



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Virové genomy a jejich analýza, strategie replikace virů ve světle nových poznatků vědy a výzkumu

Dobromila Molinková, Vladimír Celer



Organizace genomu virů

Genom viru musí být kompatibilní s hostitelskou buňkou (mechanismy translace a transkripce)

Geny jsou čteny v rámci ORF

Většinou monocistronické mRNA – každá s vlastním promotorem

úspora prostoru pro genetickou informaci

Překrývání ORF

Ribozomální frameshifting (změna čtení ORF)



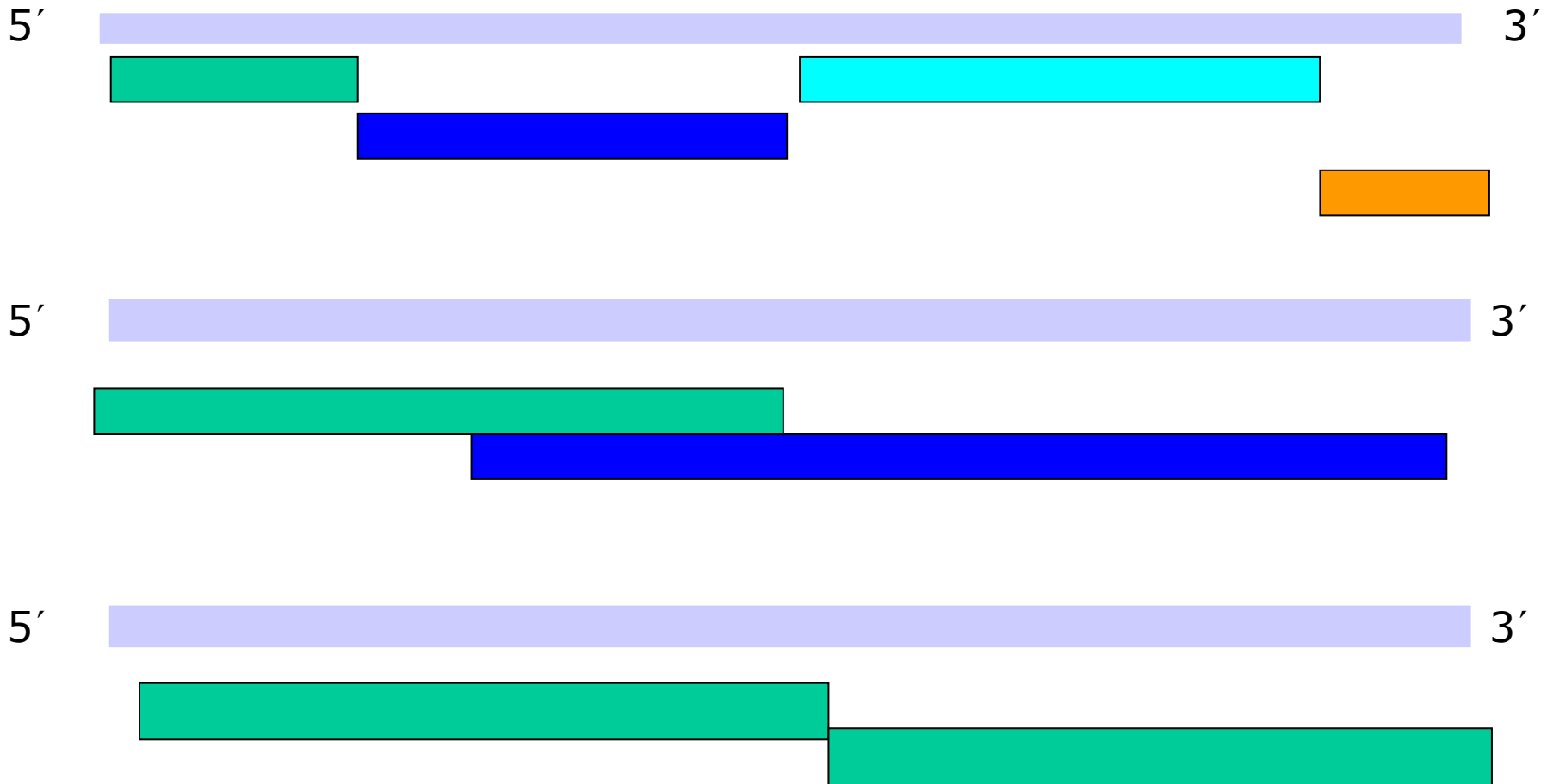
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Kódování genetické informace viry

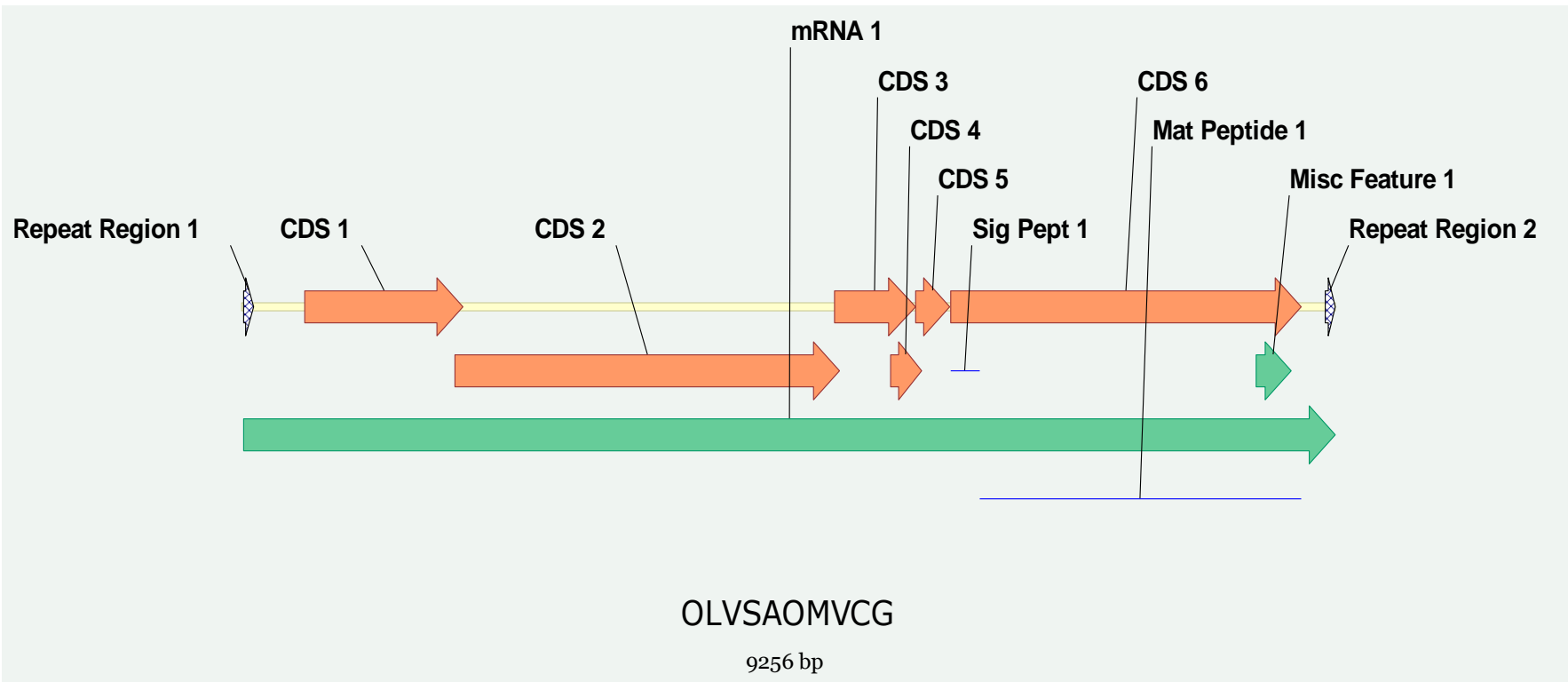


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

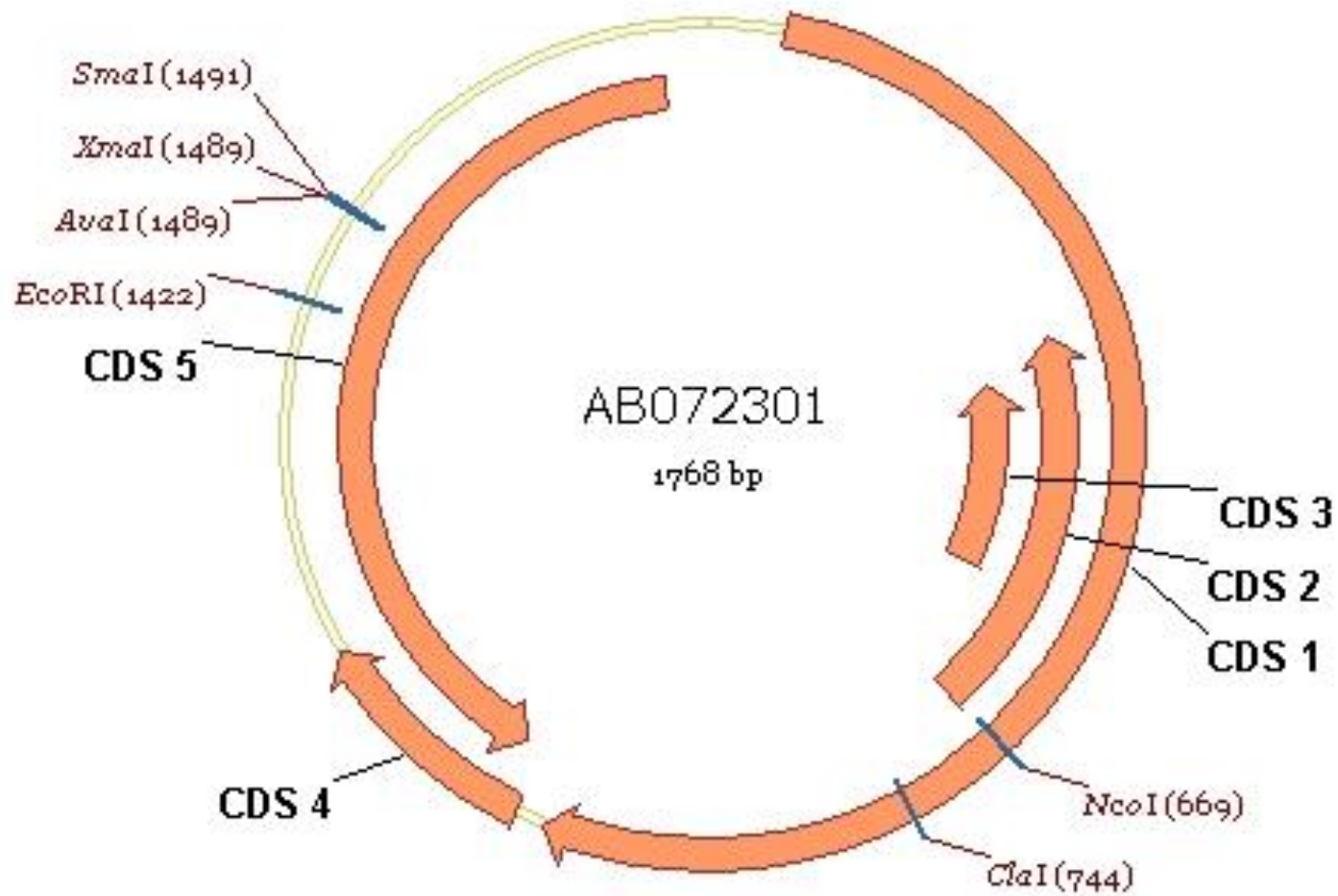


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Regulace exprese eukaryotické buňky

- ◆ Několika úrovnňová kontrola
- ◆ Základní poznatky získány studiem virů

Kontrola na úrovni jádra a organizace DNA

Hypometylace transkribované DNA

Interakce chromatinu s nukleární matrix



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Kontrola transkripce

Promotory, různá „síla“ promotorů

Transkripční faktory (regulují míru transkripce) virové,
buněčné

Enhancery transkripce (fungují i na vzdálenost tisíců bp)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Struktura mRNA

Poločas rozpadu mRNA

Polyadenylace, methylace, capping

Diferenciální sestřih (splicing – odstranění intronů)

Export mRNA z jádra

Kontrola translace

- ◆ Různě efektivní translace
- ◆ Enhancery translace



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

dsDNA viry

Herpesviridae, Adenoviridae, Papillomaviry se replikují v jádře

Hodně využívají enzymy buněčného jádra

Geny spouštěny sekvenčně



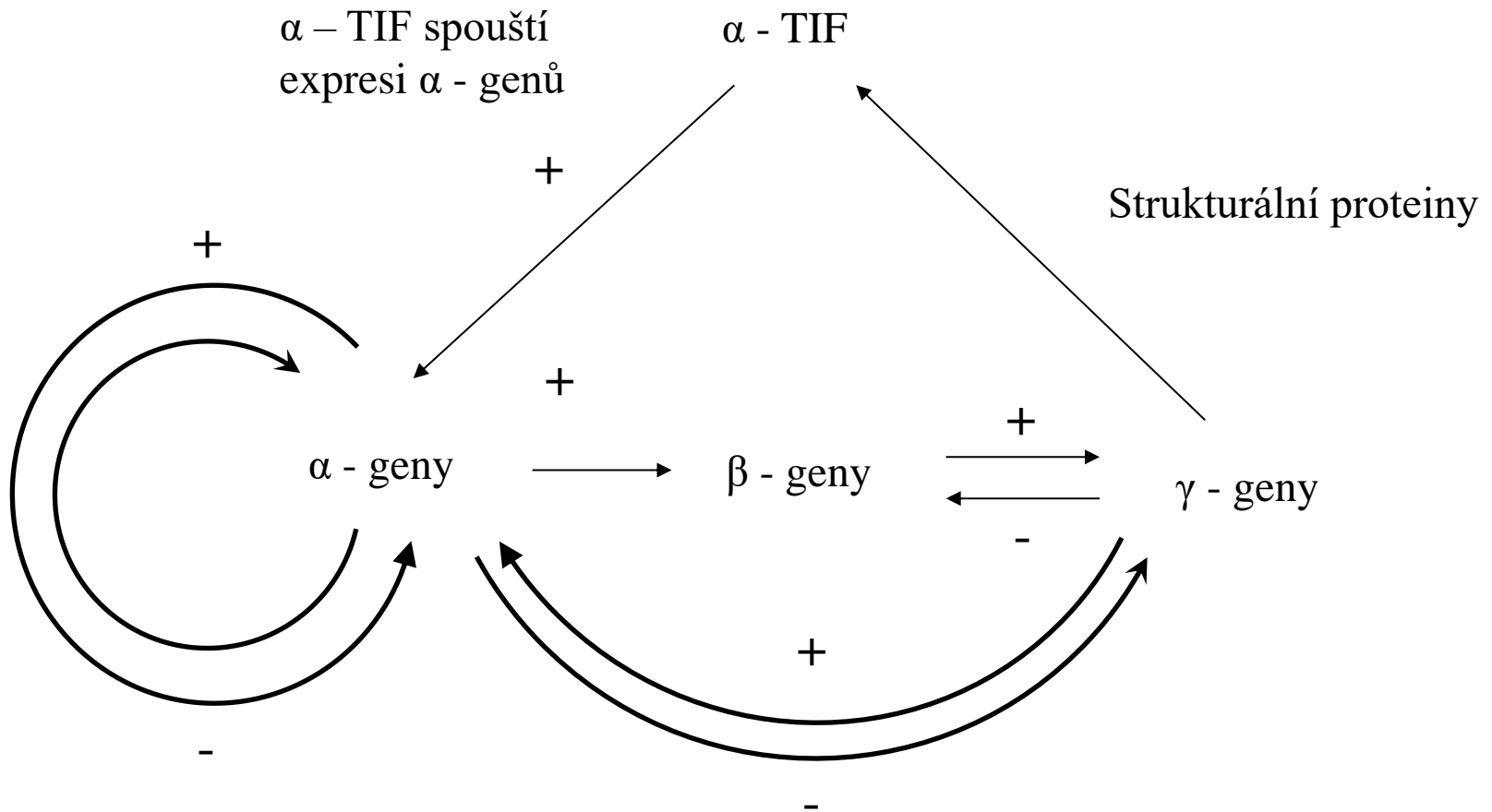
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Kontrola exprese herpesvirů



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

α proteiny herpesvirů

α -TIF (UL48) – iniciační transkripční faktor – protein tegumentu - indukuje transkripci raných proteinů vazbou na motiv TAATGARAT jejich promotoru

vhs (UL41) –“viral host shutoff“ degraduje buněčné mRNA (endoribonukleázová aktivita)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Ranné transaktivační a regulační proteiny herpesvirů

Protein	Gen	Funkce
ICP 27	UL54	Význam v pozdní expresi, inhibuje RNA sestřih a transport virových mRNA do cytoplasmy
ICP 0	R _L 2	Nespecifický mRNA transaktivátor, kofaktor pro ICP 4 β-transkripci
ICP 4	R _S	Zvyšuje transkripci β a γ genů
ICP 22	US1	Kofaktor pro expresi γ genů
ICP 47	US12	Inhibuje transport peptidů a jejich prezentaci MHC I antigeny



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

dsDNA

Poxviridae, Asfarviridae, Iridoviridae

Replikace v cytoplazmě

Velmi komplexní, mnoho enzymů, často přibaleny do virionu

Dosti nezávislé na celulárních mechanismech (vyjma ribozomů)

Exprese časných genů (50% virového genomu) nastává před replikací genomu

Exprese pozdních genů nastává po replikaci genomu



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

(+) ssRNA

Genom virů představuje mRNA (je infekční)

Exprese genů je dvojitá

1. Produkce polyproteinu z celého virového genomu, následně štěpeného virovou proteázou
2. Produkce subgenomových mRNA ústící ve dvě kola translace a tím separují časnou (produkce virové replikázy) a pozdní fázi replikace (strukturální proteiny). V mezifázi je replikována virová RNA



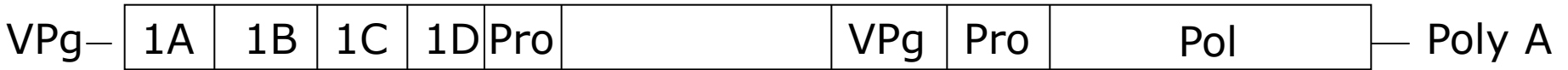
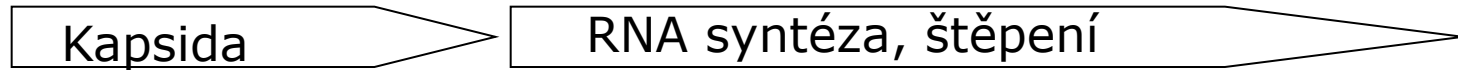
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

(+) ssRNA



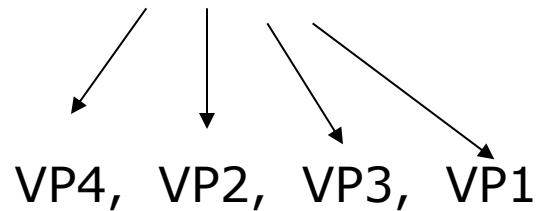
Polyprotein



P1

P2

P3



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

(-) ssRNA

Ribonukleoproteinový komplex (RNA, nukleoprotein, polymeráza a fosfoprotein)

Transkripcí vznikají monocistronické transkripty genů ohraničené umístěním start a stop signálů

Četnost transkriptů je pro jednotlivé geny různá a závisí na jejich poloze v genomu viru

Replikací vzniká kopie celého genomu ale jsou ignorovány start a stop transkripční signály 11932 bp

3' N NS M G Ψ L
5'



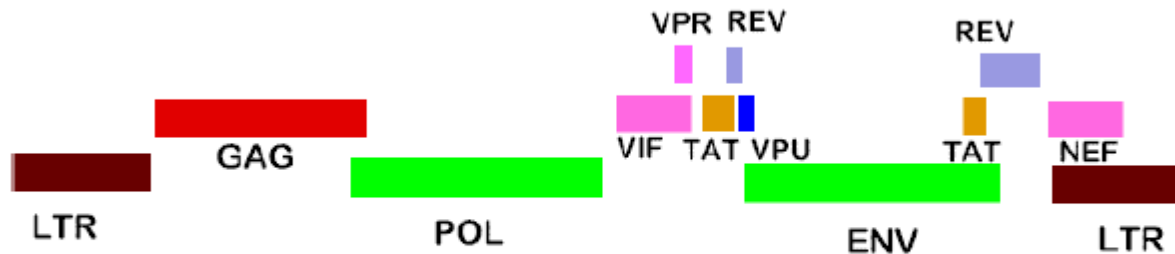
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MĚ
M
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Regulace transkripce lentivirů



HIV-1 GENOME 9749 NUCLEOTIDES



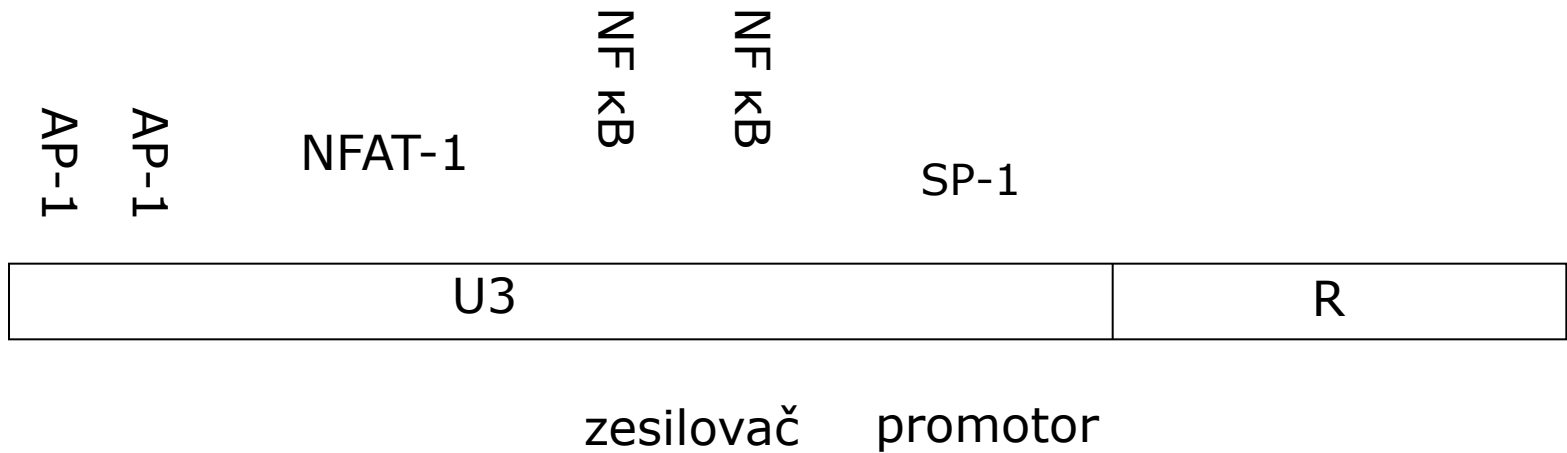
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

LTR viru HIV-1



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Tat protein lentivirů

Protein o 86 AA, 2 exony

N' terminální aktivační doména

C' terminální RNA vazebná doména

(arginin bohatá – nuclear localisation signal)

Vazba na TAR (transaktivace response element)

TAR – vlásenkovitá struktura na 5' konci mRNA

Pro vazbu je rozhodující prostorová struktura



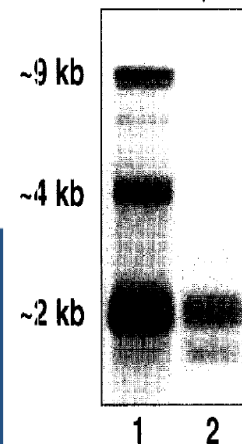
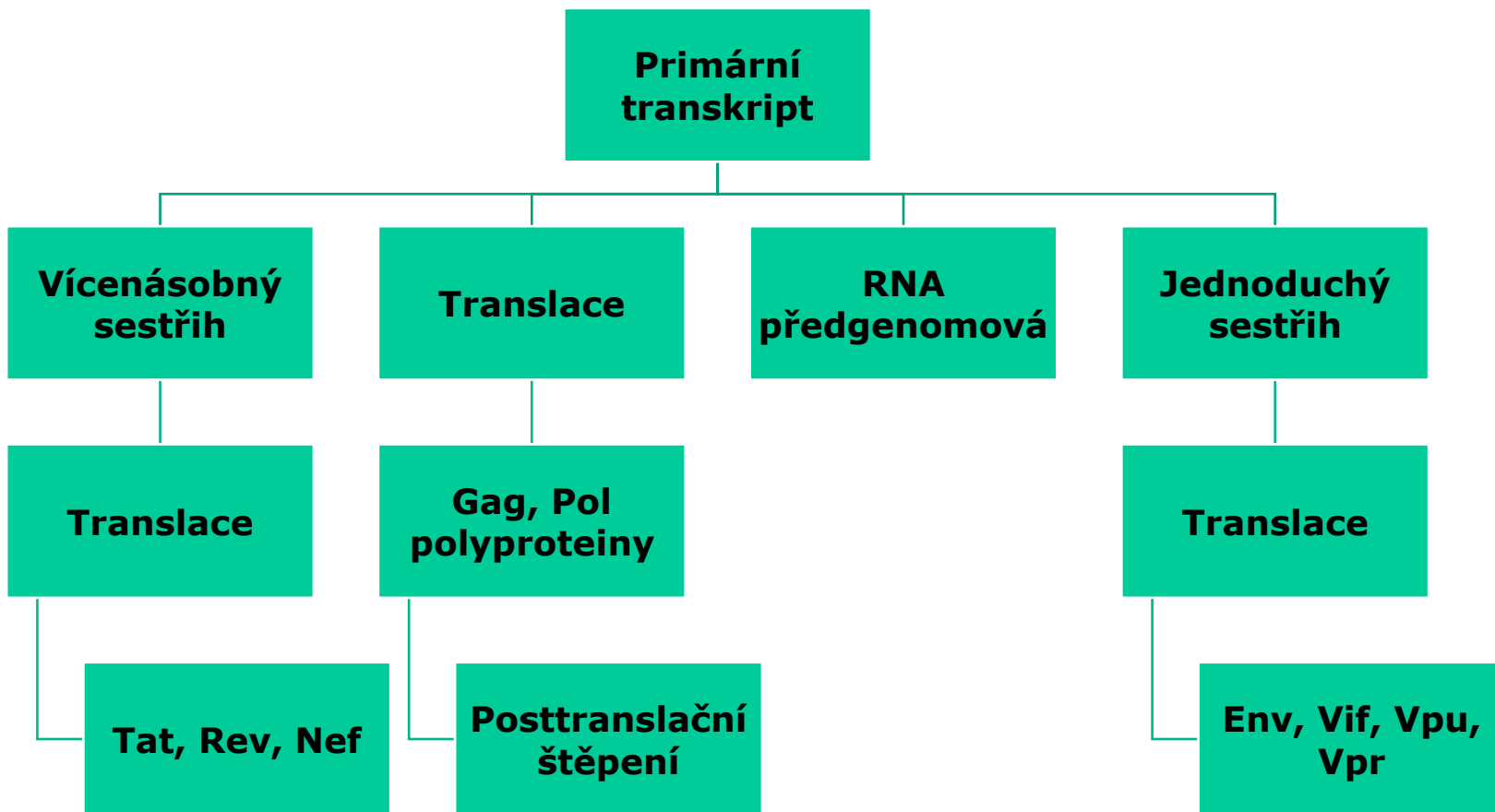
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Exprese genomu viru HIV-1



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

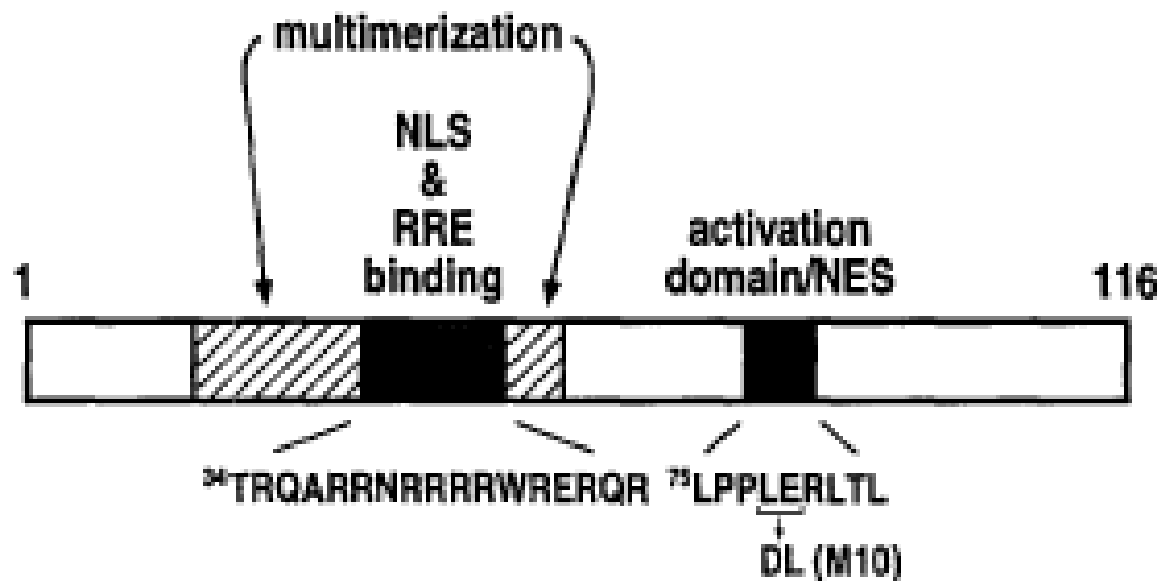
MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Rev protein viru HIV-1

Export neseštríhaných mRNA z jádra

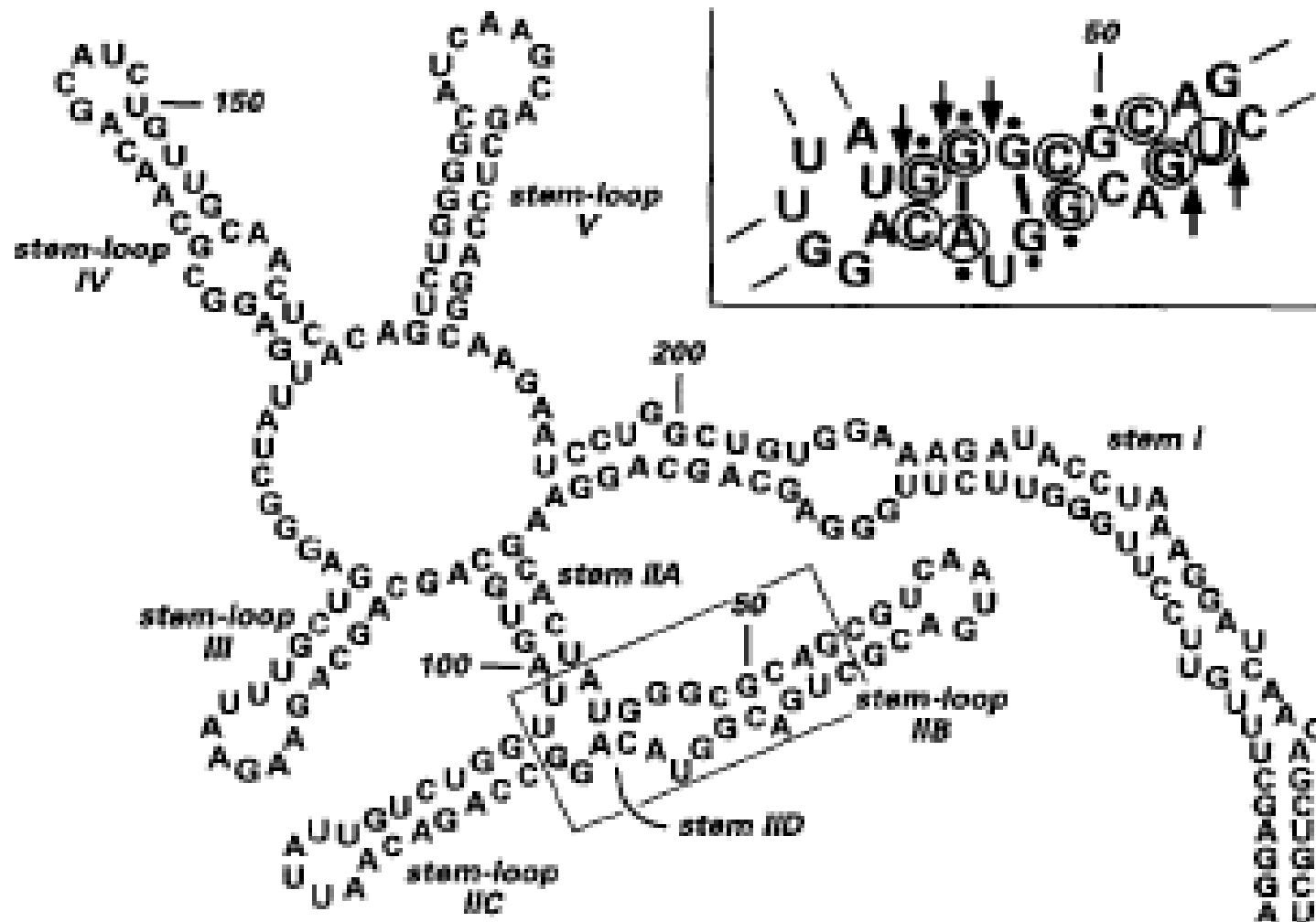


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Genová terapie

1. Strategie interferující s virovou replikací

Proteiny

Nukleové kyseliny

2. Strategie eliminující infikované buňky



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Transdominantní negativní proteiny

Nefunkční mutanti virových strukturálních (gp41, gp120) nebo regulačních proteinů (Tat, Rev)

Inhibují funkci virových proteinů kompeticí se:

Substrátem

Kofaktory

Nefunkční multimery

Nevýhoda – možná tvorba protilátek



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Anti-infekční celulární proteiny

Derivovány z normálních buněčných proteinů se specifickou antivirovou funkcí

Inhibují:

Vazbu viru na buňku

Vazba na funkční virové proteiny (rozpustný CD4 receptor)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Intracelulární protilátky

Intracelulárně exprimovaná vazebná místa
protilátek

Exprese ve vybraných kompartmentech buňky
(jádro, ER)

Kompetice s maturací viru (gp41) nebo inhibice
funkčních proteinů (Tat, Rev)



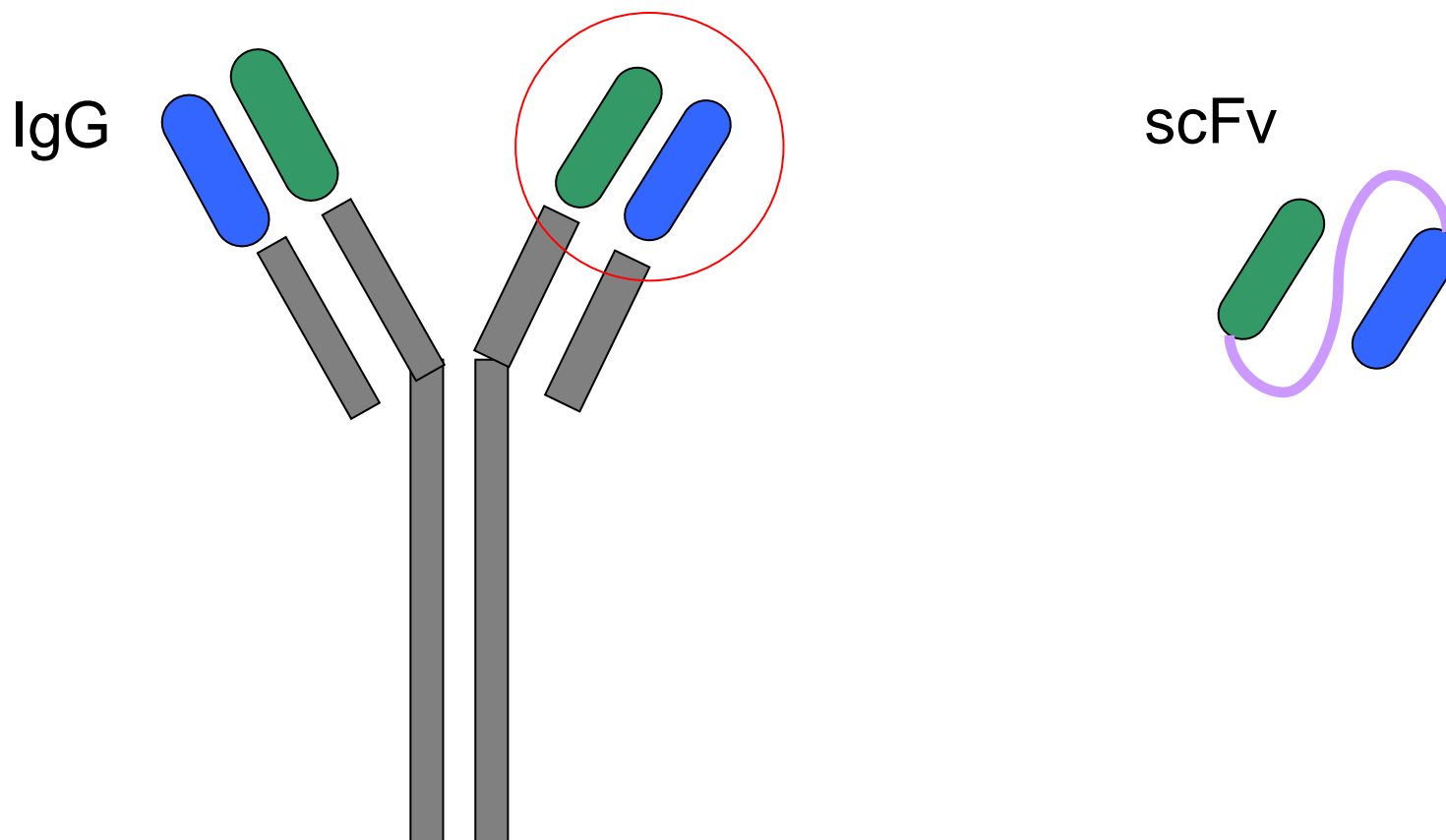
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Schéma IgG a scFv molekuly



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

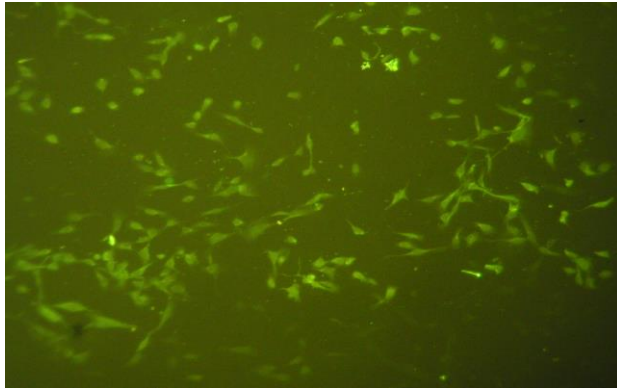
MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



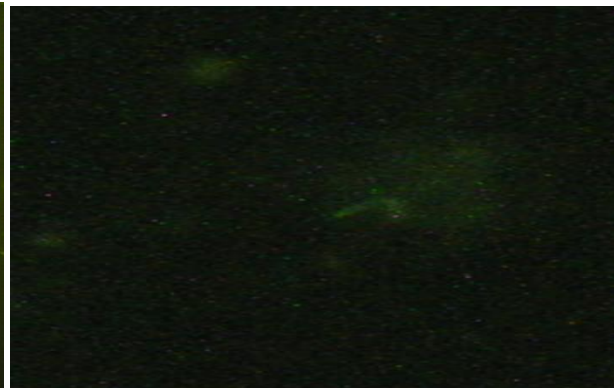
Národní
plán
obnovy

Intracelulární imunizace

A



B



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Sebevražedné geny

Exprimují toxické proteiny (difterický toxin, herpesvirovou tymidin kinázu) pod kontrolou virového promotoru

Selektivně usmrtí infikovanou buňku po infekci virem



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Antisense RNA

Antisens oligonukleotidy k různým transkriptům
(mRNA) virového genomu

Funkce:

Vazba na komplementární oblasti

RNA duplexy jsou degradovány RNásami

Blokování translace

Nutná intracelulární exprese

Výhoda – nejsou imunogenní

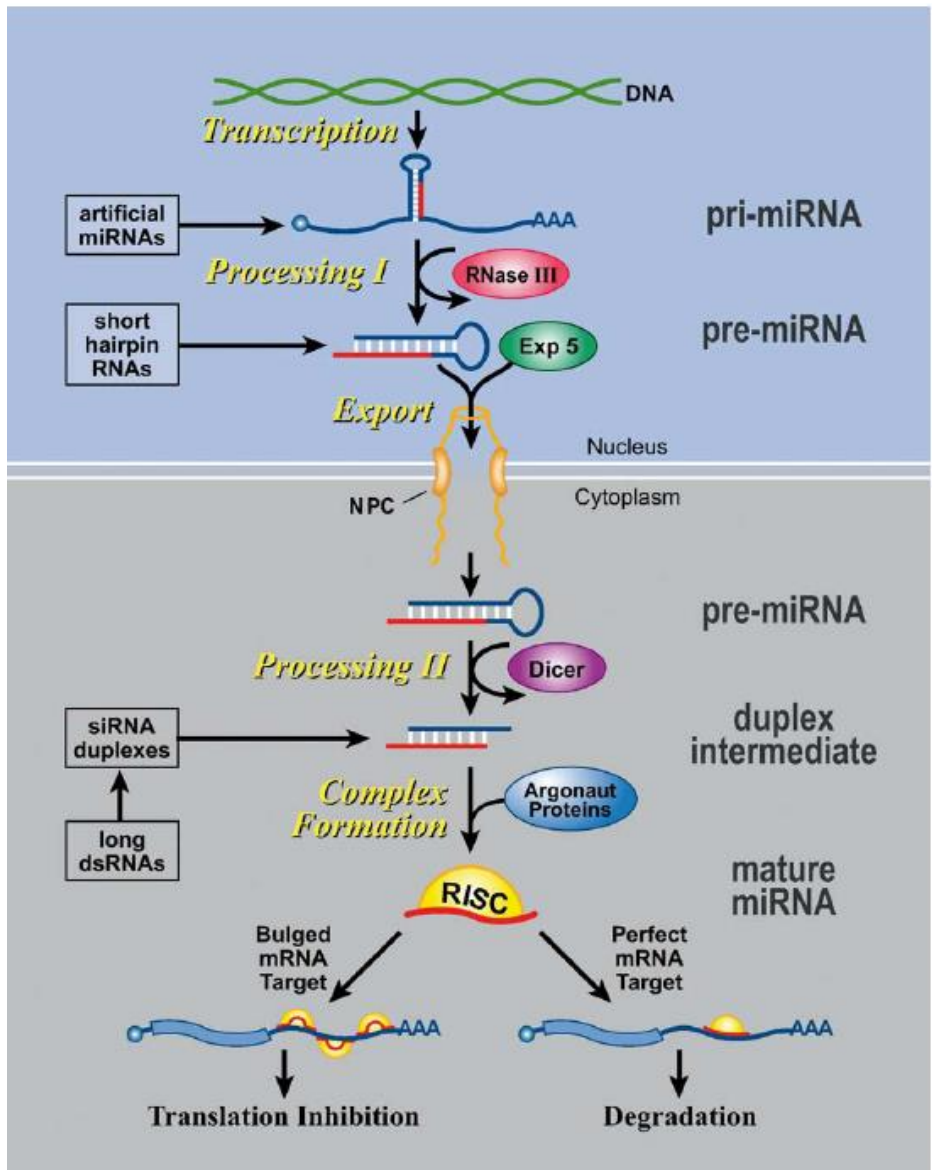


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MŠ
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

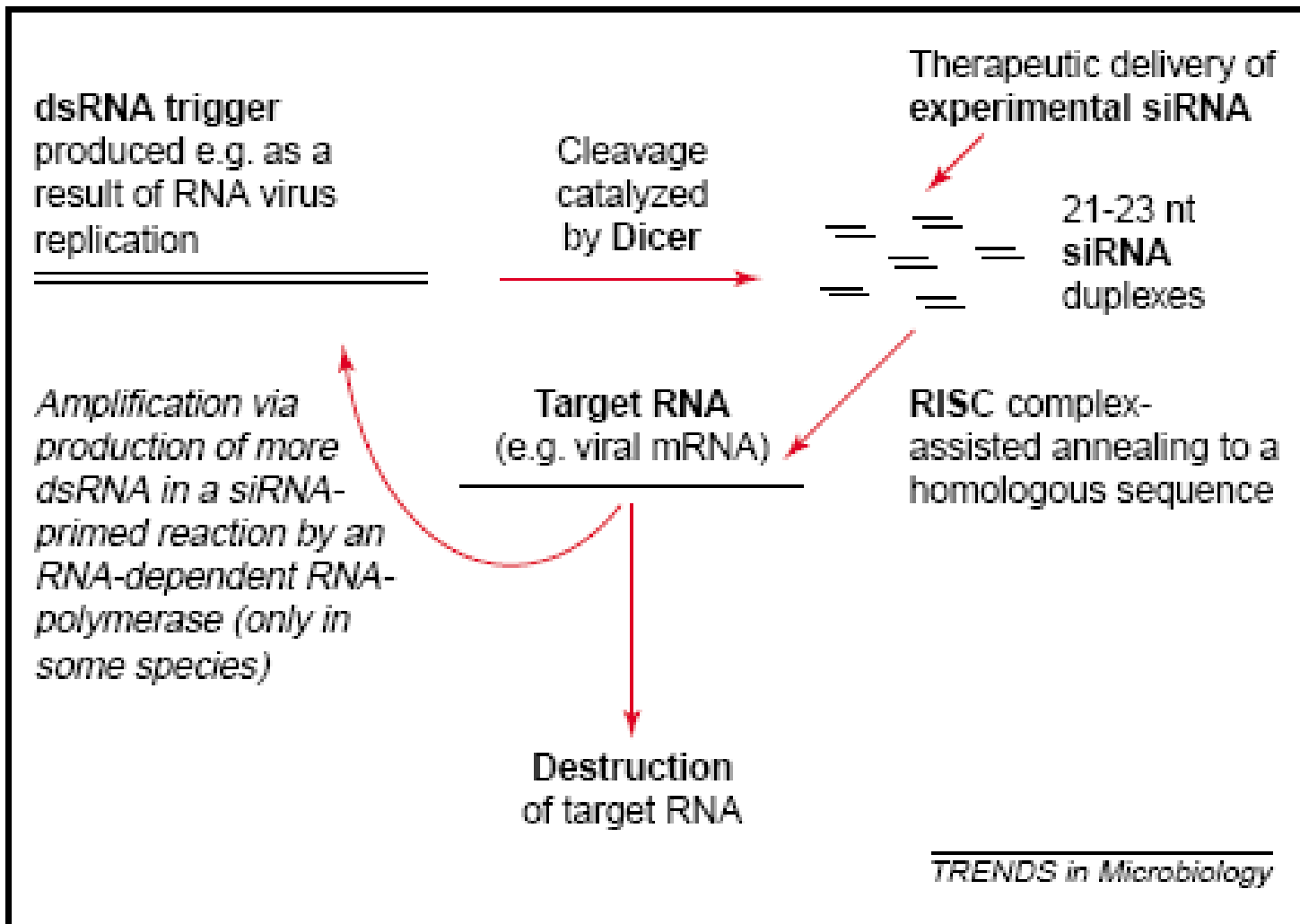


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

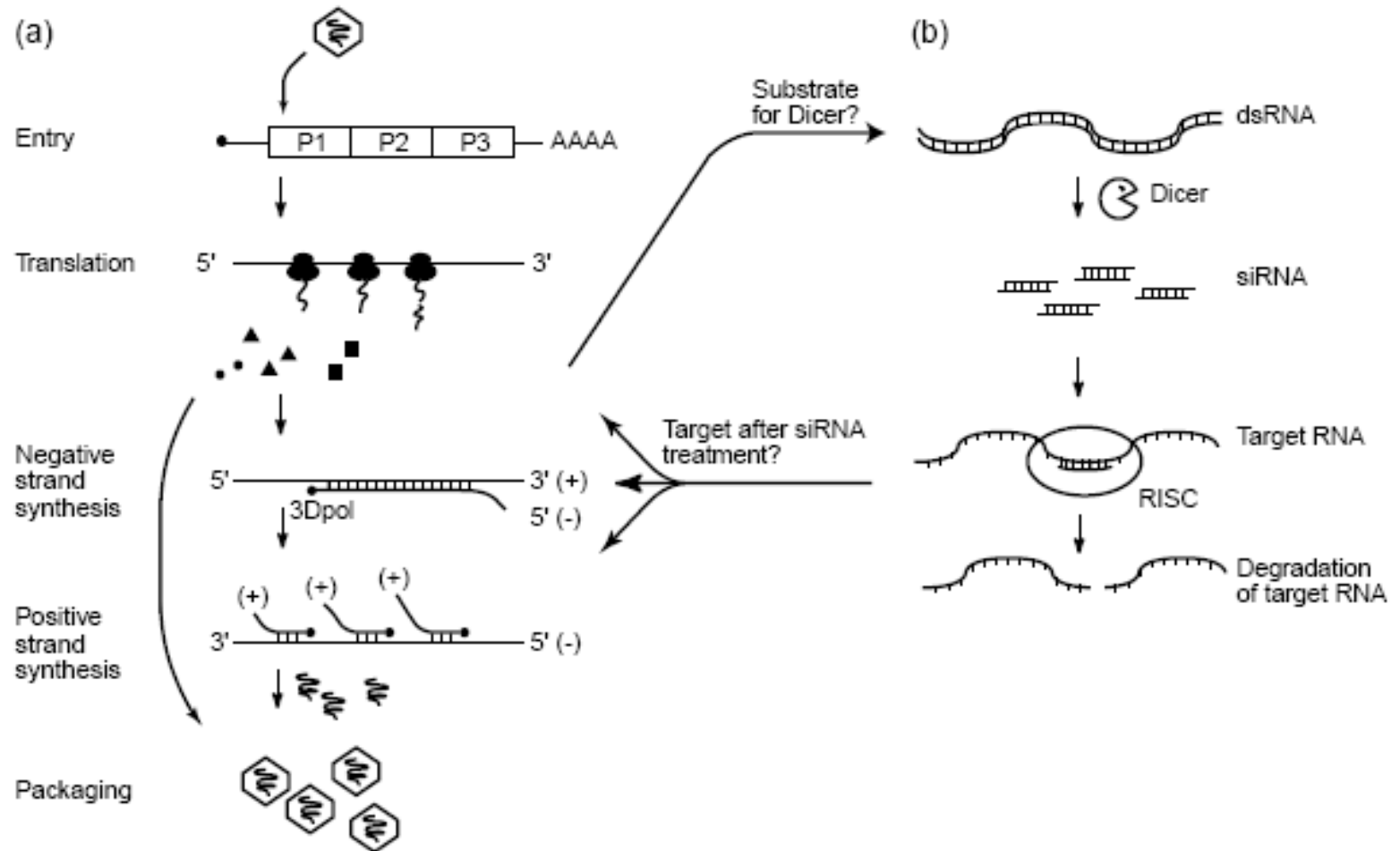


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy



Ribozymy

Antisens RNA molekuly s katalytickým účinkem

Funkce:

Vazba na mRNA

Katalytické štěpení - fosfodiesterové vazby

Jedna molekula inaktivuje mnoho mRNA molekul

Vysoce specifické (rozpoznávací i štěpenou sekvencí)

Jsou snadno degradovány RNázami



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

RNA návnady

Krátké RNA molekuly imitující funkční domény virových regulačních proteinů (např. RRE viru HIV-1)

Výhody – nemohou být ovlivněny variabilitou transkripčních faktorů (ovlivněna by byla i vazba na originální transaktivační sekvence)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

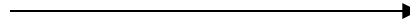


Národní
plán
obnovy

DNA vakcíny



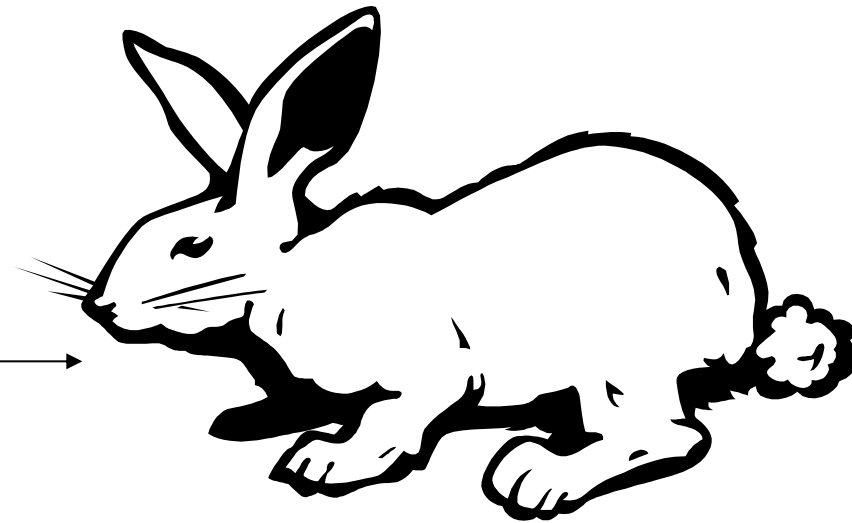
Gen kódující imunogen



Konstrukce vakcíny
plazmid + gen imunogenu



Transformace bakterií, pomnožení
Purifikace plazmidové DNA



Vakcinace plazmidovou DNA



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Výhody DNA vakcín

Dlouhodobá stimulace imunitního systému (týdny až měsíce)

Preferenční stimulace CTL

Přítomnost plazmidové kostry (CpG motivy) má imunostimulační účinky

levná, snadná a rychlá příprava, extrémní stabilita

Možnost genetických manipulací (peptidové knihovny), koexprese cytokinů

Zatím nebyly pozorovány vedlejší účinky a autoimunita

Imunizace i proti slabým (kryptickým) imunogenům



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Stimulované T lymfocyty

CTL odpověď může být rozhodující v anti-HIV-1 odpovědi

Stimulace CTL ex-vivo

Nepřímo - stimulace dendritických buněk

Adoptivní imunní transfer cytotoxických lymfocytů

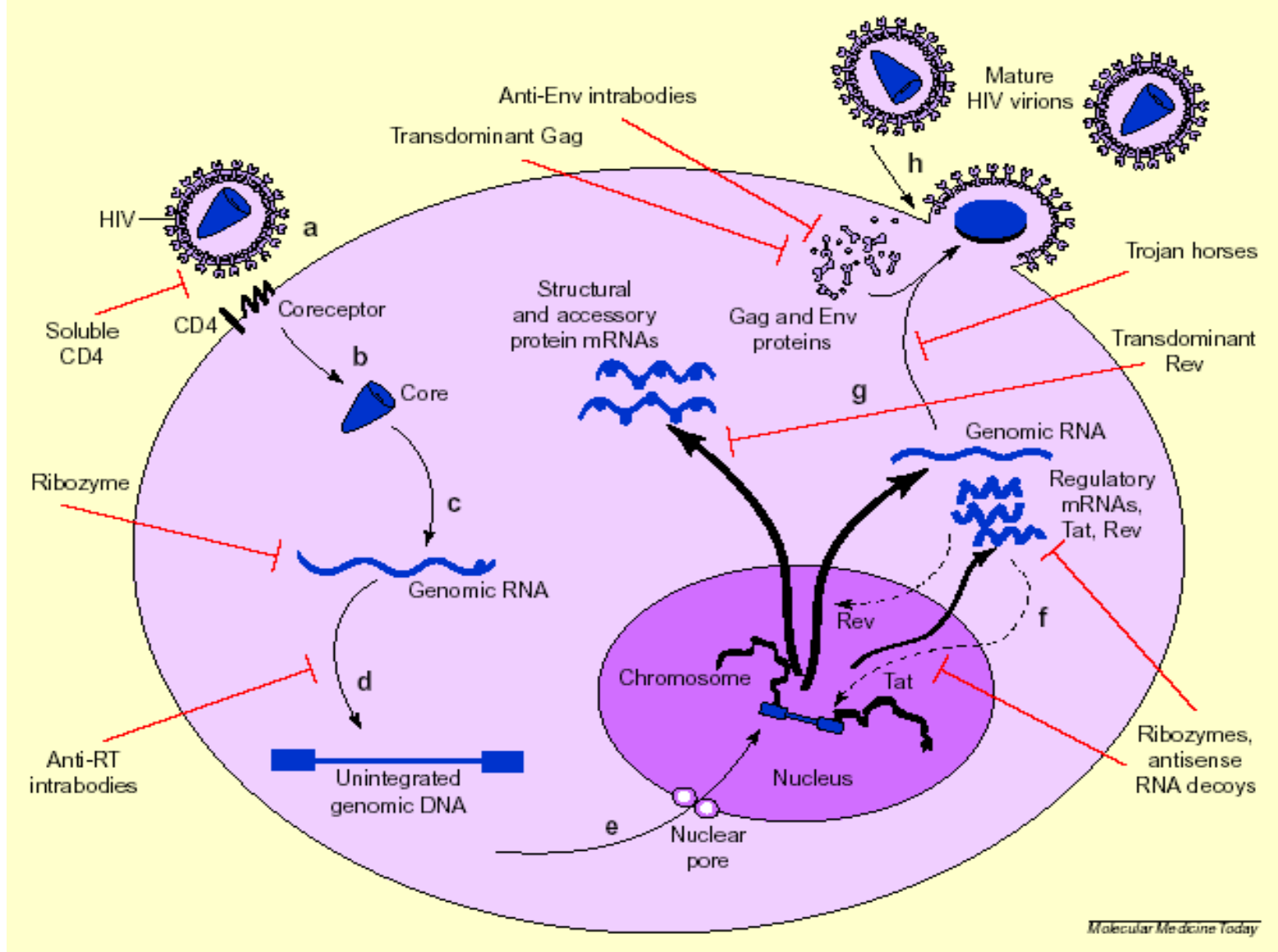


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Praktické aplikace

Exprese „mechanismu“ v autologní kmenové buňce

Depopulace kmenové dřeně pacienta (ozáření, chemoterapeutika)

Transplantace těchto transgenních kmenových buněk



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠ
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy