



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ, ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ**



ЦЕНТАР ЗА ПРЕКЛИНИЧКА ИСПИТИВАЊА БИОАКТИВНИХ СУПСТАНЦИ (CPCTAS)

<http://cpctas-lcmb.pmf.kg.ac.rs>

ЛАБОРАТОРИЈА ЗА ЋЕЛИЈСКУ И МОЛЕКУЛАРНУ БИОЛОГИЈУ



<https://www.pmf.kg.ac.rs/lcmb/>

КОРОНА ВИРУСИ ПРЕХЛАДЕ У ИНТЕРАКЦИЈИ СА ХУМАНИМ ГЕНОМОМ-МИКРОБИОМОМ-ВИРОМОМ

Доц. др Снежана Марковић

Асис. др Милена Милутиновић

Истраживач-сарадник, докторанд: Данијела Никодијевић

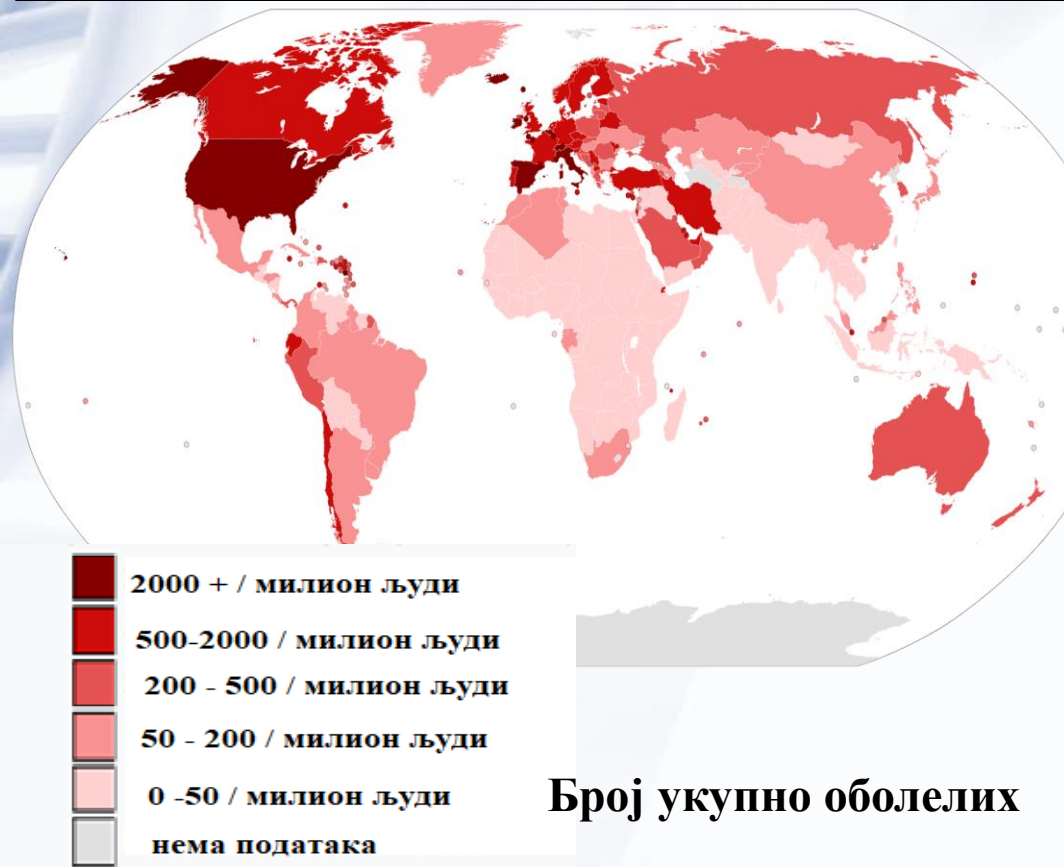
**Истраживачи приправници, докторанди: Јована Јованкић, Милена Јовановић, Александра
Никезић, Невена Планојевић, Стефан Благојевић, Маја Ћупурдија**

Докторанд: Дејан Арсенијевић

- **ТЕМА: Корона вируси у интеракцији са хуманим геномом-микробиомом-виромом**
- **ПОДТЕМЕ:**
- **Основне информације о актуелној пандемији и вирусном узрочнику SARS-Cov2 и болести коју изазива Covid-19 (*Corona Virus Infectious Disease 2019*)**
- **Хумани геном – информације засноване на *Human genome project***
- **Хумани микробиом – информације засноване на *Human microbiome project***
- **Хумани виром, подела, структура и основна улога**
 - **Молекуларни механизми ћелије**
 - **репликација за умножавање наследних молекула ДНК вируса**
 - **реверзна транскрипција – репликација – транскрипција, за умножавање наследних молекула РНК вируса**
 - **Лизогена и литичка фаза животног циклуса вируса**
 - **Употреба РНК вируса у трансфекцији и генској терапији**
 - **Имуни систем и вирами**
- **Молекуларни механизми преноса информација између вирома и генома прокариотских и еукариотских ћелија. Место-специфичне рекомбинације**
- **Корона вируси прехладе – основне карактеристике РНК генома, механизми инфекције специфичних ћелија респираторног тракта, животног циклус**
- **Молекуларне методе детекције корона вируса и специфично детекција SARS-Cov2. Потенцијалне методе лечења инфекције SARS-Cov2**
- **Како разумети вирусе и људски сарађивати са виромима у циљу одржања равнотеже организма човека и екосистема Земље**

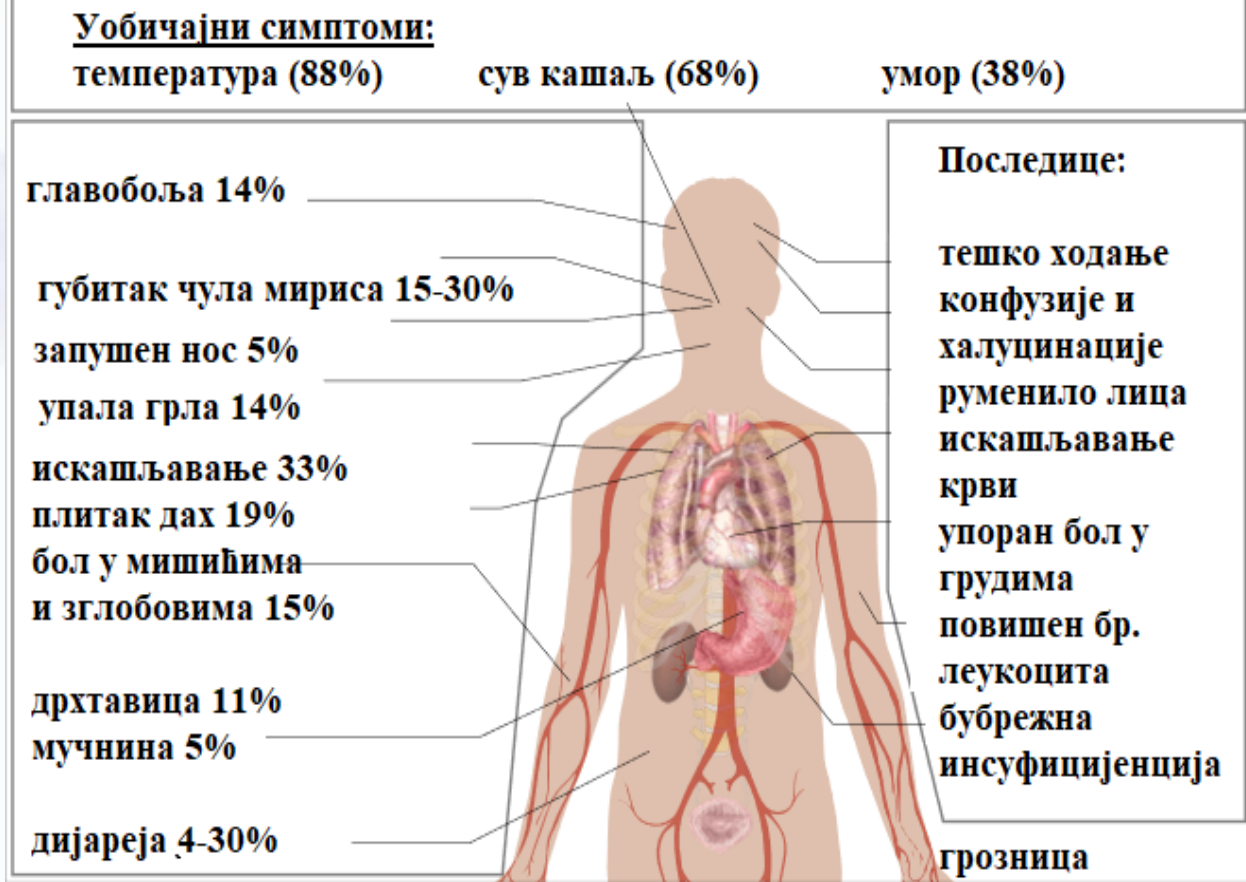
Основне информације о актуелној пандемији, вирусном узročнику SARS-Cov2 и болести коју изазива - Covid-19 (*Corona Virus Infectious Disease 2019*)

- Пандемија корона вируса 2019-2020. године је инфекција корона вирусом (SARS-CoV-2) са пратећим симптомима респираторних инфекција и тешког акутног респираторног синдрома, као и других болести које изазива овај вирус – *Corona Virus Infections Disease, Covid-19*
- Пандемија је започела као епидемија изазвана вирусом у Вухану, главном граду провинције Хубеи у Кини, у децембру 2019. године, а прерасла је у јавно здравствено стање од међународног значаја



- У Европи, инфекција вирусом се иницијално појавила у Италији у јануару 2020. године, одакле се проширила на остале Европске државе. Најтеже погођене државе Европе су Италија и Шпанија, са највећим бројем оболелих и бројем смртних случајева. На глобалном светском нивоу највећи број оболелих и смртних случајева је у САД
- Светска здравствена организација (енгл. *World Health Organization, WHO*) је крајем јануара 2020. године прогласила међународну забринутост за јавно здравље поводом ширења вируса, а 11. марта 2020. прогласила је глобалну епидемију корона вирусом (Covid-19)

- Идентификован је **РНК вирус** који изазива **респираторне инфекције и акутни респираторни синдром (SARS-CoV-2)**
- Тежи облик болести развијају особе старије од 55 година, мушког пола, са нарушеним имуним системом и већ постојећим медицинским проблемима (кардиоваскуларне болести, дијабетес, хроничне респираторне болести)
- Деца, млади и психо-физиолошки здрави људи су релативно имуни на инфекцију и не показују изражене симптоме
- Уобичајни и најчешћи симптоми су приказани на слици
- Период инкубације (време између инфекције и појаве симптома) креће се од 1-14 дана (~ 5 дана)

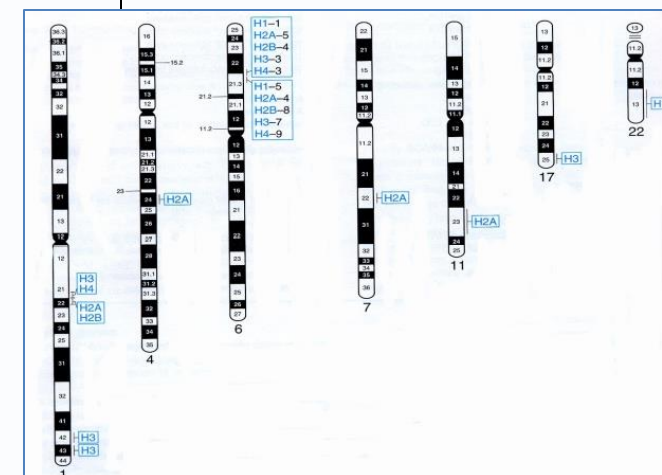
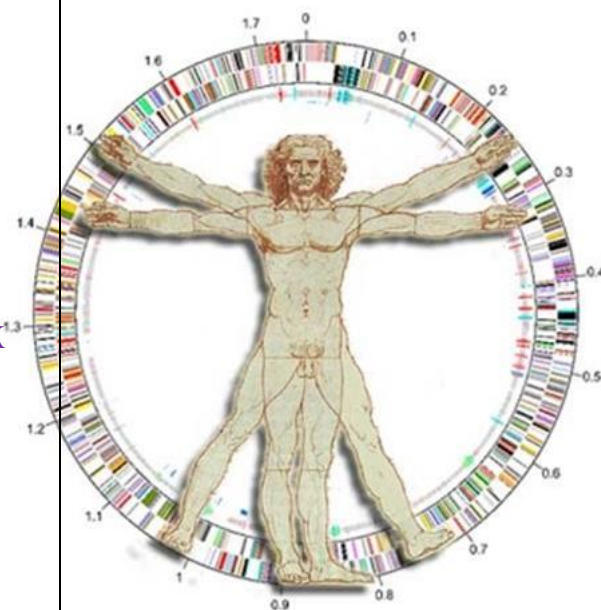


Лечење:

- У овом тренутку не постоје вакцина или специфични антивирусни лекови против SARS-Cov2.
- У недостатку вакцина примењивани видови терапије су: антивирални лекови, примена високог протока кисеоника, механичка вентилација, кортикостероиди, хидроксихлороквин, тоцилизумаб, интерферони, интравенски имуноглобулини
- Терапија крвном плазмом особа које су оздравеле након инфекције – **плазма је обогаћена интерферонима и специфичним антителима на SARS-CoV-2.**

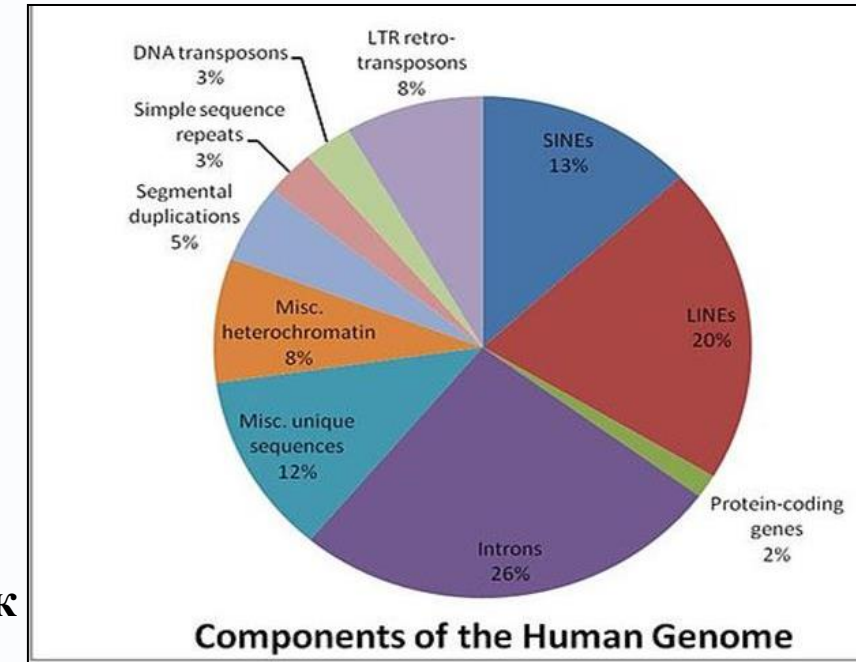
Хумани геном – информације засноване на *Human genome project*

- Да бисмо упознали ефекте РНК вируса SARS-CoV-2 на човека, морамо разумети структуру информативних ДНК и РНК молекула самог човека
- “ПОЗНАЈ ДРУГОГ, КАО СЕБЕ САМА”
- Информативни ДНК и РНК молекули човека су лоцарини у оквиру генома еукариотских ћелија (**Хумани геном**), микробиома прокариотских ћелија (**Хумани микробиом**), који садрже и виралне ДНК и РНК молекуле (**Хумани виром**)
- Информативни ДНК и РНК молекули човека омогућавају **молекуларне основе свих животних процеса – у основи су живота**
- **Геном човека је укупан наследни материјал еукариотских ћелија, хаплоидног сета хромозома – 22 аутозома и оба полна (X и Y) хромозома;**
- **Human genome project** – је реализован 1990-2006. г., са циљем утврђивања броја и редоследа нуклеотида у ДНК молекулама еукариотских хромозома једра и митохондрија, као и функционално мапирање ДНК секвенци
- Хумани геном се састоји од једарног генома (24 хромозома) и митохондријског генома (митохондрион)
- Хумани геном се састоји од око 3.2 милијарде базних парова
- **Геном једра се састоји се од генских и интергенских секвенци ДНК**
- Функционално, хумани геном се карактерише бројем гена који кодирају функционални продукт (РНК молекуле), а део ових гена носи информацију за синтезу протеина. **Укупан број гена је нешто мањи од 22000.**
- **Гени који кодирају протеине су дисконтинуирани – кодирајући (егзони) и не кодирајући региони (интрони – носе информацију за синтезу микро РНК)**
- **ДНК секвенце егзона чине око 1.5% укупног генома**



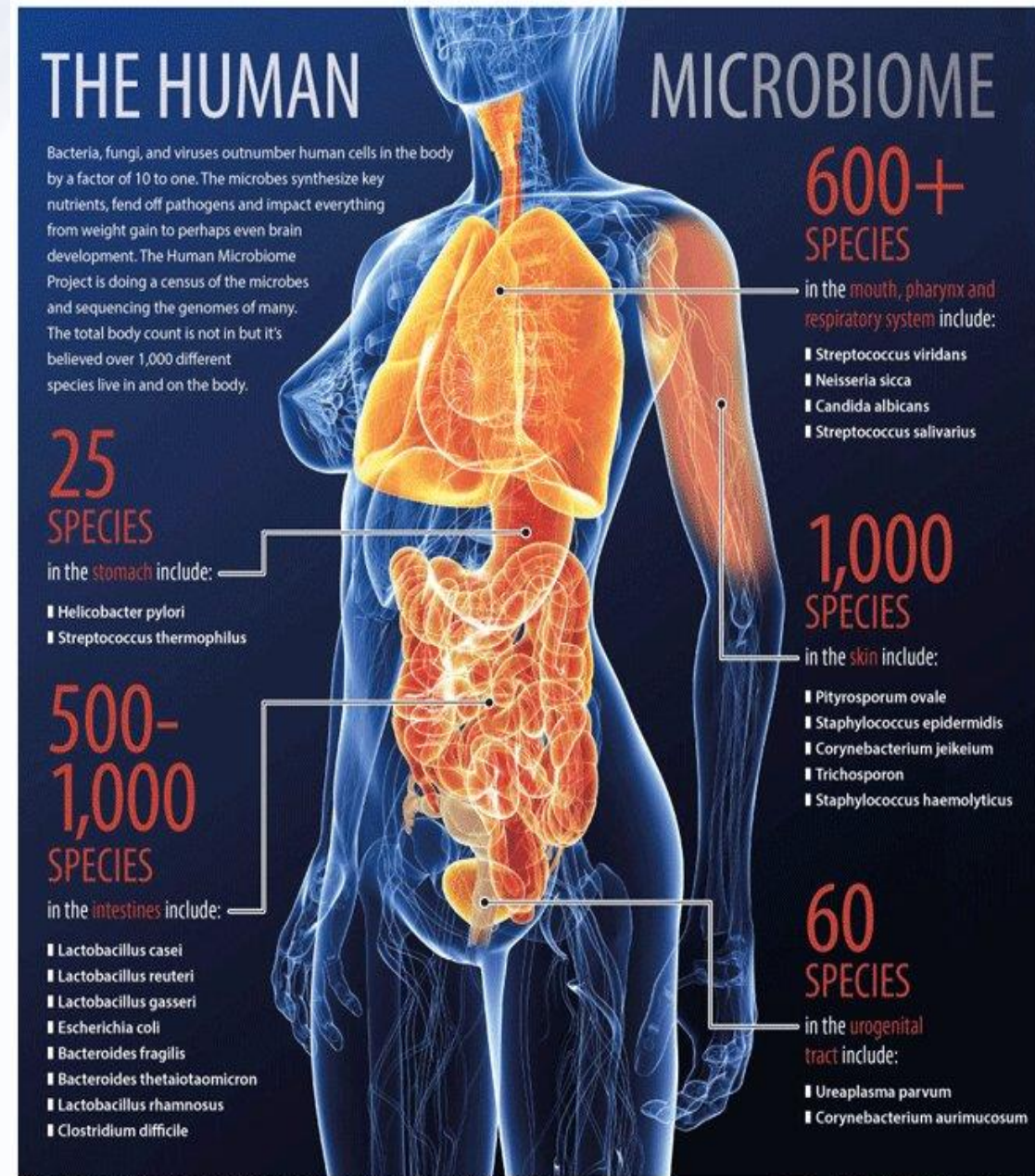
Хумани геном – информације засноване на *Human genome project*

- **Генске секвенце** су организоване као појединачни гени или су груписане у оквиру генских фамилија (за глобине, имуноглобулине, и сл.); генске фамилије су настале дупликацијама предачких гена
- У геному постоје и преко 20,000 псеудогена, оштећених и мутираних гена који не дају функционалне продукте – РНК; ово су реликти генома
- **ИНТЕРГЕНСКЕ СЕКВЕНЦЕ** заузимају преко 60% генома, а могу бити:
 - Тандемски поновљене секвенце – стелитска ДНК – мега, микро и минисателити; микросателити служе као ДНК маркер секвенце за мапирање генома и „хумани ДНК отисак“
 - Поновљене секвенце расуте по геному – скочи гени или **ДНК и РНК транспозони који потичу од инсертованих виралних ДНК молекула** (ДНК вируси директно инсертују свој генетски материјал у геном, док РНК вируси свој информативни молекул реверзном транскрипцијом преводе у ДНК а затим се инсертују у геном)
- ДНК транспозони чине око 3% генома, а РНК транспозони око 40% генома
- РНК транспозони обухватају 3 класе секвенци: LINE (дуги расути нуклеотидни низови), SINE (кратки расути нуклеотидни низови) и LTR (дуги терминални поновци)
- **ГЕНОМ МИТОХОНДРИЈА** (0.0005% укупног генома) представљен је кружним молекулима ДНК, чији број зависи од активности ћелије и њених потреба за енергијом
- Садржи укупно 37 гена: 22 за тРНК, 2 за рРНК и 13 за иРНК
- Митохондријски геном садржи хиперваријабилне некодирајуће регионе, која су погодни за молекуларне анализе у циљу хаплотипизације људи

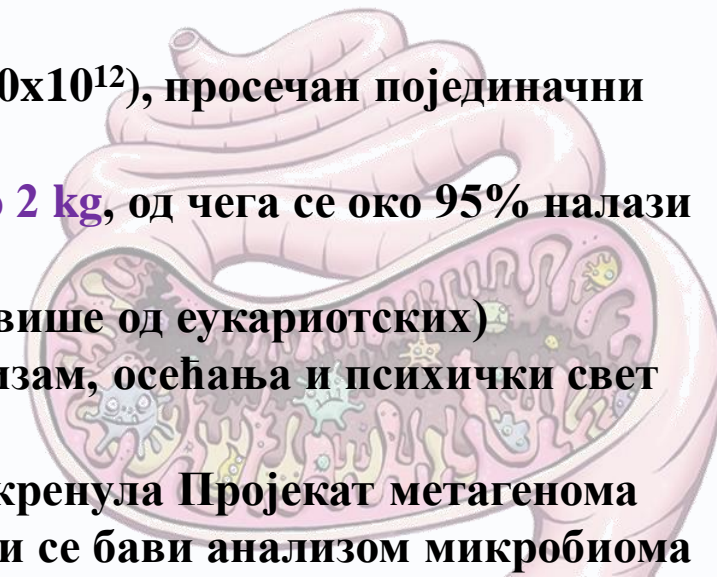


Хумани микробиом – информације засноване на *Human microbiome project*

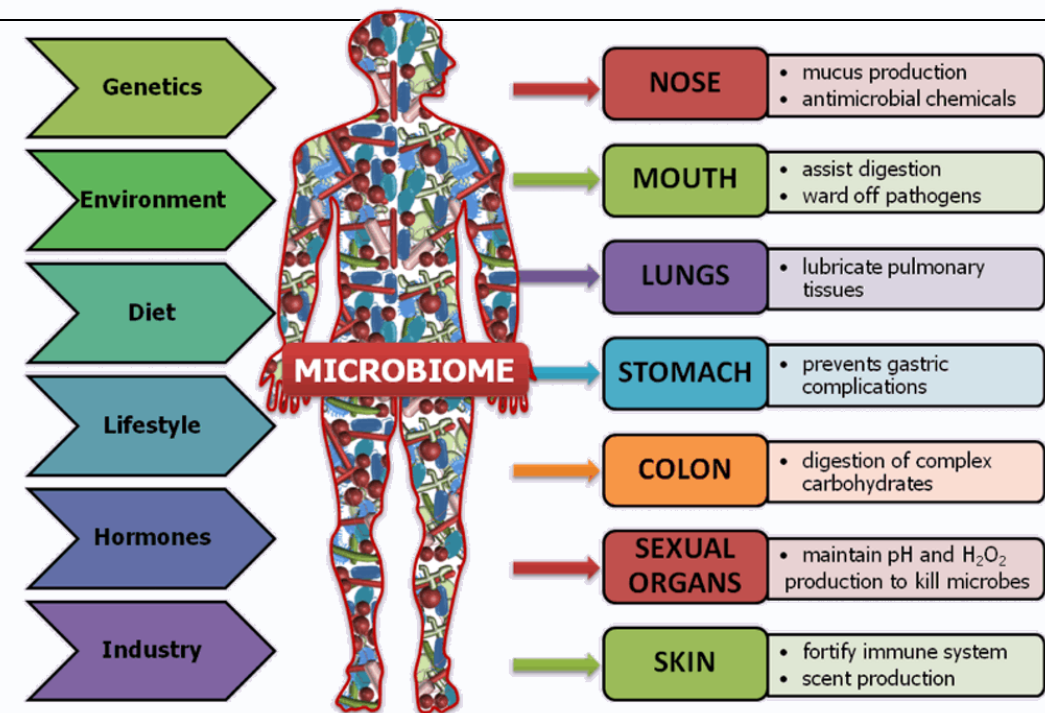
- **МИКРОБИОМ** је укупан генетички материјал микроорганизама (бактерија, вируса, гљивица и др.) јасно дефинисане регије или екосистема (у води, земљи, ваздуху, унутар неког организма)
- **Хумани микробиом у ужем смислу се односи на геноме прокариотских ћелија у одређеним регијама на површини и унутрашњости организма, попут микробиома ока, носа, грла, плућа, дебелог црева, ИТД.**
- **Пројекат хуманог микробиома** од стране Америчког Националног здравственог института, започет је 2008. године - анализирани су узорци специфичних регија у људском организму, узорковане од укупно 300 здравих особа
- Резултати су обухватили информације о физичким карактеристикама микробиома, односно број бактеријских врста (на основу секвенцирања гена за 16S рРНК)
- Детаљније испитивање микробиома (2014. године) имало је за циљ функционално мапирање микробиома, анализу молекуларних интеракција микробиома и еукариотских генома, као и утицај микробиома на потенцијални развој болести испитиваних регија (<https://www.hmpdacc.org/>).



- Резултати пројекта хуманог микробиома
- У односу на укупан број еукариотских ћелија у телу човека (процена иде до 100×10^{12}), просечан појединачни број бактерија је 10 пута већи, а број честица вируса је 100 пута већи
- Просечна тежина свих бактерија које се налазе у / на телу човека износи 1.5 до 2 kg, од чега се око 95% налази у дигестивном систему
- Укупан број гена у бактеријском микробиому је око 8,000,000 (преко 350 пута више од еукариотских)
- Укупан микробиом човека је есенцијалан за живот човека – утиче на метаболизам, осећања и психички свет човека. Душа човека живи у микробиому
- Дигестивни систем садржи преко 33627 врста бактерија. Европска унија је покренула Пројекат метагенома хуманог интестиналног тракта (*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*), који се бави анализом микробиома и метаболома дигестивног система (Ehrlich и The MetaHIT Consortium, 2010)

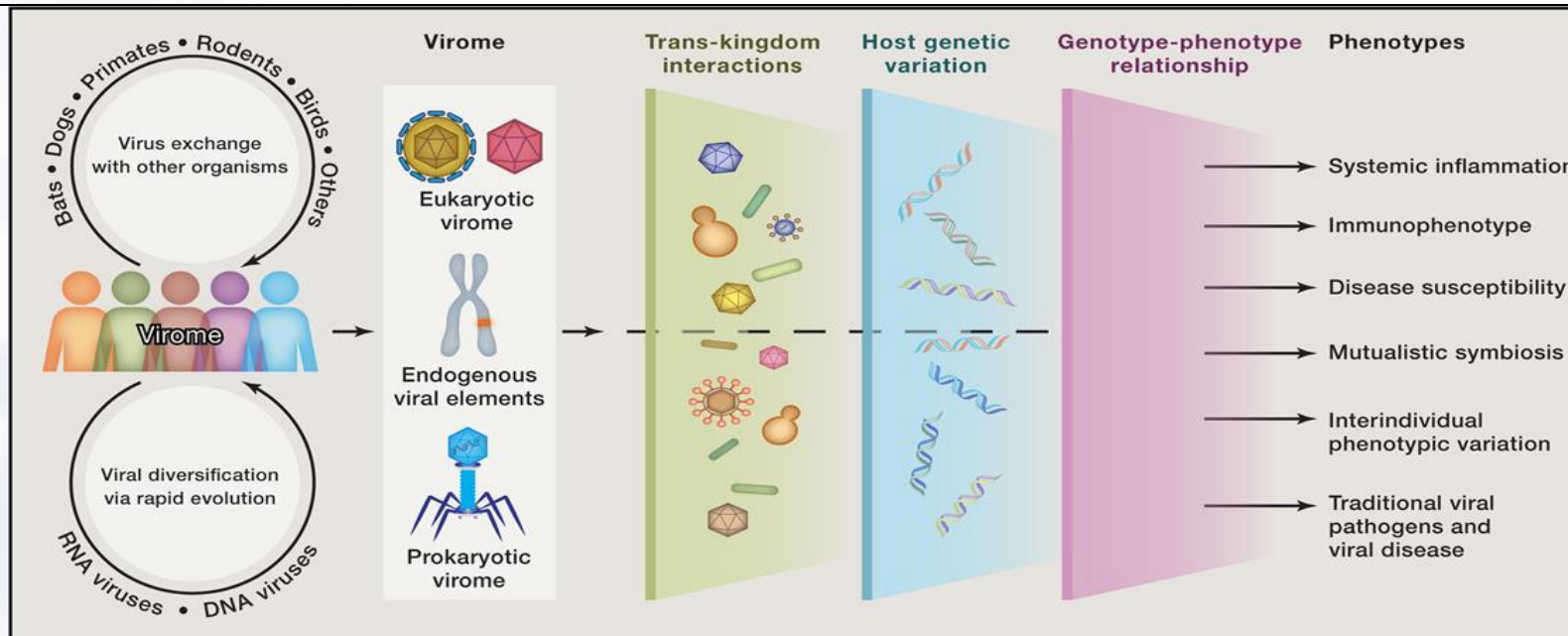


- Сматра се да ношење контактних сочива представља фактор ризика од појаве конјуктивитиса и кератитиса. Наиме, микробиом ока се услед коришћења сочива мења тако да постаје сличнији микробиому коже. У микробиому конјуктиве ока код особа које носе сочива, уочава се већи ниво *Methylobacterium*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter* и *Pseudomonas*



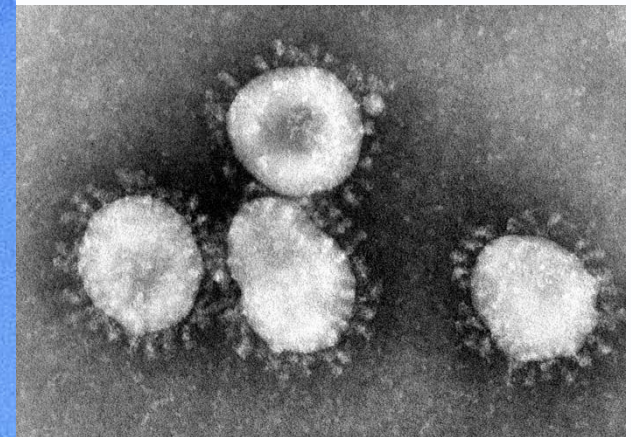
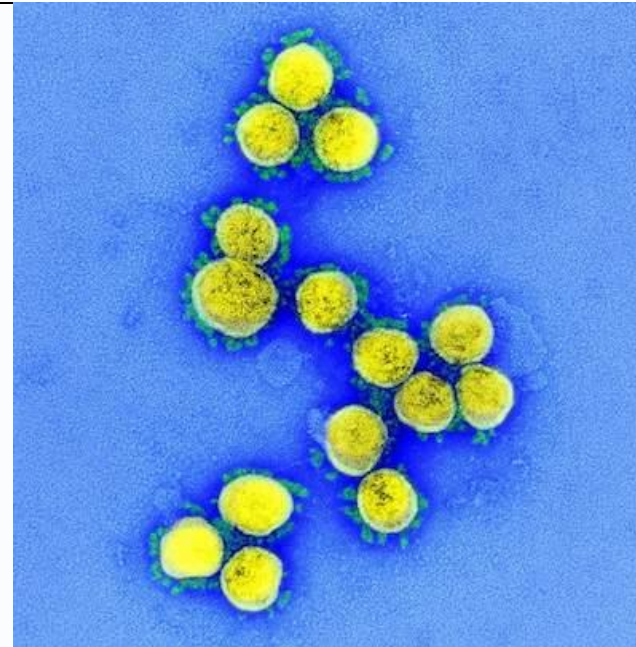
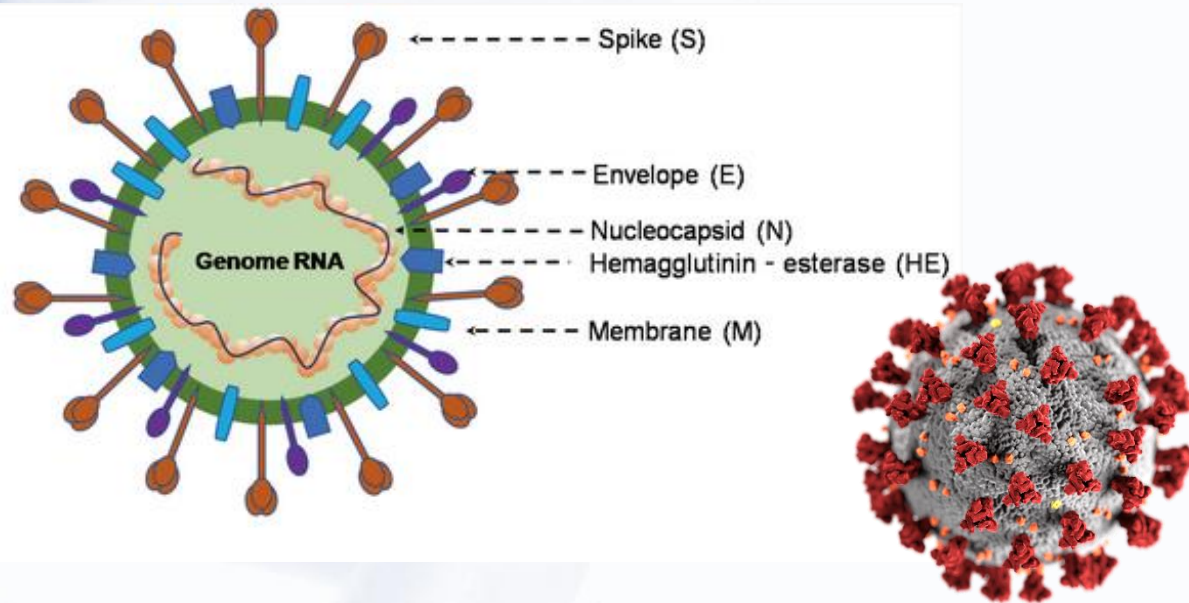
Хумани виром - подела, структура и основна улога

- **Виром је укупан геном виралних честица у специфичном окружењу; виром представља најобимније и најбрже мутирајуће генетске елементе на Земљи**
- **Основна улога вирома јесте пренос информација између различитих генома**
- **Виром човека садржи информације – ту се крије људски дух**
- **Виром човека се састоји од следећих елемената:**
 - **Еукариотски виром** – вируси који инфицирају еукариотске ћелије
 - **ДНК секвенце генома еукариотских ћелија (транспозони) који су пореклом од ДНК или РНК вирусног материјала**
 - **Прокариотски виром** – вируси (нпр. бактериофаги) који инфицирају прокариотске (бактеријске) ћелије организма; у ову групу спадају и вируси који инфицирају и све остале микроорганизме који живе у хуманом организму, као што су паразити, протозое, гљивице, квасци, алге,...



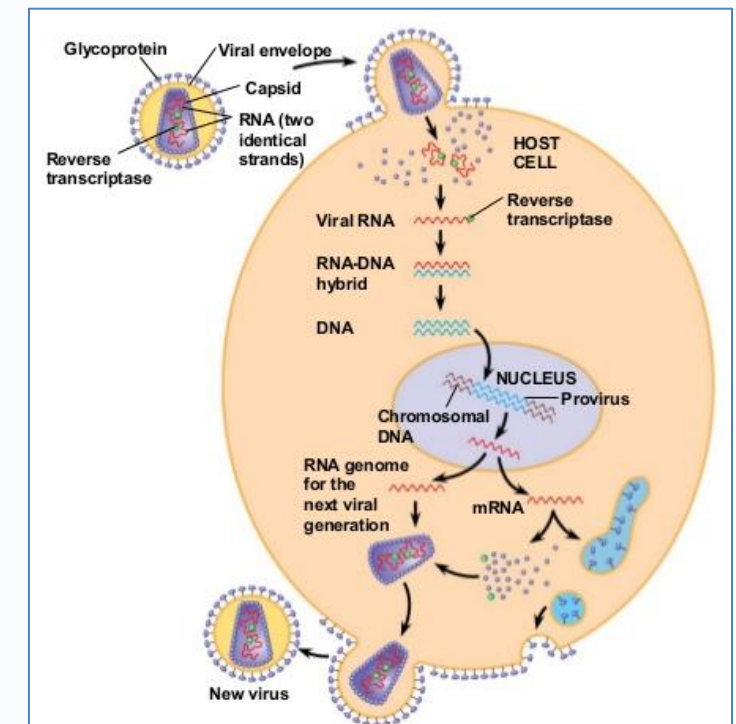
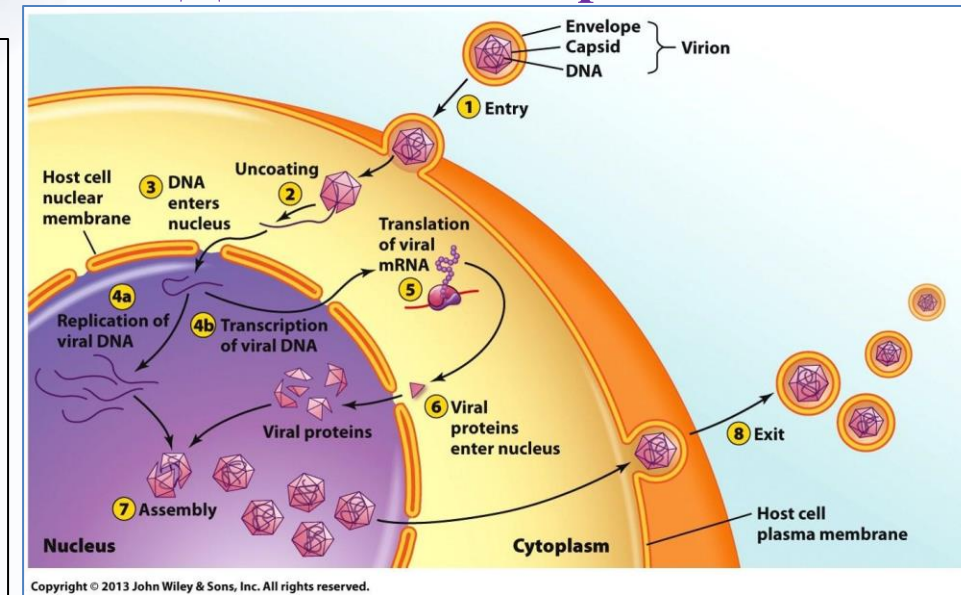
Хумани виром - подела, структура и основна улога

- Хумани виром је асоциран са различитим патолошким стањима као нпр.: дијабетес типа 1 и 2, инфламаторна болест цревног тракта (енгл. *Inflammatory Bowel Disease* - IBD), HIV и канцер
- Вируси код сисара након инфекције могу трајно насељавати различите типове ћелија и ткива у организму
- Вируси не поседују филогенетски конзервиране гене, као што је случај са бактеријама и еукариотама
- Обзиром да не садрже водену средину, мембрану и енергетске молекуле, основне компоненте које, поред наследног материјала, дају есенцијалну предиспозицију за развој живог система – ћелије, **вируси су на ивици живог-неживог света и за свој животни циклус захтевају ћелију**
- Вируси су партикуле и састоје се од: **капсида и кратких наследно-информативних ДНК или РНК молекула**
- **Улога наследно-информативних ДНК и РНК молекула вируса је пренос информација између различитих генома и умножавање сопственог генетског материјала**
- **Улоге капсида:** транспорт наследног материјала и специфично препознавање циљане ћелије домаћина.
- Вируси су ћелијски специфични



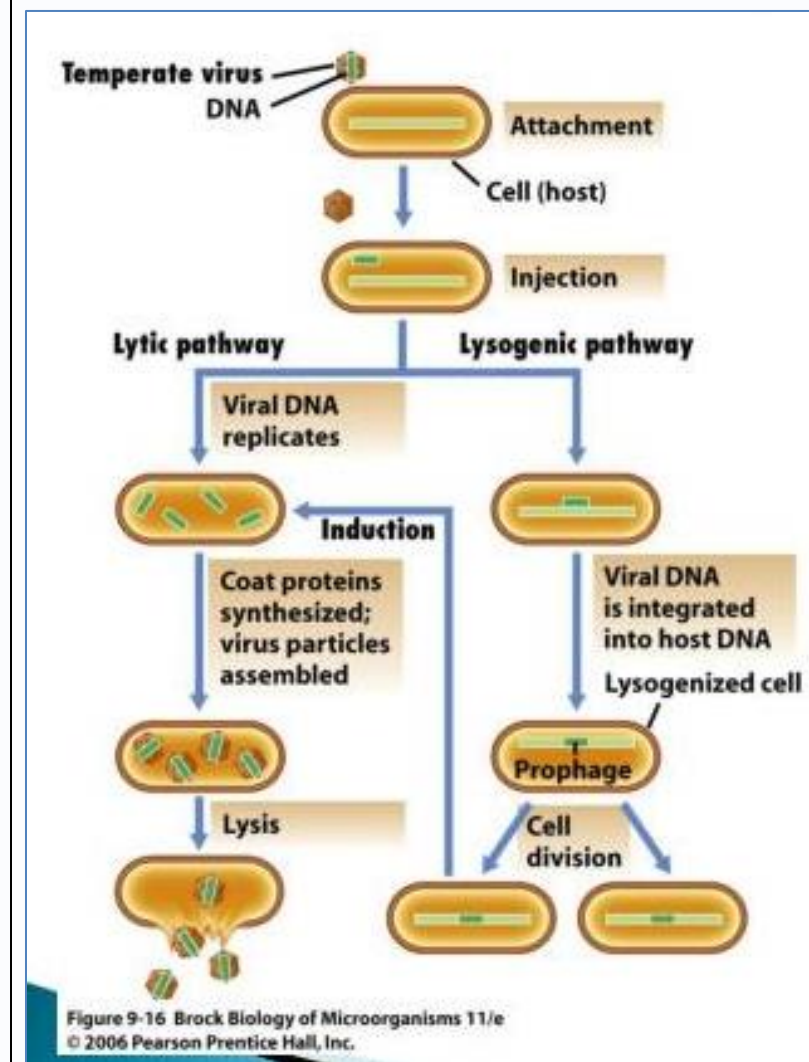
Хумани виром – молекуларни механизми умножавања ДНК и РНК вирома

- Након инфекције ћелије, вирами (ДНК и РНК молекули) користе ћелијске механизме за умножавање наследних молекула (репликација и транскрипција) и протеина (транслација)
- ДНК вируси (нпр., аденовируси, херпес симплекс вируси) могу свој наследни материјал директно инсертовати у геном хуманих ћелија
- ДНК вируси користе механизам репликације (удвајање ДНК молекула) за умножавање својих наследних молекула. Осим тога, користе механизме транскрипције и транслације за синтезу протеина капсида и других активних виралних протеина (могу бити цитотоксични)
- РНК вируси (нпр., HIV, корона вируси, вируси грипа) не могу свој наследни материјал директно инсертовати у геном ћелије домаћина, већ захтевају превођење РНК у ДНК молекул
- Механизам реверзна транскрипција – репликација – транскрипција – транслација за умножавање РНК вируса
- Механизмом реверзне транскрипције (ензим реверзна транскриптаза), РНК молекул се преписује у комплементарни ланац ДНК (цДНК), који се даље преводи у дволанчани молекул ДНК и инсертује у геном ћелије домаћина (пасивно се умножава са геномом ћелије домаћина, пратећи њене ћелијске циклусе)
- Из ДНК генома домаћина, РНК виром се транскрипцијом умножава, а затим транслацијом синтетише протеине који изграђују капсид и остале специфичне виралне протеине



Хумани виром – лизогена и литичка фаза животног циклуса вируса

- Након инфицирања про-еукариотске ћелије, вируси улазе у лизогену или литичку фазу животног циклуса.
- Лизогена фаза подразумева инсерцију виралног наследно-информативног молекула у геном ћелије домаћина - вирални геноми се умножавају са ћелијским геномом и прате ћелијски животни циклус
 - ДНК вирами се директно инсертују у геном домаћина
 - РНК вирами се превode у ДНК молекуле (реверзна транскрипција), а затим се инсертују у геном домаћина
 - На овај начин су настале секвенце транспозона у хуманом геному (45%)
 - Лизогена фаза се дешава се у физиолошки здравим ћелијама
- Литичка фаза подразумева лизу и смрт инфициране ћелије након вирусне инфекције, а вирами користе ћелијске механизме за сопствено умножавање
 - Умножавање наследног материјала (а) механизмима репликације за ДНК виrome, (б) механизми реверзне транскрипције – репликације – транскрипције за РНК виrome
 - Умножавање виралних протеина (литички, капсид) механизмима транскрипције - транслације
 - Паковање вирусних партикула и ослобађање вируса уз лизирање ћелије
 - Литичка фаза се одвија у дисфункционалним ћелијама (оболеле или без довољно доступне хране)
- Латентност вируса је преживљавање вирома интегрисањем у геном ћелије домаћина или као епизом (херпес вирус), све до реактивације и стварања инфективних вирусних партикула



Хумани виром – употреба РНК вируса у трансфекцији и генској терапији

- **Генска терапија** је савремени приступ у лечењу или превенцији различитих болести, чија је етиологија у дисфункцији, односно мутацијама (епи)генома, транскриптома (укупна РНК) или протеома (протеини)
- Генска терапија подразумева **замену оштећеног (нефункционалног) гена** здравим геном или његовим продуктом
- Генска терапија се врши на нивоу епигенома, генома, транскриптома и протеома
- **Трансфекција или унос функционалног гена** (ДНК секвенце - трансгени) најчешће се врши помоћу вирусних вектора (преносиоца), при чему се користе механизми инфекције и животног циклуса вирома за унос и инсерцију трансгена у геном циљне ћелије; инхибирају се (исеку) секвенце виралних РНК и ДНК који кодирају протеине који оштећују ћелију
- **Ex vivo генска терапија** - врши се увођењем трансгена у изоловане ћелије, - манипулација *in vitro*
- **In vivo генска терапија** - трансген се директно уводи у ћелије организма (*in situ*)

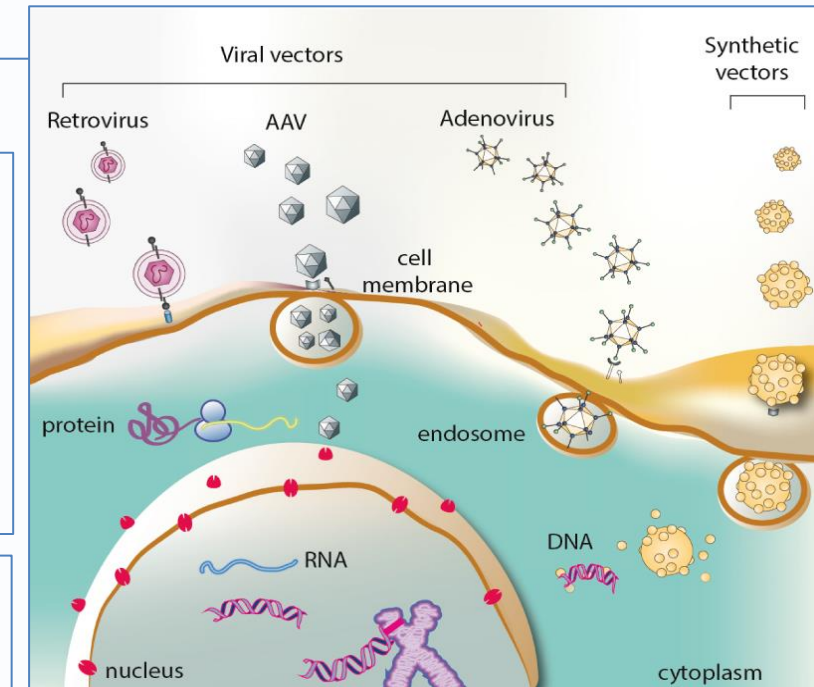
ВИРУСНИ ВЕКТОРИ (ПРЕНОСИОЦИ) У ГЕНСКОЈ ТЕРАПИЈИ

РЕТРОВИРУСИ имају два идентична РНК молекула. Након инфекције, РНК се копира у провиралну ДНК реверзном транскрипцијом, а затим интегрише у геном домаћина у процесу који зависи од LTR-дугих терминалних поновака, на сваком крају генома. Ретровирусима се лече имунодефицијенције које имају узрок у генетским мутацијама

ХЕРПЕС СИМПЛЕКС ВИРУСИ – инфицирају ћелије које се не деле, перзистирају у нервном ткиву, што омогућава генску терапију неуралних обољења (Алцхајмерова и Паринсонова болест). ХСВ имају дволанчану ДНК (150 kbp) која се не интегрише у геном инфициране ћелије, већ перзистира и удваја се у једру

АДЕНОВИРУСИ су дволанчани ДНК вирами који инфицирају ћелије које су слабо пролиферативне (нпр., ћелије респираторног и дигестивног система), где се умножавају независно од дељења генома. Перзистирају као епизоми у једру. Користе се у терапији канцера, моногенских наследних и кардиоваскуларних болести

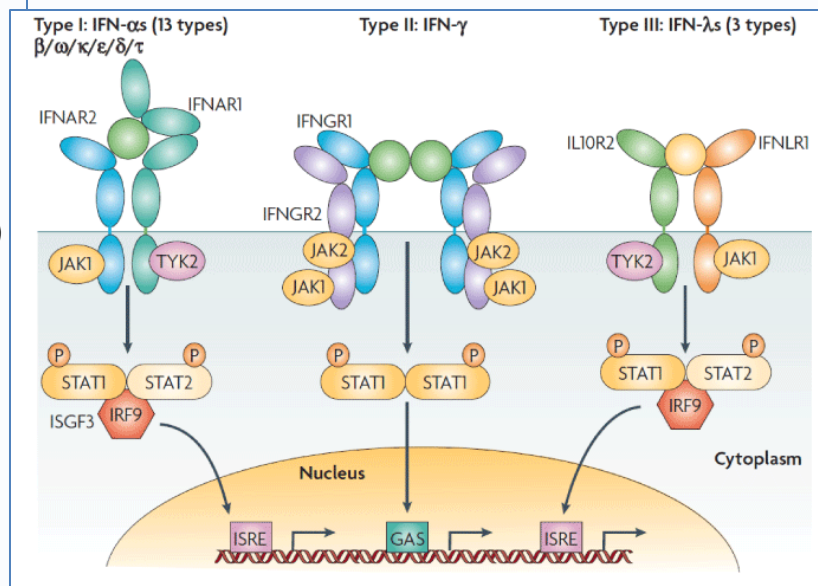
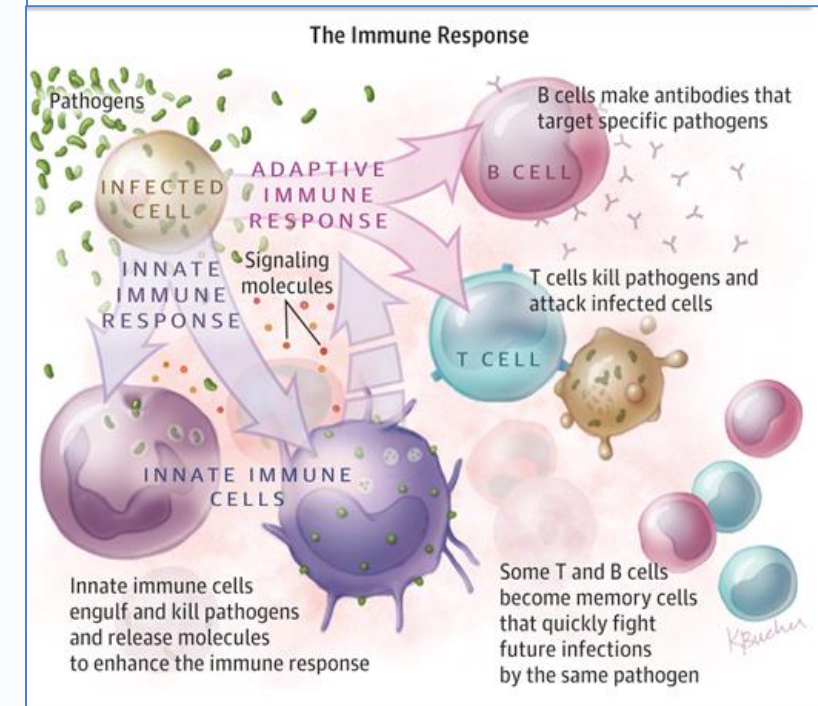
АДЕНО-АСОЦИРАНИ ВИРУСИ (ААВ) су по природи репликационо-дефектни и зависе од других помоћних вируса, који им дају есенцијалне функције. Предности ових вируса су у томе што нису патогени, показују дуготрајну експресију итд. Ови вектори су коришћени у терапији цистичне фиброзе



НЕВИРАЛНИ ГЕНСКИ ТРАНСФЕР
Липозоми; Липоплекси; Гола ДНК (негативна контрола, при анализи липоплекса и липозома); Генетички пиштољ, и др.

Хумани виром – имуни систем и вирами

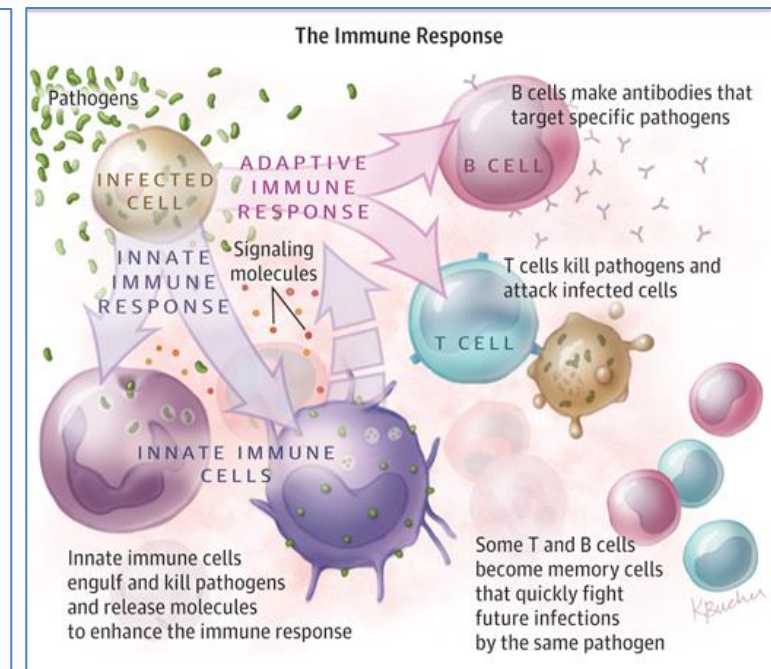
- Имуни систем човека се функционално формира након рођења; примарна улога је да препозна СВОЈЕ протеине (посредно и остале биомолекуле), те да разликује ТУЂЕ у односу на СВОЈЕ и заштити сопствени организам (одбрамбена улога) од страних микроорганизама (вируса, бактерија, гљивица и паразита), њихових хемијских супстанци (токсина), као и сопствених измењених (нпр. туморских) и дисфункционалних ћелија
- Имунитет може бити: неспецифични (урођени) и специфични (стечени).
- Неспецифични имунитет (урођењи, прва линија одбране) састоји се од низа неспецифичних компоненти и механизма - анатомске епителне баријере, имуни фагоцити (макрофаги, неутрофили, ћелије природне убице), хемотаксичне и инфламаторне супстанце, и др.
- Јавља се приликом вирусне инфекције и као реакција на некротишуће продукте лизираних ћелија. Резултује запаљивом реакцијом (инфламација) при чему се продукују вазоактивне, хемотаксичне и инфламаторне супстанце које могу системски оштетити организам
- У инфекцији коронавирусима, системска обољења и летални исходи су углавном последице инфламације као одговор на вирусну инфекцију
- ИНТЕРФЕРОНЕ луче активирани макрофаги и дендритске ћелије ($IFN\alpha$) и друге имуне ћелије ($IFN\beta$ из фибробласта, $IFN\gamma$ из ћелија природних убица и Т лимфоцита), као одговор на присутност патогених фактора – пре свега, вируса, затим бактерија, паразита
- Интерферони заустављају умножавање вируса у ћелијама, омогућавају комуникацију између ћелија у циљу покретања имунског одговора, која има за циљ да уклони или спречи даље дејство патогених фактора



Хумани виром – имуни систем и вирами

- **Специфични (стечени) имунитет** се развија постепено након рођења - за сваки антиген (протеинске структуре) постоји специфичан имунски одговор. Заснива се на активности антиген-специфичних Б и Т лимфоцита
- Имунски одговор може бити хуморални (Б лимфоцити луче антитела у екстраћелијске течности) и ћелијски (Т лимфоцити делују директно цитотоксично)
- **Хуморални имуни одговор** се заснива се на стварању специфичних антитела против одређеног антигена. Након продора антигена у организам и његовог препознавања, антиген-специфични Б лимфоцити се активирају (плазма ћелије) и луче антитела (имуноглобулини) против антигена који је проузроковао имунску реакцију
- Титар (концентрација) специфичних антитела на антиген инфективних агенаса (нпр., SARS-Cov2) расте након инфекције - **крвна плазма оздравелих пацијената је богата специфичним антителима и интерферонима, те се може користити (након специфичних манипулација) у циљу пасивне имунизације инфицираних особа**

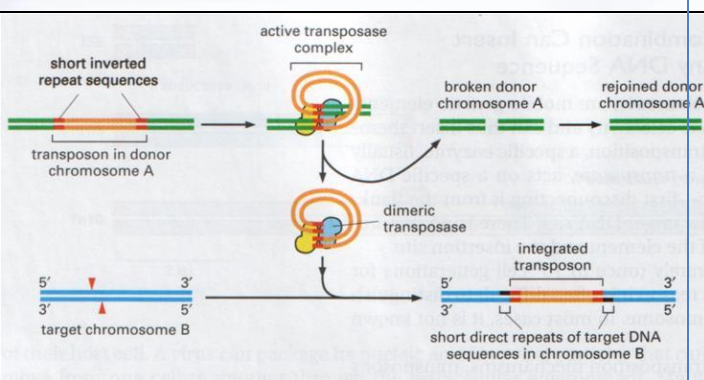
- **Ћелијски имуни одговор - Т цитотоксични лимфоцити** долазе у директан контакт са антигеном (специфични протеини капсида вируса, протеински рецептори на мембранама про-еукариотских ћелија, и сл.) и луче протеолитичке супстанце, перфореине, реактивне врсте, проапоптотске сигнале, и сл., у инфективни микроорганизам или оштећену/трансформисану ћелију, изазивајући њихову смрт
- **Т помоћнички лимфоцити** луче цитокине (регулишу имуни одговор и координишу рад имуних ћелија), хематопоедине (регулишу пролиферацију и диференцијацију имуних ћелија). **HIV специфично инфицира Т помоћничке лимфоците** и разара координацију имуног одговора
- **Ћелијски имуни одговор је доминантно усмерен против вирусних инфекција, малигно трансформ. ћелија органа, трансплантираних органа**



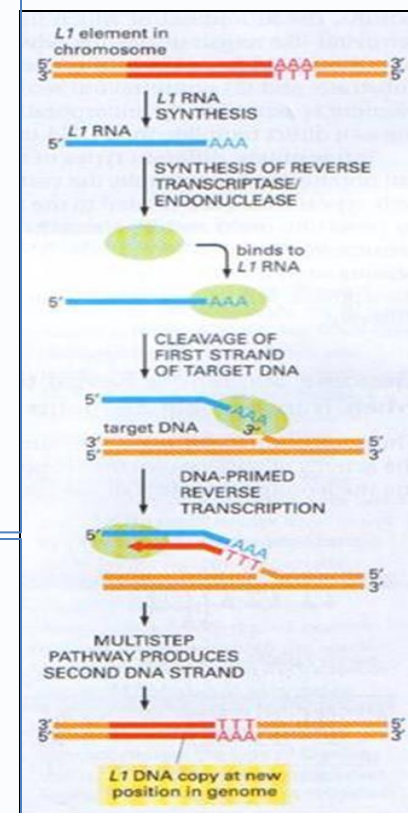
Молекуларни механизми преноса информација између вирома и генома прокариотских и еукариотских ћелија

- Механизми пропагације РНК и ДНК транспозона и вирома у хуманом геному/микробиому
- 1. Транспозициона место специфична рекомбинација - исецање крајева транспозона и њихово уграђивање у неспецифична места
- 2. Конзервативна место-специфична рекомбинација - захтева кратку ДНК секвенцу која је иста у доворском и акцепторском месту ДНК молекула; ензими рекомбиназе, интегразе; у микробиому

- Транспозони хуманог генома су вирусног порекла и имају веома великог удела у еволуцији генома; вируси користе механизме транспозиције за кретање кроз геном ћелије и између генома различитих ћел.
- РНК транспозони заузимају преко 40% генома човека, имају јако важну улогу у еволуцији
- За мобилност РНК транспозона, непоходно је да се са ДНК секвенце у геному транскрибују у РНК молекул, а затим реверзном транскрипцијом преведу у цДНК (*Target Primed Reverse Transcription*, TPRT); ретротранспозони се инсерцијом цДНК у геном шире на нова места - „*Copy and Paste*” механизмом
- Ретропозони (елементи са полиА репом) - *Long Interspersed Elements*, LINEs, (активан L1) су аутономни ретротранспозони који кодирају ензиме (реверзну транскриптазу, транспозазу-интегрзу,..), док *Short Interspersed Elements*, SINEs (*Alu* и *SVA* елементи) су неаутономни, користе ензиме кодиране LINE елементима; *LTR elementi* – на крајевима имају дуге поновљиве секвенце (*LTR-Long terminal repeats*)

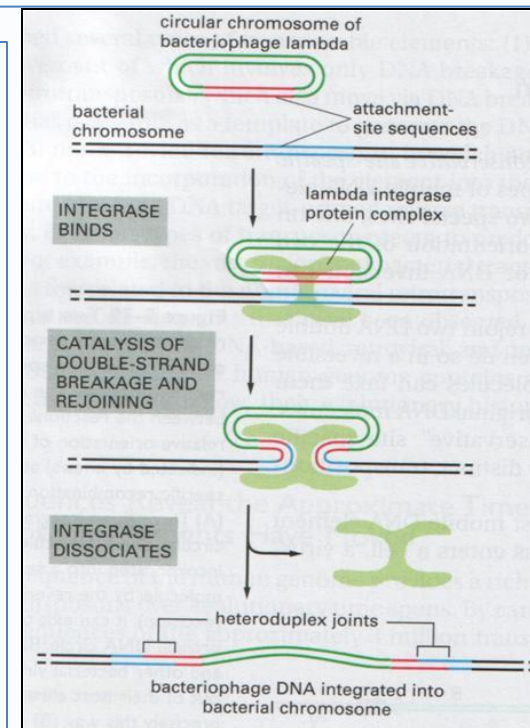


- ДНК транспозони или „*inactive fossils in humans*” су неактивни 37-40 милиона година; познато је 125 фамилија у хуманом геному (*hAT* и *Tc1/mariner* су две најпознатије); 3% хуманог генома
- Користе „*Cut and Paste*” или „*Copy and Paste*” механизам транспозиције, помоћу ензима транспозазе; кратке инвертоване понављајуће ДНК секв. на крајевима везују транспозазу, а комплекс у виду петље се пребацује на неспецифично место инсертовања, доводећи до делеција/инсерција и промене места читања



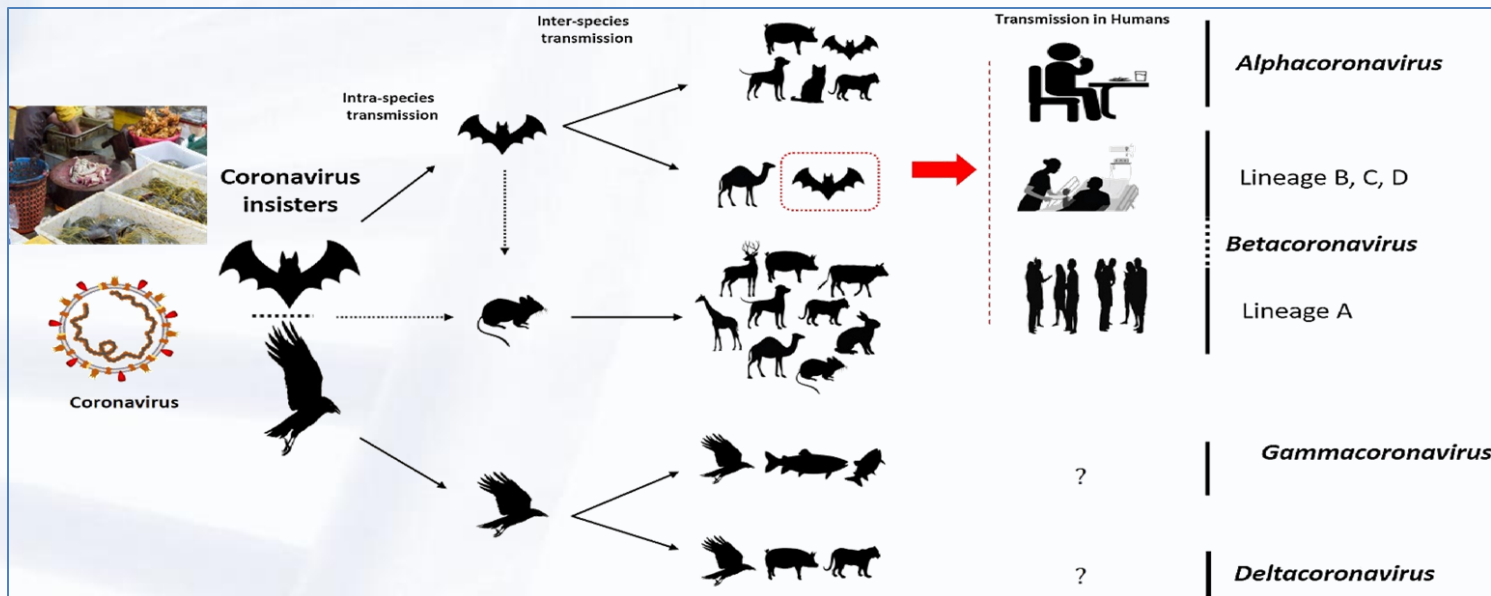
- **Интеракције миРНК и миДНК са хуманим геномом**
- Организам човека садржи 10 пута више бактеријских ћелија него еукариотских, а микробиом има важну улогу у нормалном функционисању организма
- Испитивањем **цревног микробиома**, откривене су 2 врсте везикула:
 - **Екстрацелуларне везикуле (егзозоми)** у којима се налазе **микроРНК** и пореклом су из хуманих епителних ћелија. Улога ових везикула јесте да регулише (од стране домаћина) експресију гена код бактерија
 - **Мембранске везикуле (outer-membrane vesicles, OMV)** су **бактеријског порекла** и **пored циркуларних и линеарних ДНК и протеина** (IL и многи други мали сигнални молекули) садрже **и РНК молекуле** који су јако слични еукариотским микроРНК. Секвенцирањем је утврђено да су се поклапале са дугим некодирајућим РНК код човека (*Long Non-Coding RNA, lncRNA*) чија је улога утишавање и регулација генске експресије, као и модификација хроматина и хистона
- Преко ове две врсте везикула и за њих карактеристичних малих некодирајућих РНК молекула врши се **међусобна комуникација између прокариотских и еукариотских ћелија**

- **Интеракције вирома и генома бактерија хуманог микробиома**
 - Када инфицирају бактерије, вируси могу ући у:
 - **Литички циклус** – умножавање вирусних партикула и лизирање ћелија, у ћелијама које су оболеле, или немају довољне изворе хране
 - **Лизогени циклус** – вирами се уграђују у геном бактерија и репликују се са геномом домаћина – здраве ћелије, богати извори хране
 - Најбоље изучени **прокариотски кружни ДНК виром је λ фаг**
- λ интеграз (слична ДНК топоизомерази) сече ковалентне везе на вирусној ДНК и на специфичном месту везивања за ДНК молекулу бактерије, при чему за себе везује крајеве, чувајући енергију за повезивање са вирусном ДНК. Пресечени крајеви имају продужене ланце у дужини од 7 bp и за бактеријску ДНК се везују по принципу комплементарности уз помоћ интегразе и утрошак сачуване енергије од раскидање претходне везе.
- Механизам конзервативне место-специфичне рекомбинације**

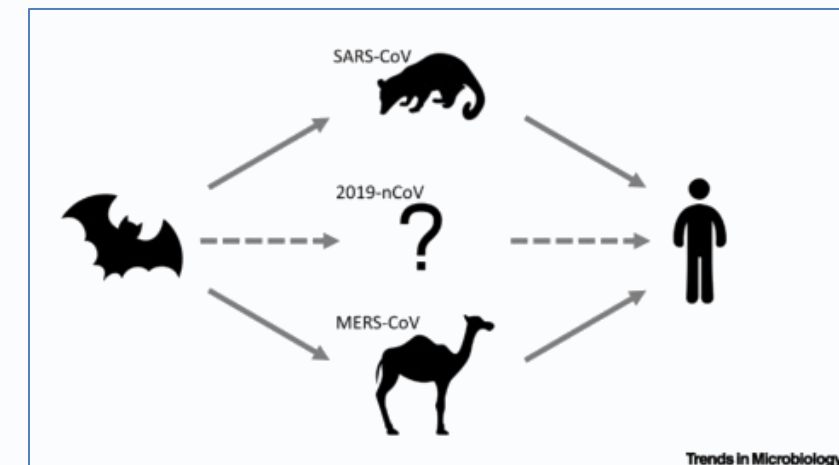


Корона вируси прехладе – основне карактеристике РНК генома, механизми инфекције специфичних ћелија респираторног тракта, животни циклус

- Корона вируси припадају реду *Nidovirales* , фамилији *Coronaviridae*
 - Фамилија *Coronaviridae* обухвата две подфамилије од којих се *Coronavirinae* даље класификују на 4 рода (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)
 - У родове *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* спадају вируси патогени по хуману популацију, сматра се да су **на човека пренети са слепих мишева директно или преко преносиоца**
 - Три најпознатија корона вируса и обољења која изазивају код људи:
 1. **SARS-CoV** - SARS (*Severe acute respiratory syndrome*) – смртност ~ 10%
 2. **MERS-CoV** - MERS (*Middle East respiratory syndrome*) - смртност ~ 35%
 3. **SARS-CoV-2** - COVID19 (*Corona virus infectious disease-19*) - смртност ~ 2-10%

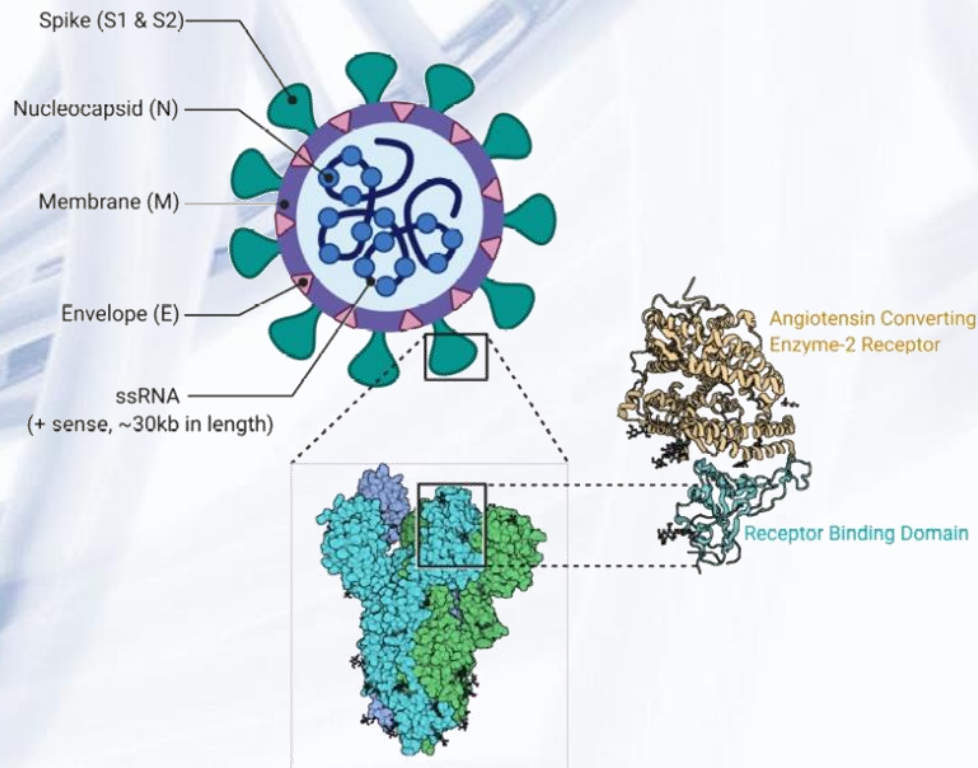


Shereen *et al.* (2020)



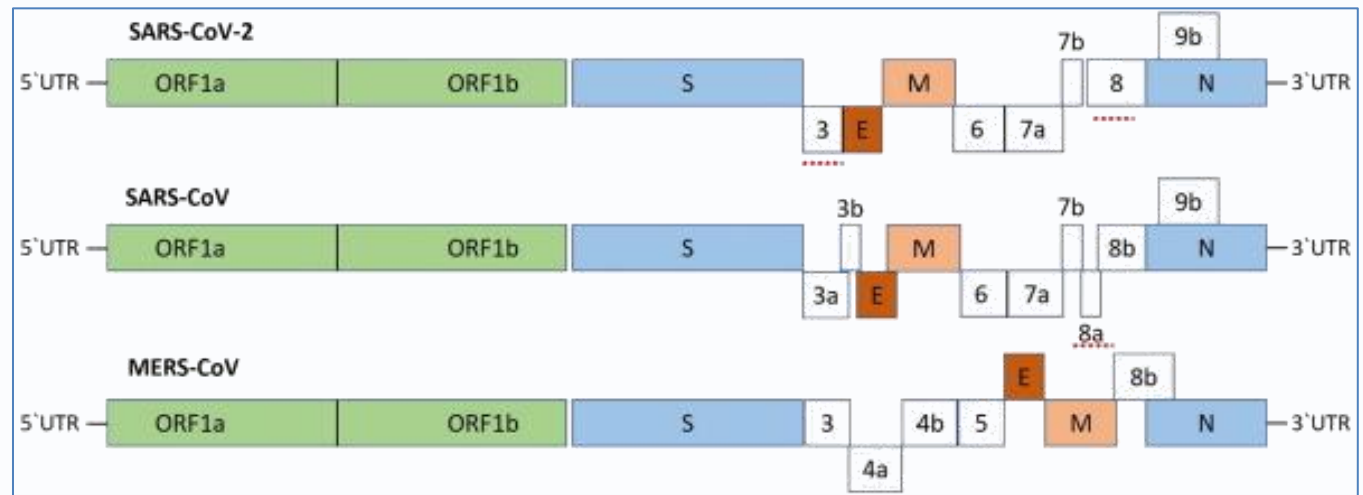
Xu (2020)

Корона вируси – основне карактеристике РНК генома



Casella *et al.* (2020)

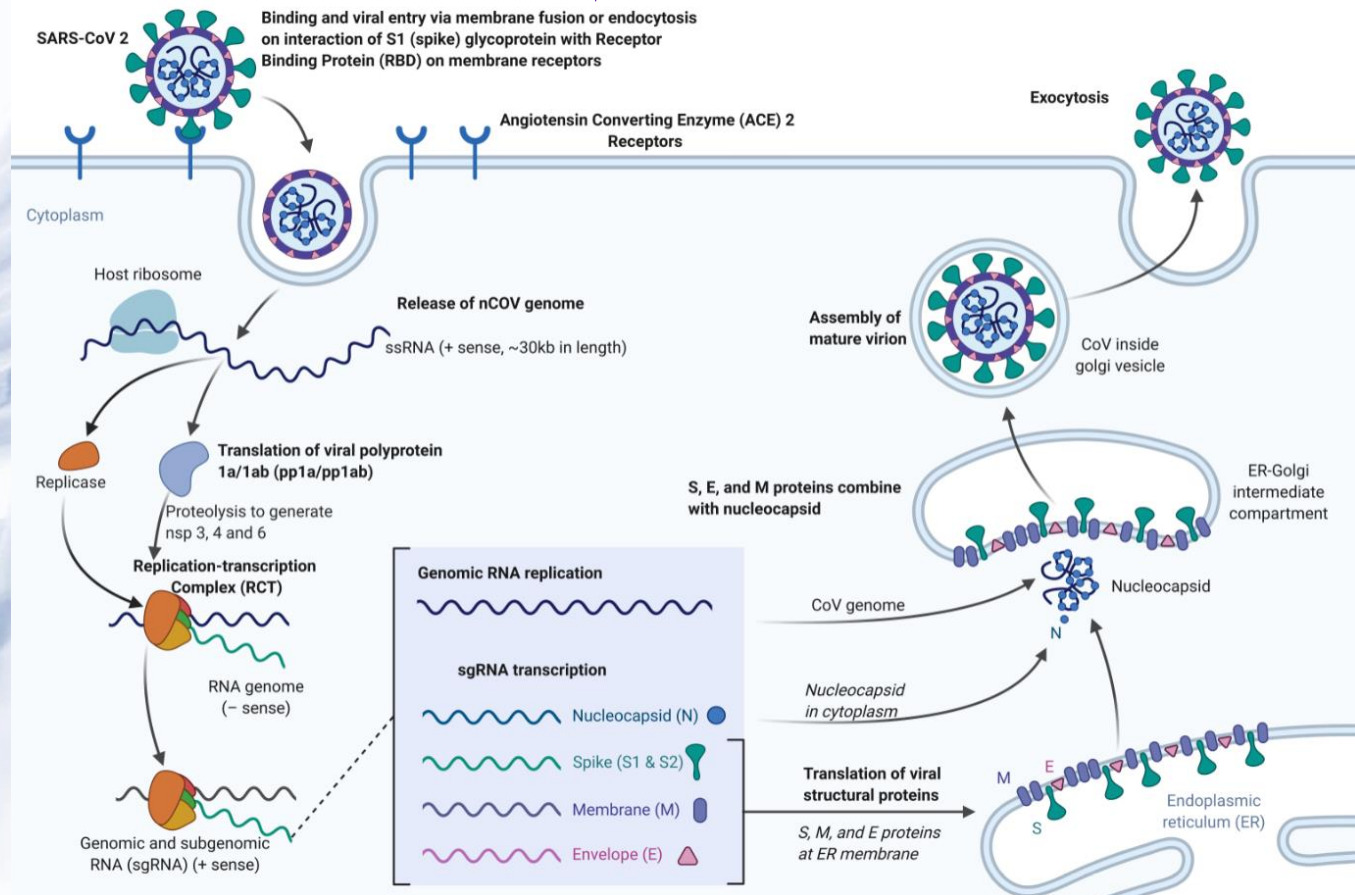
- Корона вируси формирају кружне или сферичне партикуле дијаметра 100–160 nm. Њихов геном је позитивна једноланчана РНК (ssRNA) дужине 27–32 kb (Cui *et al.*, 2019). Корона вируси припадају групи најдужих РНК вирома.
- РНК *Betacoronaviruse-a*:
 - 5'-UTR, ORF1a/b кодира полипротеин, pp1ab, који се даље цепа у 16 неструктурних протеина, укључени у транскрипцију и репликацију генома
 - Гени за структурне протеине, тзв. *spike* гликопротеине (S), мембранске протеине (M), *envelop* протеине (E), протеине који граде нуклеокапсид (N)
 - Помоћни гени специфични за врсту, 3'-UTR (Shereen *et al.*, 2020).



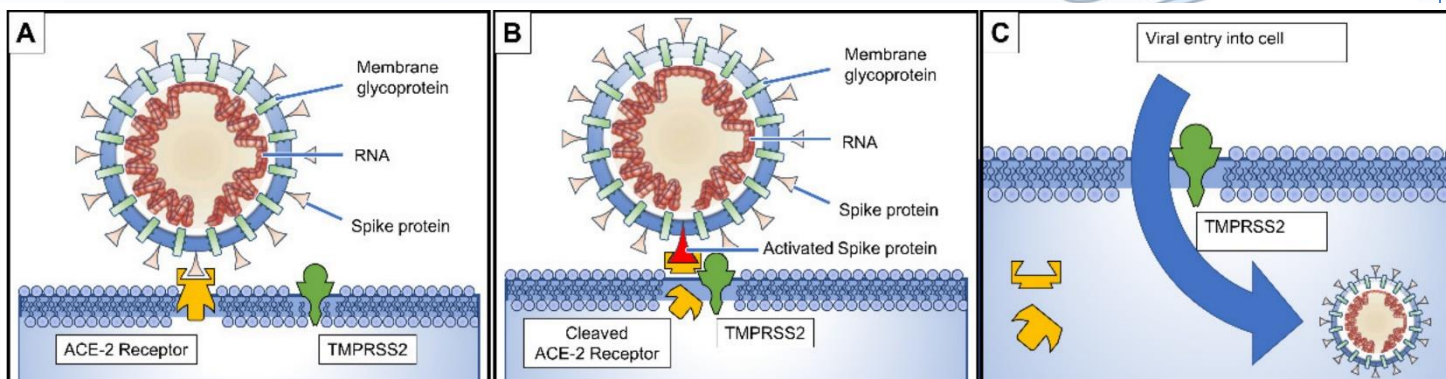
Shereen *et al.* (2020)

Корона вируси – механизми инфекције специфичних ћелија респираторног тракта

Цитотоксични – литички животни циклус вируса

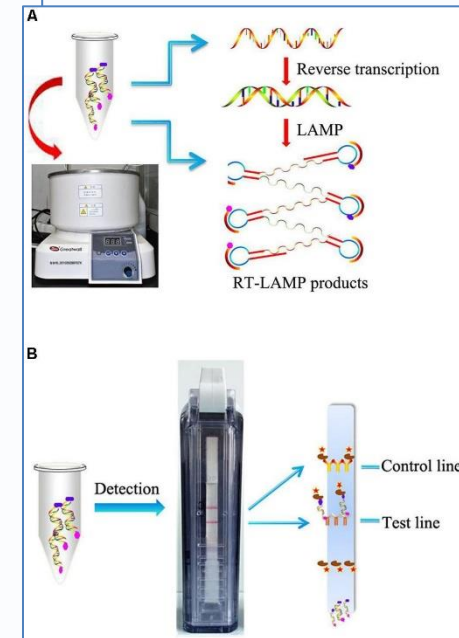


- **Рецептор-специфичне интеракције корона вируса и еукариотских ћелија – специфичност вирусних инфекција**
 - **SARS корона вируси, као своје рецепторе специфично препознају ангиотензин конвертујући протеин и специфично инфицирају цилијарне бронхо-епителне ћелије и тип 2 пнеумоцита (Cui *et al.*, 2019)**
 - **Spike протеини се везују за ангиотензин конвертујући ензим 2 рецептор (ACE-2) на површини ћелије; Трансмембранска серин протеаза тип 2 (TMPRSS2) се веже за ACE-2 и исеца га на два дела. У том процесу се активира spike протеин. Ови процеси олакшавају улазак вируса у ћелију (Rabi *et al.*, 2020)**
 - **Протеин TMPRSS2 није неопходан за развој и хомеостазу па је потенцијална мета терапије (Hoffmann *et al.*, 2020).**



Молекуларне методе детекције корона вируса и специфично детекција SARS-Cov2

- За утврђивање присуства вируса најбоље је користити два сета узорак: из горњег и доњег дела респираторног тракта. За узорковање се користи бронхоскопија. Утврђени су протоколи по којима се врши узорковање, транспорт и складиштење биолошког материјала пацијената.
- Постоји више различитих метода за детекцију вируса. Најчешће коришћене спадају у групу NAAT (*Nucleic Acid Amplification Test*) код којих се детекција заснива на одређивању присуства нуклеинске киселине вируса, а заснивају се на различитим модификацијама ланчане реакције полимеразе (PCR).
- Из досадашњег искуства, *Real Time Reverse transcriptase PCR - RT PCR* представља златни стандард у детекцији Sars-Cov2 вируса.
- Захваљујући секвенцирању овог вируса, утврђено је да је најбоље циљати ген за овојницу вируса (*Envelope – E*), ген за вирусни нуклеокапсид (*N*), ген за *spike* протеин (*S*) и *RNA Dependent RNA Polymerase (RdRp)* ген. За сваки ген се користе по 3 различита сета прајмера, а да би резултат био валидан, потребно је циљати бар два од наведена 4 гена.
- Модификација PCR методе која је показала добру специфичност и сензитивност *LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)* PCR који захтева коришћење бар 20-ак сетова прајмера и стварање петљи приликом амплификације чиме се поспешује брзина добијања позитивног/негативног резултата.
- Као потенцијални дијагностички тестови, добро су се показали они са *Cas-CRISPR* методологијом.
- Поред тестова који показују присуство нуклеинских киселина, испитивана је и употреба серолошких тестова, односно антитела као маркера (имунодијагностика), и у ове сврхе највише су коришћена *IgM* и *IgE*. Иако специфична, сензитивност антитела много варира (30-80%), те по најновијим подацима *WHO* препоручује ову врсту тестова само у комбинацији са *RT-PCR* тестовима.
- Многе корпорације раде на производњи специфичних китова и брзих тестова за дијагностику који представљају стандардне реагенсе за *RT-PCR*, при чему је мануелни рад онога ко тестира сведен на минимум. Код већине брзих тестова, добије се тзв. кетриц са већ помешаним компонентама у који се убади узорак, а сам кетриц се монтира на апарат који представља мини *PCR* са већ подешеним програмом и софтвером који после одређеног времена избацује обрађен резултат.

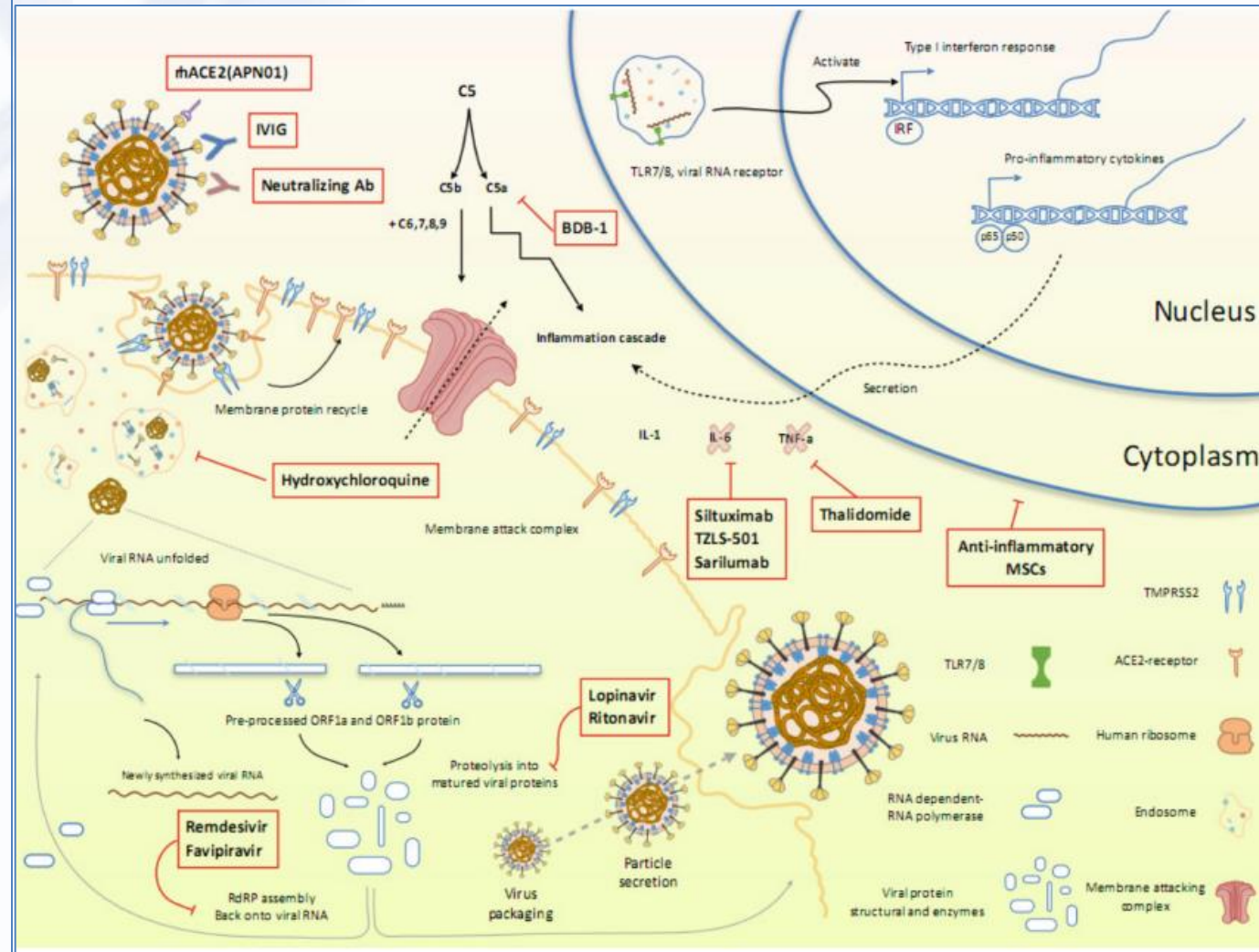


Потенцијалне методе лечења инфекције SARS-CoV2

➤ **Још увек није пронађен званичан лек против овог вируса.** Сматра се да највећу штету изазива, не сам вирус, већ претерани имуни одговор домаћина и инфламаторна реакција, који системски оштећују организам

➤ У току су многобројна клиничка испитивања која прилазе проблему са различитих аспеката:

1. **Инхибиција РНК зависне РНК полимеразе** – Remdesivir, Favipiravir
2. **Инхибиција виралне протеазе** – Ivermectin, Lopinavir/Ritonavir
3. **Блокирање фузије између вируса и ћелијске мембране домаћина** – *Recombinant Human Angiotensin-converting Enzyme 2 (rhACE2)*, *Hydroxychloroquine*, *Arbidol Hydrochloride (Umifenovir)*
4. **Јачање урођеног имунитета** – подстицање NK ћелија помоћу рекомбинантних интерферона (INF 1 у комбинацији са различитим лековима)
5. ...



- <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov>
- Tu et al. Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 2657.

Потенцијалне методе лечења инфекције SARS-Cov2

➤ У току су многобројна клиничка испитивања која прилазе проблему са различитих аспеката:

5. Ублажавање инфламаторног одговора

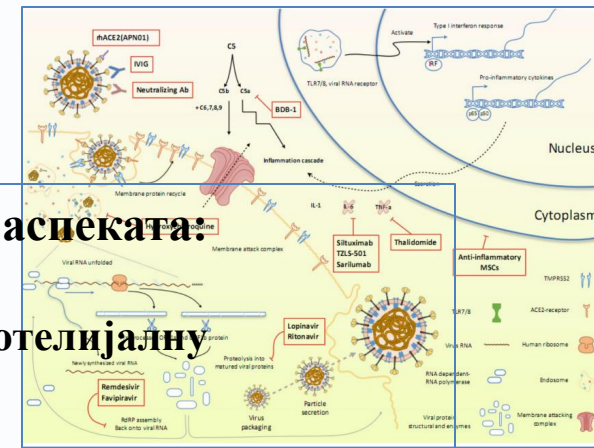
- ✓ мезенхимске стем ћелије - утичу на регулацију нивоа проинфламаторних цитокина и ендотелијалну пермеабилност
- ✓ интравенозни имуноглобулин (IVIg) - стимулишу производњу антитела
- ✓ Sars-CoV2 специфична неутрализујућа антитела изолована из плазме излечених пацијената
- ✓ Anti-C5 моноклонска антитела - помажу репарацију плућног оштећења
- ✓ Блокирање интерлеукин 6 сигналног пута IL-6 моноклоналним антителом
- ✓ Thalidomide – антиангиогенетско, антиинфламаторно, антифиброзно и имуномодулаторно деловање
- ✓ Methylprednisolone- глукортикоид, инхибира нежељени имуни одговор домаћина
- ✓ Fingolimod – орални имуномодулатор, делује на Т ћелије

6. Контрола симптома – Bevacizumab (рекомбинантно хумано VEGF антитело) спречава ангиогенезу

7. Вакцина

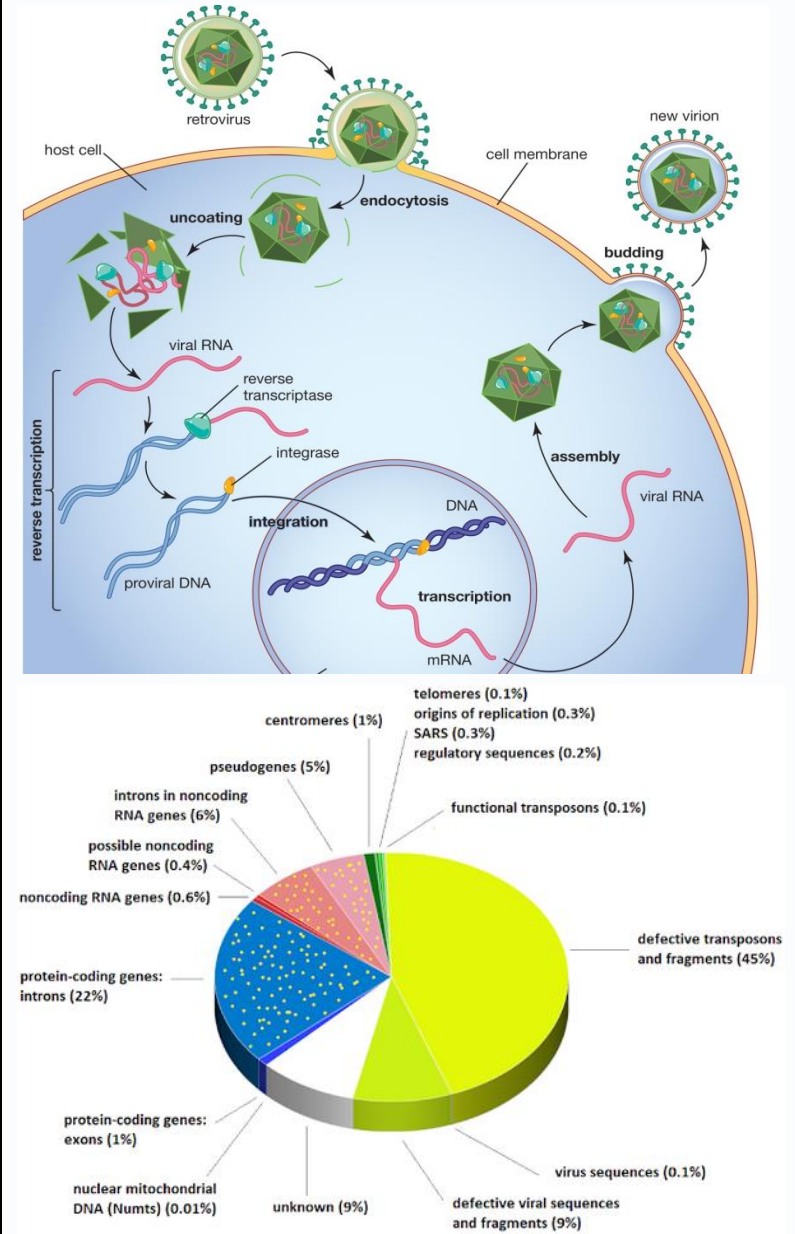
- ✓ mRNA 1273 – кодира прекурсоре Spike протеина
- ✓ INO-4800 – ДНК вакцина која кодира протеине вируса
- ✓ ChAdOx1 nCoV-19 – састоји се од нерепликативног аденовирусног вектора и секвенце за Spike протеин; сам вектор је карактеристичан за респираторне и гастроинтестиналне органе
- ✓ вакцине базирани на неактивним субјединицама овојнице вируса
- ✓ базирана на нанопартикулама које би, конјуговане са вирусним антигенима, „изимитирале“ сам вирус

8. Патоген специфичне вештачке антиген презентујуће ћелије (*Artificial Antigen Presenting Cells – aAPC*) – ради се на продукцији вештачки направљених антиген презентујућих ћелија које би, убризгавањем у организам утицале на продукцију одговарајућих цитотоксичних Т ћелија



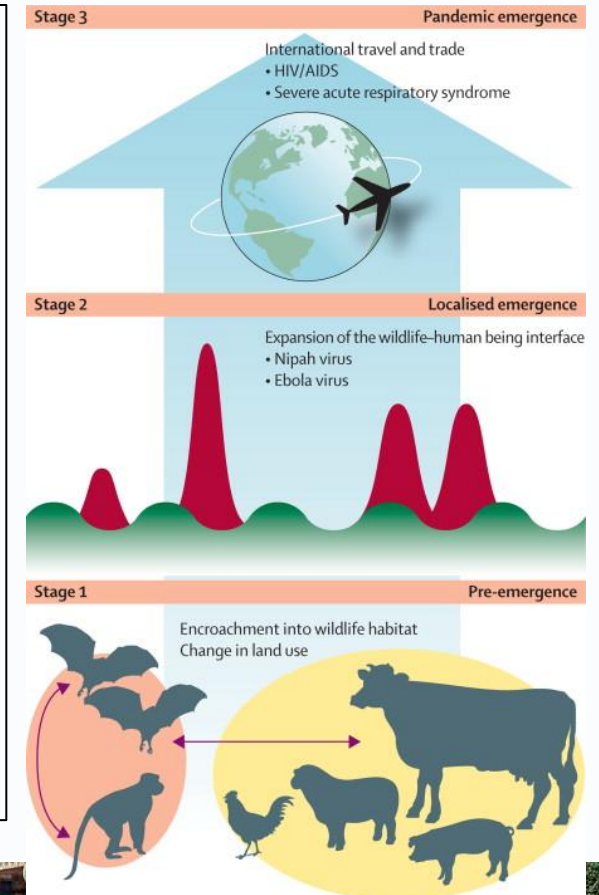
Како разумети вирусе и људски сарађивати са виромима у циљу одржања равнотеже организма човека и екосистема Земље

- Хумани свет јесте комплекс генома еукариотских и прокариотских ћелија и вируса, као и њиховог хармоничног суживота и комуникације
- Вируси представљају мале пакете генетског материјала који су се развили као „паразити“ на репродуктивној и биосинтетској машинерији ћелија домаћина
- Вируси нису живе ћелије али могу деловати као вектори за пренос гена. Тако ДНК вируси, могу постојати у ћелијама свог домаћина као релативно безопасни, било као плазмид, епизом или инстерован у геном домаћина. На својим путовањима вируси могу покупити фрагменте ДНК генома једне ћелије домаћина и пренети их у другу.
- Нови реаранжмани у ДНК секвенци које вируси индукују помоћу рекомбинационих механизма, створили су генетске варијације које су пресудне за еволуцију ћелија и организама.
- Хумани геном, процентуално садржи знатно више ДНК пореклом од вируса него протеин-кодирајућих гена. Остаци вирусне ДНК налазе се у геномима различитих организама, од животиња, биљака па све до бактерија.
- Основна улога вирома јесте пренос информација између различитих генома живих организама, што омогућава њихову комуникацију и хоризонтални трансфер гена



Како разумети вирусе и људски сарађивати са виромима у циљу одржања равнотеже организма човека и екосистема Земље

- Промене у људском понашању индукују настанак и еволуцију нових заразних болести. Тенденција модерног човека да живи у густо насељеним градовима је створила прилику вирусима да покрену епидемију, попут грипа, AIDS-а и SARS-Cov2. Путовање авионом може омогућити асимптоматском, тек инфицираном домаћину да прошири епидемију било којој претходно неекспонираној популацији у року од неколико сати.
- Ендогени хумани вирами штите домаћина од егзогених вируса - могу заштитити организам од штетних ефеката које епидемија изазива. Под одређеним условима, вирусна инфекција могла би се показати као повољна особина унутар популације.
- Многи вируси постоје веома дуго у њиховим природним резерватима. Константан пренос вируса са природних домаћина на људе и друге животиње су последица људских активности, укључујући: савремену пољопривреду, уништавање биодиверзитета, трговину животиња, урбанизацију, климатске промене узроковане људским фактором.

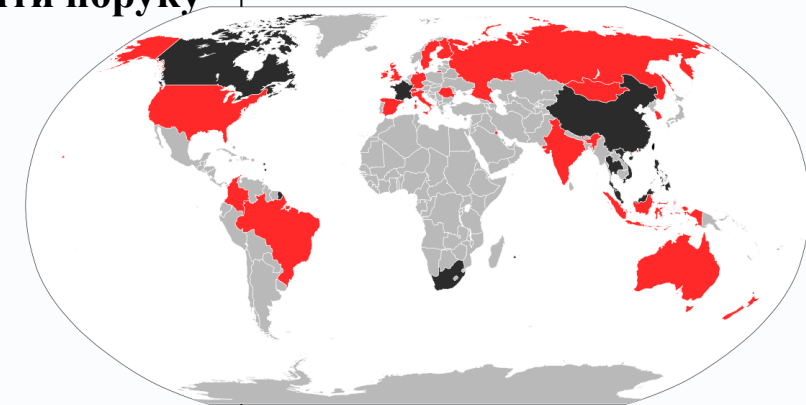


- Превентивне мере и мере ублажавања ефеката SARS-Cov2 епидемије: прање руку и дезинфиковање средствима на бази алкохола, прекривање уста приликом кашљања, забране контаката, одржавање међусобне дистанце међу људима, спречавање миграција, самоизолација потенцијално заражених и особа са блиским контктами са зараженима, контрола опасности од инфекције на радном месту, дезинфиковање просторија и површинско чишћење, привремено затварање одређених објеката, одлагање спортских, верских и културних догађаја.

Како разумети вирусе и људски сарађивати са виромима у циљу одржања равнотеже организма човека и екосистема Земље

- Отуђеност човека од себе, од људи и природе – живог света, заправо отуђеност генома и микробиома у човеку и екосистему, индукује виrome (наследно-информативни ДНК и РНК молекули) на агресивније преношење информација – паковање у вирусне партикуле, инфекција и пандемија, као у случају SARS-Cov2
- Коју информацију SARS-Cov2 преноси људима?
- SARS-Cov2 је један од 10^{15} виралних партикула у хуманом организму
- SARS-Cov2 припада групи вируса прехладе. Инфицира кроз цитотоксичну-литичку фазу животног циклуса оштећене ћелије респираторног тракта, а инфламаторне супстанце разарају дисфункционалне системе организма. Због тога се SARS-симптоми јављају код старијих и хронично оболелих особа.
- Деца, млади, психо-физиолошки здраве особе не експримирају SARS-симптоме, релативно су имуни
- Вируси прехладе се јављају као инфекција уморног организма – психо-соматски умор или исцрпљеност организма јесте први симптом хроничног стреса, који води психо-соматским хроничним обољењима (након инфекције ових особа изражени су SARS-Cov2 симптоми)
- Прва системска превентивна мера у епидемији SARS-Cov2 била је самоизолација, посвећеност себи и ближњима – ОДМОР и релаксација, као одговор на УМОР који је “вирусно” инфицирао целу цивилизацију

- Човечанство је на овај пандемијски начин упознато са вирусима, те је битно схватити поруку коју природа шаље, променити начине размишљања и разумевања себе и света
- Како би се смањило ризик ширења вирусних зооноза у будућности неопходно је:
 - Идентификовати потенцијално заразне вирусе које се налазе у дивљини;
 - Развити вакцине за ове вирусе;
 - Идентификовати ризично понашања људи; Спречити илегалну трговину животиња;
 - Смањити пренасељеност и загађење градова;
 - Уложити већи напор у очувању природних станишта и биодиверзитета;
 - Регулисати узрочнике глобалног загревања.



ЛИТЕРАТУРА

- Human genome project. <https://www.genome.gov/human-genome-project>
- Human microbiome project. <https://www.hmpdacc.org/>
- Metagenomics of the Human Intestinal Tract project. <http://www.metahit.eu/>
- <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov>
- World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. World Health Organization, 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>.
- World Health Organization. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
- Abduljali JM, Abduljalil BM. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. *New Microbes and New Infections*. 2020, 35: 100672.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition. Garland Science, New York, 2008.
- Celluzzi A, Masotti A. How Our Other Genome Controls Our Epi-Genome. *Trends in Microbiology*. 2016, 24(10): 777-787.
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews / Microbiology*. 2019, 17: 181-192.
- Finer M, Glorioso J. A brief account of viral vectors and their promise for gene therapy. *Gene Therapy* / 2017, 24: 1–2.
- García-López R, Pérez-Brocal V, Moya A. Beyond cells - The virome in the human holobiont. *Microbial Cell*. 2019, 6(9): 373-396.
- Goodier JL, Kazazian HH. Retrotransposons Revisited: The Restraint and Rehabilitation of Parasites. *Cell*. 2008, 135: 23-35.
- Hoffmann M, et. Al.. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020, 181(2): 271-280.
- Jalasvuori M. Revolutionary Struggle for Existence: Introduction to Four Intriguing Puzzles in Virus Research. In: Witzany G. (eds) *Viruses: Essential Agents of Life*. Dordrecht. Springer. 2012.
- Jin Y, Wang M, Zuo Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020, 94.
- Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunology* / 2018, 9: 2061.
- Morse S, Mazet J, Woolhouse M, et al. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *The Lancet*. 2012, 380: 1956-1965.
- Pavićević-Savić D, Matić G. *Molekularna biologija 1*. Prvo izdanje. NNK internacional, Beograd, 2011.
- Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res.* / 2015, 9(1): GE01–GE6.
- Richard GF, Kerrest A, Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology, Molecular Biology Reviews*. 2008, 72: 686- 727.
- Sanchez B, Delgado S, Blanco-Miguez A, Lourenco A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2017, 61(1): 1-15.
- Santiago-Rodriguez TM, Hollister EB. Human Virome and Disease: High-Throughput Sequencing for Virus Discovery, Identification of Phage-Bacteria Dysbiosis and Development of Therapeutic Approaches with Emphasis on the Human Gut. *Viruses*. 2019, 11(7): 656.
- Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*. 2020, 24: 91–98.
- Shin H, Price K, Albert L, Dodick J, Park L, Dominguez-Bello MG. Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing. *mBIO*. 2016, 7(2): 1-6.
- Stern J, Miller G, Li X, Saxena D. Virome and bacteriome: two sides of the same coin. *Current Opinion in Virology*. 2019, 37: 37-43.
- Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, Lai WY, Yang DM, Chou SJ, Yang YP, Wang ML, Chiou SH. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci*. 2020, 21, 2657.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature*. 2007, 449: 804–810.
- Vaillant J, Jan A. *Physiology, Immune Response*. Treasure Island (FL): StatPearls, 2020.
- Valencia DN. Brief review on COVID-19: The 2020 pandemic caused by SARS-CoV-2. *Cureus*. 2020, 12(3): e7386.