

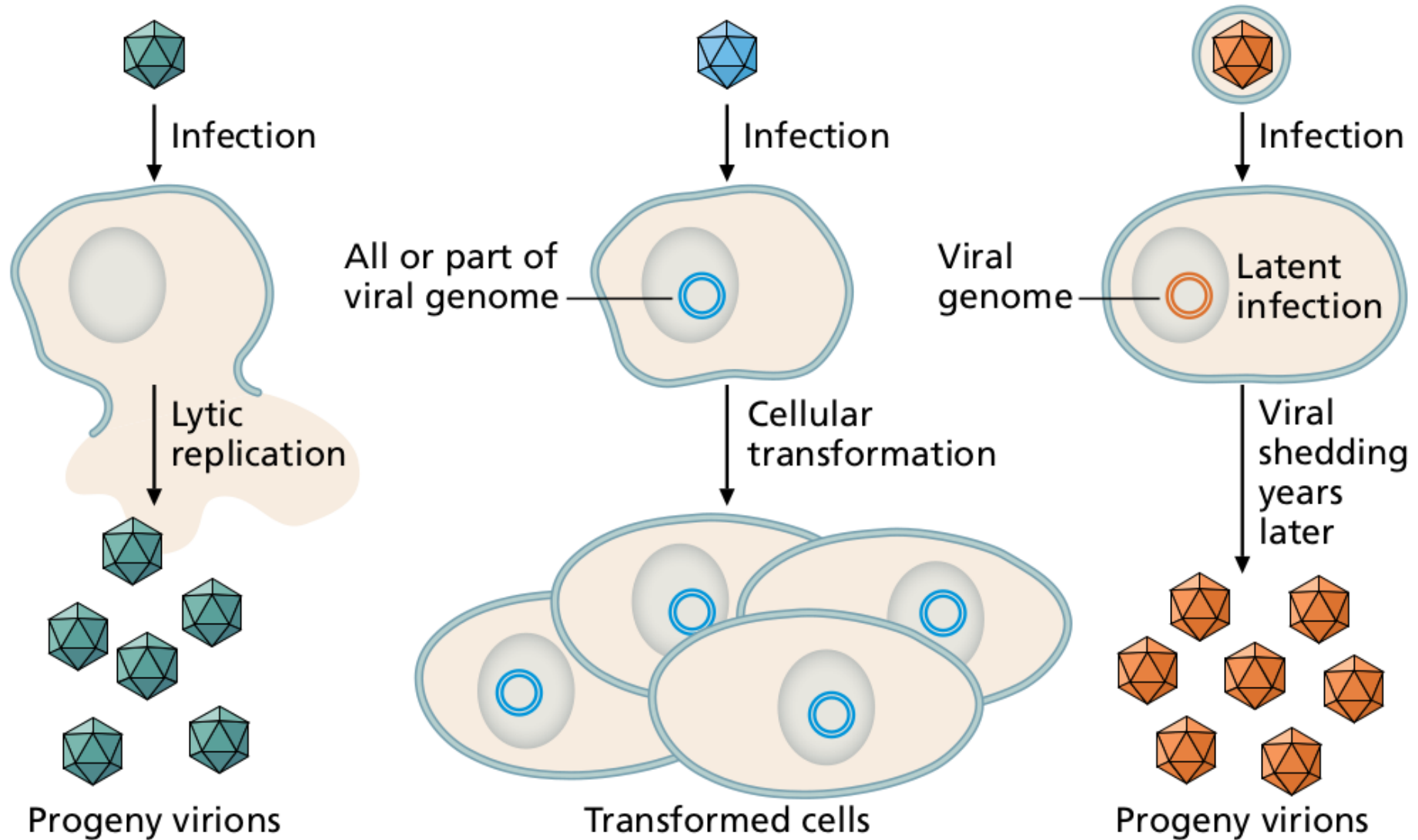
Ders6: Çift Zincir DNA Virüsleri

MBG4222 - Doç.Dr.Alper YILMAZ - 29 Mart, 5 Nisan 2024

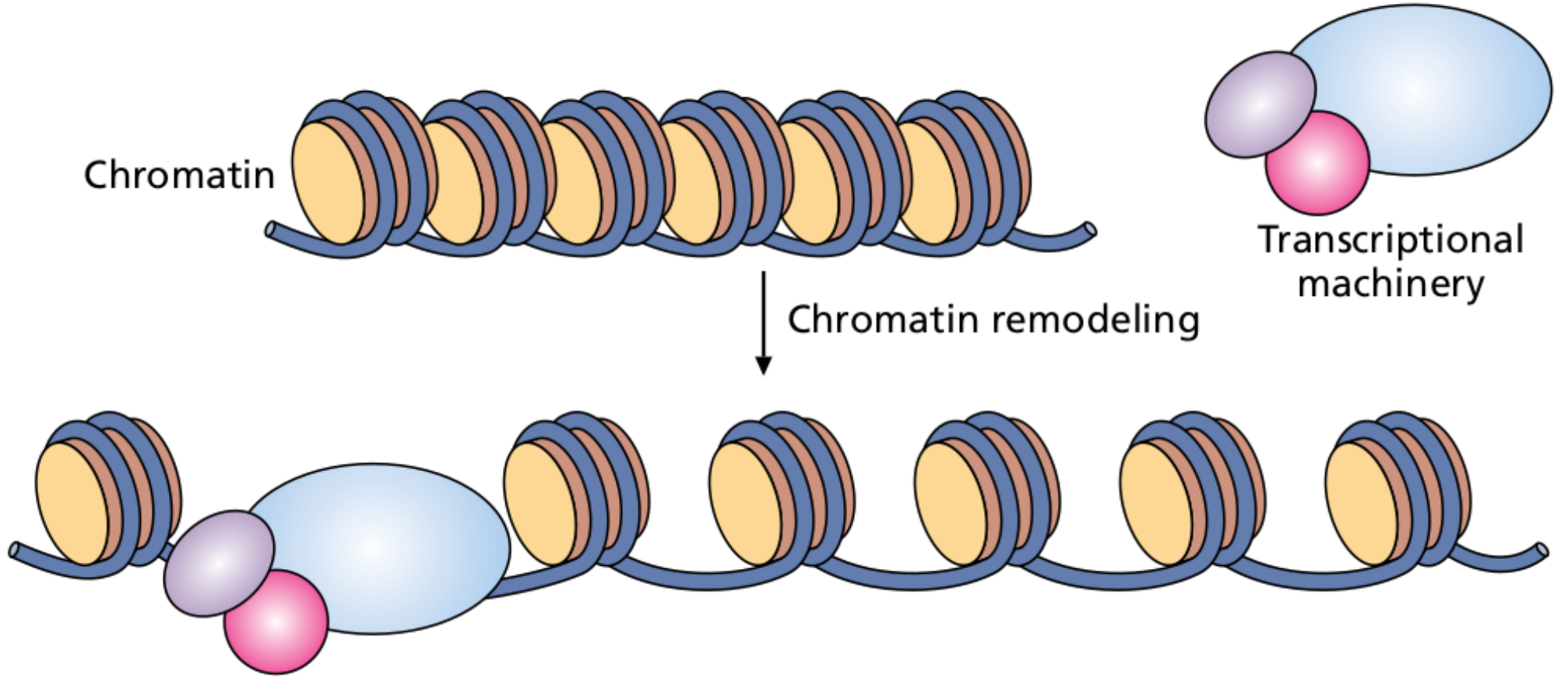
Özet

- SV40: küçük genom, hücre döğüsü ve apoptosis kontrol edebilir. p53 keşfi
- HPV (Human papillomavirus): Küçük genomdan gen ifadesi ve genom replikasyon işlemleri epitel hücrelerin farklılaşma seviyesine bağlıdır
- Human adenovirus C: Lineer büyük genom. 5'ucundaki protein ile uçların kısalması problemi önlenir. İntron keşfi
- Herpes simplex virus 1: Oldukça büyük lineer DNA genom
- Vaccinia: Kendi RNA Pol ve replikasyon proteinlerini kodlar, çekirdekte değil, sitoplasmada çoğalır. Self-priming

Olası sonuçlar

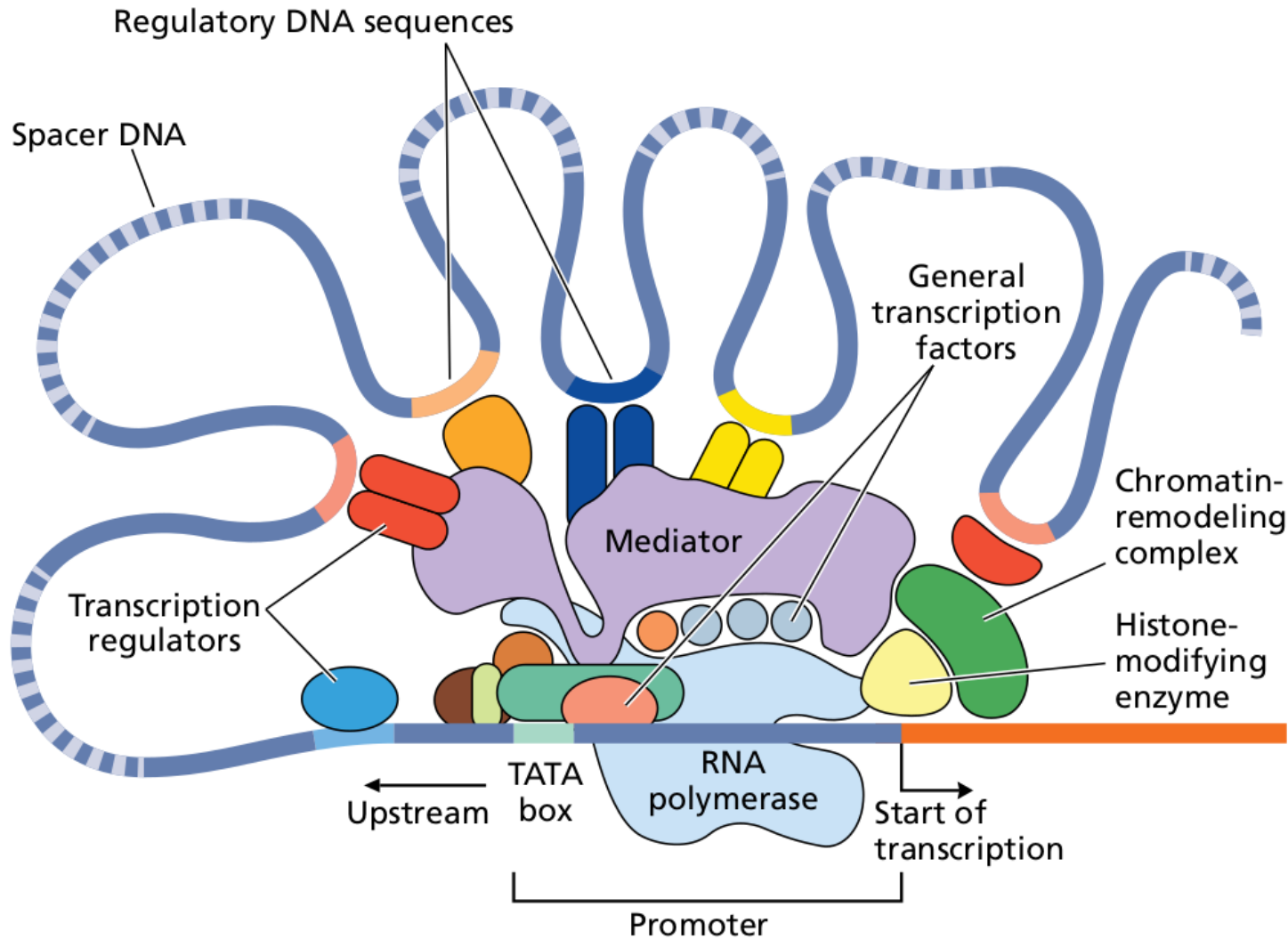


Ökaryot transkripsiyon mekanizması



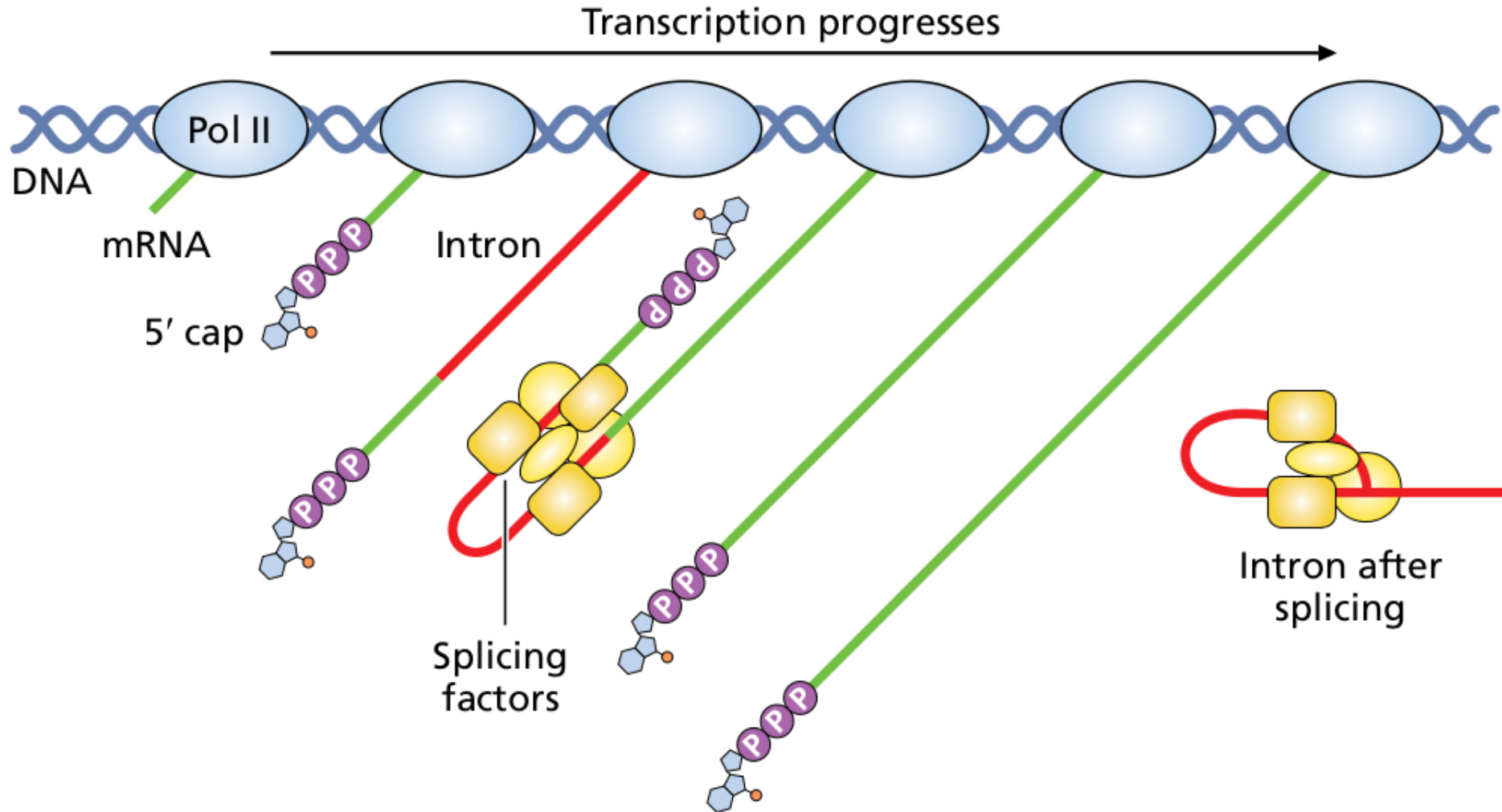
Çoğu dsDNA virüs, konak hücrenin transkripsiyon mekanizmasını kullanır, o yüzden konak hücredeki kromatin remodelleme ve diğer kurallara uymak zorundadır.

Ökaryot transkripsiyon - Mediator

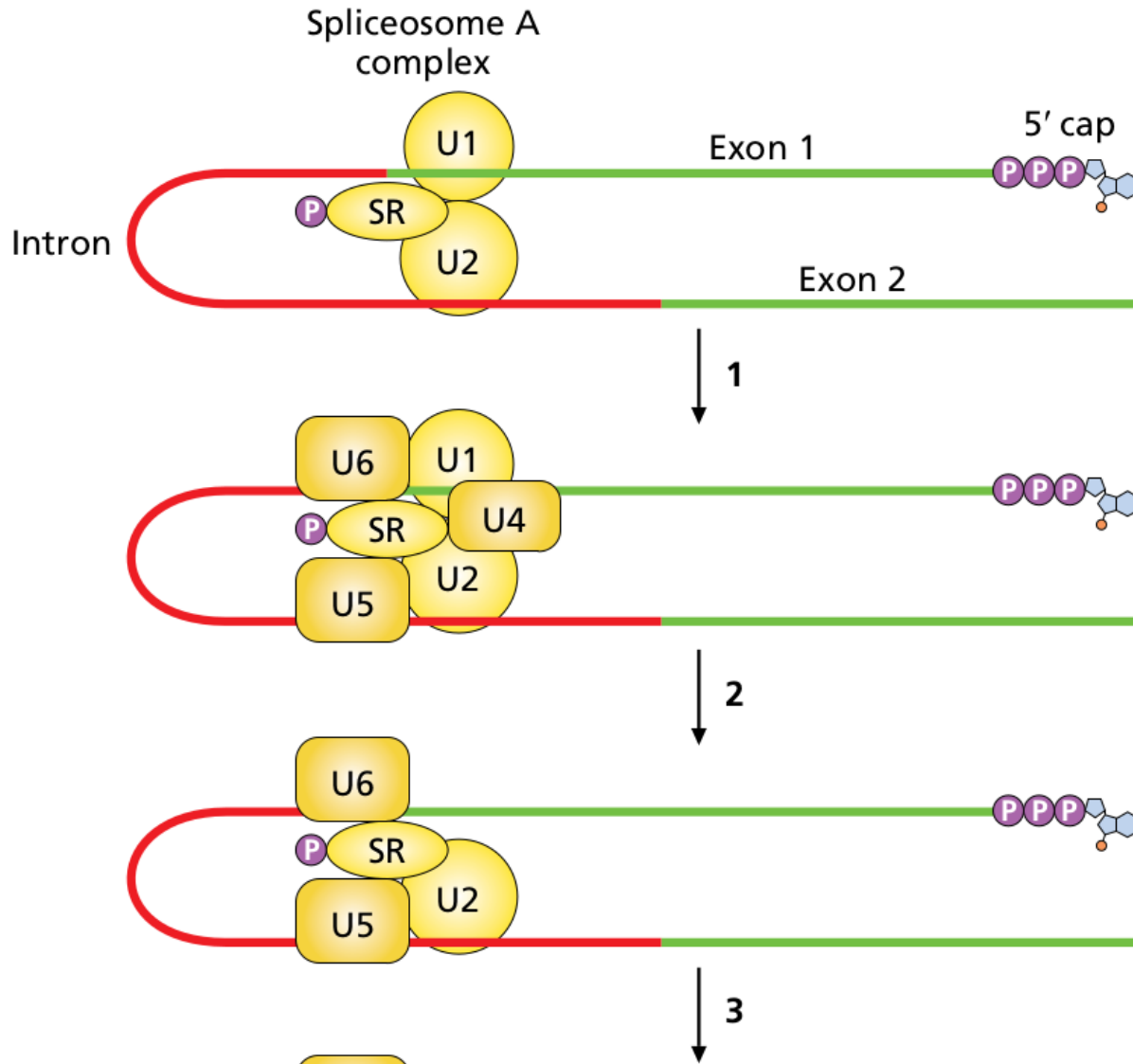


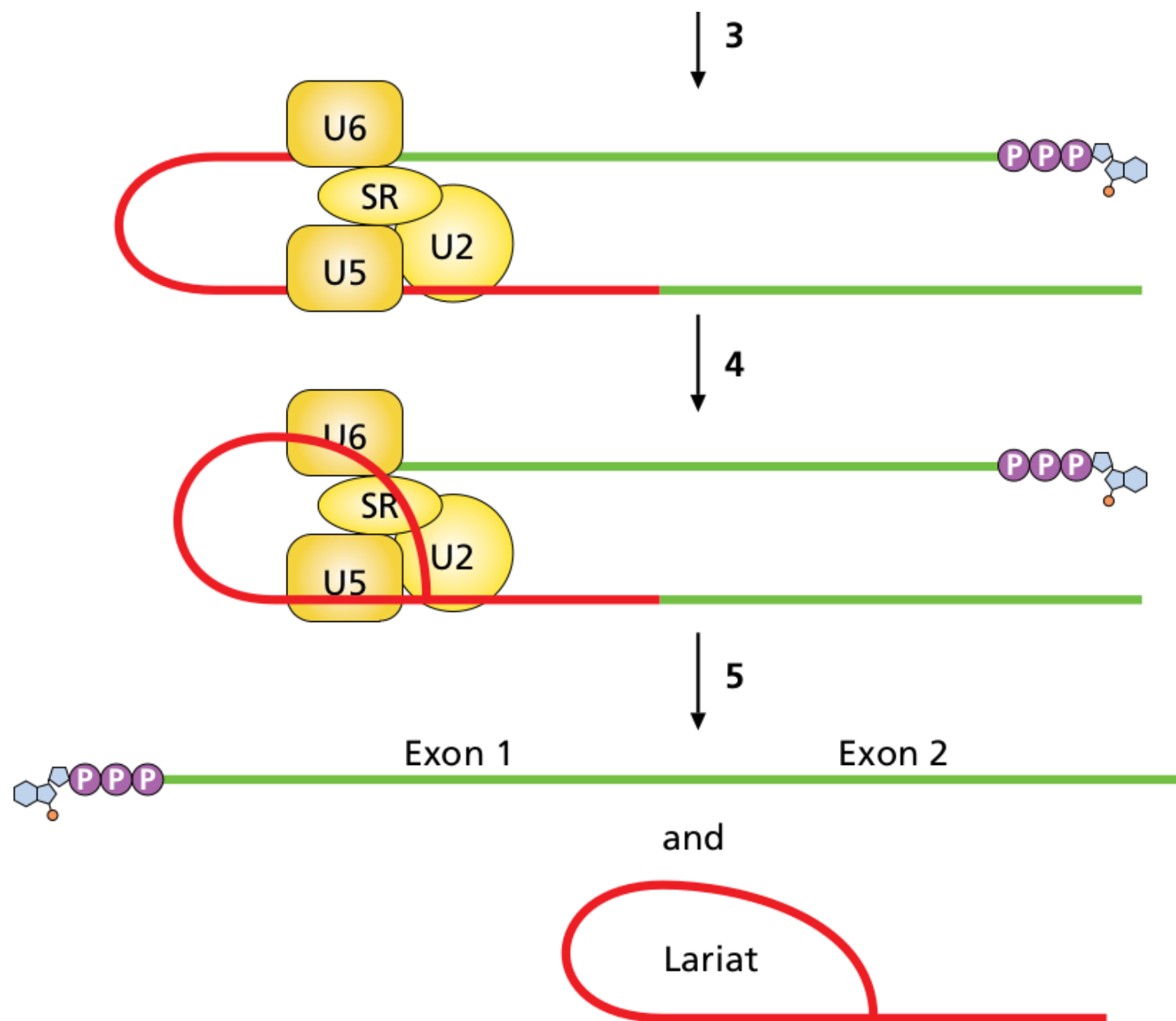
Ökaryotik transkripsiyon

Cap ekleme, uç birleştirme ve polyA kuyruğu eklenmesi ko-transkripsiyoneldir

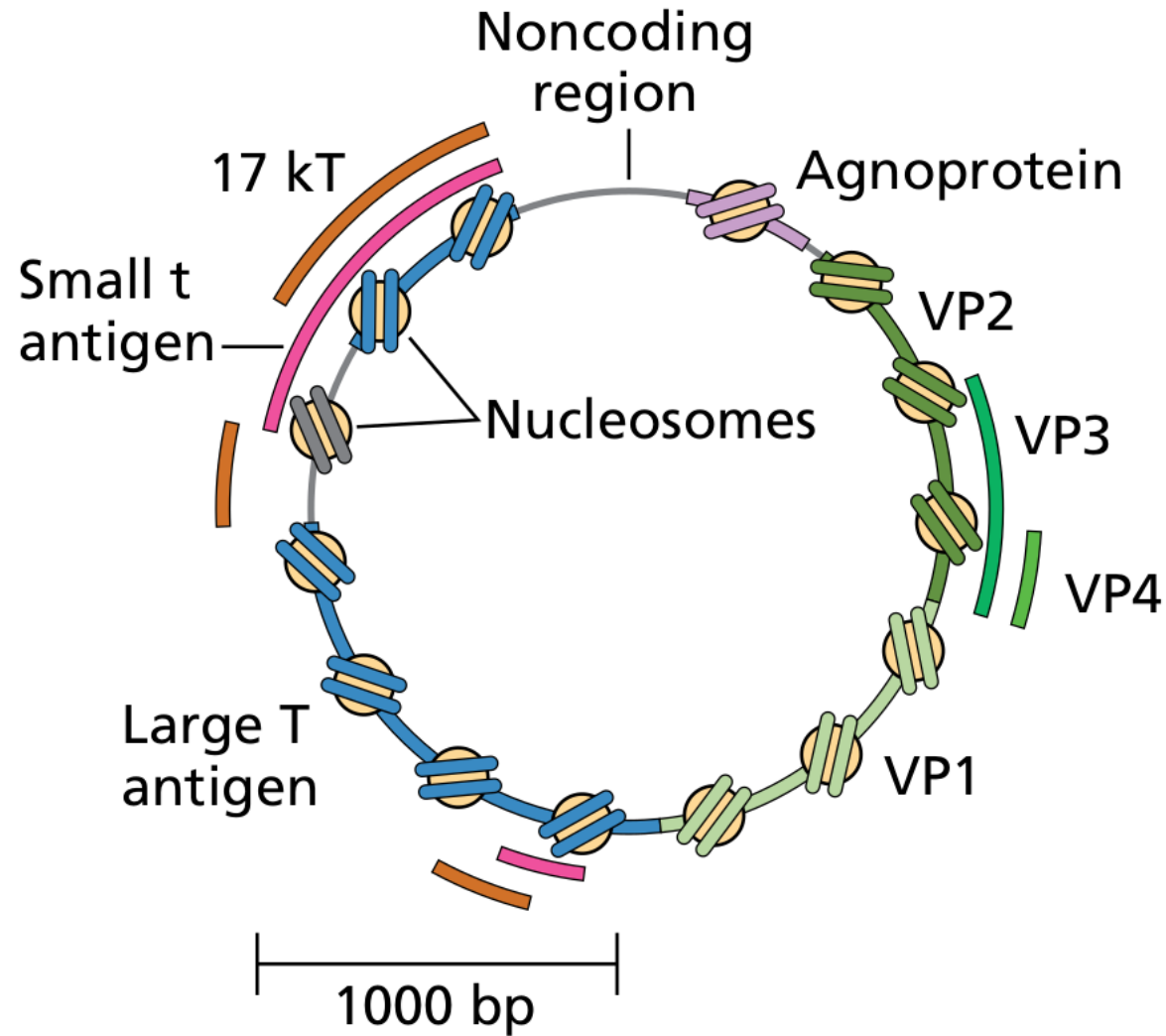


Ökaryotlarda uç birleştirme - splicing

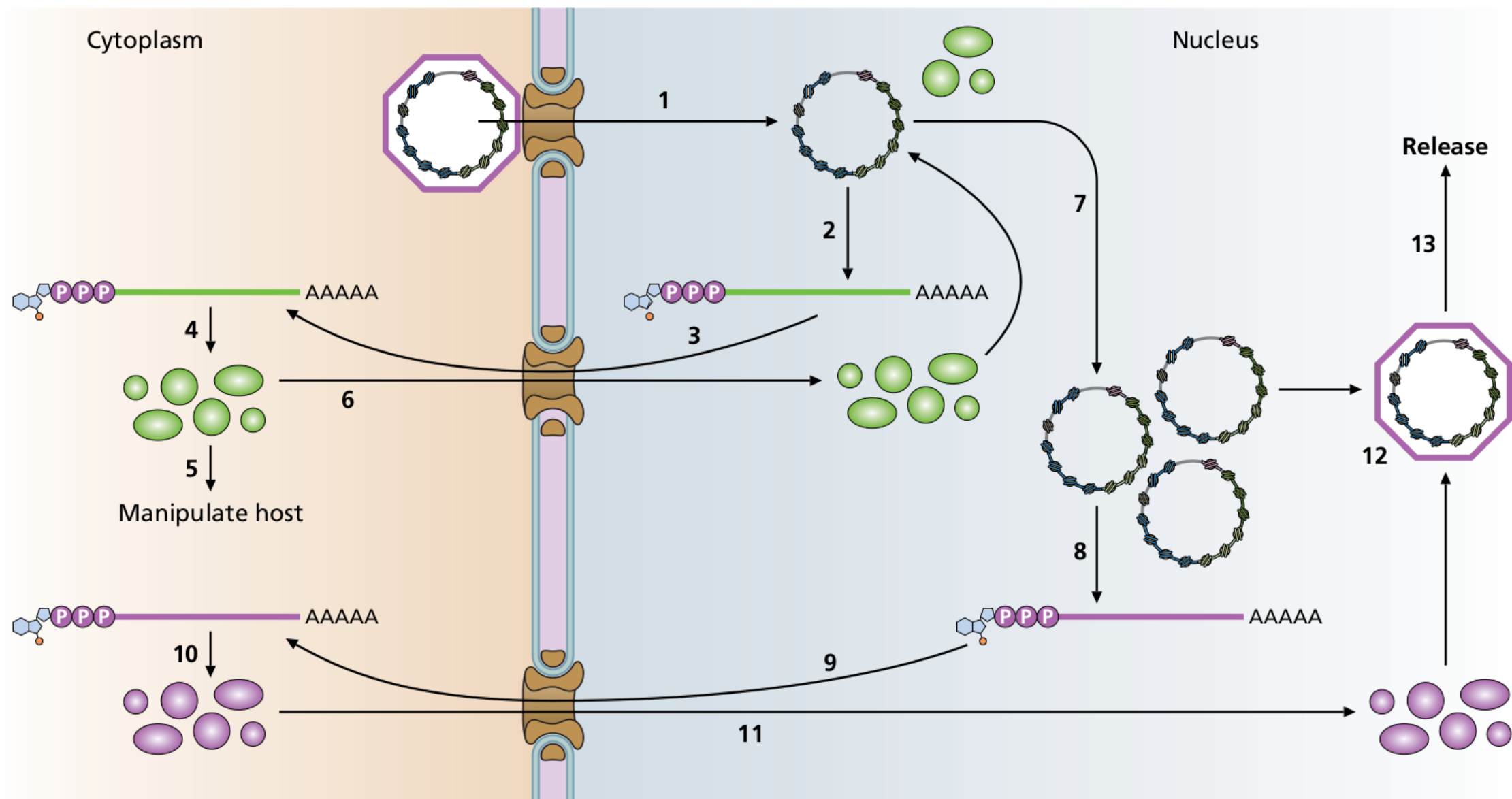




Polyomavirüsler / SV40



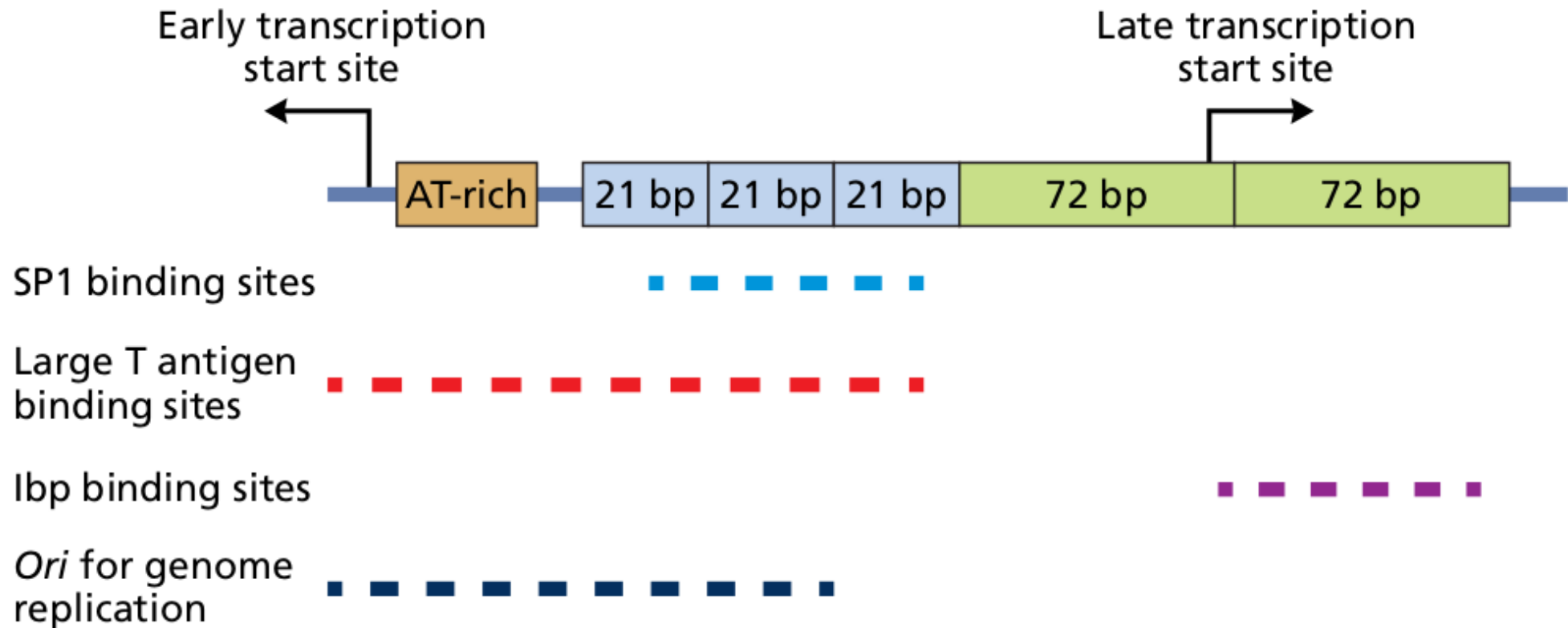
4-5 kb boyutundaki genom nükleozom ile kaplıdır. (SV40: simian vacuolating virus 40)



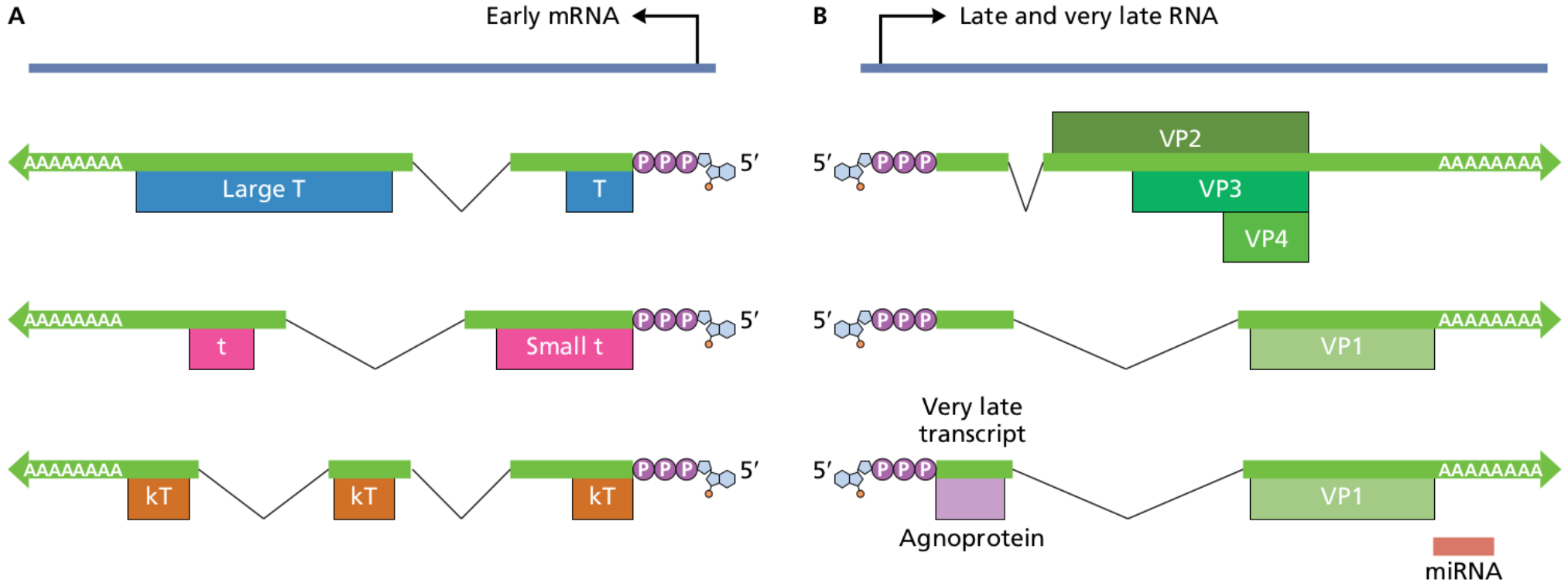
DNA molekülü çekirdeğe salınır. Erken mRNA, konak hücre Pol II tarafından sentezlenir. Erken mRNA'lar sitoplasmada translasyona uğrar ve konak hücreyi kontrol eden proteinler açığa çıkar. Erken proteinler çekirdeğe girer ve genom replikasyonunu başlatır. Geç mRNA'lar da konak Pol II tarafından sentezlenir ve sitoplasmada translasyona uğrar. Geç proteinler çekirdeğe girer ve genom ile beraber paketlenirler. Hücreden çıkış lizis ile gerçekleşir.

SV40 transkripsiyonu

NCCR bölgesi SV40 transkripsiyonunu kontrol eder

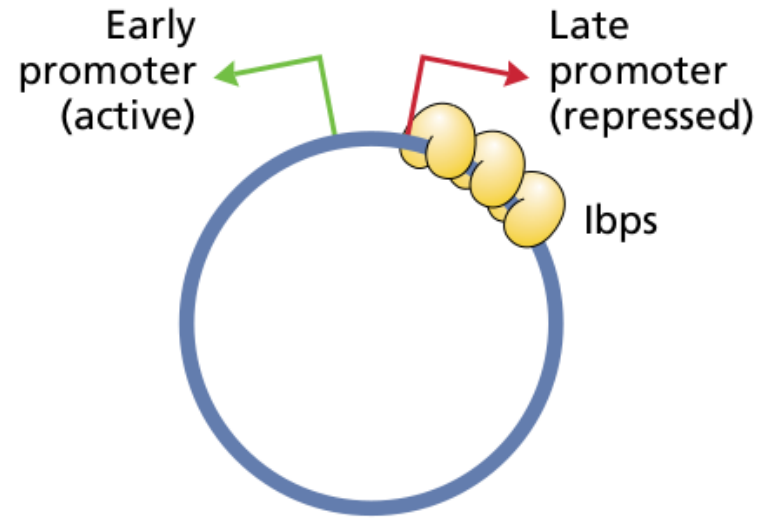


SV40 transkripsiyonu

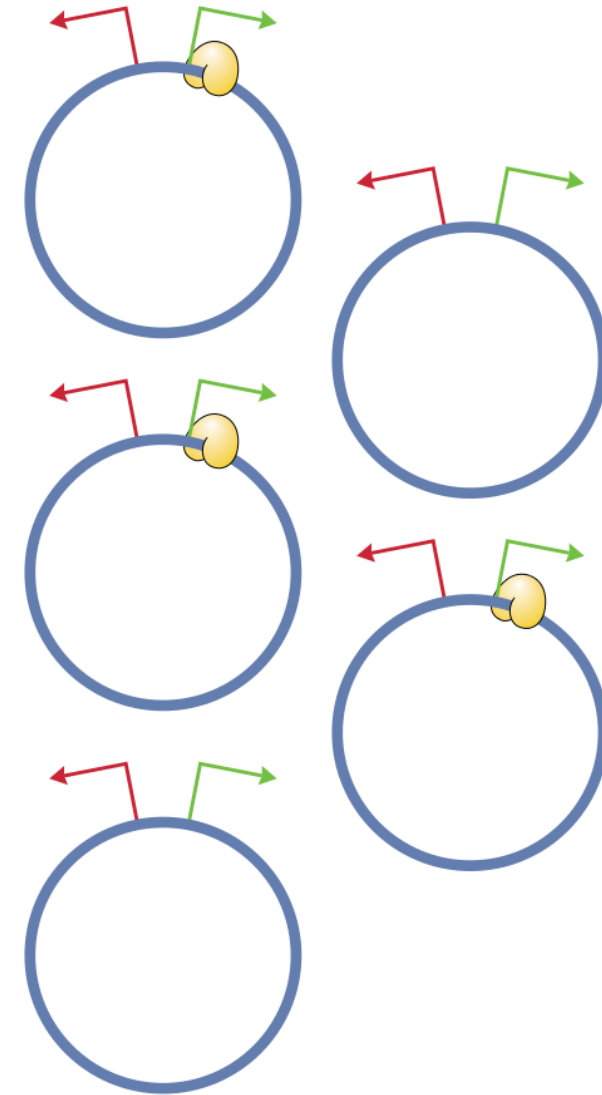


Erken ve geç faz transkripsiyonu ürünleri

A Late gene expression repressed

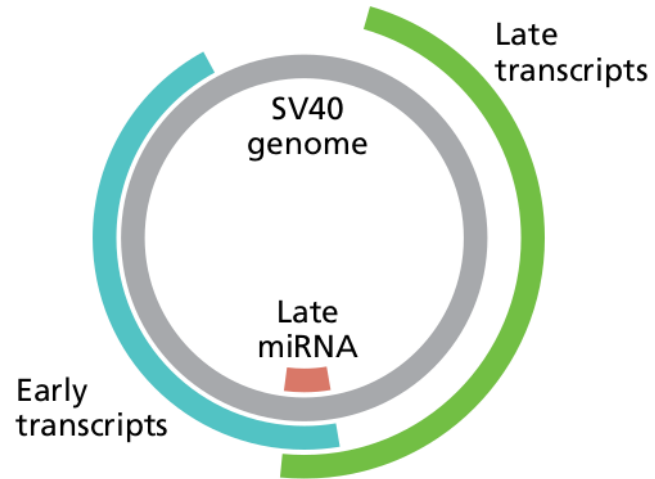


B Late gene expression derepressed

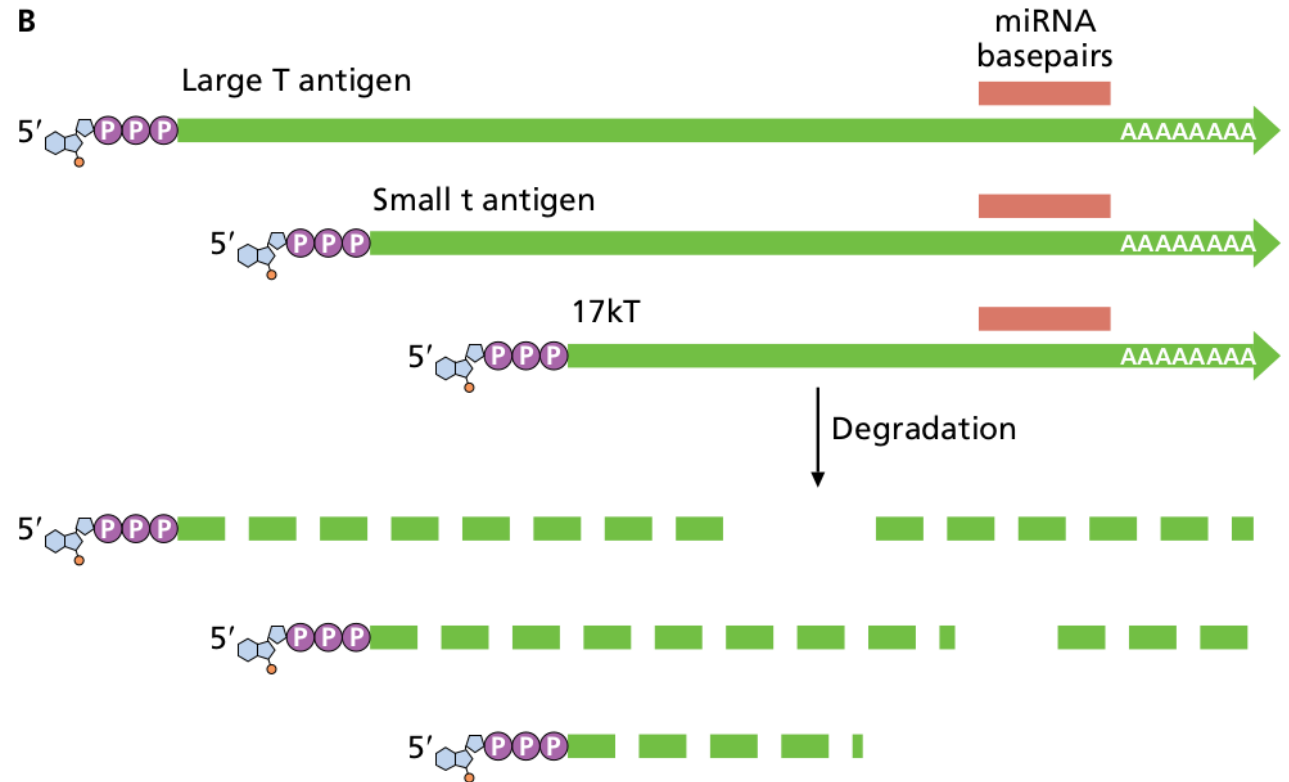


SV40 miRNA

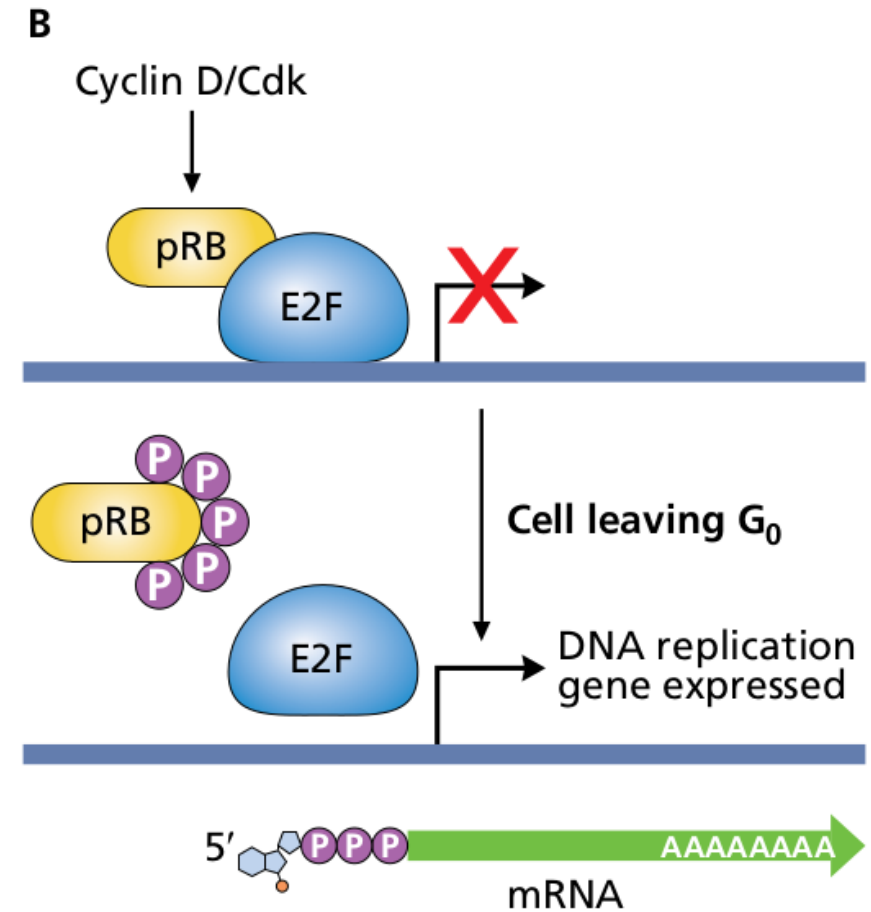
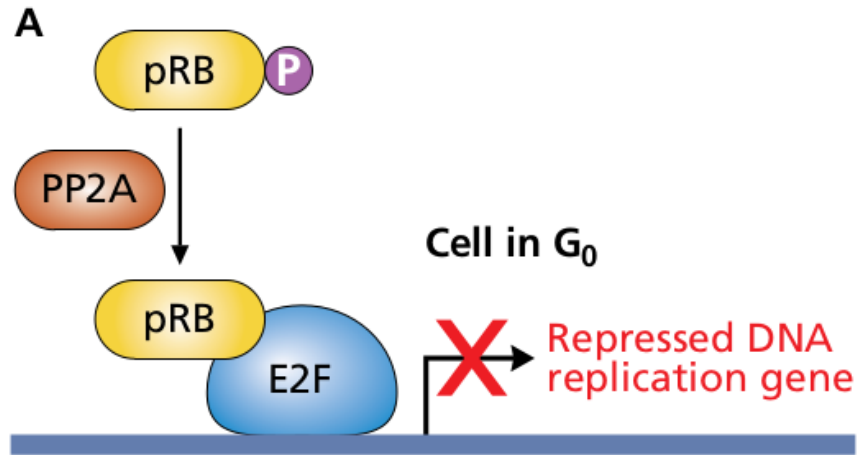
A



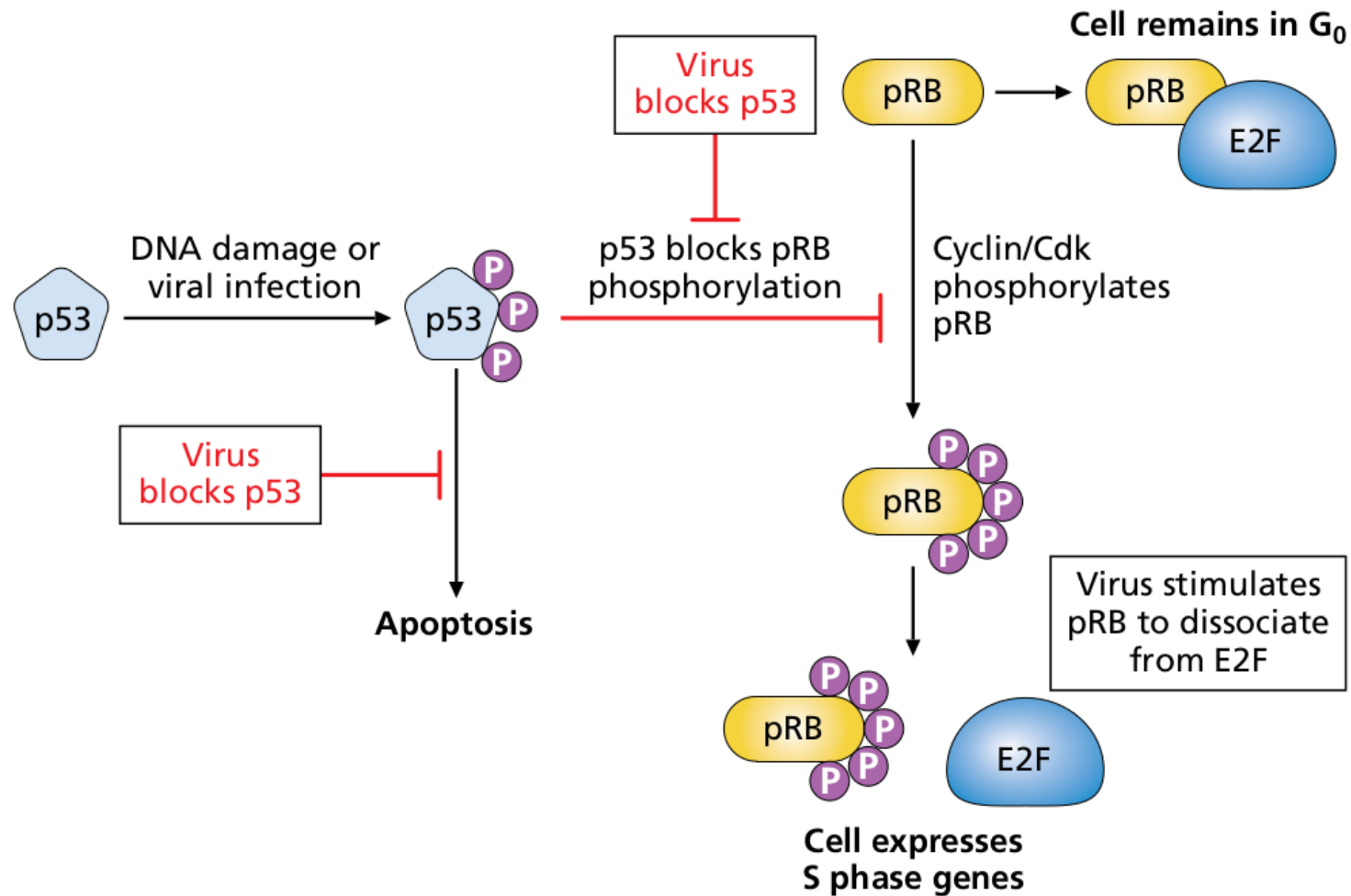
B



Hücre döngüsü

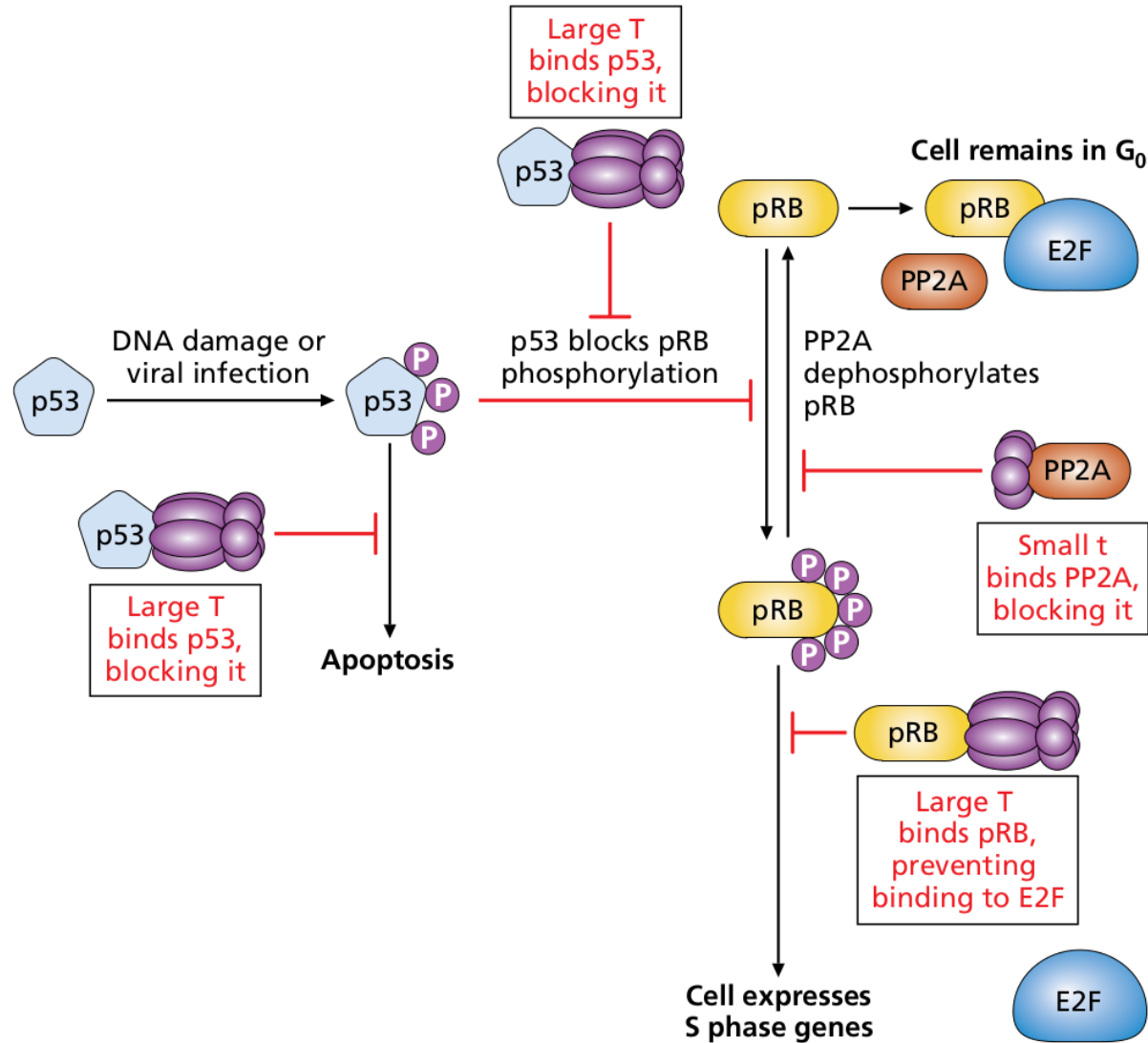


p53 mekanizması - genel

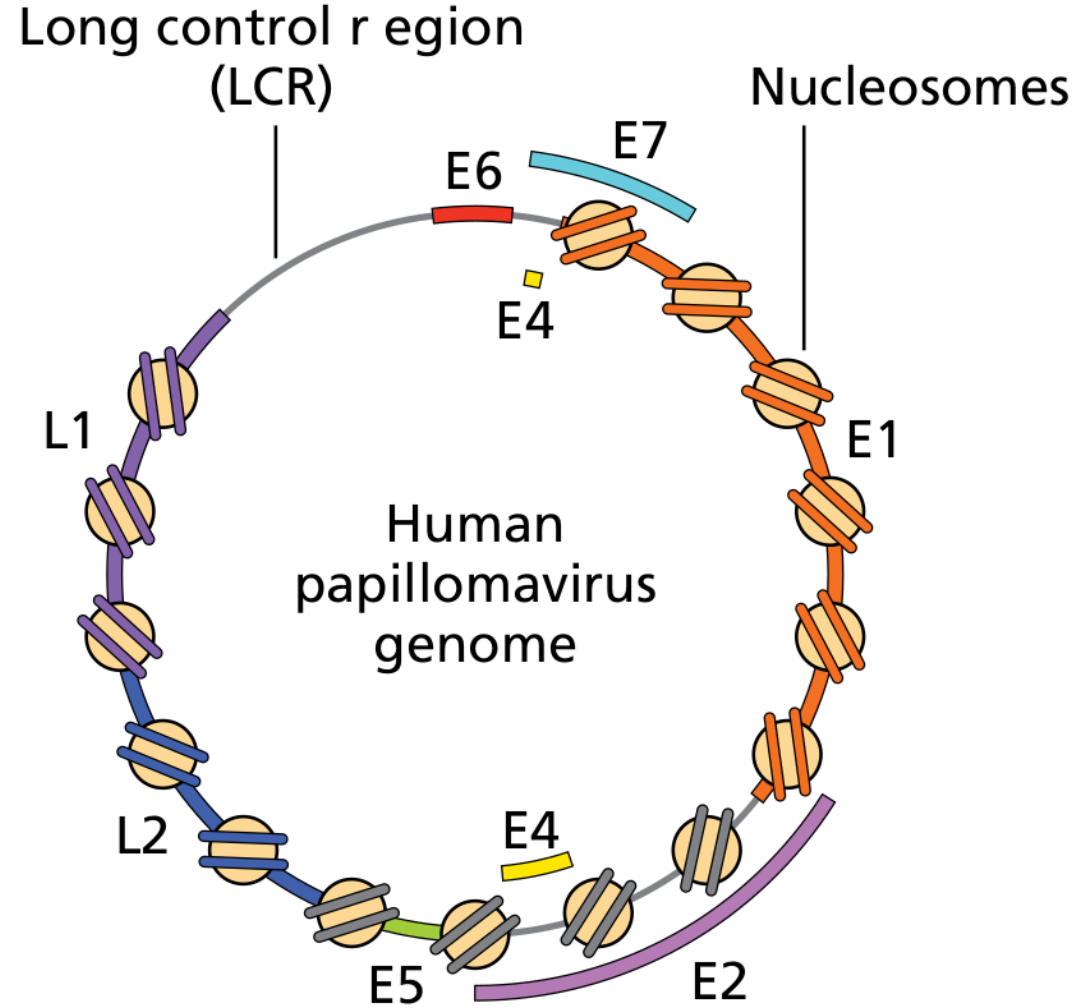


Çoğu dsDNA virüsü, apoptozu engeller veya geciktirir.

SV40 - p53 etkisi

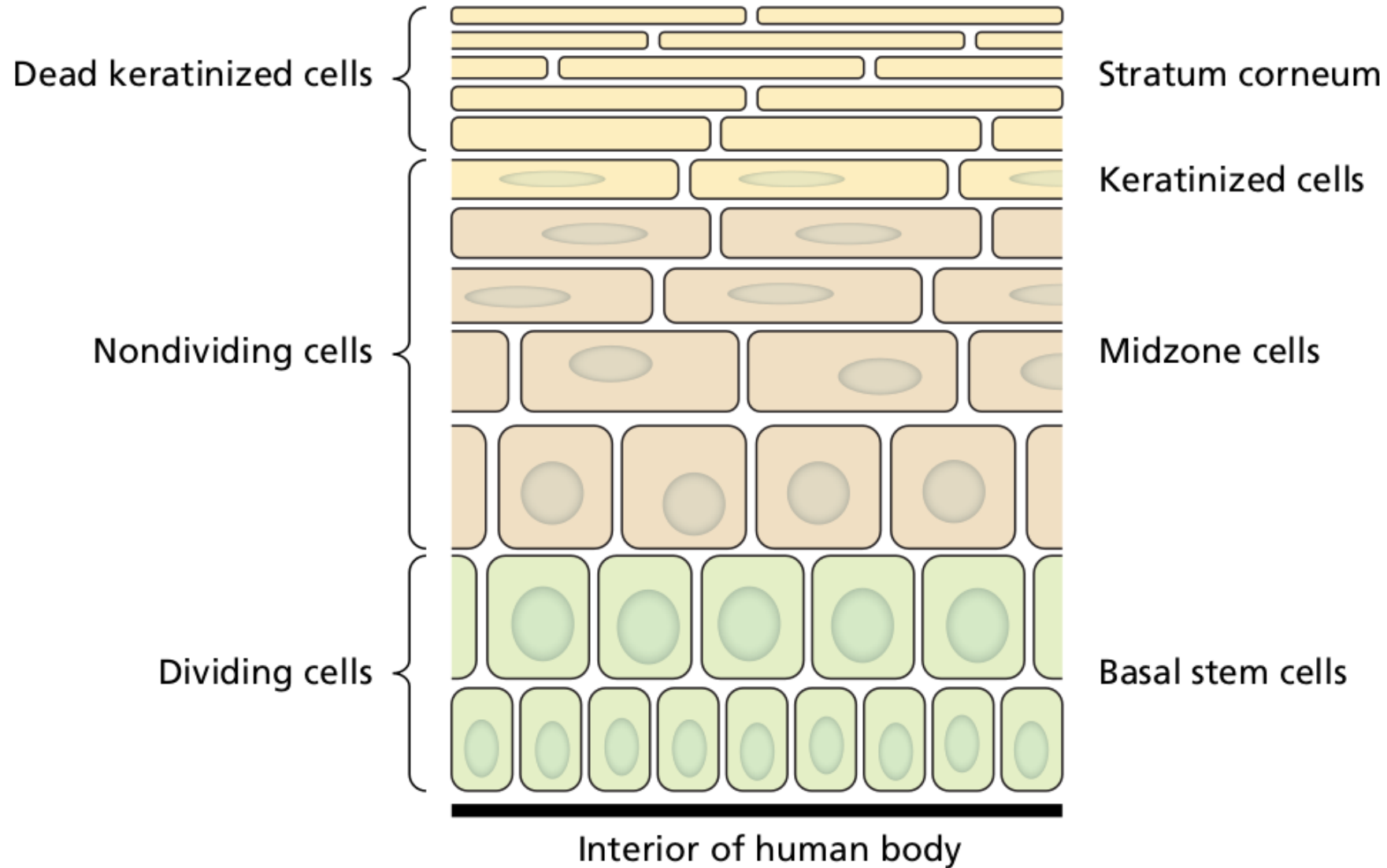


İnsan papillomavirüs (HPV)

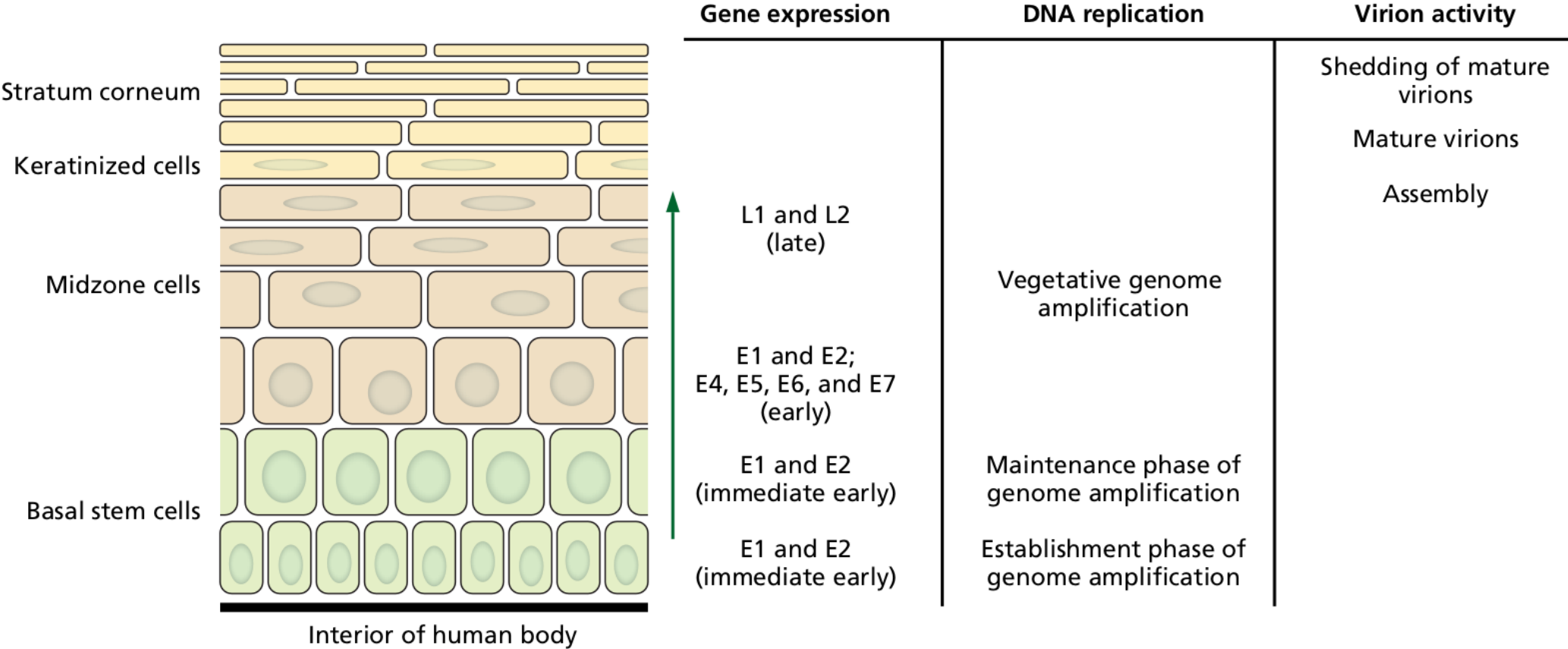


6-8.5 kb uzunluğundaki genom nükleozom kaplıdır. E: erken genler, L: geç genler

Epitel yapısı

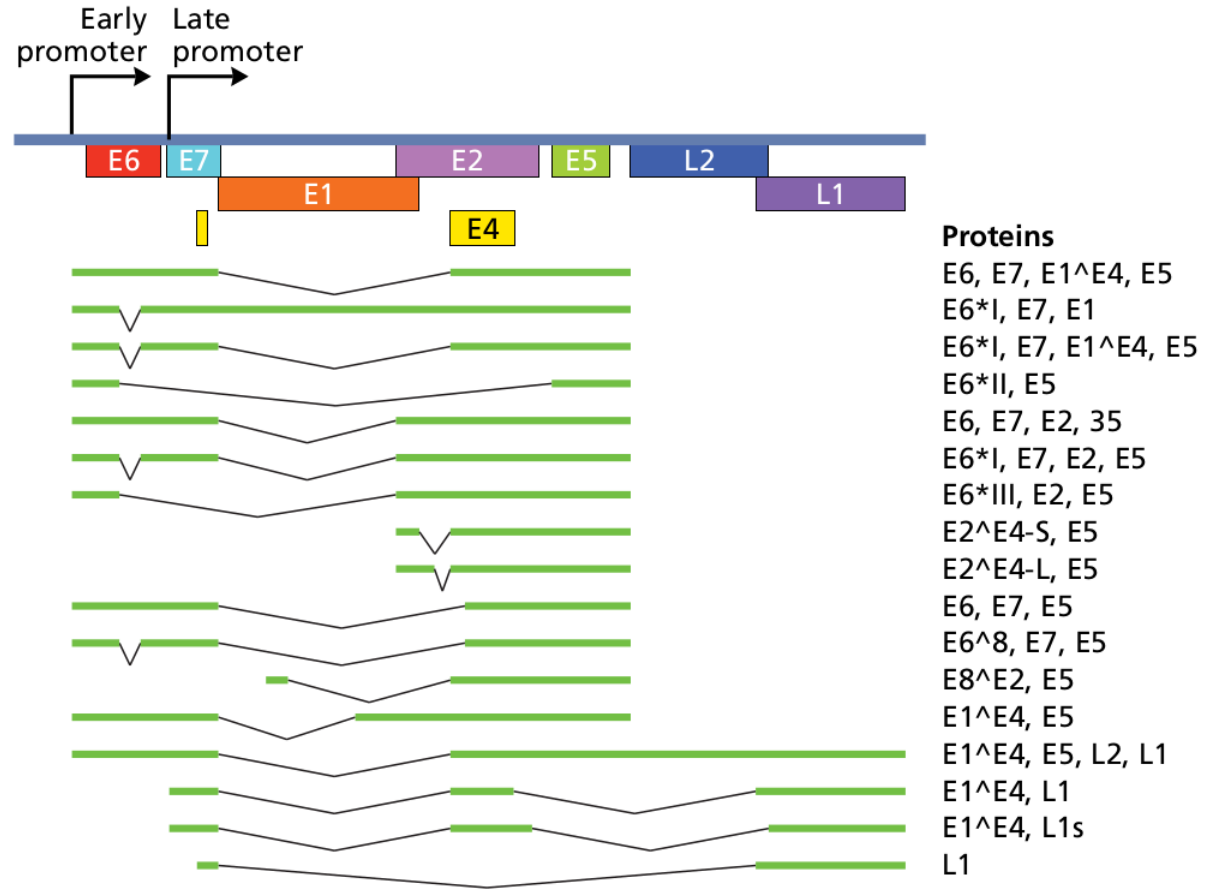


Epitel ve HPV



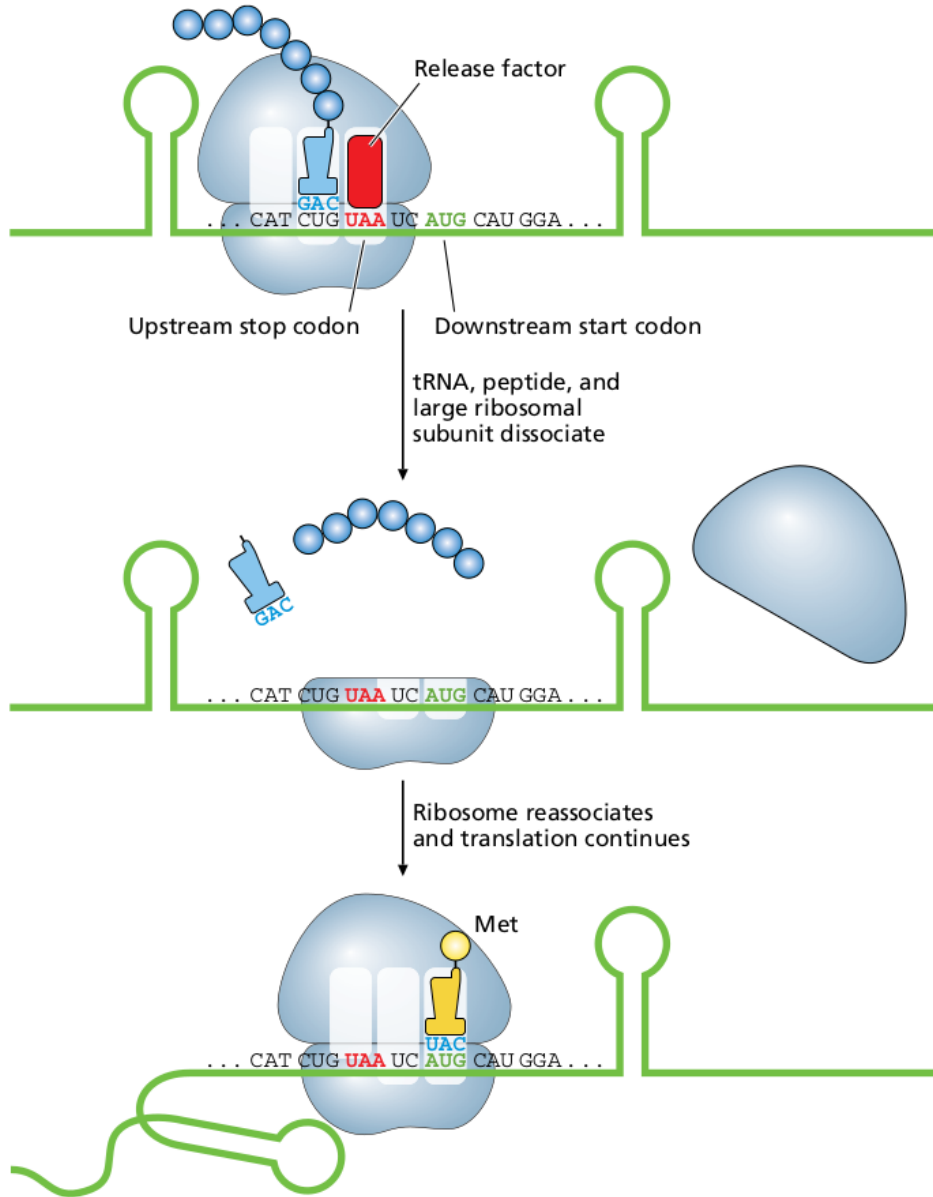
HPV transkriptleri

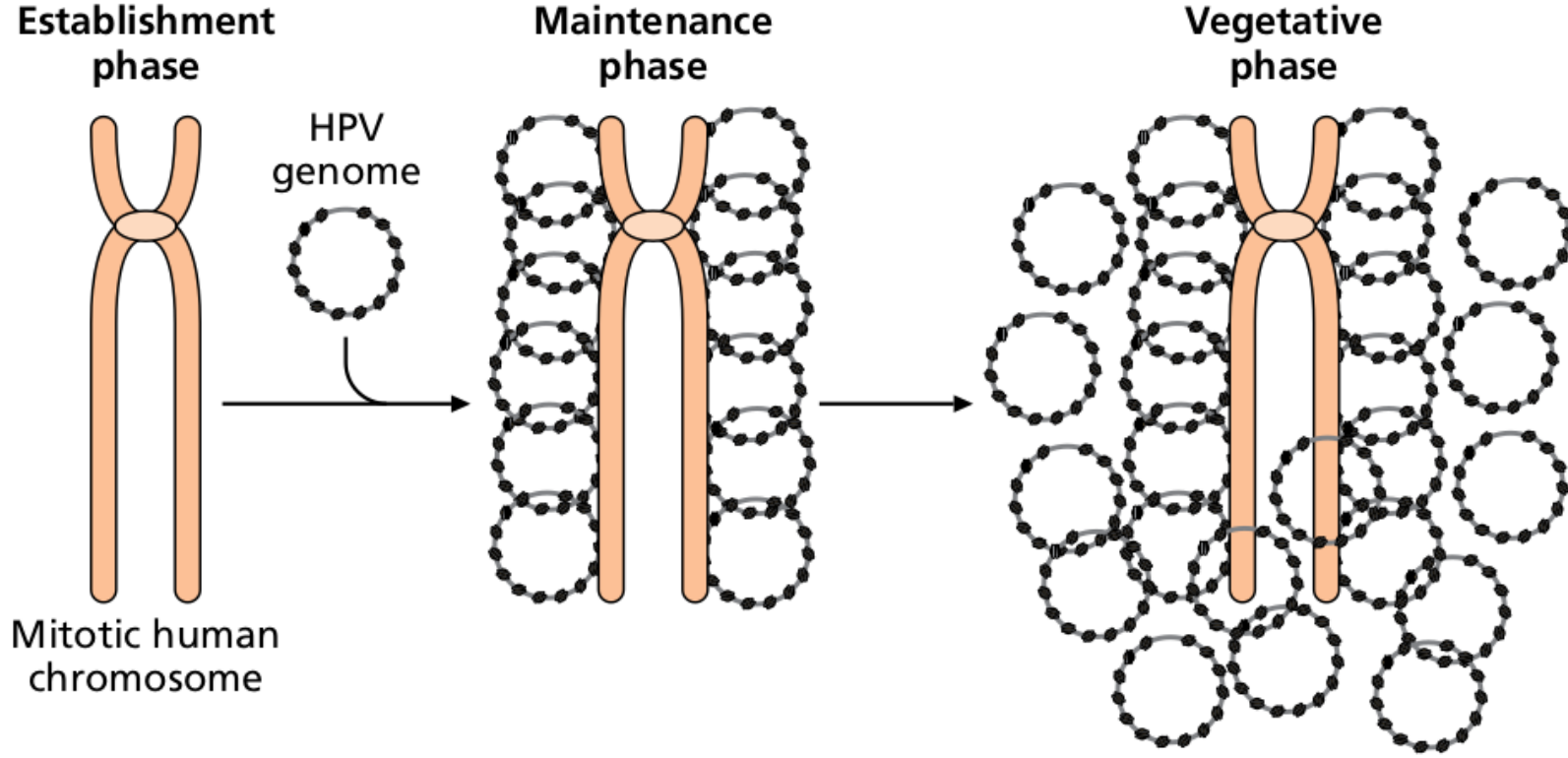
Polycistronic birçok mRNA oluşmaktadır.



HPV translasyon

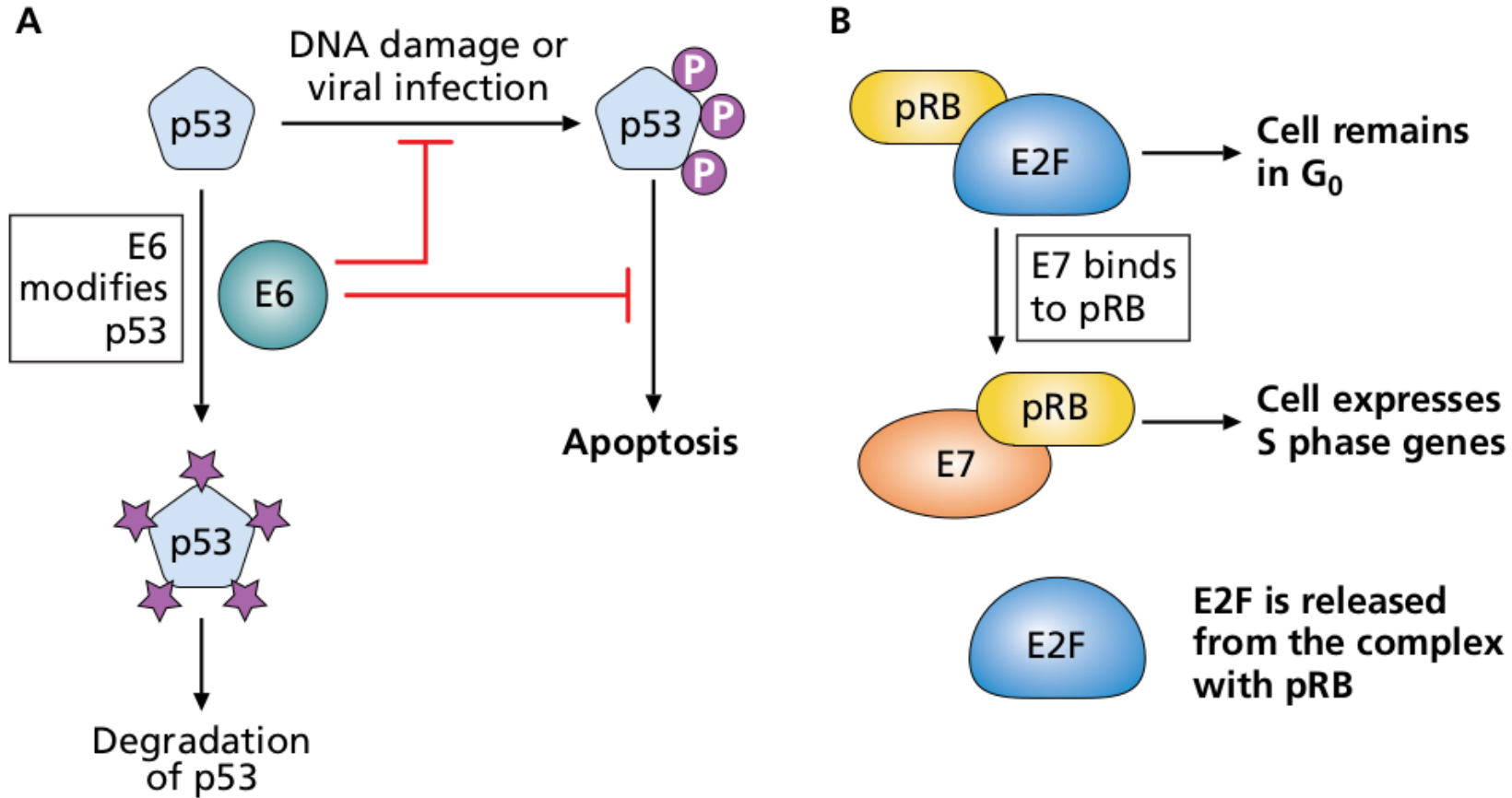
Leaky scanning
(sızdırmalı tarama), IRES
(internal ribosome entry
site) yanısıra translasyon
tekrar başlatma
(translation re-initiation)
yöntemi kullanılmaktadır.
E7 proteinin translation
re-initiation yöntemi ile
elde edildiği
düşünölmektedir.





HPV replikasyonu ve epitel farklılaşma: Basal bölgedeki hücrelerde, hücrede birkaç kopya vardır (establishment state), orta katmanlara gelindiğinde (maintenance state) 50-300 kopya genom bulunmaktadır ve virüs genomları insan kromozomları üzerinde bulunurlar, böylelikle mitoz bölünme sırasında kromozomlar ile beraber dağılırlar. Orta katmandan çıkılırken (vegetative state) başlar ve binlere kopya virüs genomu üretilir.

HPV ve apoptoz

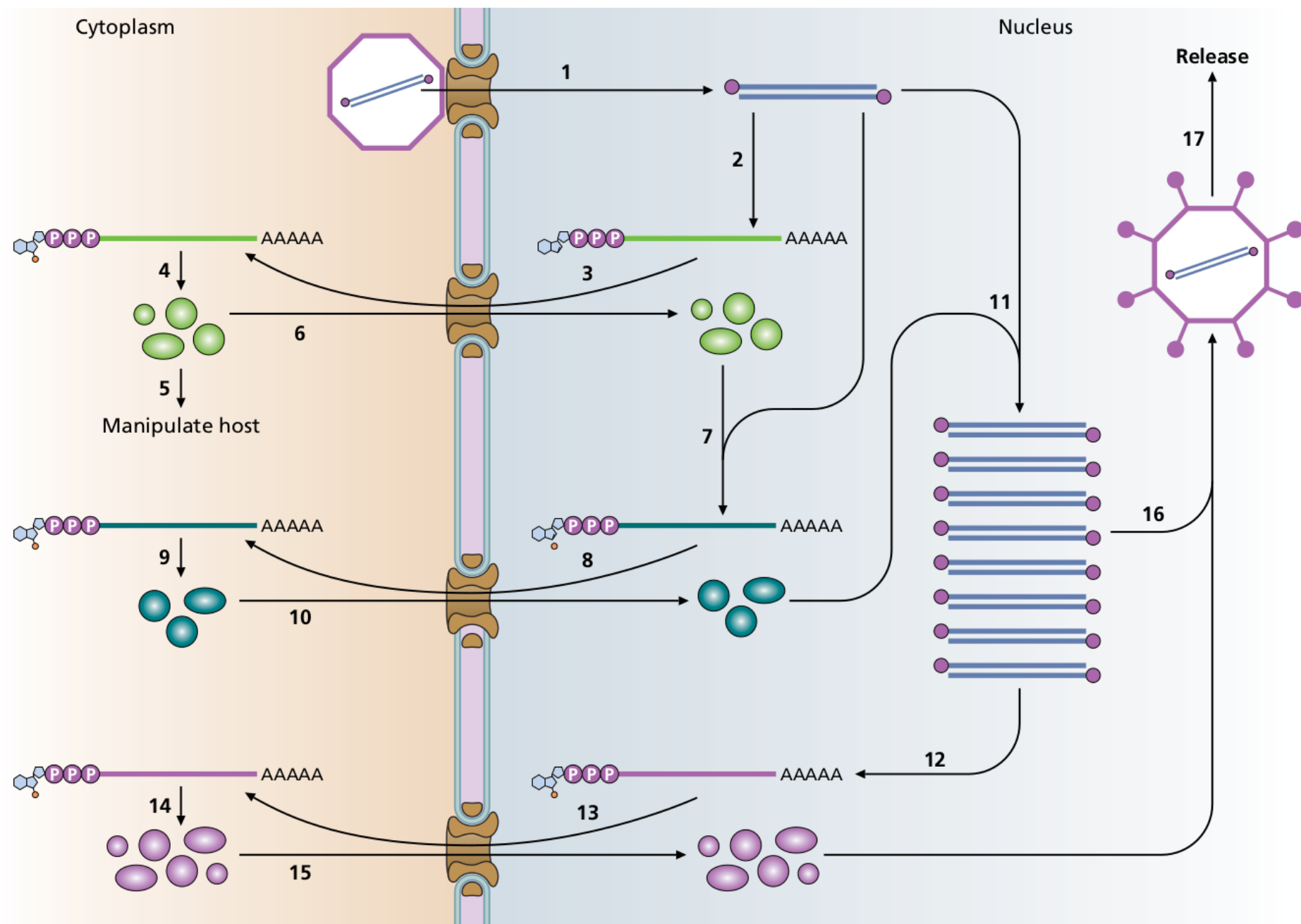


HPV E6 proteini p53 proteinini modifiye ederek degradasyona, E7 proteini de pRB ile etkileşerek E2F ile etkileşimini engeller.

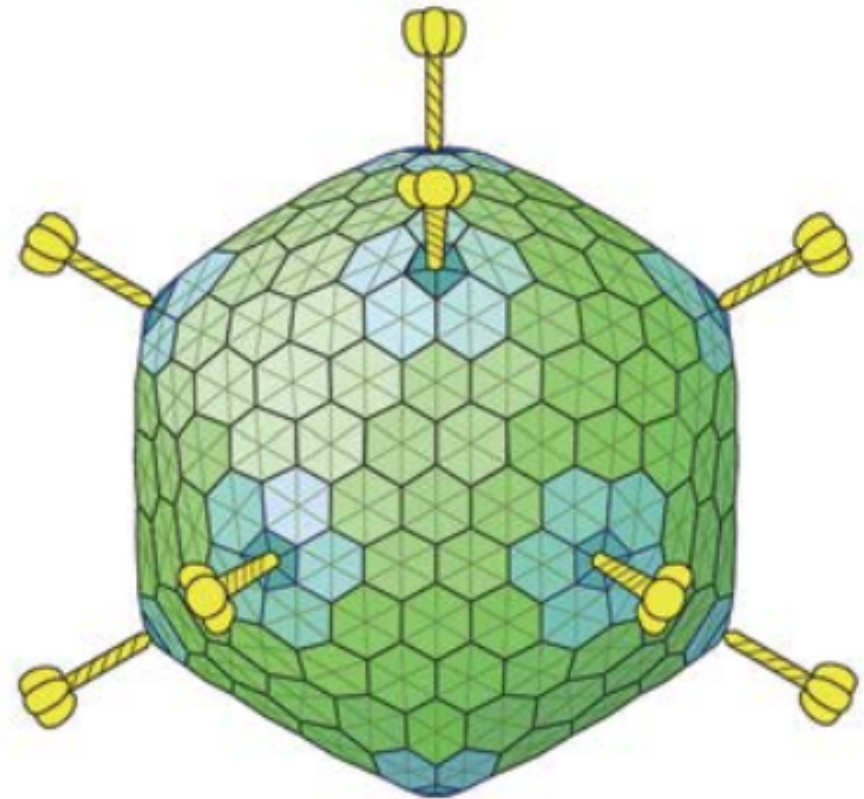
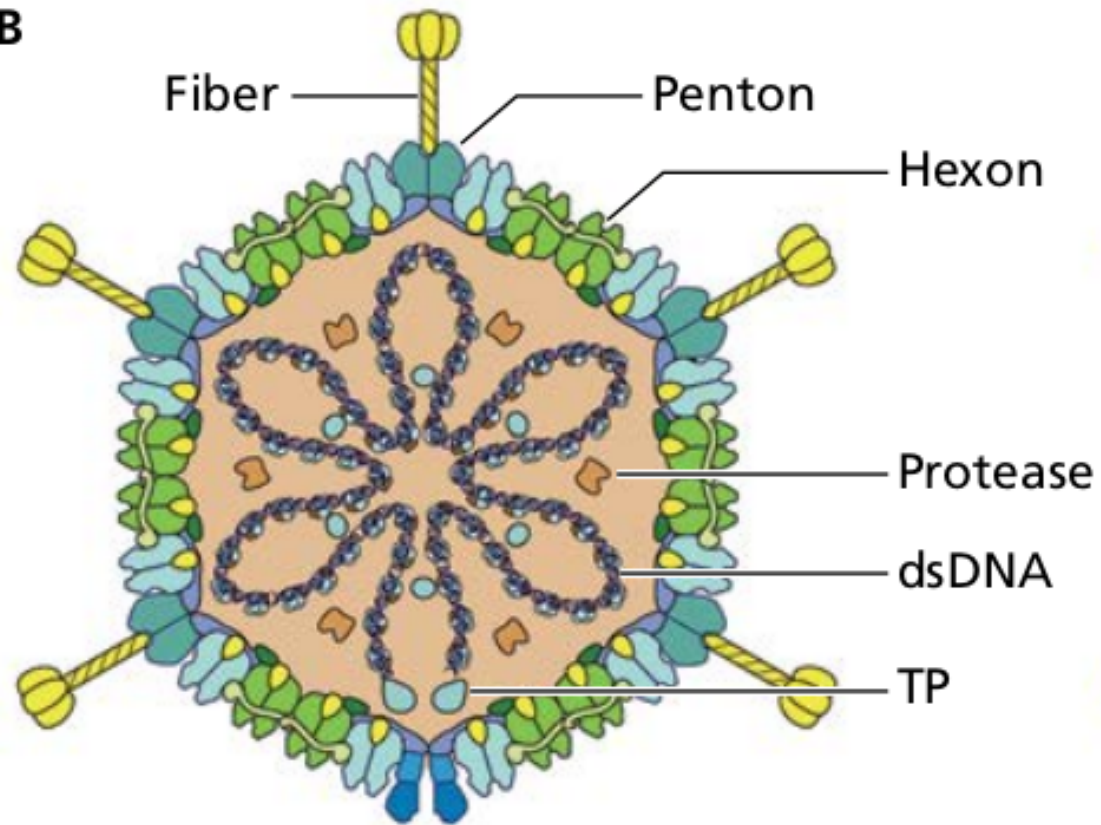
Adenovirüsler

özet

Adenovirüs replikasyon döngüsüne genel bakış. Viral genomik DNA çekirdeğe salınır (1). Erken mRNA'lar transkribe edilir (2) ve sitoplazmaya taşınır (3) ve translasyona girer (4). Birçok erken protein, konakçıyı manipüle eder (5), bağışıklığı, hücre döngüsünü ve apoptozu etkiler. Bazı erken proteinler çekirdeğe girer (6) ve gecikmeli-erken transkripsiyonu tetikler (7). Gecikmeli-erken mRNA sitoplazmaya taşınır (8), burada gecikmeli-erken proteinlerin üretilmesi için translate edilir (9). Bazı gecikmeli-erken proteinler çekirdeğe girer (10), burada genom replikasyonuna katılırlar (11). Yeni genomlardan ara ve geç mRNA'lar transkribe edilir (12) ve sitoplazmaya taşınır (13), burada geç proteinlerin üretilmesi için translate edilirler (14). Geç proteinler çekirdeğe girer (15), burada olgunlaşma sırasında yeni virionlarla birleşirler (16). Olgun virionlar, lizis yoluyla konak hücreden salınır (17).



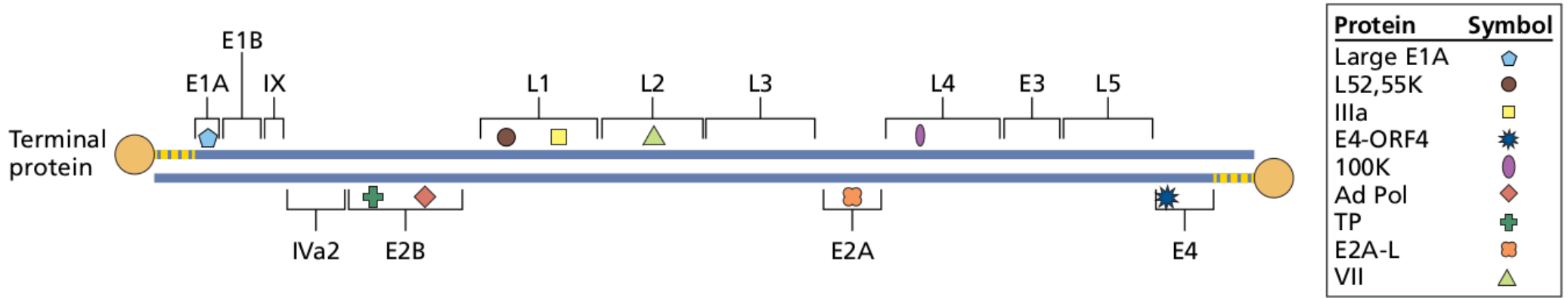
B



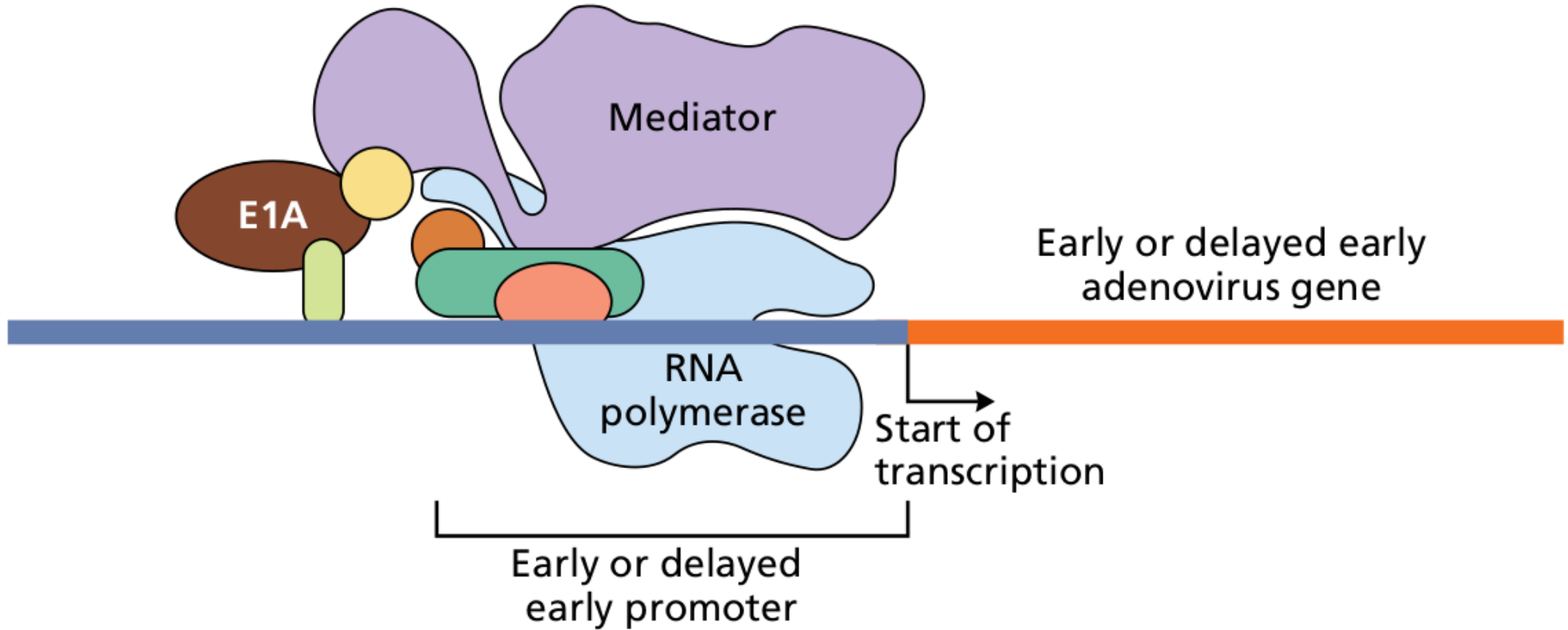
Human adenovirus C

Genom

HAdV-C genomu. HAdV-C genomunun her iki 5' ucuna kovalent olarak bağlı iki terminal proteini ve ters terminal tekrarları (sarı ve mavi) bulunur. Parantezler, çeşitli kesilmiş mRNA'larla sonuçlanan transkripsiyonel birimleri gösterir. Genomun üstünde yer alanlar sol'dan sağ'a doğru, genomun altında yer alanlar ise sağ'dan sol'a doğru transkribe edilir.

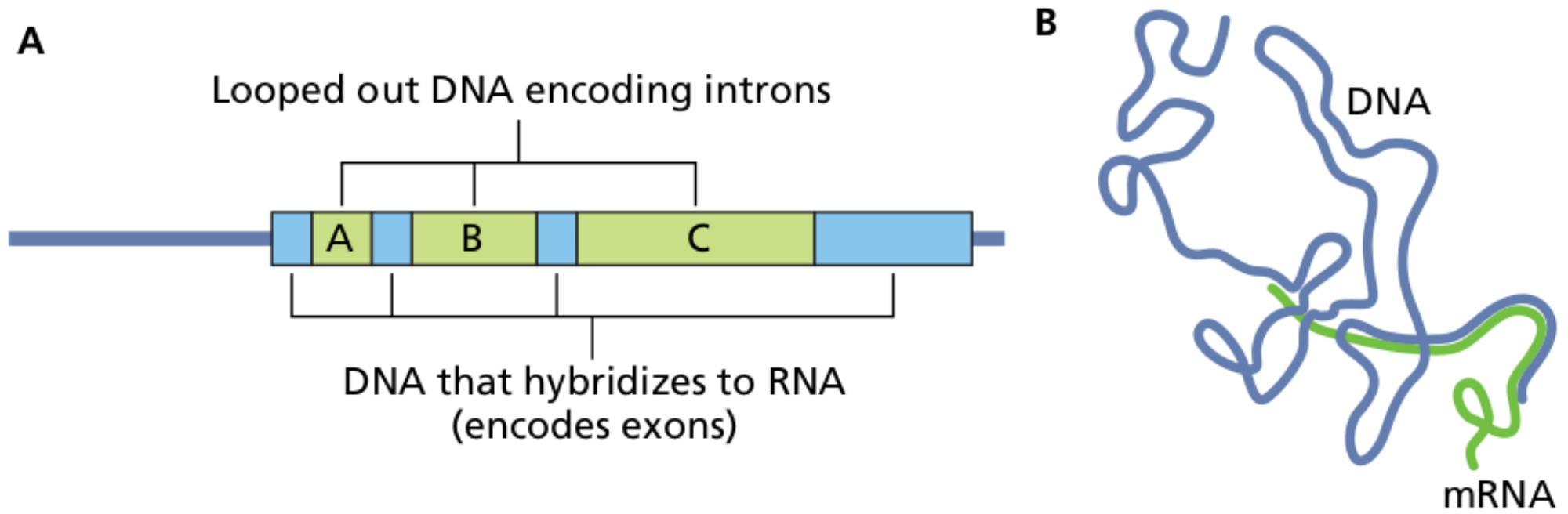


Transkripsiyon



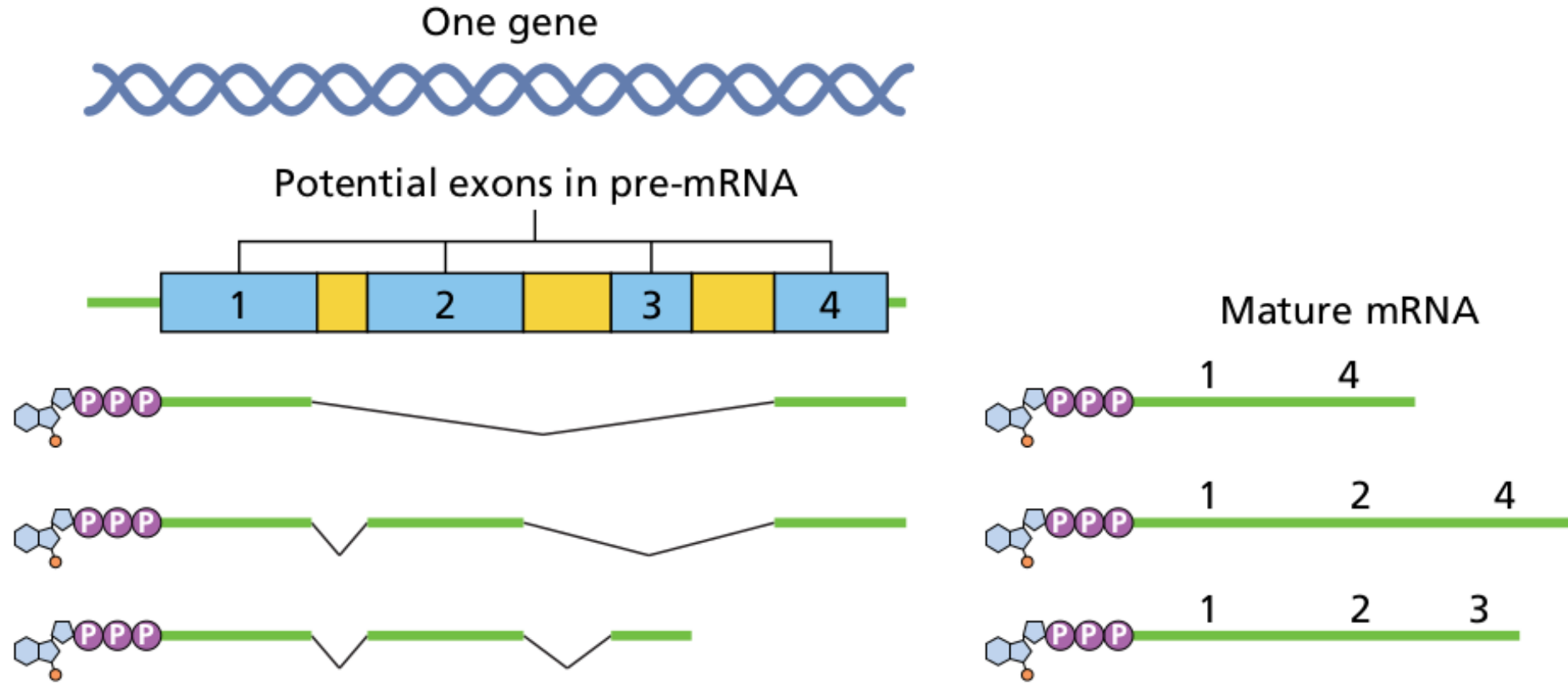
E1A proteini Pol II transkripsiyonunu, Mediator ve diğer konak hücre proteinleri ile etkileşerek başlatır.

Splicing



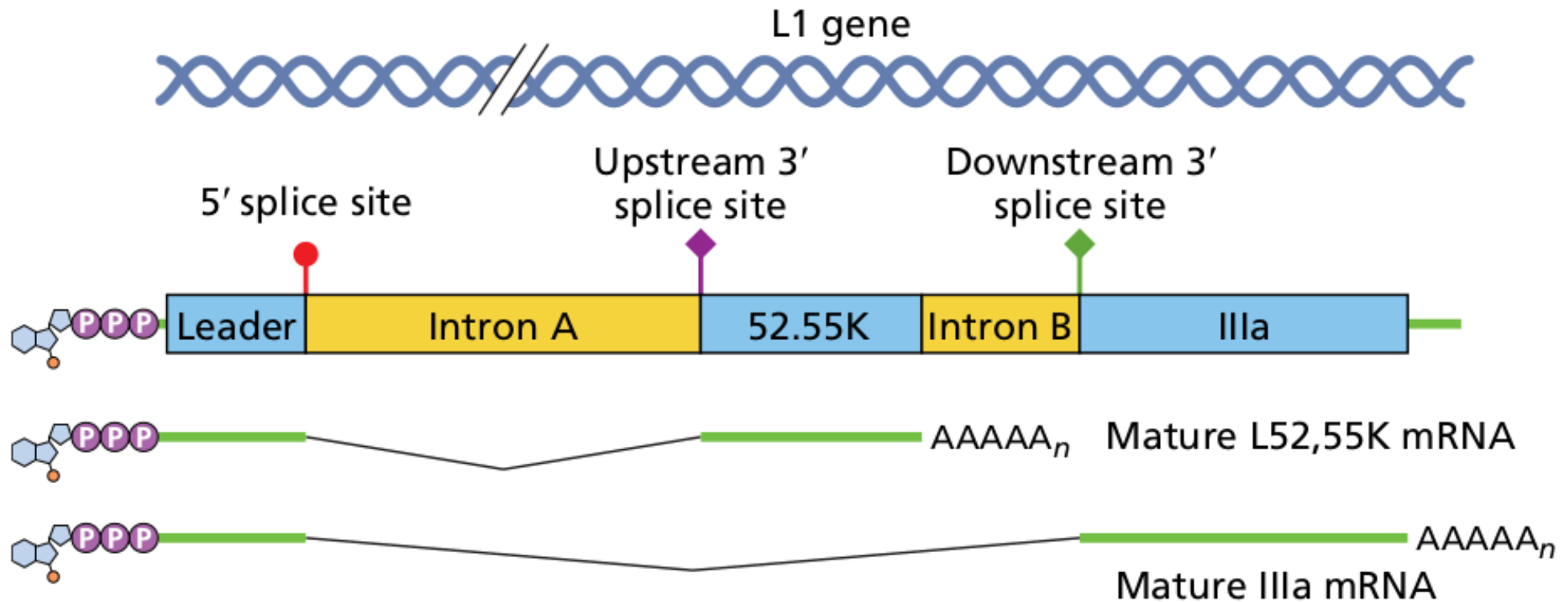
Adenovirus mRNA ile uçbirleştirilme mekanizmasının keşfi (RNA–DNA hybrid elektron mikroskop görüntüsü).

Alternative splicing



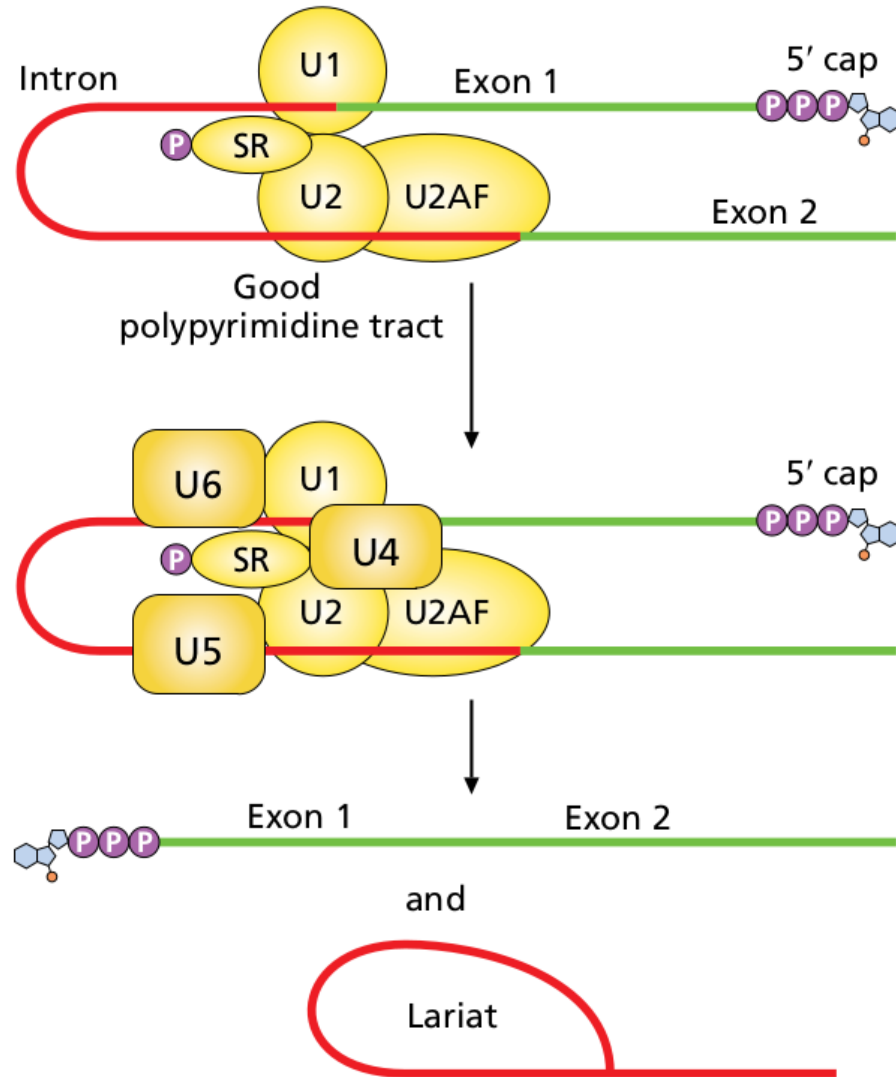
Alternatif splicing özet

L1 transkript

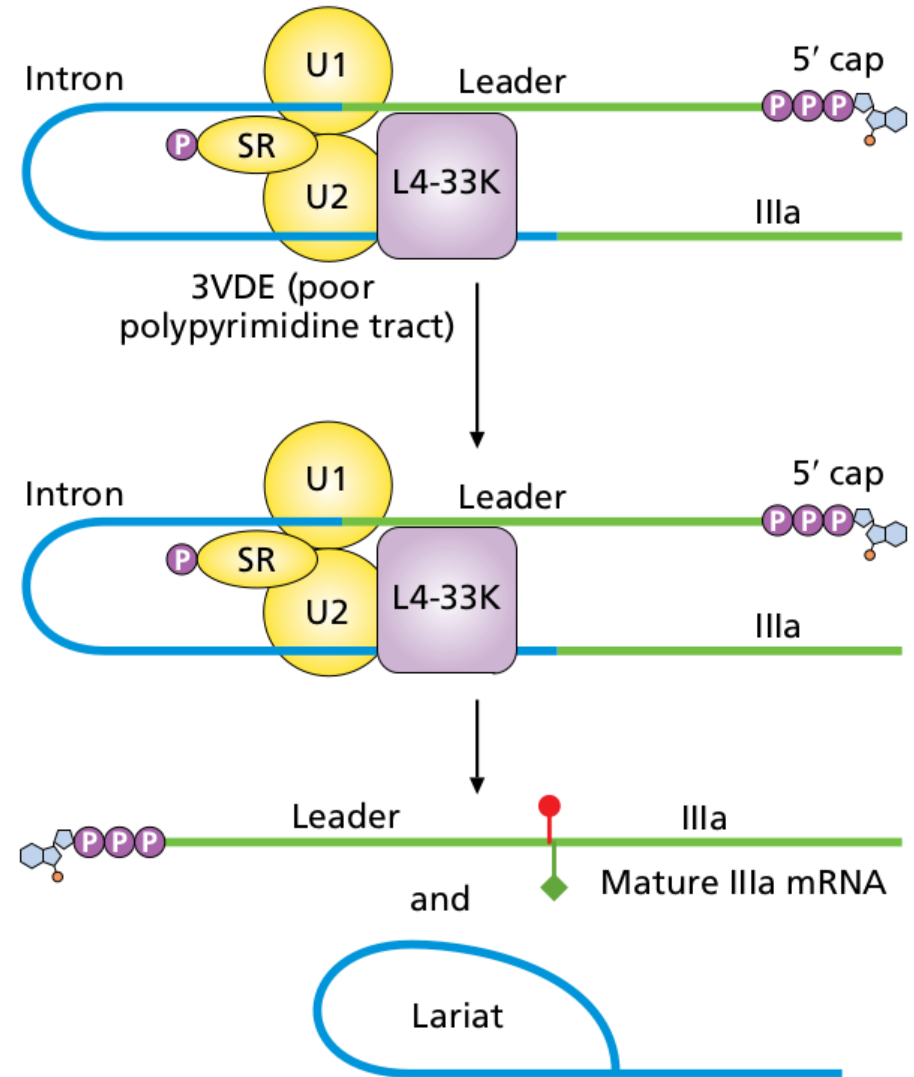


Her ikisi de late protein üretir fakat L52,55K proteini IIIa proteininden daha önce üretilir.

A Normal cellular pre-mRNA

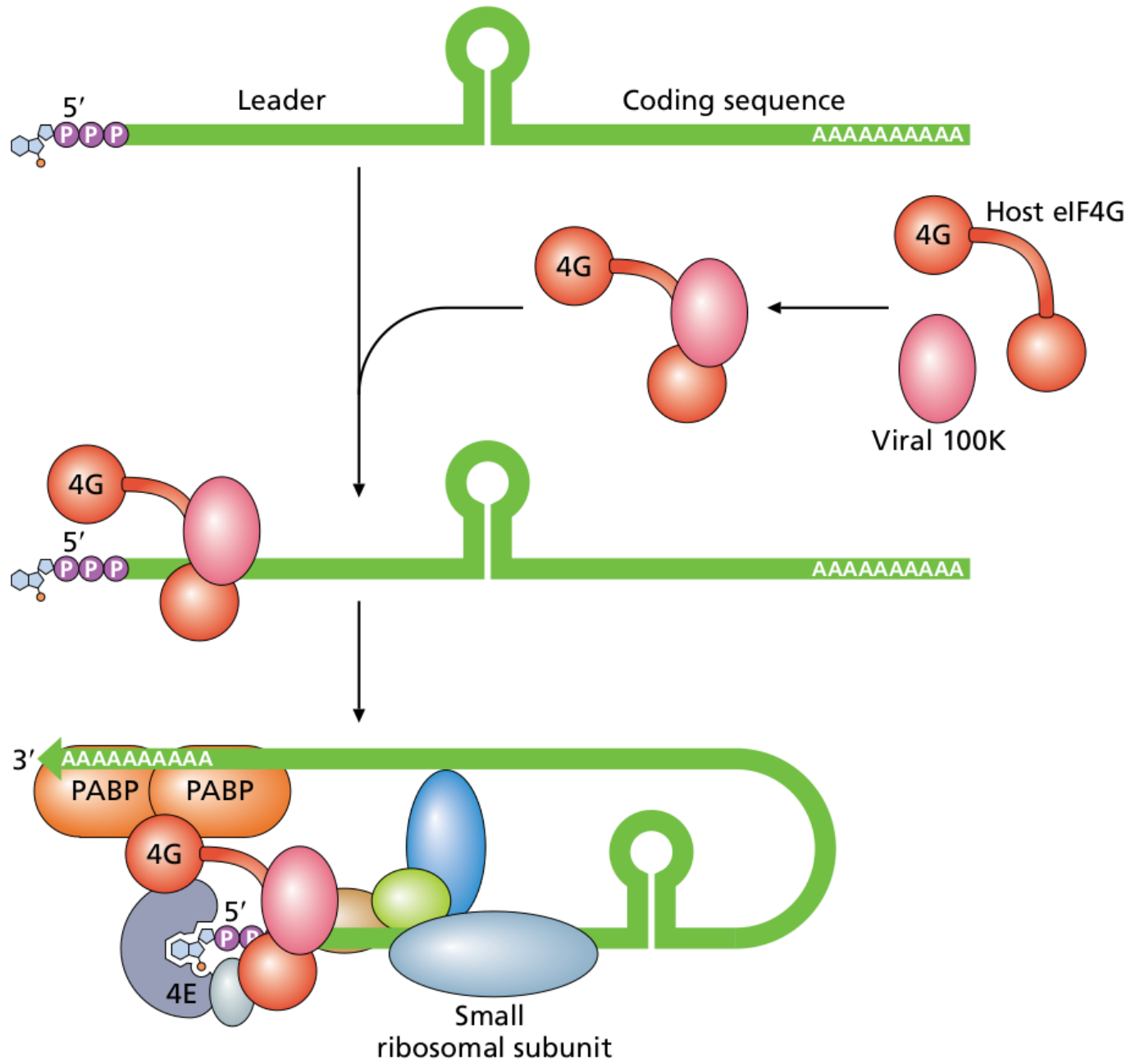


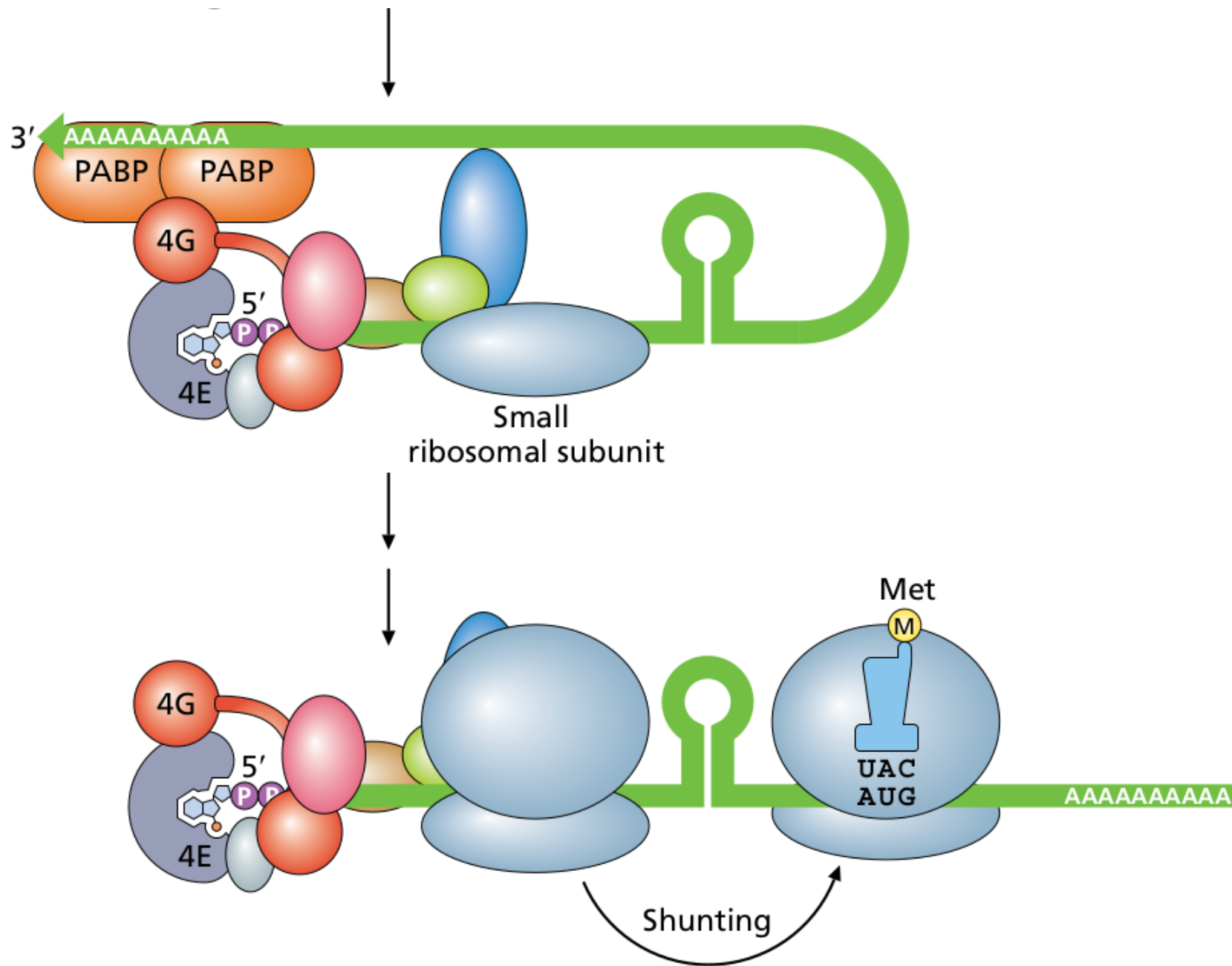
B Viral late pre-mRNA



Geç (late) translasyon

Viral 100K ile eIF-4G birleşir, konak mRNA'lar üzerinde 48S oluşamaz. 100K-eIF4G kompleksi late transkriptlere ait leader RNA dizisini tanır. O yüzden sadece konak mRNA'ları değil, viral early genlerin mRNA'ları da translasyona giremez.





Ribosome shunting

Geç adenovirüs mRNA'larının çevirisi için ribozom atlaması (ribosome shunting) kullanılır. Viral 100K proteini, konak eIF4G'ye bağlanır. Ayrıca, tüm geç transkriptlerde bulunan bir lider mRNA dizisine bağlanır ve böylece eIF4G ve geç viral mRNA'larla bir kompleks oluşturur. Bunun ardından, viral mRNA–100K–eIF4G kompleksi, küçük ribozomal alt birimi, diğer ökaryotik başlatma faktörlerini ve poli(A)-bağlayıcı proteini çekerek viral mRNA üzerine bir ribozomun montajını tetikler. Ribozomun montajından sonra, mRNA'daki ikincil yapı, ribozomun mRNA'nın 5' ucunu atlayıp yerine ikincil yapıdan sonra bulunan içsel bir AUG'da çeviriyi başlatması şeklinde bir atlamaya yol açar.

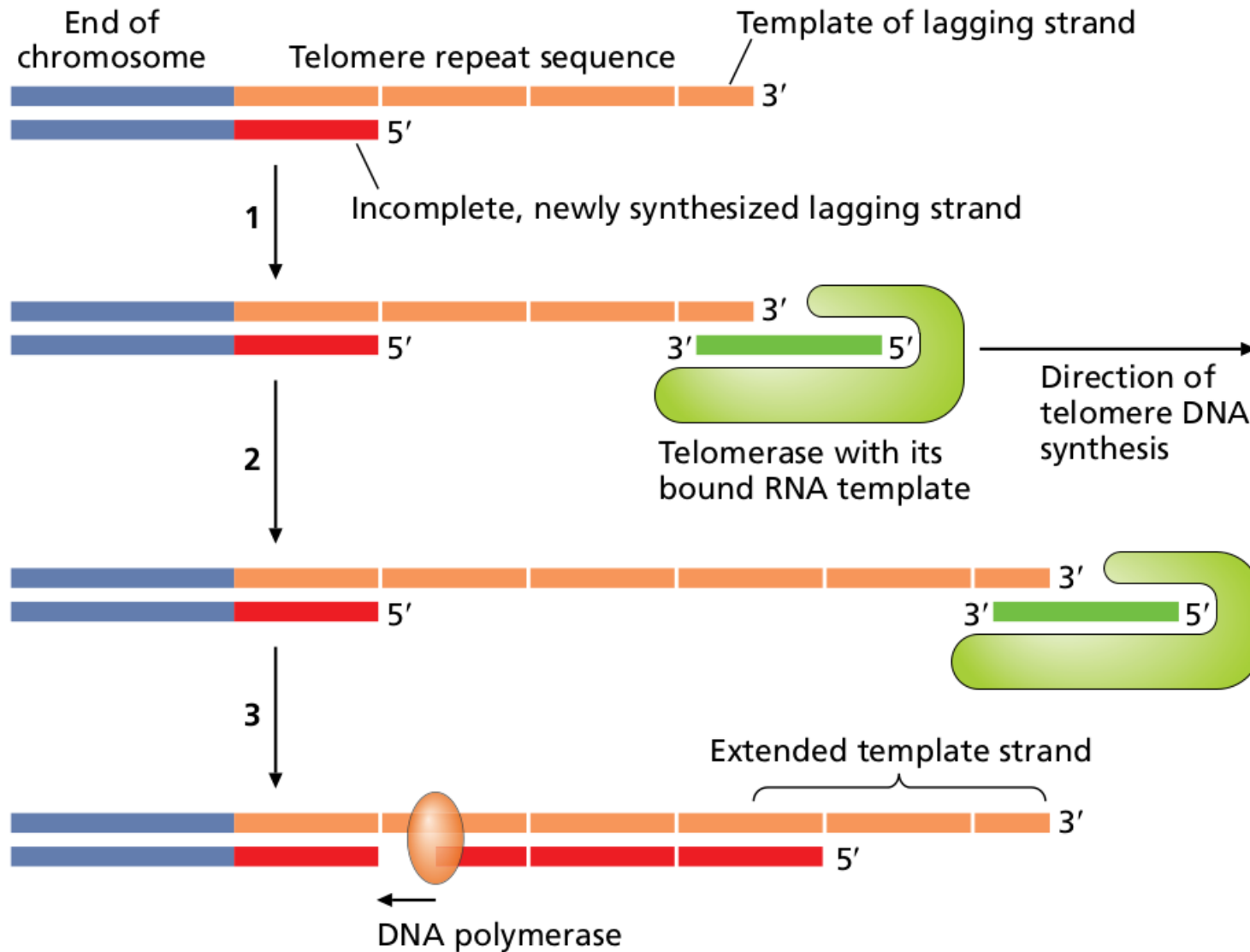
Ribosome shunting

Özellik	Ribozom Atlaması	IRES Elementi
Mekanizma	Ribozomlar 5' kapakçığı ve poliadenilasyon kuyruğunu atlar	Ribozomlar mRNA içindeki iç dizilere doğrudan bağlanır
Dizi gereksinimi	5' UTR içinde kısa, belirli bir dizi	mRNA içinde karmaşık, yapılandırılmış bir dizi
Verimlilik	Son derece verimli	Ribozom atlamasından daha az verimli
Hücrel düzenleme	Hücrel düzenlemelerden kaçır	Hücrel faktörler tarafından düzenlenebilir
Viral kullanım	Adenovirüsler, hepatit C virüsü	Pikornavirüsler, flavivirüsler

Adenovirus Replikasyon

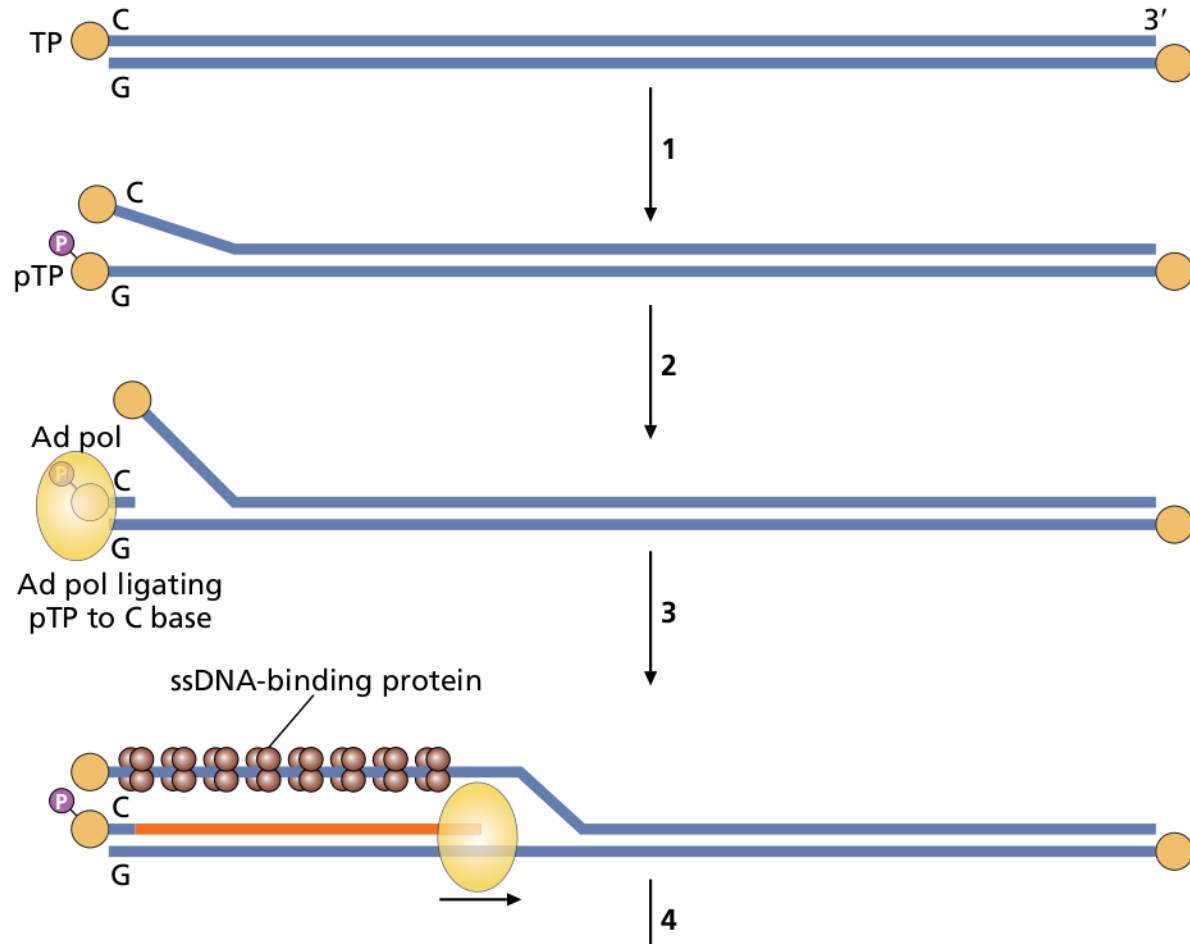
Virüs genomu lineer olduğundan “uçların kısalması” problemi yaşayacaktır.

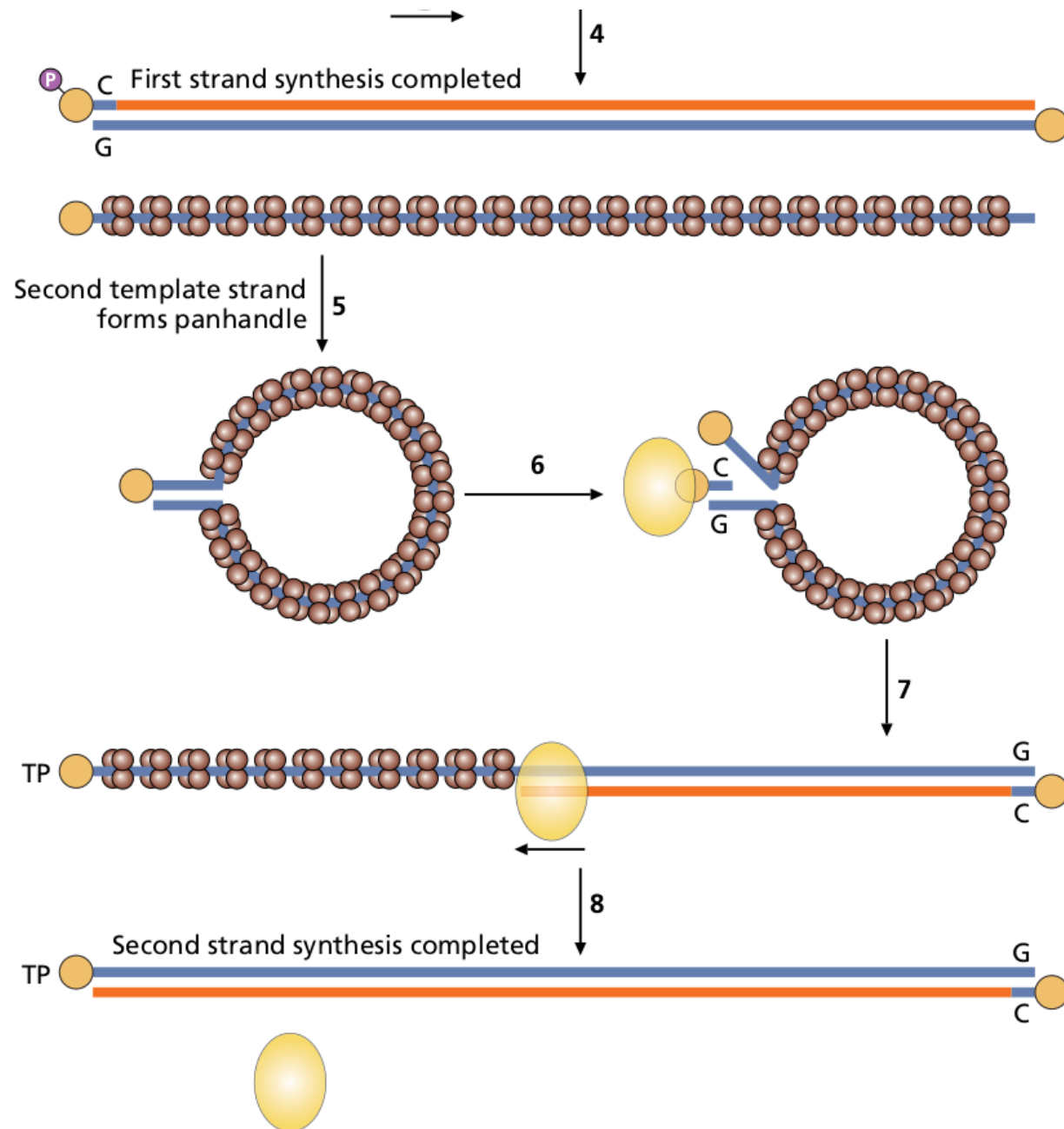
Telomer - genel



Adenovirüs - uçların kısalması

Ad pol, pTP proteinin primer olarak kullanır. Picornavirüslerin VPg kullanmasına oldukça benzerdir. *preterminal protein (pTP)*

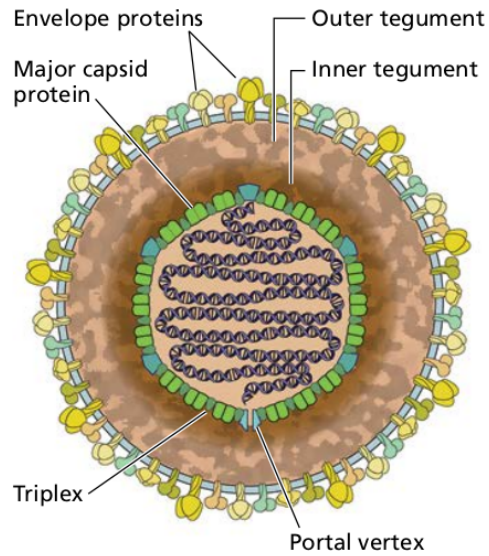




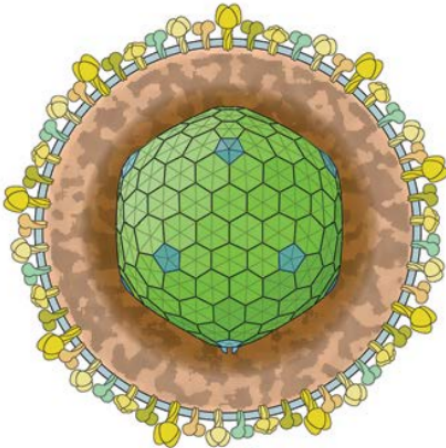
Adenovirus replikasyon

Ad pol ve pTP, adenovirüs genom replikasyonu için gereklidir. Viral genom replikasyonunu başlatmak için, pTP genomun 3' uçlarından birine bağlanır ve bazı baz çiftlerini ayırmak için hidrojen bağlarını kırar (1). Ad pol, pTP'ye bağlanır ve bir kompleks oluşturur, ardından proteindeki belirli bir serin yan zincirine bir C nükleotidinin kovalent eklenmesini katalize eder (2). Sonraki adımda, Ad pol–pTP kompleksi, şablon olarak hizmet eden diğer iplikle ilişkili kalmaya devam eder. Ad pol, pTP–C nükleotidine bağlı serbest 3' OH'yi uzatır (3). İlk ipliğin kopyalanmasının sonunda, yeni bir çift sarmallı molekül ve ssDNA-bağlayıcı proteinlere bağlı bir yer değiştirmiş nontemplate molekül vardır (4). Yer değiştirmiş adenovirüs şablon molekülü daha sonra, adenovirüs genomunun sonundaki ters tekrarlar sayesinde, bir tava sapı şekli oluşturacak şekilde daireselleşir (5). Bu tava sapı, başka bir viral polimeraz ve pTP kompleksinin bağlanabileceği (6) ve bu ipliği de kopyalayabileceği bir replikasyon başlangıcı olarak hizmet eder. Ad pol aktivitesi nedeniyle, şablon lineerleşir ve tek iplik bağlayıcı proteinler, enzim DNA'yı kopyalarken yer değiştirilir (7). Net sonuç, bir ipliğine kovalent olarak pTP'nin bağlı olduğu iki dsDNA genomunun oluşumudur (8).

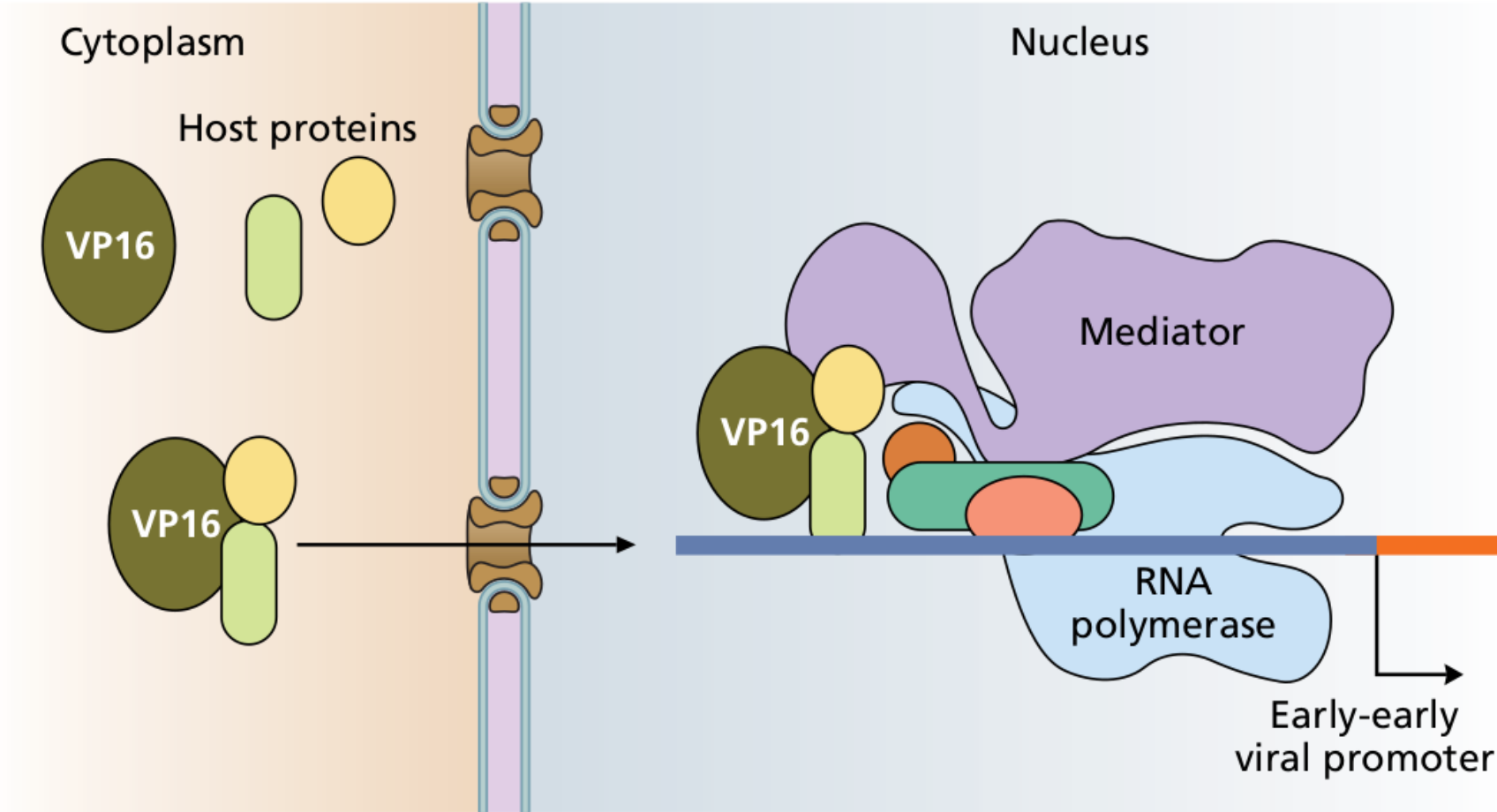
Herpesvirüsler / Human Herpesvirus 1



Genom



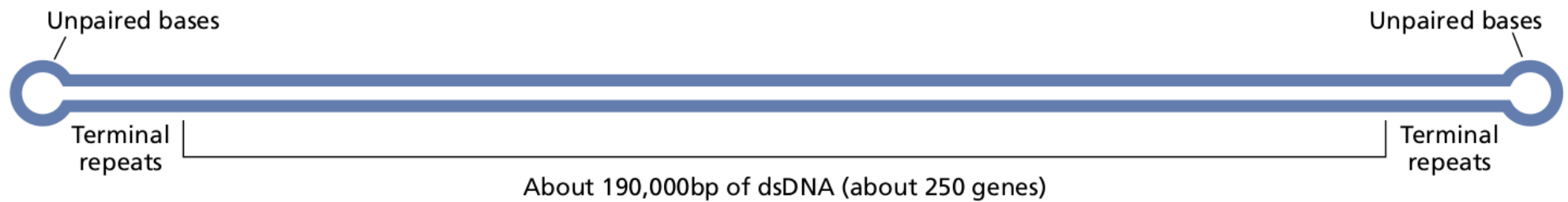
İleri erken transkripsiyon



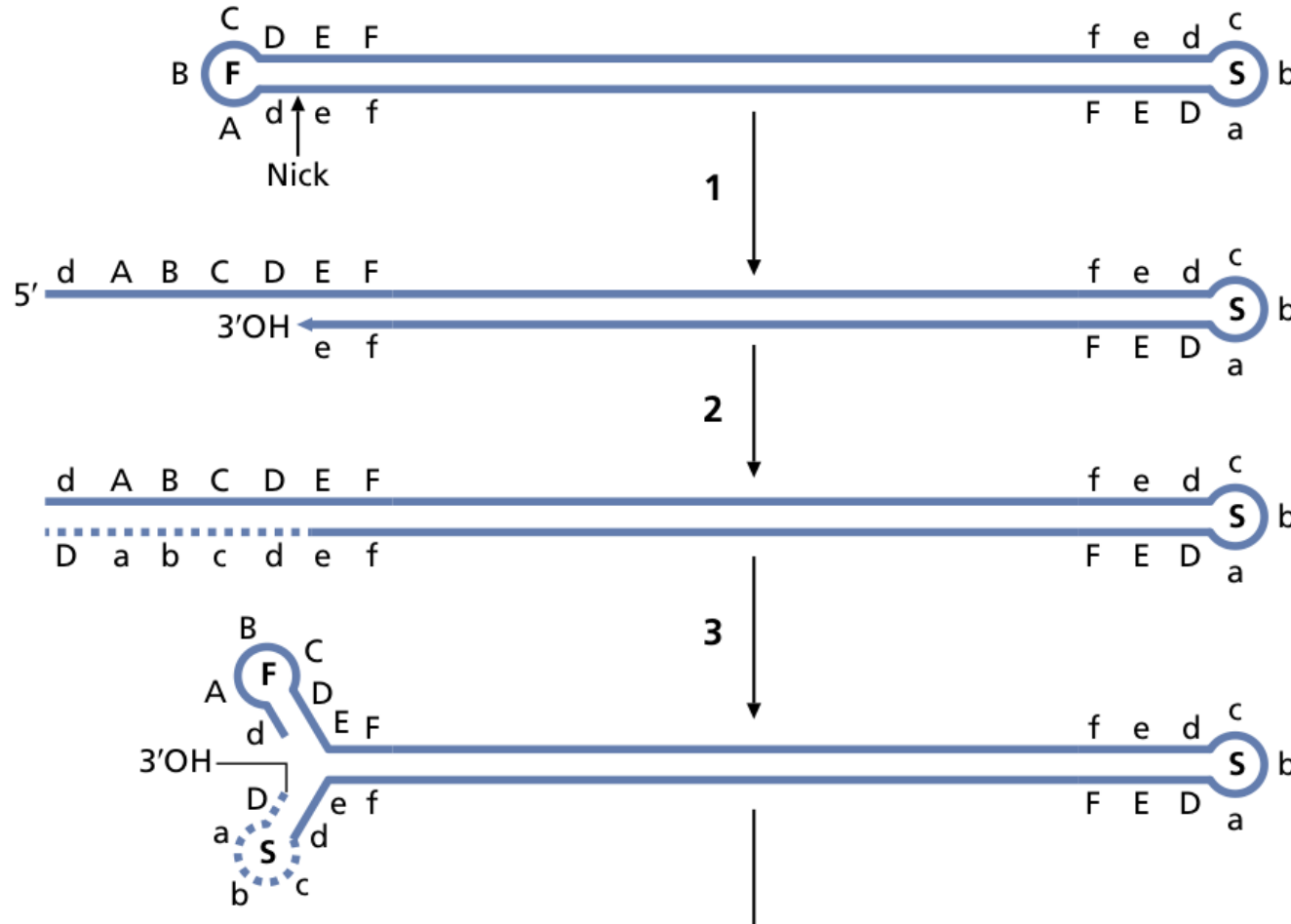
HSV, tegument bölgesinde getirmiş olduğu VP16 proteinini sayesinde ileri-erken genlerin transkripsiyonunu başlatır.

Poxvirüsler / Vaccinia virüs

Replikasyon ve gen ifadesi sitoplazmada gerçekleşir (Intron yok, o yüzden splicing de yok).
Genom, kovalent olarak kapalı bir hairpin olarak bulunur.



Genom replikasyonu



D/d, E/e, F/f, eşlenik diziler, F: fast, S: slow hairpin. A,B,C eşleşmemiş diziler (A ile a, B ile b ve C ile c eşleniktir)

