

Zemědělské půdoznalství a mikrobiologie

přednáška 12

**Ing. Jaroslav Záhora, CSc.
ústav 221**

Základy genetiky prokaryotické buňky



Chromozomová DNA

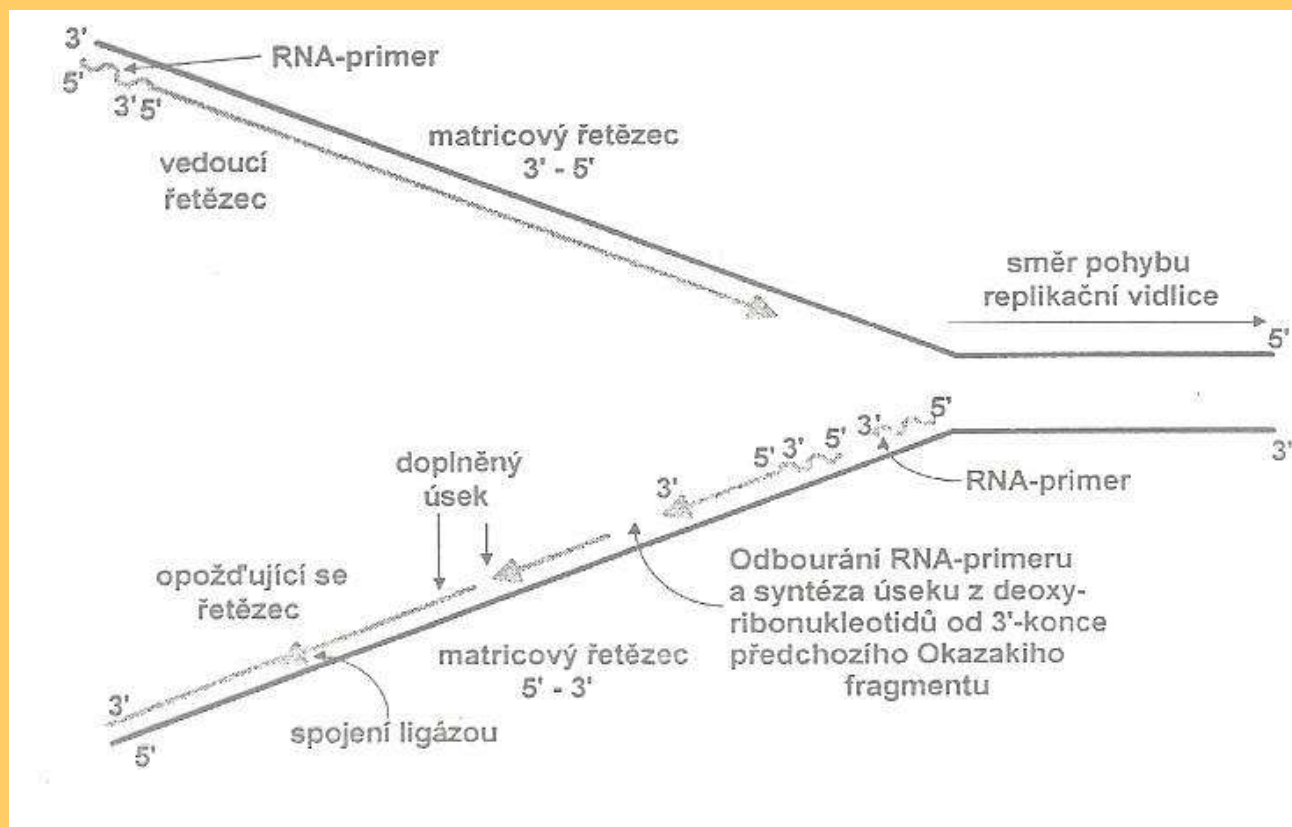
- U **prokaryot** (bakterie, archea) dvouřetězcová většinou kružnicová
- U **DNA-virů** dvouřetězcová lineární, jednořetězcová lineární nebo jednořetězcová kružnicová
- Extrachromozomální DNA - **plazmidová, chloroplastová a mitochondriová DNA** jsou většinou kružnicové

Replikace nukleových kyselin

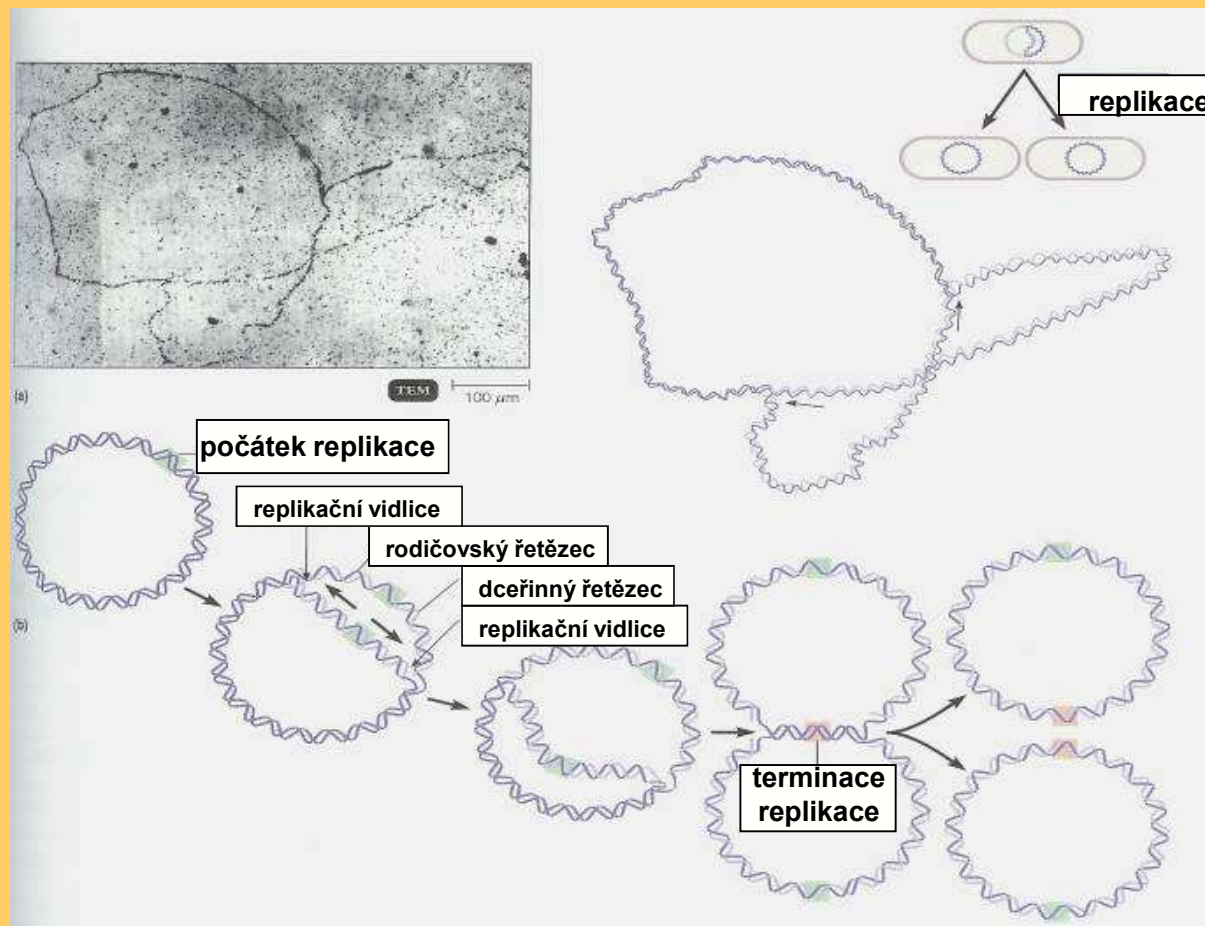
- Replikace – tvorba kopií molekul nukleových kyselin zajišťujících přenos genetické informace z DNA do DNA nebo z RNA do RNA

Semidiskontinuální syntéza DNA

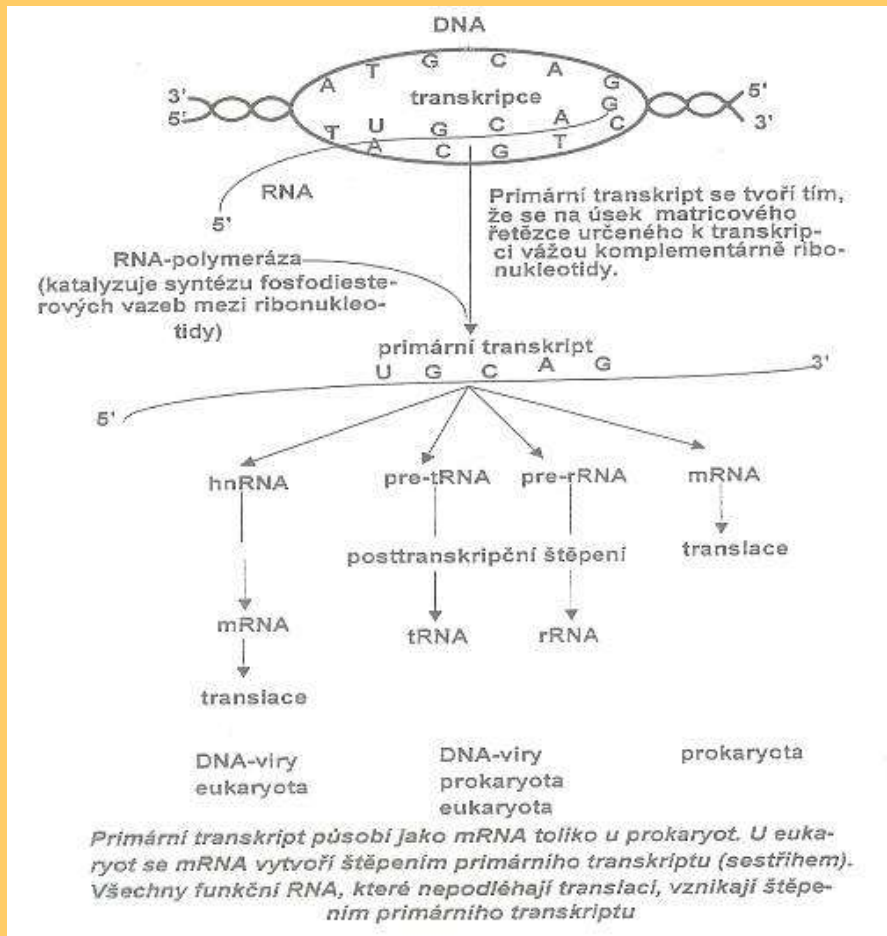
Replikace chromozómové DNA



Replikace plazmidové DNA

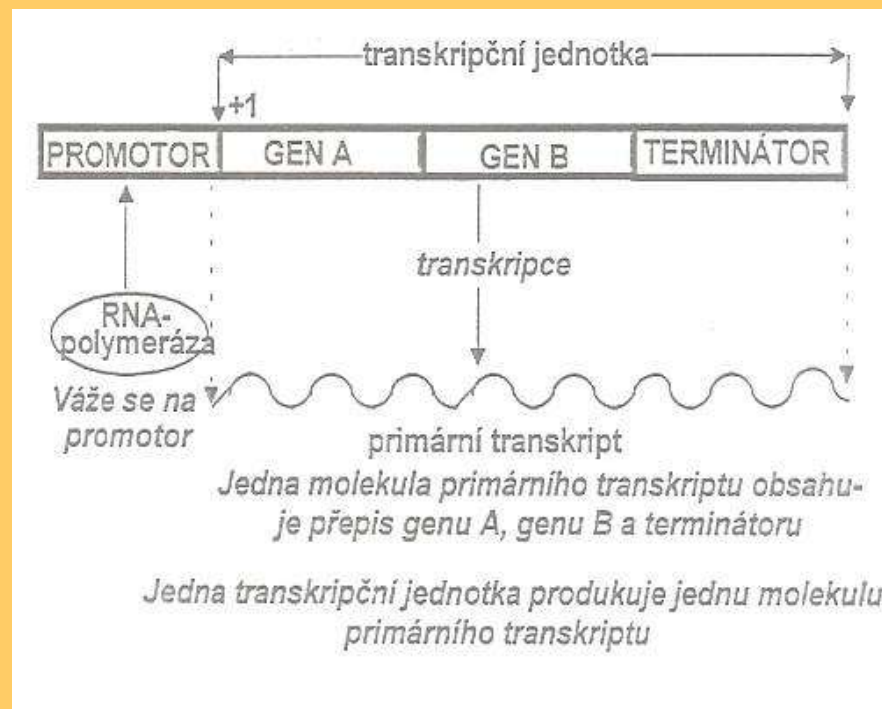


Základní schéma transkripce



u DNA-virů,
prokaryot,
eukaryot

Transkripční jednotka



Dědičnost, proměnlivost a přenos znaků u mikroorganismů

- dědičnost – souhrn znaků, které jsou v procesu reprodukce předávány na potomstvo
- dědičné znaky

Genetická informace

- Genetická informace je obsažena ve sledu (pořadí) nukleotidů – nukleotidových sekvencích funkčních typů nukleových kyselin

Nukleotidové sekvence

- * v DNA nebo RNA sekvenci je obsažena informace o **primární struktuře proteinu**
- * v DNA je informace o **primární struktuře biologicky funkční RNA** (tRNA, rRNA, ...)
- * RNA sekvence může obsahovat **informaci o struktuře DNA**
- * DNA nebo RNA sekvence může obsahovat **informace o vazbě ke specifickým proteinům** (začátek nebo konec transkripce)

Základní pojmy

■ Gen – jednotka genetické informace

Gen obsahuje genetickou informaci o struktuře buď

- * funkční molekuly translačního produktu (polypeptidu, proteinu)
- * funkční molekuly produktu transkripce (rRNA atd.) nepodléhající

primární

translaci

(tRNA,

Genetický kód

- **Systém pravidel determinujících způsob přepisu pořadí nukleotidů do pořadí aminokyselin v peptidickém řetězci**

Genetický kód

- Základní jednotkou genetického kódu je

kodon

tj. pořadí nukleotidů, kódující určitou
aminokyselinu v peptidickém řetězci

Genetický kód

- Genetický kód je **tripoletový**
- Je sestaven ze **64 kodonů**
- **Je degenerovaný** (jedna aminokyselina je kódována několika kodony)
- Aminokyseliny kóduje pouze **61 kodonů**
- Schopnost kodonu kódovat aminokyselinu se označuje jako **smysl kodonu**

Genetický kód

Kodony					
První nukleotid (5'konec)	Druhý nukleotid				Třetí nukleotid (3'konec)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	N	N n.Secys	A
	Leu	Ser	N	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met n.I	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

N – nesmyslný kodon

I – iniciační kodon

Genetický kód

- Některé kodony jsou **nesmyslné**

- * **UAA** - ochre

- * **UAG** - amber

- signalizují ukončení syntézy
polypeptidu (terminační kodony)

- * **UGA** - opal je **bifunkční**

- terminační kodon

- kodon pro selenocystein

Gen

■ v genu je kodována

- * primární struktura bílkovinného řetězce (strukturní geny)
- * struktura tRNA
- * struktura rRNA
- * mají regulační funkci

Gen

- **Lokus** - umístění genu kódujícího daný enzym metabolické dráhy na různých místech chromozomu (u eukaryot)

Genom – souhrn všech genů buňky nebo viru

- U **eukaryot** jsou geny lokalizovány v různých organelách → jádro, mitochondrie nebo chloroplasty (případně plazmidy)
- U **prokaryot** jsou geny lokalizovány na chromozomové DNA a plazmidech

Genotyp

- Souhrn všech genů představujících genetickou informaci
 - * nesených na chromozomální i extrachromozomální DNA
- Projev genotypu (potenciál pro projev v podobě znaků) je závislý na podmínkách vnějšího prostředí

Fenotyp

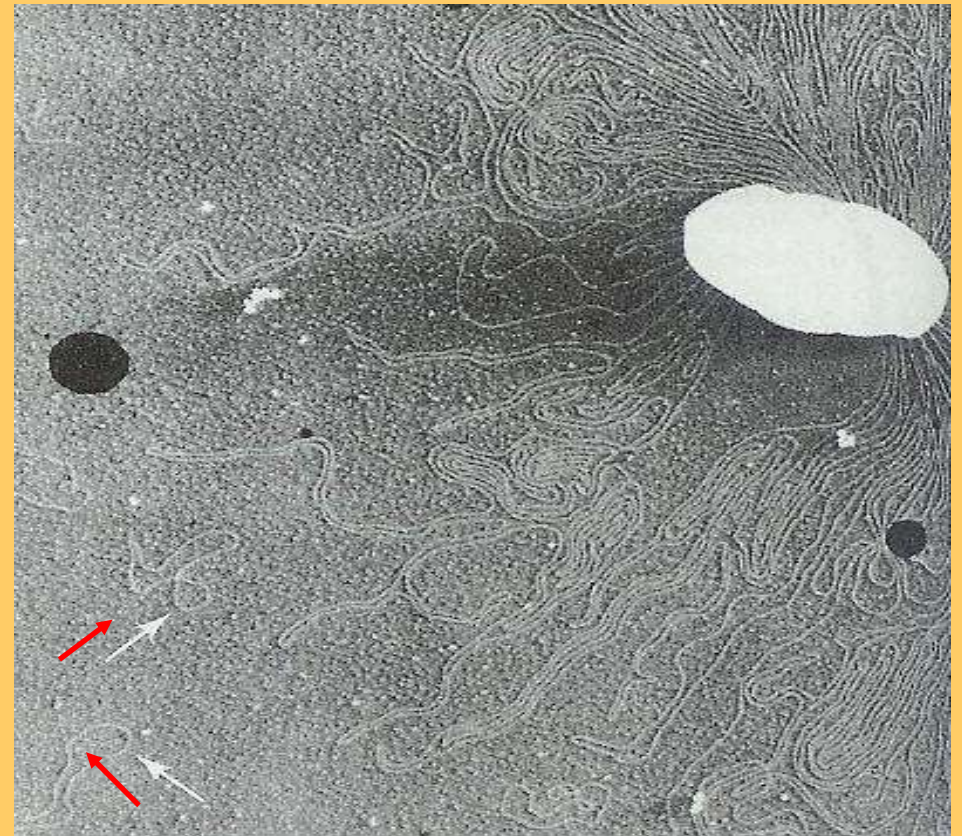
- Projev genotypu za daných vnějších podmínek
- Znamená to, že daný genotyp se může v různých podmínkách projevit různě

Fenotyp

- Pokud je změna vnějších podmínek tak intenzivní, že vede k nápadné změně fenotypu, označuje se tato změna jako **modifikace fenotypu**
- Modifikace se projevuje u **převážné části** mikrobiální populace
- Modifikace **je jev reverzibilní**. Po odeznění podmínek vyvolávajících změnu, se vrací populace do “normálního” stavu

Plazmidy

- Samostatný replikon tvořený dsDNA (cirkulární nebo lineární)
- **Nenese informace o dělení buňky**
- Nese informace o specifickém fenotypovém projevu



plazmid

Plazmidy

- Každý plazmid obsahuje
 - * lokus **ori** – počátek replikace
 - * lokus **inc** – místo pro připojení na biologickou membránu při replikaci

Plazmidy

- Plazmid je

- * **jednokopiový** – pouze jedna kopie DNA v buňce
- * **vícekopiový** – několik kopií téhož plazmidu v buňce

Plazmidy

- Plazmid je

- * **kompatibilní** – dva různé plazmidy v jedné buňce mají odlišný lokus **inc**, mohou se replikovat současně
- * **inkompatibilní** – mají stejný lokus **inc**

Plazmidy

- Plazmid může být v
 - * **autonomním stavu** - samostatný replikon lokalizovaný volně v základní cytoplazmě (replikuje se nezávisle na replikaci chromozomu)
 - * **integrovaném stavu** – navázaný **mezi** geny v chromozomální DNA (replikuje se současně s replikací chromozomu)

Plazmidy

- Plazmid je

* **konjugativní** – obsahuje geny **tra**
(označované i jako fertilní faktor) zodpovědné
za syntézu sexuálních pilusů, a průběh
konjugace

* **nekonjugativní** – neobsahují geny **tra**

Plazmidy u bakterií

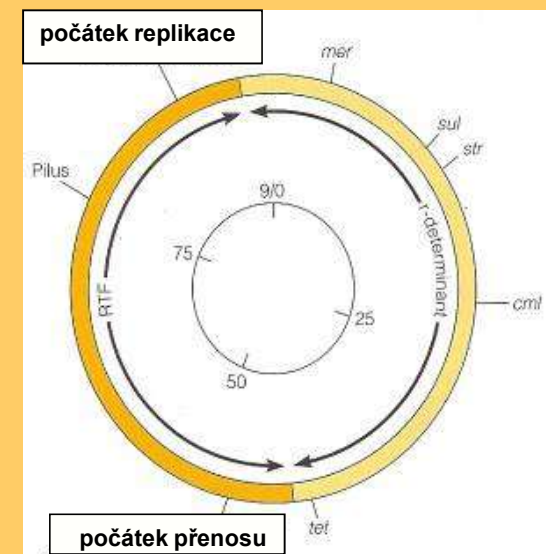
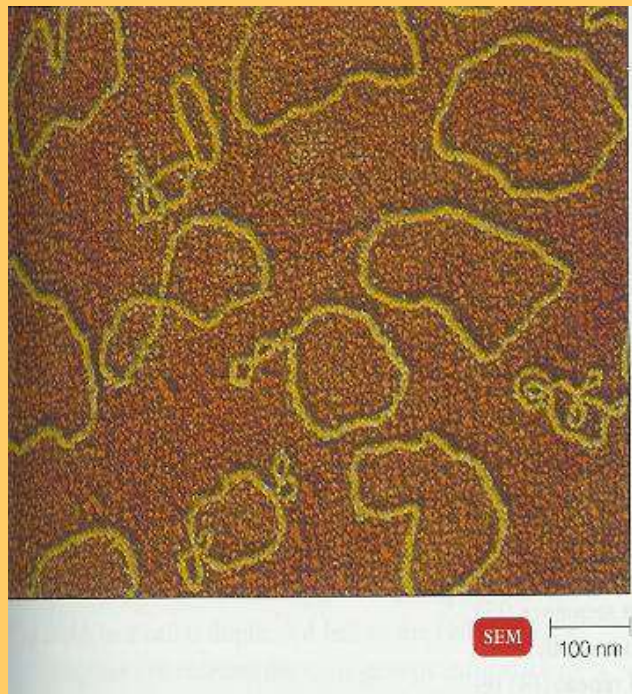
Plazmidy se u bakterií vyskytují velice často –
málo druhů bez plazmidů

- Plazmidy F a F' - konjugativní plazmidy u *E.coli* K12
 - * F faktor (fertilní faktor)
 - * Jsou zodpovědné za průběh konjugace
 - * Jsou zodpovědné za syntézu sexuálních pilusů

R - plazmidy

- R faktory jsou zodpovědné za rezistenci k antibiotikům
 - * buněčným toxinům
 - * těžkým kovům
- Objeveny byly v Japonsku v r. 1950 při epidemii dysenterie
- Jeden plazmid může nést informaci o rezistenci k několika látkám – vznik polyrezistentních kmenů

R - plazmidy

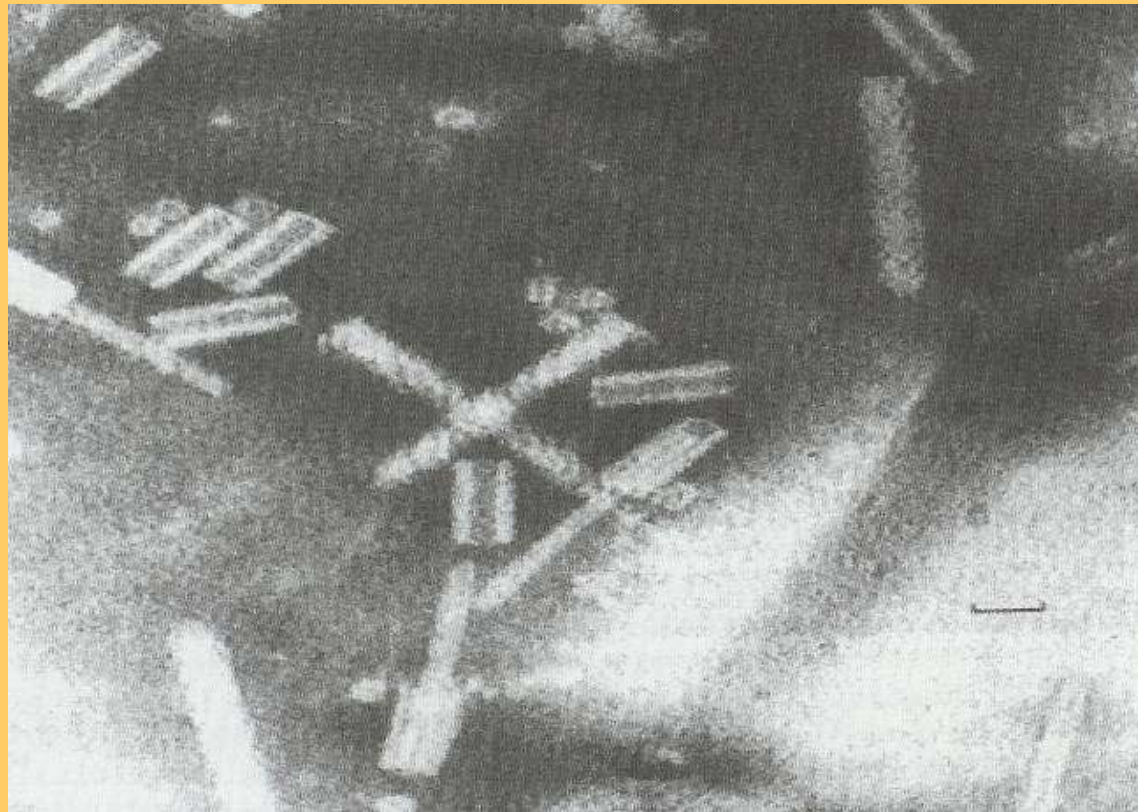


R plazmid *Bacteroides fragilis* kodující rezistenci ke clindamycinu

Bakteriocinové faktory

- Bakteriocin – bílkovina usmrcující citlivé kmeny téhož druhu nebo jiných druhů
- Bakteriociny působí na cytoplazmatickou membránu nebo na syntézu bílkovin. Mohou také blokovat vazebná místa na buněčné stěně (receptory)
- Col plazmidy (koliciny)

Bakteriocin



Pyocin R - *Pseudomonas aeruginosa*

Plazmidy

■ Kryptické

Představují skupinu plazmidů,
jejichž fenotypový projev není
dosud znám

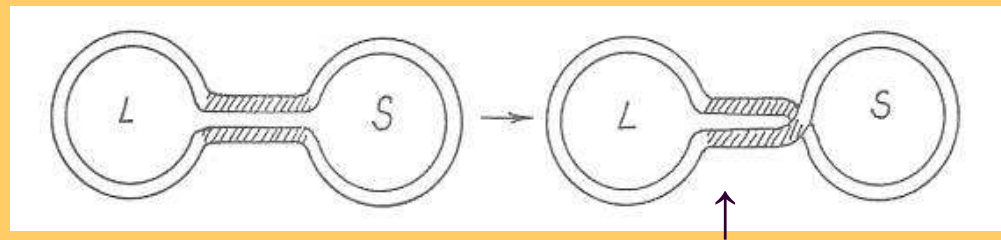
■ Degradativní

Nesou informaci o schopnosti
využívat “neobvyklé“ látky
(toluen, oktan, kafr, kys.
salicylovou,)

Plazmidy kvasinek

- Dosud popsány u některých druhů rodu *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida* a *Zygosaccharomyces*
- Nejlépe prostudovaným je plazmid označený 2μm *Saccharomyces cerevisiae*
- Vyskytuje se v **nukleoplazmě** v 60-100 kopiích na diploidní buňku
- Plazmid 2μm se používá v genovém inženýrství jako vektor pro klonování

Plazmid 2 μ m u *Saccharomyces cerevisiae*



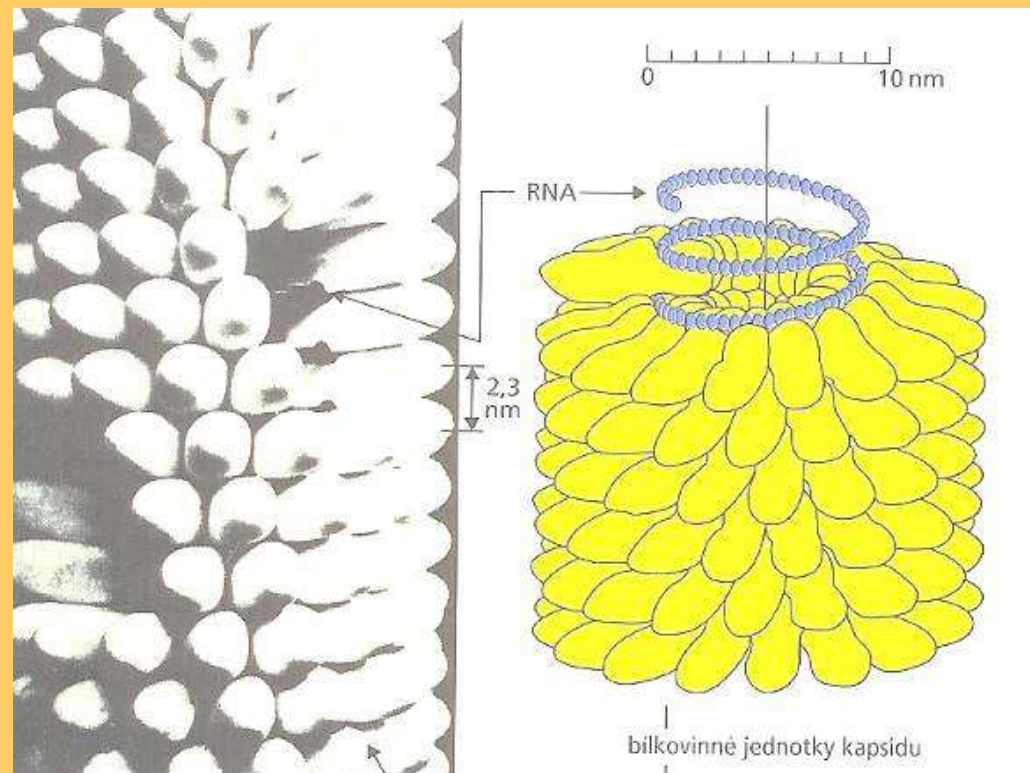
Překřížení

ds cirkulární DNA

obvodová délka 2 μ m

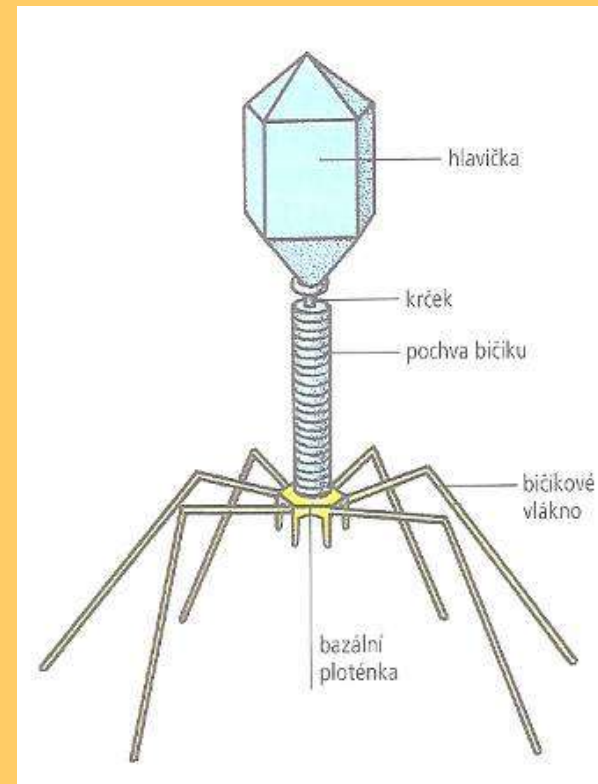
6 kb

Virus tabákové mozaiky

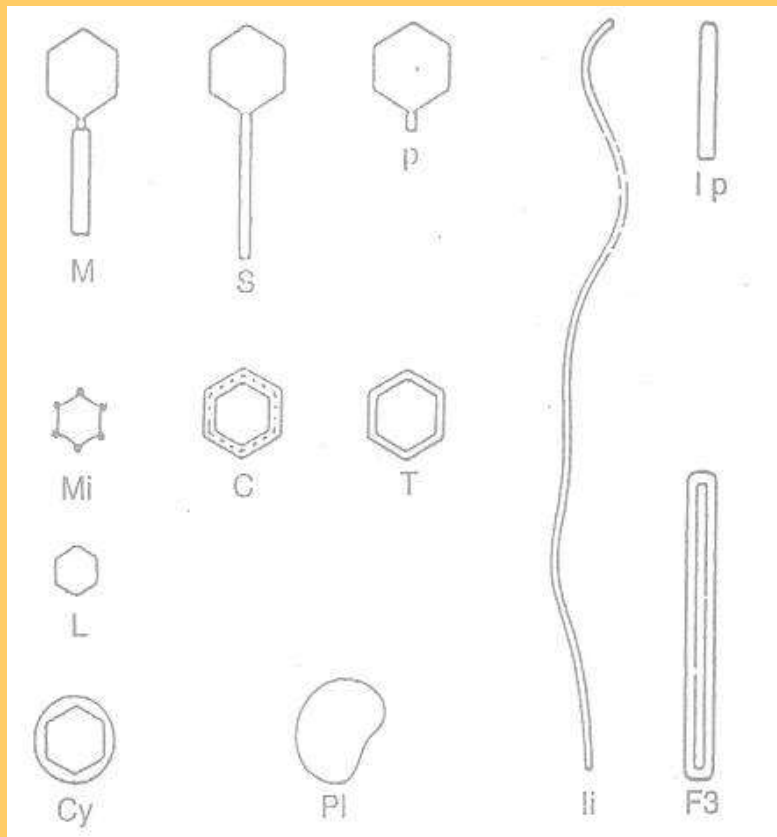


Bakteriofágy

- Viry bakterií
- Mají specifickou strukturu
- Klasifikace je velmi nesnadná a je založena především na morfologické stavbě



Morfologie a taxonomie bakteriofágů



- M – Myoviridae
- S – Siphoviridae
- li – Inoviridae
- lp – jiný morfologický typ čel. Inoviridae
- Mi – Microviridae
- C – Corticoviridae
- T – Tectiviridae
- Cy – Cystoviridae
- PI – Plasmoviridae
- F3 – Skupina F3

Bakteriofágy – životní cyklus

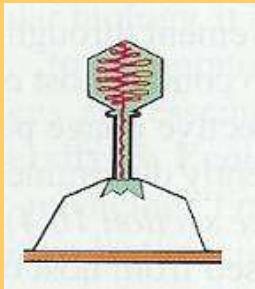
■ Virulentní bakteriofág

- Adsorpce
- Penetrace
- Injekce
- Replikace
- Lyze buňky

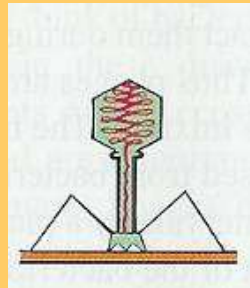
■ Temperovaný bakteriofág

- * adsorpce
- * penetrace
- * injekce
- * začlenění do chromozomu bakt.buňky
- ↓
- * uvolnění z chromozomu
- * replikace
- * lyze buňky

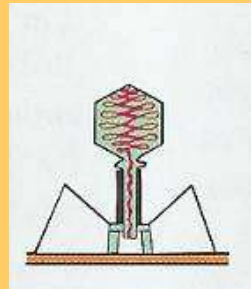
Bakteriofágy – adsorpce, penetrace, injekce



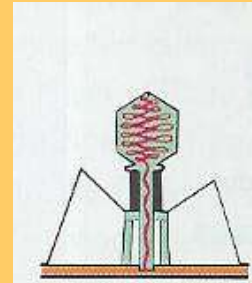
**vazba
na
povrch**



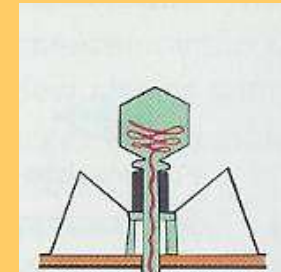
**adsorpce
(irreverzibilní)**



**kontrakce
pochvy**



penetrace

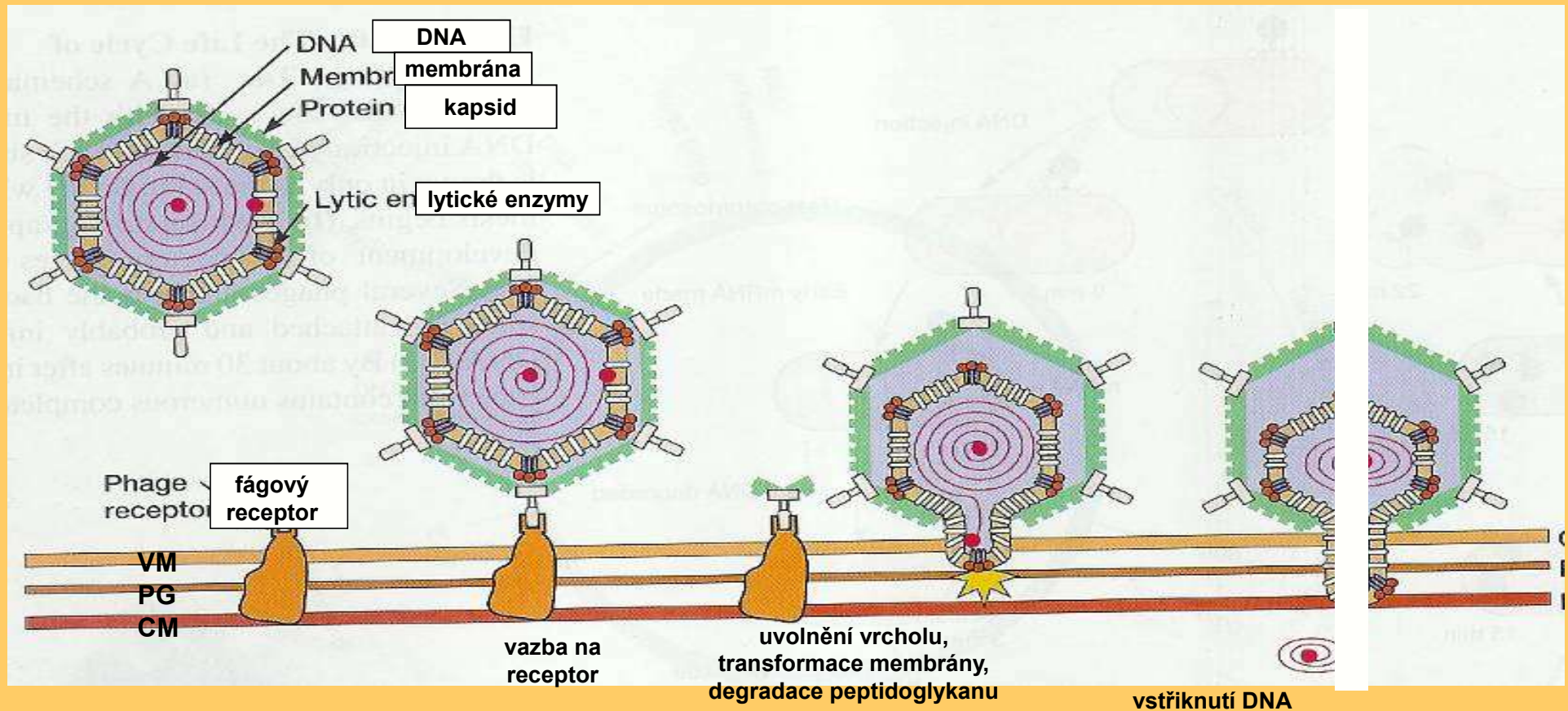


injekce DNA



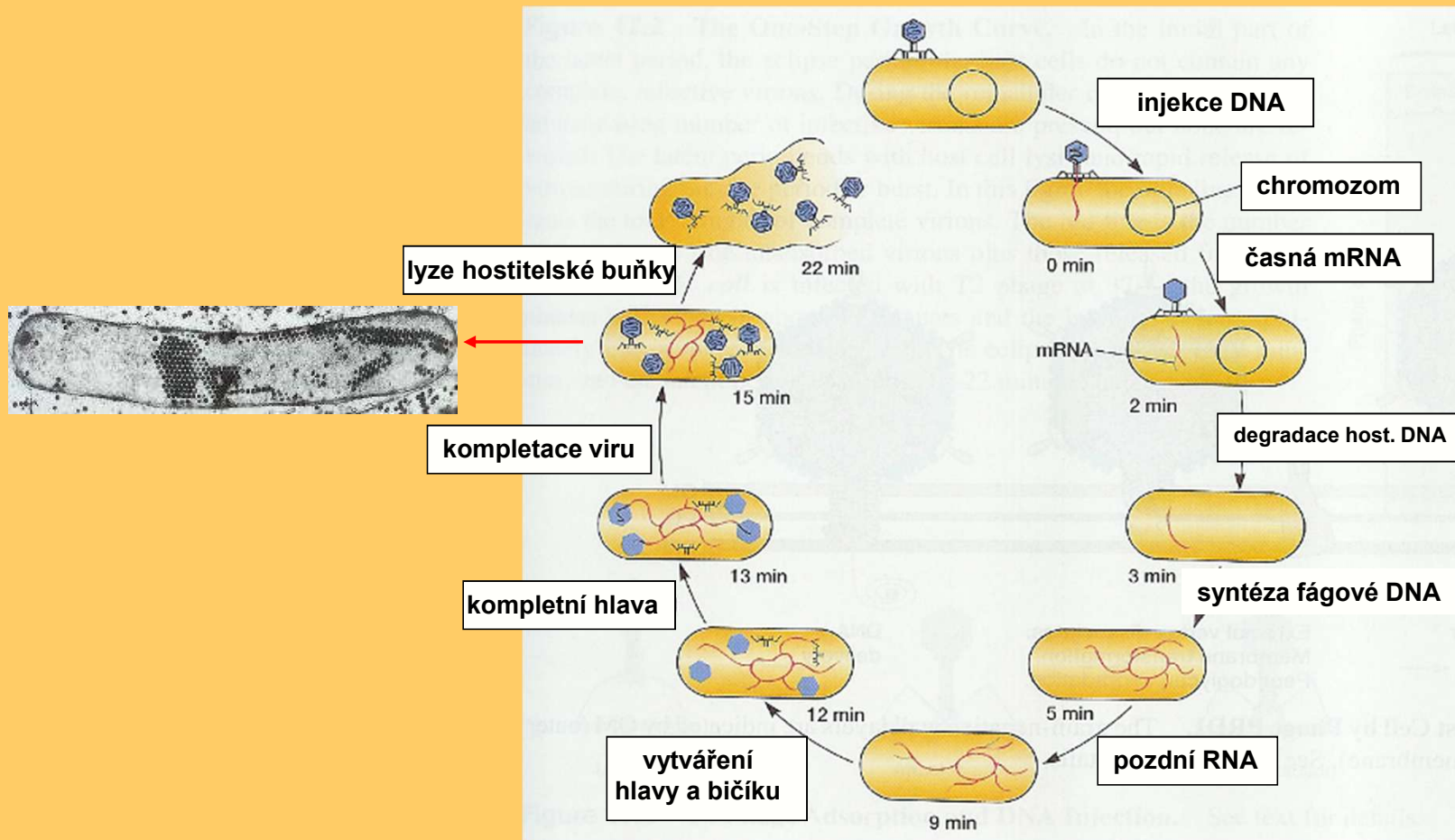
Bakteriofág – adsorpce, penetrace, injekce

(fág PRD1 – *Tectiviridae*, host.buňky *Enterobacteriaceae*)

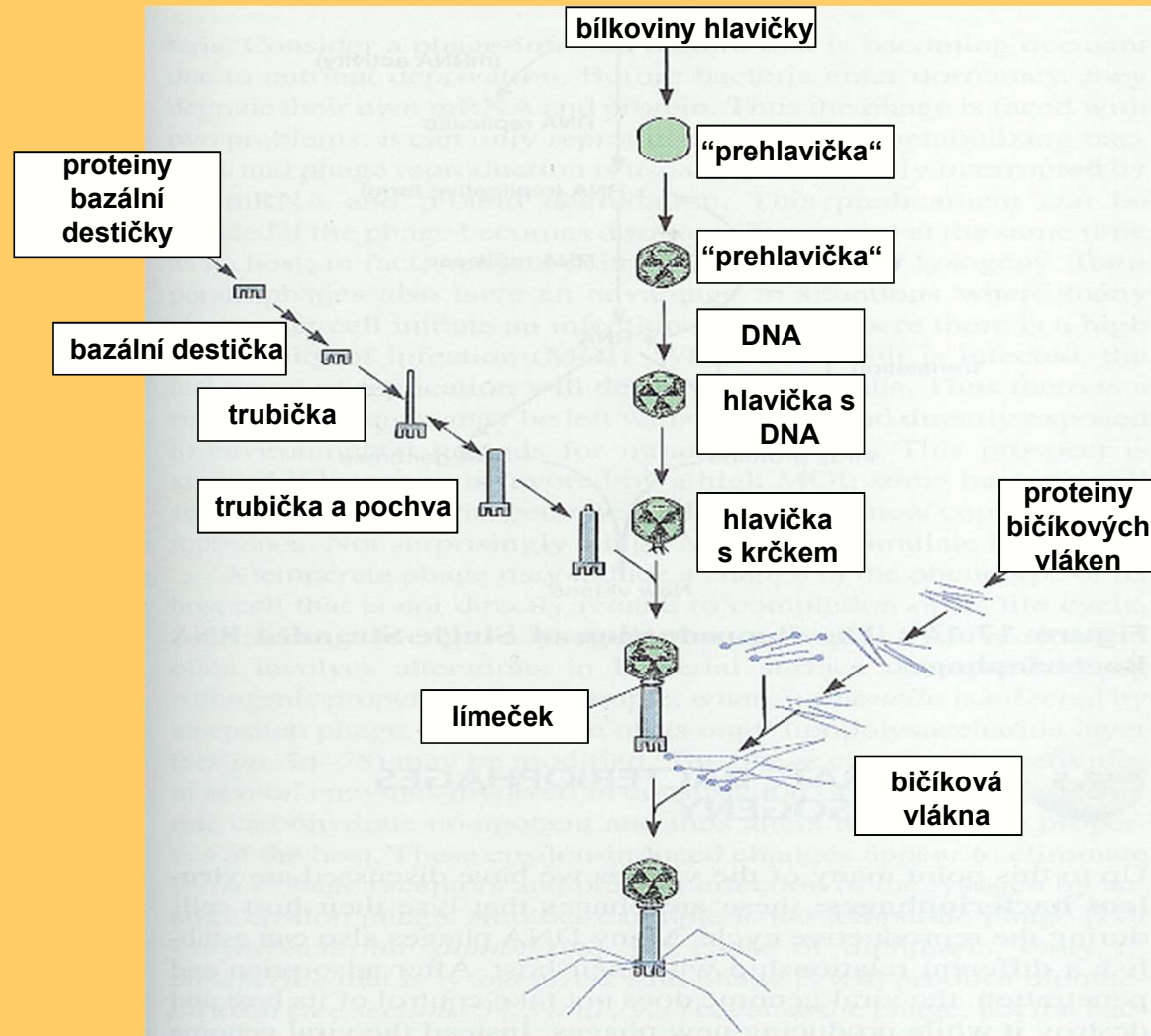


VM-vnější membrána , PG-peptidoglykan , CM-cytoplazmatická membrána

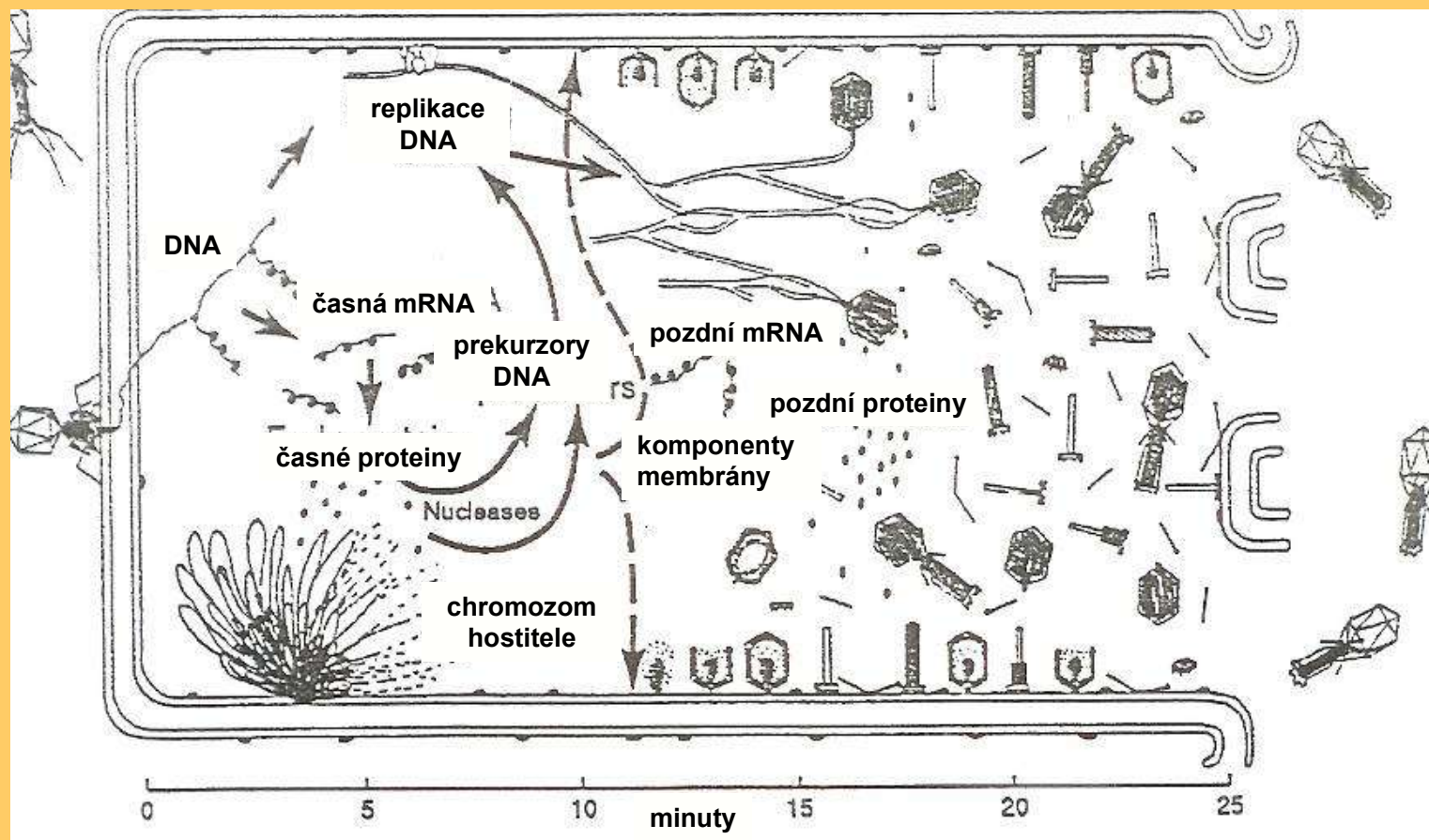
Bakteriofágy – životní cyklus fága T4



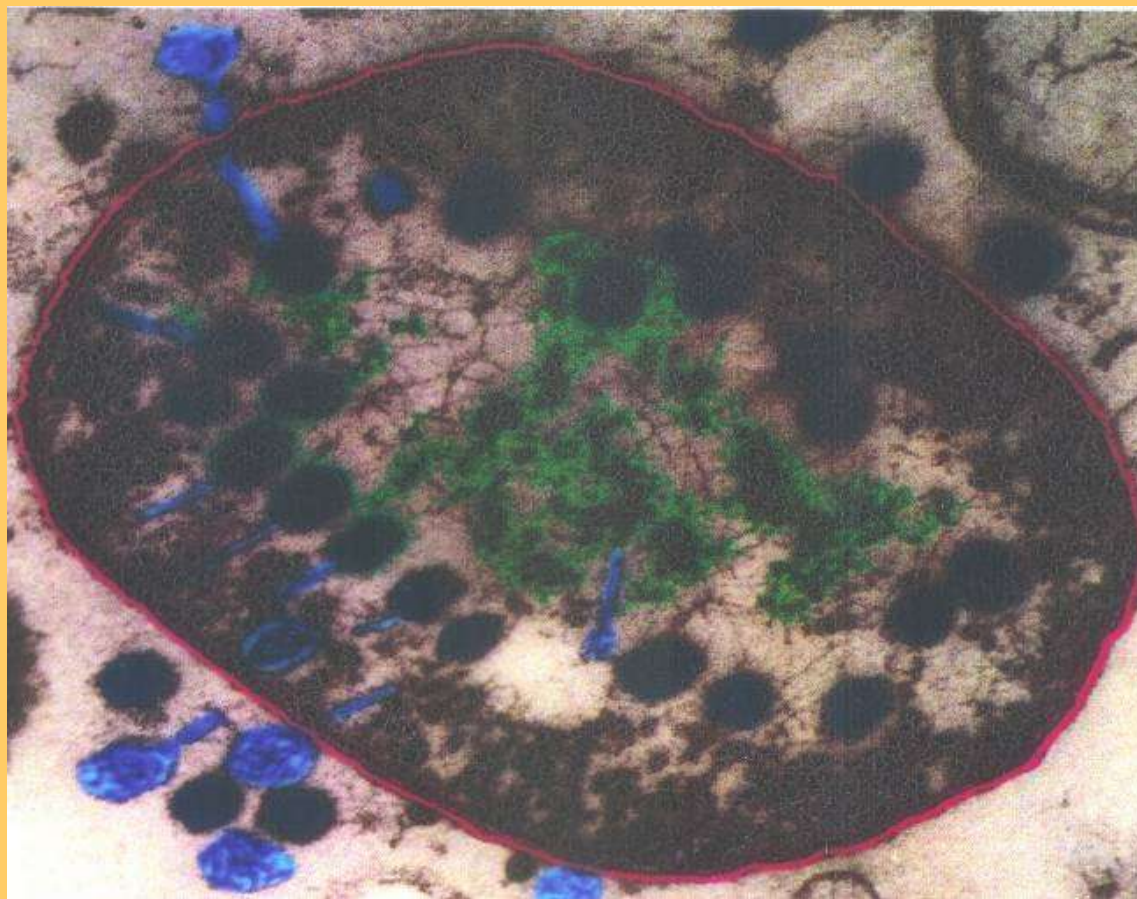
Bakteriofágy – “tvorba” fága T4



Množení fágové částice v hostitelské buňce (shrnutí)



Maturace fágové částice



Bakteriofágy – životní cyklus

■ Virulentní bakteriofág

- Adsorpce
- Penetrace
- Injekce
- Replikace
- Lyze buňky

■ Temperovaný bakteriofág

- * adsorpce
- * penetrace
- * injekce
- * začlenění do chromozomu bakt.buňky
- ↓
- * uvolnění z chromozomu
- * replikace
- * lyze buňky

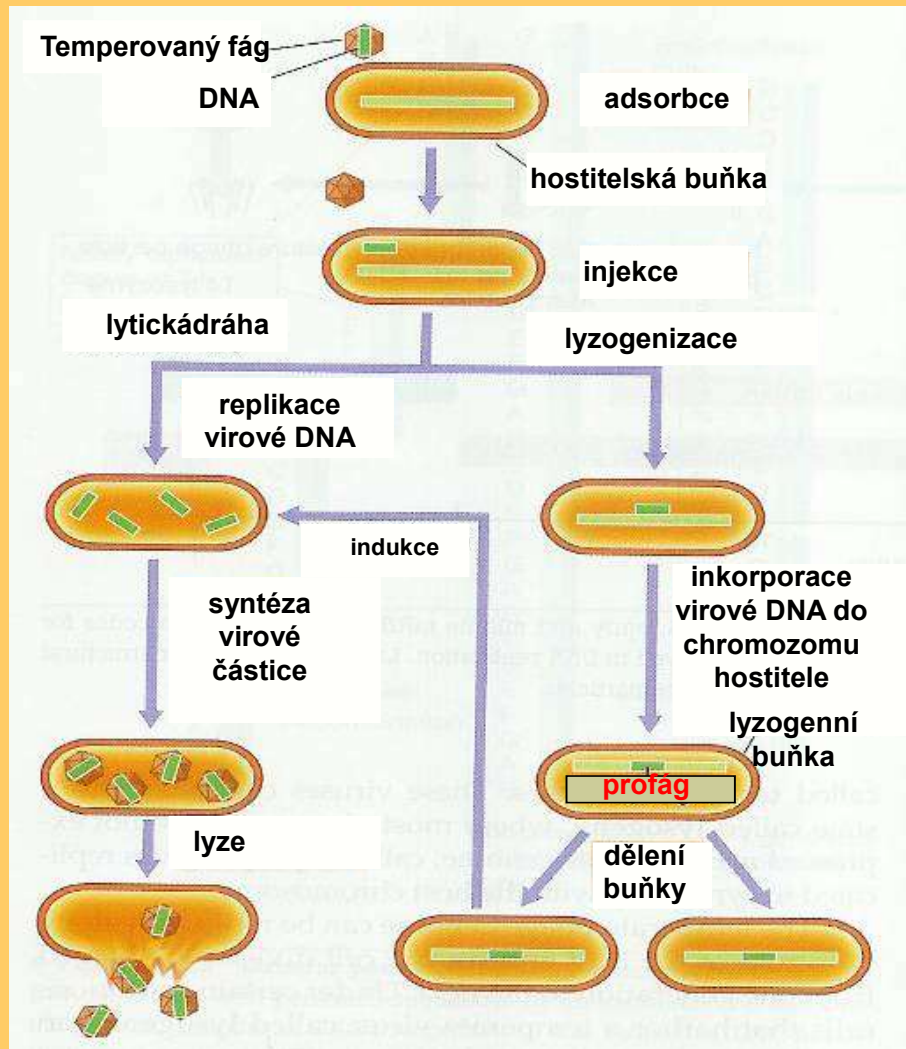
Bakteriofágy – lyzogenie

- Infekce buňky temperovaným (mírným) fágem

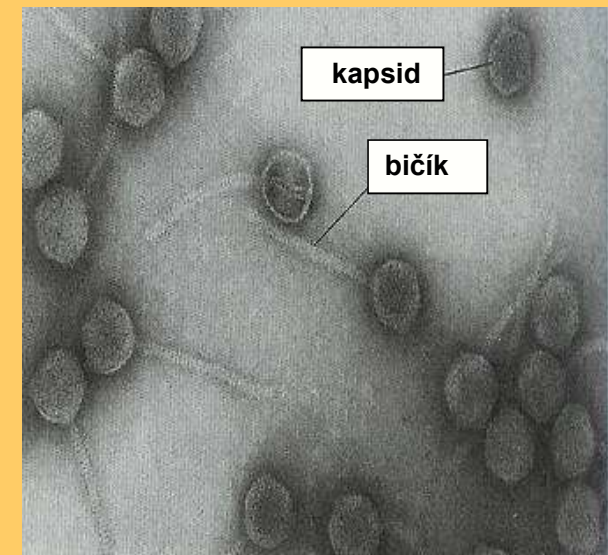
1. proběhne normální **lytický cyklus**
2. fágový chromozom se integruje do chromozomu hostitelské buňky (buňka infekci “přežije”) – **lyzogenní buňka**

Integrovaný fág se označuje jako **profág**

Bakteriofágy – životní cyklus (temperovaný fág)



Fág λ - hostitel: *E.coli*



Otázky 12

- 1. Replikace DNA
- 2. Transkripce a translace
- 3. Gen, genom, mikrobiom
- 4. Genotyp a fenotyp
- 5. Lytický a lysogenní životní cyklus fágů

Priony

- Přesný mechanismus nákazy přenosnou spongiformní encefalitidou mátl učence po desetiletí až do doby, než Prusiner identifikoval a definoval prionovou infekci. Prusiner klasifikoval prion jako infekční částici skládající se z bílkoviny (PrP – Prion Protein), která zapříčiňuje fatální neurodegenerativní onemocnění (chaos, zmatek).
- Priony jsou infekční agens ve smyslu biologickém a medicínském, ale se zcela ojedinělými vlastnostmi, kterými se liší od konvenčních nákaz způsobených např. mikroby.
- Priony zapříčiňují mnoho degenerativních neurologických onemocnění, které mohou být **infekčního, zděděného** nebo **nahodilého** původu.



Stanley B. Prusiner, profesor neurologie, biochemie a biofyziky - objev nového původce pomalu se rozvíjejícího mozkového onemocnění, nazvaného **prion** (1981),



Priony

- Příčina **nahodilých forem** je neznámá; **zděděné formy** jsou zapříčiněné až 20 mutacemi lidského genu pro tvorbu PrP a **infekční formy** jsou přenosné kontaktem nebo pozřením infikované tkáně.
- Dobře známá lidská prionová onemocnění zahrnují: Creutzfeldt–Jakobovu nemoc, nemoc kuru, Gerstman–Sträussler–Scheinker syndrom a fatální dědičnou nespavost.
- Nemoc **kuru** se vyskytovala u domorodců z Nové Guiney a přenášela se rituálním pojídáním mozků zabitých nepřátel. Vymýcením kanibalismu zanikla i choroba.
- Další dobře známá prionová onemocnění, která ovlivňují živočichy zahrnují scrap (u ovcí a koz), bovinní spongiformní encefalopatii (BSE, nebo nemoc šílených krav), přenosnou encefalopatii norků, kočičí spongiformní encefalopatii atd.



Priony

- Byl již popsán přenos BSE cestou konzumace kontaminovaného masa na člověka vyvolávající novou variantu CJD (nvCJD).
- PrPc je normální, buněčný prionový protein a je přeměňován na PrPSc (označení podle scrapu). Normální protein se sestává hlavně z α -helixu se spirálovitou kostrou, ale nový, mutovaný protein je tvořen zejména z β - řetězců s plně rozšířenou kostrou. Tato změna v terciální struktuře je důkazem post-translační modifikace bílkoviny.
- Mechanismus replikace zahrnuje syntézy polypeptidů za absence určité NA-matrice a post-translační modifikace bílkovin. Pro priony představuje proces replikace přeměnu konvenčních bílkovin na priony. Výsledný PrPSc je čtyřhelixový bílkovinný svazek se čtyřmi oblastmi sekundární struktury, pojmenovanými H1 až H4.

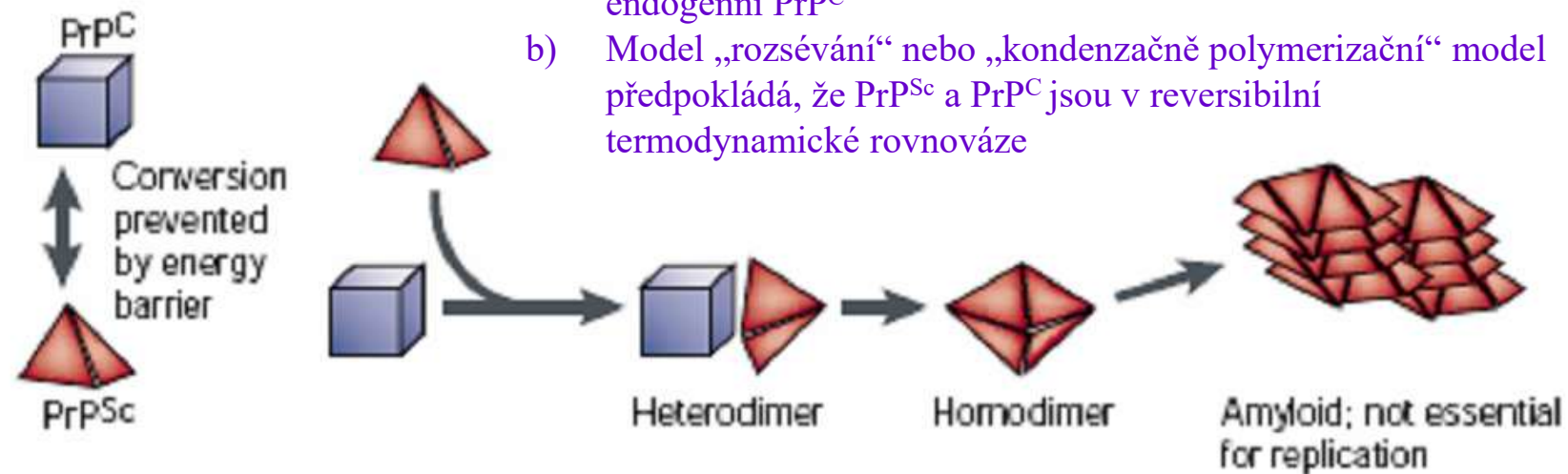


Priony

- Priony se replikují transformací normálních bílkovin na bílkoviny infekční, které infikují jiné buňky nebo živočichy.
- Tato změna iniciuje řetězovou reakci a nově transformované priony přemění ostatní proteiny se kterými přijdou do styku.
- PrPSc se akumuluje v lysosomech až do té doby než explodují, uvolňujíc priony k útoku na jiné buňky.
- Mnohé studie ukazují, že blanokřídlý hmyz a roztoči mohou v sobě obsahovat zárodky scrapu a tím mohou sloužit jako vektor k infikování dosud zdravých živočichů.
- Lidská pokožka je přirozeným cílem pro oba zkoumané parazity a také vytváří PrP bílkoviny ve velkém množství.
- Na druhé straně je autokatalytická metoda rozšiřování prionů určitým redukčním činitelem omezujícím množství PrPSc nutné k indukci infekce.

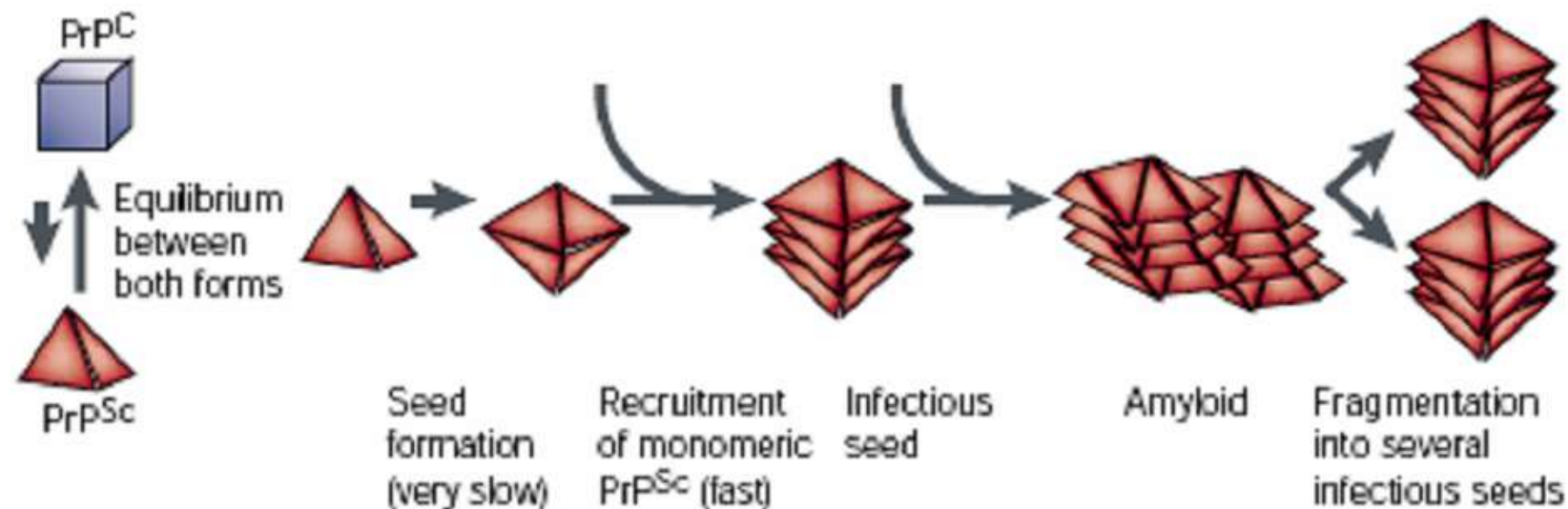


a 'Refolding' model



- a) Model „opakovaného skládání“ nebo model „šablonové asistence“ předpokládá interakci mezi exogenní PrP^{Sc} a endogenní PrP^{C}
- b) Model „rozsévání“ nebo „kondenzačně polymerizační“ model předpokládá, že PrP^{Sc} a PrP^{C} jsou v reversibilní termodynamické rovnováze

b 'Seeding' model



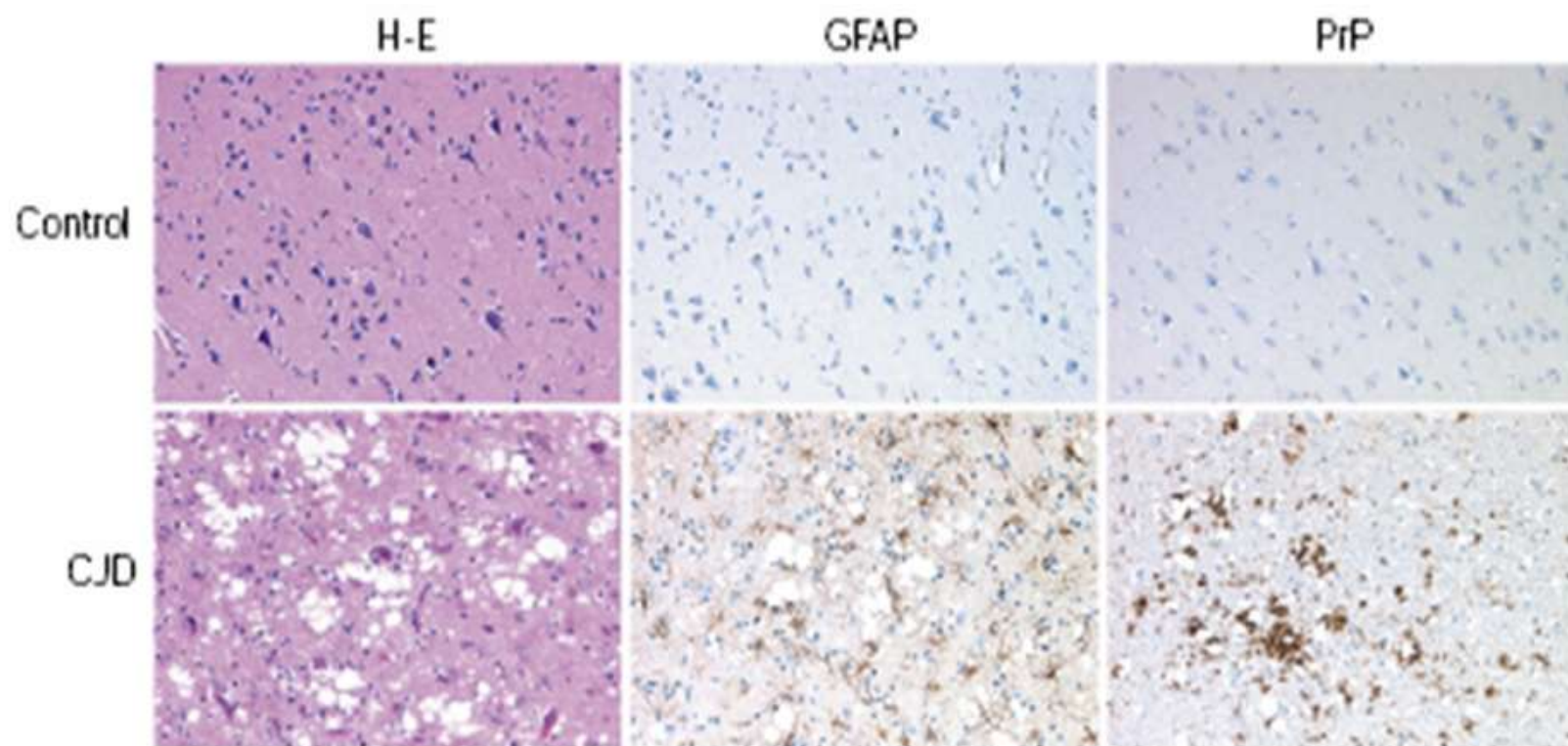


Figure 3 | Neuropathological features of transmissible spongiform encephalopathies. Histological and immunohistochemical analysis of frontal cortex samples from the brain of a patient who died of non-cerebral causes (upper row) and of a patient suffering from CJD (lower row). Brain sections were stained with hematoxylin-eosin (H-E, left panels), with antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP, middle panels) and with antibodies against the prion protein (PrP, right panels). Neuronal loss and prominent spongiosis are visible in the H-E stain. Strong proliferation of reactive astrocytes (gliosis) and perivacuolar prion protein deposits are detectable in the GFAP and PrP immunostains of the CJD brain samples.



Priony

- Tvořeny jedinou proteinovou molekulou, která je kódována samotnou hostitelskou DNA.
- Prion protein (PrP)¹ is a glycoprotein that is highly expressed in brain, heart, lungs, and lymphoid system and at lower levels in several other tissues such as muscle.
- Mature PrP contains two *N*-linked glycans and a disulfide bond.
- Although a great deal is known about the role of PrP^{Sc} in the disease process, the normal function of PrP has remained elusive.
- A variety of functions have been proposed for PrP^C, including roles in metal ion trafficking, cell adhesion, and transmembrane signaling.
- Identifying the function of PrP^C may provide important clues to the pathogenesis of prion diseases.

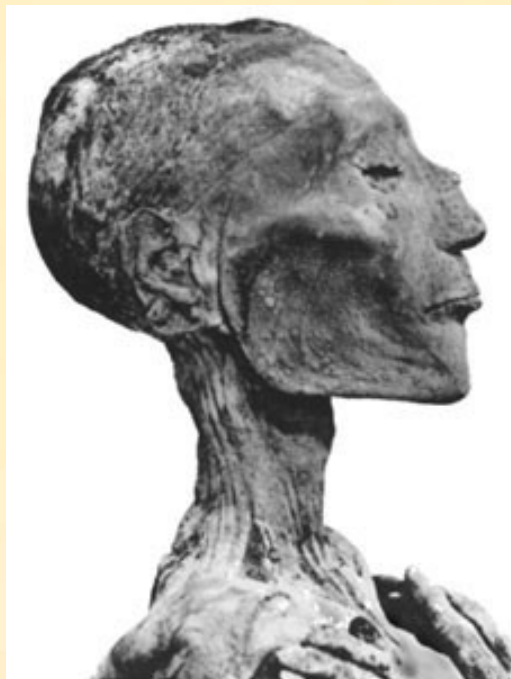


Viry

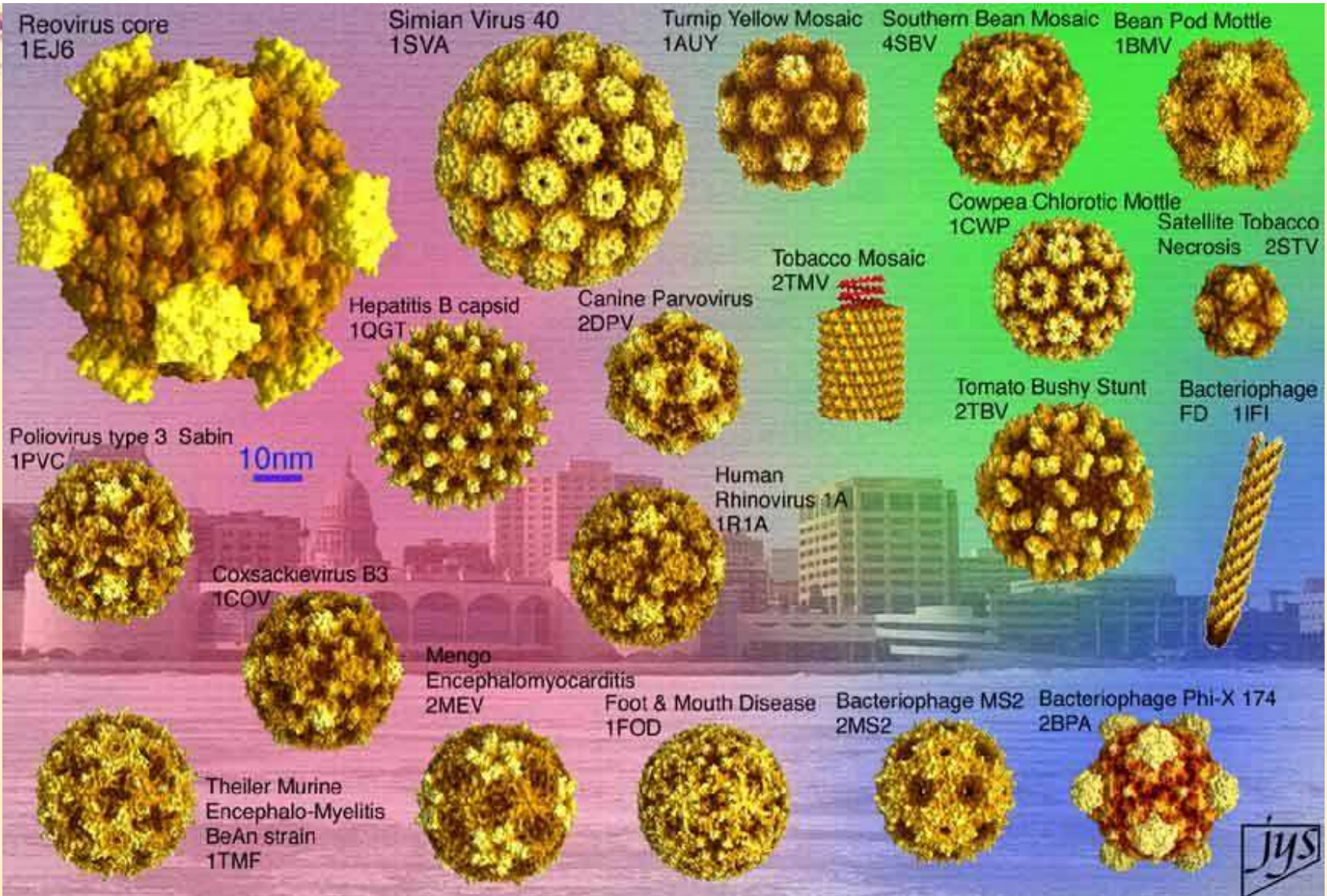
- Viry jsou nebuněčné částice, nejmenší „organismy“(?) (velikost 15-390 nm), jsou patogenní
- Virus mimo hostitelskou buňku je chápán jako neživý (neprojevuje žádné známky a vlastnosti života).
- Lze s nimi zacházet způsobem, který by živé organizmy zahubil
 - můžeme je rozložit a složit, aniž by utrpěla schopnost infikovat hostitele.
- Není schopen samostatně vykonávat životní funkce. Pouze v závislosti na hostitelské buňce může realizovat přenos genetické informace.
- Všechny životní funkce provádí v závislosti na translačním systému hostitelské buňky, informace uložená v DNA nebo RNA viru se překládá do jejich bílkovin na ribozómech hostitelské buňky.



Lidé v dávnověku si nejen uvědomovali účinky virové infekce, ale v některých případech zkoumali také příčiny a prevenci virových infekcí. Snad první psaný záznam virové infekce (v hieroglyfu) pochází z Memphisu, z hlavního města starobylého Egypta, zapsaný cca 1 400 let před Kristem, který zobrazuje chrámového duchovního jménem Siptah s typickými klinickými příznaky ochrnutí dětskou obrnou (paralytickou poliomyelitidou).



*U faraóna Ramsese V, který zemřel 1196 BC, se předpokládá, že podlehl neštovicím
(– k porovnání bradavčité puchýřky na tváři mumie a tytéž u současného pacienta).*



Animal (red area), plant (green area) and bacteriophages (blue area) are depicted to scale (see 10nm bar) as GRASP surfaces from published X-ray crystallography coordinates. Virus names are followed by their PDB entry code (see www.rcsb.org or mmtsb.scripps.edu/viper). For downloadable images see also www.bocklabs.wisc.edu. Background: Madison landscape seen from Monona lake. All images by Dr. Jean-Yves Sgro, Institute for Molecular Virology, UW-Madison.



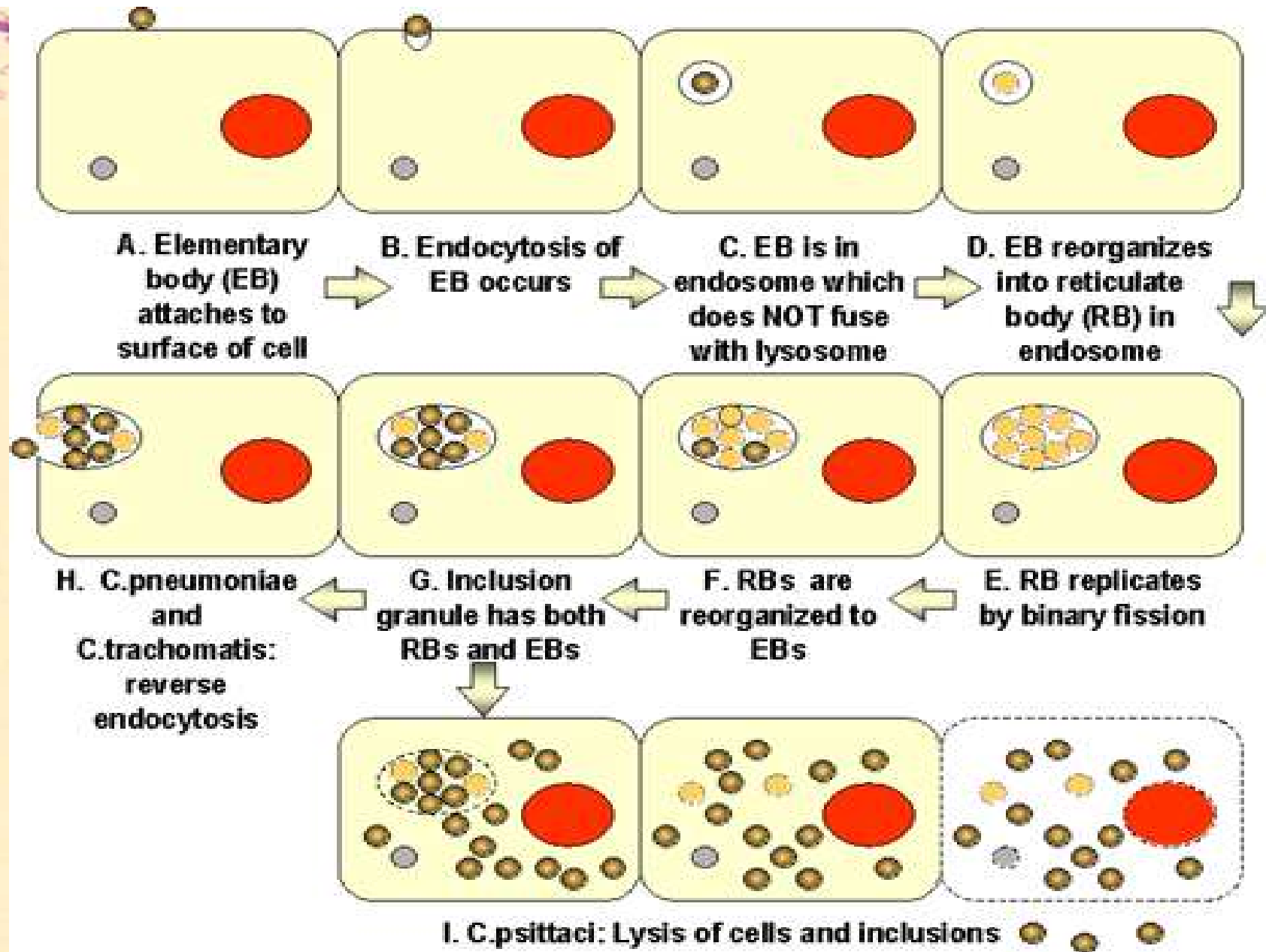
Viry

- Rozlišujeme **RNA viry** (obsahují pouze RNA) a **DNA viry** (obsahují pouze DNA). **Viry nikdy neobsahují obě nukleové kyseliny!**
- Nejmenší jednotka viru, která je schopna infikovat hostitele, je **virion**. U malých, jednoduchých virů je to pouze komplex nukleové kyseliny a bílkoviny, u složitějších ještě povrchové obaly, které získává při uvolnění z buňky.
- Nukleová kyselina je uložena v bílkovinném obalu, tzv. **kapsidu**. Kapsid může být jednovrstevný i vícevrstevný, mohou z něj vyčnívat různé výběžky a hroty, které jsou bílkovinného charakteru a jsou dány genetickou informací viru.
- Komplex nukleové kyseliny a bílkoviny označujeme jako **nukleokapsid**. U jednoduchých virů je shodný s virionem.



Teorie vzniku virů

1. Předpokládá, že viry jsou zjednodušené složitější organismy, např. bakterie, přechodem by mohly být intracelulárně (uvnitř buněk) žijící bakterie (např. chlamydie), jež ztratily většinu biosyntetických drah.





Teorie vzniku virů

1. Viry - zjednodušené složitější organismy,
2. Vyvinuly se z RNA nebo DNA hostitelské buňky, která získala schopnost množit se nezávisle na buňce, např. **viroidy** (10 x menší než NA virů – napadají rostliny) jsou autonomně se replikující kruhové molekuly RNA, které nekódují žádný bílkovinný obal. Z čeho se ale vyvinula kapsida (bílk. obal), když se v eukaryotech podobná bílkovina nevyskytuje?
3. Za předpokladu, že dříve sloužila k uchování genetické informace RNA (nikoli DNA), kteřá je univerzálnější (RNA má ribózu s OH skupinami v poloze 2' a 3', které umožňují vykonávání enzymatických funkcí - štěpit fosfodiesterové vazby, provádět sestřih (splicing) nebo katalyzovat polymeraci), RNA viry by tedy byly nejstarší organizmy. Tato hypotéza předpokládá vznik předbuněčných forem života.



Rozdělení virů (dle hostitele)

- Každý virus je schopen infikovat jen určitý okruh buněk, které mu umožňují navázat se na specifickou molekulární strukturu v membráně, respektive stěně, na tzv. **receptor**.
- Ze strany viru se na tom podílí také specifická molekulární struktura.
- Jen buňky nesoucí specifické receptory mohou být virem infikovány.
- Receptory pro daný virus nesou jen buňky určitého druhu a obvykle ještě jen buňky určitého tkáňového typu.
- **bakteriofágy**: zkráceně fágy, existují DNA i RNA-fágy, napadají bakterie
- **cyanofágy**: napadají sinice
- **rostlinné viry**: většinou RNA viry
- **mykofágy**: napadají houby
- **živočišné viry**: DNA i RNA viry, dělí se na viry bezobratlých a viry obratlovců

(podle složení)

B. Členění virů

1.1 DNA viry

1.1.1 ds-DNA viry obalené

- ♦ poxviry *Poxviridae* (právé neštovice, myxomatózy králíků...)
- ♦ herpesviry *Herpesviridae* (plané neštovice, opary, mononukleóza, obrna, chřipka aj)
- ♦ bakuloviry *Baculoviridae* (původci polyedrie u virů)
- ♦ plazmaviry *Plasmaviridae*

1.1.2 ds-DNA viry neobalené

- ♦ iridoviry *Iridoviridae* (živočišné viry)
- ♦ adenoviry *Adenoviridae* (viry obratlovců)
- ♦ papovaviry *Papovaviridae* (virus lidských bradavic)

1.1.3 ss-DNA viry neobalené

- ♦ parvoviry (*Parvoviridae*)

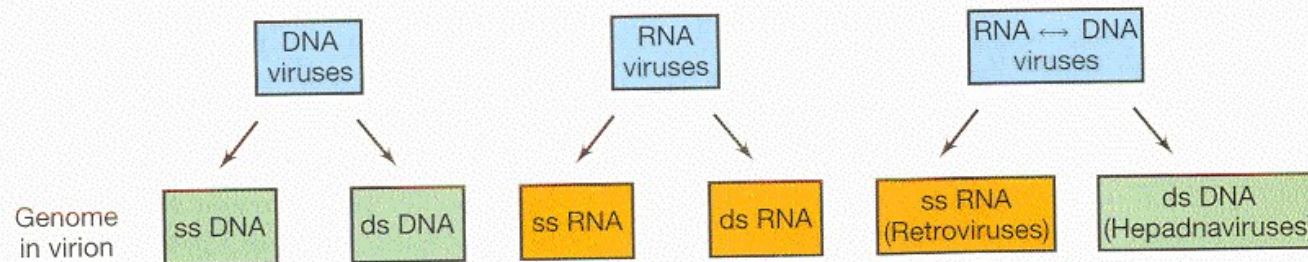
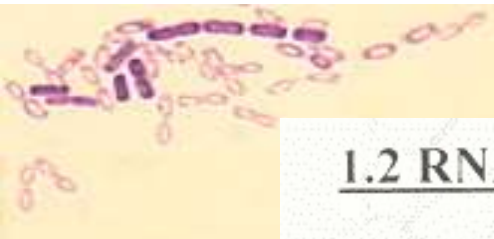


FIGURE 8.1 Viral genomes. The genomes of viruses can be composed of either DNA or RNA, and some use both as their genomic material at different stages in their life cycle. However, only one type of nucleic acid is found in the virion of any particular type of virus. This can be single-stranded (ss), double-stranded (ds), or in the case of the hepadnaviruses, partially double-stranded.



Členění virů

1.2 RNA viry

1.2.1 ds-RNA viry obalené

- ♦ cystoviry *Cystoviridae* (bakteriofágy)

1.2.2 ds-RNA viry neobalené

- ♦ reoviry *Reoviridae*

1.2.3 ss-RNA viry obalené

- ♦ togaviry *Togaviridae* (encefalitida, zarděnky, žlutá zimnice)
- ♦ retroviry *Retroviridae* (HIV, onkoviry-zhoubné bujení)
- ♦ paramyxoviry *Paramyxoviridae* (příušnice, spalničky)
- ♦ ortomyxoviry *Orthomyxoviridae* (chřipka, příušnice)
- ♦ rhabdoviry *Rhabdoviridae* (vzteklina)

1.2.4 ss-RNA viry neobalené

Převážně rostlinné viry.

- ♦ tobamoviry *Tobamoviridae* (TMV-virus mozaiky tabáku)
- ♦ closteroviry *Closteroviridae* (BYV-nekrotická žloutenka řepy)
- ♦ luteoviry *Luteoviridae* (žlutá zakrslost ječmene)
- ♦ cucumoviry *Cucumoviridae* (CMV-virus mozaiky okurky)

Složení viru

Nukleová kyselina

- DNA může být **dvouřetězcová** i **jednořetězcová**, **lineární** nebo **cyklická** a obsahovat 3 až stovky genů. Kapsid virů s dvouřetězcovou DNA je nejčastěji pravidelný **dvacetistěn** (kapsid ikosaedrický), kapsidy virů s jednořetězcovou DNA bývají **dvanáctistěnné** (dodekaedrické) nebo **šroubovicové** (helikální). RNA je dvouřetězcová, nebo jednořetězcová a lineární.

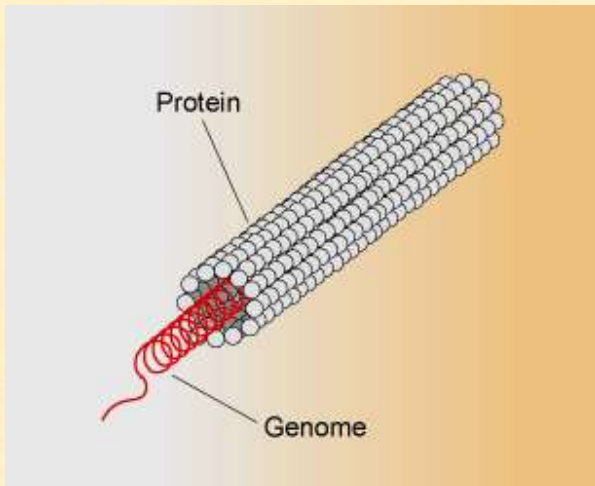


Struktura kapsidu

- Kapsid je tvořen z opakujících se jednotkových makromolekul nazvaných **kapsomery**.
- Z existujících typů kapsomer se mohou vytvořit dva typy virionů:
 - a) **tyčinkové**
 - b) **kulovité** (resp. mnohostěnné)

Složení viru

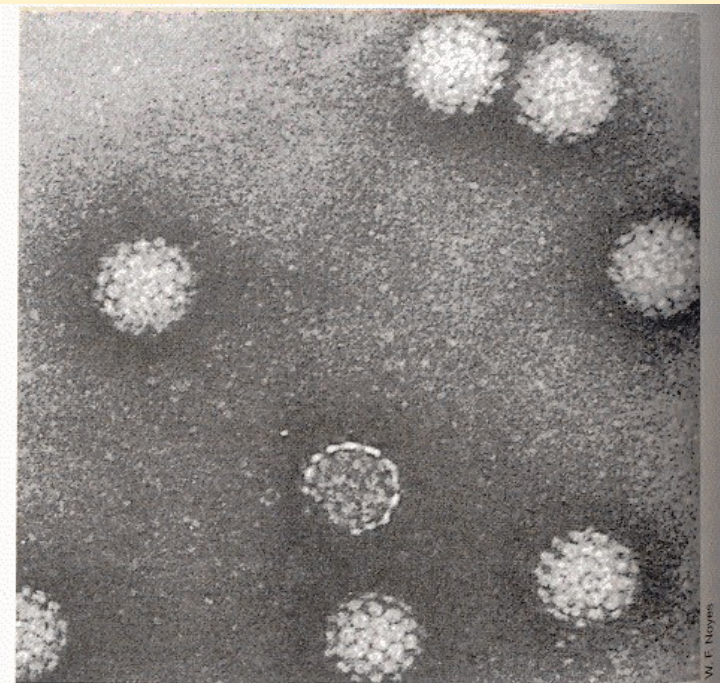
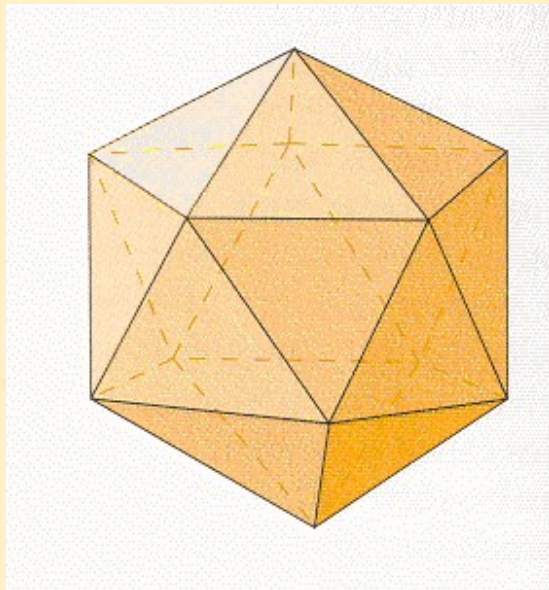
- **Tyčinkovité viry** jsou pevné nebo ohebné, vždy s helikální symetrií (Kapsid s touto symetrií je vytvořen z elipsoidních jednotek, které jsou sestaveny šroubovicovitě a nukleová kyselina je protažena mezi jejich užšími částmi. Neleží volně v dutině virionu.).



1 - virion viru tabákové mozaiky,
Genome - *RNA*,
Protein - *bílkoviny kapsidu*,

Složení viru

- **Kulovité viry** mají většinou ikosaedrickou symetrii (Takovéto kapsidy jsou tvořeny desítkami až stovkami identických jednotek, které vytváří tvar dvacetistěnu o 20 shodných stěnách, 30 hranách a 12 vrcholech.).

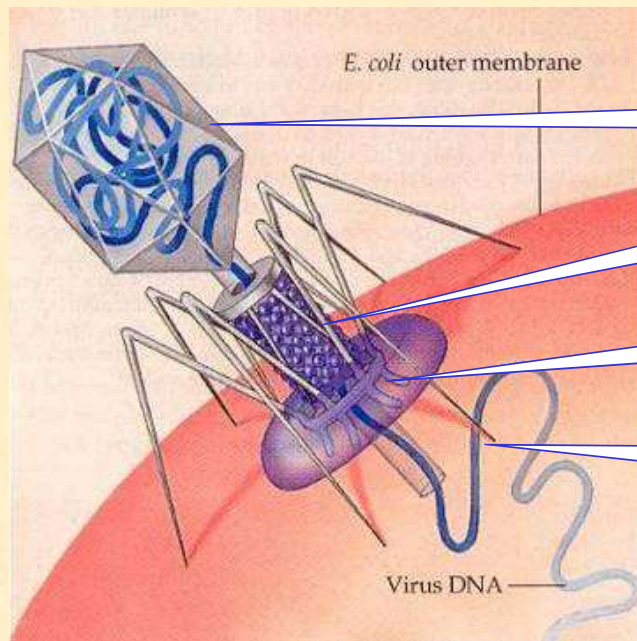


(b)

FIGURE 8.4 Icosahedral symmetry. (a) A model of an icosahedron. (b) Electron micrograph of human wart virus, a virus with icosahedral symmetry. The individual particles are about 55 nm in diameter.

Složení viru

- **Bakteriofágy** jsou tvarově rozmanité, ale i u nich se vyskytuje ikosaedrická nebo helikální symetrie. Největší z nich jsou tvořeny **hlavičkou** s ikosaedrickou symetrií (obsahuje nukleovou kyselinu), **bičíkem** se symetrií helikální, může být stažitelný nebo nestažitelný (nikdy neslouží k pohybu!) a **bičíkových vláken**. Menší bakteriofágy jsou bez bičíku.



Struktura a tvar bakteriofága T4,

kapsid

kontraktilní bičík

hroty bičíku

vlákna bičíku

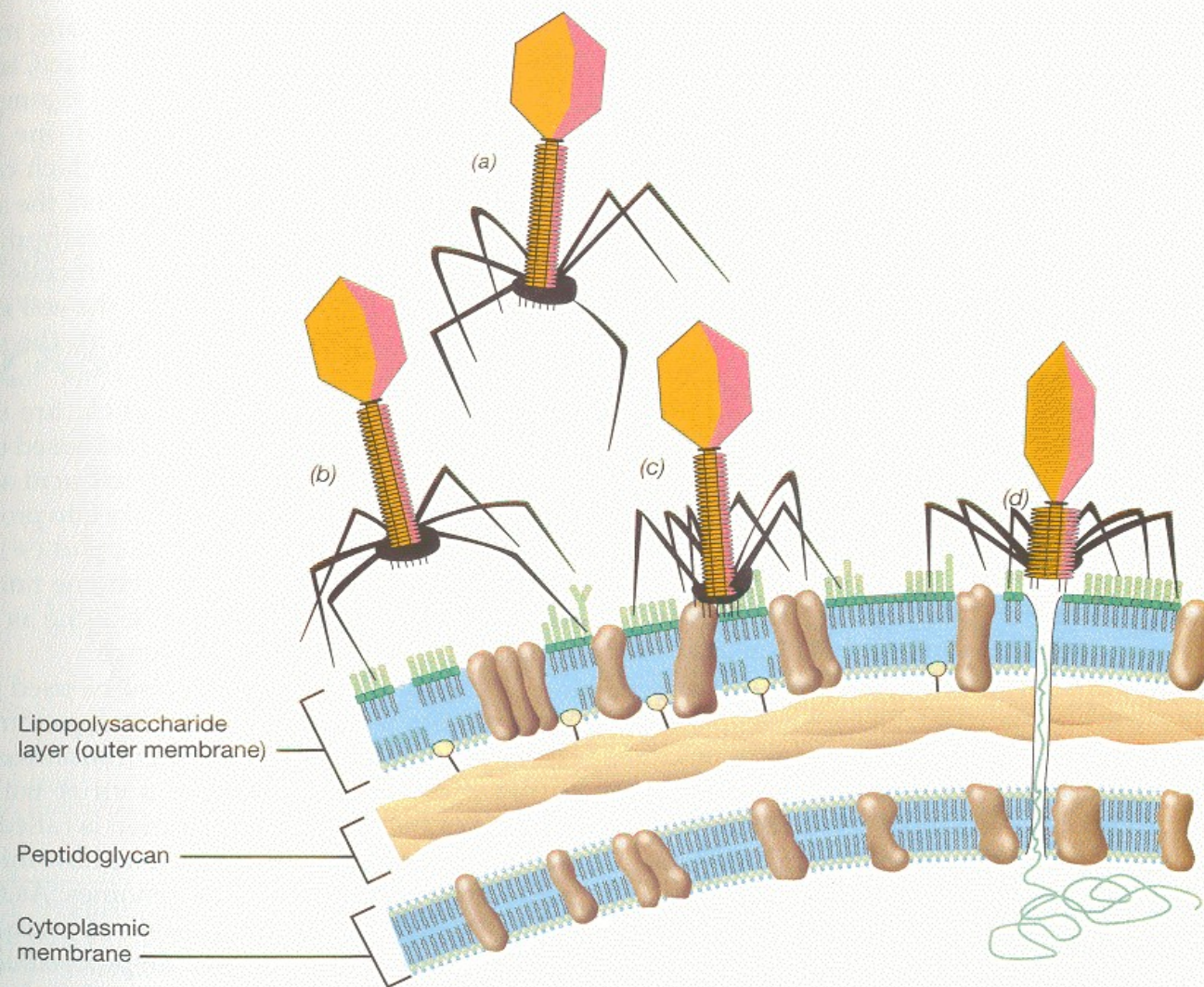
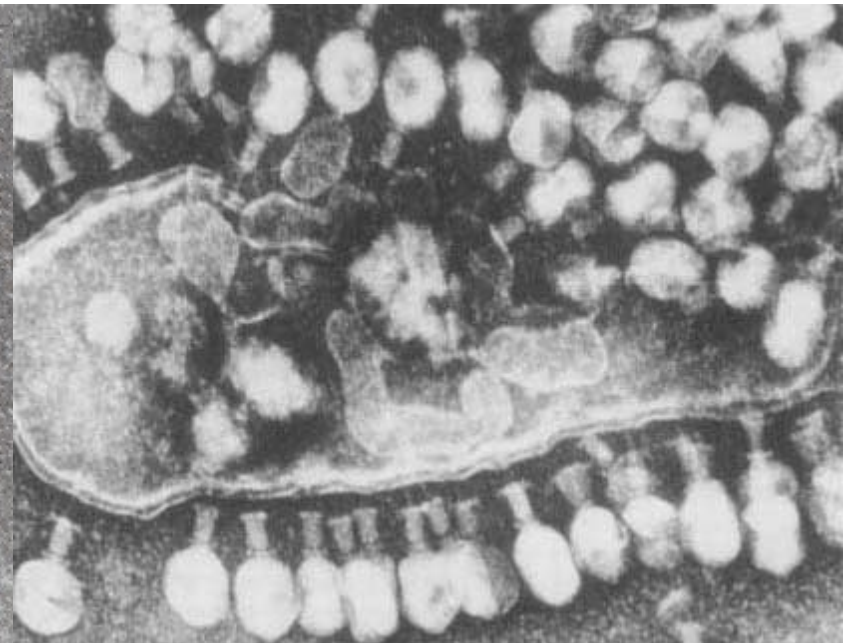
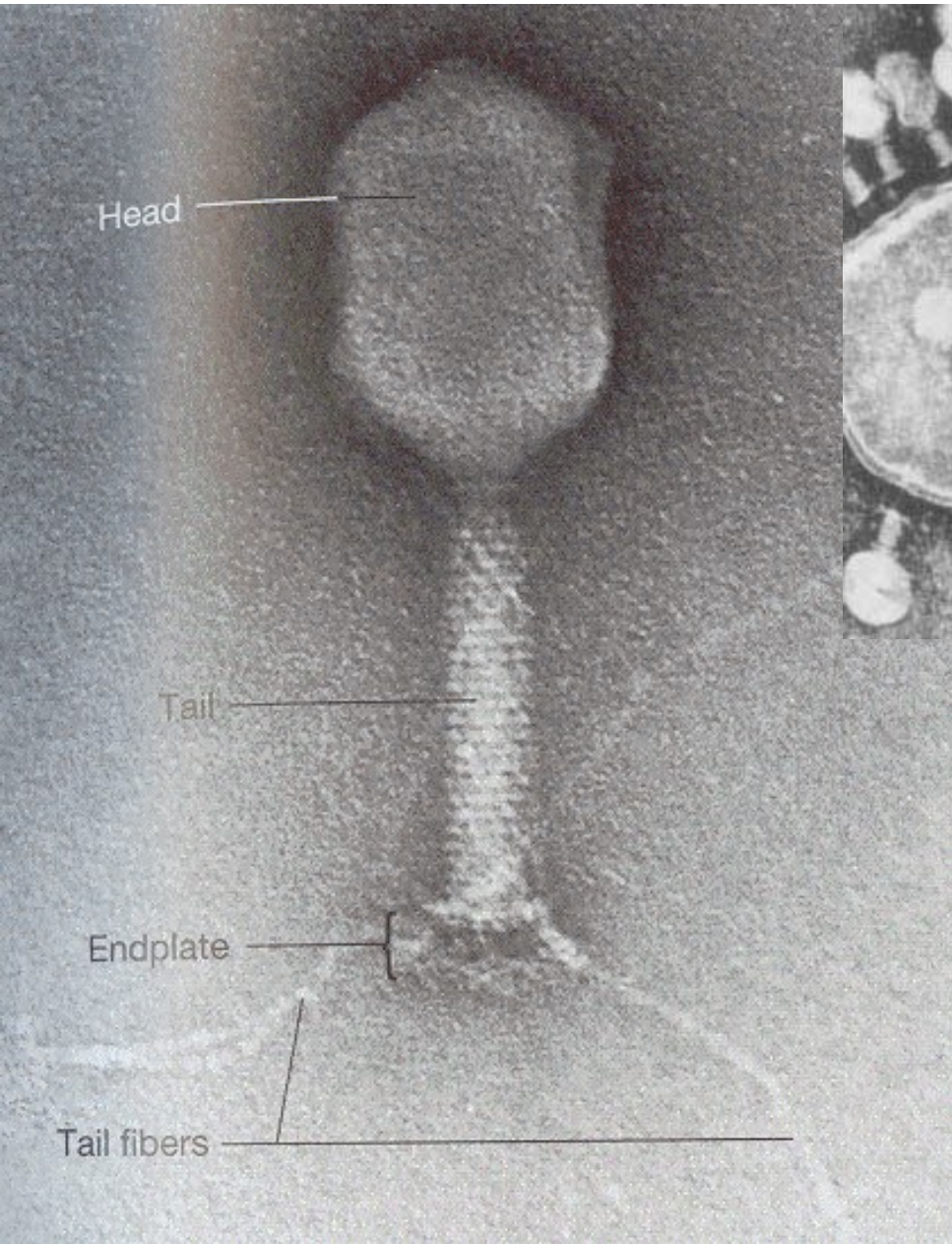
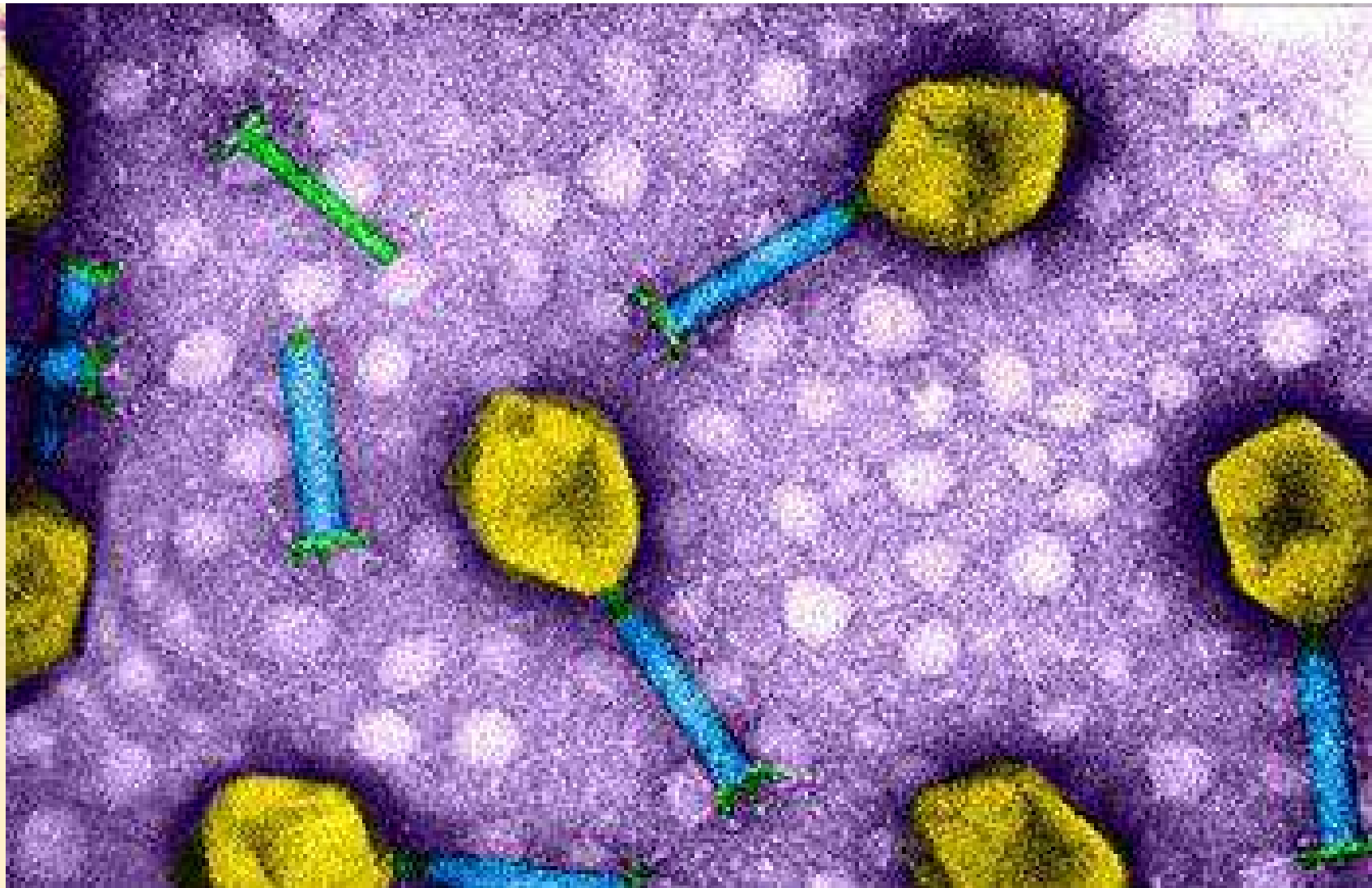


FIGURE 8.10 Attachment of T4 bacteriophage particle to the cell wall of *Escherichia coli* and injection of DNA: (a) Unattached particle. (b) Attachment to the wall by the long tail fibers interacting with core polysaccharide. (c) Contact of cell wall by the tail pins. (d) Contraction of the tail sheath and injection of the DNA. For a detailed description of the gram-negative cell wall see Section 3.8.



Bakteriofág T4
Escherichia coli
(hlavička má cca 85 nm)



bacteriophage DNA virus phage T4

Kvantifikace bakteriálních virů s využitím techniky agarového překryvu

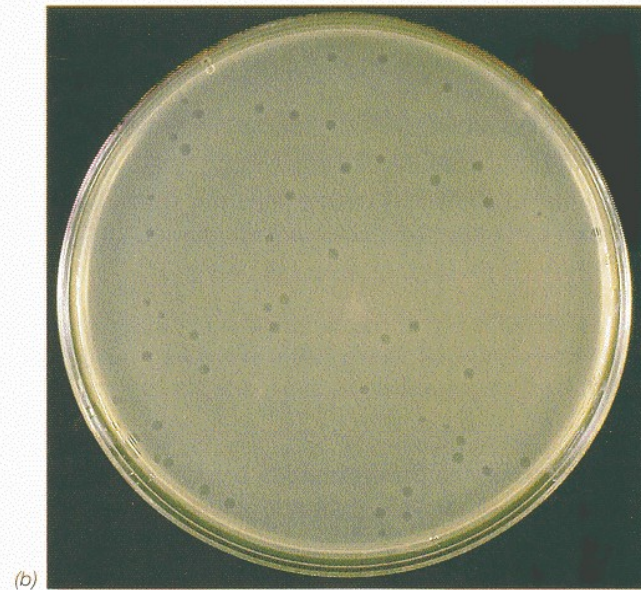
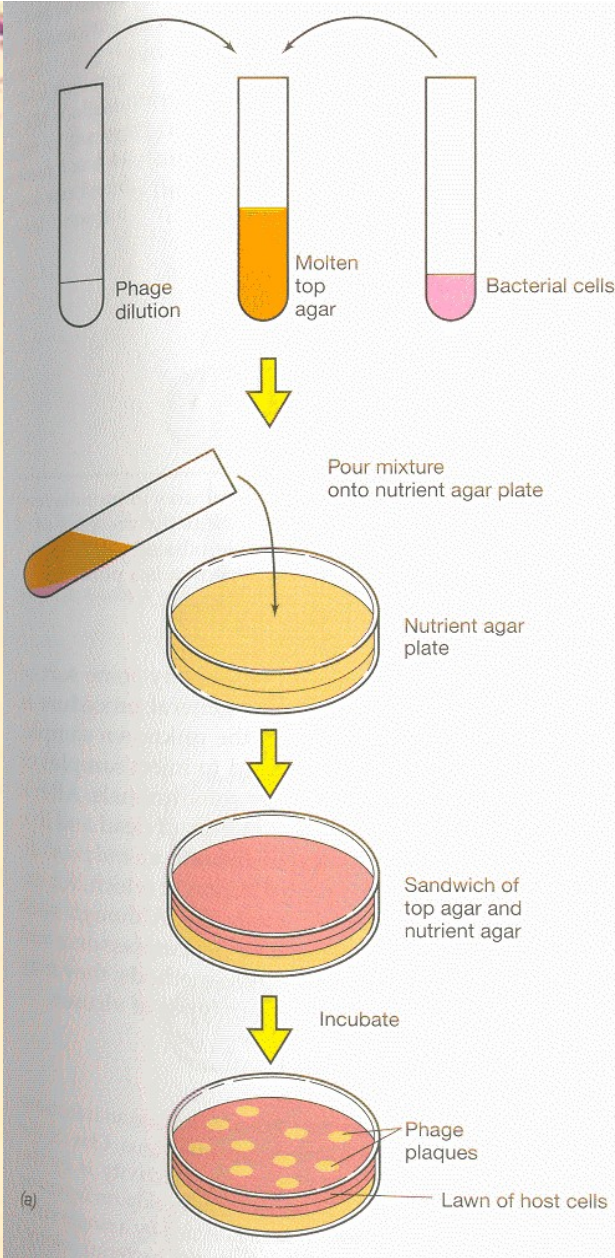


FIGURE 8.6 Quantification of bacterial virus by plaque assay using the agar overlay technique. (a) A dilution of a suspension containing the virus material is mixed in a small amount of melted agar with the sensitive host bacteria, and the mixture poured on the surface of a nutrient agar plate. The host bacteria, which have been spread uniformly throughout the top agar layer, begin to grow, and after overnight incubation form a *lawn* of confluent growth. Each virus particle that attaches to a cell and reproduces may cause cell lysis, and the virus particles released can spread to adjacent cells in the agar, infect them, be reproduced, and again lead to lysis and release. The size of the plaque formed depends on the virus, the host, and conditions of culture. (b) Photograph of a plate showing plaques formed by bacteriophage on a lawn of sensitive bacteria. The plaques shown are about 1–2 mm in diameter.

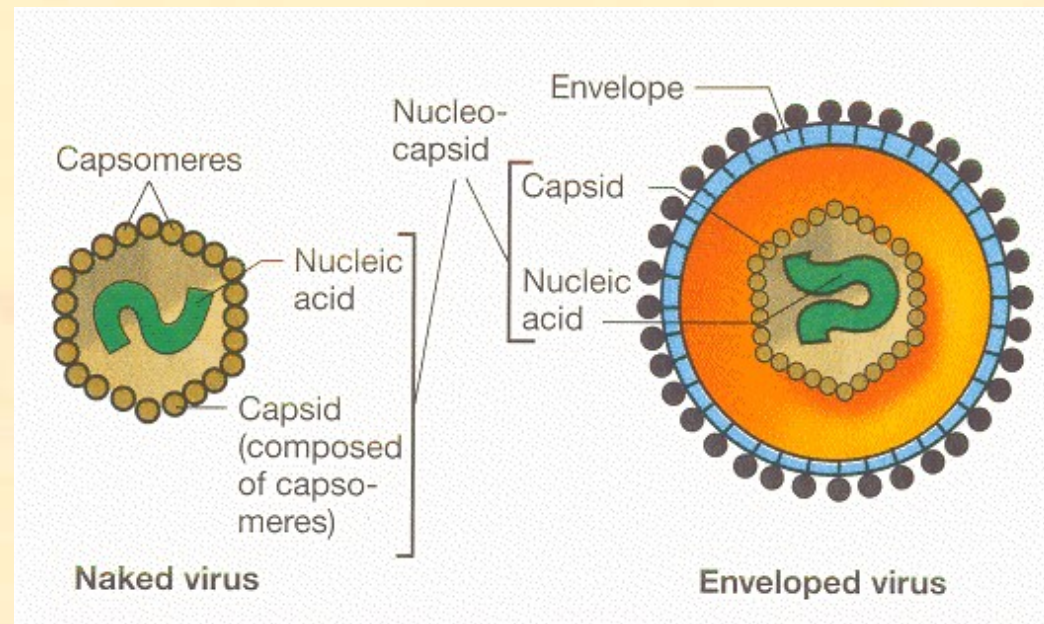
Princip: počítání transparentních okének na sendvičovém agaru. Ten vzniká: živná půda se přelije směsí agaru bez živin, roztoku bakteriofága a živé bakteriální suspenze. Na rozhraní mezi dvěma agary se okamžitě rozvine kolonie hostitelských bakterií v tenounké vrstvě. V mnoha generacích se pomnoží bakteriofágy a lýze hostitelských buněk se projeví

zprůhledněním (oněch okének) – tyto můžeme spočítat.

Agar je roztok získaný ze síranu polysacharidu mořské řasy, mikroby jej neumí rozložit. Může se opakovaně tepelně zpracovat, aniž by utrpěly jeho vlastnosti.

Membránový obal viru

- Membrána viru je odvozena od jaderné nebo plazmatické membrány hostitelské buňky, kterou vir získá v konečné fázi zrání (maturace). Membrána buňky se vychlipuje kolem viru a nakonec se virus **pučením** (exocytózou) dostává i s membránou ven.
- Takovýmto virům se říká **viry obalené**. Největší viry mohou mít membrány dvě; jednu z jaderné membrány, druhou z membrány plazmatické.





Virová infekce

- Většinou se viry jeví jako nitrobuněční parazité, ale ne vždy buňka soužitím s virem strádá. Virus může být přítomen, a přesto může buňka bez omezení fungovat. Virové geny se také mohou stávat součástí jaderných genomů a naopak.
- Proniknutí viru do organismu (respektive vniknutí jeho nukleové kyseliny) se nazývá **infekce**.
- Viry se přenáší vdechnutím, krví, slinami atd. Aby mohl virus proniknout do buňky, musí nejdříve najít vhodnou buňku, kterou pozná podle určitých molekul (receptorů) na jejím povrchu.
- Přítomnost receptorů na povrchu buněk jednotlivých orgánů je příčinou **orgánového tropizmu** virů (náklonnost k určitému orgánu, napadají určitý orgán).
- Po navázání na povrch (na receptor), proniká vir do buňky.

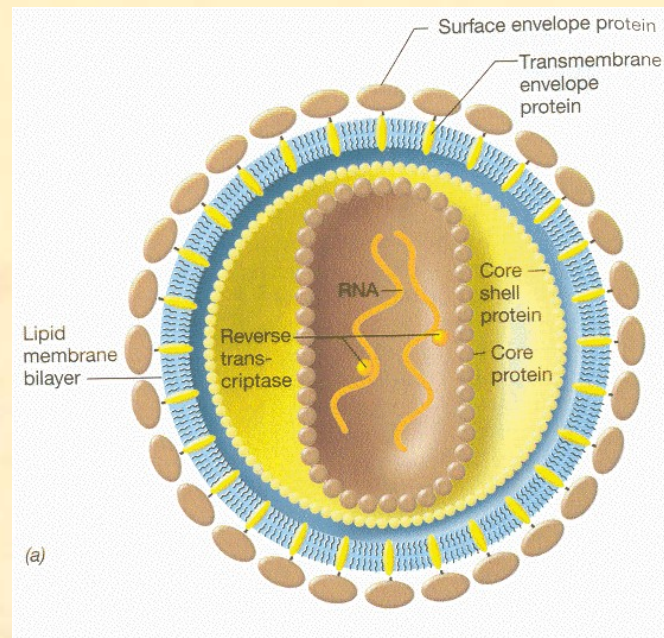


Virová infekce

- U obalených virů se tak děje endocytózou - membrána splyne s membránou hostitelské buňky a kapsid je uvolněn do cytoplazmy. Uvnitř buňky dochází k rozložení viru, tj. obnažení nukleové kyseliny.
- Bakteriofágové pouze vstříknou nukleovou kyselinu.
- Ven z buňky se vir dostává pučením (vznikají tak obalené viry) nebo lyzí, tj. rozpad buňky pomocí enzymu, který je produkován virem.
- Co se bude dít s virem dál po vstupu do buňky záleží na druhu nukleové kyseliny.
- **DNA viry** - přímé transkripce a translace z virové DNA
- **pozitivní RNA viry** - jednovláknová RNA slouží přímo jako mRNA pro syntézu proteinů

Virová infekce

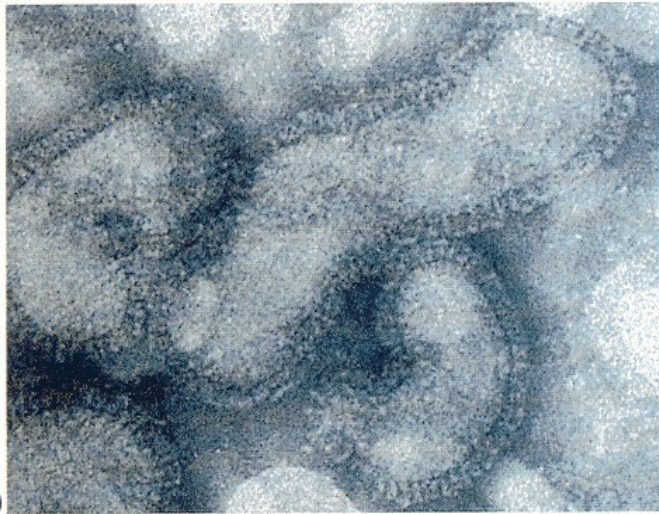
- **negativní RNA viry** - jednovláknová RNA je zreplikována - vzniká komplementární vlákno, které slouží jako mRNA, přepis je katalyzován dependentní RNA polymerázou, která je přinesena v kapsidu virionu
- **vir s dvouvláknovou RNA** - přepis do mRNA
- **retroviry** - RNA je **reverzní transkriptázou** (je přinesena v kapsidu) přepsána do DNA (zpětná transkripce)





Virová infekce

- Doba od proniknutí viru do organismu do propuknutí choroby se nazývá **inkubační doba**.
 - Množení viru probíhá tak, že buňka pracuje s DNA viru jako se svou vlastní a tím vytváří nové viriony.
 - Některé viry se množí již v místě vstupu (např. virus rýmy), jiné se šíří lymfatickými cévami a krví do nervové soustavy, kůže nebo svalů. V těchto cílových buňkách se pomnoží, čímž se buňky poškodí nebo dokonce rozloží a tím se choroba projeví.
- Infekce zjevná (aparentní)** se projeví hned po inkubační době.
- Latentní infekce** se projevuje jen čas od času při **aktivaci viru**, která je způsobena např. horečkou nebo ultrafialovým zářením. Příznaky odezní, když je zastaveno množení viru, ten však v organismu přetrvává dál.



P. W. Choppin and W. Stoeckenius

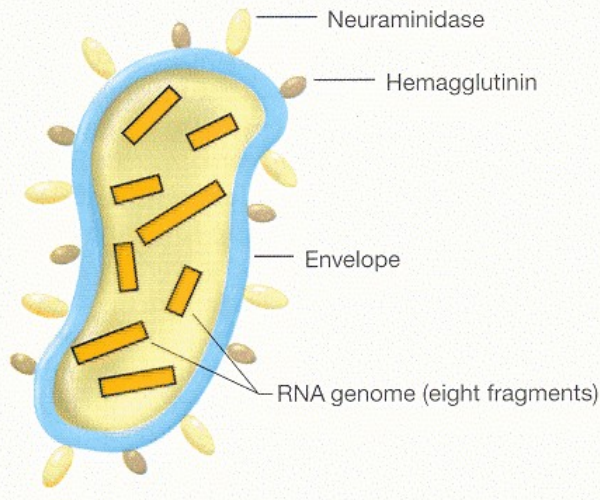


FIGURE 8.38 Influenza virion structure. (a) Electron micrograph. (b) Diagram, showing some of the components.

-Vir se v buňce replikuje a syntetizuje proteiny (enzymy a kapsidové proteiny). Kapsidové proteiny se samovolně skládají kolem nukleové kyseliny a vytvářejí obal (kapsid). Většina virů obsahuje jedinou molekulu nukleové kyseliny.

-Výjimkou jsou **retroviry**, které mají **dvě identické molekuly**.

-**Virus chřipky obsahuje 8 různých molekul RNA.**

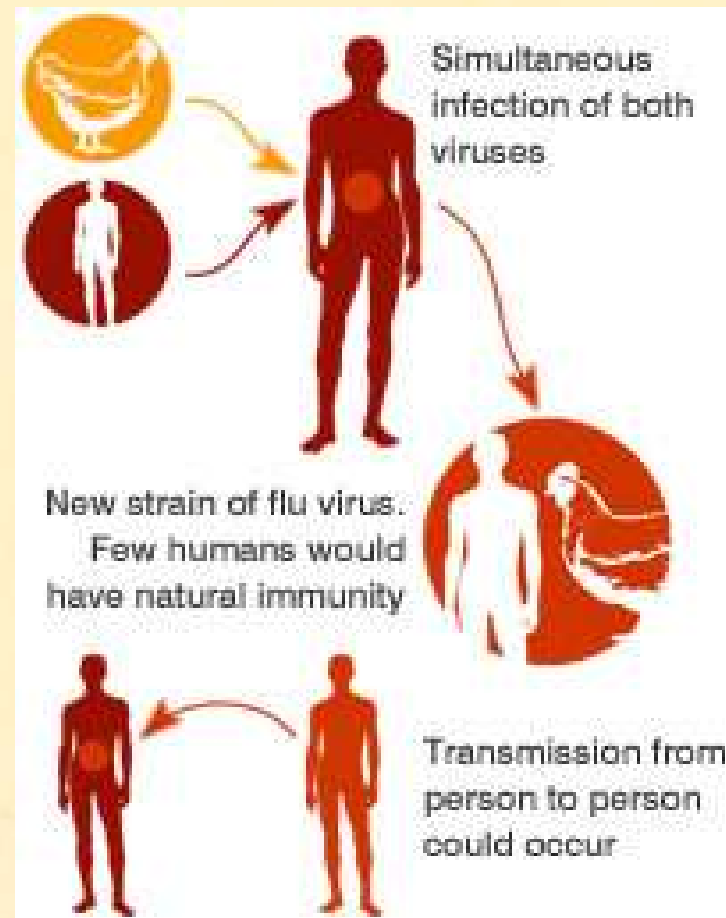


Virus (ptačí) chřipky

Virus chřipky patří taxonomicky do rodu Pneumovirus, čeleď Orthomyxoviridae . Jde o viry, které mají ochranný obal a velikostně se pohybují v rozmezí 80-120 nm. Genetická informace je uložena ve fragmentované molekule RNA (8 fragmentů). Na povrchu viru jsou bílkoviny **hemagglutininu-HA (17 typů) a neuraminidázy (9 typů)**. Od toho se odvozují různé typy chřipkových virů: H5N5, H5N1. Tyto viry jsou inaktivovány při 56°C za 30 minut a během několika minut při pH nižším než 5.

Protože nukleová kyselina je specifická, rozdělují se tyto viry do tří rodů (A, B, C). Různé kombinace hemagglutininu a neuraminidázy pak určují podtypy.

Poprvé byl přenos ptačí chřipky z ptáků na člověka zaznamenán v Hong Kongu, kde zapříčinil těžká onemocnění a smrt.



1 The virus enters a cell ...

The surface of an avian flu virus is dotted with proteins called antigens — hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). The HA antigens bind to receptors on a cell and enter the cell's cytoplasm.

2 ... hijacks its machinery ...

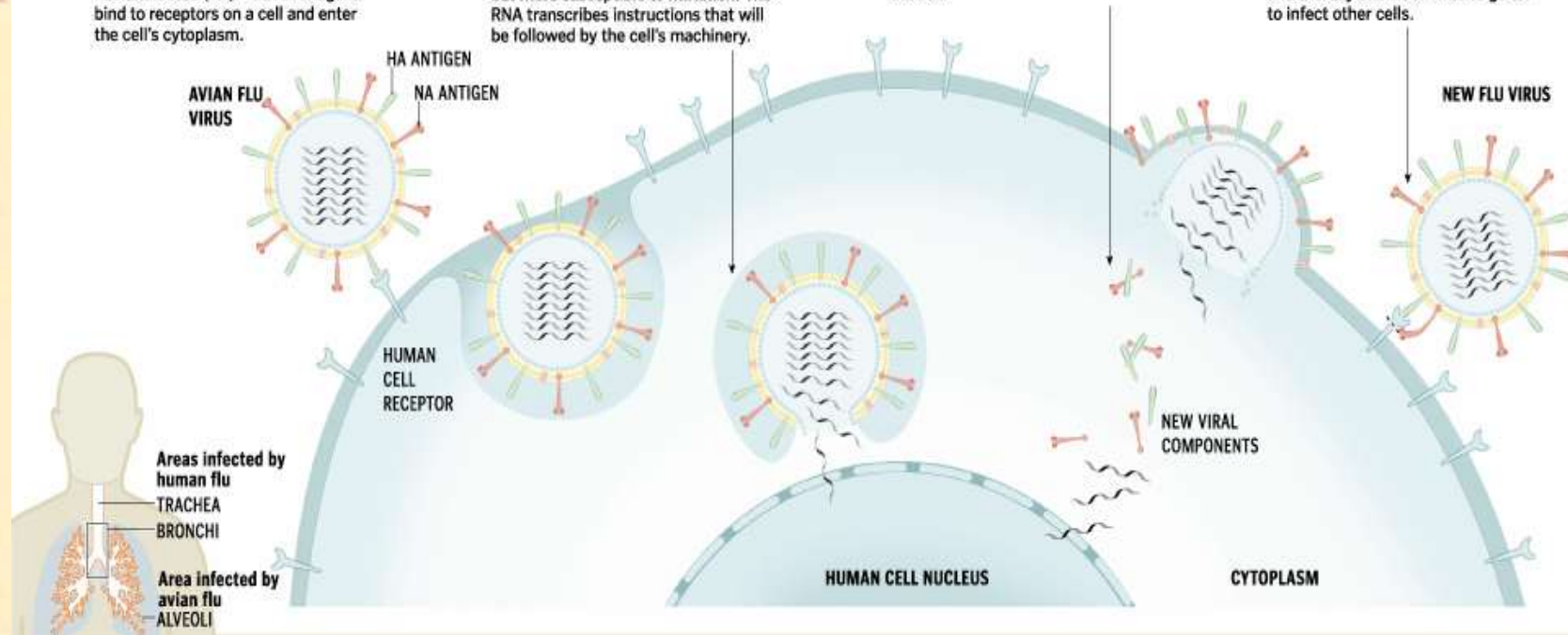
Once inside the cell, the virus breaks open and releases its eight strands of RNA, a genetic material similar to DNA but more susceptible to mutation. The RNA transcribes instructions that will be followed by the cell's machinery.

3 ... and makes it replicate the virus.

The cell constructs new viral components. These components assemble into new viruses that "bud off" from the inside of the cell.

4 The replicated virus spreads.

In order for a new virus to leave the host cell, the viral NA antigen must sever the final link to the infected cell and thereby allow the virus to go on to infect other cells.

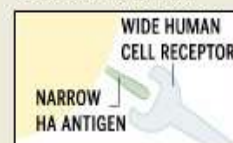


Why avian flu is so deadly ...

Normally, seasonal flu viruses infect the upper respiratory tract. New studies indicate the avian flu mostly infects the lower respiratory tract, including critical air ducts called alveoli that transfer oxygen from the lungs into the bloodstream. Infection in these areas may deprive the body of oxygen. Avian flu may also induce an immune system overload in which inflammatory chemicals called cytokines bombard infected areas, causing them to clog with immune cells and fluid.

... why it rarely infects humans ...

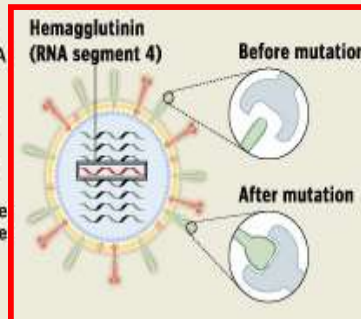
One possible reason the avian flu is not easily transmissible to humans is that its HA antigen spike fits poorly into human cell receptors in the upper respiratory tract.



... and two ways it could adapt and become easy to transmit

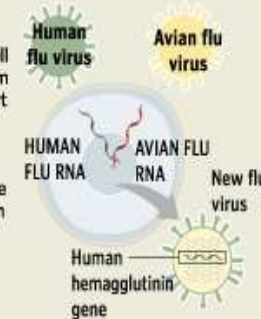
MUTATION

When a flu virus infects a cell and replicates, its RNA segments can mutate, possibly making it more infectious to humans. For instance, if the RNA segment that encodes for the HA antigen were to mutate, it could change the shape of the antigen to one that fits better into cell receptors in the upper respiratory tract.



COMBINING

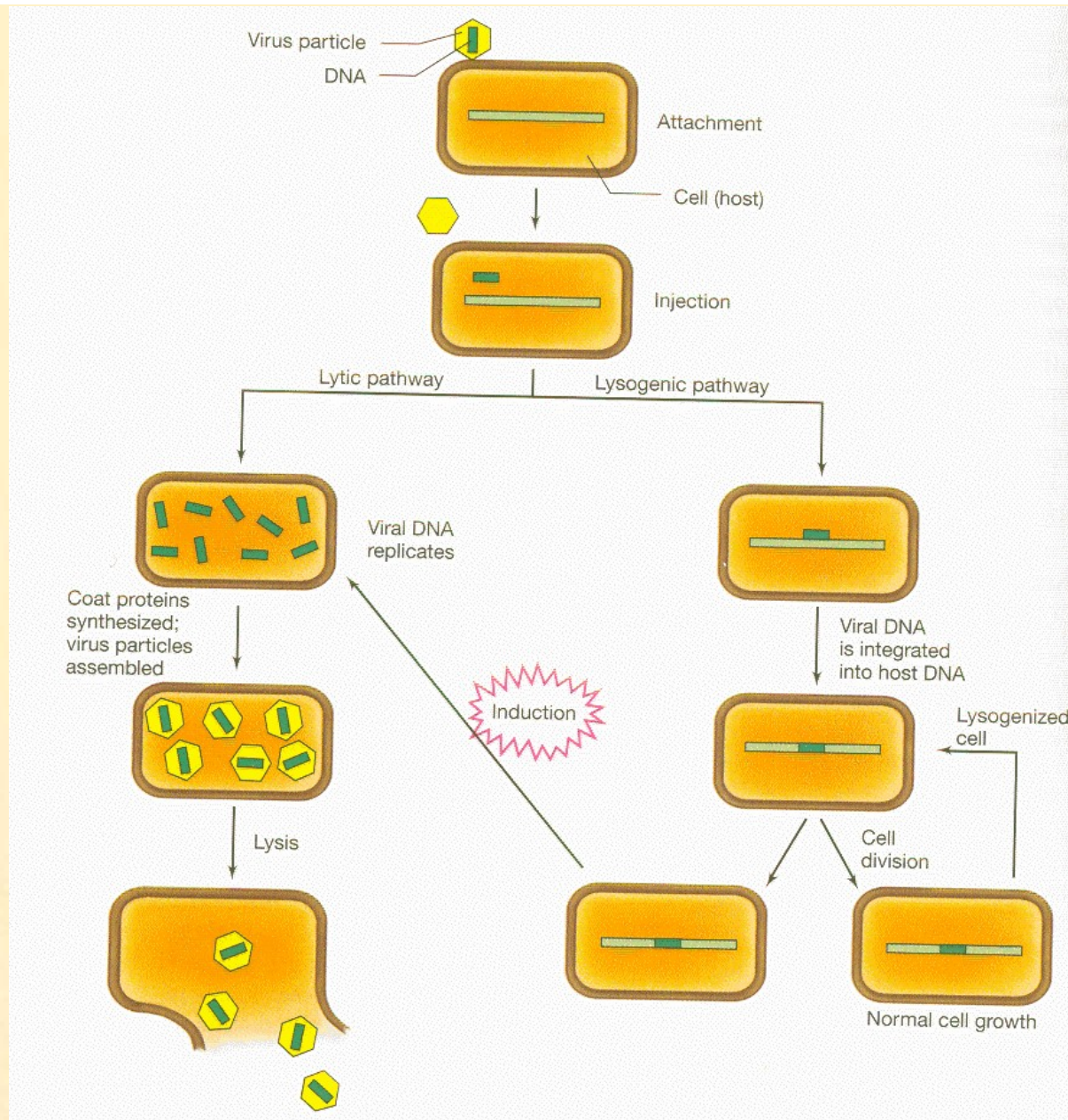
If human and avian flu viruses infect a human cell simultaneously, RNA from both viruses could re-sort in a process similar to drawing new cards in a hand of poker. The resulting virus could have the infectious HA antigen shape from the human virus while retaining the lethal properties of the avian virus.





Formy virové infekce

- 1. virus v buňce přetrvává aniž by se replikoval (perzistence) a jeho molekula v buňce přetrvává jako mimochromozomální kruhová molekula (virus Epstein-Barrové)
 - nebo se začlení do genomu buňky (**virogenie**), na venek se nijak neprojevuje (**latentní infekce**)
 - nebo ji přitom může změnit, nejčastěji v buňku rakovinnou. V genomu buňky se může přenášet z generace na generaci.
 - Takovýto virus je označován jako **provirus**, jsou jimi retroviry.
-
- 2. buňkou je pomnožován a ta tím zaniká (lyze buňky)





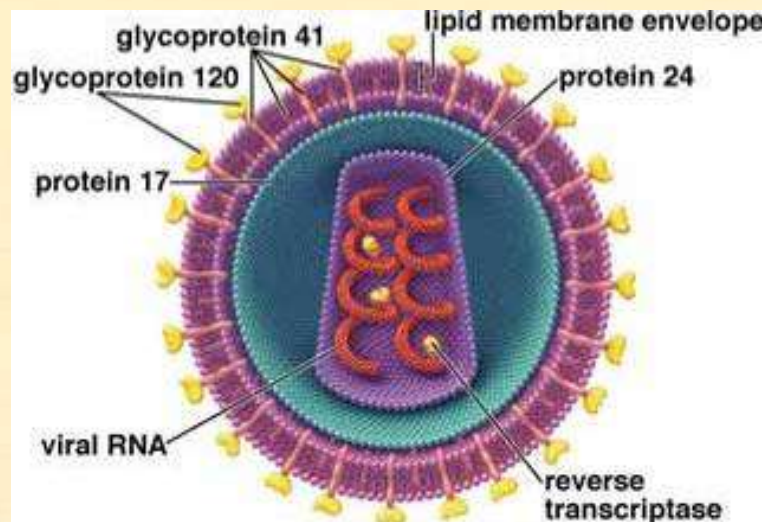
Virová infekce

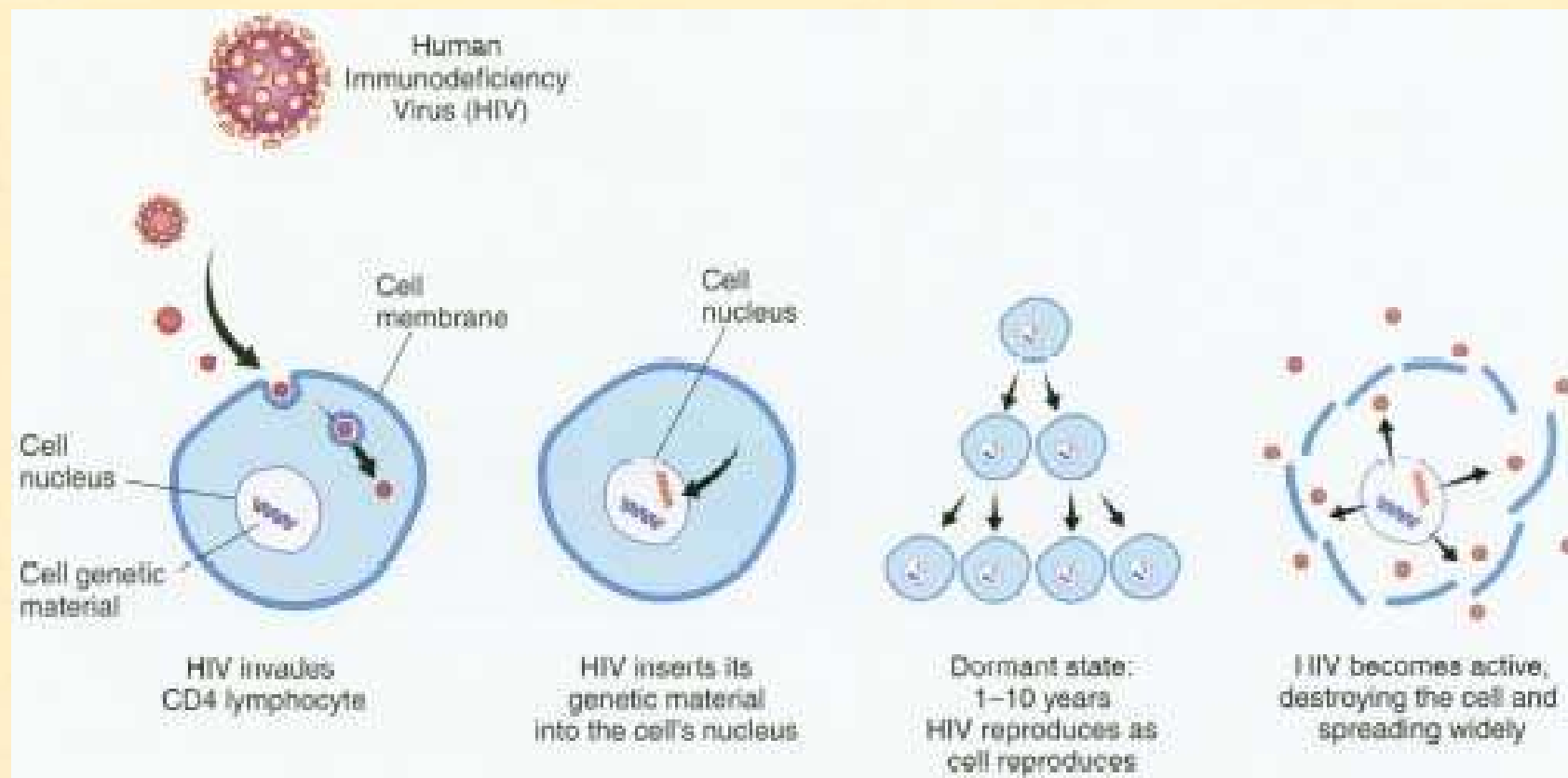
Druhy výskytu chorob:

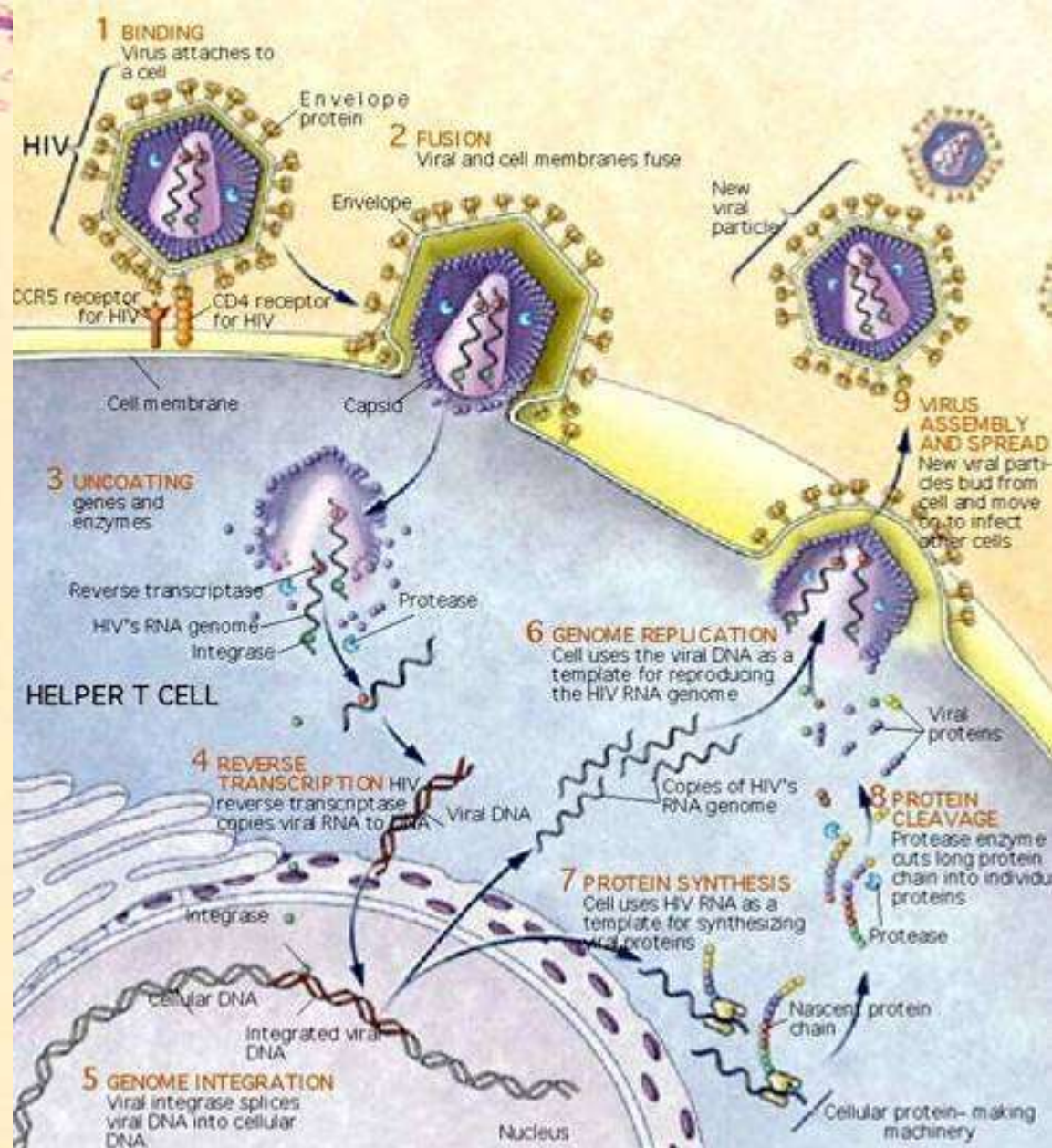
- **lokální infekce** - výskyt choroby pouze na malém území
- **epidemie** - rozšíření choroby přes větší území, stát (chřipka)
- **pandemie** - výskyt choroby přes celý kontinent popřípadě svět (AIDS)
- **Koevoluce viru a hostitele**
- Společný vývoj, př. po vysazení králíků do Austrálie jich 99,8 % uhynulo na myxomatózu králíků, 0,2 % si na vir zvykla a přežila, viry jim pomáhají chránit teritorium - kdyby přišli noví králíci, nakazili by se chorobou a zemřeli.

Virus HIV

- izolován v roce **1983** virus nedostatečnosti imunity (Human immunodeficiency virus).
- Vznikl asi před 50-100 lety v izolované oblasti Afriky. Pochází ze šimpanzů - SIV (simian immunodeficiency virus) zmutoval a přenesl se na člověka.
- Je to obalený virus přenášející se tělními tekutinami (krví, pohlavním stykem, mateřským mlékem, při porodu). Napadá T4-lymfocyty (pomocné T-lymfocyty), které mají specifický receptor CD4.





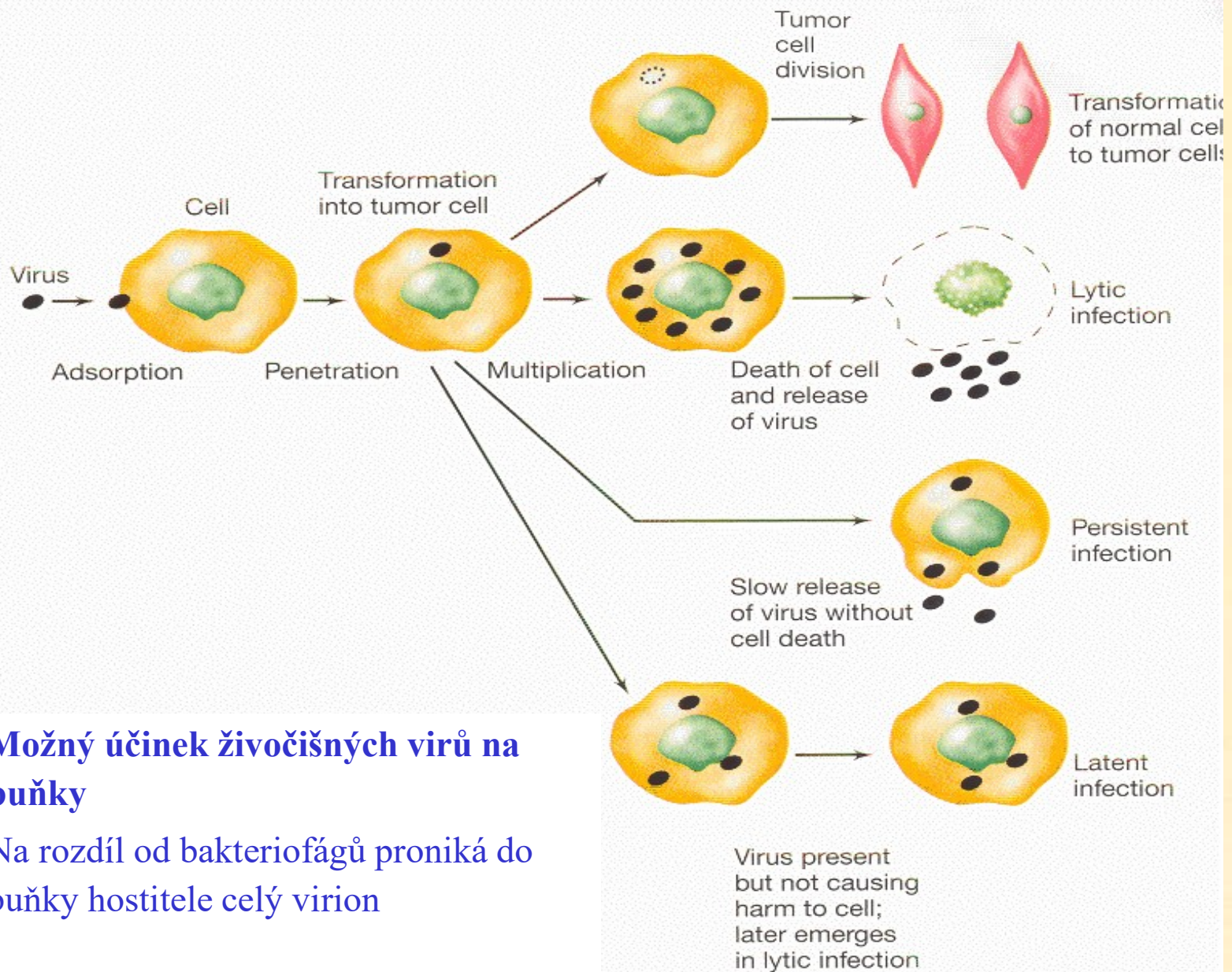


HIV life cycle



Virus HIV

- Množením viru se naruší jejich funkce a postupně ubývají na počtu.
- Virus HIV se vyznačuje **antigenní proměnlivostí**, díky níž uniká imunitnímu systému.
- Do tří týdnů po nakažení se mohou objevit první příznaky - vyrážka, horečka, v 50% případů nic. Virus se pomnoží a vyvolá prudkou reakci bílých krvinek, ty většinu virů zahubí.
- V buňkách po celém těle, ale pár virů zůstane, zpětnou transkripcí nasyntetizují DNA uloží ji do DNA hostitele - provirus. Za 5-10 let se projeví první příznaky AIDS , po 13 letech se vyvine do konečného stadia AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom -syndrom získaného selhání imunity).
- Syndrom AIDS byl poprvé popsán počátkem 80. let minulého století v USA. V ČR dosud na AIDS zemřelo cca 100 lidí, v celém světě bylo nakaženo 40 mil. lidí, nejvíce v Africe a Asii, velký nárůst v Rusku a Ukrajině.



- **Možný účinek živočišných virů na buňky**
- Na rozdíl od bakteriofágů proniká do buňky hostitele celý virion



Kontrolní otázky

1. **Priony**
2. **Obecná charakteristika virů**
3. Teorie vzniku virů
4. Členění virů
5. **Bakteriofág**
6. Kvantifikace bakteriálních virů
7. **Virus chřipky**
8. Lytický a lysogenní cyklus virů
9. **Retroviry**
10. Formy virové infekce