

## Genetica virală

## GENOM VIRAL

- acid nucleic viral: ADN / ARN
- menține și transmite informația genetică virală la descendenți

## GENOTIP VIRAL

- grecesc *gennaō* = a da naștere
- recunoaște caracterele potențiale specific virale
- exprimare în unele condiții de mediu, în caractere fenotipice
- nu se suprapune în totalitate genomului viral
- modificările de genotip – se transmit descendenților

## FENOTIP VIRAL

- grecesc *phainomenon* = ceea ce apare
- totalitatea caracterelor ce pot fi observate
- genă codantă → caracter fenotipic
- modificările în fenotip – nu se transmit descendenților

## caracterele fenotipice se referă la:

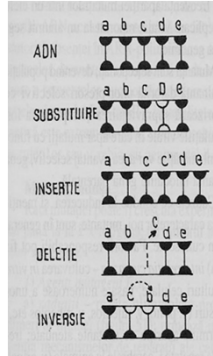
- patogenitate – induc sau nu stare de boală
- virulență – grad de agresivitate
- spectrul de gazde
- tropism tisular
- caractere de cultivare
  - *in vitro*
    - tip de cultură celulară
    - temperatură de cultivare
    - prezența unor ingrediente în mediu
    - tip de ecp, etc.
  - *in vivo*
    - capacitatea de a induce sau nu boală la animal
  - OGE – leziuni specifice

## VARIAȚIA GENETICĂ VIRALĂ

- Apare prin:
  - mutații
  - interacțiuni virale:
    - genotipice
    - fenotipice

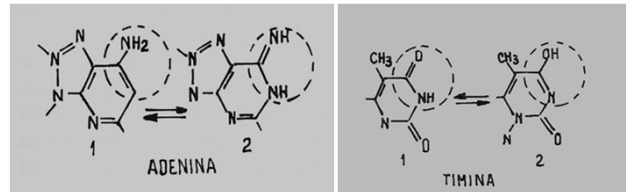
## MUTAȚIA ȘI MUTANTE CU INTERES MEDICAL

- **MUTAȚIA = alterarea stabilă a uneia sau mai multor gene, transmisă constant la descendenți → MUTANȚI**
- **urmare a modificării structurii ADN prin:**
  - Substituire
  - Inserție
  - Deleție
  - Inversie



## SUBSTITUIRE – înlocuirea unei baze nucleotidice cu alta prin:

- transversie PU→PI; PI→PU
- tranziție PU→PU; PI→PI



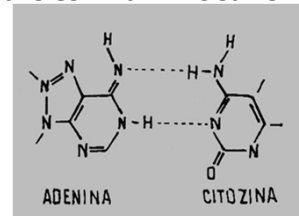
1.config.normală; 2.config.tautomerică (rară)

## MECANISMELE MOLECULARE ALE MUTAȚIEI

- 1. erori în replicarea acizilor nucleici**
  - funcționare defectuoasă a ARN sau ADN polimerazelor → sinteza incorectă a catenelor
  - frecvența mai mare de erori la ARN-polimeraze
  - ADN-polimeraza are mecanisme de corectare *proof reading*: domeniu cu activitate exonucleazică (clivează și elimină secvențele incorecte)

## MECANISMELE MOLECULARE ALE MUTAȚIEI

- exemplu:
- **forma tautomerică a adeninei se va cupla incorect cu citozina în locul timinei**



## MECANISMELE MOLECULARE ALE MUTAȚIEI

### 2. erori de transcriere sau translație

- **ARNm transcris greșit → proteine modificate**
- **codoni ce codifică greșit aminoacizii → proteine cu aa lipsă**

## MECANISMELE MOLECULARE ALE MUTAȚIEI

### 3. procese reparatorii după lezarea acidului nucleic

- **lipsuri mari în secvențele nucleotidice**
  - completate uneori incorect → catena restantă, incompletă → catene diferite → **MUTANȚI**

## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

### 1. după numărul de secvențe nucleotidice afectate:

- mutații punctiforme – o singură pereche de baze
- mutații multisituate – mai multe perechi nucleotidice

## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

### 2. după modul de apariție

#### a. mutații spontane:

- modificarea unor caractere într-o populație de virus sălbatic și transmiterea la descendenți
- presori selectivi favorizează supraviețuirea și replicarea descendenților → populație dominantă

## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

### - cauze puțin cunoscute

- ⊙ interrelația cu gazda
  - \*pasaže numeroase pe culturi de celule, schimbarea gazdei naturale sau a căii de intrare → mutante atenuate
  - \*tregeri repetate pe animal → mutante virulente
- ⊙ interrelații de microbiocenoză: vaccin polio atenuat – intestin – selecția de revertanți neurovirulenți sau mutanți neurovirulenți ai unor enterovirusuri
- ⊙ tipul de virus – rata mutației spontane la virusuri ARN este mare 10<sup>-3</sup>/10<sup>-4</sup>

## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

### ■ b. mutații induse

- intervin agenți mutageni:

- ⊙ agenți mutageni fizici
  - ♦ temperatura

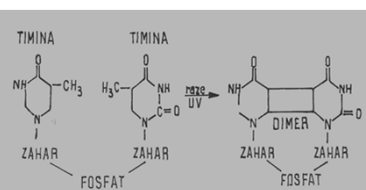
Cultivare tulpini virale sălbatice la temp. de 40°C sau 25-35°C → mutanți termosensibili

## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

### ♦ radiații

UV – produc dimeri ai timinei → intervenția mec. de reparații ale catenei de ADN cu deleții de baze azotate

X și ionizante ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) – rupturi ale acizilor nucleici → eliberare de radicali hidroxilanți liberi → oxidări



Formarea dimerilor sub acțiunea radiațiilor UV (Boyd, 1984)

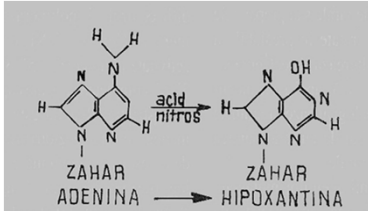
## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

- ⊙ agenți mutageni chimici

- ♦ modificări ce duc la apariția de baze nucleotidice anormale → defecte în legarea bazelor

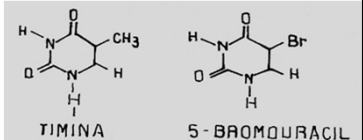
## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

Exemplu: acid nitros, hidroxilamina; acidul fenic depurinează adenina și guanina; etilmetansulfonatul (agent alchilant) adaugă bazelor ADN grupe etil sau metil



## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

- ♦ încorporare în acizii nucleici, în timpul replicării, de analogi ai bazelor nucleotidice
  - baze purinice similare cu 2-aminopurina
  - baze pirimidinice similare cu 5-bromouracil, 5-fluorouracil, 4-bromodeoxipirimidină



## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

- ♦ deleții sau inserții de baze azotate datorită unor agenți intercalanți (proflavină, coloranți acridinici)

## CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

- ⊙ mutageneza prin inginerie genetică strategii precise de modificare a genelor
- ♦ mutageneza prin deleție/substituție
  - eliminarea unor secvențe precise din molecula de ADN cu nucleaze ce digeră porțiunile dorite
- ♦ mutageneza prin explorare cu linkeri (linker scanning mutagenesis)
  - producerea succesivă de deleții și substituiri
- ♦ mutageneza prin intermediul oligonucleotidelor de sinteză
  - oligonucleotidele sunt sintetizate ca secvențe scurte de duplexuri ADN sau secvențe monocatenare și sunt utilizate în diferite modalități

## REVERSIA

- mutațiile pot fi reversibile → revenire la genotipul original = REVERTANȚI
- apare prin SUPRIMARE – datorită unei alte mutații ce reface fenotipul parental prin:
  - supresie intragenică – mutație în aceeași genă la alt situs
  - supresie intergenică – noua mutație situată pe altă genă

## TIPURI DE MUTANȚI

- caracterele modificate prin mutații = MARKERI
- mutanți cu mutații silențioase – afectate gene neesențiale
- mutanți cu mutații letale – afectate gene esențiale
- mutanți cu caracter condiționat letal

## TIPURI DE MUTANȚI

- **mutanți termosensibili – marker ts**
  - factor presor temperatura
  - selectate populații virale ce se multiplică la temperaturi nepermissive
  - sintetizate proteine modificate care asigură supraviețuirea
  - cultivare ulterioară la alte temp. → urmări letale
  - mutante „reci” → pt. vaccinuri virale atenuate vii (polio, rujeolă, rubeolă etc.)
- **mutanți sensibili la frig (cold sensitive) – marker cs**
  - selectate tulpini la temperaturi crescute

## TIPURI DE MUTANȚI

- **mutanți dependenți de gazdă (host dependent) – marker hd**
  - cultivare seriată pe culturi de celule nepermissive → mutanții nu mai pot cultiva pe substratul permisiv pt. tulpinile sălbatice parentale
  - cultivare pe celule capabile să suprime mutațiile *nonsens*

## TIPURI DE MUTANȚI

- **mutanți morfologici – care produc modificări diferite în culturi de celule sau pe OGE**
- **mutanți rezistenți la anticorpi – eludează răspunsul imun al gazdei**
- **mutanți rezistenți la substanțele antivirale → terapie asociată**

## TIPURI DE MUTANȚI

- **mutanți de patogenitate – marker P**
  - patogenitate exacerbată – treceri succesive pe gazde umane
  - patogenitate atenuată – acțiune combinată a 2 factori
    - cultivare la temp. suboptimale și treceri repetate pe celule îndepărtate filogenetic de celula-gazdă

## INTERACȚIUNI VIRALE GENOTIPICE - RECOMBINAREA

- **aport de material genetic exogen**
- **schimburi de segmente genomice între virusuri diferite ce parazitează aceeași celulă-gazdă**
- **obligatorie omologia structurală**
  - NU între ADN și ARN
  - DA între tulpini diferite ale aceluiași ADN (adeno – polio)
- **rezultă RECOMBINANȚI – cu structură genomică diferită de cea parentală**

## MECANISME DE RECOMBINARE

- **1. RECOMBINAREA INTRAMOLECULARĂ**
  - nu a fost descrisă la virusuri genom d.c. sau de sens negativ
  - retrovirusuri cu genom diploid – rată înaltă de recombinare

## MECANISME DE RECOMBINARE

### ■ 1. a.

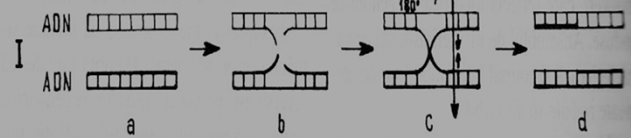
*prin ruperi și asocieri* de acizi nucleici parentali + încrucișare reciprocă (crossing over) + schimbări de conformație și orientare spațială;

- descrisă la virusuri ADN, adeno, herpes, poxvirusuri

## MECANISME DE RECOMBINARE

### ■ 1. a.

#### RUPERE SI ASOCIERE



- a. alăturare de secvențe omoloage;
- b. rupere de secvențe omoloage;
- c. reunirea secvențelor omoloage de pe catene omoloage;
- d. recombinanți rezultați;

## MECANISME DE RECOMBINARE

### ■ 1. b.

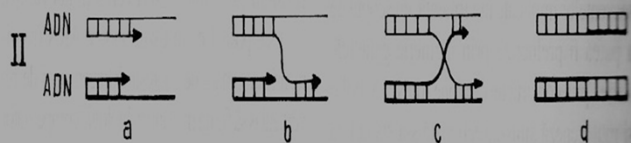
*copiere alternativă (copy-choice)* de către polimeraze a două catene matrice alăturate în cursul replicării virale;

- descrisă la virusuri ARN cu genom nesegmentat de sens pozitiv : polio, coronavirus, v. aftos etc.

## MECANISME DE RECOMBINARE

### ■ 1. b.

#### COPIERE ALTERNATIVA



- a. sinteză de catene noi;
- b-c. Răsucire și copiere de pe cealaltă catenă;
- d. recombinanți rezultați

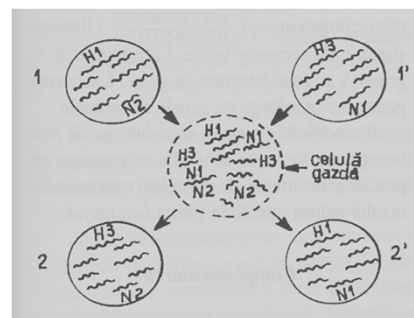
## MECANISME DE RECOMBINARE

### ■ 2. REASOCIEREA (REASORTAREA) GENOMICĂ

- descrisă la virusuri cu genom segmentat plurimolecular, taxonomic înrudite: v.gripale, reovirusuri, arenavirusuri
- reasortarea subunităților genomice constituyente, prin replicarea în aceeași celulă-gazdă
- morfogeneză - segm.genomice parentale diferite – împachetate în aceeași nucleocapsidă

## MECANISME DE RECOMBINARE

### ■ 2. REASOCIEREA (REASORTAREA) GENOMICĂ



## MODALITĂȚI DE RECOMBINARE

### ■ A. Reactivarea multiplă

- la virusuri cu potențial recombinant mare:  
v.gripal, poxvirus

- tulpini inactivate – genom viral inactivat  
neomogen – intrare în celula gazdă în număr  
mare – recombinare și reasortare → virus  
nou, infectant care se replică

## MODALITĂȚI DE RECOMBINARE

### ■ B. Reactivare încrucișată

- celulă – virus activ + virus cu genom  
parțial inactivat – recombinare → virus  
nou cu markeri ai virusului inactivat și  
genomul virusului activ

## RECOMBINAREA CU STRUCTURI DE GENOM CELULAR

### ■ 1. recombinări cu material genomic din celula-gazdă

- ex. retrovirusuri oncogene –  
captează protooncogenele celulare –  
le încorporează în propriul genom

## RECOMBINAREA CU STRUCTURI DE GENOM CELULAR

### ■ 2. modificări genomice ale celulei- gazdă

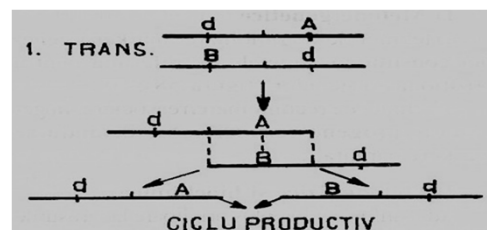
- încorporare de material viral  
- mai ales la virusuri ale plantelor

## INTERACȚIUNI VIRALE FENOTIPICE - COMPLEMENTAREA

- celula-gazdă – 2 virusuri (unul sau  
ambele cu genom incomplet) – își  
suplinesc reciproc produsele codificate  
de gene lipsă
- a. unul sau ambii mutanți defectivi în  
gene diferite (poziție *trans*)
  - genele nemutante suplinesc biosinteza  
proteinelor necesare replicării

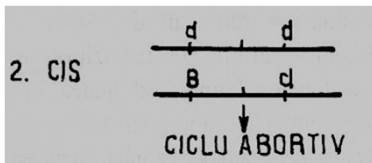
## INTERACȚIUNI VIRALE FENOTIPICE - COMPLEMENTAREA

- a. unul sau ambii mutanți defectivi în  
gene diferite (poziție *trans*)
  - genele nemutante suplinesc biosinteza  
proteinelor necesare replicării



### INTERACȚIUNI VIRALE FENOTIPICE - COMPLEMENTAREA

- **b. ambii mutanți defectivi în aceeași genă (poziție *cis*)**
  - nu se realizează complementaritate ⇒
  - nu se sintetizează produsele deficiente ⇒
  - multiplicarea nu are loc



### RELAȚII INTERVIRALE NEGENETICE - AMESTECUL FENOTIPIC

- **infecție mixtă cu virusuri înrudite**
  - ⇒ virusuri în a căror capsidă sunt
  - încorporate aleator proteine
  - codificate de ambii parentali

### RELAȚII INTERVIRALE NEGENETICE - AMESTECUL FENOTIPIC

- **transcapsidarea**
  - la virusuri neînvelite: picorna, polio tip 1,2, echo, coxsackie
  - maturare defectuoasă: capsida unui parental învelește genomul celuilalt

### RELAȚII INTERVIRALE NEGENETICE - AMESTECUL FENOTIPIC

- **formarea pseudotipurilor**
  - la virusuri cu înveliș
  - nucleocapsida unuia poate fi învelită în anvelopă cu glicoproteine codificate de celălalt

### RELAȚII INTERVIRALE NEGENETICE - AMESTECUL FENOTIPIC

- **poliploidia**
  - la virusuri învelite: paramyxo, myxo
  - mai multe nucleocapside încorporate în același înveliș

### RELAȚII INTERVIRALE NEGENETICE - INTERFERENȚELE

- **coinfecția unei celule cu două virusuri** ⇒ inhibiția replicării unuia dintre virusuri
- **este independentă de răspunsul imun**

## RELAȚII INTERVIRALE NEGENETICE - INTERFERENȚELE

- după virusurile implicate
  - interferență heterologă (intrinsecă) – între virusuri neînrudite: polio, rubeolos etc
    - ambele virusuri active, infectante
    - mecanisme: inactivarea replicazei de către unul din virusuri sau alterarea unor proteine cu rol în translație
  - interferență homologă – între virusuri înrudite
    - unul din virusuri poate fi inactivat
    - mecanisme: inhibiție adsorbție, particule defective, autointerferență
  - autointerferență
    - inocule concentrate cu un singur virus – mutante ale virusului complet – particule interferent defective (au genom incomplet)

## RELAȚII INTERVIRALE NEGENETICE - INTERFERENȚELE

- mecanismele interferenței virale:
  - inhibiția adsorbției pe celulă
    - blocare de receptori – enterovirus
    - distrugere de receptori – orthomyxovirus
  - concurența pentru componente ale aparatului de replicare
  - blocarea replicării prin mutante defective
    - la v. ADN – herpes, pox
    - la v. ARN - orthomyxo, paramyxo, rhabdo, toga
    - particula defectivă se leagă selectiv de o replicată virală din particulele virale complete ⇒ inhibată replicarea particulei complete
  - producerea unui inhibitor ca interferonul = interferență extrinsecă
    - declanșată de primul virus
    - previne replicarea celui de al doilea