

## Лекція 1. ГЕНОМ ВІРУСІВ

*Віруси* - це особлива форма життя, що об'єднує організми з неклітинною будовою. Віруси здатні існувати в двох формах: поза клітинами і всередині клітин.

Поза клітин існують вільні віруси - віріони. Віріони не проявляють особливостей біологічних систем: у них відсутній обмін речовин, і вони не здатні до самовідтворення. Віріони складаються з нуклеїнових кислот (ДНК або РНК), укладених в білкову оболонку - капсид.

До складу капсида входить строго певна кількість повторюваних білкових субодиниць - капсомерів. Наприклад, у вірусу поліомієліту до складу капсида входить 60 капсомерів, у аденовірусу - 252, у вірусу тютюнової мозаїки - 2000.

Розміри вірусів коливаються від 20 до 350 нм. За морфологією розрізняють наступні форми вірусів: сферичну, паличкоподібну, кубоїдальну, сперматозоїдну. За характером симетрії капсида розрізняють віруси зі спіральним, кубічним (ікосаедрічним) і комбінованим типом симетрії.

Ступінь складності віріона може бути різним. У простих вірусів до складу віріона входить тільки нуклеїнова кислота і білки, які пов'язані в єдину нуклеопротеїнову структуру - нуклеокапсид. У складних вірусів є додаткова ліпопротеїнова оболонка - суперкапсид. До складу складних віріонів можуть входити вуглеводи і деякі ферменти. Однак віруси ніколи не містять метаболічних систем, що забезпечують обмін речовин.

Для власного відтворення віруси повинні проникнути в клітину. Поверхня капсида включає хімічні речовини, що сприяють прикріпленню віріона до поверхні клітини і проникненню всього віріона або нуклеїнової кислоти в клітину. Спочатку відбувається адсорбція (фіксація) віріонів на поверхні клітини, а потім всередину клітини проникає або весь віріон або тільки вірусна нуклеїнова кислота. У більшості випадків віруси проникають в клітину шляхом віропексису (цей механізм проникнення вірусів в клітину схожий на фагоцитоз).

Як і будь-які чужорідні речовини, нуклеїнові кислоти вірусів, які проникли в клітину, повинні руйнуватися захисними системами клітини. Основу захисних систем складають нуклеази - ферменти, що розщеплюють нуклеїнові кислоти. Однак існує безліч способів захисту вірусних нуклеїнових кислот від руйнування ферментними системами клітини. Наприклад, у великих ДНК-вмісних бактеріофагів до складу вірусної ДНК входять модифіковані основи: окислені і метильовані. Така модифікована ДНК не руйнується клітинними нуклеазами.

Після проникнення в клітину віруси вступають в вегетативно-репродуктивну фазу, тобто набувають здатності до обміну речовин і відтворення, причому, метаболізм вірусів нерозривно пов'язаний з метаболізмом клітини-господаря. Таким чином, віруси є облігатними (обов'язковими) спеціалізованими внутрішньоклітинними паразитами на молекулярно-генетичному рівні.

Багато віруси приступають до репродукції відразу ж після проникнення в цитоплазму клітини-господаря. Однак в ряді випадків нуклеїнові кислоти вірусів вбудовуються (інтегруються) в склад хромосом господаря. В інтегрованому стані вірус називається провірусом. Провіруси не відрізняються від генетичного матеріалу хазяїна і відтворюються разом з ним. В інтегрованому (вірогенному) стані віруси можуть перебувати довгий час. Але в ряді випадків (при зміні фізіологічного стану клітини, наприклад, при опроміненні) починається репродукція вірусу. За допомогою ферментів і пластичних

речовин клітини йде реплікація вірусних нуклеїнових кислот і вірусних білків. Шляхом самозборки з цих молекул формується безліч віріонів, які залишають клітину. При цьому клітина може загинути або зберегтися.

### **Різноманіття і значення вірусів**

В даний час відомо понад 800 видів вірусів (ймовірно, мільйони видів ще не відкриті). Віруси класифікуються по носіям спадкової інформації (ДНК-вмісні та РНК-вмісні) і по господарям (віруси рослин, віруси грибів, віруси тварин і віруси прокариот, або бактеріофаги). Біномінальна номенклатура в вірусології не закріпилася, і зазвичай кожен вид вірусу отримує власне ім'я.

Віруси - збудники багатьох інфекційних захворювань рослин, тварин і людини. У той же час, віруси - збудники захворювань у небажаних для людини організмів («вороги наших ворогів»). Віруси широко використовуються як об'єкти молекулярно-генетичних досліджень. В генній інженерії віруси застосовуються для створення генетичних конструкцій і для перенесення генетичного матеріалу.

**Походження вірусів.** Існує ряд теорій походження вірусів. Згідно з однією з теорій, віруси - дуже спрощені прокариотичні організми, що втратили цитоплазму. Протилежні теорії розглядають віруси як частину генетичного матеріалу клітини, винесеного за її межі.

**Біологічне значення вірусів** в першу чергу пов'язують з їх патогенністю - здатністю викликати захворювання. Розрізняють гострі вірусні захворювання (наприклад, грип), хронічні та латентні (приховані).

Боротьба з вірусними захворюваннями людини і тварин ведеться з використанням неспецифічних препаратів (наприклад, інтерферону), специфічних сироваток і препаратів, що пригнічують репродукцію вірусів. Для профілактики вірусних захворювань застосовують різні вакцини. Антибактеріальні препарати (сульфаніламід, антибіотики) на віруси не діють.

Деякі віруси (аденовіруси, ретровіруси) можуть перешкоджати нормальному функціонуванню генетичного апарату клітини господаря, що призводить до розвитку онкологічних захворювань.

### **Геном вірусів.**

Геном вірусів включає:

- Структурні гени, які кодують білки. Займають приблизно 95% вірусної хромосоми. Білки вірусів можна розділити на кілька груп: структурні, ферменти, регулятори.
- Регуляторні послідовності, які не кодують білки: промотори, оператори і термінатори.
- Інші некодуючі ділянки (сайти), в тому числі:
  - ділянку *attP*, що забезпечує інтеграцію вірусної хромосоми в хромосому клітини-господаря;
  - ділянки *cos* - липкі кінцеві ділянки лінійних вірусних хромосом, що забезпечують замикання лінійної хромосоми в кільцеву форму.

Гени, що кодують рРНК і тРНК, в геномі вірусів зазвичай відсутні. Однак в геномі великого фага Т4 є гени, що кодують кілька тРНК.

Геном вірусів відрізняється високою щільністю упаковки інформації.

Серед фагів найменша молекула ДНК у фага X174. Це паразит *E.coli*. ДНК цього фага складається з 5000 нуклеотидів: А = 25%, Т = 33%, Г = 24%, Ц = 18%. Різний вміст азотистих основ показує, що вони не можуть утворювати пари, а значить, ДНК не має двухланцюгової конфігурації. Вона складається з одного ланцюга і має форму кільця.

Геном цього вірусу містить всього 10 генів. Причому два гени знаходяться в межах двох інших генів, тобто ці гени перекриваються. Зокрема, ген В знаходиться в межах гену А, а ген Е - в межах гену D.

Цей феномен (перекривання генів) згодом був виявлений і у інших бактеріофагів *E.coli*. Так, у ряду РНК-бактеріофагів (R17, MS2, QB) були відомі всього три гени: реплікази, білка оболонки і дозрівання вірусної частинки. Однак після виявлення мутації, яка блокує лізис ураженої клітини, виявлено ген, для якого вже не залишалося місця на РНК бактеріофази. Проте виявили білок L розміром в 75 амінокислот, який кодується цим геном. Виявилося, що перший ген локалізований частиною в гені білка оболонки (47 основ), частиною в міжгенному інтервалі (36 основ) і частиною в гені РНК-реплікази (142 основи).

Перекриття генів - нерідке явище у вірусів і транспозонів, але це не означає, що код може бути перекриваючимся. У кожному гені що перекривається триплети так само зчитуються з фіксованої точки, а кожен нуклеотид належить одному кодону.

### **Особливості вірусів еукаріот**

У вірусів еукаріот виявлені наступні особливості:

1. Інtron-екзонна структура генів.
2. Модифікація білків після синтезу поліпротеїнів: весь геном транскрибується у вигляді однієї молекули мРНК, яка служить матрицею для синтезу поліпротеїну - одного гігантського інертного білка, і лише потім відбувається розщеплення поліпротеїну на білки, що виконують певні функції.
3. Перекриття генів (мавп'ячий вірус SV 40, вірус грипу).

### **ДНК-віруси**

До ДНК-вірусів відносяться багато вірусів бактерій - *бактеріофаги* (або просто *фаги*). Деякі дрібні фаги (наприклад, фаг M13) при репродукції не руйнують клітину. Репродукція великих фагів (наприклад, фага Т-4) призводить до загибелі клітини. Фаг Т-4 - це один з найбільш складно організованих вірусів. Білковий капсид включає не менше 130 білків, що утворюють головку, комірець, скоротливий хвіст, базальну пластинку і хвостові нитки. Така будова капсиду дозволяє вводити ДНК в бактеріальну клітину через товсту оболонку, тому подібні віруси образно називають «живими шприцами». Т-фаги можуть існувати у вигляді профага тривалий час. До ДНК-вірусів відносяться збудники багатьох захворювань людини і тварин: віруси віспи, герпесу, гепатиту В, аденовіруси ссавців і людини (викликають шлунково-кишкові захворювання, ГРВІ, кон'юнктивіти), віруси бородавок людини. До ДНК-вірусів відносяться і деякі віруси рослин (вірус золотистої мозаїки квасолі, вірус мозаїки цвітної капусти). Деякі віруси використовуються в генній інженерії для переносу генів від одних організмів до інших, наприклад, мавп'ячий вірус SV 40.

Віріони ДНК-вірусів містять ДНК. Об'ємом ДНК визначається кількість білків у віріоні: один поліпептид кодується відрізком ДНК довжиною приблизно 1 тисячу нуклеотидів (нуклеотидних пар). Після проникнення в клітину вірусна ДНК стає матрицею для синтезу ДНК і РНК.

Приклади організації генома ДНК-вірусів

1. Кільцева дволанцюгова ДНК довжиною близько 5 тпн.
  - Мавп'ячий вірус SV 40. Дрібний еукаріотичний вірус. Віріони у вигляді ікосаедра. Капсид білковий. Використовується в генній інженерії як вектор переносу генів. Кодує 5 білків.
  - Віруси бородавок людини.
2. Кільцева одноланцюгова ДНК довжиною близько 5 тн; може бути як кодуючою, так і антикодуючою.
  - Дрібні бактеріофаги типу M13. Не руйнують клітину. Капсид включає 8 білків.
  - Вірус золотистої мозаїки квасолі.
3. Лінійна дволанцюгова ДНК довжиною 30-150 тпн.
  - Бактеріофаги типу T4. Віріони великі. Білковий капсид зі 130 білків включає: голівку, хвостовий відділ і хвостові нитки. Ці віруси можуть існувати у вигляді профага тривалий час.
  - Аденовіруси ссавців і людини. Віріони середніх розмірів у вигляді ікосаедра. Капсиди білкові. Викликають ГРВІ, кон'юнктивіти, шлунково-кишкові захворювання, іноді володіють онкогенними властивостями.
  - Віруси віспи, герпесу і їм подібні. Віріони великі. Є ліпопротеїнова оболонка.
4. Лінійна одноланцюгова ДНК довжиною близько 5 тн; ДНК може бути як кодуючою, так і антикодуючою. У людини відомі як супутники аденовірусів.
5. Дволанцюгова ДНК, замкнута в кільце з перекриваючимися сегментами. Довжина ДНК - 3-8 тпн.
  - Вірус гепатиту В. Віріон сферичний, середніх розмірів. Є додаткова оболонка з вірусних і клітинних білків. Кодує 5 білків.
  - Вірус мозаїки цвітної капусти (CaMV). Промотор 35S-RNA (CaMV35S) цей вірус широко використовується в традиційній генній інженерії для створення генетичних конструкцій.

### **РНК-вмісні віруси**

До РНК-вмісних вірусів відносяться багато вірусів рослин, збудники захворювань людини і тварин: вірус поліомієліту, віруси грипу А, В і С, віруси паротиту (свинки), кору, чуми м'ясоїдних тварин (чумки), сказу, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ). В окрему групу виділяються арбовіруси, які переносяться членистоногими (кліщами, москітами), наприклад, віруси кліщового енцефаліту, жовтої лихоманки. Багато РНК-вмісних вірусів викликають ГРВІ (наприклад, коронавіруси), шлунково-кишкові захворювання (реовірус птахів, ссавців і людини). Деякі РНК-віруси використовуються в біотехнології, наприклад, віруси поліедрозу комах.

Віріони РНК-вмісних вірусів містять РНК. Після проникнення в клітину вірусна РНК стає матрицею для синтезу ДНК і РНК.

У 1970р Тьомін і Балтімор, вивчаючи вірус саркоми Рауса (онкогенний вірус), встановили, що він містить невідомий раніше фермент, який вони назвали зворотною транскриптазою. Такі віруси, заражаючи клітину, вносять в неї не тільки свій геном, що складається з одноланцюгової РНК, але і фермент зворотної транскриптази. Потім цей РНК-геном при спільній дії зворотної транскриптази вірусу і ДНК-полімерази клітини-господаря послідовно транскрибується в дволанцюгову ДНК. Це відбувається в три етапи:

- 1) синтез (-) - ланцюга ДНК на вірусній (+) - РНК як на матриці;
- 2) руйнування вірусної РНК у складі гібрида РНК-ДНК, що утворився;

3) синтез (+) - ланцюга ДНК на (-) Оланцюзі з утворенням дволанцюгової ДНК. Це також характерно для ретровірусів, в т.ч. для вірусу СНІДу.

Далі цей ДНК-транскрипт включається в хромосому клітини-господаря і при її поділі реплікується вже як частина генома клітини. Ці інтегровані вірусні послідовності транскрибуються назад в мРНК і транслюються з утворенням білків, які впливають на нормальну проліферацію клітин і вони стають клітинами пухлини.

Більш поширений інший спосіб реплікації РНК-вірусів. При ньому використовується інший фермент - РНК-синтетаза (або РНК-залежна РНК-полімераза). Тут на вірусній РНК як на матриці синтезується не ДНК, а РНК. Причому це відбувається в цитоплазмі ураженої клітини. Це характерно для пікорнавірусів, рабдовірусів і параліксовірусів.

Реовіруси ( «віруси-сирітки») складаються з двохланцюгової РНК, але ключовим ферментом в їх синтезі також є РНК-синтетаза.

Приклади організації генома РНК-вірусів

1. Лінійна одноланцюгова мРНК (плюс-ланцюг) довжиною близько 4 тн; у вигляді єдиної молекули або у вигляді декількох різних молекул. Плюс-ланцюг відразу ж може використовуватися для трансляції. Вегетативно-репродуктивна фаза цих вірусів протікає в цитоплазмі. В плюс-ланцюзі закодована РНК-репліказа (РНК-залежна РНК-полімераза). Представники:

- Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) - сегментована РНК. Віріон ниткоподібний (18x300 нм). ВТМ відкритий Д.І. Івановським в 1982 р

- Вірус поліомієліту - несегментована РНК. Віріони дрібні, у вигляді ікосаедра. Капсид білковий.

- Вірус сказу. Ниткоподібний віріон. Є додаткова ліпопротеїнова оболонка.

- Арбовіруси (переносяться членистоногими: кліщами, москітами) - віруси кліщового енцефаліту, жовтої лихоманки. Морфологія і розміри віріонів різноманітні, наприклад, вірус енцефаліту містить 9 білків. Є додаткова ліпопротеїнова оболонка.

- Дрібні бактеріофаги (з несегментованою РНК).

2. Лінійна одноланцюгова кРНК (мінус-ланцюг, порядок нуклеотидів комплементарний по відношенню до мРНК). Мінус-ланцюг не може служити для трансляції та використовується як матриця для синтезу плюс-ланцюга. Плюс-ланцюг служить для трансляції вірусних білків і використовується як матриця для синтезу вірусної кРНК. Вегетативно-репродуктивна фаза цих вірусів також протікає в цитоплазмі.

- Віруси грипу А, В, С. Вірус грипу А містить мінус-ланцюг РНК, що складається з 8 фрагментів. Фрагменти РНК пов'язані з вірусними білками і утворюють спіральний нуклеокапсид. Зверху нуклеокапсиду розташовується гліколіпопротеїновий суперкапсид. У складі віріона 10 білків. До складу суперкапсиду входить два білка, що визначають антигенні властивості вірусу: гемаглютинін та нейрамінідази. Крім того, до складу віріона входить вже готова РНК-репліказа, що забезпечує синтез плюс-ланцюга на матриці мінус-ланцюга.

- Віруси паротиту (свинки), кору, чуми м'ясоїдних тварин (чумки). Сферичний віріон середніх розмірів. Є додаткова ліпопротеїнова оболонка.

3. Лінійна дволанцюгова РНК

- Дрібні бактеріофаги. Віріони дрібні, сферичні або у вигляді ікосаедра. Капсид білковий.

- Віруси поліедрозу комах. Віріони дрібні, сферичні або у вигляді ікосаедра. Капсид білковий. Використовуються в біотехнології (для синтезу інтерферону).

- Реовіруси птахів, ссавців і людини. Віріони дрібні, сферичні або у вигляді ікосаедра. Капсид білковий. Викликають ГРВІ, шлунково-кишкові захворювання. РНК фрагментована (10 ... 11 фрагментів), кодує 11 білків.

4. Дві лінійні одноланцюгові однакові молекули мРНК довжиною близько 10 тн. Ретровіруси. Здатні інтегруватися в ДНК. До складу віріонів входить фермент зворотна транскриптаза (ревертаза). Є додаткова ліпопротеїнова оболонка. Багато ретровірусів викликають онкологічні захворювання: лейкози, саркоми, пухлини молочних залоз. До ретровірусів відноситься і вірус імунодефіциту людини, що викликає СНІД.

- Вірус імунодефіциту людини (ВІЛ). Містить один плюс-ланцюг РНК, кодує 13 білків. Сферичний віріон. Є додаткова ліпопротеїнова оболонка, що включає фрагменти мембран людини. Вибірково вражає Т-лімфоцити.

ВІЛ - це вірус імунодефіциту людини, який викликає важке невиліковне захворювання - синдром набутого імунодефіциту (СНІД). СНІД - це захворювання імунної системи, яке проявляється в тому, що безпечні для здорової людини мікроорганізми набувають здатність викликати важкі інфекційні захворювання.

В організмі людини ВІЛ вибірково вражає строго певний тип лімфоцитів - Т4-лімфоцити (Т-хелпери), що відповідають за розпізнавання чужорідних антигенів. У здорової людини титр (концентрація) Т4-лімфоцитів становить 800 клітин на 1 мл крові, але при захворюванні на СНІД цей показник знижується до 100.

ВІЛ відноситься до ретровірусів. Його геном представлений лінійною одноланцюговою молекулою РНК (це плюс-ланцюг, або мРНК). ВІЛ - це складний вірус. До складу віріона входить нуклеокапсид (власне віріон) і зовнішня ліпопротеїнова оболонка. До складу нуклеокапсида входить РНК (дві молекули) і 13 вірусних білків, в тому числі, і зворотна транскриптаза (ревертаза). До складу ліпопротеїнової оболонки віріона входять фрагменти мембран загинувших лімфоцитів, що містять комплекс з двох особливих білків: глікопротеїнів **gp41** і **gp120**. Білок **gp120** розпізнає Т-лімфоцити, а білок **gp41** «пробиває» мембрану Т-лімфоциту і забезпечує проникнення нуклеокапсида в клітину.

В інфікованій клітині на матриці вірусної РНК за допомогою вірусної зворотної транскриптази синтезується мінус-ланцюг ДНК, а на ній - плюс-ланцюг ДНК. Вірусна РНК при цьому руйнується. Новоутворена дволанцюгова ДНК вбудовується в певну ділянку однієї з хромосом клітини господаря. Інтегрована ДНК-копія вірусного генома є провірусом. В такому стані ретровірус може довгий час співіснувати з інфікованим організмом - вірусноносієм. Однак, отримавши певні молекулярні сигнали, з провірусної ДНК ініціюється транскрипція вірусної мРНК, а з неї - синтез вірусних білків. Потім відбувається самосборка безлічі вірусних частинок і їх вихід з клітини. Клітка господаря (лімфоцит) гине, а частина її мембран утворює ліпопротеїнову оболонку вірусу. Загибель Т-хелперів і призводить до розвитку СНІДу.

Для фолдингу вірусних білків також потрібні шаперони.

За останніми даними, ДНК фага Т4 містить близько 250 генів.



До складу ж зібраної фагової частинки входить не більше сотні різних білків.

Решта білків, які кодуються фаговою ДНК, грають допоміжну роль: забезпечують протікання різних стадій фагової інфекції, в тому числі і зборку готових віріонів.

Серед цих допоміжних білків є і **шаперони**. Тобто, фаг приносить з собою в клітину, окрім іншого, інформацію про свої власні шаперони, які будуть забезпечувати фолдинг його власних структурних білків.

Існують інфекційні агенти, які не є вірусами. До однієї з цих груп відносяться *віроїди* - дрібні одноланцюгові кільцеві молекули РНК довжиною до 300 нуклеотидів, що не кодують власних білків (не мають власного капсида). Віроїди викликають багато хвороб рослин, наприклад, веретеноподібні бульби картоплі. До віроїдів близькі *вірусоїди*. Це молекули РНК, які здатні до самовідтворення в присутності вірусу-помічника. Вірусоїди також викликають захворювання рослин, наприклад, скороминушу смугастість люцерни.

До іншої групи інфекційних агентів відносяться регуляторні білки *пріони*. Пріони включають ті гени, які не повинні функціонувати в даний час і в даній тканині. Це порушує нормальне функціонування клітин, що призводить до розвитку важких захворювань, наприклад, енцефалопатії («сказ корів»).