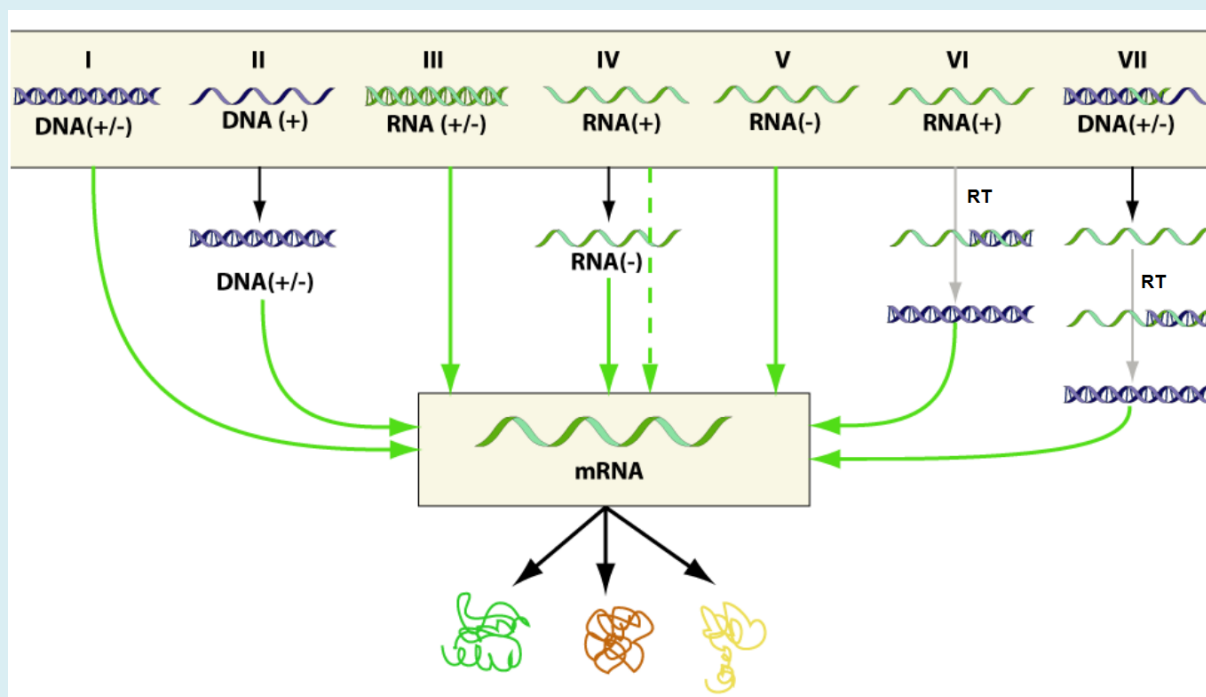


Anna Kostrábová
Silvia Pastoreková
Tatiana Betáková

BIOSYNTÉZA VÍRUSOV

I.diel



2017

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave

Anna Kostrábová

Silvia Pastoreková

Tatiana Betáková

BIOSYNTÉZA VÍRUSOV

I.diel

2017

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Obrázok na obale znázorňuje schému Baltimorovej klasifikácie vírusov. Ilustrácia je prevzatá a upravená so súhlasom SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

© Anna Kostrábová, RNDr., PhD., Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Silvia Pastoreková, prof. RNDr., DrSc., Virologický ústav, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Bratislava

Tatiana Betáková, RNDr., DrSc., 2017, Virologický ústav, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Bratislava; Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Recenzenti: prof. MUDr. Erik Dorko, PhD.
 prof. Ing. Štefan Vilček, DrSc.

Za jazykovú a odbornú stránku tejto publikácie zodpovedajú autorky.

ISBN 978-80-223-4402-9

OBSAH

Úvod	5
1 Základná charakteristika vírusov	6
1.1 Rastová krivka vírusov	6
1.2 Základné kroky infekčného cyklu vírusov	8
1.3 Rôznorodosť vírusových genómov.....	15
1.4 Baltimorova klasifikácia vírusov.....	16
1.4.1 Skupina I – dsDNA vírusy	17
1.4.2 Skupina II – ssDNA vírusy	18
1.4.3 Skupina III – dsRNA vírusy.....	18
1.4.4 Skupina IV – (+)ssRNA vírusy	19
1.4.5 Skupina V – (-)ssRNA vírusy	19
1.4.6 Skupina VI – reverzne transkribujúce (+)ssRNA vírusy	20
1.4.7 Skupina VII – ss/dsDNA vírusy.....	21
2 Polyomavírusy	22
2.1 Štruktúra viriónu.....	23
2.2 Organizácia genómu polyomavírusov	24
2.3 Infekčný cyklus polyomavírusov.....	25
2.4 Expresia génov u polyomavírusov	26
2.4.1 Skorá transkripcia a proteíny kódované skorou oblasťou	26
2.4.2 Neskorá transkripcia a proteíny kódované neskorou oblasťou	28
2.5 Replikácia polyomavírusovej DNA.....	29
2.6 Vplyv polyomavírusovej infekcie na hostiteľa.....	29
3 Papilomavírusy	32
3.1 Štruktúra viriónu.....	33
3.2 Organizácia genómu papilomavírusov	33
3.3 Infekčný cyklus papilomavírusov.....	34
3.4 Expresia génov u papilomavírusov.....	35
3.4.1 Skorá transkripcia papilomavírusov a funkcia skorých proteínov	35
3.4.2 Neskorá transkripcia papilomavírusov a funkcia neskorých proteínov	39
3.5 Replikácia papilomavírusov	40
3.6 Vplyv papilomavírusovej infekcie na hostiteľa.....	41
4 Adenovírusy	43
4.1 Štruktúra viriónu.....	43
4.2 Organizácia genómu adenovírusov	44
4.3 Infekčný cyklus adenovírusov	45
4.4 Expresia génov u adenovírusov	45
4.4.1 Expresia skorých génov a funkcia skorých proteínov adenovírusov	47
4.4.2 Expresia neskorých génov a funkcia neskorých proteínov adenovírusov.....	49
4.5 Replikácia adenovírusov.....	51
4.6 Adenovírusy ako vektory.....	53
5 Herpesvírusy	55
5.1 Štruktúra viriónu.....	56

5.2	Organizácia genómu herpesvírusov	58
5.3	Infekčný cyklus herpetických vírusov	60
5.4	Expresia génov u herpesvírusov	64
5.4.1	Regulácia expresie α -génov	66
5.4.2	Regulácia expresie β -génov	68
5.4.3	Regulácie expresie γ -génov	69
5.5	Replikácia herpesvírusov	70
5.6	Vplyv infekcie ľudskými herpetickými vírusmi na hostiteľa	72
6	Poxvírusy	74
6.1	Štruktúra viriónu	75
6.2	Organizácia genómu poxvírusov	76
6.3	Infekčný cyklus poxvírusov	78
6.4	Expresia génov u poxvírusov	80
6.4.1	Regulácia expresie skorých génov	81
6.4.2	Regulácia expresie intermediálnych génov	82
6.4.3	Regulácie expresie neskorých génov	83
6.5	Replikácia poxvírusov	84
7	Parvovírusy	87
7.1	Štruktúra viriónu	88
7.2	Organizácia genómu parvovírusov	88
7.3	Infekčný cyklus parvovírusov	89
7.4	Expresia génov u parvovírusov	90
7.5	Replikácia parvovírusov	93
7.6	Parvovírusy závislé od „helper“ vírusu	94
7.7	Využitie parvovírusov v terapii ochorení	95
8	Hepadnavírusy	97
8.1	Štruktúra viriónu	97
8.2	Organizácia genómu hepadnavírusov	98
8.3	Infekčný cyklus hepadnavírusov	99
8.4	Expresia génov u hepadnavírusov	101
8.5	Replikácia genómu hepadnavírusov	104
8.6	Vplyv hepadnavírusovej infekcie na hostiteľa	105
9	Retrovírusy	108
9.1	Štruktúra viriónu	109
9.2	Organizácia genómu retrovírusov	110
9.3	Infekčný cyklus retrovírusov	112
9.4	Reverzná transkripcia retrovírusov	114
9.5	Integrácia retrovírusov	117
9.6	Expresia génov u retrovírusov	119
9.6.1	Transkripcia provírusovej DNA	119
9.6.2	Translácia a post-translačná úprava retrovírusových proteínov	121
9.7	Transformácia buniek retrovírusmi	125
	Zoznam použitých skratiek	128
	Použitá literatúra	133
	Zdroje použitých obrázkov	134

ÚVOD

Vírusy, ako ubikvitne rozšírené biologické entity, sú súčasťou nielen nášho života, ale aj existencie všetkých živých bunkových organizmov. Z toho dôvodu je virológia vednou disciplínou, pri štúdiu ktorej je nevyhnutné prepájať poznatky z mnohých iných vedných disciplín – cytológie, genetiky, molekulárnej biológie, biochémie, ekológie, epidemiológie, zoológie či biológie človeka.

Biosyntéza vírusov je jeden zo základných predmetov vyučovaných niekoľko desaťročí v rámci špecializácie virológia na Katedre mikrobiológie a virológie, Prírodovedeckej fakulty UK. V nadväznosti na vedomosti o štruktúre a morfogéneze vírusov je náplň predmetu orientovaná prednostne na biosyntetické deje, ktoré sa odohrávajú po preniknutí vírusu do bunky. Je to komplexná problematika, ktorej dokonalé pochopenie si vyžaduje nahliadnuť aj do procesov prebiehajúcich na úrovni neinfikovanej bunky. Vzhľadom na obrovskú diverzitu vírusov a ich replikačných stratégií, každým rokom narastá množstvo informácií, ktoré rozširujú naše poznanie v tejto vednej disciplíne. Napriek nepretržitému generovaniu nových poznatkov, mnoho procesov je ešte nedokonale preštudovaných, veľa mechanizmov pôsobenia vírusov neznámych a funkcií proteínov zahalených tajomstvom.

Súčasťou tejto vysokoškolskej učebnice je sumarizácia najaktuálnejších poznatkov na poli biosyntézy vírusov, od charakterizácie všetkých typov vírusových genómov, cez analýzu organizácie genómov jednotlivých skupín vírusov, ktorá podmieňuje následné biosyntetické procesy, až po detailný opis transkripcie vírusových génov, osudu ich transkriptov, syntézy proteínov, vrátane ich pôsobenia na dianie v bunke, a v neposlednom rade aj rozmanitých mechanizmov replikácie vírusových genómov. Samostatné kapitoly učebnice systematicky spracúvajú doteraz ozrejmené biosyntetické deje jednotlivých čeľadí vírusov infikujúcich človeka.

Autorky

1 ZÁKLADNÁ CHARAKTERISTIKA VÍRUSOV

S poznatkami, ktoré máme v súčasnosti k dispozícii, môžeme povedať, že vírusy sú vôbec tými najrozmanitejšími biologickými entitami. Dokážu byť fascinujúce nielen z hľadiska rôznorodej štruktúry vírusových častíc, ale aj minimalistickým charakterom informácie nesenej v sekvencii nukleových kyselín, pričom s touto malou genetickou výbavou dokážu robiť divy – ovplyvňovať, riadiť a k svojmu prospechu modifikovať najkomplexnejšie deje na úrovni bunky aj organizmu.

Podstatou diverzity vírusov môže byť aj skutočnosť, že do dnešnej doby nebol objavený ani jeden dôkaz ich monofyletického pôvodu (tj. pôvod z jedného spoločného predka), nakoľko nezdieľajú ani jeden spoločný gén, ktorý by bol prítomný u všetkých zástupcov vírusov. Predsa len, niektoré skupiny vírusov s rôznymi genómami a replikačnými stratégiami zdieľajú malý set charakteristických génov, ktoré kódujú kapsidové proteíny, polymerázy, helikázy, integrázy a iné enzýmy.

Napriek variabilite vírusov na každej možnej úrovni dokážeme identifikovať niekoľko spoločných črt, ktoré platia pre všetkých vírusy:

- sú obligátne vnútrobunkové parazity. Kľúčovým dôvodom tohto spôsobu fungovania je, že syntéza ich vlastných vírusových proteínov je kompletne závislá na translačnom aparáte bunky.

- vírusové genómy sú zbalené v častici, ktorá zabezpečuje ich prenos medzi bunkami či hostiteľmi.

- vírusový genóm kóduje informáciu pre iniciáciu a kompletizáciu infekčného cyklu v permissívnej bunke. Infekčný cyklus pozostáva z viacerých krokov – prichytenia vírusu na bunku, penetrácie do bunky, odhalenia genetickej informácie, translácie vírusových mRNA vďaka bunkovým ribozómom, replikácie vírusového genómu, skladania a maturácie nových viriónov, uvoľnenia častíc obsahujúcich genóm vírusu z bunky.

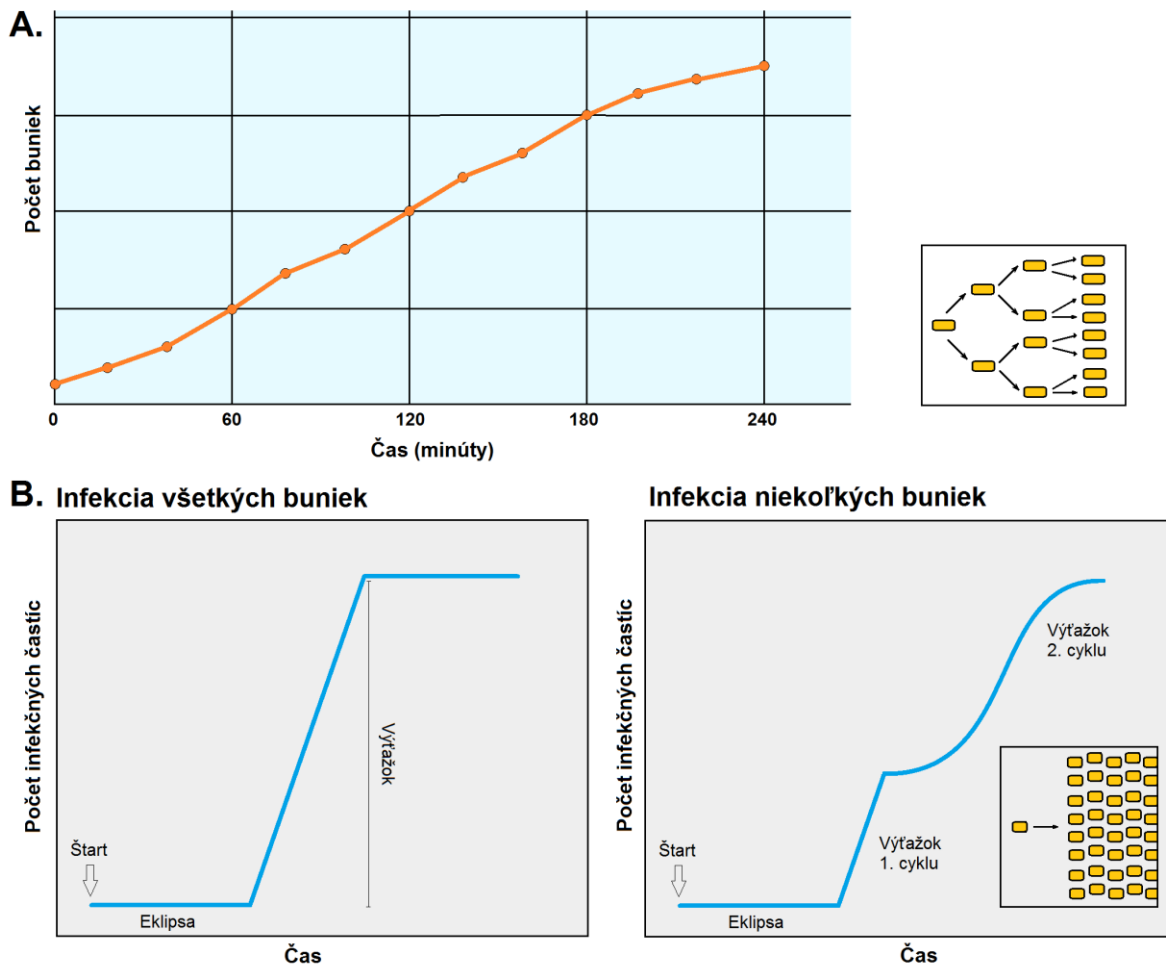
- sú schopné etablovať sa v hostiteľskej populácii, aby zabezpečili svoje prežitie.

- vyznačujú sa nárazovým spôsobom tvorby nového potomstva, ktorý je realizovateľný vďaka tomu, že sa vírusy replikujú skladaním predformovaných komponentov do jednotlivých častíc. Tento mechanizmus sa v anglickej literatúre označuje termínom „build and assemble“ („vytvor a poskladaj“).

1.1 Rastová krivka vírusov

Jedným z najvýznamnejších rozdielov medzi bunkovými organizmami a vírusmi je spôsob, akým vzniká nové potomstvo. Kým bunky znásobujú svoj počet delením (na 2 alebo

4 dcérske bunky), vírusy môžu jedným infekčným cyklom vytvoriť až niekoľko tisíc nových vírusových častíc naraz. Tieto rozdiely sú pozorovateľné aj na ich rastových krivkách (obr. 1.1).



Obr. 1.1 – Rastové krivky buniek a vírusov

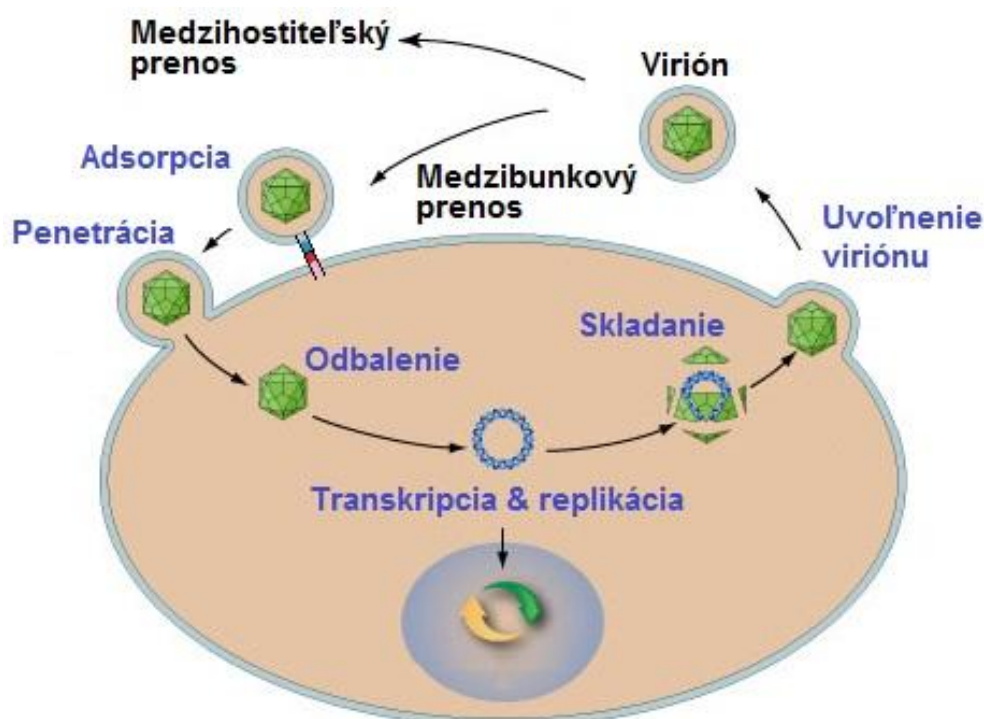
A.- rastová krivka baktérií, ktoré sa delia binárnym delením, B.- rastová krivka vírusu v prípadoch infekcie všetkých buniek (vľavo) alebo len subpopulácie buniek (vpravo)

Stratégia nárazového vzniku nového potomstva je spoločná pre všetky vírusy, avšak rôzne vírusy sa líšia mnohými detailami v rámci svojho infekčného cyklu, a tie je možné identifikovať pomocou zhotovenia a štúdia rastovej krivky pre daný vírus. Z týchto pozorovaní je možné vyvodit' rôzne závery nielen o víruse, ale aj o bunkách, ktoré sú infikované. Vo všeobecnosti, jeden typ permissívnej bunky v rovnakých podmienkach dokáže vyprodukovať v priemere rovnaký počet nových vírusových častíc. Kapacita tvorby nových viriónov daným typom buniek je konečná, ak sa jedná o infekciu lytickým vírusom. V prípade infekcie nelytickými vírusmi dochádza k produkcii nového vírusového potomstva v priebehu dlhšej doby.

1.2 Základné kroky infekčného cyklu vírusov

Infekčný cyklus vírusu, často označovaný aj pojmom replikačný cyklus, pozostáva zo šiestich základných fáz (obr. 1.2):

1. adsorpcia vírusu na bunku
2. penetrácia cez bunkovú membránu
3. odbalenie a uvoľnenie nukleovej kyseliny
4. replikácia genómu
5. skladanie a maturácia nových vírusových častíc
6. uvoľnenie vírusu z bunky



Obr. 1.2 – Schéma infekčného cyklu vírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

V odbornej literatúre sa dá výnimočne stretnúť s rozdelením infekčného cyklu na 5 alebo 7 fáz, v závislosti od toho, či niektoré zo šiestich krokov boli spojené do jedného alebo naopak rozdelené na ďalšie dva kroky. Keďže vírusové častice sú priveľké na to, aby samovoľne difundovali cez plazmatickú membránu bunky, vstup vírusu do bunky je aktívnym procesom. Stret vírusovej častice s vnímavou bunkou indukuje sériu dejov, ktoré vedú k vstupu vírusového genómu do cytoplazmy alebo jadra. Prvým krokom tohto procesu je adsorpcia.

Adsorpcia – vírus sa prichytí na bunku prostredníctvom interakcie svojich špecializovaných štruktúr s bunkovými receptormi. Obalené vírusy sa viažu na bunku svojimi transmembránovými glykoproteínmi, kým neobalené vírusy sa viažu vďaka kapsidovým proteínom (prípadne výbežkami kapsidu). Vírus môže viazať rôzne receptory a zároveň jeden povrchový bunkový proteín môže byť receptorom pre viac druhov vírusov. V tomto štádiu môže byť vírus izolovaný v infekčnej podobe bez lýzy buniek metodikami, ktoré degradujú receptor alebo oslabia jeho interakciu s vírusom. Bunkové receptory môžu byť glykoproteíny, fosfolipidy alebo glykolipidy, ide zvyčajne o makromolekuly so špecifickými fyziologickými funkciami prospešnými pre bunku. Prítomnosť receptora pre určitý vírus je daná druhom organizmu, typom tkaniva alebo bunky a ich fyziologickým stavom. Bunky, ktoré nemajú receptor pre určitý vírus sú pre tento vírus rezistentné, a preto väzba konkrétneho typu bunkového receptora určuje bunkový tropizmus a hostiteľský okruh vírusov.

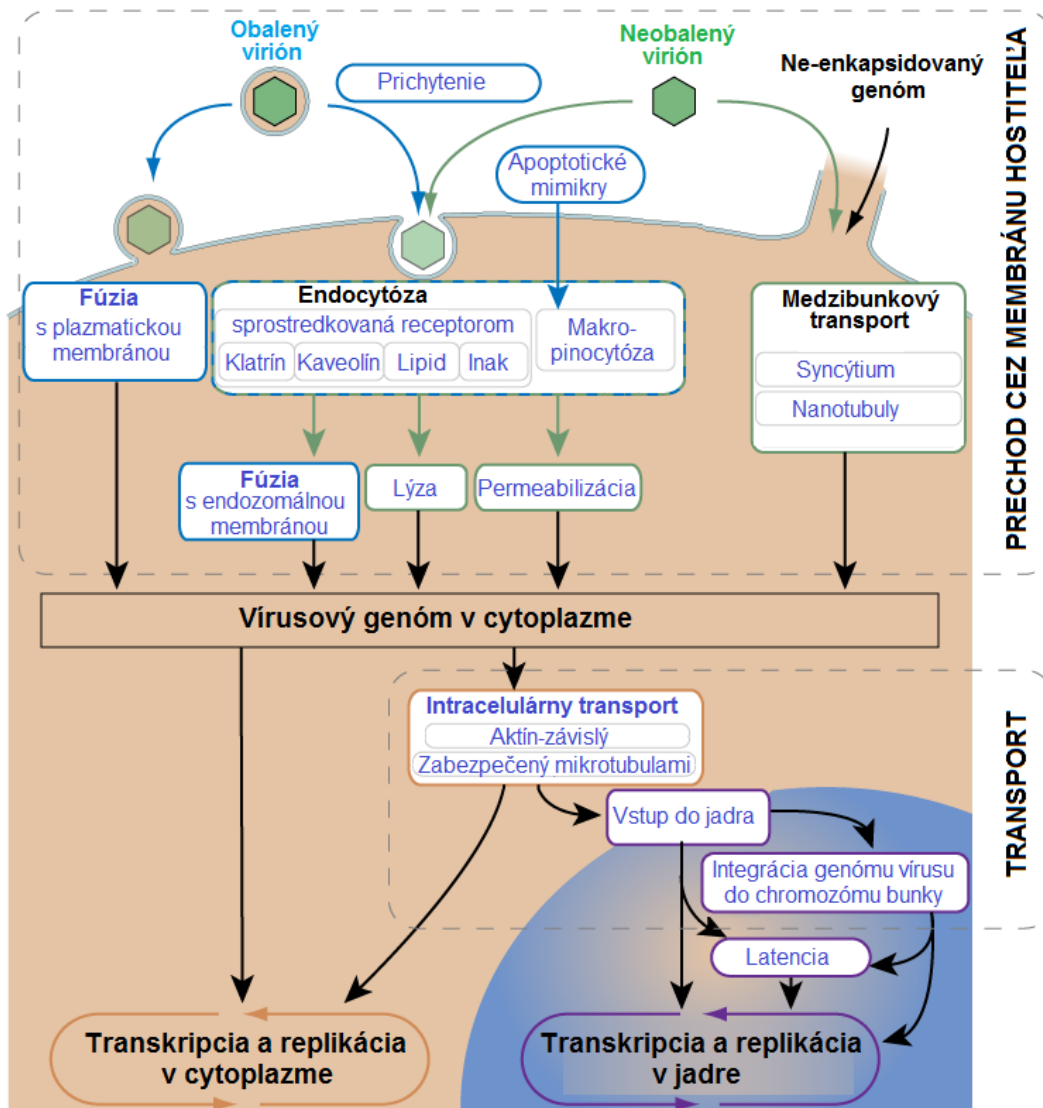
Tab. 1.1 – Niektoré známe a predpokladané receptory, ktoré vírusy využívajú k adsorpcii na bunky

Čeľad'	Vírus	Vírusový receptor	Bunkový receptor (koreceptor)
<i>Polymaviridae</i>	SV40	VP1	GM1 gangliosidy
<i>Adenoviridae</i>	Ad5	Vlákno kapsidu	Integríny α a β
<i>Herpesviridae</i>	HSV-1	gD, gB	Nectín-1, GAG
<i>Herpesviridae</i>	EBV	Gp350	CD21
<i>Parvoviridae</i>	AAV	CAP	HSPG (integrín)
<i>Hepadnaviridae</i>	HBV	Pre-S1	HSPG, NTCP
<i>Retroviridae</i>	HIV-1	Gp120	CD4 (CCR5/CXCR4)
<i>Picornaviridae</i>	Poliovírus	VP1-3	PVR/CD155
<i>Picornaviridae</i>	Rhinovírus	VP1-3	ICAM-1/LDL receptor
<i>Flaviviridae</i>	HCV	E2	CD81, Claudín-1
<i>Coronaviridae</i>	SARS	S glykoproteín	ACE2
<i>Orthomyxoviridae</i>	Vírus chrípky	HA	Kyselina sialová
<i>Rhabdoviridae</i>	Vírus besnoty	G proteín	NCAM-1/CD56
<i>Rhabdoviridae</i>	VSV	G proteín	Fosfatidyl serín
<i>Reoviridae</i>	Reovírus	s1	JAM-A

Penetrácia – nastupuje hneď po adsorpcii a po nej už vírus nemôže byť získaný z intaktnej bunky. Niektoré obalené vírusy dokážu indukovať priamo na povrchu bunky fúziu svojho obalu s plazmatickou membránou pri neutrálnom pH (napr. herpesvírusy, poxvírusy, paramyxovírusy).

Najčastejším mechanizmom penetrácie obalených aj neobalených vírusov je receptorom-sprostredkovaná endocytóza, t.j. proces ktorým do bunky vstupujú mnohé hormony, toxíny a iné molekuly. Pri endocytóze alebo makropinocytóze (poxvírusy, filovírusy) sa vírus dostáva do cytoplazmy v endocytickej vezikule, ktorá môže byť obalená klatrínom,

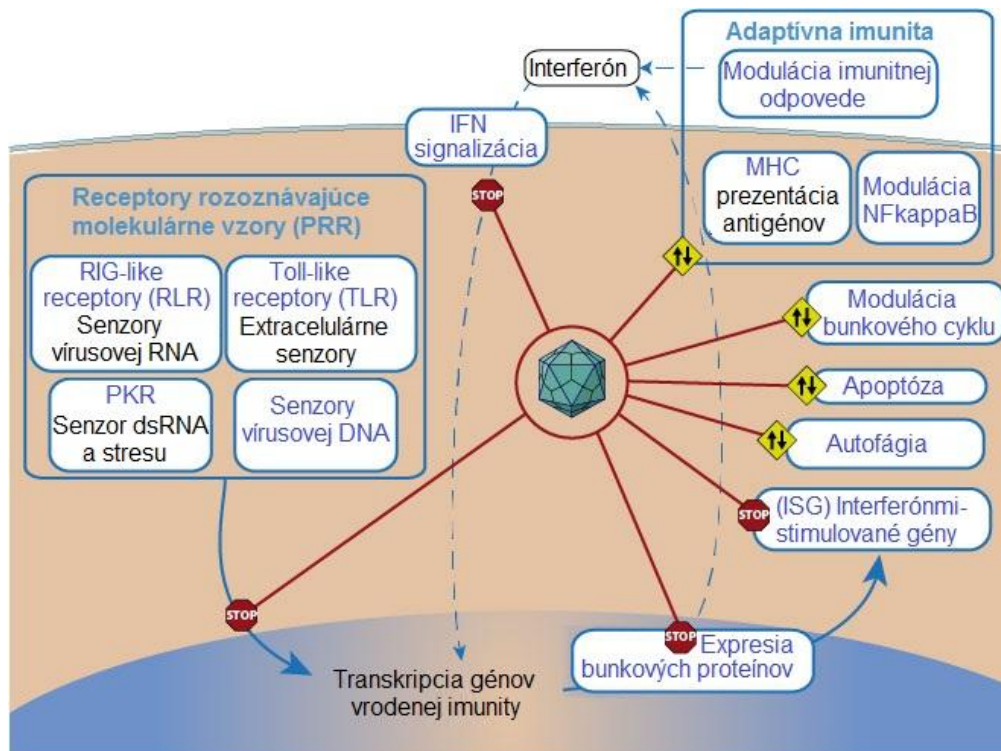
kaveolínom alebo ani jedným z nich. Z endocytickej vezikuly sa vírus uvoľňuje buď fúziou s endozomálnou membránou (flavivírusy, koronavírusy, ortomyxovírusy), lýzou (adenovírusy) alebo permeabilizáciou (parvovírusy, reovírusy). Fúzia, či už na úrovni plazmatickej alebo endozomálnej membrány, je riadená špecializovaným vírusovým fúznym peptidom, ktorého aktivita je u jednotlivých vírusov spúšťaná rôznym spôsobom. Alternatívnym spôsobom preniknutia vírusov do bunky je transport z bunky do bunky, buď nanotubulami alebo tvorbou syncytií (obr. 1.3).



Obr. 1.3 – Mechanizmy vstupu vírusov do bunky
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Odbalenie a uvoľnenie genómu – nasleduje po preniknutí vírusovej alebo subvírusovej častice do bunky. V prípade endocytickej cesty vstupu, kľúčovým krokom vo vyzliekaní viriónu je acidifikácia vnútorného obsahu endozómu na pH zhruba 5, v dôsledku aktivity protónovej pumpy prítomnej v membráne endozómu. Nízke pH spôsobuje prestavbu

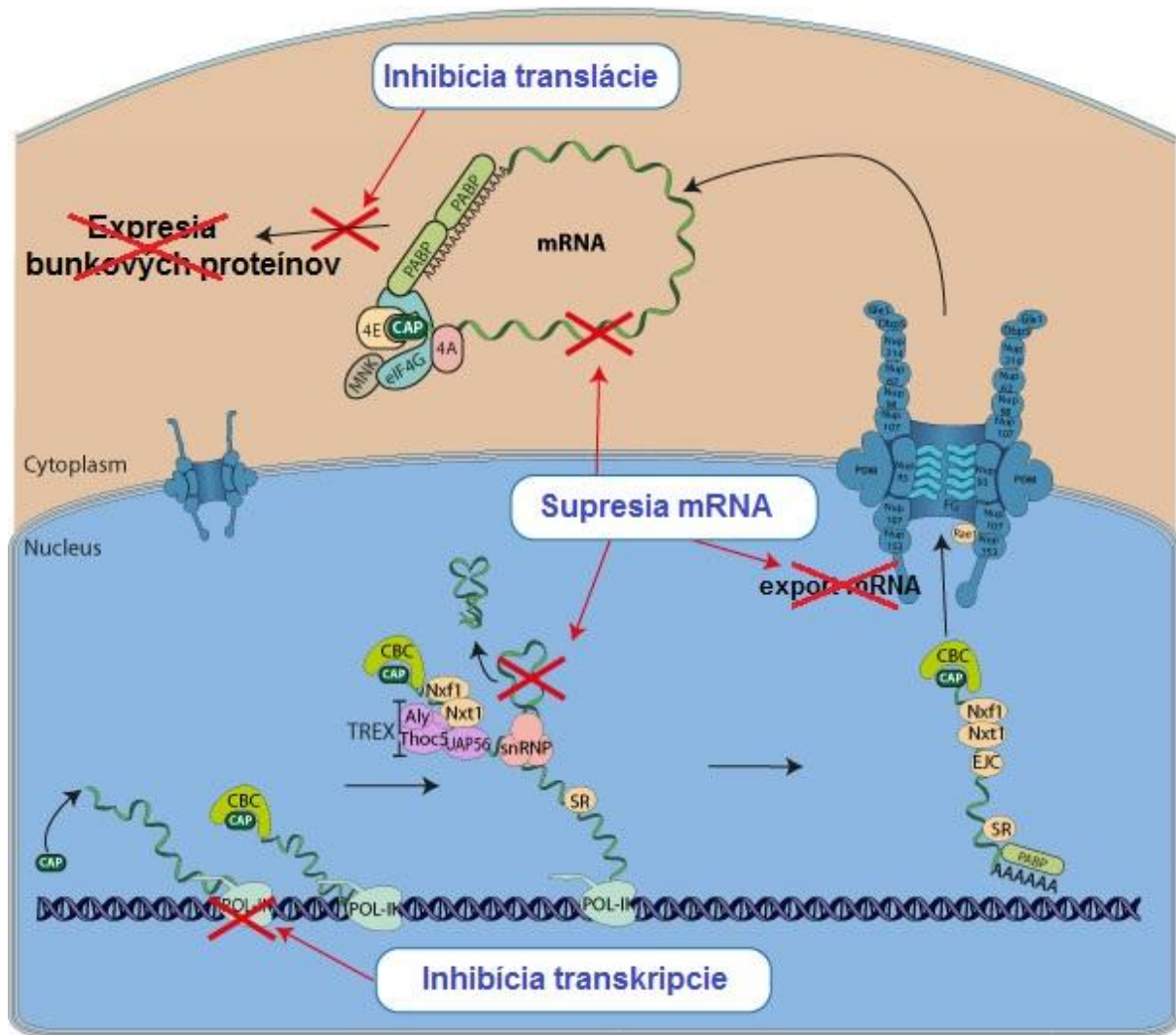
obalových komponentov, ktorou sa odhalia skryté hydrofóbne miesta. Tieto sa viažu na lipidickú dvojvrstvu membrány a umožnia vylúčenie obsahu viriónu do cytoplazmy. Jednotlivé časti vírusu sú závislé od cytoskeletu pri transporte vnútri bunky, ktorý vírusy využívajú na dopravenie svojho genómu k miestu replikácie a transkripcie. Vírusy, ktoré sa replikujú v jadre, musia byť dopravené do jadra – môžu prechádzať cez jadrový pór alebo si počkajú na delenie bunky, počas ktorého dochádza k dezintegrácii jadrovej membrány.



Obr. 1.4 – Zasahovanie vírusu a jeho produktov do bunkových procesov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Replikácia vírusového genómu – v závislosti od typu vírusu môže prebiehať v jadre alebo v cytoplazme, čo je dané nielen typom nukleovej kyseliny vírusu, ale aj špecifickými požiadavkami pri transkripcii génov, či komplexnosťou ich enzymatickej výbavy. Variabilita vírusových genómov je jedným z hlavných dôvodov existencie rôznych replikačných stratégií, ktoré budú detailnejšie opísané v ďalších kapitolách. Replikácia genetickej informácie je predchádzaná alebo sprevádzaná expresiou vírusových génov, ktoré ovplyvňujú rôzne bunkové procesy (obr. 1.4).

Najčastejším dejom v bunke je syntéza proteínov, nakoľko všetky vírusy sú závislé na bunkovom proteosyntetickom aparáte. Väčšina vírusov kóduje produkty, ktoré vypínajú syntézu bunkových proteínov a podporujú produkciu tých vírusových. Mechanizmus inhibície expresie bunkových génov sa môže líšiť aj v rámci tej istej vírusovej čeľade.



Obr. 1.5 – Inhibícia expresie proteínov na rôznych úrovniach
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

K narušeniu syntézy vírusových proteínov môže dôjsť na 3 úrovniach (obr. 1.5):

- inhibíciou transkripcie – ktorú vírusy dosiahnu narušením iniciácie bunkovej transkripcie alebo ovplyvnením funkcie RNA polymerázy II
- supresiou bunkových mRNA – ktorá môže nastať následkom blokovania zostrihu a úpravy pre-mRNA na mRNA, inhibíciou exportu mRNA z jadra do cytoplazmy alebo vírusom-sprostredkovanou degradáciou bunkových mRNA
- inhibíciou translácie – štiepením, degradáciou rôznych translačných faktorov. Napríklad poliovírus pomocou vírusovej proteázy štiepi 200 kDa proteín interagujúci s mRNA čiapočkou, ktorá je potrebná na iniciáciu translácie bunkových mRNA.

Menej virulentné vírusy, napríklad polyomavírusy, môžu naopak stimulovať syntézu hostiteľskej DNA, mRNA a proteínov. Tento fenomén je dôležitý pre vírusovú karcinogézu.

Skladanie, maturácia a uvoľňovanie nových vírusových častíc – prebieha odlišne u obalených a neobalených vírusov (obr. 1.6). Skladanie kapsidov väčšiny DNA vírusov replikujúcich sa v jadre nastáva tiež v jadre, vďaka čomu je možné novosyntetizovanú vírusovú DNA promptne zakomponovať do skladajúceho sa kapsidu. Ortomyxovírusy, hepadnavírusy, poxvírusy a RNA vírusy skladajú svoje častice v cytoplazme.

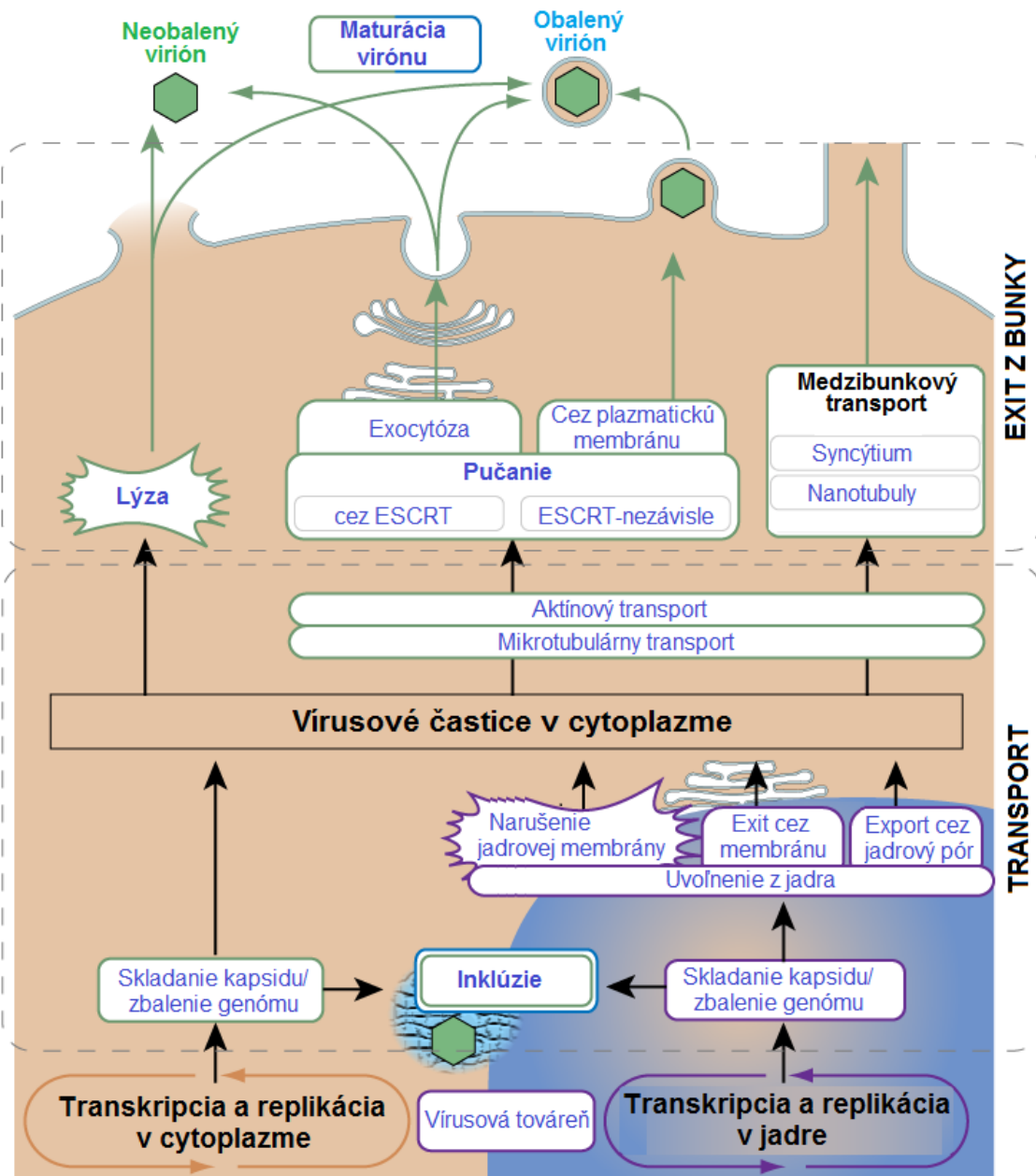
Neobalené vírusy využívajú predformované kapsoméry, ktoré sa spájajú a vytvoria prázdne kapsidy (prokapsidy) – prekuzory viriónov. Skladanie prokapsidov je často sprevádzané extenzívnou reorganizáciou štruktúr v mieste ich formovania. Neobalené ikozaedrálné vírusy sa uvoľňujú z bunky rôznymi spôsobmi – pri lýze bunky alebo exocytózou. DNA vírusy, ktorých častice sa skladajú aj dozrievajú v jadre, sa akumulujú v infikovanej bunke dlhšiu dobu a uvoľňujú sa pri jej lýze.

Obalené vírusy najprv formujú nukleokapsid, ktorý je následne obalený membránou. Pri tvorbe nukleokapsidu sú jeho proteínové súčasti syntetizované na cytoplazmatických ribozómoch a rýchlo poskladané na kapsidové komponenty. Pri tvorbe obalu, vírus-špecifické obalové proteíny najprv putujú k príslušnému membránovému kompartmentu (plazmatickej membráne, endoplazmatickému retikulu alebo Golgiho aparátu), kde vytesnia hostiteľské proteíny. Cukrové a lipidické zložky obalu sú produkované hostiteľskou bunkou. Vírusový obal má zloženie lipidov tej oblasti membrány, kde prebieha obalovanie – napr. bunková membrána pre ortomyxo- a paramyxovírusy, jadrová a vnútrobunkové membrány pre herpesvírusy. Daný vírus môže mať odlišné zloženie lipidov a karbohydrátov, ak sa množí v rozdielnom type buniek, čoho následkom môžu byť rôzne fyzikálne a biologické vlastnosti. Obalové glykoproteíny sa syntetizujú tak, že polypeptidový reťazec sa najprv translatuje na ribozómoch endoplazmatického retikula a prechádza do jeho lúmenu, pričom transmembránovou časťou ostáva ukotvený v membráne. V lúmene endoplazmatického retikula začína jeho post-tranlačná úprava. Potom sa prostredníctvom transportných vezikúl dostáva do Golgiho aparátu, kde je dokončená jeho glykozylácia a acylácia masnými kyselinami. Matrixové proteíny zvyčajne nie sú glykozylované a pripájajú sa na cytoplazmatickú stranu plazmatickej membrány prostredníctvom hydrofóbnej domény. Tieto matrixové proteíny pripájajú cytoplazmatickú doménu obalových glykoproteínov na bunkový cytoskelet a zabezpečujú akumuláciu glykoproteínov pri tvorbe viriónov. Selekcia vírusových glykoproteínov je účinná, ale nie exkluzívna, napríklad rabdovírusy obsahujú 10-15 % nevirusových glykoproteínov vo svojom obale. Obal viriónu jedného vírusu môže tiež obsahovať glykoproteíny kódované druhým vírusom, ktorý infikuje tú istú bunku. Obaly sa tvoria okolo nukleokapsidov pučiacich cez membránu.

U ortomyxovírusov a paramyxovírusov, vírusové glykoproteíny inkorporované do povrchovej membrány bunky prepožičiavajú bunke niektoré vlastnosti viriónu. Bunky infikované týmito vírusmi môžu viazať erytrocyty (hemaglutinácia) a paramyxovírusmi-infikované bunky môžu fúzať s neinfikovanými bunkami a tvoriť mnohojadrové syncýtiá. Táto fúzia je

ekvivalentná fúzií vírusových obalov s plazmatickou membránou pri penetrácii do bunky na začiatku infekcie.

Komplexné vírusy, napríklad poxvírusy, sú predtavitel'mi vysoko organizovaných vírusových častíc. Ich maturácia sa odohráva v cytoplazmatických kompartmentoch nazývaných vírusové fabriky/továrne („factories“). Na rozdiel od jednoduchších vírusov, poxvírusová membrána obsahuje lipidy, ktorých zloženie sa líši od bunkových lipidov. Na základe toho sa predpokladá, že poxvírusy kódujú lipid-modifikujúce enzýmy.



Obr. 1.6 – Mechanizmy skladania, maturácie a uvoľňovania vírusov z bunky
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

1.3 Rôznorodosť vírusových genómov

Diverzitu vírusov v celej svojej šírke môžeme rozpoznať, keď ich porovnáme s bunkami. Prokaryotické aj eukaryotické organizmy majú genetickú informáciu uloženú v podobe dvojvláknovej DNA (dsDNA). Tá môže byť lineárna, cirkulárna a v prípade zložitejších organizmov usporiadaná do chromozómov. Ich dsDNA sa síce replikuje rôznymi setmi enzýmov a za pomoci rôznych replikačných faktorov, ale výsledkom je opäť dsDNA. Tok genetickej informácie ide smerom od dsDNA cez mRNA, až sa premietne do poradia aminokyselín v polypeptidovom reťazci.

Narozdiel od bunkových organizmov, vírusy objavili akoby celú novú dimenziu možností uloženia genetickej informácie a spôsobov replikácie. Ich genómy môžu mať rôzne formy a tvary – dsDNA, jednovláknová DNA (ssDNA), dvojvláknová RNA (dsRNA), jednovláknová RNA (ssRNA), ktorá môže byť kladnej, negatívnej či ambisense polarity, a pritom môžu byť lineárne, cirkulárne, segmentované, prerušované (čiastočne dvojvláknové a sčasti jednovláknové), navyše monopartitné alebo multipartitné. Čo sa týka typu, organizácie genómu a zákonite aj replikačných stratégií, vírusy toho aplikovali omnoho viac ako bunkový svet. A pritom v súčasnosti poznáme len zlomok predpokladaného množstva vírusových druhov.

Medzi jedno z najzákladnejších rozdelení vírusov podľa genómu patrí rozlíšenie na DNA a RNA vírusy. Medzi vírusmi infikujúcimi stavovce prevažujú RNA vírusy nad DNA vírusmi v pomere 2:1.

DNA vírusy – ich výhodou je, že počas replikácie svojho genómu môžu použiť bunkovú DNA polymerázu. Túto možnosť využívajú prevažne malé DNA vírusy (s genómom menším ako 10 kb), väčšie DNA vírusy kódujú vlastnú DNA polymerázu. Nezávisle od toho, replikácia väčšiny skupín DNA vírusov prebieha v jadre hostiteľskej bunky. Z toho vyplýva, že transkripcia a translácia nie sú u DNA vírusov spriahnuté (okrem poxvírusov), transkripcia prebieha v jadre pomocou bunkovej RNA polymerázy II a translácia v cytoplazme. V niektorých prípadoch až 30% transkribovanej RNA zostáva netranslatovaná v jadre. Prevažná časť vírusových mRNA je monocistronických, podobne ako bunkových. Transkripcia je časovo organizovaná, pričom u väčšiny DNA vírusov je iba malá časť genómu transkribovaná na skoré mRNA. Syntéza skorých proteínov je kľúčovým úvodným krokom pre vírusovú DNA replikáciu, po nej je zvyšná časť genómu transkribovaná na neskoré mRNA. Genóm DNA vírusov je chemicky aj štruktúrne stabilnejší, čo umožňuje existenciu veľkých vírusových genómov (až 2500 kbp), navyše nepodlieha takým častým mutáciám ako RNA.

RNA vírusy – uchovávanie genetickej informácie v podobe RNA je unikátnym pre vírusy. Všetky RNA vírusy (až na tie, ktoré nesú reverznú transkriptázu) musia kódovať enzým zabezpečujúci syntézu RNA na templáte RNA, lebo takýto mechanizmus syntézy v bunkách

neprebieha. Enzýmom zabezpečujúcim zmienený proces je RNA-dependentná RNA polymeráza (RdRp). Väčšina RNA vírusov preto nemusí riešiť transport do jadra a môžu sa replikovať v cytoplazme. Vďaka tomu sú ich transkripcia a translácia spriahnutými procesmi, a môžu prebiehať v okamžitej časovej následnosti. RNA je menej stabilná ako DNA, navyše RdRp nemá schopnosť opraviť svoje chyby (tzv. „proofreading“ aktivita) a to vedie k vyššej frekvencii mutácií. Tieto vlastnosti RNA limitujú veľkosť RNA genómov na maximálne 30 kb. Na druhej strane táto premenlivosť im poskytuje schopnosť rýchlejšie sa prispôbovať novým podmienkam (napr. hostiteľom, protilátkam, liekom, vakcinácii). Samotná vyššia prevalencia RNA vírusov oproti DNA vírusom v prírode svedčí o tom, že sú evolučne veľmi úspešné.

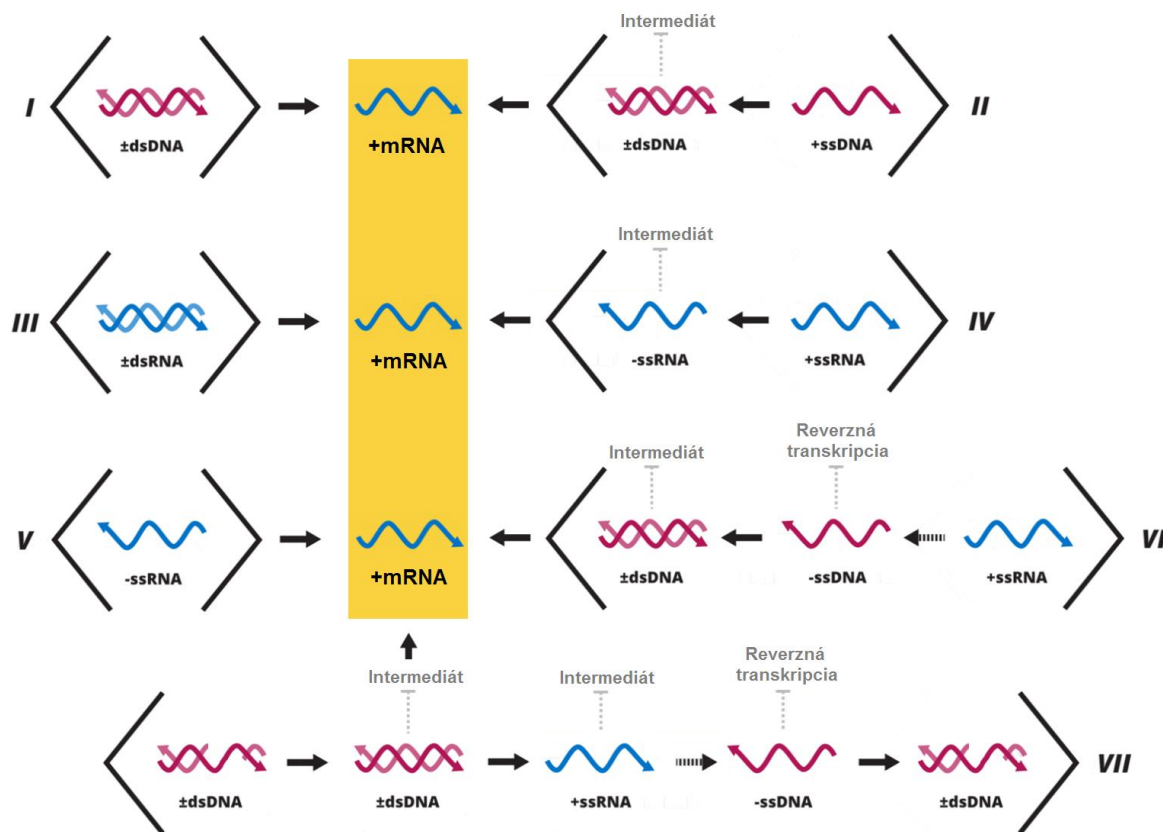
Tab. 1.2 – Všeobecné zaujímavosti o DNA a RNA vírusoch

DNA vírusy	
➤ druhovo špecifickejšie	➤ všetky vírusy infikujúce termofilných hostiteľov majú dsDNA genóm
➤ cirkulárna forma genómu je bežná	➤ mnohé majú onkogénne vlastnosti
➤ ssDNA vírusy zvyknú mať veľmi malé rozmery	➤ DNA vírusy s veľkým genómom (400 – 2500 kbp) boli doteraz objavené len ako parazity jednobunkových rias a protozoa
➤ nie je známy žiaden rastlinný vírus s dsDNA genómom (bez RT)	
RNA vírusy	
➤ menej druhovo špecifické a vedia prelomiť druhovú bariéru	➤ genóm väčšiny vírusov infikujúcich rastliny je ssRNA pozitívnej polarity
➤ cirkulárna forma genómu je vzácna	➤ vírusy infikujúce huby majú dsRNA genóm

1.4 Baltimorova klasifikácia vírusov

Ako bolo spomínané, vírusy sú obligátne vnútrobunkové parazity, a napriek rôznej závislosti od bunkovej výbavy sú všetky kompletne závislé na translačnom aparáte bunky. A keďže tok genetickej informácie v smere od genómu cez mRNA k proteínom platí aj pre vírusy, museli tomu prispôbiť svoj parazitický spôsob existencie. Preto aby mohli využiť proteosyntetický aparát hostiteľa, musia vírusy prepísať svoju genetickú informáciu (v hociakej forme sa nachádza) do mRNA, aby táto mohla byť translatovaná na bunkových ribozómoch a vznikli vírusové proteíny. Na základe uvedenej centrálnej úlohy mRNA molekúl v programovanej syntéze vírusových proteínov zostavil David Baltimore schému,

zohľadňujúcu charakter genómov a stratégie generovania mRNA u všetkých známych vírusov, ktorá dostala názov Baltimorova klasifikácia. Na jej základe rozoznávame 7 hlavných typov vírusových genómov (obr. 1.7).



Obr. 1.7 – Schéma Baltimorovej klasifikácie vírusov podľa typu genómu
Prevzaté a upravené z webu 1.

1.4.1 Skupina I – dsDNA vírusy

Momentálne sem patrí 34 čeľadí vírusov, avšak len niekoľko ich infikuje človeka – adenovírusy, herpesvírusy, papilomavírusy, polyomavírusy a poxvírusy. Ich genómy môžu byť lineárne alebo cirkulárne. Replikácia ich genómu a syntéza mRNA sú katalyzované bunkovou alebo hostiteľskou DNA-závislou DNA polymerázou a DNA-závislou RNA polymerázou. V ich infekčnom cykle sa nachádzajú 2 a viac fáz expresií génov (expresia skorých a neskorých, prípadne intermediálnych génov), ktoré sú často rozdelené samotnou replikáciou dsDNA. Vírusy s dsDNA zvyknú kódovať vlastné proteíny, ktoré môžu spôsobovať transformáciu bunky.

Polyomavírusy a papilomavírusy – ich genóm je cirkulárny. Replikácia prebieha symetricky a obojsmerne, za vzniku cyklických intermediátov.

Adenovírusy – vyznačujú sa asymetrickou alebo asynchrónnou replikáciou, ktorá začína na

3'-konci jedného z templátových vlákien s pomocou proteínového primera. Narastajúce vlákno vytesňuje pôvodné vlákno rovnakej polarita a vytvára kompletnú dvojvláknovú molekulu. Vytesnené vlákno sa replikuje podobným spôsobom, čomu predchádza vytvorenie „panvicovitej“ štruktúry spárovaním obrátených terminálnych repetícií.

Herpesvírusy – majú lineárny genóm s terminálnymi repetíciami. V jadre bunky sa terminálne sekvencie genómu čiastočne naštiepia exonukleázou a potom spárovaním vytvoria kruh - epizóm. Replikácia sa uskutočňuje tvorbou théta štruktúry a následne mechanizmom rotujúcej kružnice, pričom sa vytvárajú konkateméry. Počas maturácie sú tieto konkateméry štiepené na molekuly jednotkovej dĺžky.

Poxvírusy – zvláštnou črtou ich genómu je, že ju tvoria dve komplementárne vlákna kovalentne spojené na koncoch. Replikácia začína v mieste naštiepenia jedného z vlákien a nové vlákno sa dosyntetizuje, pričom vytesní existujúce vlákno. Vznikajú replikačné intermediáty, špeciálne konkateméry, ktoré obsahujú páry genómov spojené na koncoch.

1.4.2 Skupina II – ssDNA vírusy

Patrí sem 11 čeľadí vírusov, avšak len zástupcovia parvovírusov sú významnejšími patogénmi ľudí. Jednovláknová DNA musí byť najprv doplnená na dsDNA, lebo len táto forma môže slúžiť ako templát pri transkripcii na mRNA. To znamená, že tvorbe mRNA musí predchádzať istý level syntézy DNA. Genómy tejto skupiny vírusov sú replikované pomocou bunkovej DNA polymerázy.

Parvovírusy – ich replikácia sa začína na terminálnych repetíciách, ktoré tvoria vlásenkové štruktúry. Najprv vzniká dvojvláknová molekula, ktorá slúži jednak pre transkripciu a zároveň aj replikáciu mechanizmom podobným poxvírusom.

1.4.3 Skupina III – dsRNA vírusy

Zahŕňa 12 čeľadí vírusov, z ktorých len jediná zoskupuje vírusy infikujúce človeka – reovírusy. Napriek tomu, že dsRNA pozostáva z vlákna pozitívnej aj negatívnej RNA, ani jedno nemôže slúžiť ako mRNA. Negatívne vlákno je preto potrebné najprv prekopírovať enzýmom RdRp na mRNA.

Reovírusy - obsahujú neprekrývajúce sa segmenty dvojvláknovej RNA. Každý z nich je transkribovaný vírusovou RdRp transkriptázou na nezávislú mRNA. Väčšina transkriptov je monocistronická, ale jeden je bicistronický a exprimuje druhý proteín iniciáciou v internom AUG mieste v inom čítacom rámci. Každý segment reovírusovej RNA je replikovaný nezávisle. Vírusová transkriptáza najprv vytvorí jedno vlákno plus polarita, ktoré potom slúži ako templát pre syntézu druhého vlákna mínus polarita. Obe vlákna sú asociované a stanú sa súčasťou viriónu. Táto replikácia je asymetrická a konzervatívna, pretože negatívne vlákno

vírusovej RNA slúži ako prvotný templát a rodičovská RNA sa nedostane do dcérskeho viriónu.

1.4.4 Skupina IV – (+)ssRNA vírusy

Vírusy nesú jednovláknovú RNA pozitívnej polarity, čo znamená, že ich genómová RNA má aj funkciu mRNA a teda môže hneď slúžiť na transláciu proteínov. Vďaka tejto vlastnosti je purifikovaná genómová RNA vírusov IV skupiny infekčná. Ide o vôbec najpočetnejšiu skupinu vírusov na planéte. Patrí sem 35 čeľadí, spomedzi ktorých najvýznamnejšie patogény ľudí sú zaradené ku koronavírusom, flavivírusom, pikornavírusom a togavírusom. Ich genóm je replikovaný v dvoch krokoch – genóm je prepísaný na celodĺžkovú RNA negatívnej polarite, ktorá je v nasledujúcom kroku prekopírovaná na vlákno pozitívnej polarite. V priebehu replikácie zvyknú vznikať dvojvláknové RNA intermediáty.

Pikornavírusy a flavivírusy - genóm pozitívnej polarite sám funguje ako mRNA a obsahuje informáciu na syntézu štruktúrnych aj neštruktúrnych proteínov. Tieto vírusy netvoria subgenómové RNA, čo im neumožňuje kontrolu expresie z hľadiska množstva produkovaných proteínov. Na rovnakej molekule, ktorá bola potrebná pre expresiu proteínov, sa iniciuje aj syntéza novej genómovej (+)ssRNA.

Koronavírusy a togavírusy – RNA vírusy s genómom pozitívnej polarite tvoriace subgenómové RNA počas infekčného cyklu. To umožňuje určitú kontrolu nad replikáciou aj tvorbou štruktúrnych jednotiek viriónu. Subgenómové mRNA nie sú rozoznávané vírusovou RNA polymerázou a sú využívané výlučne len na syntézu vírusových proteínov. Alternatívnym spôsobom je syntéza série skrátených mRNA, čím sa dá kontrolovať, ktorá časť genómu má byť exprimovaná.

U togavírusov je 49S genómová RNA najprv translatovaná na polyproteín, ktorý je štiepený na neštruktúrne proteíny. Subgenómová 26S mRNA, ktorá je transkribovaná z negatívneho RNA vlákna komplementárneho ku genómu, je translatovaná na menší polyproteín, ktorý je štiepený na štruktúrne proteíny.

Koronavírusy najprv vytvoria úplný transkript negatívnej polarite, z ktorého potom produkujú set subgenomických monocistronických mRNA rôznej dĺžky. Každý transkript začína identickou „leader“ sekvenciou na 5'-konci, ktorá je pripojená k transkriptom na začiatkoch rôznych génov, transkripcia potom pokračuje až k 3' koncu genómu.

1.4.5 Skupina V – (-)ssRNA vírusy

V súčasnosti sa týmto typom genómu vyznačujú zástupcovia 20 čeľadí vírusov, z hľadiska humánnej medicíny sú významné najmä filovírusy, rabdovírusy, paramyxovírusy,

ortomyxovírusy, arenavírusy a bunyavírusy. Narozdiel od predchádzajúcej skupiny, ich genóm negatívnej polarita nemôže byť okamžite translatovaný a musí byť najprv prepísaný na mRNA. Keďže v bunke nie je prítomná RdRp, musia si tento enzým vírusy do bunky priniesť so sebou, inkorporovaný vo svojom virióne. Ich genóm je templátom pri syntéze celodĺžkovej RNA pozitívnej polarita, z ktorej sa syntetizujú nové genómové (-)ssRNA.

Súčasťou V skupiny sú 3 triedy vírusov – s nesegmentovaným, segmentovaným, ale aj ambisense genómom.

Rhabdovírusy, filovírusy a paramyxovírusy – ich vírusová RNA-závislá RNA transkriptáza prítomná vo virióne najprv prepisuje nesegmentovaný genóm na jednotlivé monocistronické mRNA. Prepis je iniciovaný na jedinom promotore. Transkriptáza sa vždy zastaví a reštartuje v každej intergénovej oblasti. Keďže opätovná preiniciácia transkripcie nie je stopercentná, uloženie génov za sebou v genóme určuje množstvo tvorby jednotlivých génových produktov.

Ortomyxovírusy, niektoré bunyavírusy – genóm negatívnej polarita je rozdelený do viacerých neprekrývajúcich sa segmentov jednoláčkovej RNA. Vírusová transkriptáza prítomná vo virióne individuálne prepisuje každý segment na mRNA. Väčšina genómových segmentov ortomyxovírusov obsahuje iba jeden gén, ale niektoré segmenty obsahujú dva prekrývajúce sa gény – jeden je exprimovaný z mRNA plnej dĺžky, druhý je exprimovaný z kratšej mRNA tvorenej zstrihom. Replikácia ortomyxovírusov sa líši od iných RNA vírusov tým, že sa odohráva v jadre. Jadro je potrebné ako zdroj čiapečiek mRNA, ktoré získava endonukleázovým štiepením čerstvých bunkových transkriptov.

Arenavírusy a niektoré bunyavírusy – majú segmentovaný genóm dvojakej polarita (tzv. ambisense). Jedna jeho časť negatívnej polarita je transkribovaná na mRNA vírusovou transkriptázou. Druhá časť pozitívnej polarita je transkribovaná v dvoch stupňoch – najprv sa vytvorí transkript komplementárny k celému genómu a potom je z negatívnej oblasti tohto transkriptu syntetizovaná mRNA.

1.4.6 Skupina VI – reverzne transkribujúce (+)ssRNA vírusy

Narozdiel od ostatných RNA vírusov, vírusy tejto skupiny nemusia kódovať RdRp. Problém so zabezpečením tvorby mRNA riešia úplne iným spôsobom – prepisom svojej RNA na dsDNA, tzv. reverznou transkripciou. Tento proces je sprostredkovaný unikátnym enzýmom, vírusovou RNA-dependentnou DNA polymerázou (reverznou transkriptázou, RT). Vzniknutá dsDNA je templátom pri syntéze mRNA aj genómovej RNA pomocou bunkových enzýmov.

Retrovírusy – ich genóm tvoria dve homologické molekuly jednoláčkovej RNA pozitívnej polarita s poly(A) chvostom na 3' konci a čiapečkou na 5' konci. RNA je prekonvertovaná na dvojvláknovú DNA vírusovým enzýmom reverzná transkriptáza, ktorá pri prepise využíva oba templáty (RNA aj DNA). DNA je potom integrovaná do genómu bunky vo forme

provírusu. Transkripcia provírusu bunkovými enzýmami produkuje dcérske genómy a subgenómové mRNA, ktoré sú translatované na vírusové proteíny. Maturácia proteínov vyžaduje ich štiepenie vírusovou proteázou.

1.4.7 Skupina VII – ss/dsDNA vírusy

Tieto vírusy majú cirkulárnu, čiastočne dvojláknú a čiastočne jednovláknú DNA. Kompletné je negatívne vlákno a nekompletné pozitívne vlákno. Po vstupe do jadra musia byť medzery doplnené (na kompletnú dsDNA), aby mohlo následne dôjsť k syntéze mRNA. Unikátnosť tohto typu genómu spočíva v tom, že ss/dsDNA vzniká reverznou transkripciou RNA templátu, podobným mechanizmom ako u retrovírusov. Jedinou čeľadou ss/dsDNA vírusov infikujúcich ľudí sú hepadnavírusy.

Desaťročia trvajúce štúdium štruktúry, patogenézy, molekulovej biológie, ale najmä moderné techniky, akou je sekvenovanie, umožnili detailnejšiu kategorizáciu a rozdelenie vírusov do ucelených menších taxonomických jednotiek – čeľadí. V rámci nich ich zástupcovia zdieľajú jednotnú organizáciu genómu, spoločné gény a ich poradie v genóme, ale aj replikačnú stratégiu a expresiu génov. Týmto čeľadím sa v nasledujúcich kapitolách budeme venovať jednotlivo. Vzhľadom na rozsiahlosť témy sa zameriame len na čeľade, v ktorých sú zaradené vírusy spôsobujúce humánne ochorenia.

2 POLYOMAVÍRUSY

Polyomavírusy, ako malé neobalené vírusy obsahujúce nevelikú cirkulárnu dvojláknovú DNA, boli pôvodne zaradované spolu s papilomavírusmi do spoločnej čeľade *Papovaviridae*. Sekvenovaním bola dokázaná výrazná rozdielnosť v nukleotidovej sekvencii ich genómov, ktorá viedla k rozdeleniu papovavírusov na dve čeľade, *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae*.

Polyomavírusy infikujú opice, ľudí, myši, škrečky, potkany a papagáje, pričom každý polyomavírus vykazuje úzku hostiteľskú špecificitu a dokonca môže byť aj tkanivovo-špecifický v rámci prirodzeného hostiteľa. Prvým objaveným vírusom tejto čeľade bol polyomavírus myši (MPyV), ktorý charakterizoval Ludvig Gross v roku 1953 ako agens spôsobujúci malígne nádory v rôznych orgánoch novorodených myši. SV40 bol objavený ako kontaminant vakcíny proti poliomyelitíde, ktorá bola v tom čase pripravovaná na bunkových kultúrach opičích obličkových buniek infikovaných SV40. Schopnosť SV40 navodiť tvorbu tumorov u škrečkov, nepermisívneho hostiteľa, bola jedným z indikátorov príbuznosti tohto vírusu s MPyV. Zároveň sa jednalo o alarmujúci problém vzhľadom na to, že značná časť ľudskej populácie v 50. a 60. rokoch 20. storočia bola zaočkovaná proti poliomyelitíde a preto aj infikovaná SV40. Tieto skutočnosti podnietili mnohé štúdie zaoberajúce sa asociáciou SV40 so vznikom nádorových ochorení u ľudí. Epidemiologické štúdie nepotvrdili nárast počtu nádorových ochorení u ľudí zaočkovaných kontaminovanou vakcínou. Niektoré neskoršie výskumy však indikovali možnú spojitosť s mezotelálnymi nádormi u ľudí za účasti azbestu ako ko-karcinogénu prispievajúcemu k onkogenéze SV40. Do dnešného dňa ostáva táto téma kontroverznou a plne nezodpovedanou. Keďže SV40 je relatívne jednoduchým vírusom, dokáže transformovať bunkové kultúry *in vitro* a spôsobiť tumory laboratórnym zvieratám, v snahe o objasnenie molekulárnych mechanizmov vzniku nádorových ochorení sa stal vôbec najlepšie preštudovaným polyomavírusom. Experimenty s SV40 viedli k prelomovým a neplánovaným objavom na poli molekulárnej a bunkovej biológie - identifikácia úlohy enhancerov v eukaryotickej transkripcii, objav alternatívneho splicingu mRNA, opísanie iniciácie replikácie eukaryotickej DNA alebo identifikácia jadrového lokalizačného signálu (NLS). Nemenej významným bol aj objav kľúčových bunkových tumor supresorových proteínov - p53 a pRb.

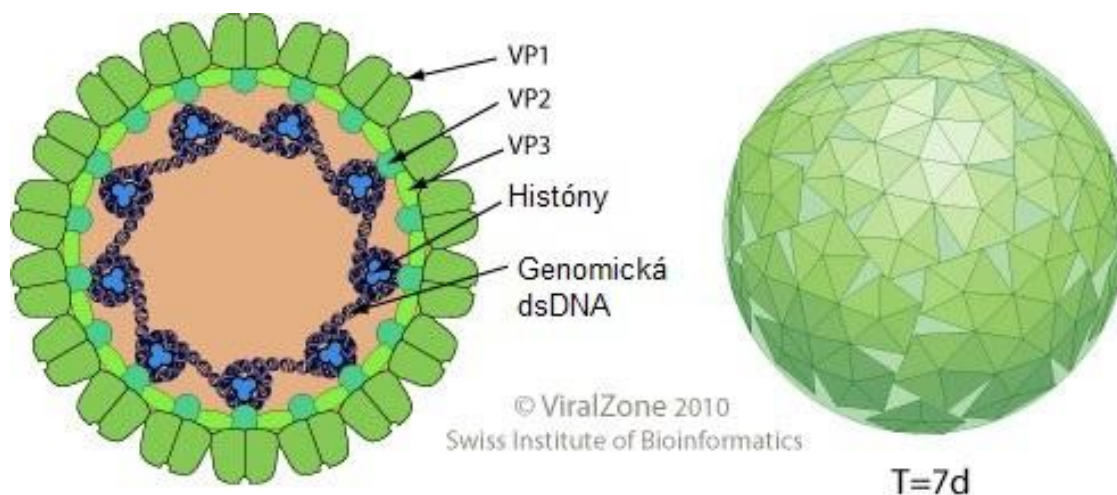
Človek je prirodzeným hostiteľom aj pre ďalšie dva polyomavírusy, BK a JC, ktorých prevalencia v populácii je vysoká (60%). Oba vírusy sú asociované s ochoreniami iba u imunosuprimovaných ľudí (tab. 1.1). O desiatky rokov neskôr boli identifikované ďalšie humánne polyomavírusy - KI, WU (2007) a polyomavírus Merkelových buniek (2008), ktorému sa dostalo väčšej pozornosti vďaka jeho asociácii so zriedkavým nádorovým ochorením kože, karcinómom Merkelových buniek.

Tab. 2.1 - Najvýznamnejšie polyomavírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

Vírus	Ochorenie
Opičí vírus 40 (SV40)	Tumory u škrečkov
Polyomavírus myši (MPyV)	Tumory u myši
BK polyomavírus (Humánný polyomavírus 1, BKV)	Nefropatia, cystitída
JC polyomavírus (Humánný polyomavírus 2, JCV)	Progresívna multifokálna leukoencefalopatia
Polyomavírus Merkelových buniek (Humánný polyomavírus 5, MCV)	Karcinóm Merkelových buniek

2.1 Štruktúra viriónu

Infekčné častice polyomavírusov sú neobalené, o veľkosti približne 45 nm. Pri vysokej multiplicite infekcie môže dochádzať k tvorbe defektných častíc, ktoré sú prázdne, prípadne nesú nekompletný genóm alebo úseky bunkovej DNA.

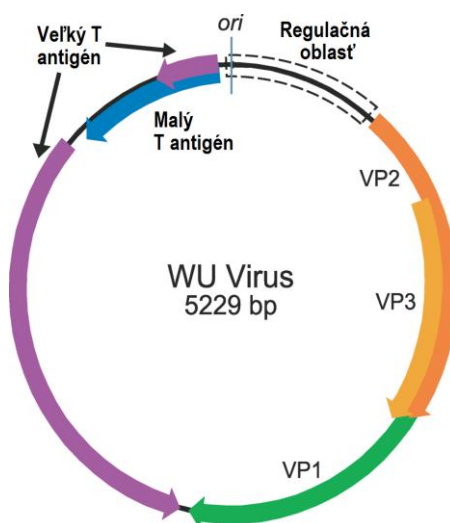


Obr. 2.1 - Štruktúra viriónu polyomavírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Virión s ikozaedrálnou symetriou kapsidu je tvorený štruktúrnymi proteínmi VP1-VP3. Genóm pozostáva zo superšpiralizovanej cirkulárnej dvojláčkovej DNA, ktorá je organizovaná do podoby 24-26 nukleozómov. Vznik štruktúry nukleozómov umožňuje väzba bunkových jadrových histónov (H2A, H2B, H3, H4) na nukleovú kyselinu vírusu a genóm polyomavírusov je preto označovaný aj ako tzv. minichromozóm (obr. 2.1).

2.2 Organizácia genómu polyomavírusov

Genetická informácia polyomavírusov je uchovaná v podobe kovalentne uzatvorenej cirkulárnej dvojvláknovej DNA o veľkosti okolo 5,2 kbp, ktorá je asociovaná s bunkovými histónmi do 24-26 nukleozómov a na základe tejto svojej podobnosti s bunkovým chromatínom získala pomenovanie "minichromozóm". Genóm je veľmi kompaktný, obsahuje niekoľko prekrývajúcich sa otvorených čítacích rámcov (ORF) a vďaka uplatneniu alternatívneho zostrihu je schopný kódovať 5-9 proteínov (obr. 2.2).

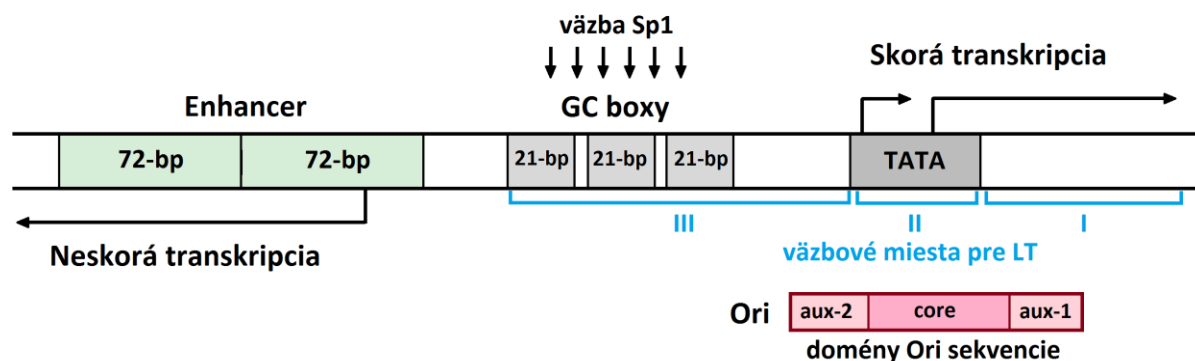


Obr. 2.2 - Organizácia genómu polyomavírusov
Prevzaté a upravené z webu 2.

Všetky regulačné elementy sú uložené vedľa seba v úseku nazývanom *regulačná oblasť* (obr. 2.3). Nachádza sa tu počiatok replikácie (Ori), promotory skorých aj neskorých génov, enhancer a väzbové miesta pre viaceré bunkové transkripčné faktory. V *ori* sekvencii sa nachádza AT-bohatá oblasť (core), na ktorú sa viaže veľký T antigén (LT) pri iniciácii replikácie vírusovej DNA. Príslahlé sekvencie *aux-1* a *aux-2* zvyšujú rýchlosť replikácie. Promótor skorej transkripcie pozostáva z 21-bp repetícií a TATA boxu. V rámci niekoľkých 21-bp repetícií sa nachádzajú sekvencie bohaté na GC-páry (GC boxy), ktoré sú väzbovými miestami pre bunkový transkripčný faktor Sp1. Enhancer, obsahujúci dva 72-bp elementy, zvyšuje úroveň expresie nezávisle na polohe či orientácii a je miestom naviazania viacerých bunkových transkripčných faktorov (AP-1, AP-2, OCT-1). Veľký T antigén sa viaže na miesta I-III v závislosti od množstva nasyntetizovaného LT a podľa kroku replikačného cyklu.

Na cirkulárnom genóme sa v úseku proti smeru hodinových ručičiek od regulačnej oblasti nachádzajú skoré gény, kódujúce neštruktúrne proteíny – veľký a malý T antigén u SV40, u MPyV je prítomný aj stredný T antigén. Produkty tejto skorej oblasti sú potrebné pre

transkripciu, replikáciu alebo ovplyvnenie bunkových procesov. V opačnej orientácii, v neskorej oblasti, sú uložené gény pre štrukturálne proteíny VP1, VP2, VP3 a novoobjavený viroporín VP4.



Obr. 2.3 - Regulačná oblasť polyomavírusov

2.3 Infekčný cyklus polyomavírusov

Receptorom pre SV40 na permissívnych opičích bunkách je MHC molekula I triedy, na ktorú sa vírus viaže prostredníctvom hlavného kapsidového proteínu VP1. Virión je endocytovaný a cez kaveoly transportovaný do vnútra endoplazmatického retikula. Z tejto organely putuje do jadra hostiteľskej bunky, pričom zároveň dochádza k odbaleniu a uvoľneniu vírusovej nukleovej kyseliny. V jadre je vírusová DNA (v podobe epizómu) templátom pre hostiteľskú RNA polymerázu II, ktorá zabezpečuje najprv skorú transkripciu polyomavírusov. Po alternatívnom zostrihu (splicing) sú skoré mRNA transportované do cytoplazmy a translatované na dva proteíny, veľký T antigén (LT) a malý T antigén (sT). LT sa v jadre bunky viaže na *ori* sekvenciu polyomavírusového genómu a tým zabezpečuje iniciáciu syntézy vírusovej DNA, ktorá prebieha za účasti bunkových enzýmov a faktorov. Preto je pre tento proces dôležité, aby bola hostiteľská bunka v S fáze bunkového cyklu. Vznikajúce dcérske DNA vytvárajú komplex s bunkovými histónmi a formuje sa vírusový minichromozóm. Po syntéze vírusovej DNA veľký T antigén stimuluje transkripciu neskorých génov, z ktorých sa exprimujú štrukturálne proteíny VP1-VP4. Tri z nich putujú naspäť do jadra a zbaľujú vírusové minichromozómy za vzniku nových viriónov. Nové vírusové potomstvo je uvoľnené z bunky za pomoci VP4 proteínu, ktorý má funkciu viroporínu, narúša integritu bunkovej membrány a tým spúšťa lýzu infikovanej bunky. Počas pozorovaní *in vitro* bolo zistené, že jedna infikovaná bunka dokáže uvoľniť až 100 000 nových viriónov.

2.4 Expresia génov u polyomavírusov

Okamžite po vstupe vírusovej DNA do jadra hostiteľskej bunky dochádza k odštartovaniu transkripcie. Tá je iniciovaná v regulačnej oblasti, kde sa nachádza skorý aj neskorý promótor. Proces je katalyzovaný bunkovou RNA polymerázou II, vďaka čomu bol SV40 vhodným modelom pre štúdium eukaryotickej génovej expresie. Prepis prebieha v oboch smeroch z protiľahlých vlákien a pokračuje približne do polovice genómu. Transkripcia skorej oblasti beží proti smeru hodinových ručičiek. Transkripcia neskorej oblasti prebieha v opačnom smere a môže byť spustená až po iniciácii replikácie vírusovej DNA. K produkcii rôznych typov proteínov z prekryvajúcich sa ORF je potrebný alternatívny zostrih (splicing). Všetky vznikajúce mRNA majú čiapočku (cap) na 5'-konci, sú polyadenylované na 3'-konci a majú "leader" sekvenciu homologickú k 18S ribozomálnej RNA, ktorá zvyšuje účinnosť translácie vírusových mRNA na bunkových ribozómoch.

2.4.1 Skorá transkripcia a proteíny kódované skorou oblasťou

Skorá transkripcia začína z niekoľkých štartovacích miest po väzbe bunkovej RNA polymerázy II na skorý promótor, ktorý pozostáva podobne ako typický eukaryotický promótor z "TATA boxu" a upstream elementov s väzbovými miestami pre transkripcčné faktory (napr. SP1). Skoré prekursorové mRNA podliehajú alternatívnejmu splicingu, vďaka nemu vznikajú dve rôzne mRNA (u SV40), ktorých pomer závisí od typu buniek a prítomnosti kofaktorov RNA zostrihu v danom type bunky. Následne sú tieto mRNA v cytoplazme translatované na proteíny - T antigény, ktorých N-terminálne konce sú rovnaké, ale líšia sa v sekvencii C-konca.

Veľký T antigén (LT) SV40 je kľúčovým proteínom plniacim viaceré funkcie počas transkripcie aj replikácie vírusovej DNA:

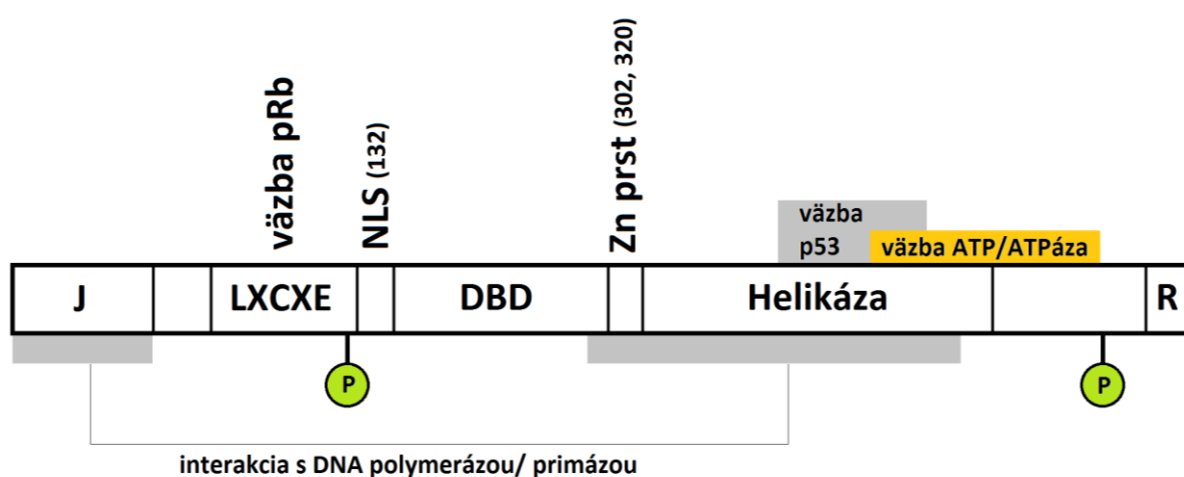
- naviazaním sa na promótorovú oblasť skorých génov (väzbové miesto I) reguluje a reprimuje ich transkripciu, čím ovplyvňuje aj vlastnú syntézu.
- je transaktivátorom prepisu neskorých génov.
- rozoznáva *ori* sekvenciu, na ktorú sa viaže a prostredníctvom svojej ATPázovej a helikázovej aktivity dokáže rozplieť obe vlákna DNA.
- ovplyvňuje bunkové procesy, najmä schopnosťou viazať sa na p53 aj pRb, ktoré potom nemôžu kontrolovať bunkový cyklus a dochádza k spusteniu jeho S fázy.

V sekvencii LT proteínu sa nachádzajú dva klastre fosforylačných miest, ktoré majú rozhodujúcu úlohu pri kontrole jeho aktivít. Okrem toho je LT o-glykozylovaný, acetylovaný, má štruktúru zinkového prsta a je tu prítomný jadrový lokalizačný signál (NLS), ktorý zabezpečuje import proteínu z cytoplazmy do jadra, kde vykonáva svoje regulačné funkcie.

Za multifunkčnosť LT sú zodpovedné jeho jednotlivé domény (obr. 2.4) - DNA-viažúca

doména, ATPázová doména schopná viazať ATP, helikázová doména ako aj miesta zodpovedné za interakciu s bunkovou DNA polymerázou. Na N-terminálnom konci proteínu sa nachádza DnaJ (J doména), ktorá je homologická k šaperónom niektorých baktérií a je zodpovedná za transformáciu buniek, stimulovanie bunkového delenia ako aj inhibíciu apoptózy. Za J doménou je miesto väzby pRb proteínu. Táto interakcia spôsobuje uvoľnenie transkripčného faktora E2F z komplexu pRb/E2F nezávisle od fosforylácie riadenej progresiou bunkového cyklu. Neriadené uvoľnenie transaktivátora E2F vedie k jeho transportu do jadra, kde sa následne viaže na kontrolné elementy E2F-závislých promótorov a spúšťa transkripciu špecifických bunkových génov, ktoré naštartujú prechod z G1 do S fázy bunkového cyklu. Časť molekuly zodpovednej za helikázovú aktivitu proteínu je miestom, ktorým sa LT dokáže viazať s proteínom p53 - označovaným aj ako "strážca genómu", ktorý riadi opravu bunkovej DNA. Proteín p53 je v bunke prítomný v nízkych hladinách v neaktívnej forme. Keď je však bunka vystavená poškodeniu DNA alebo vírusovej infekcii, p53 je stabilizovaný fosforyláciou a jeho množstvo sa zvyšuje. Biologická aktivita p53 je závislá od špecifickej transkripčnej aktivácie cieľových génov - napríklad *p21* a *bax*. Proteín p21 zabezpečuje zablokovanie bunkového cyklu v G1 fáze, čím dáva bunke čas na opravu poškodenej DNA, kým Bax sa zúčastňuje na procesoch indukcie apoptózy (programovanej bunkovej smrti), ktorou sa odstraňujú abnormálne bunky. Väzba LT na p53 suprimuje funkciu p53 ako transkripčného aktivátora, čím narúša jeho kontrolu nad delením buniek a apoptózou.

LT dereguláciou pRb vedie bunku k nadmernému deleniu a vyviazaním p53 na druhej strane k tomu, že sa bunka delí s mutáciami, ktoré sa časom začínajú kumulovať. LT je preto považovaný za vírusový onkogén.

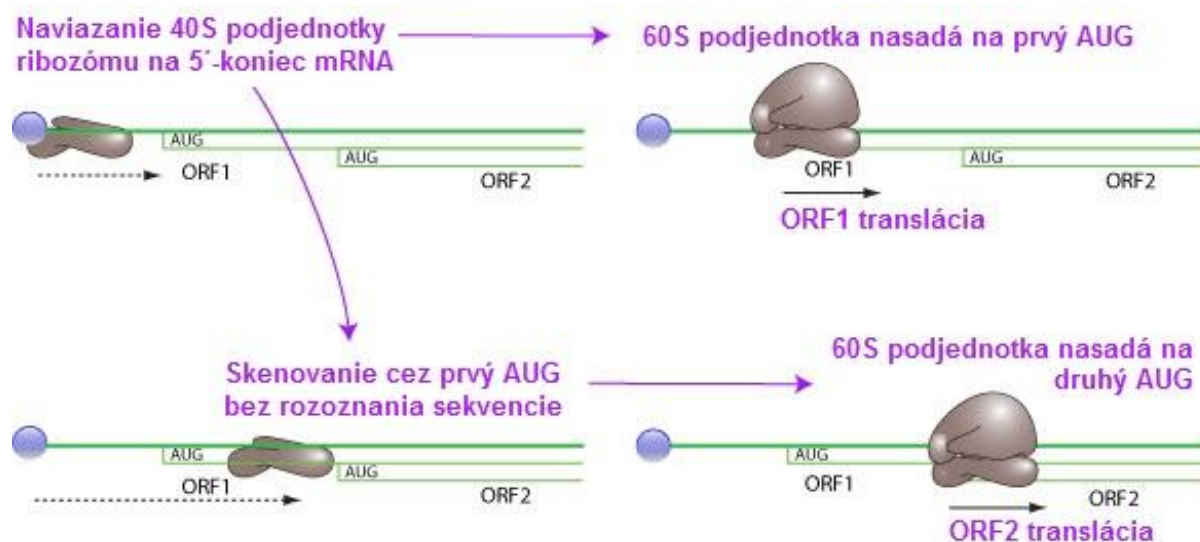


Obr. 2.4 - Domény veľkého T antigénu vírusu SV40

J (DnaJ) doména je zodpovedná za transformačné vlastnosti LT, NLS - jadrový lokalizačný signál, DBD - DNA-viažúca doména, R - doména zodpovedná za bunkovo/hosťiteľsky-špecifickú produkciu vírusu, P - oblasti fosforylačných miest.

Malý T antigén (sT) je rovnomerne rozmiestnený v jadre aj cytoplazme infikovanej bunky. Je zodpovedný za indukciu bunkovej transformácie, ale len za istých podmienok a len v niektorých typoch buniek. Na N-terminálnom konci zdieľa rovnakú DnaJ doménu s LT, ale má unikátnu C-terminálnu časť schopnú viazať dve molekuly zinku. Táto jedinečná doména je zodpovedná za interakciu sT s bunkovou proteínovou fosfatázou 2A (PP2A), výsledkom čoho je inhibícia aktivity PP2A a narušenie signalizácie cez MAP kinázovú dráhu.

Stredný T antigén (mT) je kódovaný myšiacim polyomavírusom, ale nie je prítomný u humánnych polyomavírusov ani u SV40. Tento proteín indukuje bunkovú transformáciu spolu s LT polyomavírusu prostredníctvom interakcie s bunkovým proto-onkogénom pp60src. A podobne ako sT je schopný viazať aj PP2A. Okrem toho, niektoré jeho domény sa môžu viazať aj na proteíny zapojené do signálnej transdukcie, fosfolipázu C (PLCG1) alebo fosfatidylinozitol 3-kinázu (PIK3CA), ako aj niektoré tyrozín kinázy, čím zabezpečuje konštitutívnu aktiváciu signálnych dráh RAS a MEK.



Obr. 2.5 - Uplatnenie mechanizmu "leaky scanning" počas translácie
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

2.4.2 Neskorá transkripcia a proteíny kódované neskorou oblasťou

Veľký T antigén sa postupne začína viazať na svoje väzbové miesta I-III v regulačnej oblasti podľa toho, v akom množstve je naakumulovaný v jadre bunky. Najprv sa LT viaže len na miesto I, čím suprimuje skorú transkripciu. V druhom kroku, väzbou na úsek II dochádza k iniciácii replikácie vírusovej DNA, po ktorej môže LT interagovať s posledným možným miestom III a tým sa aktivuje transkripcia z neskorého promotora. Vzniknuté prekursorové mRNA absolvujú rovnakú post-transkripčnú úpravu ako v prípade skorých mRNA a sú translatované v cytoplazme. VP2, VP3 a VP4 sú translatované z jednej mRNA

prostredníctvom mechanizmu "leaky scanning", pri ktorom ribozóm počas skenovania mRNA raz rozozná prvý AUG kodón alebo ho preskočí a translácia sa iniciuje až od druhého, prípadne tretieho AUG kodónu (obr. 2.5). Týmto procesom môžu byť z jedného typu mRNA syntetizované viaceré rôzne proteíny. Štruktúrne proteíny VP1-VP3 sú následne importované do jadra, kde sa podieľajú na zbaľovaní vírusovej DNA a formovaní kapsidov nových viriónov. Len nedávno identifikovaný proteín VP4 vykonáva funkciu viroporínu, umožňuje vytvorenie pórov v bunkovej membráne, čím zabezpečuje lýzu infikovanej bunky a uvoľnenie novovzniknutých polyomavírusov z bunky.

Niektoré ľudské polyomavírusy kódujú okrem VP proteínov aj malý agnoproteín, ktorý sa v bunke vyskytuje vo fosforylovej (v cytoplazme) aj nefosforylovej forme (v jadre). V menšom množstve je prítomný vo viriónoch a prostredníctvom interakcie s VP1 v periplazmickom priestore zohráva dôležitú úlohu počas morfogénzy.

2.5 Replikácia polyomavírusovej DNA

Replikácia genómu polyomavírusov je vo veľkej miere závislá na replikačnej mašinérii bunky. Využíva nielen hostiteľskú DNA polymerázu, ale aj ďalšie faktory a iné pomocné enzýmy (napr. topoizomerázu). Aby došlo k úspešnej replikácii vírusovej DNA, musí byť bunka v S fáze bunkového cyklu a preto polyomavírusy disponujú mechanizmami ako v bunke navodiť tento stav.

Syntéze vírusovej DNA predchádza skorá transkripcia a produkcia veľkého T antigénu. Keď je LT akumulovaný v jadre v dostatočnom množstve najprv reprimuje skorú transkripciu. Následkom interakcie s p53 a pRb sa aktivuje cyklín-dependentná kináza 1 (cdk-1), ktorá fosforyluje LT (na treoníne v pozícii 124) a len takto modifikovaný proteín po väzbe ATP a v podobe hexamérneho komplexu nadobúda schopnosť viazať sa na oblasť Ori. Vďaka svojej helikázovej aktivite a za pomoci bunkových proteínov (Rp-A, topoizomerázy I) LT komplex rozplieťa vírusovú dvojvláknovú DNA v *ori* sekvencii a vzniká replikačná bublina. Cirkulárna DNA sa odvíja obojsmerne a dochádza k semikonzervatívnej syntéze DNA z RNA primeru pomocou bunkovej DNA polymerázy α . Replikácia je ukončená, keď sa stretnú obe protichodné replikačné vidlice. Topoizomeráza zabezpečí odvinutie a oddelenie pôvodnej a dcérskej molekuly DNA.

2.6 Vplyv polyomavírusovej infekcie na hostiteľa

Polyomavírusy si zasluhujú mimoriadnu pozornosť ako potenciálne humánne patogény, keďže narastá množstvo údajov o vzťahu SV40, BKV, JCV a najmä MCV k ľudským nádorom. SV40 bol detegovaný v 50% malígnych mezoteliómoch. Iné typy nádorov

pozitívne na SV40 boli identifikované v rôznych geografických oblastiach vrátane USA, Európy, Číny, Japonska či Nového Zélandu. Či dôjde k produktívnej replikácii polyomavírusu alebo k transformácii bunky závisí od typu bunky, resp. hostiteľa.

Ak sú infikované bunky permissívne pre vírus, môže prebehnúť kompletný cyklus replikácie vírusu, vzniká nové vírusové potomstvo následkom čoho je bunka lyzovaná a nepodlieha transformácii. V prípade infekcie nepermissívnej bunky môže nastať niekoľko situácií. Buď je replikácia vírusu spolu s transkripciou neskorých génov blokovaná, pričom dochádza k expresii LT a to vedie bunku k transformácii. Alebo je replikácia vírusu obmedzená do takej miery, že vírus nedokáže zabezpečiť lýzu danej bunky, čo môže byť sprevádzané integráciou vírusovej DNA do hostiteľského genómu bez narušenia expresie veľkého T antigénu a ten prispieva k vzniku karcinómu Merkelových buniek. Prípadne sa môžu bunky správať ako semipermissívne, ak sa replikuje vírus v minimálnej hladine, ale produkuje dostatočné množstvo LT na zmenu rastových charakteristík buniek.

Nepermissívnosť bunkového prostredia priamo súvisí s druhovo-špecifickou prítomnosťou rozdielnych typov DNA replikačných faktorov a vzájomnou bunkovo-špecifickou interakciou medzi LT a p53, čo bolo najlepšie zdokumentované pre SV40. SV40 sa nedokáže replikovať v bunkách škrečkov kvôli tomu, že v týchto bunkách nie je schopný viazať komplex DNA polymeráza α /primáza. Napriek tomu prebieha skorá transkripcia a produkcia LT. Výsledkom takejto infekcie v prevažnej väčšine prípadov býva abortívna transformácia alebo zriedkavo ($1:10^7$) sa genóm SV40 integruje do bunkovej DNA a nastáva malígna transformácia. Ako LT ovplyvňuje funkciu p53, tak aj "strážca genómu" recipročne mení aktivitu LT ako replikačného faktora. SV40 sa produktívne replikuje v ľudských fibroblastoch, ale infekcia mezoteliálnych buniek je výrazne limitovaná - len 20% buniek je lyzovaných a v 80% buniek sa exprimuje len LT (v ktorých s frekvenciou 1:1000 môže dôjsť k malígnej transformácii). Tento fakt je založený na tom, že v mezoteliálnych bunkách sa p53 nachádza vo vyššej hladine a v stabilnejšej podobe ako vo fibroblastoch. Zníženie expresie p53 v mezoteliálnych bunkách preto vedie k zvýšeniu replikácie SV40.

Zhrnutie charakteristík polyomavírusov

- malá neobalená častica obsahuje genóm tvorený malou cirkulárnou dsDNA organizovanou v podobe tzv. minichromozómu
- skorá a neskorá oblasť genómu sú uložené v opačných smeroch od regulačnej oblasti
- regulačná oblasť obsahuje *ori* sekvenciu a promótoru skorej aj neskorej transkripcie
- skorá a neskorá transkripcia je oddelená replikáciou genómu
- vírusové transkripty sú upravované alternatívnym zostrihom
- nekódujú vírusovú DNA polymerázu
- génová expresia aj replikácia vírusu je závislá od enzymatickej výbavy bunky
- multifunkčný LT reguluje vírusovú transkripciu, replikáciu a zasahuje do kontroly bunkového cyklu väzbou proteínov p53 a pRb
- osud infikovanej bunky (lýza alebo transformácia) závisí od druhu hostiteľa/typu buniek

3 PAPILOMAVÍRUSY

Bradavice boli známe dlhé storočia, ale až v roku 1933 bol objavený prvý papilomavírus. Richard Shope zistil, že tieto benígne neoplázie kože môžu byť prenesené inokuláciou extraktom bradavíc z divého králiku na domáceho králiku. Zároveň dokázal, že benígne tumory sa môžu zvrhnúť na malígnu formu rakoviny, čím položil základy hypotézy mnohostupňovej karcinogenézy. V roku 2008 bola Haraldovi zur Hausenovi udelená Nobelova cena za identifikáciu kauzálnej súvislosti medzi infekciou ľudskými papilomavírusmi (HPV) a vznikom cervikálneho karcinómu, ako aj za vývoj vakcíny založenej na tomto poznaní. Dnes je už známy veľký počet papilomavírusov, s celosvetovým rozšírením, ktoré sú patogénmi zvierat aj človeka (tab. 3.1).

Papilomavírusy sú prísne druhovo aj bunkovo špecifické a ich replikácia je viazaná na diferenciáciu epitelových buniek kože alebo slizníc (ústnej dutiny, nosovej dutiny, genitálneho traktu). Na základe týchto ich vlastností bolo náročné ľudské papilomavírusy kultivovať či študovať *in vitro*. Z toho dôvodu sa stal bovínný papilomavírus (BPV-1) prvotným modelom na štúdium molekulárnej biológie a transformácie papilomavírusmi, keďže bradavice hovädzieho dobytku boli ľahko dostupné a BPV dokázal transformovať hľodavčie bunky *in vitro*. V súčasnosti je už známe, že BPV a HPV sú z patogenetického hľadiska rozdielne.

V závislosti od podmienok, papilomavírusy vyvolávajú produktívnu alebo neproduktívnu (latentnú) infekciu. U prirodzených hostiteľov spôsobujú vznik benígnych bradavíc na koži a papilómy na slizniciach, pričom niektoré môžu konvertovať na malígne karcinómy a to nielen krčka maternice, ale aj ústnej dutiny, tonzíl či nosohltanu. S ohľadom na vznik nádorov sa HPV delia na vysokorizikové alebo "high risk" a nízkorizikové alebo "low risk".

Tab. 3.1 - Najvýznamnejšie papilomavírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

Vírus	Ochorenie
Papilomavírus králikov (CRPV)	Papilomatózy, keratinózne karcinómy králikov
Bovínny papilomavírus (BPV-1)	Kožné fibropapilómy, fibrosarkómy
Ľudský papilomavírus 2, 4, 7 (HPV-2, 4, 7)	Bežné bradavice na rukách
HPV- 3, 8, 9, 10, 12,14, 15, 17, 19-25, 36, 38	Bradavice rúk, trupu, rakovina kože
HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 41-45, 52, 56, 58	Rakovina krčku maternice, kondylómy

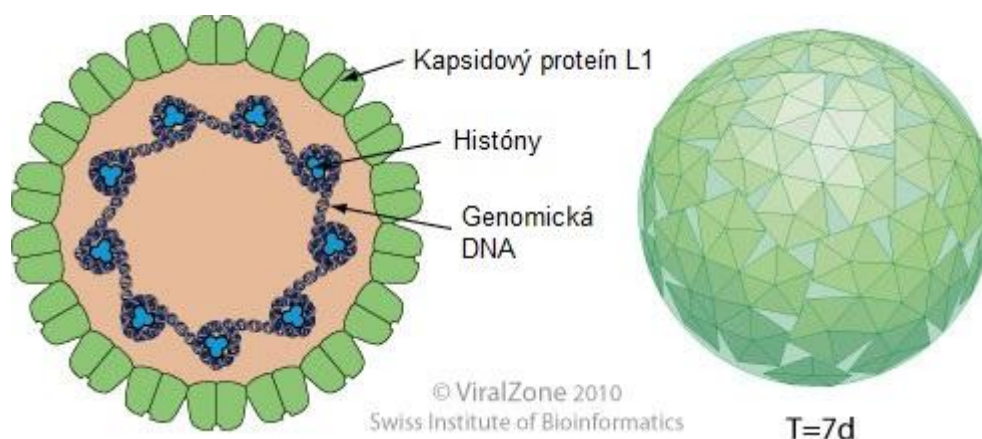
Poznáme približne 150 typov ľudských papilomavírusov a predpokladá sa identifikácia mnohých ďalších s využitím moderných molekulárno-biologických techník. V

posledných rokoch štúdiu ľudských papilomavírusov výrazne progreduje vďaka ich možnosti štúdia v podmienkach *in vitro* v špeciálnych 3D raftových kultúrach keratinocytov.

3.1 Štruktúra viriónu

Z hľadiska štruktúry viriónov sú papilomavírusy veľmi podobné polyomavírusom (obr. 3.1). Ich častice sú malé (55-60 nm), neobalené a ich kapsid ikozeadrálnej symetrie pozostáva zo štruktúrnych proteínov L1 a L2. Hlavný kapsidový proteín L1 je zodpovedný za väzbu vírusovej častice na vhodný receptor bunky. Je schopný tzv. „self-assembly“ - dokáže samovoľne formovať ikozeadrálne častice aj bez prítomnosti DNA alebo iných faktorov. Táto jeho vlastnosť sa využila pri navrhovaní a dizajnovaní vakcín. Proteín L2 je lokalizovaný na vnútornej strane kapsidu a po úspešnej endocytóze viriónu zabezpečuje transport vírusového genómu do jadra bunky.

V kapside je uchovaná superšpiralizovaná cirkulárna dvojvláknová DNA, ktorá je vďaka väzbe s bunkovými histónmi organizovaná do nukleozómom podobným štruktúram a preto je označovaná ako minichromozóm.



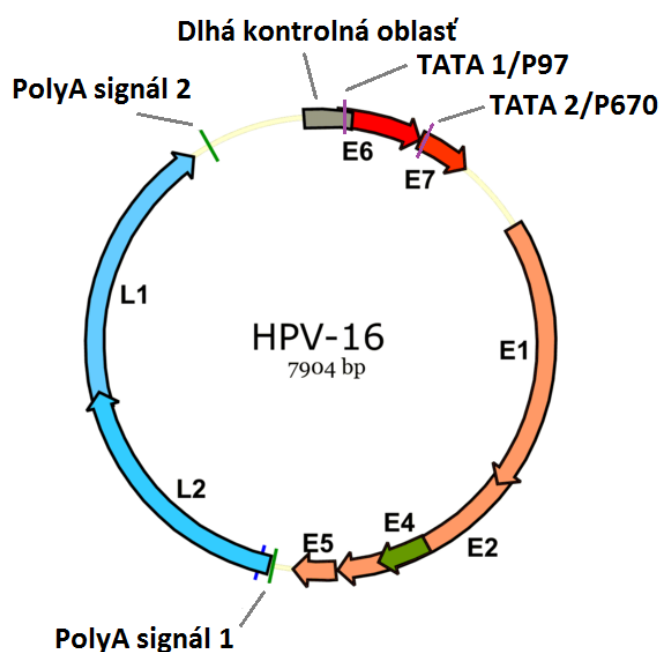
Obr. 3.1 - Štruktúra viriónu papilomavírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

3.2 Organizácia genómu papilomavírusov

Kovalentne uzavretá cirkulárna dvojvláknová DNA papilomavírusov má veľkosť približne 8000 bp. Genóm je rozdelený na dve časti - skorú a neskorú oblasť. Prvá menovaná kóduje skoré proteíny E1-E7 (prípadne aj E8) a z neskorého úseku sa exprimujú štruktúrne proteíny L1 a L2.

Na rozdiel od polyomavírusov, otvorené čítacie rámce (ORF) oboch oblastí

papilomavírusov sú lokalizované na tom istom vlákne DNA a preto aj všetky funkcie vírusu sú kódované len na jednom vlákne. Kompaktnosť genómu je zabezpečená tým, že viaceré ORF v skorej aj neskorej oblasti sa prekrývajú. Nekódujúci úsek o veľkosti cca 1000 báz je situovaný medzi koncom neskorej a začiatkom skorej oblasti, a označuje sa termínom "dlhá kontrolná oblasť" (LCR, long control region). Sú tu uložené *cis*-aktivačné elementy - enhancery, skorý a neskorý promótor, ale aj počiatok replikácie (Ori). V genóme HPV sa nachádzajú dva promótory v rovnakom smere - skorý promótor P_E (P₉₇) a neskorý promótor P_L (P₆₇₀). Skorá aj neskorá oblasť je ukončená vlastným polyadenylačným miestom (obr. 3.2).



Obr. 3.2 - Organizácia genómu papilomavírusov
Prevzaté a upravené z webu 3.

3.3 Infekčný cyklus papilomavírusov

Replikačný cyklus papilomavírusov je unikátny v tom, že prebieha v rôznych diferenciačných štádiách keratinocytov, vďaka čomu aj replikácia prebieha v dvoch fázach a celý proces od infekcie bunky po uvoľnenie nových vírusových častíc trvá približne 3 týždne.

Cez drobné ranky vo vrchnej vrstve kože vírus preniká až k nediferencovaným keratinocytom v hlbšej vrstve epidermy. Najprv interaguje svojím L1 proteínom s laminínom v extracelulárnej matrix a následne rovnaký vírusový receptor zabezpečuje väzbu s heparán sulfátmi na povrchu bunky. Niektoré papilomavírusy sa viažu aj so sekundárnym receptorom, ktorým najčastejšie býva alfa-integrín. Vírusová častica penetruje do bunky endocytózou. Vplyvom kyslého pH v endozóme dochádza k štruktúrnej reorganizácii viriónu, odhaleniu

kapsidového proteínu L2, ktorého účinkom je endozomálna membrána narušená. Následne je vírusový minichromozóm v komplexe s L2 transportovaný pozdĺž mikrotubulov do jadra bunky. V nediferencovaných bunkách je papilomavírusový genóm lokalizovaný v tzv. ND10 telieskach (ND10 – „nuclear domain 10“ alebo PML telieska), kde dochádza k transkripcii skorých génov - E génov. Vzniknuté mRNA sú translatované na E proteíny, ktoré sú esenciálne pre replikáciu vírusového genómu. V tejto fáze infekčného cyklu sa nasyntetizuje 50-400 kópií vírusového genómu, ktorý je ďalej rovnomerne rozdeľovaný do dcérskych buniek počas delenia infikovaného keratinocyту. Počas tohto obdobia, označovaného ako "plazmidová replikácia", sa vírusová DNA replikuje synchronne s chromozómami hostiteľskej bunky, bunky sa posúvajú do vyšších vrstiev epidermy a postupne sa diferencujú. Produktívna infekcia sprevádzaná uvoľňovaním nových viriónov je možná iba v plne diferencovaných keratinocytoch, ktoré sa však samé už nedelia. Z toho dôvodu papilomavírusy kódujú proteíny - E6 a E7 - ktoré spúšťajú v diferencovaných bunkách vstup do S fázy bunkového cyklu. Počas neho nastáva masívna replikácia vírusového genómu (vyše 1000 kópií) a exprimujú sa už aj neskoré gény (L1 a L2). Táto fáza je označovaná ako "vegetatívna replikácia". Naakumulované kapsidové proteíny zbaľujú s histónmi asociované vírusové genómy, skladajú sa nové vírusové častice, ktoré sú uvoľňované z hynúcej bunky.

3.4 Expresia génov u papilomavírusov

Podobne ako u polyomavírusov, transkripcia papilomavírusov prebieha prostredníctvom bunkovej RNA polymerázy II a je rozdelená na dve fázy. V prvej sa zo skorého promotora prepisujú gény skorej oblasti, ktoré dávajú vznik neštruktúrnym proteínom podieľajúcim sa na transkripcii, replikácii a modulácii bunkového prostredia. Počas druhej fázy sú z neskorého promotora transkribované neskoré gény, ktoré kódujú štruktúrne proteíny kapsidu. Obe fázy sú rozdelené začiatkom replikácie genómu, avšak u papilomavírusov je prechod zo skorej fázy do neskej viazaný na diferenciáciu epitelových buniek. Okrem toho, na rozdiel od polyomavírusov, transkripcia prebieha len jedným smerom, tj. prepisované je len jedno vlákno vírusovej DNA. Oblasť skorých aj neskorých génov je ukončená vlastným polyadenylačným signálom. Aj u papilomavírusov podliehajú prekurzorové mRNA alternatívne splicing, vznikajú tak rôzne mRNA, ktoré putujú do cytoplazmy, kde sú translatované na proteíny. Počas translácie E6 a E7 sa uplatňuje mechanizmus "leaky scanning".

3.4.1 Skorá transkripcia papilomavírusov a funkcia skorých proteínov

K transkripcii skorých (E) génov dochádza v ND10 hneď po vstupe vírusového genómu do jadra nediferencovanej epitelialnej bunky. Tento proces je, v závislosti od typu

papilomavírusu, kontrolovaný jedným (P₉₇/P_E) alebo viacerými promótorami lokalizovanými v LCR. Aktivačnú úlohu pri spustení vírusovej transkripcie majú viaceré bunkové faktory - Sp1, AP-1 a špecifický keratinocytový TF-1, ktoré sa viažu na oblasť LCR. Prítomnosť týchto faktorov podmieňuje permissivnosť buniek pre infekciu papilomavírusmi. To je jedna z hlavných príčin, prečo sa HPV produktívne nemnožia vo fibroblastoch - lebo v nich nie je stabilne prítomný transkripčný faktor AP-1.

Vznikajúce transkripty sú väčšinou monocistronické, aj keď boli identifikované aj polycistronické mRNA. Skoré gény kódujú E proteíny (E1-E8), ktoré vykonávajú v bunke rôzne regulačné funkcie.

E1 - gén E1 kóduje fosfoproteín, ktorý zdieľa istú štruktúru aj funkčnú podobnosť s veľkým T antigénom polyomavírusov, keďže má ATPázovú a helikázovú aktivitu. Proteín E1 je nevyhnutný pre replikáciu vírusu, nakoľko sa viaže na *ori* sekvenciu a v podobe hexaméru interaguje s komplexom bunkových molekúl zabezpečujúcich syntézu DNA (bunkovou DNA polymerázou α , primázou a ďalšími). E1 sa (spolu s E2) zúčastňuje aj na udržiavaní vírusového genómu počas fázy "plazmidovej replikácie" v nediferencovaných bunkách.

E2 - gén E2 je exprimovaný v podobe dvoch variantov proteínov - E2 a E2-Tr, ktoré vo forme dimérov majú DNA-viažúcu aktivitu a zúčastňujú sa regulácie vírusovej transkripcie aj replikácie. E2 proteín nasadá na sekvenciu v blízkosti Ori, pričom interaguje s E1 a tým stabilizuje väzbu E1 na počiatok replikácie.

E2 zároveň funguje ako transaktivátor, viaže tzv. E2-responzívne sekvencie v promótoroch aj enhanceroch uložených v LCR a dokáže regulovať transkripciu skorých génov. E2-Tr je skrátanou formou E2 proteínu, ktorá má síce zachovanú DNA-viažúcu doménu, ale chýba jej transaktivačná doména. Ak sa homodimér E2-Tr (alebo heterodimér E2-Tr/E2) naviaže na cieľové sekvencie, nedokáže spustiť transkripciu, ale pôsobí ako transrepresor. V infikovanej bunke je funkcia E2 ako transaktivátora alebo transrepresora určená koncentráciou a pomerom oboch foriem E2. Hlavnou úlohou E2 proteínov u onkogénnych typov HPV-16 a HPV-18 je suprimovanie transkripcie génov E6 a E7 v diferencovaných bunkách krčka maternice. Niektoré typy papilomavírusov exprimujú aj tretí variant E2 proteínu - E8/E2-Tr - ktorý je tiež transrepresorom.

Ďalšou kľúčovou úlohou E2 je zabezpečenie rovnomerného prerozdelenia kópií vírusového genómu do dcérskych buniek pri delení infikovanej bunky. Tento efekt je sprostredkovaný väzbou E2 na "minichromozóm udržiavací element" (MME – „minichromosome maintenance element“) v LCR oblasti vírusového genómu a súčasne interakciou so sekvenciou na chromozomálnej DNA hostiteľskej bunky.

E3 - gén E3 nie je prítomný u väčšiny ľudských papilomavírusov

E4 - napriek tomu, že sa jedná o proteín exprimovaný v najväčšej miere, jeho úloha nie je úplne objasnená. Dokáže interagovať s keratínmi, indukovať kolaps cytokeratínovej siete a pravdepodobne zohráva úlohu pri maturácii a uvoľnení viriónov.

E5 - je malým membránovým proteínom schopným aktivovať membránovo viazaný receptor trombocytového rastového faktora beta (PDGF- β), tento mechanizmus je označovaný aj ako virokinná stimulácia. Týmto spôsobom, imitujúcim ligand, dokáže stimulovať bunkovú proliferáciu a predstavuje hlavný transformačný proteín BPV-1. E5 proteín HPV interaguje s receptorom pre epidermálny rastový faktor (EGFR) a bunkovou ATPázou. Paradoxne, gén E5 nie je exprimovaný vo väčšine HPV-pozitívnych nádorových bunkách, čo indikuje, že *in vivo* neprispieva k stimulácii bunkového delenia tak ako *in vitro*, avšak predpokladá sa jeho účasť v tvorbe benígnych papilómov.

E6 - pozostáva z dvoch domén zinkového prstu, je to proteín viažúcich ióny Zn^{2+} . Je schopný viazať DNA a bolo dokázané, že u HPV-16 je účastný na regulácii skorého promótoru (P_{97}) v LCR. E6 prispieva k transformácii buniek, ale nedokáže indukovať tento proces sám (ako LT polyomavírusov), iba v kooperácii s E7 proteínom. K transformačnému procesu prispieva schopnosťou tvorby komplexu s bunkovým E6-asociovaným proteínom (E6-AP), ktorý má ubikvitín-ligázovú aktivitu, ktorá umožňuje ubikvitinyláciu bunkových proteínov, čím ich označí na proteozomálnu degradáciu. Cieľovými bunkovými proteínmi podliehajúcimi proteolýze sú tumor-supresorový p53, jadrový faktor X1-91 (NFX1-91), proapoptotický proteín Bak a Bax, PDZ-doménu obsahujúce proteíny a niekoľko ďalších. Vďaka tomu E6 inhibuje apoptózu a blokovanie progresie bunkového cyklu.

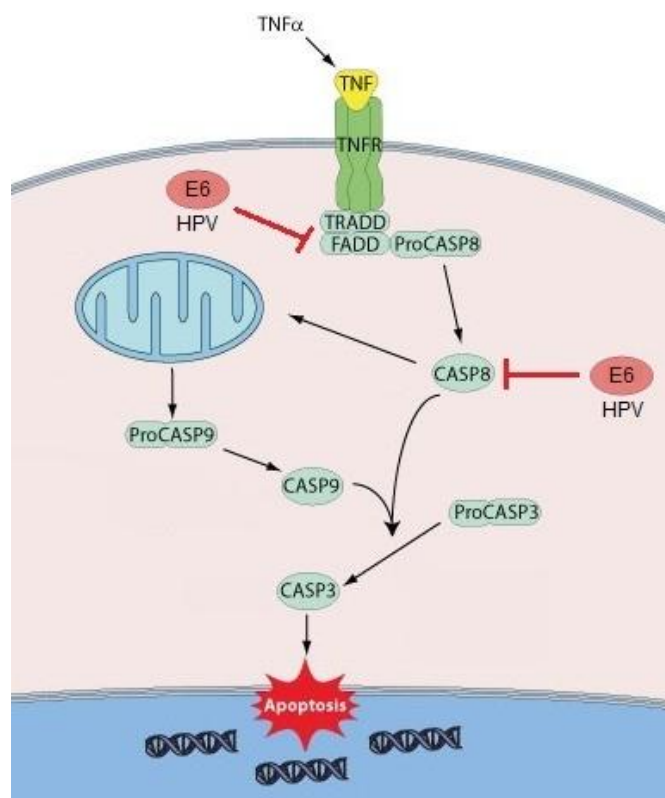
Proteín p53 funguje ako transkripčný faktor aktivujúci expresiu génov, ktorých produkty jednak zabezpečujú zablokovanie bunkového cyklu v G2 fáze a teda oddialenie prechodu do S fázy, a zároveň sú medzi nimi aj faktory účastné na oprave DNA. Urýchlenou degradáciou p53 pôsobením E6 (proteolýza p53 za 1 hodinu namiesto 3 hodín) dochádza k jeho deficiencii v bunke vedúcej k akumulácii mutácií a vstupu bunky do S fázy bunkového cyklu bez opravy bunkovej DNA. Okrem toho, E6 dokáže interagovať s p300, CREB-viažúcim proteínom (CBP) a ADA3, čím blokuje acetyláciu p53 a tak inhibuje transkripciu p53-responzívnych génov.

NFX1-91 je transrepresorom viažúcim sa na promótor humánnej telomerázovej reverznej transkriptázy (hTERT) a tým blokujúcim expresiu tohto enzýmu. Degradáciou NFX1-91 a ďalších proteínov (c-Myc, NFX123) je aktivovaný enzým hTERT, ktorý bráni skracovaniu telomér a podporuje imortalizáciu buniek.

Proapoptotické proteíny sú vo väčšej miere syntetizované v diferencovanej vrchnej vrstve kože, kde je apoptóza žiaduca k priebežnému obnovovaniu epidermy. Degradácia proteínov Bax a Bak, ako aj interakcia E6 s TNFR1, FADD a kaspázou 8 inhibuje apoptotickú signalizáciu (obr. 3.3).

E6 proteíny typov HPV označovaných ako vysokorizikové ("high risk" - zhl'adom k vzniku malígnych nádorov) dokážu ubikvitinylovať a degradovať aj proteíny obsahujúce PDZ-domény. Proteín E6 nízkorizikových ("low risk") typov HPV túto schopnosť nemá. Zvýšená proteolýza PDZ-doménu obsahujúcich proteínov hDlg, hScrib, MUPP1 vedie k strate

bunkovej polarity a indukcií hyperplázií.



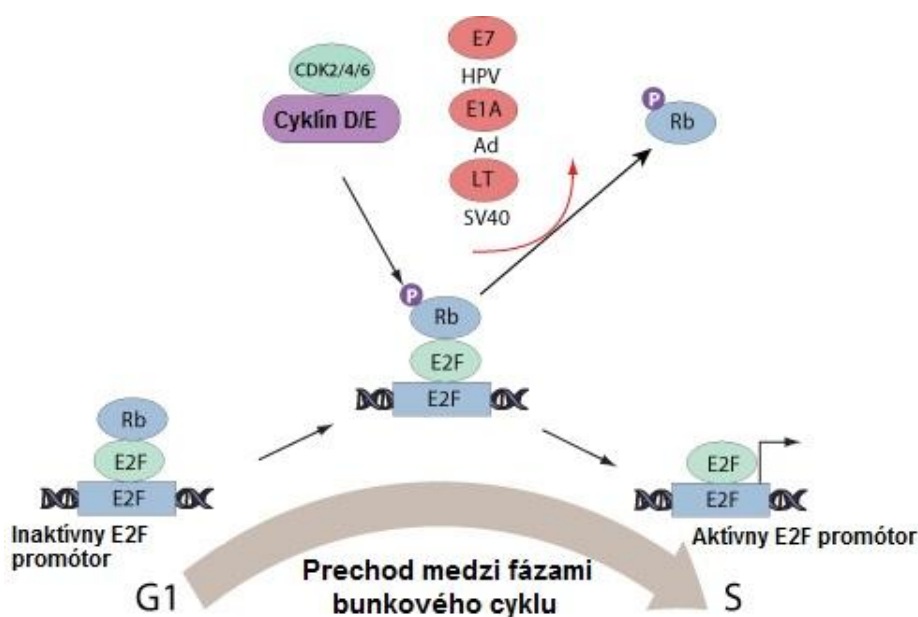
Obr. 3.3 - Inhibícia apoptózy proteínom E6
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

E7 - je fosforylovaný proteín s jednou doménou zinkového prstu potrebnou pre správne zloženie proteínu a jeho dimerizáciu. C-terminálna doména je štruktúrne a funkčne podobná E1A proteínu adenovírusov a zdieľa čiastočnú homológiu s časťou LT u SV40. Interakciu E7 s pRb dochádza k uvoľneniu pRb z jeho komplexu s E2F, nezávisle na fosforylačnom stave pRb (obr. 3.4). Rovnako ako u polyomavírusov, výsledkom tohto procesu je konštitutívna aktivácia E2F-responzívnych génov, vstup bunky do S fázy bunkového cyklu a deregulácia delenia buniek. Typy HPV, ktoré nie sú asociované s indukciou malignít, kódujú E7 proteín s nízkou afinitou k pRb. E7 proteín vysokorizikových HPV dokáže okrem väzby pRb indukovať aj jeho ubiquitínom-sprostredkovanú proteolytickú degradáciu. E7 ovplyvňuje génovú expresiu aj väzbou histón deacetylázy (HDAC) a stimuluje abnormálnu syntézu centrozómu. Okrem toho, dereguluje bunkový cyklus – jednak inhibíciou p21 a p27 (inhibitorov cyklín-dependentných kináz), a zároveň stimuláciou cyklínov priamou aktiváciou cyklín dependentnej kinázy 2 (cdk2). E7 dokáže inhibovať TATA-viažúci proteín (TBP), ktorý je súčasťou komplexu bunkových transkripčných iniciačných faktorov a tým blokuje hostiteľskú transkripciu.

Z hľadiska zavŕšenia infekčného cyklu papilomavírusov je úloha E7 proteínu rozhodujúcou, lebo bez indukcie S fázy bunkového cyklu a delenia v diferencovaných keratinocytoch, ktoré

sa v štandardných podmienkach už nedelia, by nemohlo dôjsť k replikácii vírusového genómu bunkovou DNA mašinériou, neprebehla by expresia neskorých génov a nevznikli by nové vírusové častice. Neplánovaná syntéza DNA v bunke a akumulácia chromozomálnych zmien indukovaných pôsobením E7 však aktivuje apoptózu – proces, ktorý je závislý od aktivity bunkového tumor-supresorového proteínu p53. Jeho funkcia je však neutralizovaná proteínom E6, čím papilomavírusy získajú čas na dokončenie celého infekčného cyklu v infikovanom keratinocyte. Proteíny E6 a E7 pôsobia synergicky a ich kombinovaná aktivita je predispozíciou pre vznik nádorov. Transformujúci efekt oboch proteínov sa však neprejaví počas lytickej replikácie, lebo vírus-produkujúce bunky nakoniec hynú. Problém nastáva pri integrácii vírusového genómu do DNA bunky, ktorá nie je súčasťou normálneho infekčného cyklu vírusu, ale náhodne k nej môže dôjsť a ak je sprevádzaná nekontrolovanou expresiou E6 a E7, môže to viesť k vzniku malignít.

E8 - absentuje u väčšiny HPV. Prítomný u BPV-1, kde zohráva úlohu pri syntéze niektorých variantov E2 proteínu.



Obr. 3.4 - Interakcia niektorých vírusových proteínov s pRb
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

3.4.2 Neskorá transkripcia papilomavírusov a funkcia neskorých proteínov

Ako bolo už spomenuté, neskoré gény sú transkribované až po replikácii vírusovej DNA. Neskorý promótor (P_{670}/P_L) je aktivovaný len v diferencovaných keratinocytoch a nie je závislý od transaktivácie E2 proteínom. Len mRNA začínajúce z P_L a končiace neskorým polyadenylačným signálom kódujú štruktúrne proteíny L1 a L2. Tieto prekursorové mRNA podliehajú zostrihu, ktorý vystrihne 3-5-kbp oblasť ležiacu medzi P_L a začiatkom ORF pre L1

a L2. Produktami neskorých génov sú štruktúrne proteíny L1 a L2.

L1 - hlavný kapsidový proteín tvoriaci pentaméry, ktorý je zodpovedný za väzbu na bunkový receptor. L1 má schopnosť samovoľne formovať viriónom podobné častice (VLP – „virion like particles“). Táto jeho schopnosť sa využíva pri dizajnovaní vakcín, ktoré sa pripravujú zmiešaním L1 proteínov pochádzajúcich z viacerých typov HPV. Vakcíny vykazujú 100% protekciu proti typom HPV, ktorých proteíny boli prítomné vo vakcíne.

L2 - minoritný kapsidový proteín, ktorý ovplyvňuje tropizmus papilomavírusov. Aj keď sa vo vírusových časticiach nachádza v 30-krát menšom množstve ako L1, virióny sú infekčné len ak obsahujú aj L2 proteín. L2 je rozoznávaný bunkovou proteázou - furínom, a jeho štiepením sa zvyšuje infekčnosť papilomavírusov. Zároveň bola dokázaná účasť L2 pri lýze membrány endozómu, uvoľnení vírusového genómu do cytoplazmy bunky a jeho transportu pozdĺž mikrotubulov k jadrovému póru.

3.5 Replikácia papilomavírusov

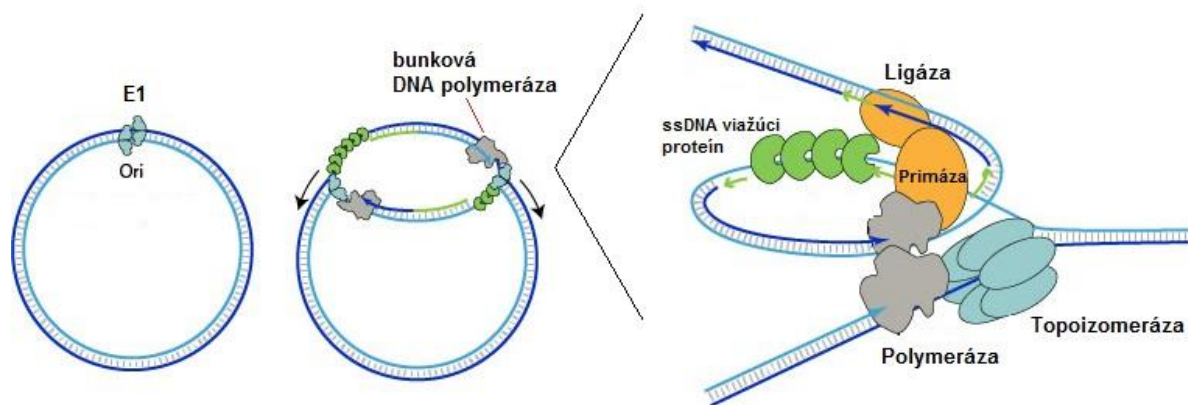
Nakoľko papilomavírusy nekódujú vlastnú DNA polymerázu, k replikácii vírusovej DNA dochádza len počas S fázy bunkového cyklu, kedy sú aktívne bunkové enzýmy a faktory zúčastňujúce sa syntézy hostiteľskej DNA. Zo strany vírusu sa na regulácii ich genómovej replikácie podieľajú neštruktúrne proteíny E1 a E2.

Replikácia papilomavírusov je rozdelená na 2 fázy, ktoré sú viazané na stupeň diferenciácie bunky a sú pomenované "plazmidová replikácia" a „vegetatívna replikácia“.

Plazmidová replikácia - taktiež označovaná aj ako "epizomálna replikácia" nastáva v nediferencovaných keratinocytoch. V tejto fáze niekoľko kópií E1 proteínu rozoznáva a viaže *ori* sekvenciu v LCR. V rovnakom čase E2 proteín nasadá na špecifické sekvencie v blízkosti Ori a vytvára komplex s E1, čím zvyšuje afinitu E1 k Ori. E1 svojou helikázovou aktivitou spôsobuje rozpletenie dsDNA, zároveň viaže komplex bunkovej DNA polymerázy s primázou a navedie ich k vírusovému počiatku replikácie. Následne nastáva obojsmerná syntéza nového vlákna vírusovej DNA, semikonzervatívnym spôsobom, pričom replikácia prebieha na cirkulárnom templaté - teda s dvoma replikačnými vidlicami (obr. 3.4). Takto dochádza k produkcii 50-400 kópií vírusovej DNA v bunke. V priebehu ďalšieho delenia infikovanej bunky na dcérske bunky sa pomocou E1 a E2 proteínov tento počet genómov udržiava v rovnakom množstve, keďže sa vírusová DNA delí synchronne s infikovanou bunkou. Distribúcia novovznikajúcich vírusových epizómov je zabezpečená väzbou vírusového genómu na mitotický chromozóm bunky počas jej delenia. Táto väzba je sprostredkovaná E2 proteínom, ktorý interaguje s oblasťou MME (lokalizovanou v LCR papilomavírusovej DNA) a zároveň cez Brd4 aj so sekvenciou na chromozomálnej DNA.

Vegetatívna replikácia - prebieha v diferencovaných keratinocytoch. Zároveň s neskorou transkripciou (aktivovanou z E2-nezávislého neskorého promotora) dochádza k

produkcii menšieho množstva transkriptov, z ktorých vznikajú proteíny E1 a E2. Tieto spolu s bunkovou DNA polymerázou a ďalšími faktormi, počas vírusom indukovanej S fázy bunkového cyklu, zabezpečia produkciu veľkého počtu vírusových genómov (vyše 1000 kópií). Tieto genómy asociujú s histónmi a spolu so štruktúrnymi proteínmi L1 a L2 sú zbaľované do nových vírusových častíc.



Obr. 3.5 - Seminkonzervatívna obojsmerná replikácia cirkulárnej DNA papilomavírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

3.6 Vplyv papilomavírusovej infekcie na hostiteľa

Na rozdiel od polyomavírusov, papilomavírusy za istých podmienok dokážu transformovať bunky prirodzeného hostiteľa. Primárnym zámerom papilomavírusov však nie je indukcia malignít, ale replikácia vlastného genómu so zavŕšením infekčného cyklu. Na umožnenie svojej replikácie v nedeliacich sa bunkách musia vírusy zasiahnúť do regulačných dráh bunkového cyklu, ako to bolo spomínané v predchádzajúcich podkapitolách. Ak je replikačný cyklus úspešne dokončený, infikované bunky hynú a transformácia nenastáva. Môže však nastať aj situácia, keď sa vírusový genóm náhodne integruje do hostiteľskej DNA, čím často dochádza k narušeniu časti vírusového genómu, ktorý potom nie je schopný dokončiť replikačný cyklus za lýzy infikovaných buniek a následkom týchto dejov môže bunka podľahnúť transformácii. V tomto procese zohráva dôležitú úlohu súhra dvoch papilomavírusových génových produktov - E6 a E7. Integrácia genómu HPV zvykne byť sprevádzaná deléciou značnej časti vírusovej DNA, väčšinou sa zachová oblasť LCR so sekvenciami v jej blízkosti (L1, LCR, E6, E7) a narušené či neprítomné sú gény ležiace na opačnej strane cirkulárneho genómu - E1-E5, L2. Pri absencii E2 proteínu, ktorý je negatívnym regulátorom expície E6 a E7, sa množstvo oboch vírusových onkogénov zvýši 10-20 násobne. Zasiahnuté bunky zároveň neprodukujú infekčný vírus, nedochádza k ich lýze a aktivita proteínov E6 a E7 vedie bunku na cestu transformácie.

Druhým spôsobom, akým integrácia HPV genómu môže navodiť transformáciu

buniek, je inzercia do blízkosti proto-onkogénu c-Myc, čím sa zvýši jeho expresia. Tento jav bol zaznamenaný u 10% rakoviny krčka maternice.

Objav vysokorizikových HPV ako etiologického agensu rakoviny krčka maternice v roku 1983 nasledoval veľký záujem o štúdium papilomavírusov. Celosvetovo je každý rok diagnostikovaných približne 500 000 nových prípadov HPV-asociovaného cervikálneho karcinómu. Vysokorizikovými v tomto smere je cca 15 typov HPV, spomedzi nich k najznámejším patria HPV-16 a HPV-18. V USA bola zistená 30% prevalencia HPV a v Afrike, Južnej Amerike a Juho-východnej Ázii je HPV ešte rozšírenejším. Papilomavírusy sú nutnou, ale nie postačujúcou podmienkou vzniku nádorov, nakoľko približne len jednému percentu žien infikovaných "high risk" HPV je diagnostikovaný cervikálny karcinóm. K jeho vzniku prispievajú aj ďalšie faktory (fajčenie, UV, promiskuita a iné). Podľa WHO (Svetová zdravotnícka organizácia) je výskyt HPV infekcie detegovaný pri rakovine krčka maternice až v 99,7% prípadov. Tento typ rakoviny je asociovaný s narušením funkcie p53, avšak mechanizmus jeho deregulácie je rozdielny v závislosti od toho, či sa na procese onkogenézy podieľa HPV alebo nie. Vznik HPV-negatívneho cervikálneho karcinómu nastáva následkom mutácie p53, mutované formy p53 sú dominantné nad divým typom p53 a potláčajú jeho funkciu. Iný mechanizmus sa uplatňuje v HPV-pozitívnych karcinómoch, v ktorých nie je p53 mutovaný, ale vo zvýšenej miere degradovaný a preto nemôže plniť svoju funkciu.

Zhrnutie charakteristík papilomavírusov

- **malá neobalená častica obsahuje genóm tvorený malou cirkulárnou dsDNA organizovanou v podobe tzv. minichromozómu**
- **v genóme sú prítomné dva promótoary a dva polyadenylačné signály, transkripcia prebieha len z jedného vlákna DNA**
- **regulačná oblasť obsahuje Ori, promótoary a enhancery**
- **iniciácia skorej a neskej transkripcie aj "plazmidovej" a "vegetatívnej" replikácie závisí od diferenciačného stavu epiteliálnej bunky**
- **alternatívny zostrih**
- **nekódujú vírusovú DNA polymerázu**
- **génová expresia aj replikácia vírusu je závislá od enzymatickej výbavy bunky**
- **E1 a E2 proteíny sa podieľajú na replikácii vírusového genómu**
- **proteín E6 spôsobuje degradáciu p53 a proteín E7 dereguluje pRb**
- **sú pôvodcami benígnych bradavíc na koži a slizniciach**
- **môžu transformovať bunky, väčšinou tomu predchádza integrácia vírusového genómu do DNA hostiteľskej bunky**

4 ADENOVÍRUSY

Adenovírusy boli po prvýkrát izolované v roku 1953 z tkaniva nosných mandlí chorých detí. V priebehu nasledujúcich rokov do tejto čeľade pribúdali zástupcovia, ktorí sú pôvodcami ochorení ľudí, opíc, hospodárskych zvierat, vtákov, plazov aj rýb. Adenovírusy sú etiologickým agensom respiračných ochorení, konjunktivitíd, infekcií gastrointestinálneho traktu a pečene.

Experimentálne sa potvrdilo, že ľudský adenovírus typu 12 (HAdV-12) dokáže indukovať malígne tumory u škrečkov. Išlo o prvý humánny vírus, u ktorého bol dokázaný onkogénny potenciál. Napriek tomu, že neboli dôkazy o jeho asociácii s nádormi u ľudí, adenovírusy sa stali modelom štúdia molekulárnej podstaty vzniku rakoviny. Ich následný rozsiahly výskum odhalil principiálne mechanizmy génovej expresie v cicavčích bunkách a viedol k objaveniu RNA zostrihu (Sharp a Roberts, 1977). Ako sa neskôr ukázalo, kauzálna súvislosť medzi HAdV a nádormi u ľudí nebola dokázaná preto, lebo tieto vírusy nevyvolávajú nádory v organizme prirodzeného hostiteľa. Sú schopné viesť k vzniku nádorov len u neprirodzených hostiteľov, akým je škrečok pre HAdV-12, a ich vývoju prechádza integrácia vírusového genómu do DNA hostiteľa. V dnešnej dobe sú adenovírusy dôležitými vektormi génovej terapie a sľubnými nástrojmi onkolytickej protinádorovej liečby.

V súčasnosti je známych vyše 60 rôznych subtypov ľudských adenovírusov, ktoré sú rozdelené do skupín A-G podľa podobnosti ich genómovej sekvencie, tropizmu, onkogénneho potenciálu v hlodavcoch a schopnosti replikácie v bunkových kultúrach (tab. 4.1).

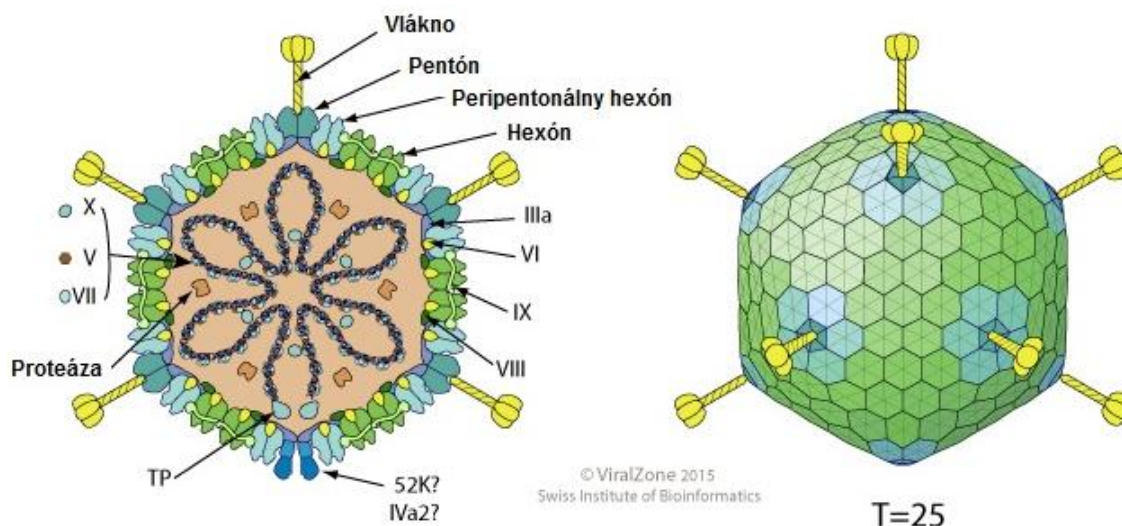
Tab. 4.1 - Najvýznamnejšie adenovírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

Vírus	Ochorenie
Ľudský adenovírus 12, 18, 31	Črevné infekcie
Ľudský adenovírus 1, 2, 5, 6, 16, 21, 34	Akútne respiračné ochorenia
Ľudský adenovírus 4	Konjunktivitídy

4.1 Štruktúra viriónu

Adenovírusové častice sú neobalené, sférické, s priemerom približne 90 nm. Na dvanástich vrcholoch ikozaedrálného kapsidu sa nachádzajú vlákna vyčnievajúce do priestoru, ktoré v závislosti od zástupcu môžu dosahovať dĺžku 9-77 nm. Kapsid pozostáva z 11 vírusových proteínov označených rímskymi číslicami. V jeho vnútri je uložená vírusová dvojitá DNA asociovaná s tromi štruktúrnymi proteínmi (V, VII, X) a terminálnym proteínom (TP). Proteín VII je podobný histónom, zabezpečuje kondenzovanie a zvinutie

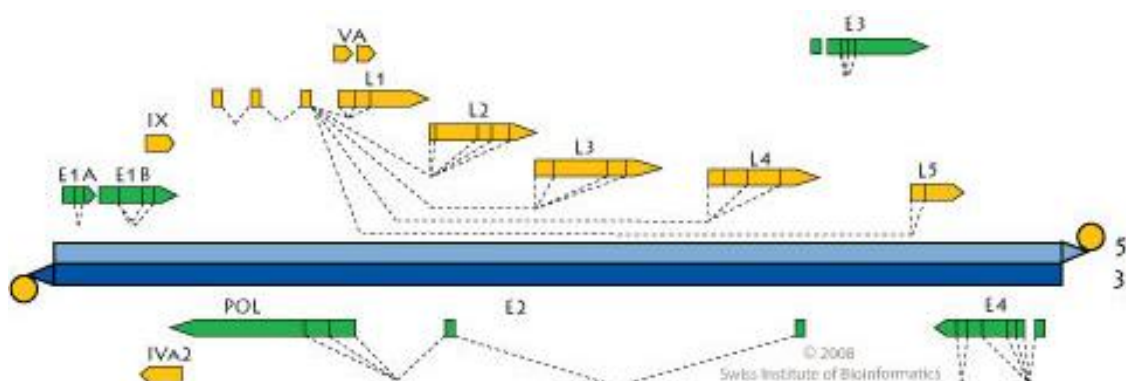
vírusovej DNA. TP je prítomný v dvoch kópiách, lebo je naviazaný iba na koncoch genómu. Obe jeho molekuly dokážu navzájom interagovať nekovalentnými väzbami, čím udržiavajú genóm v kvázi-cirkulárnej podobe (obr. 4.1).



Obr. 4.1 - Štruktúra viriónu adenovírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

4.2 Organizácia genómu adenovírusov

Genóm adenovírusov je tvorený lineárnou, dvojvláknovou DNA, dlhou 35-38 kbp. Na koncoch sú prítomné obrátené terminálne repetície (ITR) o veľkosti 36-200 bp, ktoré slúžia ako počiatky replikácie pri syntéze nového vlákna vírusovej DNA.



Obr. 4.2 - Organizácia genómu adenovírusov
Skoré (E) gény sú znázornené zelenou farbou, neskoré (L) gény žltou farbou.
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Ak je vírusová dsDNA rozpletená na jednovláknovú formu, vďaka komplementarite ITR sekvencie na oboch koncoch vlákna dochádza k párovaniu báz a vytvoreniu tzv.

panvicovitej štruktúry. Oba 5'-konce genómu sú kovalentne viazané na serín terminálneho proteínu, ktorý má pri replikácii adenovírusového genómu funkciu primera. Medzi ITR a prvou proteín-kódujúcou oblasťou genómu sa nachádzajú repetície označované aj ako "pac" sekvencie, ktoré sú zodpovedné za zbaľovanie genómu do novovznikajúcej vírusovej častice. Všetky adenovírusy kódujú 3 vírusové proteíny nevyhnutné pre replikáciu ich DNA - terminálny proteín, vírusovú DNA polymerázu a proteín viažúci jednovláknovú DNA (SSBP). Každý gén kóduje sadu niekoľkých proteínov (obr. 4.2).

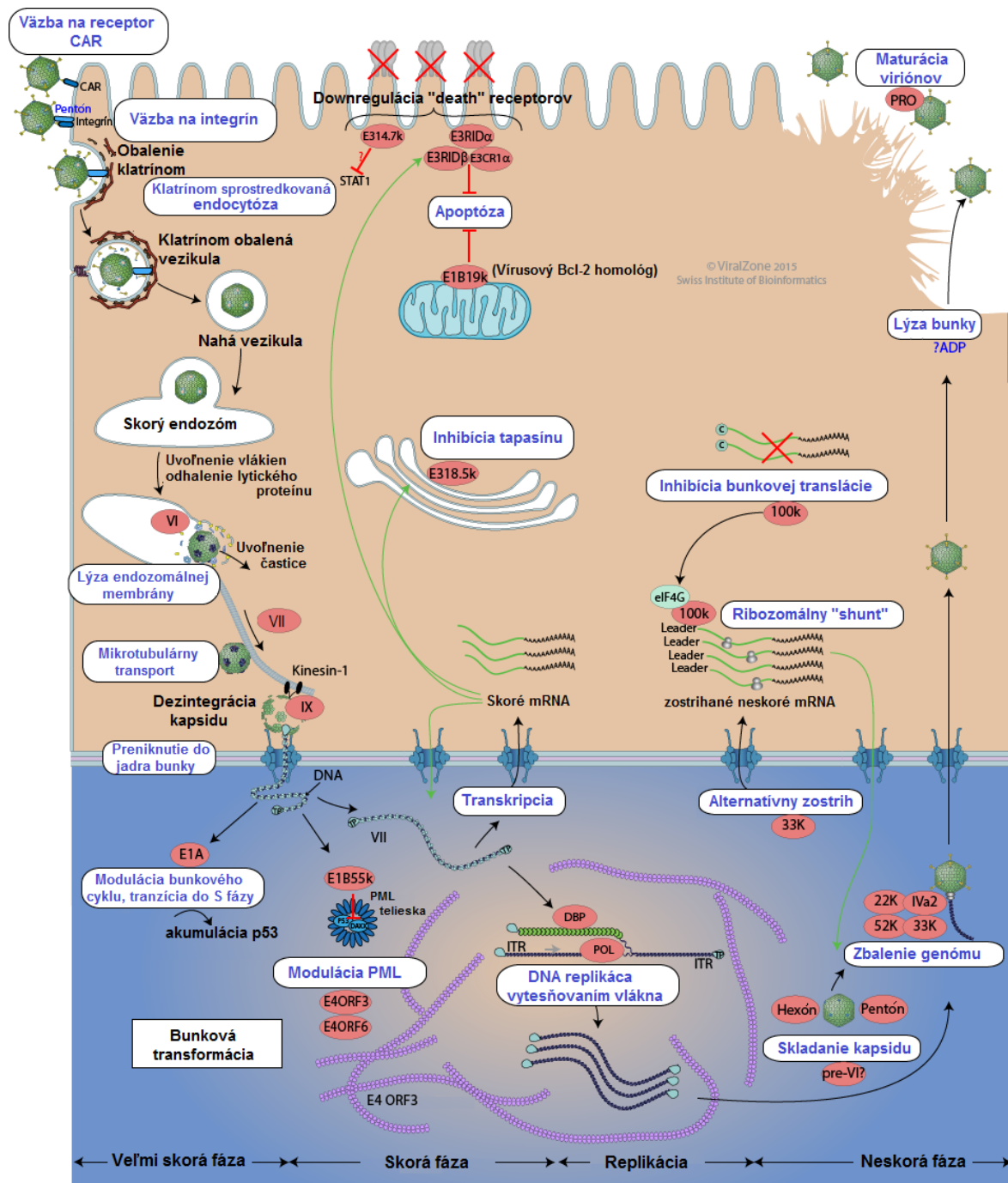
4.3 Infekčný cyklus adenovírusov

Prvým krokom infekčného cyklu adenovírusov (obr. 4.3) je väzba vláknitého výbežku viriónu na receptor CAR alebo CD46 na povrchu bunky. K následnej internalizácii vírusovej častice dochádza jedine po interakcii pentónovej bázy so sekundárnym receptorom, ktorým zvykne byť alfa-integrín. Virión sa prostredníctvom klatrínom-obalených vezikúl dostáva do endozómu. Nízke pH v endozóme spôsobuje destabilizáciu kapsidu a uvoľnenie lytického proteínu VI, ktorého aktivita vedie k narušeniu endozomálnej membrány. Vďaka tomu sa vírusový kapsid dostáva do cytoplazmy a dyneín-sprostredkovaným transportom po mikrotubuloch, za účasti proteínu VII, sa dostáva k jadrovému póru, kde je kapsid dezintegrovaný a vírusová DNA je uvoľnená do jadra bunky. Tu dochádza k transkripcii skorých génov (E) hostiteľskou RNA polymerázou II. Adenovírusová infekcia vedie k inhibícii replikácie bunkovej DNA, ale aj syntézy hostiteľských mRNA a proteínov. Skoré proteíny zabezpečujú replikáciu vírusovej DNA mechanizmom vytesňovania vlákna („strand displacement“). Následne sú transkribované neskoré gény (L) kódujúce štruktúrne proteíny. Tie sa za asistencie vírusom kódovaných neštruktúrnych proteínov s funkciou šaperónov formujú do podoby kapsidu, do ktorého je zbalená vírusová DNA. Maturované virióny opúšťajú hostiteľskú bunku lytickou cestou. Lýza bunky je iniciovaná adenovírusmi kódovanými viroporínmi.

4.4 Expresia génov u adenovírusov

Bolo dokázané, že po vstupe vírusovej DNA do jadra sú bunkové históny asociované s vírusovým genómom a teda nahrádzajú proteín VII. Transkripcia adenovírusov prebiehajúca v jadre bunky má dve fázy - skorú a neskorú, napriek tomu, že prepis skorých a neskorých génov sa môže časovo prelínať. V prípade niektorých adenovírusov boli zadefinované aj intermediálne gény. Vo všeobecnosti, genóm je usporiadaný do konzervovaného setu piatich skorých transkripčných jednotiek, kódujúcich skoré E proteíny, a jednej neskorkej transkripčnej jednotky, z ktorej je generovaných päť mRNA (L1-L5), nesúcich informáciu pre

vznik štruktúrnych proteínov. Skoro všetky gény sú prepisované hositeľskou RNA polymerázou II, vzniká niekoľko prekursorových mRNA, ktoré sú alternatívnym zstrihom upravené na viac rôznych mRNA, so štruktúrou čiapočky na 5'-konci a polyadenylovaných na 3'-konci, kódujúcich spolu okolo 50 adenovírusových proteínov. S vírusom-asociované gény (VA gény) sú vo vysokej miere transkribované RNA polymerázou III a výsledným produktom sú VA RNA, ktoré sa podieľajú na regulácii translácie tým, že inhibujú interferónom indukovanú PKR kinázu.

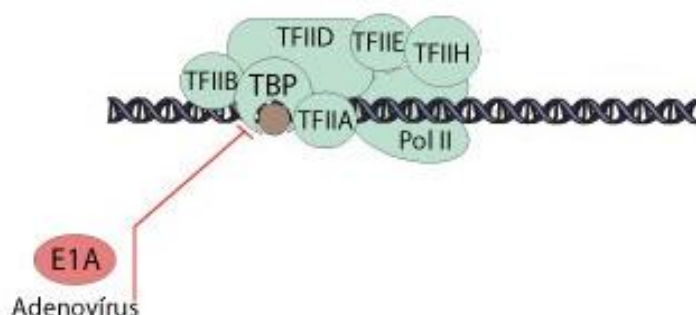


Obr. 4.3 - Infekčný cyklus adenovírusov
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

4.4.1 *Expresia skorých génov a funkcia skorých proteínov adenovírusov*

Úlohou skorej fázy génovej expície je najskôr indukcia S fázy bunkového cyklu, ktorá predstavuje najvhodnejšie bunkové mikroprostredie pre replikáciu vírusového genómu. Druhým cieľom je syntéza vírusových produktov (E1A, E1B, E3 a VA RNA) schopných uchrániť infikovanú bunku pred rozpoznáním a aktivitami imunitného systému. V neposlednom rade, počas skorej fázy vznikajú génové produkty nevyhnutné pre replikáciu vírusovej DNA. Ako bolo spomínané, adenovírusy dokážu inhibovať expresiu bunkových génov, čím zvyšujú efektivitu a výťažok syntézy vírusových produktov. Ich stratégiou je blokovanie funkcie hostiteľského TATA-viažúceho proteínu (TBP), ktorý je súčasťou eukaryotického transkripčného iniciačného komplexu (obr. 4.4).

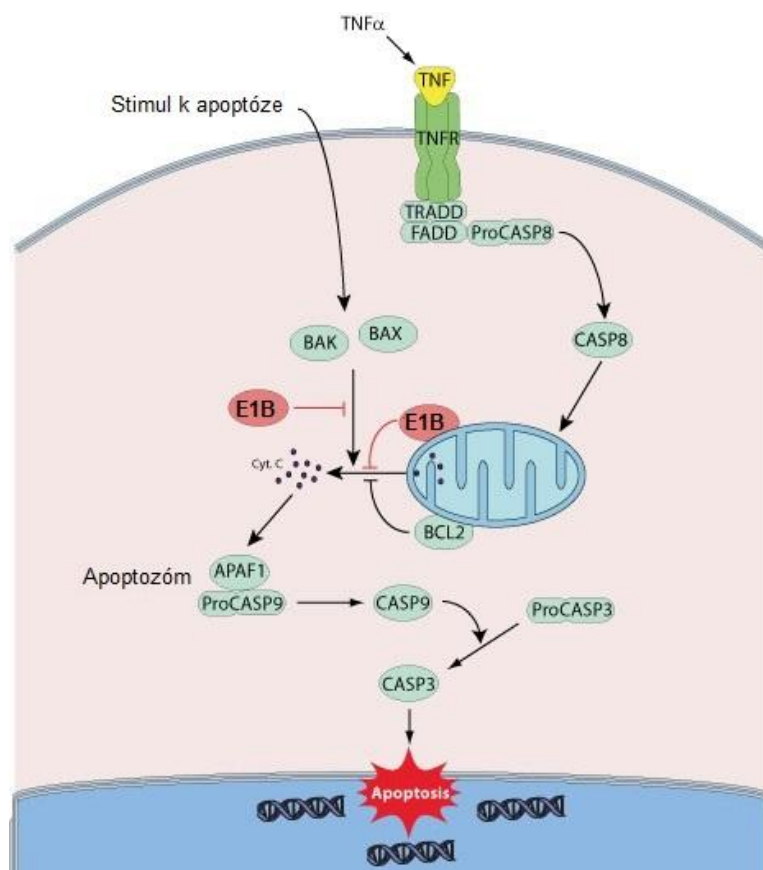
Transkripcia skorých vírusových génov prebieha po celej dĺžke genómu, z oboch vláskien a každý gén má svoj vlastný promótor. Využitím alternatívneho splicingu a rôznych polyadenylačných signálov vzniká viacero mRNA, ktoré sa v cytoplazme translatujú na skoré E proteíny. Vírusové skoré mRNA sú v tejto fáze infekčného cyklu translatované zároveň s bunkovými mRNA.



Obr. 4.4 - Inhibícia iniciácie bunkovej transkripcie
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

E1A - je prvý transkribovaným génom počas infekcie adenovírusmi, vďaka silnému enhanceru ležiacemu 500 bp pred ("upstream") jeho promótorom, aktivitu ktorého svojou väzbou regulujú iba bunkové transkripčné faktory. Z toho dôvodu je E1A často označovaný aj ako veľmi skorý gén. Alternatívnym zostrihom vznikajú dve formy mRNA, ktoré sú translatované do podoby proteínov zdieľajúcich C-terminálny koniec - veľký (289R) a malý (243R) E1A. Veľký E1A má 4 konzervované domény - CR1-CR4, kým malému E1A chýba doména CR3. Napriek tomu, že E1A nedisponuje DNA-viažúcou aktivitou, pôsobí ako transkripčný transaktivátor vďaka interakcii s transkripčnými faktormi (napríklad p300/CBP, ATF), ktoré sa viažu na vírusové skoré promótory. Transaktivuje transkripciu ďalších skorých génov E1B, E2, E3, E4, niektorých bunkových génov a zároveň aktivuje prepis vlastného génu E1A, teda má autoregulačnú funkciu. Doména CR3 obsahujúca motív zinkového prstu, sa nachádza len u veľkého E1A a je zodpovedná za väzbu TBP, čím spôsobuje inhibíciu

bunkovej transkripcie (obr. 4.4). V doménach CR1 a CR2 sa nachádzajú väzobné miesta pre pRb. Vďaka tejto interakcii vedú adenovírusy (mechanizmom opísaným u polyomavírusu a papilomavírusov) navodiť syntézu DNA v nedeliacich sa bunkách a umožniť im vstup do S fázy bunkového cyklu. Nepriamym dôsledkom tohto procesu je transformácia nepermissívnych buniek, vďaka čomu E1A získal označenie onkogén. E1A proteíny sú schopné interagovať aj s bunkovými histón acetyltransferázami a CREB-viažúcim proteínom (CBP), čím ovplyvňujú aktivitu bunkových promótorov.



Obr. 4.5 - Inhibícia apoptózy E1B - adenovírusovým homológom Bcl-2
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

E1B - aj z tohto génu vznikajú dva rôzne proteínové produkty, veľký (55 kDa) a malý (19 kDa) E1B. Druhý menovaný vykazuje podobnú funkciu ako antiapoptotický proteín Bcl-2, viaže sa na Bax a v infikovanej bunke inhibuje apoptózu (obr. 4.5). Veľký E1B interaguje s tumor-supresorovým proteínom p53, viaže sa na jeho N-terminálnu doménu zodpovednú za jeho transkripčnú aktiváciu, čím inaktivuje jeho funkciu a následkom je vstup bunky do S fázy bunkového cyklu. V spolupráci s ďalším vírusovým proteínom, E4-ORF6 (34 kDa), tvoria E3 ubikvitín ligázový komplex, ktorý vedie k ubikvitinylácii a SUMOylácii p53, čo rezultuje proteolytickou degradáciou p53 v proteazóme. Kooperácia týchto dvoch

adenovírusových proteínov kontroluje aj export neskorých mRNA z jadra do cytoplazmy, kým bunkové mRNA sú zadržované v jadre. Veľký E1B humánných adenovírusov zohráva dôležitú úlohu pri transformácii buniek hlodavcov - proces, pre ktorý je nevyhnutná ko-expressia E1B s E1A. Existuje tu paralela s papilomavírusmi, kde bola k transformačnému procesu tiež potrebná súhra dvoch vírusových produktov.

E2 - gén kóduje kľúčový komplex proteínov nevyhnutných pre replikáciu vírusového genómu. Z dlhej prekursorovej RNA sú zostrihom generované rôzne formy mRNA, ktoré dávajú vznik trom proteínom. E2A je mnohonásobne fosforylovaný proteín na svojom N-terminálnom konci a vie sa naviazať na jednovláknovú DNA. Táto jeho schopnosť je potrebná počas replikácie vírusovej DNA, keď nasadá na ssDNA vlákno, čím ho chráni pred degradáciou alebo tvorbou duplexu. Oblasť E2B kóduje dva proteíny - terminálny proteín TP a vírusovú DNA polymerázu.

E3 - gén E3 kóduje súbor menších proteínov, ktoré nie sú esenciálne pre replikáciu vírusu a preto sa táto časť adenovírusového genómu často využíva pri inzercii cudzorodých génov pri konštrukcii adenovírusových vektorov. Niektoré E3 sa zúčastňujú na redukcii množstva MHC molekúl I triedy na povrchu bunky, čím blokujú rozpoznanie a elimináciu infikovaných buniek cytotoxickými T lymfocytmi. Ďalšie E3 proteíny sú antagonistami TNF- α -sprostredkovej indukcie apoptózy, vedú k internalizácii a následnej degradácii EGFR aj TNF receptora alebo sa podieľajú na lýze infikovaných buniek.

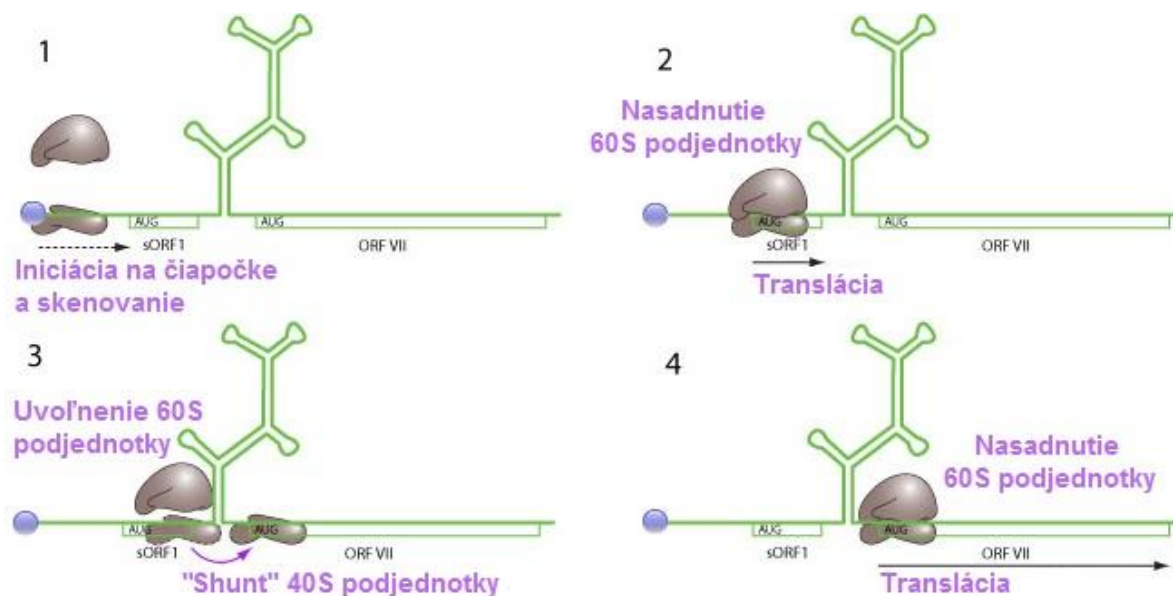
E4 - tento gén tiež kóduje set proteínov - E4-ORF1 až E4-ORF7. Niektoré formy proteínov stabilizujú neskoré vírusové transkripty, zabezpečujú ich transport z jadra do cytoplazmy, bránia vzniku konkatemérov počas replikácie vírusového genómu, viažu sa na proteín fosfatázu 2A (PP2A), čím ovplyvňujú fosforylačný status vírusových aj bunkových proteínov (napríklad faktorov zúčastňujúcich sa na zostrihu RNA).

4.4.2 Expresia neskorých génov a funkcia neskorých proteínov adenovírusov

Viac ako polovica genómu je určená na expresiu neskorých proteínov adenovírusov. Neskoré gény majú spoločný hlavný neskorý promótor ("major late promoter"), sú prepisované len z jedného vlákna vírusovej DNA a ich mRNA majú spoločný 5'-koniec. Počas skorej fázy je síce neskorý promótor aktívny, ale len vo veľmi redukovanej hladine, transkripcia je predčasne ukončená a vzniká len minimálne množstvo L1 mRNA.

K aktivácii neskej transkripcie v plnom rozsahu dochádza až po iniciácii replikácie vírusovej DNA. V tomto čase všetky neskoré mRNA vznikajú z jedného dlhého 29 kb prekursorového transkriptu. Z neho vzniká päť skupín neskorých mRNA, označených L1 až L5, ktoré sú zadefinované podľa piatich poyladenylačných miest. Každý primárny transkript prepisovaný z hlavného neskorého promótora je štiepený v jednom z týchto piatich miest a vzniknuté polyadenylované RNA sú zostrihom upravené na 18 možných typov neskorých

mRNA. Každá mRNA nesie identickú nekódujúcu tripartitnú "leader" sekvenciu dlhú približne 200 nukleotidov, ktorá za pomoci E1B s E4-ORF6 zabezpečuje efektívny transport neskorých mRNA do cytoplazmy k translácii.



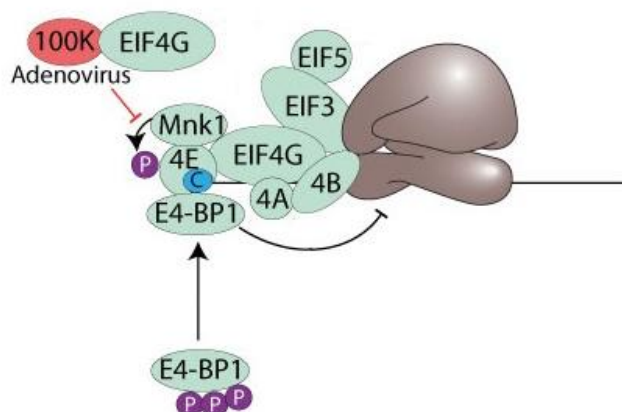
Obr. 4.6 - Ribozomálny "shunting" ako mechanizmus translácie neskorých adenovírusových mRNA
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Keďže adenovírusy defosforylujú bunkový translačný iniciačný faktor eIF4E, čím inhibujú jeho aktivitu a tým aj schopnosť rozoznávať čiapočku na 5'-konci transkriptov a riadiť následné skenovanie 40S ribozomálnej podjednotky po mRNA, translácia bunkových mRNA je efektívne blokováná. Tripartitný "leader" na vírusových mRNA umožňuje tzv. ribozomálny "shunting" a selektívnu transláciu vírusových transkriptov. "Shunting" (premostenie, posunutie) je riadený sekundárnou vlásenkovou štruktúrou v oblasti "leader" sekvencie vírusovej mRNA, ktorá je komplementárna s 18S RNA (súčasť 40S ribozomálnej podjednotky). Vlásačka spôsobuje, že po prvotnom naviazaní 40S podjednotky na 5'-čiapočku mRNA, ribozóm diskontinuálne skenuje po mRNA, je presunutý priamo k iniciačnému kodónu, od ktorého začína syntéza proteínov (obr. 4.6). Ribozomálny "shunt" môže byť vo všeobecnosti závislý alebo nezávislý od účasti vírusových proteínov na tomto procese. V prípade adenovírusov sa jedná o aktivitu nezávislú od iných vírusových produktov.

Neskoré gény väčšinou kódujú štruktúrne proteíny, ale sú medzi nimi aj produkty s funkciou šaperónov (tzv. "scaffolding" proteíny), proteáza a iné faktory podieľajúce sa na skladaní a zbalení vírusových častíc.

Niektoré vírusové štruktúrne proteíny (IV, VI, VII, VIII, Mu) sú syntetizované ako veľké prekursorové proteíny, ktoré musia byť následne proteolyticky štiepené vírusovou proteázou

adenaínom počas skladania vírusového kapsidu. Adenaín je papaínu-podobná cysteinová proteáza, ktorej aktivita je nevyhnutná pre maturáciu a infekčnosť novovznikajúcich viriónov. K neskorým neštruktúrnym proteínom patrí aj metylovaný L4-100K, ktorý sa viaže s faktorom eIF4G, čím blokuje jeho väzbu s kinázou Mnk1, výsledkom čoho je defosforylácia faktora eIF4E a následná inhibícia translácie bunkových mRNA (obr. 4.7).



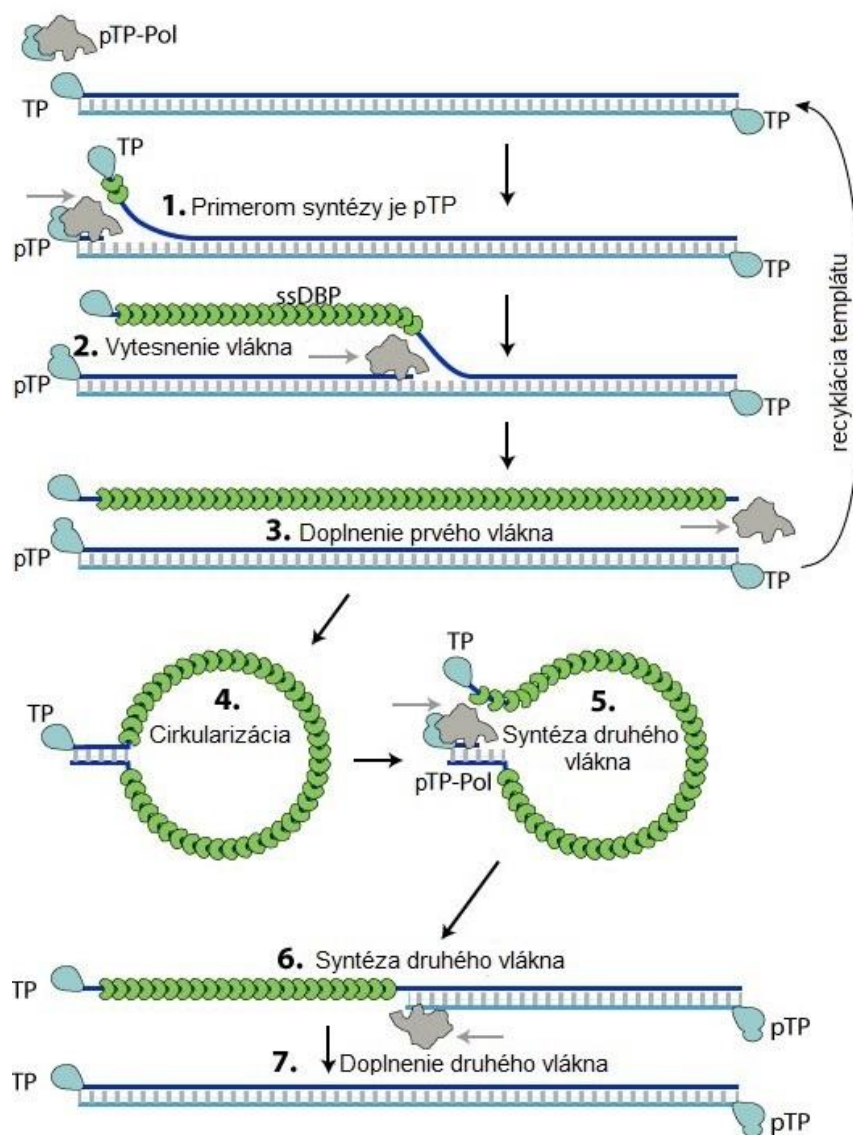
Obr. 4.7 - Inhibícia translácie bunkových mRNA adenovírusovým proteínom L4-100K
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

4.5 Replikácia adenovírusov

Na replikáciu vírusového genómu, ktorá začína približne 6 hodín po infekcii bunky, sú nevyhnutné 3 vírusové proteíny kódované skorým genómom E2 a preto môže byť iniciovaná až po skoršej transkripcii. Replikácia prebieha semikonzervatívne, avšak bez syntézy Okazakiho fragmentov, mechanizmom označovaným ako "strand displacement" - replikácia vytesňovaním vlákna (obr. 4.8).

Replikačným počiatkom sú repetície v ITR oblasti genómu. Celý proces začína esterifikačnou reakciou, počas ktorej sa molekula dCMP kovalentne viaže na hydroxyl serínového zvyšku prekursorového terminálneho proteínu (pTP) nachádzajúceho sa na 5'-konci vírusovej DNA. Vzniká komplex s vysokou afinitou k vírusovej DNA polymeráze, ktorý je zároveň primerom syntézy DNA iniciovanej na 3'-OH skupine dCMP. Na úspešnú realizáciu ďalších krokov replikácie je nevyhnutné zapojenie bunkových faktorov NF-I a NF-II s aktivitou topoizomerázy I. V prvej fáze replikácie, je rodičovské vlákno s naviazaným TP vytesnené novým narastajúcim dcérskym vláknom. Vytesňovaná jednovláknová molekula DNA je priebežne obalovaná E2A proteínmi, ktoré bránia degradácii ssDNA bunkovými nukleázami. ITR sekvencie na ssDNA hybridizujú za vzniku krátkeho úseku dsDNA, kvázi-cirkularizácie a formovania tzv. panvicovitej štruktúry DNA. Tento proces podnieti vznik nového iniciačného komplexu - dCMP-pTP/vírusová DNA polymeráza/NF-I/NF-II - a

odštartovaniu druhej fázy replikácie so syntézou druhého dcérskeho vlákna, ktorú sprevádza rozpletenie panvicovitej štruktúry a odstránenie naviazaných E2A proteínov. Na záver je pTP štiepený proteolytickým enzýmom adenainom na maturovanú formu TP, ktorá zostáva viazaná na 5'-koncoch adenovírusového genómu.



Obr. 4.8 - Replikácia adenovírusového genómu mechanizmom vytesňovaného vlákna
 TP - terminálny proteín, pTP - prekursorový terminálny proteín, ssDBP - jednovláknovú DNA viažuci proteín (E2A)

Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Výsledkom celého procesu sú dve nové molekuly dsDNA, z ktorých každá pozostáva z jedného rodičovského a jedného dcérskeho vlákna. Narozdiel od polyomavírusov a papilomavírusov, počas replikácie adenovírusov sa syntetizuje len jedno dcérske vlákno v čase, syntéza DNA je uskutočnená v časovej postupnosti v dvoch fázach a preto sa zvykne

označovať aj ako "asynchrónna replikácia". Celý replikačný proces je relatívne natoľko jednoduchý, že v prostredí s faktormi zúčastňujúcimi sa replikácie (pTP, DNA polymeráza, E2A - SDBP, NF faktory, topoizomeráza) a templátom obsahujúcim *ori* sekvenciu je možné rekonštituovať replikáciu vírusovej DNA *in vitro* v reakčnej zmesi.

4.6 Adenovírusy ako vektory

Napriek tomu, že adenovírusy kódujú onkogény (E1A a E1B) schopné transformovať bunky *in vitro* a navodiť vznik tumorov u zvierat *in vivo*, dnes už nie sú považované za rizikové z hľadiska tvorby nádorov u ľudí, lebo ich transformačný potenciál sa prejavuje len počas infekcie nepermissívnych buniek. Výhodou je ich schopnosť infikovať široké spektrum buniek, efektívna expresia svojich génov a relatívne ľahká manipulácia a úprava ich genómu. Jednoduchý mechanizmus replikácie vírusovej DNA a lokalizácia "pac" sekvencií na ľavom konci genómu umožnila vývoj adenovírusových vektorov, v ktorých môže byť skoro celá vírusová DNA nahradená cieľovým DNA inzertom. Preto sa od 90-tych rokov 20. storočia začali využívať v gémovej terapii a neskôr aj ako inovatívna protinádorová liečba.

Adenovírusy sú v gémovej terapii využívané ako vektory, ktorých úlohou je doručiť správny gén tak, aby korigoval genetické poruchy spôsobujúce ochorenia ľudí. Väčšina pripravovaných konštruktov má deletované gény E1A, E1B a E3 (prípadne niektoré ďalšie), a nie sú schopné sa replikovať v normálnych bunkách, čím sú cieľové bunky chránené pred lýzou. Pôvodne boli tieto vektory vyvinuté na liečbu cystickej fibrózy, chceli využiť tropizmus adenovírusov k respiračnému epitelu a doručiť zdravý CFTR gén do buniek pľúc pacientov postihnutých týmto dedičným ochorením. V súčasnosti sa uvažuje o využití replikačne-kompetentných vektorov ako vakcín na zvýšenie imunitnej odpovede voči želanému cieľu, ktorým v experimentálnych podmienkach boli povrchový proteín HBV, glykoproteín HSV, glykoproteín vírusu besnoty, F proteín RSV alebo niekoľko proteínov HIV.

Najnovším trendom, ktorého účinnosť je v dnešnej dobe testovaná v klinických testoch, je využitie onkolytických vlastností adenovírusov. Onkolytické vírusy dokážu lyzovať nádorové bunky, pričom rozhodujúcou pri navrhovaní terapeutických stratégií je ich schopnosť rozlíšiť zdravé bunky od nádorových a deštruovať cielene len poškodené bunky. Približne 50% všetkých humánných nádorových ochorení vzniká dôsledkom zníženého množstva funkčného proteínu p53 v bunkách. Špecificky upravený adenovírus s deléciou E1B génu sa dokáže selektívne množiť a zabíjať nádorové bunky s defektným p53, kým v normálnych bunkách sa nemnoží. Kým v Číne sa tento vírus už bežne používa v kombinácii s chemoterapiou na liečbu nazofaryngeálneho karcinómu, v iných krajinách ešte len prechádza klinickým testovaním. Dizajnovanie podobných onkolytických stratégií je nádejou najmä pre tých onkologických pacientov, ktorí sú rezistentní k samotnej chemoterapeutickej liečbe.

Zhrnutie charakteristík adenovírusov

- malá neobalená častica s typickými dvanástimi výbežkami obsahuje genóm tvorený lineárnou dsDNA
- na koncoch genómu sú obrátené terminálne repetície (ITR) a na 5'-koniec vlákien je naviazaný terminálny proteín (TP)
- skorá a neskorá transkripcia sa prelínajú, uplatňuje sa alternatívny zostrih, transkripty majú čiapočku a sú polyadenylované
- skoré gény (E) sú transkribované po celej dĺžke genómu, v oboch smeroch a majú vlastné promótoary
- neskoré gény (L) majú spoločný promótor, sú prepisované z rovnakého vlákna DNA a vzniknuté mRNA majú spoločnú tripartitnú "leader" sekvenciu
- inhibícia translácie bunkových mRNA, ribozomálny "shunt" pri translácii vírusových neskorých mRNA
- kódujú vírusovú DNA polymerázu
- asynchrónna replikácia genómu mechanizmom vytesňovania vlákna, primerom syntézy vírusovej DNA je TP
- E1A proteín viaže bunkový pRb a E1B inaktívuje p53
- súhra proteínov E1A a E1B je potrebná na transformáciu buniek
- vytvárajú nádory len u neprirodzených hostiteľov
- využitie v génovej terapii a protinádorovej liečbe

5 HERPESVÍRUSY

Herpesvírusy sú schopné infikovať širokú škálu hostiteľov počnúc lastúrnikmi a končiac človekom. Historicky bolo zaužívané zaradovanie vírusov do čeľade *Herpesviridae* na základe architektúry viriónu. Fylogenetické analýzy na základe sekvencie nukleových kyselín, ktoré sa využívajú ako nástroje vytvárania súčasnej taxonómie, poukázali na divergentnosť skupiny a tým prispeli k ich povýšeniu na rad *Herpesvirales*. Nový rad je rozdelený na 3 čeľade, ktoré zahŕňajú zástupcov infikujúcich ryby a obojživelníky (*Alloherpesviridae*), lastúrniky (*Malacoherpesviridae*), ale aj cicavcov, vtákov a plazov (*Herpesviridae*).

Tieto vírusy patria k najrozšírenejším vírusom na svete a každý živočíšny druh slúži ako hostiteľ pre jeden až niekoľko druhov herpesvírusov. Pritom máloktorý herpetický vírus infikuje viac ako jeden druh hostiteľa. V súčasnosti bolo identifikovaných a charakterizovaných vyše 200 rôznych herpetických vírusov. Napriek tomu, že len deväť z nich je patogénnych pre človeka, stali sa významnými aktérmi pri štúdiu rôznych typov vírusovej infekcie (produktívna a latentná), translokácie proteínov, génovej regulácie alebo onkogenézy.

Všetky herpetické vírusy majú spoločné biologické vlastnosti. Kódujú špecifické enzýmy potrebné pre metabolizmus nukleových kyselín (tymidínkináza, tymidylátsyntetáza, dUTPáza, ribonukleotid-reduktáza a pod.), syntézu DNA (DNA polymeráza, helikáza, primáza), modifikáciu proteínov (proteín kináza), ale aj rozsiahle spektrum imunomodulačných proteínov. Syntéza vírusovej DNA a skladanie kapsidu prebieha v jadre, kým kompletný virión vzniká v cytoplazme. Vírusy produkujú infekčné potomstvo, ktoré deštruuje infikovanú bunku (lytická infekcia). Zároveň majú herpesvírusy schopnosť celoživotne pretrvávajúť v hostiteľskej bunke v latentnej forme. Predpokladá sa, že latentnou infekciou umožnená koevolúcia herpetických vírusov s bunkami hostiteľa viedla k nadobudnutiu ich vzájomného symbiotického vzťahu. Dôkazom toho sú vedecké štúdie, ktoré identifikovali pozitívny efekt herpesvírusovej infekcie na organizmus hostiteľa, prejavujúci sa lepšou aktivitou imunitného systému cicavčieho hostiteľa a dokonca až protektívnym účinkom pred fatálnou infekciou inými (väčšinou bakteriálnymi) patogénmi.

Text v tejto kapitole sa bude zaoberať biosyntézou herpetických vírusov zaradených do čeľade *Herpesviridae* (tab. 5.1). Aj v rámci nej existujú viaceré rozdiely medzi jednotlivými zástupcami, ktoré boli predpokladom pre ich ďalšie rozdelenie na alfa-, beta- a gamaherpetické vírusy. Vírusy v týchto troch podčeľadiach sa líšia okruhom hostiteľov, tropizmom a miestom latencie. Každá podčeľaď zahŕňa niekoľko rodov, zoskupujúce vírusy s podobnou sekvenciou DNA, organizáciou genómu a príbuznosťou dôležitých vírusových proteínov.

Podčeľaď *Alphaherpesvirinae* tvoria vírusy, ktoré majú širší okruh hostiteľov, relatívne krátky replikačný cyklus, rýchlo sa šíria z bunky do bunky, deštruujú infikovanú bunku a vírus pretrváva v latentnej forme hlavne v sensorických gangliách. Pre podčeľaď *Betaherpesvirinae* je charakteristický úzky hostiteľský okruh, dlhý infekčný cyklus, pričom infikované bunky zväčšujú svoj objem (cytomegália) a latencia je viazaná na sekrečné žľazy, lymforetikulárne bunky, epitel vývodov slinných žliaz a obličiek. *Gamaherpesvirinae* majú limitovaný okruh hostiteľov a *in vitro* sa množia v lymfoblastoidných bunkách. Niektoré gamaherpesvírusy sa množia aj v epiteloidných a fibroblastových bunkách. Vírusy poslednej skupiny špecificky infikujú buď B alebo T lymfocyty. Latentnú infekciu navodzujú v lymfoidných bunkách, ktoré jej vplyvom môžu podliehať proliferácii, prípadne transformácii.

Tab. 5.1 - Najvýznamnejšie herpesvírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

Vírus	Ochorenie
Herpes simplex vírus 1 (HSV-1, HHV-1)	Orálne lézie
Herpes simplex vírus 2 (HSV-2, HHV-2)	Genitálne lézie
Ľudský cytomegalovírus (HCMV)	Infekčná mononukleóza
Varicella zoster vírus (VZV)	Ovčie kiahne, pásový opar
Epstein-Barrovej vírus (EBV)	Infekčná mononukleóza
Ľudský herpesvírus 6A a 6B (HHV-6A a -6B)	Šiesta choroba, roseola
Ľudský herpesvírus 7 (HHV-7)	Šiesta choroba, roseola
S Kaposiho sarkómom asociovaný vírus (KSHV)	Kaposiho sarkóm
Vírus Marekovej choroby (MDV)	Marekova choroba, lymfómy kurčiat
Myšací herpetický vírus 4 (MuHV-4, MHV-68)	Lymfoproliferatívne ochorenie myši
Prasací herpesvírus 1 (SuHV-1)	Aujezskyho choroba, pseudobesnota

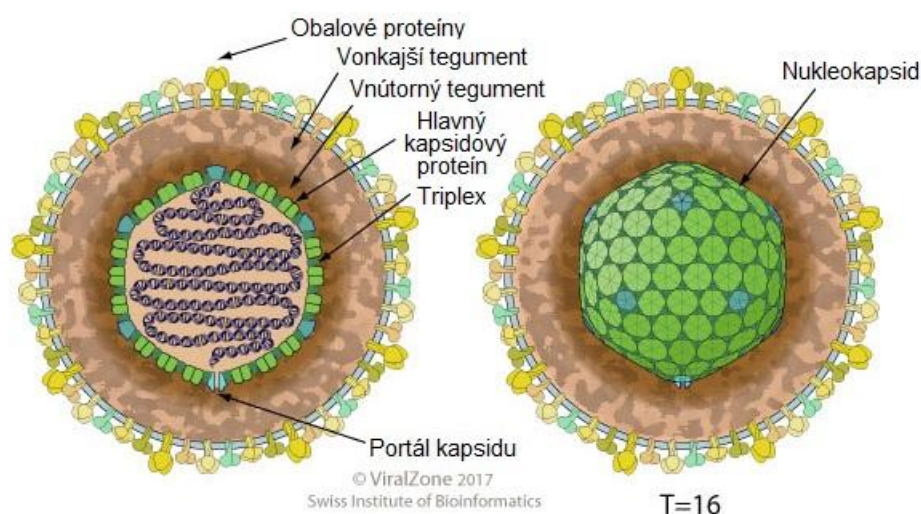
5.1 Štruktúra viriónu

Veľkosť zreých herpesvírusov závisí od hrúbky tegumentu a pohybuje sa v rozmedzí od 120 do 260 nm. Obal viriónu tvorí nepermeabilná kvázi-sférická membrána. Každý virión sa skladá z jadra, kapsidu, tegumentu a obalu (obr. 5.1).

Jadro obsahuje jednu molekulu lineárnej nechromatinizovanej vírusovej dvojvláknovej DNA, ktorá je pevne zvinutá do podoby kruhového prstenca (torus). U niektorých vírusov je torus akoby zavesený na proteínovom vretene, ktoré pozostáva z vlákien zakotvených vo vnútornej časti kapsidu a ktoré prechádzajú celým torusom. Presné uloženie a poskladanie DNA do kapsidu zatiaľ nie je úplne objasnené, avšak je známe, že proces zbalenia vírusového genómu do kapsidu vyžaduje ATP. Energia je potrebná na vytvorenie vnútorného tlaku

v jadre kapsidu, dôležitého pre vystrelenie vírusovej dsDNA cez jadrový pór počas infekcie bunky.

Kapsid je tvorený 162 kapsomérmi (150 hexónov a 12 pentónov) a má asi 100 nm. Pozostáva z minimálne štyroch rôznych vírusových proteínov, pričom jeden z nich je hlavný kapsidový proteín (VP5 u HSV-1) a je obkolesený ďalšími proteínmi vytvárajúcimi trimérne komplexy – triplexy. Neobalené kapsidy existujú v bunke v 3 rôznych formách: A-kapsidy, neobsahujú jadro; B-kapsidy majú proteínový skelet, ale neobsahujú genóm; a C-kapsidy obsahujú DNA a nemajú proteínový skelet.



Obr. 5.1 - Štruktúra viriónu herpesvírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Tegument tvorí štruktúru medzi kapsidom a obalom. Niekedy je asymetrický a jeho šírka závisí od lokalizácie viriónu v infikovanej bunke. Množstvo tegumentu je však určované vírusom a nie hostiteľom. Tegument má usporiadanú štruktúru a interaguje s kapsidom. Pri uvoľňovaní novovznikajúcej častice z jadra sa tegument obaluje druhou vrstvou a ďalšie dozrievanie viriónu prebieha v cytoplazme. Úlohou tegumentu je dopraviť do infikovanej bunky proteíny, ktoré okamžite začnú pripravovať prostredie bunky pre potreby vírusu tým, že odstavia syntézu bunkových proteínov, zablokujú obranyschopnosť bunky a stimulujú expresiu vírusového genómu (napr. proteíny VHS, VP16, VP22 u HSV-1).

Obal viriónu má typickú trojvrstvovú štruktúru a obsahuje množstvo výčnelkov – povrchových glykoproteínov, ktoré sa u herpesvírusov vyskytujú vo väčšom počte a sú kratšie ako u iných obalených vírusov. HSV obsahuje minimálne 11 glykoproteínov, pričom niektoré z nich sú prítomné v počte vyše 1 000 kópií. Súčasťou obalu herpesvírusov sú aj neglykozylované membránové proteíny.

Vírusové častice môžu obsahovať aj vírusové alebo bunkové mRNA, ktoré sú po vstupe viriónu do bunky okamžite translatované na proteíny.

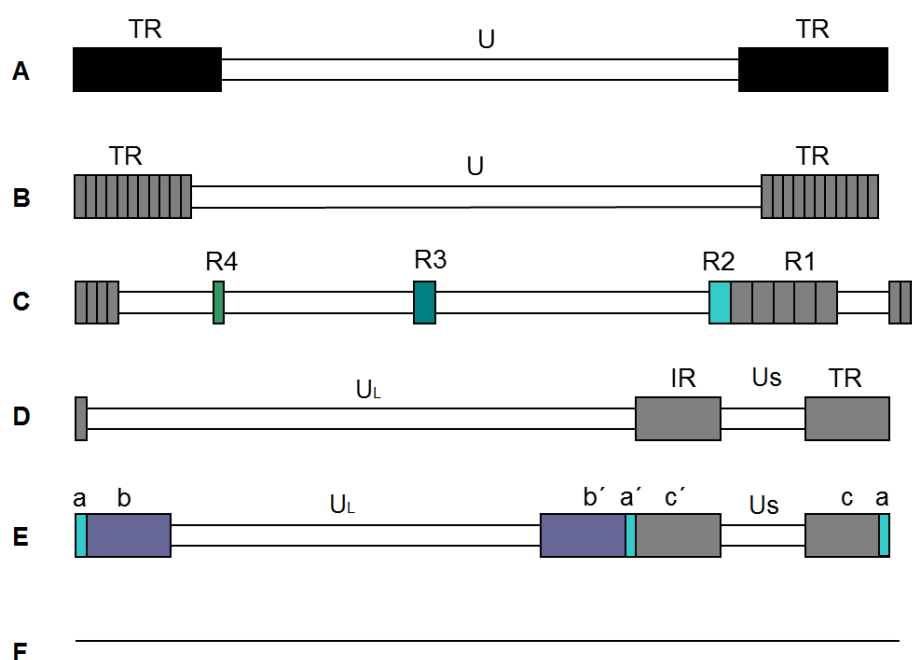
Prvé štruktúrne proteíny HSV-1, ktoré boli identifikované vo vírusovej častici, boli označené ako „VP“ („virion proteins“). Neštruktúrne proteíny, ktoré boli zistené v extraktoch HSV-1 infikovaných buniek dostali názov „ICP“ („infected cell proteins“).

5.2 Organizácia genómu herpesvírusov

Genóm herpesvírusov tvorí lineárna, dvojvláknová DNA o veľkosti 120-230 kbp, ktorá cirkularizuje a vytvára epizóm okamžite po uvoľnení z kapsidu do jadra infikovanej bunky. Dĺžka a kompozícia jednotlivých báz je určená druhom vírusu. Genóm herpesvírusov obsahuje terminálne (TR) a interné opakovania (IR) určitých sekvencií v rôznom počte kópií. Počas pasážovania herpesvírusov v bunkových kultúrach dochádza k zdublikovaniu alebo spontánnym deléciám niektorých sekvencií, ktoré sú základom vnútrodruhovej variability v dĺžke genómu medzi kmeňmi jedného vírusu. Obsah G+C báz sa pohybuje v závislosti od konkrétnych kmeňov od 31% do 77%. Dá sa povedať, že vyšší výskyt G+C báz sa nachádza hlavne v terminálnych oblastiach DNA. V týchto koncových oblastiach genómu sú prítomné aj *cis*-aktivačné signály – *pac* sekvencie – zodpovedné za vystrihnutie genómu jednotkovej dĺžky z konkatemérneho replikačného intermediátu, ale sú nevyhnutné aj pre zbalenie DNA do kapsidu.

Genómy herpesvírusov môžeme rozdeliť do šiestich skupín – A-F (obr. 5.2). Do skupiny A patrí genóm HHV-6, v ktorom sa veľká sekvencia z jedného terminálneho konca opakuje na druhom konci. Do skupiny B zaradíme genóm herpesvírusu saimiri (HVS) – terminálne sekvencie sa niekoľkokrát opakujú na oboch koncoch genómu, pričom počet repetícií sa u jednotlivých vírusov líši. Do skupiny C patrí genóm EBV, s malým počtom priamych koncových repetícií, ale obsahujúcich iné, pomerne veľké opakujúce sa 100 bp sekvencie, ktoré rozdeľujú unikátnu sekvenciu genómu na niekoľko dobre charakterizovaných úsekov. Genóm VZV patrí do D skupiny a jediná koncová repetitívna sekvencia sa nachádza v obrátenej orientácii v rámci jednej internej repetície. Genóm je tak rozdelený na dve domény, ktoré tvoria unikátne úseky DNA (malá a veľká unikátna sekvencia, U_S a U_L) ohraničené obrátenými repetíciami. DNA extrahovaná z viriónu alebo infikovanej bunky obsahuje dve ekvimolárne populácie, ktoré sa líšia v orientácii krátkeho (U_S) komponentu. Do skupiny E patria genómy vírusov HSV a HCMV, ich sekvencie opakovaní na oboch koncoch sa opakujú v obrátenej orientácii v IR a navzájom rozdeľujú genóm na dve časti, pričom každá unikátna sekvencia je ukončená obrátenými repetíciami. V tomto prípade sa môžu obe časti relatívne ľahko prevrátiť a DNA extrahovaná z viriónu alebo infikovaných buniek obsahuje 4 ekvimolárne populácie izomérnych foriem genómu, ktoré sa líšia v orientácii oboch svojich komponentov (U_S aj U_L). Genóm typu F reprezentuje genóm Tupaia herpesvírusu (TuHV-1), ktorý neobsahuje identické terminálne sekvencie a nijaké priame ani obrátené repetície. Nomenklatura génov niektorých herpetických vírusov (HSV-1 a -2) sa

riadi aj podľa ich lokalizácie v unikátnych segmentoch – sú označované ako UL1-UL56 a US1-US12.



Obr. 5.2 - Organizácia genómov herpesvírusov

TR – terminálne repetície, U – unikátna sekvencia, R – repetícia, IR – interná repetícia, U_L – dlhá unikátna sekvencia, U_S – krátka unikátna sekvencia

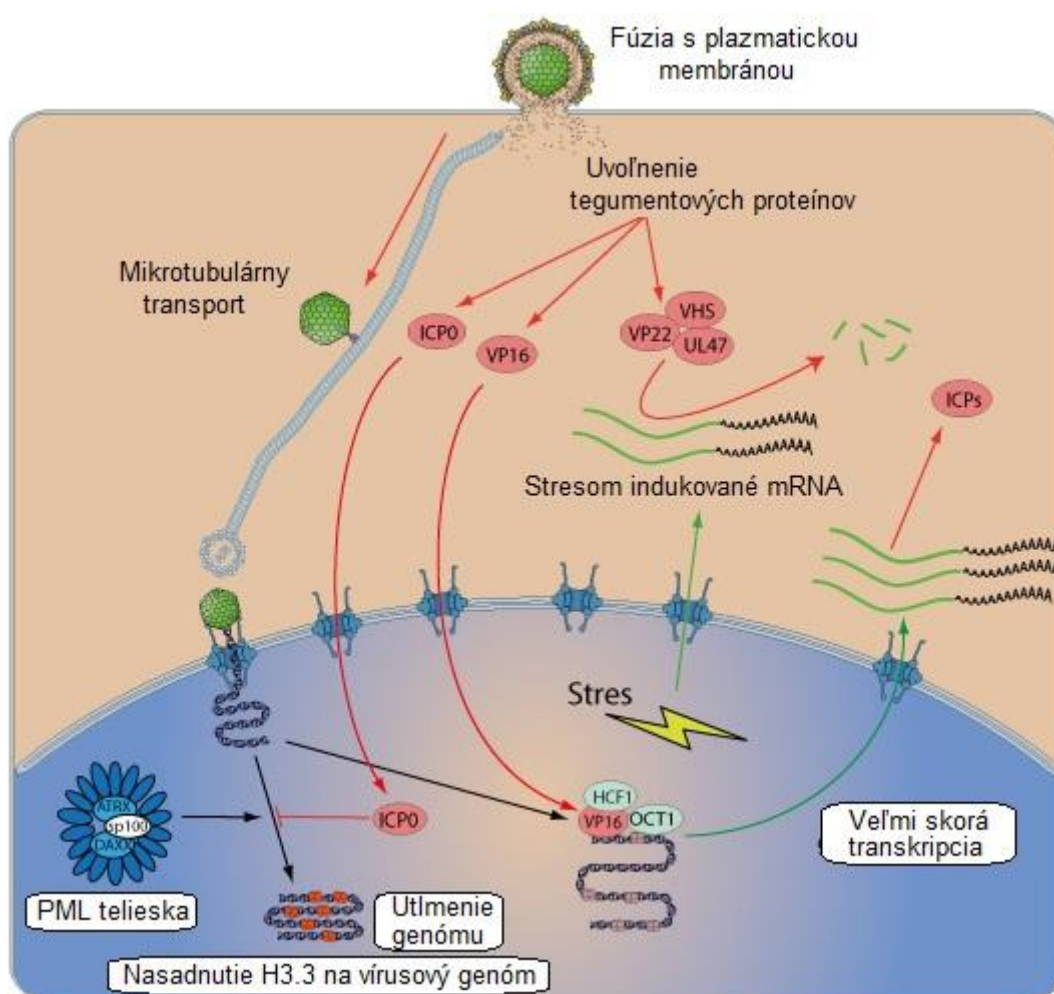
DNA herpesvírusov v závislosti od svojej veľkosti kóduje od 70 po 200 proteínov. Proteín-kódujúce sekvencie sa nachádzajú na oboch vláknach DNA, a preto sa môžu niektoré gény prekryvať najmä v promótorových sekvenciách. Väčšina herpesvírusových génov má 50-200 bp pred TATA boxom regulačné sekvencie a promótor rozpoznávaný hosťateľskou RNA polymerázou II. Iničiálne miesto transkripcie sa nachádza 20-25 bp za TATA boxom a gény sú ukončené polyadenylačným signálom. V genóme HSV-1 boli identifikované aj výnimky, gény bez TATA boxu, u ktorých iniciácia translácie potom začína až od druhého metionínu, prípadne gény s promótor-regulačnými sekvenciami umiestnenými za TATA boxom na 3'-konci. Okrem proteínov, herpesvírusy kódujú aj krátke nekódujúce RNA (ncRNA), najmä miRNA, ale aj vírus-špecifické RNA s rôznou funkciou (EBER, LATs a iné).

V genóme herpevírusov bol identifikovaný rôzny počet Ori („origin of replication“). U jednotlivých zástupcov môžu byť počiatky replikácie označené rôzne – u EBV je jeden OriP a dva OriLyt, kým u HSV-1 sú dva OriS a jeden OriL. Význam niekoľkých *ori* sekvencií u všetkých herpetických vírusov nie je jednoznačne ozrejmený, ale predpokladá sa, že ich funkcia je závislá od typu infekcie. V prípade EBV bolo dokázané, že OriP zabezpečuje

udržiavanie epizomálneho genómu v latentne infikovaných bunkách, kým oba OriLyt sú aktívne v priebehu replikácie vírusového genómu počas produktívnej infekcie.

5.3 Infekčný cyklus herpetických vírusov

Na rozdiel od predchádzajúcich čeľadí DNA vírusov, lytická replikácia herpesvírusov sa neuskutočňuje počas S fázy bunkového cyklu, ale v G1 fáze. Zastavenie bunkového cyklu v G1 fáze je v tomto prípade evolučnou výhodou, lebo herpesvírusy disponujú množstvom regulačných proteínov a enzýmov schopných riadiť replikáciu vlastného genómu a pritom nemusia súťažiť o nukleotidy s bunkovou replikačnou mašinériou.

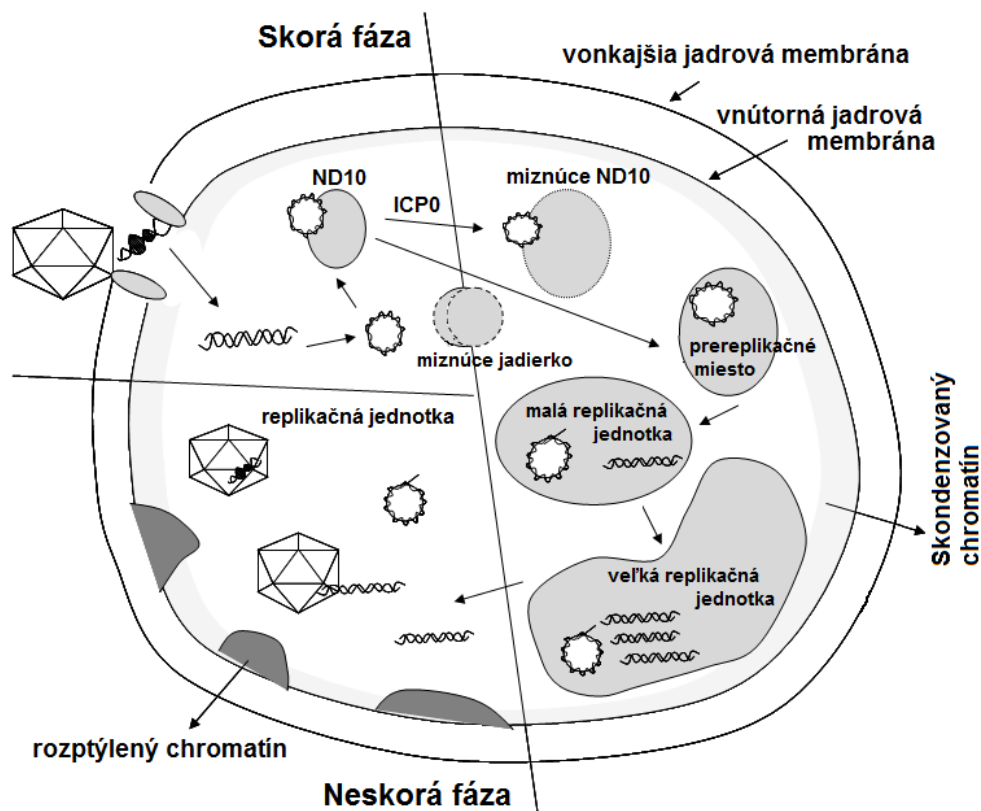


Obr. 5.3 – Transport herpesvírusovej DNA a tegumentových proteínov cez jadrový pór do jadra. Prezaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Infekčný cyklus herpesvírusov bol detailne študovaný najmä u HSV vírusov a preto proces uvedený v tejto kapitole bude charakterizovať priebeh infekcie permissívnej bunky HSV-1. Predpokladá sa, že podobný mechanizmus sa uplatňuje aj u ostatných herpesvírusov,

pričom jednotlivé fázy lytického cyklu replikácie sú spoločné. Každý rod má svoj špecifický mechanizmus navodenia latencie, reaktivácie latencie, modelovania hostiteľskej reakcie na infekciu, ktorý nie je konzervovaný medzi jednotlivými rodmi.

Prichytenie herpesvírusu na bunky je komplexný proces, ktorý zahŕňa väzbu viacerých vírusových proteínov na špecifické bunkové štruktúry. Prvým krokom infekcie je väzba povrchových vírusových glykoproteínov gB a gC na glykozaminoglykány (heparán sulfát alebo chondroitín sulfát) v extracelulárnej matrix cieľovej bunky a tým zabezpečujú reverzibilnú väzbu viriónu a bunky. Po väzbe na receptor, herpesvírusy vstupujú do bunky dvoma možnými dráhami – fúziou vírusovej membrány s plazmatickou membránou na povrchu bunky alebo pH-závislým mechanizmom fúzie vírusovej a endozomálnej membrány po receptorom-sprostredkovej endocytoze. V prvom prípade, vírusový gD interaguje s druhým bunkovým receptorom, nektínom-1 a gH/gL proteíny asociujú s ďalším doteraz neznámym receptorom. Po fúzii, v prípade oboch dráh, sú tegumentové proteíny a vírusový nukleokapsid uvoľnené do cytoplazmy. Nukleokapsid je mikrotubulárnym transportom presunutý k jadrovým pórom, na ktoré nasadá a do jadra bunky vypustí vírusový genóm (obr. 5.3), ktorý okamžite cirkularizuje do podoby epizómu.



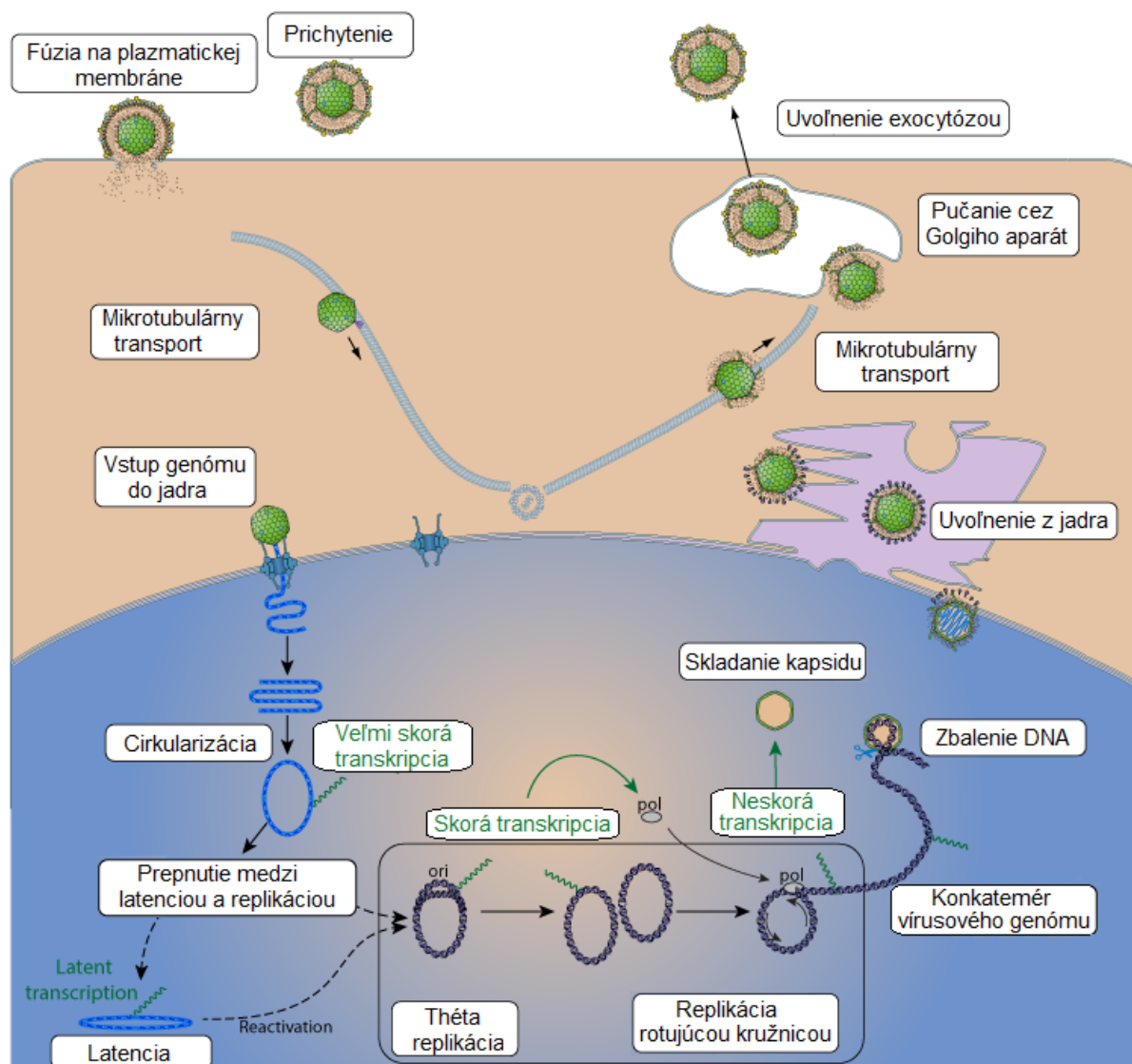
Obr. 5.4 – Preusporiadanie jadra HSV-1 infikovanej bunky

Niektoré tegumentové proteíny (napr. VP16/ α -TIF) sú nezávisle od nukleokapsidu dopravené do jadra bunky, kým iné (napr. Vhs) ostávajú v cytoplazme. Vhs („virion host

shut-off^c) sa vyznačuje endonukleázovou aktivitou, ktorou degraduje bunkové aj vírusové mRNA. Ale nakoľko vírusové mRNA sú v priebehu infekcie akumulované rýchlejšie ako sú degradované a syntéza bunkových mRNA je inhibovaná aj ďalšími vírusovými produktami, výsledkom je prevládajúca syntéza vírusových proteínov. Nasledujúce procesy – kaskádovitá transkripcia, replikácia a enkapsidácia – prebiehajú v jadre infikovanej bunky. Aby sa zvýšila produktivita infekcie a zablokovala obranyschopnosť bunky, vírus kaskádovito mení štruktúru jadra hostiteľa (obr. 5.4). Kruhovú epizómálnu DNA je v jadre obalená histónmi a je uložená v blízkosti subnukleárnej štruktúry označovanej ako jadrová doména 10 (ND 10 alebo PML telieska), kde prebieha replikácia vírusovej DNA a pravdepodobne aj skorá transkripcia. Asociácia histónov so vstupujúcou cudzorodou DNA do jadra, ako aj jej lokalizácia v ND10 obsahujúcej množstvo sumoylovaných bunkových proteínov, je súčasťou vnútrobunkovej odpovede na vírusovú infekciu a mala by zabezpečiť utlmenie transkripcie vírusového genómu. Herpesvírusy však disponujú mechanizmami, ktorými dokážu obranu bunky eliminovať a aktivovať transkripciu svojich génov.

Expresia vírusového genómu je regulovaná kaskádovito, môžeme ju rozdeliť na tri stupne – veľmi skorú (IE, „immediate early“), skorú (E, „early“) a neskorú (L, „late“). Transkripcia herpesvírusov je katalyzovaná bunkovou RNA polymerázou II a ide o proces postupnej derepresie promótorov a aktivácie transkripcie jednotlivých skupín génov. Počas IE fázy, je k iniciácii veľmi skorej transkripcie potrebná interakcia vírusového VP16 s hostiteľskými faktormi (Oct-1 a HCF-1). Následne sú z alfa (IE) génov exprimované veľmi skoré proteíny, ide prevažne o regulačné proteíny a transaktivátory transkripcie beta a gama génov. V rámci skorej fázy sú z beta (E) génov produkované skoré proteíny nevyhnutné pre replikáciu vírusovej DNA. V tejto fáze infekčného cyklu môže dôjsť k replikácii vírusovej DNA z niekoľkých počiatkov replikácie (Ori). Replikácia prebieha v rámci kruhového genómu najprv obojsmerne, potom je nasledovaná mechanizmom rotujúcej kružnice („rolling circle“), pričom vznikajú konkateméry vírusovej DNA, ktoré slúžia ako templát expresie L génov. Gama (L) gény kódujú neskoré proteíny, ktorými sú väčšinou štruktúrne proteíny. Niektoré z nich putujú naspäť do jadra bunky, kde sa zúčastňujú na štiepení konkateméru na genómy jednotkovej dĺžky a ich zbalení do novovznikajúceho nukleokapsidu. Časť neskorých proteínov sa ukladá do membrány jadra alebo endoplazmatického retikula, prípadne je glykozylovaná v Golgiho aparáte. Nová dcérska vírusová DNA je v jadre vďaka *pac* sekvencii zbalená cez portál kapsidu do prekapsidu, ktorý je formovaný pomocou tzv. „scaffolding“ proteínov. Po degradácii týchto proteínov vzniká zrelý kapsid, ktorý je ešte v jadre obalený tegumentovými proteínmi a spolu s nimi pučí do perinukleárneho priestoru, pričom získava prvý obal. Membrána tejto nezrelej vírusovej častice fúzuje s vonkajšou jadrovou membránou a voľný nukleokapsid s tegumentom je uvoľnený do cytoplazmy. V ďalšom kroku prechodom cez membránu trans-Golgiho aparátu alebo endoplazmatického retikula obsahujúcu maturované herpesvírusové membránové proteíny získava vírusová

častica obal (druhé obalenie) a zároveň dochádza k skompletizovaniu tegumentovej vrstvy. Zrelý virión je vo vezikulách transportovaný k cytoplazmatickej membráne a exocytózou uvoľnený z bunky (obr. 5.5).

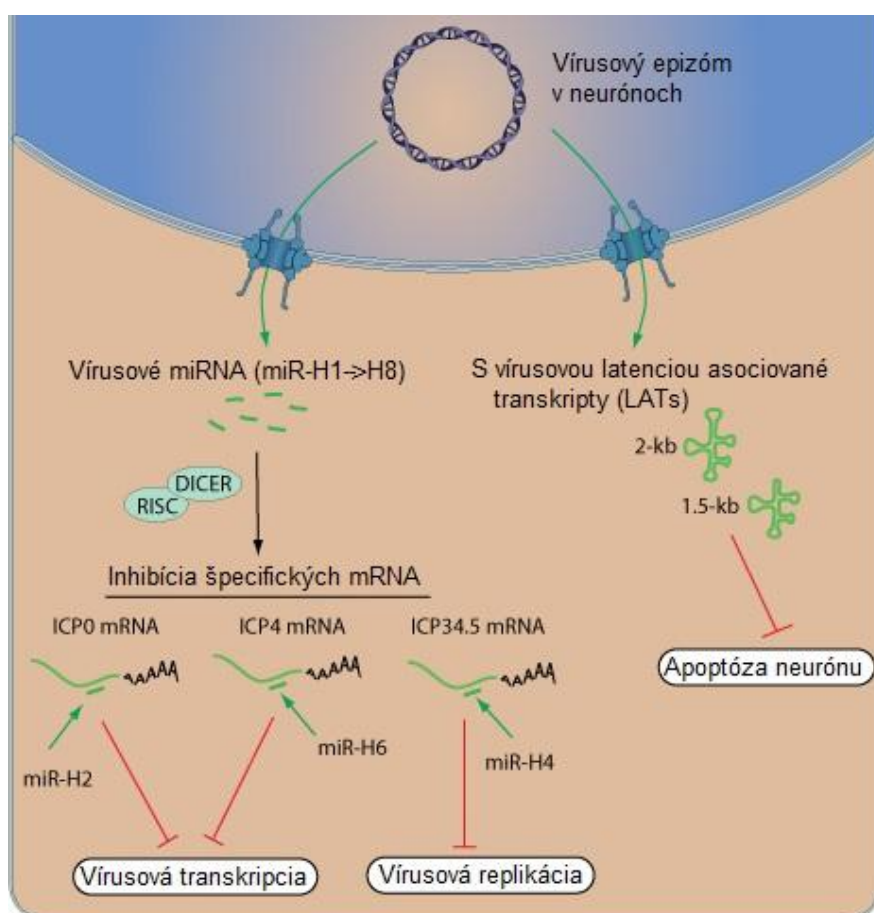


Obr. 5.5 – Infekčný cyklu herpesvírusov

Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Okrem produktívnej infekcie dokážu herpetické vírusy navodiť aj latentnú infekciu, ktorá sa stala jednou z charakteristických črt tejto skupiny vírusov. Ako bolo už spomínané, zástupcovia jednotlivých podčeľadí sa líšia v type cieľových buniek, ktoré sú rezervoárom latentne pretrvávajúceho vírusu. Dokonca sa predpokladá, že v rámci čeľade neexistuje jednotná stratégia alebo spoločné genetické elementy, ktoré by boli zodpovedné za navodenie latencie, jej udržiavanie a reaktiváciu. Latentná infekcia všetkých herpesvírusov však zdieľa niekoľko spoločných základných znakov – a) infikované bunky nie sú rozoznávané ani

odstránené imunitným systémom hostiteľa; b) nedochádza k expresii génov typických pre produktívnu infekciu; c) sú transkribované nekódujúce RNA asociované s latenciou (LATs, miRNA, EBER, obr. 5.6); d) vplyvom rôznych faktorov môže dôjsť k reaktivácii latentného vírusu, ktorá je sprevádzaná tvorbou nových infekčných častíc, pričom tento jav môže, ale nemusí viesť ku klinickej manifestácii ochorenia. Súbor viacerých faktorov – dlhodobé pretrvávanie herpetických vírusov v organizme (najmä gamaherpesvírusov), sporadická a nevyspytateľná syntéza určitých herpesvírusových proteínov, schopnosť manipulovať imunitným systémom hostiteľa, či zasahovať do rôznych bunkových signálnych dráh – môžu v konečnom dôsledku priamo alebo nepriamo viesť k transformácii buniek a vzniku nádorov.



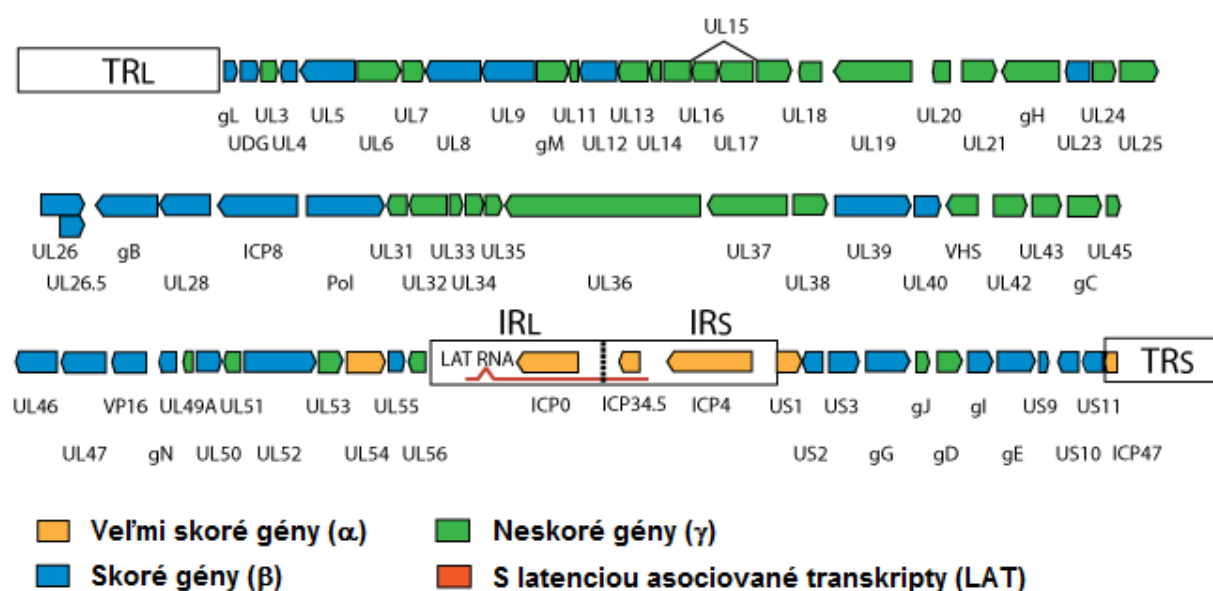
Obr. 5.6 – Udržiavanie latencie HSV-1 prostredníctvom ncRNA
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

5.4 Expresia génov u herpesvírusov

Transkripcia vírusovej DNA prebieha po cirkularizácii genómu v jadre infikovanej bunky, s využitím bunkovej RNA polymerázy II. Prepísované sú obe vlákna DNA, ale k prekryvaniu génov dochádza len zriedkavo. Vznikajúce mRNA majú čiapočku a sú

polyadenylované, podobne ako bunkové transkripty. Len malý počet transkriptov je upravovaných zostrihom a až na pár výnimiek, každá jedna vírusová mRNA kóduje jediný proteín. Štúdie za poslednú dekádu zmenili pohľad na expresiu herpesvírusových génov zo sériovej aktivácie transkripcie na postupnú derepresiu a transkripčnú aktiváciu vírusového genómu.

Expresia génov je časovo aj funkčne rozdelená na 3 skupiny, k tomu je potrebná koordinovaná a striktno regulovaná syntéza proteínov. Na základe kinetiky vzniku produktov jednotlivých génov sa v súčasnosti rozdeľujú gény do niekoľkých skupín: α alebo veľmi skoré gény, ktoré sú exprimované ako prvé. Produkty α -génov aktivujú expresiu β -génov alebo tzv. skorých génov. Niekoľko β -génov kóduje enzýmy a DNA-viažúce proteíny, ktoré zabezpečujú replikáciu vírusovej DNA. Gama (γ) alebo neskoré gény, sú transkribované až po replikácii vírusovej DNA a produkty týchto génov sú zväčša štruktúrne proteíny (obr. 5.7).



Obr. 5.7 – Rozloženie 3 skupín génov v genóme HSV-1
 TR – terminálne repetície, IR – interné repetície
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Okrem proteín kódujúcich génov, genómy herpesvírusov kódujú aj rôzne nekódujúce ncRNA, ktoré sú transkribované hostiteľskou RNA polymerázou III. Patria k nim ORI_S RNA a LATs (s latenciou asociované transkripty) u HSV-1, EBER-1,2 (EBV-kódované malé RNA) u EBV, tRNA-podobné transkripty u MHV-68 a veľký počet miRNA kódovaných množstvom zástupcov herpesvírusov. Jednotlivé typy ncRNA môžu mať rôzne funkcie, väčšinou však ide o regulačné RNA, ktoré sa podieľajú na ovplyvňovaní expresie vlastných génov, riadia niektoré bunkové procesy (apoptóza, vrodenná imunitná odpoveď), ale aj navodenie latencie v niektorých bunkách či dokonca disemináciu vírusu v organizme.

Všetky herpesvírusové mRNA sú za asistencie ICP27 transportované z jadra do cytoplazmy, kde sú translatované na jednotlivé proteíny a dopravené na miesto pôsobenia - do jadra, ostávajú v cytoplazme alebo sú vsadené do membránových štruktúr bunky. Proteíny určené na glykozyláciu sú ďalej modifikované a procesované v Golgiho aparáte. Počas translácie mRNA niektorých herpesvírusov (napr. KSHV alebo HCMV) sa môže uplatniť „leaky scanning“ (obr. 2.5).

Infekcia HSV, ale aj ďalšími herpetickými vírusmi, inhibuje expresiu bunkových génov na niekoľkých úrovniach – v rovine transkripcie a RNA zostrihu (ICP27), degradáciou bunkových mRNA (Vhs), interakciou s bunkovými translačnými faktormi (ICP27).

Až vyše 50% ORF herpetických vírusov nie je esenciálnych počas ich replikácie *in vitro*. Herpesvírusy totiž kódujú široké spektrum regulačných proteínov adaptovaných na potreby a podmienky buniek, ktoré tieto vírusy infikujú *in vivo*. Ich funkciou je modulácia intracelulárneho aj extracelulárneho prostredia ovplyvňovaním bunkového metabolizmu, syntézy makromolekúl, transportu, najmä však vyhnutím sa imunitnej odpovedi hostiteľského organizmu, čo je základným predpokladom pre úspešné navodenie latencie.

5.4.1 Regulácia exprese α -génov

Rozhodujúcu úlohu pri derepresii promótorov a transkripčnej aktivácii alfa génov u HSV-1 má vírusový VP16 proteín (α -TIF, alfa trans-indukčný faktor), ktorý je súčasťou tegumentu vírusovej častice a po infekcii bunky je transportovaný do jadra. VP16 sa priamo neviaže na promótory, ale interaguje s dvoma bunkovými proteínmi – HCF-1 („host cell factor 1“) a Oct-1 („octamer-binding protein“) – s ktorými vytvára tripartitný komplex, ktorý zabezpečuje dva procesy. Prvým je aktivácia demetylázy LSD1 („lysine-specific demethylase 1“), histón acetyltransferázy (CLOCK) a niekoľkých ďalších faktorov, ktoré dereprimujú promótory. Druhým je väzba komplexu na kľúčový promótorový responzívny element (5'-GnTAATGAR TTC-3'), následná interakciu komplexu s TFIID, ako aj mobilizácia ďalších bunkových transkripčných faktorov (TFIIB, TBP), ktorá vedie k formovaniu Pol II preiniciačného komplexu a k aktivácii transkripcie α génov. Sekvencia promótorového responzívneho elementu sa raz, prípadne niekoľkokrát, opakuje v promótoroch všetkých α -génov.

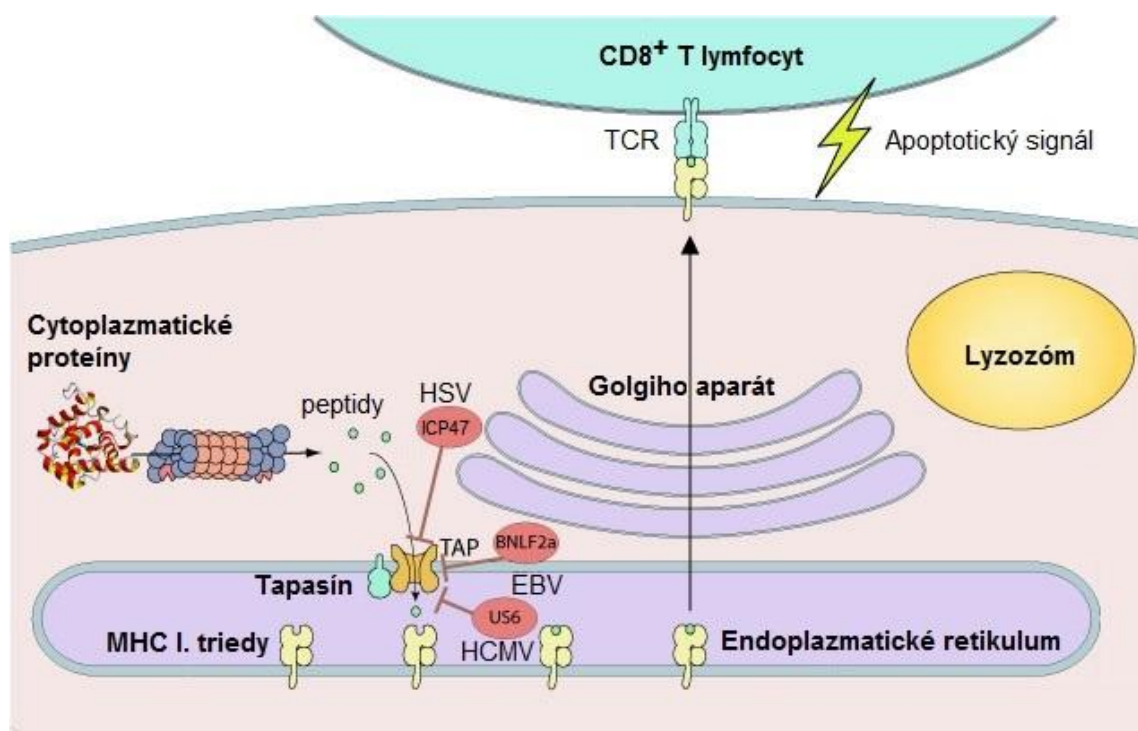
Sú popísané tri rôzne mechanizmy ukončenia transkripcie α -génov. Prvý predpokladá, že transkripcia α -génov je inhibovaná väzbou proteínu ICP4 na väzobné miesto s konsenzus sekvenciou ATCGTCNNNNYCGRC. Druhý mechanizmus vychádza z toho, že produkty β -génov (ICP6 a ICP8) znižujú expresiu α -génov. A tretí mechanizmus stavia na tom, že jednou z úloh Vhs proteínu je degradovať mRNA prepísané z α -génov a tak zosúladiť expresiu troch skupín vírusových génov.

Niektoré veľmi skoré transkripty podliehajú RNA zostrihu (mRNA pre ICP0, 22, 47), mRNA kódujúce ostatné IE proteíny nie sú takto procesované. Všetky putujú do cytoplazmy, kde sú translatované, v prípade HSV-1, na šesť IE proteínov – ICP0, 4, 22, 27, 47 a U_S1,5, pričom päť z nich sa podieľa na regulácii vírusovej a bunkovej génovej exprese:

ICP0 – je považovaný za promiskuitný aktivátor regulujúci transkripciu mnohých génov, najmä však β a γ génov prostredníctvom inaktívácie represorového komplexu. V ND10 štruktúrach spôsobuje disociáciu histón deacetyláz z chromatinu, čím dokáže zvrátiť utlmenie transkripcie vírusových génov. Okrem toho má ICP0 aktivitu E3 ubikvitín ligázy, ktorou riadi proteozomálnu degradáciu promyelocytického leukemického proteínu (PML) a proteínu SP100, a tým prispieva k degradácii ND10. Narušenie ND10 je pre replikáciu herpesvírusov podstatné, svedčí o tom aj fakt, že ostatné herpesvírusy kódujú produkt s rovnakou funkciou akú má ICP0 – IE61 (VZV), UL35 (HCMV), EBNA1 (EBV), LANA2 (KSHV).

ICP4 – je represorom α -génov (aj svojho vlastného génu) a zároveň transaktivátorom β a γ génov. Dokáže sa viazať priamo na DNA a zároveň interagovať s transkripčnými faktormi (TBP, TFIIB), čím umožňuje formovanie transkripčného preiniciačného komplexu na promótoroch vírusových génov.

ICP22 – je fosforylovaný regulačný proteín. Časť vlastností zdieľa s proteínom U_S1,5. Prostredníctvom aktivácie cyklín-dependentnej kinázy 2 (cdc2), v spolupráci s U_L13, zvyšuje expresiu niektorých γ génov.



Obr. 5.8 – Inhibícia TAP transportérov herpesvírusmi
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

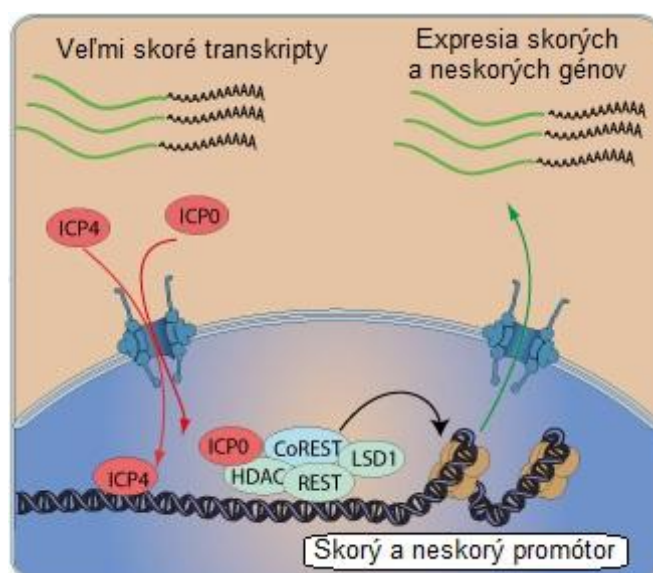
ICP27 – multifunkčný regulačný proteín, ktorý v skorých fázach infekcie prispieva k inhibícii syntézy bunkových proteínov tým, že blokuje RNA zostrih. Neskôr počas infekcie, je potrebný pre transkripciu β a γ génov, nakoľko privádza RNA polymerázu II k vírusovým promótorom. ICP27 riadi transport vírusových mRNA z jadra do cytoplazmy.

ICP47 – viaže TAP1/TAP2 transportéry, čím inhibuje prezentáciu antigénnych peptidov na MHC molekulách I triedy (obr. 5.8) a potláča imunitnú odpoveď na vírusovú infekciu podobným mechanizmom ako UL49,5 (HSV-1), BNLF2a (EBV) alebo US6 (HCMV).

5.4.2 Regulácia expzie β -génov

Expzia beta génov je regulovaná produktami alfa génov, minimálne ICP0 a ICP4, ktoré sprostredkujú druhú úroveň derepresie a transaktivácie. Narozdiel od α génov, β a γ gény nemajú unikátny promótorový element, na základe ktorého by sa dalo predpokladať načasovanie, trvanie alebo úroveň génovej expzie.

Promótory beta génov majú pred transkripčným iniciačným miestom uložené 2-3 väzobné miesta pre bunkové transkripčné faktory. Všeobecne sa dá povedať, že k transkripcii β -génov sú potrebné tieto sekvencie – proximálny TATA box obsahujúci signál 12-29 bp pred transkripčným počiatkom, a dva periférne signály vzdialené 47-61 bp (miesto väzby transkripčného faktora SP1) a 80-105 bp (miesto väzby CTF transkripčného faktora).



Obr. 5.9 – Derepresia a transkripčná aktivácia skorých a neskorých promótorov HSV-1
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Jednou z hlavných úloh ICP0 v expzii beta génov je jeho schopnosť zvrátiť epigenetické zmeny iniciované bunkou, ktoré spôsobujú potlačenie transkripcie týchto génov. Tento efekt dosahuje inaktiváciou HDAC (histón deacetyláz). Ďalšou aktivitou ICP0 je jeho

väzba na CoREST, vďaka čomu dochádza k disociácii represorového komplexu z promótorov β génov. ICP4 je komponentom transkripčného komplexu, privádza RNA polymerázu II k promótorom vírusových génov a zároveň viaže základné bunkové transkripčné faktory TBP, TFIIB, TFIID, ale aj vírusové proteíny ICP22, ICP27, čím aktivuje transkripčný proces. Skoré transkripty väčšinou nepodliehajú RNA zostrihu a sú hneď transportované do cytoplazmy k translácii (obr. 5.9).

Beta gény sa syntetizujú v rôznom čase a tvoria veľmi heterológnu skupinu, preto sú ešte rozdeľované na $\beta 1$ - a $\beta 2$ -skupinu. Produktami $\beta 1$ génov sú proteíny ICP6 (veľká subjednotka ribonukleotid-reduktázy) a ICP8 (DNA-viažúci proteín), ktoré boli dlho považované za α -proteíny. Tymidínkináza, DNA polymeráza a ďalšie proteíny potrebné na replikáciu vírusového genómu (tab. 5.2) sú kódované $\beta 2$ génmi.

Tab. 5.2 – Sedem skorých proteínov esenciálnych pri replikácii vírusového genómu

Proteín	Funkcia
UL5, UL8, UL52	Heterotrimerický helikázovo-primázový komplex
UL9	Ori-viažúci proteín
UL29 (ICP8)	Hlavný DNA-viažúci proteín, viaže a odvíja ssDNA
UL30	Katalytická podjednotka vírusovej DNA polymerázy
UL42	Faktor procesivity DNA polymerázy

5.4.3 Regulácie expresie γ -génov

Prerekvizitou expresie gama génov je syntéza vírusovej DNA. Podobne ako v prípade beta génov, aj gama gény sa môžu ešte rozčleniť na $\gamma 1$ a $\gamma 2$ gény. Kým $\gamma 1$ gény sú v limitovanom množstve transkribované aj pri absencii replikácie vírusovej DNA, prepis $\gamma 2$ génov je na syntéze nových kópií vírusového genómu úplne závislý. Neskorá transkripcia sa uskutočňuje v replikačných jednotkách v infikovanom jadre, za pomoci vírusových proteínov ICP4, 8, 22, 27 a U_L13.

Esenciálne elementy v promótoroch $\gamma 1$ génov pozostávajú z väzobného miesta pre SP1 (-48 bp), TATA boxu (-30 bp) a *cis*-aktivačného elementu (v oblasti -2 až +10 bp). Nakoľko však promótory gama génov sú heterogénne, môžu sa v ich sekvenciách objaviť aj iné elementy – napríklad E box (CACGTG), CAAT box a iné. Vo väčšina promótorov $\gamma 2$ génov pred transkripčným počiatkom neboli identifikované žiadne alebo len minimálne množstvo sekvencií, na ktoré by sa viazali bunkové transkripčné faktory. Zostavenie preiniciačného komplexu v promótorovej oblasti γ génov je riadené ICP4, interakciou tohto proteínu s RNA polymerázou II a ostatnými transkripčnými faktormi. Na väzbe RNA polymerázy II k sekvencii novovzniknutej DNA sa podieľajú aj ICP8 a ICP27.

Vzniknuté mRNA nepodliehajú zostrihu, dostávajú sa do cytoplazmy k translácii na štruktúrne proteíny kapsidu (VP5/UL19, UL18, UL38/VP23), tegumentu (VP16, Vhs), membránové proteíny (UL27/gB, UL44/gC, US6/gD) alebo šaperóny (proteáza VP24/UL26) podieľajúce sa na skladaní novej herpesvírusovej častice.

5.5 Replikácia herpesvírusov

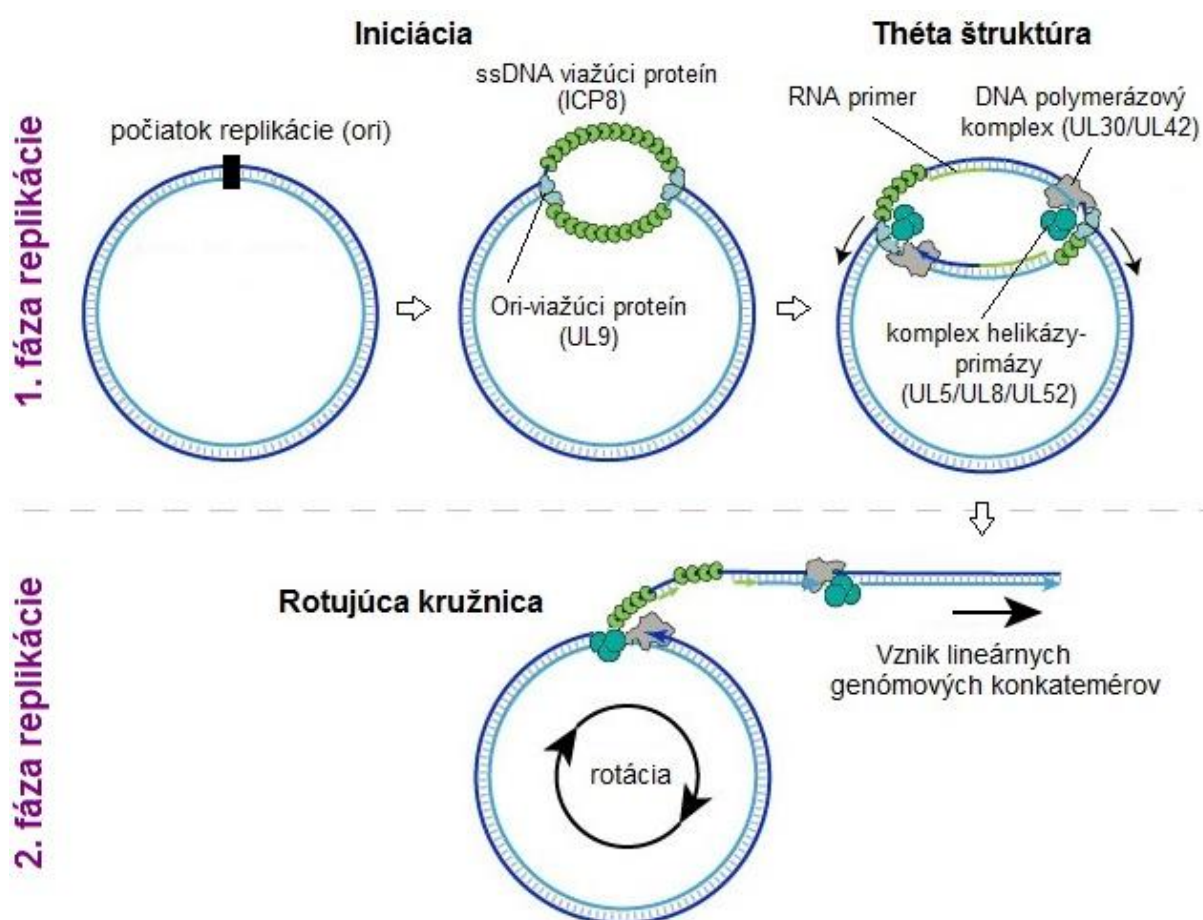
Podobne ako ostatné „veľké“ DNA vírusy, aj herpesvírusy kódujú vlastnú DNA polymerázu, ktorá je produktom β génov a preto k replikácii genómu môže dôjsť až po expresii skorých génov. Celý proces prebieha v jadre, konkrétne v periférenej oblasti jadra nazývanej prereplikačné miesto, ktoré je asociované so subjadrovou štruktúrou ND10 (obr. 5.4). Aktivitou vírusových proteínov dochádza k cielenej degradácii ND10 v priebehu replikácie, čo je v protiklade s činnosťou papilomavírusov, ktoré naopak stabilizujú proteíny prítomné v ND10. Za degradáciu SUMOylovaných proteínov ND10 je zodpovedný najmä ICP0, ktorý nasmeruje PML a SP100 na cestu proteozomálnej degradácie. S postupnou replikáciou vírusovej DNA sa prereplikačné miesta zväčšujú a vytvárajú replikačné jednotky, ktoré sa môžu spájať a vyplniť prevažnú časť jadra.

Mechanizmus replikácie herpetických vírusov nie je úplne objasnený, ale vo všeobecnosti je akceptovaný model dvojkoľového procesu (obr. 5.10), na realizáciu ktorého je esenciálnych 7 vírusových skorých proteínov. Prvá fáza pozostáva z Ori-závislej iniciácie replikácie a tvorby kruhového replikačného intermediátu tzv. théta štruktúry. Neskôr dochádza k prepnutiu na Ori-nezávislú replikáciu mechanizmom rotujúcej kružnice. Malé, vírusom kódované transkripty, ktoré zodpovedajú mikro RNA (miRNA) sa kumulujú v prereplikačných jednotkách, kde začína replikácia DNA. Predpokladá sa, že tieto miRNA pomáhajú vytvoriť théta (θ) replikačnú formu.

Replikácia vírusovej DNA je iniciovaná v mieste iba jednej z *ori* sekvencií, na ktorú sa viaže vírusový UL9. Spolu s ICP8 spôsobujú rozvinutie oboch vlákien DNA. Oddelenie vlákien umožňuje väzbu trimérneho komplexu s helikázovou a primázovou aktivitou, ktorý najprv nasyntetizuje krátky RNA primer, ide o podobný mechanizmus aký prebieha aj pri iniciácii syntézy DNA u polymomavírusov alebo eukaryotických buniek. V tomto momente sa na vírusovú DNA naviaže DNA polymeráza s faktorom procesivity (komplex UL30/UL42) a začína syntéza dcérskeho vlákna DNA oboma opačnými smermi od *ori* sekvencie. Ako sa replikačné vidlice od seba vzdiaľujú, za pomoci miRNA vytvárajú typickú štruktúru pripomínajúci písmeno gréckej abecedy, théta, podľa ktorého vzniklo pomenovanie „théta replikácia“.

V druhej fáze replikácie dochádza k štiepeniu jedného rodičovského vlákna DNA, výsledkom čoho je prepnutie na replikáciu mechanizmom rotujúcej kružnice. Táto fáza replikácie teda nie je závislá od Ori a nezúčastňuje sa jej UL9. V režime rotujúcej kružnice sa

replikuje len jedno vedúce vlákno rodičovskej DNA v dvoch miestach tak, aby bola zachovaná cirkulárna forma vírusového genómu na jednej strane a na druhej strane sa mohlo vlákno DNA predlžovať za vzniku multimérneho replikačného intermediátu, konkateméru. Genómy jednotkovej dĺžky sa z konkateméru vytrihujú v oblasti terminálnych repetícií, kde sa nachádza signál štiepenia. Novovzniknutá vírusová DNA je vbaľovaná do predformovaných kapsidov vďaka *pac* sekvenciám.



Obr. 5.10 – Model herpesvírusovej replikácie
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Okrem vyššie spomínaných vírusových produktov sa na celom procese zúčastňujú aj ďalšie proteíny – tymidín kináza (UL23), ribonukleotid-reduktáza (UL39/UL40) a deoxyuridín trifosfatáza (UL50), ktoré zabezpečujú produkciu nukleozid trifosfátov, stavebných jednotiek potrebných pri replikácii DNA. Ako bolo už vyššie spomínané, novosyntetizovaná vírusová DNA je templátom transkripcie neskorých herpesvírusových génov.

5.6 Vplyv infekcie ľudskými herpetickými vírusmi na hostiteľa

Herpesvírusy sú dobre adaptované na svojich hostiteľov a zriedkakedy spôsobujú smrteľné ochorenia. Najlepšie sú preštudované vírusy, ktoré infikujú ľudí a ekonomicky dôležité zvieratá (ošípané, kone, hydina a pod.). Väčšina týchto vírusov patrí medzi alfaherpesvírusy. Beta a gamaherpesvírusy (CMV a EBV) často spôsobujú stredne ťažké primárne infekcie, ale spájajú sa aj s nádorovým ochorením. Alfaherpesvírusy spôsobujú kožné lézie, vznikajú pľuzgieriky, ktoré obsahujú tekutinu s vírusom. Mimo kože sa prejavuje infekcia hemoragickými nekrózami.

HSV vírus má unikátne biologické vlastnosti ako sú neurovirulencia a latencia. Schopnosť vírusu replikovať sa v bunkách centrálnej nervovej sústavy zapríčiňuje HSV encefalitídu. Latentné štádium slúži vírusu ako rezervoár v organizme, kedy po reaktivácii môže dôjsť v priebehu osobného kontaktu k nakazeniu ďalšej osoby. HSV-1 infikuje orofarynx a trigeminálne gangliá, kým HSV-2 sa replikuje v sliznici genitálií, perigenitáliách a okolo análneho otvoru. Po primárnej infekcii pokračuje vírusová infekcia do sensorických nervových zakončení, odkiaľ je vírus transportovaný do dorzálneho ganglia a prechádza do latencie. Reaktivácia vírusu závisí od intaktnej centrálnej nervovej dráhy a periférnej nervovej siete. Okrem orofaryngálnych zápalov, môže HSV-1 spôsobovať keratokonjunktivitídy (infekcia očí), rôzne exantémy, atopické dermatitídy, herpes zoster a pod. HSV encefalitída patrí medzi najhoršie ochorenia spôsobené herpetickými vírusmi. 70% postihnutých tejto infekcií podľa ne a iba 2,5% pacientov sa dokáže úplne vyliečiť.

Vírus varicella zoster preniká do hostiteľa kvapôčkovou infekciou. Dostáva sa do nervových zakončení v koži, kde sa tvoria pľuzgieriky. Odtiaľ sa dostáva do koreňov miechy a príslušných sensorických ganglií, kde navodzuje latentnú infekciu. Vírus pretrváva v satelitných bunkách okolo neurónov. Pri normálnom priebehu sa objavujú kožné pľuzgieriky na 4. deň po infekcii a číry pľuzgierik sa postupne mení na zakalený a napokon sa vytvorí chrasta. Medzi komplikácie tohto infekčného ochorenia patrí cerebrálna taxia, myelitída, encefalitída, zápal pľúc, neutropénia a trombocytopénia.

Cytomegalovírusy pretrvávajú v leukocytoch periférnej krvi, v slinných žľazách a obličkách. Pri prvotnej infekcii CMV dochádza k silnej proliferácii T lymfocytov a vzniká tak syndróm podobný infekčnej mononukleóze. U detí prebieha prvotná infekcia zväčša bez klinických príznakov. U tehotných žien CMV spôsobuje malformácie plodu (žltáčka, hepatosplenomegália, vrodené chyby oka, poškodenie mozgu, srdca a sluchu). Pri silnejšej virémii dochádza k potratu plodu. Infekcia novorodenca môže nastať aj pri pôrode alebo prostredníctvom požívania materského mlieka. Najčastejšie sa vyvinie zápal pľúc, zápal srdcového svalu, poškodenie krvotvorby, trombocytopénia a encefalitída.

Asi 90% ľudskej populácie má protilátky proti **EBV**. Tento vírus transformuje B lymfocyty, v ktorých navodzuje celoživotnú latenciu. Infekcia prebieha orálnou cestou a často

býva asymptomatická. Najznámejšou formou primárnej infekcie EBV je infekčná mononukleóza. Ochorenie začína horúčkou, bolesťami v krku s faryngitídou a pokračuje zdurením lymfatických uzlín. Môže sa vyskytnúť aj morbiliformný exantém a hepatitída. Pri chronickej infekcii sa tento vírus podieľa na vzniku nádorov lymfatického systému a vzniku karcinómov (Burkittov lymfóm, nazofaryngálny karcinóm, Hodgkinsov lymfóm a pod.).

Vírus asociovaný s Kaposiho sarkómom spôsobuje sarkóm, nádor kože a podkožia, ktorý je endemický v severnej Afrike a pripomína chronický zápal spojený s agresívnou proliferáciou vretenovitých buniek. Vírus Kaposiho sarkómu sa dostal do popredia najmä vďaka HIV pozitívnym pacientom.

Ľudské herpesvírusy 6 a 7 spôsobujú benígne ochorenia spojené s vyrážkami na koži a niekoľkodňovou horúčkou. Exantém sa môže vyskytovať na tvári a hrudníku. U starších ľudí sa môže vyskytnúť syndróm infekčnej mononukleózy.

Zhrnutie charakteristík herpesvírusov

- veľká obalená častica nesúca genóm tvorený lineárnou dsDNA
- je známych niekoľko typov genómov, môžu mať terminálne aj interné repeticie
- 70-200 ORF
- po vstupe do jadra bunky sa lineárny genóm cirkularizuje - epizóm
- kaskádovitá expresia génov – veľmi skoré (α), skoré (β) a neskoré (γ) gény
- transkribované bunkovou RNA polymerázou II, transkripty väčšinou nepodliehajú zostrihu, majú čiapočku a sú polyadenylované
- kódujú aj rôzne typy ncRNA s regulačnou funkciou
- v genóme sa nachádza niekoľko *ori* sekvencií
- syntéza vírusovej DNA je katalyzovaná vlastnou vírusovou DNA polymerázou, nastáva až po expresii skorých génov
- replikácia vírusovej DNA je dvojkrokový proces, zahŕňa replikáciu cez théta štruktúru aj rotujúcou kružnicou za vzniku konkatemérov
- ich charakteristickou črtou je schopnosť navodiť celoživotnú latentnú infekciu, z ktorej sa dokážu reaktivovať
- niektoré sú asociované s nádorovými ochoreniami

6 POXVÍRUSY

Poxvírusy predstavujú početnú skupinu vírusov s komplexnou štruktúrou, ktoré spôsobujú infekcie hmyzu, plazov, vtákov až cicavcov. Sekvenčné analýzy DNA a iné bioanalýzy zistili, že poxvírusy sú geneticky vzdialenými príbuznými vírusov z čeladi *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* a novoobjavenej čelade *Mimiviridae*. Niektorí jej zástupcovia sú obligátnymi humánnymi patogénmi (vírus varioly, VARV; vírus molluscum contagiosum, MOCV), kým iní majú širší okruh hostiteľov a môžu infikovať zvieratá aj ľudí. Poxvírusy zapríčiňujú rôzne druhy ochorení, od systematických, ktoré môžu byť spojené s vysokou mortalitou, cez mierne ochorenia s lokálnymi prejavmi infekcie, až po asymptomatické infekcie.

Najznámejším je prototypový vírus čelade, VARV, ktorý je pôvodcom historicky vôbec najdlhšie známeho infekčného ochorenia postihujúceho ľudskú populáciu – pravých kiahní. Právě kiahne spôsobovali najväznejšie ochorenie zaznamenané v dejinách ľudstva. Existovali dve klinicky odlišné formy varioly – major a minor. Mortalita spôsobovaná vírusovým kmeňom variola major sa pohybovala v rozmedzí 30-40%. Vírus variola minor bol miernejší a mortalita dosahovala 1-2 %. Štúdium tohto ochorenia zamerané na prevenciu a liečbu pravých kiahní viedlo k objavom, ktoré sú považované za historické mílniky na poli virológie. V 10. storočí sa v Číne objavili praktiky variolizácie – kedy sa z lézií pacientov infikovaných miernou formou varioly vytvorilo práškové inokulum, ktoré sa podávalo zdravým jedincom. Títo po prekonaní ľahšej formy pravých kiahní boli imúnni pred ďalšou infekciou. Riziko tohto postupu však spočívalo v stále hrozivej 1-2 % mortalite. O niekoľko storočí neskôr, v roku 1796, si Edward Jenner všimol, že dojičky kráv infikované kravskými kiahňami, sú odolné voči pravým kiahňam. Toto pozorovanie bolo základom pre experiment, počas ktorého Jenner inokuloval 8-ročného chlapca vírusom kravských kiahní. O šesť týždňov neskôr ho infikoval VARV a zistil, že chlapec bol rezistentný. Jenner svoju procedúru nazval vakcináciou. V priebehu krátkeho obdobia sa rozšírila a používala na celom svete. V roku 1958 Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) vyhlásila program na globálnu eradikáciu pravých kiahní, pozostávajúcu z intenzívnej a koordinovanej vakcinácie s využitím vírusu vakcínie. Program bol zavŕšený v roku 1979, o rok neskôr WHO vyhlásila vírus pravých kiahní za eradikovaný a tým pádom sa variola stala prvým, a zatiaľ jediným, celosvetovo eliminovaným humánnym ochorením. Od roku 1980 sa tento vírus prechováva iba v dvoch laboratóriách WHO.

Okrem humánnych ochorení, poxvírusy spôsobujú aj ochorenia hospodárskych zvierat (tab 6.1), ktorých konzekvenciou sú vysoké ekonomické straty. Poxvírusy oviec a kôz spôsobujú vážne infekcie týchto domácich zvierat v určitých častiach Afriky, Ázie a Strednom Východe. Najťažšie infekcie sú pozorované najmä u mladých zvierat, u ktorých

mortalita dosahuje skoro 100 %. Vírus myxomatózy spôsobuje ochorenie domácich a divožijúcich európskych králikov. V roku 1950 sa tento vírus použil na vyhubenie nepôvodnej a extrémne premnoženej populácie králikov v Austrálii. Avšak, veľmi skoro sa spozorovalo, že vírus prestal byť vysoko virulentný, začal spôsobovať iba stredné alebo mierne ochorenia a u králikov sa postupne vyvinula rezistencia na vírusovú infekciu.

Všetky poxvírusy patria medzi obalené vírusy, majú komplexnú štruktúru a niektoré sú dokonca viditeľné i pod svetelným mikroskopom. Morfogenéza a vstup poxvírusov do bunky je jedinečná a charakteristická pre tieto vírusy (tiol oxidoreduktázový systém, ktorý zabraňuje tvorbe disulfidických väzieb, morfogenéza v cytoplazme, komplex fúznych proteínov a pod.). Vďaka obrovskému genómu sú poxvírusy schopné kódovať veľa faktorov virulencie alebo imunomodulačných proteínov, ktoré síce nie sú esenciálne pre replikáciu vírusu v bunke, ale ovplyvňujú následky infekcie *in vivo*. Okrem toho, rozsiahly génový repertoár zabezpečuje poxvírusom nezávislosť od bunkového replikačného a transkripčného aparátu. Ide tak o jedinú čeľaď DNA vírusov infikujúcich ľudí, ktorých replikácia prebieha v cytoplazme a nie v jadre.

Tab. 6.1 - Najvýznamnejšie poxvírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

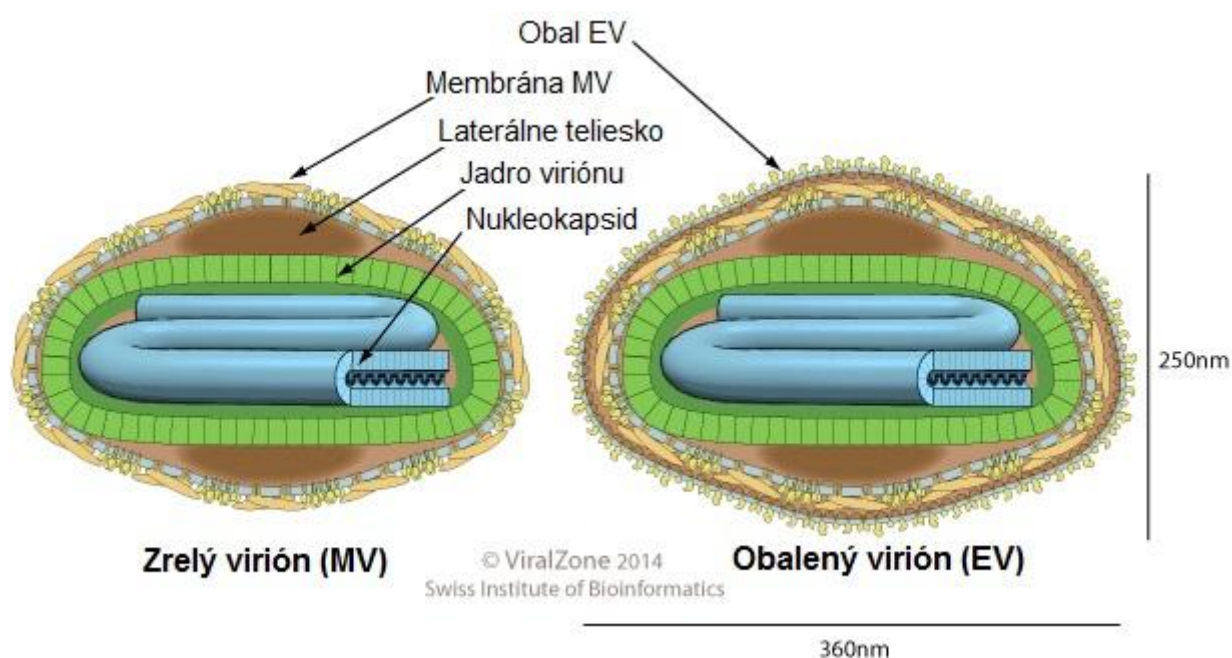
Vírus	Ochorenie
Vírus varioly (VARV)	Pravé kiahne
Vírus vakcínie (VACV)	Miernejšie vyrážkovité ochorenie
Vírus kravských kiahní (CPXV)	Kravské kiahne
Vírus molluscum contagiosum (MOCV)	Bradavice a lézie na koži ľudí
Vírus myxomatózy (MYXV)	Generalizované ochorenie králikov
Poxvírus oviec (SPPV)	Kiahne oviec
Poxvírus kôz (GTPV)	Kiahne kôz

6.1 Štruktúra viriónu

Vírusová častica poxvírusov má sudovitý (tehlovitý) tvar a je relatívne veľká, meria 360 x 270 x 250 nm, vďaka čomu je pozorovateľná aj pod svetelným mikroskopom. Virión je veľmi komplexný, obsahuje približne 100 rôznych vírusových štruktúrnych proteínov. Základnú infekčnú časticu tvorí zrelý virión (MV alebo IMV). Extracelulárny obalený virión (EV alebo EEV) je tvorený MV obaleným ďalšou membránou (obr. 6.1), ktorú častica získala z membrány Golgiho aparátu. Rozdiely medzi MV a EV sú dané ich rôznou morfogenézou. V lipidovej membráne MV je uložených 12 neglykozylovaných proteínov. Vonkajší obal EV je na povrchu zvrásnený nepravidelnými výčnelkami presahujúcimi 3-5 nm, ktoré predstavujú 4 glykozylované proteíny a jeden neglykozylovaný proteín, líšiacimi sa od proteínov

prítomných v membráne MV. Oba typy častíc (MV aj EV), napriek rozdielnemu počtu membrán a typu povrchových proteínov, zabezpečujú disemináciu vírusu v infikovanom jedincovi aj šírenie na nového hostiteľa. Vírus-neutralizačné protilátky sa tvoria voči povrchovým proteínom uloženým vo vonkajšej aj vnútornej membráne.

Vnútorňa štruktúra viriónu je tvorená komplexom, ktorý tvorí činkovité jadro a agregáty heterogénneho materiálu, ktoré nazývame laterálne telieska. Tieto sú uložené v priestore medzi jadrom a vnútornou membránou. Funkcia ani zloženie laterálnych teliesok nie sú úplne objasnené. Stena viriónového jadra je dvojvrstvová, obsahuje množstvo kanálov a na jej povrchu sa nachádzajú 8 nm dlhé tubuly. V jadre viriónu je uložený vírusový dsDNA genóm, ktorý je usporiadaný do tvaru písmena S a je asociovaný s viacerými vírusovými proteínmi. Polovica všetkých štruktúrnych proteínov viriónu (asi 50) je súčasťou jadra viriónu, približne 30 z nich má enzymatickú úlohu.



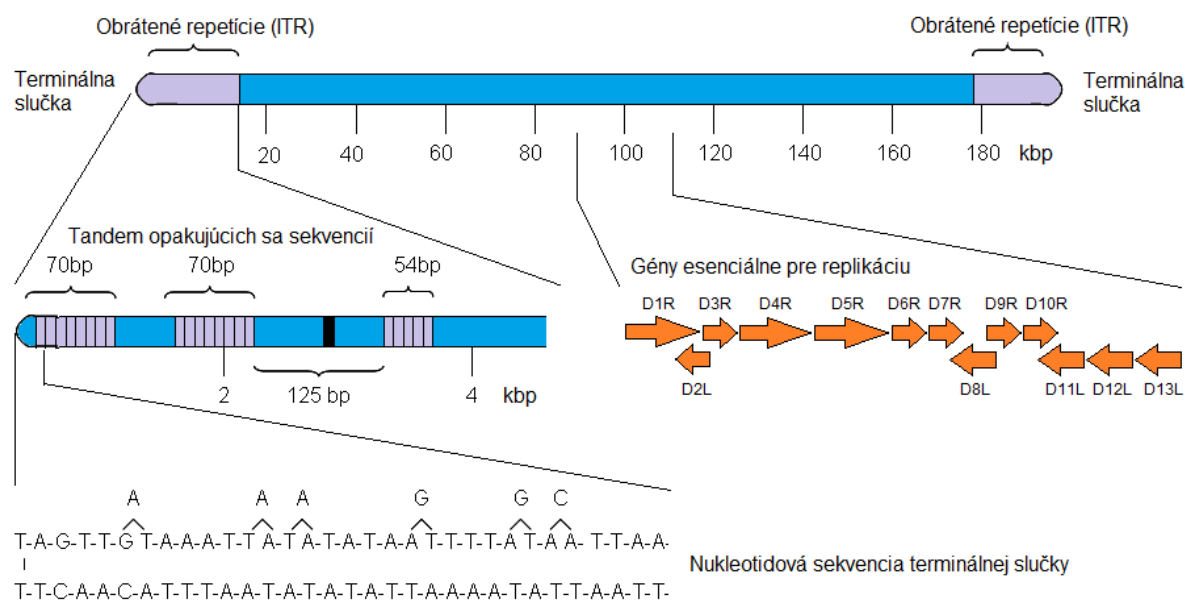
Obr. 6.1 - Štruktúra viriónu poxvírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

6.2 Organizácia genómu poxvírusov

Genóm poxvírusov je tvorený lineárnou, dvojvláknovou DNA, ktorá je dlhá 134 - 300 kbp. Vypurifikovaná DNA sama o sebe nie je infekčná, pretože na jej expresiu je potrebná vírusová RNA polymeráza ako aj ďalšie enzýmy a faktory.

Genóm všetkých poxvírusov má na oboch koncoch obrátené terminálne repetície (ITR), ktoré obsahujú identické, ale opačne orientované sekvencie. Na koncoch ITR je lokalizovaná vysoko konzervovaná oblasť 100 bp obsahujúca sekvencie, ktoré sú potrebné pri

rozpletení konkamérneho replikačného intermediátu vznikajúceho pri replikácii DNA. Táto oblasť je bohatá na A+T páry, sekvencia je prevažne komplementárna, aj keď sa tu nájdu aj nespárované bázy a na konci tvoria terminálnu slučku (vlásenku), ktorá kovalentne spája obe vlákna DNA. V ITR sa ďalej nachádzajú aj tandemovo sa opakujúce repetície a niekoľko otvorených čítacích rámcov. Delécie, repetície a transpozície môžu ovplyvniť dĺžku ITR, ktorá je preto variabilná a pohybuje sa v rozpätí 700 – 10 000 bp (obr. 6.2).



Vo vírusovej DNA poxvírusov bolo identifikovaných 150-200 génov. Jednotlivé gény sú uložené na oboch vláknach DNA a transkripcia beží v oboch smeroch. Napriek vysokej denzite kódujúcej sekvencie v genóme, kde sú gény uložené pri sebe veľmi tesne s intergénovými sekvenciami nepresahujúcimi 100 bp, sa gény prekrývajú len ojedinele. Približne 100 génov je vysoko konzervovaných u všetkých chordopoxvírusov a asi polovica z nich sa nachádza aj u entomopoxvírusov. V centrálnej oblasti genómu sa nachádzajú konzervované gény, ktorých produkty sú esenciálne pre replikáciu vírusu, transkripciu alebo morfogénu. Na koncoch genómu sa vyskytujú variabilné gény kódujúce proteíny, ktoré majú špecifické funkcie v závislosti od druhu infikovaných buniek alebo hostiteľa.

Genóm poxvírusov nesie genetickú informáciu pre veľké spektrum proteínov podieľajúcich sa nielen na replikácii DNA (DNA polymerázu, helikázy, nikázy), ale aj transkripcii a post-transkripčnej modifikácii vírusových mRNA (RNA polymerázu, vlastný transkripčný faktor, polyadenylázy), či post-translačných úpravách proteínov (proteázy, kinázy) alebo metabolizme nukleových kyselín. Vďaka tomu sú relatívne nezávislé od

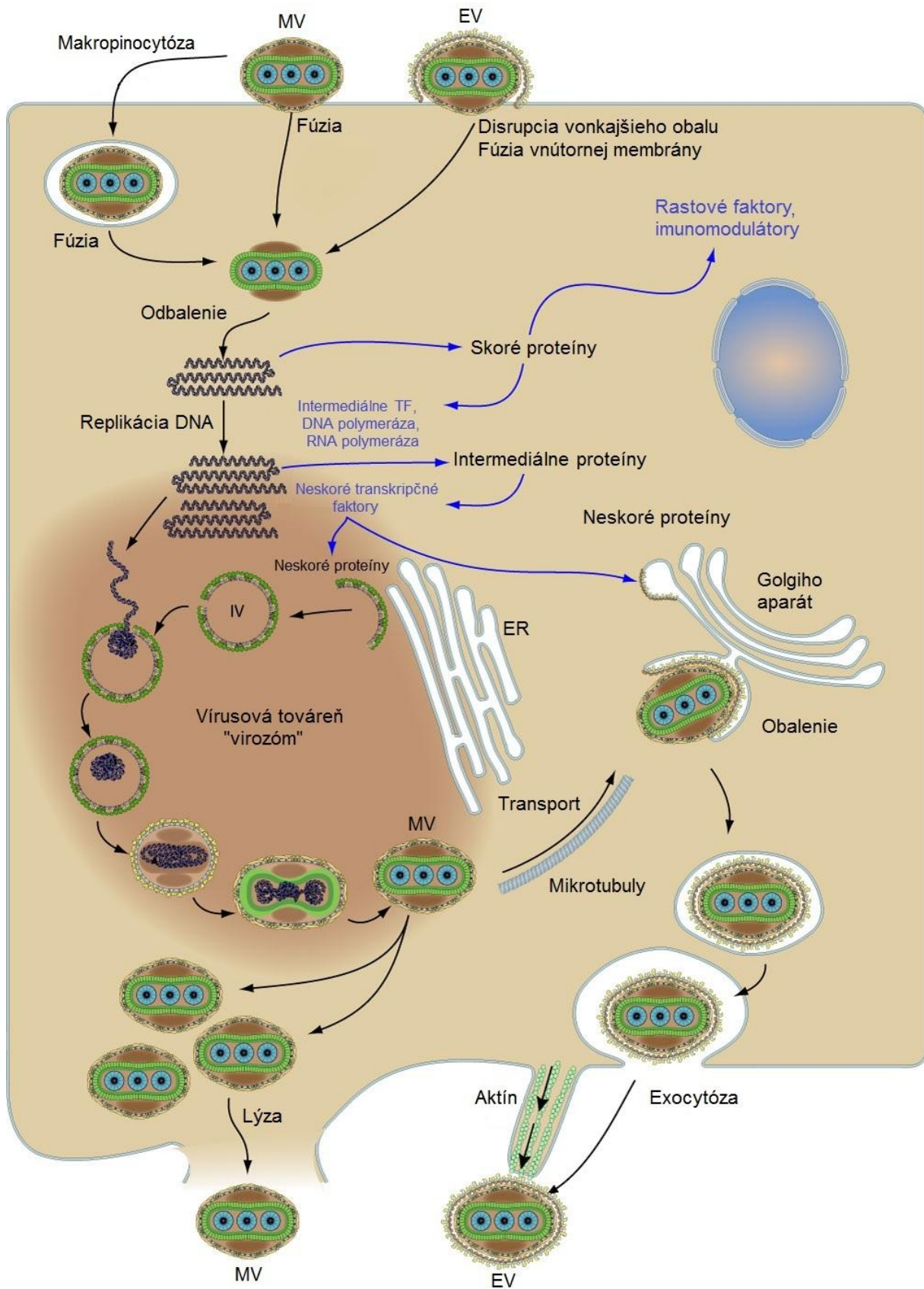
bunkovej mašinerie, nereplikujú sa v jadre, ako predchádzajúce čeľade DNA vírusov, ale v cytoplazme.

Navyše, poxvírusy kódujú množstvo imunomodulačných proteínov, ktoré dokážu blokovať, alebo úplne rozvrátiť imunitný systém hostiteľa. Tieto gény nie sú esenciálne pre replikáciu vírusu a tiež sú lokalizované na koncoch genómu. Ich proteínové produkty sú namierené najmä voči vrodenej imunite a pôsobia proti množstvu molekúl v bunke i mimo bunky. Vnútro bunkové proteíny kódované poxvírusmi dokážu blokovať rôzne signálne dráhy, môžu inhibovať antivírusovú aktivitu interferónov, prezentáciu antigénov a blokovať apoptózu bunky. Extracelulárne proteíny inhibujú komplement, cytokíny, chemokíny a interferóny tým, že im bránia naviazať sa na ich bunkové receptory. Niektoré poxvírusy dokonca kódujú proteíny, ktoré imitujú cytokíny alebo chemokíny, prípadne kódujú receptory pre chemokíny, ktoré sú vo veľkom množstve potom exprimované na infikovaných bunkách a tým znefunkčujú imunitný systém hostiteľa.

6.3 Infekčný cyklus poxvírusov

Štúdium mechanizmov vstupu poxvírusov do bunky je komplikované, pretože existujú dve infekčné formy viriónov (MV a EV). EV má navyše druhú membránu, v ktorej sa nachádzajú proteíny, ktoré nie sú prítomné v MV. Preto tieto rôzne formy viriónov v prvom kroku pravdepodobne interagujú s rôznymi povrchovými bunkovými štruktúrami. Navyše, vonkajšia membrána EV musí byť odstránená.

Predpokladá sa, že pri vstupe MV do bunky, v závislosti od vírusového kmeňa a typu bunky, sa uplatňujú 2 mechanizmy – priama fúzia s plazmatickou membránou a endozomálna cesta nasledujúca po aktívom-sprostredkovej makropinocytóze. V endozóme potom dochádza k pH-závislej fúzii vírusovej a endozomálnej membrány. Dôkazom komplikovanosti celého procesu je, že u VACV sa na prichytení na bunkové receptory podieľajú až 4 povrchové receptory a na vstupe do bunky dokonca 12 vírusových proteínov (tzv. vstupno-fúzny komplex, „entry fusion complex“, EFC). Bunkovými väzbovými partnermi pri prichytení MV sú rôzne typy glykozaminoglykánov alebo laminín. V prípade vstupu EV do bunky boli tiež identifikované dva mechanizmy. V prvom prípade sa EV dostáva cez bunky fagocytózou, pričom dochádza k disrupcii jej vonkajšieho obalu vplyvom nízkeho pH v endozóme. Následne dochádza k fúzii vnútornej vírusovej membrány s membránou endozómu a uvoľneniu jadra viriónu do cytoplazmy. Alternatívne môže dôjsť k ruptúre vonkajšieho obalu EV hneď po kontakte s bunkovým povrchom a vnútorná membrána vírusu potom priamo fúzuje s plazmatickou membránou bunky.



Obr. 6.3 - Infekčný cyklus poxvírusov
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Rôzne spôsoby vstupu viriónov do bunky majú jeden výsledný efekt – uvoľnenie jadra viriónu do cytoplazmy, ktorým je ukončené tzv. prvé odbalenie viriónu. V intaktnom viriónovom jadre dochádza k transkripcii skorých vírusových génov. Je to umožnené tým, že vírus má celú skorú transkripčnú mašinériu uloženú vo svojom jadre a nesie si ju so sebou do infikovanej bunky. V jadre viriónu sú teda prítomné všetky potrebné vírusové enzýmy, transkripčný faktor a iné komponenty zúčastňujúce sa transkripcie. Vzniknuté skoré mRNA sú tranlatované na bunkových ribozómoch a nasyntetizované skoré proteíny majú funkciu imunomodulátorov, ktoré neutralizujú mechanizmy imunitného systému. Niektoré skoré proteíny imitujú bunkové rastové faktory a indukujú proliferáciu okolitých buniek. Produktami skorých génov sú aj proteázy, ktoré narúšajú jadro viriónu, čím umožňujú vypustenie vírusového genómu z jadra do cytoplazmy – tzv. druhé odbalenie, po ňom môže byť vírusová DNA replikovaná za účasti ďalších skorých proteínov. Syntéza nových vírusových DNA prebieha mechanizmom vytesňovania vlákna („strand displacement“). V priebehu replikácie sú generované konkateméry, ktoré sú nastrihané na genómy jednotkovej dĺžky. Novosyntetizované vírusové DNA sú templátom nielen ďalších cyklov replikácie genómu, ktorá sa uskutočňuje vo vírusových „továrňach“ („virus factories“) alebo virozómoch, ale aj transkripcie intermediálnych génov. Realizácia druhého levelu transkripcie si vyžaduje prítomnosť bunkového proteínu VITF-2 a iniciačných proteínov, ktoré sú produktami skorých vírusových génov. Transláciou intermediálnych mRNA sa produkujú proteíny nevyhnutné pre transkripciu neskorých génov, kódujúcich štruktúrne proteíny alebo enzýmy, ktoré by mali byť inkorporované do novej vírusovej častice. Skladanie nových viriónov prebieha vo vírusových továrňach obalených membránou derivovanou z endoplazmatického retikula. Prvé morfológicky rozlíšiteľné štruktúry sú polkruhovité membrány (tzv. vírusové „crescents“) a sférické nezrelé virióny (IV), do ktorých sa dostáva denzný nukleoproteín. Za vbalovanie genómu do nezrelých viriónov sú zodpovedné ATPáza A32, teloméry-viažúci proteín I6 a membránový proteín A13. Dozrievanie IV je sprevádzané degradáciou „scaffolding“ proteínu D13 a ďalších membránových (A17) alebo jadrových proteínov (A3, A10, A12, G7, L4) s pomocou proteázy I7. Častice opúšťajúce virozómy sú proteolyticky sformované na MV vyznačujúce sa typickým sudovitým tvarom. Zrelé MV sa následne uvoľňujú z bunky počas jej lýzy, prípadne môžu nadobudnúť druhú membránu prechodom cez *trans*-Golgiho sieť a exocytózou sa dostávajú z bunky von v podobe EV (obr. 6.3).

6.4 Expresia génov u poxvírusov

Ako už bolo spomenuté, bohatý súbor vírusových proteínov umožňuje, aby všetky kroky vírusovej expresie mohli prebiehať v cytoplazme, vrátane transkripcie, čo odlišuje poxvírusy od ostatných doteraz spomenutých čeľadí DNA vírusov. Po vstupe viriónu do

cytoplazmy, je vírusové jadro transportované mikrotubulami na miesto transkripcie a syntézu mRNA je možné detekovať už 20 minút po infekcii.

Expresia poxvirusových génov prebieha v regulovanej kaskáde, ktorá je závislá od postupnej syntézy vírusom-kódovaných transkripčných iniciačných faktorov, ktoré sa viažu na špecifické elementy jednotlivých skupín promótorov. Transkripcia génov je katalyzovaná vírusovou DNA-závislou RNA polymerázou, je súčasťou viriónu aj spolu s ďalšími kľúčovými proteínmi, ktoré sa priamo podieľajú na syntéze a modifikácii mRNA – s RNA polymerázou-asociovaný proteín 94 kDa (RAP94), skorý transkripčný faktor (VETF), guanylyltransferáza, ribóza metyltransferáza, poly(A) polymeráza, nukleotid fosforyláza I, DNA-závislá ATPáza a DNA-RNA helikáza. Každý gén má vlastný transkripčný promótor, ktoré bývajú relatívne krátke – u VACV pozostávajú len z približne 35 nukleotidov. Gény poxvirusov nemajú intróny a preto vírusové mRNA nie je potrebné upraviť zostrihom. Vzniknuté mRNA majú čiapočku, sú metylované a polyadenylované, pričom aj tieto procesy sú realizované vírusovými enzýmami.

Syntéza bunkovej DNA, RNA aj proteínov je efektívne blokována ešte v prvých fázach infekčného cyklu poxvirusov. Za inhibíciu týchto dejov sú pravdepodobne zodpovedné povrchové tubuly jadra viriónu a niektoré intermediálne proteíny. Vďaka tomu môže vírus využívať celý translačný aparát bunky výlučne na syntézu vlastných proteínov. Niektoré vzniknuté vírusové membránové proteíny obsahujú domény s unikátnymi intramolekulovými disulfidickými väzbami. Na základe toho sa predpokladá, že poxvírusy kódujú nový typ oxidoreduktázy fungujúcej v cytoplazmatickej časti membrány endoplazmatického retikula, ktorá zabezpečuje post-translačnú modifikáciu vírusových proteínov.

6.4.1 Regulácia expresie skorých génov

Expresia skorých génov je iniciovaná hneď po uvoľnení jadra viriónu do cytoplazmy, prebieha v jeho uzavretom priestore a ukončenie tejto skorej fázy je sprevádzané rozpadom jadrovej steny, pričom tento proces sa nazýva druhým odbalením vírusu.

Vírusová RNA polymeráza je komplexný enzým, pozostávajúci z 8 podjednotiek, čiastočne podobný s RNA polymerázou eukaryotov. Na iniciáciu skorej transkripcie sú potrebné 2 vírusom-kódované transkripčné faktory – RAP94 viažuci RNA polymerázu a iniciačný faktor VETF rozoznávajúci promótor (funkčne podobný bunkovému transkripčnému faktoru TFIID) – ktoré vo vzájomnej súčinnosti umožňujú RNA polymeráze odštartovať transkripciu. Po iniciácii sa na ďalšom priebehu transkripcie podieľa aj DNA-závislá ATPáza.

Sekvence promótorov sú vysoko konzervované u všetkých poxvirusov. Tým sa môže vysvetliť reaktivácia, pri ktorej sa môže aktivovať tepelne inaktivovaný poxvírus pri

koinfekcii s druhým poxvírusom, ktorý patrí do iného rodu. Inaktivovaný poxvírus slúži ako templát a druhý poxvírus poskytuje enzýmy potrebné pre transkripciu.

Promótoory skorých génov majú jednotnú štruktúru, sú bohaté na A+T páry a sú dlhé približne 28 nukleotidov, pričom kľúčová konzervovaná centrálna sekvencia je lokalizovaná -13 až -25 báz pred transkripčným štartom (5'-(A)₆TG(A)₆-3'). Túto konsenzus sekvenciu špecificky rozoznáva a viaže heterodimér VETF. Terminačným signálom transkripcie skorých génov je konsenzus sekvencia TTTTNT (resp. UUUUUNU sekvencia v narastajúcom RNA reťazci) umiestnená 50 nukleotidov pred samotným terminačným miestom. Skoré transkripty sú kotranskripčne modifikované vírusovými enzýmami pridaním čiapočky na 5'-koniec (guanylyltransferázou a ribóza metyltransferázou) a polyadenyláciou 3'-konca (poly(A) polymerázou). Následne sú mRNA translokované z jadra viriónu do cytoplazmy, kde sú translatované na proteíny.

Asi polovica vírusového genómu pozostáva zo skorých génov transkribovaných ešte pred replikáciou DNA, pričom ich produktami sú proteíny zodpovedné za interakciu vírusu s hostiteľom, dezintegráciu viriónového jadra, syntézu DNA, rekombináciu, opravu DNA a expresiu intermediálnych génov.

6.4.2 Regulácia expresie intermediálnych génov

Transkripcia intermediálnych génov prebieha na templáte novosyntetizovanej DNA, teda až po replikácii vírusového genómu, približne 100 minút po infekcii bunky. Na realizáciu expresie týchto génov sú nevyhnutné produkty skorých génov, najmä transkripčné faktory VITF-1 a VITF-3, ktoré špecificky rozpoznávajú konsenzus sekvenciu v rámci intermediálnych promótorov.

Promótor intermediálnych génov obsahuje dve dôležité oblasti: 14 bp úsek tvoriaci jadro promótoru, ktorý je oddelený 10-11 bázovými párami od tetranukleotidu iniciačného elementu (TAAA) lokalizovaného hneď pred iniciačným tripletom ATG. Jadro promótoru, nachádzajúce sa asi 30 nukleotidov pred TAAA, je podobne ako skoré promótoory bohaté na A/T bázy, ale líši sa špecifickou sekvenciou.

Transkripciu zabezpečujú vírusové i bunkové proteíny. Vírusové proteíny zahŕňajú vírusovú RNA polymerázu; guanylyltransferáza; VITF-1 („virus intermediate transcription factor“), podjednotka vírusovej RNA polymerázy, ktorá je homológna s eukaryotickým elongačným faktorom TFIIS (Rosales a spol, 1994); heterodimér VITF-3, ktorý je kódovaný génmi A8R a A23R. Bunkovým komponentom potrebným na iniciáciu intermediálnej transkripcie je VITF-2, tvorený komplexom dvoch proteínov – G3BP a p137. VITF-2 faktor funkčne dopĺňa vírusovú RNA polymerázu a vírusové transkripčné faktory VITF-1 a VITF-3.

Intermediálne (aj neskoré) mRNA sa líšia od skorých mRNA dvoma unikátnymi štruktúrnymi elementami – majú poly(A) sekvenciu na 5'-konci a heterogénne 3'- konce –

ktoré sú vytvárané vďaka jedinečnej vlastnosti vírusovej RNA polymerázy. Prvý element je generovaný v úvode transkripcie, počas ktorej RNA polymeráza opätovne číta a syntetizuje AAA iniciačného tetranukleotidu, kým nevznikne reťazec 30-50 adenínov pred prvým AUG kodónom primárneho transkriptu. Následne RNA polymeráza pokračuje v syntéze v smere transkripcie („downstream“) od promótoru bez ďalšieho zdržania. Táto nekódujúca oblasť výslednej RNA umožňuje lepšie rozoznanie AUG na ribozómoch a zvyšuje efektivitu translácie. Heterogénne 3'-konce intermediálnych (aj neskorých) mRNA vznikajú tým, že RNA polymeráza ignoruje terminačnú sekvenciu T₅NT (U₅NU), syntéza transkriptu je ukončená na rôzne vzdialených miestach za terminačnou sekvenciou, dôsledkom čoho je súbor transkriptov dlhých od 2 do 4 kb s variabilne dlhými 3'-koncami. Pridanie čiapočky a polyadenylácia intermediálnych transkriptov prebieha prostredníctvom rovnakých enzýmov ako počas post-transkripčnej úpravy skorých pre-mRNA.

Doteraz bolo identifikovaných 53 intermediálnych génových produktov u VACV. Patria medzi ne DNA viažúce proteíny zúčastňujúce sa formovania novej vírusovej častice, proteíny jadra viriónu, ale aj kľúčové transkripčné faktory neskoršej transkripcie, kódované génmi A1L, A2L a G8R.

6.4.3 Regulácie expresie neskorých génov

Neskoré gény sú lokalizované prevažne v centrálnej oblasti genómu. Prerekvizitou iniciácie ich transkripcie je syntéza intermediálnych proteínov, najmä 3-4 neskorých transkripčných faktov (VLTF), ktoré sa spolu s ďalšími skorými proteínmi a bunkovými faktormi podieľajú na prepise poslednej skupiny poxvírusových génov, trvajúcej až do ukončenia infekčného cyklu vírusov.

Neskoré promótory majú tri dôležité oblasti – centrálna oblasť tvorená 20 bp s niekoľkými po sebe idúcimi T reziduami, sú oddelené 6 bp sekvenciou od vysokokonzervovaného elementu TAAAT, z ktorého je iniciovaná transkripcia. Za TAAAT sekvenciou sa nachádza G alebo A, v prípade TAATG sa iniciačné miesto a iniciačný kodón ATG prekrývajú. Neskoré promótory rozoznávajú a viažu tri transkripčné faktory VLTF-1, VLTF-2 a VLTF-3, ktoré interagujú aj medzi sebou a sú nevyhnutné na transaktiváciu promótorov. Ďalší vírusový faktor, označovaný VLTF-4, je kódovaný génom H5R. Interakciou s neskorými transkripčnými faktormi zabezpečuje elongáciu transkripcie a pri jeho zapojení do celého procesu je transkripcia niekoľkonásobne stimulovaná.

Intermediálna aj neskorá transkripcia je pozitívne aj negatívne regulovaná bunkovými a vírusom-kódovanými faktormi. Vírusová helikáza A18 zohráva dôležitú úlohu, lebo v spolupráci s bunkovými proteínmi pôsobí ako faktor uvoľňujúci vírusové transkripty. Z bunkových proteínov sa na regulácii expresie poxvírusových proteínov podieľa TATA-viažúci proteín (pozitívna regulácia) a YY1 (negatívna regulácia).

Neskoré proteíny kódujú mnoho proteínov zapojených do morfogénzy vírusovej častice, membránových proteínov, komponenty vstupno-fúzneho komplexu (EFC), skoré transkripčné faktory a ďalšie štruktúrne súčasti komplexného viriónu.

6.5 Replikácia poxvírusov

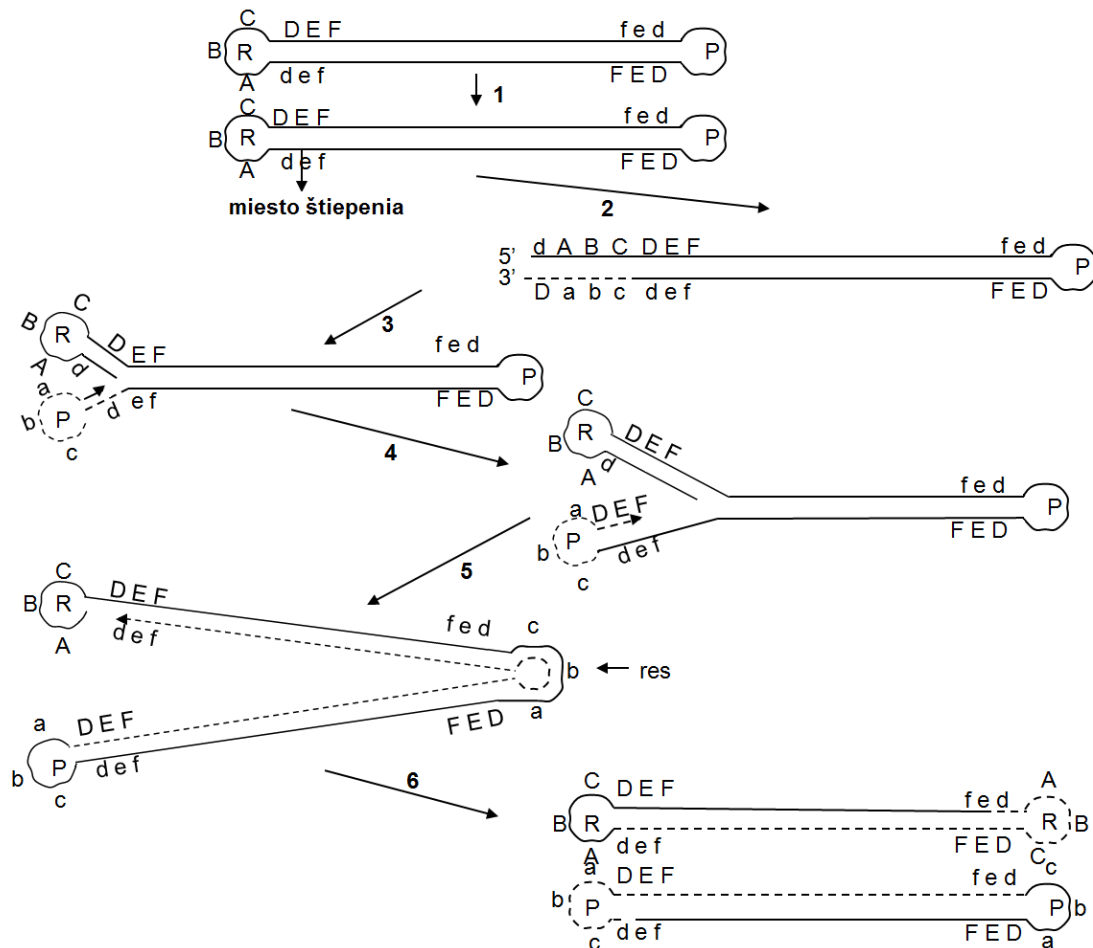
Syntéza novej vírusovej DNA začína 1-2 hodiny po infekcii a prebieha v cytopazme – v oblastiach nazývaných „vírusové továrne“ alebo „virozómy“. Tieto štruktúry, kde prebieha nielen replikácia DNA, ale aj transkripcia neskorých génov, sú obalené membránou derivovanou pravdepodobne z membrány endoplazmatického retikula. V bunke infikovanej jednou vírusovou časticou VACV sa vytvorí až 10 000 kópií genómu, pričom iba polovica je zbalená do viriónov. K replikácii poxvírusovej DNA dochádza až po nasyntetizovaní skorých vírusových proteínov (tab. 6.2), ktoré sú nevyhnutné pre syntézu nových genómov vo virozómoch. Model replikácie poxvírusov je podobný parvovírusom, tento mechanizmus sa označuje ako rotujúca vlásenka s vytesňovaním vlákna („rolling hairpin strand displacement“).

Tab. 6.2 – Enzyémy potrebné pre replikáciu DNA u VACV

DNA polymeráza	Resolváza Hollidayových spojení (HJR)
DNA polymerázový faktor procesivity	Proteín kináza
DNA primáza	„Scaffold“ proteín
Topoizomeráza I	Uracyl DNA glykozyláza
ssDNA-viažúci proteín	dUTPáza
DNA ligáza	Enzým opravujúci zlomy dsDNA

Keďže v genóme poxvírusov nebolo identifikované miesto Ori, hovoríme o Ori-nezávislej iniciácii replikácie. Prvým krokom je naštiepenie jedného vlákna DNA v oblasti vlásenky v terminálne uložených ITR. Vzniknutý voľný 3'-koniec DNA je primerom replikácie, vďaka čomu poxvírusy nemusia využívať ani RNA primer (napr. herpesvírusy) alebo proteínový primer (adenovírusy), a označujú sa ako „self-priming“. Predĺžovaním voľného 3'-konca je kopírovaná sekvencia vírusovej DNA až po 5'-koniec templátu (krok 2). Posledných 100 nukleotidov nového dcérskeho vlákna DNA sa zvinie do vlásenky (krok 3), dochádza k výmene templátu a nová vlásenka je primerom pokračujúcej syntézy DNA po celej dĺžke druhého rodičovského reťazca DNA genómu, pričom prvé rodičovské vlákno je z replikačného intermediátu vytesňované (krok 4). Syntéza DNA sa nezastaví ani v oblasti distálnej vlásenky, ale pokračuje cez celé prvé rodičovské vlákno až na jeho koniec (krok 5). Týmto spôsobom vzniká konkatemér, dimér dvoch spojených poxvírusových genómov. Na

rozuzlenie a rozdelenie konkateméru na genómy jednotkovej dĺžky je potrebný enzým resolváza, ktorý vytvára dvojláknové zlomy v špecifických miestach (oblasť vlásenky) dsDNA. Po spojení voľných koncov dsDNA vírusovou DNA ligázou vznikajú dve molekuly genómovej DNA (krok 6), pričom každá pozostáva z jedného rodičovského a jedného dcérskeho vlákna (semikonzervatívna syntéza DNA).



Obr. 6.4 – Ori-nezávislá replikácia poxvírusového genómu mechanizmom vytesňovania vlákna
Res – miesto štiepenia konkateméru

Niektoré poxvírusy kódujú proteíny, ktoré sa podielajú na syntéze deoxyribonukleotidov, aby zvýšili účinnosť replikácie – tymidínkináza, tymidilátkináza, ribonukleotid-reduktáza, dUTPáza a nekompletná guanylátkináza. Ostatné poxvírusy nemusia kódovať všetky tieto enzýmy a potom sú viac závislé od hostiteľskej bunky.

Zhrnutie charakteristík poxvírusov

- veľká obalená komplexná častica, môže mať dve formy (MV alebo EV)
- genóm tvorený dsDNA, obe vlákna genómu sú kovalentne spojené
- na koncoch genómu sú obrátené terminálne repetície (ITR) s koncovou vlásenkou
- 150-200 ORF
- kódujú veľký počet proteínov, ktoré ich robia nezávislými od bunkového transkripčného a replikačného aparátu
- kaskádovitá expresia génov – skoré, intermediálne a neskoré gény – závislá od syntézy 3 skupín transkripčných faktorov a prítomnosti 3 tried promótorov
- transkribované vírusovou RNA polymerázou, transkripty väčšinou nepodliehajú zostrihu, majú čiapočku a sú polyadenylované vírusovými enzýmami
- genóm bez Ori
- replikácia vírusovej DNA prostredníctvom vírusovej DNA polymerázy
- replikácia mechanizmom rotujúcej vlásenky a vytesňovaním vlákna DNA za vzniku konkatemérov
- replikácia a neskorá transkripcia sa uskutočňujú vo „vírusových továrňach“
- pravé kiahne sú jediným eradikovaným humánnym ochorením

7 PARVOVÍRUSY

Už názov čeľade indikuje, že sa jedná o skupinu vírusov malých rozmerov. Dones dávna boli považované za najmenšie vírusy infikujúce človeka, v tejto pozícii ich však nahradili vírusy z čeľade *Circoviridae*. Parvovírusy sú extrémne odolné voči vplyvom vonkajšieho prostredia a pôsobeniu detergentov. Aj keď ich zástupcovia infikujú veľké spektrum živočíchov z radov stavovcov aj bezstavovcov, hostiteľský okruh jednotlivých vírusov je úzky. Parvovírusy sa vyznačujú silným tropizmom k deliacim sa bunkám, avšak na rozdiel od veľkých DNA vírusov nedokážu indukovať proliferáciu buniek alebo ovplyvňovať imunitnú odpoveď hostiteľa.

V prvej polovici 20. storočia bolo zaznamenané ochorenie mačkovitých šeliem a neskôr aj ochorenie s rovnakým priebehom u noriek, ale až v roku 1952 boli identifikované zodpovedné patogény, ktorými boli navzájom veľmi podobné malé DNA vírusy. Začiatkom 60. rokov 20. storočia bol v elektrón-mikroskopických preparátoch pozorovaný malý vírus, ktorého replikácia bola závislá na koinfekcii buniek adenovírusom. Tento vírus dostal názov adeno-asociovaný vírus (AAV) a dal základ pre vznik rodu dependovírusov zoskupujúcich také vírusy, ktoré sú schopné produktívne infikovať bunky iba za pomoci "helper" vírusu, ktorým býva spravidla väčší DNA vírus (adenovírus, herpesvírus alebo poxvírus). V neprítomnosti helpera vedia dependovírusy navodiť latentnú/perzistentnú infekciu, počas ktorej integrujú svoju DNA do genómu hostiteľa.

Tab. 7.1 - Najvýznamnejšie parvovírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

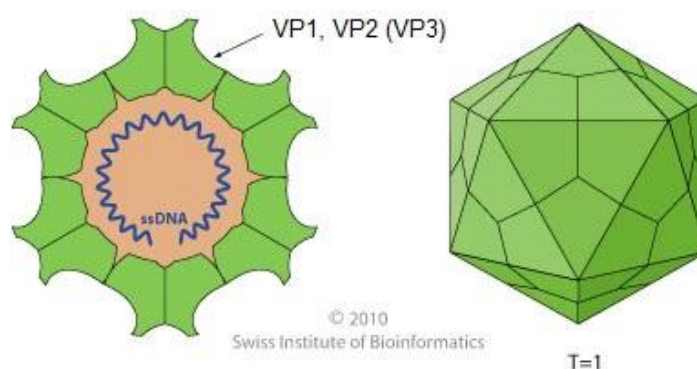
Vírus	Ochorenie
Parvovírus B19 (B19V)	Piata choroba (Erythema infectiosum)
Humánný bocavírus (HBoV)	Infekcie dolného dýchacieho traktu detí
Ľudský parvovírus 4 (PARV4)	Zhoršený priebeh AIDS, hepatitíd
Adeno-asociovaný vírus (AAV1-5)	Bez jednoznačnej asociácie s humánnym ochorením
Bovínny parvovírus (BPV)	Ochorenie tráviaceho a respiračného traktu dobytky
Malý myšší vírus (MVM)	Bez klinických prejavov

Ostatní zástupcovia parvovírusov, rozdelení do niekoľkých ďalších rodov, sú autonómne sa replikujúce vírusy. V roku 1974 bol pri skríningu ľudskej krvi identifikovaný parvovírus B19, infikujúci prekursor retikulocytov. Je asociovaný s dočasnou poruchou hematopoézy, nebezpečnou najmä u pacientov s kosáčikovitou anémiou a zároveň je pôvodcom detského ochorenia - piatej choroby (erythema infectiosum). Odvtedy bolo objavených viacero parvovírusov živočíchov (psov, mačiek, myší, hydiny, ošípaných, opíc) a

ľudí (tab. 7.1). Parvovírusy síce nespôsobujú ťažké alebo smrteľné ochorenia ľudí, sú však oveľa závažnejšími a ekonomicky významnými patogénmi dobytka a domácich zvierat.

7.1 Štruktúra viriónu

Vírusové častice parvovírusov sú neobalené a svojimi rozmermi, 18-26 nm, sa zaraďujú medzi jedny z najmenších a štruktúrne najjednoduchších vírusov. Virióny sú veľmi rezistentné voči pôsobeniu detergentov a stabilitu si udržia približne hodinu aj v prostredí s rôznymi hodnotami pH (pH 3-9) alebo teplotou do 56°C. Ikozaedrálny kapsid tvoria neglykozylované vírusové štruktúrne proteíny VP1 a VP2 (v pomere 1:19), pričom niektoré parvovírusy obsahujú aj VP3, ktorý vzniká proteolytickým štiepením VP2. Vírusový genóm tvorený lineárnou jednovláknovou DNA je uložený v kapside, v ktorom je fixovaný vďaka jeho asociácii s VP2 proteínom prostredníctvom 11 nukleotidov (obr. 7.1). V prípade vírusov rodu *Bocaparvovirus*, má parvovírusová DNA zbalená do viriónu iba negatívnu polaritu (komplementárnu k mRNA). Vo virióne zástupcov iných rodov (erytrovírusy, dependovírusy) je enkapsidovaná DNA jednej alebo druhej polaritty a ich pomer (väčšinou 1:1) je ovplyvnený druhom vírusu, ako aj typom hostiteľskej bunky.

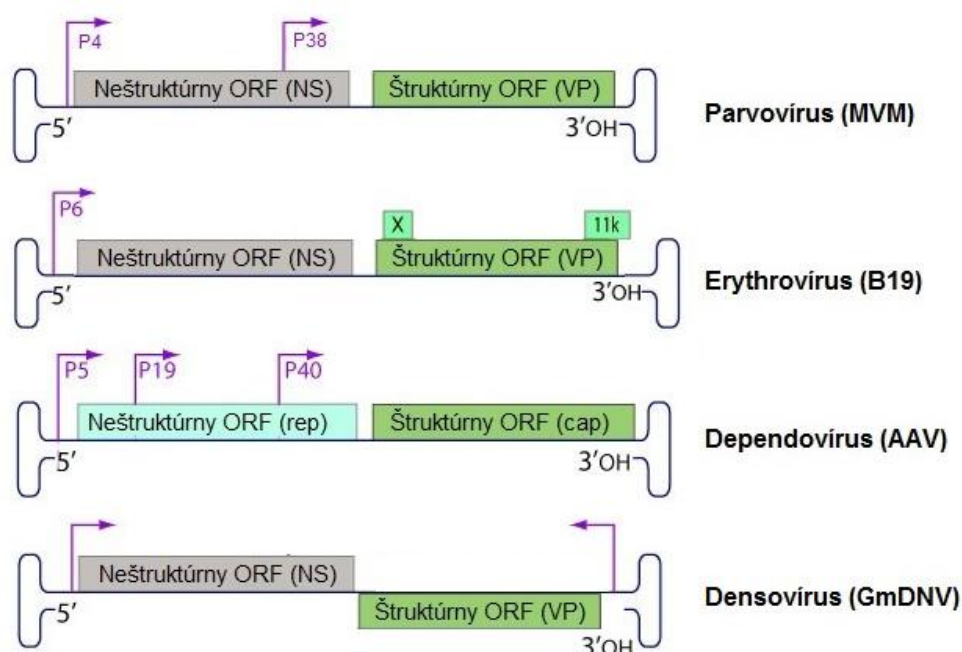


Obr. 7.1 - Štruktúra viriónu parvovírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

7.2 Organizácia genómu parvovírusov

Genóm parvovírusov tvorí jednovláknová lineárna molekula DNA, s dĺžkou okolo 5000 nukleotidov. Na oboch koncoch genómu sa nachádzajú palindrómové sekvencie (dlhé 120-550 nt), označované aj ako obrátené terminálne opakovania (ITR), ktoré umožňujú formovanie krátkeho dvojvláknového úseku so štruktúrou vlásenky s podobou rôzneho tvaru (T, Y alebo inou). U niektorých parvovírusov sú ich obe ITR komplementárne, môžu navzájom hybridizovať a udržiavať tak genóm v kvázi-cirkulárnej alebo panvicu-

pripomínajúcej podobe. U iných parvovírusov nie sú ITR komplementárne a koncové vlásenky môžu mať rôznu dĺžku či tvar. Nezávisle od vzájomnej komplementarity alebo tvaru koncových vláseniek, sú tieto štruktúry esenciálne pri replikácii vírusovej DNA. Parvovírusy majú iba dva neprekrývajúce sa otvorené čítacie rámce (ORF) lokalizované na rovnakom vlákne DNA - NS (alebo rep) kóduje neštruktúrne proteíny a VP (alebo cap) štruktúrne proteíny. Vo všeobecnosti je transkripcia génov regulovaná z dvoch promótorov, ale v genóme vírusov niektorých rodov môže byť prítomný len 1 alebo až 3 promótoary. Densovírusy prepisujú svoje gény z oboch vlákien DNA – genómovej ssDNA aj z opačného vlákna dvojvláknového replikačného intermediátu – sú teda ambisense (obr. 7.2).



Obr. 7.2 - Organizácia genómu parvovírusov

Neštruktúrny gén (NS/rep) sa nachádza na ľavej strane genómu, štruktúrny gén (VP/cap) na pravej strane genómu. P - promótor.

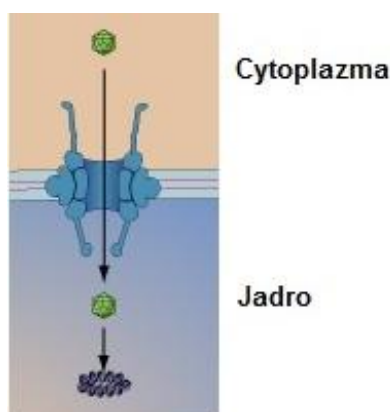
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

7.3 Infekčný cyklus parvovírusov

Autonómne sa replikujúce parvovírusy (ARP) k realizácii produktívnej infekcie potrebujú infikovať bunky, ktoré prechádzajú cez S fázu bunkového cyklu, nakoľko replikácia vírusového genómu je do veľkej miery závislá od faktorov hostiteľskej bunky.

U parvovírusov sa nedá hovoriť o preferencii spoločného receptora, lebo jednotliví zástupcovia sa viažu na rôzne receptory, čím sa vysvetľuje aj ich úzky bunkový a hostiteľský tropizmus. Bunkovým receptorom parvovírusu B19 je erytrocytárny P antigén, s ktorým interaguje prostredníctvom VP2 proteínu. K preniknutiu tohto vírusu do bunky je nevyhnutná

väzba aj na koreceptor ($\alpha 5\beta 1$ integrín). Najlepšie preštudovaným parvovírusom je myší vírus MVM, preto priebeh infekčného cyklu je opísaný pre tento modelový vírus.



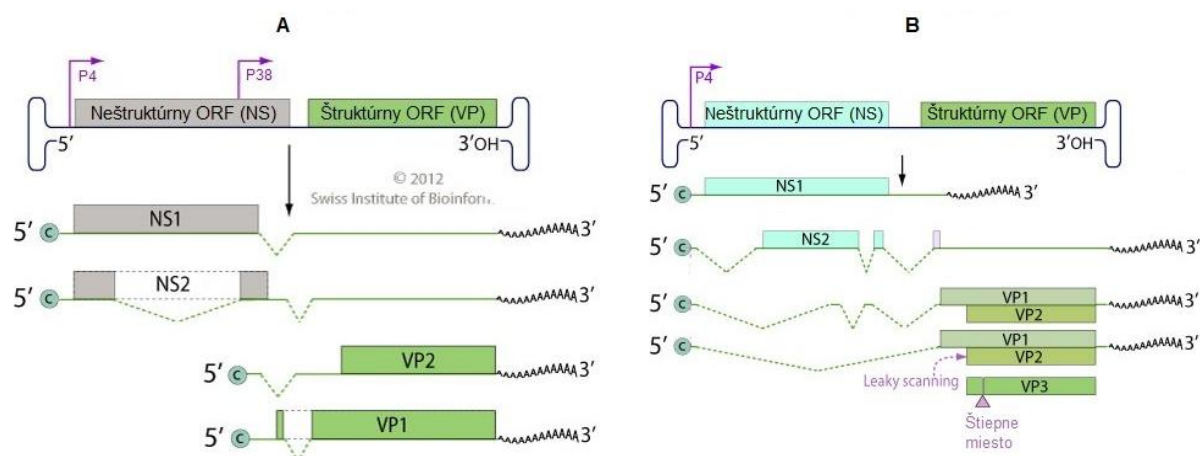
Obr. 7.3 - Vstup parvovírusu cez jadrový pór do jadra
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Po endocytóze vírusovej častice sa vplyvom PLA2 (fosfolipáza A2)-podobnej aktivity VP1 proteínu parvovírusy uvoľňujú z endozómu jeho permeabilizáciou. Vírusové častice putujú k jadru bunky vďaka jadrovému lokalizačnému signálu prítomnému na VP1 a kvôli ich malým rozmerom dokážu v intaktnej podobe vstúpiť cez jadrový pór až do jadra (obr. 7.3), kde je vírusový genóm uvoľnený z kapsidu doteraz neznámym mechanizmom. Následne je jednovláknová vírusová DNA bunkovými enzýmami konvertovaná na dsDNA. Polarita vstupujúcej vírusovej DNA nie je teda podstatná a neovplyvňuje procesy počas infekčného cyklu vírusu, keďže v jadre dochádza k dosyntetizovaniu druhého vlákna ešte pred spustením transkripcie. Duplex DNA je templátom pri transkripcii vírusového genómu bunkovou RNA polymerázou II. Najprv dochádza k prepisu neštruktúrneho génu a vytvorené mRNA sú v cytoplazme translatované na proteíny NS1 a NS2, ktoré sú nevyhnutné počas replikácie vírusovej DNA. Samotná replikácia prebieha mechanizmom vytesňovania jednovláknovej DNA, za vzniku monomérych aj konkatemérnych dvojvláknových intermediátov. NS1 zároveň transaktivuje vnútorný transkripčný promótor (v rámci konkatemérneho intermediátu) a tak riadi syntézu štruktúrnych proteínov. Keď je nasyntetizované dostatočné množstvo VP proteínov, dochádza k prepnutiu replikácie zo syntézy duplexov na vyštiepenie jednovláknových vírusových DNA, ktoré sú vbalované do formujúcich sa kapsidov v jadre bunky. Zrelé vírusové častice sú uvoľnené z bunky väčšinou po jej apoptóze.

7.4 Expresia génov u parvovírusov

Vzhľadom na minimalistický počet kódovaných proteínov sú parvovírusy vo veľkej miere odkázané na transkripčný aparát bunky. Prepis preto realizuje hostiteľská RNA

polymeráza II, ktorá však ako templát rozoznáva iba dvojvláknovú DNA. Z toho dôvodu, po vstupe vírusového genómu do jadra bunky je ssDNA doplnená o druhé vlákno. Tento proces je realizovaný hosťiteľskými enzýmami zabezpečujúcimi opravu DNA počas S fázy bunkového cyklu, pričom hydroxylová skupina vlásenky na 3'-konci genómu slúži ako primer (tzv. „self-primer“). Vzniknutý DNA duplex je s podporou vírusových štruktúrnych proteínov rozpoznávaný bunkovými transkripčnými faktormi, ktoré s účasťou RNA polymerázy II iniciujú syntézu prvých parvovírusových transkriptov. Výsledné mRNA sú upravené alternatívnym zstrihom, nesú čiapočku a sú polyadenylované.



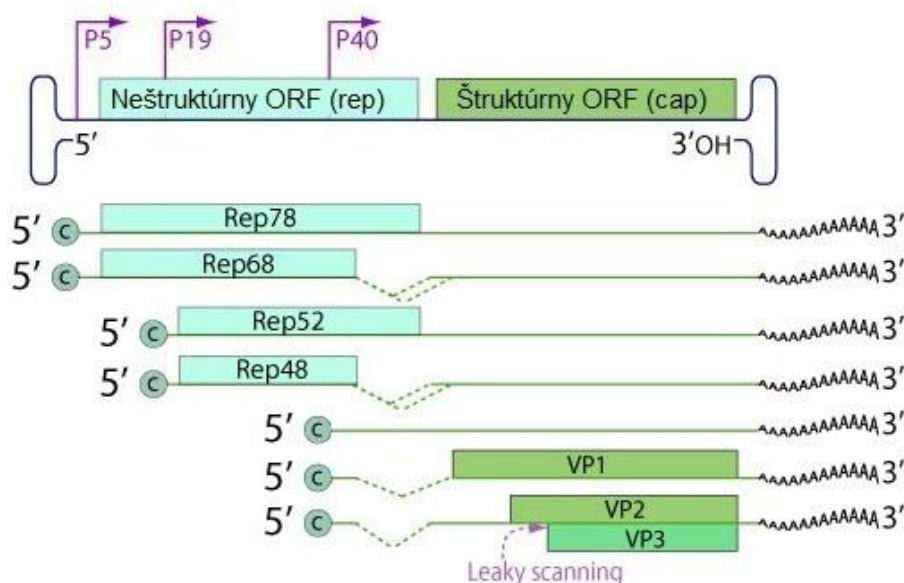
Obr. 7.4 - Transkripcia parvovírusov

A - transkripcia z 2 promótorov; B - transkripcia z jedného promótoru
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Transkripčné schémy jednotlivých parvovírusov sú rozdielne na základe toho, že v genóme vírusov sa nachádza rôzny počet promótorov a polyadenylačných signálov (obr. 7.4 a 7.5). MVM má dva promótory a jeden poly(A) signál na pravej strane genómu. P4 promótor MMV riadi syntézu mRNA ďalej translatovaných na neštruktúrne proteíny a P38 syntézu mRNA pre štruktúrne proteíny. Na transkripcii z P4 sa podieľajú najmä bunkové transkripčné faktory - tento fakt má na svedomí aj bunkovú/tkanivovú špecificitu jednotlivých parvovírusov - kým iniciácia transkripcie z P38 je riadená hlavne vírusovým NS1 proteínom. Na transaktiváciu vnútorného promótoru sú potrebné 3 *cis*-aktivačné sekvencie – *tar* sekvencia („transactivation response element“, v pozícii -139), miesto väzby Sp1 faktora (v pozícii -50) a TATA box. Erythrovírusy (B19V) majú len jeden promótor, ale štruktúrny a neštruktúrny ORF je ukončený vlastným polyadenylačným signálom. Produkcia kapsidových proteínov je spustená len po iniciácii replikácie genómu, ktorá dáva signál RNA polymeráze II, aby ignorovala prvý poly(A) signál a syntetizovala dlhý transkript obsahujúci sekvenciu kódujúcu informáciu pre vznik VP proteínu.

V genóme dependovírusov (AAV) sú prítomné až tri promótory (P5, P19, P40) a jeden poly(A) signál. Ich transkripcia je zložitejšia, keďže závisí od vnútrobunkového prostredia,

podmienok vonkajšieho prostredia (UV, teplota, chemické zloženie) a infekcie bunky inými vírusmi. V zdravých bunkách AAV reprimuje svoju vlastnú transkripciu aj replikáciu DNA, zároveň však dochádza k expresii minimálneho množstva Rep proteínu. Pri koinfekcii bunky adenovírusom alebo herpesvírusom zohrávajú produkty týchto " helper" vírusov (E1A, E1B, E2A, ICP0) kľúčovú úlohu pri aktivácii AAV transkripcie, napriek tomu, že v promótoroch AAV sa nachádzajú väzobné miesta pre transkripčné faktory nielen „helper“ vírusu, ale aj pre bunkové TF a neštruktúrne proteíny AAV.



Obr. 7.5 - Transkripcia dependovírusov (AAV2)

Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

NS1 - fosforylovaný neštruktúrny multifunkčný proteín, ktorý je nevyhnutný počas replikácie vírusovej DNA vďaka svojim dvom enzymatickým funkciám – ATP-závislej helikázy a sekvenčne-spezifickej endonukleázy. V priebehu iniciácie replikácie dokáže rozplieť dsDNA a zároveň štiepiť jedno vlákno duplexu DNA v počiatku replikácie v rámci ITR oblasti. NS1 proteín slúži aj ako transaktivátor vírusového vnútorného (druhého, centrálného) promótoru – svojou väzbou na *tar* sekvenciu a väzbou na transkripčné faktory CBP (CREB-viažúci proteín), Sp1, TBP (TATA-viažúci proteín), TFIIA – čím kontroluje expresiu štruktúrnych génov. Aj keď nedokáže priamo nasadnúť na promótor hostiteľa, svojou väzbou na bunkové faktory (napr. Sp1) je schopný stimulovať alebo reprimovať ich aktivitu, napríklad zvýšiť expresiu proteínu p21. Okrem toho, NS1 má cytotoxický efekt na eukaryotické bunky, pričom táto jeho dispozícia sa pripisuje jeho interakcii s podjednotkou kazeín kinázy 2, zvýšením syntézy proapoptotických faktorov (Bax a Bad) či bunkových kaspáz (kaspáza 3, 6, 8, 9) ako aj indukciou TNF- a Fas-závislej apoptotickej dráhy.

NS2 - je fosforylovaný proteín s funkciou helikázy. Predpokladá sa jeho zapojenie pri vytesňovaní vlákna počas replikácie parvovírusového genómu. NS2 dokáže ovplyvniť

syntézu aj transport kapsidových proteínov, a to prostredníctvom interakcie s jadrovým exportným proteínom Crm-1. Zároveň je potrebný pre tvorbu infekčných vírusových častíc.

Rep - gén dependovírusov, z ktorého sú exprimované 4 neštruktúrne proteíny. Transkripty pre Rep78 a Rep52 sú prepisované z P5, kým Rep68 a Rep40 z druhého promótoru P19. Všetky Rep proteíny však zdieľajú dlhú homologickú oblasť. Rep78 a Rep68 sú lokalizované v jadre, podobne ako NS1 proteín a zúčastňujú sa na replikácii pravovírusového genómu, avšak na rozdiel od MVM, v priebehu tohto procesu Rep proteíny nezostávajú asociované s 5'-koncom DNA. Oba proteíny majú endonukleázovú aj helikázovú aktivitu, dokážu interagovať s bunkovými transkripčnými faktormi, ale aj s ICP8 herpevírusov alebo E1 proteínom papilomavírusov. V neprítomnosti "helper" vírusu však reprimujú vlastné promótory. Rep78 indukuje apoptózu aktiváciou kaspázy 3. Nedávno sa zistilo, že Rep78 bráni fosforylácii pRb, stabilizuje komplex pRb/E2F a zároveň sa viaže na E2F-závislé promótory, čím inhibuje ich aktivitu. Vďaka týmto skutočnostiam sa považuje za antionkogén.

Dva menšie neštruktúrne proteíny – Rep52 a Rep40 – sú prítomné v cytoplazme infikovanej bunky. Podobne ako NS2 sa vyznačujú helikázovou aktivitou a vplyvom na morfogénu viriónov.

VP1 - je neglykozylovaný štruktúrny proteín prítomný vo virióne. Väčšina vírus-neutralizačných protilátok vzniká voči unikátnej doméne VP1 proteínu, ktorý je exponovaný na povrchu kapsidu. V štruktúre VP1 proteínu sa nachádza doména s aktivitou podobnou vápnik-dependentnej fosfolipáze A2 (PLA₂), ktorá sa vplyvom konformačných zmien počas vstupu vírusu do bunky odhaľuje a zabezpečuje uvoľnenie kapsidu z endozómu. Jadrový lokalizačný signál (NLS) nachádzajúci sa na VP1 následne zabezpečuje transport viriónu k jadrovému póru.

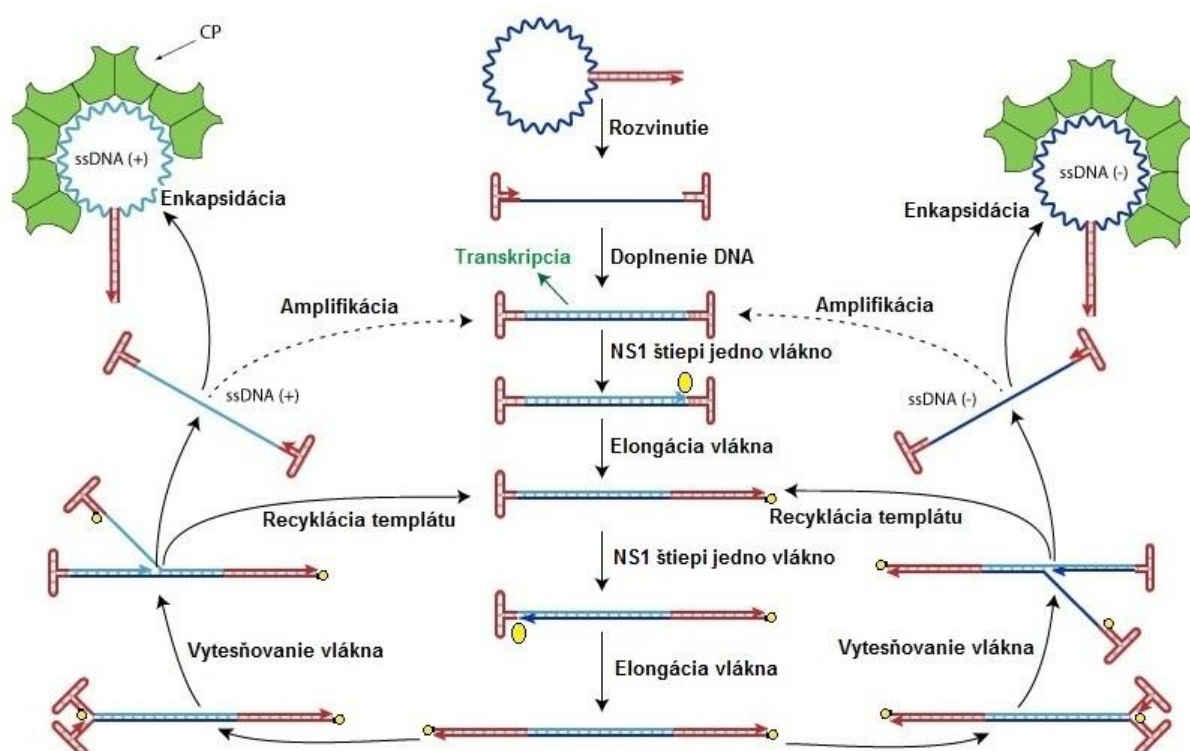
VP2 - je identický s C-terminálnym koncom VP1. Je zodpovedný za väzbu na hlavný bunkový receptor. Niektoré parvovírusy obsahujú vo virióne aj VP3 a VP4. VP3 vzniká proteolytickým štiepením VP2. VP4 je prítomný u zástupcov infikujúcich hmyz a vzniká uplatnením "leaky scanning" počas translácie.

7.5 Replikácia parvovírusov

Aj keď syntézu nového vlákna vykonáva bunková DNA polymeráza, expresia neštruktúrnych vírusových proteínov je nevyhnutná k úspešnej realizácii kompletného procesu replikácie parvovírusového genómu.

Ako už bolo spomenuté, narozdiel od syntézy bunkovej DNA, nie je pri iniciácii replikácie potrebný RNA primer, nakoľko 3'-OH skupina v oblasti ITR na 3'-konci ssDNA slúži ako „self-primer“ pri syntéze komplementárneho vlákna DNA. V ďalšom kroku, NS1 proteín rozoznáva špecifickú palindrómovú sekvenciu označenú ako TRS („terminal resolution site“, 5'-ACCA-3') v počiatku replikácie a vytvára jednovláknový zlom vďaka

svojej endonukleázovej aktivite. V prípade ARP zostáva NS1 proteín kovalentne naviazaný na 5'-koniec vírusovej DNA vzniknutý v mieste zlomu. NS1 proteín slúžiaci zároveň ako helikáza pomáha uvoľniť a rozplieť sekundárnu štruktúru na konci genómu. Súčasne, voľný 3'-koniec v mieste zlomu je primerom pri syntéze komplementárneho dcérskeho vlákna DNA počas replikácie mechanizmom vytesňovania jednovláknovej DNA („single-strand displacement“), alternatívne označovanom aj ako rotujúca vlásenka („rolling hairpin“). Replikácia je kontinuálna (bez syntézy Okazakiho fragmentov), replikačná vidlica postupuje po templáte, pričom ssDNA je z dsDNA intermediátu vytesnená a vyštiepená v mieste TRS opäť prostredníctvom NS1. Novovznikujúca ssDNA interaguje so štruktúrnymi proteínmi pri formovaní nových vírusových častíc (obr. 7.6).



Obr. 7.6 - Replikácia parvovírusového genómu mechanizmom vytesňovaného jednovláknovej DNA
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

7.6 Parvovírusy závislé od „helper“ vírusu

Spomedzi dependovírusov najväčší záujem sa venoval adeno-asociovaným vírusom (AAV), pre niektoré z ich jedenástich sérotypov je hostiteľom aj človek. Narozdiel od autonómne sa replikujúcich parvovírusov, AAV sa vyznačujú širokým bunkovým tropizmom a dokážu infikovať viac druhov hostiteľov. Produktívna replikácia prebieha veľmi podobne ako u ARP, avšak v priebehu replikácie genómu nebol identifikovaný žiaden kovalentne

viazaný proteín na 5'-koncoch DNA. Najmarkantnejším rozdielom je však nevyhnutnosť koinfekcie bunky „helper“ vírusom, lebo ich veľmi skoré proteíny sú prerekvizitou replikácie dependovírusového genómu a tvorby infekčného potomstva. Príkladmi zapojenia niektorých adenovírusových neštruktúrnych proteínov v rámci infekčného cyklu adeno-asociovaných vírusov sú účasť E1A na transaktivácii AAV promótorov alebo regulácia exportu mRNA AAV z jadra do cytoplazmy pomocou E4 a E1B. Na druhej strane, dependovírusy dokážu inhibovať replikáciu „helper“ vírusu a neutralizovať onkogénne vlastnosti E1A a E1B.

Ďalšou jedinečnou vlastnosťou AAV je, že v neprítomnosti helper vírusu dokážu nastoliť latentnú infekciu a pretrvať v organizme natrvalo. Počas tohto obdobia je genóm AAV špecificky integrovaný do 19q13.3-qtter lokusu ľudského chromozómu 19. Ide o vôbec jediné doteraz známe vírusy, ktoré sa neintegrujú do genómu hostiteľa náhodne, ale na jedno konkrétne miesto. Tento proces je riadený proteínmi Rep78 a Rep68, ktoré interagujú jednou doménou s Rep-viažúcim miestom (RBS) lokalizovanom v ITR vírusu a zároveň druhou doménou rozoznávajú RBS-podobnú sekvenciu v mieste integrácie (AAVS1) na chromozóme 19. Rovnaké vírusové proteíny zabezpečia štiepenie vírusovej DNA sekvencie a jej integráciu v cieľovom mieste. Napriek tomu, že u značného percenta ľudskej populácie bola identifikovaná prítomnosť sekvencií AAV, ktoré môžu byť reaktivované v prítomnosti "helper" vírusu, do dnešnej doby neboli zaznamenané žiadne negatívne následky takejto infekcie pre ľudí.

7.7 Využitie parvovírusov v terapii ochorení

Napriek skutočnosti, že niektoré ARP boli objavené pri snahe o izoláciu vírusov spôsobujúcich nádory, následné štúdium dokázalo schopnosť parvovírusov efektívnejšie sa replikovať práve v nádorových bunkách – tzv. onkotropizmus. Parvovírusy dokážu redukovať tvorbu nádorov, ktoré vznikli u zvierat spontánne, pôsobením chemických mutagénov alebo inými vírusmi. Mechanizmus, akým parvovírusy dokážu navodiť tento efekt, má niekoľko úrovní. ARP sa replikujú v transformovaných bunkách lepšie ako v zdravých, lebo transformované bunky vstupujú do S fázy bunkového cyklu častejšie. Zároveň, v týchto bunkách dochádza k zvýšenej produkcii vírusového NS1 proteínu, ktorý je pre ne toxický. Parvovírusy nenavodzujú interferónom-indukovanú imunitnú odpoveď v nádorových bunkách, vďaka čomu sa môžu replikovať vo zvýšenej miere. Jedným z ďalších faktorov je aj antiproliferatívny účinok proteínov Rep78/68. Okrem toho, genóm parvovírusov s vlásenkou na oboch koncoch sa bunke javí ako poškodená DNA, to v nádorovej bunke aktivuje mechanizmy opravy DNA, avšak bez blokovania progresie bunkového cyklu, výsledkom čoho je smrť bunky počas mitózy. Nedávno bolo zistené, že parvovírusy okrem vnútrobunkovej onkolytickej aktivity vedia indukovať NK bunkami-sprostredkovanú lýzu nádorových buniek a stimulovať protinádorovú imunitnú odpoveď. Predmetom súčasného

výskumu je zužitkovanie týchto unikátnych vlastností parvovírusov pri cielenej onkolytickej liečbe nádorových ochorení.

Unikátne vlastnosti adeno-asociovaných vírusov boli podnetom k ich využitiu ako vektorov v génovej terapii. Výhodou je najmä ich bezpečnosť, keďže AAV sa nedokáže replikovať bez prítomnosti "helper" vírusu a dokonca ani v takom prípade nie sú patogénne pre človeka. K ďalším benefitom patrí ich schopnosť perzistentne infikovať široké spektrum deliacich sa aj nedeliacich sa buniek bez indukcie zápalovej odpovede a stabilná expresia génov. AAV vektorový systém je možné využiť aj na génovú terapiu deliacich sa buniek, pri ktorej sa využíva sekvenčne-špecifická integrácia AAV do genómu bunky umožňujúca zachovanie transgénu aj v dcérskych bunkách. V takom prípade musia byť v bunke prítomné Rep proteíny AAV. Častou variantou je dizajnovanie AAV vektorov, kde oba parvovírusové gény sú nahradené terapeutickým transgénom a z pôvodnej parvovírusovej sekvencie sú zachované len ITR oblasti. Bez prítomnosti Rep proteínov zostáva takýto vektor po transdukcii v bunke v podobe extrachromozomálneho elementu, ktorý dokáže pretrvávajúť v bunke počas dlhého obdobia (1 rok u hlodavcov, niekoľko rokov u psov) a tým zabezpečiť relatívne vysokú expresiu transgénu. V súčasnosti prebieha niekoľko klinických štúdií využívajúcich AAV vektory na liečbu cystickej fibrózy, hemofilie, svalovej dystrofie, Parkinsonovej aj Alzheimerovej choroby alebo malígneho melanómu.

Zhrnutie charakteristík parvovírusov

- **malá neobalená častica nesúca genóm tvorený lineárnou ssDNA**
- **na koncoch genómu sú obrátené terminálne repetície (ITR) tvoriace vlásenku**
- **2 ORF**
- **1-3 promótoary, transkribované bunkovou RNA polymerázou II, uplatňuje sa alternatívny zostrih, transkripty majú čiapočku a sú polyadenylované**
- **2-4 neštruktúrne proteíny regulujú replikáciu vírusovej DNA, 1-4 štruktúrne proteíny zabezpečujú formovanie kapsidu**
- **Replikácia vírusovej DNA prostredníctvom bunkovej DNA polymerázy**
- **závislosť na S fáze bunkového cyklu hostiteľa**
- **replikácia mechanizmom vytesňovania jednovláknovej DNA (rotujúca vlásenka)**
- **pre replikáciu dependovírusov je nevyhnutná koinfekcia s "helper" vírusom**
- **AAV schopné špecifickeju integrácie do hostiteľského genómu**
- **využitie v génovej terapii a protinádorovej liečbe**

8 HEPADNAVÍRUSY

Napriek tomu, že termín „hepatitída B“ bol známy a asociovaný s krvou prenosným ochorením už od roku 1947, až v roku 1963 Baruch Blumberg objavil dovtedy neznámy proteín v krvi austrálskeho domorodca. Tento Austrálsky antigén bol za krátky čas spojený so sérovou hepatitídou a vďaka skríningu krvi v krvných bankách sa podarilo dvojnásobne znížiť incidencia post-transfúzne získanej hepatitídy. Za tento objav získal Blumberg v roku 1976 Nobelovu cenu za medicínu. V súčasnosti je známe, že Austrálsky antigén je povrchovým proteínom vírusu hepatitídy B schopným tvoriť prázdne sférické alebo filamentózne častice, ktoré sú od 80-tych rokov 20. storočia základným komponentom všetkých schválených vakcín proti hepatitíde B.

Napriek dostupnej vakcíne, vírus hepatitídy B (HBV) predstavuje hlavný globálny problém verejného zdravotníctva. Podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) z roku 2017 je hepatitídou B celosvetovo chronicky infikovaných približne 350 miliónov ľudí, pričom na následky infekcie ročne umiera až 780 000 pacientov, najčastejšie na cirhózu pečene alebo hepatocelulárny karcinóm.

Úzky hostiteľský okruh HBV – jediným primárnym rezervoárom vírusu je človek – bunková-špecificita k hepatocytom, ako aj obmedzené možnosti kultivácie na bunkových kultúrach *in vitro*, sťažujú možnosti štúdia tohto vírusu. Z toho dôvodu sú niektoré živočíšne hepadnavírusy dôležitým modelovým systémom pri výskume patogenézy a replikácie HBV (tab. 8.1).

Odhaliťovanie molekulárnej biológie hepadnavírusov prinieslo dovtedy tie najneočakávanejšie a najpozoruhodnejšie objavy v rámci replikačných stratégií vírusov. Prítomnosť reverznej transkripcie počas ich replikačného cyklu a organizácia genómu svedčí o ich fylogenetickej príbuznosti s retrovírusmi a kaulimovírusmi.

Tab. 8.1 - Najvýznamnejšie hepadnavírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

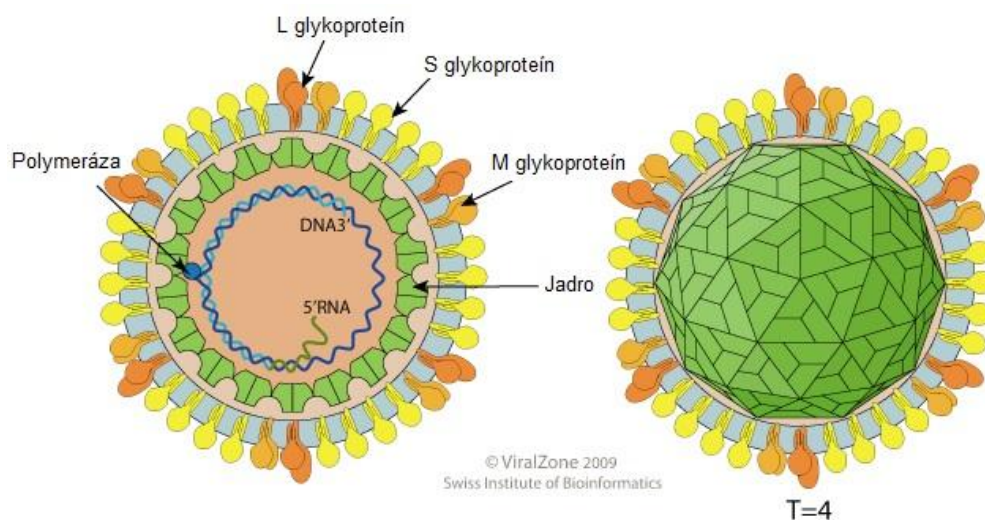
Vírus	Ochorenie
Vírus hepatitídy B (HBV)	Hepatitída B
Vírus hepatitídy svišťa (WHV)	Rakovina pečene u zvierat
Vírus hepatitídy kačice (DHBV)	Akútna hepatitída u kačíc

8.1 Štruktúra viriónu

Infekčné vírusové častice hepadnavírusov sú sférického tvaru, s priemerom 42 nm (obr. 8.1). V prípade HBV sú označované ako Daneho častice, podľa Davida Daneho, ktorý

ich ako prvý identifikoval. Obal získava virión z membrán endoplazmatického retikula. V ňom sú zakotvené tri typy povrchových glykoproteínov HBsAg – veľký (LHBsAg), stredný (MHBsAg) a malý (SHBsAg). Najviac zastúpeným proteínom v membráne je malý antigén. Pod obalom sa nachádza tzv. jadro – ikozaedrálny kapsid pozostávajúci z kapsidového (jadrového) proteínu HBcAg obsahujúci vírusovú DNA. Genóm hepadnavírusov je neštandardný, väčšinou v dvoch tretinách dĺžky tvorený dvojvláknovou DNA a zostávajúci úsek jednovláknovou DNA. Vo virióne sa nachádza aj polymeráza/reverzná transkriptáza, označovaná ako P proteín. Navyše, vo vírusovej častici bývajú zbalené aj niektoré bunkové proteín kinázy a šaperóny.

V krvi HBV infikovaného pacienta môže byť detegovaných až 10^9 Daneho častíc v jednom mililitri. Okrem toho, počas infekcie vzniká veľké množstvo neinfekčných obalov, prázdnych častíc sférického alebo filamentózneho tvaru (10^{13} /ml krvi), ktoré nesú na svojom povrchu skoro výlučne len SHBsAg.

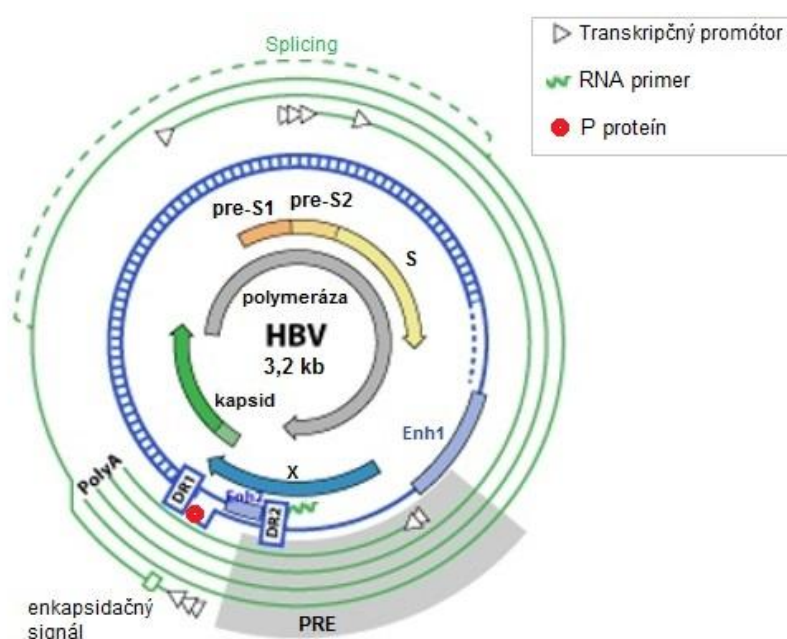


Obr. 8.1 - Štruktúra viriónu hepadnavírusov
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

8.2 Organizácia genómu hepadnavírusov

Cirkulárny genóm hepadnavírusov má veľkosť len približne 3200 bp, preto sa jedná o jeden z najmenších vírusových genómov schopných infikovať človeka. Ich genetická informácia pozostáva z DNA, ktorej jeden úsek je dvojvláknový a zostávajúca časť len jednovláknová. Tento efekt je spôsobený prítomnosťou jedného dlhého kompletného vlákna (negatívne vlákno – tj. komplementárneho k mRNA) a druhého krátkeho nekompletného vlákna DNA (pozitívne vlákno), ktoré dosahuje 40-80% dĺžky genómu. Narozdiel od ostatných vírusov s cirkulárnymi DNA genómami, žiadne z vlákien hepadnavírusov netvorí

kovalentne uzavretú kružnicu a preto dostala označenie RC DNA (relaxovaná cirkulárna DNA). Na 5'-konci negatívneho vlákna sa nachádza vírusový P proteín, kovalentne viazaný s DNA cez tyrozínový zvyšok na svojom amino-terminálnom konci. Pozitívne vlákno je v oblasti 5'-konca ukončené úsekom 17-19 nt dlhého RNA primeru s čiapočkou, ktorý pochádza z pregenómvej RNA (pgRNA). Napriek svojej veľkej dĺžke, v kompaktne organizovanom genóme boli identifikované štyri ORF – pomenované C, P, S, X, ktoré sa prekrývajú. Pred každým z génov sa nachádza transkripčný promótor, avšak polyadenylačné miesto je jediné, umiestnené 20 báz pred 3'-koncom negatívneho vlákna DNA.



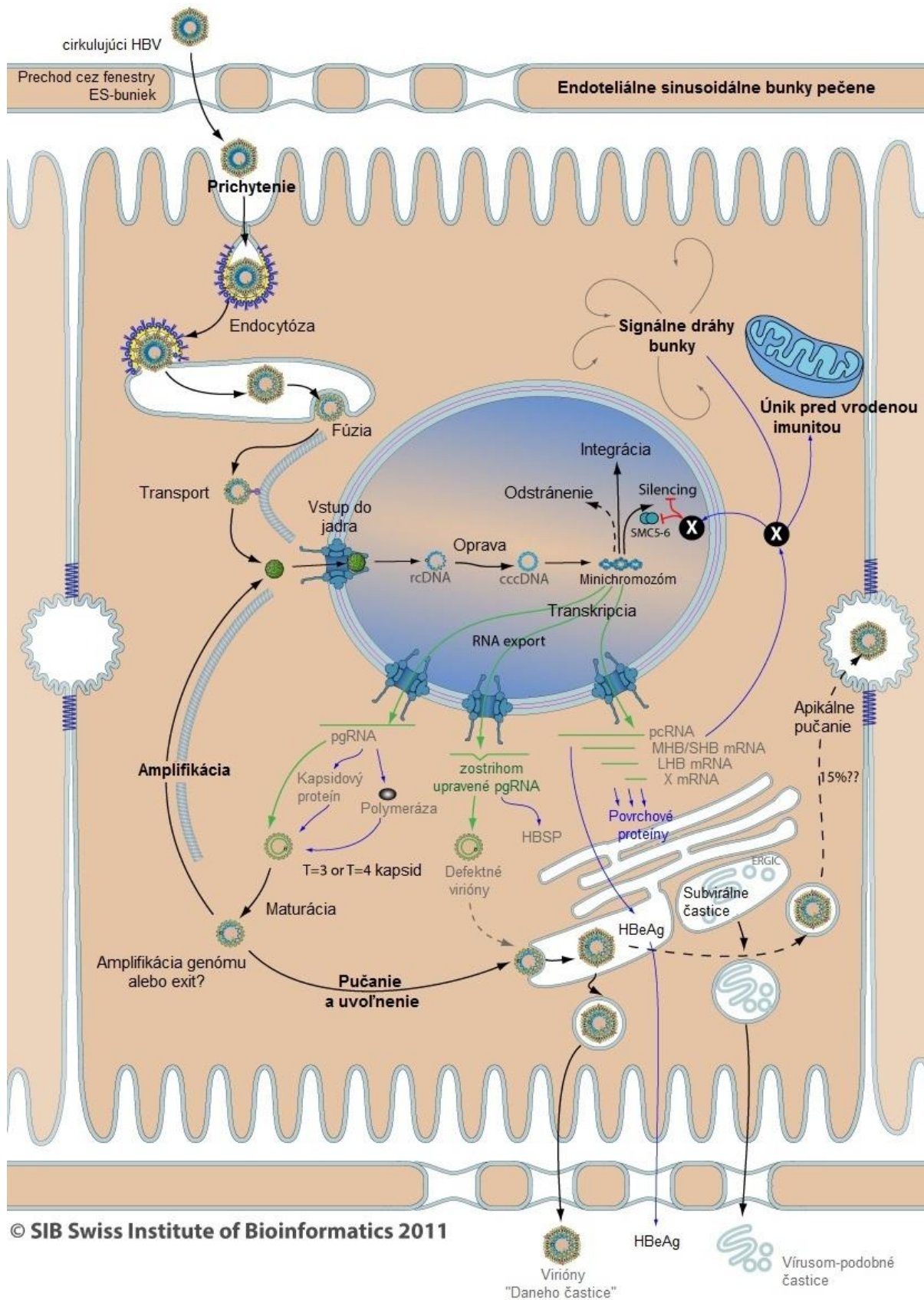
Obr. 8.2 – Organizácia genómu hepadnavírusov

Enh – enhancery, PRE – exportný motív pgRNA, DR – priame opakovania
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

V genóme je niekoľko regulačných miest – enhancery (enh1 a 2), enkapsidačný signál (ϵ), glukokortikoid-responzívny element (GRE) a dva úseky priamych opakovaní (DR1 a DR2). Konce genómu nie sú kovalentne spojené, držia pri sebe vďaka vodíkovým mostíkom medzi DR2 repetíciami prítomnými na 5'-konci oboch vlákien DNA (obr. 8.2).

8.3 Infekčný cyklus hepadnavírusov

Hepadnavírusy sa vyznačujú silným hepatotropizmom, aj keď bola dokázaná minimálna hladina replikácie HBV aj v monocytoch, epiteliálnych a endotelových bunkách. Vzhľadom na obmedzené možnosti štúdia hepadnavírusov *in vitro*, nie sú všetky kroky ich infekčného cyklu úplne objasnené.



Obr. 8.3 – Infekčný cyklus hepadnavírusov v hepatocyte
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Virióny HBV sa viažu prostredníctvom HBsAg na heparán-sulfátový proteoglykán (HSPG) hepatocytov. Nedávno bolo zistené, že pre úspešný vstup HBV do bunky je potrebná väzba aj s ďalším bunkovým receptorom – NTCP. Po endocytóze, NLS na HBcAg zabezpečuje transport vírusového kapsidu k jadrovému póru, cez ktorý je genóm uvoľnený do jadra bunky. RC DNA je za pravdepodobnej účasti vírusovej DNA polymerázy (P proteín) konvertovaná na kovalentne uzavretú cirkulárnu DNA (cccDNA). Ide o mnohostupňový biochemický proces zahŕňajúci dosyntetizovanie pozitívneho vlákna na dĺžku negatívneho vlákna, odstránenie redundandných sekvencií, zrušenie väzby P proteínu a RNA primeru na konce vírusového genómu, ako aj ligáciu voľných 3'- a 5'-koncev genómu. Predpokladá sa, že určité kroky v rámci vzniku cccDNA sú uskutočňované bunkovým aparátom opravy DNA. Niektoré experimenty však naznačujú, že dokonca všetky fázy konverzie, vrátane doplnenia pozitívneho vlákna, sú realizované enzymatickým aparátom hostiteľa. Doteraz však nebol úplne identifikovaný kompletný set bunkových faktorov zapojených v tomto procese. Vytvorenie cccDNA je jedným z predpokladov úspešnej vírusovej infekcie, slúži ako templát pri transkripcii a je nevyhnutná pre nastolenie perzistentnej infekcie, počas ktorej je udržiavaná v jadre vo forme epizómu. Keďže táto forma vírusovej DNA je superšpiralizovaná a obalená hostiteľskými histónmi, je často označovaná aj ako „minichromozóm“. Infekcia bunky pokračuje transkripciou vírusového genómu bunkovou RNA polymerázou II. Výsledkom sú 4 typy transkriptov – 3 kratšie a jeden o dĺžke genómu (pgRNA) – ktoré sú translatované na jednotlivé vírusové proteíny.

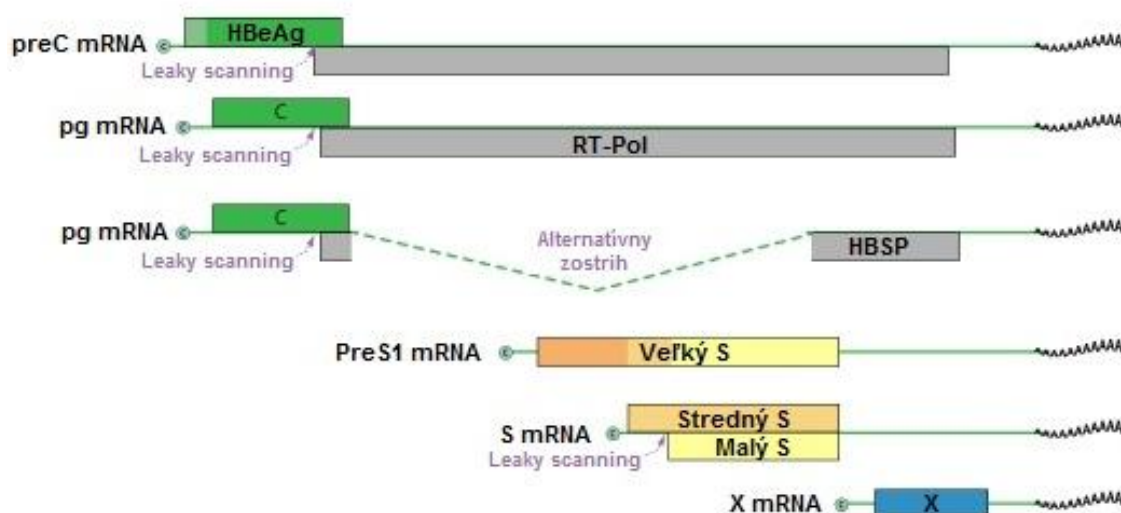
Pregenómová RNA (pgRNA) môže byť zároveň s P proteínom enkapsidovaná do novovznikajúceho kapsidu, v ktorom prebieha reverzná transkripcia pgRNA na genómovú RC DNA. Následne kapsid získava na membránach endoplazmatického retikula obal nesúci vírusové povrchové glykoproteínmi a takáto zrelá častica je uvoľnená z bunky. Súčasne s tým infikovanú bunku opúšťa niekoľko násobne väčší počet vírusom-podobných častíc, ktoré neobsahujú vírusový genóm a slúžia na oklamanie imunitnej odpovede hostiteľského organizmu.

8.4 Expresia génov u hepadnavírusov

Transkripcii hepadnavírusov v jadre bunky predchádza konverzia vstupujúceho vírusového genómu na uzavretú cirkulárnu formu cccDNA. Len negatívne (kompletné) vlákno kóduje vírusové proteíny a slúži ako templát pri transkripcii, ktorá je realizovaná bunkovou RNA polymerázou II. Kódujúca oblasť genómu je organizovaná veľmi efektívne, nakoľko každá báza negatívneho vlákna sa zúčastňuje na kódovaní aspoň jedného vírusového proteínu. Prepis génov je regulovaný piatimi promótorami (zväčša bez TATA-boxu), dvoma enhancerami a jedným polyadenylačným miestom. Enhancer 1 (Enh1) sa nachádza pred genóm X a Enh2 približne 450 bp pred začiatkom génu C, na oba nasadajú bunkové transkripčné

faktory. Ďalším regulačným elementom je 18 nt dlhá sekvencia GRE (glukokortikoid-responzívny element) lokalizovaná v géne S, v prítomnosti glukokortikoidov dokáže zvýšiť expresiu HbsAg až 5-násobne.

Výsledkom transkripcie je päť rôzne dlhých mRNA – preC, pg, preS1, S, X (obr. 8.4) s identickou sekvenciou na 3'-konci podmienenou spoločným poyladenylačným signálom. PreC a pregenómový promótor sú od seba oddelené len krátkym úsekom 15-30 nukleotidov a obe vzniknuté mRNA (3,5 kb) sú netypické svojou dĺžkou, presahujúcou veľkosť samotného genómu. Transkripty iniciované z pg promótoru majú dvojakú úlohu, slúžia ako mRNA pri translácii proteínov C aj P a zároveň majú funkciu pregenómovej RNA (pgRNA), ktorá je intermediátom v syntéze novej genómovej DNA. Len nedávno bolo zistené, že alternatívnym zostrihom upravená pg mRNA dáva vznik ďalšiemu proteínu HBSP („hepatitis B spliced protein“). Uplatnením post-transkripčných modifikácií (alternatívny zostrih) a „leaky scanning“ v priebehu translácie vzniká 7-8 rôznych vírusových proteínov.



Obr. 8.4 - Transkripcia hepadnavírusov

Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

HBeAg – vzniká transláciou pg mRNA. Je to hlavný nukleokapsidový proteín, fosforylovaný bunkovými kinázami na serínových zvyškoch. Karboxy-terminálny koniec proteínu obsahuje bázičné aminokyseliny (arginíny), zodpovedné za jeho väzbu s hepadnavírusovým genómom.

HBeAg – sekretovaný proteín detegovaný veľmi skoro po vírusovej infekcii, preto sa nazýva aj skorý proteín („early“). Je translatovaný z preC mRNA, vďaka čomu má oproti HBeAg predĺžený amino-terminálny koniec o niekoľko aminokyselín slúžiacich ako signálny peptid, ktorý zabezpečuje jeho syntézu na membráne endoplazmatického retikula a následný export z bunky. C-koniec proteínu je proteolytickým štiepením skrátený o doménu zodpovednú za väzbu na DNA.

P proteín – translatovaný z pg mRNA pri uplatnení mechanizmu „leaky scanning“. Vzniká tak 90 kDa vírusom kódovaná DNA polymeráza s aktivitou reverznej transkriptázy a RNázy H. P proteín je homológny s retrovírusovou polymerázou/RT, ale na rozdiel od nej, okrem domén RT a RNázy H má na N-terminálnom konci ešte ďalšie dve domény - TP doménu (doména terminálneho proteínu) a SP doménu (spacer - medzerník). P proteín je cez svoj tyrozínový zvyšok v TP doméne kovalentne naviazaný na 5'-koniec kompletného vlákna DNA. A práve tento tyrozínový zvyšok slúži ako proteínový primer pri syntéze negatívneho vlákna DNA. Navyše, P proteín dokáže jednak rozoznať enkapsidačný signál (ϵ) na pgRNA a zároveň svojim C-koncom interaguje s HBcAg, čím koordinuje zbalenie pgRNA do novovznikajúcich kapsidov.

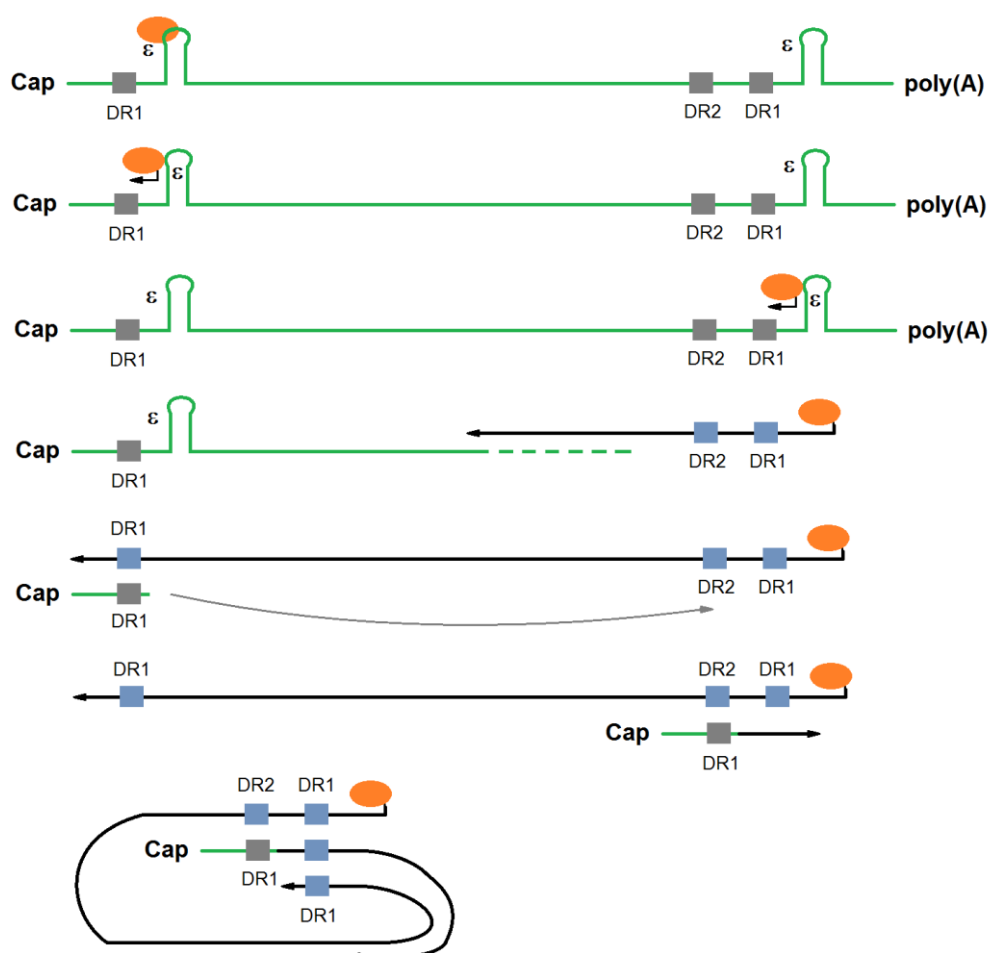
HBsAg – tri povrchové proteíny L, M a S sú translatované z dvoch mRNA – preS1 mRNA kóduje veľký LHBsAg, S mRNA sa prekladá do podoby stredného MHBsAg alebo malého SHBsAg (pri uplatnení mechanizmu „leaky scanning“). Iniciačné kodóny všetkých sú v jednom čítacom rámci, vďaka čomu sú ich C-terminálne konce identické a líšia sa len amino-terminálnou oblasťou. Všetky tri povrchové proteíny môžu byť glykozylované a predpokladá sa, že majú 4 transmembránové domény, ktorými sú ukotvené v obale viriónu. Veľký povrchový antigén je okrem toho ešte myristylovaný. HBsAg proteíny indukujú protektívnu humorálnu imunitnú odpoveď – tvorbu vírus-neutralizačných protilátok. Majoritný SHBsAg je prítomný v prázdnych vírusom-podobných časticiach, ktoré sa vo veľkom počte uvoľňujú z infikovanej bunky a ktoré sú využívané pri príprave vakcín voči HBV.

X proteín – je 34 kDa multifunkčný proteín, esenciálny pre replikáciu vírusu. Nie je sekvenčne podobný žiadnému vírusovému ani bunkovému proteínu, na základe čoho získal označenie „X“. Je považovaný za onkogén zodpovedný za vznik hepatocelulárneho karcinómu. Pôvodne bol označovaný ako „promiskuitný transaktivátor“ nakoľko zvyšoval tvorbu viacerých vírusových aj bunkových produktov. V jadre infikovanej bunky pôsobí ako transaktivátor vírusových aj viacerých bunkových promótorov, pričom sa neviaže priamo na DNA, ale znásobuje aktivitu transkripčných faktorov (TF) – CREB, ATF, TBP a iných - svojou interakciou s nimi alebo tým, že ich post-translačne modifikuje (fosforylácia, proteolytické štiepenie). Nedávno bolo zistené, že transkripciu z cccDNA templátu ovplyvňuje aj na epigenetickej úrovni (acetylácia histónov) a down-reguláciou bunkových miRNA blokujúcich väzbu TF na vírusové regulačné elementy. Navyše dokáže viazať C-terminálnu doménu p53, čím inhibuje transaktivačnú funkciu tohto tumor-supresorového proteínu. Prevažná väčšina X proteínu je však lokalizovaná v cytoplazme, kde reguluje signálne dráhy v bunke. Tento vírusový produkt dokázal up-regulovať c-Src kinázu, Ras/raf/MAP kinázy, proteín kinázu C a stimulovať tvorbu fibronektínu. V mitochondriách dokáže spôsobiť uvoľnenie reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čoho výsledkom je indukcia signálnej dráhy NF- κ B. Na druhej strane X proteín inhibuje apoptózu sprostredkovanú Fas,

tumor nekrotizujúcim faktorom (TNF), transformujúcim rastovým faktorom beta (TGF- β) alebo p53. Viaceré štúdie potvrdili, že expresia X proteínu v bunke blokuje niektoré dráhy opravy DNA a to prostredníctvom väzby na DDB1 („DNA-damage binding protein 1). Na základe všetkých vyššie uvedených funkcií, spolu s jeho schopnosťou stimulovať proliferáciu buniek, je X proteín považovaný za kľúčového aktéra pri vzniku hepatocelulárneho karcinómu.

8.5 Replikácia genómu hepadnavírusov

Hepadnavírusy využívajú netradičný spôsob na replikáciu svojej DNA, nakoľko intermediátom medzi rodičovským genómom a dcérskym DNA genómom je pregenómová RNA (pgRNA). Celý proces reverznej transkripcie pgRNA na hepadnavírusovú DNA, ktorú katalyzuje vírusový P proteín, prebieha vnútri novovznikajúceho nezrelého kapsidu.



Obr. 8.5 – Replikácia genómu hepadnavírusov
DR – priame opakovania, Cap – čiapočka, oranžová elipsa – P proteín

Bunkovou RNA polymerázou II nasyntetizovaná pgRNA je vďaka PRE („pregenome RNA export“) motívu transportovaná z jadra do cytoplazmy. Tu je rozoznávaná a asociovaná s P proteínom, ktorý sa viaže na vlásenkovú štruktúru na 5'-konci pgRNA, umiestnenú za DR1, označovanú ako enkapsidačný ϵ signál (obr. 8.2). Vznikom tohto komplexu sa spúšťa zbalenie pgRNA do nového kapsidu a zároveň aj reverzná transkripcia. Napriek prítomnosti ϵ signálu aj na 5'-konci preC mRNA, tento transkript nie je enkapsidovaný, lebo translácia otvoreného čítacieho rámca preC začína ešte pred vlásenkovou štruktúrou a to interferuje s jeho možnou enkapsidáciou.

Tyrozín v TP doméne naviazaného P proteínu poskytuje hydroxylovú skupinu, ktorá je primerom reverznej transkripcie pgRNA. Najprv sa nasyntetizuje krátky úsek DNA, od ϵ signálu smerom k DR1 sekvencii na 5'-konci pgRNA. Táto niekoľko nukleotidová časť je na základe komplementarity presunutá k 3'-koncu pgRNA. Po hybridizácii oboch vlákien dochádza k obnoveniu reverznej transkripcie za vzniku kompletného negatívneho vlákna hepadnavírusovej DNA. Templátová pgRNA je zároveň so syntézou DNA degradovaná RNázovou aktivitou P proteínu, jedine krátky fragment RNA s čiapočkou na 5'-konci zostáva zachovaný. Dochádza k druhej translokácii DNA sekvencie v rámci replikácie, keď tento úsek hybridizuje s DR2 repetíciou na opačnej strane prvého vlákna DNA. Nepoštepená RNA je primerom pri syntéze druhého vlákna DNA. Počas elongácie však P proteín využíva ako templát sekvenciu DR1 na 3'-konci a nie 5'-konci negatívneho vlákna DNA, proces je označovaný ako „template switching“ (výmena templátu). Pozitívne vlákno je však dosyntetizované len do približne 40-80% dĺžky negatívneho vlákna. Keďže na 5'-konci kompletného vlákna je naviazaný P proteín, nemôže dôjsť ku kovalentnej väzbe a vytvoreniu uzavretej cirkulárnej DNA, ale vďaka komplementarite DR sekvencií je genóm cirkularizovaný do podoby relaxovanej DNA (RC DNA).

Akonáhle je reverzná transkripcia ukončená, nastáva konformačná zmena C-terminálnej domény HBcAg, ktorá vedie k maturácii kapsidu a usporobuje ho k obaleniu. Tým sa formuje zrelá vírusová častica, ktorá je uvoľnená z infikovanej bunky.

8.6 Vplyv hepadnavírusovej infekcie na hostiteľa

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) až 2 miliardy ľudí bolo celosvetovo vystavených HBV. Najväčší počet infikovaných bol zaznamenaný vo východnej Ázii a subsaharskej Afrike. Našťastie, väčšina infikovaných dokáže prekonať ochorenie v priebehu 6 mesiacov, bez výskytu ďalších symptómov po rekonvalescencii. U istého percenta ľudí – podľa WHO globálne až 350 miliónov ľudí - však dochádza k pretrvaniu chronickej infekcie, ktorá neskôr vedie k cirhóze pečene alebo vzniku hepatocelulárneho karcinómu (HCC). Epidemiologické štúdie dokázali, že chronická infekcia zvýšila riziko vzniku rakoviny pečene

až 20-násobne. Napriek týmto údajom, vysokej korelácii medzi HBV a HCC, a dlhoročnému štúdiu, mechanizmus karcinogenézy nebol doteraz uspokojivo objasnený.

Je zrejmé, že HCC vzniká postupne na molekulárnej úrovni v bunkách pečene, pričom sa predpokladá účasť jedného či viacerých mechanizmov.

Prvým, a pravdepodobne kľúčovým predpokladom vzniku karcinómu, je náhodná integrácia genómu HBV do chromozómu hostiteľskej bunky. Cirkulárny vírusový genóm je štiepený, jeho integrita narušená a preto je tento proces často sprevádzaný deléciami niektorých častí HBV genómu, ktoré bránia produkcii infekčných vírusových častíc. Nešpecifické včlenenie vírusovej DNA môže viesť k narušeniu sekvencie a následne funkcie takých bunkových génov, ktoré riadia delenie buniek. Vo väčšine prípadov, z integrovaného genómu sú exprimované HBsAg a X proteín.

A práve aktivita X proteínu sa považuje za ďalší podstatný faktor prispievajúci ku karcinogenéze HBV. X proteín transaktivuje viaceré bunkové promótoary, následkom čoho sú stimulované mnohé signálne dráhy – NF κ B, MAPK, PKC – vedúce k proliferácii buniek. Navyše, výsledkom inhibície tumor supresorového proteínu p53 a DDB1 je blokovanie apoptózy a predčasný vstup do S fázy bunkového cyklu, bez opravy poškodení DNA a s kumuláciou mutácií.

Tretím mechanizmom participujúcim v onkogénnom procese je pretrvávajúci zápal, počas ktorého sa bunkami-sprostredkovaná imunita podieľa na priebežnej deštrukcii infikovaných pečeneových buniek. Masívna strata buniek je následne kompenzovaná nadmernou proliferáciou inak sa nedeliacich buniek alebo dediferenciáciou maturovaných hepatocytov, v ktorých sa neprimeraným delením môžu nahromadiť mutácie vedúce k ich transformácii.

Ku karcinogenéze asociovanej s HBV môžu prispievať aj niektoré ďalšie kofaktory – vysoká konzumácia alkoholu, cirhóza pečene, vystavenie organizmu aflatoxínom či iným mutagénom alebo aktivácia bunkového proto-onkogénu *c-myc*.

Skutočnosť, že v krvi jedincov chronicky infikovaných HBV sa nachádza veľké množstvo HBsAg, najmä v podobe neinfekčných vírusom-podobných častíc, viedlo k vývoju prvej vakcíny proti hepatitíde B. V 80. rokoch 20. storočia boli tieto neinfekčné častice izolované a purifikované z plazmy chronických prenášačov HBV a použité na vakcináciu rizikových skupín obyvateľov. U vakcinovaných jedincov bola zaznamenaná tvorba protilátok voči HBsAg, ktorá im zabezpečila protektívnu imunitu proti hepatitíde B. Neskôr, kvôli strachu z vakcíny pripravovanej z ľudskej plazmy, bola táto vakcína nahradená rekombinantnou vakcínou, pri výrobe ktorej sú povrchové antigény HBV získavané produkciou v rekombinantných kmeňoch kvasiniek. Najnovším vakcinačným prístupom na poli boja proti hepatitíde B je zhotovenie a testovanie „jedlej vakcíny“, využívajúc geneticky modifikované banány exprimujúce HBsAg.

Zhrnutie charakteristík hepadnavírusov

- **malá obalená častica nesúca genóm tvorený čiastočne dsDNA a sčasti ssDNA**
- **P proteín kovalentne naviazaný na 5'-koniec kompletného vlákna DNA, RNA primer asociovaný s 5'-koncom nekompletného vlákna DNA**
- **4 ORF**
- **genóm vo forme RC DNA, po vstupe do jadra je upravený na cccDNA**
- **5 promótorov, transkribované bunkovou RNA polymerázou II, uplatňuje sa alternatívny zostrih, transkripty majú čiapočku a sú polyadenylované**
- **kódujú enzým – P proteín – s aktivitou reverznej transkriptázy**
- **multifunkčný X proteín je transaktivátorom vírusových aj bunkových promótorov, inhibuje apoptózu aj opravu DNA**
- **replikácia vírusovej DNA cez pgRNA intermediát a jeho reverná transkripcia na dcérske vlákna DNA**
- **silne hepatotropné, pôvodcovia hepatitíd človeka a zvierat**
- **perzistentná infekcia asociovaná s cirhózou a rakovinou pečene**
- **schopné nešpecifickej integrácie do hostiteľského genómu**
- **vakcinácia s HBsAg navodzuje protektívnu imunitu**

9 RETROVÍRUSY

Retrovírusy predstavujú početnú a rôznorodú skupinu vírusov infikujúcich všetky stavovce. Charakteristickým znakom tejto čeľade je reverzná transkripcia vírusovej genómovej RNA do podoby dvojvláknovej DNA, ide o definujúci znak, na základe ktorého získali tieto vírusy svoje pomenovanie.

Prvými, ktorí dokázali prenos leukémie hydiny bezbunkovým filtrátom na nové jedince, boli v roku 1908 V. Ellermann a O. Bang. O pár rokov neskôr, v roku 1911, Peyton Rous zistil, že prefiltrovaný extrakt tumorov vtáčieho sarkómu môže po inokulácii zdravým kuratám spôsobiť u nich rovnaké ochorenie. Objav vírusov indukujúcich nádory bol odmenený udelením Nobelovej ceny (NC - Rous, 1966). Ďalšie vedecké bádanie v prvej polovici 20. storočia viedlo k poznaniu, že vírusové infekcie môžu byť okrem horizontálneho spôsobu prenášané aj vertikálne, ako endogénna súčasť genómu zárodočných buniek. Nesmierny dosah mal objav uskutočnený v roku 1970 Howardom M. Teminom a Davidom Baltimorem (NC, 1975), ktorí dokázali prítomnosť nového enzýmu kódovaného retrovírusmi. Išlo o reverznú transkriptázu, ktorá vyvrátila vtedajšiu dogmu o jednosmernom toku genetickej informácie (z DNA cez RNA k proteínom), lebo bola schopná prepísať RNA na dvojvláknovú DNA. V roku 1980 Robert C. Gallo charakterizoval ľudský T-lymfotropný vírus (HTLV), išlo o prvý retrovírus schopný indukovať nádory u ľudí. Nemenej podstatnou bola práca L. Montagnierom a F. Barre-Sinoussi (NC, 2008), ktorí v roku 1981 identifikovali vírus HIV a tým započali novú éru intenzívneho výskumu retrovírusov. Objavy zistené štúdiom retrovírusov do veľkej miery ovplyvnili najmä históriu a pokrok molekulárnej biológie, ale aj biochémie, evolučnej biológie a mnohých ďalších na ňu nadväzujúcich vedeckých disciplín.

Z vyššie uvedených medzníkov výskumu retrovírusov je zrejmé, že ide o unikátnu skupinu vírusov, s jedinčnou stratégiou replikácie a netypickými biologickými vlastnosťami. Zástupcovia čeľade majú spoločnú štruktúru viriónu, organizáciu genómu aj replikačný cyklus, ale líšia sa v interakciách s hositeľom. Môžu byť pôvodcami neškodných infekcií (endogénne retrovírusy, spumavírusy) až po fatálne ochorenia (nádory, anémie, neurologické ochorenia, imunodeficiencie). Jedna z klasifikácií, založená na patogenicite retrovírusov, ich rozdeľuje na onkovírusy, spôsobujúce nádorové ochorenia; lentivírusy, zodpovedné za imunodeficiencie; a spumavírusy, spôsobujúce vakuolizujúci cytopatický efekt, avšak bez výraznej patogenicity pre človeka. Podľa „životného štýlu“ môžeme retrovírusy deliť na exogénne – šíriace sa v populácii horizontálne, a endogénne – prenášané vertikálne, v integrovanej podobe v genóme zárodočných buniek hositeľa. Z hľadiska štruktúry genómu ich môžeme rozdeliť na jednoduché a zložité (tab. 9.1). Genóm jednoduchých retrovírusov (alfa-, beta-, gama-retrovírusy) obsahuje gény *gag*, *pro*, *pol*, *env*. Tieto vírusy sú pri replikácii

schopné zabudovať do svojho genómu bunkové proto onkogény, čo je často sprevádzané onkogénnou aktiváciou a stratou vlastného génu, najmä *env*. Zložité retrovírusy obsahujú vo svojom genóme aj ďalšie gény kódované alternatívnymi čítacími rámcami. Sú to väčšinou regulačné gény s úlohou v kontrole vírusovej expzie a replikácie. Tieto retrovírusy majú zložitú genetickú organizáciu a nie sú schopné tolerovať cudzorodý inzert. Ich onkogénny účinok súvisí najmä s transaktivačnou funkciou malých regulačných proteínov, ktoré stimulačne pôsobia na transkripciu niektorých bunkových génov.

Tab. 9.1 - Najvýznamnejšie retrovírusy a ochorenia, s ktorými sú asociované

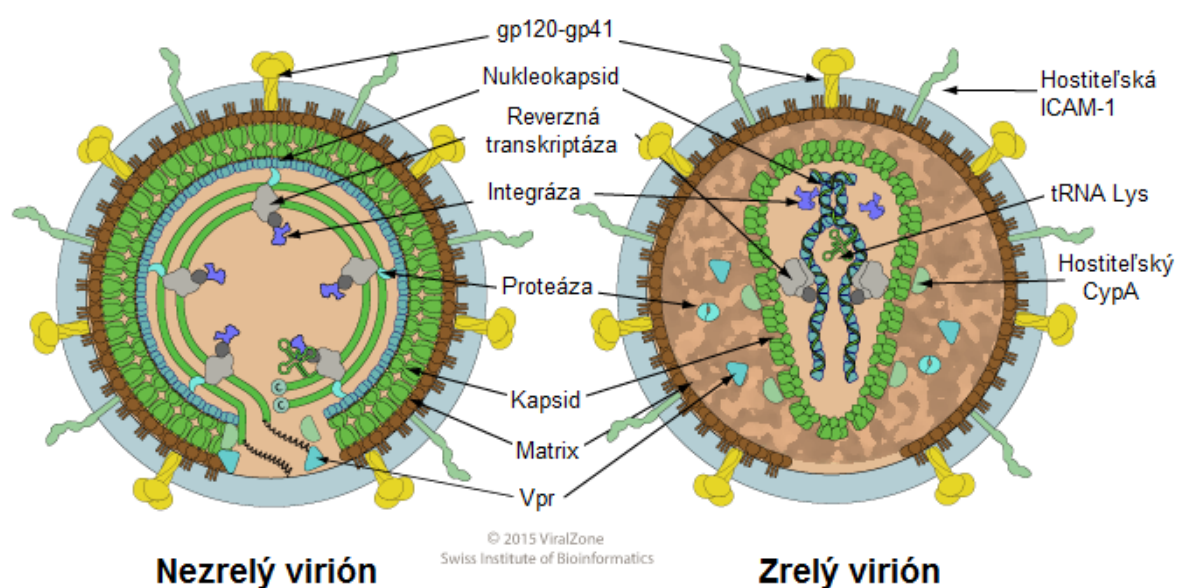
Vírus	Ochorenie
<i>Jednoduché retrovírusy</i>	
Vírus vtácej leukémie (ALV)	Nádory u kurčiat
Vírus Rousovho sarkómu (RSV)	Rousov sarkóm, nádory u kurčiat
Vírus myšej leukémie (MLV)	Nádory u myší
Vírus myšieho tumoru prsnej žľazy (MMTV)	Tumory prsných žliaz myší
<i>Zložité retrovírusy</i>	
Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV)	AIDS
Ľudský T-lymfotropný vírus (HTLV)	T-bunkové leukémie ľudí
Vírus imunitnej nedostatočnosti opíc (SIV)	Imunodeficiencia opíc

Retrovírusy sú veľmi variabilné. Dôvodom je vysoká chybovosť reverznej transkriptázy, ktorej pôsobením je generované veľké množstvo retrovírusových genómov s rôznymi mutáciami. Preto retrovírusové potomstvo sa považuje skôr za kolekciu variantov pôvodného vírusu, často označované aj ako „quasispecies“. K rôznorodosti zástupcov retrovírusov prispieva aj fenotypové miešanie. Pri koinfekcii jednej bunky dvoma vírusmi s rozdielnymi genómami sa môžu z bunky uvoľniť virióny so štruktúrnymi komponentami (najčastejšie povrchovými glykoproteínmi) pochádzajúcimi z oboch vírusov. V priebehu fenotypového miešania však nedochádza k zmene na úrovni genómu a vnútri takto vzniknutých častíc je uložený genóm jedného alebo druhého typu.

9.1 Štruktúra viriónu

Infekčná vírusová častica je sférického tvaru a má priemer približne 100 nm. Na jej povrchu sa nachádza membrána derivovaná z cytoplazmatickej membrány bunky, v ktorej sú uložené glykoproteíny. Tieto heteroméne triméry pozostávajú z povrchového SU proteínu (gp120) a transmembránového TM proteínu (gp41), obe podjednotky sú navzájom spojené nekovalentnou väzbou. Na vnútornej strane obalu sa nachádza matrixový proteín MA.

Kapsidový proteín CA tvorí jadro viriónu, ktoré má v prípade väčšiny retrovírusov ikozaedrálny tvar. Jedine jadro lentivírusov je netypické – kónické, a je unikátnym spomedzi všetkých kapsidov živočíšnych vírusov. V nukleokapside sú uzavreté dve molekuly genómovej jednovláknovej RNA pozitívnej polarity, asociované s nukleokapsidovým proteínom NC. Obe molekuly ssRNA sú nekovalentne spojené pri ich 5'-koncoch. Okrem toho, v jadre viriónu sú prítomné aj molekuly tRNA a tri vírusom-kódované enzýmy – proteáza (PR), integráza (IN) a reverzná transkriptáza (RT). Vo virióne HIV sa môžu navyše vyskytovať aj niektoré malé regulačné proteíny (napr. Vpr).



9.1 - Štruktúra viriónu retrovírusov (HIV)

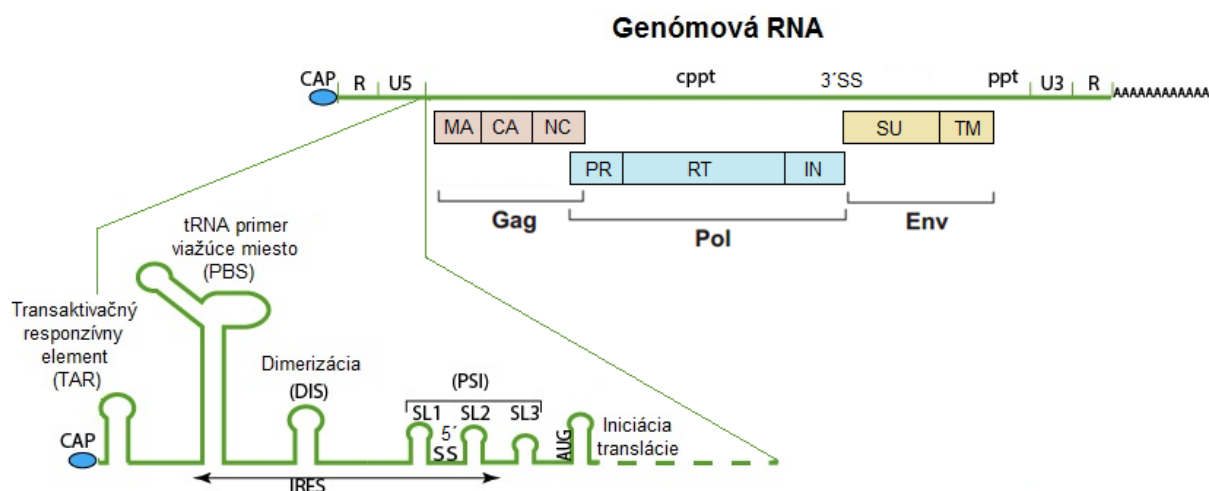
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Podľa štruktúry viriónov sú retrovírusy rozdelené na štyri morfológické typy A-D, v závislosti od uloženia a denzity nukleokapsidu. Typ A sa vyznačuje hrubou denznou vonkajšou časťou nukleokapsidu a svetlým stredom, väčšinou sa jedná o nezrelé kapsidy. Kapsidy typu B majú excentricky uložené jadro (MMTV), kým u typu C je prítomné centrálné lokalizované, symetrické jadrom (MLV). Typ D je charakteristický špecifickým kónickým tvarom jadra (HIV).

9.2 Organizácia genómu retrovírusov

Na rozdiel od ostatných vírusov, genóm retrovírusov pozostáva z dvoch kópií lineárnej jednovláknovej RNA, z toho dôvodu sa často označuje termínom „diploidný“ genóm. V závislosti od vírusu, jeho dĺžka môže byť 7-12 kb. Genómová RNA je pozitívnej polarity a

má charakter eukaryotickej mRNA, nakoľko je post-transkripčne modifikovaná ako bunková mRNA, obsahuje čiapočku na 5'-konci a je polyadenylovaná na svojom 3'-konci. Dimér dvoch ssRNA je udržiavaný v tesnej blízkosti vďaka interakcii medzi sekvenciami na 5'-konci, nazývanými „kissing loop“ alebo dimerizačná sekvencia (DIS, DLS).



Obr. 9.2 – Organizácia genómu retrovírusov

R – repetitívna sekvencia, U5/U3 – unikátna sekvencia na 5’-/3’-konci, PSI – enkapsidačný signál, 5’SS/3’SS – donorové miesta pre zostrih mRNA, cppt – centrálny polypurínový trakt, ppt – polypurínový trakt, IRES – interné miesto nasadnutia ribozómu

Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

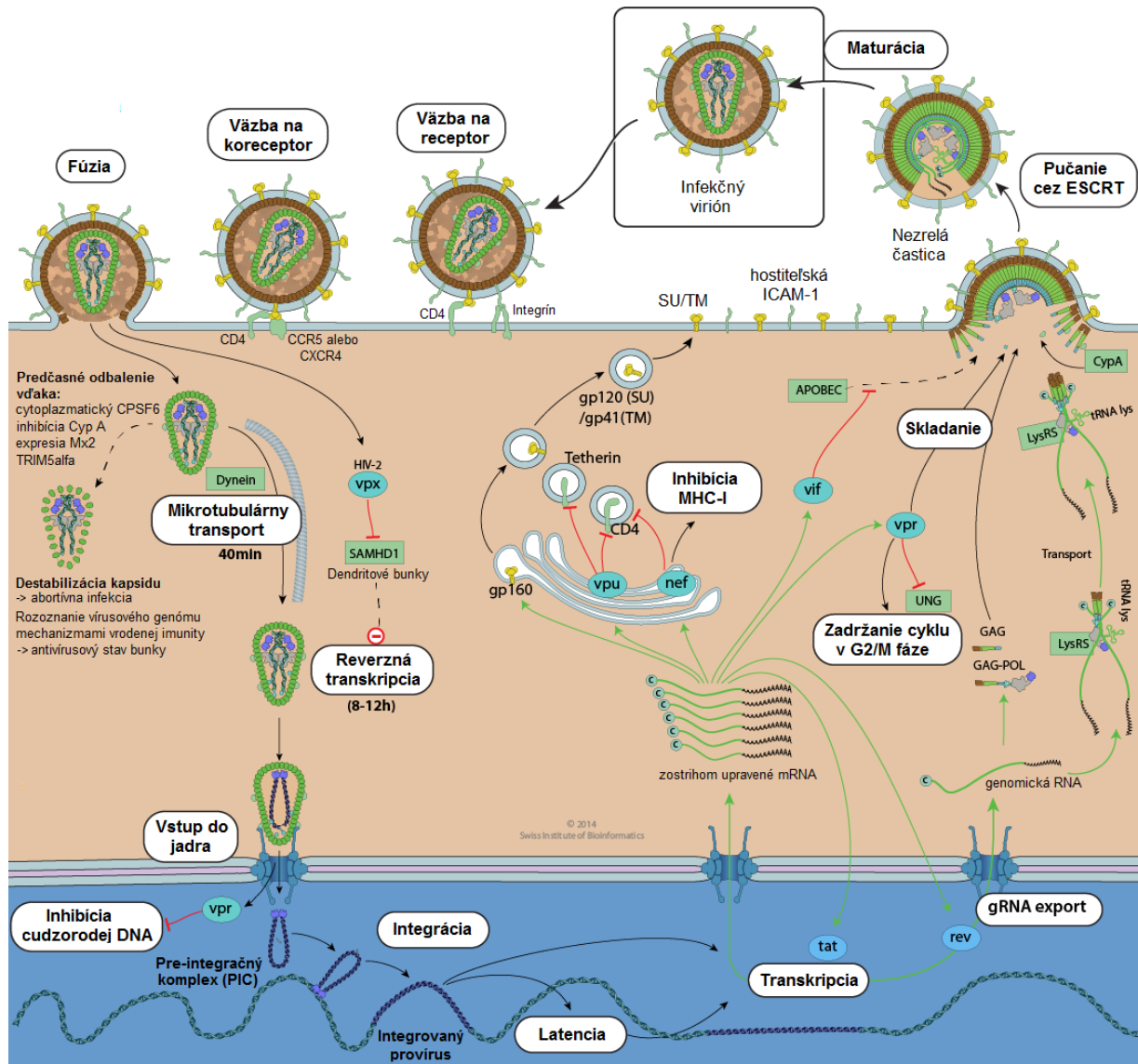
V genóme je identifikovaných niekoľko štruktúr a sekvencií, ktoré sú esenciálne pri reverznej transkripcii, integrácii, transkripcii či zbalení do kapsidu (obr. 9.2). Za čiapočkou na 5’-konci sa nachádza R sekvencia (terminálna redundancia), repetitívna sekvencia dlhá 15-200 nukleotidov, ktorá je identická v sekvencii aj orientácii s R oblasťou pri 3’-konci. Za ňou nasleduje U5, unikátna sekvencia, súčasťou ktorej je oblasť (*att*) potrebná pri integrácii provírusu. Špecifická bunková transferová RNA je naviazaná na primer viažúce miesto (PBS – primer binding site), ležiace za U5 oblasťou, pozostávajúce z 18-nukleotidovej sekvencie komplementárnej k 18 nt na 3’-konci danej tRNA. Táto tRNA má úlohu primeru pri reverznej transkripcii ssRNA na dsDNA, pričom rôzne kmene vírusov sú asociované s odlišnými typmi bunkových tRNA – prolínová tRNA u MLV, lyzínová tRNA u HIV. Za PBS je „leader“ sekvencia, neprekladaná oblasť, v ktorej boli identifikované dimerizačná sekvencia, enkapsidačný signál (Psi, ψ) nevyhnutný pre zbalenie genómu do kapsidu, ale aj donorové miesto pre zostrih subgenómových mRNA (5’SS, SD). Tieto sekvencie sú nasledované kódujúcou oblasťou, v ktorej sa u väčšiny retrovírusov nachádzajú tri až štyri gény – *gag*, *pro/pol* a *env*. Zložité retrovírusy kódujú aj niekoľko malých regulačných proteínov – Tax, Tat, Rex, Rev, Vpu, Vpr, Bel a iné. Nekódujúca oblasť na 3’-konci začína PPT miestom – polypurínovým traktom, ktoré predstavuje iniciačné miesto pre syntézu pozitívneho vlákna

vírusovej DNA pri reverznej transkripcii. Okrem PPT miesta sa v genóme spumavírusov nachádza aj centrálny polypurínový trakt (cPPT), ktorý zvyšuje efektivitu reverznej transkripcie. V U3 oblasti sú lokalizované regulačné elementy pre vírusovú replikáciu, integráciu, polyadenyláciu RNA ale aj transkripciu, nakoľko sa tu vyskytujú promótory a rôzne *cis*-aktivačné elementy riadiace génovú expresiu.

9.3 Infekčný cyklus retrovírusov

Vírus sa pomocou SU povrchového glykoproteínu viaže na svoj bunkový receptor, ktorým môžu byť CD4 (HIV), aminokyselinový transporter EcoR/Rec-1 (MLV), fosfátové transportéry Pit-1/Glvr-1 alebo iné receptory, ktoré určujú spektrum buniek vnímavých na daný typ retrovírusu. Zložité retrovírusy, napríklad HIV, potrebujú k vstupu do bunky aj signál v podobe väzby koreceptora. Interakcia gp120 s CD4 spôsobuje konformačnú zmenu umožňujúcu gp120 rozoznať koreceptor, ktorým môžu byť chemokínové receptory CXCR4 alebo CCR5. Následkom týchto interakcií je odhalenie fúzneho peptidu, ktorý je súčasťou gp41, vďaka čomu je aktivovaná pH nezávislá fúzia membrán cytoplazmatickej membrány a vírusového obalu. Na rozdiel od HIV a HTLV, jednoduché retrovírusy vstupujú do bunky receptorom-sprostredkovanou endocytózou a fúzia membrán je iniciovaná až poklesom pH vnútri endozómu. Výsledkom oboch procesov je uvoľnenie jadra viriónu do cytoplazmy a jeho postupný mikrotubulárny transport smerom k jadru bunky. Do kompaktného nukleokapsidu cestou penetrujú deoxynukleotid trifosfáty a dochádza k reverznej transkripcii genómovej ssRNA na dsDNA. Táto konverzia je komplexný proces katalyzovaný vírusovým enzýmom – reverznou transkriptázou (RT), pričom primerom syntézy komplementárneho DNA vlákna je bunková tRNA naviazaná na PBS vírusovej RNA. Konečným produktom je dsDNA, označovaná aj provírusová DNA, ktorá v priebehu reverznej transkripcie nadobudla predĺžené konce – dlhé terminálne repetície (LTR). Dvojvláknová DNA zostáva asociovaná s komponentami viriónového jadra v podobe pre-integračného komplexu (PIC). Veľkosť celého komplexu bráni jeho prechodu cez jadrové póry, preto jednoduché retrovírusy musia počkať na mitózu infikovanej bunky, počas ktorého je jadrová membrána dezintegrovaná. Tým pádom sú schopné produktívne infikovať iba deliace sa bunky. Na rozdiel od nich, zložité retrovírusy (lentivírusy) môžu realizovať svoj infekčný cyklus aj v nedeliacich sa bunkách, lebo aktívne transportujú PIC do jadra, vďaka malým regulačným proteínom, ktoré si nesú vo virióne (Vpr/Vpx, p17). V jadre vírusová integráza katalyzuje inzerciu provírusovej DNA do hostiteľského chromozómu, pričom včlenenie je náhodné, do rôznych miest bunkového genómu, avšak s vyššou preferenciou k často transkribovaným sekvenciám alebo miestam bohatým na adenín a tymín. Nešpecifická inzercia do genómu hostiteľa môže v niektorých prípadoch spôsobiť narušenie istých bunkových funkcií a tým viesť k onkogenéze. Integrovaná vírusová DNA je označovaná termínom „provírus“, je súčasťou

bunkového genómu a je replikovaná spolu s bunkovou DNA v priebehu bunkového delenia. V tejto podobe retrovírusy v bunke pretrvávajú natrvalo, môžu byť prenesené nielen do dcérskych buniek, ale aj ďalších generácií hostiteľského organizmu.



Obr. 9.3 – Infekčný cyklus retrovírusu HIV
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

V prípade produktívnej infekcie je provírus v celej dĺžke transkribovaný bunkovou RNA polymerázou II za vzniku RNA transkriptov. Z nich niektoré sú exportované do cytoplazmy, kde slúžia ako mRNA pri translácii vírusových prekursorových polyproteínov Gag a Gag-Pol (v pomere 10:1). Zároveň majú tieto molekuly RNA funkciu genómovej RNA, ak sú spolu s prekuzormi Gag a Gag-Pol proteínov zbalené do novovznikajúceho kapsidu. K enkapsidácii dvoch molekúl vírusovej RNA môže dôjsť po tom, ako NC doména Gag

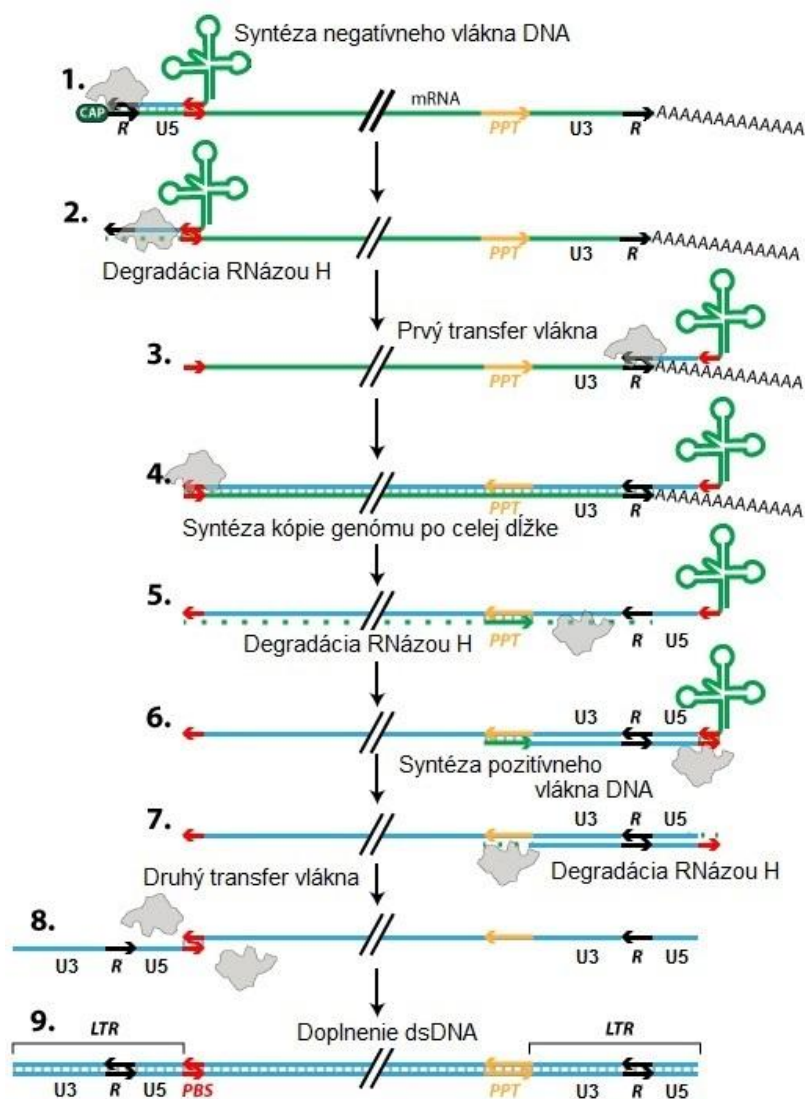
proteínu rozoznávajú enkapsidačný signál (Psi) na 5'-konci RNA. Iné primárne transkripty podliehajú ešte v jadre úprave bunkovou mašinériou a vznikajú z nich alternatívne zostrihané subgenómové formy mRNA. Jedenkrát zostrihané mRNA sú na ribozómoch endoplazmatického retikula translatované do podoby Env proteínov, kým z mnohonásobne zostrihaných mRNA (vyskytujúcich sa len u zložitých retrovírusov) sú na voľných ribozómoch syntetizované malé regulačné proteíny. Env proteíny sú ďalej transportované cez Golgiho aparát, kde sú glykozylované a štiepené bunkovými enzýmami, aby vytvorili zrelý komplex SU-TM a mohli byť dopravené na povrch infikovanej bunky. Komponenty nukleokapsidu asociované s dvoma kópiami vírusovej genómovej RNA sú skladané pod povrchom cytoplazmatickej membrány (CPM) obsahujúcej povrchové vírusové glykoproteíny. Jedine HIV infikujúci makrofágy získava svoj obal z membrány endoplazmatického retikula a nie CPM. L doména Gag proteínu zabezpečí aktiváciu ESCRT aparátu („endosomal sorting complex required for transport“), ktorý umožní pučanie a uvoľnenie novej vírusovej častice. V priebehu alebo tesne po odpútaní sa z bunky do extracelulárneho priestoru sa aktivuje vírusová proteáza prítomná vo virióne ako PR doména Gag-Pol polyproteínu. Proteáza štiepi Gag a a Gag-Pol prekurzory na samostatné maturované vírusové proteíny – MA, CA, NC, prípadne MA, CA, NC, PR, RT, IN. Vďaka týmto procesom nastáva kondenzácia jadra viriónu do typickej podoby a vírusová častica nadobúda infekčnosť (obr. 9.3). Výsledkom produktívnej infekcie jednoduchých retrovírusov nie je cytopatický efekt, avšak infekcia HIV vedie vo väčšine prípadov k lýze bunky.

Retrovírusy disponujú jedinečnou stratégiou replikácie, súčasťou ktorej sú dve základné fázy oddelené integráciou. Prvú (skorú) – reverznú transkripciu genómovej ssRNA na dsDNA a jej integráciu do genómu hostiteľa - uskutočňujú vírusové proteíny, druhú (neskorú) – génovú expresiu a vznik novej genómovej ssRNA - bunková mašinéria bez pomoci vírusových produktov.

9.4 Reverzná transkripcia retrovírusov

Ide o proces prebiehajúci vo vírusovom nukleokapside, izolovaný od bunkového prostredia, aby sa zabránilo reverznej transkripcii bunkových transkriptov prítomných v cytoplazme. Prepis jednovláknovej genómovej RNA na dsDNA je katalyzovaný vírusom kódovaným enzýmom, reverznou transkriptázou (RT), ktorá sa vyskytuje vo forme diméru a vyznačuje sa dvomi rozdielnymi funkciami. Prvou je jej pôsobenie ako RNA/DNA-závislej DNA polymerázy, ktorej chýba 3'-5'- exonukleázová aktivita bunkovej DNA polymerázy, nie je teda schopná opravy nesprávne včlenených báz a tým dochádza k inkorporácii 1-10 nesprávnych nukleotidov pri syntéze každej jednej provírusovej DNA. Z toho dôvodu, retrovírusové potomstvo nie je na úrovni genómu uniformné a považuje sa za súbor variantov – „quasispecies“. RT má zároveň aj aktivitu Rnázy H, ktorá súvisí s jej schopnosťou

selektívne hydrolyzovať RNA na templáte RNA-DNA hybridu, avšak nedegraduje nehybridizovanú jednovláknovú RNA.



Obr. 9.4 – Reverzná transkripcia retrovírusov
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Reverzná transkripcia je spustená po vstupe jadra viriónu do cytoplazmy infikovanej bunky, pravdepodobne hneď ako do neho preniknú deoxyribonukleotidy z bunkového prostredia. Počas iniciácie syntézy ako primer slúži molekula bunkovej tRNA, ktorá je prostredníctvom osemnástich nukleotidov komplementárne naviazaná na PBS miesto vírusovej RNA (obr. 9.4). Najprv dochádza k syntéze krátkeho úseku negatívneho DNA vlákna (100-400 nt), od tRNA primeru k 5'-koncu genómovej RNA. Ribonukleázová aktivita RT degraduje časť RNA z novosyntetizovaného DNA-RNA hybridu, čím uvoľní vlákno jednovláknovej DNA komplementárne k oblastiam U5 a R. K štiepeniu RNA-RNA hybridu

v mieste PBS nedochádza. V ďalšom kroku nastáva prvý transfer vlákna DNA, počas ktorého môže vzniknúť krátka DNA, nesúca kópiu R sekvencie 5'-konca, RNA hybridizovať s komplementárnym úsekom R na 3'-konci vírusovej RNA. Negatívne DNA vlákno je následne dosyntetizované po celej dĺžke genómovej RNA, až po PBS. Na 5'-konci tohto prvého vlákna DNA vzniká komplet sekvencii U3-R-U5, ktorý sa označuje ako dlhá terminálna repetícia – LTR. Z medziproduktu, DNA-RNA hybridu, je vlákno RNA opäť degradované aktivitou RT. Jedine oblasť polypurínového traktu (PPT) je rezistentná voči štiepeniu. Táto krátka sekvencia RNA, naviazaná na PPT, je primerom syntézy druhého (pozitívneho) vlákna DNA. To je predlžované od PPT, skrz oblasti U3, R, U5, až cez úsek osemnástich nukleotidov tRNA, ktoré hybridizovali s PBS miestom na pôvodnej vírusovej genómovej RNA. Následne RNáza H degraduje oba primery, ktoré umožnili iniciáciu negatívneho aj pozitívneho vlákna DNA, tRNA aj krátky úsek komplementárny k PPT.

V tejto fáze reverznej transkripcie dochádza k druhému transferu vlákna, keď krátka časť pozitívneho vlákna DNA môže byť prenesená na opačnú stranu prvého DNA vlákna a tu hybridizuje so sekvenciou v mieste PBS. Posledným krokom reverznej transkripcie je doplnenie oboch vlákien DNA za vzniku kompletnej lineárnej dsDNA lemovanej LTR na oboch svojich koncoch – tzv. provírusovej DNA.

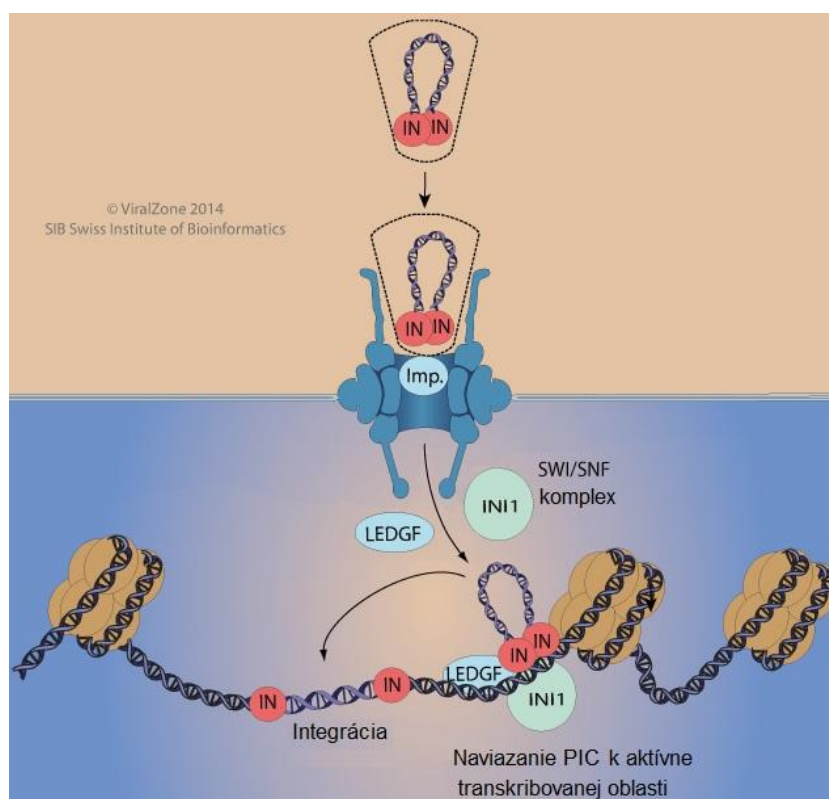
Tab. 9.2 – Porovnanie reverznej transkripcie retrovírusov a hepadnavírusov

Parameter	Retrovírusy	Hepadnavírusy
Typ vírusového genómu	ssRNA (+)	ds/ssDNA
Templát pre syntézu DNA	Genómová ssRNA (+)	Pregenómová RNA (+)
Miesto reverznej transkripcie	Reziduálny vírusový kapsid po vstupe do bunky	Novosyntetizovaný kapsid pred vznikom viriónu
Vírusom kódovaný enzým	RT	P proteín
Počet molekúl enzýmu vo virióne	50-100	1
Funkcie polymerázy	DNA polymeráza, RNáza H, helikáza	DNA polymeráza, RNáza H, proteínový primer, enkapsidácia RNA
Primer syntézy (-) vlákna DNA	Bunková tRNA viazaná na PBS	P proteín viazaný na 5'-koniec RNA
Degradácia RNA templátu	RNáza H (RT)	RNáza H (P proteín)
Prvý transfer vlákna	Cez R sekvencie	Cez DR1 sekvencie
Iniciácia (+) vlákna DNA	RNáza rezistentná časť genómovej RNA v oblasti PPT	RNáza rezistentný fragment 5'-RNA viazaný na DR2 sekvenciu
Čas iniciácie (+) vlákna DNA	Pred skompletizovaním (-) vlákna	Po skompletizovaní (-) vlákna
Druhý transfer vlákna	Cez PBS	Cez DR1 sekvencie
Finálny produkt	dsDNA s LTR na koncoch	Cirkulárna ds/ssDNA
Ďalší osud vzniknutej DNA	Integrovaná do bunkovej DNA	Inkorporovaná do viriónov

Proces syntézy provírusovej DNA u retrovírusov je v do istej miery podobný so vznikom DNA genómu hepadnavírusov, napriek tomu, že genómy oboch čeľadí nie sú ani zďaleka podobné. Zároveň bolo identifikovaných viac detailov a krokov v priebehu reverznej transkripcie, ktorými sa obe vírusové skupiny líšia (tab. 9.2).

9.5 Integrácia retrovírusov

Integrácia provírusovej DNA je nevyhnutným krokom infekčného cyklu retrovírusov, bez ktorého by nemohli dokončiť produktívnu infekciu a nedošlo by k uvoľneniu nového infekčného potomstva. Okrem toho, existencia ich genetickej informácie v podobe provírusu je zodpovedná za väčšinu ich biologických vlastností – perzistencia v bunkách, navodenie rezervoáru latentne infikovaných buniek, vertikálny prenos cez zárodočné bunky, či onkogénne aktivity.

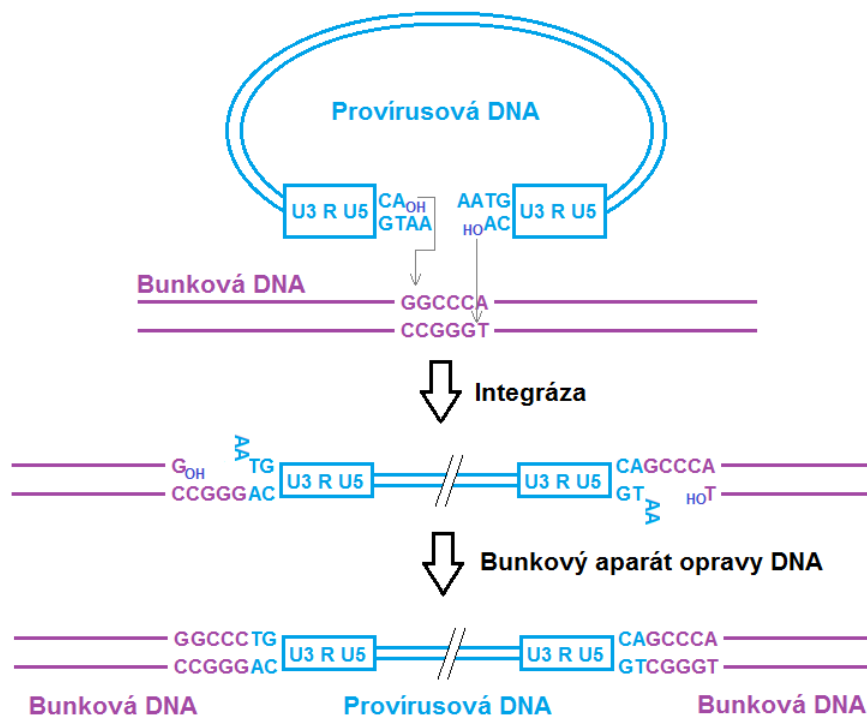


Obr. 9.5 – Import pre-integračného komplexu HIV cez jadrový pór
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Lineárna dvojvláknová DNA, ktorá vznikla reverznou transkripciou, je asociovaná s komponentami prítomnými vo viriónovom jadre a v tejto zostave sa nazýva pre-integračným komplexom (PIC). Všetky komponenty PIC neboli doteraz identifikované, ale v prípade niektorých retrovírusov boli v tomto komplexe detegované minimálne tri vírusové proteíny -

CA, RT, a IN. Ako bolo uvedené v predchádzajúcom texte, jednoduché retrovírusy vedia PIC k hostiteľskému chromozómu dopraviť iba počas narušenia jadrovej membrány v priebehu bunkového delenia, kým PIC zložitých retrovírusov je aktívne transportovaný cez jadrový pór do jadra. V prípade HIV, proteíny Vpr a matrixový proteín p17 (komponenty PIC u HIV) sa zúčastňujú importu 20-30 nm veľkého PIC komplexu do jadra, pričom esenciálnu úlohu v tomto procese predstavuje 99-nukleotidový úsek polypurínového traktu, s ktorým interagujú tieto proteíny ako aj ďalšie zložky pre-integračného komplexu. Na transporte PIC sa podieľajú aj viaceré bunkové faktory – LEDGF, BAF-1, INI1 podjednotka SWI/SNF komplexu (obr. 9. 5).

Provirusová DNA je integrovaná do bunkového genómu prostredníctvom enzýmu integráza, ktorý je súčasťou kapsidu infekčného vírusu a katalyzuje celú súhrnu viacerých štiepných a ligačných reakcií. Tento enzým viaže oba konce lineárnej vírusovej DNA, pritiahne ich k sebe navzájom a zároveň ich dostáva do tesnej blízkosti bunkovej DNA. Rozoznanie *att* miest integrázou v terminálnych oblastiach vírusovej DNA je nevyhnutné pre procesovanie a ligáciu koncov DNA.



Obr. 9.6 – Integrácia provirusovej DNA do genómu bunky

Prvým krokom je odštiepenie dvoch nukleotidov z 3'-konca každého LTR, výsledkom čoho sú krátke 5'-prečnievajúce konce. Endonukleotidová aktivita integrázy taktiež vytvára zlomy v bunkovej DNA, na ľubovoľnom mieste euchromatínu, ktoré je však dostupné. Preto najčastejšie dochádza k integrácii do aktívne transkribovaných oblastí. Štiepením bunkovej

DNA vznikajú prečnievajúce 5'-konce dlhé 5-6 nukleotidov. Tieto sú v ďalšom kroku kovalentne spojené, fosfodiesterovou väzbou, so skráteným 3'-koncom vírusovej DNA. Finálne kroky zabezpečí bunkový aparát opravy DNA – odstráni dva nukleotidy na prečnievajúcom 5'-konci provírusovej DNA a zostávajúce úseky jednovláknovej DNA doplní a zliguje s dsDNA, čím vzniká celistvé vlákno dvojvláknovej DNA. V priebehu integrácie, vírusový genóm stráca dva terminálne nukleotidy, pričom 4-6 nukleotidov v cieľovom mieste bunkovej DNA je naopak duplikovaných (obr. 9.6).

Uvedeným procesom vytvorená forma retrovírusovej DNA, včlenená do bunkového genómu, sa nazýva „provírus“. A v tejto podobe zostáva permanentne inkorporovaný do chromozómu infikovaných buniek, je replikovaný spolu s bunkovou DNA, čím je zabezpečená distribúcia vírusovej genetickej informácie do dcérskych buniek na základe princípov mendelistickej dedičnosti. S veľmi nízkou frekvenciou môže nastať homologická rekombinácia medzi koncovými LTR provírusu, ktorá spôsobí deléciu sekvencie medzi nimi. Výsledkom je odstránenie väčšiny provírusovej DNA, avšak minimálne jeden LTR zostáva vždy zachovaný. Napriek tomu, do dnešného dňa nepoznáme efektívny spôsob, akým by mohol byť provírus cielene vystrihnutý a eliminovaný, čo predstavuje problém pri liečbe retrovírusových ochorení.

9.6 Expresia génov u retrovírusov

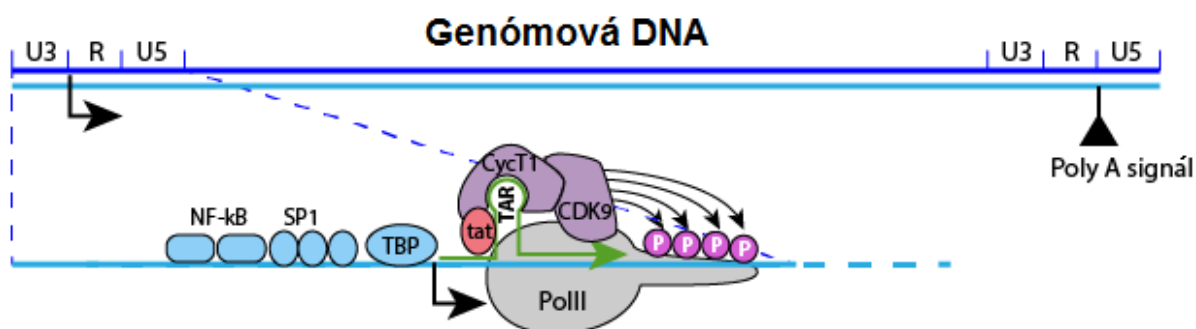
Génová expresia retrovírusov môže prebiehať až po integrácii reverzne prepísanej vírusovej DNA do DNA bunky. Provírusová DNA však môže byť v hostiteľskej bunke dlhú dobu neaktívna, ako ostatné bunkové gény, v závislosti od miesta integrácie – pri včlenení do inaktívnej časti chromozomálnej DNA alebo značne metylovaných oblastí. Keďže ďalšie neskoré fázy infekčného cyklu retrovírusov sú regulované prevažne bunkovými enzýmami, o osude expresie vírusového genómu rozhoduje aj prítomnosť vhodného setu transkripčných faktorov v jadre daného typu bunky. Aj podmienky extracelulárneho prostredia (stres, stimuly) ovplyvňujú početnosť a zostavu aktívnych transkripčných faktorov, preto môžu regulovať expresiu retrovírusov.

Provírusová DNA retrovírusov kóduje produkty Gag, Pro/Pol a Env, translatujú sa ako polyproteínové prekurzory, ktoré sú štiepené vírusovými alebo bunkovými proteázami na jednotlivé maturované proteíny.

9.6.1 Transkripcia provírusovej DNA

Transkripcia retrovírusových génov prebieha prostredníctvom bunkovej RNA polymerázy II, ktorá rozoznáva vysoko výkonný promótor v U3 oblasti ľavého LTR konca

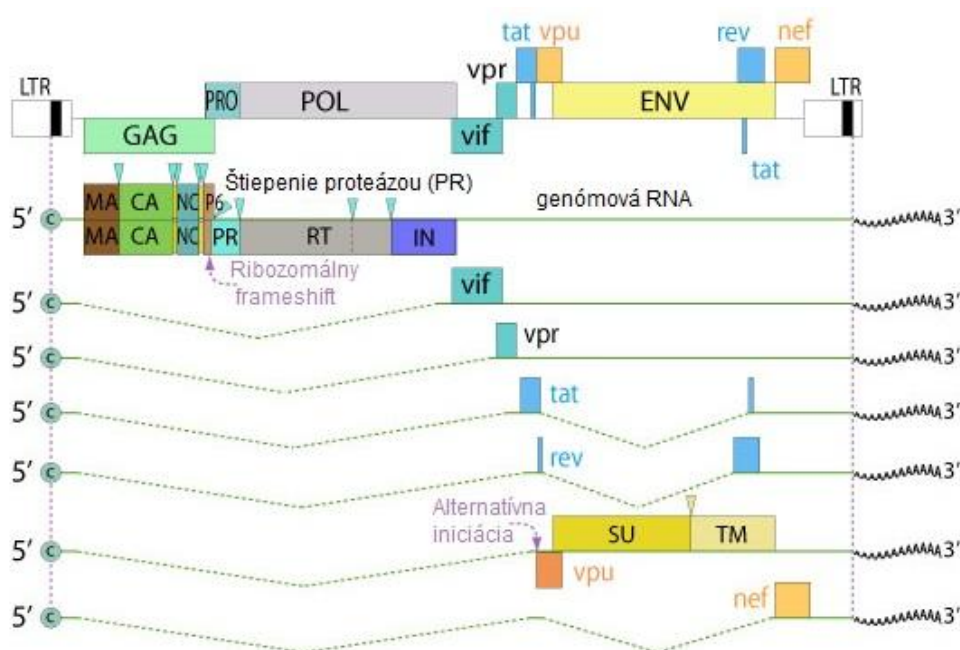
provírusovej DNA. Promótor obsahuje TATA box, na ktorý sa viaže TFIIB a CCAAT box, rozoznávaný CEBP. V ideálnych podmienkach je retrovírusový promótor konštitutívne aktívny a dochádza k produkcii vysokého počtu vírusových RNA. V blízkosti promótoru (v U3) sa nachádzajú ďalšie kľúčové *cis*-aktivačné elementy a enhancery ovplyvňujúce iniciáciu transkripcie. Na tieto sekvencie nasadajú rôzne bunkové faktory – Sp1, USF-1, CBF, TBP, Ets, NFκB a iné. Okrem nich sa na regulácii transkripcie môžu podieľať aj vírusové transaktivačné proteíny – Tax (HTLV-1) a Tat (HIV-1). Tax indukuje väzbu ATF/CREB na responzívne elementy v LTR. Tat asociuje s vlásenkovou štruktúrou - TAR elementom - na novosyntetizovanej RNA, mobilizuje väzbu bunkových proteínov k RNA, podporuje elongáciu a zvyšuje procesivitu RNA polymerázy (obr. 9.7). Výsledkom pôsobenia oboch, Tat aj Tax, je výrazne (až 100-násobné) zvýšenie hladiny vznikajúcich transkriptov. Na rozhraní U3 a R sa nachádza transkripčný počiatočok, polyadenylačný signál (AAUAAA) leží v sekvencii pravého LTR (medzi R a U5). Všetky transkripty sú polyadenylované na 3'-konci a nesú čiapočku na 5'-konci.



Obr. 9.7 – Regulácia transkripcie proteínom Tat
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Syntéza vírusovej RNA z provírusovej DNA vedie k tvorbe dlhých primárnych transkriptov, niektoré môžu byť upravené zosteriom na menšie subgenómové mRNA. Úpravy vírusových mRNA sú realizované prostredníctvom bunkových enzýmov. Všetky retrovírusy majú minimálne dva typy mRNA (obr. 9.8) – zosteriom neupravené RNA slúžia na syntézu polyproteínov Gag a Gag/Pol, kým mRNA upravené jedným zosteriom, odstraňujúcim čítacie rámce pre Gag/Pol, umožňujú vznik proteínov Env. Zložité retrovírusy generujú aj tretí typ RNA – sadu niekoľkých viacnásobne alternatívne zosterihaných mRNA, ktoré vo všeobecnosti kódujú predovšetkým malé regulačné proteíny (Tat, Rev, Nef).

Tieto retrovírusové RNA sú translokované do cytoplazmy bunky, kde sú v závislosti od ich typu buď translatované na korešpondujúce proteíny alebo enkapsidované do nového kapsidu.

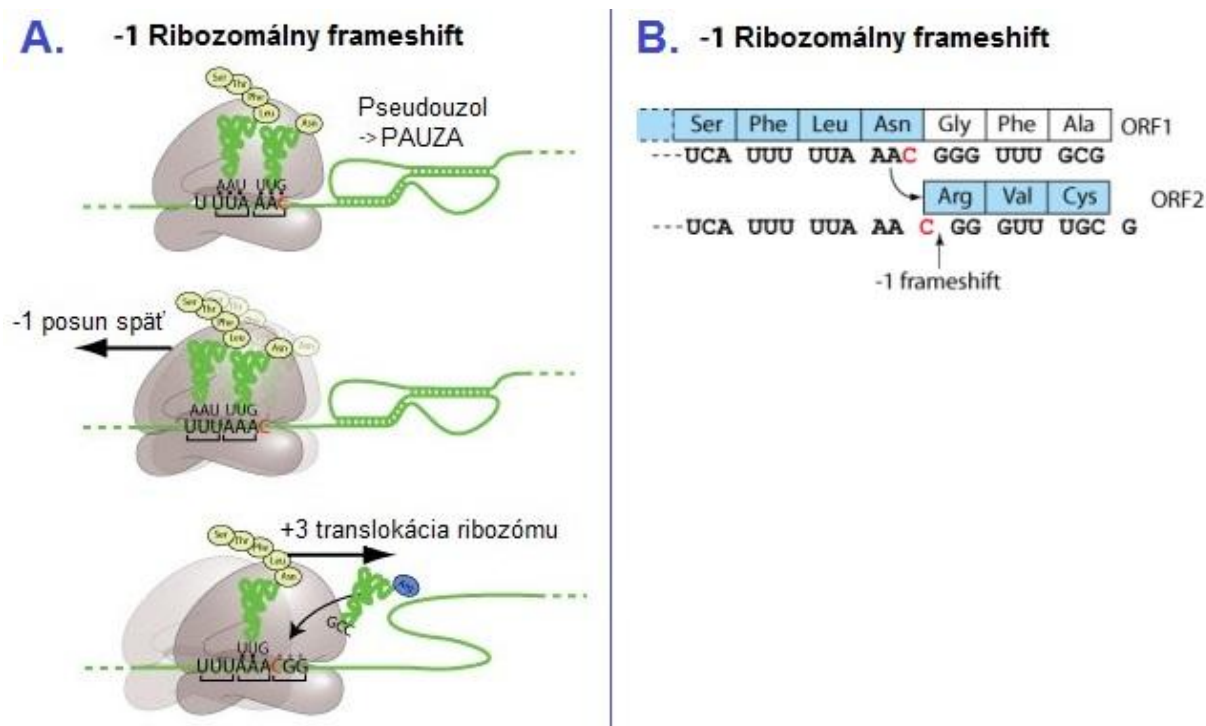


Obr. 9.8 – Transkripty prepisované z provírusu HIV
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

9.6.2 Translácia a post-translačná úprava retrovírusových proteínov

Vírusové transkripty sú translatované na niekoľko prekursorových polyproteínov, ktoré sú následne štiepené proteázami na jednotlivé proteíny. Tento mechanizmus zabezpečuje generovanie viacerých proteínov z jedného ORF a zároveň udržiava ich počet v stálom a potrebnom pomere. Počas translácie retrovírusových mRNA sa uplatňujú špecifické mechanizmy umožňujúce tvorbu rôznych typov polyproteínov. Patria medzi ne ribozomálny „frameshift“ a potlačenie terminácie translácie, tzv. „suppression of termination“ (alebo označovaný aj ako „stop codon readthrough“).

Ribozomálny „frameshift“ je alternatívny spôsob translácie dvoch proteínov (alebo polyproteínov), ktoré sú kódované prekrývajúcimi sa ORF (obr. 9.9). Posun čítacieho rámca nastáva buď smerom k 5'-koncu (-1) alebo k 3'-koncu (+1) mRNA. K realizácii tohto mechanizmu sú potrebné dva funkčné elementy na mRNA – sedem nukleotidov dlhá sekvencia („slippery sequence“) v podobe X XXY YYZ, ktorá je nasledovaná špecifickou sekundárnou štruktúrou RNA tvaru pseudouzla („pseudoknot“) lokalizovanou 5-9 nukleotidov za heptanukleotidom. Takéto rozloženie signálov v mRNA spôsobí zabrzdenie ribozómu na štruktúre pseudouzla, ribozóm sa posunie o jeden nukleotid dopredu alebo dozadu, a pokračuje ďalej v translácii v inom čítacom rámci. Vďaka tomu sú od „frameshiftu“ do reťazca proteínu zaradované iné aminokyseliny. Efektivita tohto mechanizmu je približne 10% a preto pomer oboch vznikajúcich proteínov je 10:1.

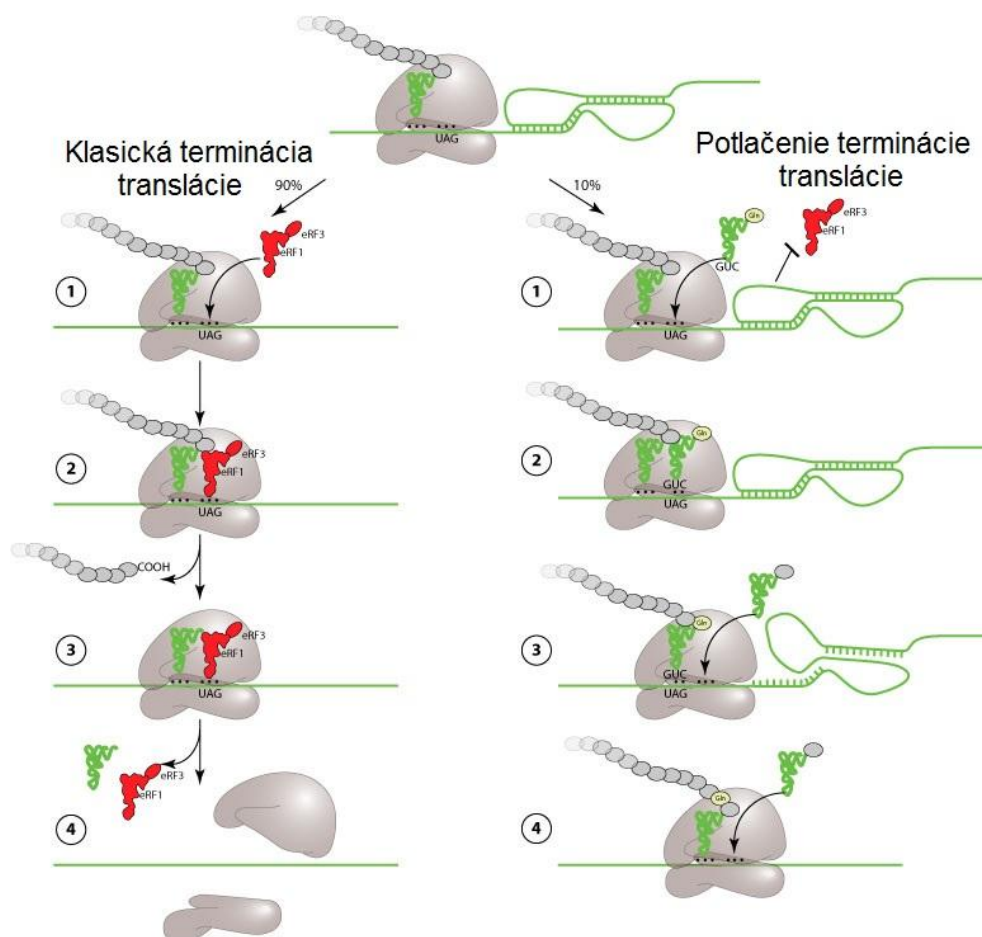


Obr. 9.9 – Ribozomálny „frameshift“ (-1)

A – pohyb ribozómu na mRNA počas -1 frameshiftu, B – zmena v poradí aminokyselín
 Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

„**Suppression of termination**“ umožňuje generovanie proteínov s predĺženým C-terminálnym koncom (obr. 9.10). Bežne sú terminačné kodóny amber (UAG) a opal (UGA) rozpoznávané terminačným faktorom eRF, nedochádza k začleneniu tRNA a translácia je ukončená. Avšak pri terminačnej supresii je k stop kodónu priradená tRNA nesúca aminokyselinu a syntéza proteínu pokračuje ďalej. Aj pre tento proces je potrebná prítomnosť pseudouzola v štruktúre mRNA. Úspešnosť ignorovania terminačného kodónu a vzniku predĺženej verzie proteínu varíruje medzi 5-30%.

Najdlhšia forma gamaretrovirusovej RNA, transkribovaná po celej dĺžke provírusovej DNA, kóduje informáciu pre syntézu dvoch typov polyproteínov, Gag a Gag/Pol. Čítacie rámce pre Gag a Pol sú oddelené terminačným kodónom (UAG) a preto pre vznik Gag/Pol polyproteínu je potrebné uplatnenie mechanizmu potlačenia terminácie translácie. V prípade ALV a HIV-1, nielen že sa medzi Gag a Pol nachádza stop kodón, ale oba proteíny sú kódované v rozdielnych čítacích rámcoch. Pre produkciu Gag/Pol polyproteínu je preto nevyhnutný -1 ribozomálny „frameshift“. Uvedený spôsob translácie zabezpečuje tvorbu 10-20 násobne väčšieho množstva Gag ako Gag/Pol, čo je pre retrovírusy výhodné, nakoľko v ďalšom priebehu infekčného cyklu je potrebné menšie množstvo molekúl enzýmov (PR, RT, IN) a oveľa väčší počet štruktúrnych proteínov MA, NC a CA. Gag aj Gag/Pol polyproteíny sú po translácii uvoľnené do cytosolu, kde navzájom interagujú a iniciujú skladanie vírusového kapsidu/jadra.



Obr. 9.10 – „Suppression of termination“ mechanizmus translácie
Prevzaté a upravené zo SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone.

Dlhá a zostrihom neupravená mRNA, z ktorej sa translatovali Gag a Gag/Pol, má zároveň aj funkciu genómovej RNA. V jej „leader“ oblasti sa nachádza enkapsidačný signál ψ (Ψ), ktorý je zostrihom odstránený zo všetkých ostatných kratších subgenómových mRNA. Tento element sa viaže na motív zinkového prstu v NC oblasti prekurzorov Gag a Gag/Pol a je zbalený do novovznikajúceho kapsidu. Doteraz nie je známe, aký mechanizmus zabezpečuje enkapsidáciu práve dvoch molekúl genómovej ssRNA. Celý komplex prekurzorových proteínov s dimérom RNA je postupne obalený a vzniká nezrelá vírusová častice s vnútorným pH 6,0-6,2. Nízke pH je vhodným prostredím na maturáciu proteázy (PR), ktorá sa autokatalyticky vyštípi z polyproteínového prekurzora Gag/Pol a jej pôsobením sú polyproteíny rozdelené na jednotlivé proteíny – MA, NC, CA, RT a IN. Tieto procesy spúšťajú preskupenie štruktúrnych proteínov a formovanie kónického (lentivírusy) alebo ikozaedrálného (ostatné retrovírusy) kapsidu. Virión v tejto podobe je už infekčný.

Kratšia mRNA, z ktorej bola zostrihom odstránená informácia pre Gag a Pol, je translatovaná na ribozómoch endoplazmatického retikula (ER). Vznikajúci Env proteín je ešte počas svojej syntézy translokovaný do lúmenu ER. Odtiaľ je transportovaný cez Golgiho

aparát až k CPM, v priebehu svojej cesty je glykozylovaný a štiepený bunkovými proteázami na maturované formy SU (gp120) a TM (gp41). V oblasti CPM s akumulovanými vírusovými povrchovými glykoproteínmi pučia nezrelé kapsidy za vzniku obalených nezrelých viriónov.

Všetky ďalšie krátke mRNA upravené alternatívnym zostrihom, kódujúce malé regulačné proteíny, sú translatované na voľných ribozómoch v cytoplazme.

Vlastnosti a funkcie hlavných vírusových proteínov, prítomných u všetkých zástupcov retrovírusov:

MA – matrixový proteín je asociovaný s obalom viriónu vďaka svojmu N-koncu, ktorý je myristylovaný.

CA – kapsidový proteín je hlavnou štruktúrnou zložkou viriónov. Vytvára vonkajšiu vrstvu kondenzovaného jadra viriónu, ktoré môže mať sférický alebo kónický tvar.

NC – malý bázický proteín so štruktúrou zinkového prsta. Vo virióne sa nachádza približne 2000 kópií NC proteínu, ktoré obalujú obe vlákna genómovej RNA. Okrem nešpecifickej asociácie s RNA, NC je schopný sekvenčne špecificky viazať enkapsidačný signál, čo je nevyhnutné pri zbalení genómovej RNA do kapsidu. Pri formovaní novej vírusovej častice NC napomáha vstupu tRNA do kapsidu a prispieva k jej väzbe na PBS.

PR – aktívna vírusová aspartátová proteáza je homodimérom. Zabezpečuje štiepenie polyproteínových prekursorov Gag a Gag/Pol na individuálne proteíny.

RT – Mg^{2+} -závislá reverzná transkriptáza je heterodimérom s viacerými funkciami, kódovanými rôznymi doménami proteínu. Jednak je RNA/DNA-dependentnou DNA polymerázou katalyzujúcou reverznú transkripciu a zároveň je činná ako RNáza H, ktorá degraduje RNA z DNA/RNA heteroduplexu. Enzým nemá exonukleázovú aktivitu, takže nedokáže korigovať nesprávne zaradené bázy, výsledkom čoho sú mnohopočetné mutácie.

IN – integráza je 32 kDa proteínom s dvojakou funkciou – endonukleázovou aj ligázovou aktivitou.

SU – povrchový glykozylovaný proteín zodpovedný za rozpoznanie a väzbu bunkových receptorov a koreceptorov, vďaka čomu je hlavným determinantom hostiteľského okruhu.

TM – transmembránový proteín, ktorý ukotvuje nekovalentne viazaný komplex SU-TM v obale viriónu. Obsahuje fúzny peptid, ktorý sa aktivuje po interakcii SU s vhodným bunkovým receptorom, a iniciuje pH nezávislú fúziu vírusovej membrány s CPM.

Vlastnosti a funkcie malých regulačných vírusových proteínov:

Tax – kódovaný deltaretrovírusmi (HTLV, BLV), je transkripčným aktivátorom vírusových aj bunkových génov. Pravdepodobne je zapletený aj do transformačných procesov.

Rex – rovnako ako *tax*, aj *rex* je lokalizovaný medzi génom *env* a U3 oblasťou genómu. Zabezpečuje export zostrihom upravených deltaretrovírusových mRNA z jadra do cytoplazmy.

Bel1/Tas – je transaktivátorom transkripcie, má podobný mechanizmus pôsobenia ako Tat proteín, reguluje sekvencie na 5'-konci genómu, v oblasti LTR.

Tat – lentivírusový transkripčný transaktivátor. Počas infekcie HIV-1, dostatočná hladina NFκB a Sp1 v jadre buniek je nevyhnutná na iniciáciu transkripcie, ktorá je zároveň výrazne limitovaná. Väčšinou je prepis ukončený po syntéze TAR sekvencie a k vzniku kompletného transkriptu dochádza v minimálnych množstvách, ktoré sú však dostatočné pre produkciu Tat proteínu. Ten sa následne viaže na vlásenkovú štruktúru TAR elementu v R oblasti novosyntetizovanej vírusovej RNA, sprostredkuje väzbu ďalších bunkových faktorov (napr. TBP, cycT1, cdk9) k RNA, ktoré hyperfosforylujú RNA polymerázu II. Výsledkom je zvýšenie procesivity RNA polymerázy II, urýchlenie elongácie nového RNA reťazca a až stonásobný nárast miery transkripcie (obr. 9.7).

Rev – má podobnú funkciu ako Rex, riadi export vírusových mRNA z jadra do cytoplazmy. Viaže sa na Rev-responzívny element (RRE), simultánne interaguje s bunkovým exportínom Crm1 a v takomto komplexe dokáže previesť vírusové transkripty cez jadrový pór.

Nef – označovaný aj ako negatívny faktor napriek tomu, že ma pozitívny efekt na replikáciu vírusu. Je to multifunkčný proteín, nevyhnutný pre udržiavanie vysokej vírusovej záťaže a akceleráciu progredovania ochorenia u HIV-infikovaných pacientov. Nef je zodpovedný za degradáciu membránových proteínov CD4, MHC molekúl I. triedy alebo CXCR4 receptora, čím umožňuje vyhnúť sa imunitnej odpovedi hostiteľa.

Vpr – je súčasťou vírusových častíc HIV. Napomáha importovať pre-integračný komplex do jadra nedeliacich sa buniek. Bolo dokázané jeho zapojenie pri blokovaní bunkového cyklu v G2 fáze, ako aj účasť v ubikvitinylácii a degradácii bunkových proteínov.

Vif – je prítomný vo virióne a zvyšuje infekčnosť vírusu tým, že spôsobuje degradáciu APOBEC3G (enzým editujúci RNA) obmedzujúceho HIV infekciu.

Vpu – membránový proteín identifikovaný jedine u HIV-1, podieľa sa na morfogénze vírusu. Interaguje s novosyntetizovaným CD4 v endoplazmatickom retikule (ER) a spôsobuje jeho degradáciu, čím zabráni predčasnej väzbe gp120 na molekuly CD4 v ER. Vpu taktiež inhibuje aktivitu hostiteľského tetherínu, ktorý blokuje uvoľňovanie nových vírusových častíc z bunky.

Vpx – malý proteín SIV a HIV-2 s funkciou podobnou Vpr. Podporuje replikáciu vírusov v makrofágoch a lymfocytoch.

9.7 Transformácia buniek retrovírusmi

Unikátny replikačný cyklus retrovírusov, s integráciou vírusového genómu do hostiteľského chromozómu, ich predisponuje k transformácii buniek. Je to vôbec jediná čeláď RNA vírusov, ktorá dokáže navodiť onkogénne procesy v organizme svojho hostiteľa. Štúdium retrovírusov odhalilo niekoľko mechanizmov indukcie vzniku nádorov. Vo všeobecnosti môžeme onkogénne retrovírusy rozdeliť do dvoch skupín – akútne transformujúce retrovírusy a pomaly transformujúce retrovírusy.

Akútne transformujúce retrovírusy spôsobujú tvorbu nádorov relatívne rýchlo, lebo majú vo svojom genóme inkorporované onkogény, ktorých proteínové produkty nie sú potrebné pre replikáciu vírusov. Retrovírusy nadobudli onkogény z bunkového génového repertoáru transdukciou. „Ukradnutý“ onkogén môže byť zabudovaný do vírusového genómu bez porušenia funkcie ostatných retrovírusových génov a narušenia schopnosti vírusu dokončiť replikačný cyklus. V takom prípade hovoríme o replikačne kompetentných retrovírusoch, prototypom ktorých je RSV. Vírus Rousovho sarkómu nesie *src* onkogén (skratka z anglického výrazu „sarcoma“), ktorého protajškom v bunke je gén *c-src* kódujúci proteínovú tyrozínkinázu zapojenú do bunkových signálnych dráh. U väčšiny akútne transformujúcich retrovírusov transdukciou získaný bunkový gén nahradil menší alebo rozsiahlejší segment genómu a výsledkom bola strata schopnosti vírusu samostatne sa replikovať. Replikačne-nekompetentné alebo defektné vírusy dokážu dokončiť svoj replikačný cyklus len s pomocou „helper“ vírusu, ktorý im poskytne chýbajúce enzýmy alebo štruktúrne proteíny, potrebné pre kompletizáciu nových vírusových častíc. Retrovírusmi postrádajúcimi niektoré z esenciálnych génov na úkor onkogénu sú vírus vtácej erytroblastózy (AEV) alebo vtáčí myelocytómový vírus 29 (MC29). Bunkové gény, ktorých homológy nájdeme v genómoch retrovírusov, sú bunkovými proto-onkogénmi kódujúcimi proteíny s rôznymi funkciami – ide o rastové faktory, receptory pre rastové faktory, proteínové kinázy alebo transkripčné faktory zúčastňujúce sa regulácie delenia buniek. Ich vírusové náprotivky bývajú pozmenené mutáciami a deléciami, ktoré modifikujú aktivitu proteínov tak, aby konštitutívne signalizovali bunke potrebu proliferovať nezávisle na stimuloch z externého alebo intracelulárneho prostredia.

Pomaly transformujúce retrovírusy na rozdiel od predchádzajúcej skupiny retrovírusov nekódujú onkogény a navodzujú vznik tumorov oveľa pomalšie. Ich replikácia v hostiteľských bunkách, súčasťou ktorej je náhodná integrácia vírusového genómu do bunkovej DNA, môže viesť k onkogenéze, spravidla jej však predchádza dlhá doba latencie. Mechanizmom onkogenézy je inzerčná mutagenéza, ktorá môže mať dve podoby. Retrovírusová DNA sa môže integrovať pred proto-onkogén a prostredníctvom svojich regulačných elementov (v oblasti LTR) spôsobiť nadexpresiu daného proteínu s následnou dereguláciou bunkového delenia. Druhou alternatívou je inzerčné prerušenie sekvencie tumor-supresorového génu, ktorý je inaktivovaný a jeho neprítomnosť k bunke môže viesť k nadmernej proliferácii buniek.

Okrem dvoch vyššie uvedených všeobecne akceptovaných skupín transformujúcich retrovírusov boli identifikované aj ďalšie dva mechanizmy onkogenézy, ktoré sa nedajú zovšeobecniť, lebo sa týkajú špecifických retrovírusov – SSFV a HTLV-1. SSFV (vírus vyvolávajúci fokusy sleziny) má mutáciu v géne *env*, ktorá umožňuje exprimovanému proteínu imitovať aktivitu erythropoetínu a tým stimuluje rast buniek responzívnych k tomuto rastovému faktoru hematopoetických buniek. Výsledkom môže byť ich nadmerná proliferácia

za vzniku náhodných mutácií, ktoré môžu viesť k transformácii daných buniek. HTLV-1 kóduje transaktivačný proteín Tax, ktorý okrem exprese vírusových génov indukuje aj niektoré bunkové gény (IL-2 a receptor pre IL-2). Autokrinné pôsobenie nadexprimovaných IL-2 a IL-2R stimuluje proliferáciu infikovaných buniek, ktoré časom a vplyvom doteraz neobjasneného mechanizmu môžu nadobudnúť transformovaný fenotyp.

Zhrnutie charakteristík retrovírusov

- obalená častica nesúca dve kópie ssRNA v jadre viriónu
- vo virióne sú prítomné enzýmy PR, RT, IN a niektoré malé regulačné proteíny
- genómová RNA je polyadenylovaná a nesie čiapočku na 5'-konci, v oblasti PBS je asociovaná bunková tRNA
- po vstupe do bunky prebieha vo vírusovom kapside reverzná transkripcia RNA genómu na provírusovú dsDNA ukončenú LTR na každom konci
- Provírusová DNA je transportovaná do jadra a nešpecificky integrovaná do chromozómu hostiteľskej bunky
- 3-4 gény – *gag*, *pro/pol*, *env*
- regulačné elementy transkripcie prítomné v LTR, prepis sprostredkovaný bunkovou RNA polymerázou II, uplatňuje sa alternatívny zostrih, transkripty majú čiapočku a sú polyadenylované
- vírusové proteíny sú syntetizované ako polyproteíny, ktoré sú následne štiepené vírusovou alebo bunkovou proteázou na jednotlivé proteíny
- pri translácii sa uplatňuje ribozomálny „frameshift“ a potlačenie terminácie translácie
- exogénne a endogénne retrovírusy, jednoduché a zložité retrovírusy
- chybovosť RT je zodpovedná za generovanie quasispecies
- za onkogenézu retrovírusov sú zodpovedné vírusové onkogény alebo inzerčná mutagenéza

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

(-)ssRNA	jednovláknová RNA negatívnej polarity
(+)ssRNA	jednovláknová RNA pozitívnej polarity
A+T	pár komplementárnych báz - adenínu s tymínom
AAV	adeno-asociovaný vírus
AAVS1	miesto integrácie parvovírusu AVV na chromozóme hostiteľa
ABOPEC3G	enzým editujúci RNA
Ad5	ľudský adenovírus 5
AEV	vírus vtácej erytroblastózy
AIDS	syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti
ALV	vírus vtácej leukémie
ARP	autonómne sa replikujúce parvovírusy
ATP	adenozíntrifosfát
B19V	parvovírus B19
BKV	BK polyomavírus
bp	bázový pár
BPV	bovínny parvovírus
BPV-1	bovínny papilomavírus
CA	kapsidový proteín
CACV	vírus vakcínie
CAR	receptor pre adenovírusy a Coxsackie vírusy
CBP	CREB-viažúci proteín
cccDNA	kovaletne uzavretá cirkulárna DNA
CCR5	chemokínový receptor
CD4	diferenciačný antigén T lymfocytov
CD8	diferenciačný antigén T lymfocytov
CEBP	enhancerovú sekvenciu CCAAT-viažúci proteín
CFTR	gén pre transmembránový regulátor vodivosti pri cystickej fibróze
CLOCK	typ histón acetyltransferázy
CoREST	korepresor viažúci sa na promótor v asociácii s REST
CPM	cytoplazmatická membrána
cPPT	centrálny polypurínový trakt
CPXV	vírus kravských kiahní
CREB	transkripčný faktor, proteín viažúci cAMP responzívny element
CRPV	papilomavírus králikov
CTF	CCAAT box-viažúci transkripčný faktor, jadrový faktor 1

CXCR4	chemokínový receptor
DHBV	vírus hepatitídy kačíc
DIS	dimerizačná sekvencia
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DR	priame opakovania
dsDNA	dvojvláknová deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvojvláknová ribonukleová kyselina
EBER	EBV-kódované malé RNA
EBNA	jadrový antigén EBV
EBV	vírus Epstein a Barrovej
Enh	enhancer
ER	endoplazmatické retikulum
ESCRT	skupina proteínov zabezpečujúcich vznik transportných vezikúl
G+C	pár komplementárnych báz - guanínu s cytozínom
GRE	glukokortikoid-responzívny element
GTPV	poxvírus kôz
HBoV	humánný bocavírus
HBSP	zostrihom upravený proteín HBV
HBV	vírus hepatitídy B
HCC	hepatocelulárny karcinóm
HCF-1	faktor hostiteľskej bunky
HCMV	ľudský cytomegalovírus
HCV	vírus hepatitídy C
HDAC	histón deacetyláza
HHV	ľudský herpetický vírus
HIV-1	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti
HPV	ľudský papilomavírus
HSPG	heparán-sulfátový proteoglykan
HSV-1	ľudský herpesvírus 1, vírus herpes simplex 1
HTLV	ľudský T-lymfotropný vírus
HVS	herpesvírus saimiri
ICP	vírusové proteíny prítomné v infikovanej bunke
IFN	interferón
IN	integráza
IR	interná repetícia
IRES	interné miesto nasadnutia ribozómu
ITR	obrátene terminálne repetície
JCV	JC polyomavírus

kb	kilobáza
kbp	kilobázový pár
kDa	kilodalton
KSHV	s Kaposiho sarkómom asociovaný herpesvírus
LANA	s latenciou asociovaný jadrový antigén KSHV
LATs	s latenciou asociované transkripty
LCR	dlhá kontrolná oblasť u papilomavírusov
LSD1	lyzín špecifická demetyláza
LT	veľký T antigén polyomavírusov
LTR	dlhé terminálne repetície
MA	matrixový proteín
MC29	vtáčí myelocytómový vírus 29
MCV	polyomavírus Merkelových buniek
MDV	vírus Marekovej choroby
MHC	hlavný histokompatibilný komplex
miRNA	mikro RNA
MLV	vírus myšej leukémie
MME	minichromozóm udržiavací element
MMTV	vírus myšieho tumoru prsnej žľazy
MOCV	vírus molluscum contagiosum
MPyV	polyomavírus myši
mRNA	mediátorová RNA
mT	stredný T antigén polyomavírusov
MuHV/MHV	myšací herpetický vírus
MVM	malý vírus myši
MYXV	vírus myxomatózy
NC	Nobelova cena
NC	nukleokapsid
ncRNA	nekódujúce RNA
ND10	nukleárna doména 10
NFkB	jadrový faktor kappa B
MAPK	mitogénmi-aktivovaná proteínkináza
PKC	proteínkináza C
NLS	jadrový lokalizačný signál
NTCP	sodíkovo-závislý taurocholát kotransportný polypeptid
ORF	otvorený čítací rámec
PARV4	ľudský parvovírus 4
PBS	primer-viažúce miesto

PDGF	trombocytový rastový faktor
PDZ	štruktúrna doména niektorých signálnych proteínov
pgRNA	pregenómová RNA
PIC	pre-integračný komplex
PIK3CA	katalytická podjednotka fosfatidylinozitol 3-kinázy
PKR	proteínkináza R
PLCG1	fosfolipáza C, gama 1
PML	promyelocytický leukemický proteín
Pol II	RNA polymeráza II
PP2A	proteínová fosfolipáza 2A
PPT	polypurínový trakt
PR	proteáza
PRE	exportný motív pgRNA
PSI	enkapsidačný signál retrovírusov
R	repetícia, repetitívna sekvencia
RBS	Rep proteín viažúce miesto
RC DNA	relaxovaná cirkulárna DNA
RdRp	RNA-dependentná RNA polymeráza
REST	represor regulujúci expresiu génov
RNA	ribonukleová kyselina
RRE	Rev-responzívny element
RSV	vírus Rousovho sarkómu
RT	reverzná transkriptáza
SARS	ťažký akútny respiračný syndróm (ochorenie)
SIV	vírus imunitnej nedostatočnosti opíc
SL	vlásenka
SPPV	poxvírus oviec
SS	donorové miesto pre zostrih RNA
SSBP	jednovláknovú DNA viažúci proteín
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
SSFV	vírus vyvolávajúci fokusy sleziny
ssRNA	jednovláknová ribonukleová kyselina
sT	malý T antigény polyomavírusov
SU	povrchový proteín
SuHV-1	prasací herpesvírus 1
SV40	opičí vírus 40
TAP	transportér asociovaný s procesovaním antigénov
TAR	transaktivačný responzívny element

TBP	TATA-viažúci proteín
TCR	receptor T lymfocytov
TM	transmembránový proteín
TP	terminálny proteín
TR	terminálne repetície
tRNA	transferová RNA
TRS	miesto terminálneho rozdelenia
TuHV-1	Tupaia herpesvírus
U3/5, U _{L/S}	unikátna sekvencia
VARV	vírus varioly
VETF	vírusový skorý transkripčný faktor
Vhs	herpesvírusový proteín degradujúci mRNA
VITF	vírusový intermediálny transkripčný faktor
VLTF	vírusový neskorý transkripčný faktor
VP	vírusový/viriónový proteín
VSV	vírus vezikulárnej stomatitídy
VZV	varicella zoster vírus
WHO	svetová zdravotnícka organizácia
WHV	vírus hepatitídy svišťov

POUŽITÁ LITERATÚRA

Acheson, N. H. (2011): *Fundamentals of Molecular Virology*, 2nd Edition. Wiley, Hoboken, 528s.

Cann, A. J. (2015): *Principles of Molecular Virology*, 6th Edition. Academic Press, London, San Diego, Waltham, Oxford, 303s.

Carter, J., Saunders, V. (2013): *Virology Principles and Applications*, 2nd Edition. Wiley, Chichester, 394s.

Dimmock, N. J., Easton A. J., Leppard, K. N. (2007): *Introduction to Modern Virology*, 6th Edition. Blackwell Publishing, Malden, Oxford, Carlton, 531s.

Flint, J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Skalska, A. M., Enquist, L. W. (2015): *Principles of Virology*, 4th Edition. ASM Press, Washington, 1060s.

King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (2012): *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, London, Waltham, San Diego, 1338s.

Knipe, D. M., Howley, P. M., Cohen, J. I., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Racaniello, V. R., Roizman, B. (2013): *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins a Wolters Kluwer, Philadelphia, 2582s.

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H. (2013): *Molecular Virology*. Springer, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 1013s.

Norkin, L. C. (2010): *Virology – Molecular Biology and Pathogenesis*. ASM Press, Washington, DC, 750s.

Ryu, W.-S. (2017): *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Academic Press, London, San Diego, Cambridge, Oxford, 440s.

Wagner, E.K., Hewlett, M., Bloom, D.C., Camerini, D. (2008): *Basic Virology*. Blackwell Publishing, Malden, Oxford, Carlton, 550s.

ZDROJE POUŽITÝCH OBRÁZKOV

Zdroj web 1:

https://en.wikipedia.org/wiki/Baltimore_classification#/media/File:The_Baltimore_Classification.gif (vlastná práca autora Sara Confalonieri), Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license

Zdroj web 2:

https://en.wikipedia.org/wiki/Polyomaviridae#/media/File:Gaynor_plospathogens_2007_WU_virusgenome.png (publikované v: Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P., Wang, D. (2007): Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. PloS Pathogen 3(5): e64. doi : 10.1371/journal.ppat.0030064), Creative Commons Attribution 4.0 International license

Zdroj web 3:

https://en.wikipedia.org/wiki/Papillomaviridae#/media/File:HPV-16_genome_organization.png (autor Xmort), Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International, 3.0 Unported, 2.5 Generic, 2.0 Generic, 1.0 Generic license

Obrázky, pri ktorých je to uvedené, boli so súhlasom SIB Švajčiarskeho inštitútu bioinformatiky prevzaté z ich webovej stránky a podľa potreby upravené. Zdrojom je: ViralZone: www.expasy.org/viralzone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics

Anna Kostrábová
Silvia Pastoreková
Tatiana Betáková

BIOSYNTÉZA VÍRUSOV

I.diel

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave vo Vydavateľstve UK

Návrh obálky: Anna Kostrábová

Korigovali autori

Rozsah 135 strán, 7,22 AH, 7,64 VH, prvé vydanie

ISBN 978-80-223-4402-9