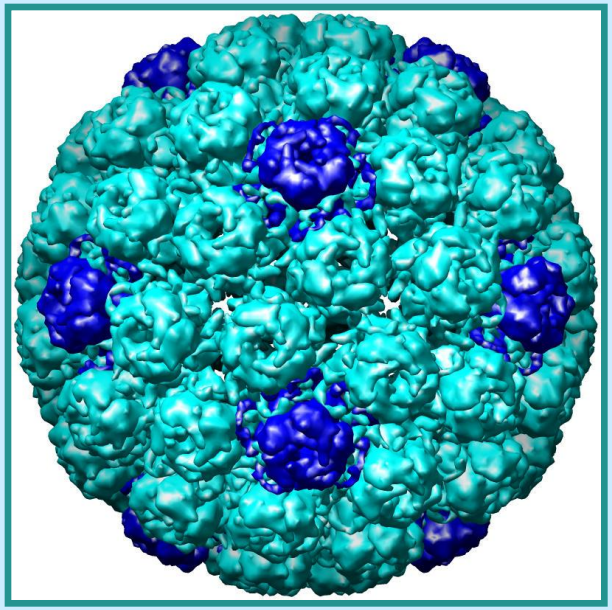
Лекція №6

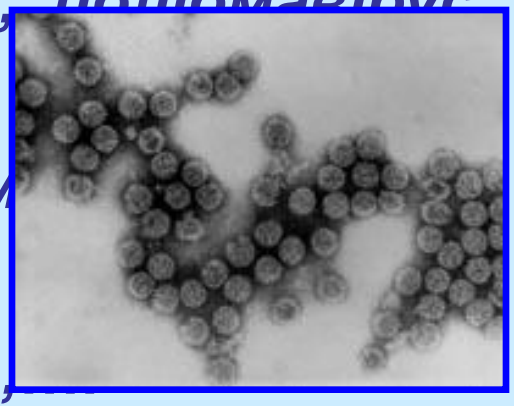
Загальна характеристика родини POLYOMAVIRIDAE



1. Морфологія вірусних часток
2. Фізико-хімічні властивості
3. Реплікація вірусу
4. Патогенез
5. Особливості епідемічного процесу
6. Діагностика
7. Лікування

Родина *POLYOMAVIRIDAE*

Рід *Alfapolyomavirus* – *HPV-5,8,9,12,13, поліомавірус миші 1,…*

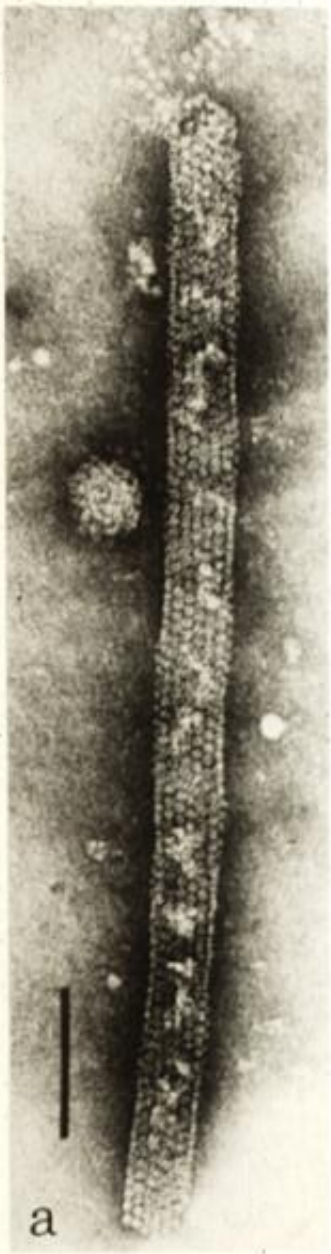


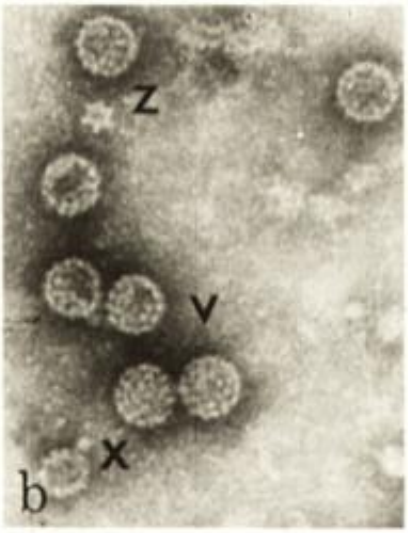
Рід B*etapolyomavirus* – *HPV-1-4, поліом* *резус (*SV40), ….

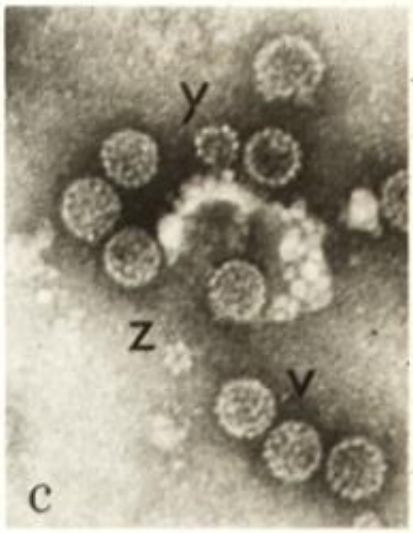
Рід *Gammapolyomavirus* – *HPV-6,7,10,11,*

Рід Delta*polyomavirus* - поліомавірус папуг 1, поломавірус сірої гуски, …

відносять поліомавірус зеленої мавпи, ВК

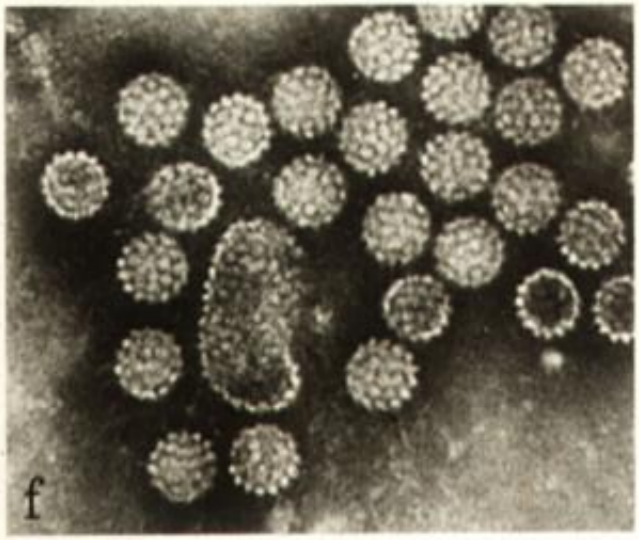

a

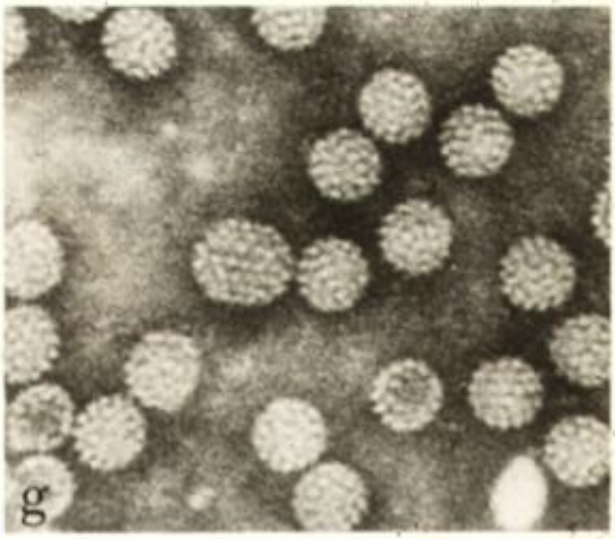

z
v
x
b

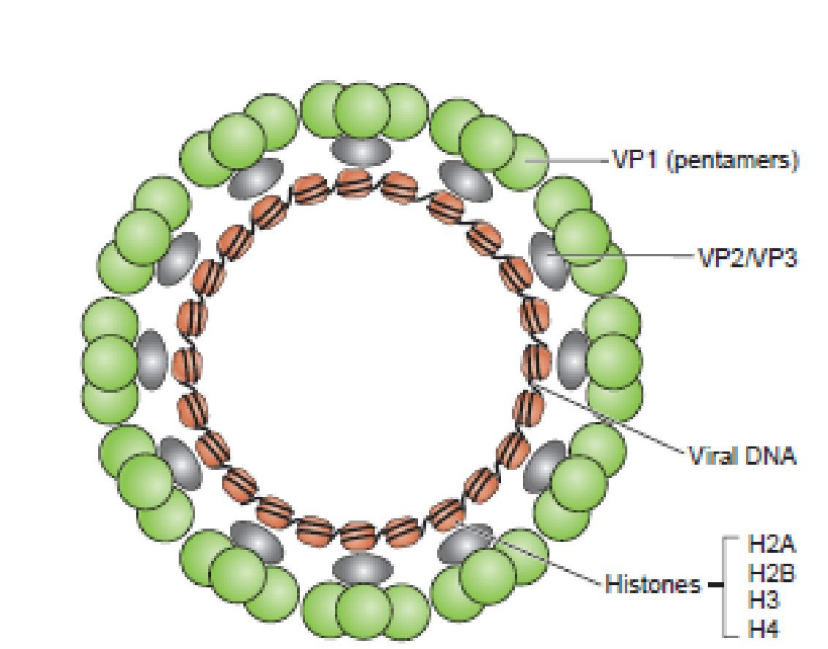

y
z
v
c

d

e


f


g

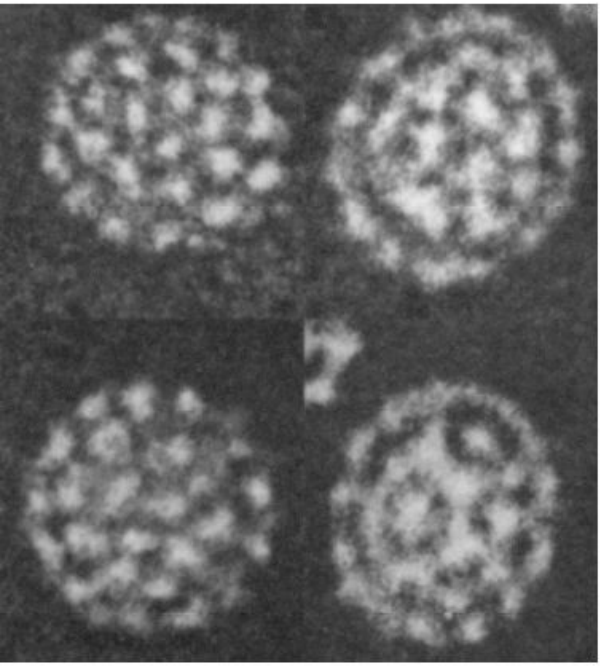


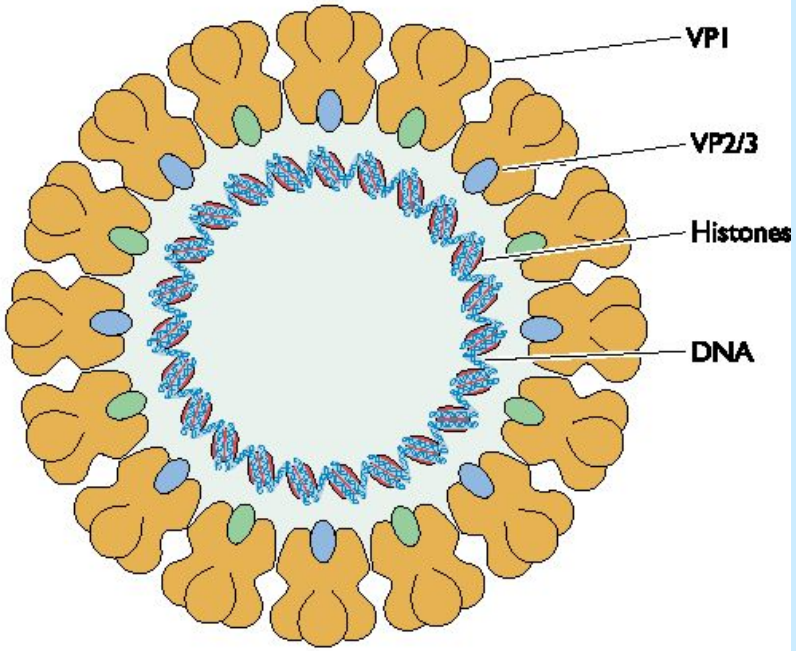
Морфологія

Капсид – ікосаедричний, 40-45 нм у діаметрі. Без зовнішньої ліпідовмісної оболонки.

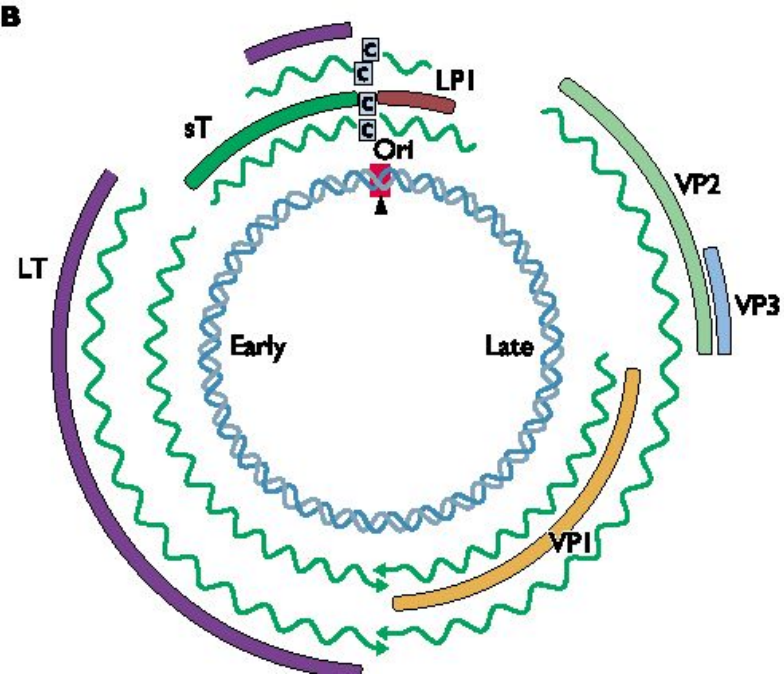
Віріон складається із 72 капсомерів (VP1), які асиметрично розташовані.

A





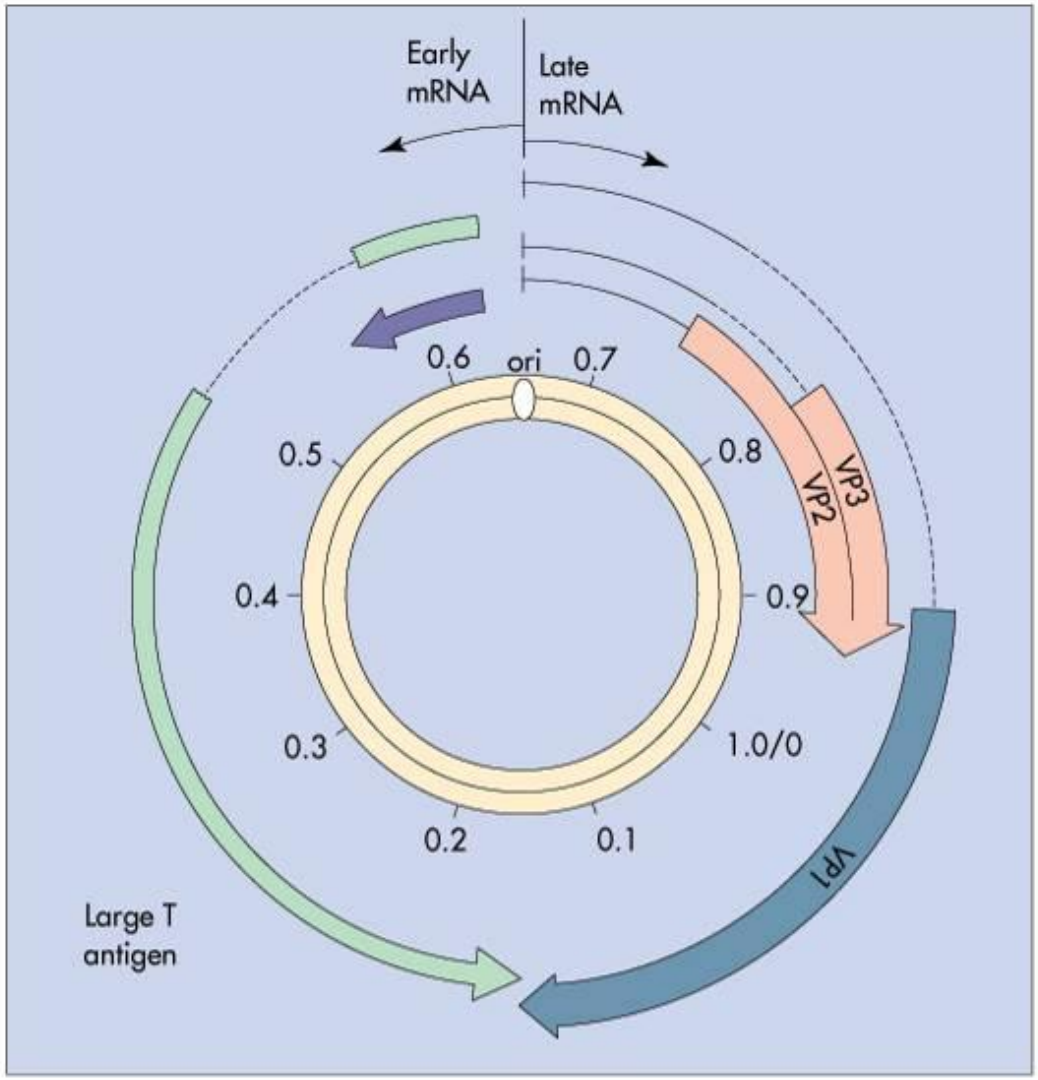
B



A. Віріон SV40, T=7, побудований з 3-х білків. Кільцева 2л ДНК всередині знаходиться у комплексі із пістонами.

B. Організація геному компактна, транскрипція двонаправлена з ділянки ORI. Транскрипція ранніх Т-антигенів починається з матричних ланцюгів, а пізніх (структурних) – з нановосинтезованих.

Структура геному

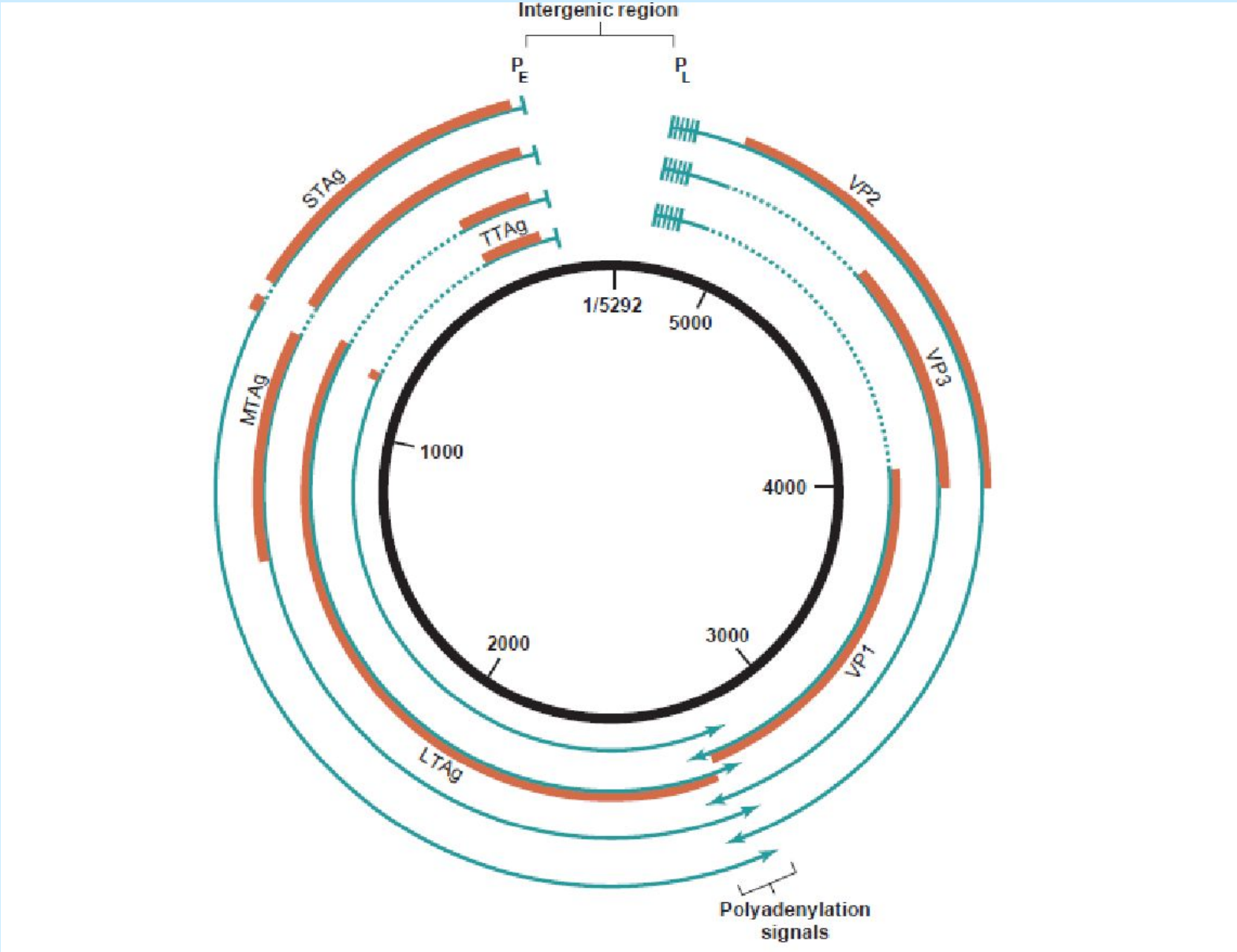


Геном - 1 молекула циркулярної 2-л ДНК.

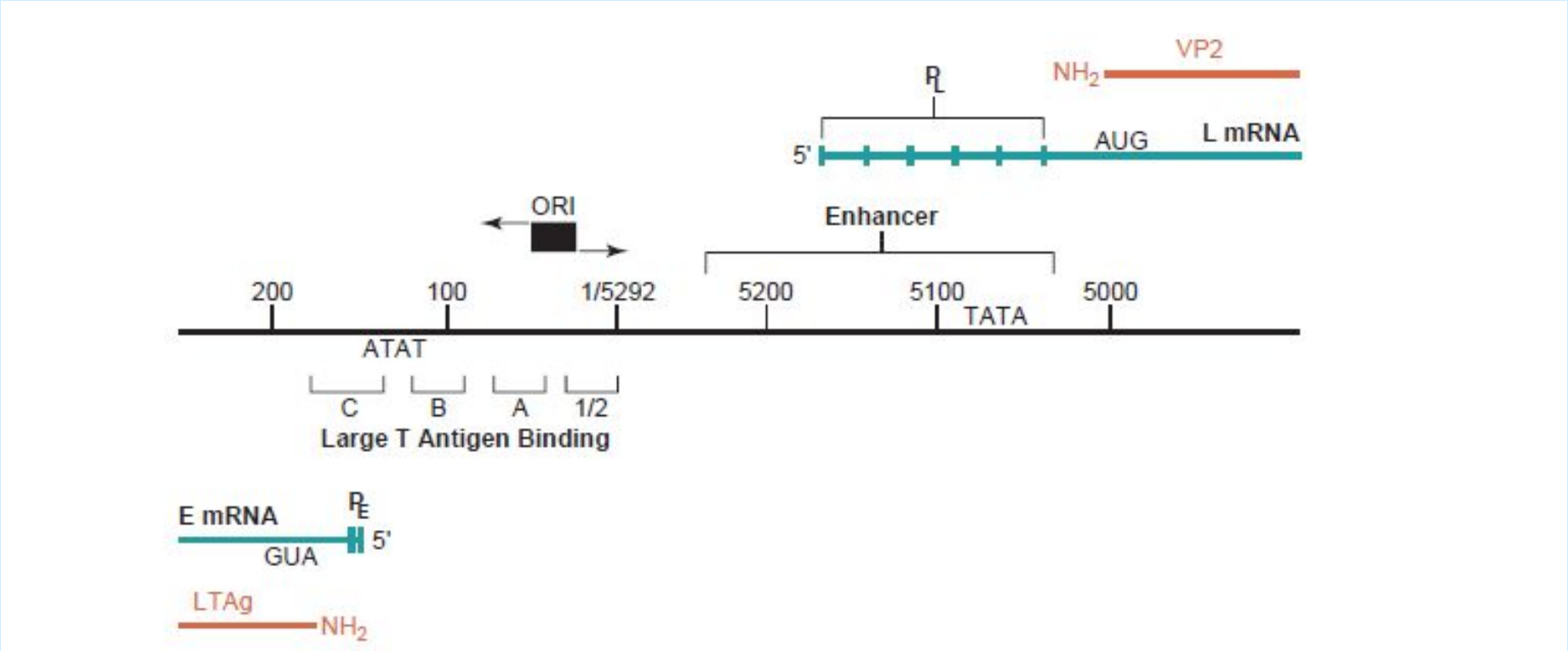
Вірусний геном може бути розділений на 3 регіони. Один з яких кодує два функціональні білки: великий та малий Т–антигени, другий кодує три структурних білки, а третій, некодуючий, контролює транскрипцію вірусних генів.

Розмір геном приблизно однаковий для усіх представників родини, близько 5 тис. пар нт. (SV 4-штам 776 – 5243 kbp, ВК – 5153 kbp). ДНК займає приблизно 12-13 % загальної маси віріону.

Співвідношення G+C дорівнює 40-50%.

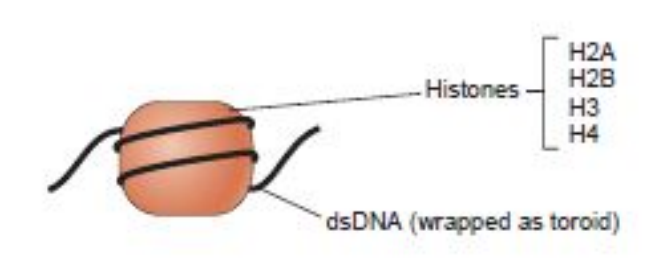


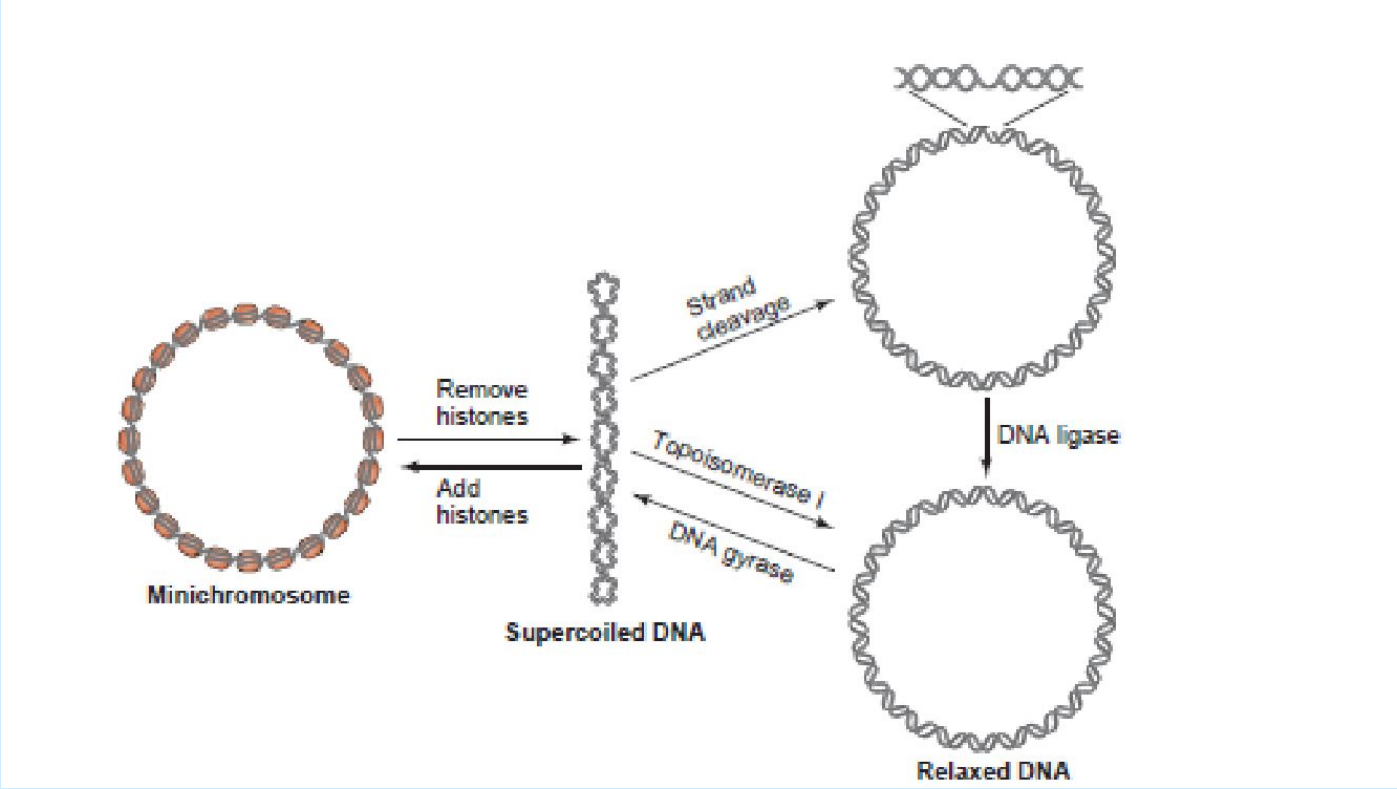
Геном поліомавірусу миші



Внутрішній контролюючий регіон поліомавірусу миші

Геном





диться

Функції великого Т антигену (**SV40**) *in vitro* та *in vivo*

- Зв’язування з ДНК (специфічно з ділянкою початку реплікації);
- Зв’язування з ДНК (з будь-якими ділянками);
- Зв’язування з p53;
- Активація пізніх стадій репродукціїї SV40;
- Інгибція ранньої транскрипції SV40;
- Індукція синтезу хазяйської ДНК в клітинах, що знаходяться в фазі G;
- Діє як складова частина трансплацентарного пухлиноспецифічного антигену SV40;
- Ініціація реплікації вірусної ДНК;
- Встановлення та підтримання трансформації, що викликається SV40;
- Стимуляція репродукції аденовірусів людини в культурі клітин мавп;
- Супутні ферментативні активності:

- АТФазна;
- Кіназна (власна функція Т?);
- Аденілювання Т-антигену (власна функція Т?).

Онкогенні властивості SV-40 та поліомавіруси миші

	SV40 virus	Mouse polyomavirus
Natural host	Monkey (Asiatic macaques)	Mouse
Tumors in natural host	Rare	Rare salivary gland tumors
Tumors in experimental hosts	Tumors in newborn hamsters	Tumors in newborn mice
Infection of permissive cultured cells	Productive lytic infection of monkey cells	Productive lytic infection of mouse cells
Infection of non-permissive cultured cells	Transient or permanent transformation	Transient or permanent transformation

Білки

- **Ранні**
- T, mT (у поліомавірусів миші та хомяка), t,

- **Пізні**
- VP1- головний компонент, що формує гексони;
- VP2, VP3 – формують пентони;
- LP1 – агнопротеїн, підсилює збірку капсиду вірусу, він не є структурним компонентом зрілого віріону.

- Також для деяких вірусів показана наявність додаткових альтернативних білків та існування ймовірних відкритих рамок зчитування (ELP, VP4).

- Ліпіди та вуглеводи у складі віріону не виявлені.

Фізико-хімічні властивості

- Маса віріонів 25 х 103 кДа. Щільність у градієнті сахарози та CsCl 1,2 та 1,34-1,35 г/см3, відповідно. SW20= 240S.
- Стійки до ефіру та нагрівання (1 год при 50оС), хоча віріони нестабільні до нагрівання (1 год при 50оС)у присутності 1 М MgCl2.

Адсорбція

Вірус приєднується до поверхні чутливої клітини шляхом з’єднання VP1 з клітинним рецептором. Поліомавіруси (окрім SV 40, який для проникнення використовує MHC I) для адсорбції зв'язуються із залишками сіалової кислоти.

Цикл репродукції SV- 40

1. Проникнення віріону та звільнення серцевини (рецепторний ендоцитоз).
2. Проникнення комплексу ДНК/нуклеосома у ядро.

3-5. Синтез та альтернативний сплайсинг ранніх (Т) транскриптів; синтез білків.

6-7. Імпорт LT назад до ядра, де за його допомогою та при участі кл. ферментів відбувається ініціація синтезу та транскрипція пізніх генів.

8-12. Синтез мРНК пізніх генів, сплайсинг, експорт, трансляція та імпорт структурних білків до ядра для формування віріонів та звільнення (невідомий механізм, можливо за рахунок злиття мембран везикул та плазматичною мембраною).

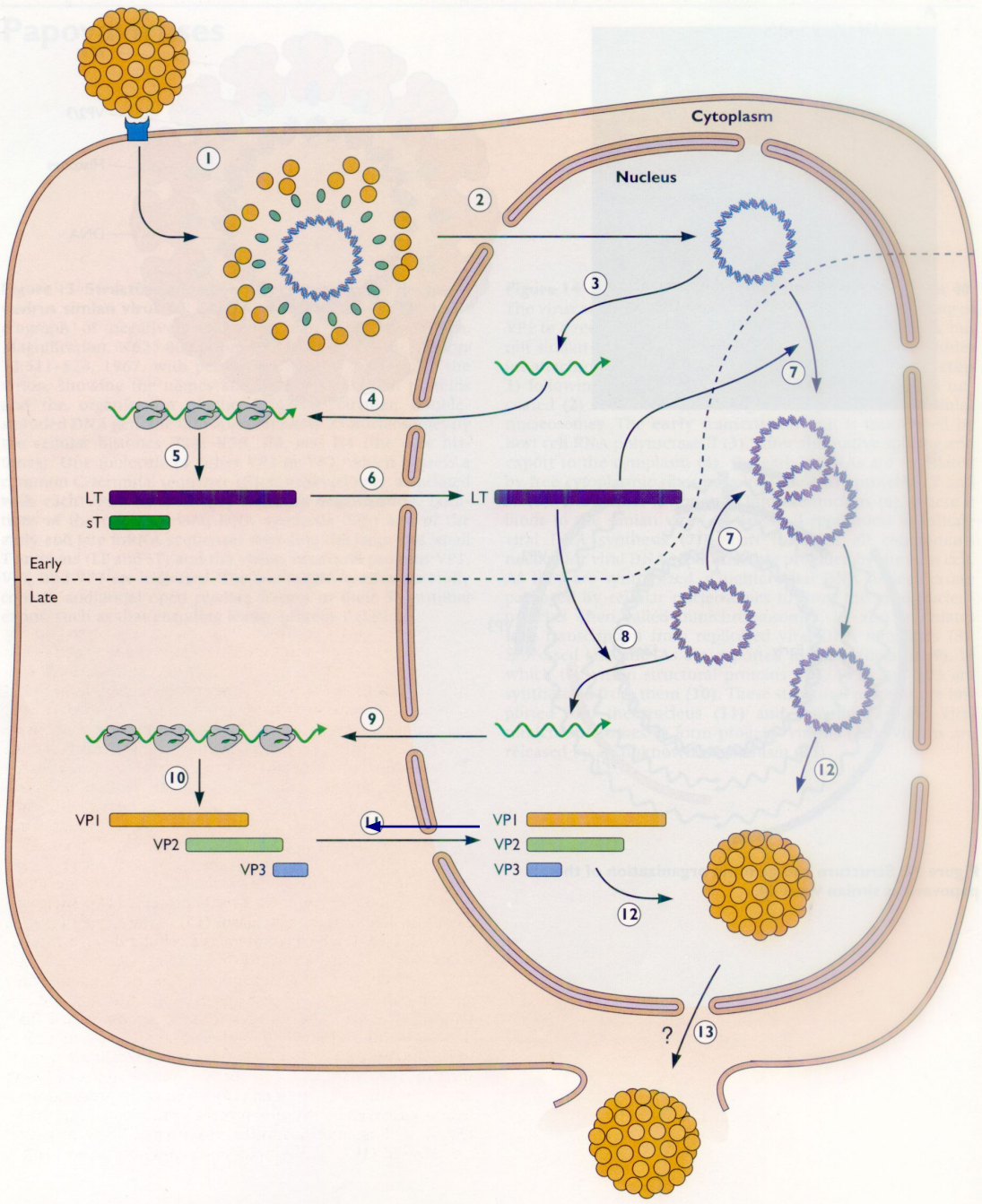
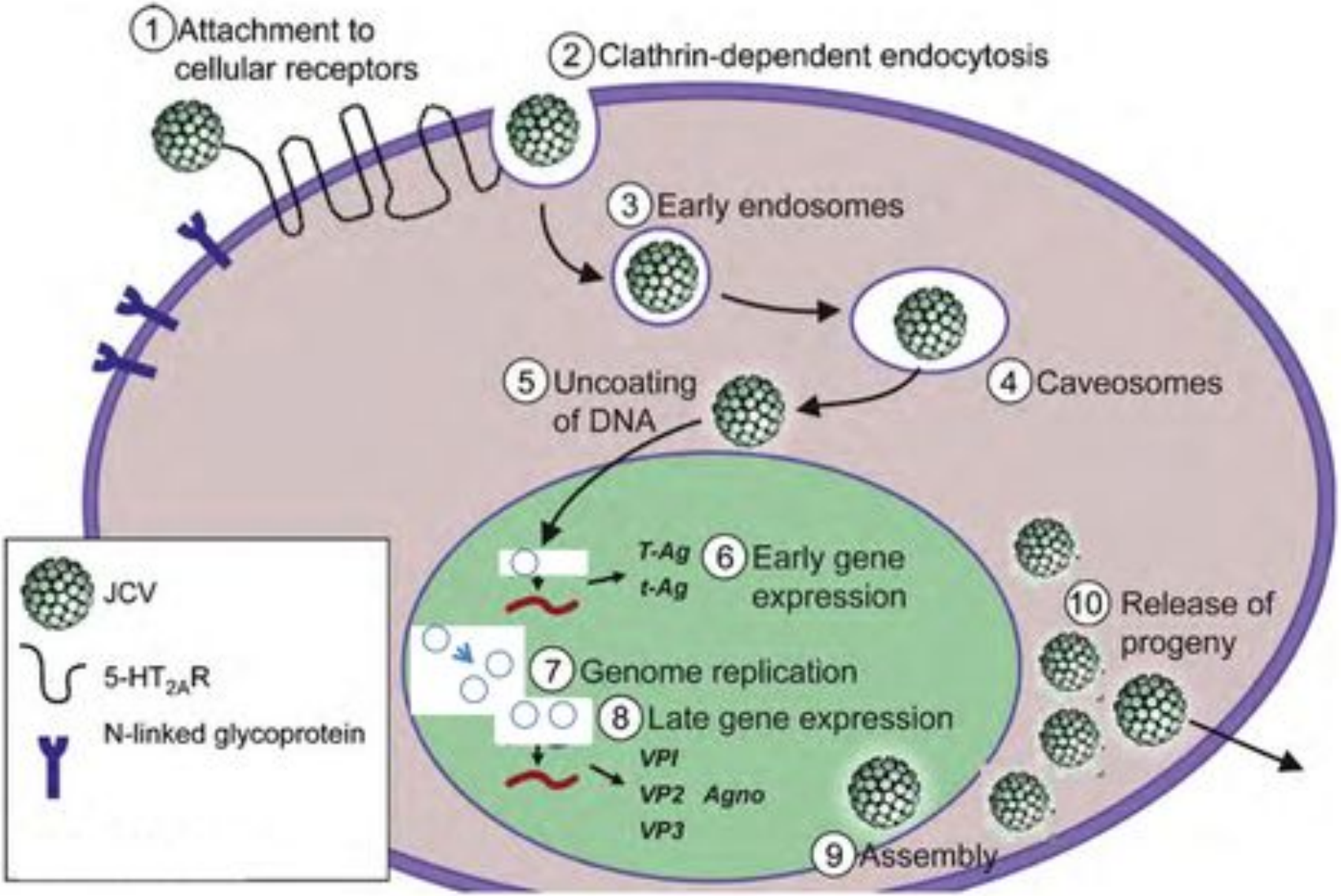


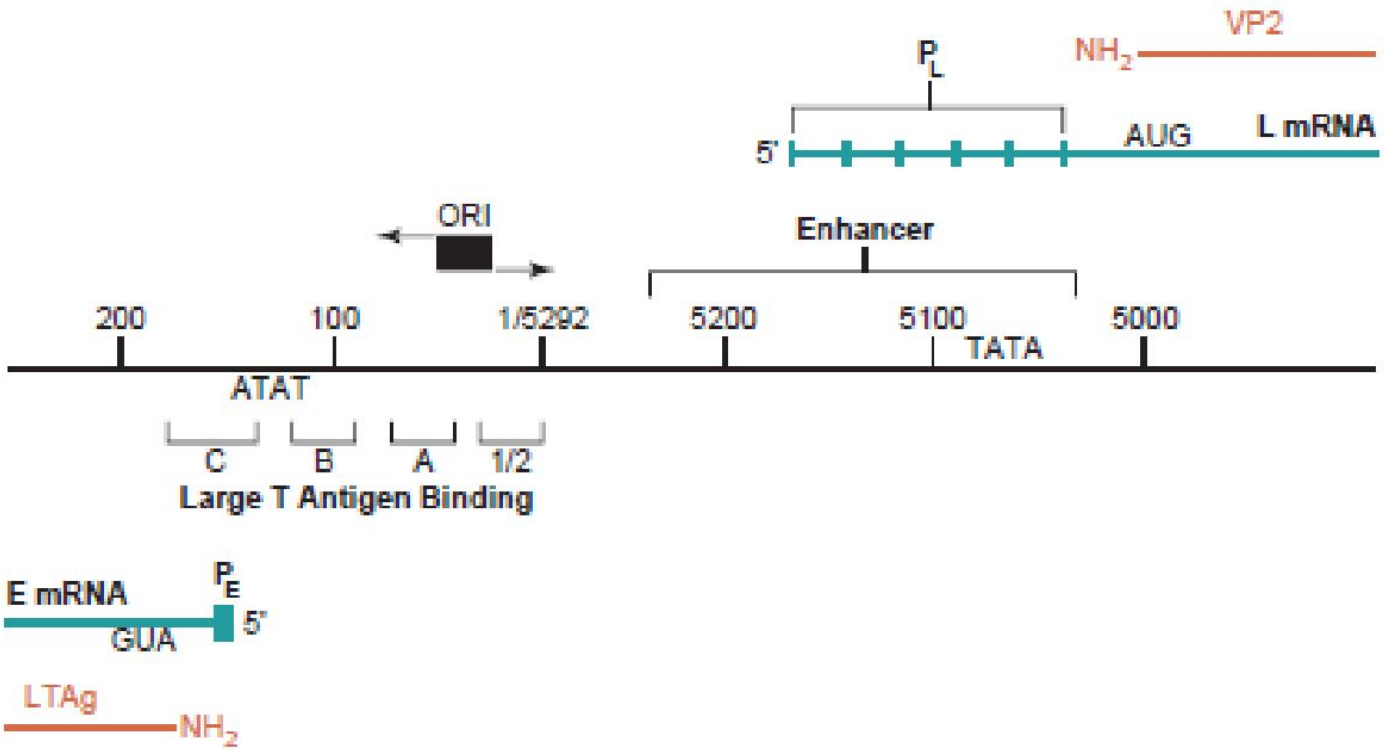
Figure 14 Single-cell reproductive cycle of simian virus 40.



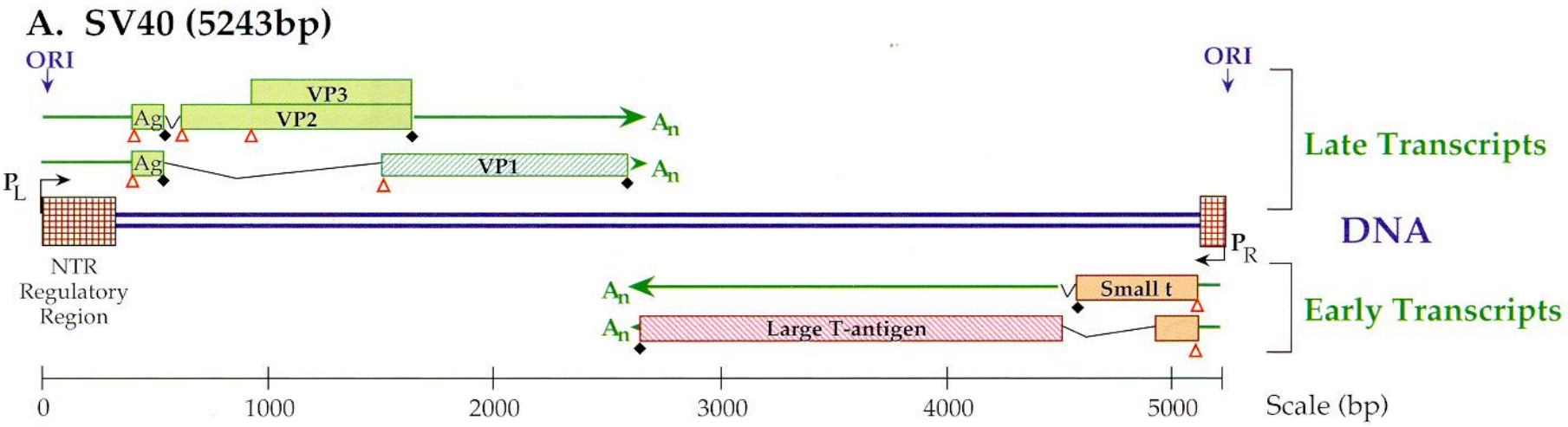
M.S. Maginnis, W.J. Atwood / Seminars in Cancer Biology 19 (2009) 261–269 modified ALD 2012 OhioLink

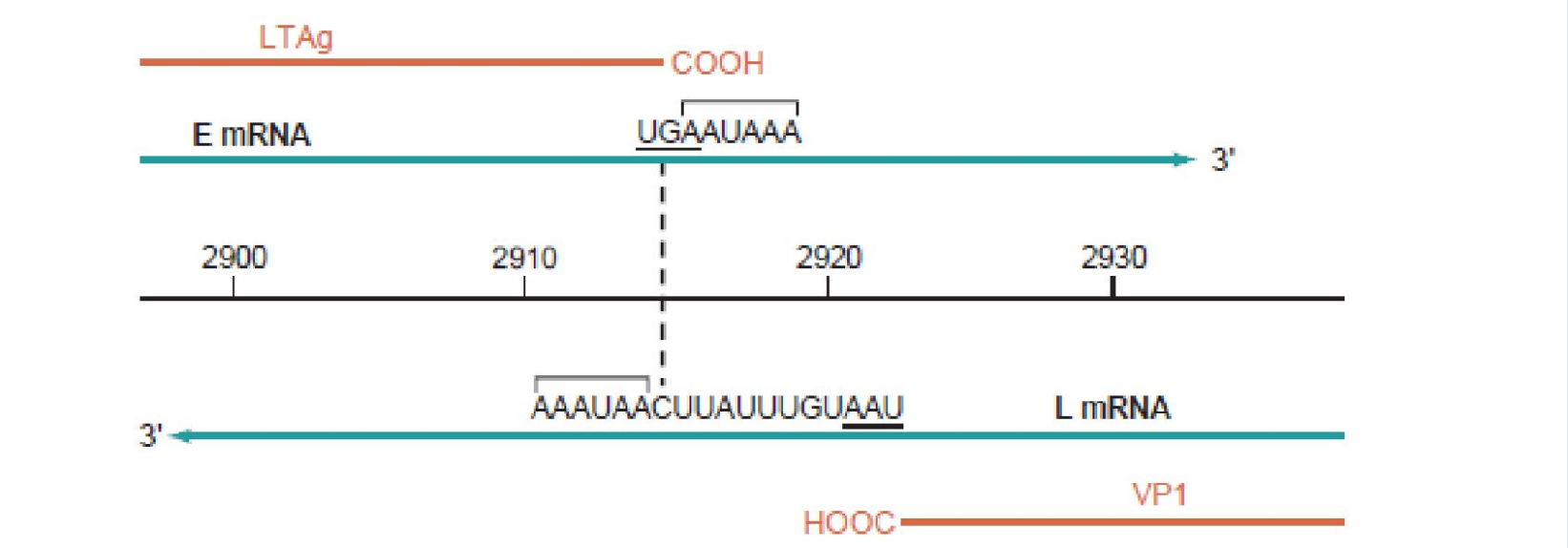
Транскрипція SV40

- “Використовує” клітинну РНК-полімеразу II.
- Ранні гени кодують Т антигени, що утворюються з мРНК, які по-різному сплайсовані.
- Пізні гени кодують VP1, VP2, VP3 та агнопротеїн (agnoprotein), які експресуються з двох мРНК, які по-різному сплайсовані.
- VP2 та VP3 утворюються з однієї мРНК, використовуючи різні старт-кодони, агнопротеїн експресується з тієї ж мРНК, що і VP1, використовуючи різні старт-кодони.


VP2
NH_2
P_L
5'
AUG
L mRNA
ORI
Enhancer
200
100
1/5292
5200
5100
5000
TATA
ATAT
C
B
A
1/2
Large T Antigen Binding
E mRNA
P_E
5'
GUA
LTAg
NH_2

SV40 virus


A. SV40 (5243bp)
ORI
ORI
VP3
VP2
Ag
Ag
VP1
A_n
A_n
P_L
P_R
NTR
Regulatory
Region
Small t
Large T-antigen
A_n
A_n
Late Transcripts
DNA
Early Transcripts
0
1000
2000
3000
4000
5000
Scale (bp)

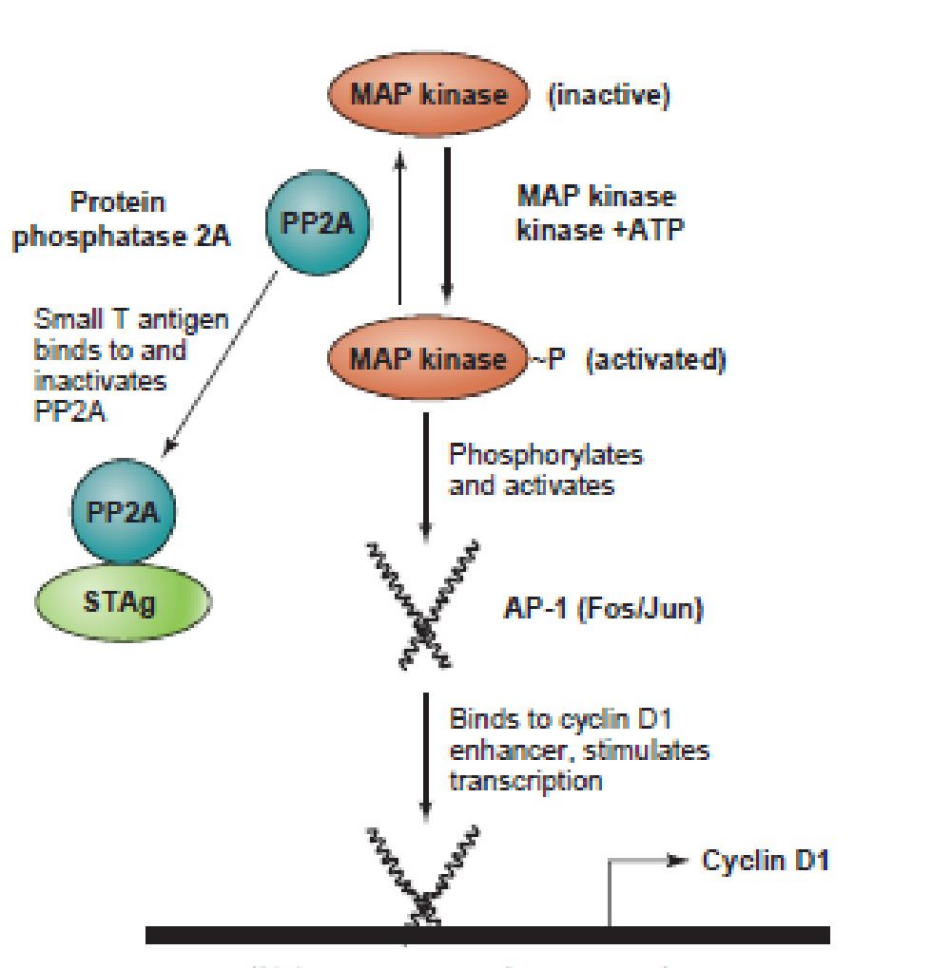


Сигнали поліаденілювання та перекриття 3-кінця

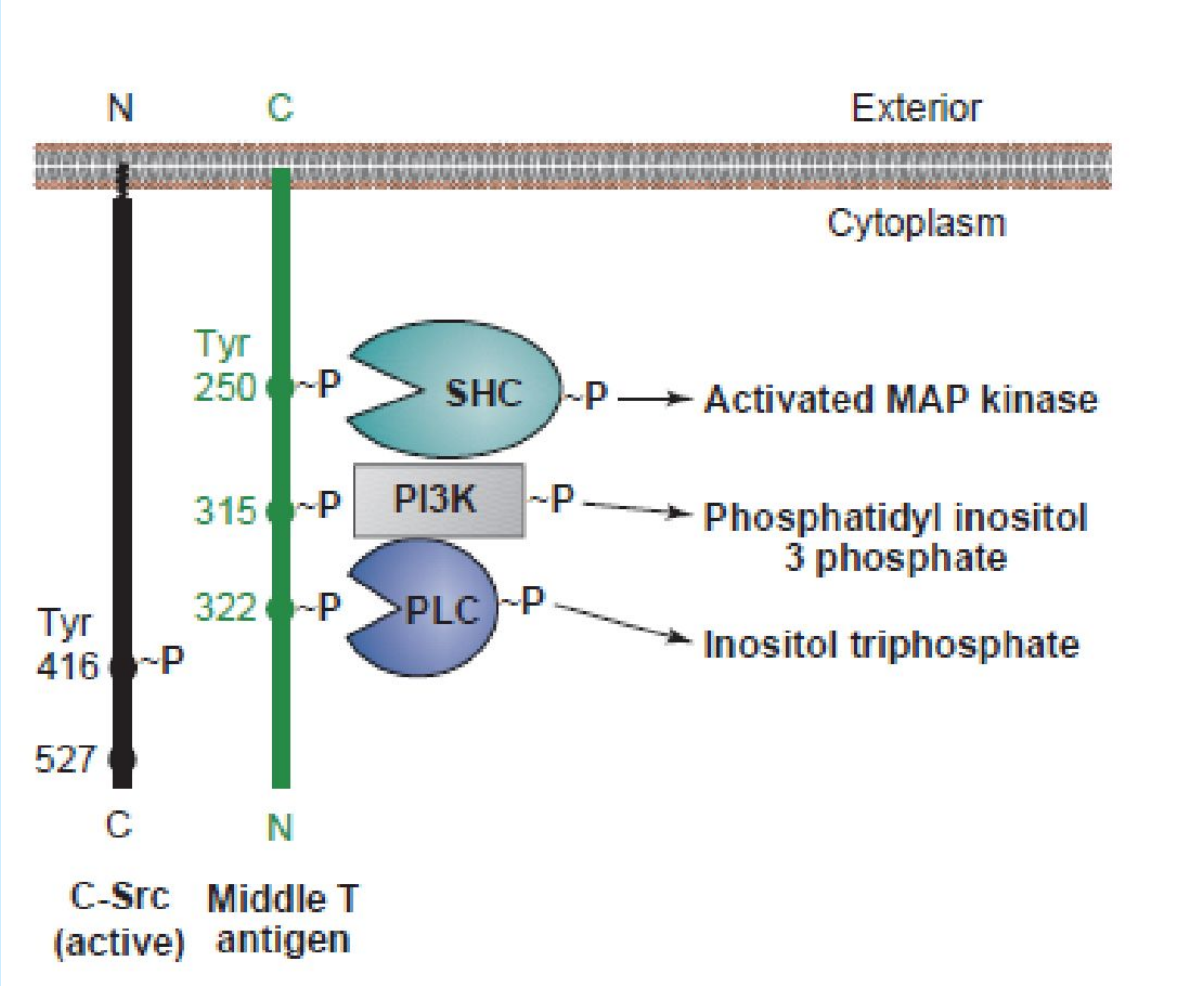
Реплікація

- Починається через 12-15 годин після ураження клітини.
- Напрямок – двонаправлений з ділянки *origin*.
- Великий Т антиген - єдиний білок залучений у реплікацію ДНК.
- Інші білки, задіяні у реплікацію – клітинні.
- Пізніше у реплікативному циклі виявляються циркулярні молекули – реплікація відбувається за механізмом “ колеса, що котиться ”.

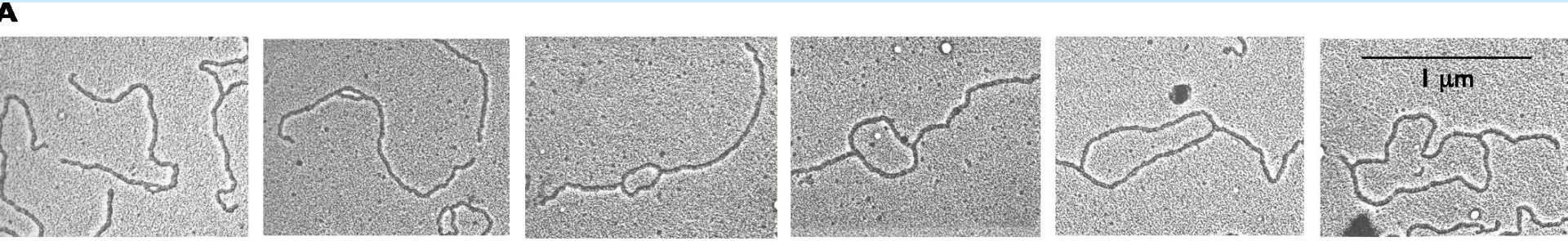
Малий Т антиген

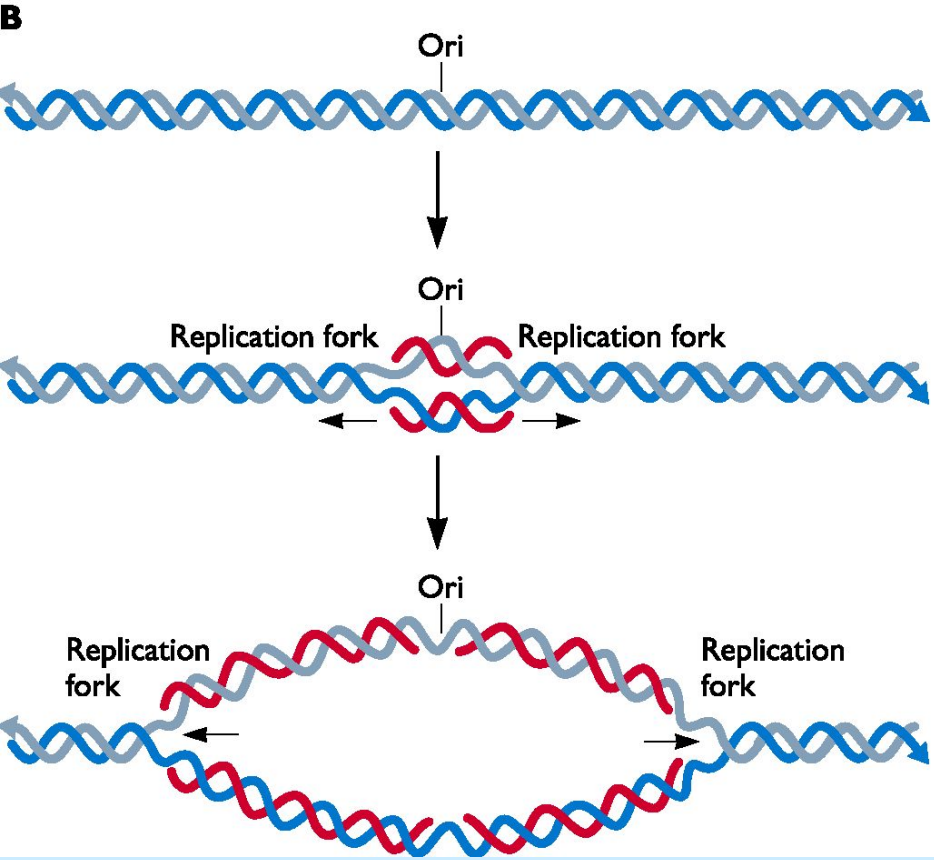


- Малий Т стимулює мар-кіназну



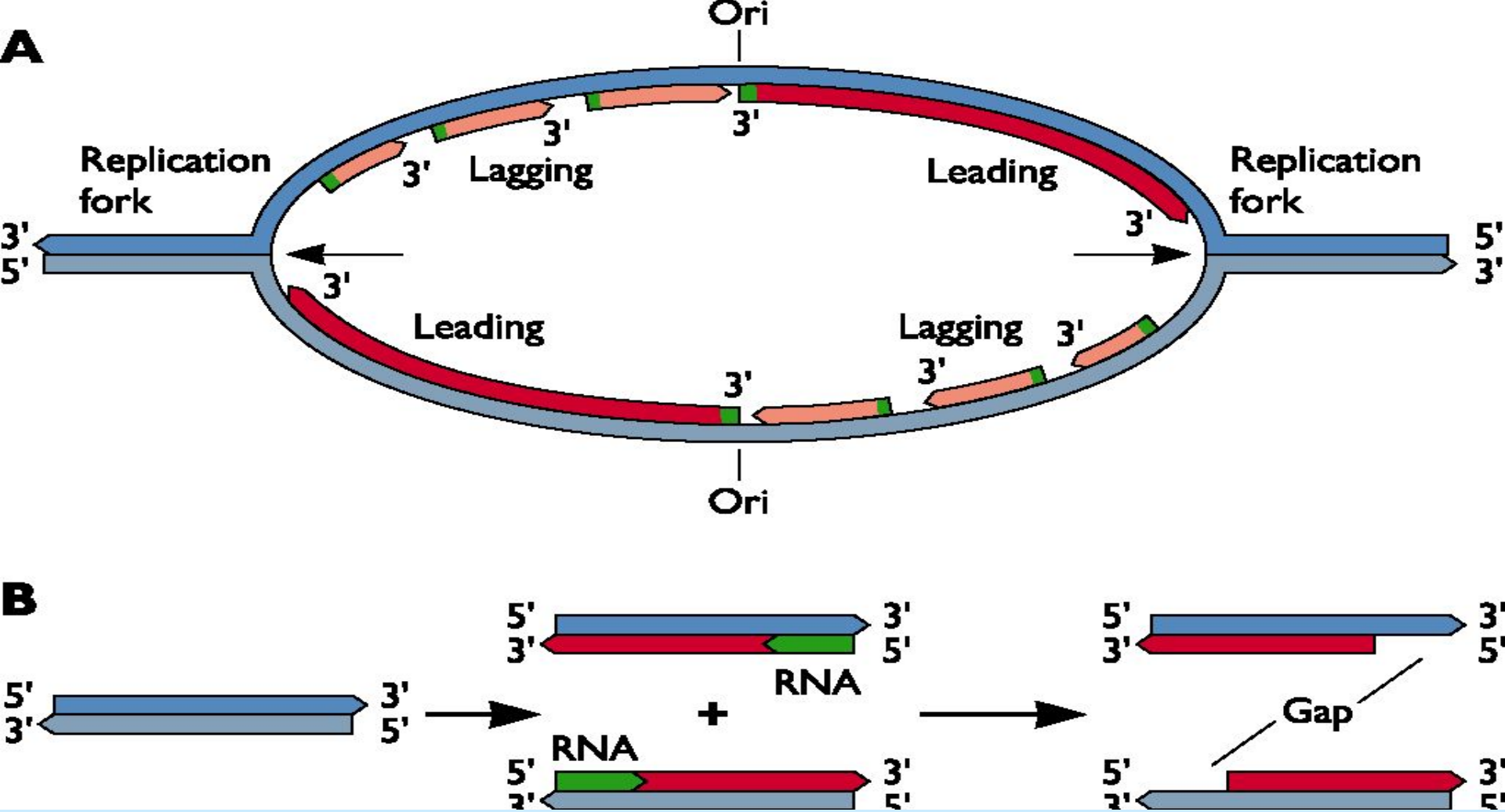
- Середній Т-антиген приєднується до c-Src та активує шлях, що стимулює клітинний метаболізм та клітинний поділ





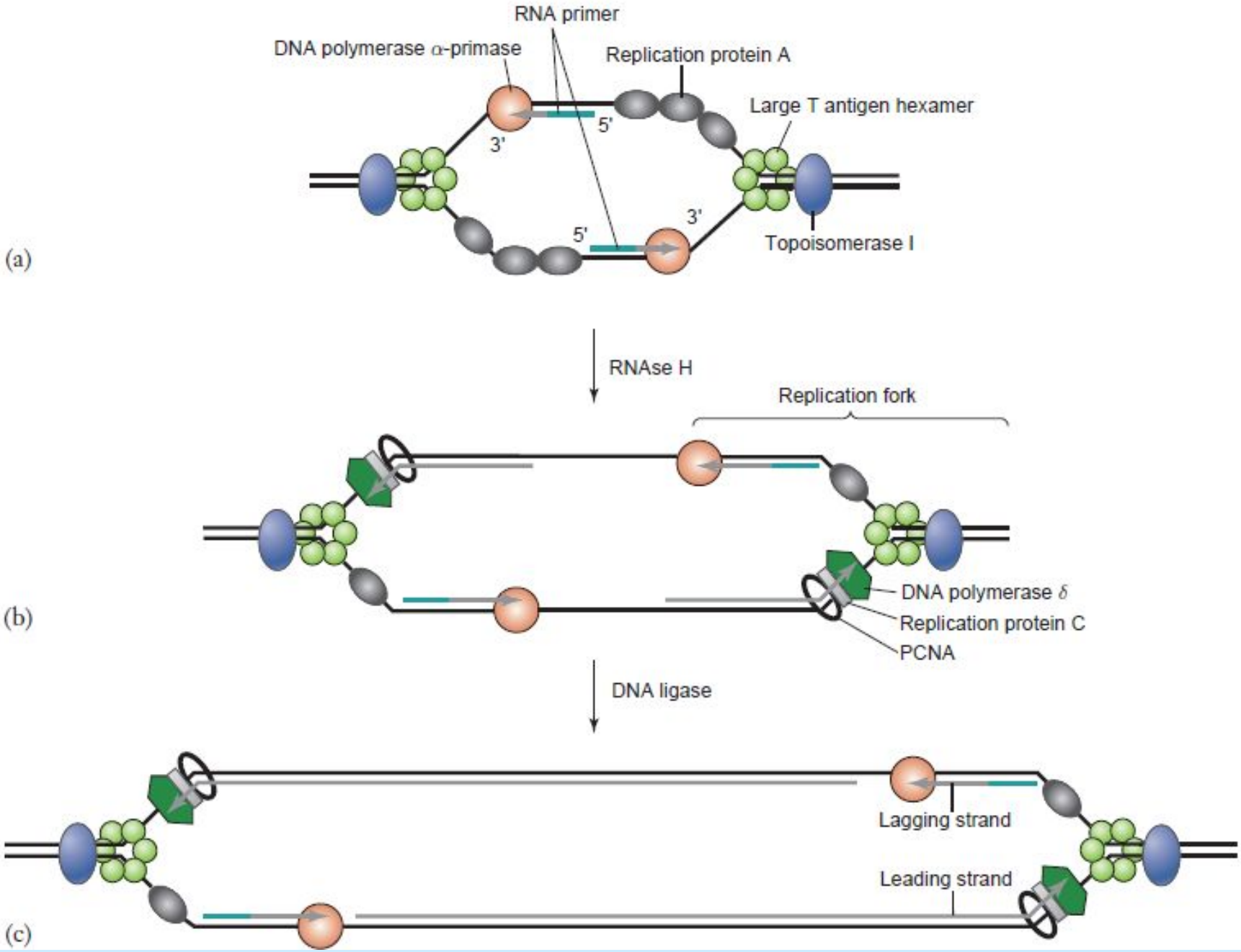
A. ЕМ реплікації ДНК SV40, двонаправлена реплікація

B. Схематичне зображення двонаправленої реплікації з єдиного сайту реплікації origin (Ori).



Напівконсерватиний синтез ДНК SV40:

A. Continuous DNA synthesis from Ori, RNA primed (primase)5’>3’
B. Discontinuous DNA synthesis toward Ori, also RNA primed, also 5’>3” (Fig 9.2, Principles of Virology)


RNA primer
DNA polymerase α-primase
Replication protein A
Large T antigen hexamer
5'
3'
3'
5'
Topoisomerase I
(a)
RNAse H
Replication fork
DNA polymerase δ
Replication protein C
PCNA
(b)
DNA ligase
Lagging strand
Leading strand
(c)

Реплікація SV40

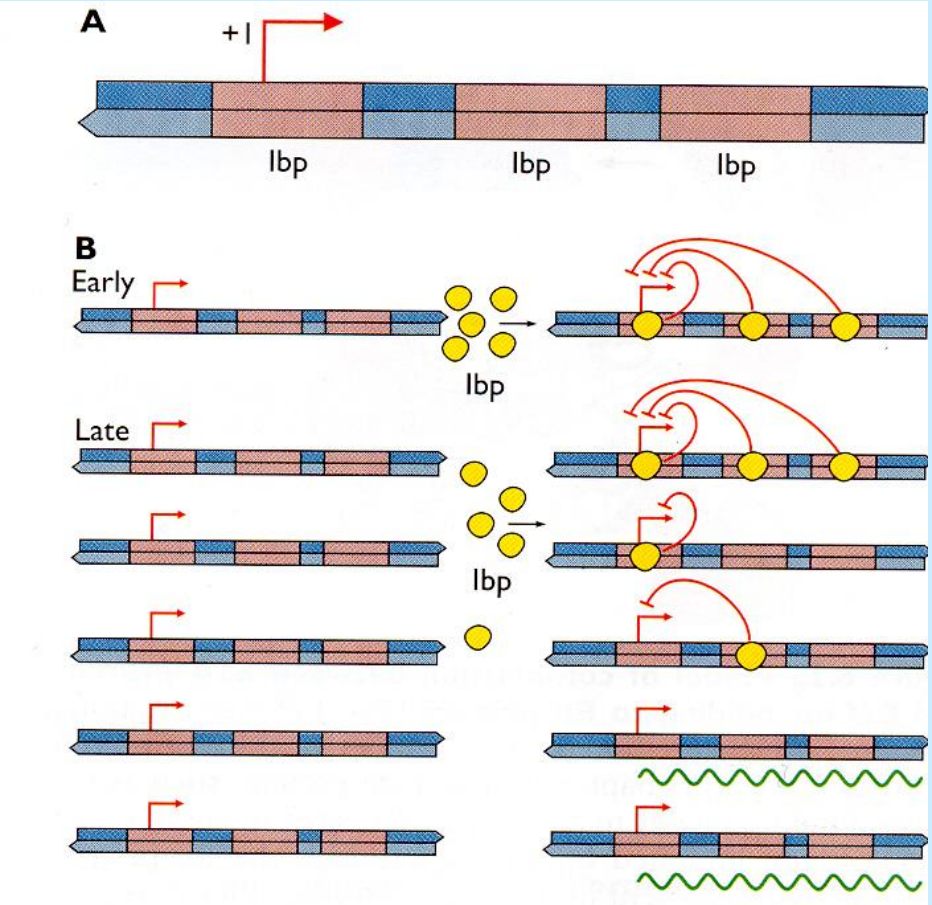
Великий Т антиген відіграє визначальну роль у реплікації

- має АТФ-азну активність;
- може функціонувати як ДНК хеліказа. Розкручує ДНК у ділянці Ori і дозволяє приєднуватися клітинному праймазному комплексу для ініціації двонаправленої реплікації ДНК. Ці події призводять до формування 2-л молекул, що набувають суперспіральної конформації за рахунок клітинної топоізомерази II.
- активатор активності клітинних генів, які залучені у контролювання клітинного циклу. При цьому відбувається індукція й синтезу клітинної ДНК. У кк відбувається імортализація кл (клітини постійно діляться).

Пізні транскрипти

- Пізні мРНК:
  - Транскрибуються після реплікації ДНК з ланцюгів, комплементарних ланцюгам, що слугують для транскрипції ранніх мРНК;
  - Транскрибуються з новосинтезованих, а не з батьківських геномів;
  - Транскрибуються у значно більших кількостях ніж ранні;
  - У них закодована інформація про три структурні білки, за рахунок різноманітного сплайсингу.

SV40

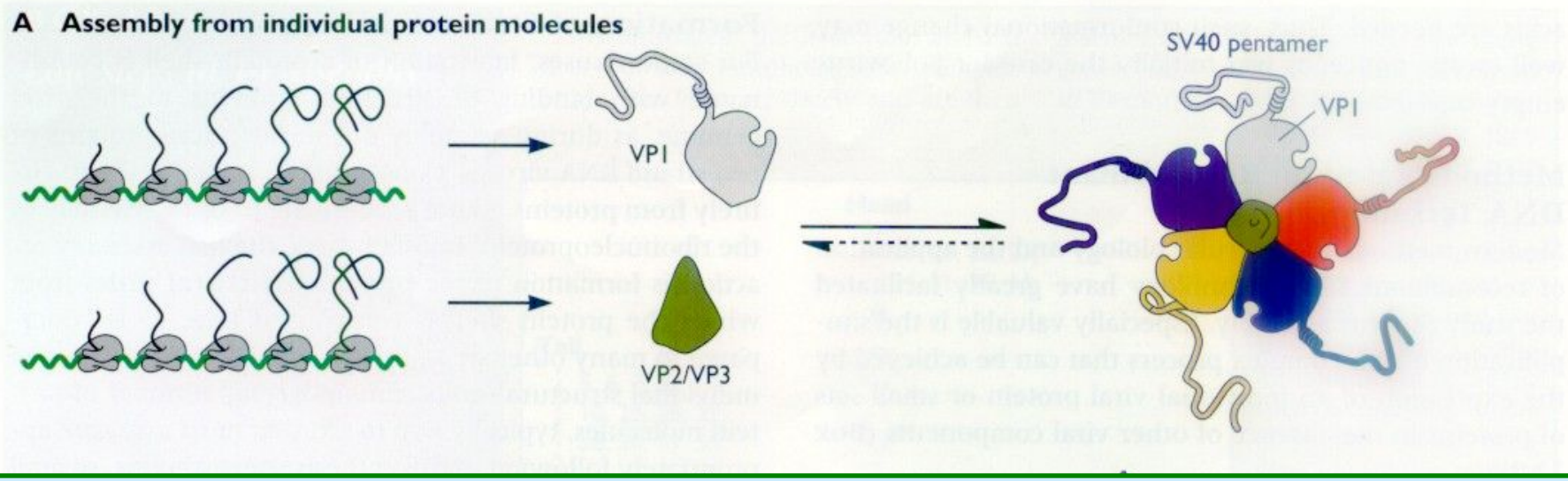


Переключення експресії ранніх на експресію пізніх генів відбувається після початку синтезу ДНК. Пізній промоторний регіон містить множинні сайти для клітинного репресору - Ibp. Після початку реплікації концентрація пізніх промоторів різко підвищується, і таким чином не всі сайти зв'язування з Ibp зайняті і ці промотори стають доступними для транскрипційних клітинних факторів. Великий Т антиген приєднується до промоторів і допомагає активувати транскрипцію пізніх генів і супресувати транскрипцію ранніх генів.

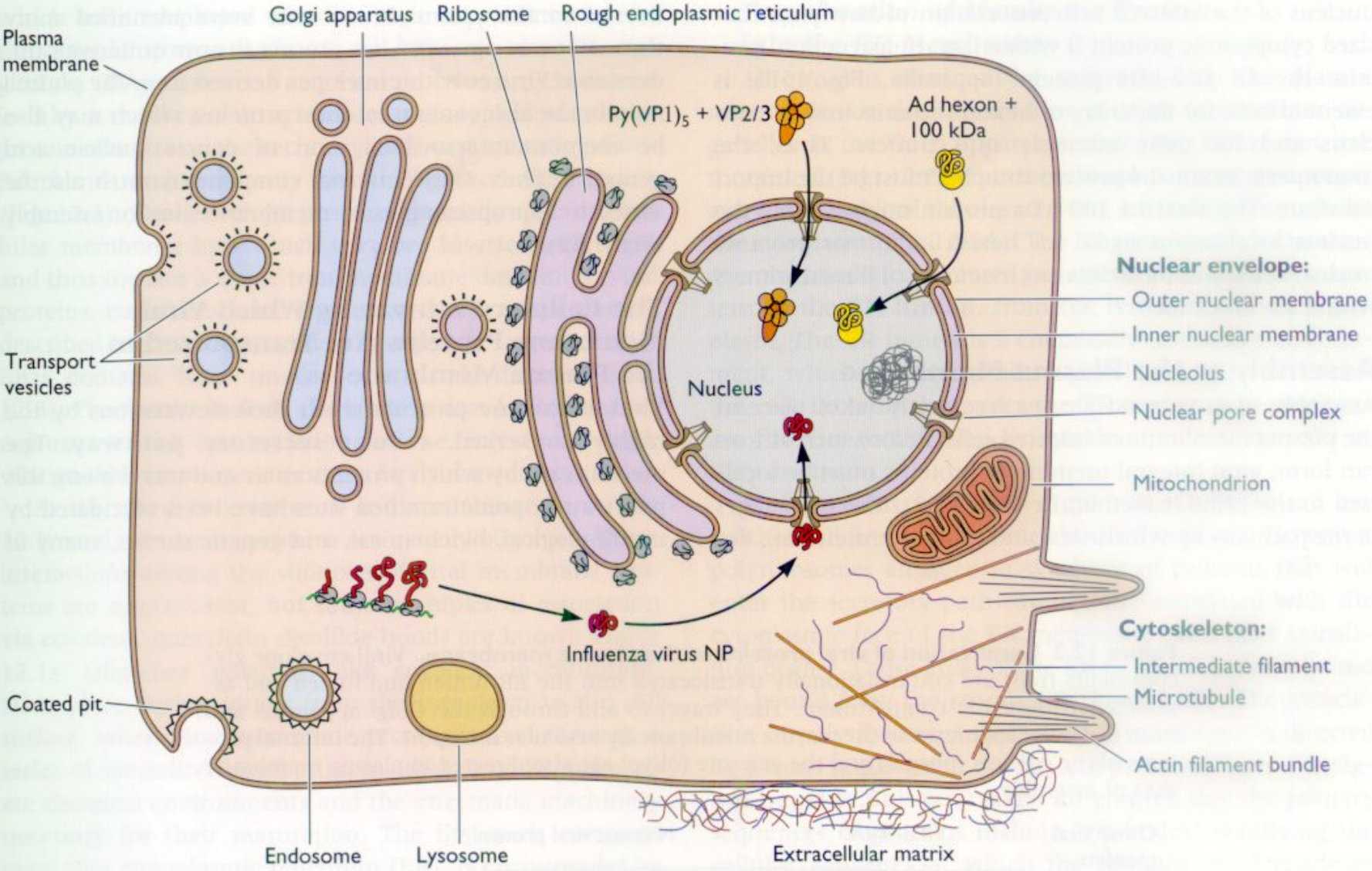
Механізми формування структурних одиниць віріонів

Механізм	Вірус	Структурні субодиниці
Асоціація індивідуальних білкових молекул	*Polyomvirus* (SV40)	Зв'язування пентамерів VP1 з однією молекулою VP2 чи VP3 у центральній виїмці

Формування субодиниць каписиду з індивідуальних білкових молекул



У поліомавірусів вірусні структурні білки потрапляють у середину ядра як попередньо зібрані структурні одиниці - пентамери [Py] (VP1 асоціюються з однією молекулою або VP2 або VP3).


Golgi apparatus
Ribosome
Rough endoplasmic reticulum
Plasma membrane
Py(VP1)$_5$ + VP2/3
Ad hexon + 100 kDa
Nuclear envelope:
Outer nuclear membrane
Inner nuclear membrane
Nucleolus
Nuclear pore complex
Mitochondrion
Transport vesicles
Nucleus
Influenza virus NP
Cytoskeleton:
Intermediate filament
Microtubule
Actin filament bundle
Coated pit
Endosome
Lysosome
Extracellular matrix

Формування вірусних часток та вихід з клітини

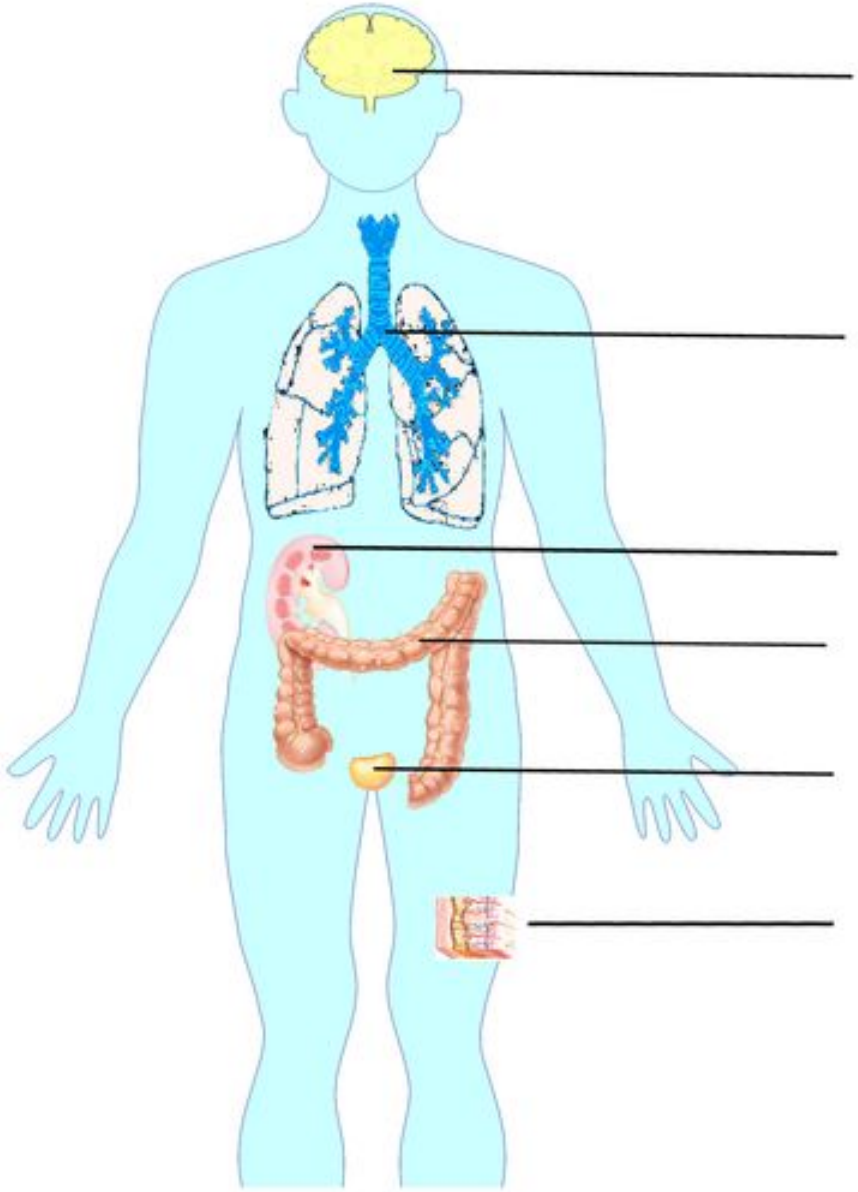
- Збірка:
  - Відбувається в ядрі;
  - Вірусний геном асоціюється з гістонами і інкапсидується у недозрілі частки;
  - Формування субодиниць капсиду з індивідуальних білкових молекул.
- Вихід
  - за рахунок лізису кл.

- Віруси мають чітко виражене коло хазяїв та розмножуються у певних КК. У непермісивних клітинах вірус може викликати трансформацію за рахунок активності ранніх генів.
- Трансформація та онкогенні властивості поліомавірусів є результатом експресії вірусних ранніх генів та їх взаємодії із продуктами специфічних клітинних генів (p 53, pRB). У трансформованих клітинах та клітинах пухлин поліомавіруси знаходяться у стані провірусу – інтегрована ДНК.

- Поліомавіруси розповсюджені по всьому світі. Вони часто призводять до розвитку персистентної інфекції.
- **SV-40** є лімфотропним вірусом приматів.
- Відомо **13** поліомавірусів, що уражують людину. Чотири з них подібні до вірусу SV-40 (вірус **JC**, вірус **BK**, вірус **KI** и вірус **WU**), тому ураження цими вірусами складно відрізнити від інфекції, обумовленої SV40.
- **Поліомавірус клітин Меркеля** значно відрізняється від інших поліомавірусів людини і є більш подібним до вірусів мишей.
- Папіломавірус 6-го типу (**HPV6**) вірус має віддалену подібність до 5-го типу (**HPV5**).

- Вірус **JC** уражує клітини дихальної системи, нирок та мозку.
- Вірус **ВК** призводить до респіраторних інфекцій, та уражує нирки у пацієнтів зі зниженою функцією імунної системи, наприклад, після трансплантації органів.
- Два поліомавіруси **KI** (Karolinska Institute) та **WU** (Washington University) близько споріднені та виділяються з секретів дихальних шляхів.
- У 2008 році описаний **поліомавірус клітин Меркеля**, що викликає рак шкіри Меркеля.
- У серпні 2010 описаний **поліомавірус, що викликає триходисплазію** (*trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*).

Human Polyomavirus	Other Names[a]	Source	Refseq	Reference
Polyomavirus BK	BK Virus, BKV *BKPyV*; Polyomavirus hominis 1	Kidney transplant recipient	V01108	Gardner et al. 1971 [6][b]
Polyomavirus JC	JC Virus, JCV; *JCPyV* Polyomavirus hominis 2	PML patient	J02226, NC_001699	Padgett et al. 1971 [4][c]
Karolinska Institute Polyomavirus	KIV, *KIPyV*	Respiratory Tract	EF127906	Allander et al. 2007 [16][d]
Washington University Polyomavirus	WUV, *WUPyV*	Respiratory Tract	EF444549	Gaynor et al. 2007 [17][e]
Merkel Cell Carcinoma-Associated Polyomavirus	MCV, *MCPyV*	Merkel Cell Carcinoma	EU375803	Feng et al, 2008 [9][f]
Human Polyomavirus-6	*HPyV6*	Normal skin	NC_014406	Schowalter et al. 2010 [27][g]
Human Polyomavirus-7	*HPyV7*	Normal skin	NC_014407	Schowalter et al. 2010 [27][g]
Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus	TSV, TSPyV HPyV8	Trichodysplasia Spinulosa	NC_014361	van der Meijden et al. 2010 [8][h]
Human Polyomavirus-9	HPyV9	Kidney transplant recipient	NC_015150	Scuda et al. 2011 [37][i]
MW Polyomavirus	MWPyV, HPyV10	Healthy Stool from Malawi WHIM patient	JQ898292, JX262162	Siebrasse et al. 2012 [38][j]; Buck et al. 2012 [39][j]



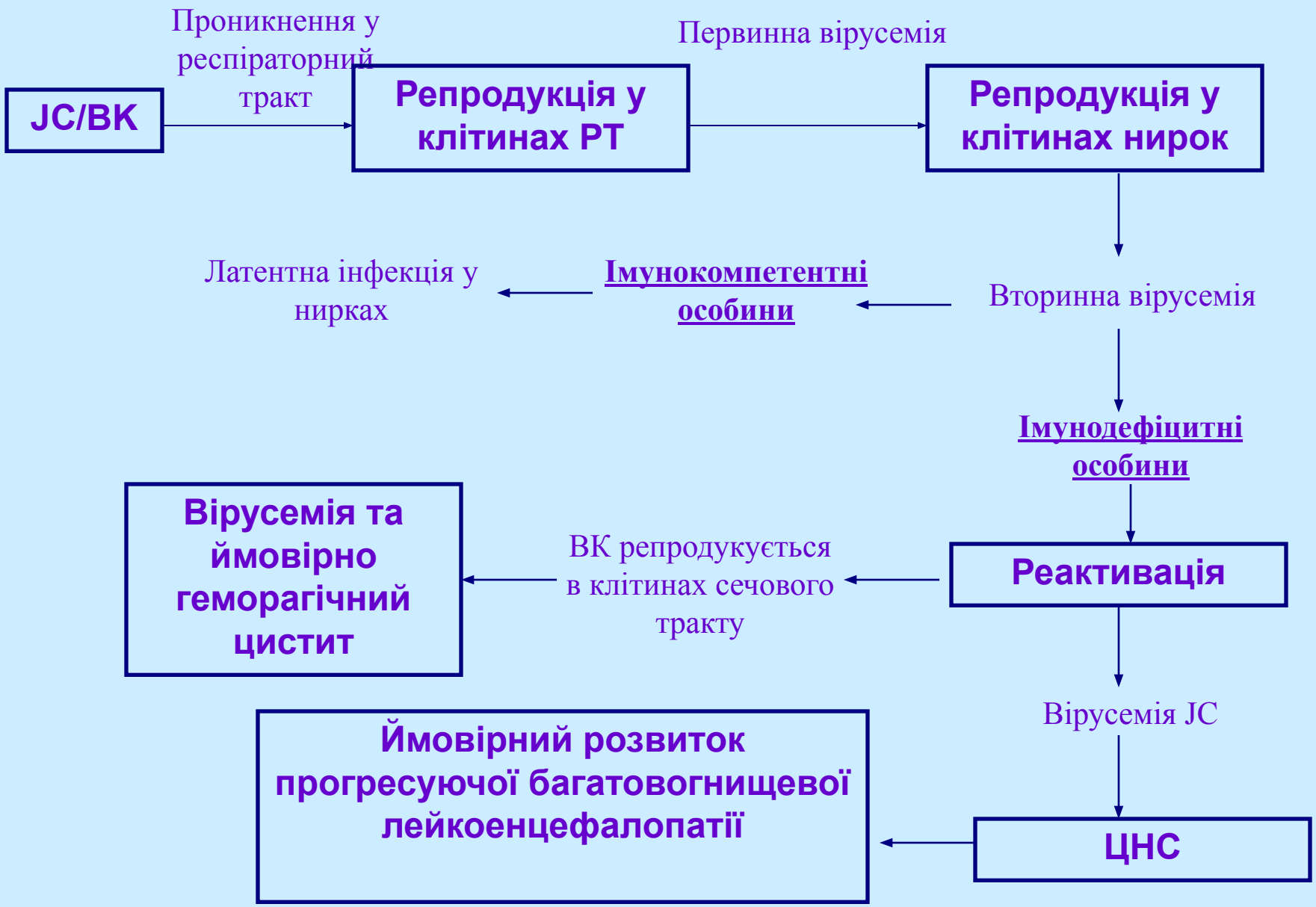
Disease	Virus
PML CNS tumors?	JCPyV
Unknown	KIPyV WUPyV
PVAN	BKPyV
Colon Cancer?	JCPyV
Prostate Cancer?	BKPyV
MCC TS Unknown	MCPyV TSPyV HPyV6,7

Механізми передачі

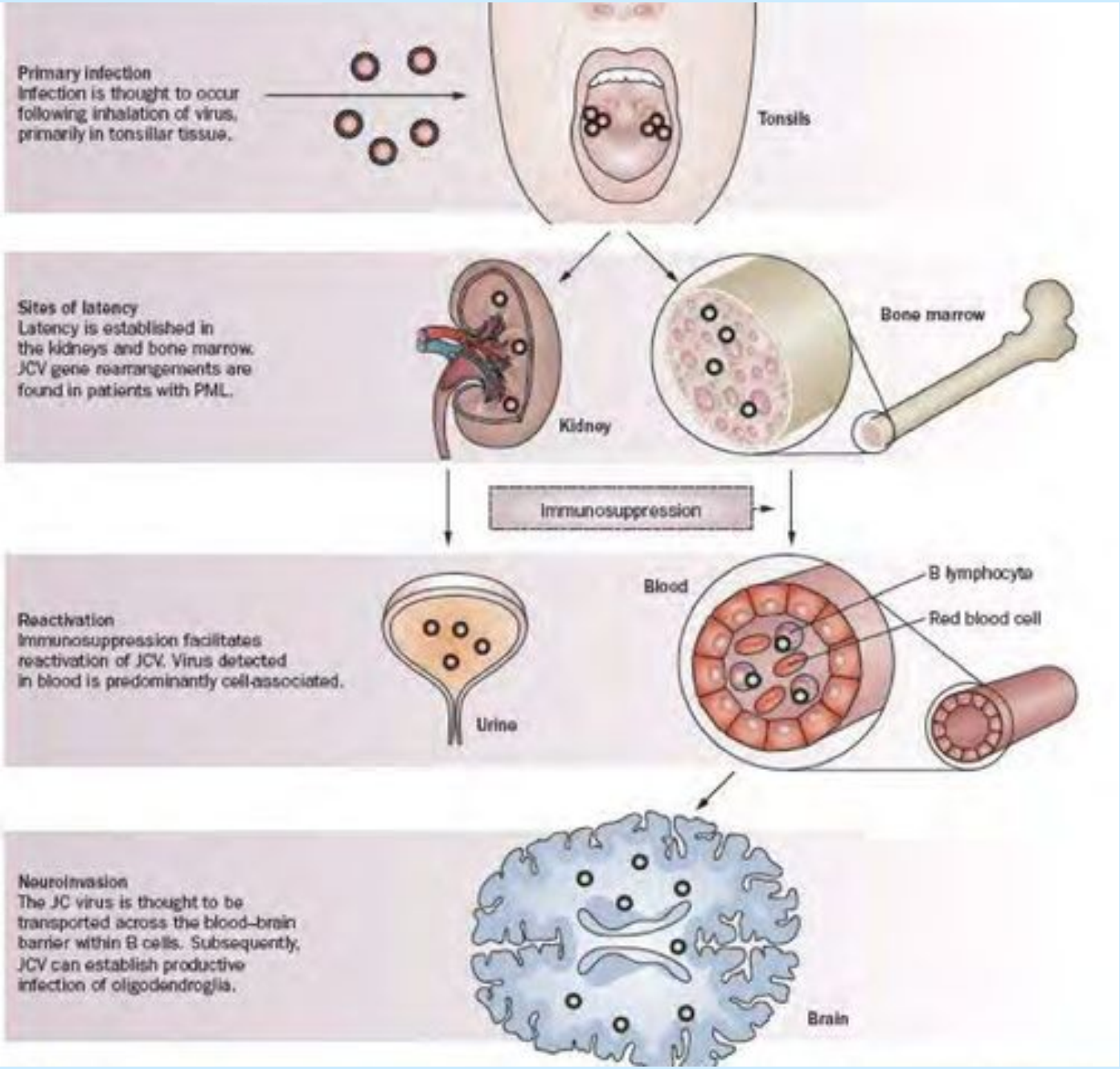
- 1. Парентеральний;
- 2. Контактний;
- 3. Повітряно-крапельний;
- 4. Трансплацентарний.

Віруси розповсюджуються
за рахунок реактивації у організмі вагітних жінок,
за рахунок виділення невеликої кількості вірусу через сечу
та в результаті пересадки органів.
Передача також може здійснюватися під час контакту та повітряно-крапельним шляхом.

Патогенез



From Medical Microbiology, 5th ed., Murray, Rosenthal & Pfaller, Mosby Inc., 2005, Fig.52-8.


Primary infection
Infection is thought to occur following inhalation of virus, primarily in tonsillar tissue.
Tonsils
Sites of latency
Latency is established in the kidneys and bone marrow. JCV gene rearrangements are found in patients with PML.
Kidney
Bone marrow
Immunosuppression
Reactivation
Immunosuppression facilitates reactivation of JCV. Virus detected in blood is predominantly cell-associated.
Urine
Blood
B lymphocyte
Red blood cell
Neuroinvasion
The JC virus is thought to be transported across the blood–brain barrier within B cells. Subsequently, JCV can establish productive infection of oligodendroglia.
Brain

BKV

- Антитіла до BKV виявляються у 90% дітей до 10 років.
- Нефропатія, обумовлена BKV, в більшості випадків призводить до руйнування ниркового трансплантату.
- Розповсюдження BKV за допомогою сечі превалює над розповсюдженням вірусу через кров під час вірусемії.
- BKV уражує трубчасті епітеліальні клітини (*decoy*): клітини швидко (протягом хвилин) руйнуються, що може утруднювати мікроскопічне обстеження сечі.

BKV

- Помилки в діагностуванні (негативні результати) завжди призводить до незворотної нефропатії.
- Біопсія алотрансплантатів на наявність BKV є досить специфічною через неоднозначність ранньої інфекції та очевидні сумніви щодо наявності вірусу у медулярній тканині нирок.

JCV

Людський вірус JCV може викликати руйнування олігодендріоцитів ЦНС, викликаючи при цьому фатальну демієлінізаційну хворобу, яка називається прогресуюча мультифокальна (багатовогнищева) лейкоенцефалопатія.

JCV

JCV виявляється у сечі 30-70% дорослого населення, у 90% дорослого населення виявляються антитіла до JCV.

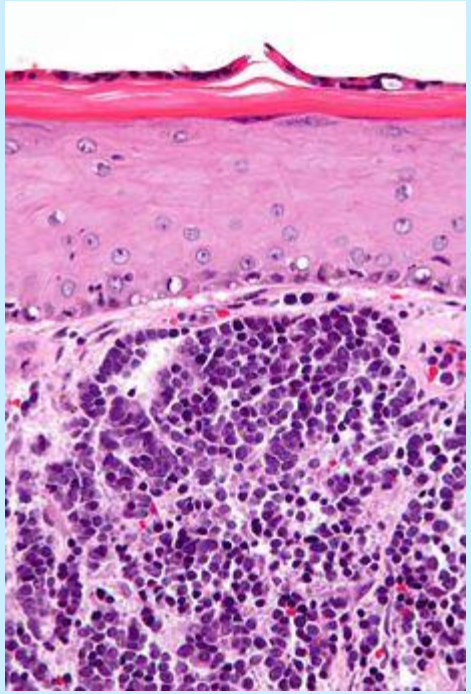
генотипи, які мають певне географічне поширення:

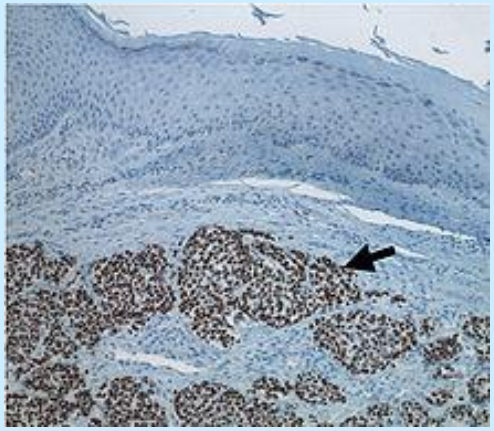
Тип 1 та тип 2 поширені відповідно в Європі та Азії, а типи 3 та 6, як правило, - в Африці. Тип 4, що є рекомбінантом європейського та азійського генотипів (1 та 3), поширений в США.

JCV

- Ураження JCV відбувається в ранньому дитинстві ймовірно через респіраторний тракт. А потім розвивається персистентна інфекція у нирках, звідки вірус виділяється з сечею.
- Захворювання розвивається на фоні імунодефіцитних станів: СНІД, лімфома, лейкемія, карцинома, саркоідоз, туберкульоз, фармакологічна імуносупресія (після трансплантації органів). У півкулях великого мозку, мозковому стовбурі та мозочку виявляються множинні вогнища та демієлінізації між білою та сірою речовиною. В основному уражуються олігодендроцити.
- порушення вищих мозкових функцій та розлади свідомості з наступною грубою деменцією.

Поліомавірус з клітин Меркеля





є причиною однієї з найбільш небезпечних форм раку шкіри - раку з клітин Меркеля.

Вірус присутній в 80% пухлин цього типу.

Клітини Меркеля розташовуються в глибоких шарах епідермісу шкіри і вважаються відповідними за тактильну чутливість. Рак з клітин Меркеля є агресивною злоякісною пухлиною шкіри, що уражує переважно літніх людей і пацієнтів з ослабленим імунітетом, зокрема хворих на СНІД, а також реципієнтів органу.

Merkel cell carcinoma (arrow) infiltrating skin tissue, stained brown for Merkel cell polyomavirus large T protein

Діагностика

- Для імуногістологічної діагностики звичайно застосовують анти-SV40 антитіла, які виявляють також ВК-вірус та JC-вірус.
- Комерційні ДНК-зонди для діагностики методом гібридизації *in situ* (виявляє наявність антигену або ДНК-вірусу лише в стадії, коли в біоптаті вже визначають інтрануклеарні включення).
- Електронна мікроскопія біоптата трансплацентованої нирки дозволяє виявити інтрануклеарні вірусні частки, які, як правило, зустрічаються у вигляді кластерів.
- Патогномонічними для ВК-вірусної інфекції є наявність у складі сечового осаду так званих "decoy"-cells.

Виявлення специфічних клітин у незабарвленій свіжозібраній сечі (трубчасті епітеліальні клітини з ядерними включеннями, асоційованим з BKV)

Digital photographs courtesy of Mr. David Oliver and Mrs. Luana Kiandoli, Nephrology Laboratory, WRAMC

Тип I: аморфні включення типу “матове скло”

Reference 7

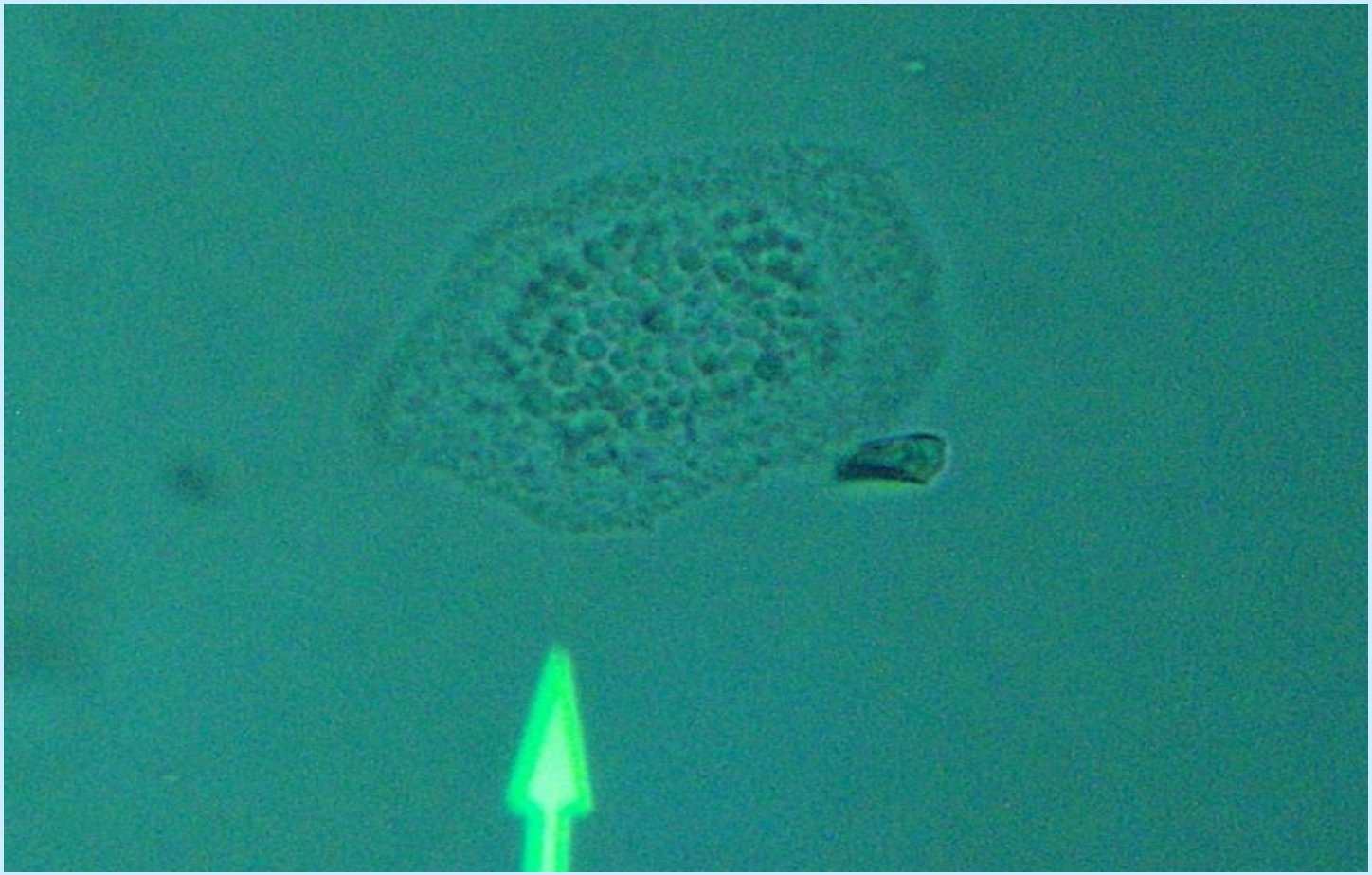
400x (Olympus BH2 microscope)

Тип II: гранулярні включення, оточені “ореолом”

Reference 7

400x (Olympus BH2 microscope)

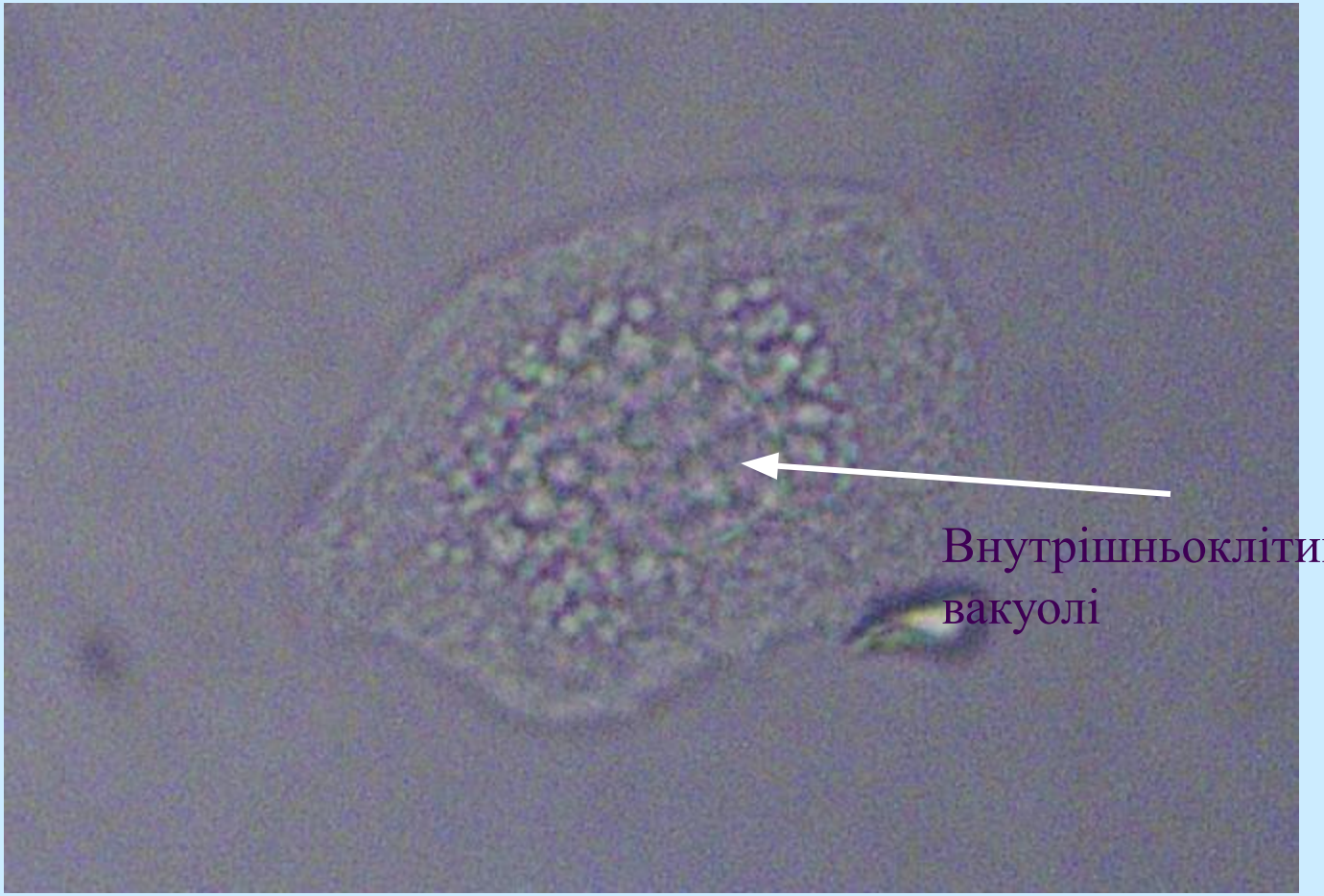
Тип III: дрібно гранулярні включення без ореалу



Reference 7

400x (Olympus BH2 microscope),
Enlarged 1.6x in processing image.

Тип II/III гібридний:



Reference 7

400x (Olympus BH2 microscope),
Enlarged 2x in processing image.

Тип IV: вакуолеподібні включення із згрупованим, невпорядкованим хроматином

Reference 7

400x (Olympus BH2 microscope),
Enlarged 2x in processing image.

- Альтернативним діагностичним методом є електронно-мікроскопичне дослідження негативно забарвлених осадків сечі
- Диференційна діагностики включає виявлення регенерованих змін ядер канальцієвого епітелію, ЦМВ-, аденовірусної інфекції, просто герпесу, інфекції, зумовленої varicella zoster, каріомегаличного інтерстиціального нефриту.

Терапія інфекції, обумовленої вірусом ВК.

Основним підходом в лікуванні ВК-нефропатії є зниження імуносупресії. Можливо застосування внутрішньовенного імуноглобуліну (IVIG).

Показана можливість застосування препарату цидофовір (Cidofovir).

Застосування інших препаратів (vidarabin, ингибиторів топоізомерази, topotecan, campothecin) знаходиться на стадії розробки.

Профілактика – відсутня.

Екфективне лікування JCV-інфекції відсутнє. Призначають амантадин (мідантан) або цитозин, арабінозид, аденін арабінозид.

Поліомавірусна інфекція птахів

- Уражуються папуги, в основному пташенята.

Вірус передається з калом, сечею та іншими біологічними рідинами (іноді з лупою на пір’ям).

- Інкубаційний період -7-14 діб.
- Залишається в організмі птахів, ще протягом 2-12 міс. У цей період птахи є інфекційними.
- Симптоми:
- - депресія;
- - блювота;
- - діарея або поліурія;
- - крововиливи під шкірою;
- - ненормальне оперення у пташенят;
- - раптова загибель.