



**Financováno  
Evropskou unií**  
NextGenerationEU



**Národní  
plán  
obnovy**

## **Příprava studijních materiálů studijního programu „Veterinární virologie“**

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

**Doktorský studijní program Veterinární virologie**

**Fakulta veterinárního lékařství**

**Veterinární univerzita Brno**

**Vytvoření doktorského studijního programu „Veterinární virologie“ na Veterinární univerzitě Brno**

**Specifický cíl B: Tvorba nových studijních programů v progresivních oborech**

Projekt NPO registrační číslo NPO\_VETUNI\_MSMT-16594/2022

Výstup č. 2, vazba na cíl projektu č. 2, volitelný indikátor U3



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

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie  
Fakulta veterinárního lékařství  
VETUNI



# 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)



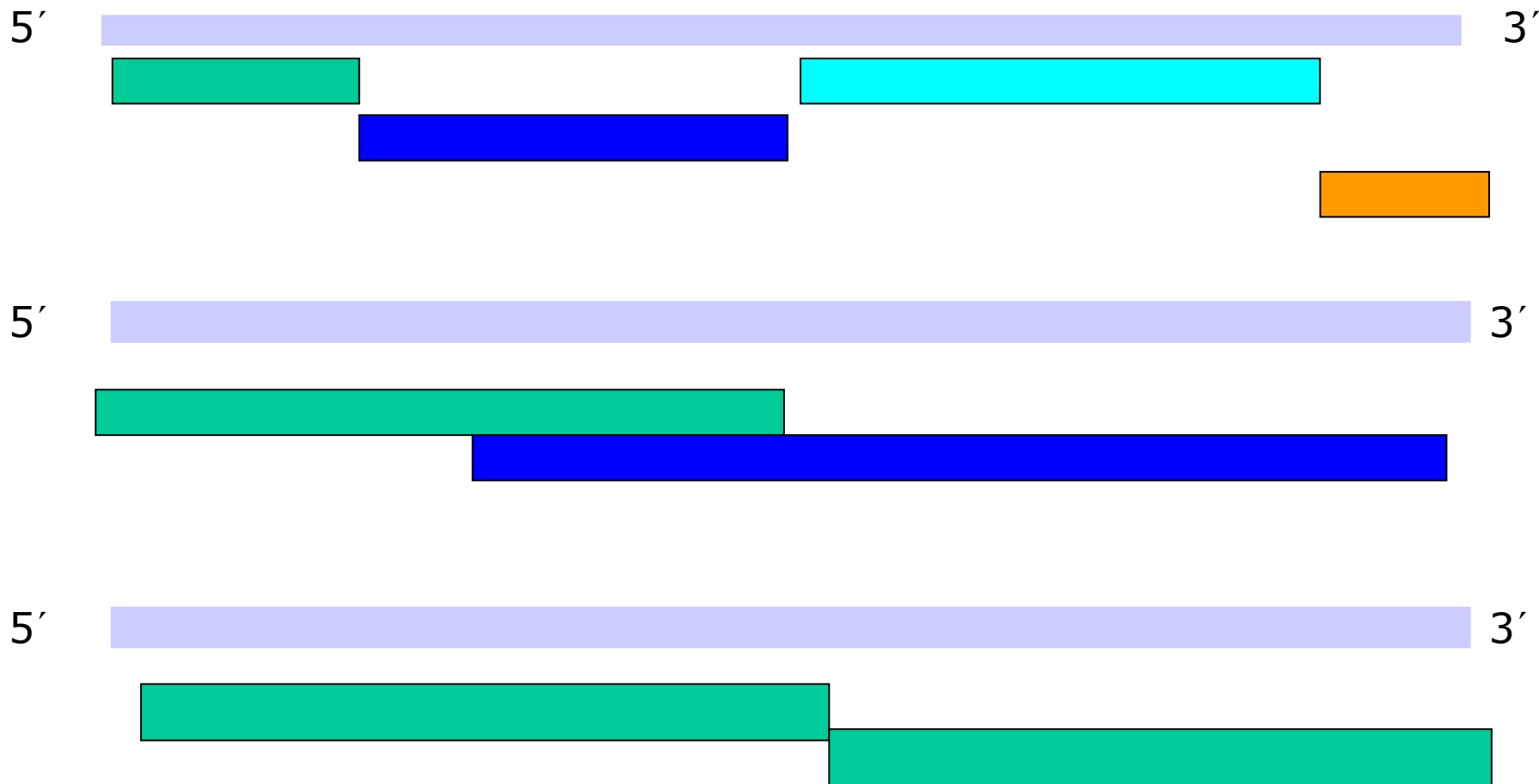
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠ  
MT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

# Kódování genetické informace viry

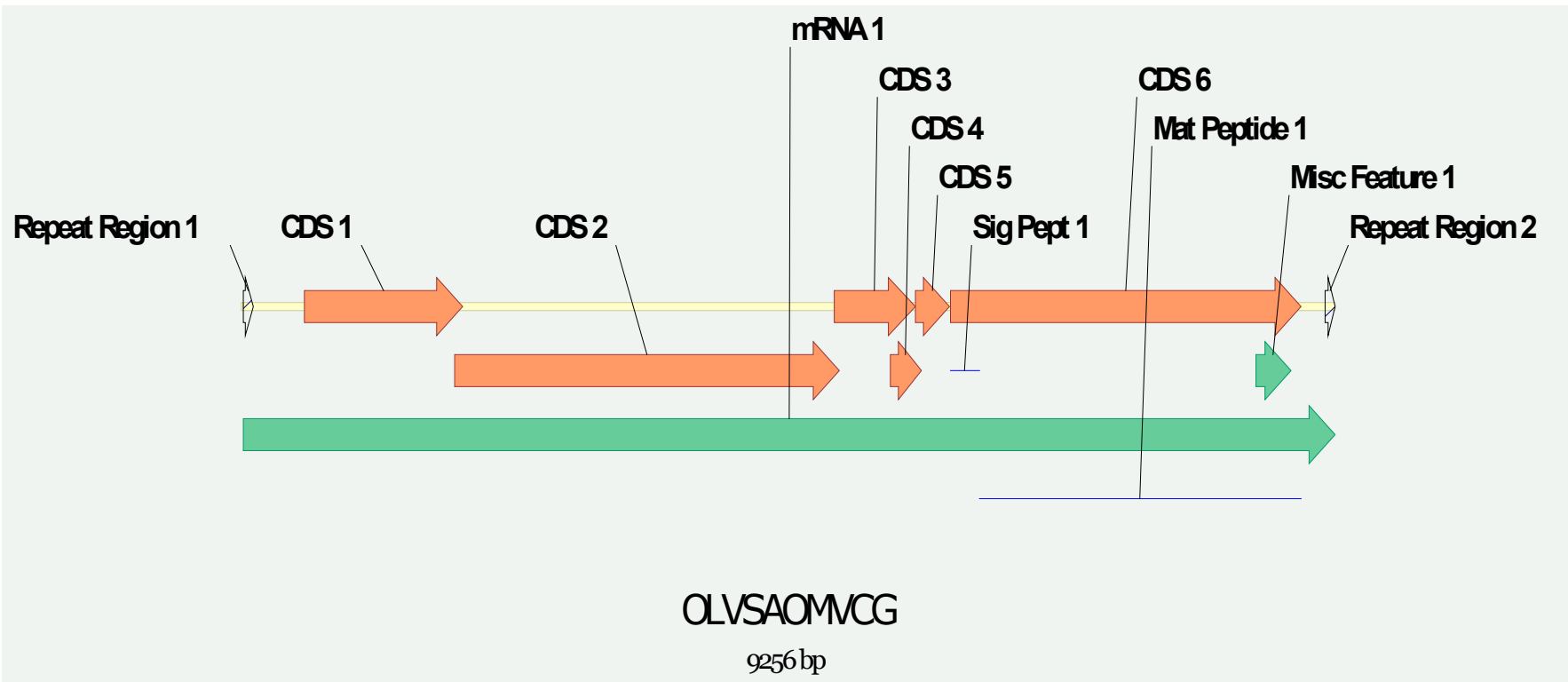


Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

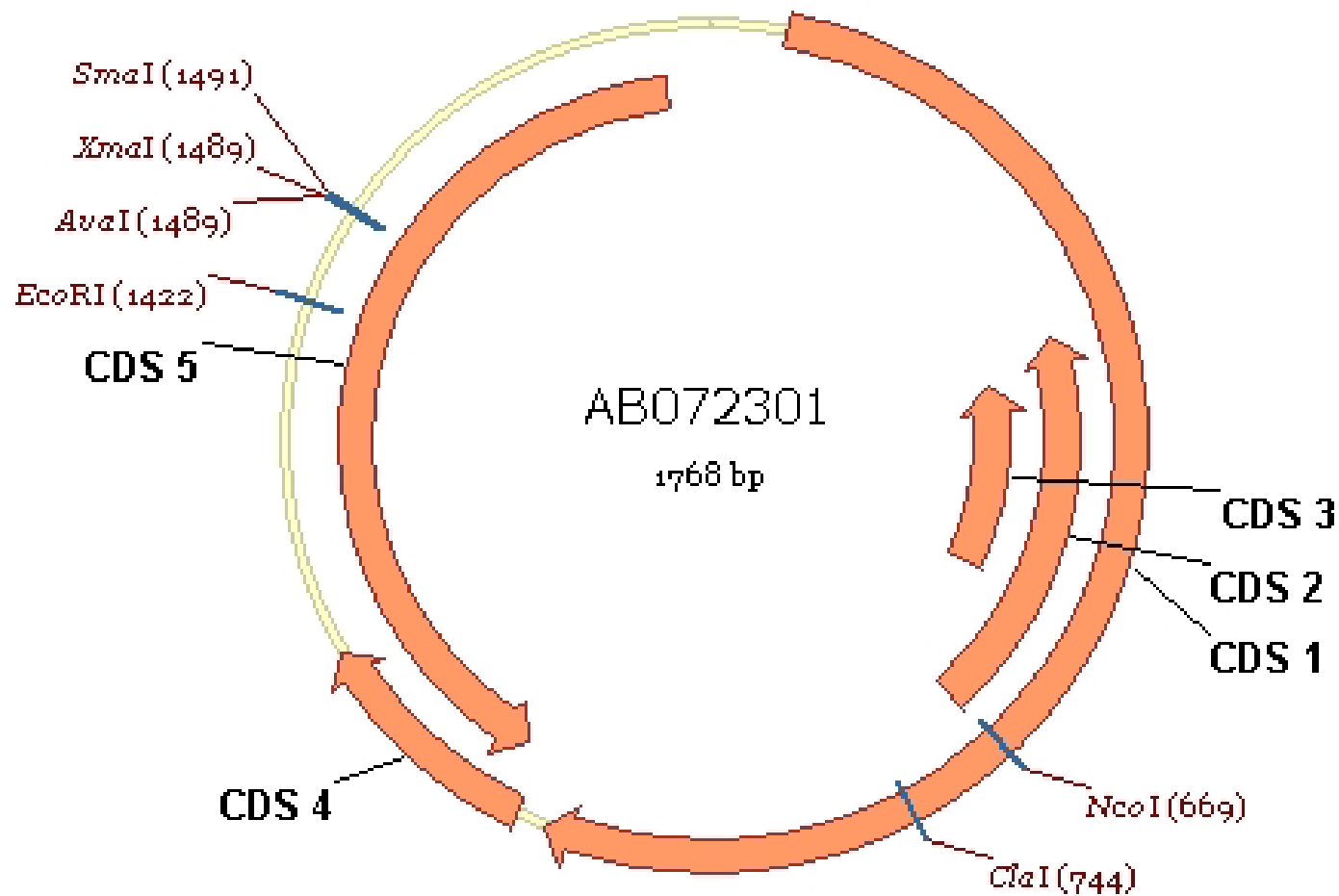


Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

**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



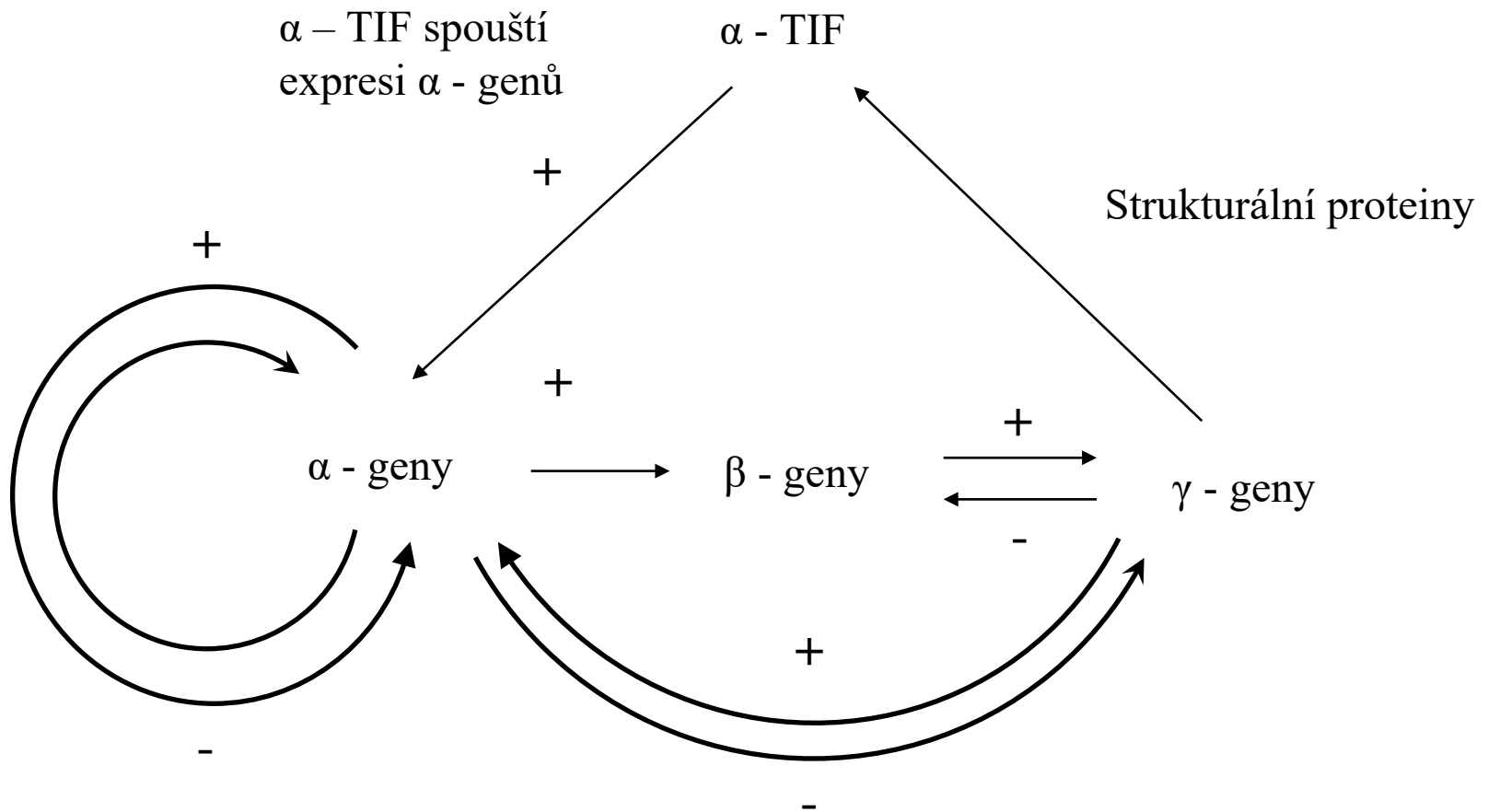
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠ  
MT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

# Kontrola exprese herpesvirů



# $\alpha$ proteiny herpesvirů

$\alpha$ -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	<b>Význam v pozdní expresi, inhibuje RNA sestřih a transport virových mRNA do cytoplasmy</b>
ICP 0	R <sub>L</sub> 2	<b>Nespecifický mRNA transaktivátor, kofaktor pro ICP 4 β-transkripci</b>
ICP 4	R <sub>S</sub>	<b>Zvyšuje transkripci β a γ genů</b>
ICP 22	US1	<b>Kofaktor pro expresi γ genů</b>
ICP 47	US12	<b>Inhibuje transport peptidů a jejich prezentaci MHC I antigeny</b>



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

**MŠMT**  
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



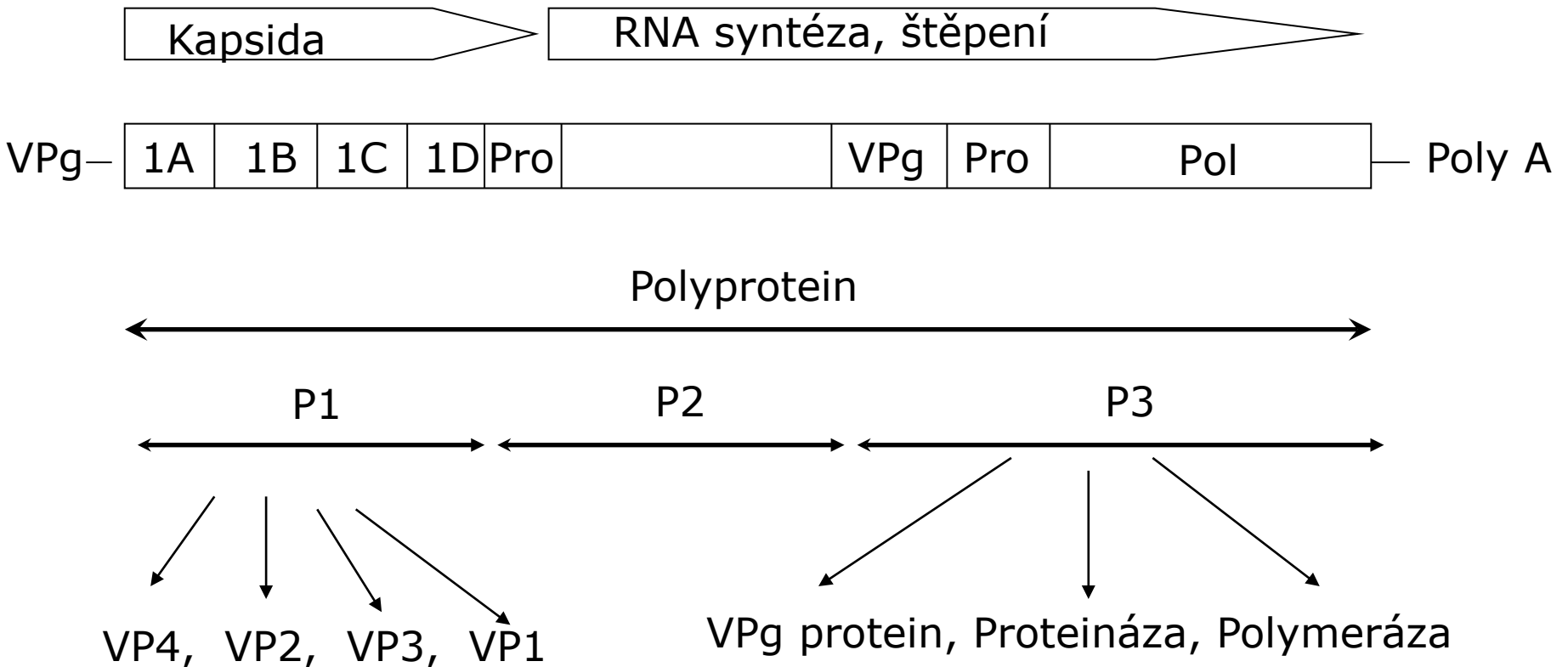
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

**MŠMT**  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

# (+) ssRNA



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠ  
MT  
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'



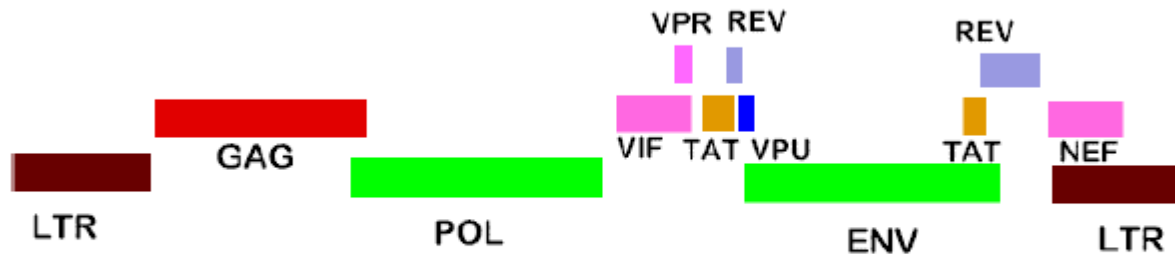
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠ  
MT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

# Regulace transkripce lentivirů



HIV-1 GENOME 9749 NUCLEOTIDES



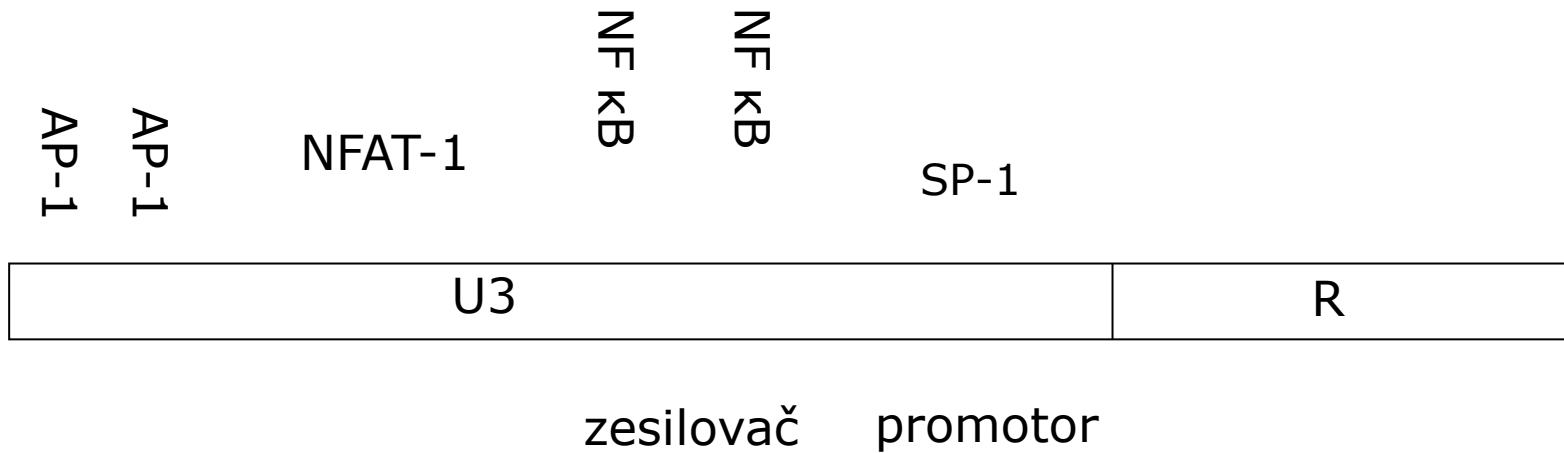
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

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



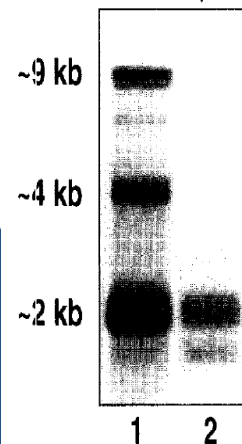
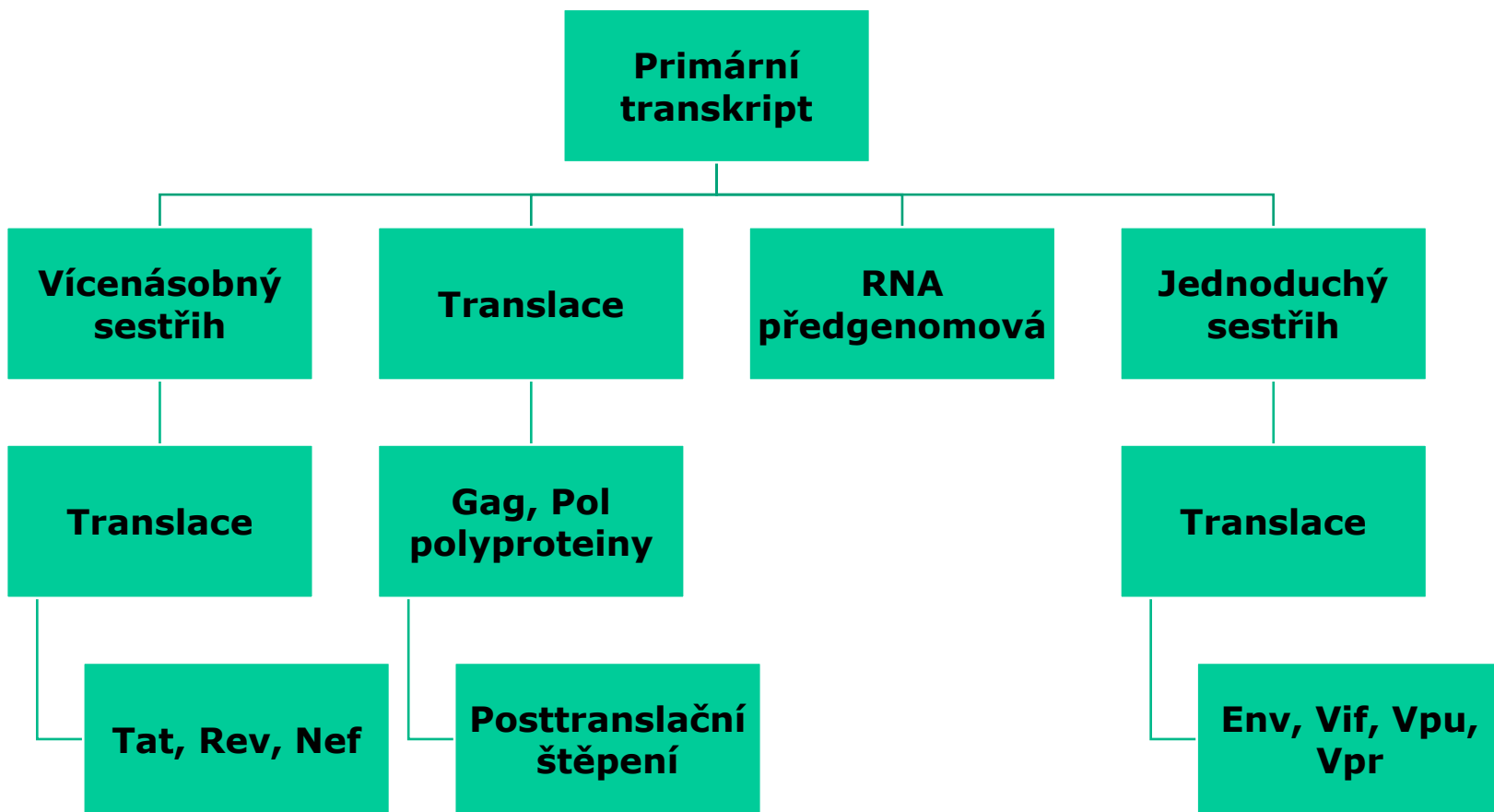
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

**MŠMT**  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

# Exprese genomu viru HIV-1



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

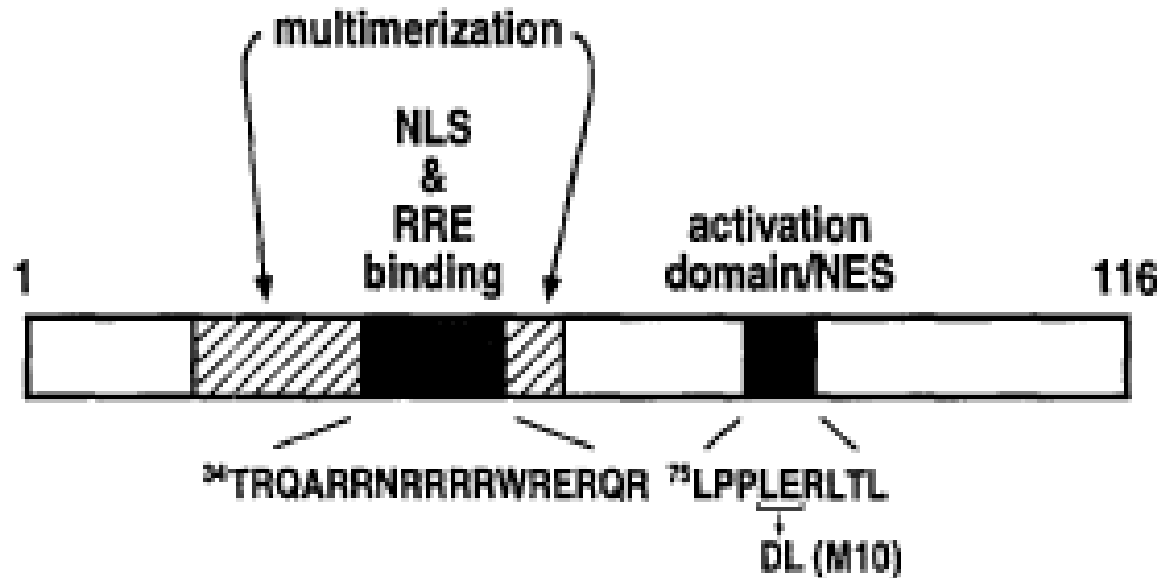
MŠ  
VIT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

# Rev protein viru HIV-1

Export nesestříhaných mRNA z jádra

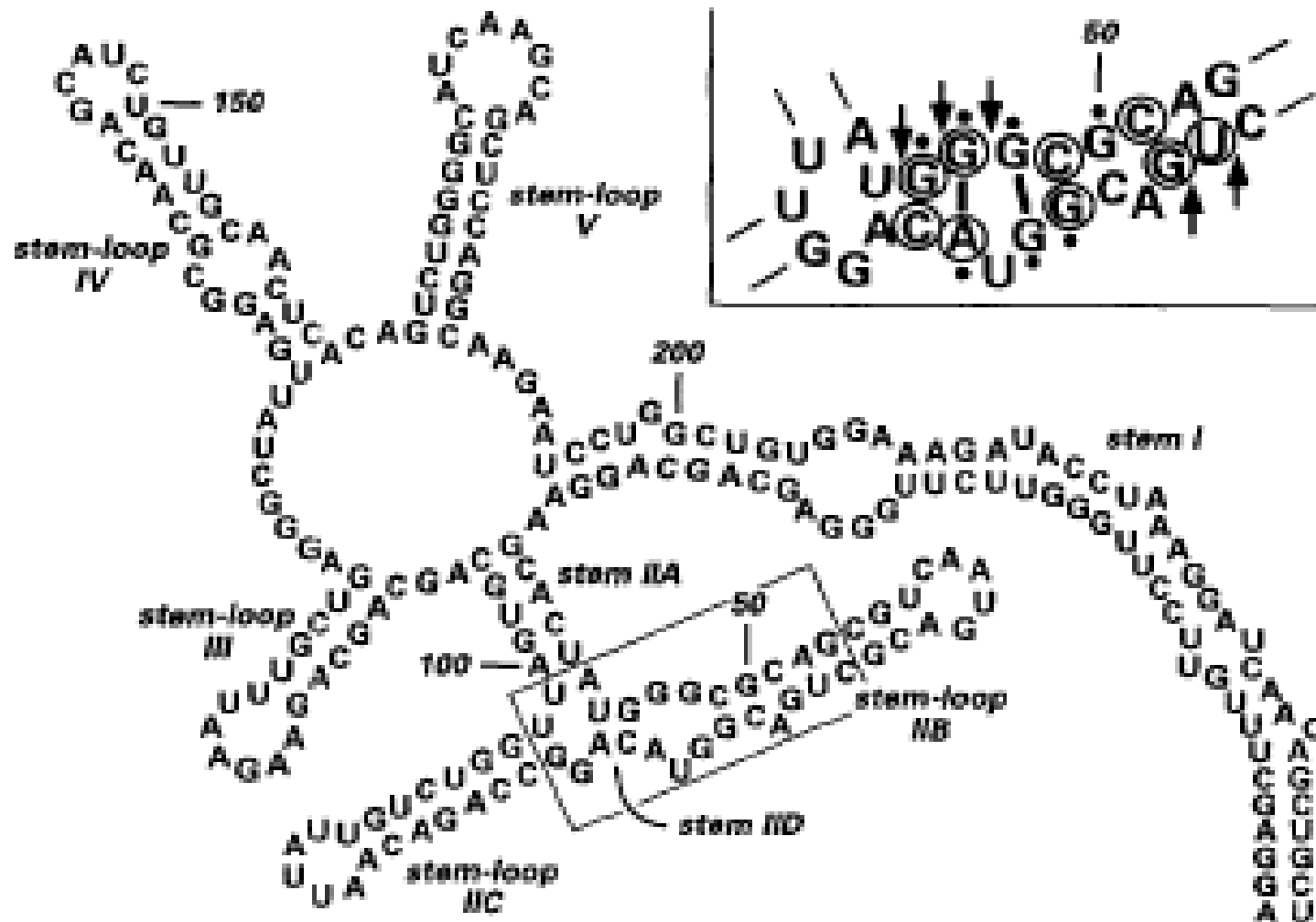


Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠ  
MT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy



Financováno  
 Evropskou unií  
 NextGenerationEU

MŠMT  
 MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
 MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
 plán  
 obnovy

# 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

MŠMT  
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)



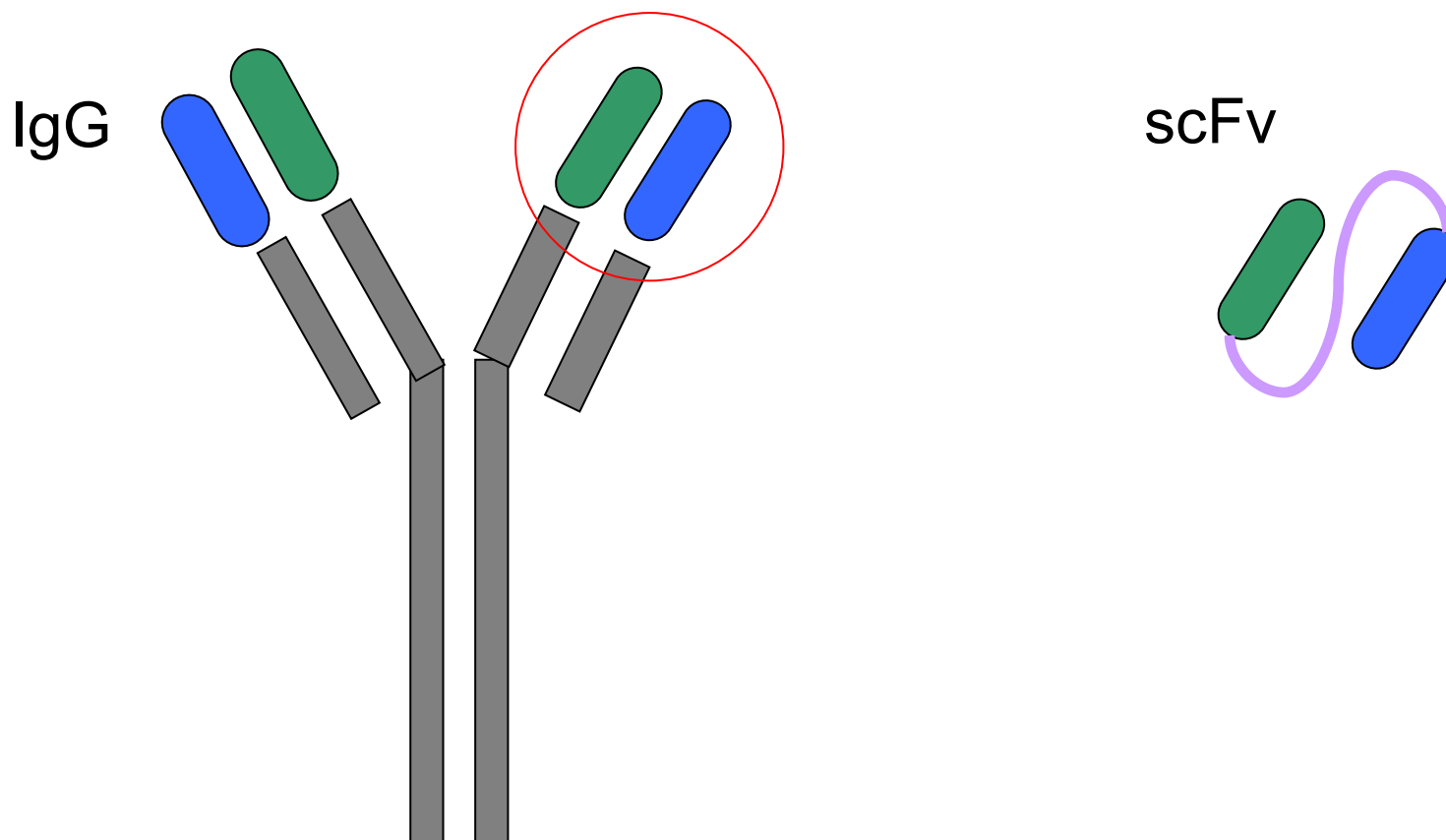
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠ  
MT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy

# Schéma IgG a scFv molekuly



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

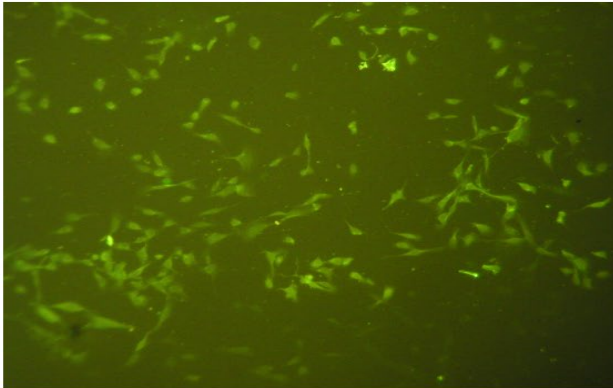
MŠMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



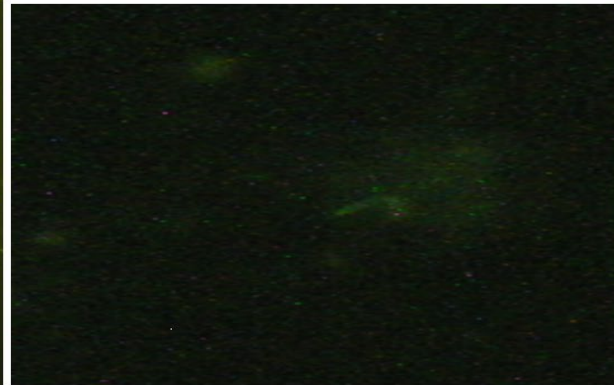
Národní  
plán  
obnovy

# Intracelulární imunizace

A



B



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠMT  
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

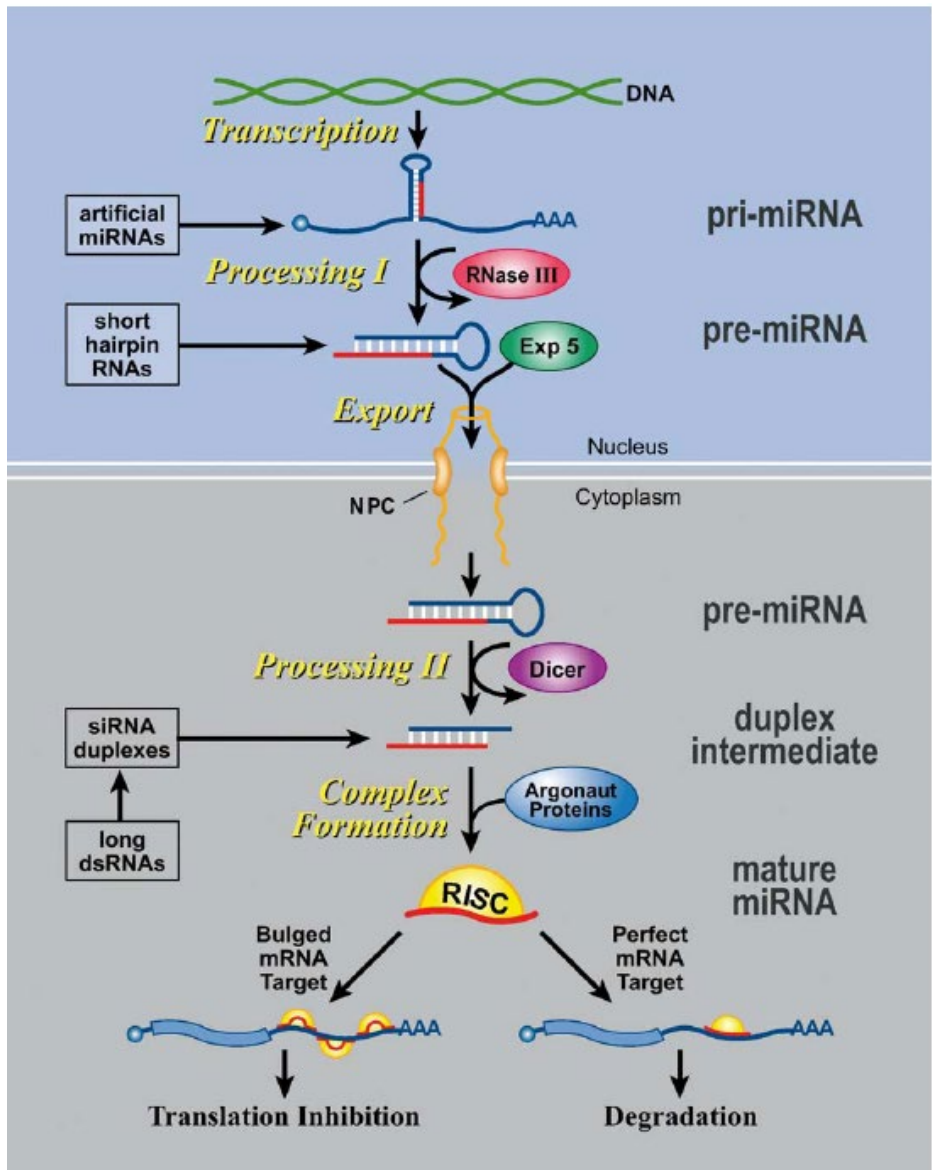


Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

**MŠMT**  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy



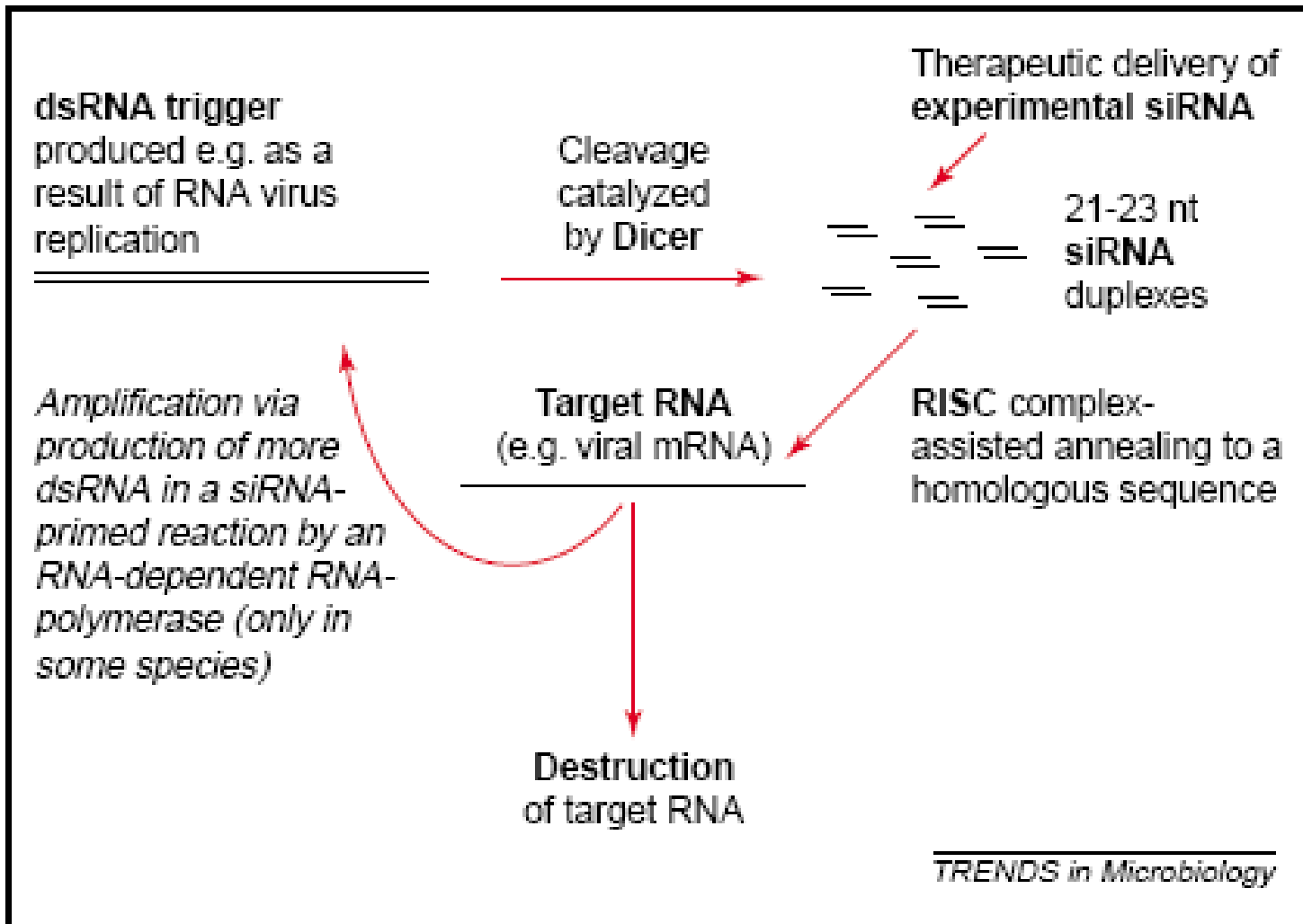
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy



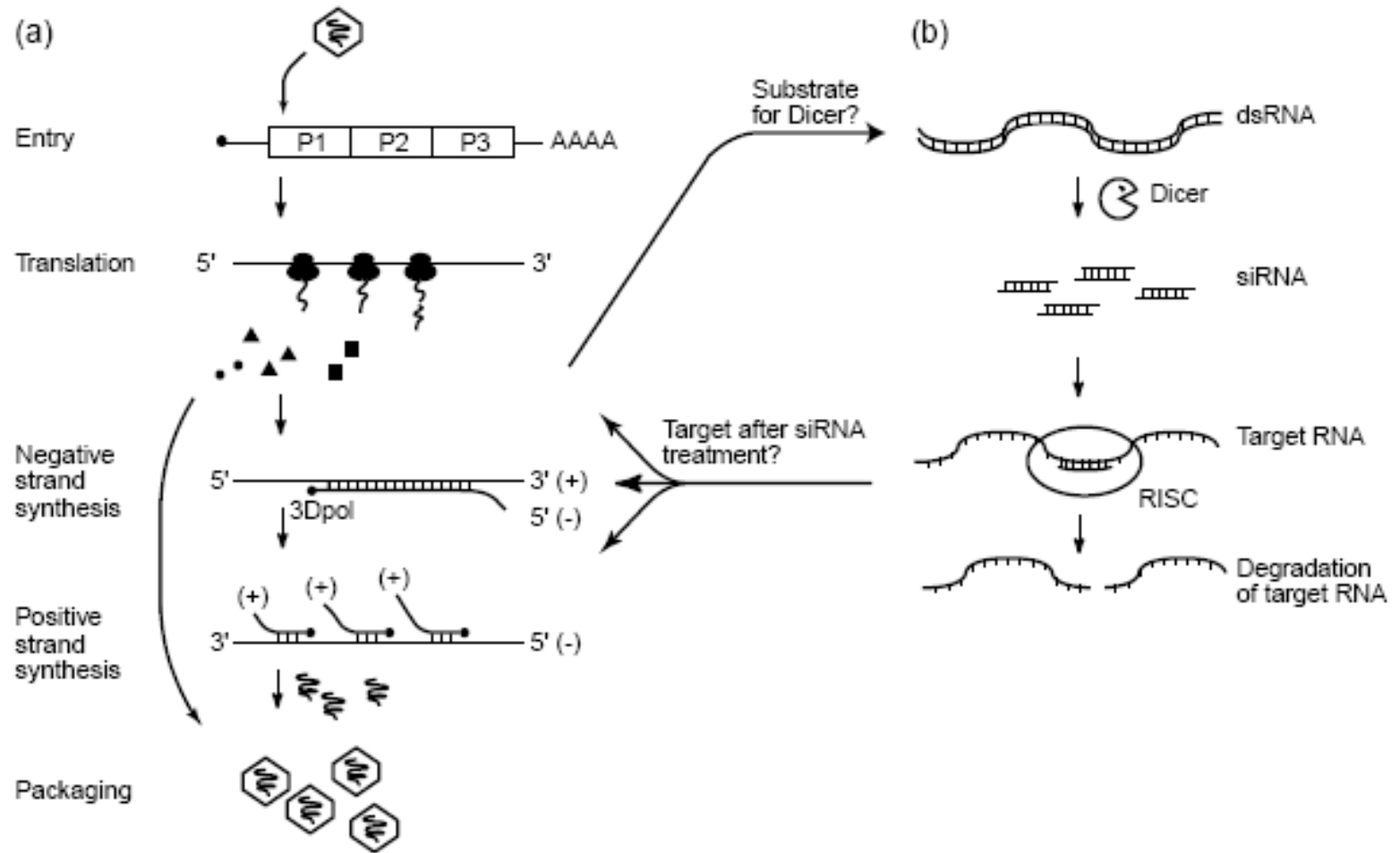


Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

MŠMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní  
plán  
obnovy



# 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

MŠMT  
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

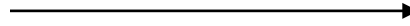


Národní  
plán  
obnovy

# DNA vakcíny



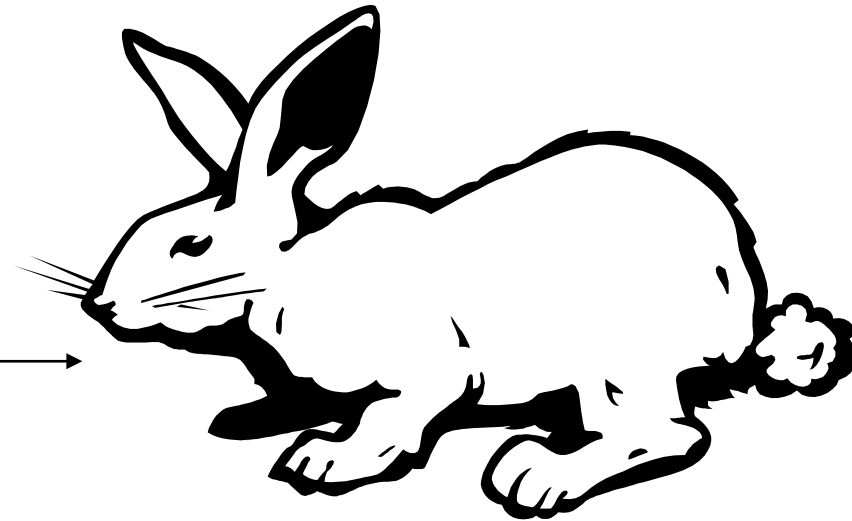
Gen kódující imunogen



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

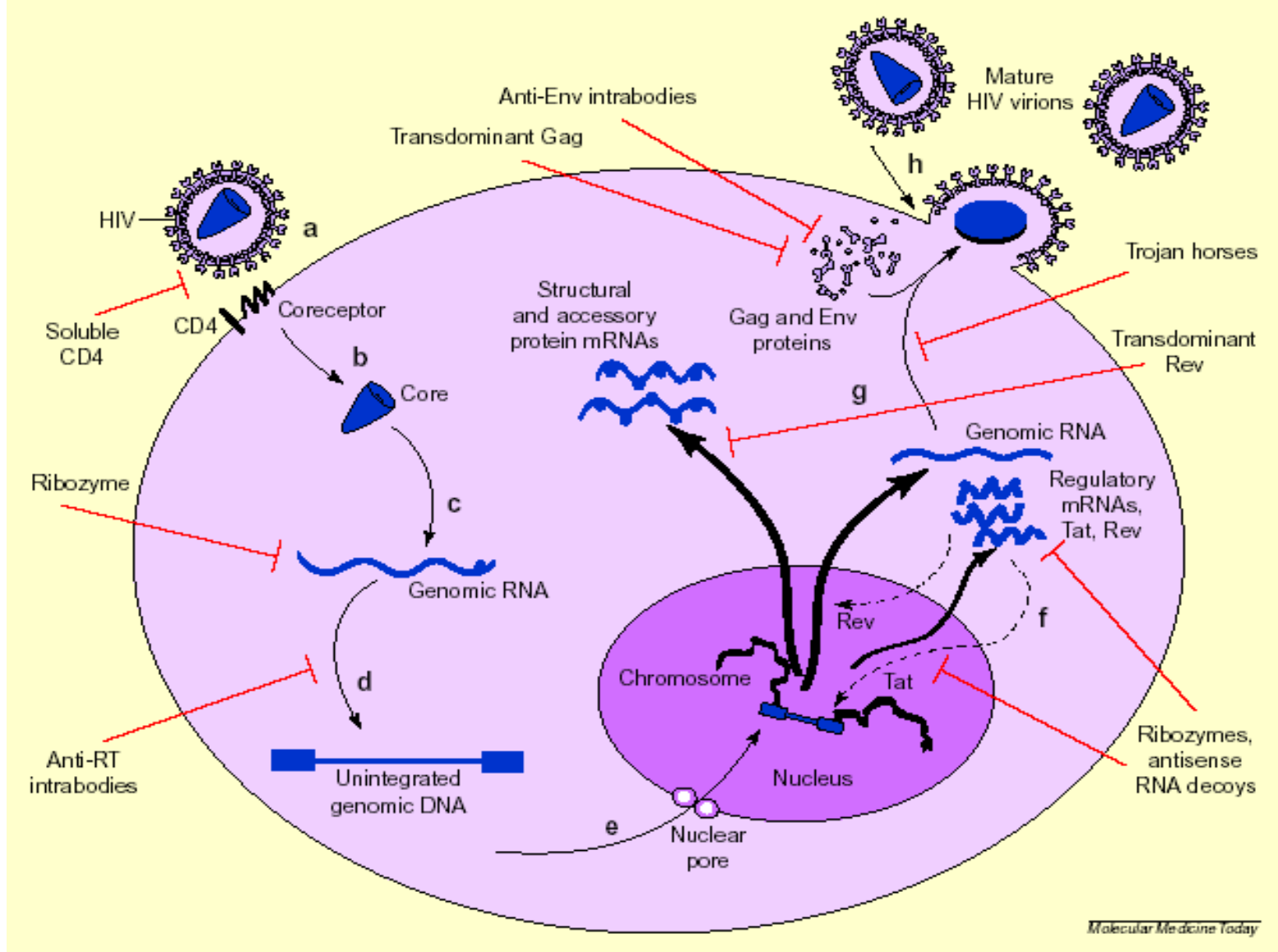


Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

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