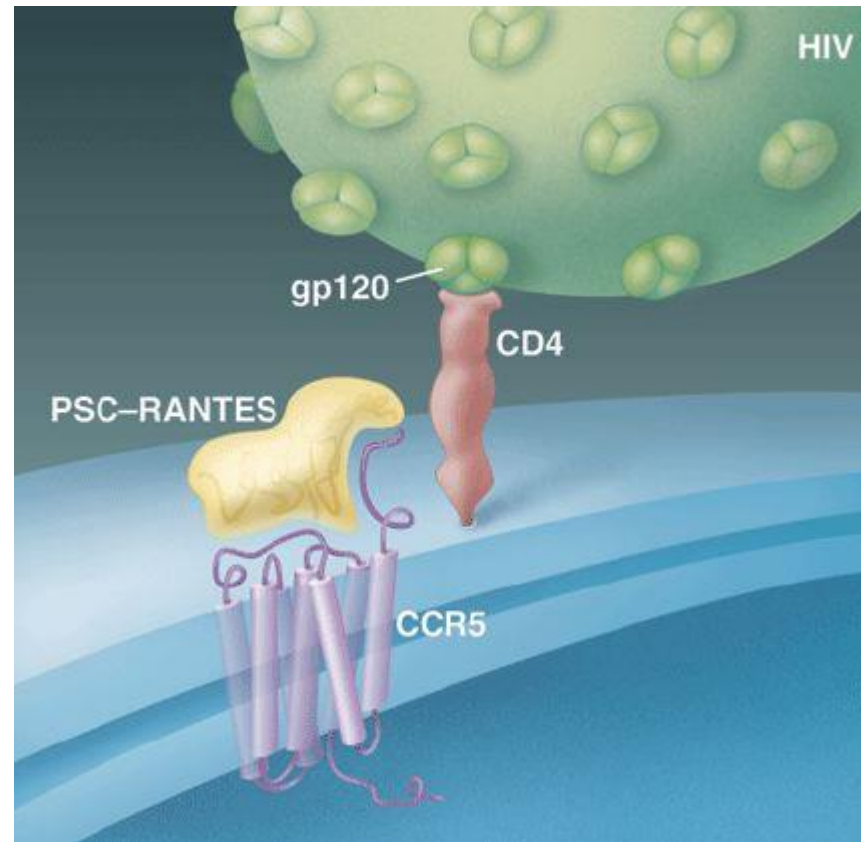
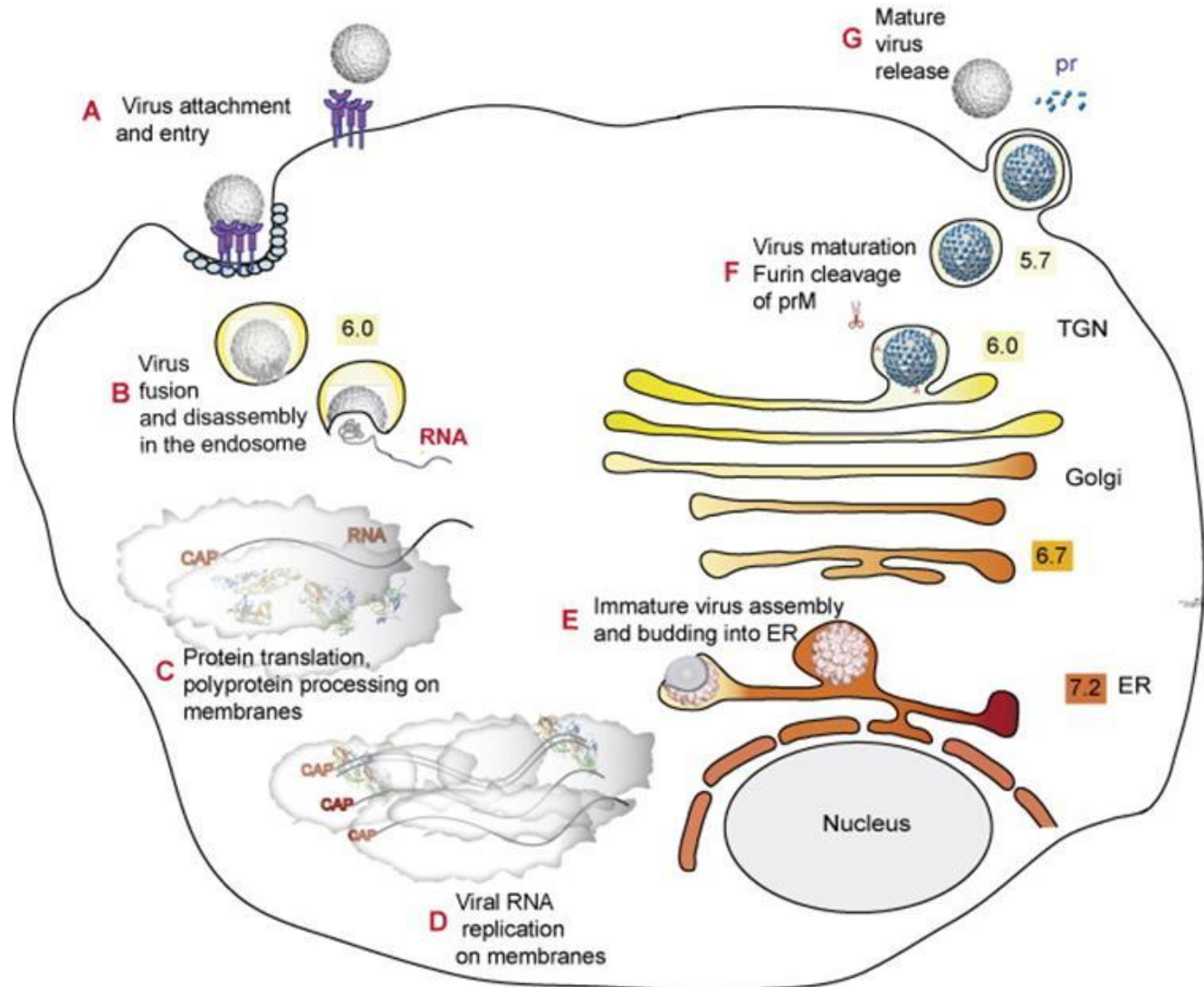


Virové receptory, tropismus and interakce virus-buňka



Přichycení virové částice a vstup do buňky

The Flavivirus Life Cycle



1. Přichycení viru na buňku
2. Pronikání (endocytózou) do bb, zbavení se obalů
3. Transport virové NK do míst, kde bude probíhat replikace
4. Exocitóza/uvonění viru z buňky

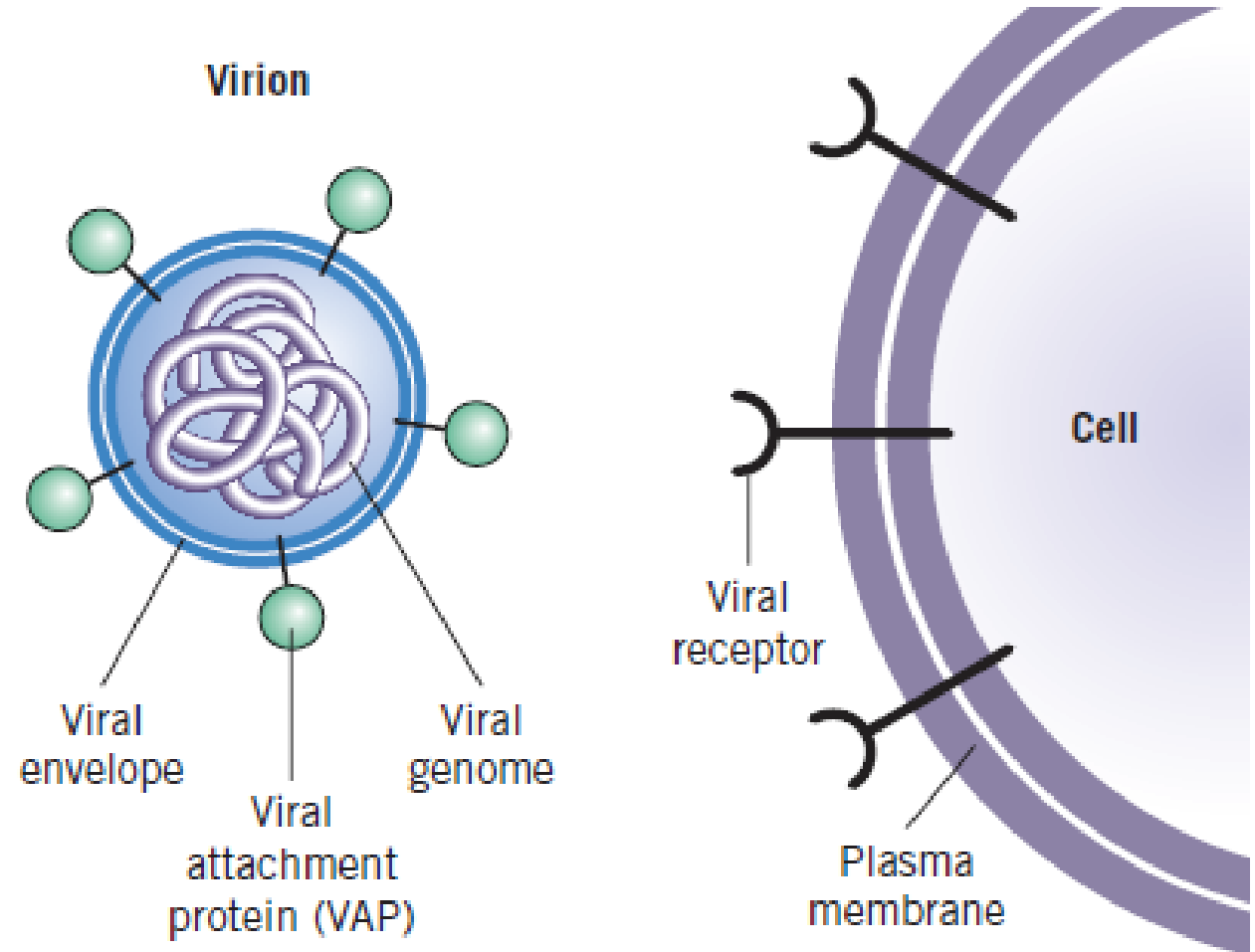


npr.org



Přichycení virové částice a vstup do buňky

- každý virus se může vázat na jeden nebo více receptorů
- virové receptory jsou přirozeně se vyskytující molekuly sloužící fyziologickým procesům buňky
- povrchové antigeny viru, které se váží na receptor na hostitelské buňce, se označují na VAP (virion attachment proteins)



Přichycení virové částice a vstup do buňky

- interakce mezi virovou částicí a receptorem může být nicméně trochu složitější: příklad HIV – virus HIV se váže na **primární receptor (CD4)** a **koreceptor**. Virus se dostane do buňky jenom v případě, že se naváže na obě molekuly. Různé buňky (jako makrofágy a CD4 lymfocyty) exprimují jiné koreceptory. Některé izoláty viru HIV se dokáží vázat vedle CD4 jenom na jeden konkrétní koreceptor, což determinuje buněčné populace citlivé k infekci.

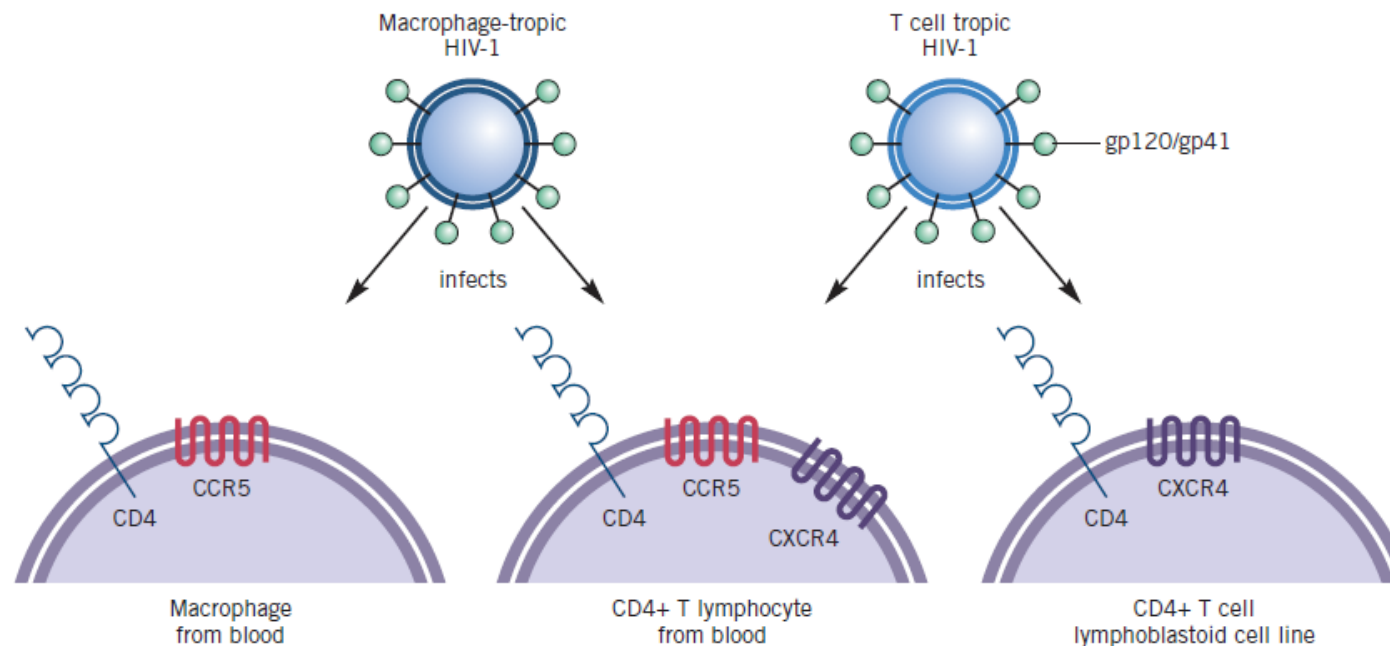


FIGURE 3.2 Cells that are permissive for the entry and replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) carry two receptors on their surface. The primary receptor is the CD4 protein, a protein expressed on the surface of certain subsets of lymphocytes (so-called CD4+ cells). The gp120 spike glycoproteins of all HIV strains can bind to human CD4. In addition, virus entry requires a coreceptor, which is either CCR5 or CXCR4; these proteins are members of a large family of molecules that serve as chemokine receptors on the surface of lymphoid cells or macrophages. Some HIV-1 isolates are macrophage-tropic because their gp120 spikes use CCR5, a chemokine receptor that is expressed on the surface of macrophages, while other isolates are T cell-tropic because they utilize the CXCR4 molecule, another chemokine receptor expressed on the surface of T cell lines. Both kinds of viruses can replicate on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), a mixed population of cells that express both coreceptors. Some HIV-1 isolates (not shown) are 'dual-tropic' since they can utilize both coreceptors. (Recent studies have shown that macrophages express low levels of CXCR4 at concentrations insufficient for entry of T cell-tropic HIV-1.)

Vazba VAP-receptor – vazba na základě **mnohočetných nekovalentních interakcí**; ovlivněno teplotou, iontovou silou, pH, složením živného média, přítomností séra

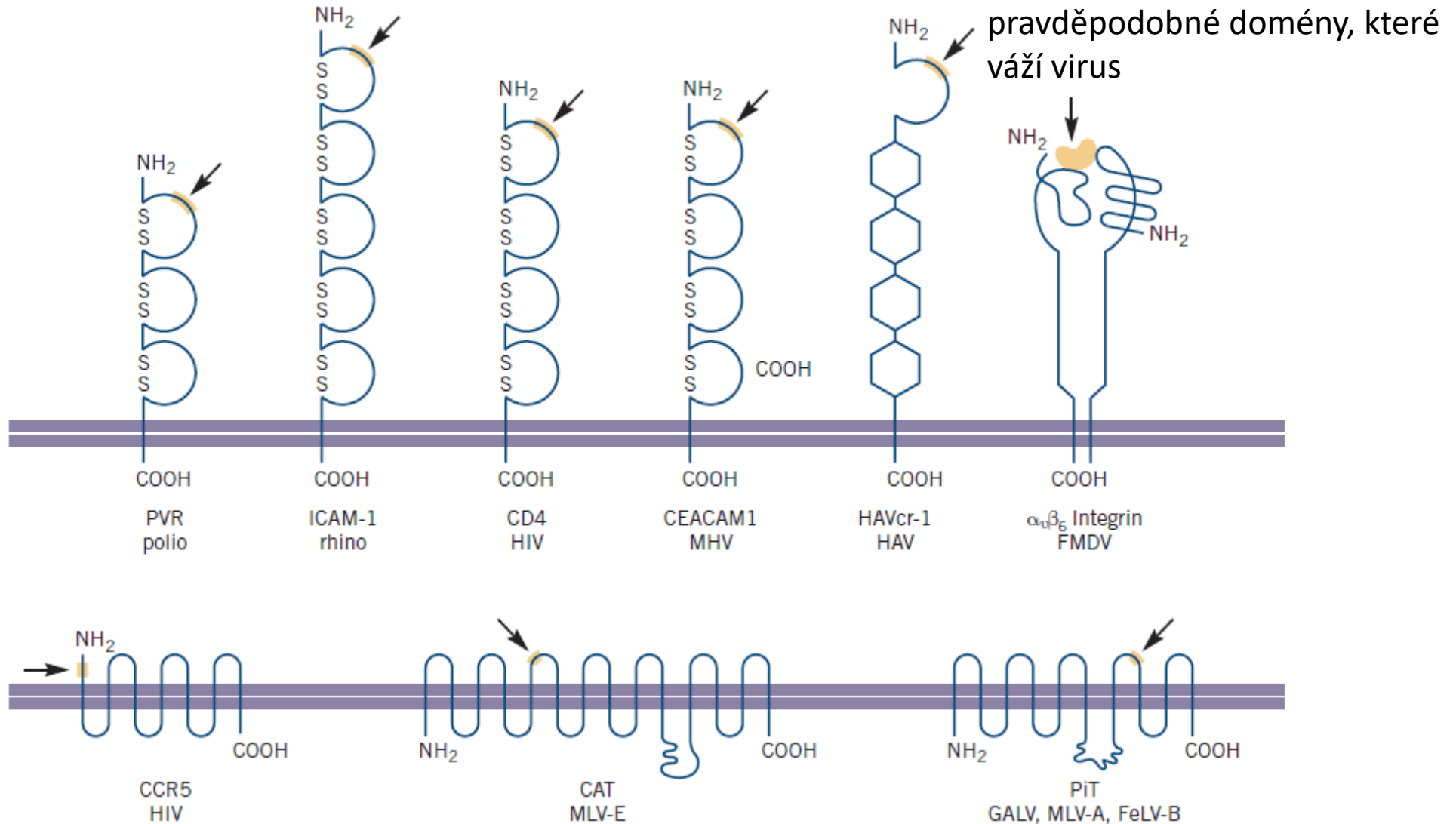
-Někdy přichycení nepřímo – např. pomocí zprostředkujících molekul

-Pro zahájení endocytózy většinou nutná **specifická interakce VAP-receptor**, ale existují výjimky

-Interakce probíhá velmi rychle



- mnoho virových receptorů jsou glykoproteiny – většina proteinů na povrchu buněk jsou glykosylované během jejich posttranslačních modifikací



receptory se liší svou strukturou a fyziologickou funkcí

Glykoproteinové receptory

- VAP se váže na doménu, která představuje malou část povrchu glykoproteinu
 - doménu může tvořit polyprotein nebo cukerná složka

Neproteinové receptory

- jako receptory mohou sloužit i glykolipidy nebo glykosaminoglykany

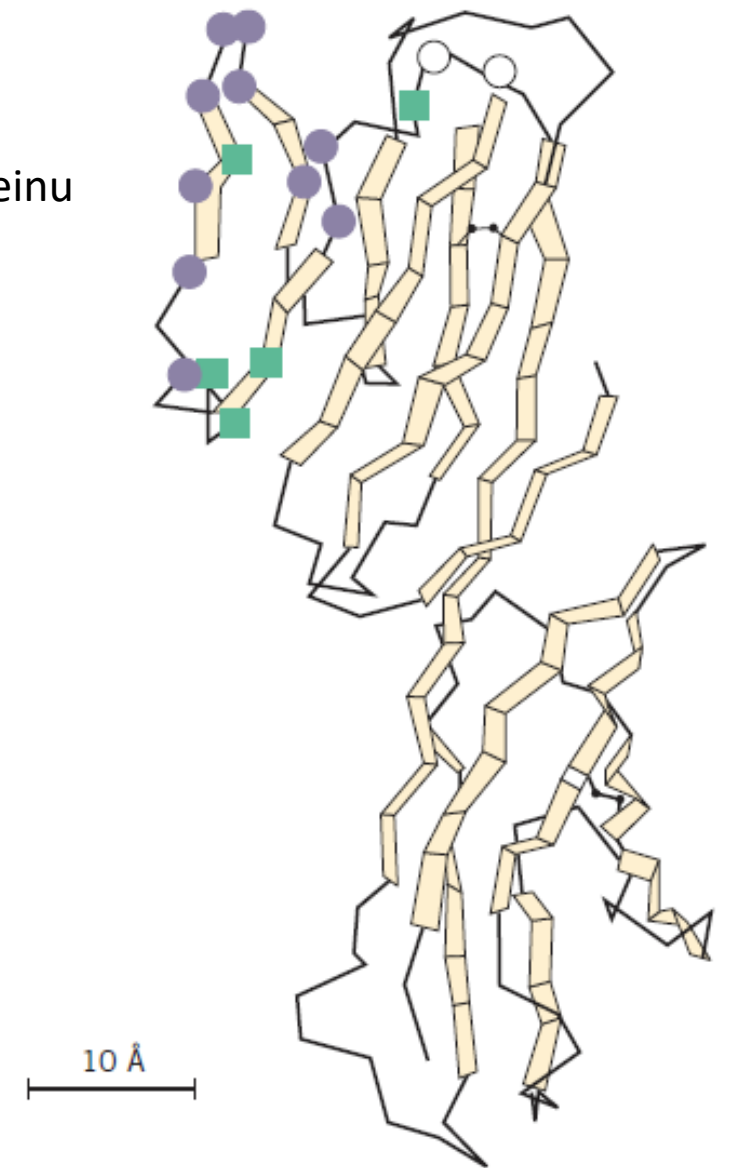
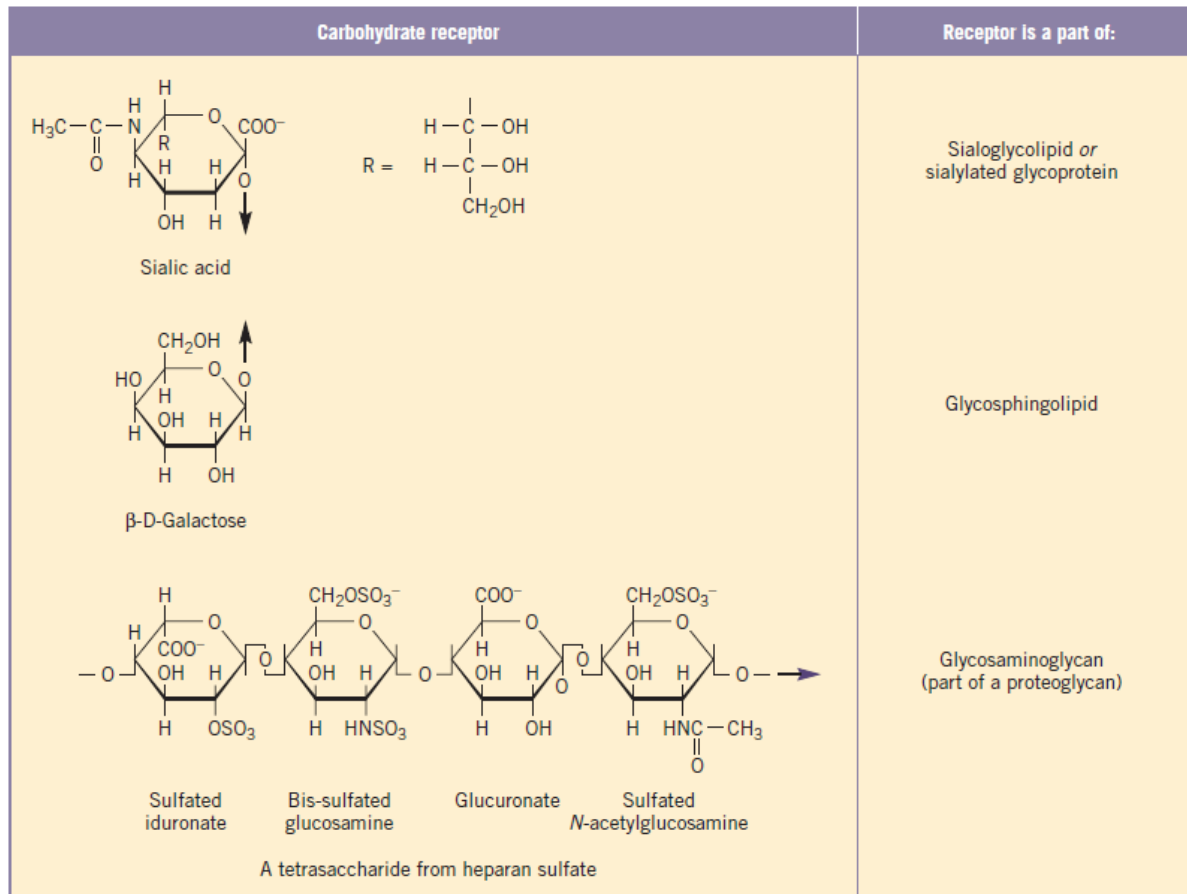
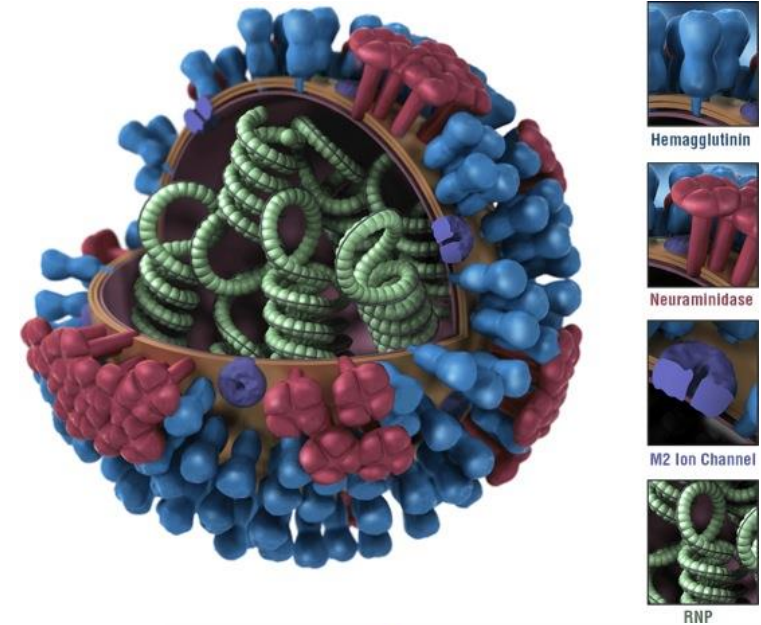


FIGURE 3.4 Molecular structure of the two outermost domains of CD4 to show the site that binds gp120, the VAP of HIV. The filled circles and squares indicate amino acids that are part of the virus spike-binding domain. After

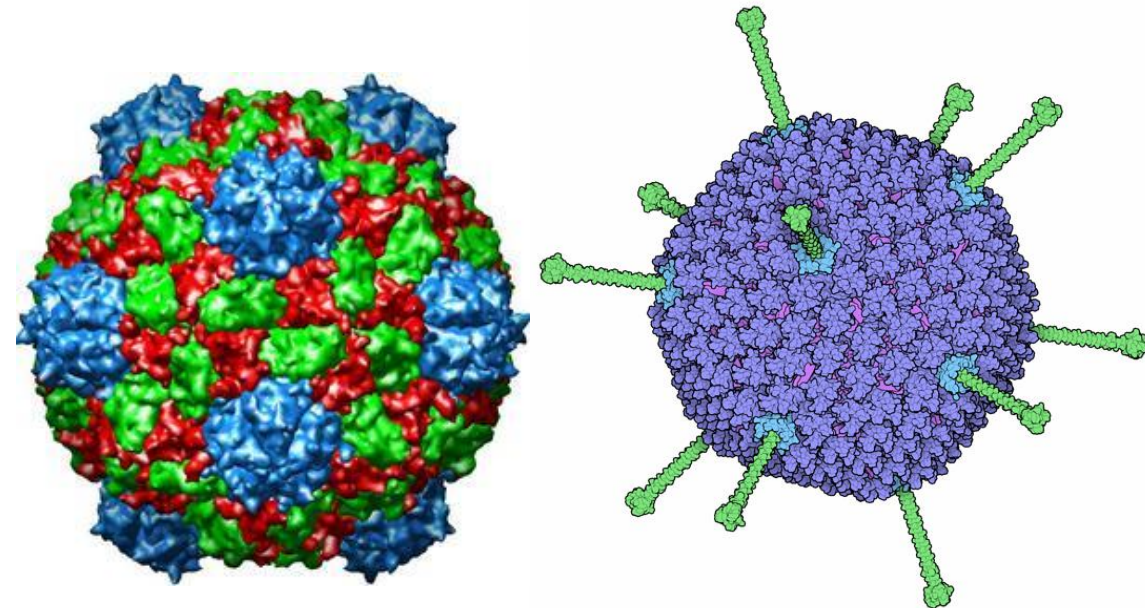
- neproteinové receptory

- např. virus HIV může infikovat i některé neurální nebo intestinální buňky, které neexprimují CD4 glykoprotein. V takovém případě je alternativním receptorem **galaktosylceramid** (glykosfingolipid).
- **kyselina sialová** (receptor pro virus chřipky) se také vyskytuje kromě glykoproteinů jako část komplexních lipidů – sialované lipidy tedy mohou také sloužit jako receptory pro virus chřipky
- glykosaminoglykany jsou sulfatované polymery karbohydrátů, které tvoří část proteoglykanů
 - **heparan sulfát** (glykosaminoglykan) slouží jako receptor mimo jiné viru herpes simplex, ale i další molekuly mohou být zapojeny



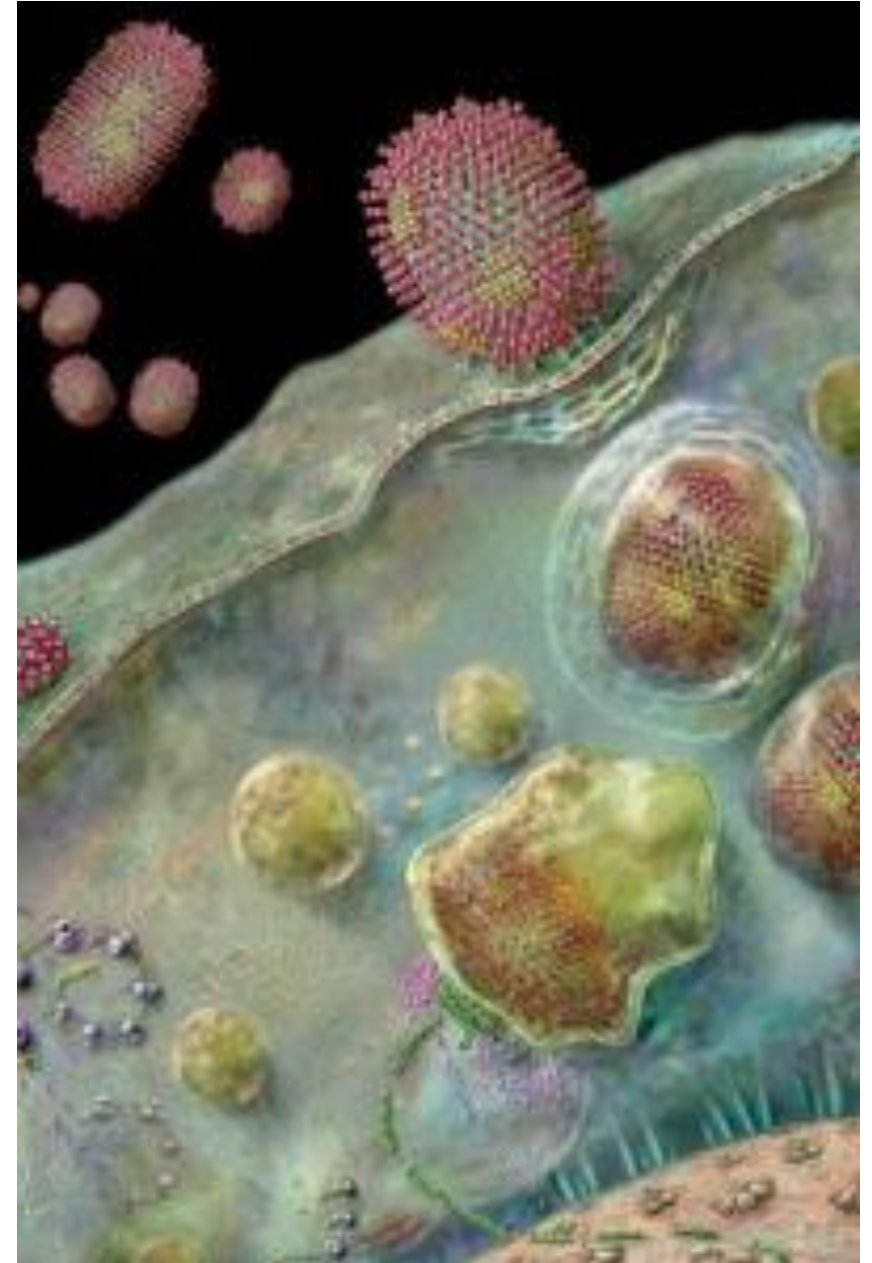
VAP – obvykle jeden typ VAP na konkrétní virus

- u obalených virů je to obvykle povrchový spike, vyčnívající z obalu viru
- u neobalených virů to jsou buď spikes nebo vnější struktury virového kapsidu
- protilátky obvykle neutralizují virus vazbou na VAP, proto mnohé viry mají vazebné místo VAP ukryto ve struktuře špatně přístupné pro protilátky



Vstup viru do buňky

- vícekový proces, který následuje po přichycení virové částice na receptor
- končí uložením virového genomu (či nukleokapsidu) do cytosolu nebo do jádra



Endocytóza viru

Endocytóza – proces, kdy buňka **internalizuje** extracelulární molekuly

-Založeno **na invaginaci** plasmatické membrány

- buď zprostředkováno receptory (vznikají klatrinem obalené vezikuly) či nespecifické (**pinocytóza**)

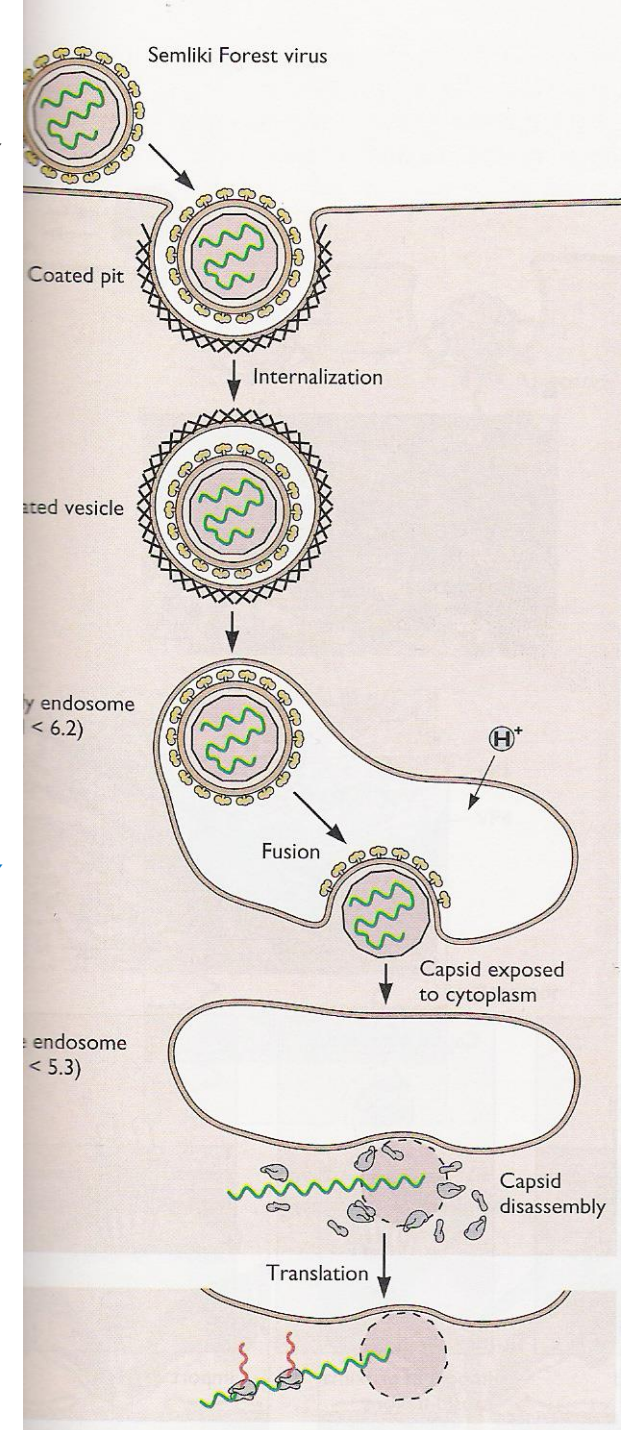
Internalizace viru – struktury navázané na receptory plasmatické membrány pronikají do buněk pomocí klatrinem obalených vezikul

-Obaly vezikulů se v cytoplasmě uvolní a vezikuly potom fúzí s dalšími složkami buňky

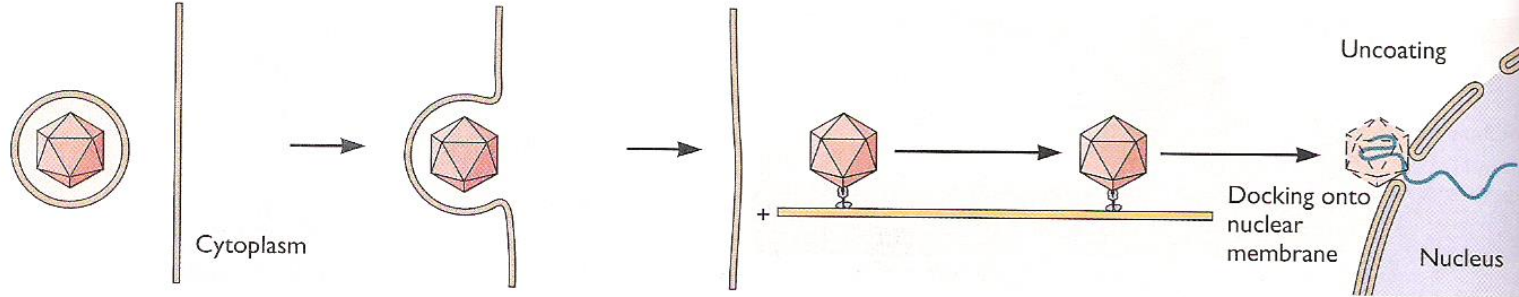
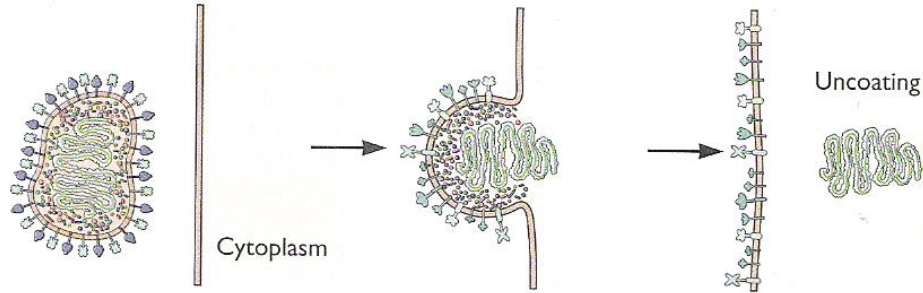
-Obalové proteiny vezikulů, klatrin a receptory se pak **vracejí** zpět k plasmatické membráně

Fúze endocytických vezikulů se složkami buňky – vezikuly transportovány k endozómům, tam v raném endozómu dojde jednak k recyklaci klatrinu a obalových receptorů za vzniku **endolyzozómu**

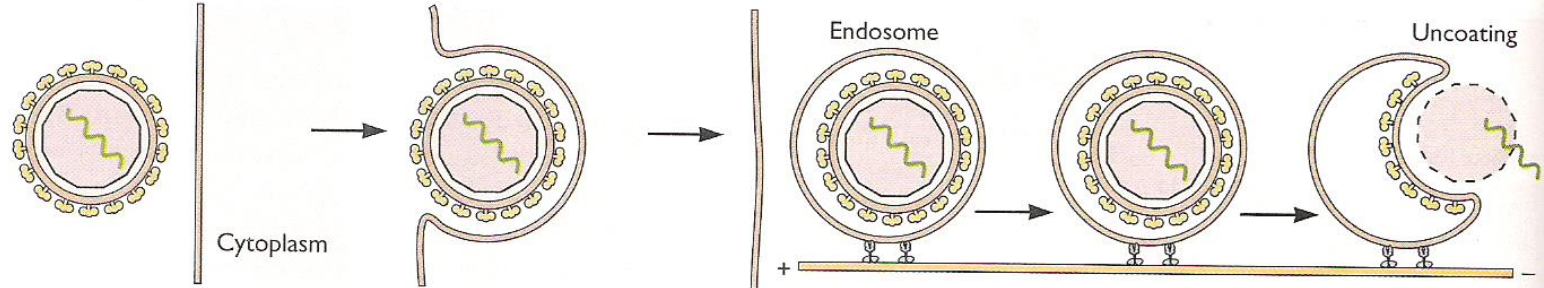
V endolyzozómu jsou podmínky pro fúzi virového obalu s membránou endolyzozómu – uvolnění genomu viru a jeho transport do místa replikace



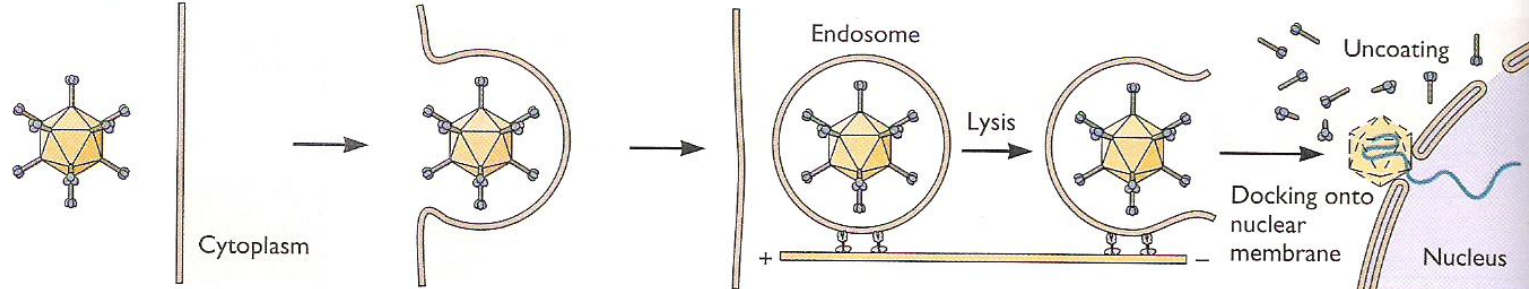
Uncoating at the plasma membrane

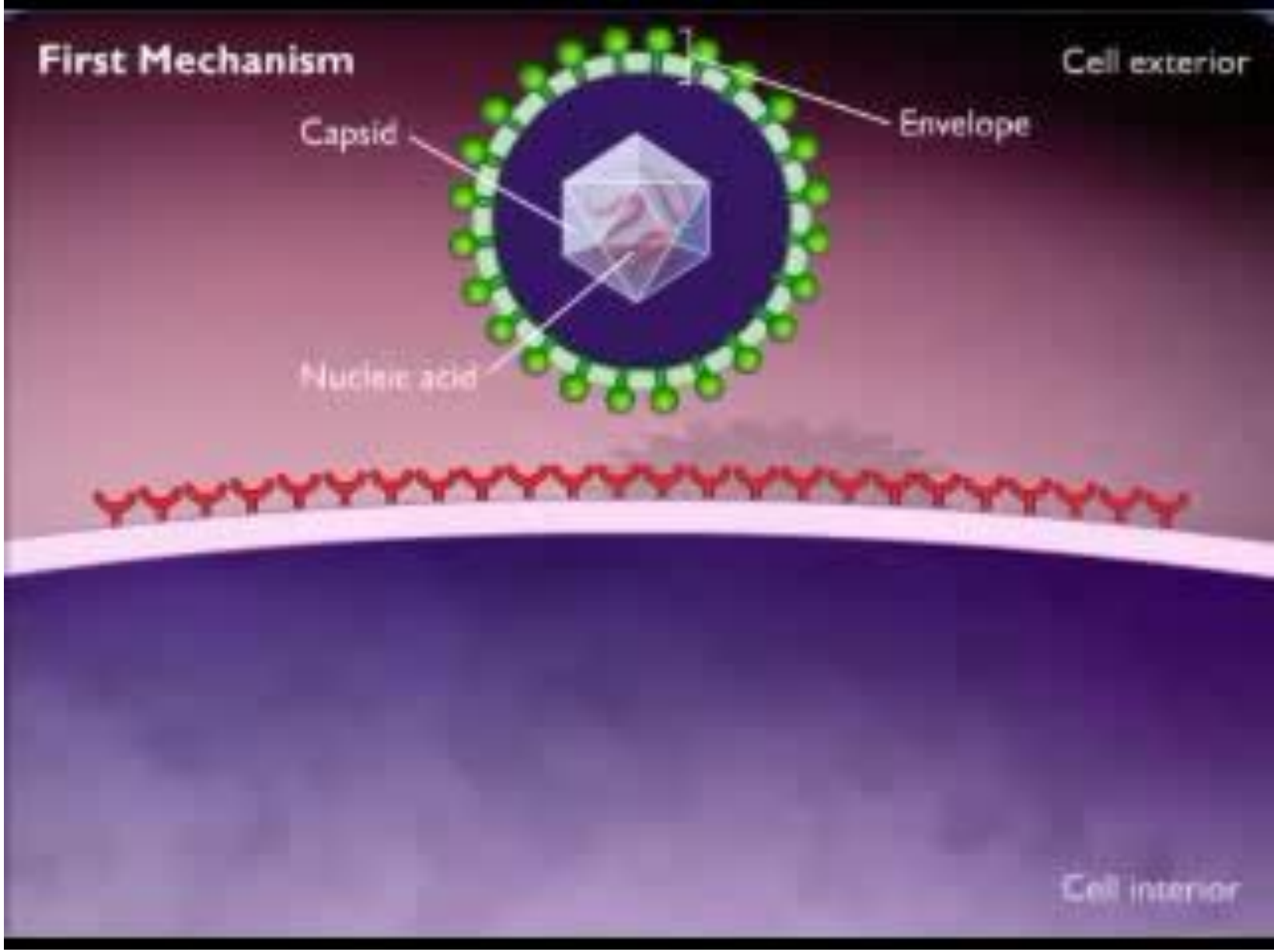


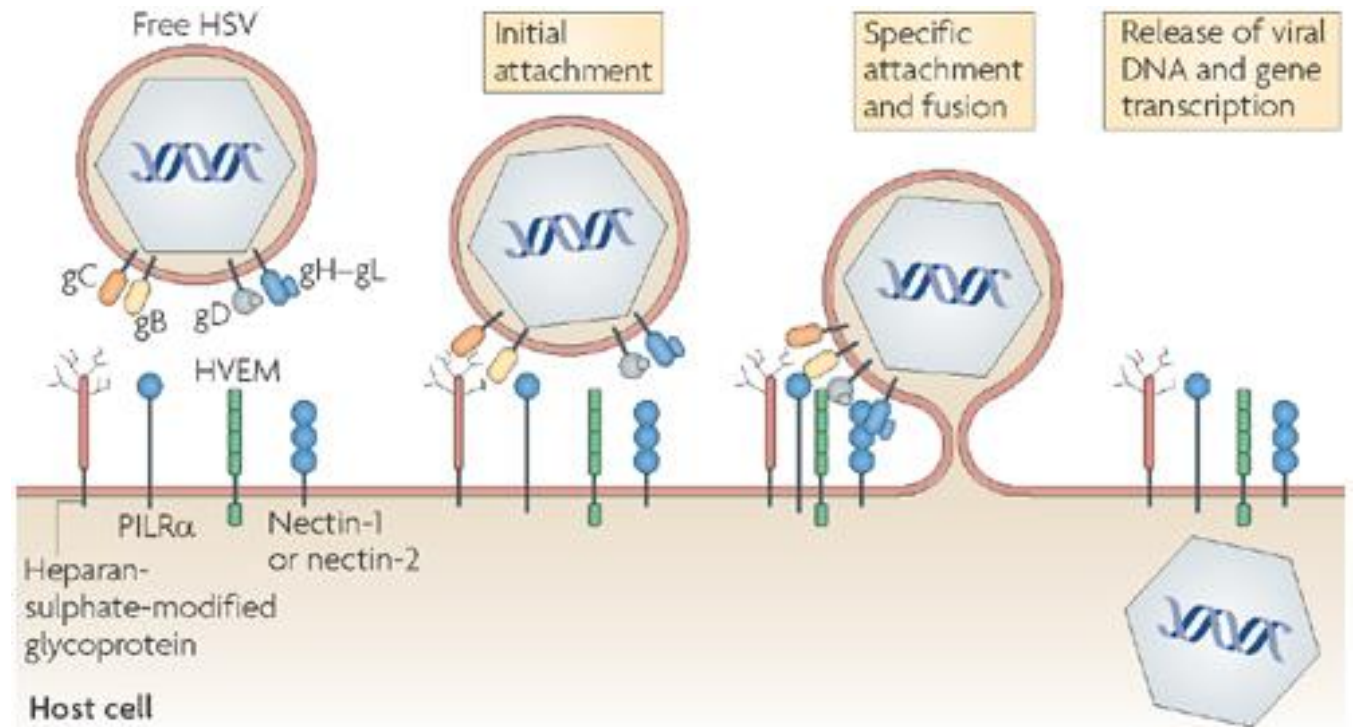
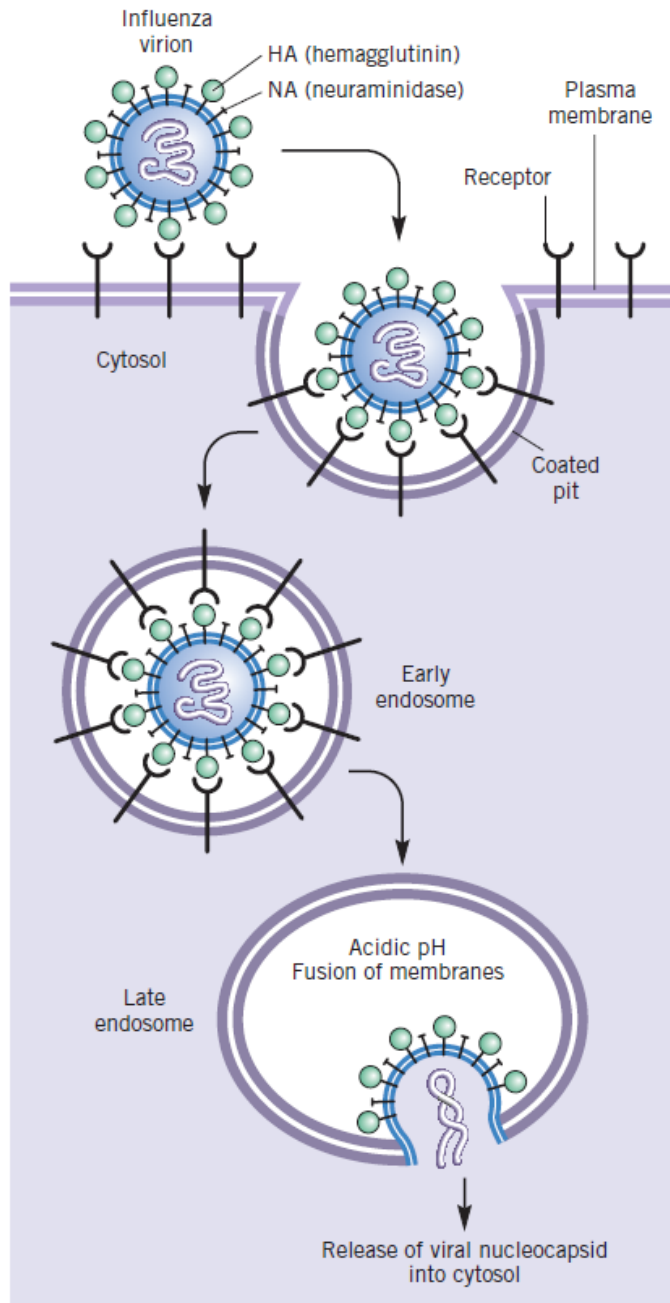
Uncoating within endosomes

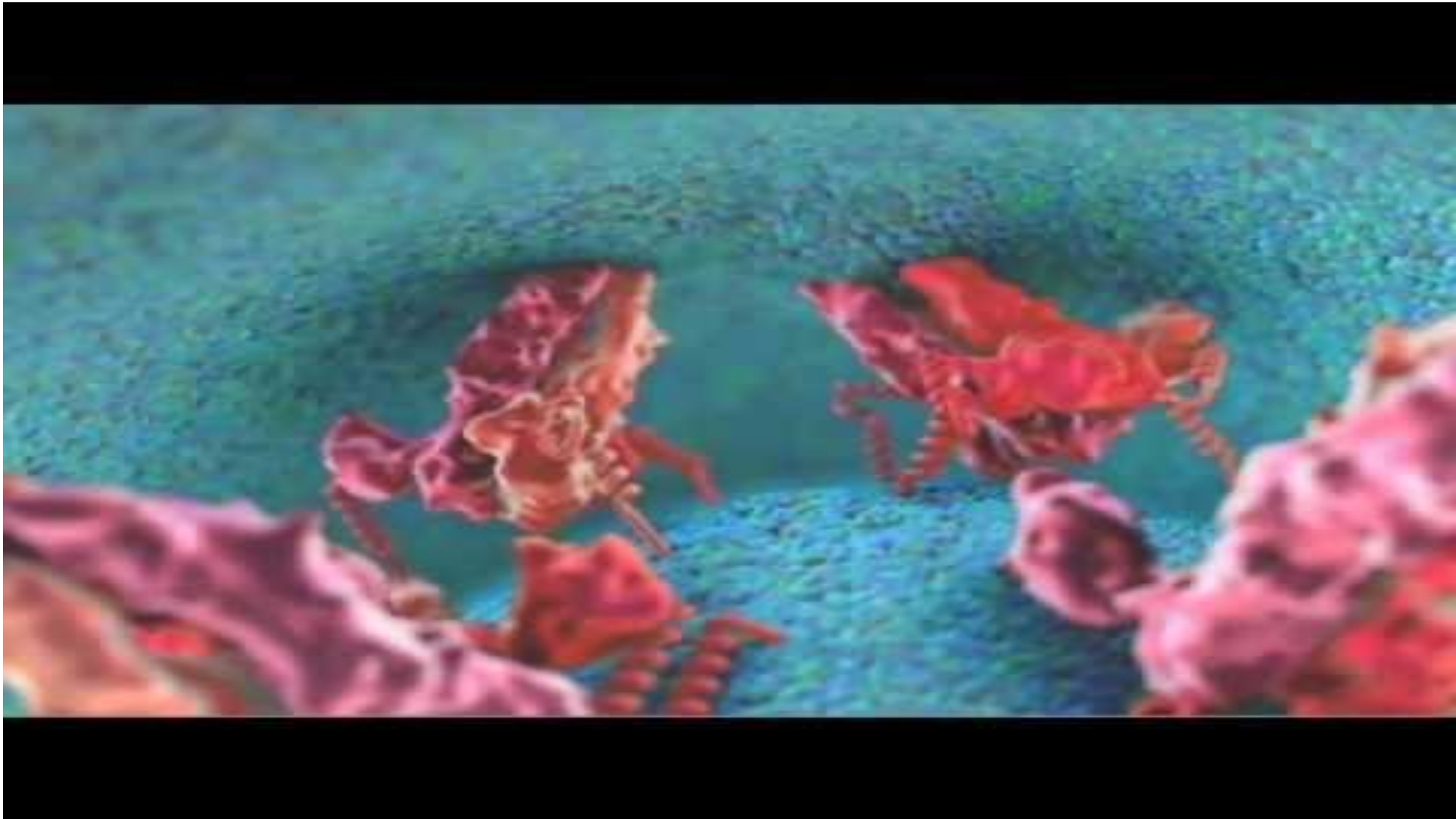


Uncoating at the nuclear membrane



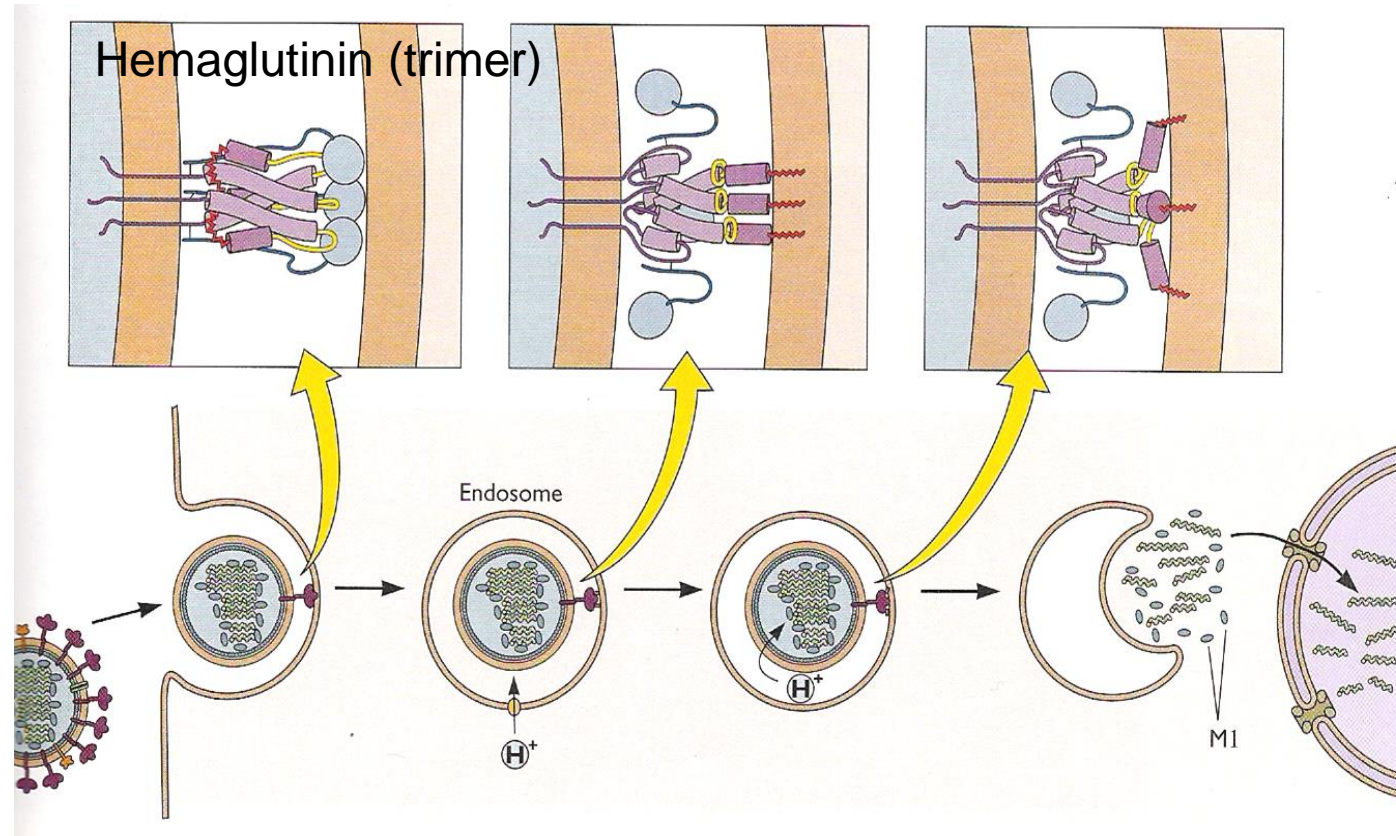
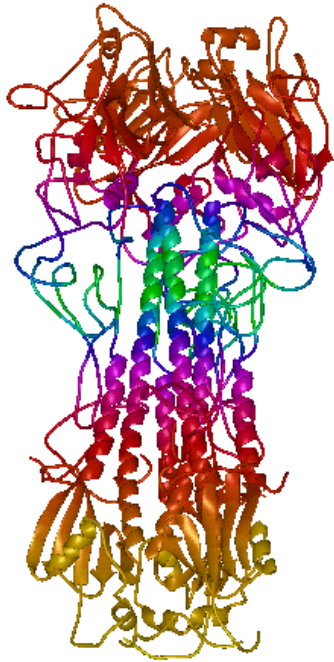






<https://www.youtube.com/watch?v=3P2qUmg-CxI>

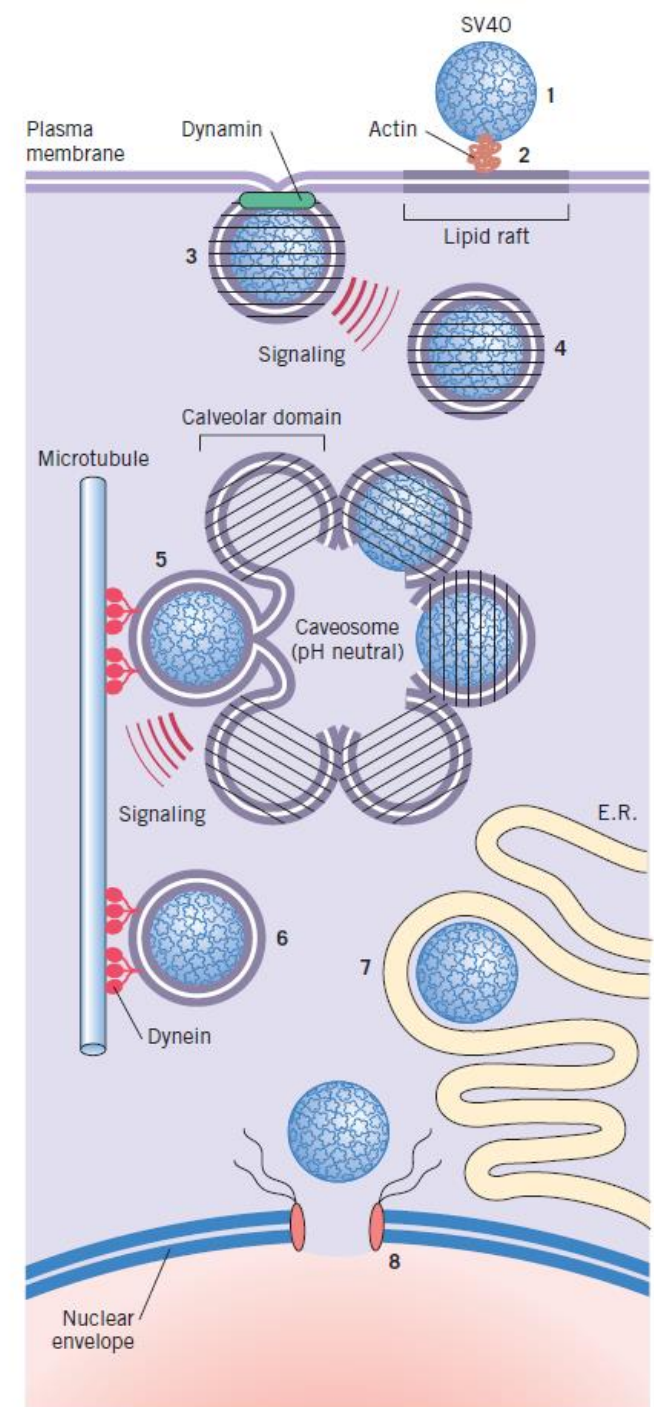
U **viru chřipky** nestačí pro uvolnění genomu fúze obalové membrány viru s membránou endozómu, proto fúzní transmembránový protein **M2** má též funkci **protonového kanálu** - to vede k vyšší acidifikaci a **rozrušení virového nukleoproteinu s matrixovým proteinem viru M1**, což vede k **uvolnění ribonukleoproteinu**

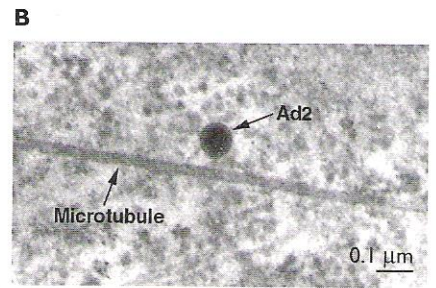
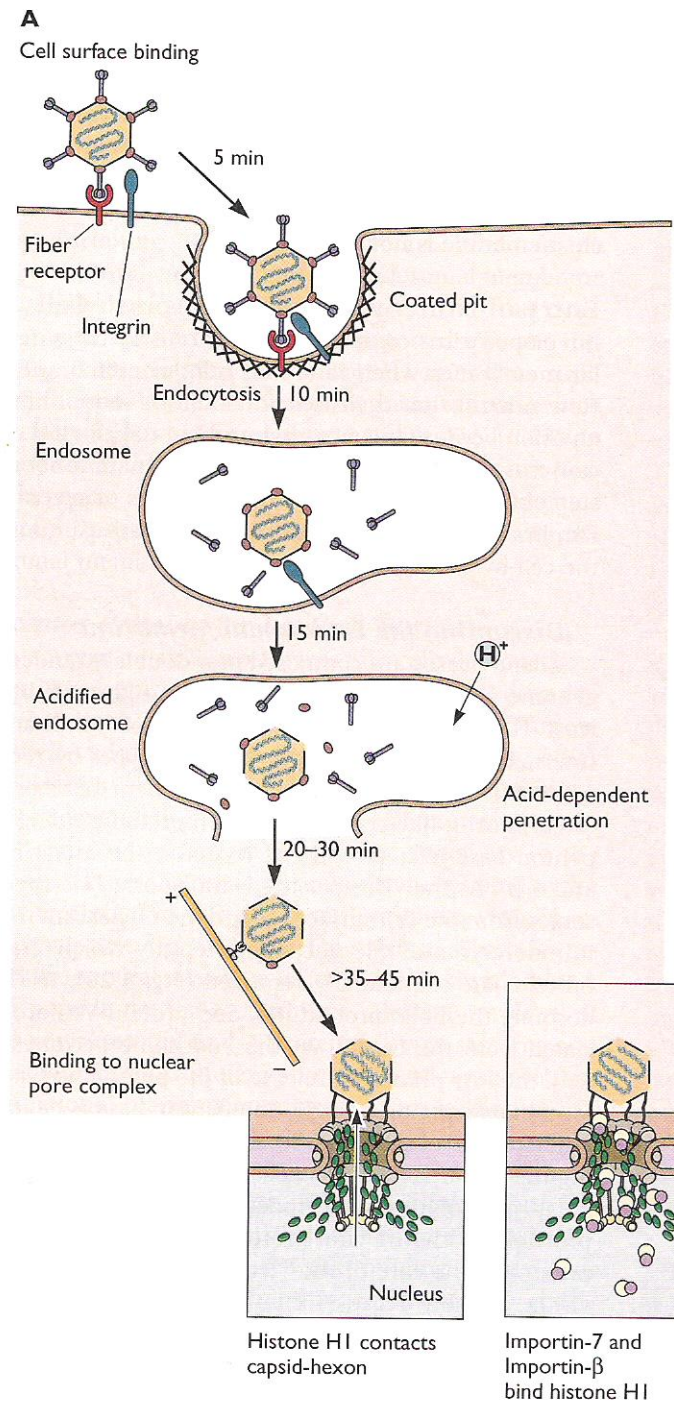


Neobalené viry

- není zapojena fúze membrán

- příklad polyomavirus SV40
 - 1. virová částice se váže na gangliosidy plasmatické membrány
 - 2. virus je inzerován do lipidických raftů
 - 3. lipidické rafty jsou začleněny do caveolinem obalených váčků
 - 4. proběhne caveolární endocytóza
 - 5. caveoly asociují s caveosomy a virus vstupuje do váčků bez caveolinu
 - 6. vesikuly asociují s dyneinem a jsou nesený po mikrotubulech
 - 7. vesikul předá virovou částici do hladkého endoplasmatického retikula
 - 8. virus je uvolněn poblíž jaderného póru





Shrnutí receptory:

- různé molekuly včetně glykoproteinů, glykolipidů a glykosaminoglykanů mohou sloužit jako virové receptory
- doména receptoru, která váže virus, může být buď polypeptidová sekvence nebo cukerný zbytek, často vázaný na externí konec receptorové molekuly
- různé viry využívají různé receptory
- v některých případech je pro vstup viru do buňky potřeba zapojit více koreceptorů
- různé izoláty stejného viru mohou preferovat různé typy receptorů (př. pasážování a adaptace na určitý typ buněk)
- ne všechny buňky, které exprimují receptory pro daný virus, jsou plně permissivní k virové infekci
- hostitelské rozdíly v expresi a struktuře receptorů mohou determinovat hostitelský rámec viru

Buněčné receptory a virový tropismus

- topismus je výraz užívaný ve vztahu k anatomické lokalizaci znaků a symptomů virové nákazy



- hlavní determinant tropismu je přítomnost/nepřítomnost buněčných receptorů pro daný virus
- hostitelská kompetence (host range) – určitá forma virového tropismu, ale zahrnuje různé mechanismy

- virový tropismus může být determinován **buněčnými receptory**
- mezi další determinanty virového tropismu patří **přítomnost/nepřítomnost buněčných proteáz, termosenzitivita viru, pH labilita viru, buněčné transkripční faktory, anatomické bariéry a hostitelská přirozená a získaná imunita**

Přítomnost buněčných proteáz

- mnohé obalené virové částice nejsou infekční v okamžiku maturace nebo pučení z buňky, protože některý jejich **povrchový glykoprotein vyžaduje proteolytické štěpení na konkrétním místě**, aby došlo k aktivaci
 - v takovém případě jsou infekční částice produkovány jen v takových buňkách, které mají buněčné proteázy v ER nebo GA, případně v extracelulárním prostoru
 - mutace v místě štěpení pak mohou výrazně ovlivňovat tropismus viru

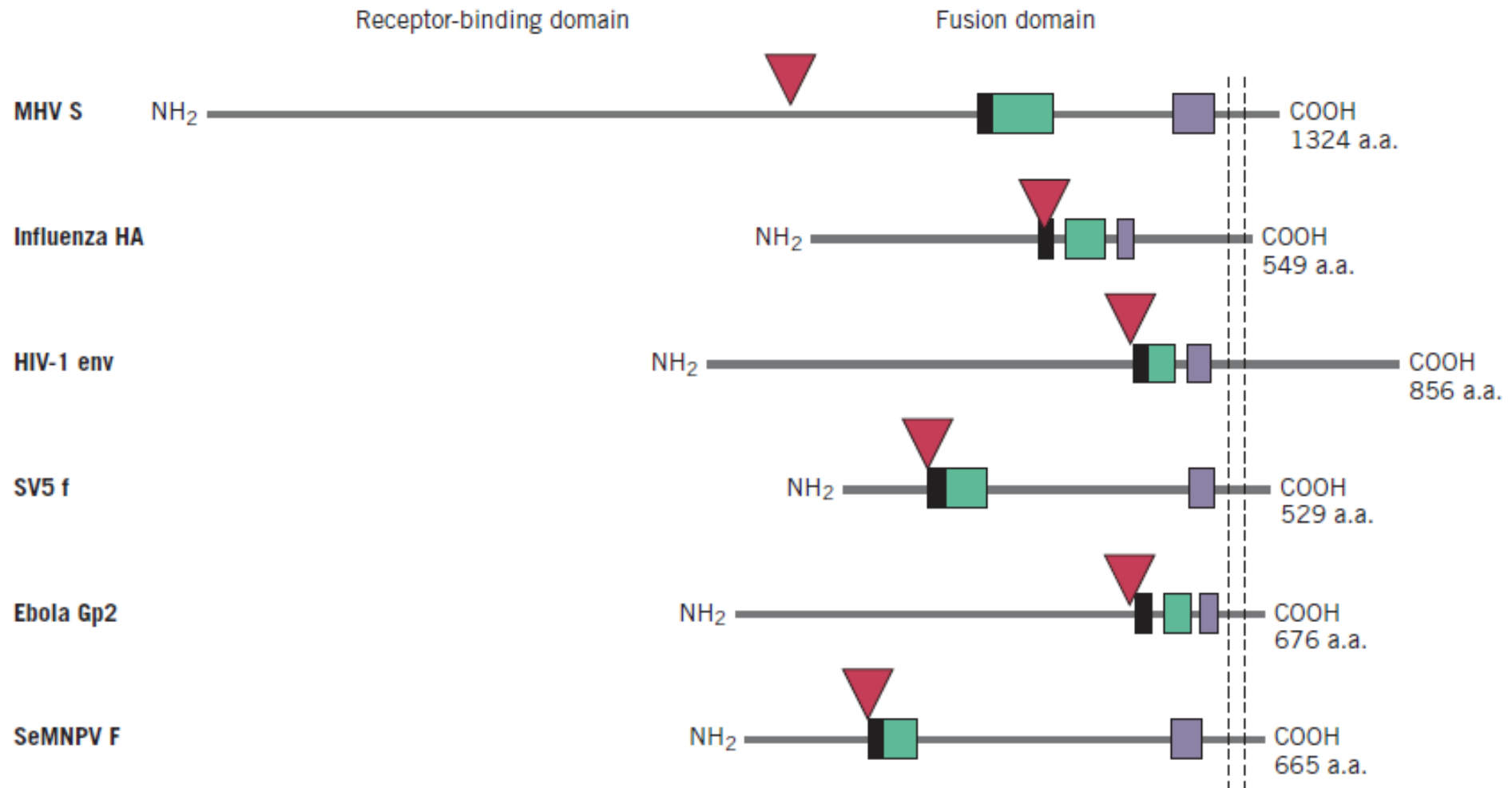
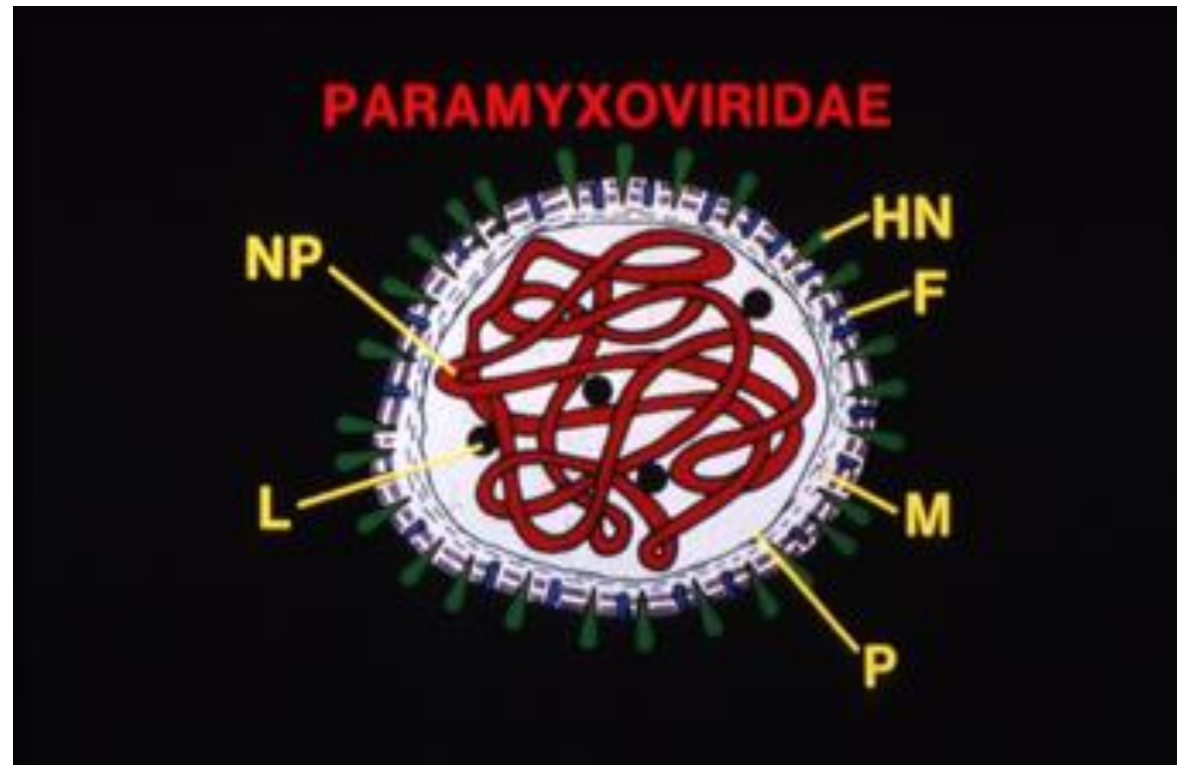


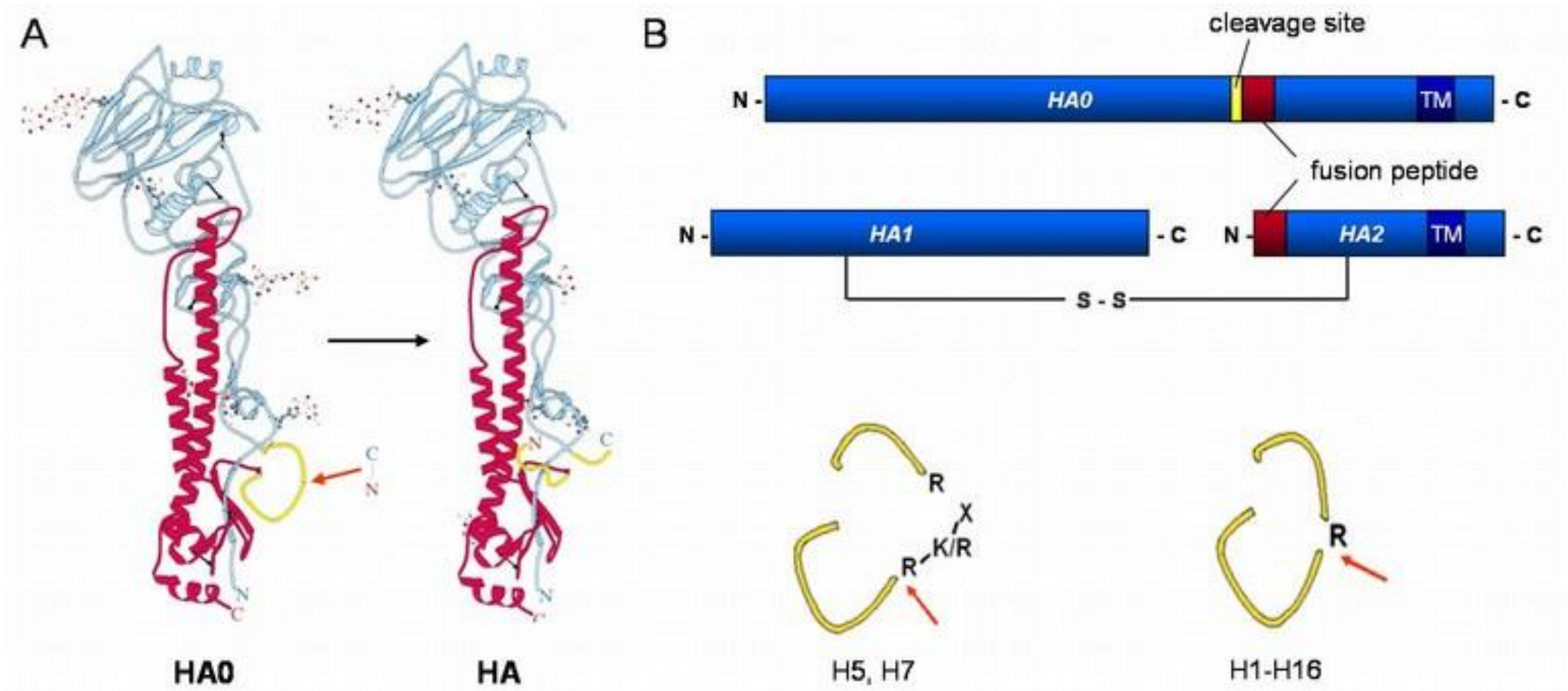
FIGURE 3.10 Schematic representation of the type 1 viral fusion proteins of six different virus families. The proteins are oriented with the exodomain pointing to the left, the transmembrane domain indicated by vertical broken line and the endodomains to the right. Red triangles indicate the cleavage sites, black boxes the putative fusion peptide and the vertical and horizontal bars HR1 and HR2 (heptad repeats), respectively. MHV: mouse hepatitis virus; SV5: simian virus 5; Ebola Gp2: ebola virus glycoprotein 2; SeMNPV F: *S exigua* multicapsid nucleopolyhedrosis virus fusion protein. After Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The coronavirus spike protein as a Class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology* 2003, 77: 8801–8811, with permission.

Př. **paramyxoviry** – kromě hemaglutinin-neuraminidázy obsahují i **fúzní peptid (F)**, který zodpovídá za fúzi virového obalu s membránou endozómu

- v mnohých případech existuje F protein ve formě **neaktivního F0** prekurzoru
- ne všechny buňky sekretují aktivační enzymy, což omezuje možnosti replikace viru a vysvětluje, proč je jeho množení omezeno na respirační trakt



Štěpení monomeru hemaglutininu u viru chřipky
-u ptáků potřebná proteáza v
respiračním a GI traktu



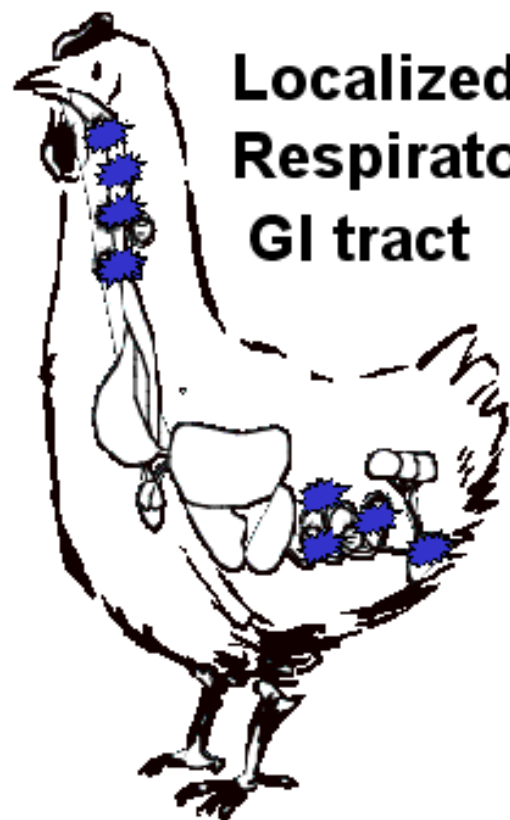
Highly pathogenic avian influenza A viruses of subtypes **H5 and H7** possess a HA with **multibasic cleavage site** that is cleaved by **ubiquitous endoproteases furin and PC6**, supporting a systemic spread of viral infection

Avian Influenza Viruses

Low Pathogenicity

(LPAI)

H1 ~ H15

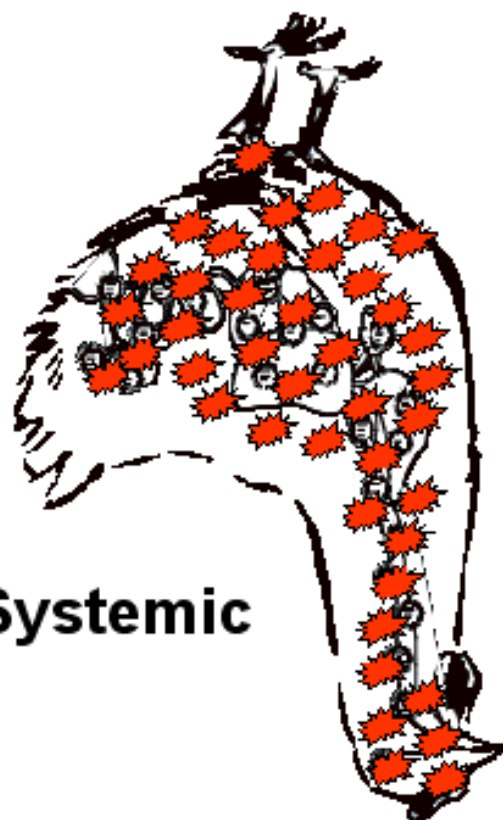


**Localized
Respiratory,
GI tract**

Highly Pathogenic

(HPAI)

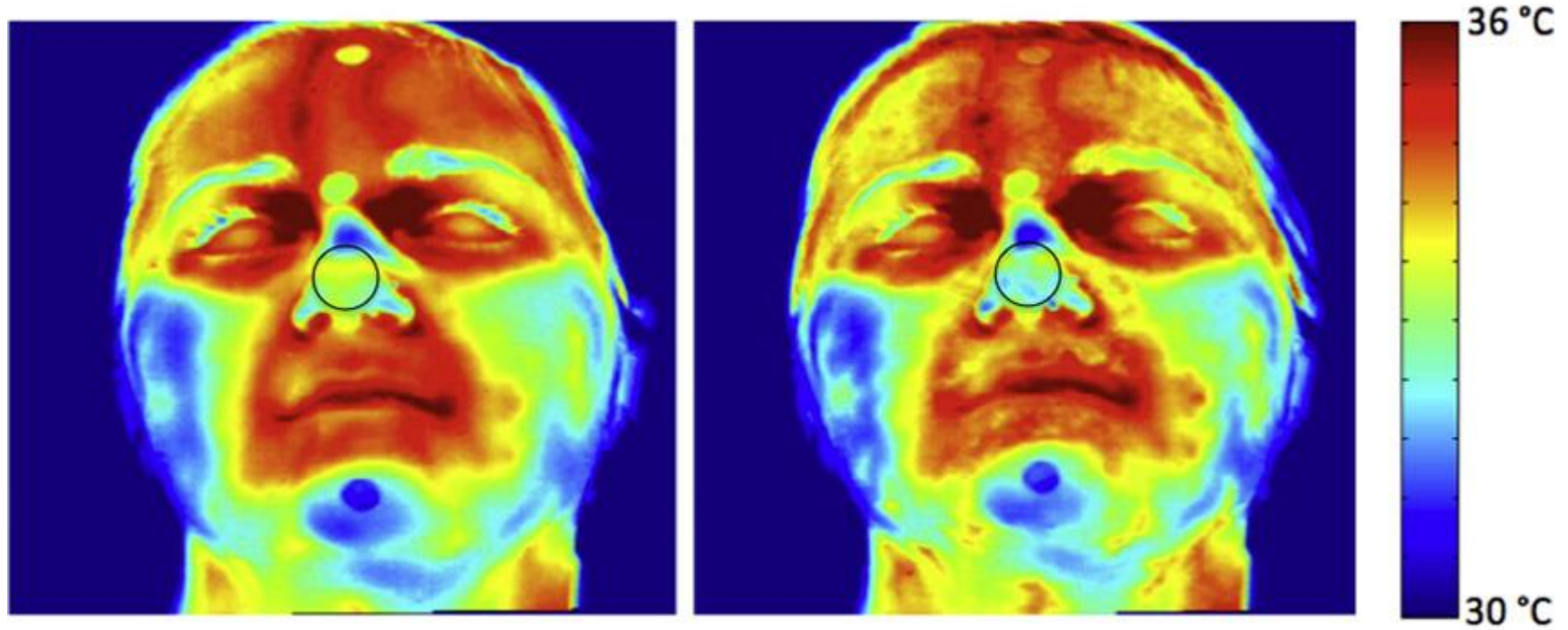
H5, H7



Systemic

Teplota

většina virů člověka se replikuje při 37°C
- některé viry množící se na slizici zejména horních dýchacích cest mají optimální teplotu pro replikaci 33°C a množí se slabě při 37°C

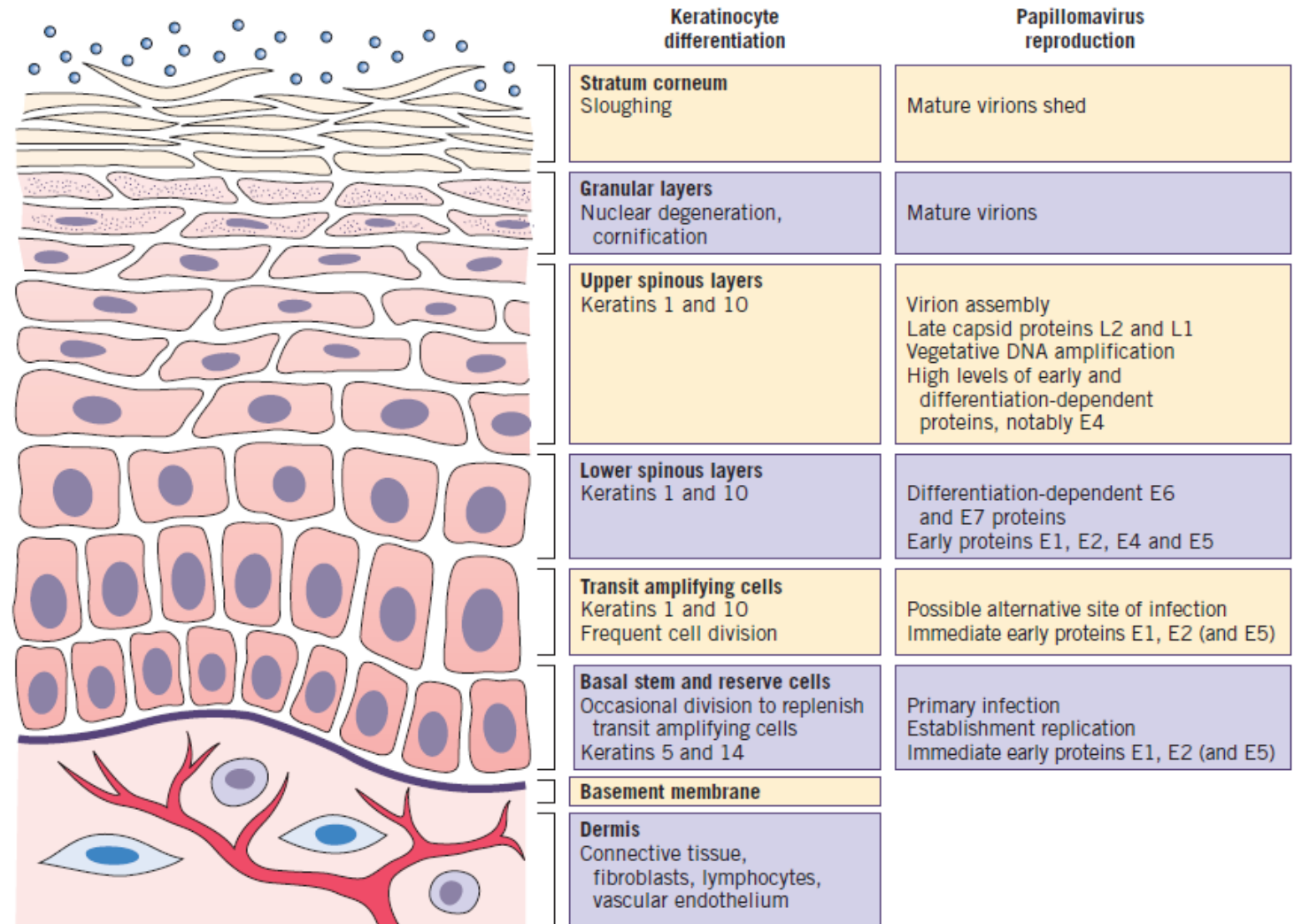


- citlivost ke kyselému prostředí a proteázám

- např. reovirus je aktivován v trávicím traktu pomocí trávicích enzymů – proteolytické štěpení vede ke konformačním změnám VAP

Transkripční kontrola tropismu

- tropismus může determinovat exprese buněčných proteinů nezbytných pro virovou replikaci (př. papilomaviry)



Tropismus mohou determinovat i **anatomické bariéry**, které virus musí překonat – bariéra krev-tkáň, hematoencefalická bariéra apod.

Hostitelská odezva k infekci – tropismus může být ovlivněn lokální **imunologickou odezvou**

Různé varianty viru se mohou lišit svým tropismem, což předurčuje průběh a závažnost onemocnění

Efekt virové replikace na hostitelskou buňku

- Infekce probíhá ve **vnímavých** (permissivních) buňkách
- V nepermissivních buňkách – se nemůže uskutečnit některý ze stupňů morfogeneze viru

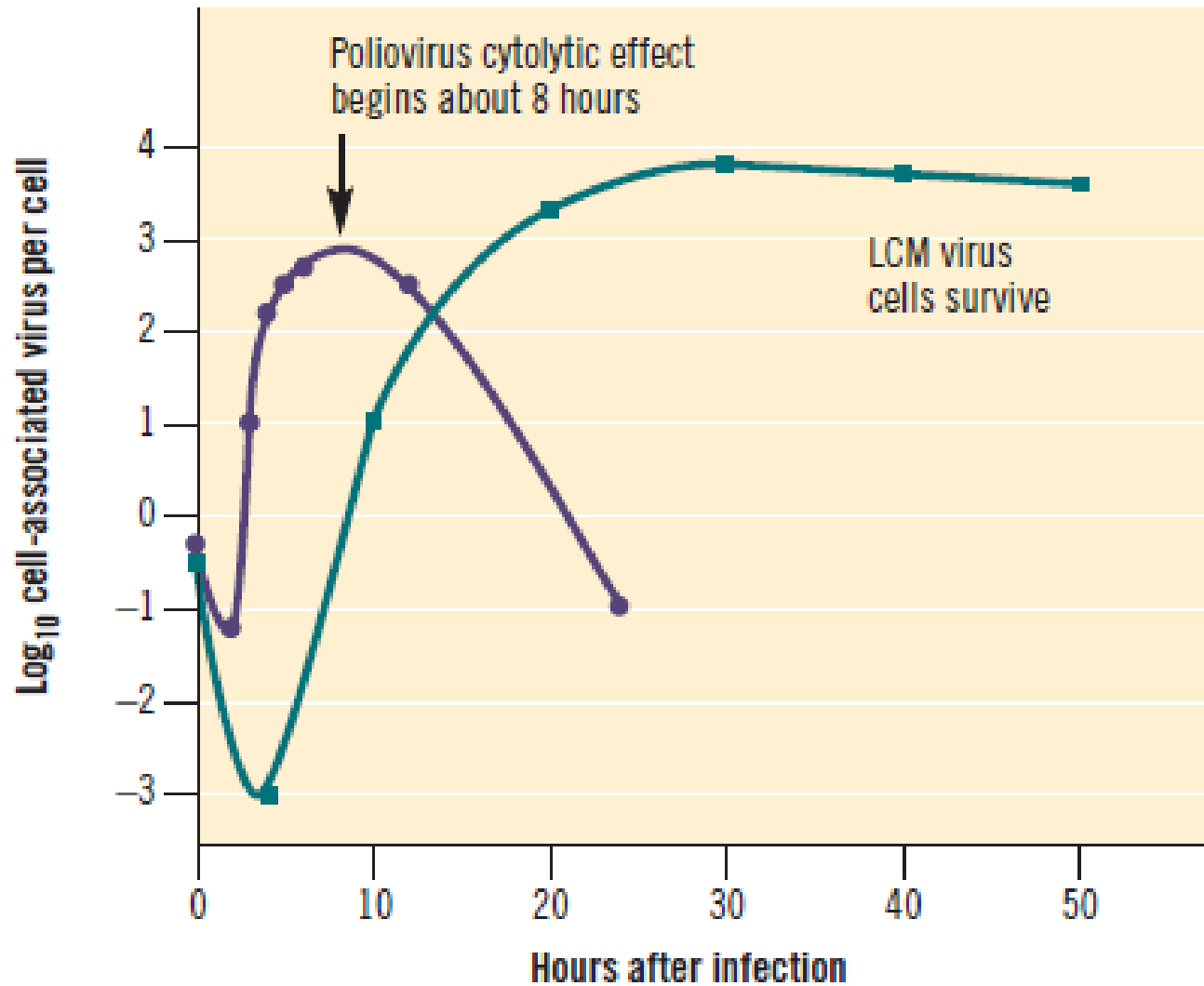
Formy a. **cytotoxicí produktivní infekce** – lytická

b. **produktivní infekce**

c. **perzistentní infekce** – virové částice se stále tvoří, buňka nebývá poškozena a dále se dělí

d. **transformace** – nádorová přeměna buňky

e. **abortivní infekce** – vznikají jen některé strukturní virové složky, netvoří se kompletní virové částice, chybí např. některý enzym



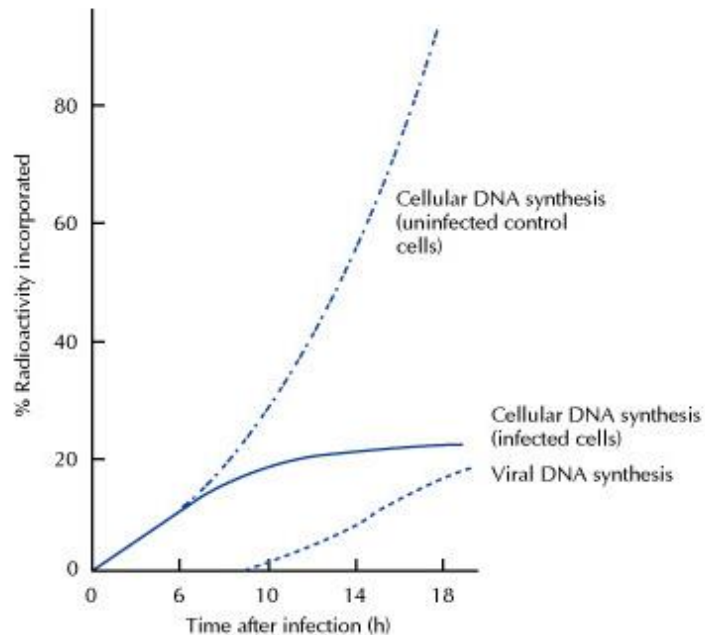
Replikace cytolýtického (poliovirus) a necytolýtického (LCMV) viru v buněčné kultuře

- neobalené viry – obvykle cytolýtické
- obalené viry – nemusí být cytolýtické

Změny v infikovaných buňkách

-Cytopatický efekt – soubor změn, které vznikají v buňce v důsledku proniknutí a rozmnožování viru a způsobují nevratné narušení jejich metabolických procesů

-Inhibice syntézy buněčných makromolekul (inhibice syntézy buněčné RNA, blokáda asociace ribozómů s buněčnou mRNA, inhibice syntézy buněčné DNA)

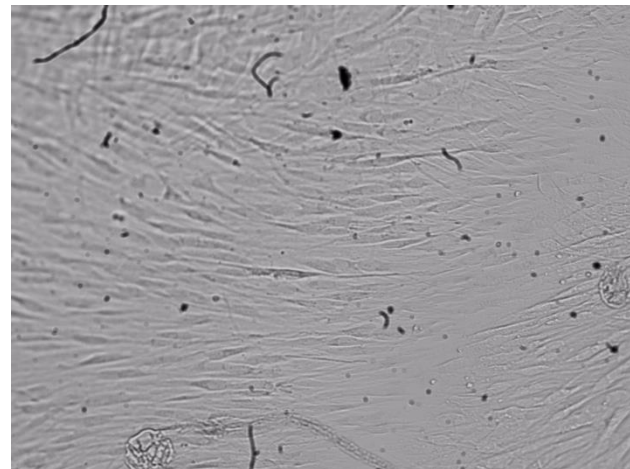
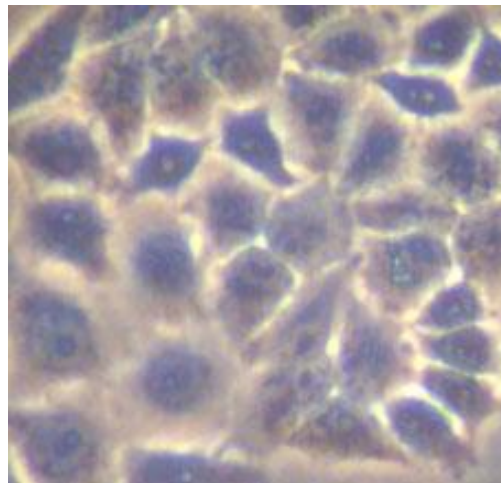


-Přestavba membrán ER a jádra, změna permeability membrán, únik iontů a makromolekul

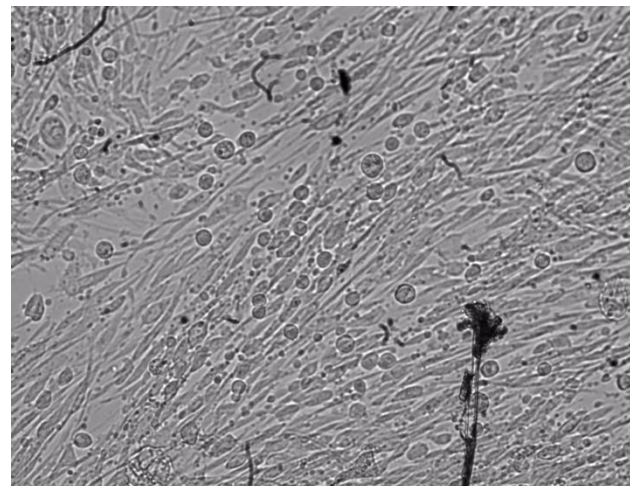
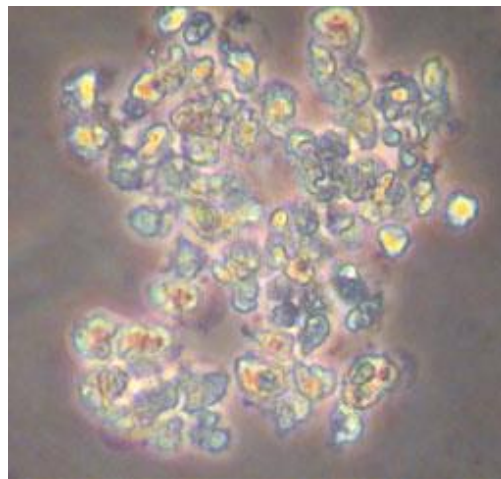
-Změny buněčných mikrofibril a mikrotubulů

Cytopatický efekt

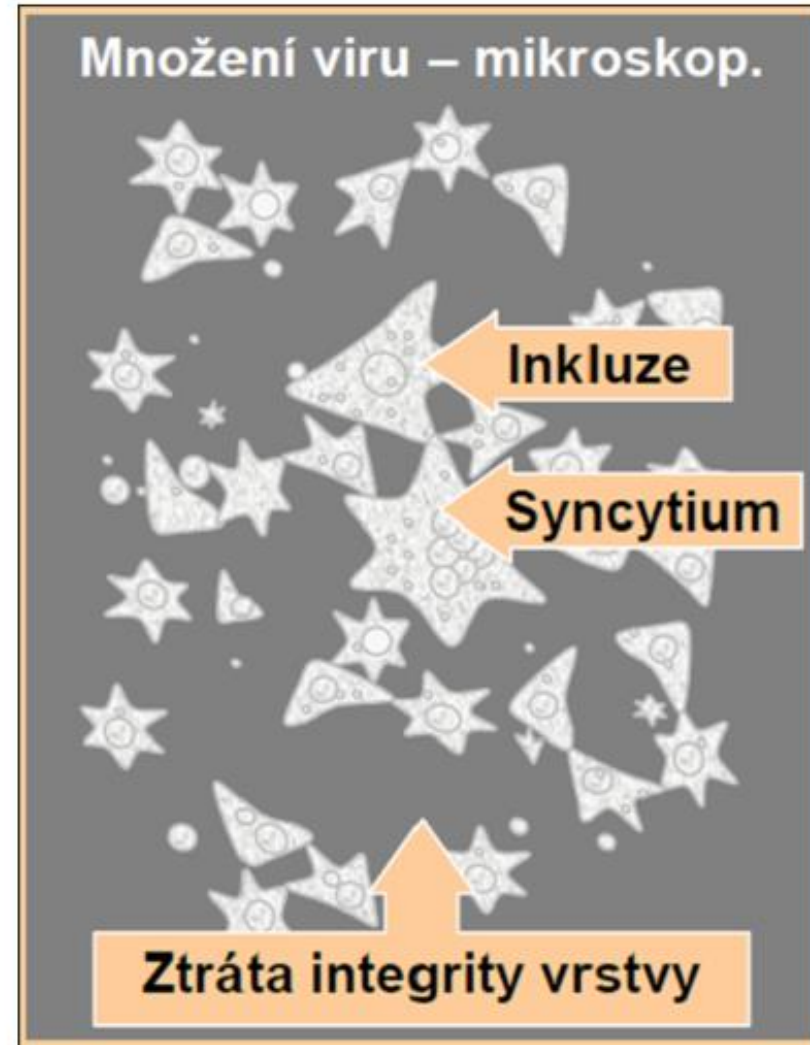
Neinfikovaná
buněčná kultura

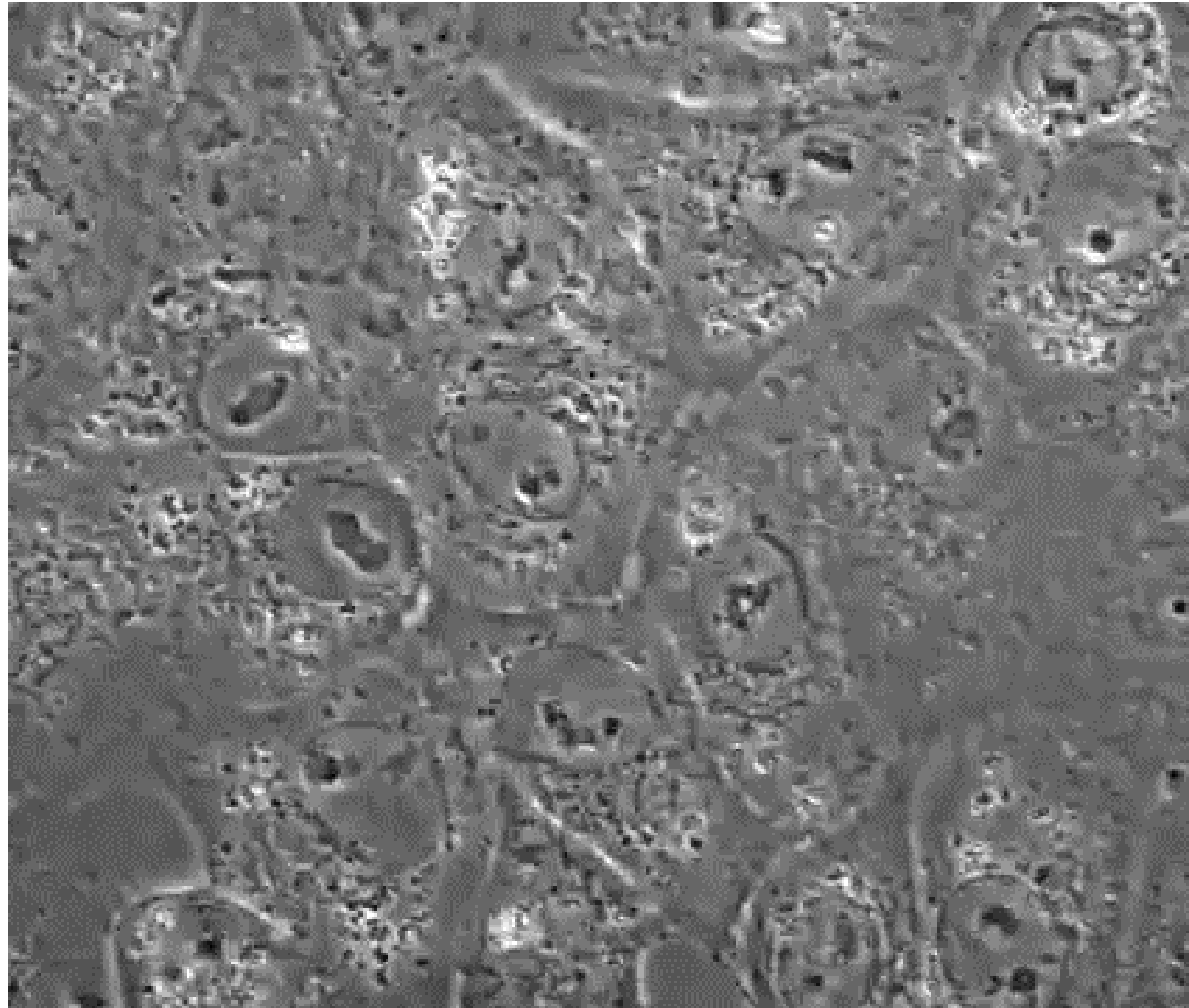


Infikovaná
buněčná kultura



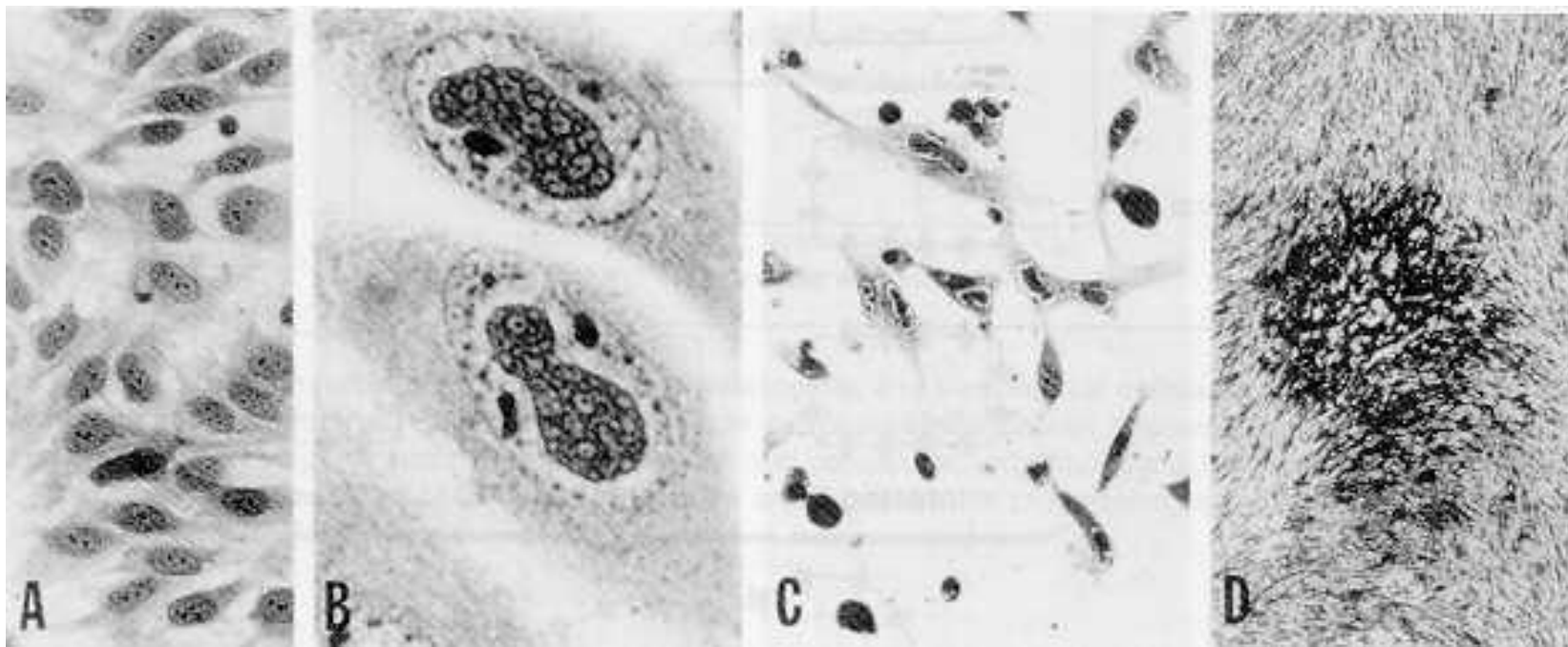
Virová infekce v buněčné kultuře





Cytopatický efekt

Změna orientace buňky na syntézu makromolekul specifických pro virus

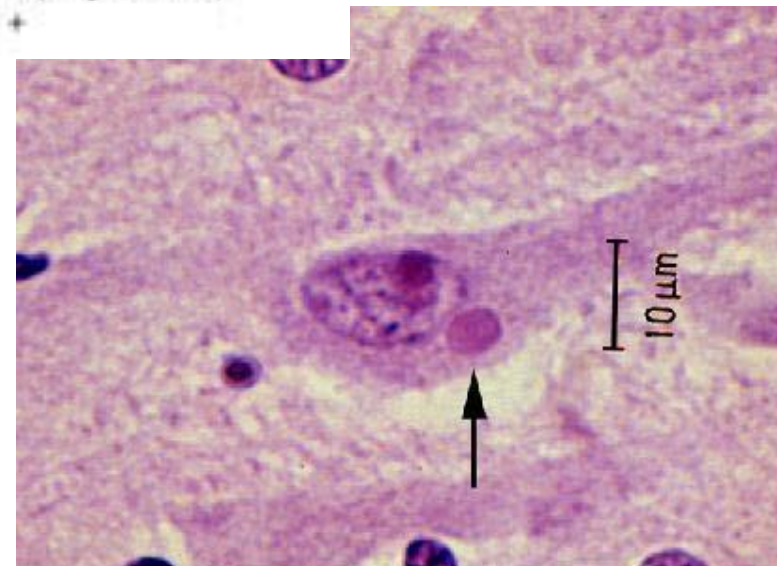


Vliv virové infekce na hostitelskou buňku

TABLE 44-2 Viral Inclusion Bodies in Some Human Diseases

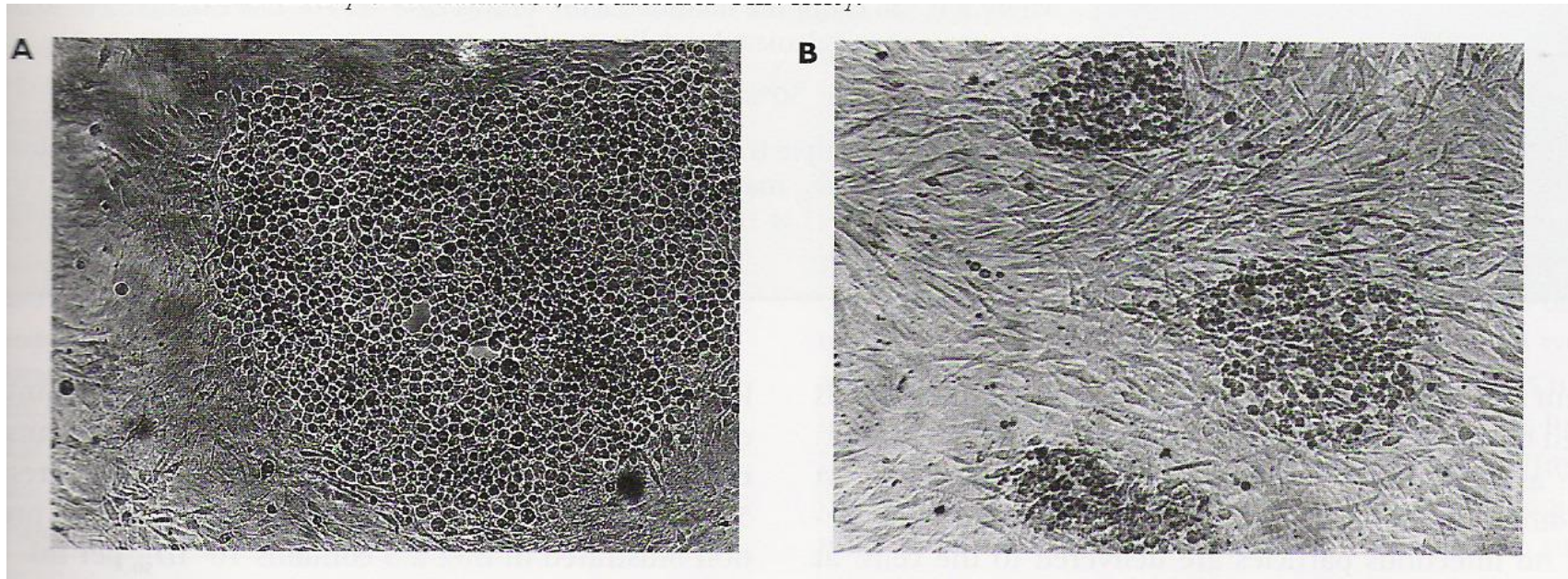
Virus	Location in Cell	
	Nucleus	Cytoplasm
Adenoviruses	Cowdry type A	—
Herpesviruses	Cowdry type A	+ (cytomegalovirus)
Papovaviruses	Cowdry type A	—
Measles	Cowdry type A	+
Vaccinia		+ (Guarnieri bodies)
Rabies virus		+ (Negri bodies)
Reovirus		+

Inkluzní tělíska



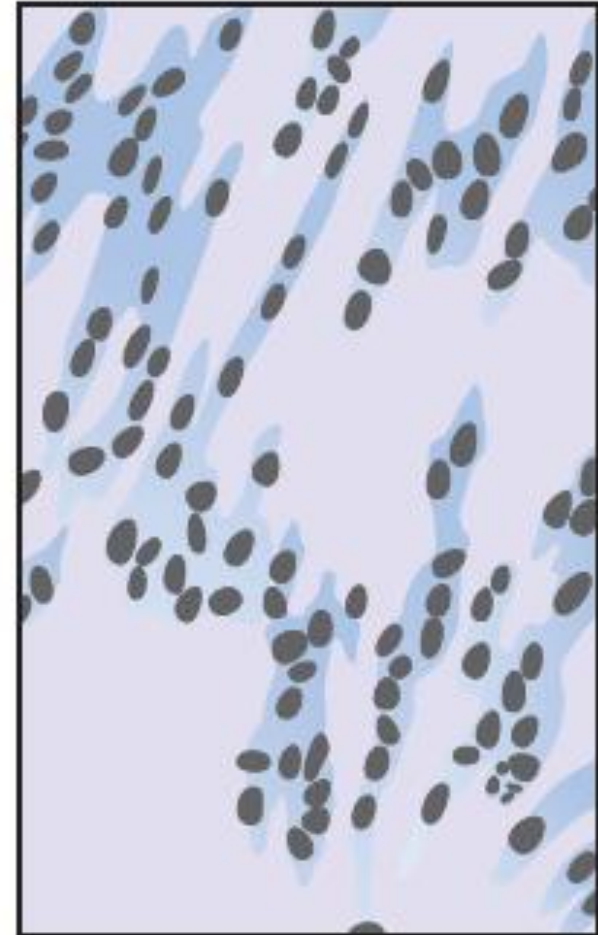
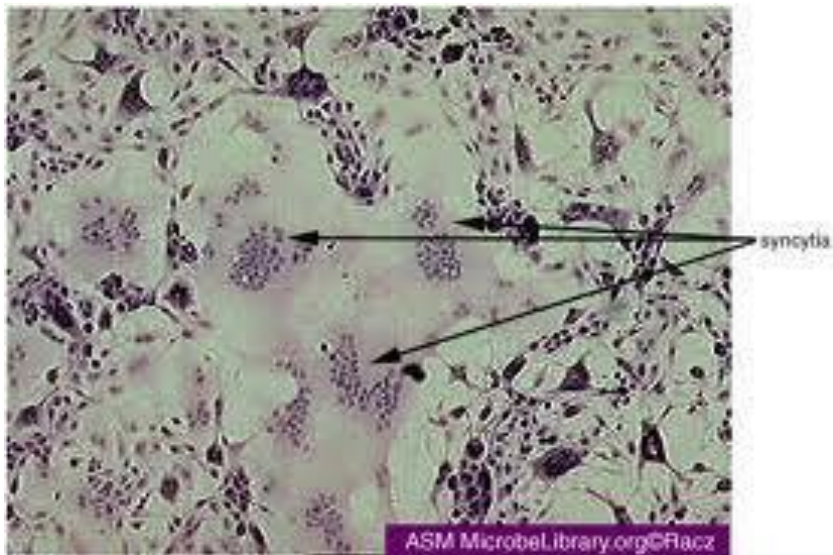
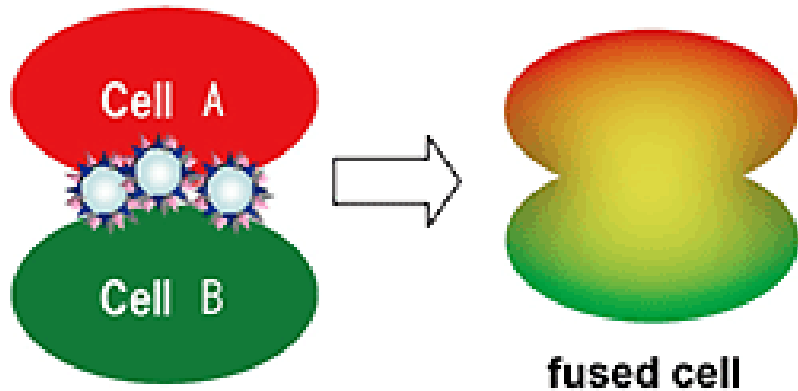
Vliv virové infekce na hostitelskou buňku

Nádorová transformace buněk



Produktivní virové infekce není nezbytně nutná pro cytopatologii

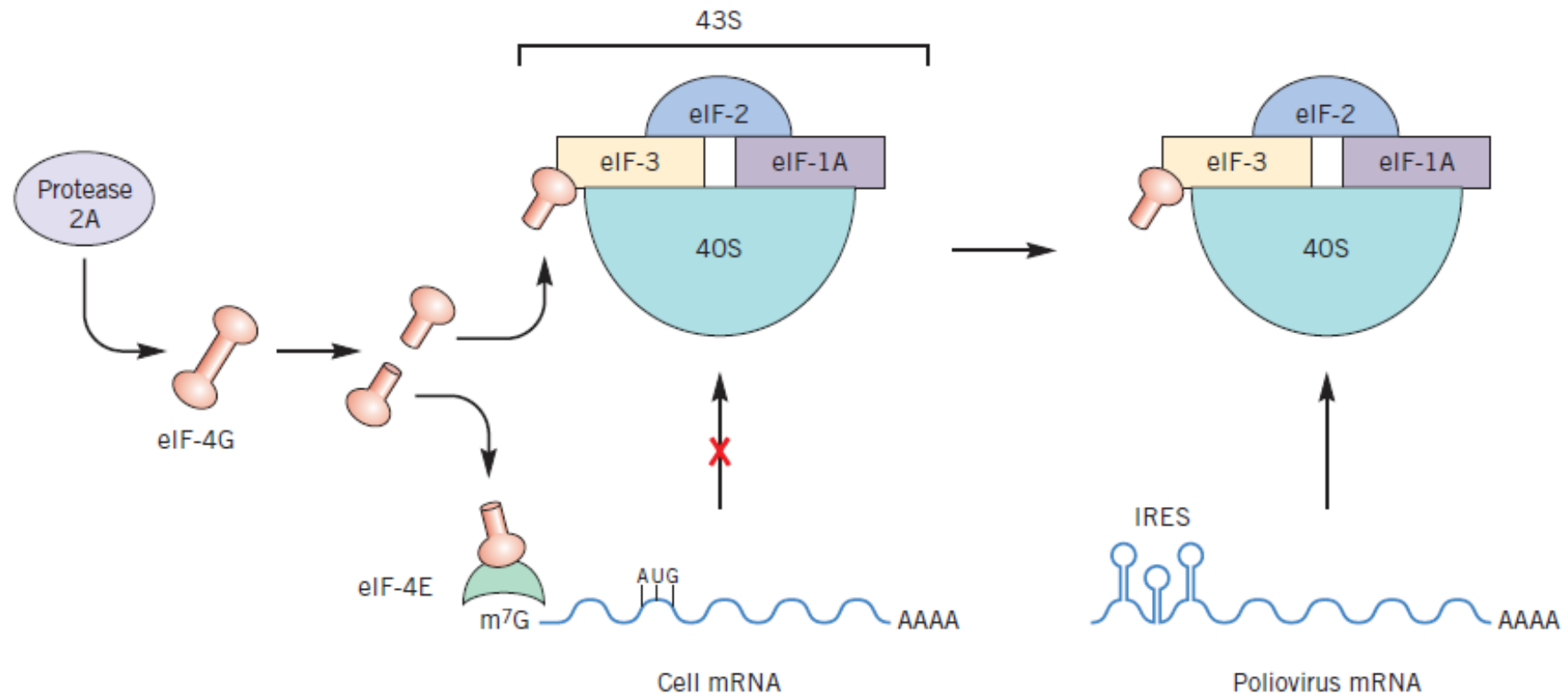
- již od prvního kontaktu viru s hostitelskou buňkou může být buňka vážně postižena
 - př. **fúze** způsobená obalenými viry (např. virus Sendai) nebo abortivní infekce vedoucí k aktivaci buněčné smrti



Modulace transkripce a translace v infikované buňce

- často rozsáhlá downregulace transkripce – může vést k úmrtí buňky, změnám buněčného fenotypu nebo transformaci
- v některých případech potlačení transkripce některých specifických genů
- některé buněčné geny mohou být vlivem virové infekce diferenciólně aktivovány

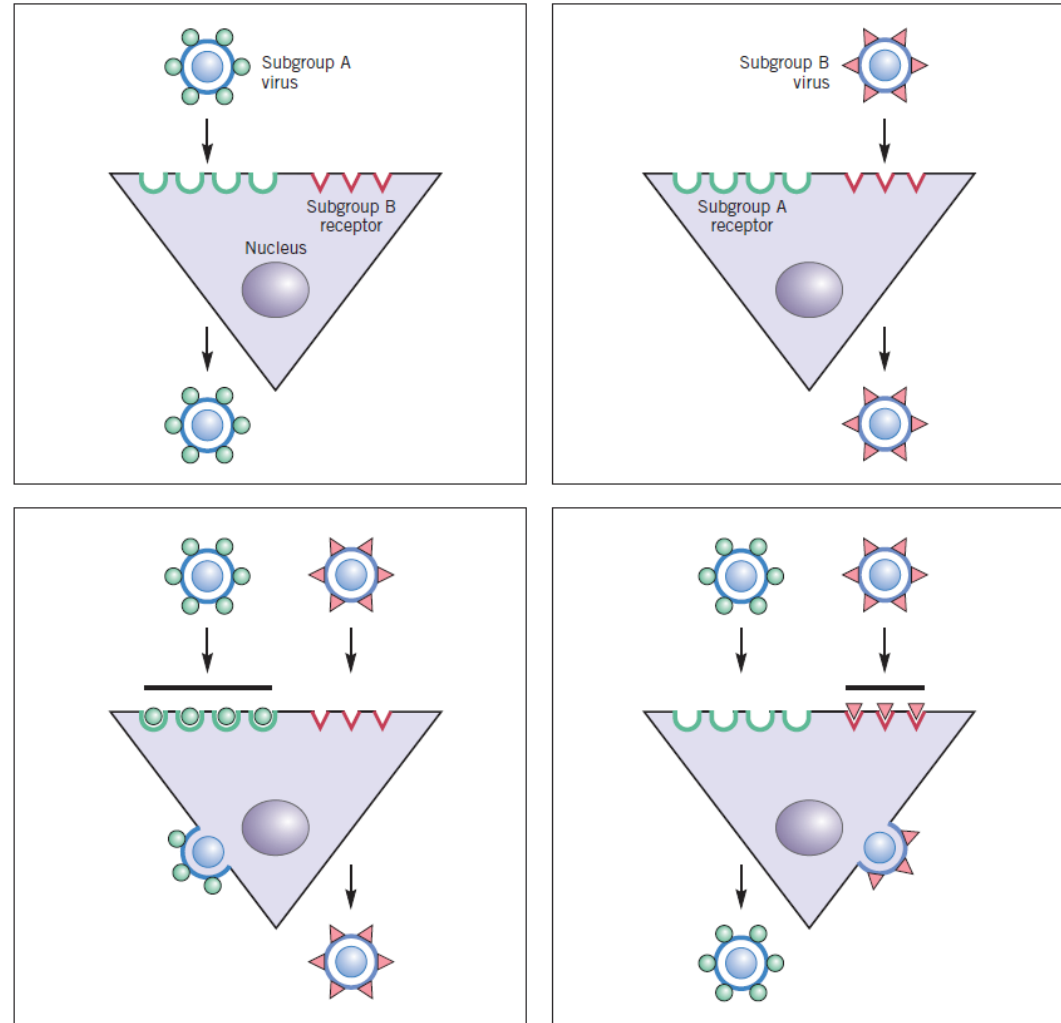
- downregulace syntézy proteinů obvykle díky interferencím s iniciací tranlace mRNA (př. poliovirus a mnohé pikornaviry obsahují virovou proteázu, která štěpí buněčný protein nezbytný pro vazbu buněčné mRNA na ribozóm.



Efekt na úrovni buněčné membrány

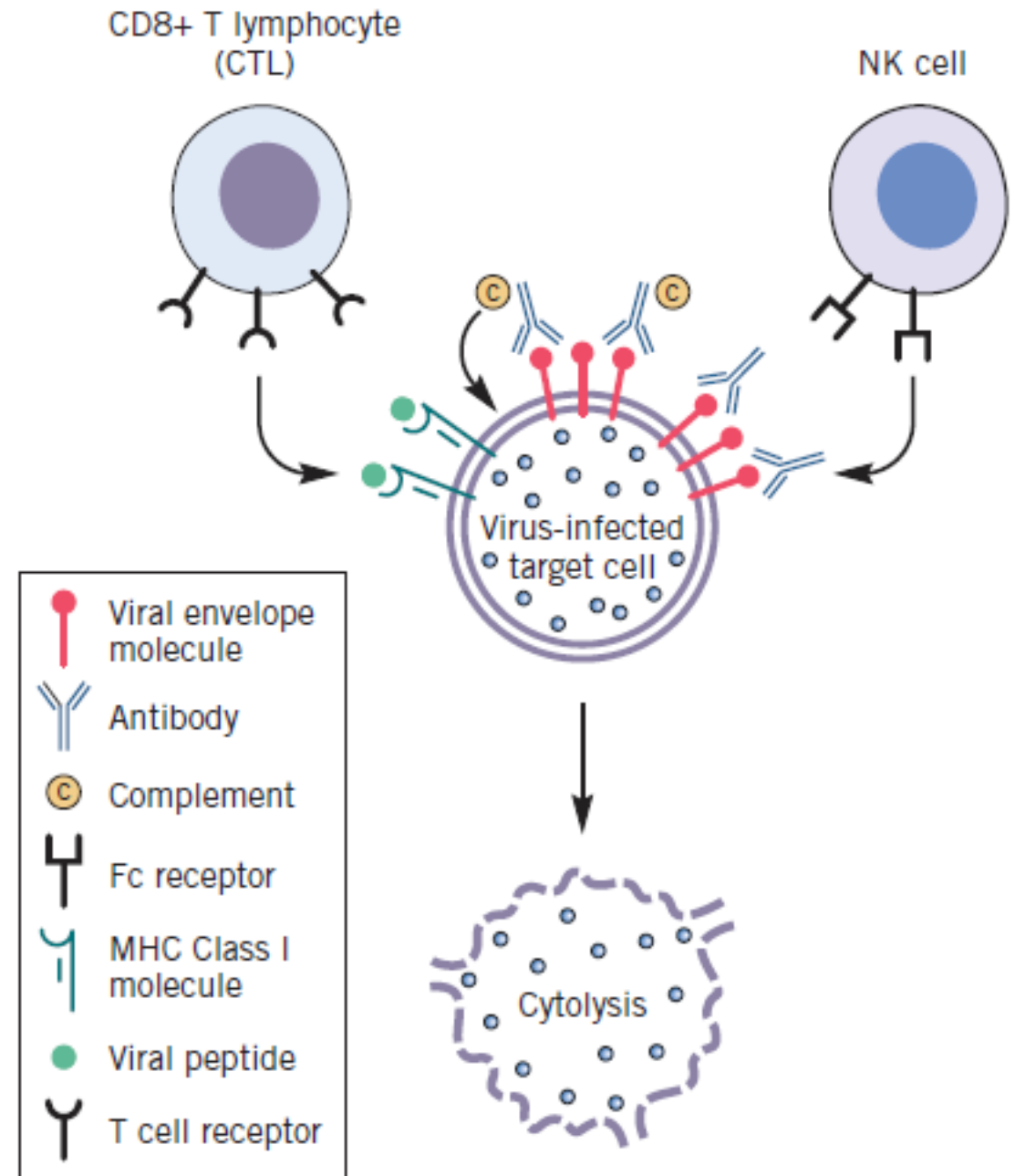
Blokování nebo downregulace buněčných receptorů pro virus

- př. buňky infikované ptačím sarkoma leukosis virem (ASLV) jsou rezistentní k superinfekci jiným blízce příbuzným kmenem retroviru – infikovaná buňka produkuje velké množství nových virových částic, ale i virového obalového proteinu, který saturuje specifické receptory. Nicméně viry, které používají jiné receptory mohou buňku infikovat



Modulace exprese MHC molekul

- infikovaná buňka štípe virové proteiny, přenáší oligopeptidy do ER, kde vytváří komplexy s MHC I. Komplexy poté migrují k povrchu buňky, kde jsou rozpoznávány cytotoxickými T-lymfocyty.
- virová infekce může downregulovat expresi MHC I molekul.



Virem indukovaná buněčná smrt: apoptóza nebo nekróza

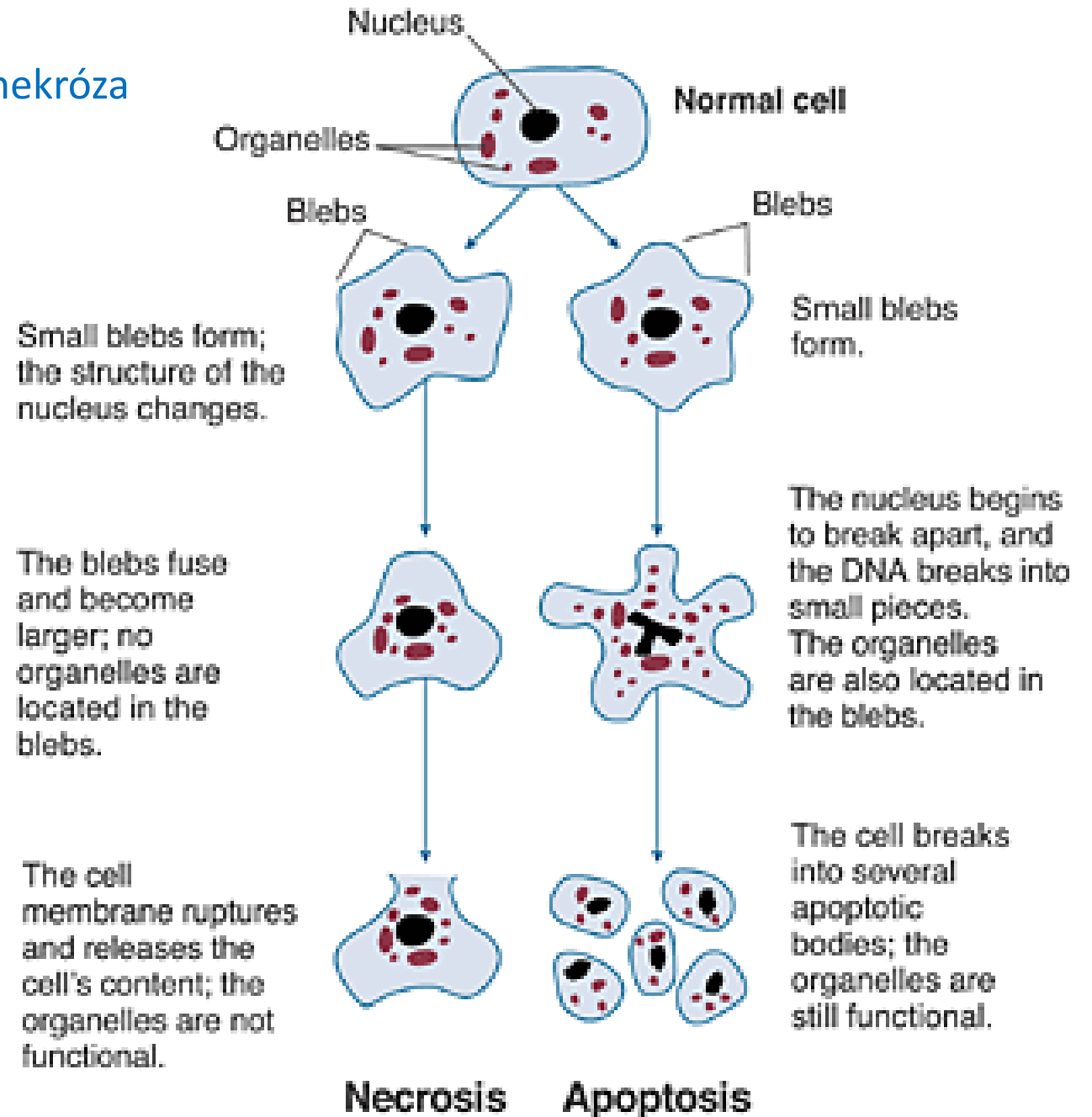
Nekróza: může být indukována různými inzulty jako teplené poškození, podchlazení, nefyziologické pH, fyzikální a chemické trauma a působení virových proteinů

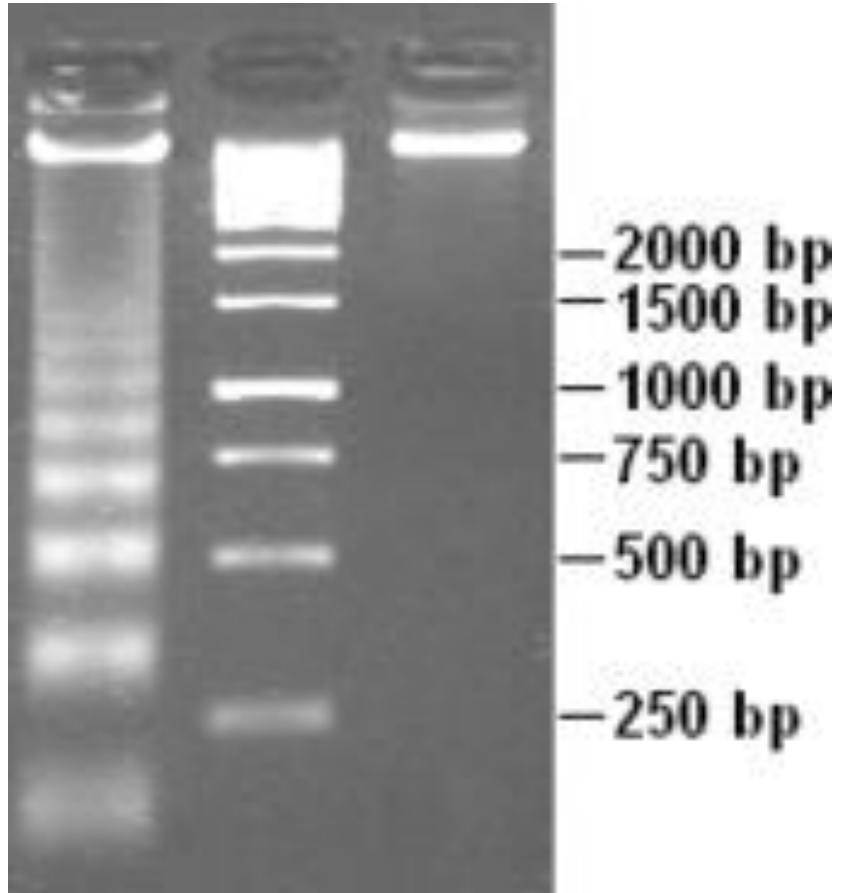
-ztráta integrity buněčné membrány a uvolnění buněčného obsahu do extracelulárního prostoru, což vede k pohlcení fagocyty a zánětlivé reakci

Apoptóza: programovaná buněčná smrt

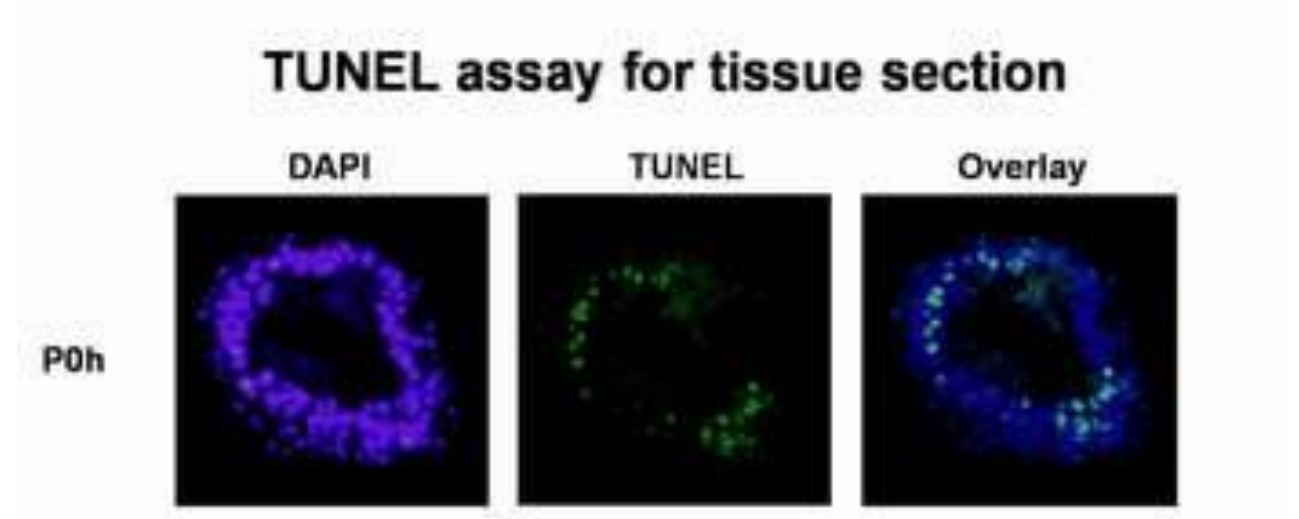
- kaskáda biochemických dějů
- „blebbing“ buněčné

membrány, kondenzace chromatinu na periferii jaderné membrány, štěpení DNA

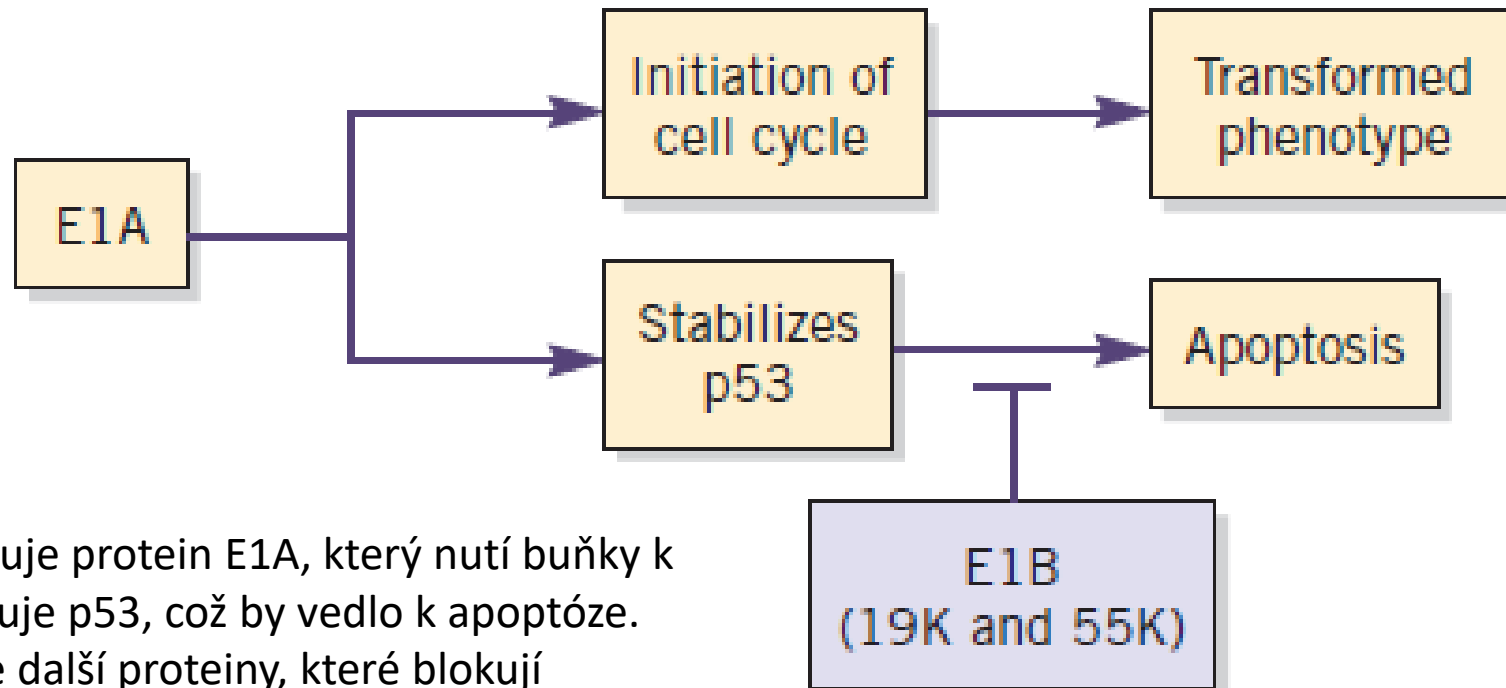




Apoptická fragmentace DNA



Anti-apoptotická efekt některých virových proteinů

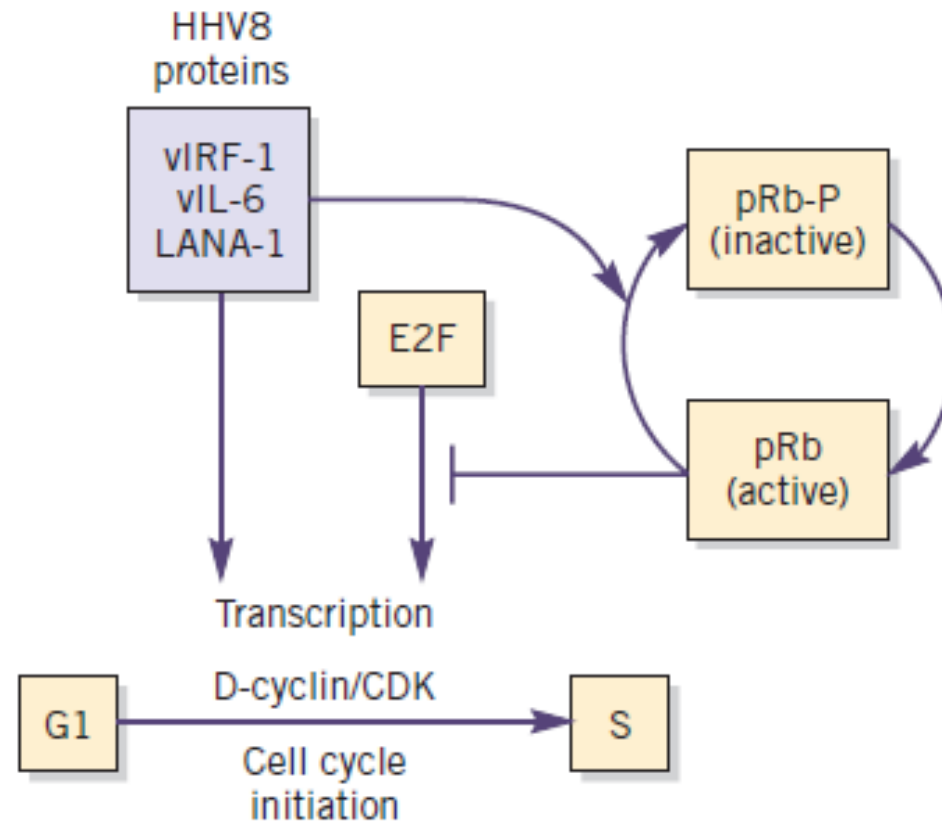


Adenovirus kóduje protein E1A, který nutí buňky k dělení a stabilizuje p53, což by vedlo k apoptóze. Ale virus kóduje další proteiny, které blokují apoptózu.

Viry a buněčný cyklus

- mnohé viry se preferenčně množí v buňkách, které jsou v určité fázi buněčného cyklu
- zejména DNA viry se množí v S fázi buněčného cyklu
- př. HHV8 – virové proteiny iniciují buněčný cyklus a stimulují proliferaci

- stimulují expresi cyklinů a cyklin-
dependentních kináz a proteinu
retinoblastomu pRb



Shrnutí:

- virová infekce může vést ke smrti hostitelské buňky, ale cytopatický efekt nemusí být vždy čistě následkem množení viru (CPE může být indukován virem, aniž by docházelo k jeho plnému pomnožení)
- vazba VAP na receptor může spustit řadu dramatických dějů, jako fúzi buněk, apoptózu nebo signalizační kaskády
- během množení viru v buňce způsobují některé viry globální downregulaci transkripce hostitelských genů, exprese některých ale může být aktivována
- virová infekce může redukovat trnanci hostitelských mRNA
- virová infekce může mít vliv na expresi některých proteinů na cytoplasmatické membráně buňky, jako jsou buněčné receptory nebo MHC 1

- buňky mohou hynout dvěma způsoby – nekrózou nebo apoptózou
- mnohé viry zabíjí hostitelské buňky aktivací apoptózy spíše než nekrózou
- některé virové proteiny přímo indukují apoptózu, zatímco jiné mají anti-apoptotický účinek
- v některých případech je rozdíl mezi virulentním a avirulentním kmenem dán odlišnou schopností vyvolat nebo blokovat apoptózu
- blokování apoptózy některými viry může vést k transformaci buňky