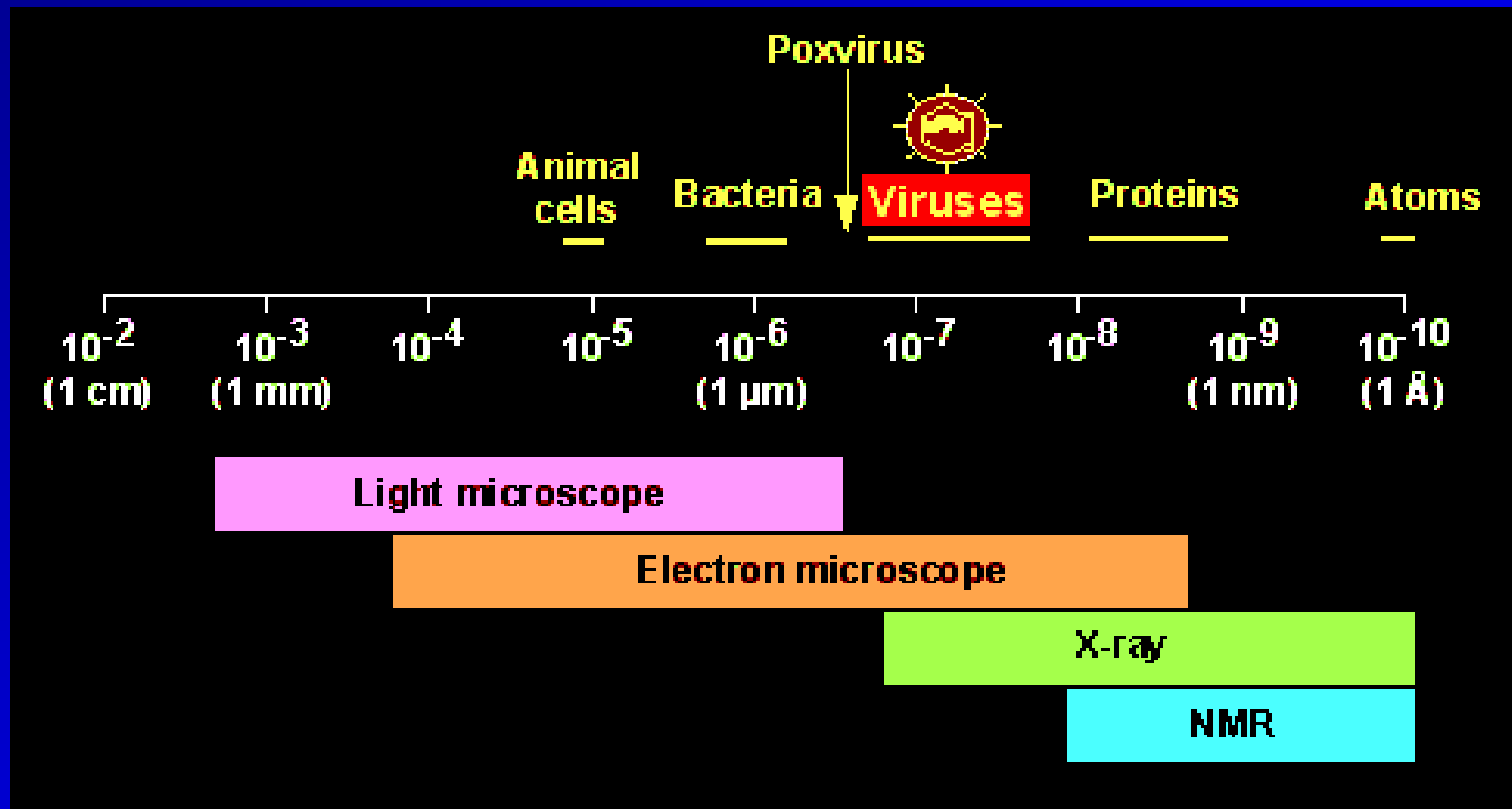


Všeobecná charakteristika virů

Virus je diskretní částice živé hmoty. Obsahuje nukleovou kyselinu (DNA nebo RNA), je schopný autoreprodukce a evoluce. Není schopný růst ani dělit se, nemá vlastní proteosyntetický a metabolický aparát, který by mu dodával stavební složky a energii pro autoreprodukci. Reprodukce virů je závislá na prokaryotických a eukaryotických buňkách. Virus je parazit.

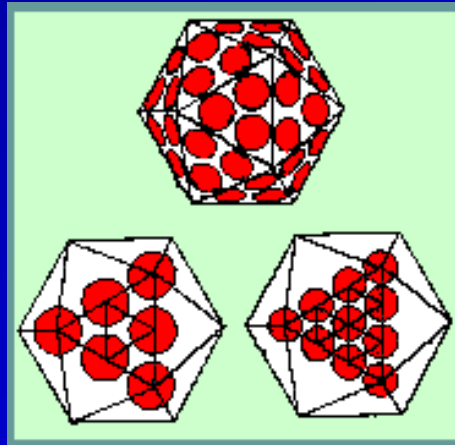
Velikost virů se pohybuje od 20 – 300 nm



Stavba virů:

- nukleová kyselina (DNA nebo RNA)
- kapsid (složený z kapsomér)
- virusový obal (lipidová dvojvrstva s glykoproteiny)

Virové kapsidy mohou být organizované do dvou forem s kubickou (ikosaedrální),



nebo helikální symetrií

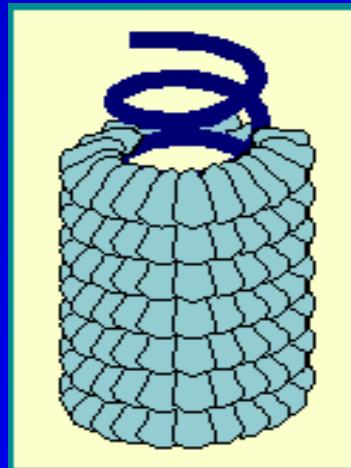
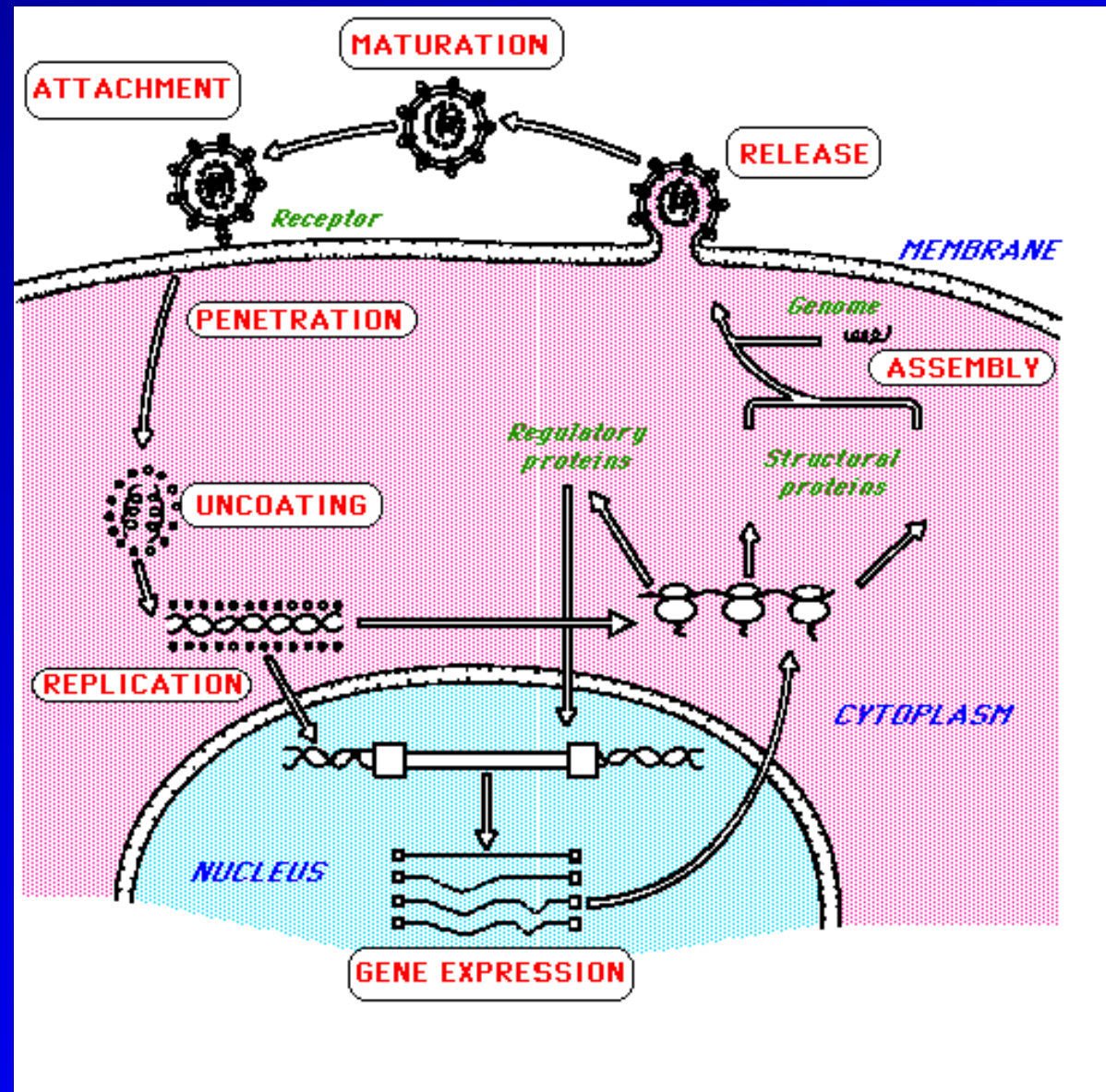


Schéma životního cyklu virů

1. přichycení se na buněčnou membránu
2. proniknutí do buňky
3. uvolnění NK
4. transkripce NK – syntéza enzymů
5. replikace NK
6. syntéza obalových proteinů
7. kompletizace
8. uvolnění viru z buňky



Onkogenní viry

Jsou to viry, které jsou schopné vyvolávat neoplastické transformace nebo je pozitivně ovlivňují.

Mechanismus transformace buněk na nádorovou probíhá:

1. přímo - vnesením genu do buňky (onkogenu)
2. nepřímo - změněním exprese celulárních genů
- změnou regulačních mechanismů

Patří sem viry z taxonomických skupin **RNA i DNA virů** :

1. RNA onkoviry

Retroviry: - mají ve svém genomu onkogen:

Savčí viry typu C
Ptačí viry typu C (virus Rousova sarkomu)

- nemají ve svém genomu onkogen:

Savčí viry typu B
Retroviry BLV, HTLV

2. DNA onkoviry - nemají ve svém genomu onkogen:

Hepadnaviry: Virus hepatitídy B (HBV)

Herpesviry: Lidský herpesvirus typ2 (HHV2 HSV2)
Lidský herpesvirus typ4 (HHV-4, EBV)
Lidský herpesvirus typ8 (HHV-8)

Papovaviry: Polyomaviry – SV40
Papilomaviry - Lidský papilomavirus typ 16, 18

Adenoviry

Poxviry

ONKOGENNÍ VIRY

hledání důkazů virového původu nádorových onemocnění. V r. 1911 Rous podal důkaz virového původu sarkomu u kuřat. Nobelovu cenu dostal až v r. 1966 v 85 letech.

B77 - virus slepičího sarkomu z onkol. ústavu v Bratislavě, Jan Svoboda - objevitel virogenie

Inbrední kmeny myši - po mnohonásobně opakovaném příbuzenském křížení. Kmeny s různou náchylností k nádorům (studium adenokarcinomu mléčné žlázy a leukémie).

Karcinom mléčné žlázy podmiňuje virus a estrogény - postihuje zvláště samice.

Leukémie postihuje samce i samice.

Důkaz virového původu byl podán přenosem na novorozené myši.

Tzv. **onkoviry** byly nalezeny u myši, drůbeže, opic (SV40).

U člověka viry způsobují benigní nádory (papilomy) i maligní onemocnění (virus hepatitidy B, Papilloma virus –děložní čípek, virus Burkittova lymfomu).

Onkoviry s RNA – retroviry – obsahují onkogen, který může transformovat buňku.

Reverzní transkriptáza přepisuje RNA do DNA a umožňuje včlenění retrovirových sekvencí do chromosomální DNA v buňce.

Virus Rousova sarkomu – onkogen v-src –kóduje protein s tyrozinkinázovou aktivitou.

V buňkách kuřat a savců podobný gen c-src, tzn., že virové onkogeny mají své ekvivalenty v normálních buňkách – změny těchto strukturálních nebo regulačních genů mají za následek transformaci buňky.

Metody transfekce DNA nebo klonovaných genů z virů či nádorů – sledování transformace normálních buněk (NIH 3T3 myší fibroblasty).

Po virové transformaci vytvářejí buňky na pozadí normálních buněk pozmeněné fokusy

Fokální metoda je základní metodou nádorové virologie.

Koncepty nádorové biologie podpořené virovou karcinogenezí

- ▶ Buněčný původ virových onkogenů – onkogeny nesené transformujícími retroviry jsou odvozeny od buněčných genů
- ▶ Genetický základ nádorů – onkogeny zahrnuté ve vývoji nádorů jsou aberantní verze normálních buněčných genů růstové kontroly
- ▶ Mnohastupňový proces karcinogeneze – je třeba mnohonásobných genetických změn pro vývoj nádoru
- ▶ Pozitivní a negativní regulační geny – v nádorech jsou změněny jak protoonkogeny tak nádorově supresorové geny
- ▶ Jednotné molekulární základy nádorů – různé třídy karcinogenů ovlivňují stejné regulační sítě kontroly buněčného růstu

Retroviry obsahující buněčné onkogeny

Table II. Retroviruses containing cellular oncogenes^a

General class	Oncogene	Virus			Protein product
		Name	Abbreviation	Origin	
Non-receptor protein tyrosine kinase	<i>abl</i>	Abelson murine leukemia virus	Ab-MLV	Mouse	Tyrosine kinase
	<i>fes</i>	ST feline sarcoma virus	ST-FeSV	Cat	Tyrosine kinase
	<i>fps</i>	Fujinami sarcoma virus	FuSV	Chicken	Tyrosine kinase
	<i>src</i>	Rous sarcoma virus	RSV	Chicken	Tyrosine kinase
Receptor protein tyrosine kinase	<i>erbB</i>	Avian erythroblastosis virus	AEV-ES4	Chicken	Epidermal growth factor receptor
	<i>fms</i>	McDonough feline sarcoma virus	SM-FeSV	Cat	Colony-stimulating factor receptor
	<i>kit</i>	Hardy-Zuckerman-4 feline sarcoma virus	HZ4-FeSV	Cat	Stem cell factor receptor
Serine/threonine protein kinase	<i>mil</i>	Avian myelocytoma virus	MH2	Chicken	Serine/threonine kinase
	<i>mos</i>	Moloney murine sarcoma virus	Mo-MSV	Mouse	Serine/threonine kinase
	<i>raf</i>	Murine sarcoma virus 3611	MSV3611	Mouse	Serine/threonine kinase
Growth factor	<i>sis</i>	Simian sarcoma virus	SSV	Monkey	Platelet-derived growth factor
G protein	<i>H-ras</i>	Harvey murine sarcoma virus	Ha-MSV	Rat	GDP/GTP binding
	<i>K-ras</i>	Kirsten murine sarcoma virus	Ki-MSV	Rat	GDP/GTP binding
Transcription factor	<i>erbA</i>	Avian erythroblastosis virus	AEV-ES4	Chicken	Transcription factor (thyroid hormone receptor)
	<i>ets</i>	Avian myeloblastosis virus E26	AMV-E26	Chicken	Transcription factor
	<i>fos</i>	FBJ osteosarcoma virus	FBJ-MSV	Mouse	Transcription factor (AP1 component)
	<i>jun</i>	Avian sarcoma virus-17	ASV-17	Chicken	Transcription factor (AP1 component)
	<i>myb</i>	Avian myeloblastosis virus	AMV	Chicken	Transcription factor
	<i>myc</i>	MC29 myelocytoma virus	MC29	Chicken	Transcription factor
	<i>rel</i>	Reticuloendotheliosis virus	REV-T	Turkey	Transcription factor (NF- κ B family)
Adapter protein	<i>crk</i>	CT10 avian sarcoma virus	CT-10	Chicken	

^aAdapted from Rosenberg and Jolicoeur (15). This list is representative, not exhaustive.

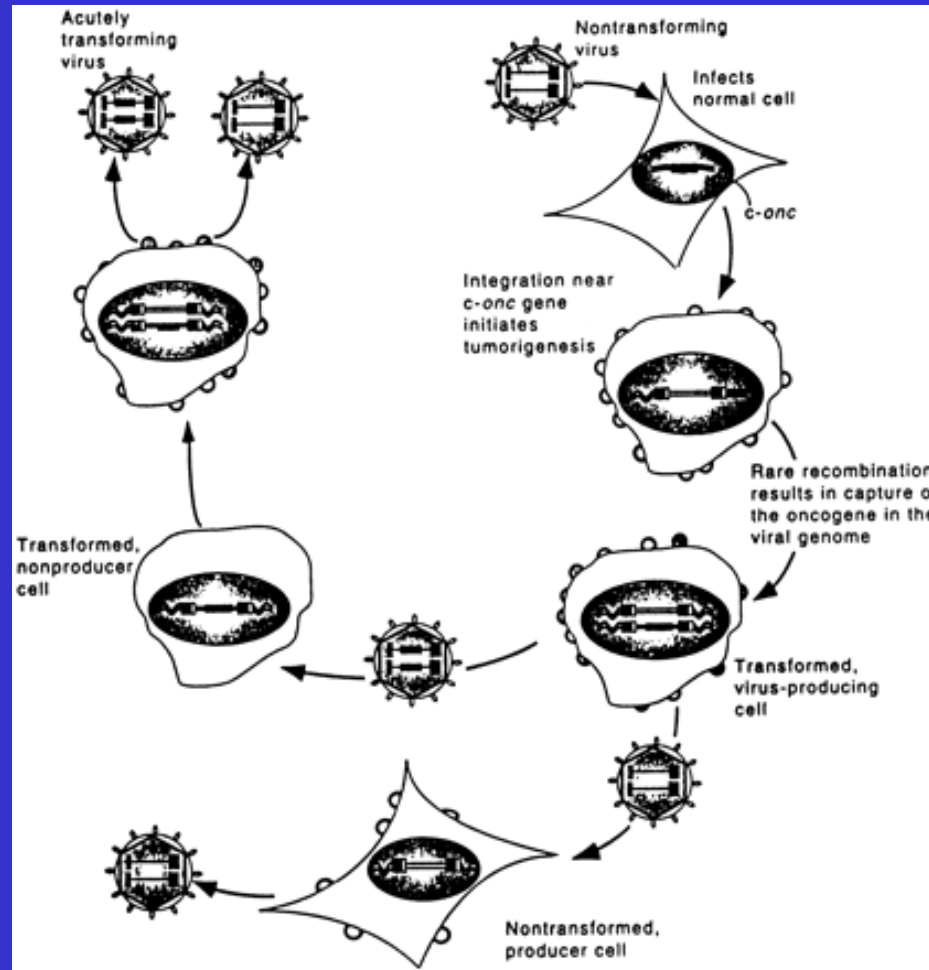
Buněčné onkogeny aktivované insercí retroviru postrádajících onkogeny

Table III. Cellular oncogenes activated by insertion of retroviruses lacking oncogenes^a

General class	Oncogene	Virus			Protein product
		Name	Abbreviation	Origin	
Non-receptor protein tyrosine kinase	<i>Lck</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Tyrosine kinase
Receptor protein tyrosine kinase	<i>c-erbB</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Epidermal growth factor receptor
	<i>c-fms</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	Colony stimulating factor receptor
Serine/threonine protein kinase	<i>Pim1</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Serine/threonine kinase
Growth factor	<i>Fgf3/Int2</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Fibroblast growth factor
	<i>Wnt1/Int1</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Secreted glycoprotein
	<i>Wnt3/Int4</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Secreted glycoprotein
G protein	<i>c-Ki-ras</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	GDP/GTP binding
Transcription factor	<i>Ets1</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Rat	Transcription factor
	<i>c-fos</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor (AP1 component)
	<i>c-myb</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor
	<i>c-myb</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Transcription factor
	<i>c-myc</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor
	<i>c-myc</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Transcription factor
Cyclin	<i>Fis1/Cyclin D1</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	G ₁ cyclin
	<i>Vin1/Cyclin D2</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	G ₁ cyclin

^aAdapted from Rosenberg and Jolicoeur (15). This list is representative, not exhaustive.

Retrovirová transformace a transdukce onkogenů



Clockwise from the top right: infection of a cell with a retrovirus that contains only viral genes can occasionally initiate tumor formation by insertion of the provirus next to a proto-oncogene. Recombination during subsequent infection can lead to the incorporation into the viral genome of the cell-derived oncogene. Cells infected with virus with only the oncogene-containing genome become transformed non-producer cells from which transforming virus can be rescued by superinfection with a replication-competent, non-transforming helper virus. Reproduced, with permission, from Vogt.

Viry, které úzce souvisí s nádorovým onemocněním lidí

Čeľad' vírusov	Vírus	Ľudský nádor
Papovaviridae	Ľudský papilomavírus (HPV)	genitálne nádory nádory viacvrstvového dlaždnicového epitelu
Herpesviridae	Epsteina-Barrovej vírus (EBV) vírus herpes simplex typ 2 (HSV2)	nazofaryngálne karcinómy Burkittov lymfóm lymfóm B-buniek cervikálny karcinóm?
Hepadnaviridae	vírus hepatitídy B (HBV)	hepatocelulárny karcinóm
Retroviridae	Ľudský lymfotropný vírus T-buniek (HTLV)	leukémia T-buniek dospelých

(Melnick, Adelberg, 1995)

Možné funkce virů v onkogenezi u lidí

Funkcia	Vírusy					
	EBV	HBV	HPV	HTLV	HSV	HIV
Stimulácia proliferácie buniek onkogénom	+	+?	+	+	-	-
Inzercia promótoru	-?	+?	-?	-?	-	-
Efekt mutácie DNA hostiteľskej bunky	-?	?	+?	-?	+	-
Nešpecifická indukcia proliferácie bunky	-	+	-	-	+	-
Imuno-supresia	-	-	-	-?	-	+

(zur Hausen, 1991)

Nejznámější onkoproteiny DNA onkogenních virů

Virus	Onkoprotein	Lokalizácia v bunke
SV40	veľký Tag malý Tag	jadro, plazmatická membrána jadro, cytoplazma
Polyomavírus	veľký Tag stredný Tag malý TAg	jadro, cytoplazma, plazmatická membrána plazmatická membrána jadro, cytoplazma
HPV 16	E6 E7	jadro, cytoplazma jadro, cytoplazma
Adenovírusy	skupina E1A skupina E1B	jadro, cytoplazma, plazmatická membrána jadro, cytoplazma
EBV	EBNA-2 (EB virus nuclear antigen) LPM (latent membrane protein)	jadro plazmatická membrána

(Žemla a kol., 1995)

Interakce mezi onkoproteiny DNA virů a buněčnými supresorovými proteiny

Virus	Virusový onkoprotein	Bunkový supresorový protein	
		Rb	p53
SV40	velký TAg	velkýTAg	velkýTAg
HPV	E6, E7	E7	E6
Adenovirus	E1A, E1B	E1A	A1B

Cytomegalovirus lidí (HCMV) (Herpesvirus lidí 5 - HHV5)

Patří do podčeledě Betaherpesvirů

Morfologie:

největší herpesvirus 180-200 nm

obal – tvořený glykoproteiny,
spikuly

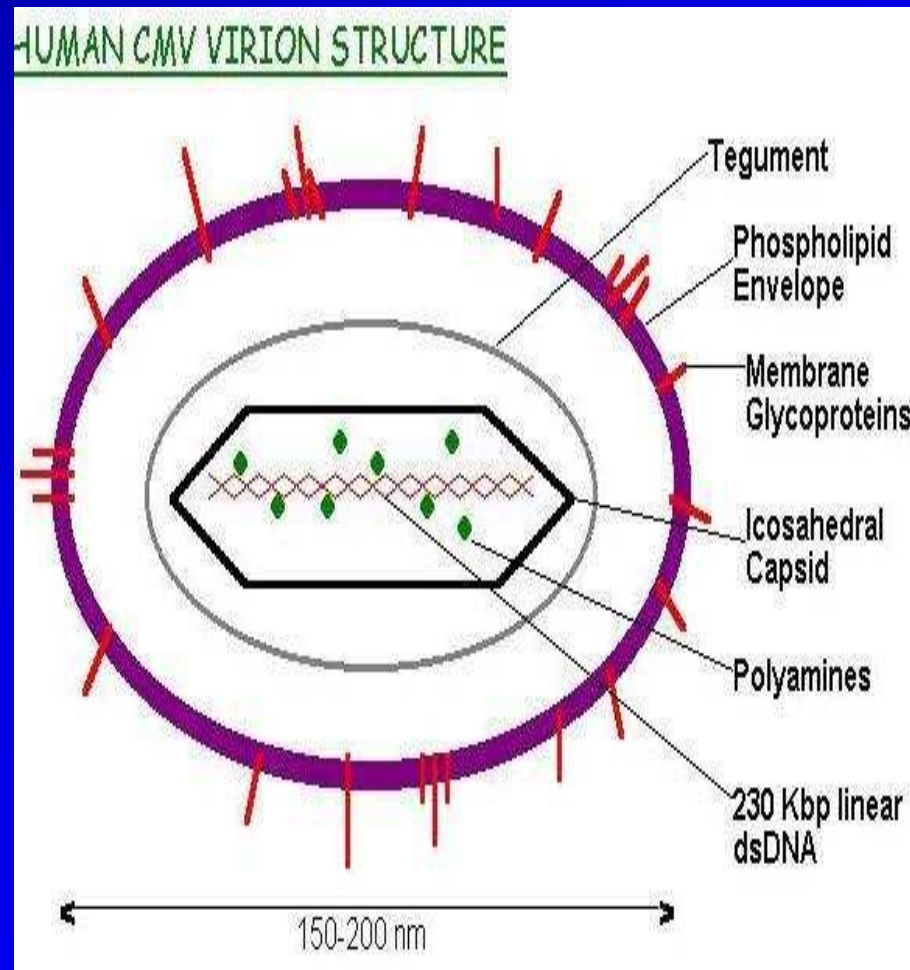
tegument – proteiny tvořená oblast

kapsid – ikosaedrální symetrie,

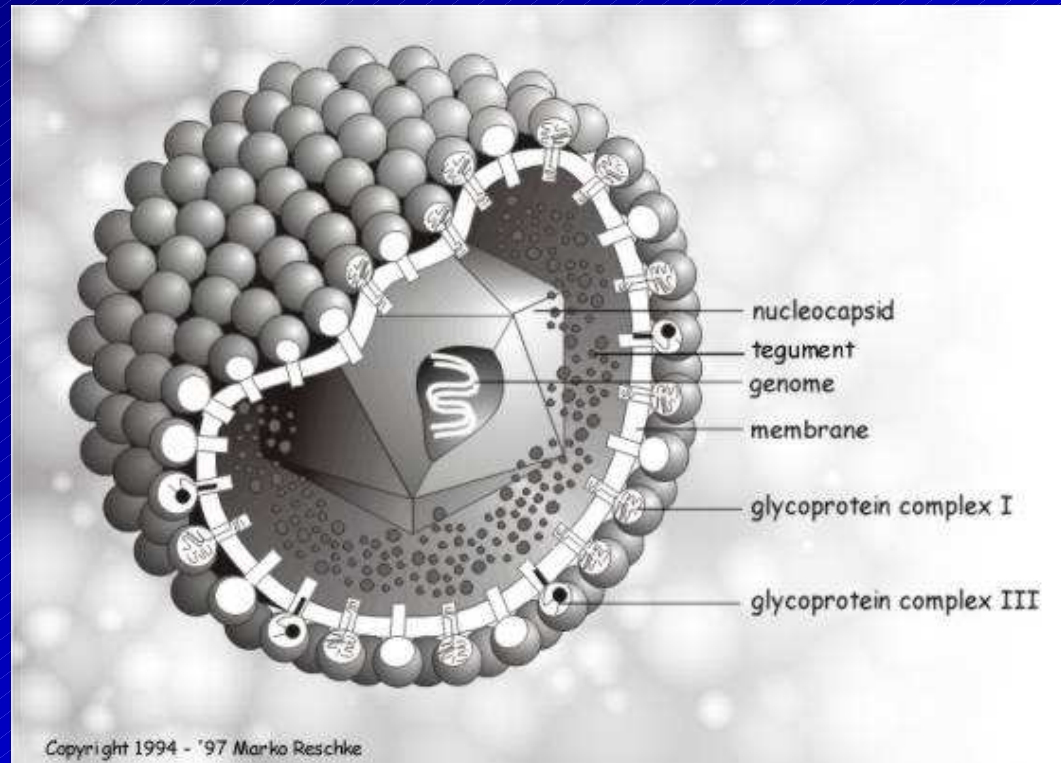
162 kapsomér

kůra – toroidální z proteinů

Genom – lineární dsDNA – 230 kbp



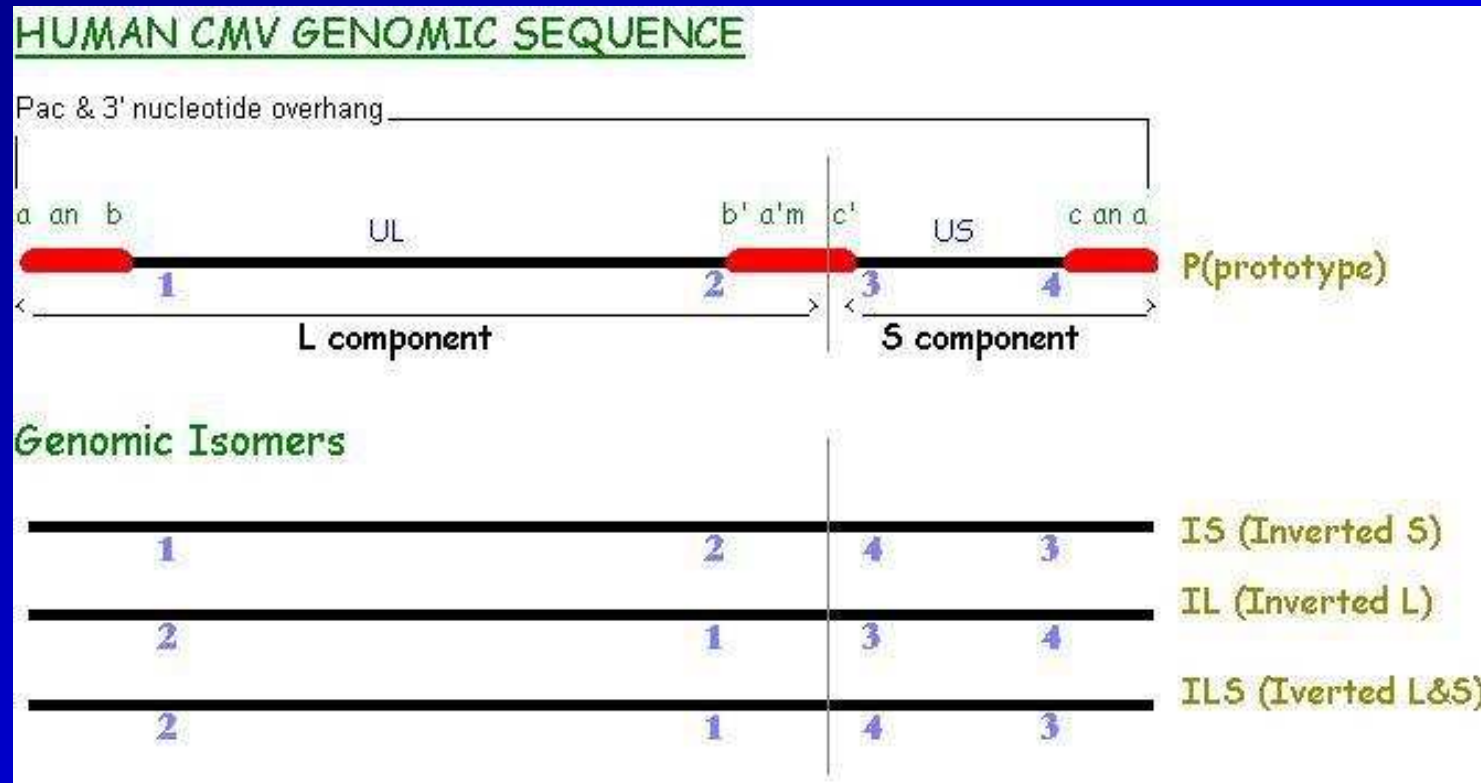
Human Cytomegalovirus (HCMV; Human Herpesvirus 5)



genom - lineární dsDNA – 230kbp

rozdělený je na dvě unikátní domény U_L a U_S ohraničené dvěma různými obrácenými repeticemi

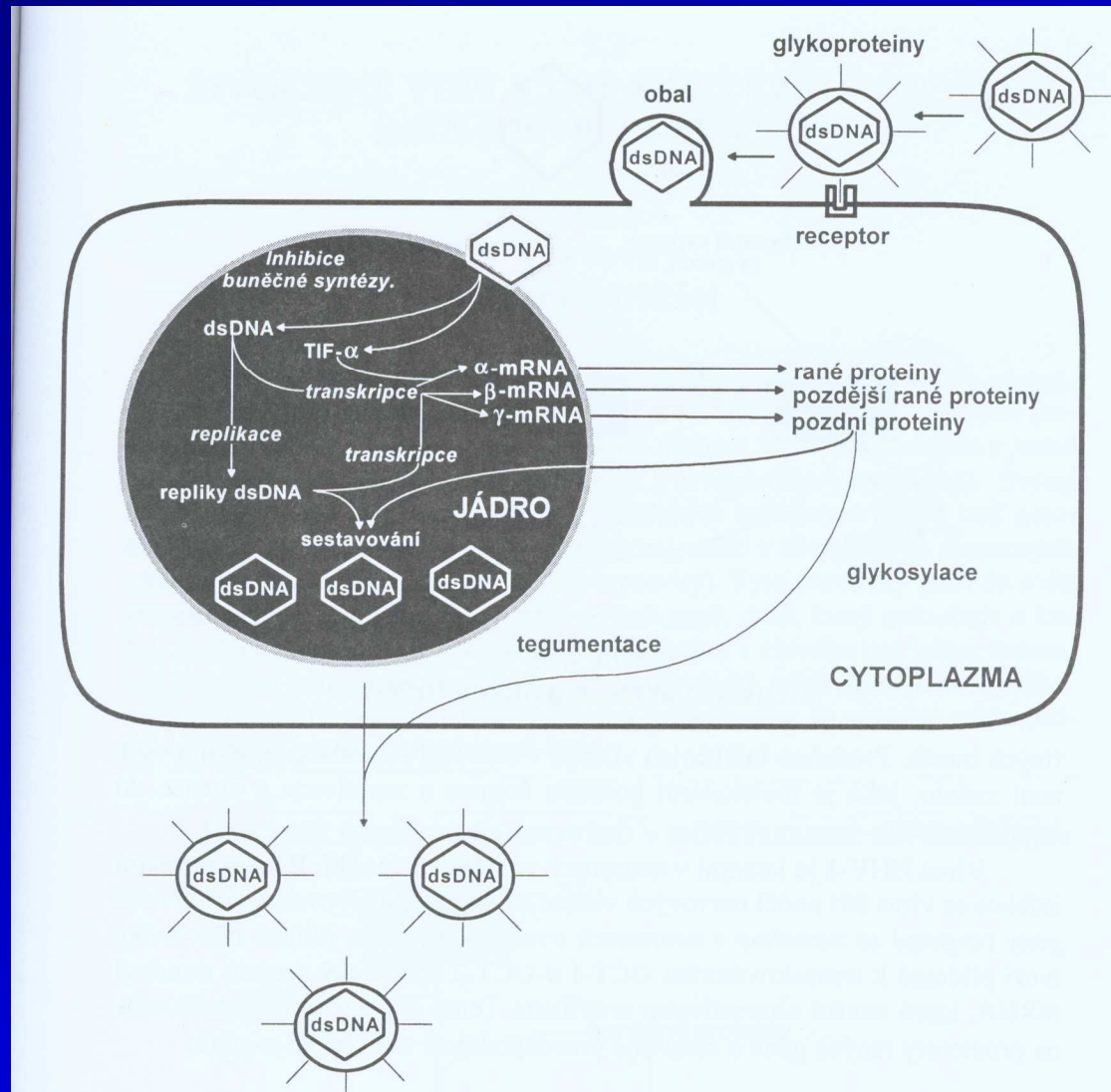
vytváří 4 izoméry genomu, které mají stejné biologické vlastnosti



Morfogeneze viru

- přichycení viru na buňku na specifické receptory plazmatické membrány
- fúze viru do buňky – obal splyne s cytopl. membránou, nukleokapsid se uvolní a proniká až do jádra buňky
- obnažená virová DNA v cirkulární formě spouští v jádře expresi genomu (transkripci, translaci a replikaci)
- transkripci katalyzuje buněčná mRNA-polymeráza II
- transkripce a replikace probíhá v jádře
- mRNA je transportovaná do cytoplazmy a tam jsou syntetizované příslušné proteiny
- některé proteiny jsou opět transportované do jádra, kde se zúčastňují na regulaci transkripce a replikace genomu a na maturaci nukleokapsidu
- obsahuje tři typy genů a jim odpovídající proteiny α -geny velmi ranné, β -geny ranné, γ -geny pozdní
- nukleokapsid při přechodu z jádra do cytoplazmy přes membránu získá tegument a obal

Schéma exprese herpesvirů



Patogeneze

- rozmnožuje se v různých druzích epitelových buněk
- buňky jsou typicky zvětšené (cytomegalie)
- obsahují typické inklúzie
- šíří se blízkým kontaktem, slinami, močí, sekrety pohlavních orgánů, slzami, krví
- přenáší se z matky na plod nebo na novorozence
- vyvolává cytomegalickou chorobu u novorozenců, může vyvolat mentální retardaci, nebo smrt novorozence nebo plodu
- způsobuje chronické poškození jater, sleziny, mozku, oka, lymfocytózu, je velmi nebezpečný pro lidi s imunosupresí
- kromě produktivní infekce často přechází do latentní formy infekce

Mechanismus transformace buňky

Transformaci buňky může navodit:

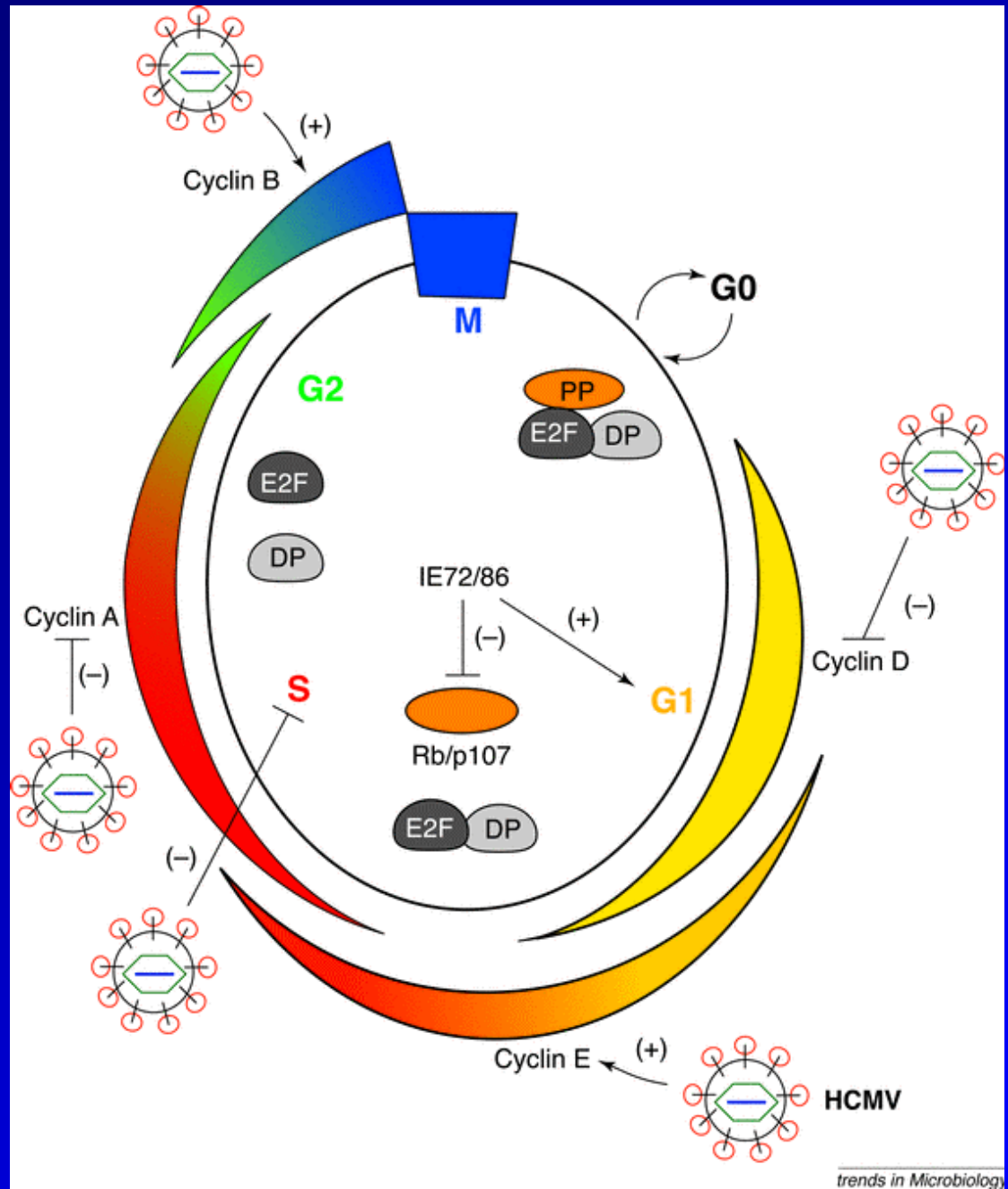
kompletní virus

genomová DNA

specifický fragment genomu

jen transformační gen (geny)

- HCMV zvyšuje hladinu některých regulátorů buněčného cyklu
- proteiny HCMV IE72 a IE86 se váží na nukleotidové sekvence promotora cyklinuE, a aktivují jeho expresi
- vyvolávají mutace v buněčných genech p53
- v genomech HCMV byli identifikované tři oblasti mtrI, mtrII a mtrIII (morfologicky transformující oblasti) z nich fragment mtrII – je považovaný za onkogenní pro buňky



Papilomaviry lidí (HPV)

Patří do čeledě Papovavirů

rod Papilomaviry

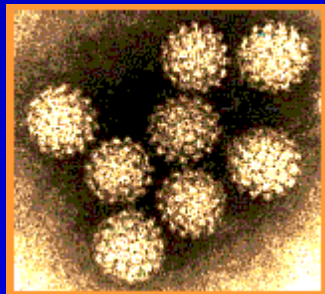
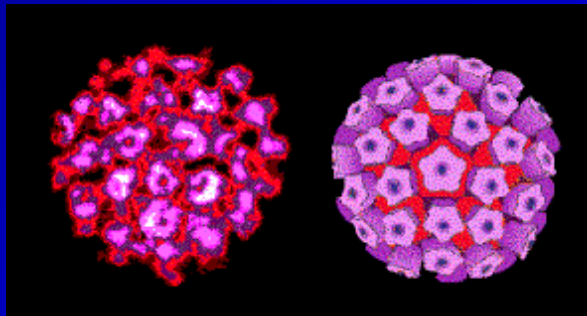
známých je asi 70 typů

Morfologie:

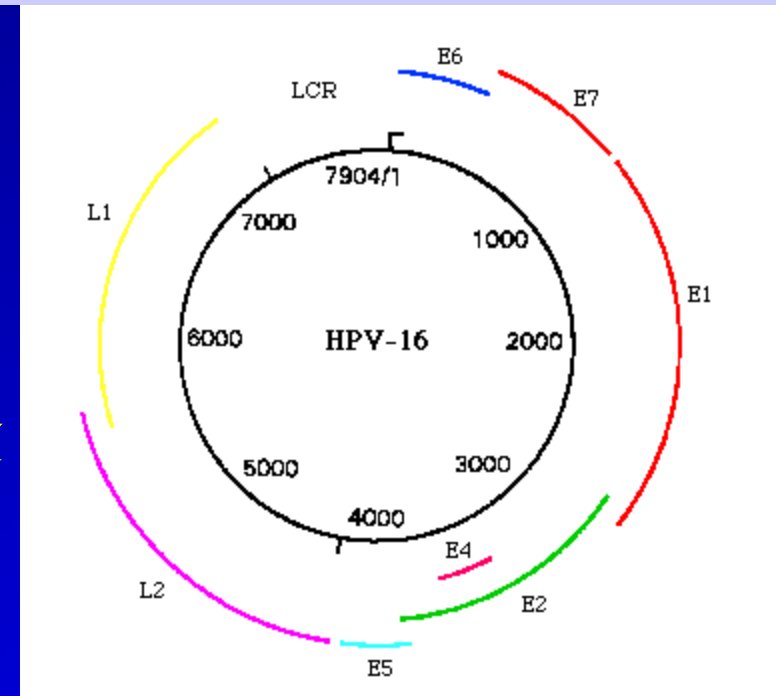
malý neobalený virus 52-55nm

kapsid – ikosaedrální symetrie, 72 kapsomér

složený je ze dvou kapsidových L1 a L2



- genom – cirkulární dsDNA – 8 kbp
- oblast LCR – reguluje zahájení exprese genů
- po infekci, je důležitá pro vznik latence
- oblast L1 a L2 - kóduje pozdní strukturální proteiny (kapsid)
- oblast E1 až E7 – kóduje časné nestrukturální regulační proteiny, regulačné
- při produktivní infekci se transkribují L i E geny
- při neproduktivní infekci se transkribují pouze E geny



Patogeneze

- Papilomaviry jsou druhově, ale i tkáňově velmi specifické viry
- (HPV napadá jen buňky epitelu - keratinocyty)
- množí se v kůži, nebo sliznicích genitálií, ústní dutiny a na spojivce
- HPV se přenáší přímým stykem bez porušení kůže nebo sexuálním stykem
- vakcína proti HPV nebyla vyvinuta
- **onemocnění, které způsobují HPV:**
 - různé benigní nebo maligní hyperplazie kůže a sliznic
 - chodidlové bradavice
 - obyčejné bradavice
 - ploché bradavice
 - laryngeální papilomy
 - genitální papilomy a kondylomy
 - nádorová onemocnění

Podíl papilloma viru na vzniku nádoru děložního čípku

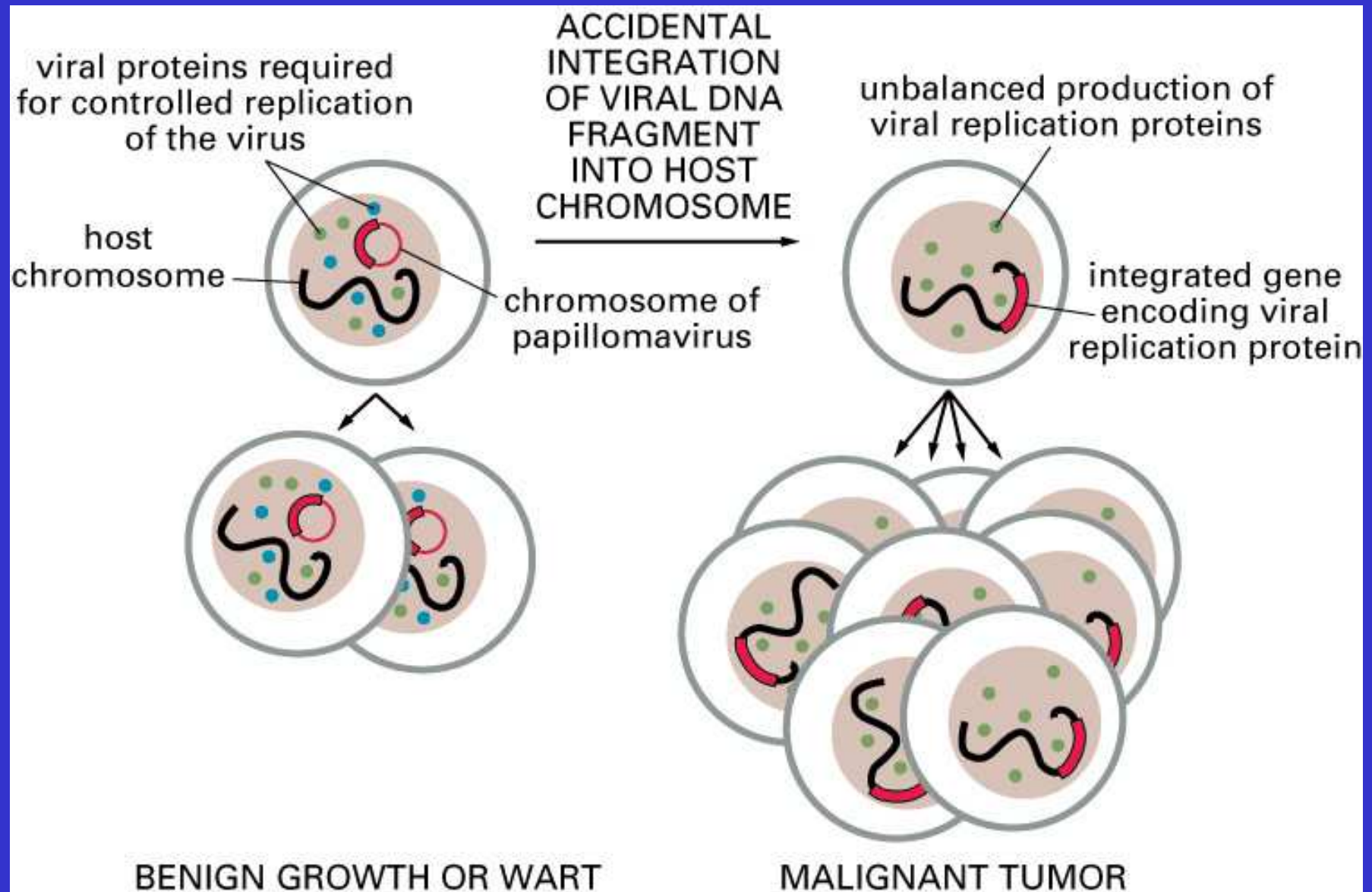
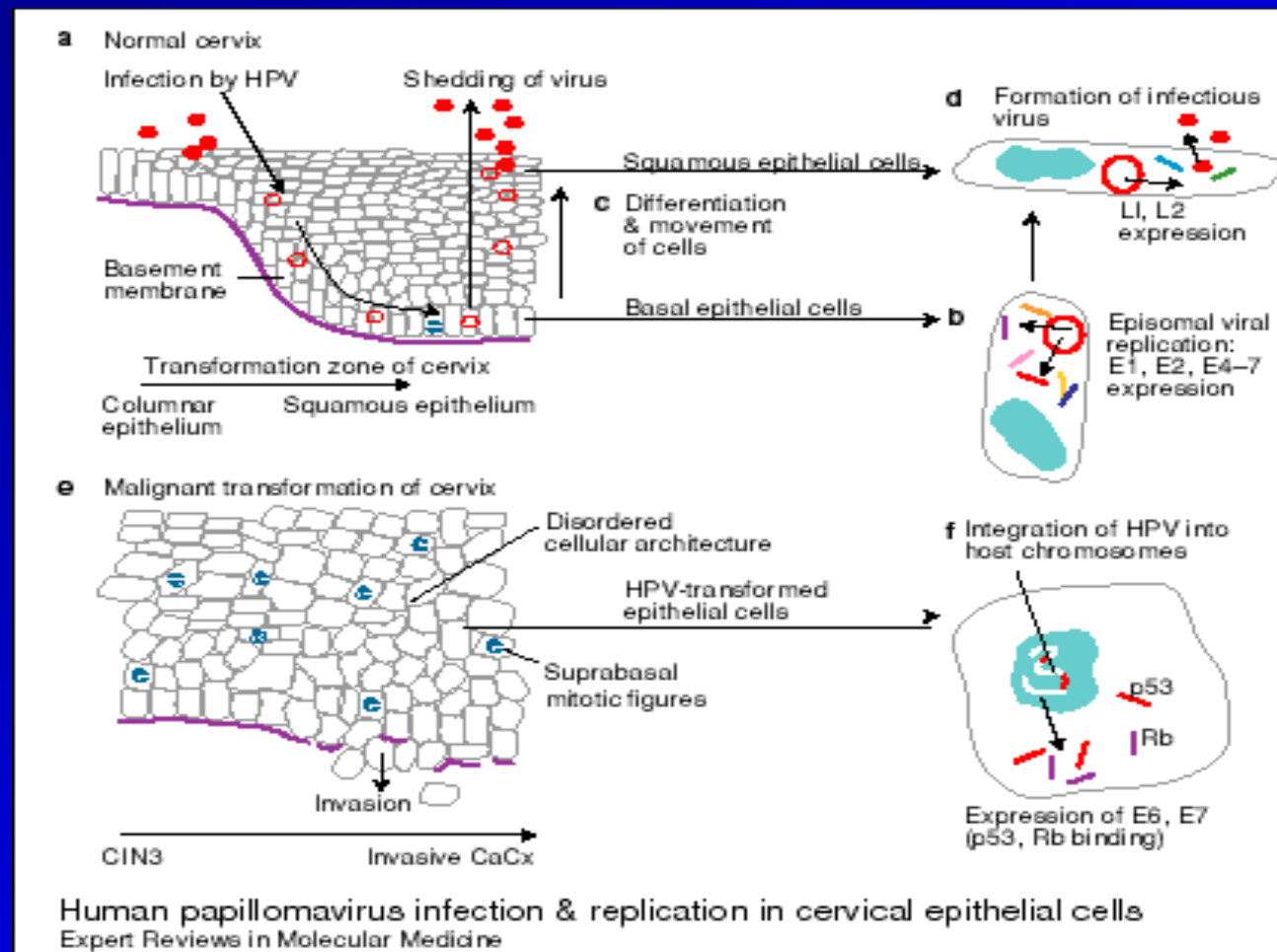


Figure 23–34. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Průběh infekce HPV v epitelu krčku dělohy

- virus penetruje přes poškozené místo na kůži, nebo sliznici a infikuje bazální vrstvu buněk. Tam probíhá latentní infekce, nemnoží se, vznikají transformační proteiny (indukují tvorbu papilomů)
- infekční virus se množí jen v nejpovrchovějších vrstvách epitelu



Mechanizmy karcinogeneze HPV

- genom HPV integruje do různých míst hostitelského chromozomu
- tato integrace vede k poruše exprese virového genu kódujícího protein E2
- protein E2 působí jako represor transkripce genů pro E6 a E7 proteiny
- E6 a E7 proteiny jsou považované za onkoproteiny
- E6 se váže na protein p53 a inhibuje jeho aktivitu
- p53 nezastaví buněčný cyklus, buňka se může neomezeně dělit
- E7 se váže na nefosforylovaný protein Rb, a tím blokuje jeho vazbu na transkripční faktor E2F. Ten může aktivovat transkripci genů, jejichž produkty jsou nutné pro vstup buňky do G₁ fáze

Rakovinové onemocnění způsobené infekcí HPV

Nádor	Typ HPV	Podporný faktor
Rakovina kože	HPV-5, 8	UV, genetická predispozícia
Genitálny trakt	HPV-16,18,31,32	??
Respiračný trakt	HPV-6,11	X-žiarenie