

# \* Вирусы в биотехнологии

Лекция профессора Бойченко М.Н.

\* Субвирусные инфекционные агенты:

\* 1. вириоды

\* 2. саттелиты

**\* Субвирусные  
инфекционные  
агенты**

**\* Вироиды - маленькие  
однонитевые кольцевые  
молекулы РНК, не  
кодирующие вирусные  
белки, лишённые  
белкового капсида**

\* Термин предложен в 1971г. Американским  
ученым Теодором Динером

**\* ВИРОИДЫ**

- \* Вироиды заражают высшие растения
- \* Им не нужен вирус-помощник
- \* Реплицируются в ядре или в хлоропластах с помощью клеточного фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы
- \* РНК вироидов обладает выраженной вторичной структурой, что обеспечивает высокую устойчивость к нуклеазам клетки и позволяет выживать без защитной белковой оболочки

**\* Вироиды**

- \* Классификация основана на первичной нуклеотидной последовательности в РНК
- \* В настоящее время определены 30 вироидов, которые объединены в 8 родов и 2 семейства:  
*Pospiviroidae* *Avsunviroidae*
- \* ***Pospiviroidae*** ( *potato spindle tuber viroid* - вироид веретеновидности клубней картофеля)
- \* ***Avsunviroidae*** ( *avocado sunblotch viroid* - вироид солнечной пятнистости авокадо)

\* **ВИРОИДЫ**

- \* **Pospiviroidae** реплицируются в ядре клетки, используя клеточные ДНК-зависимую РНК-полимеразу, а также эндонуклеазу и лигазу . Высоко структурированы
- \* **Avsunviroidae** реплицируются в хлоропластах, используют только ДНК-зависимую РНК-полимеразу, так как РНК обладает рибозимной активностью и может катализировать процессы расщепления и лигирования молекул РНК . Менее структурированы
- \* РНК вироидов не кодирует белки. В ее составе нет инициаторного кодона AUG
- \* После репликации молекулы РНК мигрируют в цитоплазму и проникают в другие клетки.
- \* От одного растения к другому вироиды распространяются при вегетативном размножении (*Pospiviroidae*) , а также с пыльцой и семенами (*Avsunviroidae*)

**\* вироиды**

- \* Патогенность вироидов связывают с влиянием вироидной РНК на синтез белка.
- \* Вироиды, реплицирующиеся в ядре влияют на процессинг м-РНК, препятствуя выщеплению интронов.
- \* Возможно, вироиды нарушают синтез рибосомной РНК, а также влияют на котрансляционный транспорт белков

\* **вириды**

\***Саттелиты** - субвирусные агенты, неспособные заражать хозяйские клетки без вируса-помощника

\* Саттелиты реплицируются на матрице своей собственной нуклеиновой кислоты. Репликация саттелита происходит только в присутствии и полностью зависит от размножения вируса-помощника

\* Среди саттелитов различают: **1. саттелитные нуклеиновые кислоты** ( когда нуклеиновая кислота одевается в белок-оболочки вируса-хозяина)

\* **2. вирусы-саттелиты**, у которых нуклеиновая кислота саттелита кодирует собственный белок оболочки и одевается в него с образованием вирионов

\* **Саттелиты**



\* Саттелиты встречаются у вирусов растений, грибов, бактерий, животных. Они обладают рядом общих свойств:

\* 1. Генетический материал представлен нуклеиновой кислотой, размером от 200 до 2000 нуклеотидов

\* 2. Н.к. не имеет гомологии с н.к. вируса-помощника

\* 3. Саттелитные нуклеиновые кислоты обладают сложной вторичной структурой, которая защищает их от действия клеточных нуклеаз, что помогает им выжить в ожидании вируса-помощника

\* Вирусы-саттелиты и саттелитные нуклеиновые кислоты не могут самостоятельно реплицироваться, поэтому они сами по себе неинфекционны

 **саттелиты**

- \* **ВИРУСОИДЫ** - имеют кольцевые молекулы РНК, размером 350 нуклеотидов, которые одеваются вместе с вирусной РНК вируса-помощника в вирусную оболочку. В одну оболочку может быть упаковано до 50 молекул вирусоидной кольцевой ss РНК
- \* Молекула РНК вирусоидов имеет выраженную вторичную структуру и обладает рибозимной активностью.
- \* Вирусоиды не способны в отличие от вироидов к самостоятельной репликации.
- \* Репликация вирусоидной РНК происходит в цитоплазме

\* **вирусоиды**

\* **Прионы** - инфекционные агенты белковой природы (Prions - Proteinaceous Infection Particles) PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> вызывающие у животных и людей губчатые (спонгиозные) энцефалопатии

\* **Прионы**

- \* 1732 в Англии была описана болезнь овец скрепи (scrape- скоблить, тереться), при которой овцы начинали неистово чесаться, соскребая всю шерсть, и вскоре погибали.
- \* 1933г. Ирландия закупила в Германии большую партию овец. Начало заболевания под названием
- \* 1954г. Sigurdsson B. Прочитал цикл лекций в Лондонском университете. Ввел термин «медленные инфекции»
- \* В 1956 Д.Гайдушек описал болезнь -куру, обнаруженной в племени форе в Папуа-Новой Гвинее, которая характеризовалась нарушением координации движения, приступами смеха, летальным исходом

\* **ПРИОНЫ**



Лауреат Нобелевской  
премии за 1997г –  
Prusiner S.B.

Установил этиологию  
трансмиссивных  
губчатообразных  
энцефалопатий

\* Прионы

\* В 1982 году Стенли Прузинер выдвинул гипотезу, что причиной губкообразных трансмиссивных энцефалопатий является белок. Он его выделил в чистом виде, заражая скрепи серийских хомячков и ввел термин прион, который обозначил PrP. В 1985 году открыл ген ( PRNP) , в котором записана аминокислотная последовательность белка . Этот ген был обнаружен у всех млекопитающих, птиц, рыб, рептилий)

\* PrP является высококонсервативным белком, состоящим из 254 аминокислотных остатка. У разных видов млекопитающих аминокислотная последовательность идентична на 80%

\* Является сиалогликопротеином.

\* Локализован на поверхности клетки, заякорен в богатую холестерином мембрану клетки через гликопротеин

\* **Прионы**

- \* Синтезируется главным образом в нейронах.
- \* Обнаружен в селезенке, лимфатических узлах, коже, ЖКТ, фолликулярных дендритных клетках, роговице глаза, дрожжах.
- \* Главной особенностью является **ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ к ПРОТЕАЗЕ**

\* **прионы**

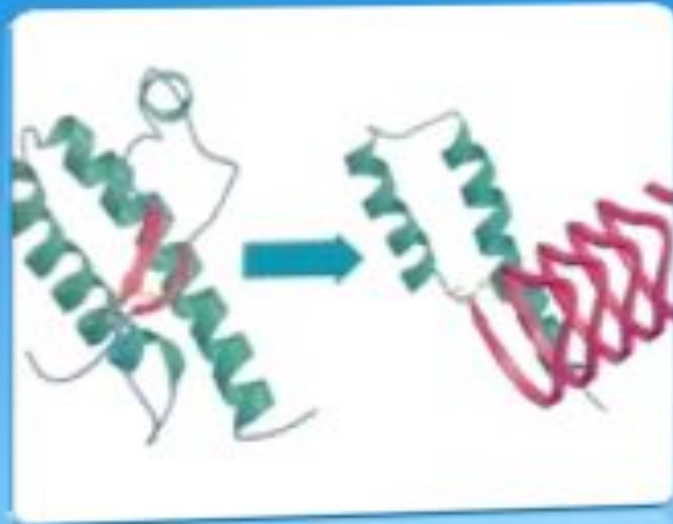
- \* Молекула нормального приона состоит из 4 альфа-спиральных доменов, стабилизированных междоменными электростатическими взаимодействиями и S-S1 - связью
- \* В модифицированной изоформе приона PrPsc ( scrapie prion protein) в отличие от нормального прионного белка PrPc первоначальную спиралевидную форму сохраняют только 2 домена: H3 и H4. Остальные 2 домена: H1 и H2 превращаются в бета-тяжи, связанные друг с другом и доменам H3 и H4
- \* Именно С-терминальный участок конформационно измененной формы, PrPsc , становится резистентным к протеазе

\* прионы



- \* **Накопление конформационно измененного белка сопровождается:**
- \* его агрегацией,
- \* образованием высоко упорядоченных фибрилл (амелоидов),
- \* приводит к гибели клетки

\* **Прионы**



Образование новой  
конформационной  
формы приона

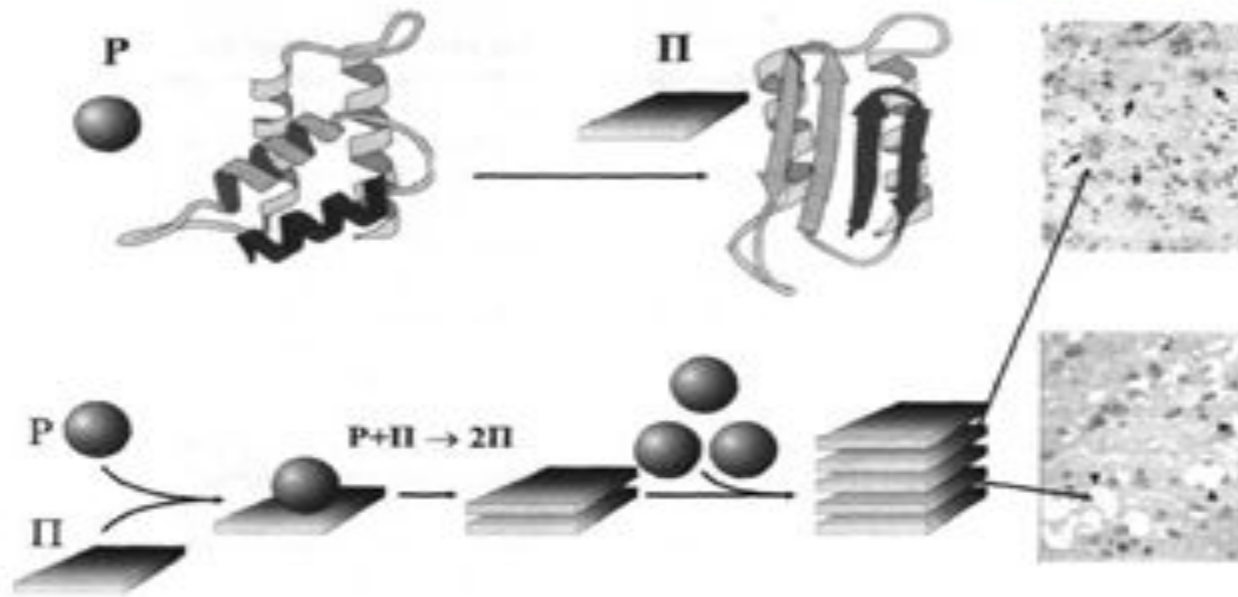
Конформационные  
изменения связаны с  
расплетением С-концевого  
участка PrP<sup>c</sup> альфа-  
спирали, в результате чего  
происходит замена на  
бета-тяжи

\* прионы

- \* Именно C-терминальный участок конформационно измененной формы, PrP<sup>sc</sup>, становится резистентным к протеазе
- \* Превращение нормального белка в патогенный PrP<sup>sc</sup> происходит или в результате генетических мутаций или в результате белок-белковых взаимодействий
- \* Процесс усиливается при возрастании количества патологического приона, который образует агрегаты с собой и с PrP<sup>c</sup> на поверхности клетки
- \* В результате PrP<sup>c</sup> превращается в прион PrP<sup>sc</sup> и далее цикл продолжается

\* **прионы**

# Механизмы образования конформационно измененного приона



\* прионы

\* Измененные прионы устойчивы :

\* 1. к протеолизу

\* 2. к излучениям

\* 3. к высокой температуре

\* 4. к формальдегиду

\* 5. к глутаральальдегиду

\* 6. к бета-пропиолдактону

\*

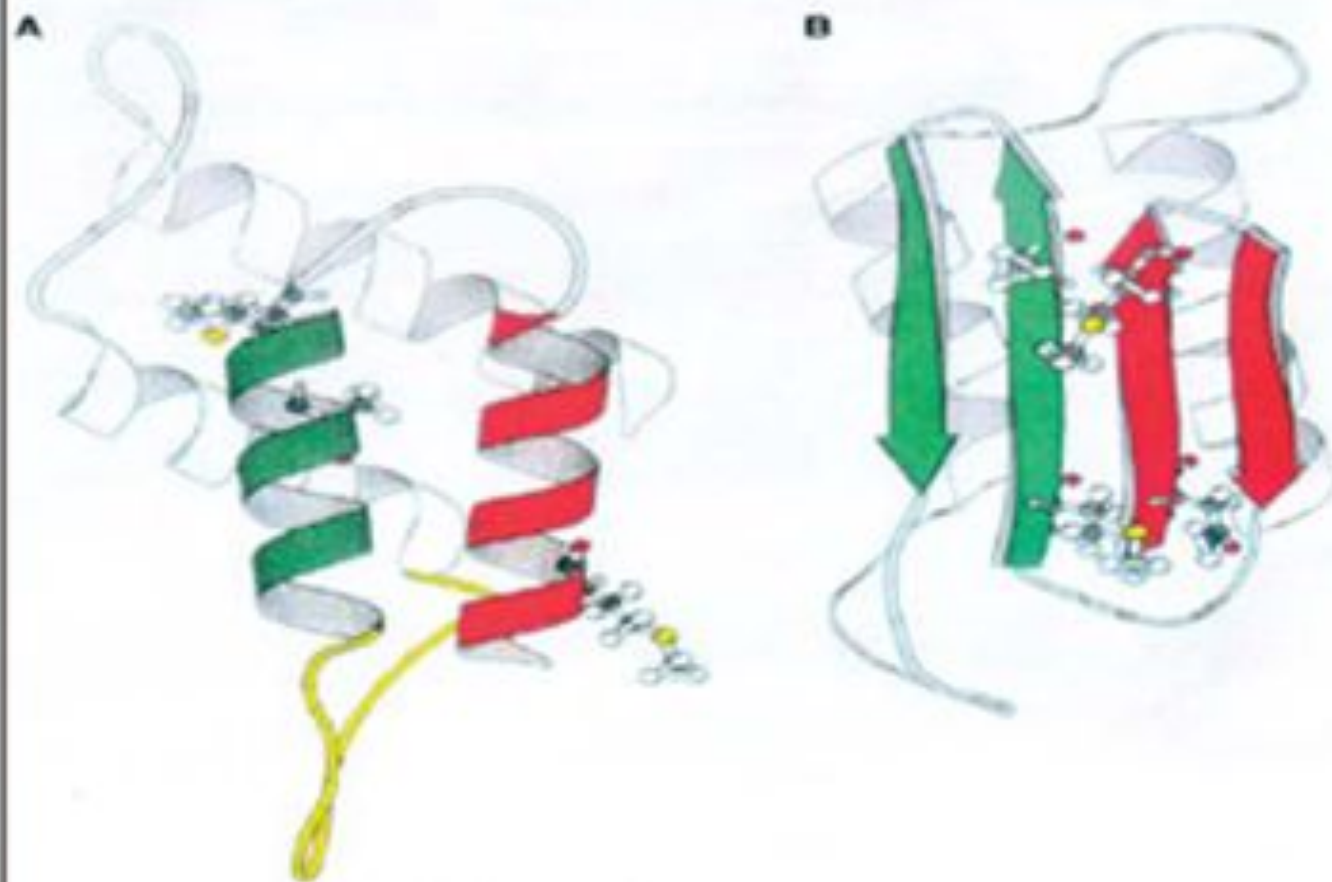


Рис. 2. Схема конформационного изменения клеточного прионного белка

A – молекула клеточного прионного белка PrP<sup>C</sup>

B – молекула инфекционного прионного белка PrP<sup>Sc</sup>

- \* Наличие прионов в дрожжах было установлено в 80х годах
- \* Представляют конформационные варианты обычных клеточных белков
- \* **В результате конформационной перестройки приобретают новые свойства:**
- \* способность к агрегации за счет взаимодействия бета-слоев и образованию амилоидов с переходом в нерастворимую форму
- \* Устойчивость к протеазе
- \* Теряют функциональную активность исходных белков. Клетка становится дефектной по функции белка предшественника приона

**\* Прионы дрожжей**

\* Дрожжевой транскрипционный ко-репрессор Ure-2p может существовать в 2 стабильных конформационных формах:

\* 1. активной как ко-репрессор (связывает и удаляет 2 транскрипционных активатора)

\* 2. нерастворимой неактивной конформационной форме

\* 3. Неактивная конформация обладает способностью быть матрицей для превращения протеина того же типа, с той же аминокислотной последовательностью в его собственную прионоподобную конформацию

\*

**\* Прионы дрожжей**

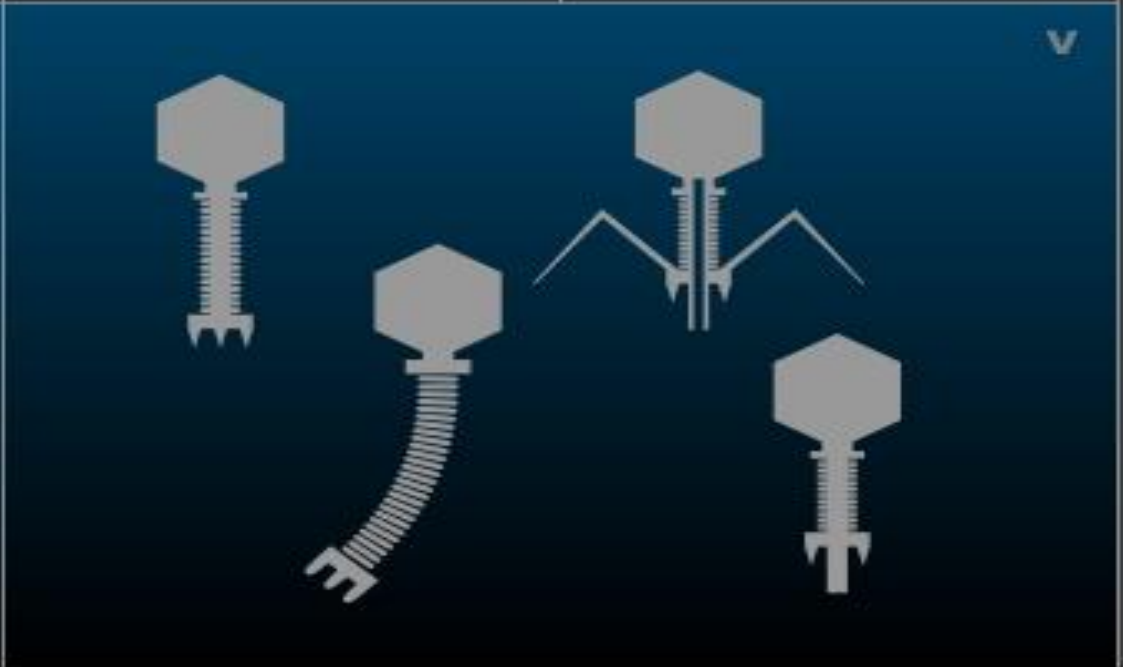
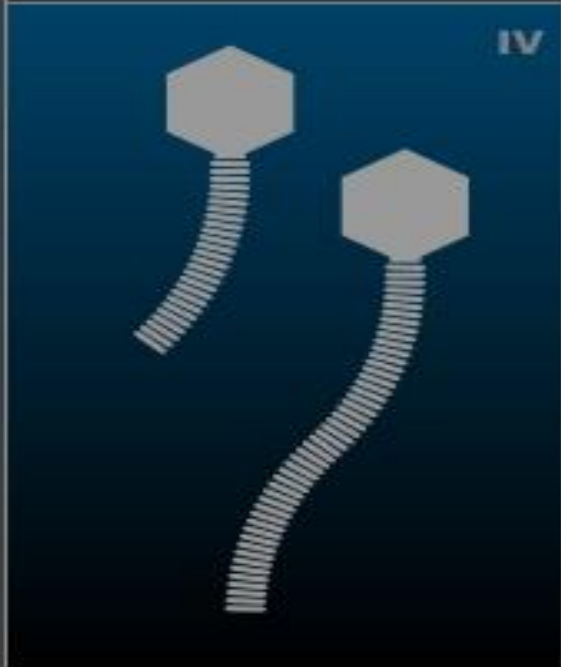
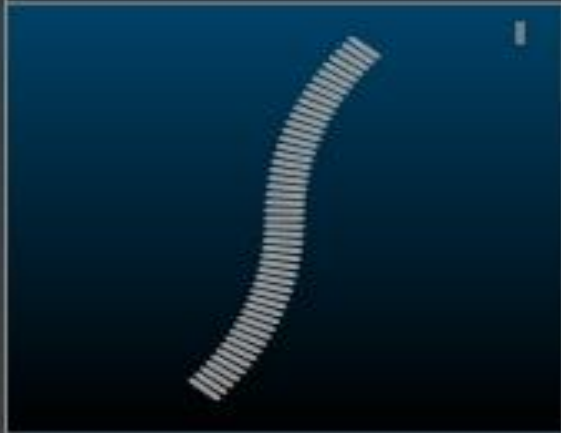


- \* Бактерии рода *Bartonella* имеют гемин-связывающий белок (Hbp), входящий в мембрану клетки.
- \* Является порин-подобным белком, обладающим способностью связывать гемин, делая бактерии геминзависимыми

- \* Прионы дрожжей не приводят к гибели клеток.
- \* Они повышают выживаемость в неблагоприятных условиях
- \* ( Белок Sup35, который является фактором терминации трансляции у *Saccharomyces cerevisiae*, при прионизации перестает терминировать трансляцию, в результате образуется длинный полипептид, который позволяет дрожжам расти без аденина, таким образом изменяя метаболизм азота)

\* Прионы дрожжей

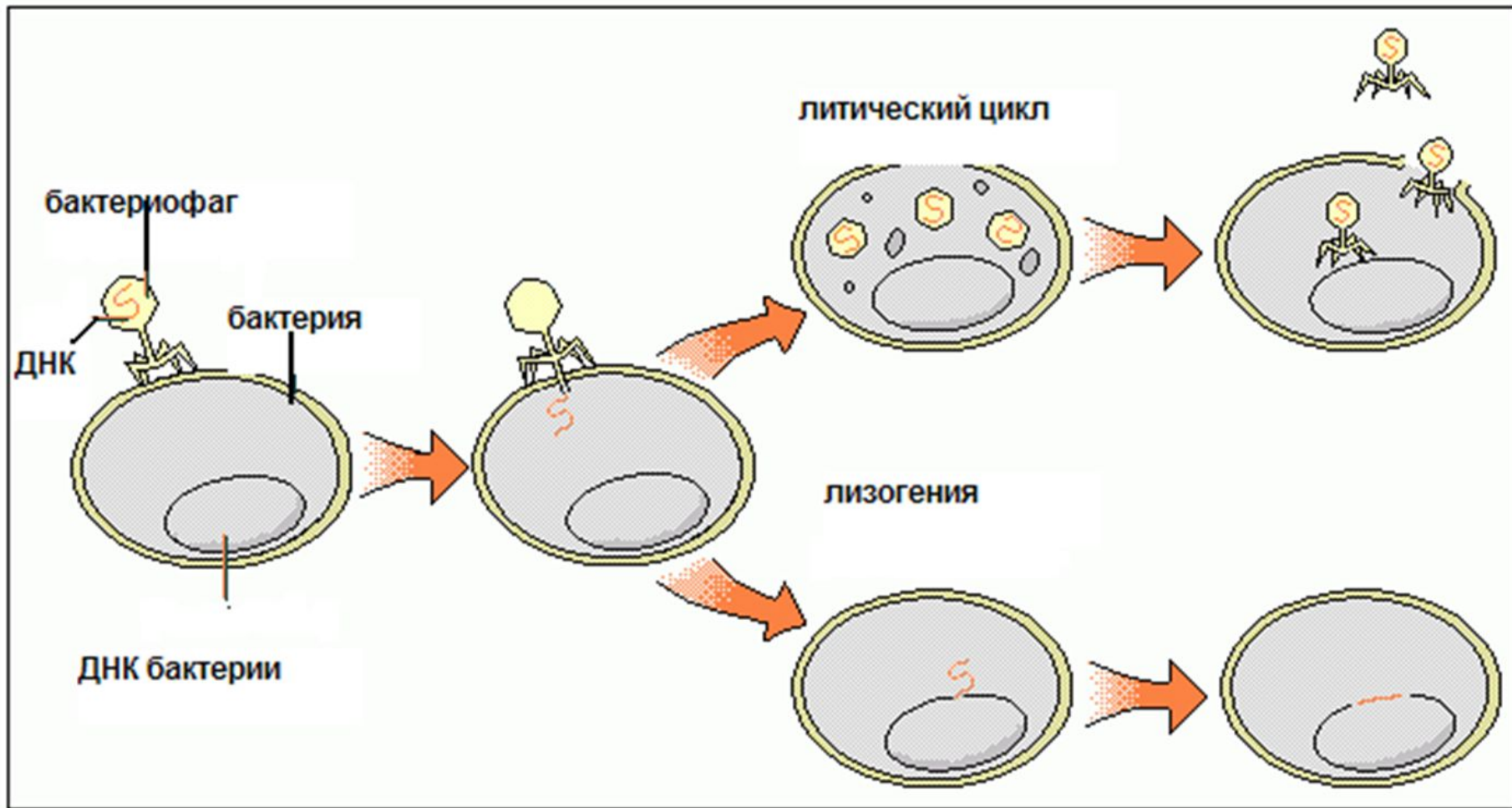
# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ



\* Морфологические формы фагов

## Проникновение в клетку

- **Хвост фага** с помощью ферментов, находящихся на его конце (в основном **лизоцима**), локально **растворяет оболочку клетки**, сокращается и содержащаяся в головке **ДНК инъецируется в клетку**, при этом белковая оболочка бактериофага остается снаружи.
- У **нитевидных фагов в клетку проникает весь фаг**. Белок остается на ЦПМ



**\* Умеренный  
бактериофаг**

## \* Механизм лизогении

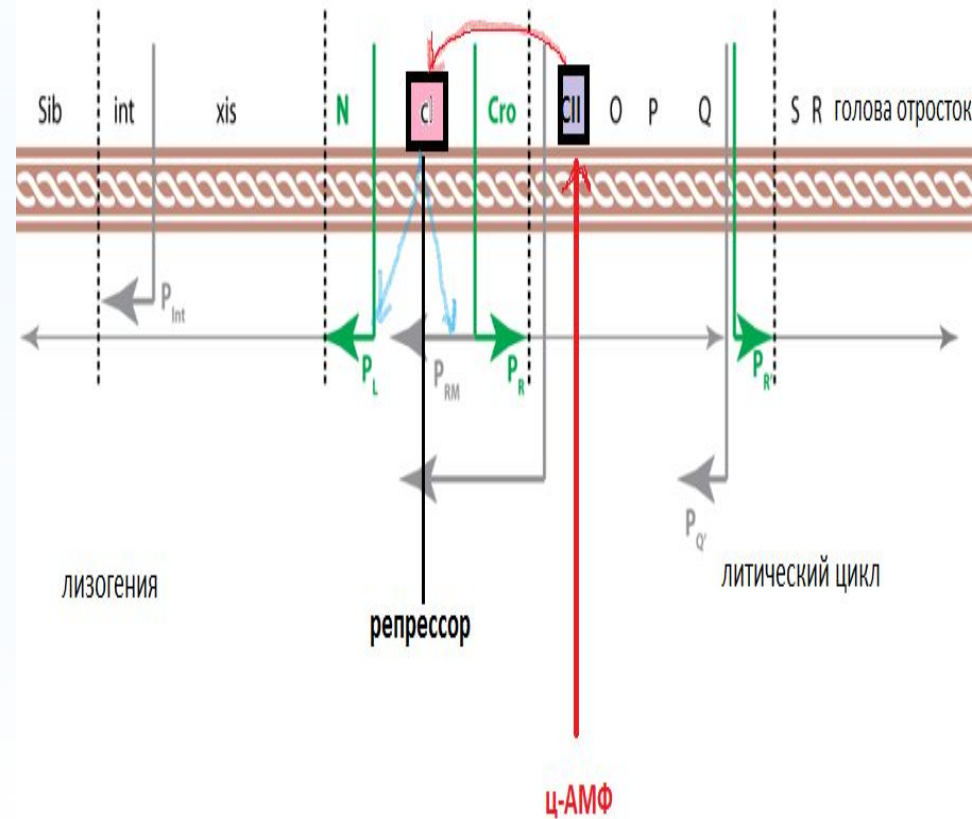
Продукт гена **C I** является репрессором, подавляющим работу промоторов **P<sub>I</sub>** и **P<sub>RM</sub>**. Он также создает иммунитет к фаговой суперинфекции

Продукт гена **cro** обеспечивает синтез ферментов литического цикла

Продукт гена **CII** вызывает интенсивный синтез **C I**. Ген **CII** находится под контролем ц-АМФ

Ген **xis** обеспечивает исключение профаговой ДНК из ДНК бактерии

Ген **int** обеспечивает включение фаговой ДНК в геном бактерии (переход в состояние профага)



\* Продукт гена **C I** является репрессором, подавляющим работу промотеров **PI** и **Prm** . Он также создает иммунитет к фаговой суперинфекции

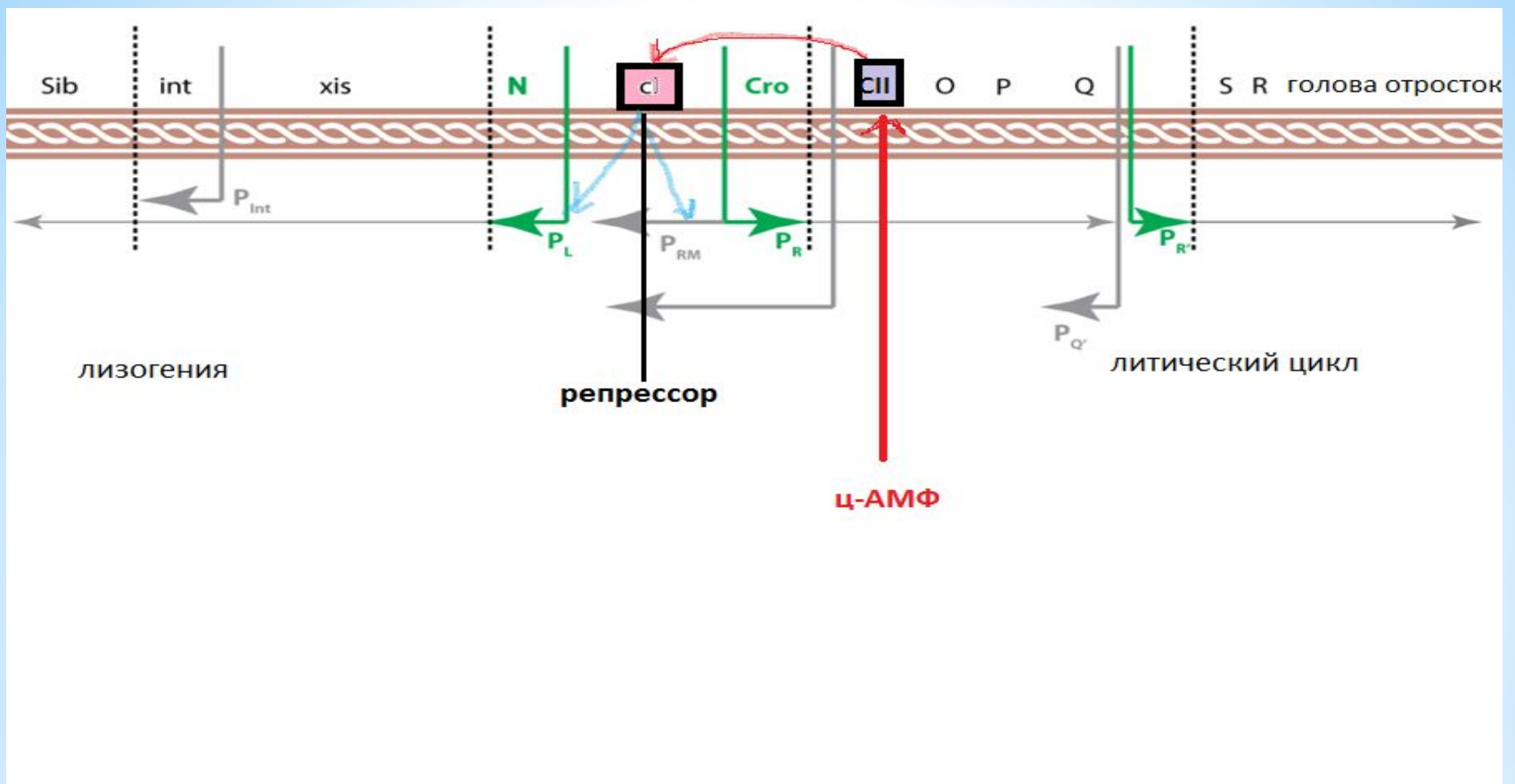
\* Продукт гена **cro** обеспечивает синтез ферментов литического цикла

\* Продукт гена **C II** вызывает интенсивный синтез **C I**. Ген **C II** находится под контролем ц-АМФ

\* Ген **xis** обеспечивает исключение профаговой ДНК из ДНК бактерии

\* Ген **int** обеспечивает включение фаговой ДНК в геном бактерии (переход в состояние профага)

\* **Механизм лизогении**



\* **Механизм  
установления  
лизогении**



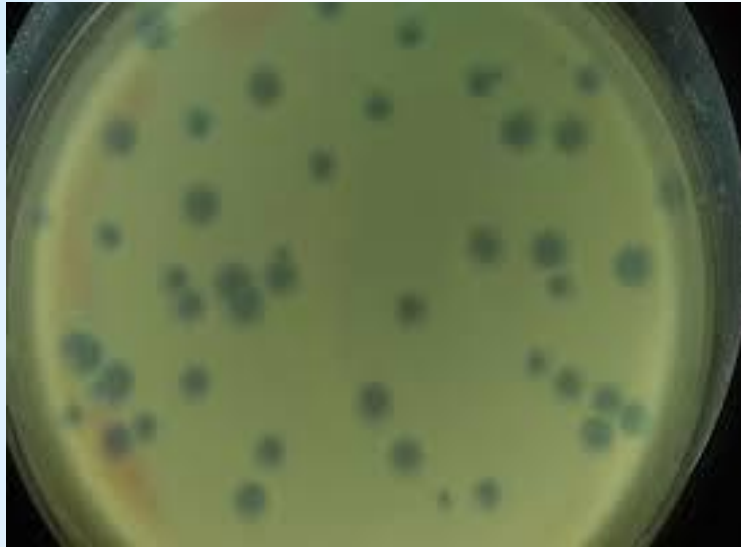
- \* В лизогенной бактериальной клетке на низком уровне происходит синтез репрессора **CI**
- \* Если под действием УФ происходит удаление CI, начинается транскрипция с правого промотора **P<sub>rm</sub>** и левого промотора **P<sub>l</sub>**
- \* Начинается синтез ранних белков **Cro** и **N**, которые индуцируют по ходу и транскрипцию генов **xis** и **Q**
- \* Происходит исключение ДНК профага и синтез поздних белков, сборка фага и лизис клетки

\* **Механизм лизогении**

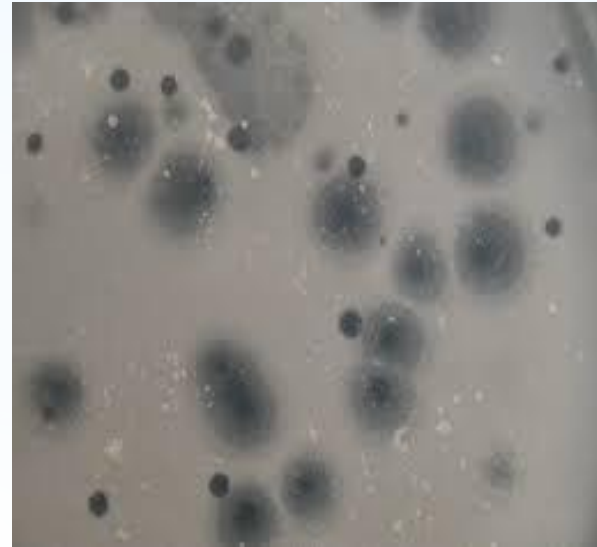
- \* В «голодной» бактериальной клетке находится высокий уровень ц-АМФ, который активирует ген CII , продукт которого стимулирует интенсивный синтез CI, в результате происходит интеграция фаговой ДНК в геном бактерии
- \* Накопившейся белок CI подавляет синтез белка CII и уровень CI находится на уровне поддержания лизогении
- \* При уменьшении концентрации ц-АМФ, синтез белка CII падает. Начинает доминировать синтез белка Cro, а не CI.
- \* Развитие фага идет по литическому пути

\* **Механизм лизогении**

**Вирулентный фаг**



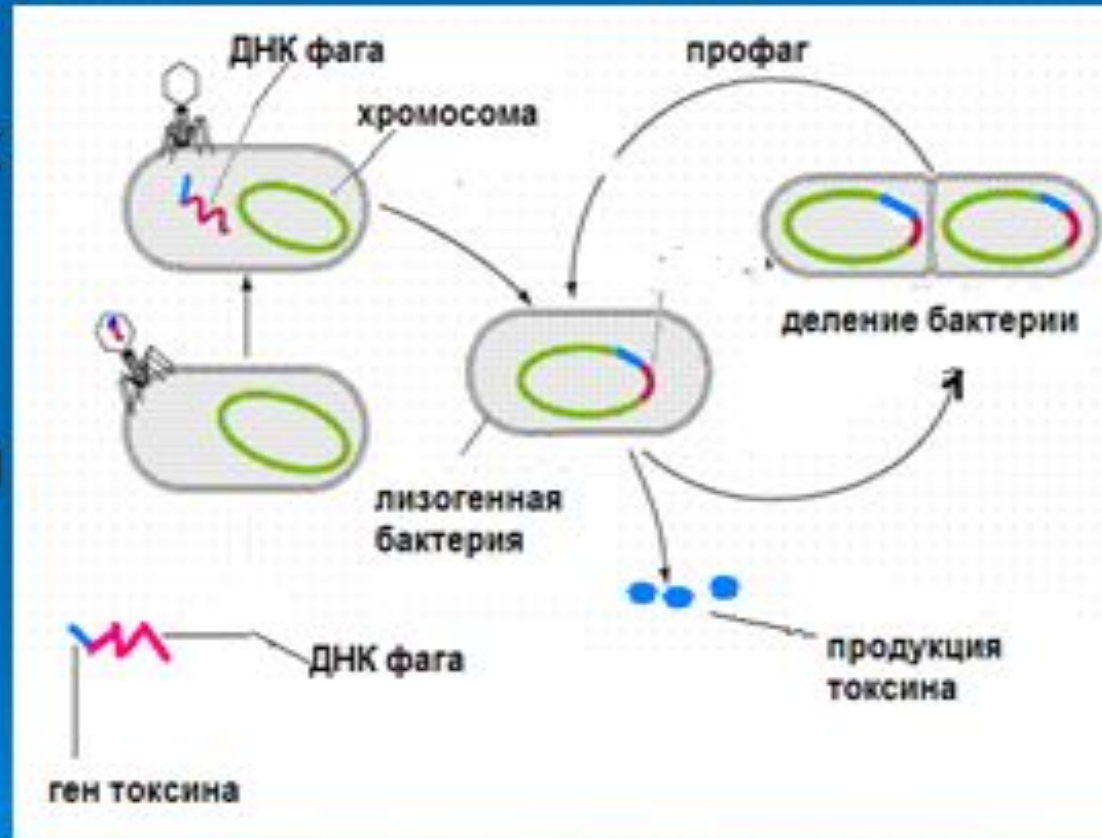
**Умеренный фаг**



**\* Форма бляшек**

# Фаговая конверсия

- Приобретение бактериями новых свойств в результате инфекции умеренным фагом



\* Лизогенная (фаговая) конверсия

\* Фаговая конверсия имеет значение в медицине: лизогенными бактериями вырабатываются эритрогенный токсин возбудителя скарлатины; дифтерийный токсин, ботулинический токсин.

\* У полилизогенной культуры стрептомицетов - продуцентов антибиотиков, содержащей 4 профага, один кодировал синтез антибиотика.

\*

\* Лизогенная (фаговая) конверсия

- \* Благодаря концентрации больших количеств микробных клеток обеспечение стабильности биотехнологических производств зависит от исключения проявления процессов фаголизиса.
- \* Фаголизис могут вызвать как вирулентные фаги, так и умеренные фаги, как при спонтанной индукции профага у лизогенных бактерий, так и при мутациях к вирулентности умеренных фагов.
- \* При использовании для культивирования биообъекта периодического или непрерывного способа культивирования в защищенных (стерильных) условиях решение проблемы фаголизиса заключается в **выборе нелизогенного штамма-продуцента.**

**\* Роль фагов в биотехнологии**

- \* При использовании нового штамма-продуцента предварительно необходимо проводить его тестирование на лизогенность
- \* Для этого используемый штамм подвергается воздействию возможных индуцирующих факторов: УФ, гамма-излучения, химических мутагенов, а также различных концентраций питательных элементов среды культивирования
- \* Если производственно ценные признаки лизогенного штамма превосходят таковые нелизогенного, и его следует использовать в производстве, то для обеспечения стабильности производства необходимо точное соблюдение правил культивирования для исключения спонтанной индукции профага.

**\* Роль фагов в биотехнологии**

- \* Для производства важно определение характера бактериофагов, лизирующей производственную культуру, а также **ИСТОЧНИК** инфицирования фагами.
- \* Основным **ИСТОЧНИКОМ** поступления фагов являются:
  - \* поступающие большие объемы **ВОДЫ**, при высоком коэффициенте разбавления среды в ферментере
  - \* **ВОЗДУХ** при аэробных условиях культивирования
  - \* **сырье**, используемое при культивировании
- \* Роль фагов в биотехнологии

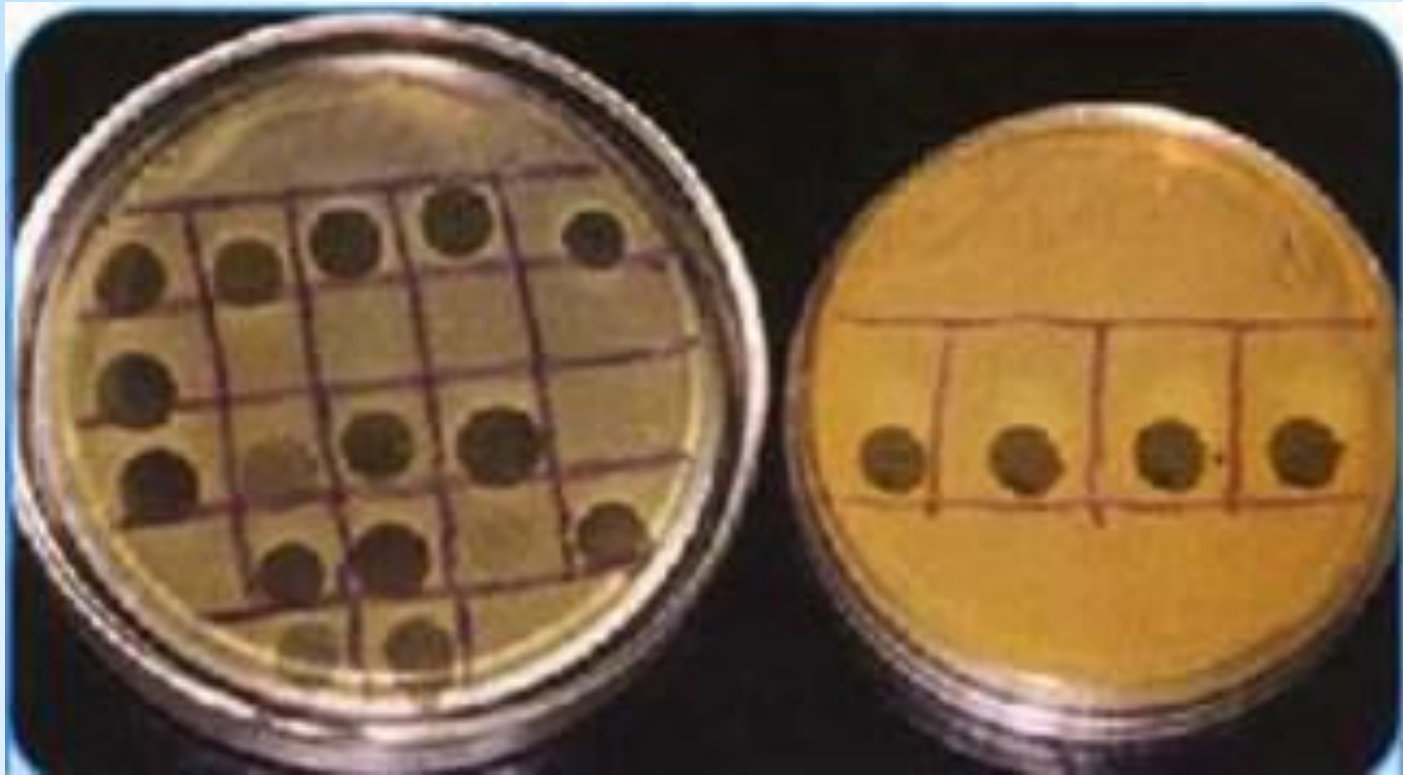


- \* Источником инфицирования производства бактериофагами может быть и сырье, например- молоко при получении молочнокислых продуктов. Поэтому при производстве молочнокислых продуктов, в качестве путей предупреждения развития фага применяют:
- \* Чередование в заквасках штаммов молочнокислых бактерий, нечувствительных к большому количеству типов бактериофагов, обнаруживаемых в биопроизводстве
- \* Исключение из заквасок лизогенных штаммов
- \* Добавление к молоку, используемому в производстве, «иммунного молока», полученного от коров, иммунизированных бактериофагами и содержащего антитела к фагам
- \* Тщательная мойка и дезинфекция оборудования, стен помещений.

**\* Роль фагов в биотехнологии**

- \* Бактериофаги могут быть использованы для диагностики, идентификации выделенных бактерий
- \* На чашку со средой, засеянной чистой культурой возбудителя, наносят различные диагностические бактериофаги. Если бактерия чувствительна к фагу, то образуется зона просветления.
- \* Возбудитель может быть чувствителен к одному или нескольким фагам.
- \* **Спектр чувствительности возбудителя к фагам называют фаготипом**, а метод диагностики - фаготипированием

**\* Практическое использование бактериофагов**



\* фаготипирование

\* Наличие фагов кишечной палочки и возбудителей кишечных инфекций в водоисточниках является показателем их антисанитарного состояния и бактериального загрязнения.

## \* Фаготерапия

\* Препараты бактериофагов точечным ударом справляются с болезнетворными микробами, а уничтожив бактерии, самостоятельно выводятся из организма. Не нарушая работу органов не вызывая побочных эффектов. Для проведения фаготерапии готовят препараты лечебно-профилактических бактериофагов

**\* Практическое использование  
бактериофагов**

лечебно-профилактические бактериофаги - антимикробные препараты, которые содержат высоковирулентные бактериальные фаги и обладают селективным антибактериальным действием

### \*Преимущества:

- \* 1. обладают строгой специфичностью по отношению к чувствительным бактериям.
- \* 2. быстрое действие. (Через 1 час бактериофаги после перорального введения обнаруживаются в крови, через 2 часа - в моче)
- \* Самовоспроизведение. Пораженная клетка продуцирует сотни бактериофагов и лизируется
- \* Полностью удаляются из организма в отсутствие бактерий. чувствительных к фагу. **Бактериофаги - антибактериальные препараты**

**Лечебно-профилактические бактериофаги** - антимикробные препараты, которые содержат высоковирулентные бактериальные фаги и обладают селективным антибактериальным действием

**Преимущества:**

1. обладают строгой специфичностью по отношению к чувствительным бактериям.
2. быстрое действие. (Через 1 час бактериофаги после перорального введения обнаруживаются в крови, через 2 часа - в моче)

Самовоспроизведение. Пораженная клетка продуцирует сотни бактериофагов и лизируется. Полностью удаляются из организма в отсутствие бактерий, чувствительных к фагу.

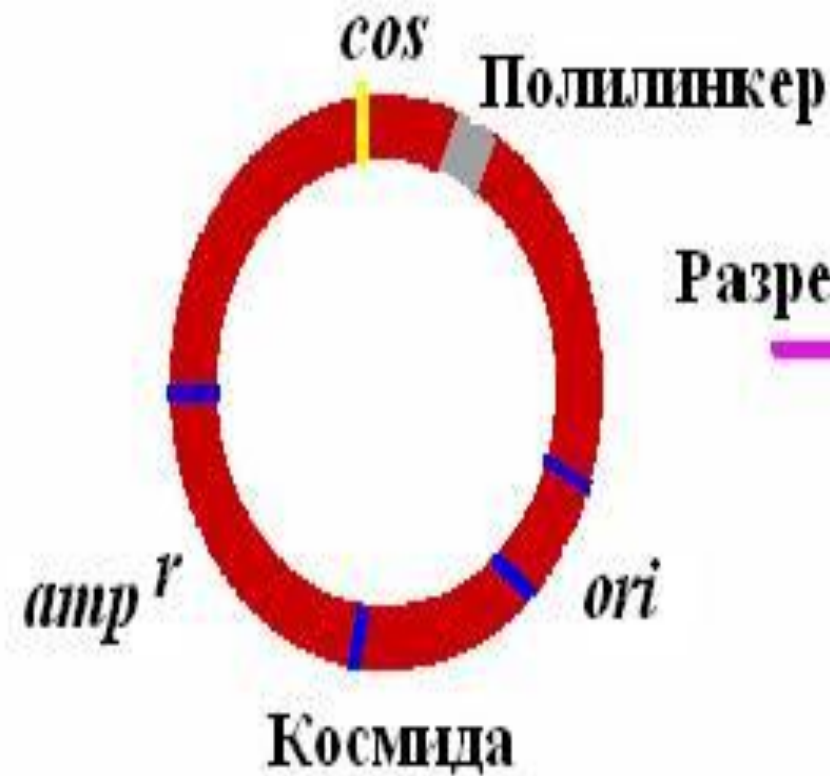
- \* 1. Подбор активных природных фаговых клонов, не способных лизогенировать бактерию и обладающих более широким спектром литической активности в отношении штаммов данного вида бактерий
- \* Накопление фагов путем заражения чувствительных бактерий, их последующего лизиса и выхода нового поколения фагов.
- \* Очистка препарата от бактериального загрязнения
- \* Используемые бактериофаги должны быть **вирулентными и не вызывать фаговой конверсии**
- \* Перспективы - использование литических ферментов, кодируемых геномом фага, способных лизировать клетки патогенных бактерий
  - \* **Технология производства препаратов бактериофаго**

\* **cosmid vector** - космида. Векторная плаزمида <*plasmid*>, содержащая *cos*-участок <*cos-sites*> ДНК фага лямбда, который является местом замыкания его линейной ДНК в кольцо, благодаря наличию *cos*-участка космидная (векторная) ДНК, включившая чужеродные гены, может быть упакована в головку бактериофага; метод клонирования ДНК с использованием К. разработан Дж. Коллинзом и Б. Хольмом в 1977.

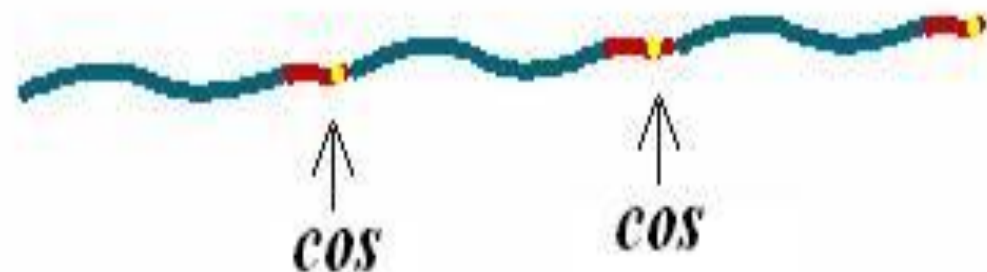
\*

\* **КОСМИДА**





Разрезание полилинкера *COS*



Геном  $\lambda$ -фага

Замещаемый участок  
20 т.п.н.



0

Встраивание ДНК-вставки

49 т.п.н.

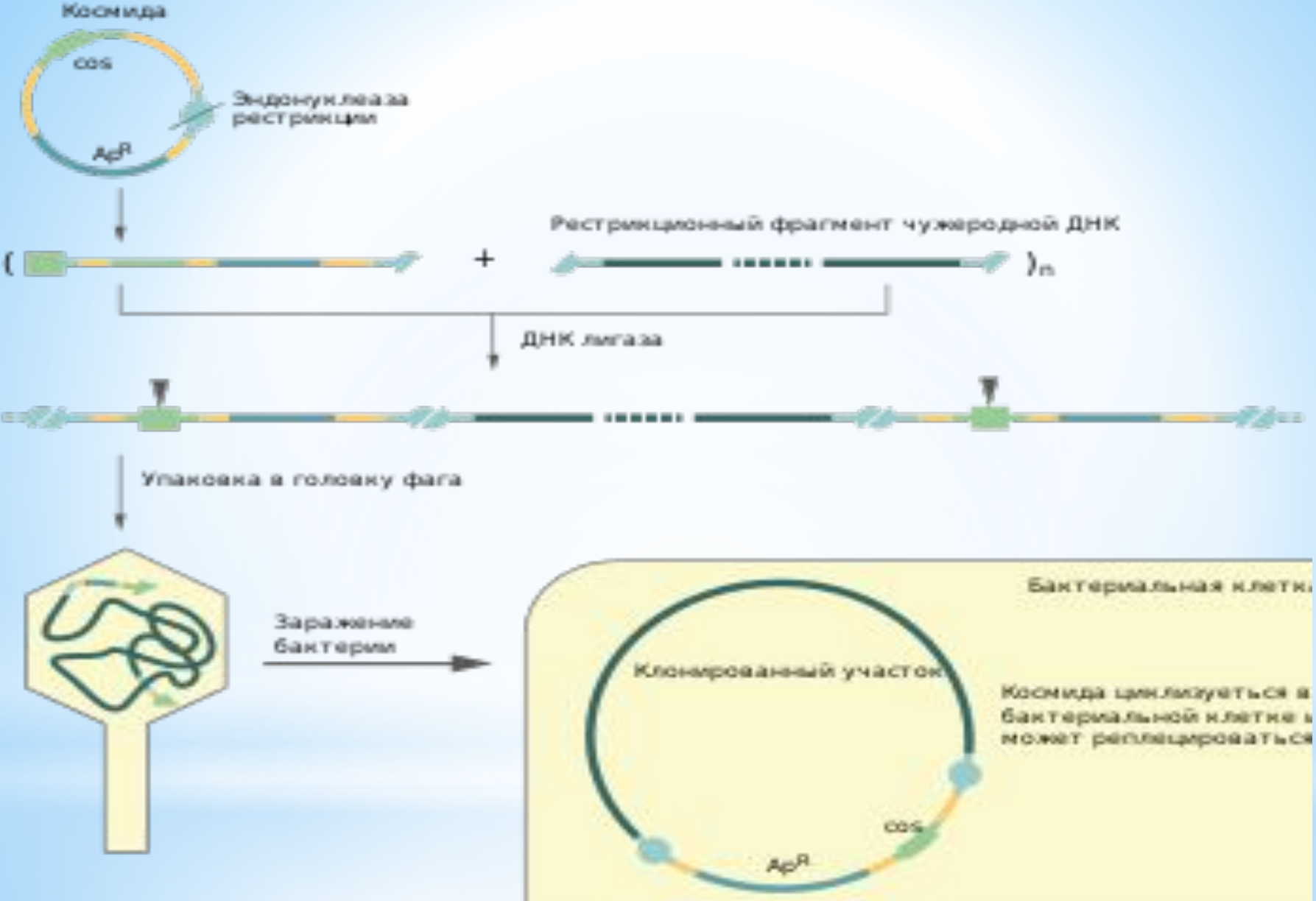


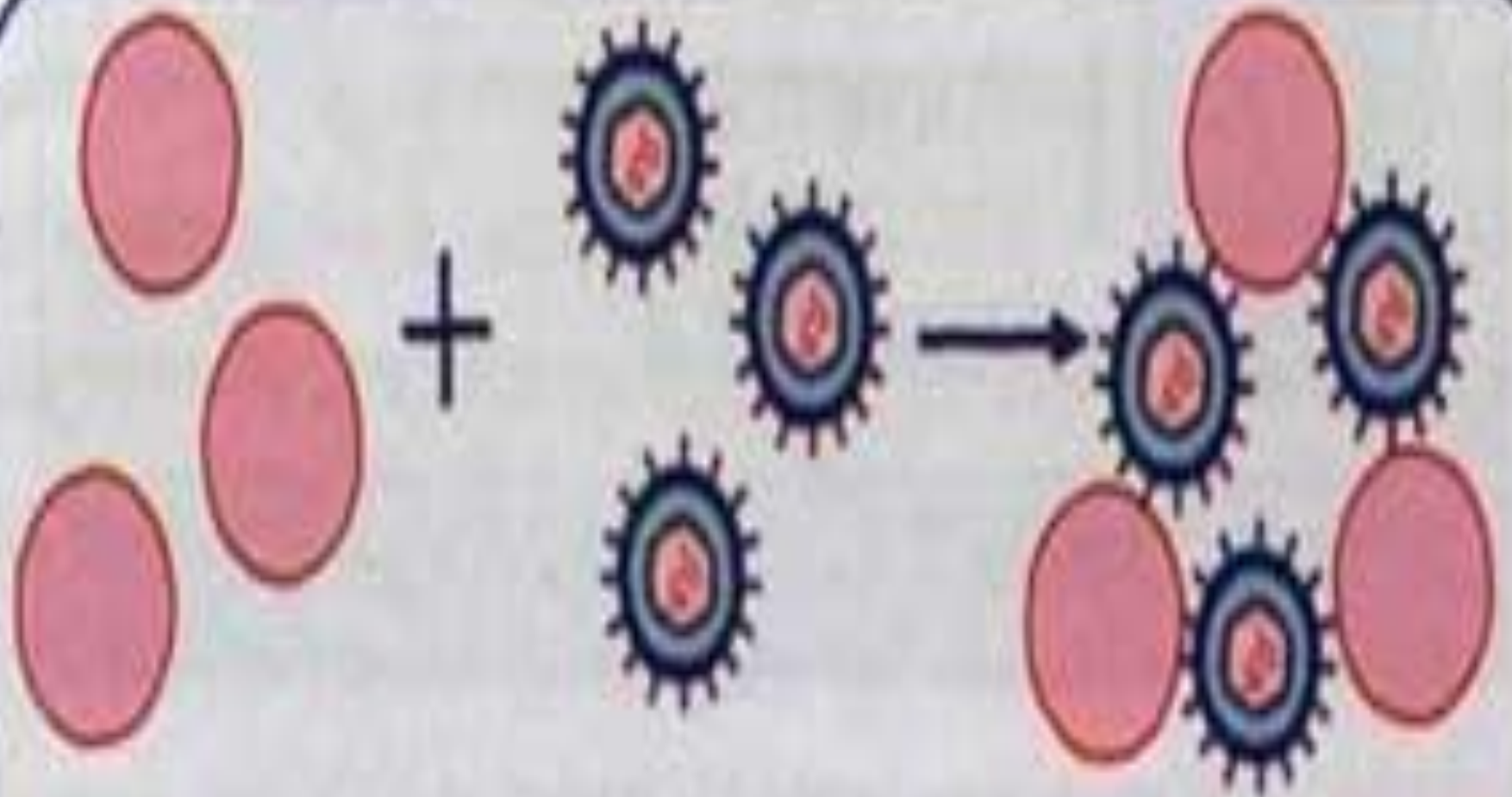
Упаковка и сборка  
фаговой частицы



Инфицирование *E. coli*







Эритроциты

Вирусы

Гемагглютинация

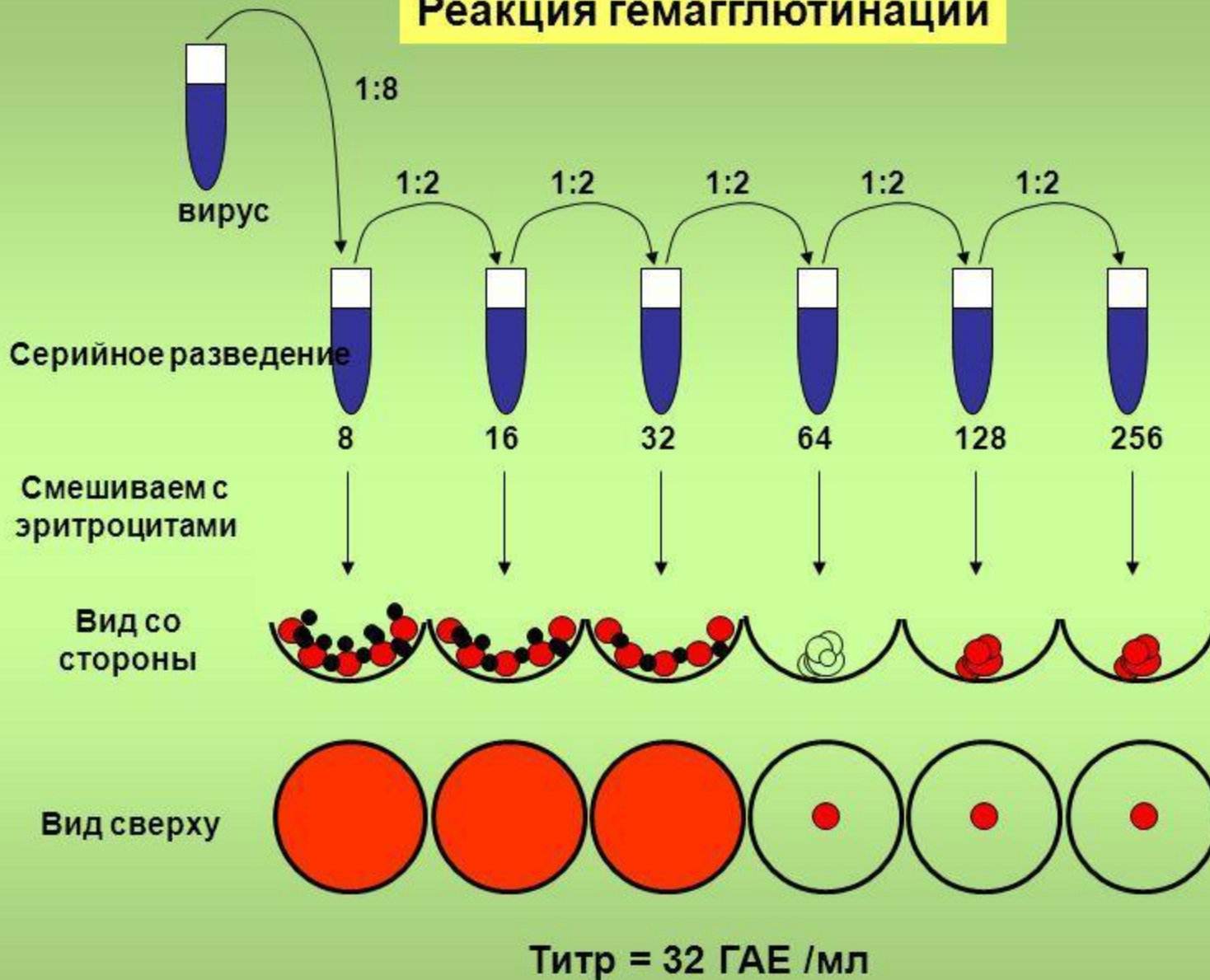
\* Pga

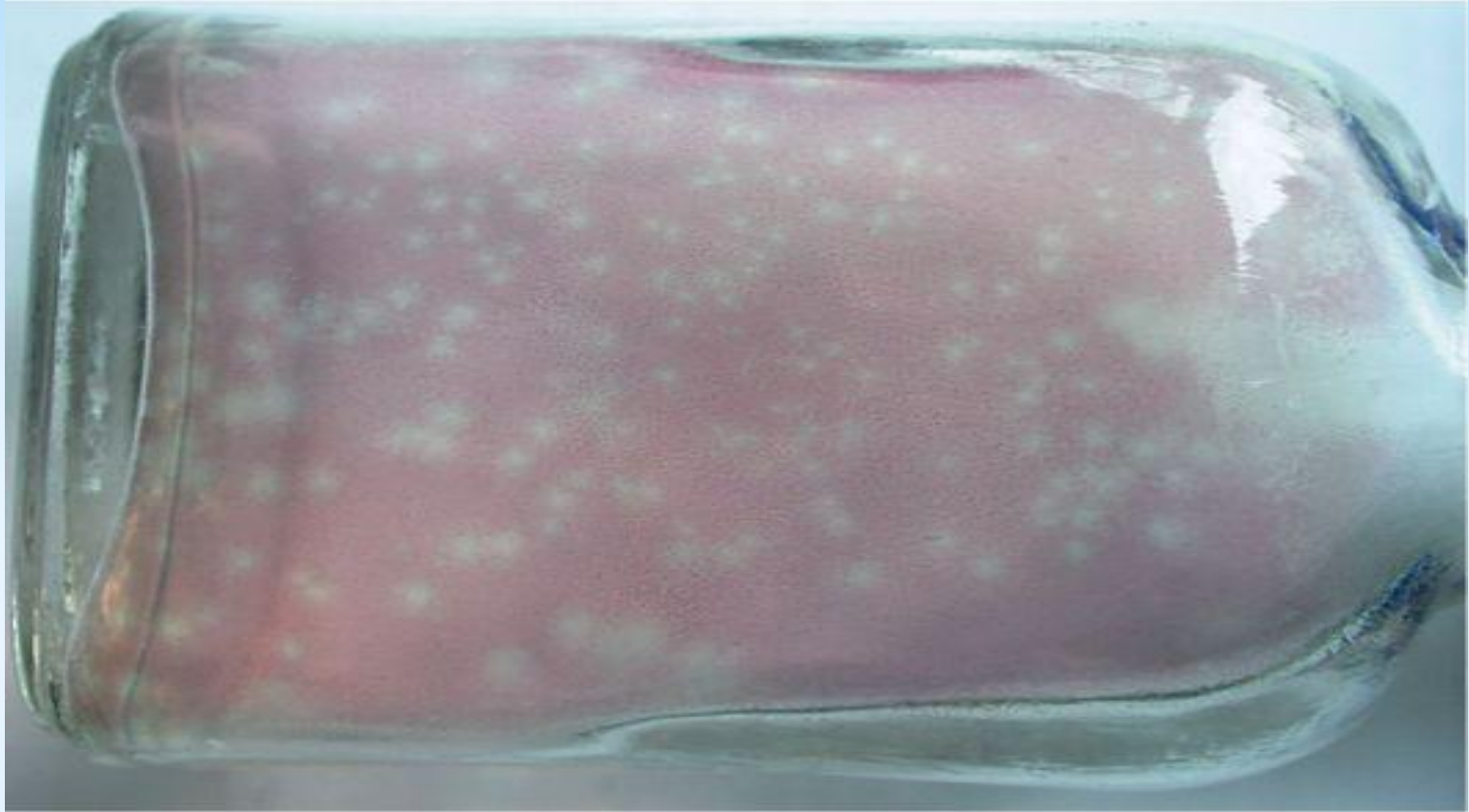
\* РГА позволяет  
обнаружить (провести  
индикацию ) вирус:

\* в зараженном курином  
эмбрионе

\* культуральной  
жидкости зараженной  
вирусом культуре клеток \* **РГА**

# Реакция гемагглютинации





\* **Метод бляшек**

\*Вирионы могут быть реконструированы в пробирке из белка оболочки и нуклеиновой кислоты. Получают структуры, обладающие биологической активностью исходных вирусных частиц, способных к самосборке. Реконструированные белки оболочки могут применяться в качестве строительных блоков для создания нанотрубок, наноконтейнеров

## \*Вирусы и нанотехнология



\* Белок оболочки бактериофага M13 связали с аморфным фосфатом железа, способным обратимо присоединять и отдавать ионы лития. Такой бактериофаг селективно присоединяется к углеродным нанотрубкам, обладающим высокой электропроводностью. Получился аккумулятор, собранный на основе «вирусных» электродов. Благодаря процессу самосборки, электродам можно придать разную форму, встраивая в различные портативные устройства

\* **Вирусы и нанотехнология**

- \* На основе ВТМ было создано цифровое запоминающее устройство. К капсидным белкам вируса присоединили положительно заряженные наночастицы платины, которые были связаны с определенными карбоксильными и гидроксильными группами белков. При приложении электрического поля заряды перемещаются от оболочки к РНК или наоборот, но находятся все время в вирусной частице.
- \* Вирус стал элементом энергонезависимой цифровой памяти

## \* Вирусы и нанотехнология