

Kolegij Molekularna biologija

VIRUSI, VIROIDI, PRIONI

dr. sc. Gordana Maravić
 Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
 Farmaceutsko-biokemijski fakultet
 Sveučilišta u Zagrebu


GM
2004

- **Obilježja virusa**
 - Genetički materijal
 - Domaćini
 - Kultiviranje u laboratoriju
 - Veličina, morfologija, klasifikacija
 - Replikacija
 - Bakteriofagi
 - Životinjski virusi
 - HIV
 - Uloga u nastanku raka
- **Viroidi**
- **Prioni**

GM
2004

Glavna obilježja virusa

- **Sitne, infektivne čestice**
- **Genom** - jedan ili više komada nukleinske kiseline (RNA ili DNA, nikad obje)
- **Nemaju staničnu građu**
 - nema membrane, citosola, organela
- **Ovisni o domaćinu**
 - nemaju metaboličku aktivnost niti se mogu razmnožavati bez domaćina
- **Izvanstanični oblik – VIRION**
 - moguća kristalizacija



GM
2004

GOLI VIRION

- proteinski omotač - **KAPSIDA**
- nukleinska kiselina (genom) } **NUKLEOKAPSIDA**



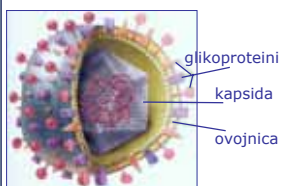
nukleinska kiselina

- Kapsida je izgrađena od podjedinica nalik podjedinicama u proteinu – **KAPSOMERE**
- Kapsomere mogu biti izgrađene od jednog ili više tipova proteina

GM 2004

VIRION S OVOJNICOM

Kod životinjskih virusa nukleokapsida je često omotana ovojnicom nalik fosfolipidnoj membrani

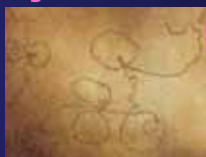


- ovojnica je dio membrane iz stanice domaćina u koju su ugrađeni glikoproteini kodirani virusnim genom
- ovojnica ne pokazuje fiziološku ulogu membrane (endocitoza, aktivni transport)
- proteini i glikoproteini ovojnice sudjeluju u prepoznavanju stanice domaćina

GM 2004

Genetički materijal virusa

- **DNA ili RNA, ali nikad obje**
- nukleinska kiselina može biti jednolančana ili dvolančana
- **+RNA djeluje kao mRNA, uspoređujemo je s kodirajućim lancom DNA**
- **-RNA ne može izravno poslužiti za sintezu proteina, uspoređujemo je s nekodirajućim lancom DNA**
- **genom može biti cjelovit ili segmentiran**



DNA T7




DNA E. coli

GM 2004

Virusni domaćini


- **Svi tipovi organizama podložni su napadu virusa**
 - životinje, biljke, gljive, bakterije
 - specifičnost je omogućena komplementarnim prepoznavanjem proteina ili glikoproteina na virusnoj kapsidi ili ovojnici s proteinima ili glikoproteinima na površini stanice domaćina
- **Biljni virusi**
 - manje istraženi iako je prvi virus izoliran iz duhana (virus mozaične bolesti duhana - TMV)
 - inficiraju biljne stanice putem abrazija u staničnom zidu ili putem nametnika
- **Virusi gljiva**
 - različiti od ostalih virusa jer nemaju izvanstanični oblik



GM 2004

Virusni domaćini

- **Bakterijski virusi**
- BAKTERIOFAGI ili FAGI
- **Životinjski virusi**
 - neki specifično prepoznaju pojedine stanice domaćina (HIV, virus gripe)
 - neki inficiraju mnogo različitih stanica u mnogim domaćinima (virus bjesnoće)



GM 2004

Kultiviranje virusa u laboratoriju

Virusi se ne mogu replicirati izvan stanice domaćina pa se stoga uzgajaju u kulturama stanica i tkiva



virusni plak
bakterijska livada



Fagi se uzgajaju u bakterijskoj kuturi



Životinjski virusi uzgajaju se pilećem zametku ili u kuturi stanica



Morfologija virusa

3 glavna oblika:
helikalni, poliedarski i kompleksni

- **Helikalni oblik**
 - virus mozaične bolesti duhana
 - kapsomere su spiralno povezane tvoreći cijev oko nukleinske kiseline
- **Poliedarski oblik**
 - virus prehlade
 - poliedar s mnogo stranica
 - gotovo sferični oblik
 - najčešće ikozaedar (20)

GM 2004

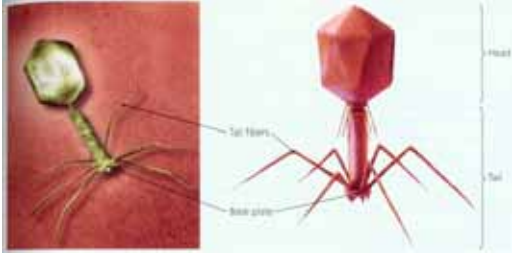
Morfologija virusa

- **Kompleksni oblik**
 - ne može se svrstati u prethodne dvije kategorije
 - više različitih oblika


- virus malih boginja
- n.k. omotana s nekoliko omotača (uključujući i lipidni), bez vidljive kapside
- virus bjesnoće
- kapsida i ovojnica u obliku metka

GM 2004

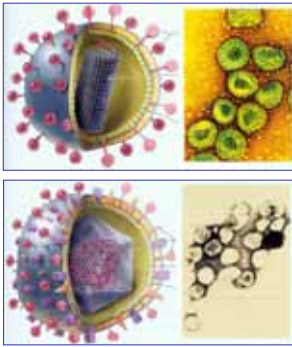
Morfologija virusa



- bakteriofag T4 – kompleksni oblik
- ikozaedarska glava i rep koji omogućava prihvaćanje i unos n.k.

GM
2004

Morfologija virusa



- koronavirus
- virus s ovojnicom i helikalnom kapsidom

Kompleksni oblik

- togavirus
- virus s ovojnicom i poliedarskom kapsidom

GM
2004

Klasifikacija virusa

- prema vrsti nukleinske kiseline
 - prema prisutnosti ovojnice
 - prema obliku
 - prema veličini
- Međunarodni komitet za taksonomiju virusa (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*)
- zbog velike raznolikosti ne mogu se organizirati u više taksonomske podjele
 - tri razreda u koje su svrstane porodice i rodovi

GM
2004

Klasifikacija ljudskih virusa

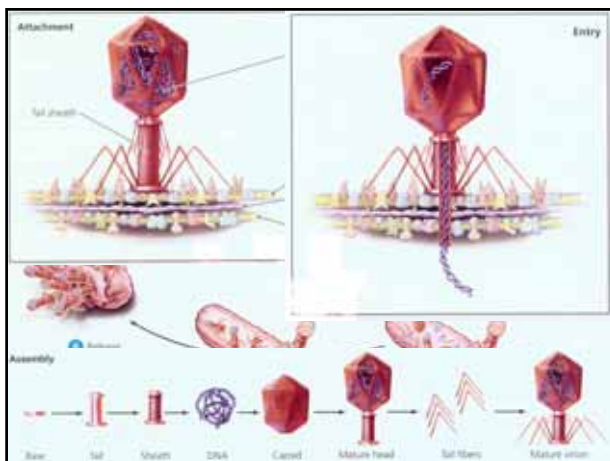
Porodica	Tip n.k.	Rod (bolest)
DNA virusi		
<i>Herpesviridae</i>	dl	<i>Simplexvirus</i> (herpes tipa 1)
<i>Hepadnaviridae</i>	dijelom dl, dijelom jl	<i>Hepadnavirus</i> (hepatitis B)
<i>Parvoviridae</i>	jl	<i>Erythrovirus</i> (eritem)
RNA virusi		
<i>Picornaviridae</i>	jl+	<i>Rhinovirus</i> (prehlada)
<i>Retroviridae</i>	jl+ segmentirana	<i>Lentivirus</i> , HIV (AIDS)
<i>Orthomyxoviridae</i>	jl- segmentirana	<i>Influenzavirus</i> (gripa)
<i>Filoviridae</i>	jl-	<i>Filovirus</i> , Ebola (hemoragijska groznica)
<i>Reoviridae</i>	dl segmentirana	<i>Rotavirus</i> (diareja)

GM 2004

Litički ciklus bakteriofaga (T4, λ)

- **Prihvatanje na površinu bakterije**
 - specifičnost proteina na nitima repa s receptorima na staničnoj stijenci, flagelama, pilima bakterije
- **Unos nukleinske kiseline u bakteriju**
 - otpuštanje lizozima
 - kontrakcija repa i unos n.k. pod pritiskom
- **Sinteza dijelova faga**
 - Razgradnja bakterijske DNA (nukleaze u kapsidi ili kodirane virusnim genomom)
 - Korištenje stanične mašinerije za proizvodnju virusnih n.k. i proteina
- **Sklapanje virusnih čestica**
 - Spontano udruživanje kapsomera
 - Enzimsko ubacivanje n.k. u kapsidu
- **Otpuštanje zrelih viriona**
 - Fag T4 - u 25 min. otpusti 100-200 viriona

GM 2004

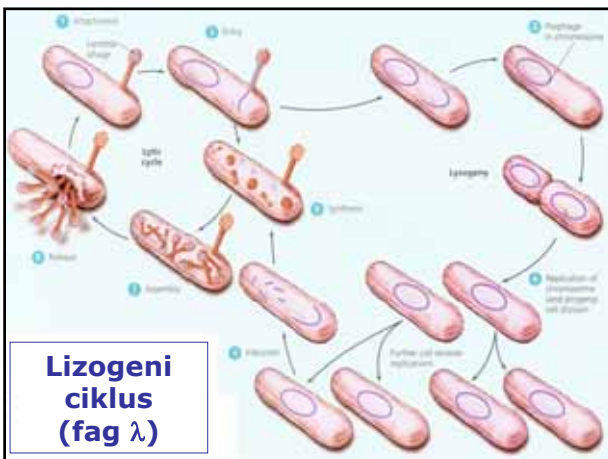


Lizogeni ciklus bakteriofaga

Lizogeni ili umjereni fagi (fag λ)

- **Prihvatanje na površinu bakterije**
- **Unos nukleinske kiseline u bakteriju**
 - Kao i kod faga T4, ali virusni genom ne preuzima odmah kontrolu nad stanicom
- **Ugradnja virusnog genoma u genom domaćina**
 - Inaktivni bakteriofag – **PROFAG** – replicira se zajedno s genomom domaćina kroz mnogo generacija
- **Indukcija**
 - Fizički i kemijski agensi koji uzrokuju oštećenje DNA (UV-svjetlo, X-zrake, karcinogeni)
 - Profag postaje litički virus
- **Sinteza dijelova faga**
- **Sklapanje virusnih čestica**
- **Otpuštanje zrelih viriona**

GM
2004



Ekspresija virusnih gena

2 klase gena koji se eksprimiraju nakon infekcije stanice domaćina

- **Rani geni**
 - Ekspresija vrlo brzo nakon infekcije
 - Sinteza proteina za replikaciju virusnog genoma
- **Kasni geni**
 - Kodiraju strukturne proteine viriona te proteine za lizu stanice domaćina

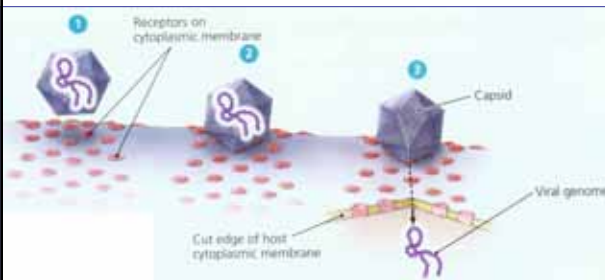
GM
2004

Replikacija životinjskih virusa

- **Prihvatanje na površinu stanice**
 - nema repa kao kod bakteriofaga
 - prepoznavanje receptora na stanici domaćinu putem glikoproteina ili proteina na ovojnici ili kapsidi
- **Ulazak u stanicu**
 - goli virioni - izravna penetracija
 - virioni s ovojnicom - fuzija s membranom
 - fagocitoza

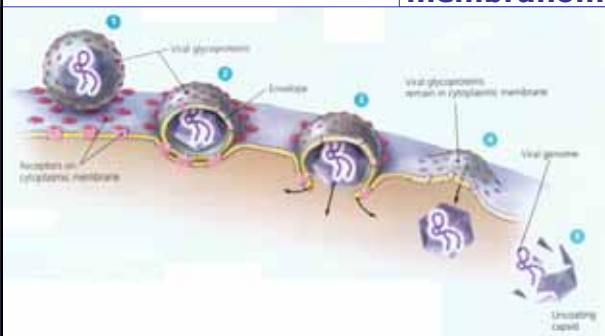
GM
2004

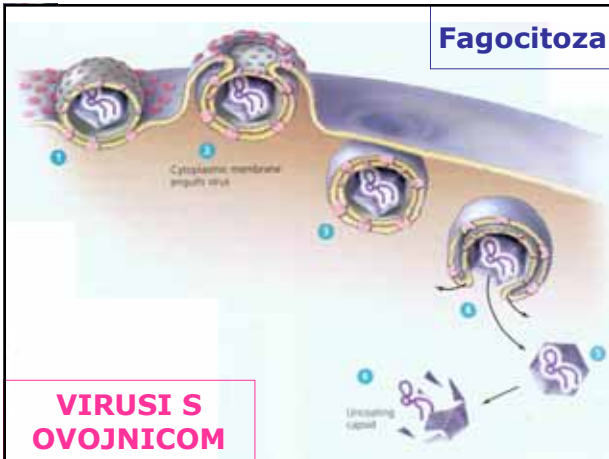
Virus bez ovojnice - izravna penetracija -



VIRUSI S OVOJNICOM

Fuzija s membranom





Sinteza DNA virusa

Dvolančana DNA (dl DNA)

- umnažanje slično normalnoj replikaciji DNA i translaciji proteina u stanici
- u staničnoj jezgri oba lanca virusne DNA služe kao kalup za replikaciju
- DNA se prepisuje u mRNA, a proteini kapsomere sintetiziraju se u citosolu
- kapsomere se vraćaju u jezgru i spontano udružuju s virusnom DNA
- herpes i papiloma virusi

GM 2004

Sinteza DNA virusa

Jednolančana DNA (jl DNA)

- Enzimi domaćina sintetiziraju novi komplementarni lanac DNA koji zajedno s jl DNA virusa tvori dl DNA
- dl DNA se prepisuje u mRNA itd.
- jl DNA se pakira u nove virione
- Parvovirusi (eritem)

GM 2004

Sinteza RNA virusa

Pozitivna jednolančana RNA (+ jI RNA)

- +RNA djeluje izravno kao mRNA i upravlja sintezom virusnih proteina
- -RNA lanac se prepisuje s +RNA pomoću virusne RNA polimeraze
- -RNA služi kao kalup za sintezu jI +RNA genoma koji se pakira u nove virione
- prepisivanje RNA ⇒ RNA jedinstveno za viruse
- poliovirus

GM 2004

Sinteza RNA virusa

Retrovirusi

- također jI RNA genom, ali ne djeluje izravno kao mRNA
- na kalupu +RNA reverzna transkriptaza sintetizira DNA intermedijar
- DNA intermedijar je kalup za sintezu novih +RNA molekula koje djeluju kao mRNA i virusni genom za nove virione
- DNA intermedijar može se ugraditi u genom domaćina djelovanjem enzima **INTEGRAZE** – nastaje **PROVIRUS**
- HIV

GM 2004

Sinteza RNA virusa

Negativna jednolančana RNA (-jI RNA)

- +RNA sintetizira se pomoću virusnog enzima RNA-ovisne RNA transkriptaze koja se otpušta iz kapside prilikom ulaska virusa u stanicu domaćina
- +RNA služi kao mRNA i kao kalup za sintezu novih kopija -RNA koje se pakiraju u zreli virion
- virus gripe, rabies

GM 2004

Latencija životinjskih virusa

- latentni virusi ili provirusi (virus malih boginja, herpes virus) mogu ostati godinama u utišanom (dormantnom) stanju bez izazivanja simptoma infekcije
- ugradnja u genom domaćina je moguća, ali nije obavezna kao kod lizogenih faga
- HIV – ugradnja u genom – trajni provirus bez mogućnosti indukcije

GM
2004

HIV i AIDS

- HIV – engl. *human immunodeficiency virus*
- Otkriće 1983. - Robert Gallo i Luc Montagnier
- AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immune deficiency syndrome*)
 - Nedostatak normalne imunosti
 - Kao posljedica razvoj oportunističkih infekcija
 - Danas svjetska pandemija - 50 milijuna zaraženih ljudi, umrlo 20 milijuna

GM
2004

Table 25.3 Opportunistic Infections and Tumors of AIDS Patients

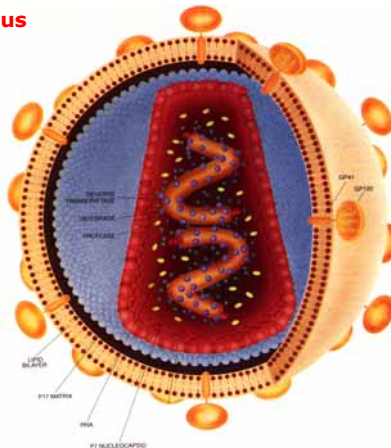
Type	Manifestations
Viral infections (24)*	Cytomegalovirus disseminated in brain, lungs, retina, etc. Herpes simplex virus disseminated in lungs, GI tract, etc. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) (JC virus) Oral hairy leukoplakia (Epstein-Barr virus)
Bacterial infections (19-21)	Tuberculosis, especially extrapulmonary (Mycobacterium spp.) Fungal pneumonia Recurrent fever and splenomegaly due to <i>Sarcocystis hominis</i> , <i>Strongyloides</i>
Protozoal infections (23)	Toxoplasmosis (<i>Toxoplasma gondii</i>) Cerebral toxaria (<i>Cryptosporidium</i>) Diarrhea, persisting for more than 1 month, due to isoprostal
Fungal infections (22)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia Thrush, disseminated in mouth, lungs, esophagus (<i>Candida albicans</i>) Histoplasmosis (<i>Histoplasma capsulatum</i>)
Viral-induced tumors (24)	Kaposi's sarcoma (angiosarcoma) related to HHV-8 Lymphoma (induced by Epstein-Barr virus)
Others	Wasting disease (called also as AIDS wasting syndrome) Dementia

*Numbers in parentheses refer to chapters where relevant material is discussed.

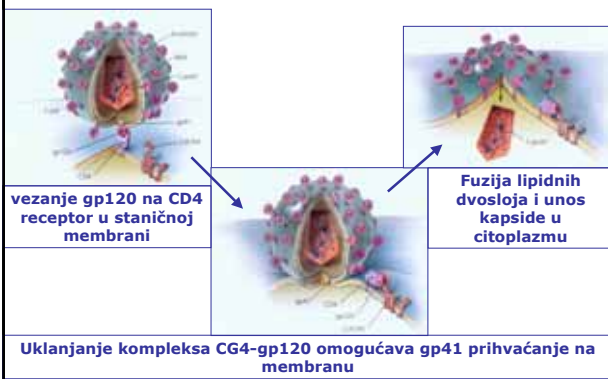
GM
2004

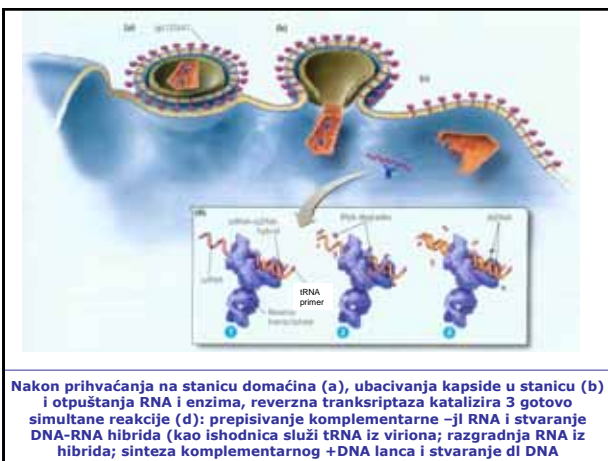
• HIV-1 je **retrovirus** koji svoju genetičku informaciju pohranjuje u **21** molekuli RNA

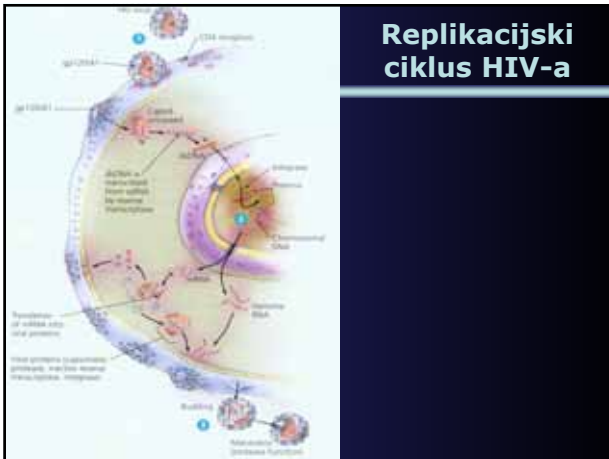
- HIV inficira
 - T4 limfocite
 - Makrofage
 - Stanice glatkih mišića



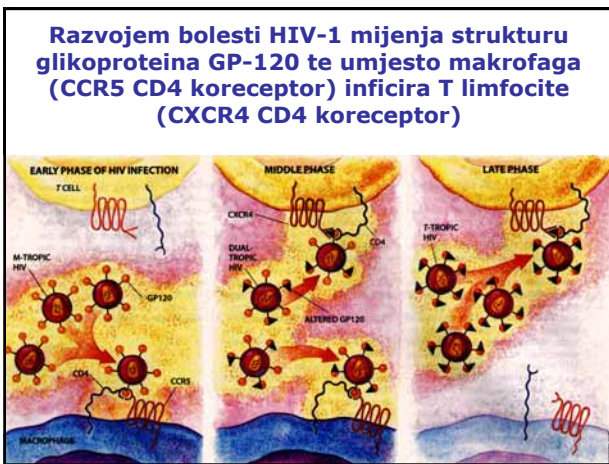
Proces prihvaćanja i ulaska HIV-a u stanicu

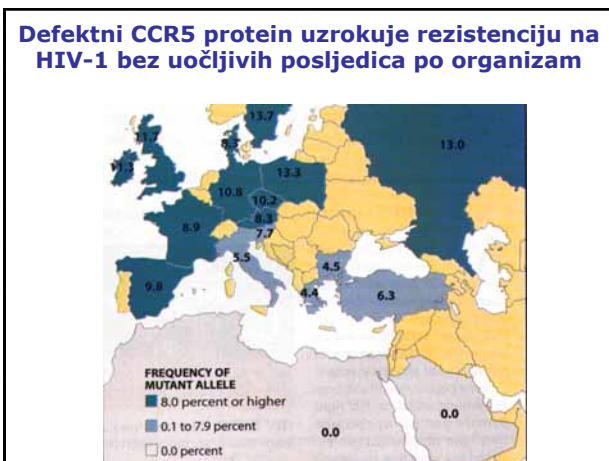






Replikacijski ciklus HIV-a





Uloga virusa u nastanku raka

Tablica 15-2. Tumorski virusi

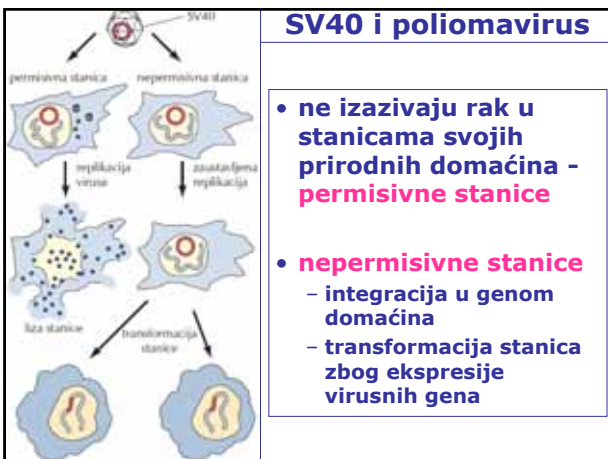
Porodica virusa	Ljudski tumori	Veličina genoma (kb)
DNA genomi		
virus hepatitisa B	rak jetre	3
SV40 i poliomavirus	ne	5
papilomavirusi	rak grlića maternice	8
adenovirusi	ne	35
herpesvirusi	Burkittov limfom, karcinom nazofarinksa, Kaposijev sarkom	100-200
RNA genomi		
virus hepatitisa C	rak jetre	10
retrovirusi	T-stanična leukemija odraslih	9-10

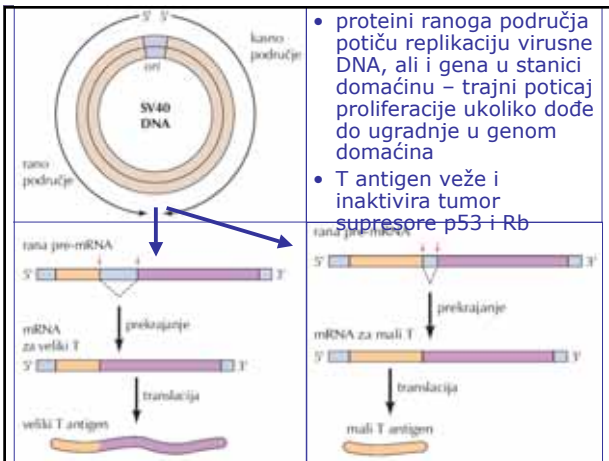
GM
2004

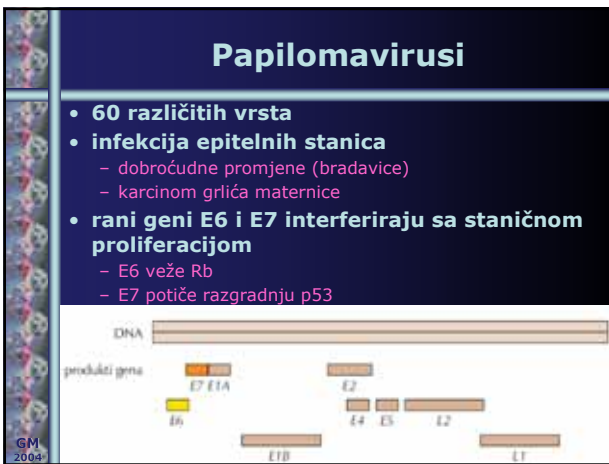
Virusi hepatitisa B i C

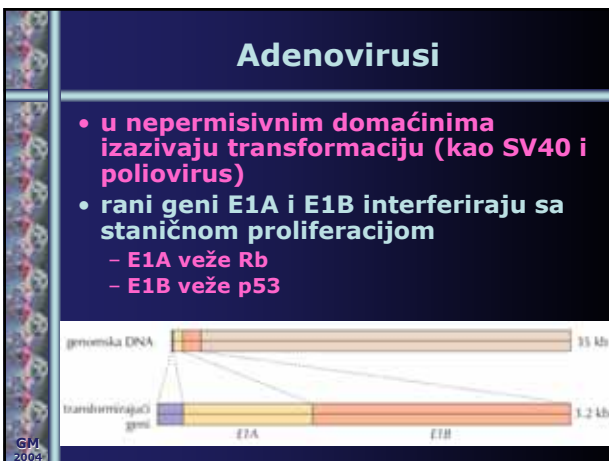
- **Kronične infekcije jetre povećavaju nastanak raka za 100 puta**
- **Trajna proliferacija jetrenih stanica zbog kroničnog oštećenja tkiva i upale potiče nastanak raka**
- **Virus hepatitisa B – gen X utječe na ekspresiju niza staničnih gena i dovodi do poremećaja proliferacije i staničnog preživljavanja**

GM
2004







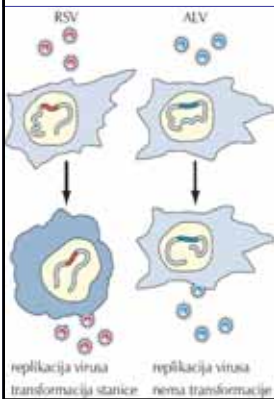


Herpesvirusi

- najsloženiji životinjski virusi
- uzrokuju tumore u životinja i ljudi
- **Epstein-Barrov virus**
 - Nekoliko vrsta raka, Burkittov limfom
 - Mehanizam nastanka raka nedovoljno razjašnjen zbog složenosti genoma
- **Herpesvirus povezan s Kaposijevim sarkomom**
 - Nekoliko virusnih gena utječe na staničnu proliferaciju i preživljavanje
 - Jedan od njih djeluje na Rb i p53

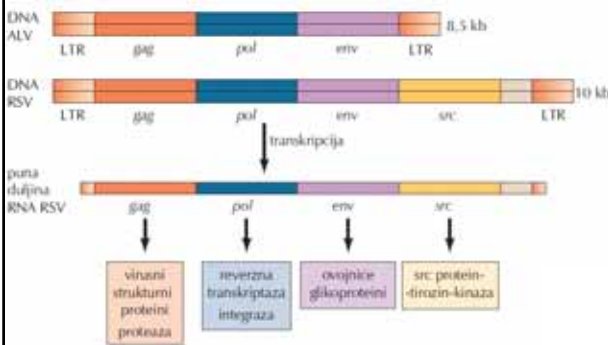
GM
2004

Retrovirusi



- različiti retrovirusi razlikuju se po onkogenim sposobnostima
 - Rausov sarkomski virus (RSV) transformira stanice pilećeg embrija, dok srodni virus ptičje leukoze (ALV) koji se replicira u istim stanicama ne uzrokuje transformaciju
- većina retrovirusa nije kancerogena, a nastanak raka povezan je s mutacijom staničnih gena uzrokovanom integracijom virusnog genoma
- karcinogeni retrovirusi sadrže ONKOGENE

Genomi retrovirusa ALV i RSV



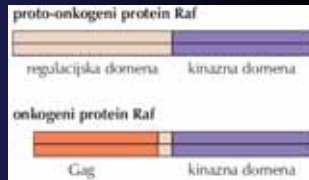
Onkogeni i protoonkogeni

- **Retrovirusni onkogeni nastaju rekombinacijom DNA virusa i domaćina**

- potječu od srodnih gena iz stanica domaćina
(**PROTOONKOGENI** - regulacijski stanični geni; *src*, *raf*, *ras*)

- **Onkogeni su mutirani ili nenormalno ekspimirani oblici staničnih protoonkogeni:**

- Transkripcija virusnog onkogeni je pod kontrolom virusnih promotora i pojačivača
- Delecije ishodnih protoonkogeni
- Nastanak fuzijskih proteina
- Točkaste mutacije



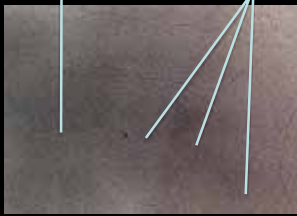
GM
2004

Viroidi

- izrazito male kružne molekule RNA
 - RNA se doima linearnom jer je povezana vodikovim vezama
- nemaju kapside
- uzrokuju bolesti biljaka i gljiva

DNA faga T7

PSTVd viroid



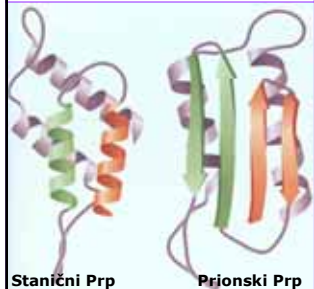
Prioni

- **Stanley Prusiner**
- **Proteinaste infektivne čestice**
- **Uzrokuju tzv. prionske bolesti**
 - Goveđi spongiformni encefalitis (bolest "lude krave")
 - Skrepi bolest ovaca
 - Creutzfeldt-Jakobova bolest u ljudi
 - Degeneracija i gubitak moždane tvari - stvaranje vakuola koje daju "spužvast" izgled



1997



<p>protein Prp</p> <ul style="list-style-type: none"> • Jedan aminokiselinski slijed može se smotati u dvije stabilne konformacije • Normalna struktura - α uzvojnice – stanični Prp • Oblik koji uzrokuje bolest - β nabrana ploča – prionski Prp 	<p>Prioni</p>
 <p>Stanični Prp Prionski Prp</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prionski Prp može inducirati konformacijsku promjenu u staničnom Prp proteinu – normalni Prp postaje prionski Prp • U normalnim okolnostima stanični proteini i polisaharidi potiču smatanje Prp u pravilan stanični oblik • Do pogrešnog smatanja može doći jedino u slučaju pretjerane ekspresije ili mutacije Prp gena • Ljudski Prp može se krivo smotati samo ako je na položaju 129 aminokiselina metionin (u 40% ljudi)
