

Viry a virologie



Martinus Willem Beijerinck

- **Virus** – genetický element, který není schopný samostatné replikace nezávisle na hostitelské buňce
- nebuněčné či podbuněčné organizmy (nebo životní formy)
- infekční agens
- vnitrobuněční parazité na genetické úrovni (závislí na proteosyntetickém aparátu hostitele, ribozómu)
- rozmnožování syntézou jednotlivých složek (ne dělením)
- zralé virové částice obsahují jen jediný typ nukleové kyseliny
- **Virologie** – věda zabývající se studiem virů
- **Virion** – virová částice, extracelulární forma viru

Historie virologie – základní mezníky

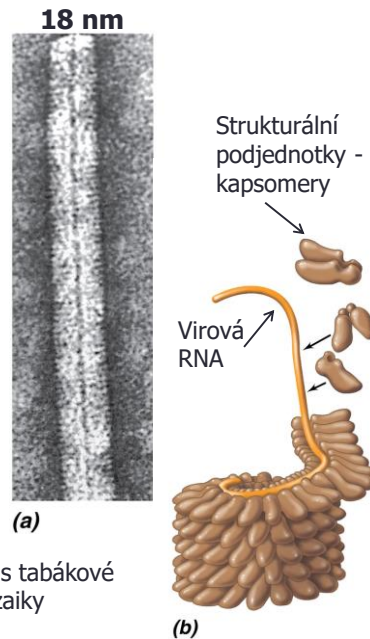
- **Dimitrij I. Ivanovskij**, ruský patolog, použil jemný filtr pro studie viru tabákové mozaiky (**1892**) (tabákový list vypadá po napadení virem jako mozaika)
- **Martinus Willem Beijerinck** – pomnožení virů tabákové mozaiky na živé rostlinné tkáni, infekční agens nazval „virus“
- Vizualizace virů **1941** díky elektronovému mikroskopu
- V **50. letech minulého století** byla připravena první vakcína proti poliomyelitidě (1954 Nobelova cena Enders, Weller, Robbins)

Dělení dle hostitele

- rostlinné
- živočišné (viry hmyzu)
- bakteriofágy (cyanofágy)
- archeální viry
- jiné

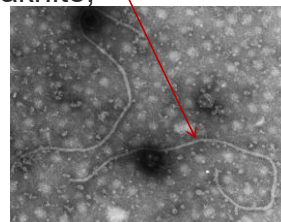
Struktura virionu

- nukleokapsid
 - symetrický – ikosaedrální, helikální, binární symetrie
 - asymetrický
- obal (u obalených virů) – zpravidla tvořen membránovými strukturami hostitelské buňky

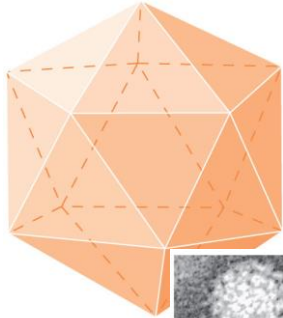


Velikost a tvar

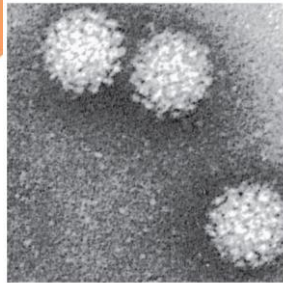
- Viry jsou mnoha tvarů a velikostí
- Většina virů je menších než prokaryotická buňka (od 0,02 do 0,3 μm)
- Živočišné viry – 18 nm (Parvovirus) až 300 nm (Poxvirus)
 - tyto dokonce viditelné ve světelném mikroskopu
 - tvar především kulovitý
- Rostlinné viry - převážně tyčinkovité (helikální symetrie)
 - 160 nm Hordeivirus – 2000 nm Closterovirus
- Bakteriofágy - bičíkaté, bezbičíkaté nebo vláknité, komplexní symetrie



Tvar virových částic



Ikozaedrální symetrie:
Lidský papillomavirus
(dvacetistěn)



W. F. Noyes

Helikální symetrie:

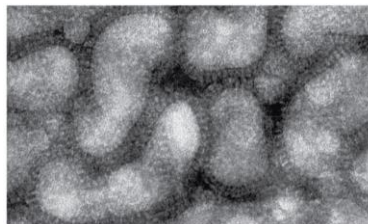
tyčinkovité viry, např.
virus tabákové mozaiky
Délka viru je dána délkou
její nukleové kyseliny
Šířka viru je dána velikostí
proteinového obalu



J.T. Finch

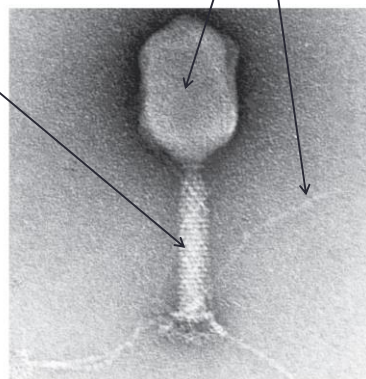
Tvar virových částic

- a) Influenza virus (virus chřipky) – obalený virus, ss RNA genom, bez definovaného tvaru
- b) bakteriofág T4 (bakteriofág *E. coli*), ds DNA genom, hlavička s ikozaedrální symetrií, bičík s helikální symetrií, bičíková vlákna



P. W. Choppin and
W. Stoekenius

(a)



M. Wurtz

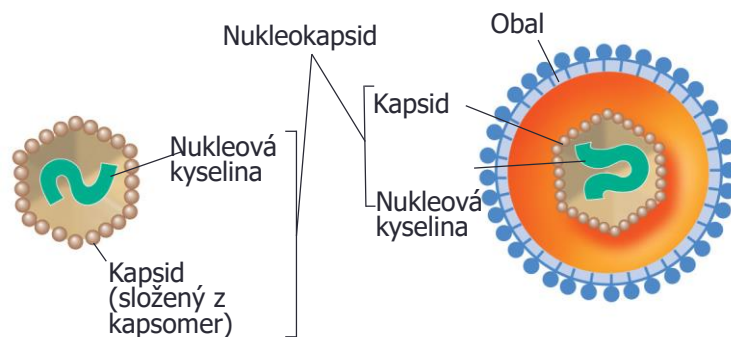
(b)

Nukleokapsida (nukleokapsid, proteinový plášť)

- Kapsida s kubickou symetrií
 - pravidelný mnohostěn (izometrický)
 - stěny kapsidu (rovnostranné trojúhelníky) – z 6 protomer (hexaméry, hexony)
 - vrcholy kapsidu – z 5 protomer (pentamery, pentony)
- Kapsida s helikální symetrií
 - hlavně rostlinné viry
 - šroubovice – uprostřed kanálek s genetickou informací
 - protomery spojeny do diskovitých kapsomer tvořící šroubovici
- Kapsida s binární symetrií (komplexní)
 - hlavně bakteriofágy
 - hlava (s gen. info)– kubická symetrie, bičík – helikální symetrie

Obal

- vnitřní protein (M-protein)
- zevní lipoproteinový (fosfolipidový) komplex
 - glykoproteiny - peplomery

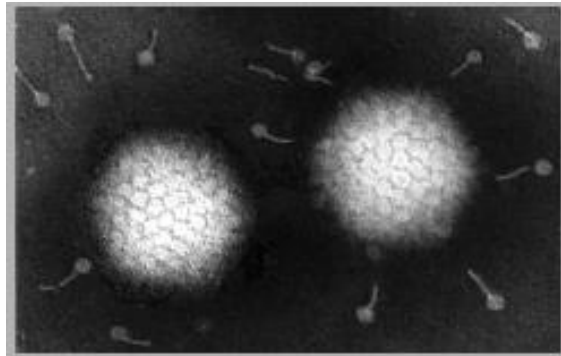
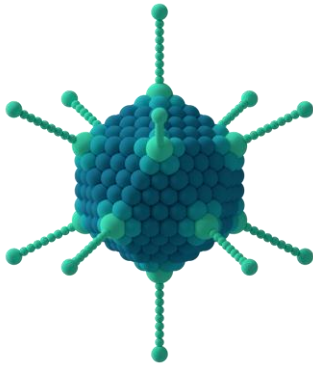


Neobalený virus

Obalený virus

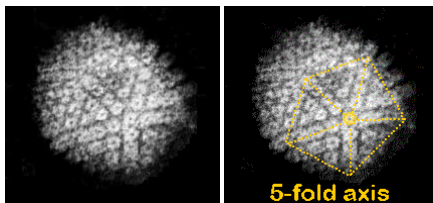
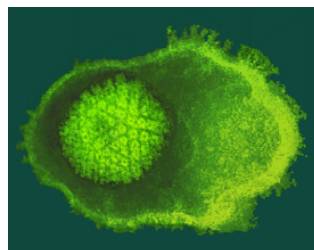
Adenovirus neobalený, ikosaedrální

kapsid z 252 přibližně kulovitých kapsomer, 240 šestičlenných a 12 pentamer (na vrcholech), "penton fibre"

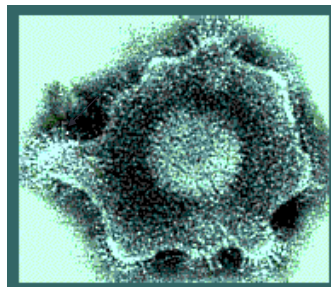


Herpesviry

- 12 pentamer a 150 hexamer
- obalené
- glykoproteiny kódované virem

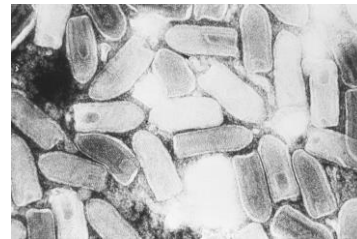
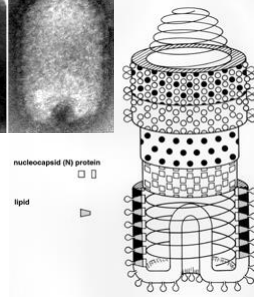
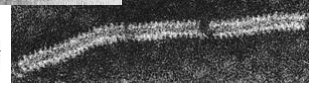
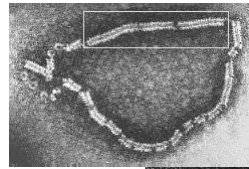
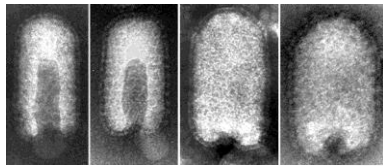


5-fold axis



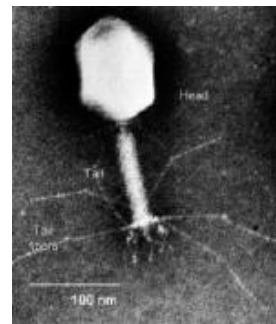
Helikální symetrie

- virus vztekliny (rhabdoviry)
- paramyxoviry



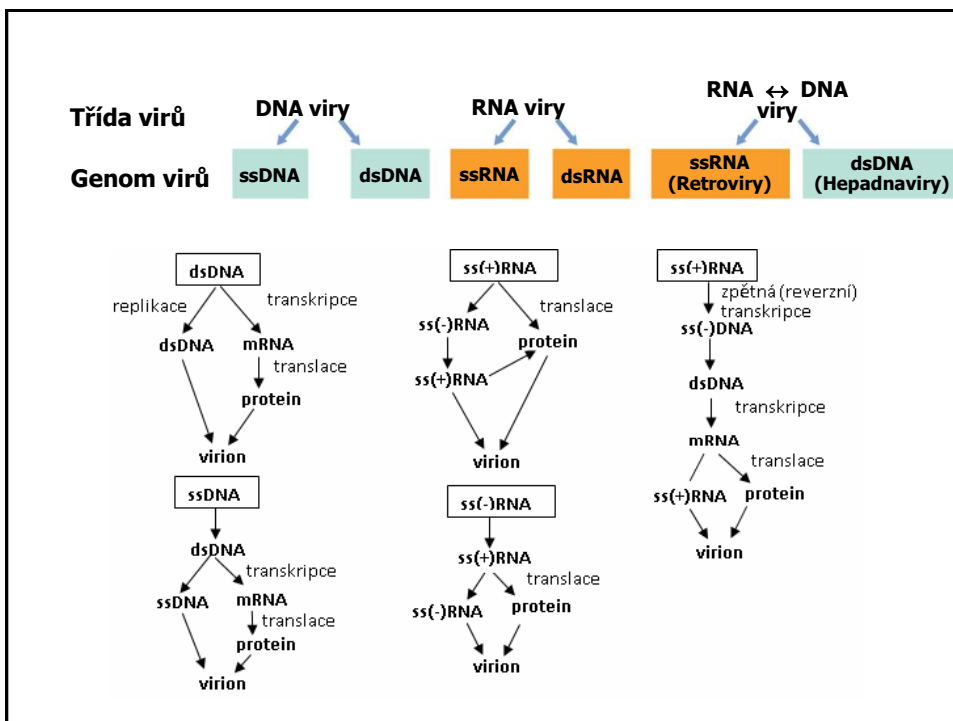
Komplexní symetrie

- bakteriofág
- T4



Genom

- ds DNA (není u rostlin, s výjimkou Caulomoviru)
- ss DNA (živočišné viry – **lineární**, bakteriofágy – **kružnicová**)
- ds RNA (charakteristická je segmentace genomu – uloženy ve společném kapsidu)
- ss RNA (častá segmentace – u rostlinných virů segmenty v oddělených kapsidách – infekce možná pouze po proniknutí všech částí)
- velikost $10^6 - 10^9$ daltonů



Baltimorovo klasifikační schéma virů:

- I: Double-stranded DNA (Adenoviruses; Herpesviruses; Poxviruses, etc)
- II: Single-stranded (+)sense DNA (Parvoviruses)
- III: Double-stranded RNA (Reoviruses; Birnaviruses)
- IV: Single-stranded (+)sense RNA (Picornaviruses; Togaviruses, etc)
- V: Single-stranded (-)sense RNA (Orthomyxoviruses, Rhabdoviruses, etc)
- VI: Single-stranded (+)sense RNA with DNA intermediate in life-cycle (Retroviruses)
- VII: Double-stranded DNA with RNA intermediate (Hepadnaviruses)

Pozn.:

RNA viry s pozitivním řetězcem: ssRNA genom má stejnou orientaci jako jeho mRNA

RNA viry s negativním řetězcem: ssRNA genom má komplementární orientaci jako jeho mRNA

Genom viru hepatitidy B (Hepadnavirus) je tvořen kruhovou dvouřetězcovou DNA, přičemž jedno z vláken dvouřetězcové DNA není kompletní

Životní cyklus – replikace virů

- Adsorpce na hostitelskou buňku
 - připojení vazebných míst virů ke specifickým receptorům hostitelské buňky
 - vazebné místo – např. bílkoviny na hrotech kapsidů (neobalené viry) nebo na výrůstcích (obalené viry); příp. bazální destička bičíku (bakteriofágy)
 - receptory – hlavně lipoproteiny a glykoproteiny na povrchu buněk
- Penetrace do buňky
- Reprodukce viru (syntéza bílkovin; replikace genomu; maturace a eluce virionů)

Životní cyklus virů

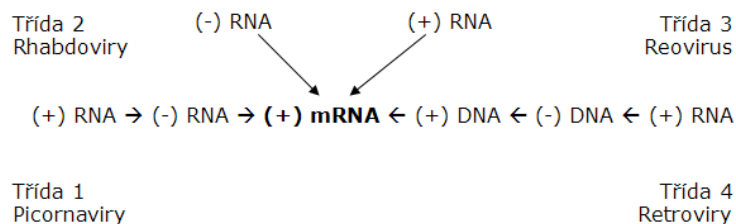
- *Penetrace*
- vstup viru do buňky
- obalené viry – splývání obalu s membránou
- neobalené viry – viropexce (podobná fagocytóze)
- bakteriofágy – obal zůstane na povrchu, do buňky pronikne pouze nukleová kyselina
- rostlinné viry – průnik po mechanickém porušení buněčné stěny (např. přenašečem)

Replikace – DNA viry

- Replikace v jádře hostitelské buňky
- mRNA (vlastní nebo buněčná RNA polymeráza)
- časné proteiny (DNA polymerázy)
- replikace DNA
- ze dceřiných molekul se přepisuje mRNA pro syntézu strukturálních proteinů

Replikace – RNA viry

- Replikace v cytoplasmě hostitelské buňky
- malé, +ssRNA – RNA působí jako mRNA, přepis do – RNA polymerázou buňky, z něj se pak přepisují dceřiné molekuly, které zároveň slouží jako mRNA
- velké RNA viry – RNA polymeráza viru přepíše – do + mRNA



Štípek, S.: Stručná biochemie

Uvolnění viru z hostitelské buňky

- lyze – většinou neobalené viry
- vznik pupenu – většinou obalené viry

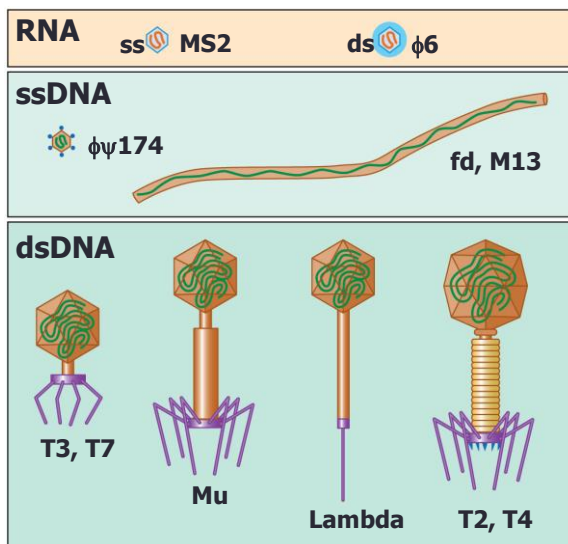
Další významné pojmy

- **Latentní infekce** – proces, při kterém jsou hostitelské buňky infikovány, ale nedochází k replikaci viru
- **Perzistentní infekce** – proces, při kterém se virus replikuje aniž by poškodil hostitelskou buňku

Retroviry

- **David Baltimore**, Howard Temin, Renato Dulbecco objevili retroviry a reverzní transkriptázu, za toto získali **Nobelovu cenu v roce 1975**
- Třída VI a VII
- Reverzní transkriptáza (přepis RNA viru do DNA, která se začlení do genomu buňky)
- Podstatná část životního cyklu se odehrává v **jádře**
- Onkoviry – nádorové bujení
- Geny **gag**, **pol**, **env**, eventuálně i **v-onc**

Hlavní typy bakteriálních virů



Životní cyklus bakteriofágů

- virulentní fágy
- temperované fágy
- temperované fágy se začleňují do hostitelského genomu (tzv. **profág**), tím se dočasně reprodukční proces zastaví (**lyzogenizace**)
- Nejvíce jsou prostudované bakteriofágy infikující střevní bakterie (*E. coli*, *Salmonella enterica*)
- Většina obsahuje **lineární dsDNA** genom, vyskytuje se ale i **kruhová ssDNA**, **lineární dsRNA** a **lineární ssRNA**
- Většina je neobalených, někteří mají lipidové obaly
- Jsou strukturálně komplexní, obsahují hlavičku, bičík a jiné komponenty

Životní cyklus bakteriofágů

Životní cyklus virulentního fága

- **Adsorpce** částice na povrch hostitelské buňky, **penetrace** a **injekce** fágové NK

Adsorpce je reverzibilní, vazba na receptor (proteiny, polysacharidy apod.) není reverzibilní

Penetrace pouze NK, bílkovinný obal zůstává vně buňky (rozdíl od ostatních virů)

Lysozym pro narušení peptidoglykanu BS hostitele

- **Syntéza komponent** fágové částice (NK a kapsid)

Syntéza NK podle jen jedné molekuly NK, ostatní injikované molekuly jsou degradovány endonukleázami. Následuje transkripce do **časné mRNA** a translace do **časných enzymů**

Syntéza specifické fágové NK (za degradující hostitelskou NK), syntéza pozdní fágové mRNA a pozdní bílkoviny podílející se na kapsidu

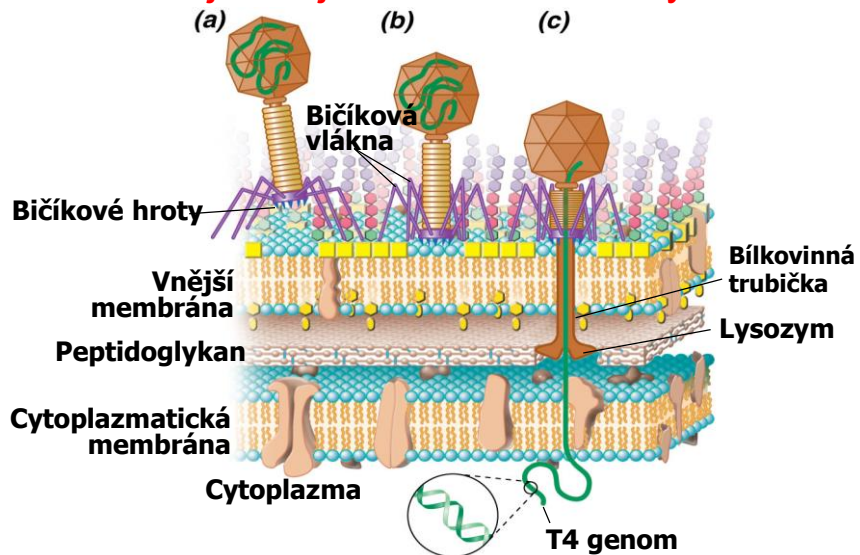
- **Maturace** a **uvolnění** částic z hostitelské buňky

Vytvoření kompletní virové částice, maturace je nahodilá, do hlavičky se uzavře NK fága nebo část NK hostitele, příp. plazmid. Pak je fág nevirulentní, tzv. „ghost“.

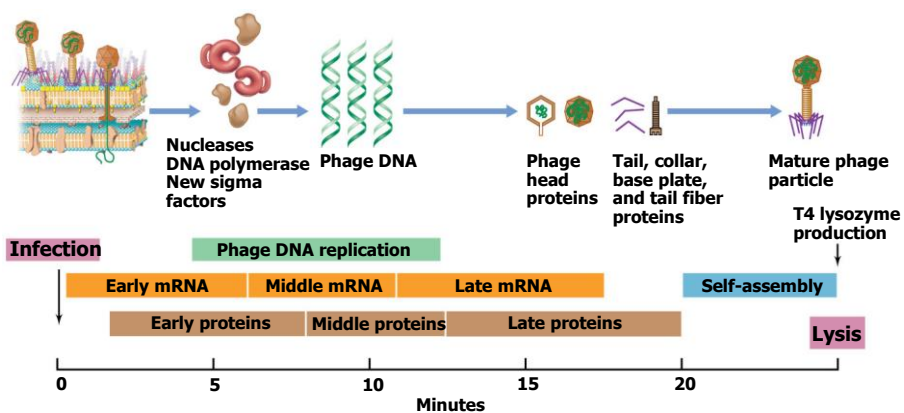
Lyze (narušení BS) hostitelské buňky, uvolnění fága

Fágový výtěžek (burst size) – počet nově syntetizovaných virulentních částic v 1 buňce

Připojení bakteriofága T4 na buňku *E. coli* a injekce jeho DNA do buňky



Časový sled infekce bakteriofágem T4



Životní cyklus bakteriofágů

Životní cyklus temperovaného (mírného) fága

Počáteční kroky shodné jako u virulentního fága, po injekci následují:

- Kroky shodné jako u virulentního fága
- Injikovaná NK fága se začlení do chromozomu hostitelské buňky (vznikne **profág**), nedojde k lyzi buňky (jde o **lyzogenní buňku**, proces **lyzogenizace**), je to ale reverzibilní krok!

začleněný fágový genom přechází do dceřiných buněk

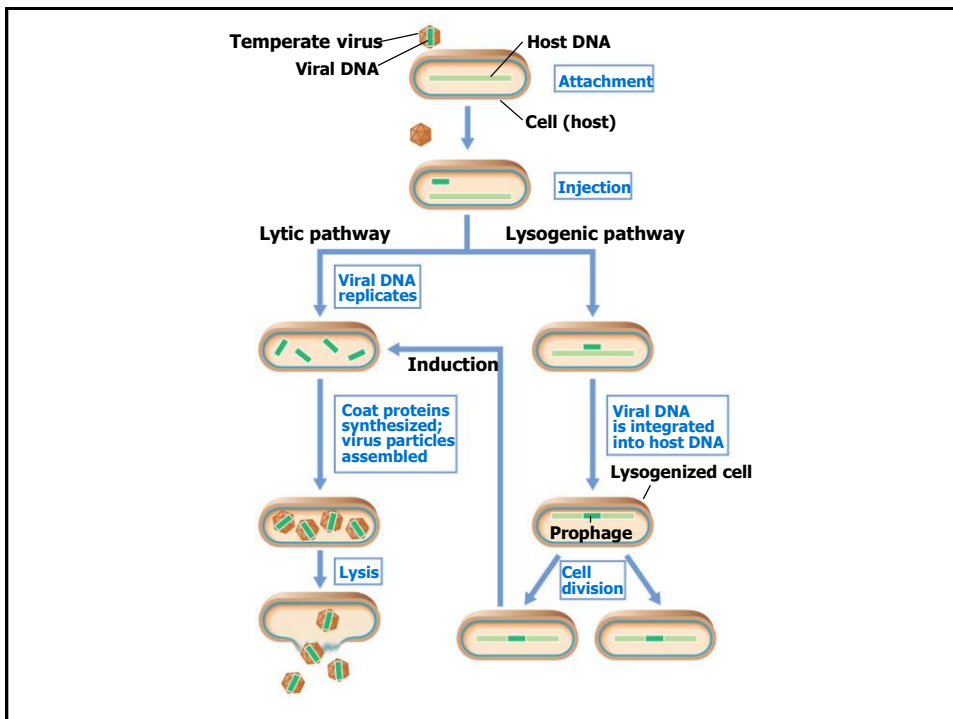
Lyzogenní buňky jsou imunní k superinfekci homologním fágem, při infekci nepříbuzným bakteriofágem se vytvoří **polylyzogenní** buňka

Fagotypizace – druhová příslušnost kmene je stanovena na základě jeho „fágového profilu“

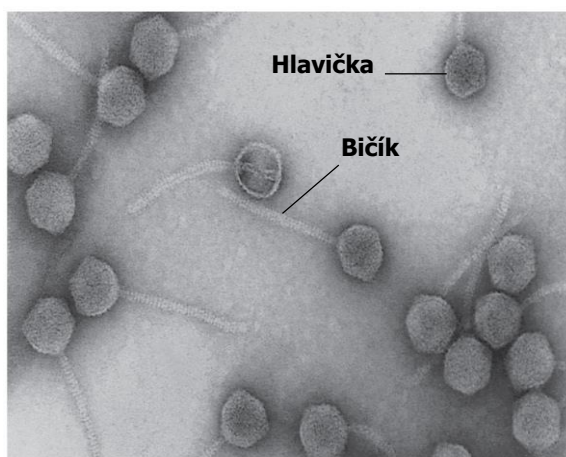
Nejméně 93 % bakterií obsahuje ve svém chromozomu genom nejméně jednoho bakteriofága.

Lyzogenní konverze – začleněním fágové NK se mění fenotypový projev buňky

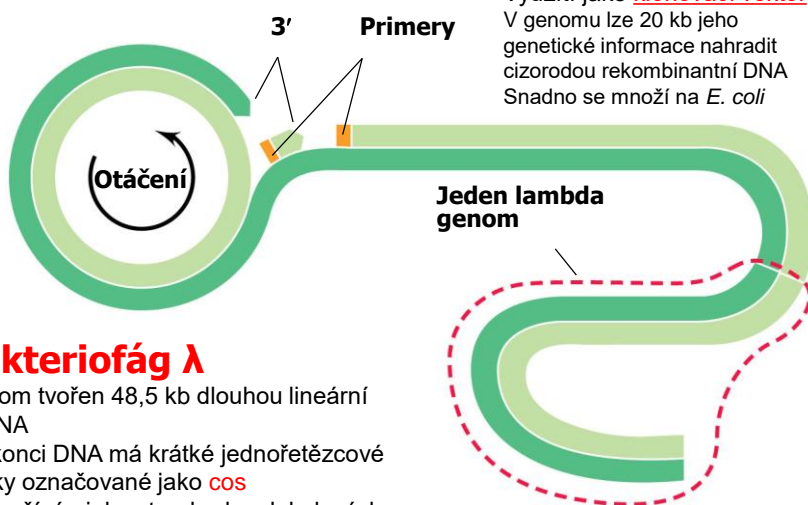
Přítomnost profága mění povrchové struktury buňky, startuje produkci toxinů (shigatoxin, neurotoxiny, cytotoxiny) apod.



Bakteriofág λ



Replikace otáčivou kružnicí



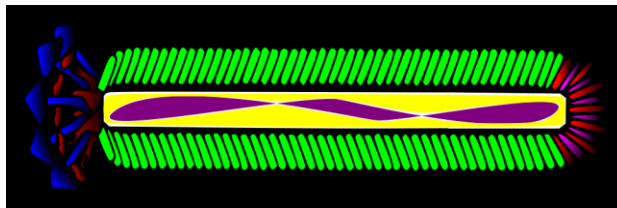
Využití jako klonovací vektor:
V genomu lze 20 kb jeho
genetické informace nahradit
cizorodou rekombinantní DNA
Snadno se množí na *E. coli*

Bakteriofág λ

Genom tvořen 48,5 kb dlouhou lineární
dsDNA
Na konci DNA má krátké jednořetězcové
úseky označované jako **cos**
Je využíván jako standard molekulových
hmotností při gelové elektroforéze

Bakteriofág M13

- Vlákňitý bakteriofág, jehož genom je tvořen **jednořetězcovou DNA**
- Na povrch *E. coli* se adsorbuje díky F-pilusů (funkce receptoru)
- Replikace v cytoplazmě infikovaných *E. coli* způsobem otáčivé kružnice
- Nepochází k lyzi buněk *E. coli*, lze jej využít k produkci virových částic
- Využití pro práci s rekombinantní DNA, kterou vkládáme do jeho genomu
- Přijme jen kratší fragmenty cizorodé DNA ve srovnání s fágem lambda



Klasifikace a názvosloví virů

- čeleď – *viridae*
- rod – *virus*
- druh – nejasně vymezená taxonomická kategorie – dynamicky se vyvíjející populace, vžitá názvy, nikoliv binomická nomenklatura
- typ nukleové kyseliny, typ polymerázy, symetrie kapsidy, obal, místo skládání kapsidy, citlivost k éteru

**ROZDĚLENÍ VIRŮ
DLE PŘÍTOMNOSTI OBALU, CHARAKTERU GENOMU A SYMETRIE KAPSIDY**

RNA-viry	
I.	neobalené dsRNA-viry, segmentované
II.	neobalené ssRNA-viry pozitivní polarity, nesegmentované
III.	obalené ssRNA-viry pozitivní polarity, nesegmentované, ikosaedrické symetrie
IV.	obalené ssRNA-viry pozitivní polarity, nesegmentované, helikální symetrie (<i>Nidavirales</i>)
V.	obalené ssRNA-viry pozitivní polarity, ikosaedrické symetrie, nesoucí reverzní transkriptasu
VI.	obalené ssRNA-viry negativní polarity, nesegmentované, helikální symetrie (<i>Mononegavirales</i>)
VII.	obalené ssRNA-viry negativní polarity, segmentované, helikální symetrie
DNA-viry	
I.	neobalené ssDNA-viry
II.	neobalené dsDNA-viry
III.	obalené dsDNA-viry, ikosaedrální symetrie
IV.	obalené ds/ssDNA-viry, ikosaedrální symetrie, využívající reverzní transkriptasu
V.	obalené dsDNA-viry, komplexní symetrie

Kultivace živočišných virů

- Na buněčných a tkáňových kulturách
- V kuřecích embryích
- Na vnímavých laboratorních zvířatech

Kvantifikace živočišných virů - metody

- Počítání PFU/ml (plaque forming units)
- Hemaglutinace (schopnost shlukovat erytrocyty)
- Stanovení **LD50** (úhyn 50% infikovaných) nebo ID50
- Stanovení **TCID50** (cytopatický efekt u 50% virem inokulovaných tkáňových kultur)
- Pomocí elektronové mikroskopie (komparativní počítání virových částic a jiných fyzických částic o známé koncentraci)
- Pomocí kvantitativní real time PCR

Nejvýznamnější zástupci

- DNA viry
 - Herpes simplex – původce oparu
 - Poxviry (Orthopoxvirus) – původce pravých neštovic; nemoc eradikována
- RNA viry
 - Ortomyxoviry – Influenzavirus A, B, C – chřipka, časté epidemie
 - Paramyxovirus – původce příušnic
 - Pikornaviry (rod Enterovirus) – původce poliomyelitidy
 - Rabdoviry (rod Lyssavirus) – původce vztekliny
 - Retroviry (HTLV III) – původce AIDS
 - Togaviry (rod Alphavirus) – původce klíšťové encefalitidy

Onkoviry

1. aktivace proto-onkogenů buněčného původu
2. onkogeny nádorových DNA virů – onkoproteiny, vazba na tumor suprimující proteiny, např. p53

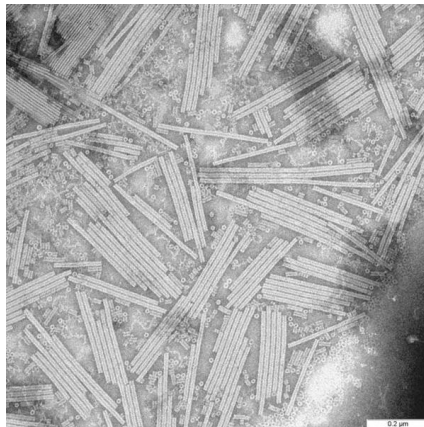
Způsobují akutní nádorové bujení

Mají ve svém genomu v-onc

- EBV – Burkittův lymfom a nasofaryngeální karcinom
- virus hepatitidy B – hepatocelulární karcinom
- papilomaviry – cervikální karcinom
- retroviry – virus lidské T-buněčné leukemie HTLV 1
- virus hepatitidy C

Viry rostlinné

- virus tabákové mozaiky
 - projev: světlé, ostře ohraničené skvrny na listech, hl. v okolí cévních svazků. Přenos: mechanicky, hmyzem sajícím rostlinné šťávy a vegetativně. Napadá: vojtěšku, brambory, rybíz, tabák, květák, tulipány a u ovocných stromů brání vývoji plodů
- RNA viry
- Caulimoviry a Gemoniviry – DNA



- **Luteoviry**, neobalené rostlinné viry s genetickou informací v jednovláknové RNA; způsobují např. žlutou zakrslost ječmene, nekrotickou zakrslost tabáku



- **Hordeiviry**, neobalené rostlinné viry s genetickou informací obsaženou ve třech molekulách kyseliny ribonukleové. Vyvolávají nekrotické změny na listech



- **Ilarviry**, neobalené rostlinné viry s širokým hostitelským rozsahem, přenosné semeny nebo pylem. Vyvolávají např. nekrotickou kroužkovitost švestky.



Virové nákazy člověka

- vstupní brána infekce
- rozsev virů v organismu a virémie
- vylučování viru
- rezistence – bariéry, virové inhibitory, interferon) brzdí syntézu virové mRNA), zvýšená teplota, zánět
 - specifická imunita – protilátková, buněčná



Virové vakcíny

- atenuované – Sabinova vakcína - poliomyelitida
- inaktivované – chřipka, hepatitida A
- pasivní imunizace
 - interferon
- antivirotika



Viroidy

- malá infekční cirkulární **autokatalytická ribonukleová kyselina (RNA)** nekódující žádný protein; **sekvenčně a strukturně podobné intronům**
- hostiteli viroidů jsou vyšší rostliny
- latentní infekce nebo onemocnění projevující se zakrslostí, žlutými skvrnami na listech
- **viroid PSTV (Potato Spindle Tuber Viroid)**
- **viroid CEV (Citrus Exocortis Viroid)**
- **viroid CCCV (Coconut Cadang-Cadang Viroid)**
- První objevený viroid, PSTV patří do čeledi Pospiviroidae, způsobuje vřetenovitost brambor
- Viroid cadang-cadang (CCCV) způsobuje smrtelné onemocnění kokosových palm na Filipínách, které devastuje místní plantáže
- další rostliny trpící na viroidová onemocnění - rajčata, chmel, citrusy, avokáda

Genom viroidů

- Cyklické RNA molekuly viroidů obsahují zhruba 250 - 400 nukleotidů, které nekódují žádný protein.
- Sekvence (primární struktura) kompletního genomu PSTV obsahuje 359 nukleotidů a je cirkulárně kovalentně uzavřená
- Viroidy se **replikují v jádru buňky**, nejvíce se jich nachází v jádru
- Replikace mechanismem otáčivé kružnice, katalyzuje buněčná RNA polymeráza II. Multimery se autokatalyticky stříhají na jednotlivé monomery. Ligací monomerů vznikají minus antiviroidy, podle nichž RNA polymeráza I v jádru syntetizuje plus viroidy.

Priony

- Prion (někdy označovaný „infekční bílkovina“) je název pro vadnou formu tzv. prionové bílkoviny vyskytující se v nervových buňkách savců.
- Prionová teorie
- formuloval profesor **Stanley B. Prusiner v roce 1982**. Ten také poprvé použil slovo prion (původně to měl být proin jakožto kombinace slov proteinaceous a infectious, nicméně prion zněl lépe). Prionovou teorii Prusiner formuloval v souvislosti s hledáním původce Creutzfeldt-Jakobovy choroby. **Nobelova cena 1997**

Prionová teorie

- prionové bílkoviny (PrPC) - malé glykoproteiny kulovitěho tvaru – alfa-helikální struktury
- normální součást membrán, především nervových buněk savců, účastní se na regulaci „vnitřních hodin“
- prion (PrP^{Sc}) představuje **vadnou formu této normální bílkoviny**, od které se odlišuje rozdílnou konformací (beta struktury)
- **změna konformace** - mimořádná odolnost vůči různým fyzikálním vlivům, prakticky absolutní odolnost proti štěpným enzymům odklízejícím vadné bílkoviny a schopnost navazovat se na zdravé formy prionových bílkovin a konvertovat je na svoji vadnou formu. Následkem je, že se v buňce hromadí vláknité struktury, které způsobí její postižení
- rozdíly ve způsobu glykozylace a v konformaci – druhová bariéra
- přenos mezidruhový – předpokládán BSE a Creutzfeldt-Jakobova choroba ???

Odolnost prionů vůči faktorům vnějšího prostředí

- vysoká
- původce **scrapie** – záření, detergenty rozpuštědla (lipidy), oxidační činidla, běžné postupy autoklávování
- výrazné snížení infekčnosti – autoklávování 134°C nebo 1M NaOH

Patogeneze onemocnění

- spontánně, dědičně nebo evidentní infekce
- inkubační doba několik let
- chronický průběh
- zhoršování stavu

Prionová onemocnění

Lidská onemocnění

- Kuru
- Creutzfeldt-Jakobova choroba
- Gerstmann-Straussler-Scheinkerův syndrom



Zvířecí onemocnění

- Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) (tzv. nemoc šílených krav)
- Scrapie
- Přenosná encefalopatie norků
- Spongiformní encefalopatie koček

