

M U N I
S C I

Infekční cyklus viru

První kontakt virus-buňka '**short distance electrostatic interactions**' s nabitými molekulami. koncentrování viru na povrchu buňky a tím lepší specifické interakce s receptory buňky

PERMISIVITA BUŇKY – definována mimojiné přítomností receptorů na membráně, které umožní vazbu viru na buněčný povrch a interakci viru s hostitelskou buňkou. V buňce musí být přítomny i další 'prerekvizity' nutné pro replikaci viru nebo musí být inducibilní (enzymy, transkripční faktory).

Replikace DNA virů převážně v jádře
(kromě např. poxvirů, iridovirů)

Replikace RNA virů převážně v
cytoplazmě (kromě např.
orthomyxovirů, retrovirů)

Fáze infekčního cyklu virů

- (1) ADSORPCE (Attachment)
- (2) PENETRACE (Entry, Penetration)
- (3) OBNAŽENÍ GENOMU (Uncoating)
- (4) STRATEGIE REPLIKACE GENOMU (Genome transcription, translation and replication=biosynthesis)
- (5) SESTAVENÍ INTAKTNÍ VIROVÉ ČÁSTICE (Assembly)
- (6) MATURACE A UVOLNĚNÍ VIR. PARTIKULÍ Z BUŇKY (genome release, Maturation and Exit)

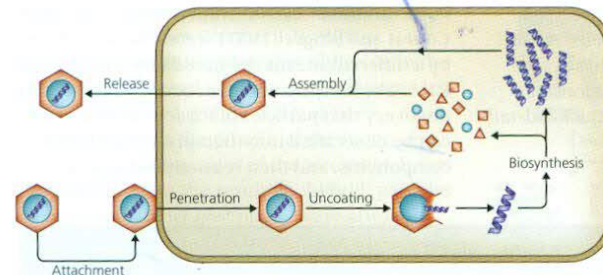
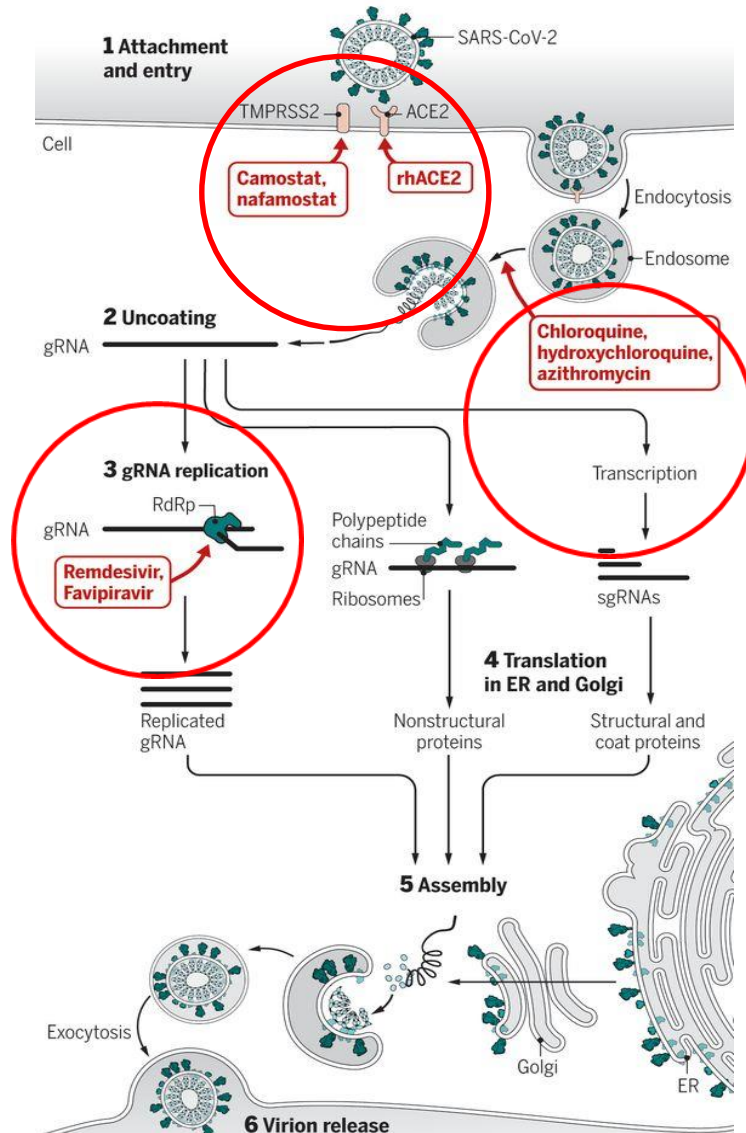


Fig. 1.2 A diagrammatic representation of the six phases common to all virus multiplication cycles. See text for details.

Possible targets in the coronavirus life cycle

This simplified coronavirus life cycle shows the processes and proteins that could be therapeutically targeted with existing drugs that have the potential to be repurposed for the treatment of COVID-19.



COVID-19, coronavirus disease 2019; ER, endoplasmic reticulum; gRNA, genomic RNA; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; rhACE2, recombinant human angiotensin-converting enzyme 2; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; sgRNA, subgenomic RNA; TMPRSS2, transmembrane protease serine 2.

GRAPHIC: V. ALTOUNIAN/SCIENCE

Proč je důležité znát jednotlivé fáze infekčního cyklu virů?

Poznáváme Achillovu patu viru...

Specifická vazba mezi hostitelskou buňkou a virem



Article

In Silico, In Vitro and *In Cellulo* Models for Monitoring SARS-CoV-2 Spike/Human ACE2 Complex, Viral Entry and Cell Fusion

Delphine Lapaillerie ^{1,†,‡}, Cathy Charlier ², Henrique S. Fernandes ³, Sergio F. Sousa ³, Paul Lesbats ^{1,†,‡}, Pierre Weigel ², Alexandre Favereaux ⁴, Véronique Guyonnet-Duperat ⁵ and Vincent Parissi ^{1,*,†,‡}

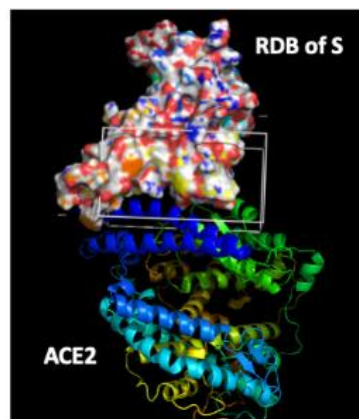
- ¹ Fundamental Microbiology and Pathogenicity Lab (MFP), UMR 5234 CNRS-University of Bordeaux, SFR TransBioMed, 33076 Bordeaux, France; delphine.lapaillerie@u-bordeaux.fr (D.L.); paul.lesbats@u-bordeaux.fr (P.L.)
- ² IMPACT Platform “Interactions Moléculaires Puces Activités”, UMR CNRS 6286 UFIP, Université de Nantes, F-44000 Nantes, France; cathy.charlier@univ-nantes.fr (C.C.); pierre.weigel@univ-nantes.fr (P.W.)
- ³ LICIBIO@REQUIMTE, BioSIM -Departamento de Biomedicina, Faculdade de Medicina da Universidade do

ACE2-
RBD

Virus
Spillover

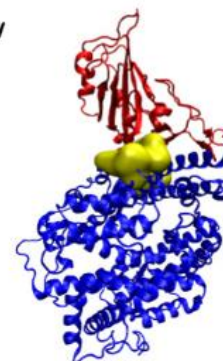
ch
up
Citation:
Fernand

A.

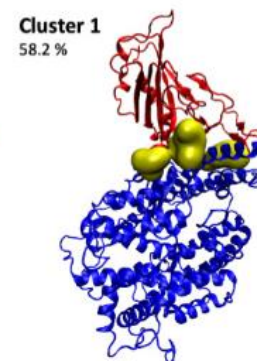


B.

X-ray



Cluster 3
6.7%



Cluster 4
6.9%

RBD of S ACE2 Druggable Pocket

Cluster 1
58.2%

Cluster 2
22.1%

Cluster 5
4.0%

Přichycení viru k buňce (1/2)

- zpočátku vazba **slabá-REVERZIBILNÍ-elektrostatický charakter** (pH, iontová síla, hydrofóbní interakce, VW síly) - nemusí dojít k infekci
- dále připojení virionu pomocí vazebných míst (**VYSOCE SPECIFICKÝCH**) na receptory hostitelské buňky (**většinou glykoproteiny, cukry, lipidy**)
- proces adsorpce typický pro živočišné viry a bakteriofágy (**nevyskytuje se zpravidla u rostlin**)
- více receptorů-silnější vazby-ireverzibilita
- **interakci viru s buňkou ovlivňuje např. pH, iontová síla, přítomnost séra**
- některé viry využívají více receptorů nutných k infekci host. buňky (např. HIV heparansulfát-CD4-CXCR4/CCR5 nebo virus hepatitidy C je nutná součinnost 4 molekul exprimovaných současně na infikované buňce (CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN))
- různé viry mohou využívat stejný receptor (adenoviry a coxsackie viry)
- viry ze stejné čeledi se mohou vázat k různým receptorům (rhinoviry, retroviry)

přítomnost resp. absence receptorů určuje tropismus virů a je rozhodující pro patogenezi onemocnění (epitel respiračního nebo zažívacího traktu, hepatocyty, buňky imunitního systému, buňky CNS); záleží také na ontogenezi (coxsackieviry infikují sající myšky, dospělé nikoliv), poliovirus infikuje buňky primátů, HIV nasedá na lidské CD4 receptory T lymfocytů, naopak chřipka infikuje množství různých hostitelů...

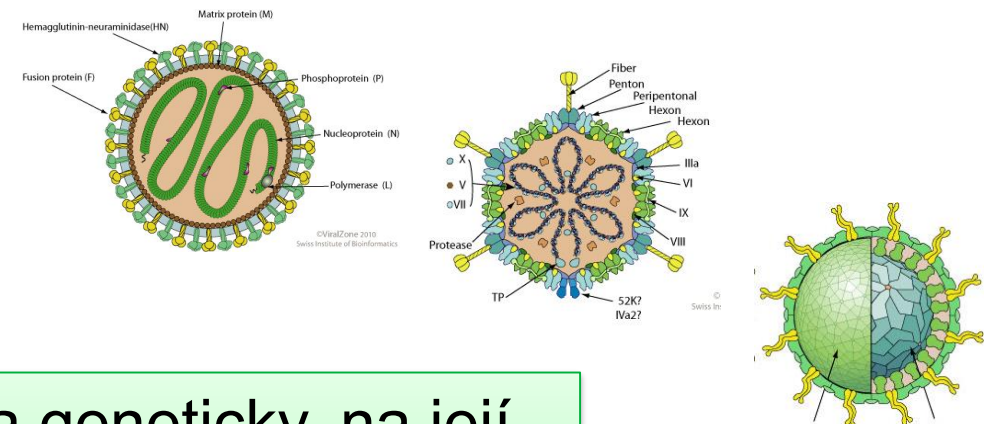
Přichycení viru k buňce (2/2)

(1) VAZEBNÁ MÍSTA VIRIONŮ – většinou jednoduché nebo složené bílkoviny (glykoproteiny)

Neobalené viry – na specializovaných strukturách ('fibers', 'knobs'-adenoviry, 'spikes'-rotaviry)

Obalené viry – glykoproteiny v obalu virové částice

např. adsorpce na erythrocyty (HEMAGLUTINACE=virion se může vázat svými výběžky na několik molekul erythrocytů-aglutinace-sérologie



Přestože adsorpce viru na buňku je podmíněna geneticky, na její účinnost má vliv řada vnějších faktorů (např. fyziologický stav buňky, přítomnost a koncentrace iontů (Mg, Ca, Na, K) nebo kofaktorů (např. L-tryptofan)

2) VAZEBNÁ MÍSTA HOSTITELSKÝCH BUNĚK – glykoproteiny, glykolipidy, cukry

lipoproteiny – pro vazbu enterovirů, herpesvirů nebo arbovirů

kyselina sialová – pro vazbu orthomyxovirů, paramyxovirů, rotavirů a reovirů

CD4 – lentiviry (HIV-1,2)

MHC I, MHC II – togaviry, herpesviry

Receptor pro acetylcholin-rhabdoviry

Aminopeptidáza N - koronaviry

Integríny – adenoviry, pikornaviry

Heparansulfát proteoglykan – pikornaviry, virus dengue

Receptor CR2 pro komplement - herpesviry (EB virus)

Receptor CD155 – receptor pro poliovirus (jen u člověka a primátů)

Globosid (glykosfingolipid, P antigen krevní skupiny, progenitorové erytroidní buňky, buňky endotelu) – parvovirus B19

IgA – virus hepatitidy B

Buněčné receptory nejsou primárně určené pro interakci s viry, spíše viry si vytvořily molekuly schopné tyto receptory využívat pro infekci buňky

Penetrace viru do buňky

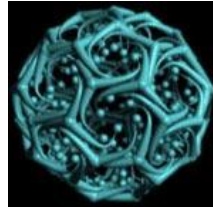
= vstup virionu do buňky

na rozdíl od přichycení (adsorpce) penetrace vyžaduje energii – vyžaduje metabolicky aktivní buňku

(1) **ENDOCYTÓZA** – nejčastější způsob pronikání viru do buňky

vchlipování se do vezikul, invaginace plazmatické membrány (uzavření virionů,

hlavně u neobalených virů



Clathrin-mediated

Caveolin-mediated

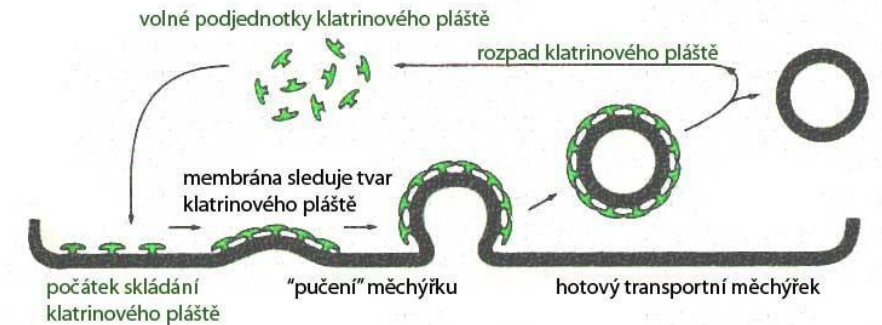
Vysvětlení:

-snížení rizika rozpoznání imunitním systémem host. buňky

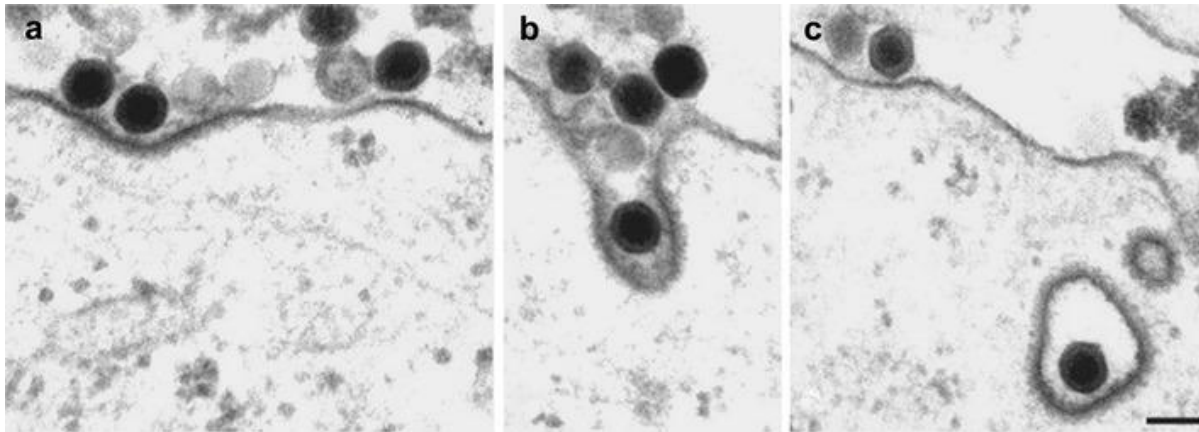
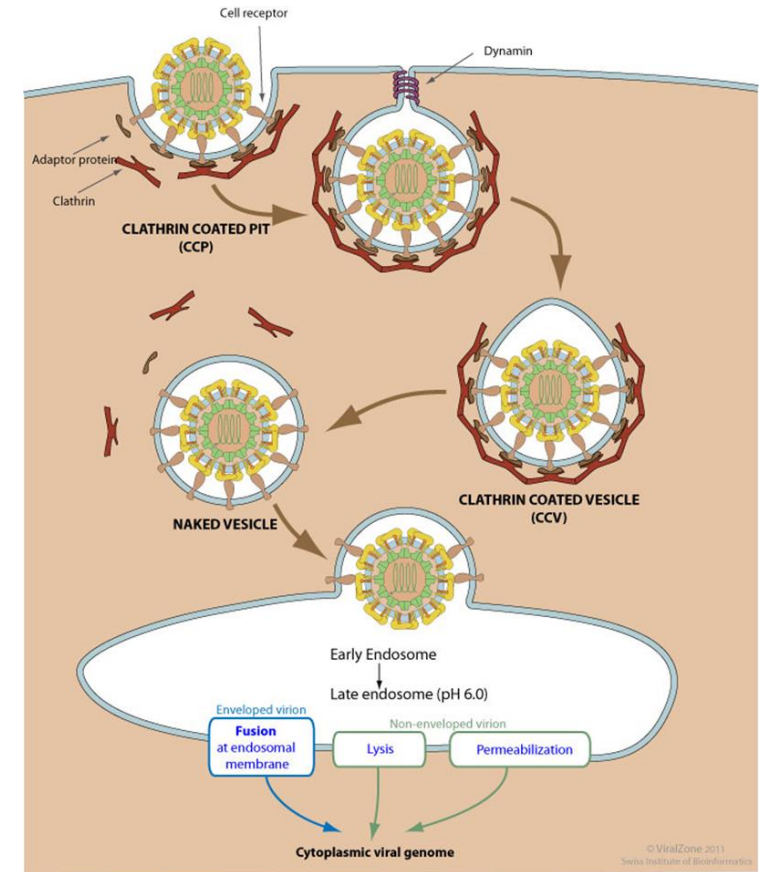
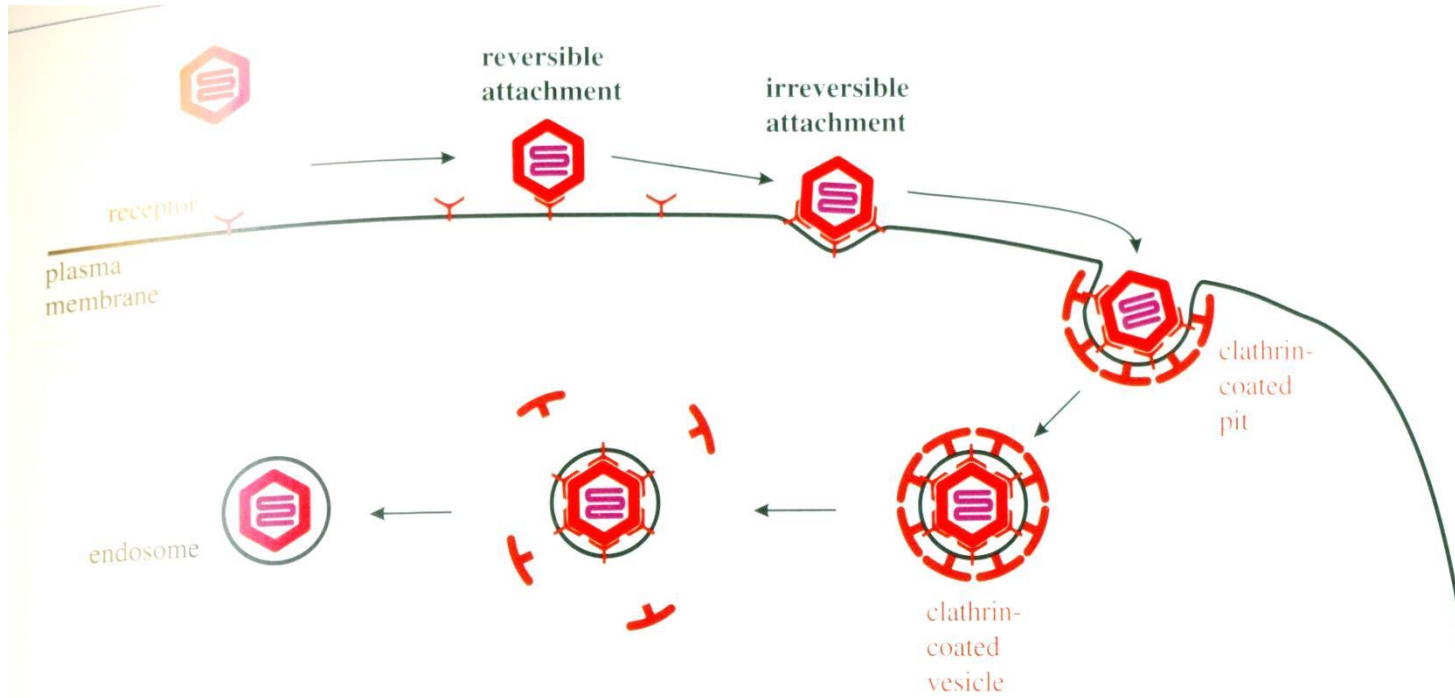
-nízké pH transport. vezikul – uvolnění virového genomu a transport

na místo replikace

VZNIK MĚCHÝŘKŮ POMOCÍ KLATRINOVÉHO OPLÁŠTOVÁNÍ



Vstup do buňky – neobalené viry ('naked viruses')



Carter and Saunders, 2013

Příklad endocytózy u neobalených virů - adenoviry

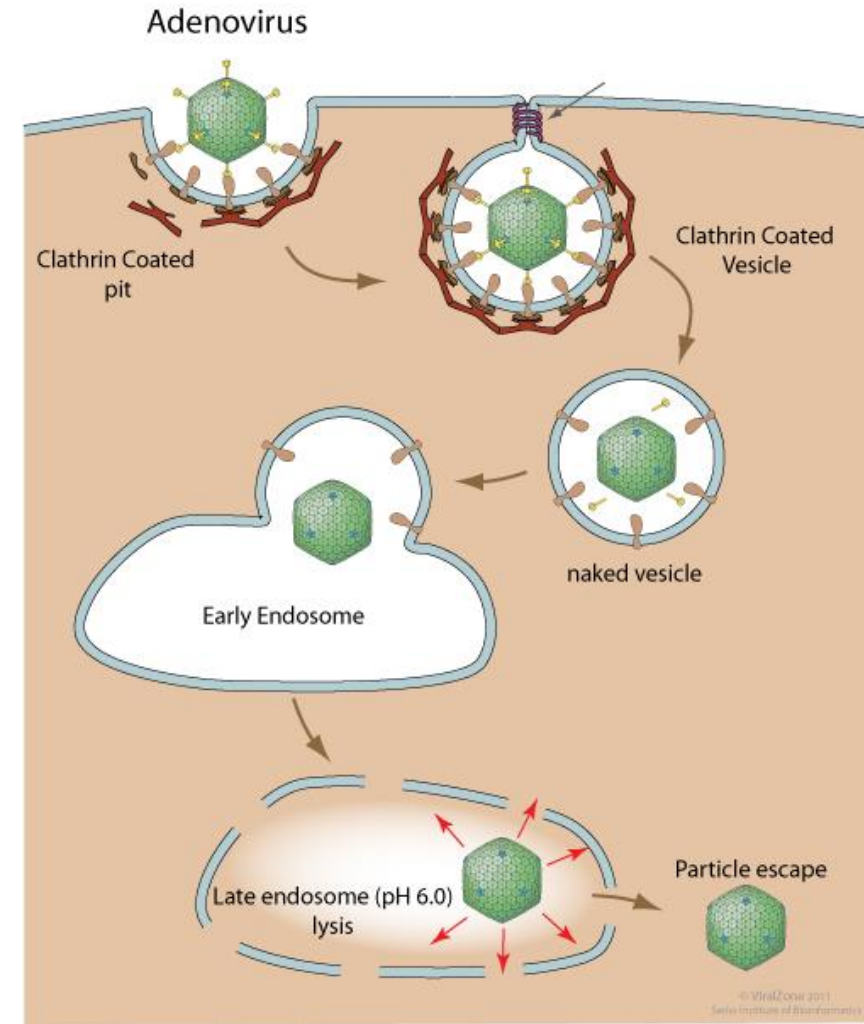
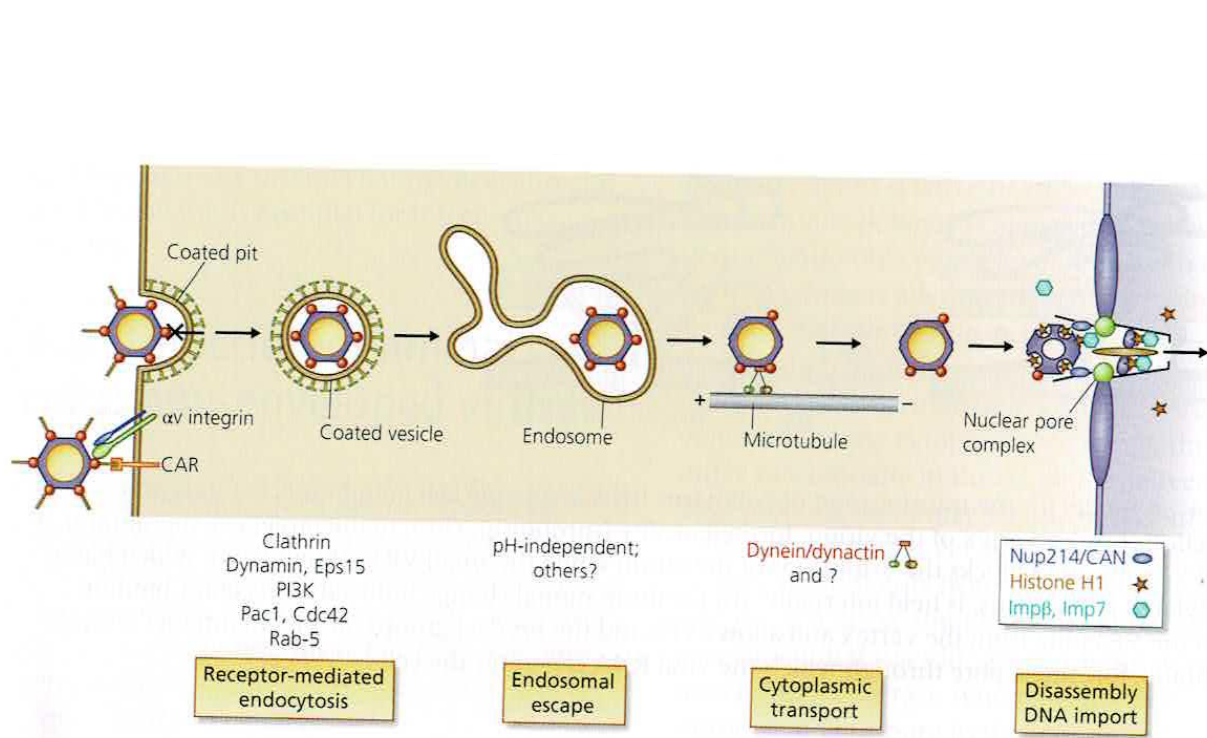
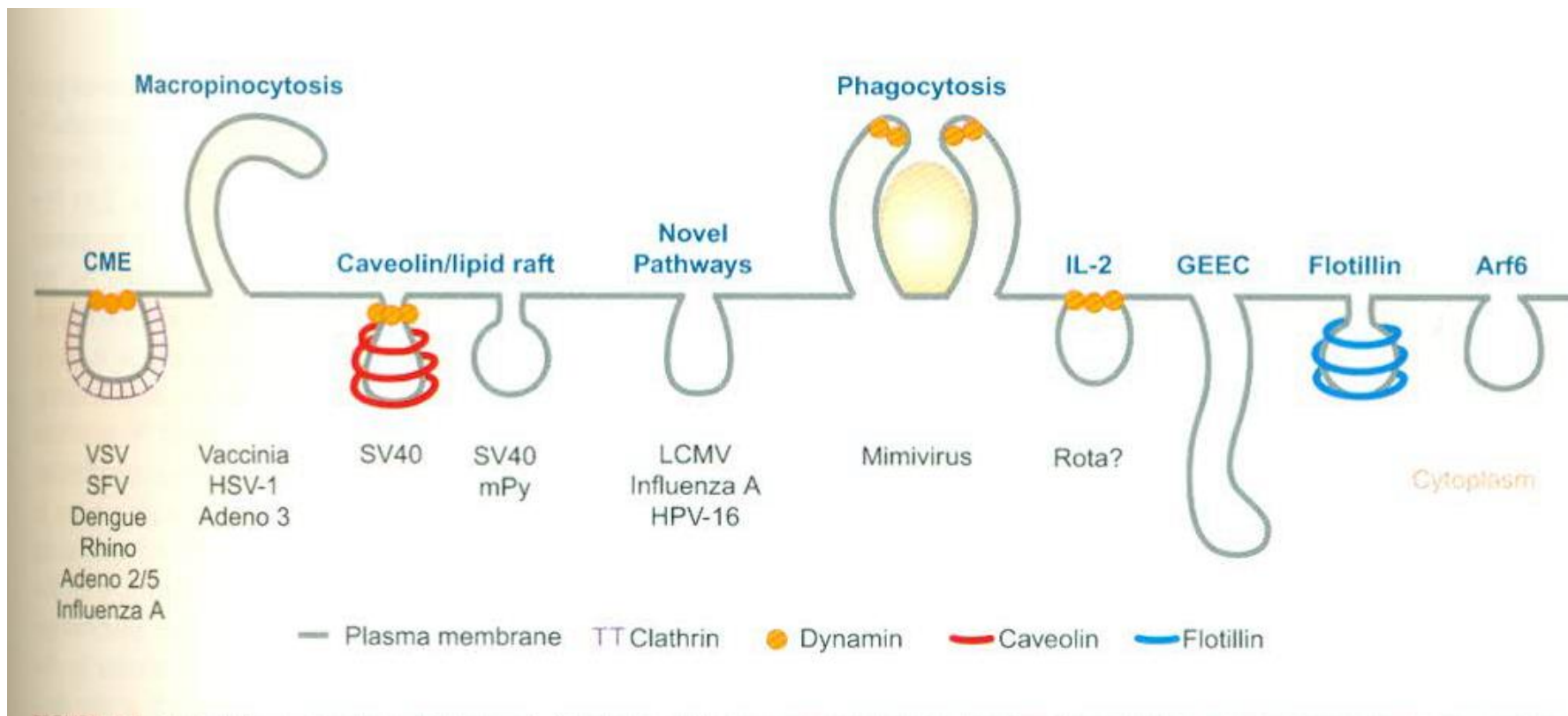


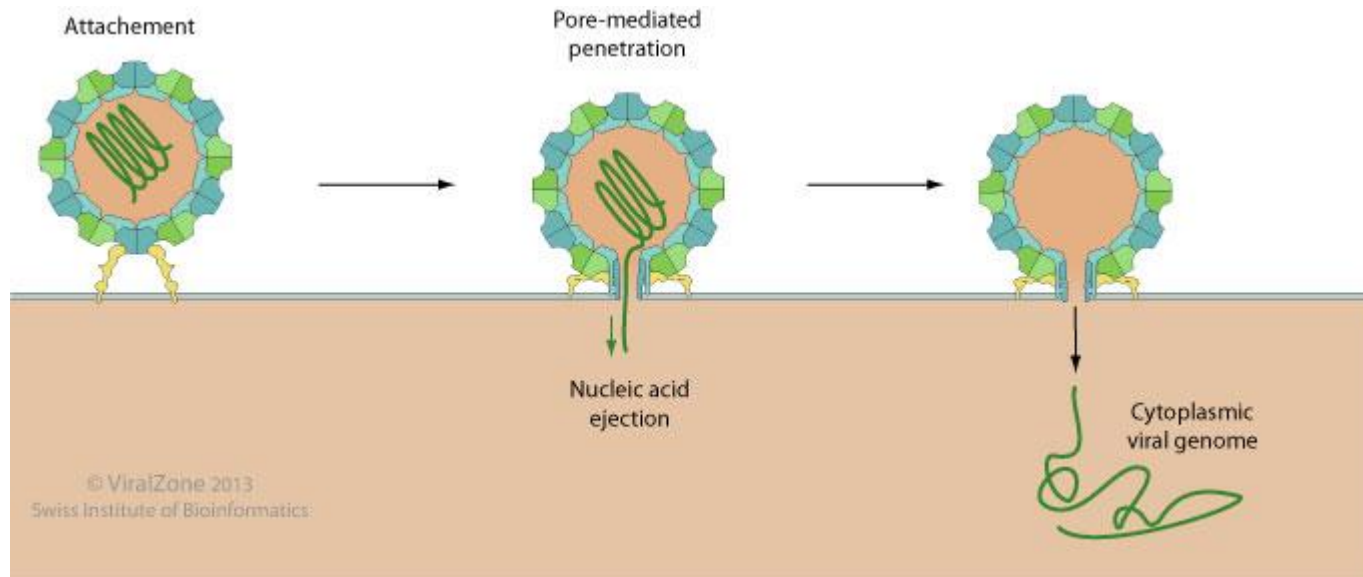
Fig. 6.5 The process of adenovirus entry into cells (see text for details). Beneath the diagram are indicated some of the host factors involved at each stage. (Reproduced with permission from Meier, O. and Greber, U. *Journal of Gene Medicine* 5, 452–462, © 2003 John Wiley & Sons.)

Mechanismy endocytózy u virů infikujících živočišné buňky

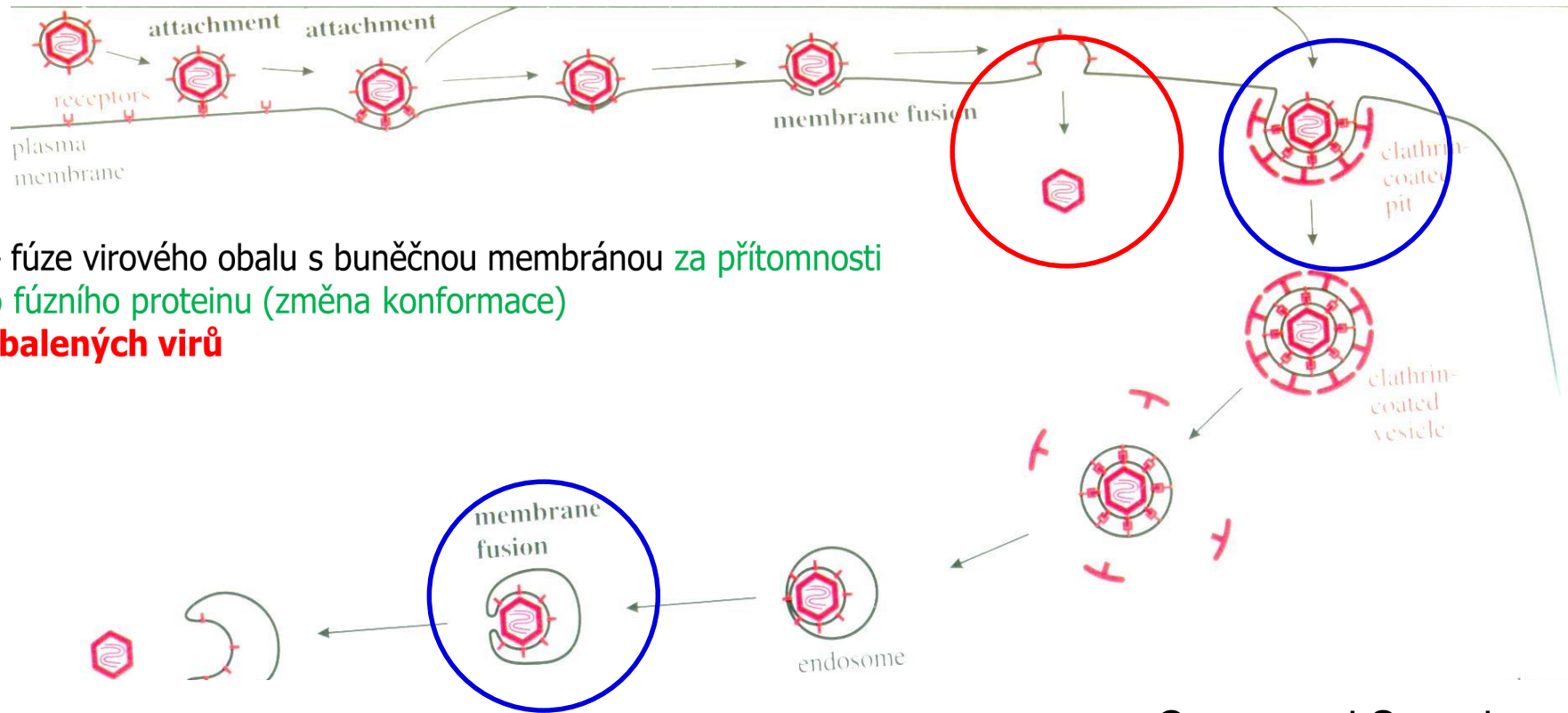


MacLachlan,
Dubovi, 2011

Ojediněle průchod **přímou penetrací** (direct penetration) v cytolazmatické membráně (reoviry) nebo **póry v cyt. mem.** (pore-mediated penetration) u pikornavirů



Vstup do buňky – obalené viry ('enveloped viruses')



(2) FÚZE – fúze virového obalu s buněčnou membránou za přítomnosti specifického fúzního proteinu (změna konformace)
hlavně u obalených virů

Carter and Saunders, 2013

2 cesty vstupu do buňky:

1. fúze obalu viru s plazmatickou membránou (HIV)
2. endocytóza následovaná fúzí obalu viru s membránou endozómu (influenza)

Příklad fúze u obalených virů - HIV

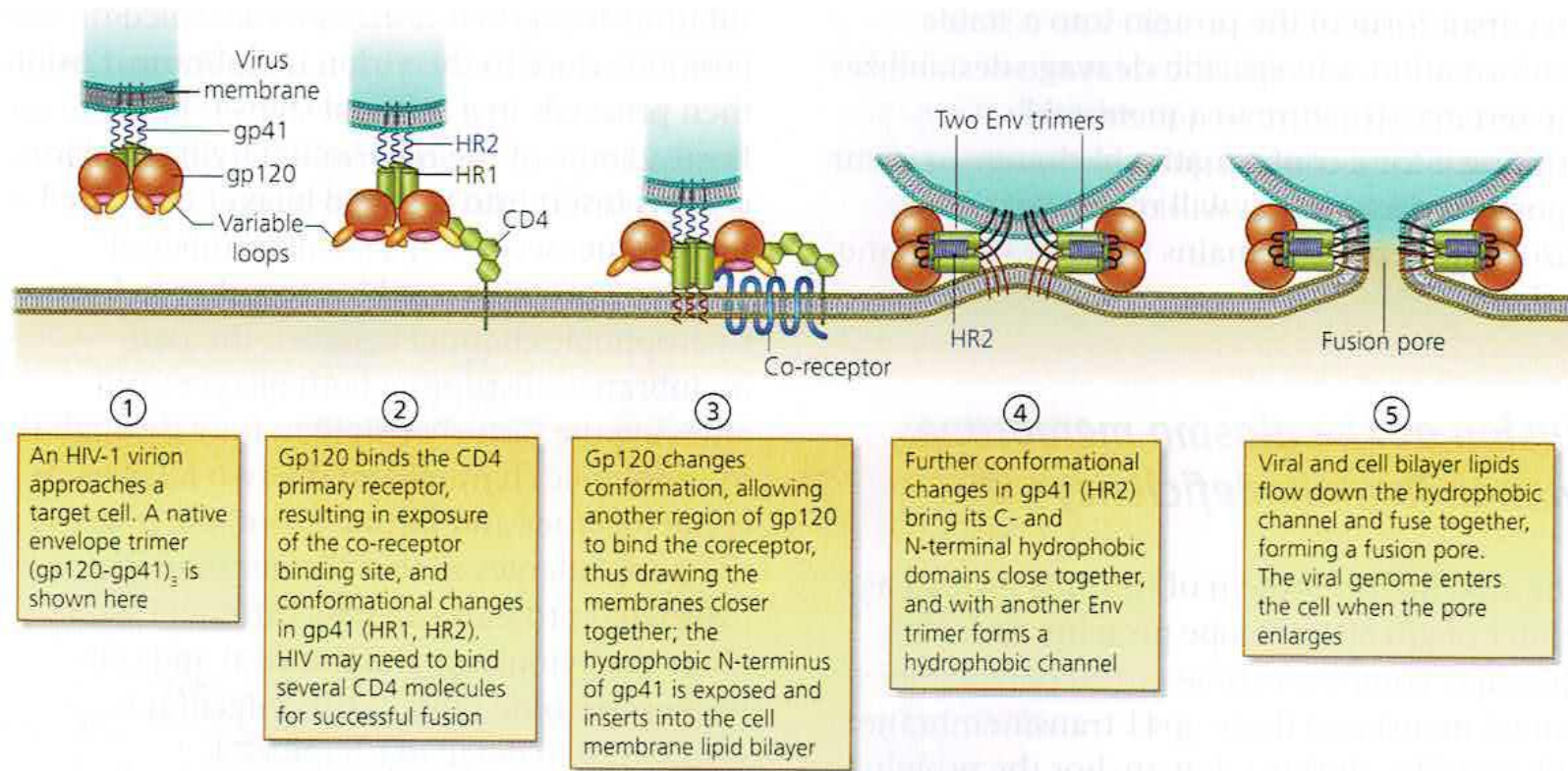
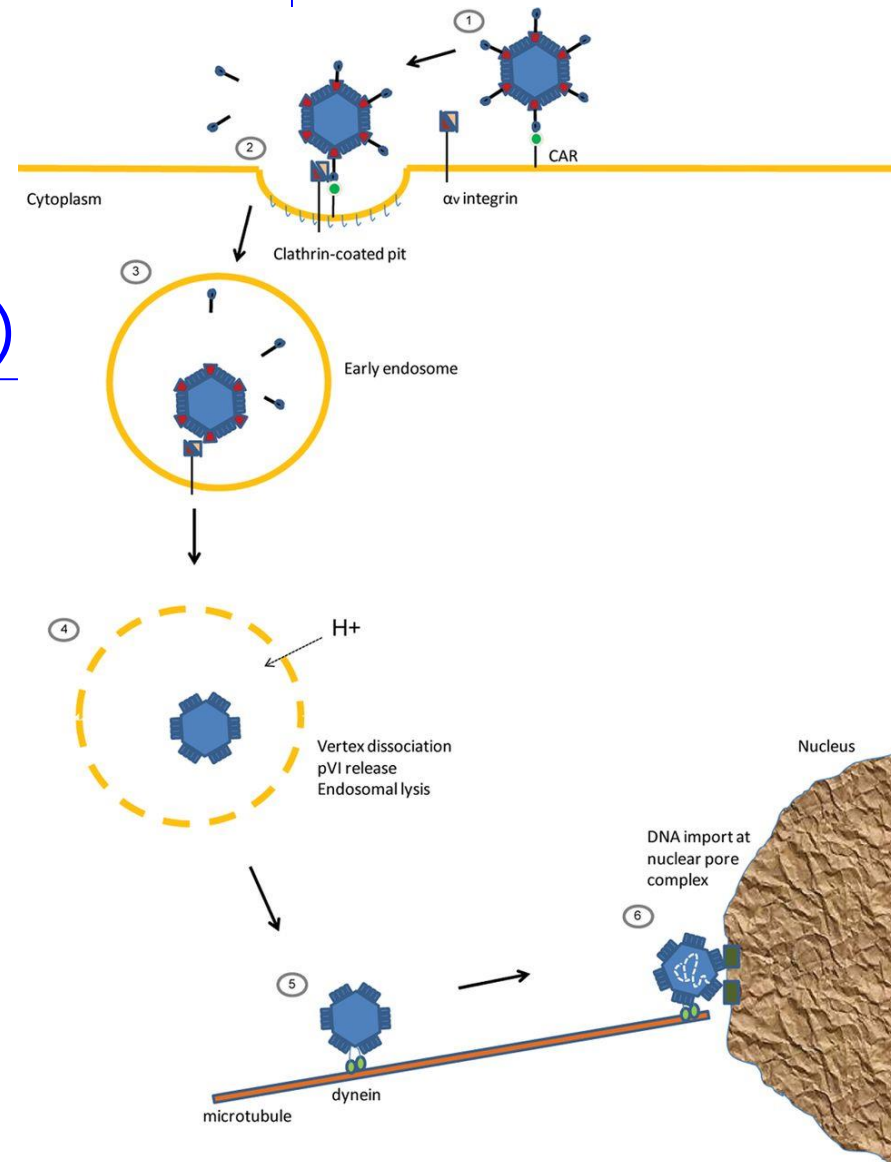
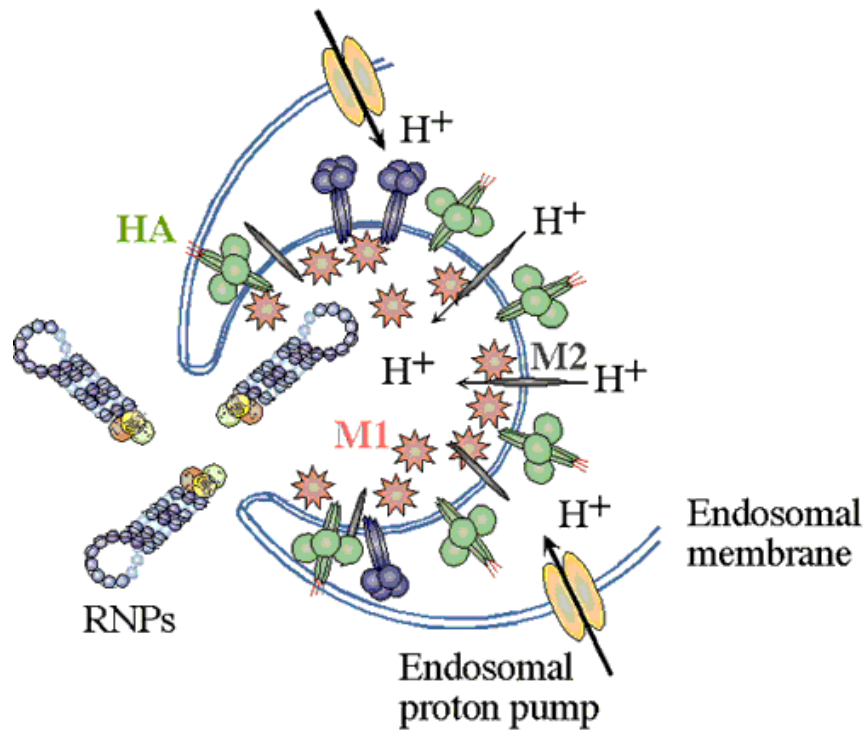


Fig. 6.2 Model for the fusion entry of the genome of an HIV-1 virion into a target cell. (Adapted from Moore, J. and Doms, R. The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100, 10598. © 2003 National Academy of Sciences, USA.)

Uvolnění viru z endozómu

Acid-trigger

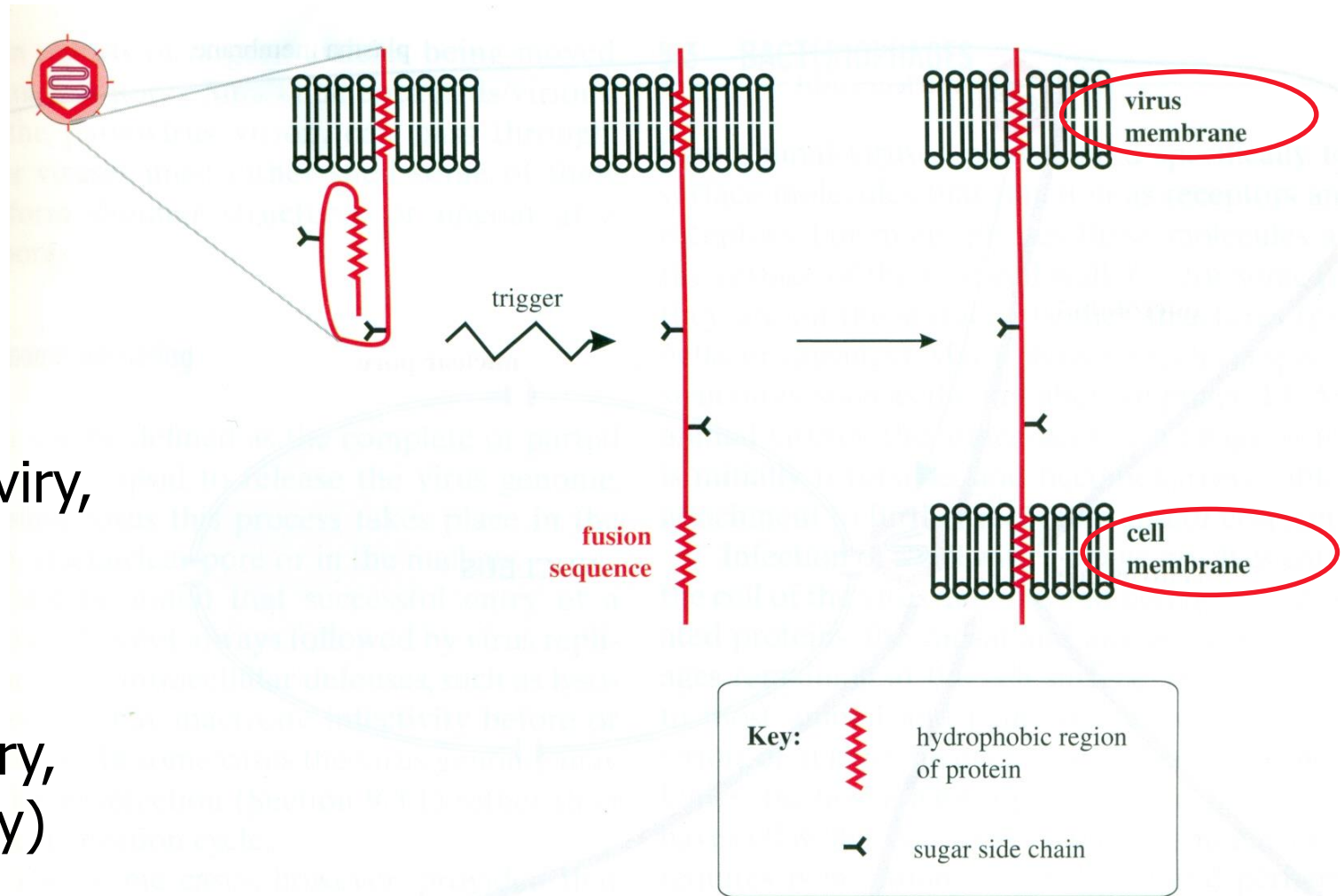
- spojení s lysozomem
- protonové pumpy (ATP/ADP)



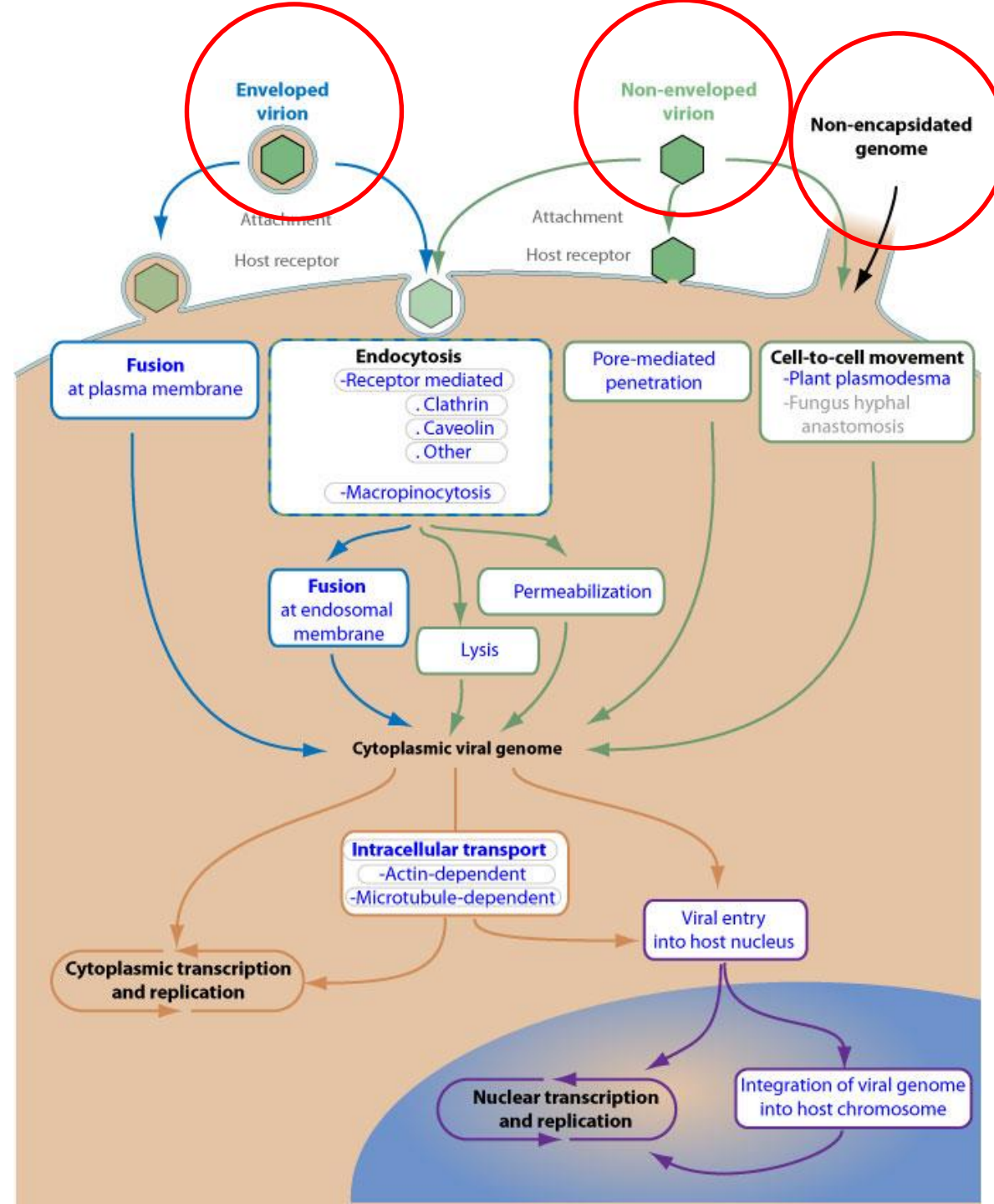
Fúzní protein u obalených virů

pH-independent fusion (herpesvirý, HIV, paramyxoviry, poliovirus)

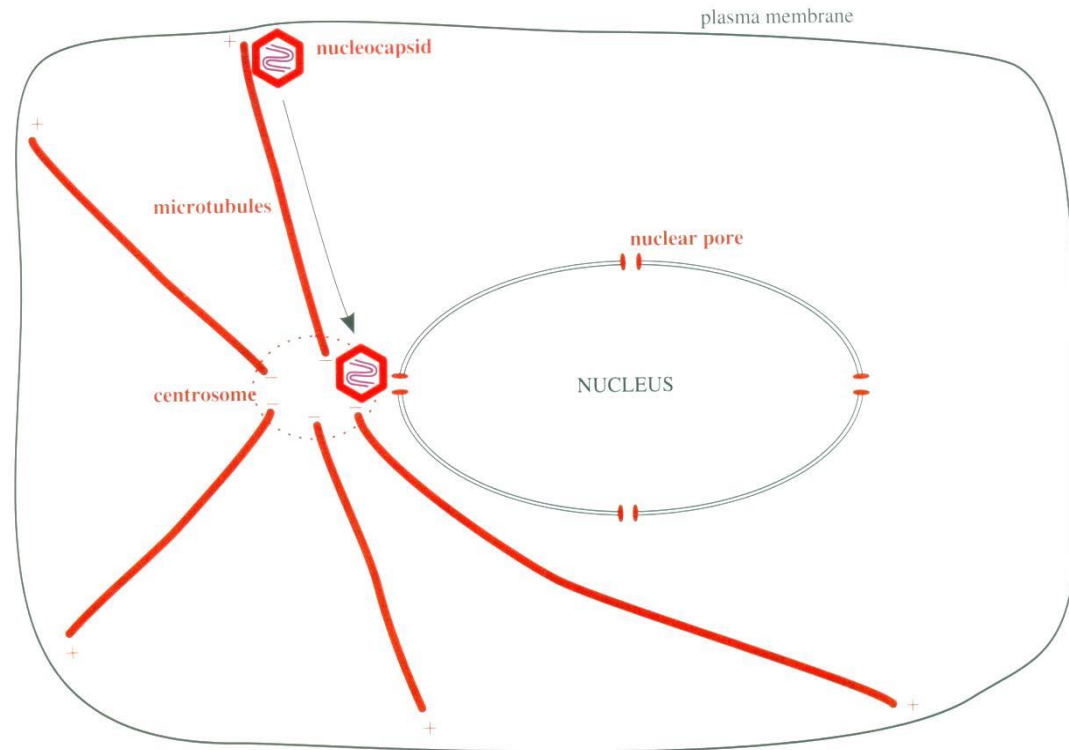
acid-trigger fusion
(orthomyxoviry, togaviry, flaviviry, bunyaviry, adenoviry, rhabdoviry)



Shrnutí (od penetrace až k replikaci...)

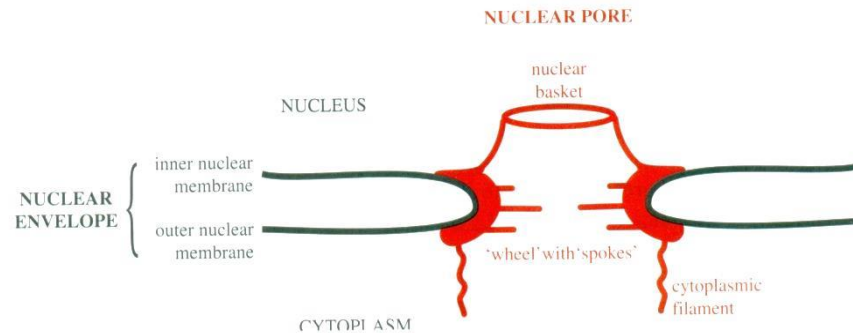


Transport virové částice uvnitř hostitelské buňky



herpesviry
adenoviry
parvoviry
retroviry

Figure 5.5 Transport of a nucleocapsid along a microtubule. The nucleocapsid is transported from the plus end of a microtubule near the plasma membrane, to the centrosome, which is located close to the nucleus.



Carter and Saunders, 2013

Obnažení genomu

poslední část penetrace je uvolnění virového genomu (**UNCOATING**)

jde o částečné (tvorba pórů) nebo úplné rozrušení kapsidu a uvolnění genomu do buňky

(u živ. virů se tak děje v cytoplazmě, nebo na jaderném póru nebo v jádře)

kyselé prostředí endozómů způsobí konformační změny na kapsidu, výsledkem je tvorba pórů a následné uvolnění do cytoplazmy (např. pikornaviry)

kapsidy obsahují proteinové sekvence, které jsou zodpovědné za přichycení ke strukturám cytoskeletu a zabezpečí transport do blízkosti jádra-uvolnění v blízkosti jaderných pórů-nahé nukleokapsidy nebo NK putují do jádra

'The mechanisms by which virions, or their genomes, are released from endosomes are not fully understood.'

Co se děje po vstupu do buňky?

Viriony vstupující do buňky ovlivňují buněčné funkce

(1) Inhibice syntézy buněčné DNA

interakce virových proteinů s buněčnou DNA (narušení regulačních mechanismů)

(2) Inhibice syntézy buněčné RNA

působení virového inhibitoru na buněčnou RNA (potlačení transkripce RNA v buňce)

(3) Inhibice syntézy buněčných bílkovin

potlačení tvorby NK (rozpad ribozómů) nebo působením specifických virových inhibitorů

Zahájení syntézy virové mRNA (transkripce) a bílkovin (translace), replikace

Alternativa:

NEBO obranné mechanismy hostitele (např. lysozym) inaktivují virus NEBO
dojde k latentní infekci místo zahájení replikačních pochodů

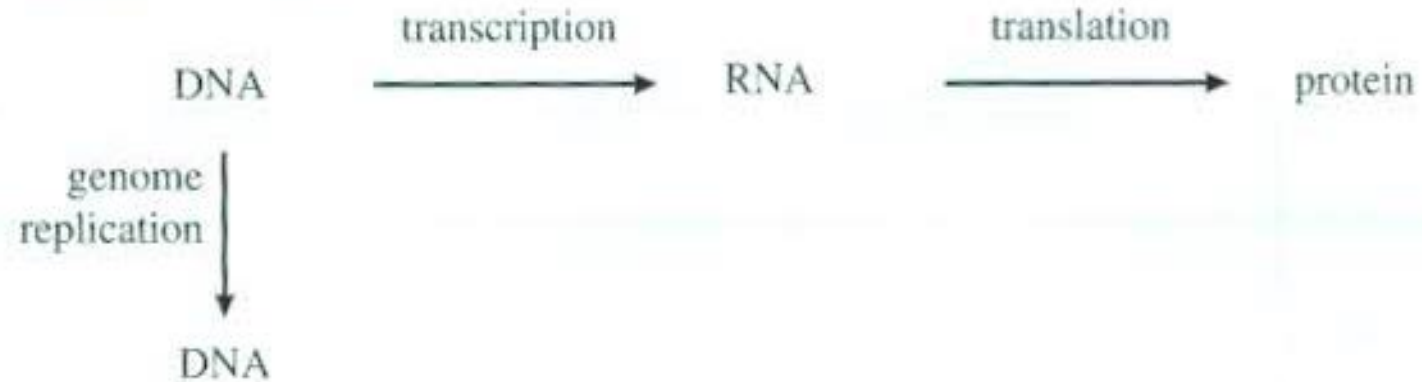
Life cycle - influenza (animation)

<https://www.xvivo.net/animation/influenza-a/>

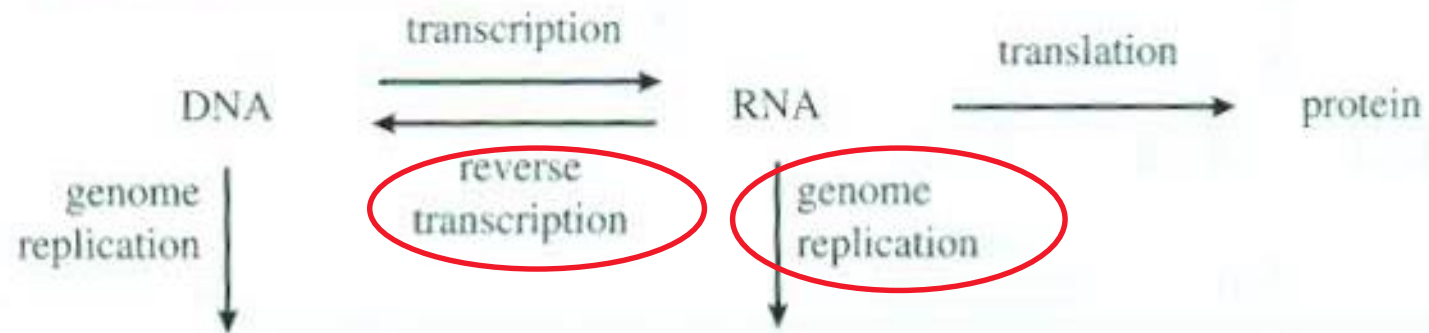
Pěkné ilustrační
video

Centrální dogma molekulární biologie včetně jeho modifikace

(a) Central Dogma

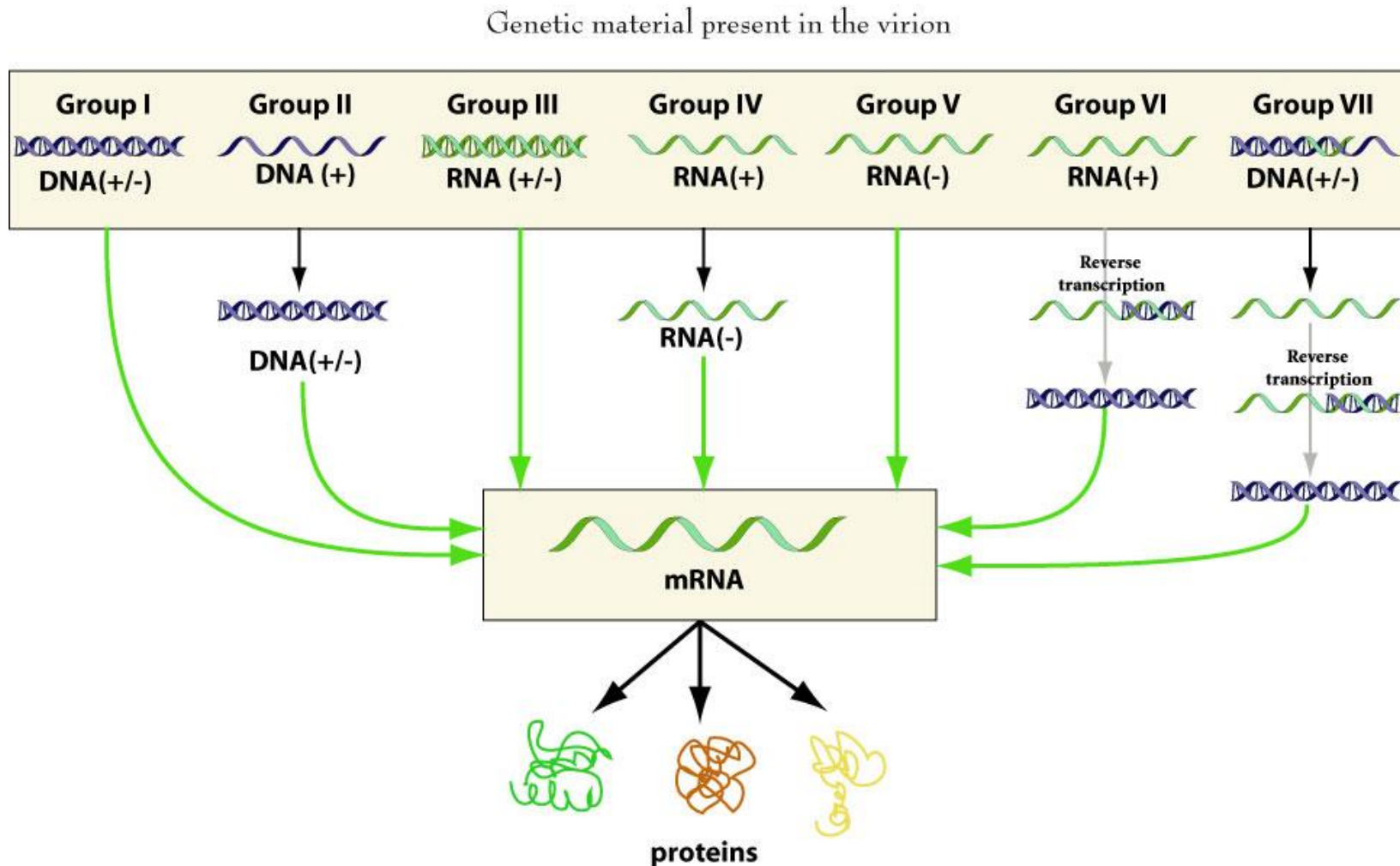


(b) Modified Central Dogma



Strategie replikace genomu viru

ústřední role mRNA klasifikace dle Baltimora



Syntéza a intracelulární transport molekul

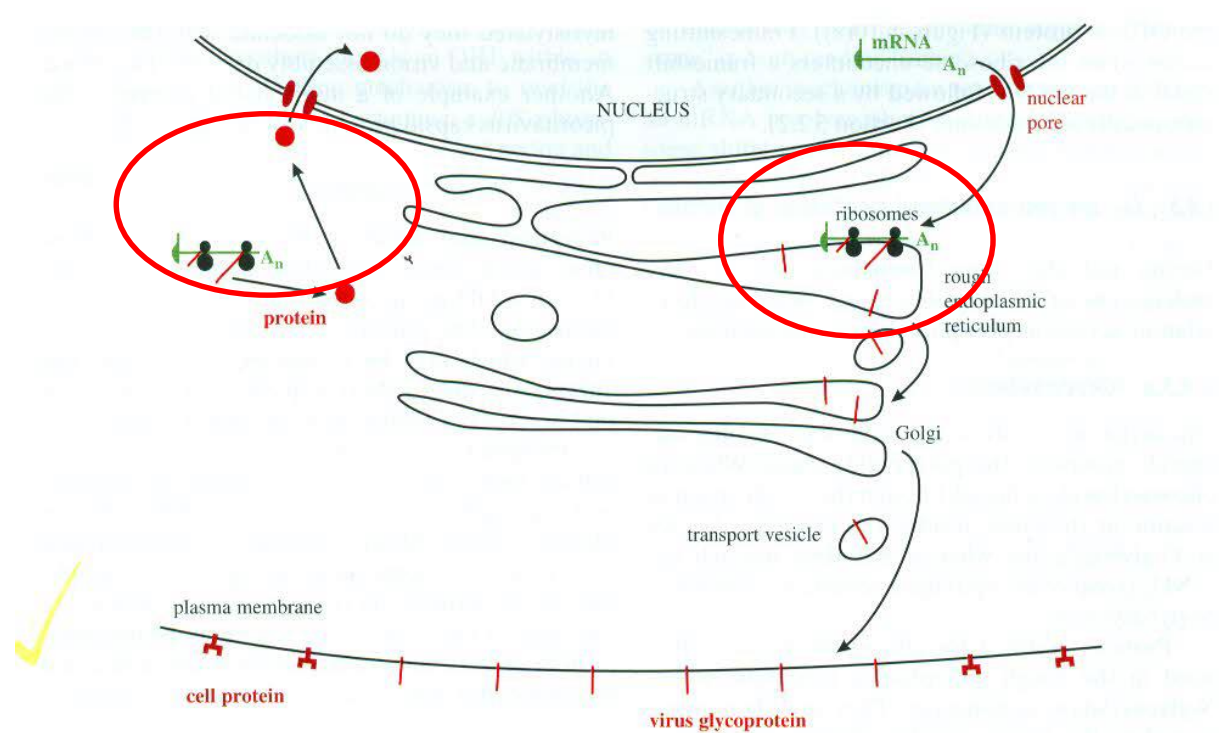


Figure 6.11 Synthesis and intracellular transport of molecules. Some proteins translated on free ribosomes are transported via nuclear pores to the nucleus. Some proteins translated in the rough endoplasmic reticulum are transported via the Golgi complex to the plasma membrane.

'Viral factories' nebo 'Viral replication complexes'

- vnitřní buněčné kompartmenty, které **zvyšují efektivitu replikace** a **sestavování virové částice** (organizace pochodů replikace a sestavování virionu)
- skrývají virus před obrannými mechanizmy hostitelské buňky (před degradací)
- umístění v jádře, perinukleárním prostoru nebo cytoplazmě
- formování viral factories vyžaduje množství komplexních interakcí a zapojení řady signálních drah

Cytoplazmatické:

Viroplazma (cyt. inkluze-poxviry, asfaviry, iridoviry, reoviry)

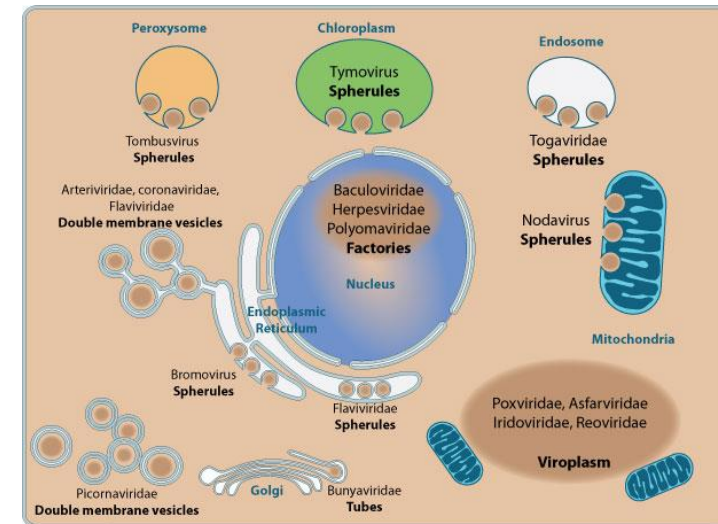
Sféruły (mem. invaginace-endozomy) (**togaviry**)

Vezikuly s dvojitou membránou

(mem. struktury ER a GA) (**pikornaviry, koronaviry, flaviviry, bunyaviry-GA**)

součástí je i cytoskelet

Jaderné: replikační kompartmenty, bakuloviry-virogenic stroma bakuloviry, herpesviry, polyomaviry



[Viruses](#). 2012 Oct; 4(10): 2218–2232.

PMCID: PMC3497049

Published online 2012 Oct 17. doi: [10.3390/v4102218](https://doi.org/10.3390/v4102218)

PMID: [23202461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202461/)

Virus-Induced Aggregates in Infected Cells

[Adi Moshe](#) and [Rena Gorovits](#)*

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#)

Jsou jedinečné -
diagnostický znak

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Abstract

Go to: 

During infection, many viruses induce cellular remodeling, resulting in the formation of insoluble aggregates/inclusions, usually containing viral structural proteins. Identification of aggregates has become a useful diagnostic tool for certain viral infections. There is wide variety of viral aggregates, which differ by their location, size, content and putative function. The role of aggregation in the context of a specific virus is often poorly understood, especially in the case of plant viruses. The aggregates are utilized by viruses to house a large complex of proteins of both viral and host origin to promote virus replication, translation, intra- and intercellular transportation. Aggregated structures may protect viral functional complexes from the cellular degradation machinery. Alternatively, the activation of host defense mechanisms may involve sequestration of virus components in aggregates, followed by their neutralization as toxic for the host cell. The diversity of virus-induced aggregates in mammalian and plant cells is the subject of this review.

Keywords: plant virus, mammalian virus, aggregation

Výstavba nových částic

KOMPLETACE (SELF-ASSEMBLY) NOVÝCH VIRIONŮ

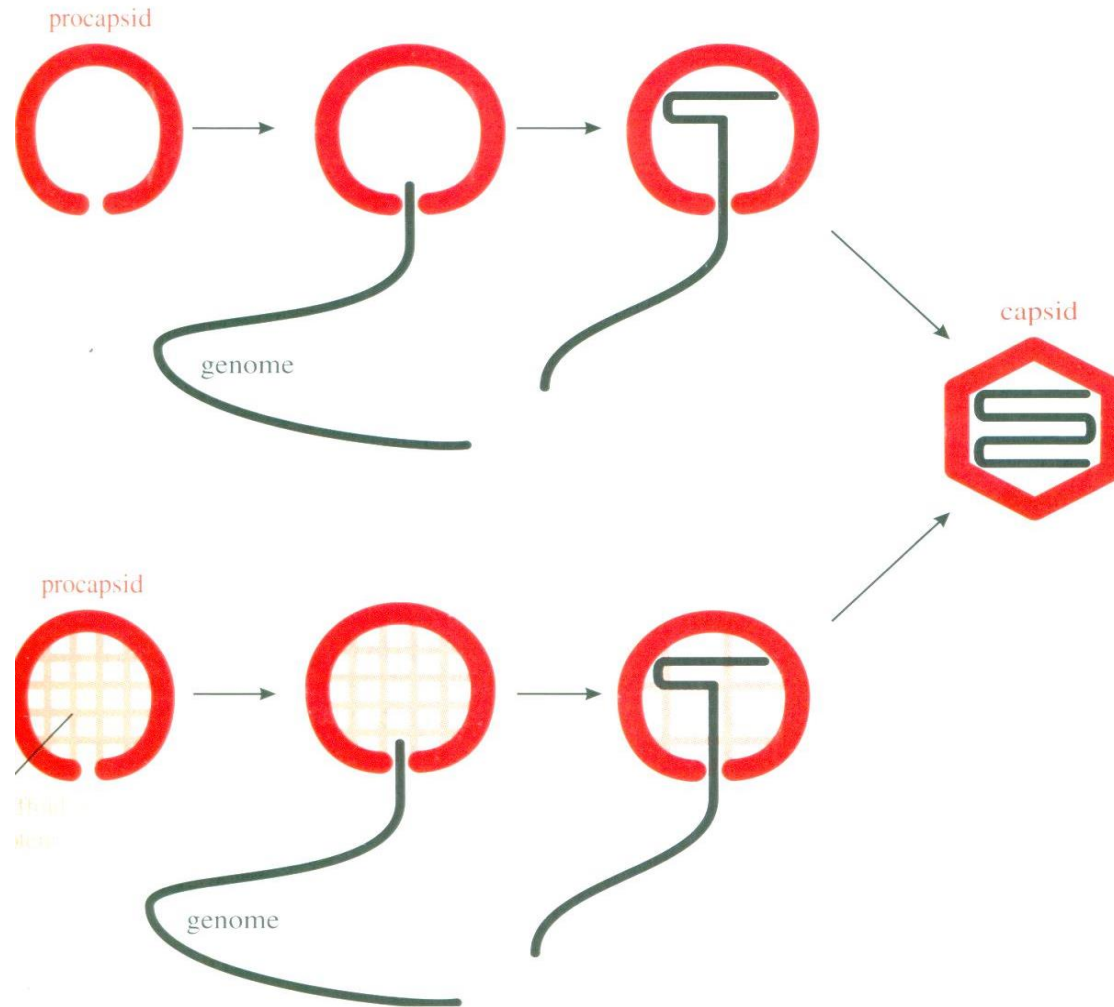
- ze složek virionů syntetizovaných **de novo**
- *in vitro* demonstrováno např. u viru mozaiky tabáku, viru Sendai, rhabdovirů
- **komponenty se tvoří na místech výstavby (uplatnění transportních mechanismů-systém buněčných cisteren (GA, ER) pohybujících se v cytoplazmě pomocí cytoskeletu)**
 - transport polarizovaný (hromadění složek virionů v jedné části mem.)
 - transport nepolarizovaný (po celé bun. mem.)

Biosyntéza virových obalových glykoproteinů (obalené viry)

1. translace a inserce proteinů do membrány
2. skladba a oligomerizace polypeptidů
3. třídění a modifikace syntetizovaných proteinů při transportu k povrchu buňky
4. včlenění proteinů do virionu

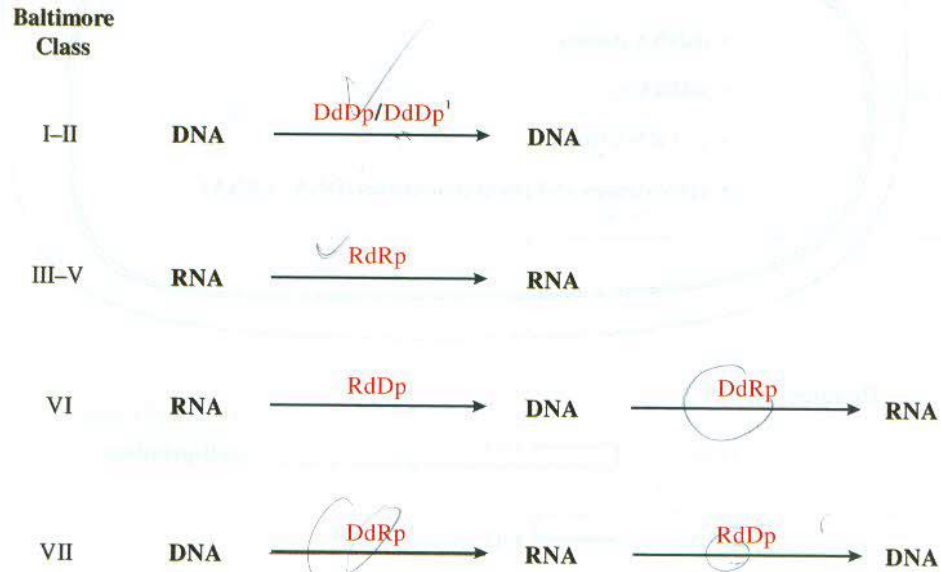
Bílkovinné podjednotky se k sobě spojují
AUTOAGREGACÍ
(energeticky výhodný proces s definovanou symetrií a stabilitou)

Sestavování nových virových částic (**'genome packaging'**)



Packaging signal
= virový protein
rozeznávající
specifickou sekvenci
virové DNA/RNA, která
má být zabalena

Genome replication



Virus enzymes

DNA $\xrightarrow{\text{DNA-dependent DNA polymerase}}$ DNA

RNA $\xrightarrow{\text{RNA-dependent RNA polymerase}}$ RNA

RNA $\xrightarrow{\text{RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase)}}$ DNA

Cell enzymes

DNA $\xrightarrow{\text{DNA-dependent DNA polymerase}}$ DNA

DNA $\xrightarrow{\text{DNA-dependent RNA polymerase (RNA pol II)}}$ RNA

Virus enzymes

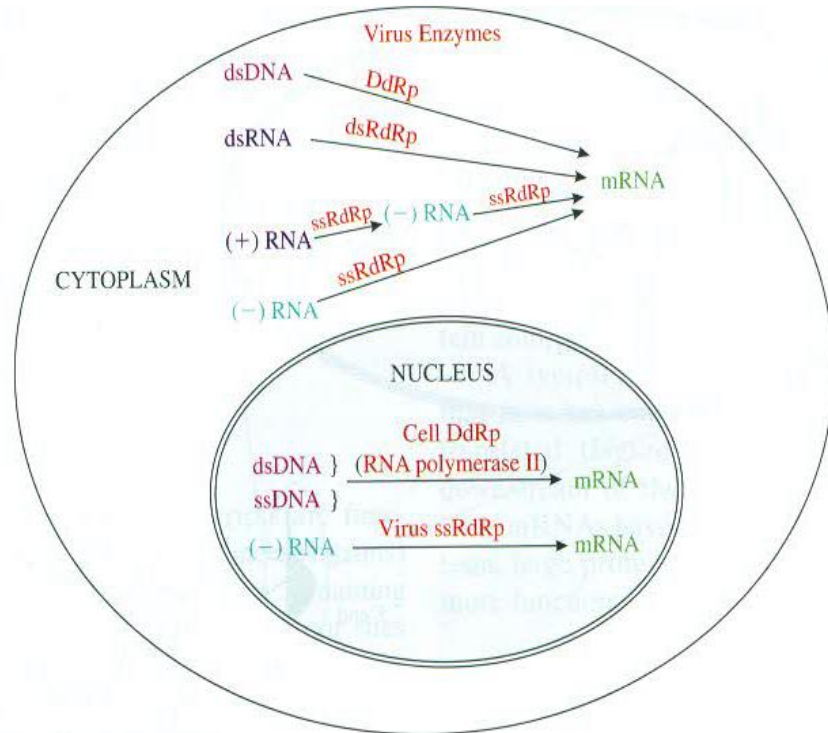
- ✓ DdDp = DNA-dependent DNA polymerase
- ✓ RdRp = RNA-dependent RNA polymerase
- ✓ RdDp = RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase)

Cell enzymes

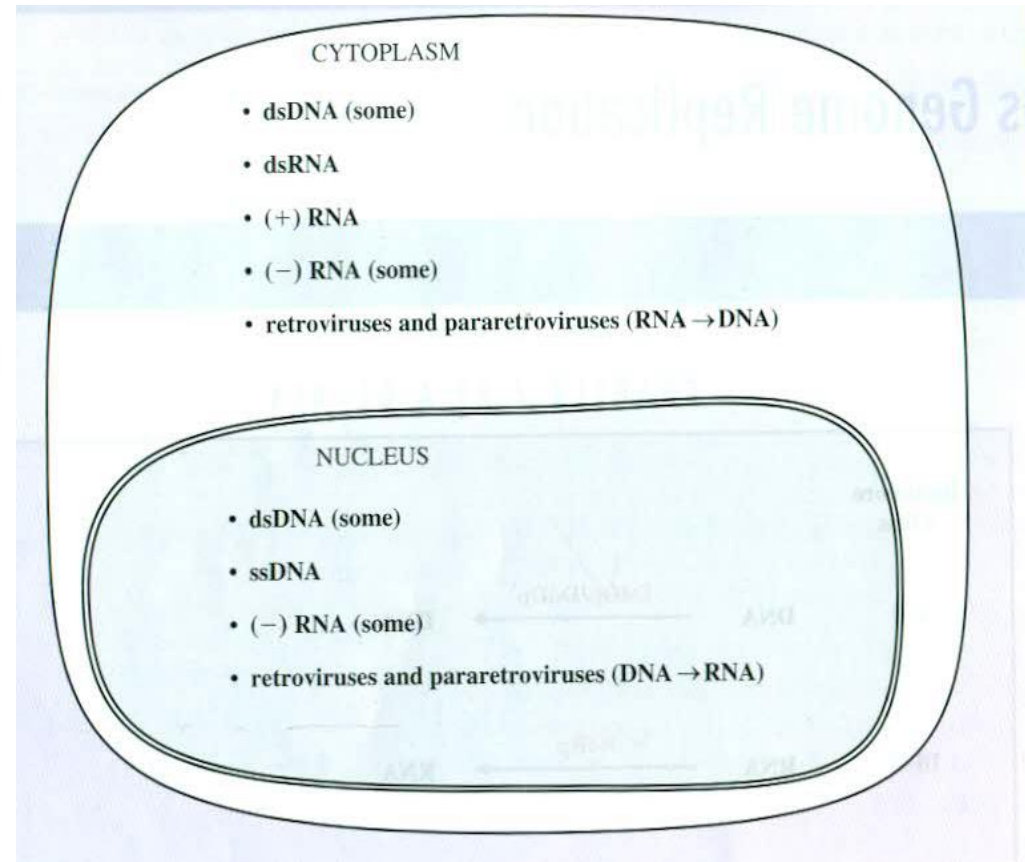
- ✓ DdDp = DNA-dependent DNA polymerase
- ✓ DdRp = DNA-dependent RNA polymerase (RNA pol II)

¹Some dsDNA viruses use a cell DdDp, some encode their own.

Lokalizace virového genomu během transkripce v eukaryotické buňce



DdRp: DNA-dependent RNA polymerase
 dsRdRp: double-stranded RNA-dependent RNA polymerase
 ssRdRp: single-stranded RNA-dependent RNA polymerase



Dozrávání nových virových částic (**MATURACE**)

- strukturní změny virové částice vedoucí ke štěpení kapsidových proteinů nebo ke změnám konformace virových proteinů=**vznik zralých funkčních produktů**
- do procesu maturace jsou zapojeny virové proteázy a směs virových a buněčných enzymů (např. HA viru chřipky-posttranslační štěpení na HA1 a HA2 nebo působení neuraminidázy-uvolnění zbytků kys. sialové)

Proces uvolnění virů z hostitelské buňky

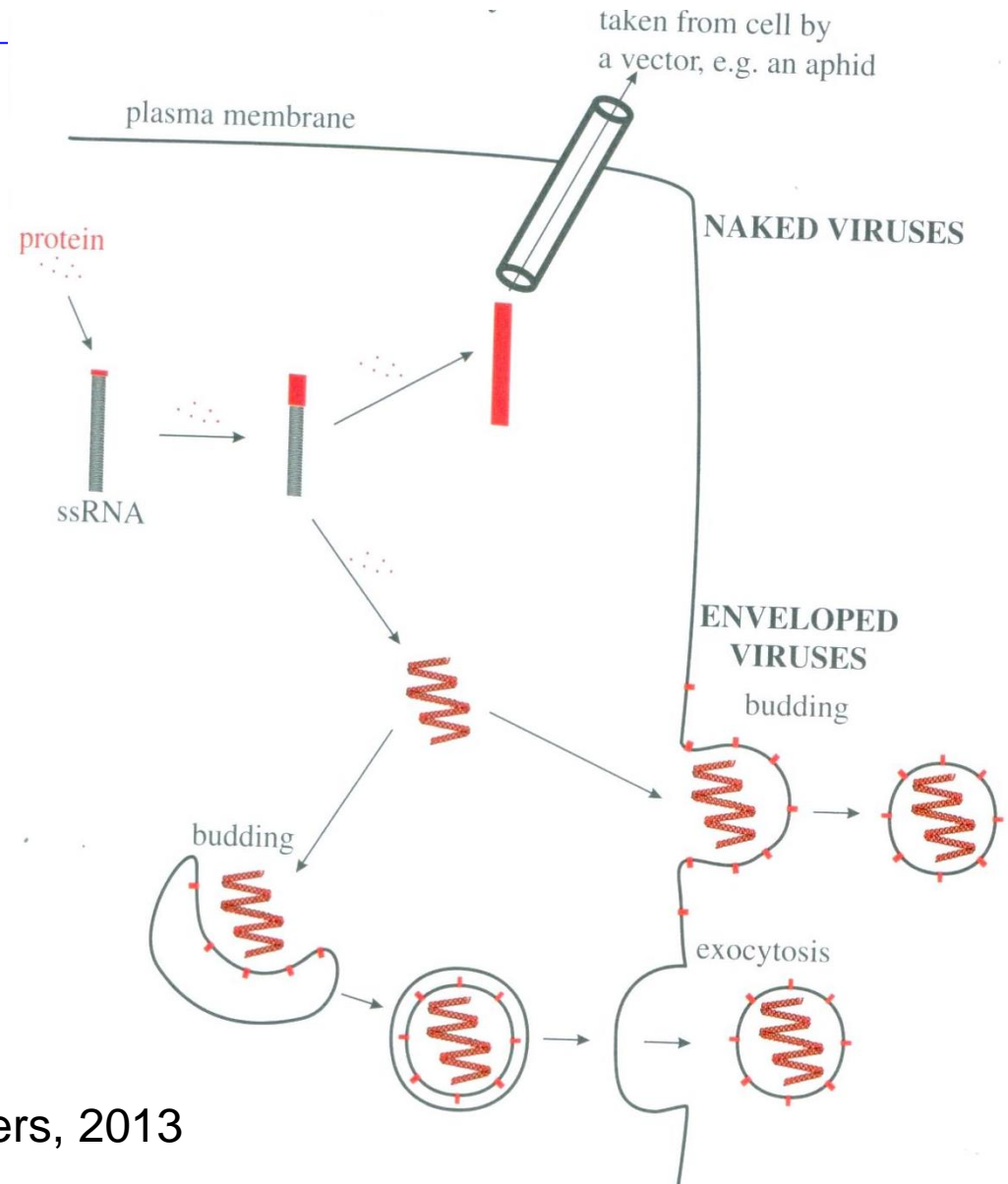
změny v permeabilitě plazmatické membrány (změna iontové rovnováhy mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky)

Lýza – infikovaná buňka se otevře, poruší se její integrita a viry se dostanou do extracelulárního prostoru (předchází změny v cytoskeletu způsobené virovými proteiny vedoucí ke změně morfologie buňky).

Exocytóza – po splnutí mem. váčku (vezikulu) s cyt. membránou

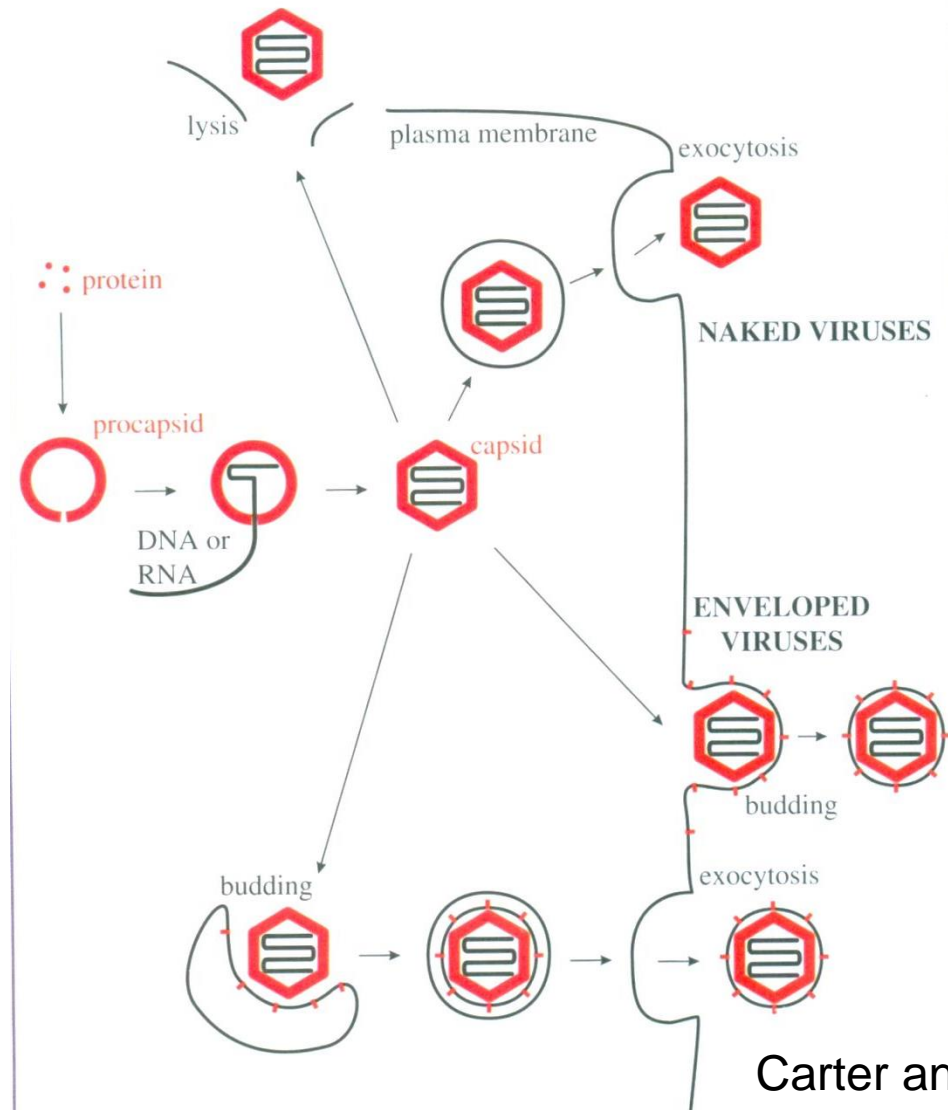
Pučení (budding)- vychlipování směrem ven z cyt. mem.

Viry s helikální symetrií (sestavení virionu a exit z hostitelské buňky)



Carter and Saunders, 2013

Viry s ikosaedrální symetrií (sestavení virionu a exit z hostitelské buňky)



Carter and Saunders, 2013

VIRUS BUDDING (ENVELOPED VIRUSES)

specifická místa v hostitelské buňce

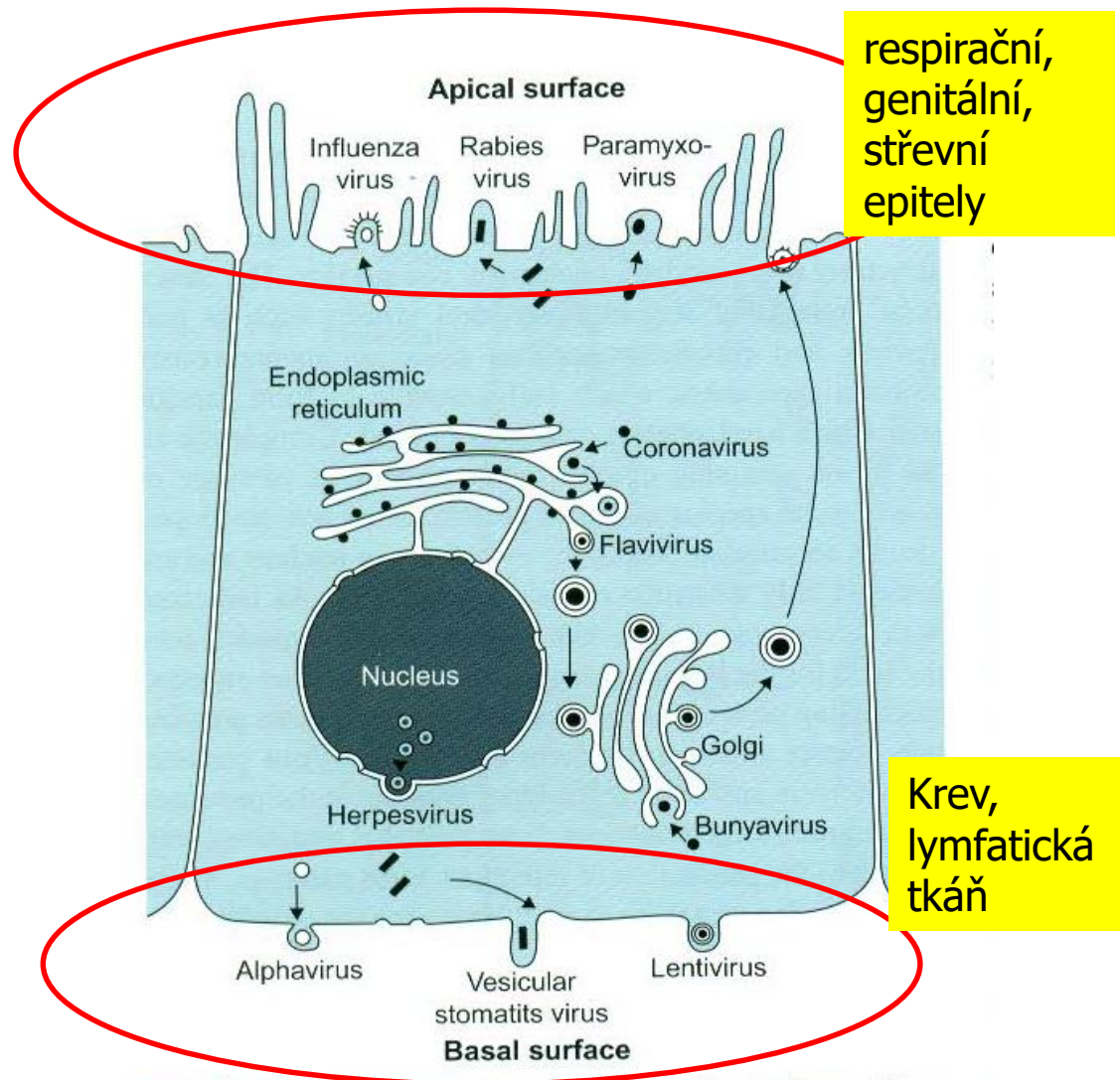
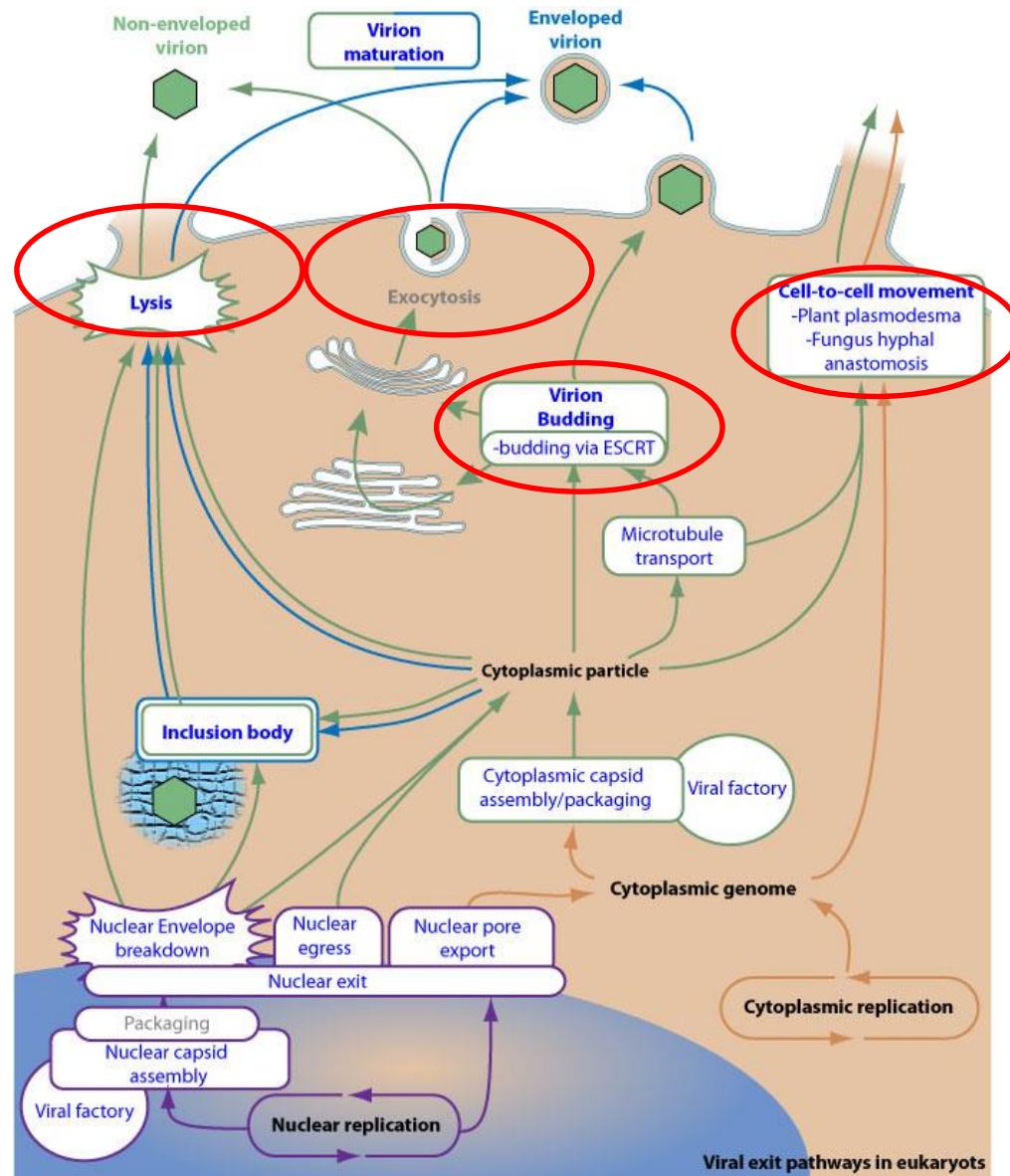


FIGURE 2.11 Sites of budding of various enveloped viruses. Viruses that bud from apical surfaces are in position to be shed in respiratory or genital secretions or intestinal contents. Viruses that bud from basal surfaces are in position for systemic spread via viremia or lymphatics. Some viruses, such as flaviviruses, bunyaviruses, and coronaviruses, take a more circuitous route in exiting the cell (see specific chapters in Part II). Viruses that do not bud usually are released only via cell lysis.

Uvolnění viru z buňky (shrnutí)



Přehled (dle čeledí):

- vstup do buňky
- místo replikace
- místo maturace

Family	Uptake Route	Site of Nucleic Acid Replication	Site of Maturation (Budding)
<i>Poxviridae</i>	Variable	Cytoplasm	Cytoplasm
<i>Asfaviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Cytoplasm	(Plasma membrane)
<i>Iridoviridae</i>	Variable	Nucleus/cytoplasm	Cytoplasm
<i>Herpesviridae</i>	Variable	Nucleus	(Nuclear membrane)
<i>Adenoviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Nucleus	Nucleus
<i>Polyomaviridae</i>	Caveolar endocytosis	Nucleus	Nucleus
<i>Papillomaviridae</i>	Clathrin/caveolar endocytosis	Nucleus	Nucleus
<i>Parvoviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Nucleus	Nucleus
<i>Hepadnaviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Nucleus/cytoplasm	(Endoplasmic reticulum)
<i>Retroviridae</i>	Plasma membrane fusion or clathrin-mediated endocytosis	Nucleus	(Plasma membrane)
<i>Reoviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Cytoplasm	Cytoplasm
<i>Paramyxoviridae</i>	Plasma membrane fusion	Cytoplasm	(Plasma membrane)
<i>Rhabdoviridae</i>	Plasma membrane fusion	Cytoplasm	(Plasma membrane)
<i>Filoviridae</i>	Plasma membrane fusion	Cytoplasm	(Plasma membrane)
<i>Bornaviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Nucleus	(Plasma membrane)
<i>Orthomyxoviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Nucleus	(Plasma membrane)
<i>Bunyaviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Cytoplasm	(Golgi membrane)
<i>Arenaviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Cytoplasm	(Plasma membrane)
<i>Coronaviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis/plasma membrane fusion	Cytoplasm	(Endoplasmic reticulum)
<i>Arteriviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Cytoplasm	(Endoplasmic reticulum)
<i>Picornaviridae</i>	Caveolar endocytosis/plasma membrane insertion	Cytoplasm	Cytoplasm
<i>Caliciviridae</i>	Caveolar endocytosis/plasma membrane insertion?	Cytoplasm	Cytoplasm
<i>Astroviridae</i>	Caveolar endocytosis/plasma membrane insertion?	Cytoplasm	Cytoplasm
<i>Togaviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Cytoplasm	(Plasma membrane)
<i>Flaviviridae</i>	Clathrin-mediated endocytosis	Cytoplasm	(Endoplasmic reticulum)