

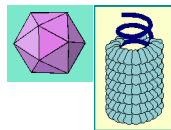
ZÁKLADY VIROLOGIE

Obecná charakteristika virů

- Nebuněčné mikroorganismy
- Genetické elementy, který se množí pouze uvnitř živé buňky
 - Vnitrobuněčná a mimobuněčná forma
- Extracelulární forma virové částice se nazývá **virion**
- Skládá se z nukleových kyselin (RNA nebo DNA, nikdy obě)
- Obklopeny ochranným proteinovým obalem - **kapsid**
- Velmi malé (20 – 300 nm)
- Malý genom (5 - 670 kbp)
- Obsahuje genetické informace pro
 - Vytváření proteinového obalu
 - Zajištění replikace vlastního chromozomu
 - Přesun virionů do a z hostitelské buňky

Stavba viru

- **Symetrie**
 - Isokahedrání
 - Helikální
- **Tvar**
 - Kulovitý
 - Tyčinkový
 - Kombinovaný
- **Kapsid**
 - Proteinový obal
 - Složen z kapsomerů (identické proteinové podjednotky)
- **Nukleokapsid** = kapsid + nukleové kyseliny
- **Obalený virus**
 - Další lipidová membrána získaná z cytoplasmatické membrány infikované buňky
 - Glykoproteiny



Chemické složení virů

- Nukleové kyseliny
- Bílkoviny
- Lipidy (u obalených virů)
- Sacharidy (u obalených virů)

Nukleové kyseliny

- Dvouřetězcová DNA (lineární, kruhová)
- Jednořetězcová DNA (lineární, kruhová)
- Dvouřetězcová RNA
- Jednořetězcová RNA
- DNA většiny virů je lineární
- Obvykle 1 molekula nukleové kyseliny
- Někdy několik různých molekul
 - Segmentované RNA viry

Bílkoviny

- **Kapsidové**
 - Vytvářejí spontánně kapsomery a kapsid z polypeptidových řetězců
- **Enzymy**
 - Lysozym (u některých bakteriofágů)
 - RNA nebo DNA polymerasy
 - Retroviry
 - RNA viry
 - Enzymy, které se uplatňují při uvolnění viru z buňky
 - Většina virů je metabolicky inertní

Funkce bílkovin

- Ochranná (ochrana virového genomu)
- Rozpoznávací (vyhledávání citlivých hostitelských buněk)
- Katalytická (enzymy u složitějších virů)
- Regulační (mohou ovlivňovat např. replikaci buněčné DNA)
- Antigenní (schopnost vyvolávat v napadeném organismu tvorbu protilátek)

Základní rozdělení virů

- Dle hostitele
 - Bakteriální viry
 - Bakteriofágy
 - Rostlinné viry
 - Živočišné viry
 - Viry dalších buněk (archea, hmyz)
- Dle složení genomu
 - DNA viry
 - RNA viry
 - RNA-DNA viry
 - Využívají DNA i RNA, ale v různých stádiích reprodukčního cyklu

Metody studia virů

- Pro růst virů jsou potřebné živé buňky (bakteriální, eukaryotické)
- Hostitelské buňky živočišných virů se kultivují v laboratoři metodou buněčných neboli tkáňových kultur
 - Buňky rostou jako monovrstva na povrchu kultivační nádoby, ale pouze po omezený počet generací (potom umírají)
 - Nádorové buňky rostou *in vitro* stále (nesmrtelné buňky)
- Kuřecí embrya
- Pokus na zvířeti

Metody studia virů

- Viry mohou infikovat, množit se a lýzovat buňky rostoucí v monovrstvě, což vede k tvorbě plak
 - Projasnění v souvislém nárůstu buněk
- Virus často mění vzhled buněk (cytopatický efekt)
- Mnohé živočišné viry mohou srážet (aglutinovat) červené krvinky díky interakci s povrchem dvou buněk naráz (myxoviry - virus chřipky)

Metody studia virů

- Kvantifikace virových částic
 - Přímým počítáním virionů pod elektronovým mikroskopem
 - Určení titru viru plakovou metodou
 - Počet infekčních částic v ml
 - Vždy nižší než počítání pod mikroskopem
 - Virus neinfikuje 100% buněk!
 - Nepřímá metoda
 - Někdy definován jako takové zředění viru, při kterém je 50% inokulovaných hostitelských buněk infikováno nebo zabito (infekční dávka ID_{50} , letální dávka LD_{50})

Učebnice Madigan a kol., obr. 10.6, str. 257

Kvantifikace bakteriálního viru plakovou metodou

Bakteriofág: vztah virus – hostitel

- Produktivní odezva
 - Je vytvořeno více kopií viru
 - Virové částice jsou uvolněny po lýzi hostitelské buňky nebo
 - Virus opouští buňku bez její lýze
- Latentní stav
 - Virální nukleová kyselina je zabudována do chromozomu hostitele a replikuje se jako součást chromozomu hostitele

Replikace viru při produktivní infekci

- Virulentní bakteriofág
- Např. T4 bakteriofág
 - Infikuje *E. coli*

Fáze replikace virulentního fága

- Adsorpce
 - Přisednutí na buňku na specifické receptory
 - Pomocí vláken bičíku
- Penetrace
 - Proniknutí nukleové kyseliny viru do buňky
 - Proteinový obal ponechán venku

Fáze replikace virulentního fága

- Syntéza virových nukleových kyselin a specifických fágových proteinů
 - Nukleové kyseliny
 - DNA viry
 - Transkripce DNA na mRNA
 - U jednovláknových nejdříve syntéza druhého vlákna
 - RNA viry
 - Genom přímo mRNA nebo
 - Genom slouží jako vzor pro syntézu mRNA
 - RNA-závislé RNA polymerasy
 - Součást virionu
 - Retroviry
 - U živočichů
 - RNA viry, které se replikují přes DNA meziprodukt
 - Reverzní transkriptasa
 - Proteiny
 - Syntetizované proteiny jsou nutné pro replikaci
 - V malém množství
 - Časné proteiny

Fáze replikace virulentního fága

- Replikace fágové DNA a syntéza strukturních proteinů
 - Kapsidové proteiny
 - Velké množství
 - Pozdní proteiny
- Maturace
 - Shromáždění fágové DNA a proteinů za tvorby zralých virionů
- Eluce
 - Uvolnění virionů z hostitelské buňky
 - Pomocí lysozymu, který se syntetizuje v pozdější fázi infekce
 - Pučení
 - Vylučování

Jednostupňová růstová křivka fága

- Analýza počtu virionů uvnitř a vně bakterie v různých časech po adsorpci
 - Přirozené uvolnění viru z buňky vs. chemická lýze

Učebnice Madigan a kol., obr. 10.6, str. 257

Popis růstové křivky fága

- **Latentní fáze**
 - Počet virionů nevrůstá
- **Fáze vzestupu**
 - Viriony se uvolňují z buněk
- **Fágový výnos**
 - Počet virionů vytvořených jednou buňkou

Učebnice Madigan a kol., obr. 10.9, str. 259

Intracelulární růst fága

- **Ekliptické období**
 - Doba potřebná k vytvoření jednoho virionu
 - Infikované buňky se lýzují chloroformem v různých časových intervalech v průběhu latentní fáze
 - Replikace fágového chromozomu, syntéza kapsidových bílkovin a strukturálních složek
- **Maturace**
 - Sestavují se viriony z bílkovin a DNA
 - Končí v době, kdy buňka začíná lýzovat
 - Konec latentní fáze, počátek vzestupné fáze

Temperovaný fág

- Fágový chromozom se buď replikuje a způsobí lýzi buňky nebo
- Fágový chromozom se integruje do chromozomu hostitelské buňky
 - Profág (virus integrovaný do chromozomu hostitele)
 - Lyzogenní buňka (lyzogen, buňka obsahující profág)
- Fág lambda (λ)
 - Infikuje *E. coli*
- Živočišné viry integrující DNA do hostitelské buňky
 - HIV (Human Immunodeficiency Virus)

Replikace viru v latentním stavu

- DNA se integruje to chromozomu hostitele
- Počáteční fáze infekce λ -fágem jako u T4 fága
- Po vstupu do buňky
 - Vyvine se produktivní infekce nebo
 - Fágová DNA se integruje do specifických míst v bakteriálním chromozomu a stane se součástí bakteriálního genomu (lyzogenizace)
 - Geneticky regulováno

Replikace viru v latentním stavu

- Integrace nastává díky krátkým úsekům homologních DNA sekvencí fága a hostitele
 - Na specifickém místě hostitelské DNA
 - Specifické vazebné místo na fágu
 - Nukleasa
- Represor
 - Protein, který inhibuje transkripci integrovaných genů potřebných pro produktivní infekci (pro syntézu pozdních proteinů)
 - Nutný pro udržení profága v integrovaném stavu
 - Kódovaný fágem

Replikace viru v latentním stavu

- Aktivace lytického cyklu
 - Působením faktorů poškozujících DNA (UV světlo, chemikálie) na lyzogenní kulturu
 - Aktivuje se obranný mechanismus hostitele (SOS reakce)
 - Aktivace proteasy, která zničí represor \Rightarrow produktivní infekce
 - Fág je vyštěpnut z chromozomu pomocí specifických enzymů
 - Indukce
- Lyzogeny jsou imunní k infekci *stejným* fágem
 - Represor se váže na specifické DNA sekvence fága a inhibuje expresi genů

Lyzogenní konverze

- Profág může kódovat proteiny, které mění vlastnosti hostitele
- *Clostridium botulinum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pyogenes*
 - Po eliminaci profága nejsou schopny syntetizovat toxiny způsobující nemoci (botulismus, záškrt, spálu)
 - Toxiny jsou kódovány fágovými geny, které jsou exprimovány pouze po integraci fágové DNA do bakteriálního chromozomu
- Viry způsobující nádory u zvířat
 - Expresí virální DNA vede k získání nových vlastností hostitelské buňky

Vláknité fágy

- Jednovláknová DNA
- Uvolněny procesem zvaným extruze, který nezničí hostitelskou buňku
- Nezpůsobují lytickou infekci
- Virus se sestaví při opuštění hostitelské buňky
- Infikované bakterie se dále množí
- Viry jsou extrudovány kontinuálně

Transdukcce

- Přenos DNA z jedné buňky do druhé pomocí bakteriofága
- **Obecná (nespecifická) transdukcce**
 - Virulentní i temperovaný fág může přenést jakoukoli část genomu během produktivní infekce
 - Transdukující fág
 - Obvykle neinfekční
 - Virální geny nahrazeny bakteriálními
 - Fágový chromozom obsahuje bakteriální DNA
- **Specifická transdukcce**
 - Temperovaný fág může přenést pouze specifický set genů při nesprávném vyříznutí z chromozomu hostitele

Učebnice Madigan a kol., obr. 11.17, str. 300

Obecná transdukcce

Učebnice Madigan a kol., obr. 11.18, str. 301

Specifická transdukcce

Hostitelé virů

- Viry mohou infikovat buňky řas, hub, protozoí, většiny bakterií, rostlin a zvířat
- Daný virus může obecně infikovat pouze jeden nebo několik druhů, často pouze několik kmenů jednoho druhu
- Rozsah hostitelů je limitován tím, že živočišné a bakteriální viry (ne rostlinné) se musejí adsorbovat na specifická receptorová místa na povrchu hostitelské buňky
- Fágy se obvykle adsorbují na buněčnou stěnu, některé na fimbrie nebo bičíky
- Živočišné viry se váží na cytoplasmatickou membránu

Živočišné viry

- Do buňky většinou vniká celý virion
 - Některé obalené viry jsou zbaveny obalu a kapsidu na cytoplasmatické membráně
- Eukaryotická buňka obsahuje jádro, ve kterém se většina virů musí replikovat

Klasifikace živočišných virů

Založena na těchto kriteriích:

- Povaha nukleové kyseliny (DNA, RNA, jedno- nebo dvouvláknová)
- Struktura virové částice
- Přítomnost obalu
- Velikost virové částice

Čeleď: -viridae (*Picornaviridae*)

Rod, druh: -virus (*Enterovirus*)

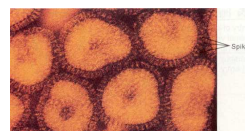
Název druhu: název nemoci, kterou způsobují
(*Poliomyelitis virus*)

Množení živočišného viru

- Kroky stejné jako u bakteriofága
- Počet fází se odlišuje u různých virů a od bakteriofága

Adsorpce na hostitelskou buňku

- Váže se pouze na specifické receptory na plasmatické membráně
 - Většina virů může infikovat pouze jeden druh hostitele nebo jeden typ buněk
- Viry obsahují povrchové výběžky obsahující přípojně proteiny
- Protilátky proti viru se často vážou na tyto proteiny



Vstup viru do buňky

- Obalené viry
 - Obal virionu se spojí s plasmatickou membránou hostitele, nukleokapsid je uvolněn přímo do cytoplasmy, kde se oddělí nukleová kyselina od proteinového obalu
 - Endocytóza – plasmatická membrána obklopí celý virion za tvorby váčku, obal virionu se pak spojí s plasmatickou membránou a nukleokapsid je uvolněn do cytoplasmy
- Neobalené viry
 - Endocytóza – virion nefúzuje s plasmatickou membránou, váček se rozpustí a viriony jsou uvolněny do cytoplasmy

Replikace nukleové kyseliny

- Závisí v různé míře na enzymech hostitelské buňky
- Čím větší je virální genom, tím méně enzymů hostitelské buňky je zapojeno do replikace (poxviry zcela nezávislé, parvoviry zcela závislé)
- Virus často kóduje proteiny nutné pro iniciaci DNA syntézy

Maturace

- Stejně jako u bakteriofága T4
- Virus tabákové mozaiky
 - Maturace extenzivně studována, model pro rostlinné a živočišné viry

Uvolnění viru

- Lýze mrtvé buňky
 - Nesyntetizuje se lysozym
 - Buňka umírá následkem toho, že je syntetizována hlavně virální DNA a proteiny, buňka neplní funkce nutné pro přežití
- Pučení
 - Obalené viry
 - Neumrtí buňku
 - Na plasmatické membráně se vytvoří proteinové hroty, vnitřek membrány se pokryje virovými proteiny, nukleokapsid se obalí plasmatickou membránou a virion je uvolněn

Interakce živočišného viru s hostitelem

- Ve většině případů viry nezpůsobují zjevné nemoci
- Většina zdravých lidí a zvířat nosí množství různých virů
- Akutní infekce
- Perzistentní infekce
- Latentní infekce

Akutní infekce

- Nemoc obvykle krátkého trvání
- Hostitel si může vyvinout dlouhodobou imunitu
- Příušnice, spalničky, dětská obrna
- Infikované buňky umírají, ne však hostitel
- Virus je postupně eliminován z těla (dny až měsíce)

Perzistentní infekce

- Virus je produkován kontinuálně mnoho let bez příznaků nemoci
- Tři typy
 1. Hostitelské buňky fungují normálně, virové částice uvolňovány pučením
 2. Infikované buňky umírají, počet virionů je malý, hostitelovy defenzivní mechanismy zabraňují infekci mnoha nových buněk
 3. Retroviry - genom je RNA, z ní se udělá DNA kopie, která je zabudována do DNA hostitelské buňky, viriony se uvolňují pučením, buňka neumírá (HIV virus zabíjí některé buňky)
- Někdy se nazývají chronické infekce (hepatitida B)
- Pomalé virové nemoci
 - Pomalý progres, vždy následuje smrt, zahrnuje centrální nervový systém

Latentní infekce

- Zralé infekční virové částice nejsou produkovány po dlouhou dobu
- Herpesviry
 - Herpes simplex virus
 - Infikuje smyslové nervové buňky
 - Zůstává neinfekční
 - Replikace viru aktivována teplotou, slunečním zářením, menstruací
 - Opar
 - Varicella zoster virus
 - Plané neštovice
 - Pásový opar

Viry a nádory

- Většina živočišných DNA virů a některé RNA viry (retroviry) mohou přeměňovat normální buňky v tkáňové kultuře na buňky rakovinné (transformované)
- Transformující viry
- Transformované buňky z tkáňové kultury mohou tvořit nádory u živočichů
 - Onkoviry

Viry a nádory u živočichů

- Nádory způsobené DNA viry
 - Následek integrace a exprese virové DNA v hostitelské buňce
 - Integrace do chromozomu a kontinuální exprese genů, které způsobují změnu vlastností buňky
 - U některých se DNA replikuje jako plasmid
- Nádory způsobené RNA viry (retroviry)
 - Tvorba DNA kopie virové RNA a její integrace do chromozomu hostitele
 - Reverzní transkriptasa
 - Provirus
 - Nevystěpuje se z chromozomu

Mechanismus transformace buňky viry

- DNA viry i retroviry narušují kontrolu normálního růstu buňky a vývoje tkáně různými mechanismy
- Výsledkem je nekontrolovatelný růst buňky
- Narušena funkce důležitých enzymů
- Retroviry integrují do chromozomu hostitelského organismu virální *onkogeny*
- Hostitelská buňka obsahuje podobné geny (*protoonkogeny*)
 - Často geny zapojené v kontrole růstu, vývoji
- Proteinové produkty onkogenů narušují funkci určitých klíčových enzymů, pravděpodobně produktů protoonkogenů
 - Defektivní proteiny
 - Nadexprese genů zapojených v kontrole replikace a transkripce

Viry a nádory u člověka

- Pouze několik DNA virů prokazatelně způsobuje nádory u lidí
 - Virus Epstein-Barrové
 - Virus hepatitidy B
 - Lidský papilomavirus
- Retroviry
 - HTLV-1 virus
 - Rakovina bílých krvinek (T-lymfocyty)
 - HIV
 - Většina tumorů pravděpodobně vzniká sekundární virovou infekcí

Rostlinné viry

- Značné množství vážných rostlinných chorob je způsobeno viry
- Žloutnutí listů, kroužky a čáry na listech, nevyvinuté rostliny, někdy abnormální růst
- Rostlina se většinou z virové infekce nevzpamatuje
- Pěstování rostlin záměrně infikovaných viry (pestrobarevné tulipány)
- Zejména RNA viry, několik DNA virů

Mechanismus přenosu rostlinných virů

- Rostlinné viry se neváží na specifické receptory
- Vstupují různými poraněními v buněčné stěně
- Šíří se plasmodesmaty
- Velmi odolné proti inaktivaci (virus tabákové mozaiky)
- Přenášeny např. z půdy, semeny, hlízkami, pylem, roubováním, hmyzem, houbami, červy
- Přenos hmyzem
 - Přechodný
 - Cirkulující

Viry u hmyzu

- Některé viry se množí jak v rostlině tak v hmyzu
- Některé viry jsou pro hmyz vysoce patogenní (bakuloviry) a používají se jako biologická kontrola hmyzu

Subvirální částice

- Defektní viry
- Viroidy
- Priony

Defektní viry

- Viry parazitující na jiném viru
 - Pomocný virus
- Některé parazitují na intaktním viru příbuzného typu
- Satelitní viry využívají nepříbuzné viry, které infikují stejné hostitelské buňky
- Pomocné viry poskytují proteiny, které defektní viry již nekódují

Viroidy

- Malá cirkulární jednořetězcová molekula RNA o molekulové hmotnosti asi 100 000 (1/10 velikosti nejmenší virové RNA)
 - Sekundární struktura
- Neobsahují proteinový obal
- RNA neobsahuje sekvence kódující proteiny
- Replikace zcela závislá na hostiteli
- Způsobují řadu rostlinných chorob
 - Vstup přes poranění
 - Šíření plasmodesmaty
 - Pomocí semen a pylu

Učebnice Madigan a kol.,
obr. 10.27, str. 275

Priony

- Prion = proteinová infekční částice, která neobsahuje nukleovou kyselinu
- Mechanismus infekce
 - Hostitelké buňky obsahují protein PrPc (prion protein cellular), který je téměř identický s prionovým proteinem a je přítomen v neuronech
 - Prionový protein PrPsc (prion protein scrapie) je strukturně modifikovanou formou PrPc a může ho modifikovat na PrPsc
 - Vysoký obsah β -struktur
 - Alternativní folding
 - Částečná rezistence k proteasám
 - PrPsc se hromadí v buňkách a dostává se symptomy
- Způsobují smrtelné neurodegenerativní nemoci
 - Svrbivka (ovce)
 - Kuru
 - Nemoc šílených krav
 - Creutzfeldt-Jakobova nemoc

Učebnice Madigan a kol., obr. 10.28, str. 275

Indukce nesprávného skládání prionového proteinu