

Inovace studia molekulární a buněčné biologie

reg. č. CZ.1.07/2.2.00/07.0354

Investice do rozvoje vzdělávání



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

OBVSB/Obecná virologie

Investice do rozvoje vzdělávání



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Sub-buněčné mikroorganismy

Od satelitních nukleových kyselin k virům

Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Cílem je seznámit posluchače se základními
charakteristikami sub-buněčných
mikroorganismů a jejich významem

Klíčová slova: viry, viroidy, satelity, priony

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

- **Úvod do virologie**
- **Základní principy biologie virů (sub-buněčných organismů)**
- **Klíčové body interakce virus – hostitel**
- **Živočišné, rostlinné a bakteriální viry**

MIKROBIÁLNÍ TEORIE CHOROB

- **Robert Koch a Luis Pasteur společně navrhli 'mikrobiální teorii' původu chorob (1880 – 1890)**
- **Mikroorganismy mohou napadnout organismus a vyvolat chorobu**
- **Kochovy postuláty: důkaz infekčního původce choroby**

KOCHOVY POSTULÁTY

- **Virus vždy provází projevy dané choroby**
- **Je nezbytné virus izolovat, purifikovat a stanovit jeho vlastnosti**
- **Je nutné vyvolat identickou chorobu inokulací zdravého hostitele**
- **Je nutné potvrdit výskyt identického viru a opakovaná izolace z infikovaného hostitele**

KOCHOVY POSTULÁTY

(modifikované pro viry; Rivers, 1937)

- Izolace viru z nemocného hostitele
- Kultivace v hostitelských buňkách (organismu)
- Infekční agens je filtrovatelné
- Choroba musí být vyvolatelná infekcí zdravého vnímavého hostitele čistým izolovaným virem
- Totéž infekční agens musí být opět izolovatelné z nově infikovaného vnímavého hostitele
- Detekce specifické imunitní odpovědi na daný virus

OBSAH STUDIA VIROLOGIE

- **Viry** (Dmitrij Ivanovskij, 1892
Martinus Beijerinck, 1898)
- **Viroidy** (Theodor O. Diener, 1971)
- **Satelity** (1962)
satelitní viry
satelitní nukleové kyseliny
- **Priony** (Carleton Gajdušek, 1956-NC1976
Stanley Prusiner, 1982-NC1997)

VIROIDY

<http://focosi.altervista.org/physioplantae.html#Viroids>

Viroidy jsou neobalené, malé, kruhové, jednovláknové RNA, které se autonomně replikují, když jsou inokulovány do hostitelské rostliny. Některé jsou patogenní, jiné se replikují bez vyvolání příznaků.

Viroidy se šíří vegetativně, většina je přenosná mechanicky, některé semenem nebo pylem.

Potato spindle tuber viroid (PSTVd)

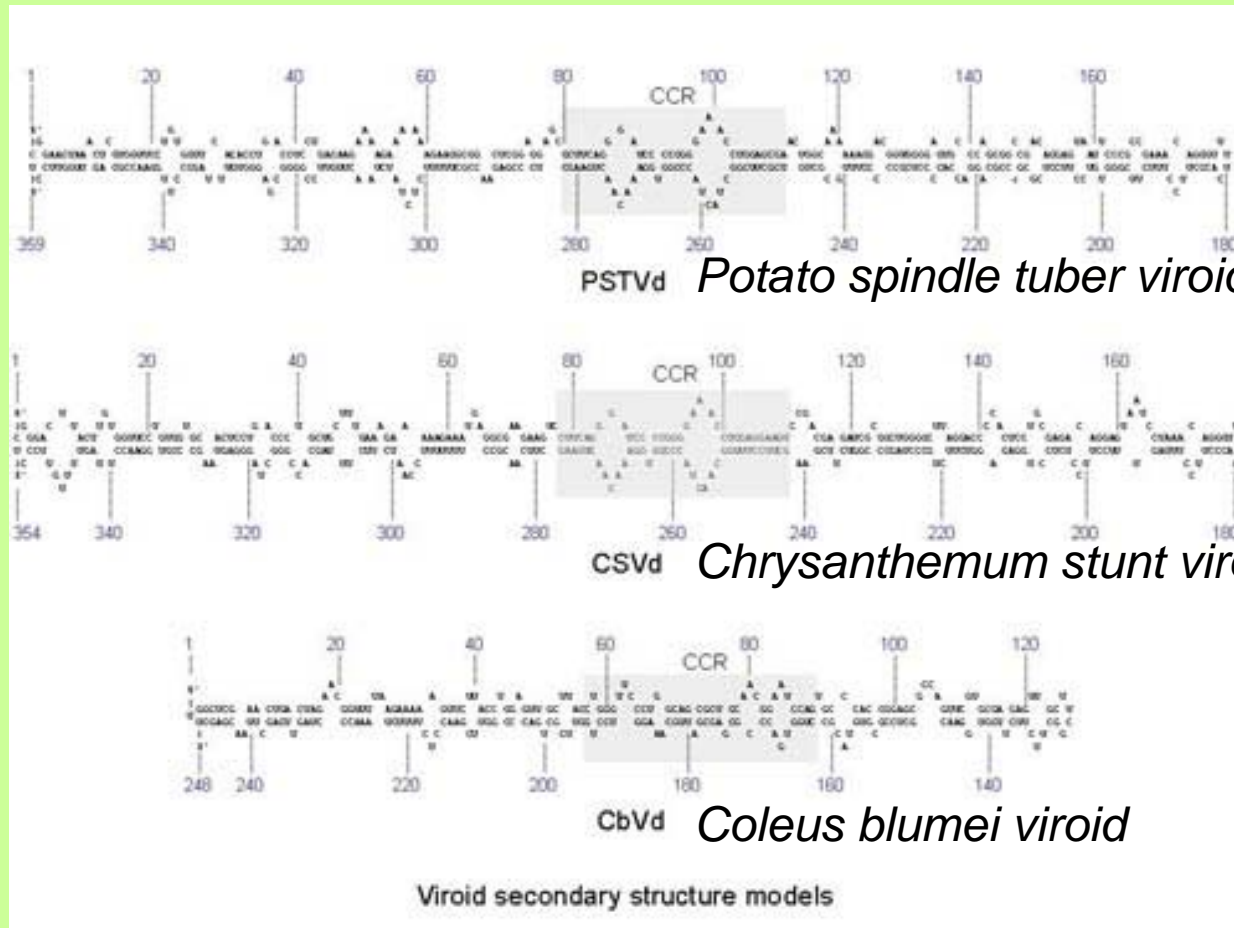
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)

Hop stunt viroid (HSVd)

Hop latent viroid (HLVd)

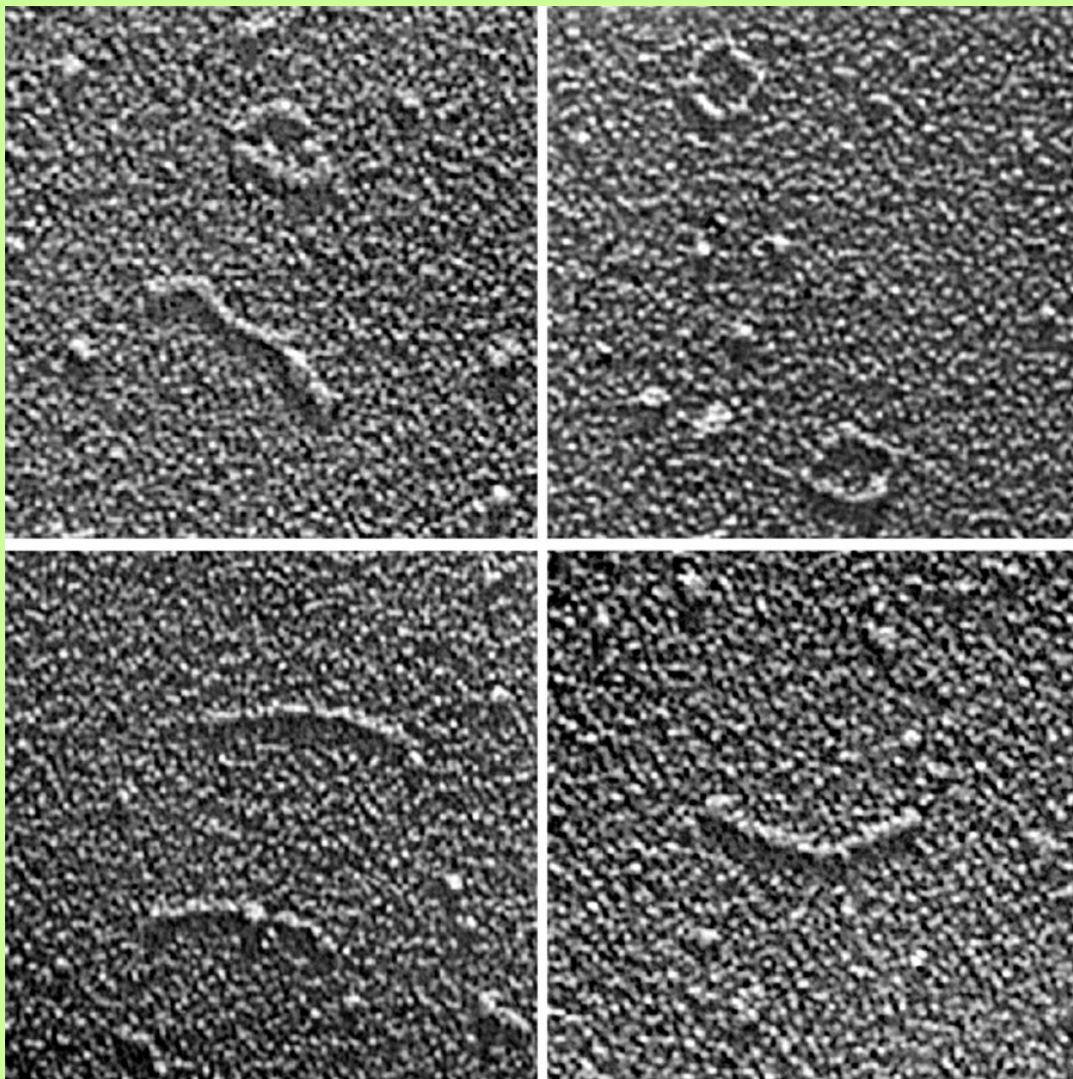
Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd)

SEKUNDÁRNÍ STRUKTURA VIROIDŮ



SEKUNDÁRNÍ STRUKTURA VIROIDŮ





Kruhové a lineární
formy *Potato spindle
tuber viroid*
pozorované v TEM
po obarvení platinou.



SATELITY

Satelity jsou sub-virové agens (částice), kterým chybí geny kódující enzymy potřebné pro jejich replikaci (reprodukcii).

Jejich zmnožení je závislé na ko-infekci buňky pomocným virem.

SATELITNÍ VIRY

Satelitní viry jsou malé jednovláknové RNA viry (o velikosti 500 - 2000 NT), které se vyskytují a jsou schopné životních projevů pouze v asociaci s pomocnými viry; kódují své obalové proteiny.

Tobacco necrosis satellite virus

Chronic bee-paralysis satellite virus

SATELITNÍ NUKLEOVÉ KYSELINY

Satelitní DNA

Satelitní RNA

Satelitní RNA jsou malé jednovláknové RNA (o velikosti 500 - 2000 NT), které se vyskytují a jsou schopné životních projevů pouze v asociaci s pomocnými viry; ke svému přenosu využívají kapsidu pomocného viru.

Satelitní nukleové kyseliny se vyznačují nukleotidovými sekvencemi značně odlišnými od genomu hostitelské buňky i pomocného viru.

Satelitní NK kódují nestrukturální proteiny nebo vůbec nekódují proteiny a jsou obaleny plášťovým proteinem pomocného viru.

PŘÍKLADY SATELITNÍCH NK

Tomato leaf curl virus satellite DNA

Cucumber mosaic virus satellite RNA

Arabidopsis mosaic virus small satellite RNA

Tobacco ringspot virus satellite RNA

PRIONY

- jsou infekční proteiny
- bez přímé účasti NK
- dvě izoformy prionového proteinu (PrP):



- PrP^C— normální forma exprimovaná buňkami
- PrP^{Sc}— infekční forma

PRIONY

skupina smrtelných neurodegenerativních chorob

BSE prion - Bovine spongiform encephalopathy

Scrapie prion - scrapie

CJD prion - Creutzfeldt-Jakob disease

Kuru prion - kuru

Projevy choroby:

- amyloidní plaky
- spongiformní degenerace nervové tkáně
- úbytek neuronů
- vyčerpanost, demence, poruchy koordinace, smrt

CO JSOU SCRAPIE

SCRAPIE jsou smrtelná, infekční choroba ovcí známá od 17. století. Charakteristická je 2 až 3 roky dlouhá inkubační doba, podrážděnost, svrbění a ztráta koordinace.

Infekční podstata **SCRAPIE** byla demonstrována přenosem z kozy na myš.

KURU

KURU je infekční choroba

KURU je nemoc podobná SCRAPIE a CREUTZFELD-JACOB nemoci (CJD)

IDENTIFIKACE/DETEKCE PRIONŮ

- **Laboratorní přenosy scrapie → myš; kuru → šimpanz; CJD → lidoop**
- **Infekční agens bylo rezistentní vůči detergentům, nukleasám, proteasám, glykosidasám, radiaci**
- **SCRAPIE – částice ?menší než viry?**
- **Syrský křeček – experimentální model, inkubační doba jen 70 dní, myš (1 rok)**
- **Vysoké koncentrace denaturačních látek a proteas snižovaly infekčnost = protein?**

IDENTIFIKACE PRIONOVÉHO PROTEINU

- Z mozku experimentálně infikovaných syrských křečků
- PrP prionový protein je 27 až 30 kDa velký k proteasam rezistentní polypeptid přítomný v mozku scrapie infikovaných zvířat
- Později byl klonován segment genu pro PrP protein; oligonukleotid pro screening cDNA knihovny

TRANSGENNÍ MYŠI

umožnily potvrdit význam PrP proteinu pro choroby vyvolané priony

- PrP deficientní myši (PrP^{0/0}) jsou rezistentní vůči prionové infekci; vnímavost je obnovena reintrodukcí PrP transgenu
- Infekce wild typů myší s over-expresí PrP vede k spongiformní nemoci u starších transgenních myší; extrakt z mozků těchto myší umožňuje experimentální přenos této neurodegenerativní nemoci

PRIONOVÝ PROTEIN

a jeho přeměna na prion

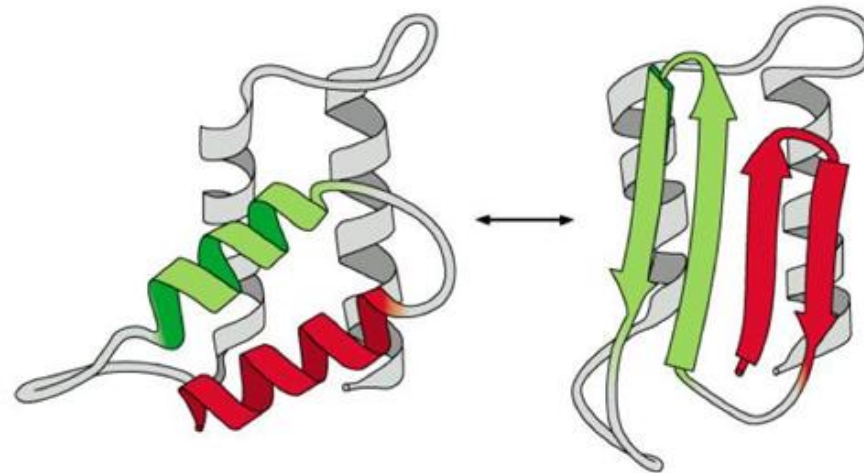
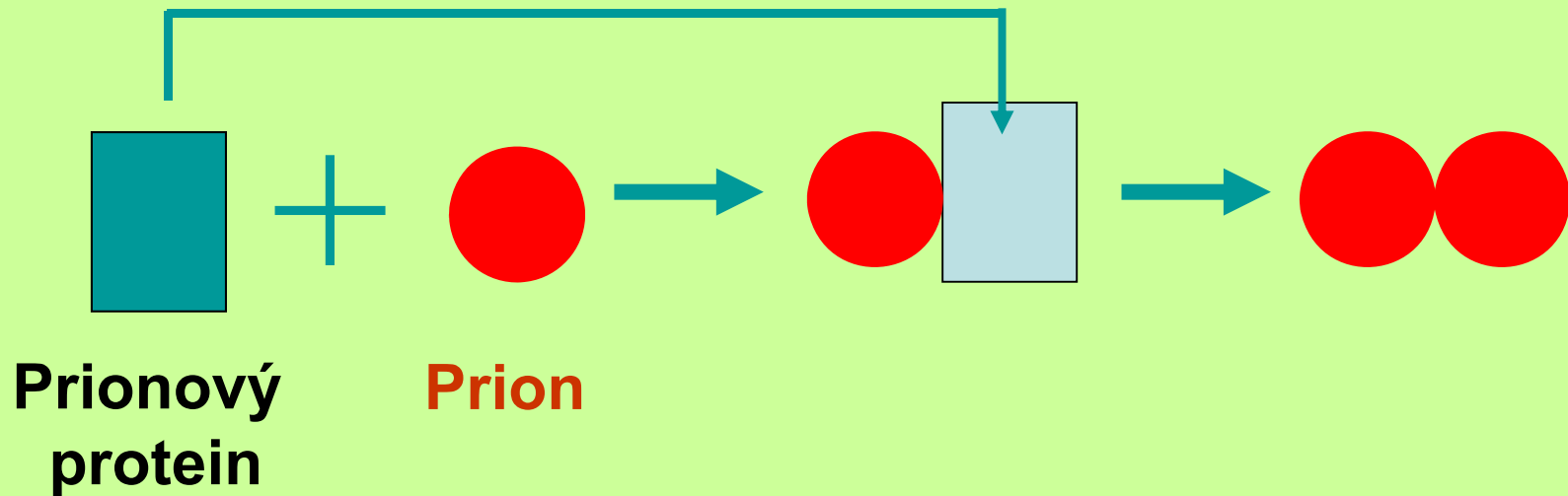


Figure 6-89 Molecular Biology of the Cell, 4th Edition

PrP^C shown to be composed of α -helices and PrP^{Sc} of β -sheets.

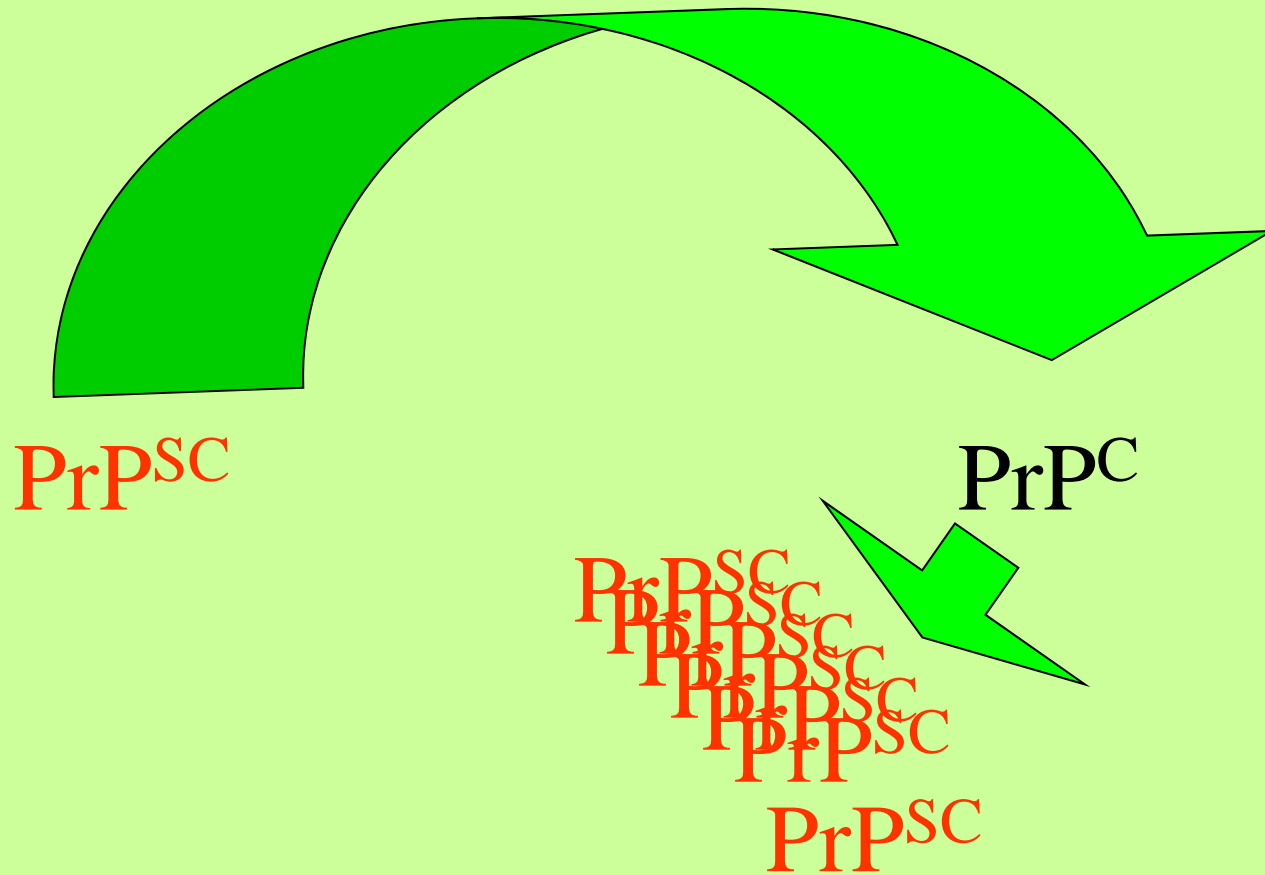
PRION SLOUŽÍ JAKO „MATRICE“ pro změnu konformace prionového proteinu



Priony se mohou množit „řetězovou reakcí“

MECHANISMUS PŘEMĚNY

PrPC na PrP^{SC} není detailně známý



JSOU KONFORMAČNÍ ZMĚNY PrP příčinou nemoci?

- **Beta- struktura PrP^{Sc} ,rezistentní vůči proteasam, se podílí na tvorbě nerozpustných fibril**
- **Akumulace těchto fibril, vede ke smrti buňky a neurodegenerativním změnám. Akumulované fibrily (PrP^{Sc} proteiny) v placích je možné specificky barvit a detekovat tak infekční prion; takové plaky označujeme jako amyloidní**

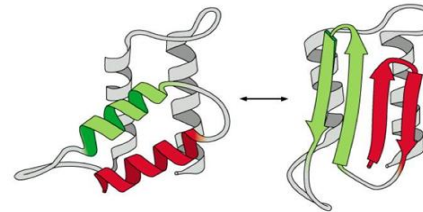
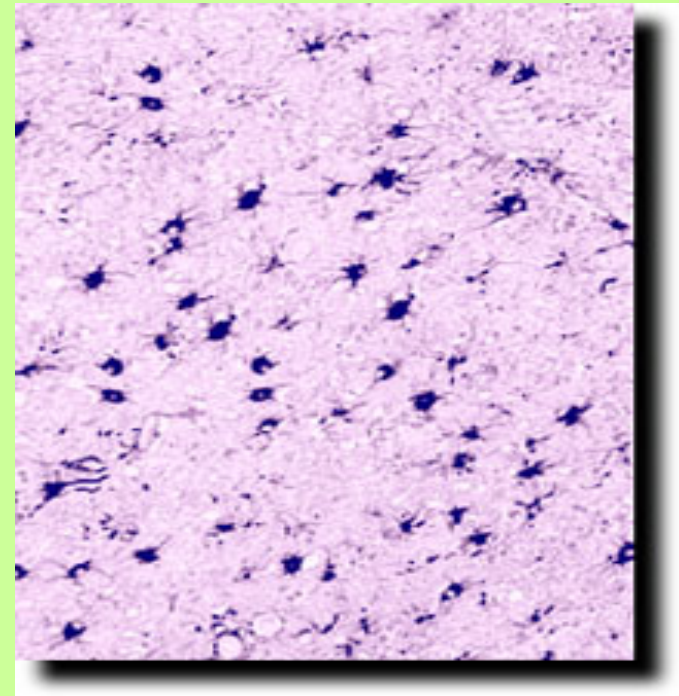
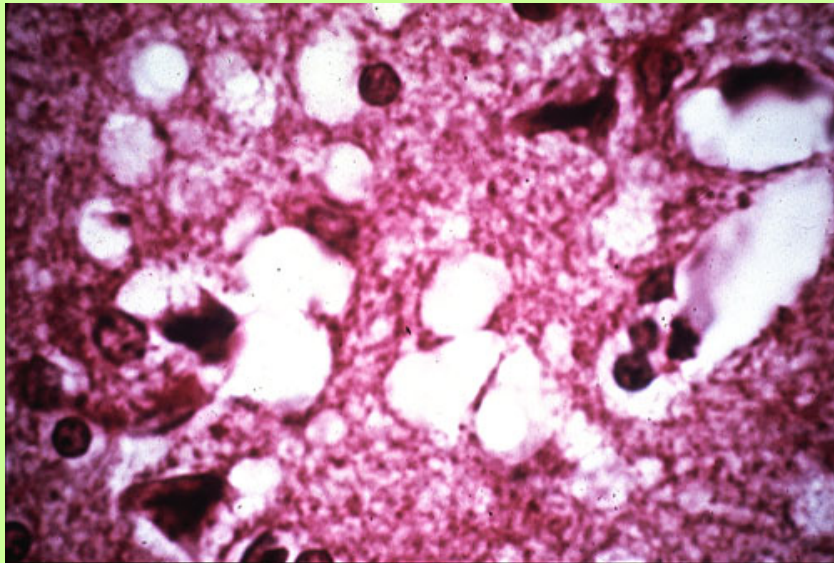


Figure 6-89 Molecular Biology of the Cell, 4th Edition

PrP^C shown to be composed of α -helices and PrP^{Sc} of β -sheets.

AMYLOIDNÍ PLAKY



NESTANDARTNĚ USPOŘÁDANÉ

proteiny jsou příčinou řady chorob

Abnormally folded proteins can aggregate to cause destructive human diseases

- Several neurodegenerative conditions are associated with spongiform-like change in the CNS

PREVALENCE OF NEURODEGENERATIVE DISEASES
IN THE UNITED STATES IN 2000.

DISEASE	No. OF CASES	No. PER 100,000 POPULATION*
Prion disease	400	<1
Alzheimer's disease	4,000,000	1450
Parkinson's disease	1,000,000	360
Frontotemporal dementia	40,000	14
Pick's disease	5,000	2
Progressive supranuclear palsy	15,000	5
Amyotrophic lateral sclerosis	20,000	7
Huntington's disease	30,000	11
Spinocerebellar ataxias	12,000	4

*Data are based on a population of approximately 275 million in 2000.

Prusiner (2001). N. Engl. J. Med. 344:1516.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

PRIONOVÉ CHOROBY

příčiny patogenese

DISEASE	MECHANISM OF PATHOGENESIS
HUMAN DISEASES	
Kuru (Fore people)	infection through ritualistic cannibalism
Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease	infection from prion-contaminated medical procedures
Variant Creutzfeldt-Jakob disease	infection from bovine prions?
Familial Creutzfeldt-Jakob disease	mutations in PrP
Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	mutations in PrP
Fatal Familial Insomnia (FFI)	mutations in PrP
Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	somatic mutation or spontaneous conversion of PrP
ANIMAL DISEASES	
Scrapie (sheep)	infection in genetically susceptible sheep
Bovine spongiform encephalopathy (cattle)	infection with prion-contaminated MBM
Transmissible mink encephalopathy (mink)	infection with prions from sheep or cattle
Exotic ungulate encephalopathy (greater kudu, nyala, oryx)	infection with prion-contaminated MBM
Feline spongiform encephalopathy (cats)	infection with prion-contaminated MBM
Chronic wasting disease (cervids)	UNKNOWN

JAK ZABÍJÍ PRION

- Proteiny se vytváří v endoplasmatickém retikulu, pokud mají špatnou konfiguraci, jsou z ER rychle vyloučeny a zlikvidovány proteasomem
- Prion setrvává v ER a pokud se dostane do cytoplasmy, odolává proteasomu
- Prion je pro buňku toxický

VLASTNOSTI PRIONU

- **Odolný vůči proteasam**
- **Odolný vůči vysokým teplotám (až 600 °C)**
- **Odolný proti řadě dezinfekčních prostředků (láh, formaldehyd, jodová tinktura) – po „desinfekci“ ještě odolnější**
- **V půdě může přežít roky**

- **Ničí ho teplota 134 °C (3 bary, 20 min.)**
- **Ničí ho silná oxidační činidla – Savo**
- **Louh – silně koncentrovaný 1 hodinu**

ALIMENTÁRNÍ INFEKCE

- **V trávicím traktu odolá prion nízkému pH i enzymům**
- **Ve střevu je zachycen některými buňkami sliznice a pronikne do mízních uzlin střev**
- **Odtud přes folikulární dendritické buňky do nervových zakončení bloudivého nervu**
- **Šíří se do míchy a mozku**

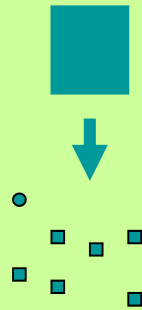
DIAGNOSTIKA - TESTY

- **Reakce prionů nestrávených proteasami s protilátkou proti prionovému proteinu**
- **Histologické vyšetření mozku**
- **Biologické testy na myších - i geneticky modifikovaných**

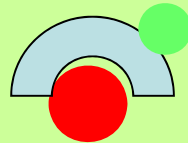
Vzorky krve, moči, lymfatických tkání

PRINCIP TESTŮ NA PRIONY

Prionový
protein



prion



proteáza



Protilátka se
„značkou“

Navázanou protilátku lze detekovat