

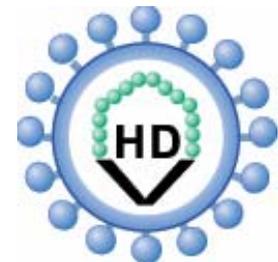
Virusgenome und virale Replikationsstrategien

Hans-Georg Kräusslich, Abteilung Virologie
www.virology-heidelberg.de

24. April 2007

Grundzüge der viralen Replikation

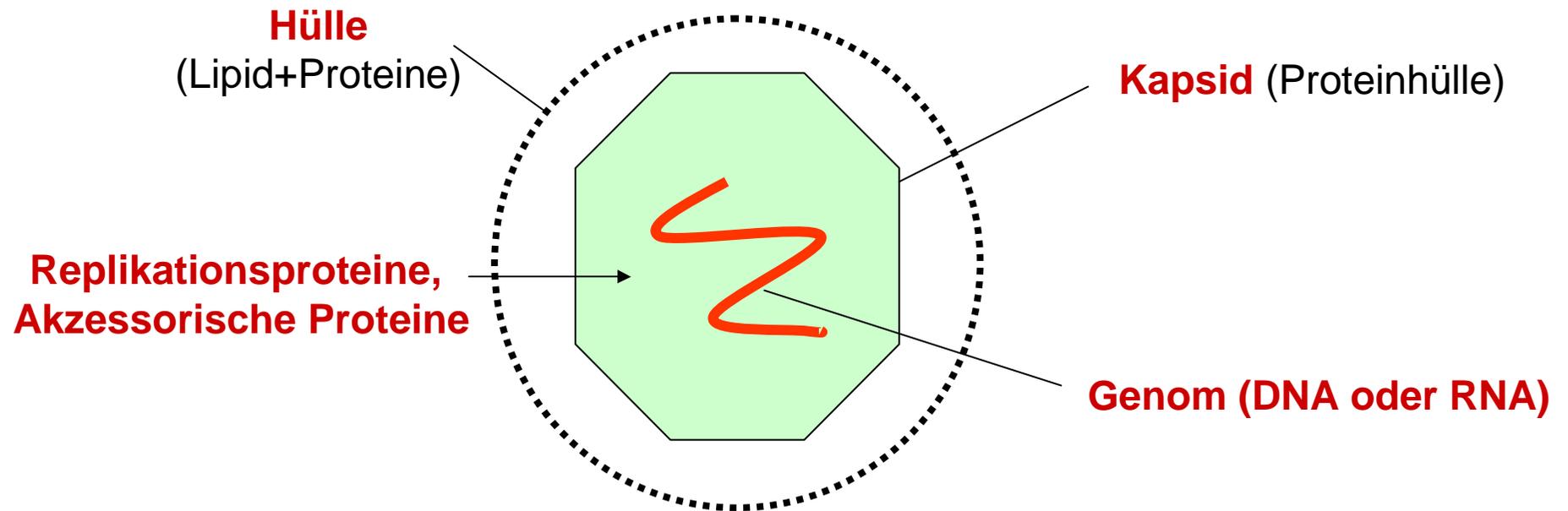
Genomaufbau und Replikationsstrategien



Definierende Eigenschaften von Viren

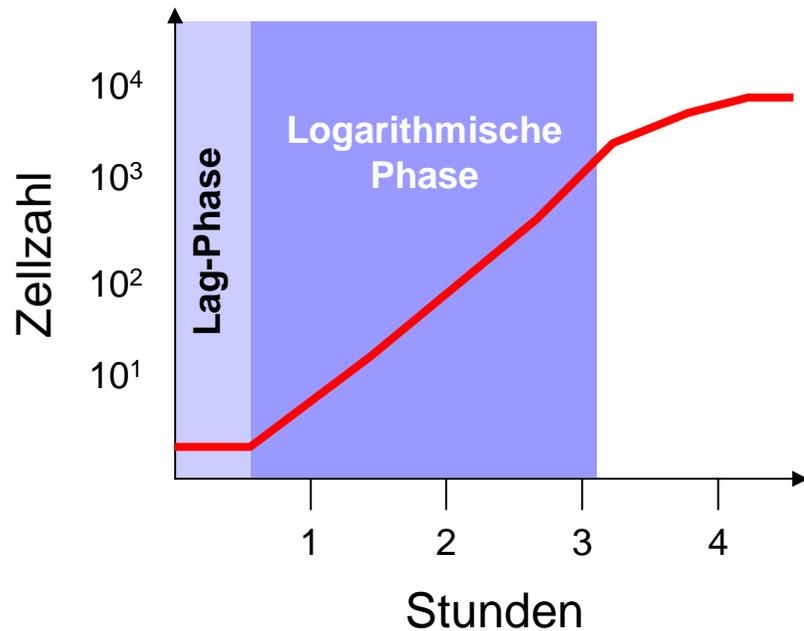
- Viren sind obligate **intrazelluläre Parasiten**
- Virusgenome können aus **DNA oder RNA** bestehen
- Das Virusgenom wird **in der Wirtszelle repliziert**
Es steuert die Synthese der übrigen Virusbestandteile
- Virusnachkommen werden aus **neu gebildeten Komponenten** zusammengesetzt (Assembly)
- Ein neu gebildetes Virion ist ein **Vehikel, mit dem das virale Genom zur nächsten Wirtszelle oder Wirtsorganismus transportiert wird**
Dort beginnt es den nächsten Replikationszyklus

Woraus besteht ein Virus?

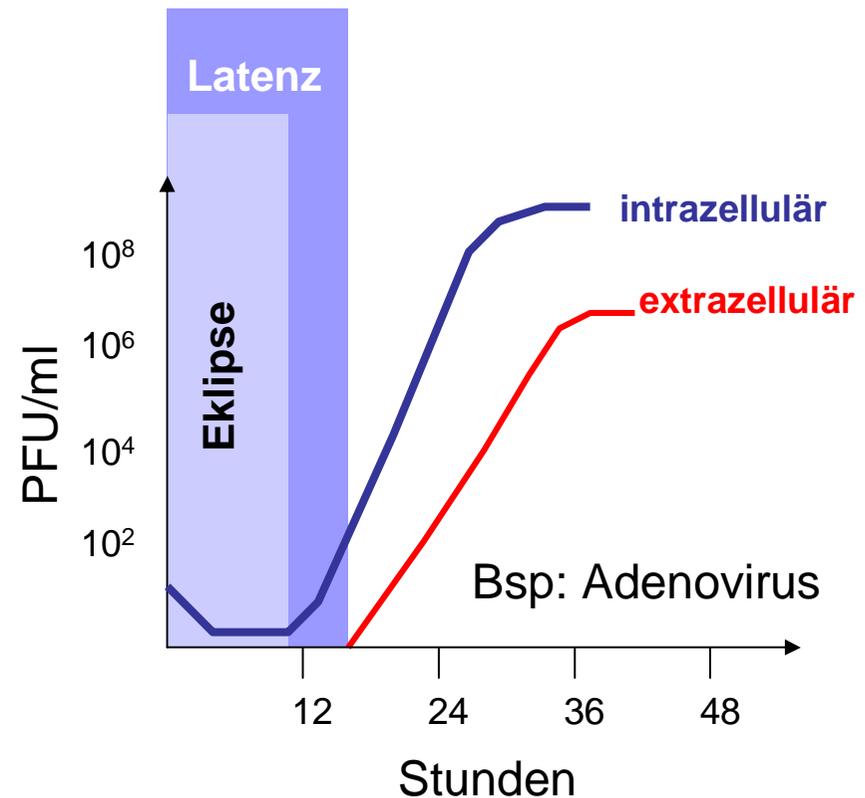


Virus = zellfreie, geschützte Nukleinsäure (RNA oder DNA)

Vermehrung von Bakterien und Viren in Kultur

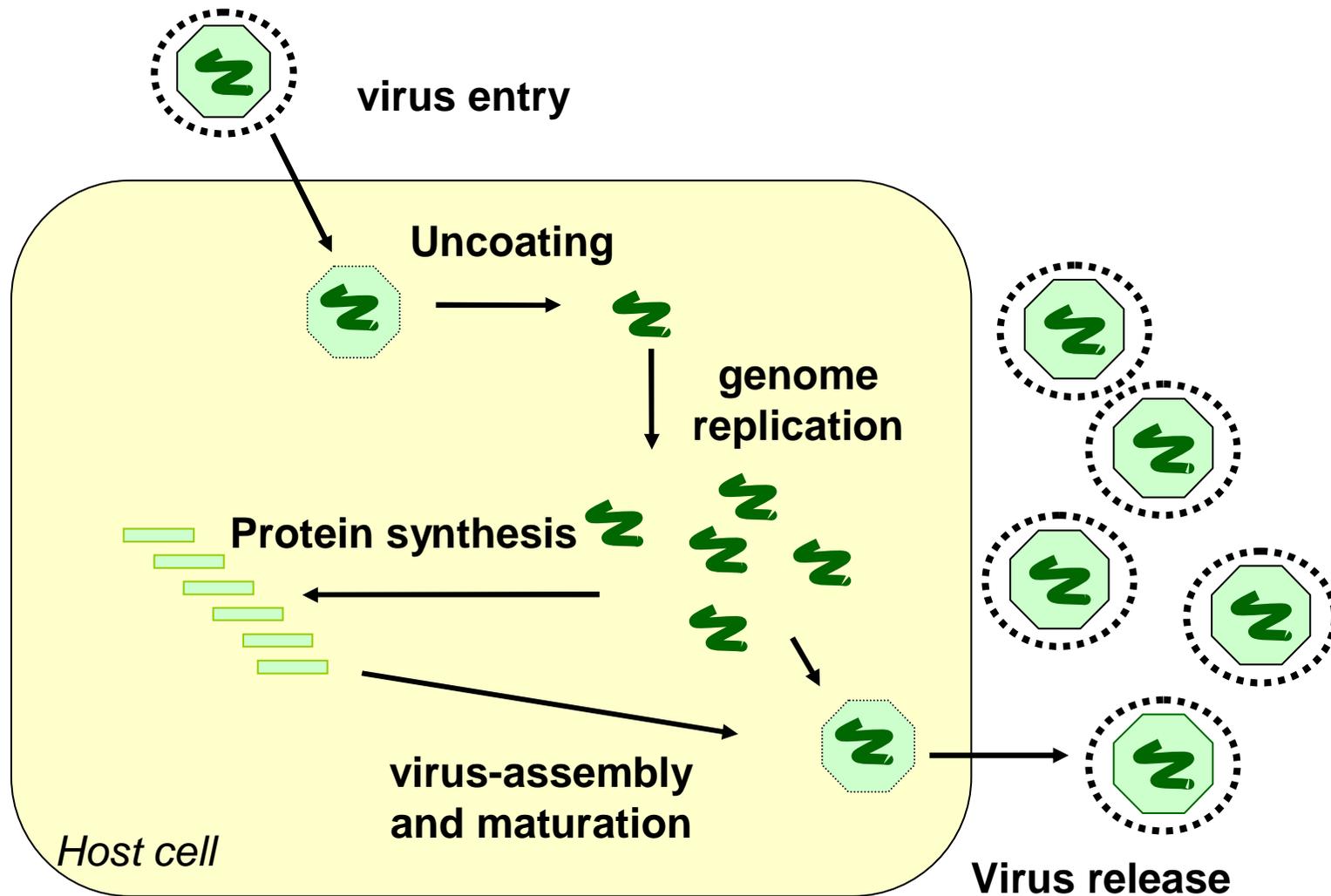


- Anpassung an die Kulturbedingungen (Lag-Phase)
- logarithmische Vermehrung durch Zweiteilung
- Verlangsamung der Teilung nach Aufbrauchen der Nährstoffe (Sättigung)



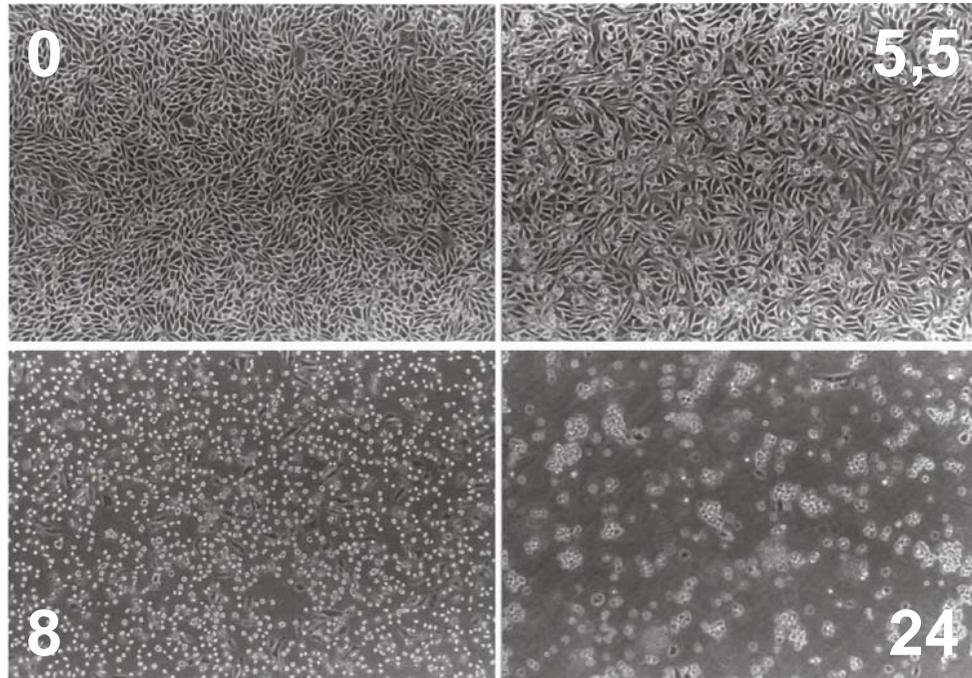
- Infektöse Partikel dringen in die Zelle ein und zerfallen (Eklipse)
- Bildung und Freisetzung von vielen Virusnachkommen pro Zelle
- Ende der Wachstumsphase durch Tod der Wirtszellen

Viral replication – basic principles



Für Proteinsynthese wird ausschließlich die zelluläre Maschinerie genutzt

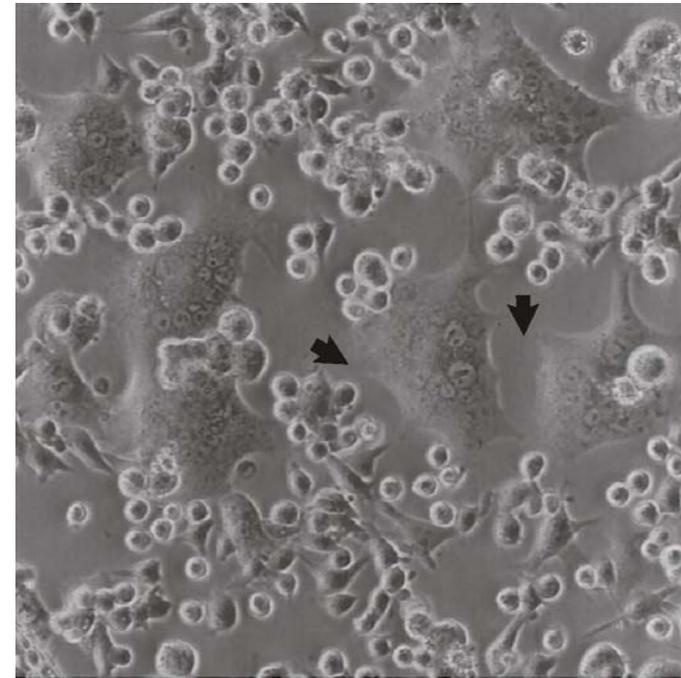
Cytopathogener (Zellschädigender) Effekt von Viren



Infektion von epithelialen HeLa-Zellen mit Poliovirus (Picornavirus)

Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (in Stunden)

fortschreitende **Lyse** der Zellen



Bildung von Riesenzellen (= **Syncytien**) nach retroviraler Infektion

Tropismus

Hepatitis B Virus infiziert nur die Leber des Menschen und Schimpansen, HIV nur die CD4-positiven Zellen des Menschen und Schimpansen

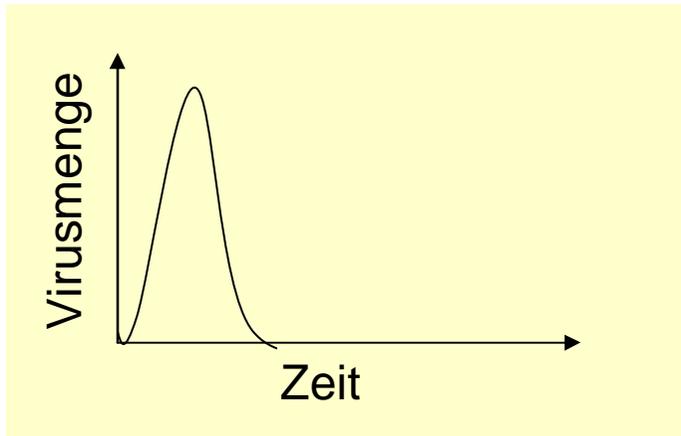
Wirtsspezifität
Gewebespezifität

Beeinflusst durch:

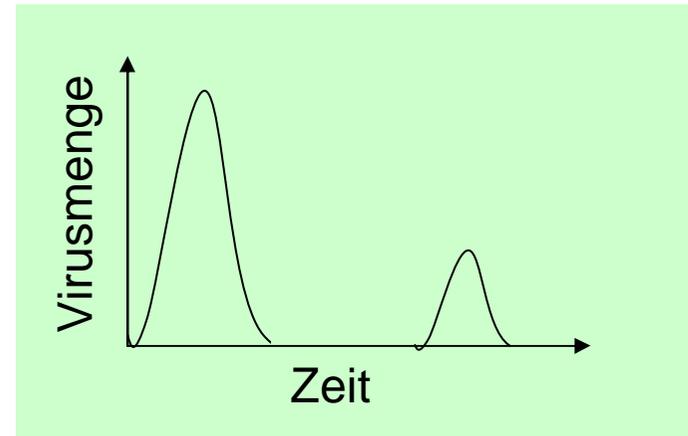
- Virusspezifischer Rezeptor auf Zelloberfläche
- Zelltyp-spezifische Promoter-/Enhancer-Elemente
- zelluläre Faktoren ,die für Eintritt, Genexpression, Assembly, Transport benötigt werden
- Eintrittspforte, Art der Inokulation

Persistenz, Latenz, Reaktivierung akute – chronische Infektion

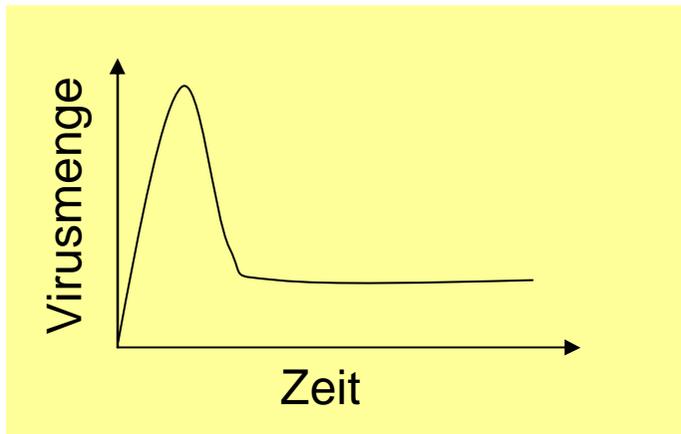
A. Akute Infektion → Clearance



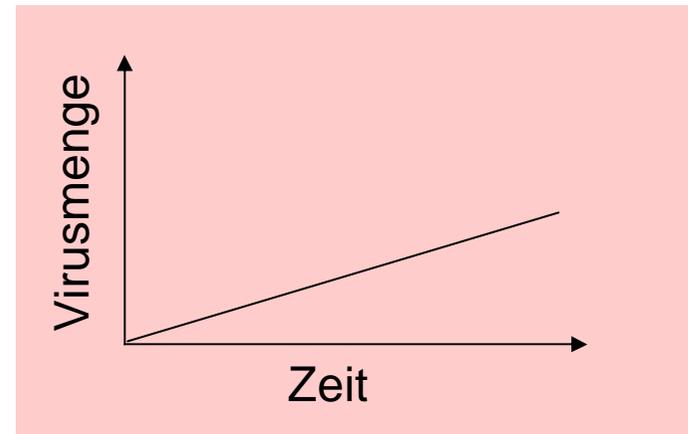
B. Akute Infektion → Latenz
→ Reaktivierung



C. Akute Infektion → chronische Infektion



D. Langsame chronische Infektion



Virusgenome **kodieren** Genprodukte und Informationen für

- **Partikelbildung** und **Verpackung** des Genoms
- **Replikation** des Virusgenoms
- **Regulation** des Replikationszyklus
- Ausschalten zellulärer **Abwehrmechanismen**
- **Verbreitung** auf andere Zellen und Wirtsorganismen

Virusgenome **kodieren nicht**

- **Proteinsynthese**-Maschinerie (rRNA, Translationsfaktoren etc)
- Enzyme des **Energiestoffwechsels**
- Faktoren der **Membranbiosynthese**
- Telomere, Zentromere

Im Gegensatz zum Genom der Zelle weisen Virusgenome eine große Variabilität auf

- DNA oder RNA
- DNA mit kurzen RNA Segmenten
- DNA oder RNA mit kovalent verknüpftem Protein
- Einzelstrang: minus, plus, ambisense
- Doppelstrang
- Linear
- Zirkulär
- Segmentiert
- Doppelstrang mit Unterbrechungen (gapped)

Die Art des Genoms bestimmt den Replikationsweg

Virusgenome können aus RNA bestehen

- Relikte aus der RNA-Welt?
- Anforderungen: 1. Kopieren des RNA-Genoms ohne Sequenzverlust
2. Herstellung von translations-kompetenten mRNAs aus genomischer RNA
 - Viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase oder Reverse Transkriptase
 - RNA-Elemente kontrollieren Replikation und Transkription in cis
 - De novo Synthese von RNA oder Mechanismen für Priming, Mechanismen für Capping + Polyadenylierung

Klassifikation der Viren: Genom

Genom

DNA-Viren

Einzelstrang

Doppelstrang

RNA-Viren

Plus-Strang (= mRNA)

Minus-Strang

Doppelstrang

Segmentiertes oder
nicht segmentiertes Genom

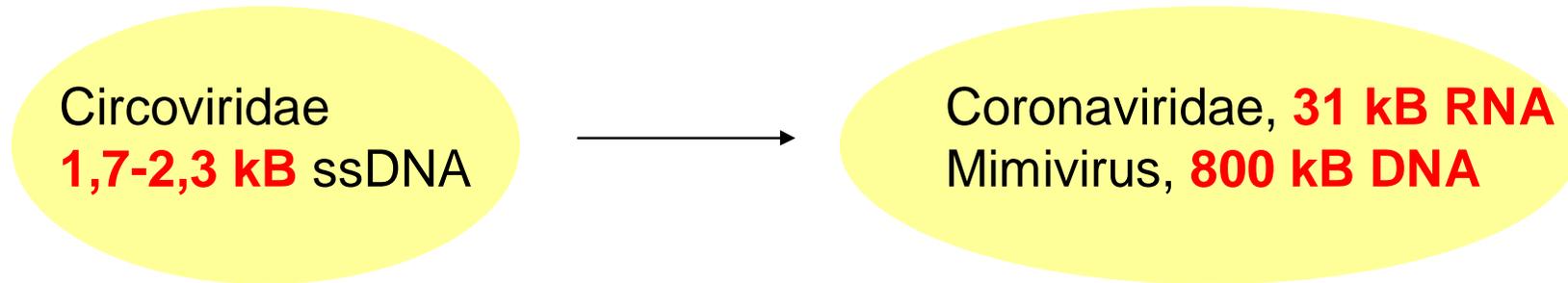
Mit oder ohne Hülle (Envelope)

umhüllt oder **nackt**

Klassifikation animaler Viren

	Umhüllt	Nackt
DNA	Pockenviren (Vaccinia, Variola, Molluscum contagiosum)	Adenoviren
	Herpesviren (HSV, VZV, EBV, CMV, HHV-6, -7, -8)	Papovaviren (Papillom, JCV, BKV)
	Hepadna-Viren (HBV)	Parvoviren (B19, ssDNA)
RNA	Retroviren (HIV, HTLV)	Flaviviren (Gelbfieber, FSME, HCV, West-Nil-Virus, Dengue-V.)
	Orthomyxoviren (Influenza)	Arenaviren (Lassa)
	Paramyxoviren (Masern, Mumps, RSV, Parainfluenza)	Rhabdoviren (Tollwut)
	Bunyaviren (Hanta)	Filoviren (Ebola, Marburg)
	Togaviren (Röteln)	Coronaviren (SARS)
		dsRNA Reoviren (Rota)
		ssRNA Picornaviren (Polio, Rhino, Coxackie, HAV, FMDV)
		Caliciviren (Noroviren: Norwalk)

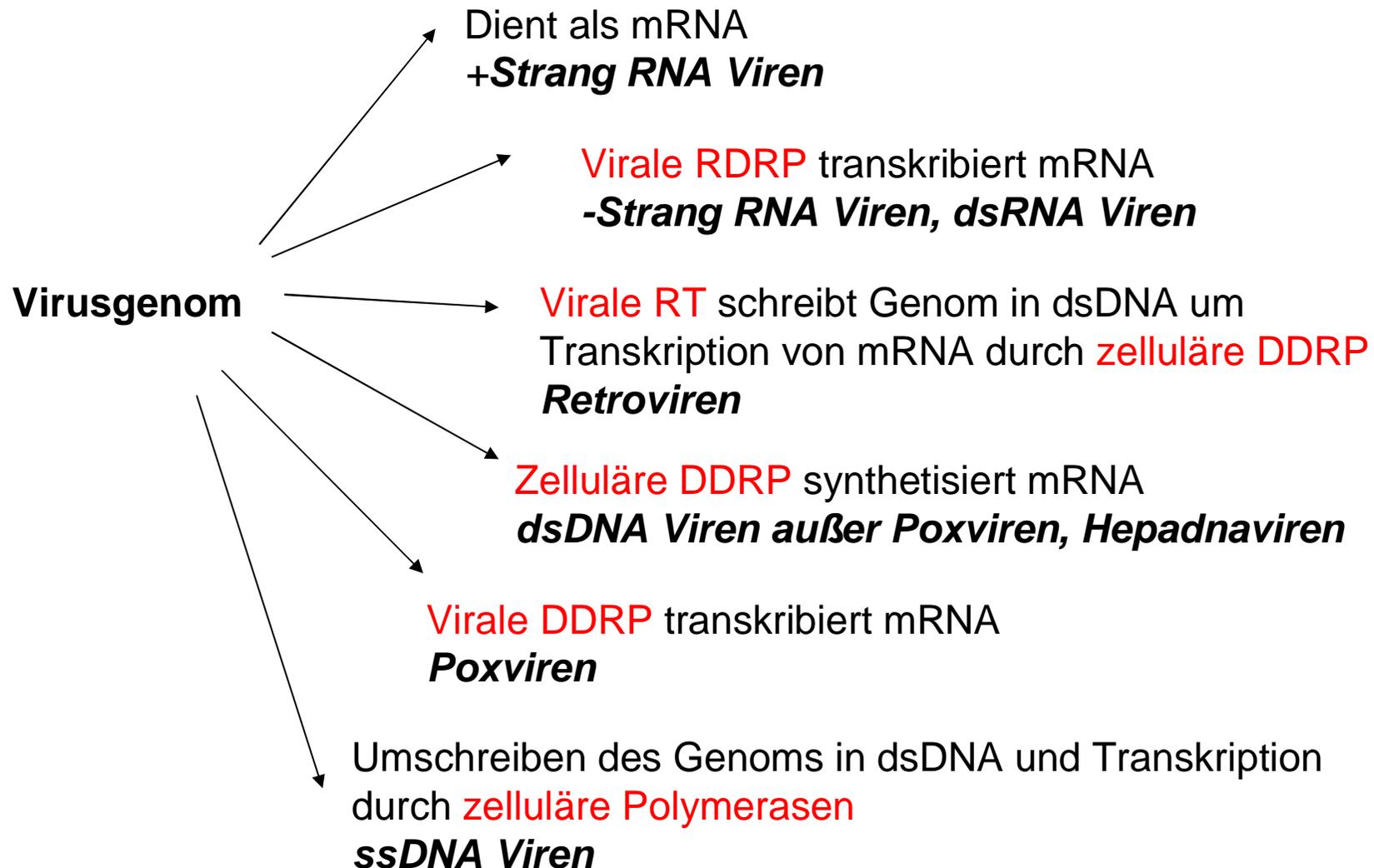
Grösse viraler Genome



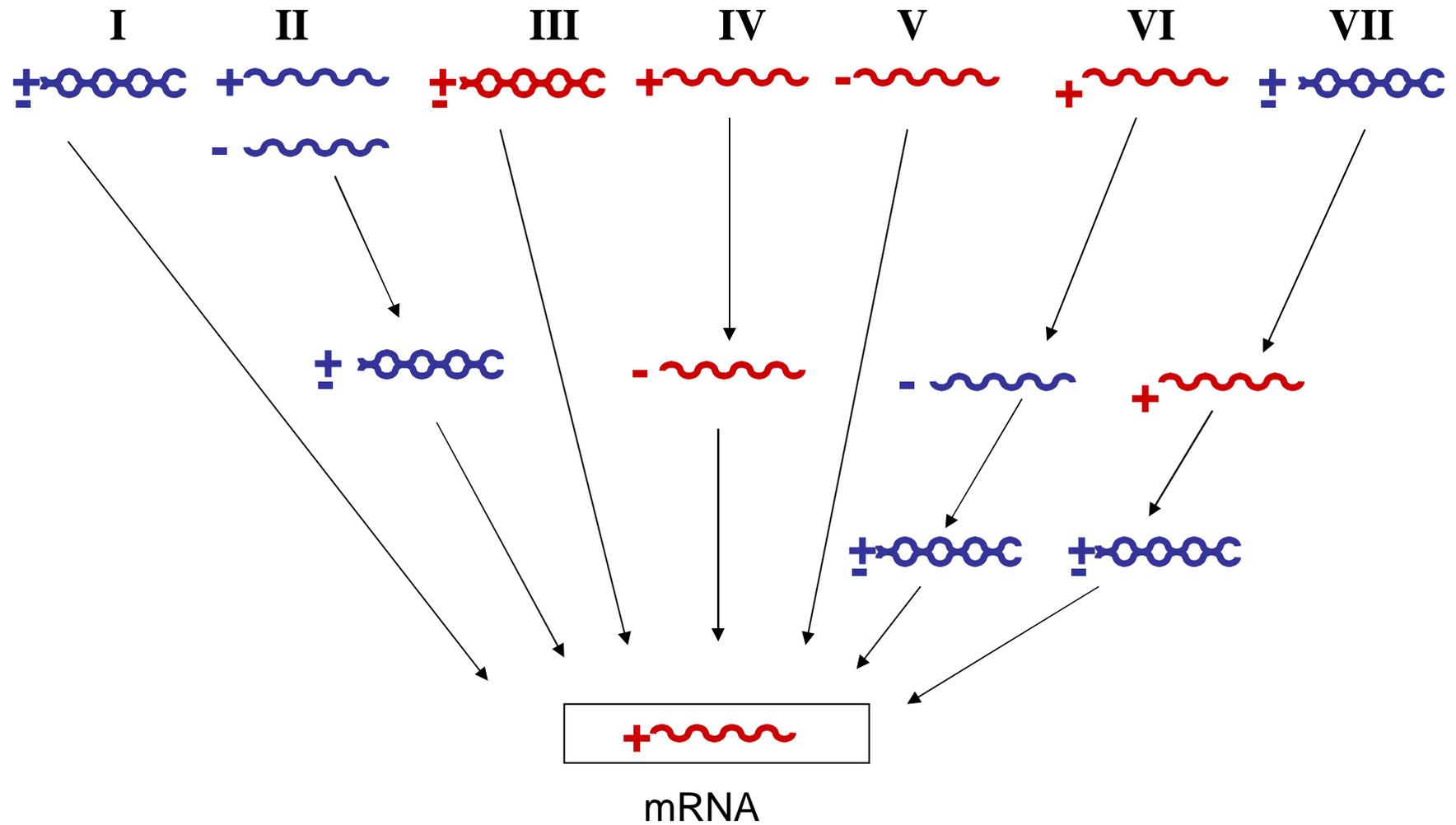
Faktoren, die die Genomgrösse begrenzen

- Dauer der Genomreplikation
- Kapsidgrösse
- RNA-Stabilität
- Genauigkeit der viralen Polymerasen

Klassifikation nach Replikationsstrategie: Unterschiedliche Wege vom Genom zur mRNA



Virale Replikationsstrategien („Baltimore-Schema“)



Die Replikationsstrategie bestimmt den Ort der Replikation

Ausnahme Pox:

Replikation im Zytoplasma

- Benötigen eigene Replikationsenzyme

RNA Viren benötigen eigene Polymerasen

- **Replikation im Zytoplasma**

DNA Viren nutzen zelluläre DNA-Polymerasen

- **Replikation im Zellkern**

Ausnahmen

Orthomyxo, Bunya: Nutzen splicing-Mechanismen im Kern

Retro: Integration ins Zellgenom

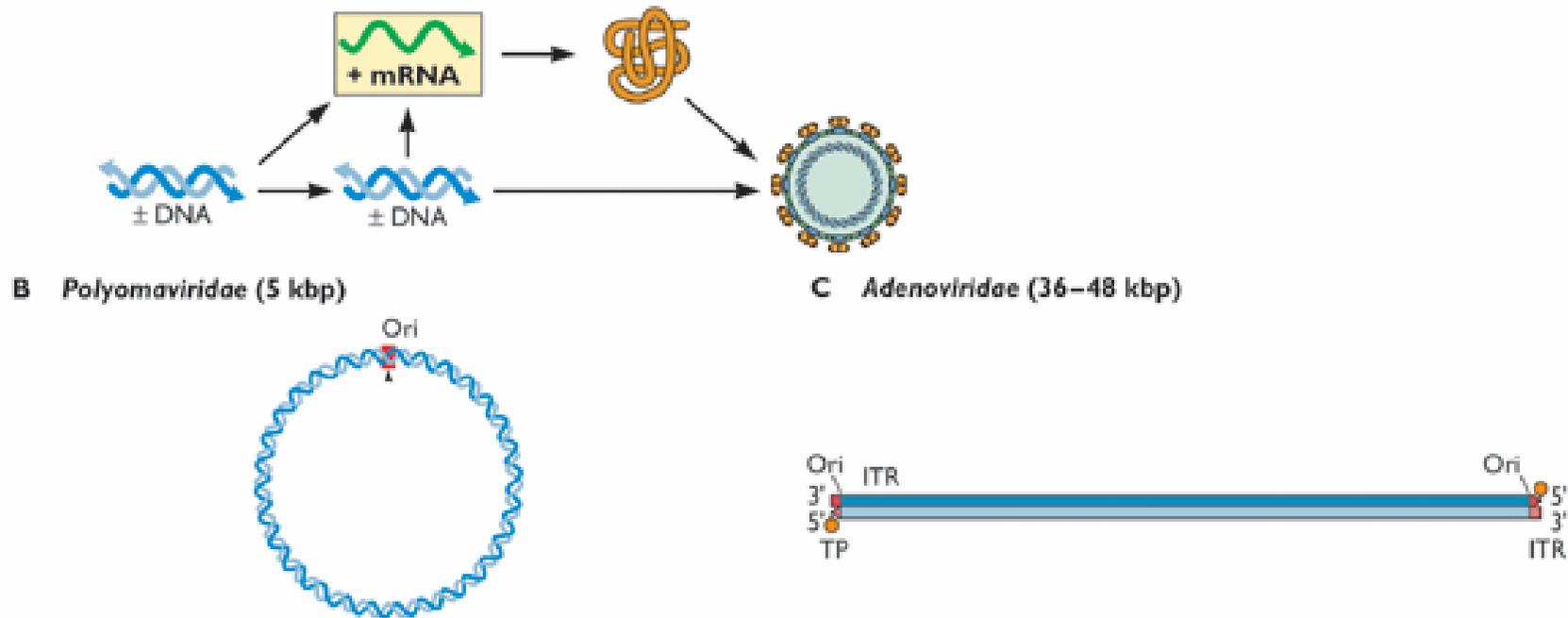
DNA Viren

Doppelstrang (zirkulär oder linear)

Einzelstrang

Unvollständiger Doppelstrang

dsDNA: Polyoma, Adeno, Herpes, Pox



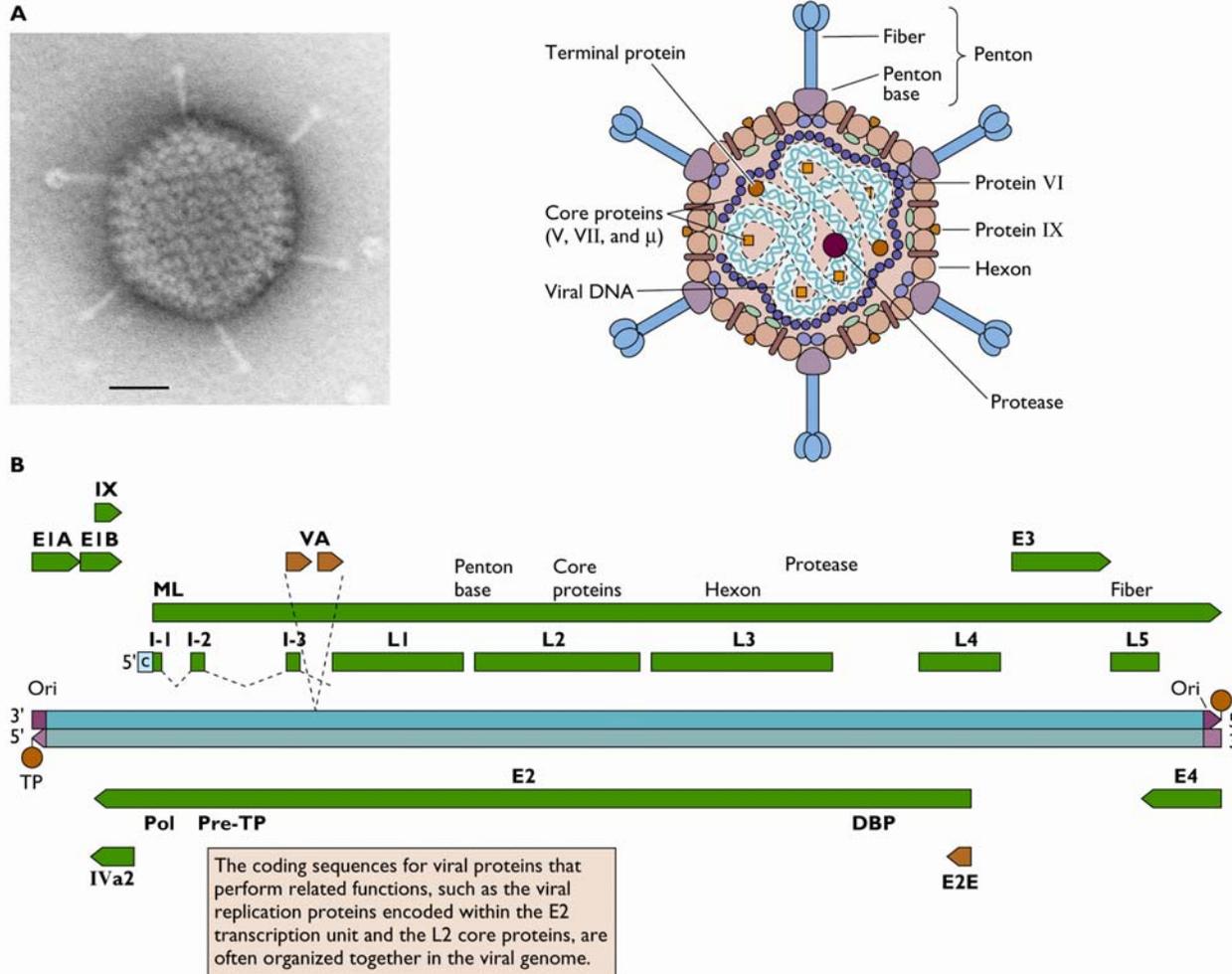
Polyoma

Replikation ausgehend vom Origin analog zum zellulären Mechanismus

Adeno

Protein-Priming durch Terminales Protein
Eigenes Replikationssystem
einschliesslich Polymerase

Adenovirus



Protein priming der Replikation

PolIII und PolIII transkribierte Gene

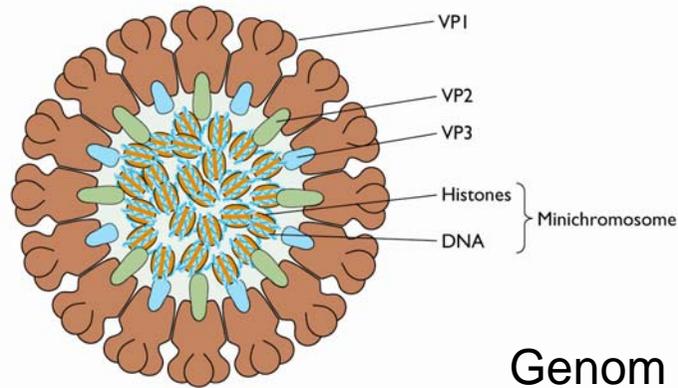
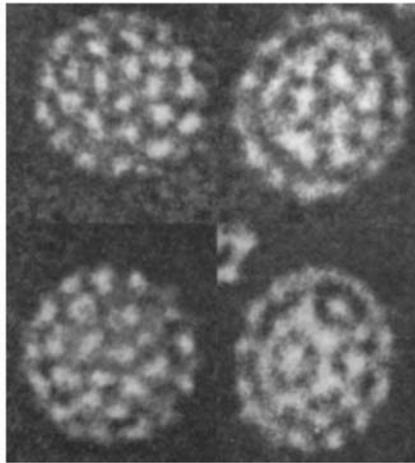
Präzise Kontrolle der Genexpression

Splicing

Alle mRNAs tragen identische leader Sequenz

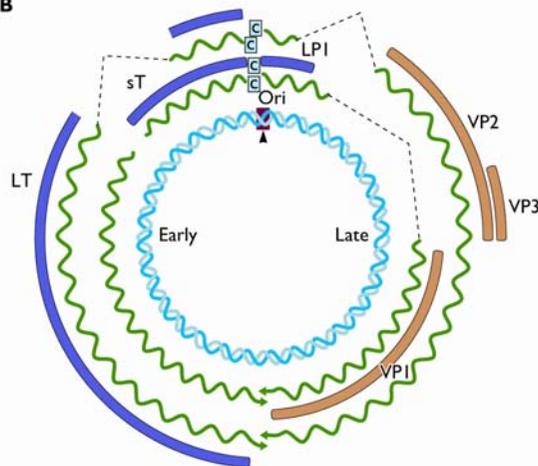
Polyomavirus: Simian Virus 40

A



Genom komplexiert mit Histon
(Minichromosom)

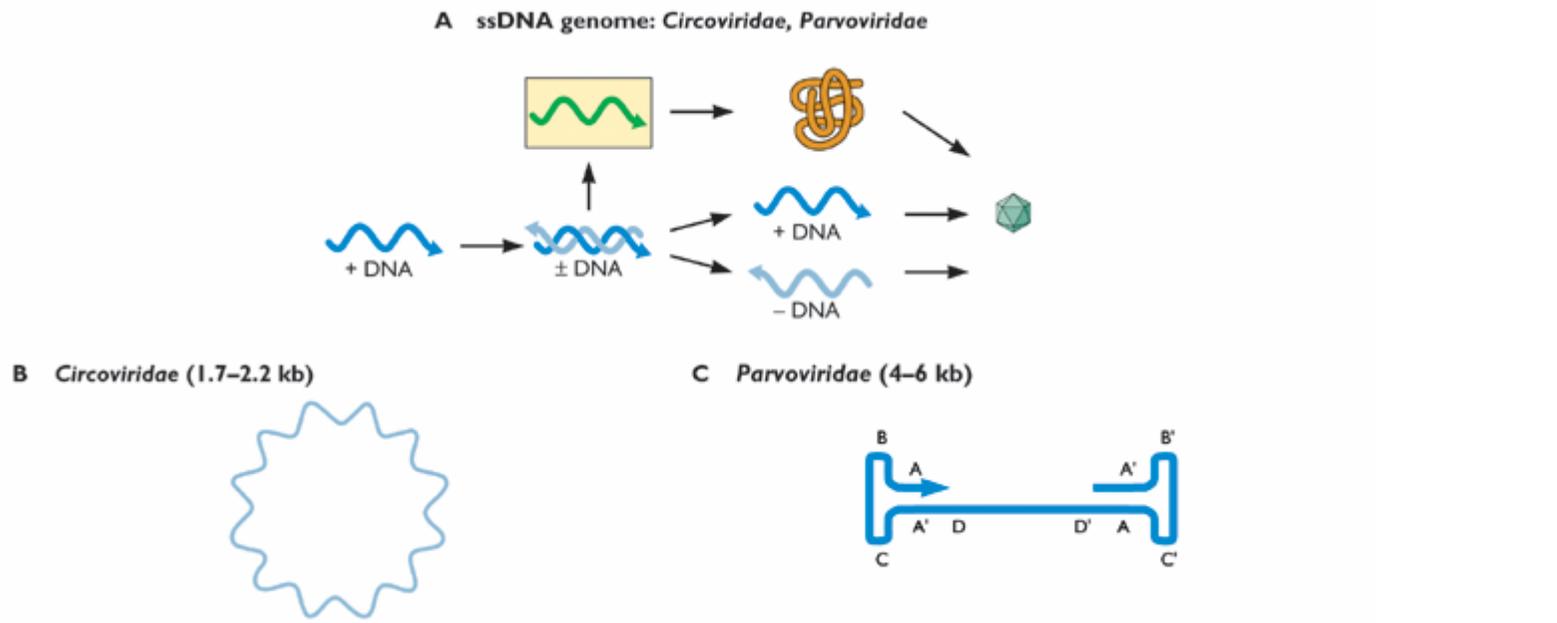
B



Erforschung von Mechanismen
der Transkription und
Transkriptionskontrolle
(Enhancer)
und der Onkogenese (T-Ag)

Early und late Genexpression

ssDNA: Circoviren, Parvoviren



Zirkuläres Genom
Antisense und ambisense

Lineares Genom mit hairpins
Hairpin ist primer für DNA-Synthese
+Strang oder -Strang

Replikation durch Wirtsenzyme
2 ORF: Replikase und Capsid

RNA-Viren

Das virale Genom besteht aus **RNA**

Grundlegende Eigenschaften des Replikationszyklus werden definiert durch die **Polarität** des RNA-Genoms

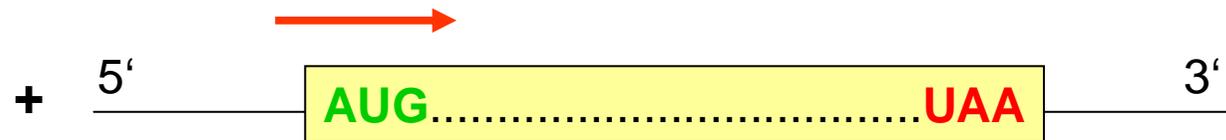
+Strang RNA: entspricht der mRNA

-Strang RNA: komplementär zur mRNA

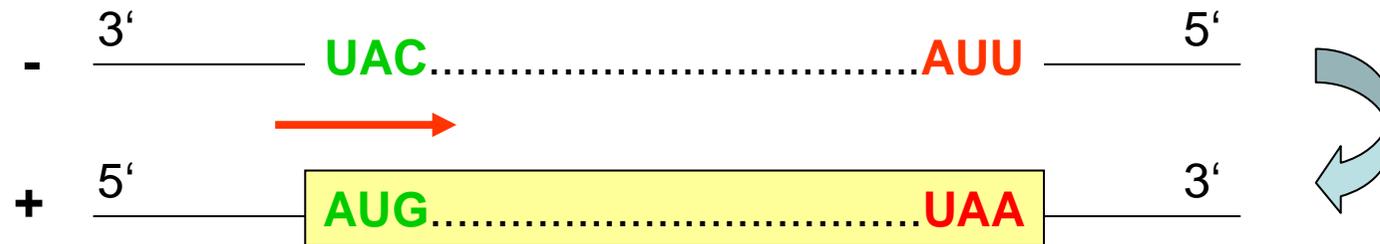
Ambisense: eine RNA wird in beide Richtungen abgelesen

Genompolarität von RNA-Viren

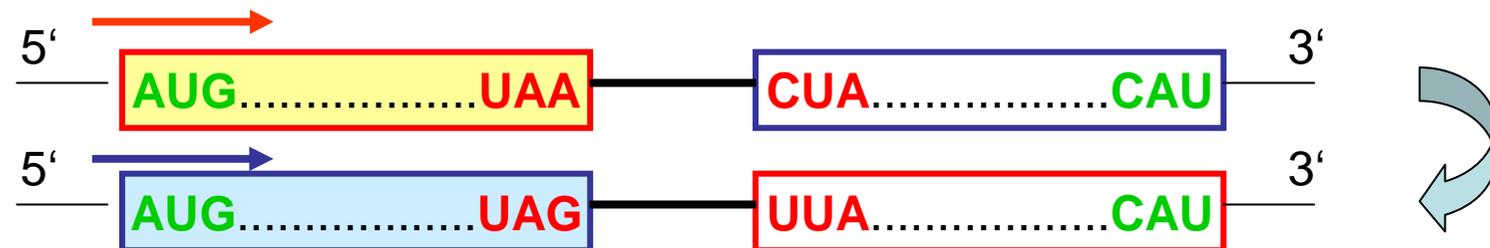
Plus-Strang: Genom = mRNA



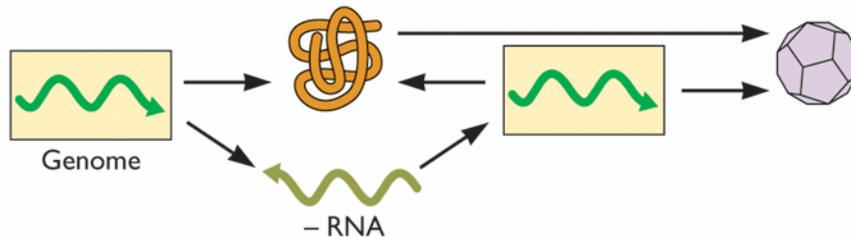
Minus-Strang: Antigenom = mRNA



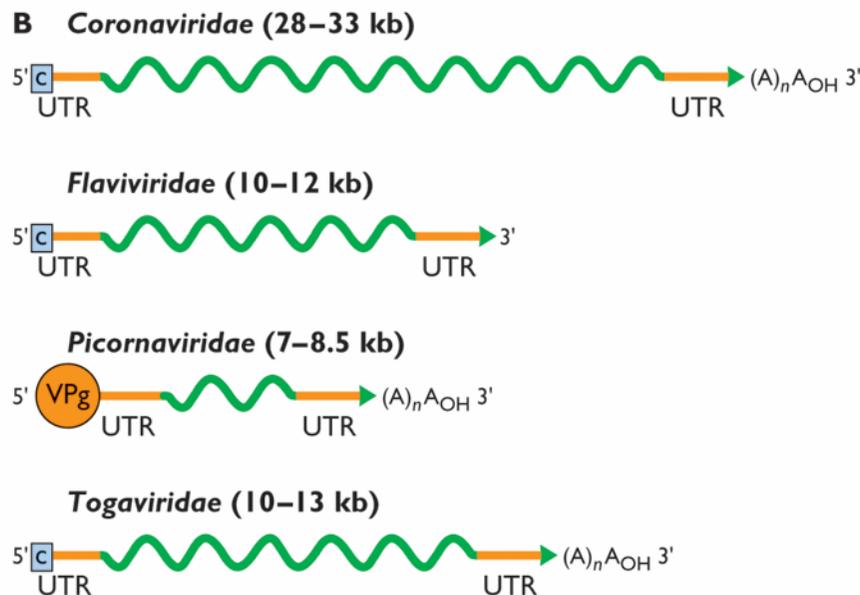
Ambisense: Genom und Antigenom = mRNA



+Strang RNA: Picorna, Flavi, Corona, Toga



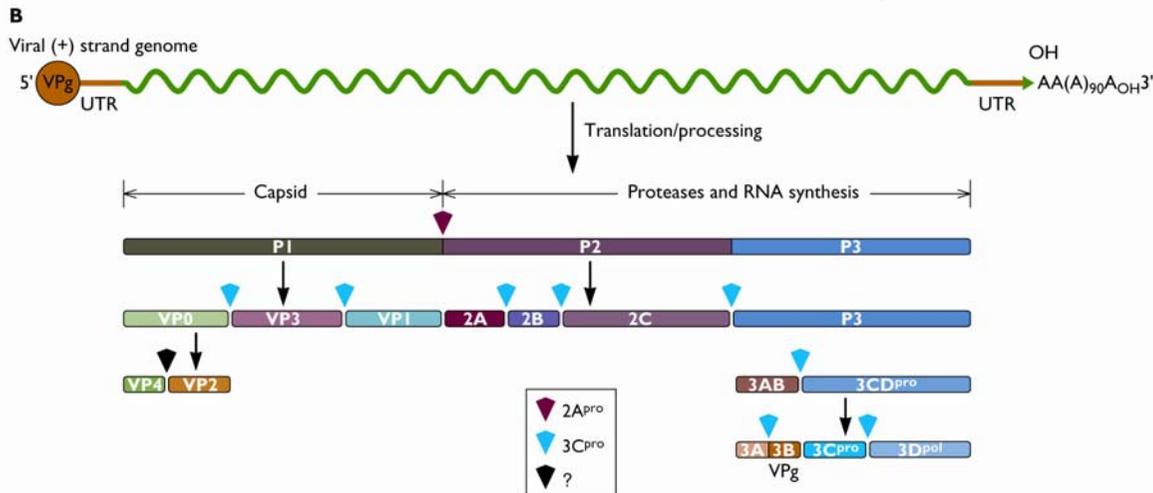
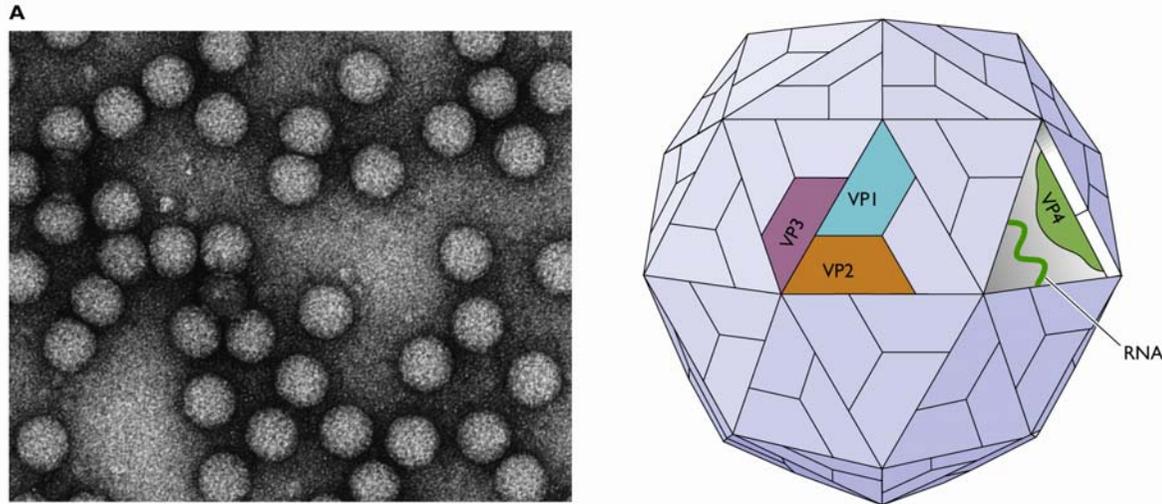
Genom dient als mRNA
Wird unmittelbar nach Infektion
translatiert



Virale RDRP synthetisiert Antigenom
und neue genomische RNA
Meist viruseigenes Capping-Enzym

Erhöhung der Codierungskapazität:
Polyprotein
Subgenomische mRNA
Ribosomales Frameshifting
Nonsense suppression

Picornavirus: Poliovirus



Protein Priming (VPg)

RNA codiert für ein einziges
Polyprotein
Proteolytische Prozessierung
in funktionelle Untereinheiten

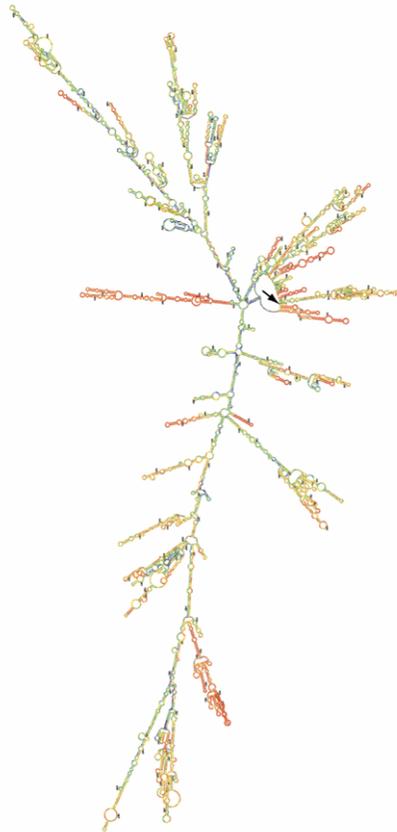
Interne Initiation der
Translation (IRES)

RNA-Virusgenome weisen Sekundär- und Tertiärstruktur auf

Linear (+) strand RNA genome of a picornavirus



Computer-produced structure of a picornavirus genome

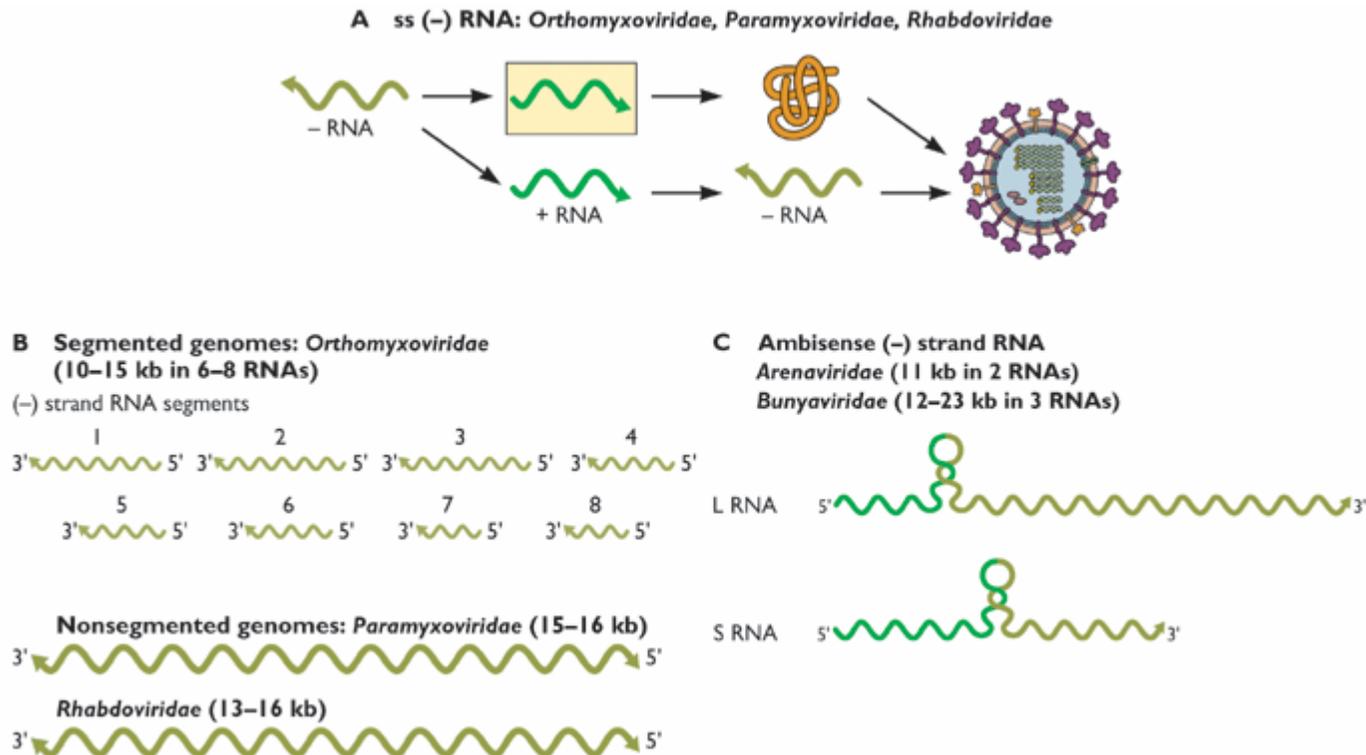


RNA-Genome sind stark gefaltet und enthalten Strukturelemente, die zur Kontrolle von Replikation und Transkription dienen

Adapted from A. C. Palmenberg and J.-Y. Sgro, *Semin. Virol.* 8:231–241, 1997, with permission.

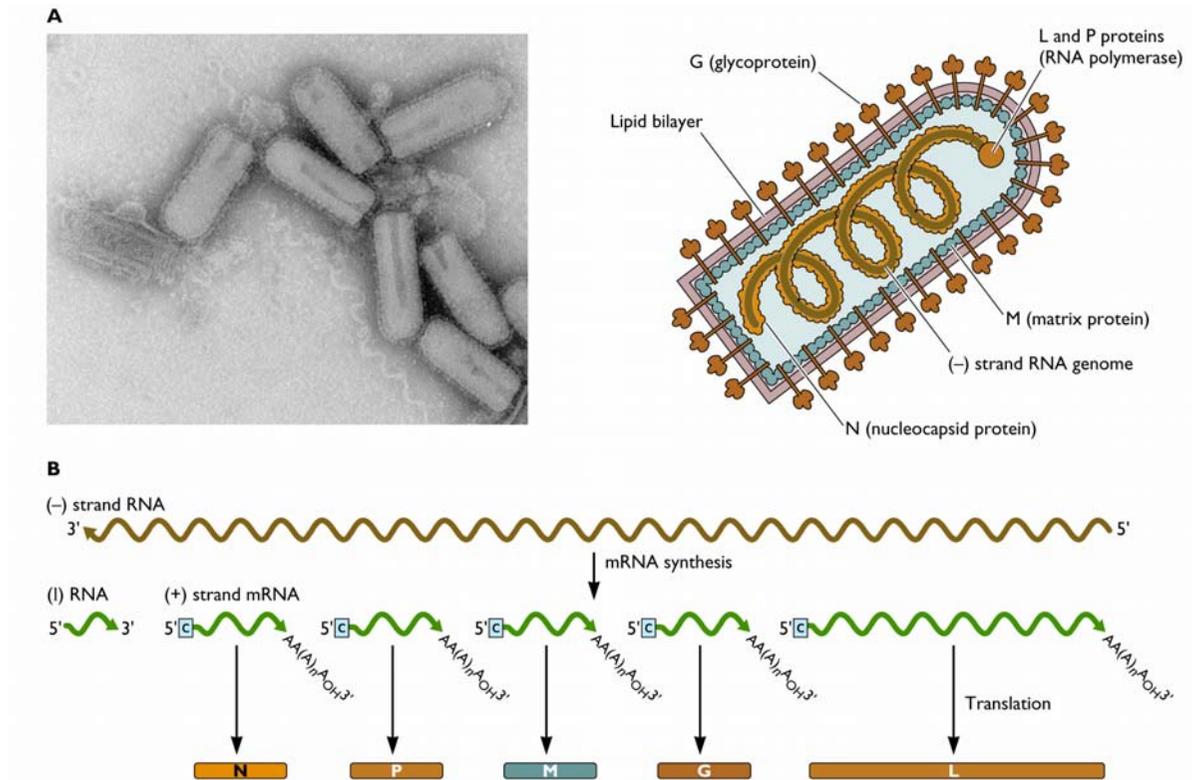
Flint et al., Principles of Virology, 2004

-Strang RNA: Orthomyxo, Paramyxo, Rhabdo ambisense RNA: Arena, Bunya



Segmentierte oder nicht segmentierte Genome

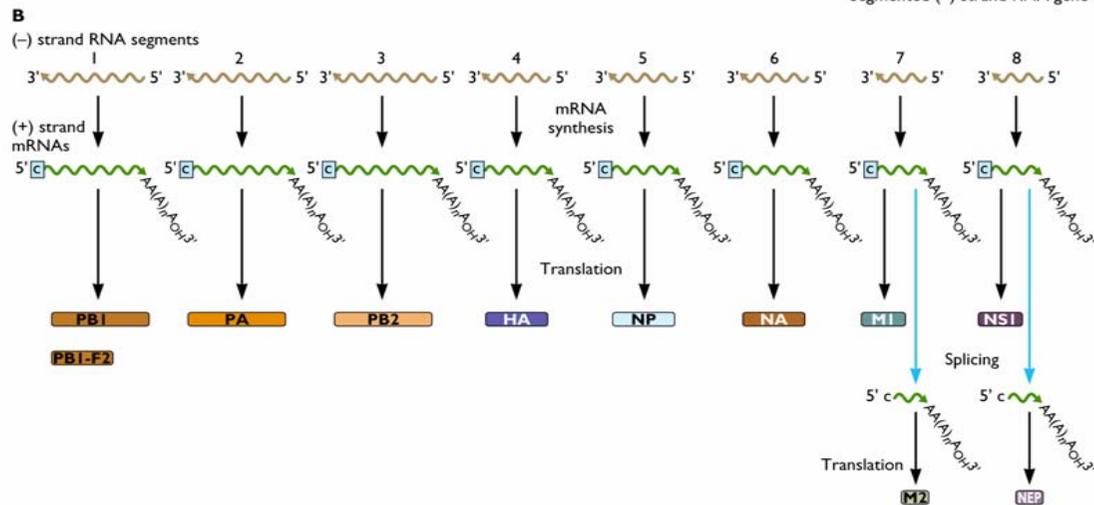
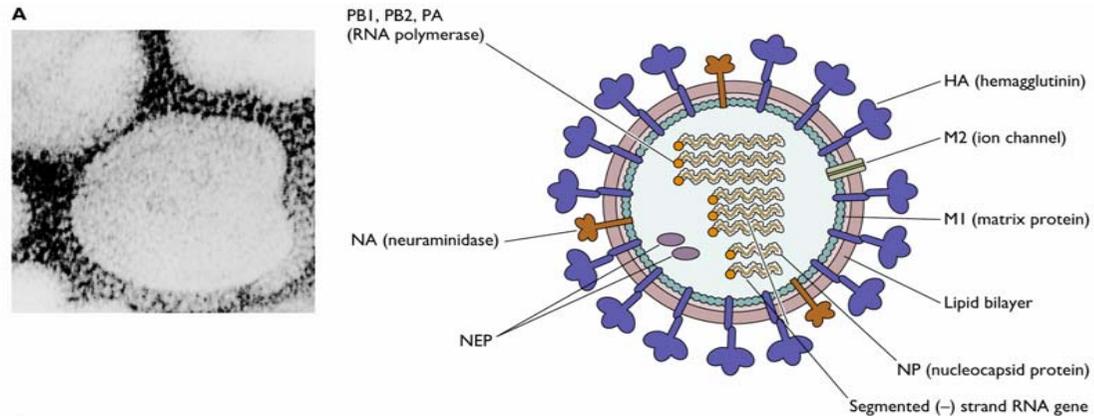
Rhabdovirus: Vesicular Stomatitis Virus



RNA-abhängige RNA Polymerase

-Strang RNA dient als template für die Synthese von 5 monocistronischen mRNAs

Orthomyxovirus: Influenza



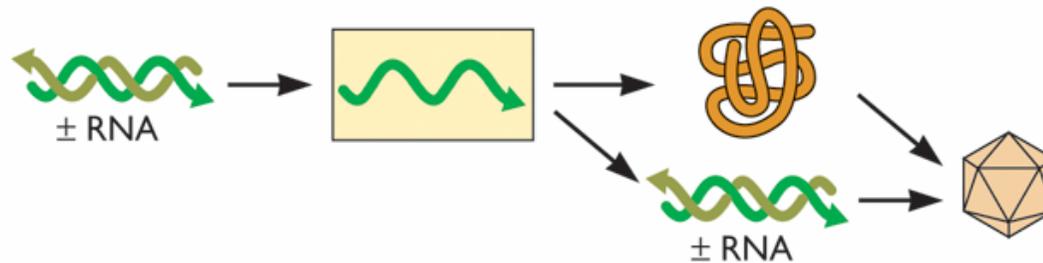
8 Segmente –Strang RNA
Reassortment

Kodieren für 1 oder 2
virale Proteine (Splicing)

RNA abhängige RNA
Polymerase
Gecappte Wirts-mRNA
Fragmente dienen als
Primer für mRNA
Synthese

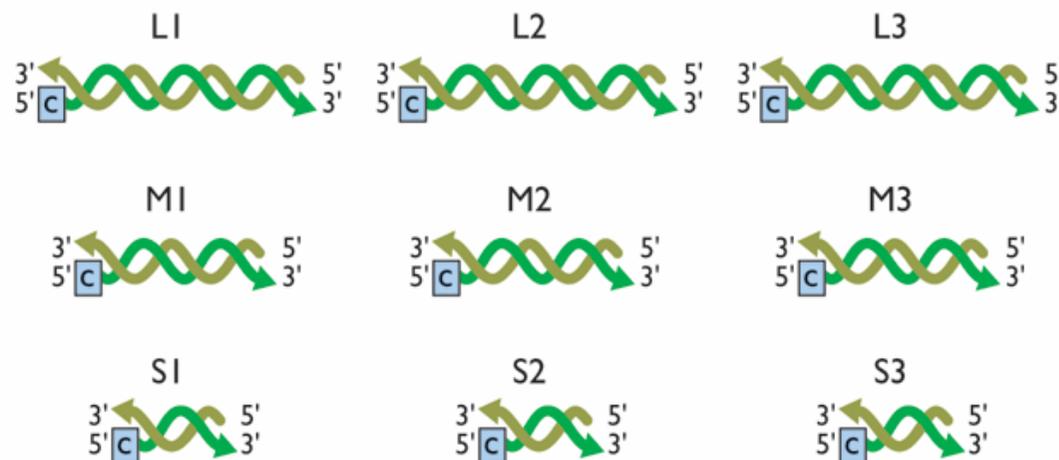
Segmentierte dsRNA: Reoviren

A dsRNA genome: *Reoviridae*



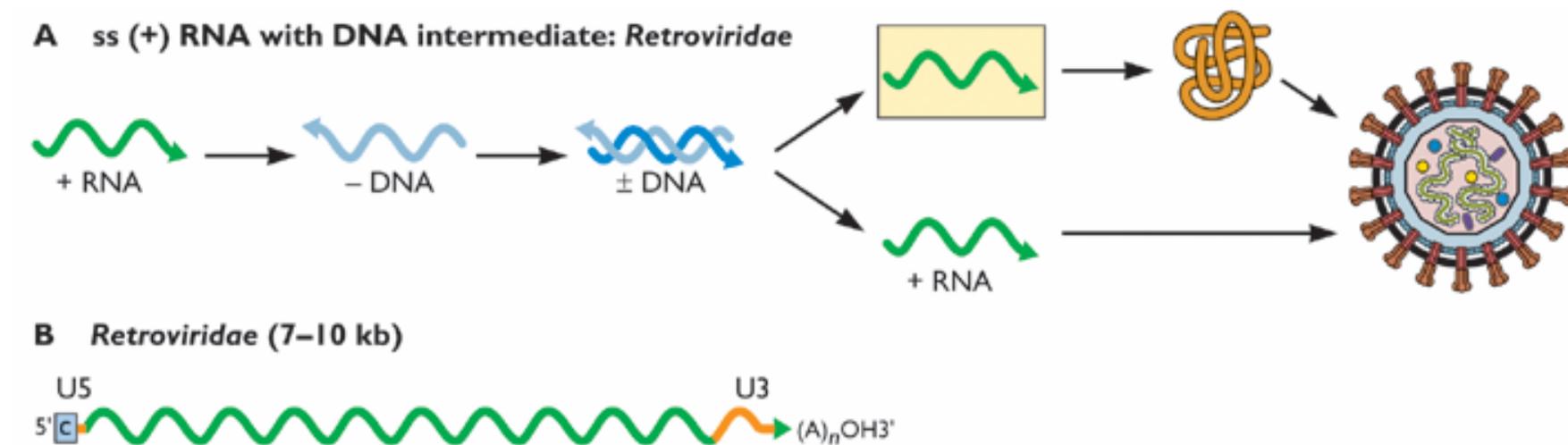
Von jedem Segment wird monocistronische mRNA abgelesen

B *Reoviridae* (19–32 kbp in 11 dsRNA segments)

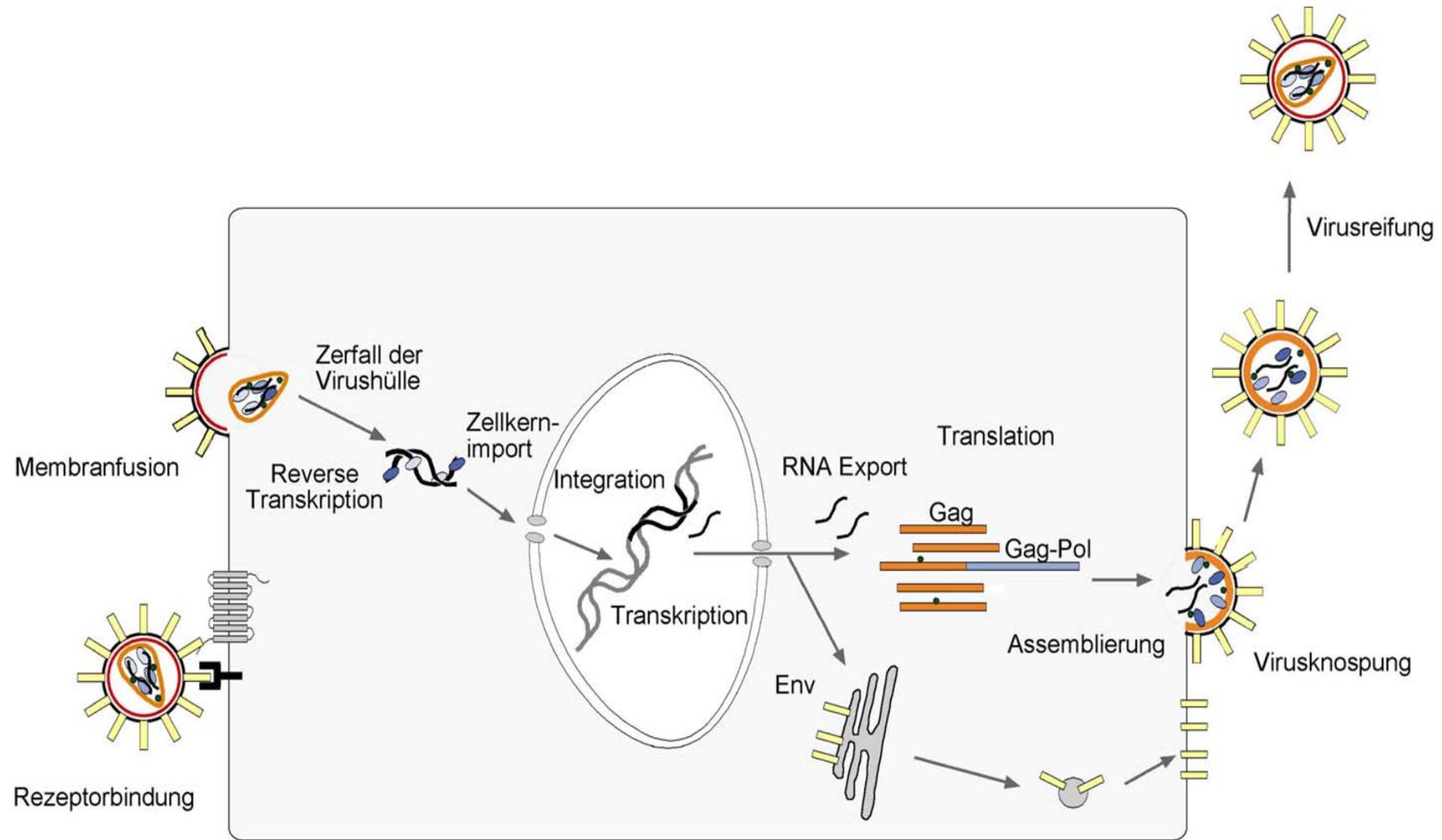


Polymerase im Partikel verpackt
Template verbleibt im Partikel

+Strang RNA mit DNA-Intermediat: Retroviren

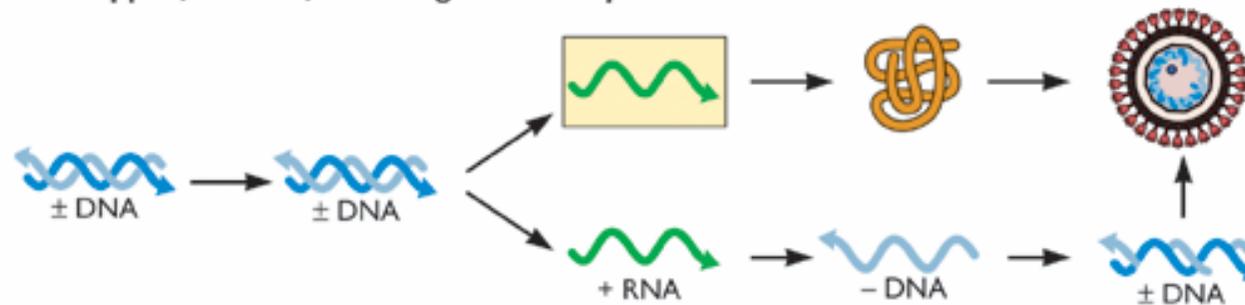


Retroviraler Replikationszyklus (HIV)

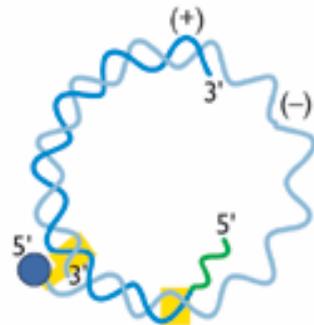


Zirkuläre unvollständige dsDNA: Hepadna

A Gapped, circular, dsDNA genome: *Hepadnaviridae*



B *Hepadnaviridae* (3.4 kbp)



Vor Transkription muss Genom von Wirtsenzymen im Zellkern vervollständigt werden

Erhöhung der Codierungskapazität: Splicing, überlappende Leseraster

