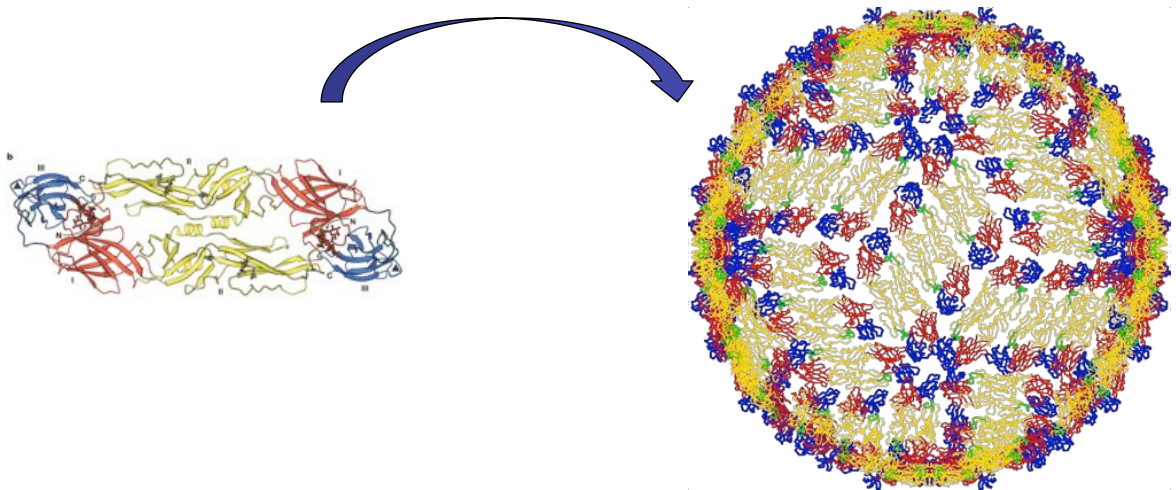


2. Virus e proteine virali: dalla struttura alla funzione biologica

Mario Milani

mario.milani@mi.infm.it

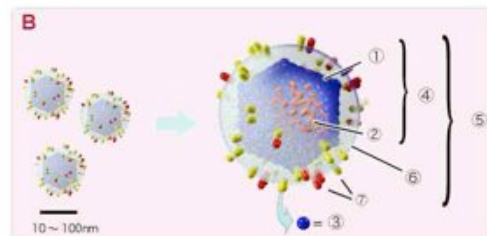
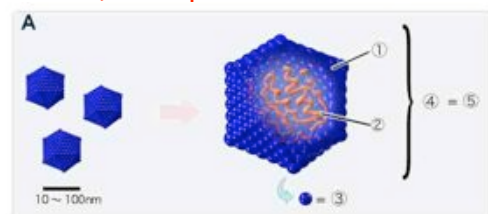
<http://digilander.libero.it/mario.milani/teaching.html>



virus

- ✓ i virus sono parassiti microscopici che **infettano le cellule**
- ✓ Sono stati scoperti dal biologo Russo Dmitri Ivanovsky nel **1892**. Il nome viene dal latino *virus* che significa veleno
- ✓ I virus sono **parassiti intracellulari obbligati**: si possono riprodurre solo all'interno di altre cellule
- ✓ Essi posseggono un genoma che può essere fatto di **DNA or RNA**, a singolo o doppio filamento a senso positivo o negativo
- ✓ Il genoma è circondato da una capsula protettiva detta **capside (icosaedrico o elicoidale)**. Alcuni virus hanno anche una **membrana (envelop)** che circonda il capside
- ✓ La particella virale è detta **virione**. Un virione può essere considerato come un **trasportatore di informazioni genetiche** utili alla sua replicazione.

A) virus privo di membrana



B) virus con membrana

- 1 Capside
- 2 Acidi nucleici
- 3 proteina del capside
- 4 Nucleocapside
- 5 Virione
- 6 Proteine di membrana
- 7 Proteine esterne alla membrana

infezione virale

- 1. Attaccamento:** Il virus si attacca ai recettori posti all'esterno della cellula
- 2. Ingresso:** Il virus passa attraverso la membrana cellulare e entra nel citoplasma
- 3. Replicazione:** il virus usa i meccanismi della cellula ospite per sintetizzare tutti i componenti necessari alla sua replicazione
- 4. Assemblaggio:** i componenti del virus vengono assemblati in nuovi virioni
- 5. Rilascio:** i virioni escono dalla cellula e possono andare ad infettare nuove cellule

Dimensione virus = 10-100 nm (filovirus 14000 nm, circovirus 12 nm)

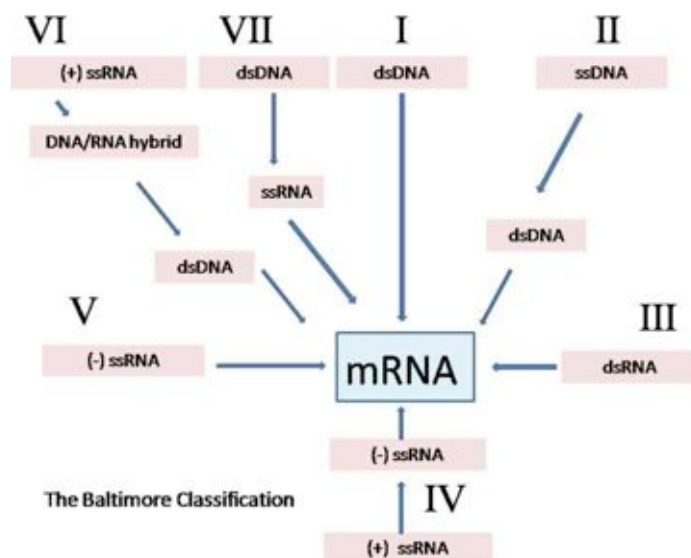
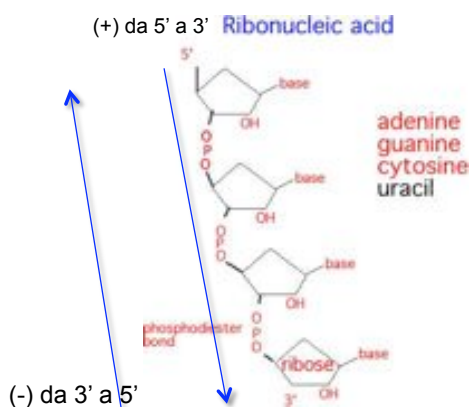
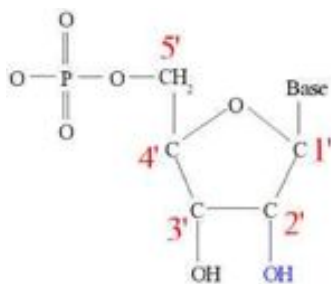
Dimensione batteri = 10^3 nm

Dimensione eucarioti = 10^4 - 10^6 nm

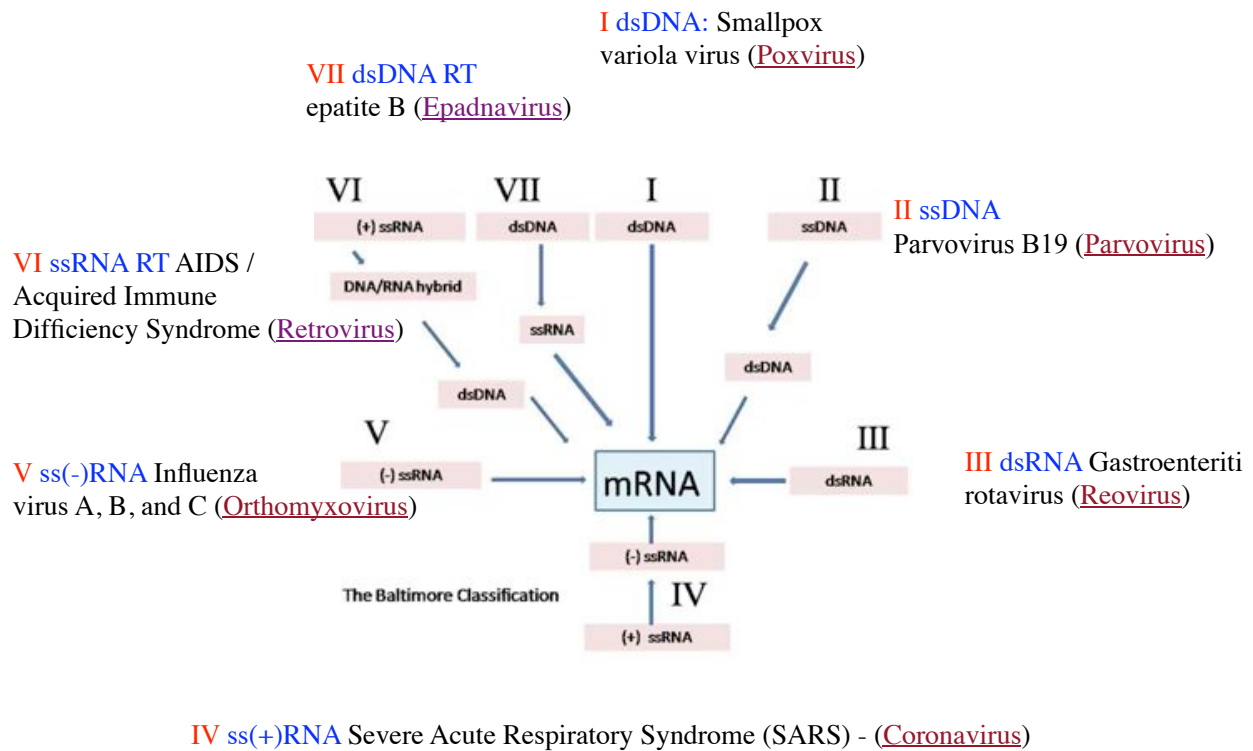
La **classificazione** dei virus segue lo schema seguente:

1. Tipo di genoma (DNA o RNA)
2. Simmetria del capside (icosaedrica, elicoidale)
3. Presenza/assenza di un envelop (membrana)
4. Architettura del genoma (ds (doppio filamento) ss (singolo filamento); +, -; lineare, circolare)
5. Dimensione del genoma: da 1.8 kb a 350 kb

Classificazione dei virus in 7 classi in base al genoma



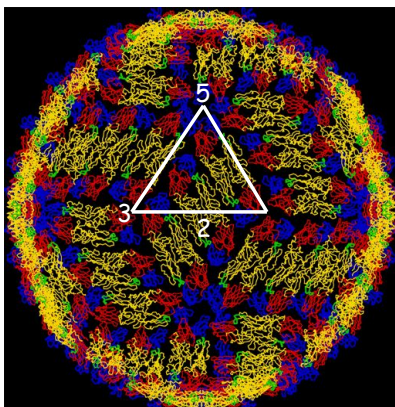
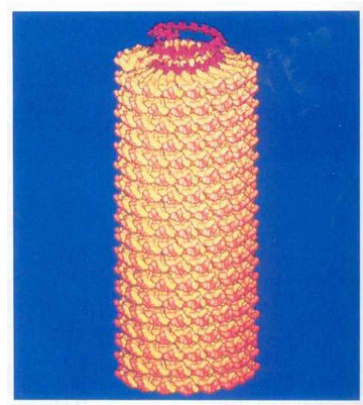
Esempi di malattie umane virali



Struttura dei virus

Le proteine che costituiscono il capside dei virus si dispongono in modo simmetrico o quasi-simmetrico. Ci sono due possibili disposizioni:

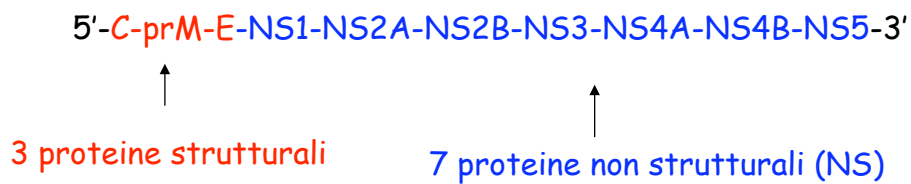
virus con **capside elicoidale**, in cui le subunità proteiche si associano a formare un bastoncino elicoidale;



virus con **capside sferico**, in cui le subunità proteiche si aggregano a formare un icosaedro.

Esempio: Flavivirus

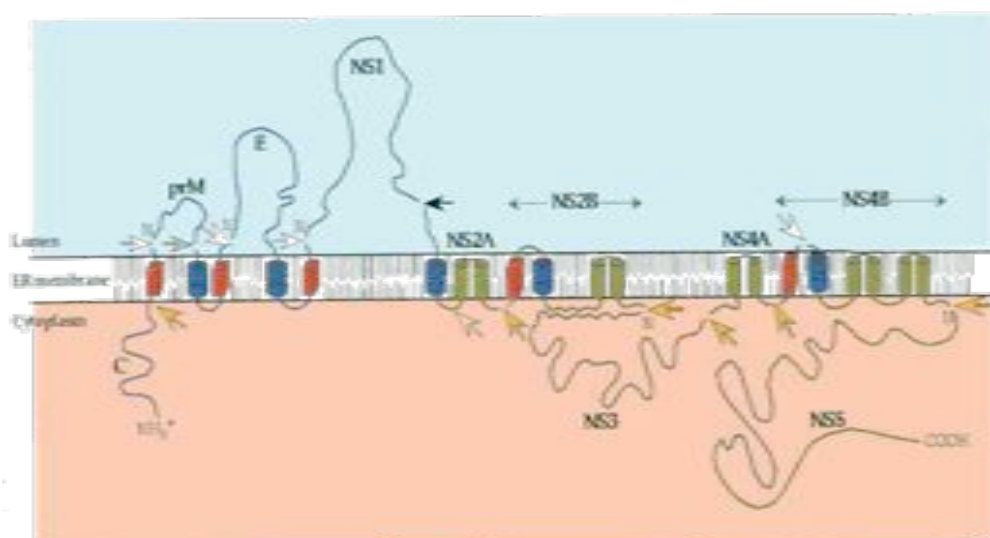
- Flavivirus: virus dotati di membrana (envelop) contenenti ss(+)RNA=mRNA
- Malattie associate: febbre gialla (flavus=giallo), Dengue, West Nile (...); sintomi: febbre emorragica, encefalite ...
- Utilizzano zanzare o zecche come vettori di infezione.
- Genoma: 11 kbs
- mRNA genera un'unica poliproteina di circa 3400 amminoacidi; tale poliproteina viene proteolizzata in almeno 10 proteine virali:



La proteolisi, traslocazione replicazione virale sono fenomeni associati che avvengono in contatto con il reticolo endoplasmatico

poliproteina dei flavivirus

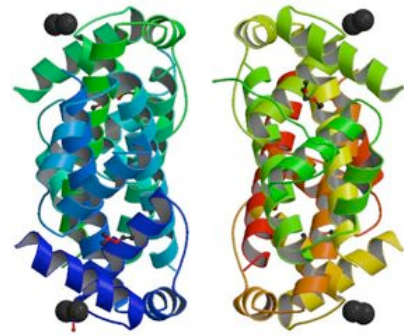
5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'



Proteine strutturali

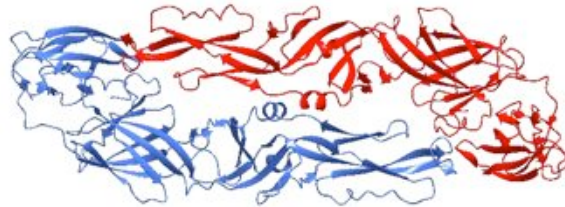
West Nile virus

C = proteina del capsid, (Mw: 12-14 kDa, circa 105 aa.), carica positivamente (pdb: 1sfk, Dokland et al., 2004)



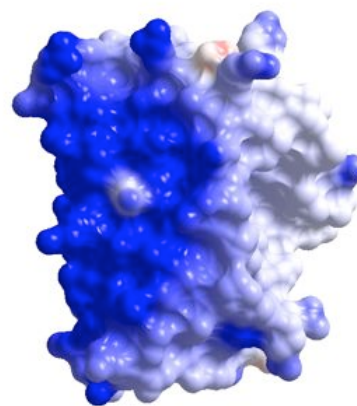
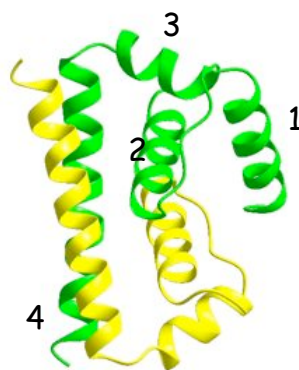
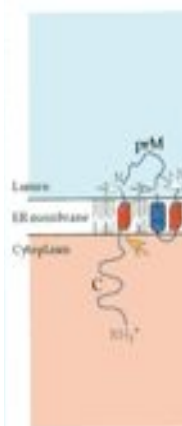
M = proteina della membrana, (Mw: 18-19 kDa), glicosilata, (non c'e' la struttura)

E = proteina dell' envelop, (Mw: 53-54 kDa, circa 500 aa.), proteina di membrana glicosilata (pdb: 1OAN, Modis et al., 2004)



C = proteina del capsid, 123 aa. \Rightarrow 105 aa. (taglio del C ter.)

Blu= +39 kT/e, rosso=-39 kT/e



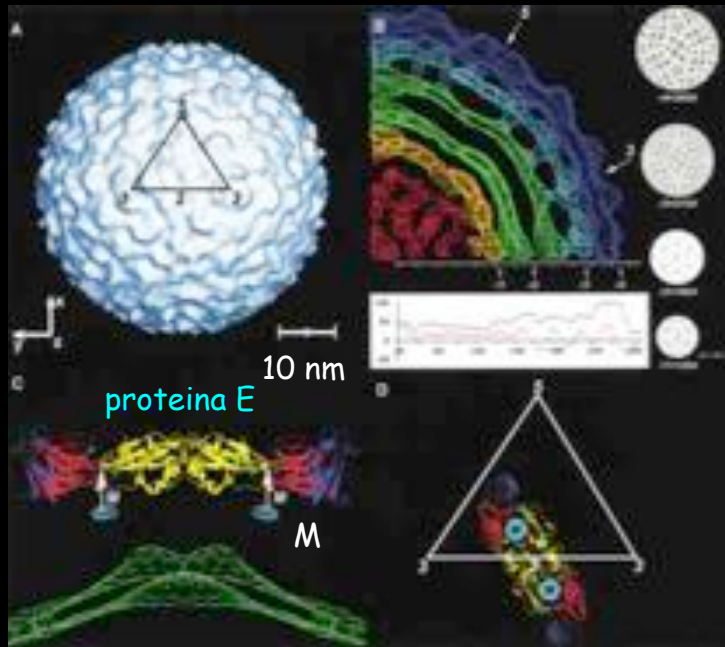
Mobilita' di $\alpha 1$:
-RNA binding
-capsid assembly

Dokland et al., 2004

Struttura del virione di virus dengue

Da microscopia elettronica: particelle virali dalla superficie poco rugosa di circa 50 nm di diametro

Cryo electron microscopy a 24 Å di risoluzione: la proteina E forma una struttura icosaedrica formata da 90 dimeri (T=3, 3 mol. nell'a.u.).



Envelop, proteina E, 220-245 Å

M ecto dom., E stem, 185-220 Å

Membrana, 140-185 Å

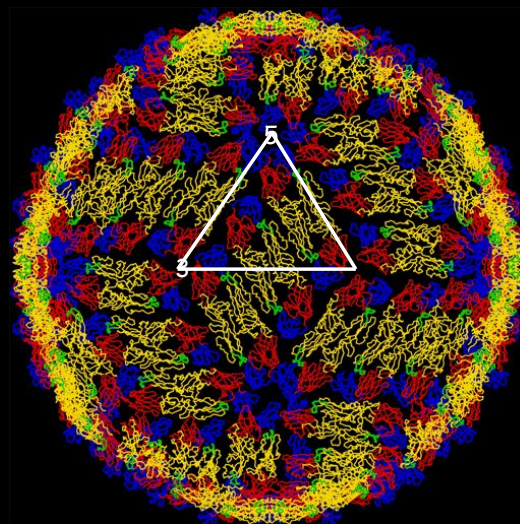
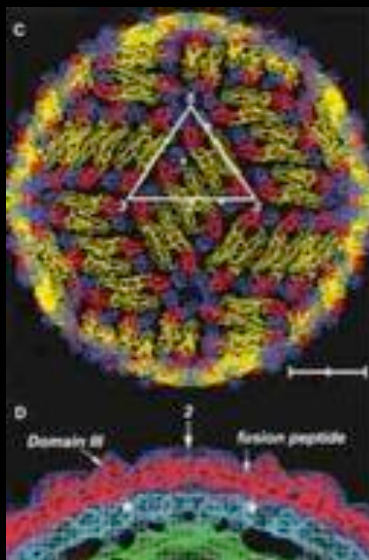
Capside, 105-135 Å

mRNA

La struttura del capside non e' ben definita:
-differente orientazione rispetto all'envelop
-disordine nella simmetria icosaedrica

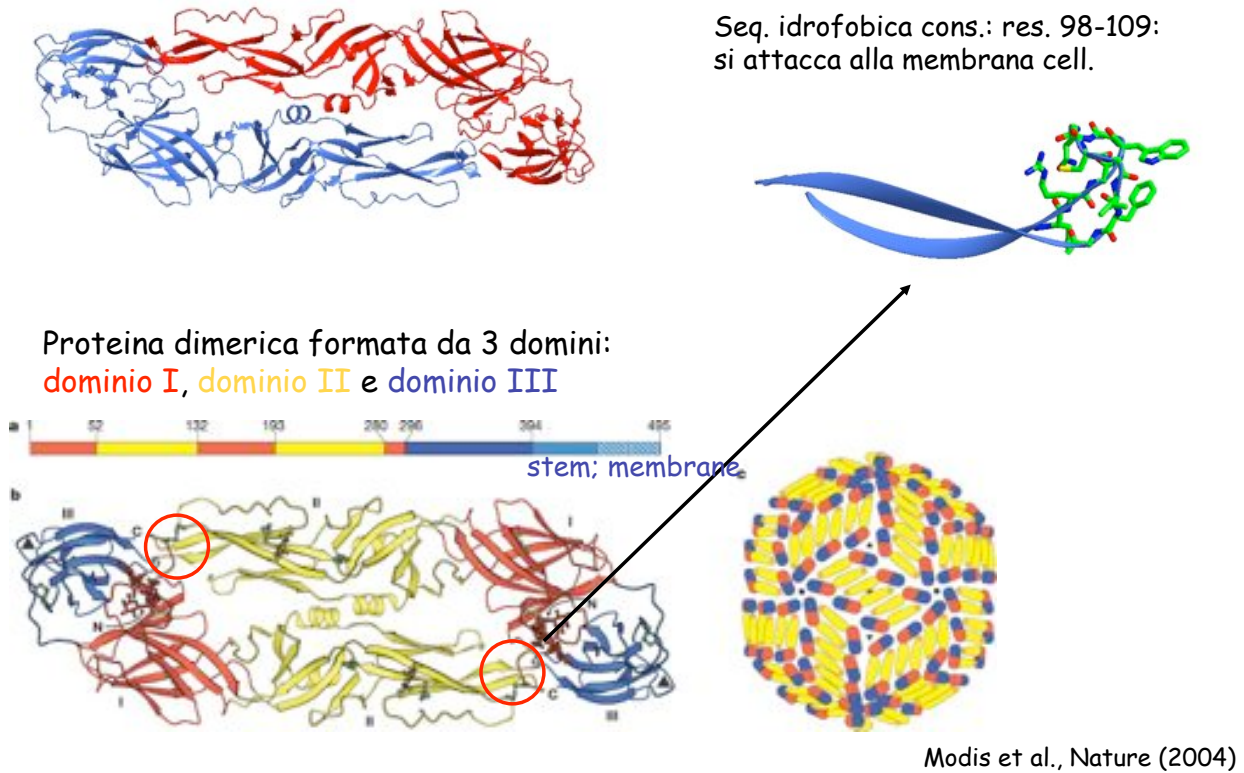
Kuhn et al., 2002

Struttura dell'envelop virale: 90 dimeri (T=3, 3 mol. nell'a.u.).



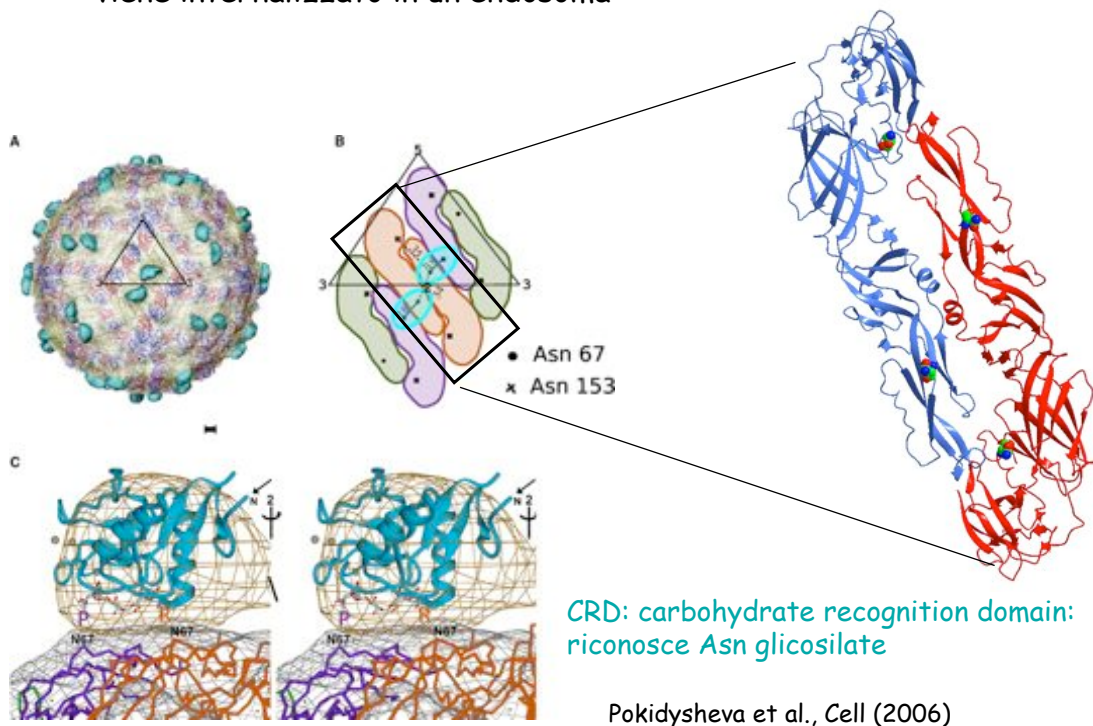
Kuhn et al., 2002

Envelop protein E

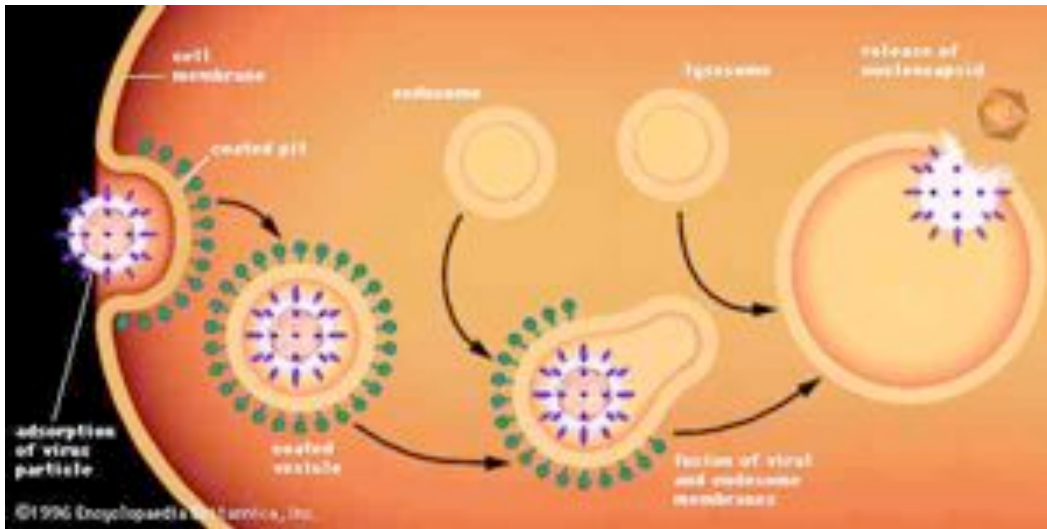


Ingresso nella cellula: fusione delle membrane

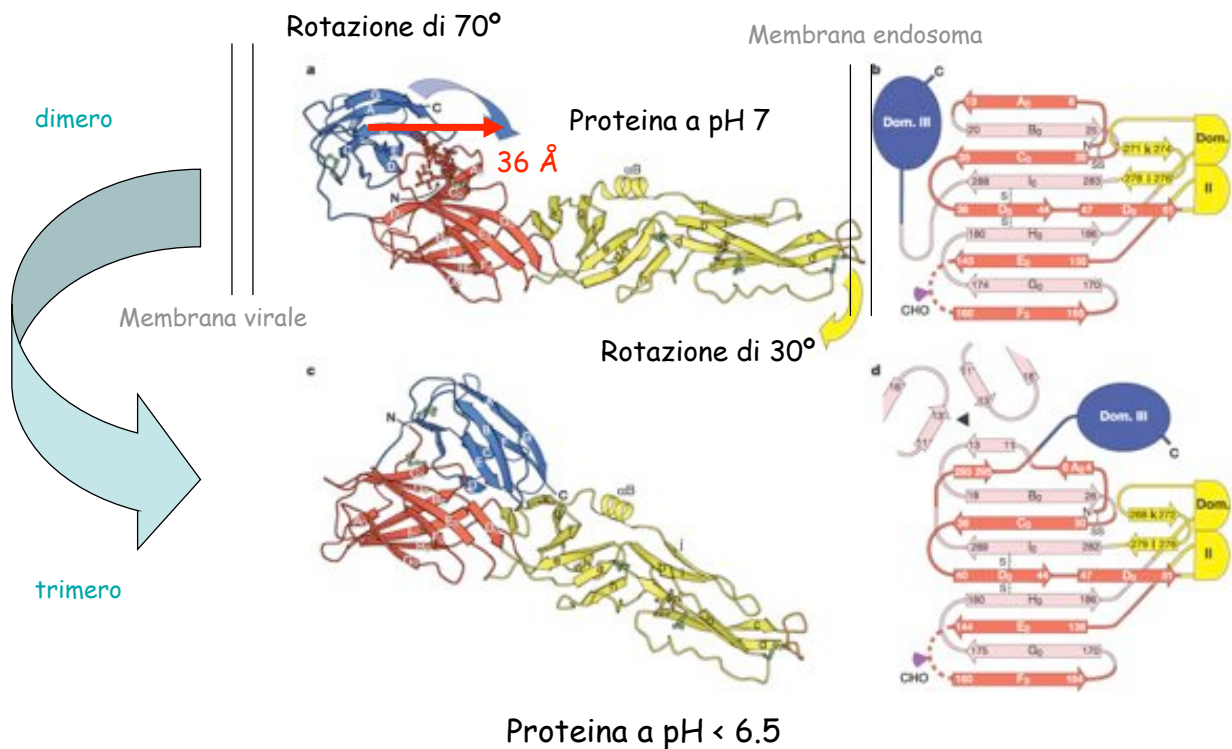
La proteina E si lega ad un ricettore sulla superficie cellulare e il virus viene internalizzato in un endosoma



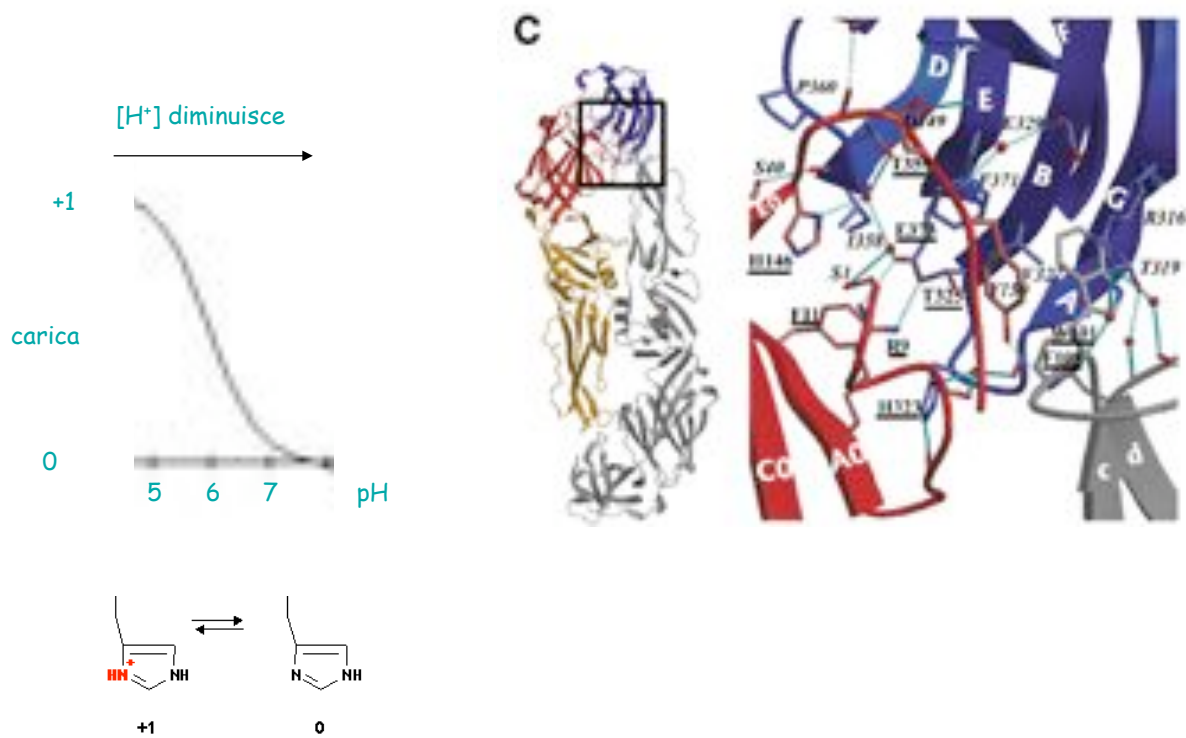
Ingresso nella cellula: endocitosi



Modificazioni della proteina E indotte dal pH



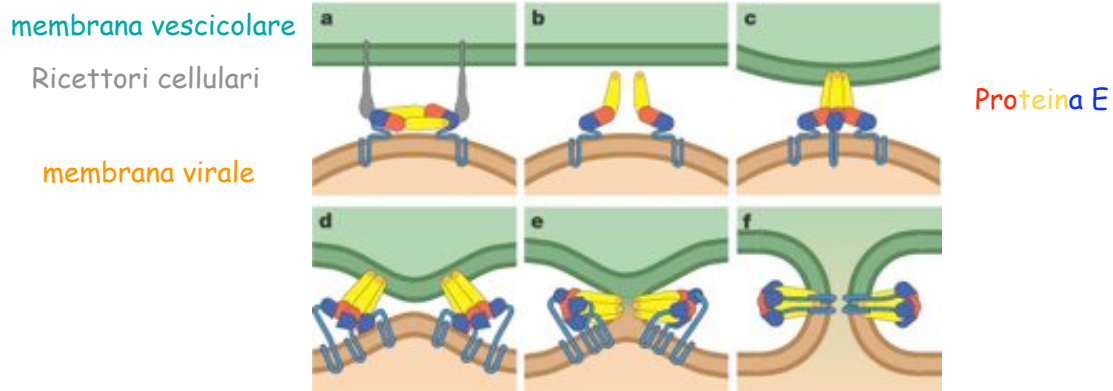
Modificazioni della proteina E indotte dal pH



Bressanelli et al., EMBO J. (2004)

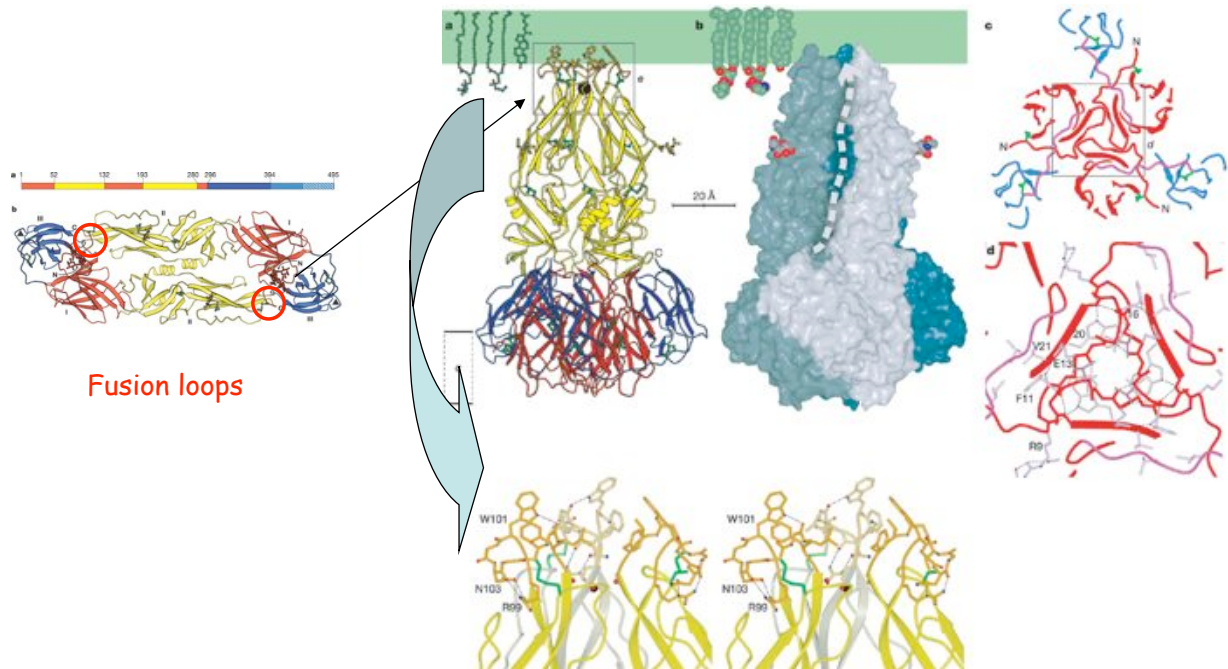
Fusione delle membrane

- Legame ai ricettori cellulari
- Endocitosi e abbassamento del pH: cambiamento conformazionale
- La proteina E nella nuova conformazione diviene trimerica e si lega alla membrana vescicolare
- e) f) fusione delle membrane e rilascio del capsido nel citoplasma



Modis et al., Nature (2004)

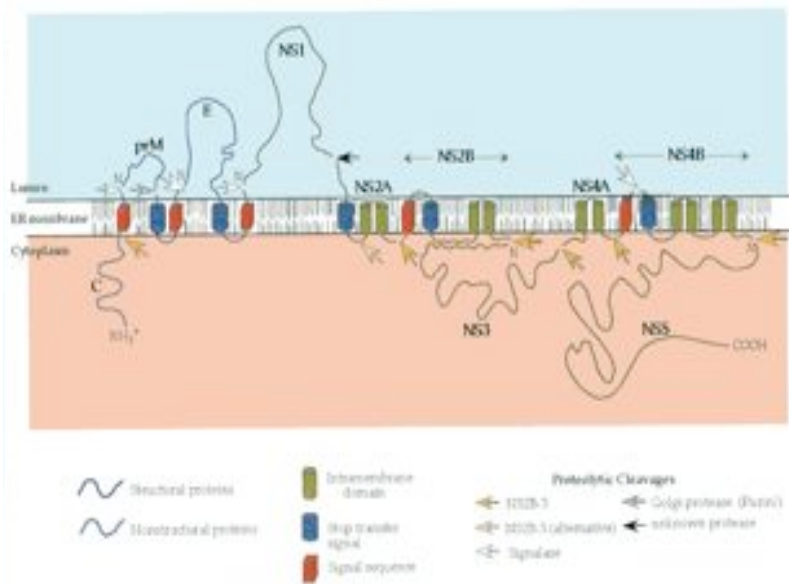
Fusione delle membrane



Modis et al., Nature (2004)

Proteine non strutturali (NS) e replicazione del virus

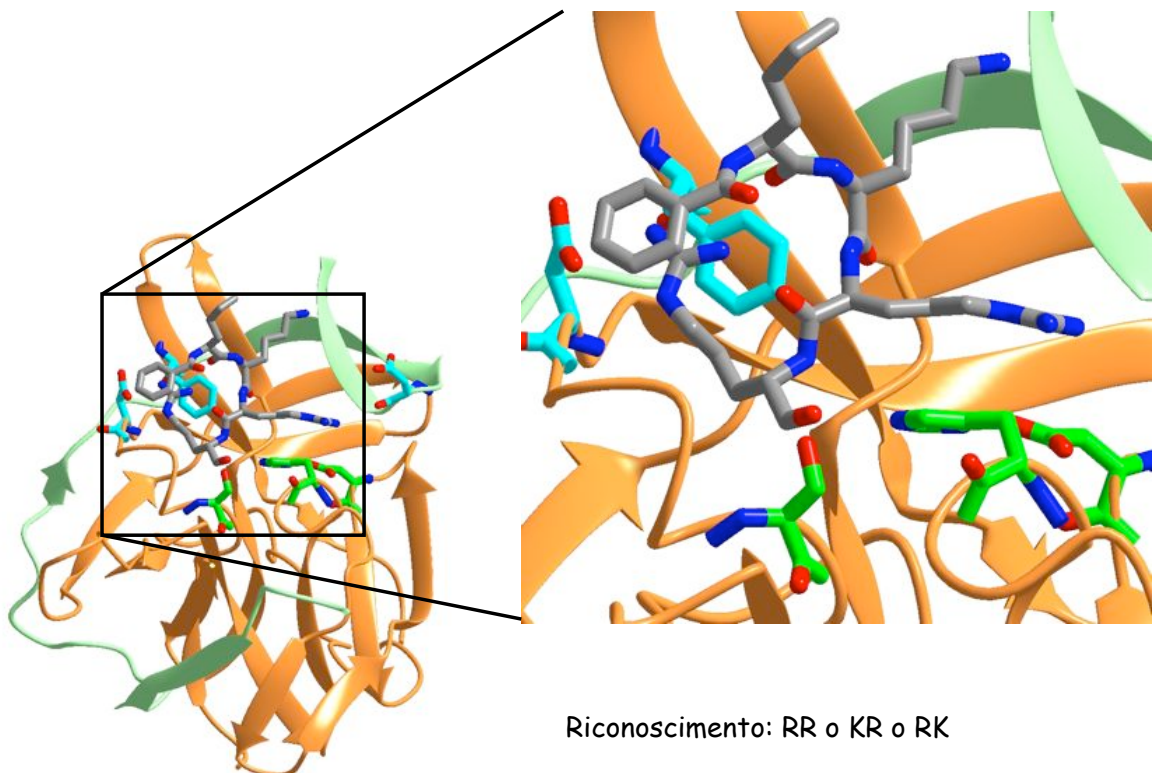
- NS1:** 40 kDa, ricca di cys, glicosilata, attivita' proteasica? Partecipa alla replicazione virale
- NS2A:** 25 kDa, proteina di membrana, ancoraggio del complesso di replicazione alla membr.
- NS2B:** si associa ad NS3 a formare la proteasi
- NS3:** 70 kDa, N-ter (1-180) Ser proteasi, C-ter elicasi e RNA trifosfatasi
- NS4A-B:** ancoraggio alla membrana del complesso di repl.
- NS5:** 104 kDa, N-ter Mtasi, C-ter RNA dep. RNA polimerasi



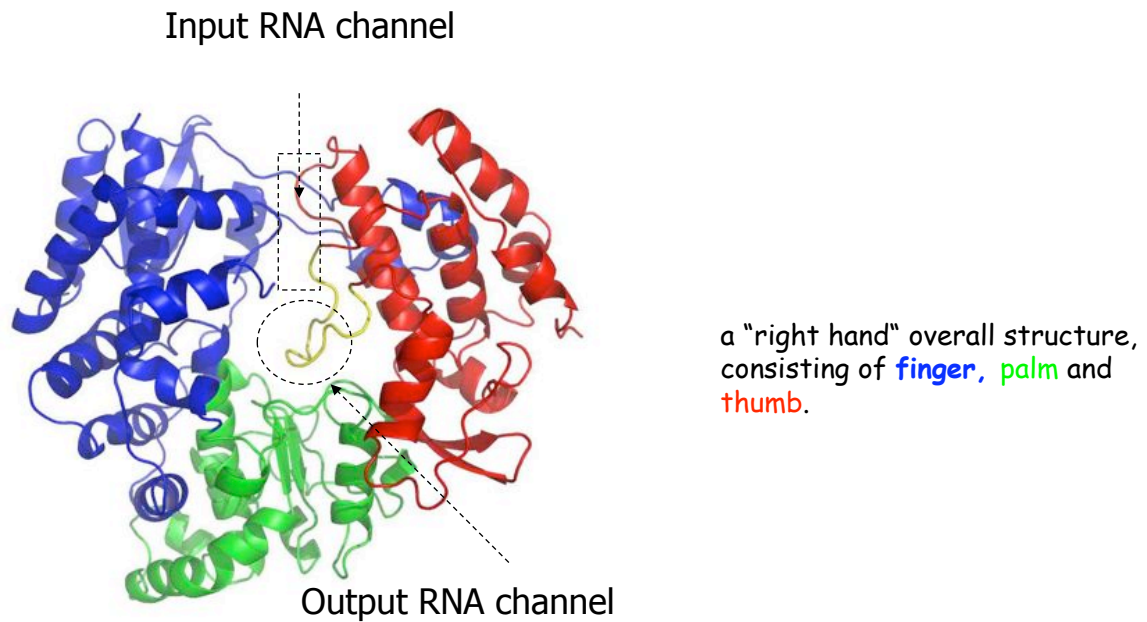
Proteine non strutturali (NS) e replicazione del virus

- **Traduzione:** Ribosomi umani, costruzione della poliproteina virale
- **Attivazione delle proteine virali:** Proteasi virale NS2B/NS3 + proteasi umane
- **Replicazione del genoma (trascrizione):** RNA polimerasi (NS5 C-ter.) + elicasi (NS3 C-ter)
- **Capping dell'RNA:** NTPasi (NS3 C-ter) + guanilil trasferasi (?) + Mtasi (NS5 N-ter.)
- **Costruzione e assemblaggio di nuove particelle virali:** (?)

Proteasi NS2B/NS3



NS5 C-ter domain: RNA dep. RNA polimerasi



Egloff et al., 2007

complesso di replicazione: NS3+NS5

