions and functions of the brome mosaic virus (BMV) 1a C-proximal NTPase/helicase domain (1aC), 1a N-proximal RNA-capping domain (1aN) and 2a<sup>pol</sup> RNA-dependent RNA polymerase. The reovirus  $\lambda 1$ – $\lambda 2$ – $\lambda 3$  interactions shown in the schematic occur at each of the twelve 5-fold axes of the reovirus core.

# Паралелі між (+) РНК вірусами і ддРНК вірусами:

## b (+)RNA virus

Cytoplasm

1a 2a<sup>pol</sup>

Lumen

Genomic RNA

RE

## c dsRNA virus

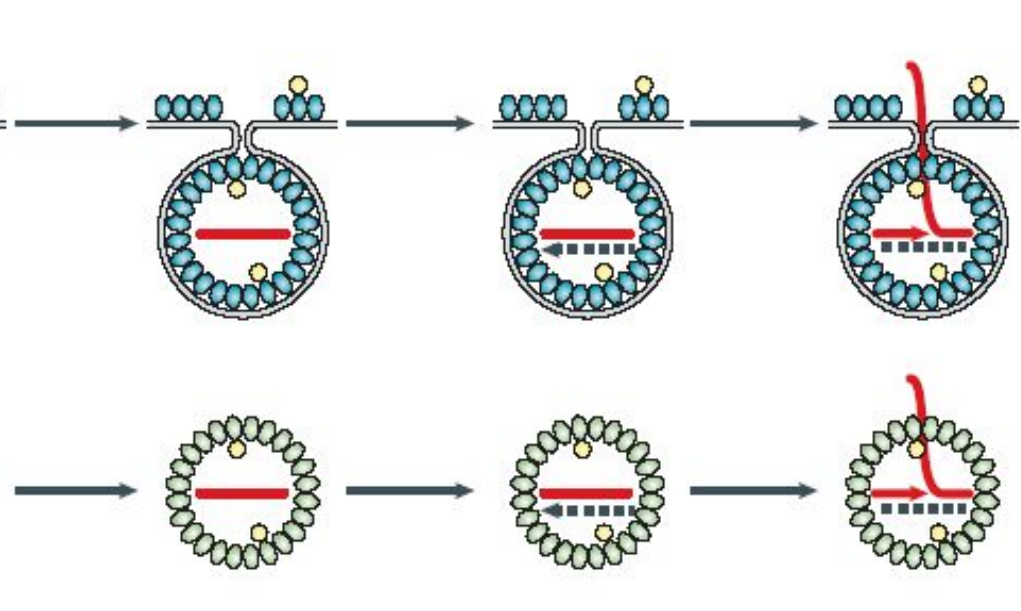
Cytoplasm

Genomic RNA

Pol

PS

Core shell protein



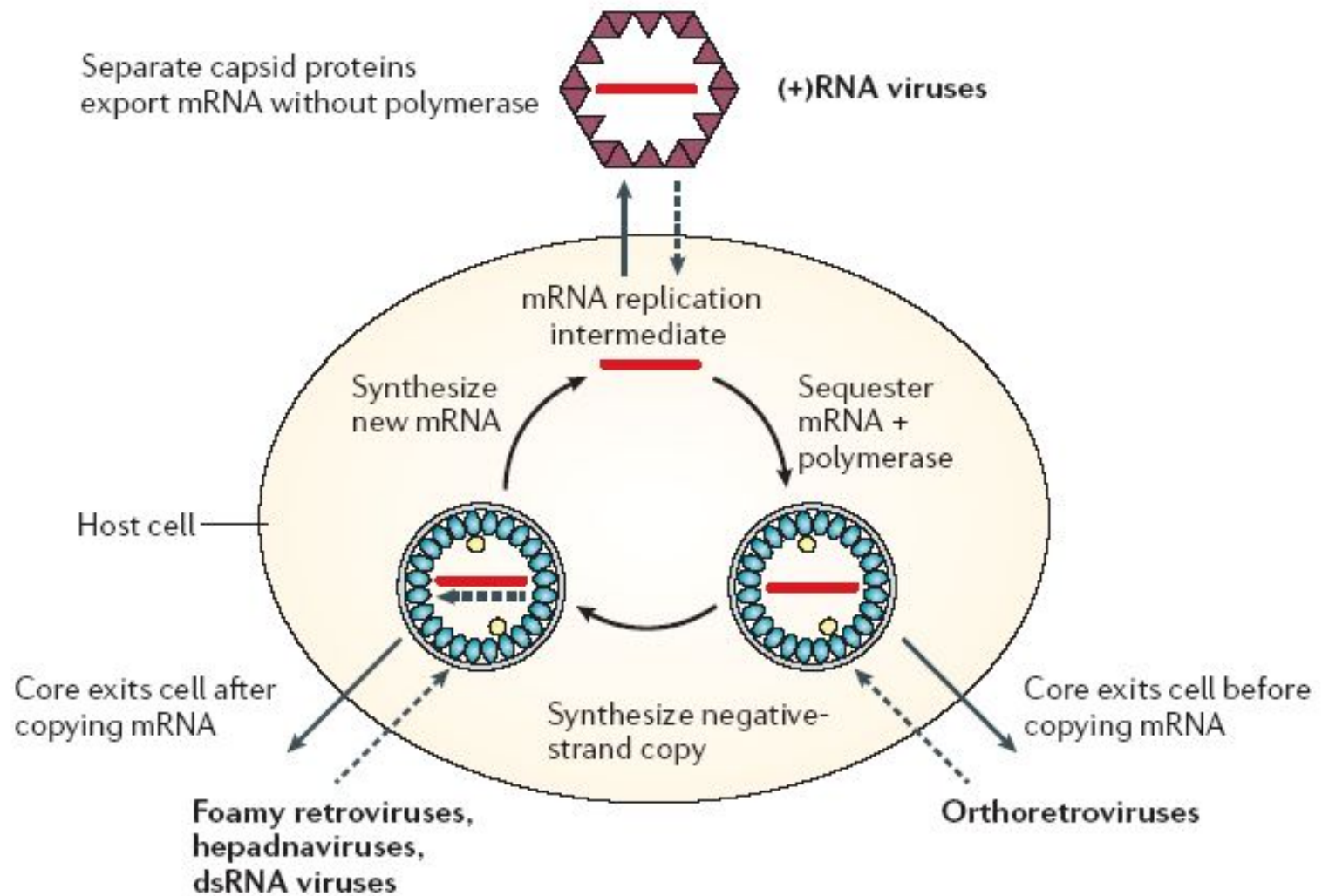


Figure 6 | **Parallels and distinctions among the life cycles of reverse-transcribing viruses, (+)RNA viruses and dsRNA viruses.** All three classes of virus share a similar replication cycle for their genomic RNA (central cyclical steps) but derive their infectious virions from different intermediates in that cycle (radial arrows). See text for further details. (+)RNA, positive-strand RNA; dsRNA, double-stranded RNA.

# НЕКАНОНІЧНІ ВІРУСИ

## Сателіти

- Геном приблизно 500-2000 нуклеотидів з одноланцюгової РНК
- Геном сателіту не схожий за своїми нуклеотидними послідовностями з вірусом-помічником
- Реплікація сателіту інтерферує з реплікацією віруса-помічника (не як у дефектних вірусів)
- Сателіти реплікуються в цитоплазмі клітини з використанням РЗРП
- Приклади сателітів:
- Barley yellow dwarf virus satellite RNA: Helper - *Luteovirus*
- Tobacco ringspot virus satellite RNA: Helper - *Nepovirus*
- Subterranean clover mottle virus satellite RNA: Helper - *Sobemovirus*



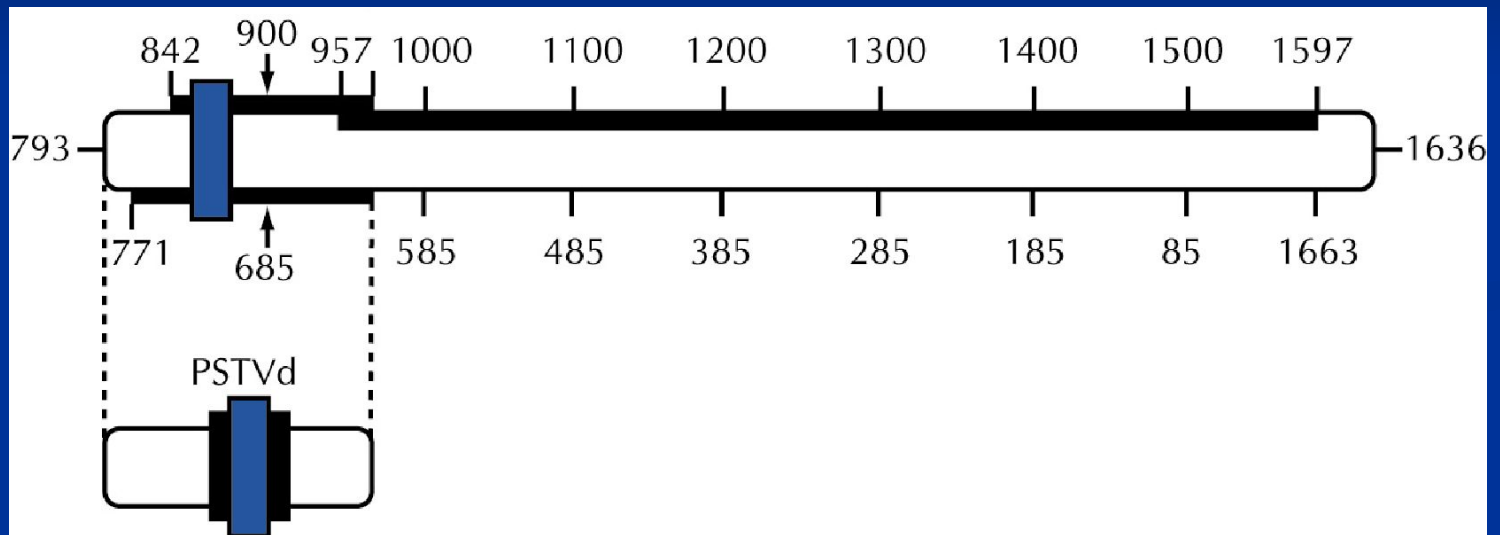
## Вірус гепатиту дельта (**HDV**)

- Вірус гепатиту дельта – унікальна молекула РНК,, яка схожа на віроїд, однак кодує власний білок ( дельта- антиген) і схожа за трансмісією на сателіт
- Вірус гепатиту дельта викликає хворобу у людей
- Вірус гепатиту дельта використовує вірус гепатиту В як помічник .
- Інфекційна часточка (віріон) вірусу гепатиту дельта складається з структурного білку вірусу гепатиту В і геномної РНК вірусу гепатиту дельта, яка за структурою і конфігурацією схожа з віроїдами

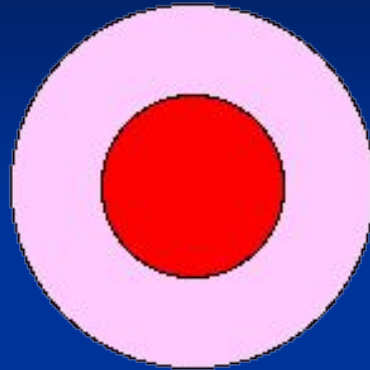
# Геном вірусу гепатиту дельта (HDV)

Віроїдоподібний  
регіон

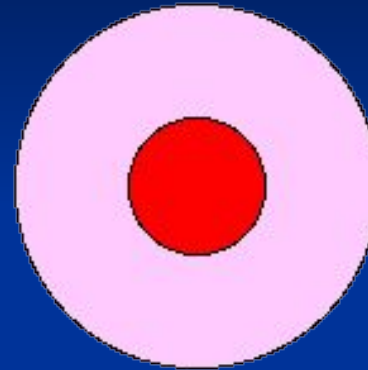
Білок-кодуєчий регіон (δ - антиген)



# Віріони **HBV** та **HDV**



Infectious HBV, 40nm outer envelope + surface antigens, 27nm nucleocapsid with core protein, Reverse Transcriptase and HBV DNA



Infectious HDV, 40nm outer envelope+ HBV surface antigens. 19nm nucleocapsid with 60 copies of delta antigen and HDV genomic RNA.

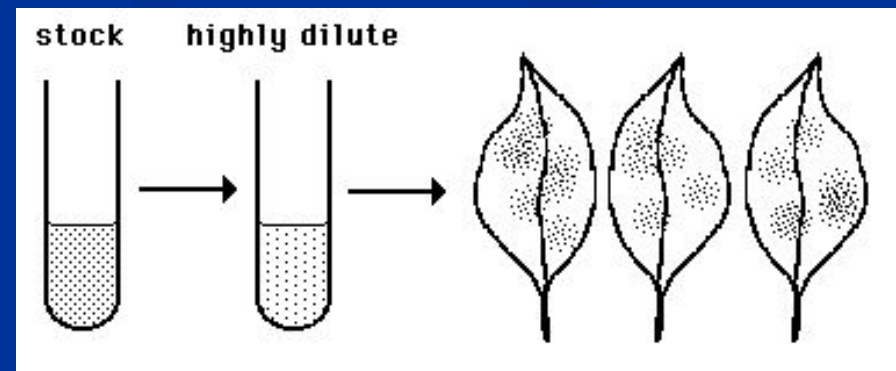
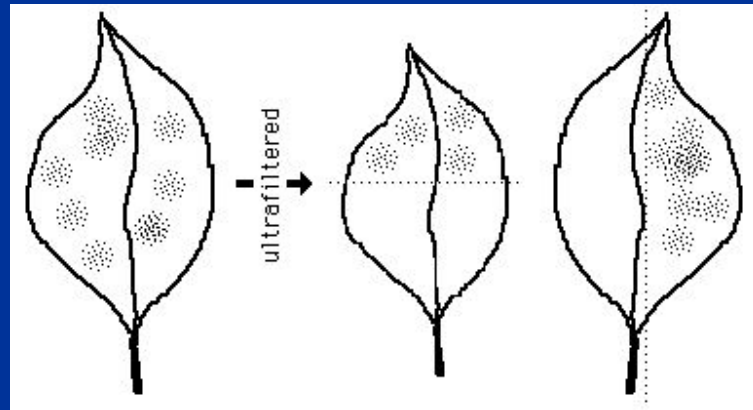
Віроїди

# Віроїди

- Дуже малі, ковалентно замкнені, кільцеві РНК молекули, здатні до автономної реплікації (не потребують віруса-хелпера) та ідукувати захворювання
- Розмір геному **246–399** нуклеотидів
- Не кодують жодного білка
- Використовують полімеразу хазяїна для реплікації
- Зараження найчастіше через механічне пошкодження та через насіння
- Відомо більше 40 видів віроїдів з багатьма варіантами
- Патогени рослин

# Відкриття

- Перший виявлений віроїд  
*Potato spindle tuber viroid*  
(PSTVd)
- 1967 Dr. Ted Diener



# *Potato spindle tuber viroid (PSTVd)*



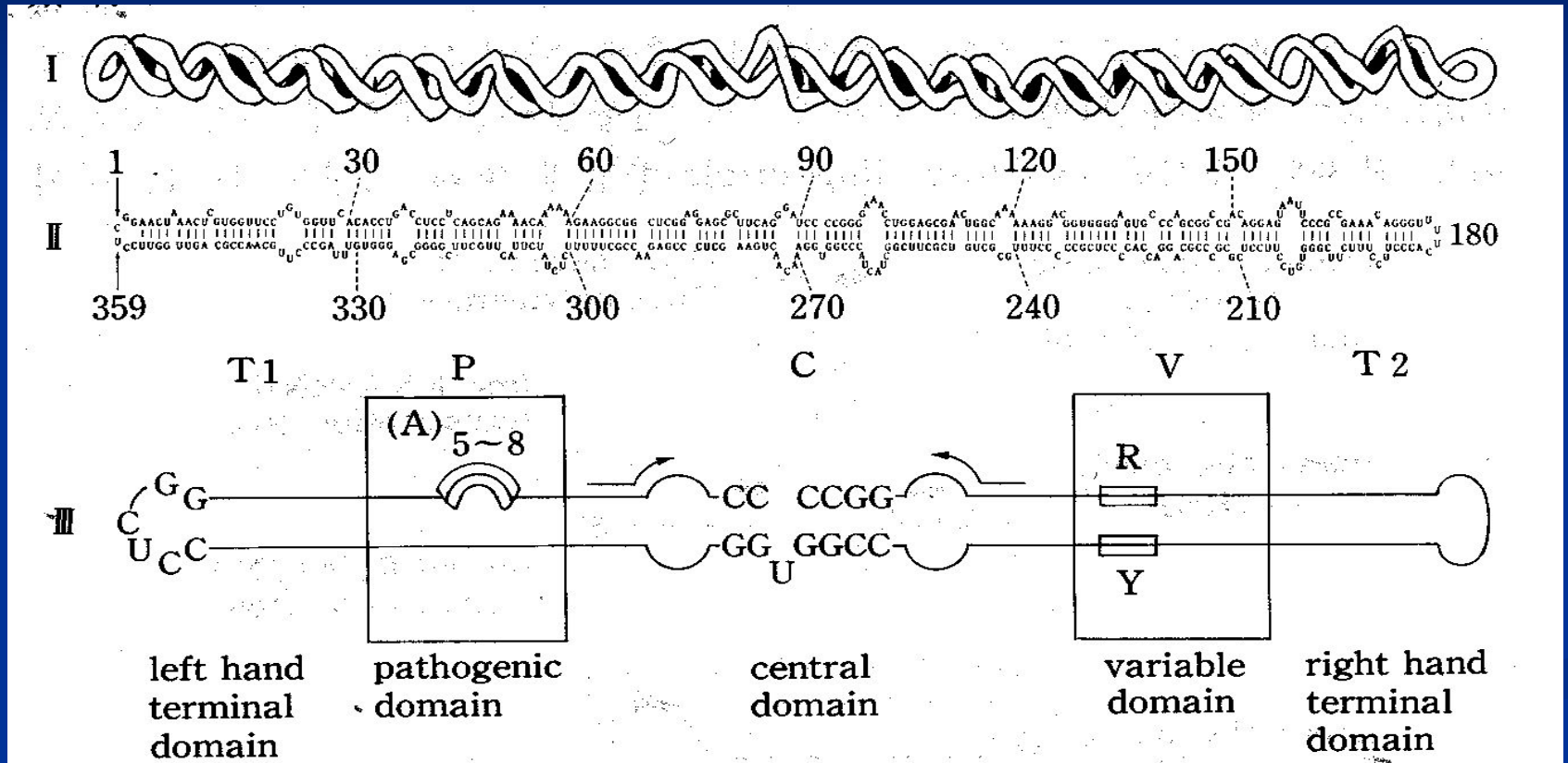
# Avsunviroidae ta Pospiviroidae

## Compilation of viroids

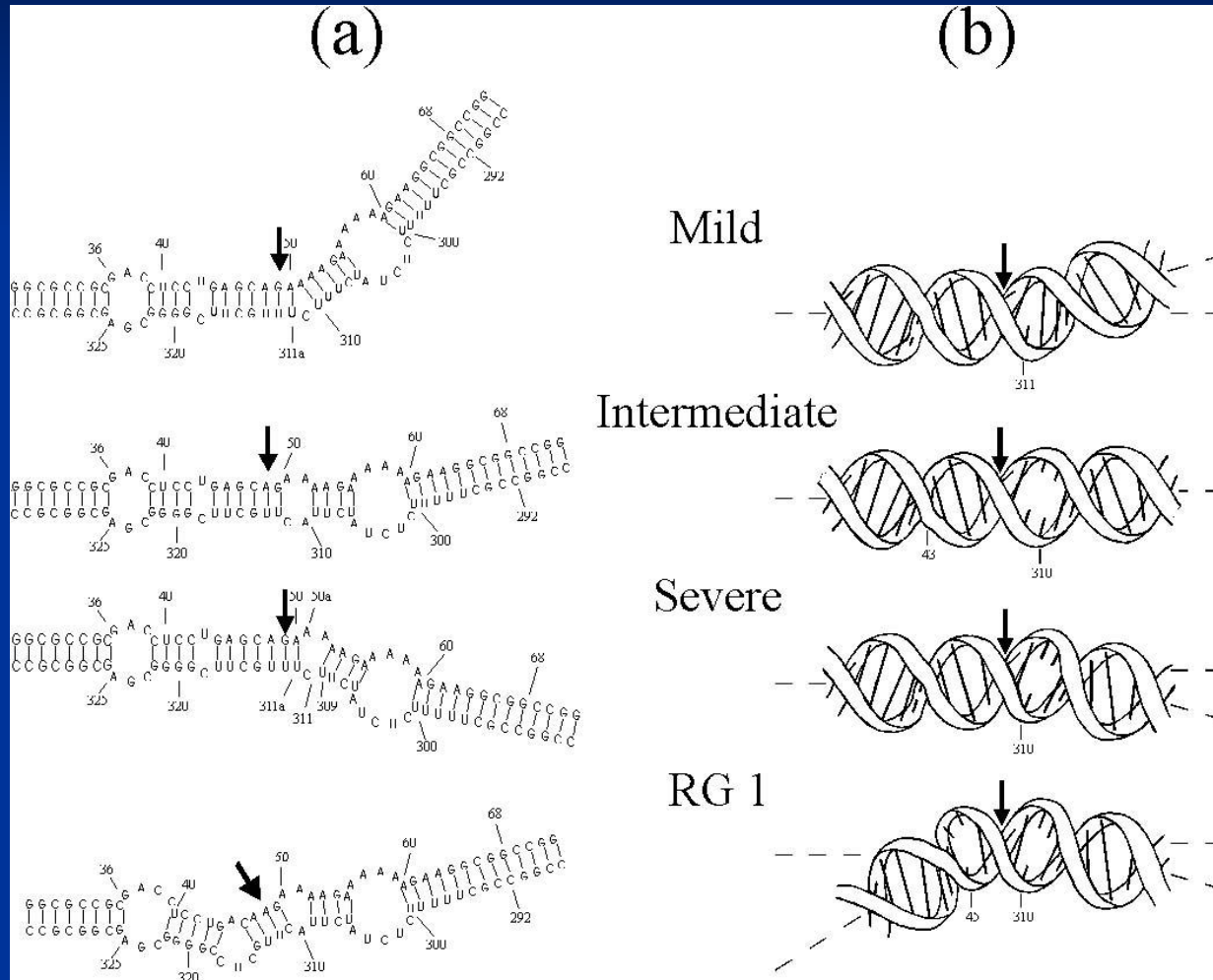
RNA species	Abbreviation	Number of sequences	RNA species	Abbreviation	Number of sequences
<b>Viroids</b>					
<b>ASBVd-type (group A)</b>					
<u>Avocado sunblotch viroid</u>	ASBVd	19			
<u>Peach latent mosaic viroid</u>	PLMVd	6			
<b>PSTVd-type (group B)</b>					
PSTVd group (subgroup B1)					
<u>Coconut cadang-cadang viroid</u>	CCCVd	7			
<u>Citrus exocortis viroid</u>	CEVd	33			
<u>Columnnea latent viroid</u>	CLVd	3			
<u>Chrysanthemum stunt viroid</u>	CSVd	4			
<u>Coconut tinangaja viroid</u>	CTiVd	2			
<u>Citrus viroid species</u>	CVdIV	1			
<u>Hop latent viroid</u>	HLVd	1			
<u>Hop stunt viroid</u>	HSVd	32			
<u>Iresine viroid</u>	IRVd	1			
<u>Mexican papita viroid</u>	MPVd	9			
<u>Potato spindle tuber viroid</u>	PSTVd	29			
<u>Tomato apical stunt viroid</u>	TASVd	3			
<u>Tomato planta macho viroid</u>	TPMVd	1			
<b>PSTVd-type (group B)</b>					
ASSVd group (subgroup B2)					
<u>Australian grapevine viroid</u>	AGVd	1			
<u>Apple dimple fruit viroid</u>	ADFVd	1			
<u>Apple scar skin viroid</u>	ASSVd	4			
<u>Citrus bent leaf viroid</u>	CBLVd	3			
<u>Citrus viroid species III</u>	Cvd-III	2			
<u>Coleus blumei viroid I</u>	CoVd	9			
<u>Grapevine yellow speckle viroid</u>	GYSVd	34			
<u>Grapevine 1B viroid</u>	G1BVd	1			
<u>Pear blister canker viroid</u>	PBCVd	1			



# Структура віроїдів

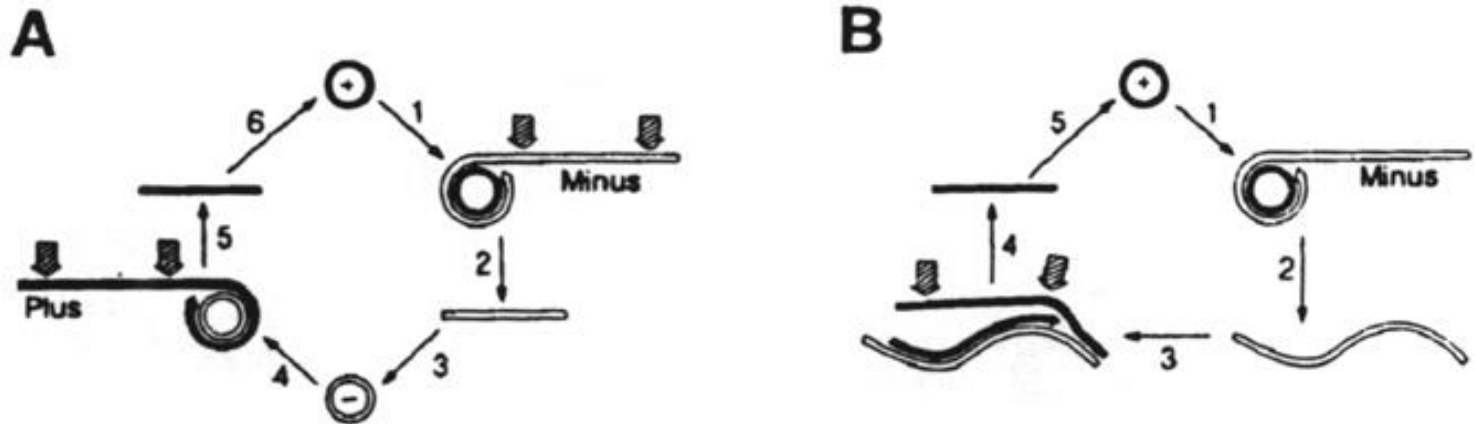


# Структура віроїдів



# Реплікація віроїда

- В ядрі (PSTVd) або хлоропласті (ASBVd)
- В хлоропласті розрізання рибозимопосередковане, у ядрі – ферментом хазяїна
- ДНК-залежна-РНК-полімераза хазяїна працює на + та – послідовностях РНК

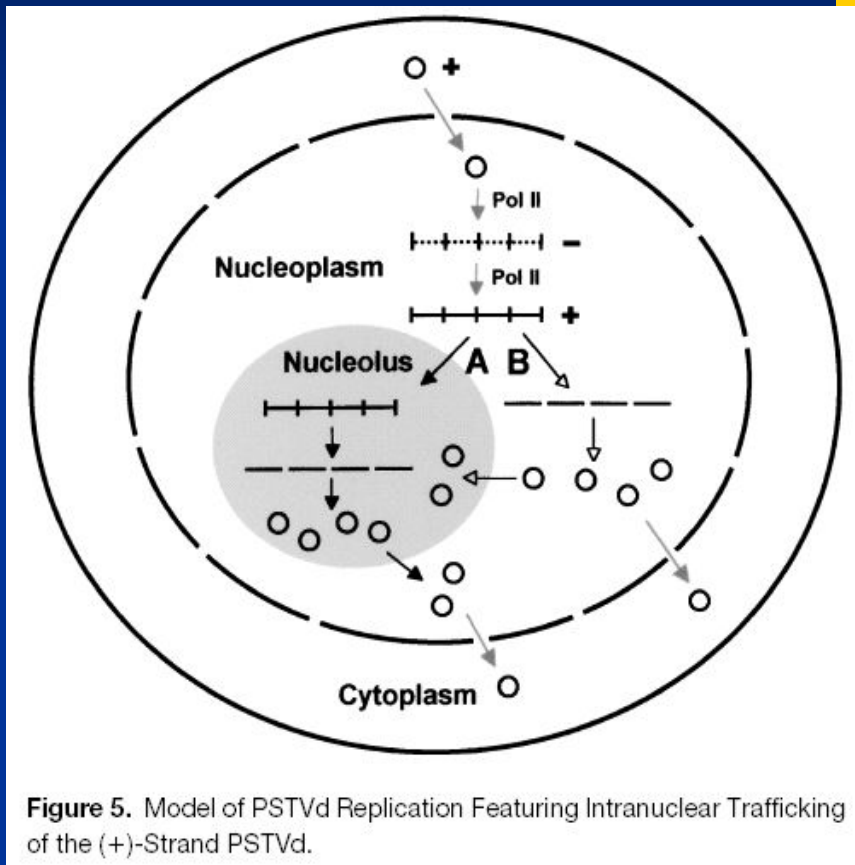


# Локалізація

- +ланцюг віроїдів локалізується і в ядерці, і в нуклеоплазмі
- -ланцюг – тільки у нуклеоплазмі

# Переміщення віроїда

для проникнення  
в крізь ядерну  
пору зв'язується  
з білком VirP1  
Через  
плазмодесми  
Через флоему

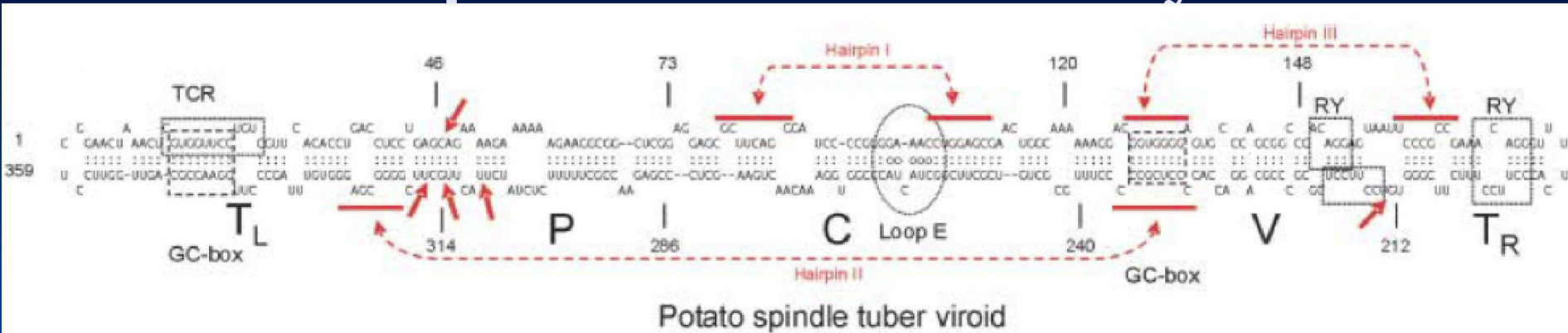


**Figure 5.** Model of PSTVd Replication Featuring Intranuclear Trafficking of the (+)-Strand PSTVd.

# Основні питання

- Які молекулярні сигнали примушують РНК-полімеразу хазяїна сприймати віроїд як матрицю для побудови комплементарного ланцюга?
- Що є причиною виникнення хвороби за відсутності віроїд-специфічних білків?
- Чим визначається коло господарів і чи обмежується воно рослинами?

# Організація геному

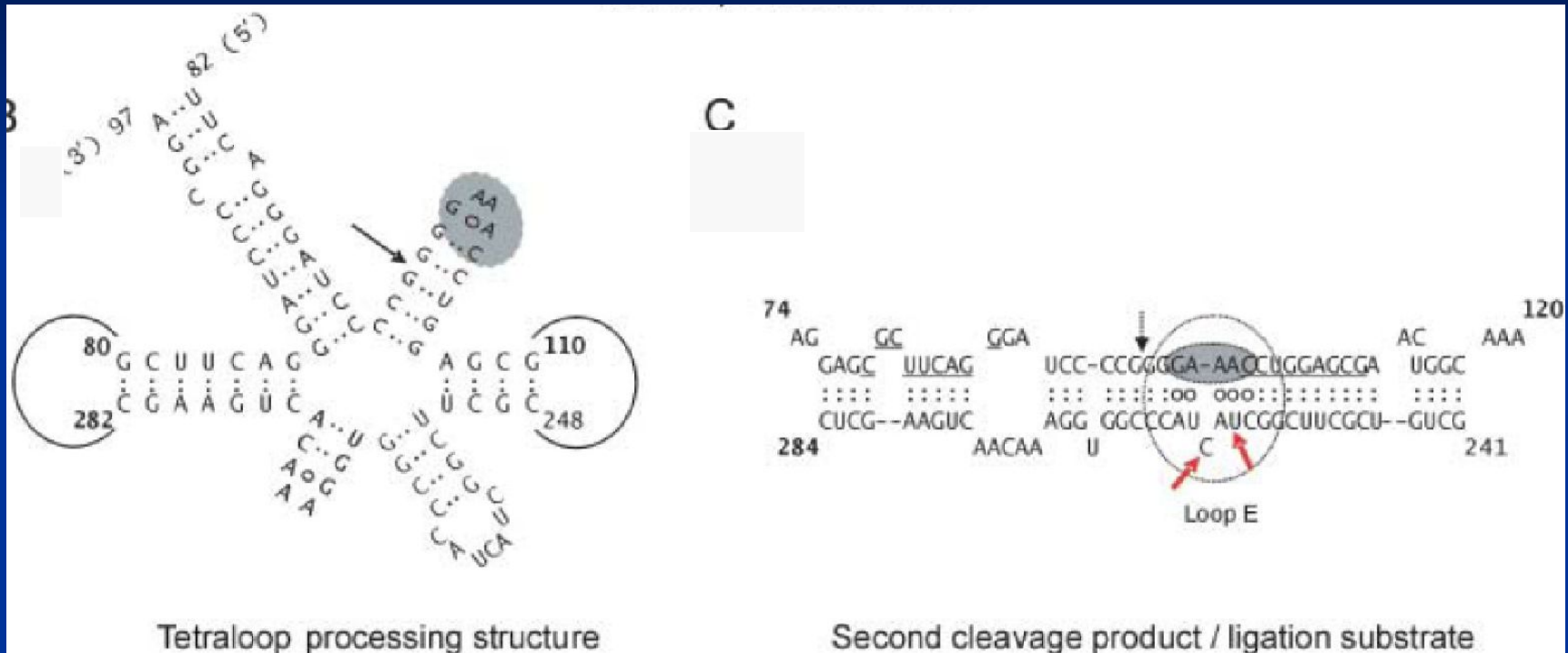


5 доменів: термінальні петлі  $T_r$  і  $T_p$ , патогенності (P), центральний з консервативною ділянкою (C), варіабельний (V).

Інші структурно-функціональні ділянки: повтори, що беруть участь в утворенні шпильок I-III, GC-boxes (РНК-полімераза), RY-boxes ( $\longleftrightarrow$ VirP1), TCR, УФ-чутлива петля  $\longleftrightarrow$  E

# Реплікація віроїду

- реплікація за механізмом кільця, що котиться



- сайт ініціації – U359 або C1 у T<sub>p</sub>, GC-boxes



- -РНК локалізуються у нуклеоплазмі, де, очевидно, відбувається транскрипція, у той час як +РНК розподілені між нуклеоплазмою та ядром.
- Реплікація РТSVd супроводжується появою siRNA (21-24 н), які переважно є дериватами +РНК, майже не представляють ділянок Р-домену. Інтерференція РНК має незначний вплив на реплікацію та накопичення віроїдів у протопласті.

# Транспорт в інфікованих рослинах

- відсутність movement-протеїнів
- мутації у правому T-домені перешкоджають нормальному міжклітинному транспорту
- мутації у петлі E блокують рух з флоєми до несудинних тканин
- 4 послідовності у P і 1 послідовність у V-домені визначають транспорт з обкладки судинних пучків до мезофілу
- за транспорт у ядро відповідають послідовності верхнього ланцюга CCR (дослідження конструкції PVX-GFP (green fluorescent protein) з вставленою в інтрон PSTVd cDNA )

# Взаємодія з компонентами клітини хазяїна

- щонайменше 3 детермінанти патогенезу у доменах T, P і V
- петля E: окрема патогенна детермінанта у позиції 257, сайт зв'язування для RIPs (ribosome-inactivating-proteins)
- вплив вторинної/третинної структури

# Взаємодія з компонентами клітини хазяїна

- інтерференція РНК господаря (суперечливі результати досліджень)
- взаємодія з протеїнами:
  - неспецифічна (лектин РР2 при транспорті у флоемі);
  - специфічна (Dicer-опосередковане роцплення PSTVd).

Зв'язуюча ділянка описана лише для VirP1.
- стимуляція протеїнкіназної активності

# Самостійна робота:

-Порівняти реплікацію віроїдів з +РНК вмісними вірусами