

Virus Sendai

PARAMYXOVIRUS

Caratteristiche generali

➤ La famiglia Paramyxoviridae (paramixovirus) comprende un ampio gruppo di virus responsabili di patologie notevolmente diverse sia per l'uomo sia per gli animali.

Questa famiglia, sulla base di criteri morfologici, dell'organizzazione del genoma e dell'attività biologica delle proteine, è stata riclassificata nel 1993 in due sottofamiglie:



Paramyxovirinae

Generi

Paramixovirus (Sendai, Parainfluenza 1 e 3)
Rubulavirus (Parotite, Parainfluenza 2 e 4a e 4b, NDV)
Morbillivirus (Morbillo)

Pneumovirinae

Generi

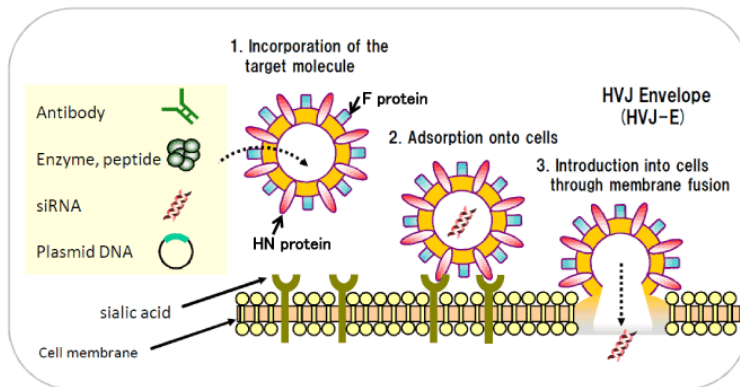
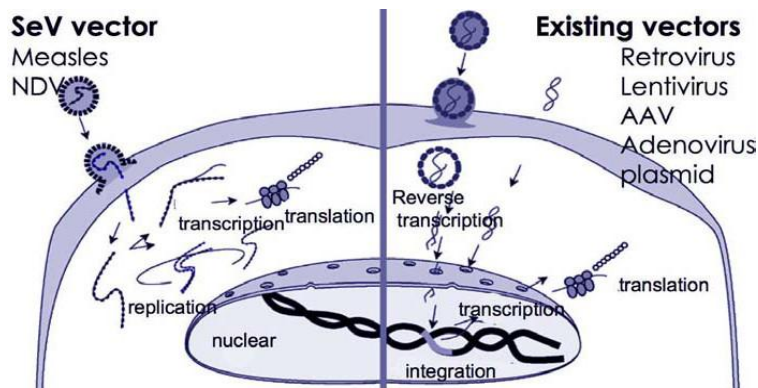
Pneumovirus (RSV)

Virus Sendai

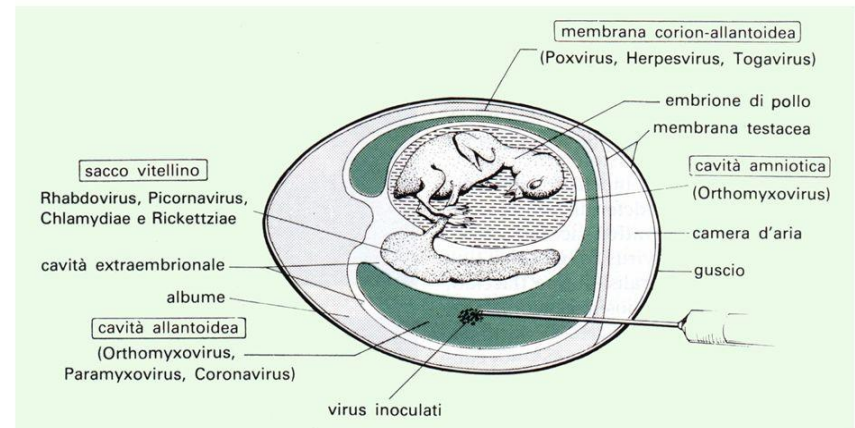
- Scoperto nel 1952 nella città di Sendai, in seguito ad una epidemia di polmonite neonatale resistente a tutti gli antibiotici
- Agente patogeno di tipo virale, con attività emoagglutinante e con struttura antigenica diversa dai virus influenzali e parainfluenzali conosciuti
- Agente eziologico della polmonite fulminante nel topo

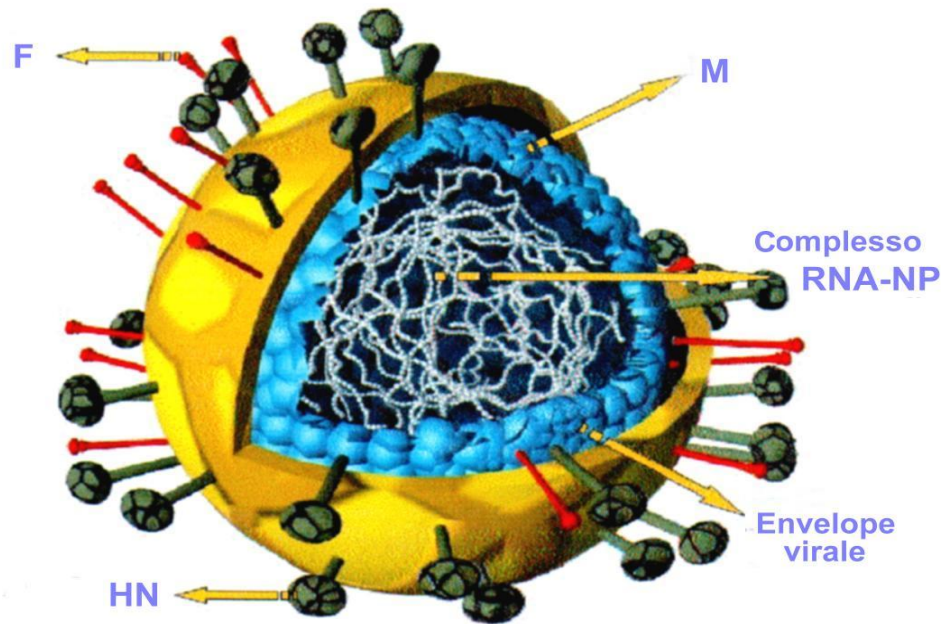
Perché studiare il VIRUS SENDAI?

- Prototipo dei Paramixovirus
- Strumento di studio nell'interazione virus-cellula
- Largo impiego nella ricerca per bassa patogenicità e facilità di produzione
- Carrier di farmaci
- Produzione dell'interferon- α



Coltivazione dei virus nell'uovo embrionato di pollo





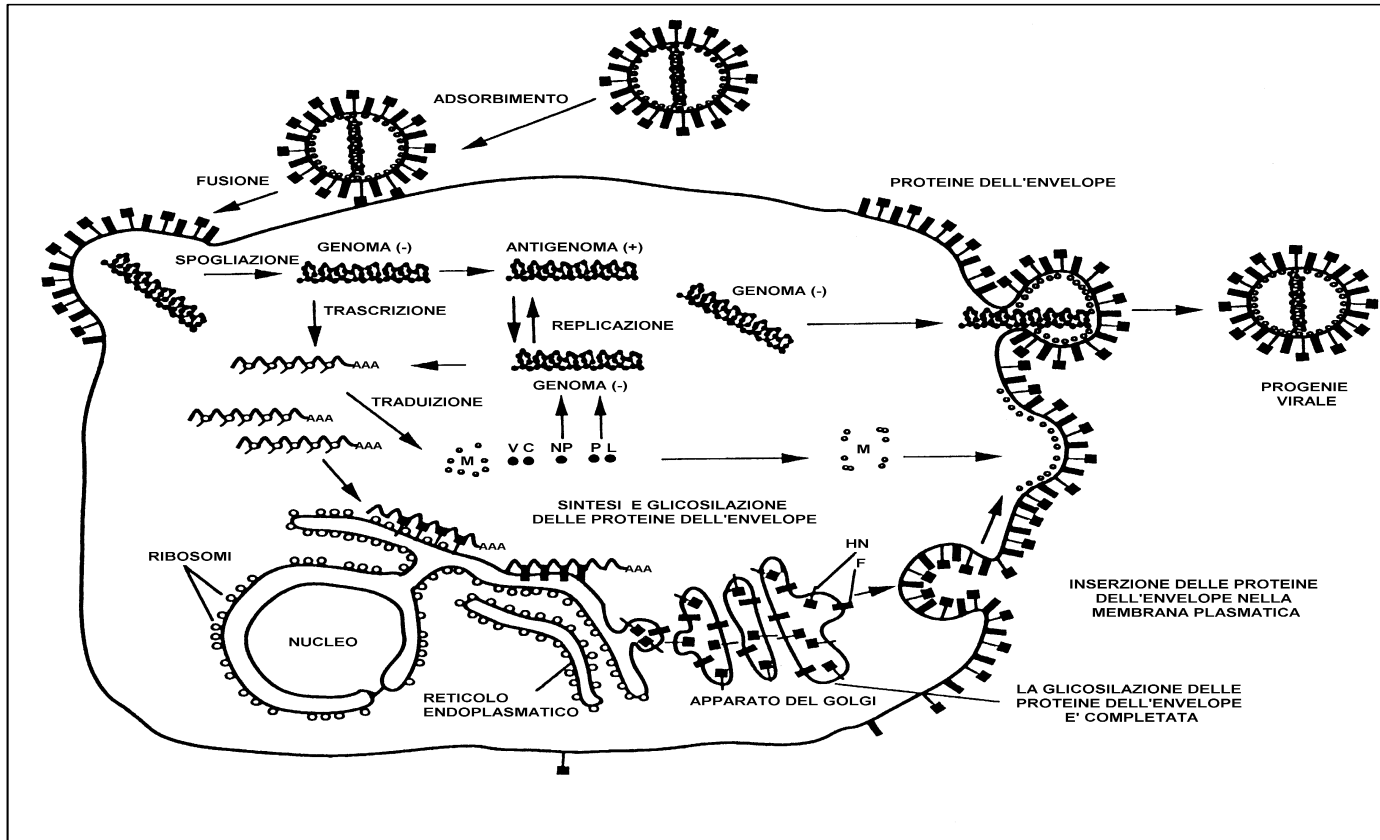
➤ E' un virus ad RNA monocatenario a polarit  negativa di circa 15 kb, in cui il genoma   associato alla proteina maggiore del nucleocapside NP;

➤ la proteina M lega il nucleocapside all' envelope e mantiene la forma sferica del virus.

➤ E' dotato di ENVELOPE e contiene due importanti proteine di membrana glicosilate:

Emagglutinina-neuraminidasi (HN): proteina del pericapside con capacit  recettoriali, che lega ed idrolizza i residui di acido sialico di glicoproteine e glicolipidi.

Proteina Fusogena (F): svolge o un ruolo essenziale nel processo di fusione tra il virus e la cellula.



Il primo e più delicato passaggio per l'infezione virale è:

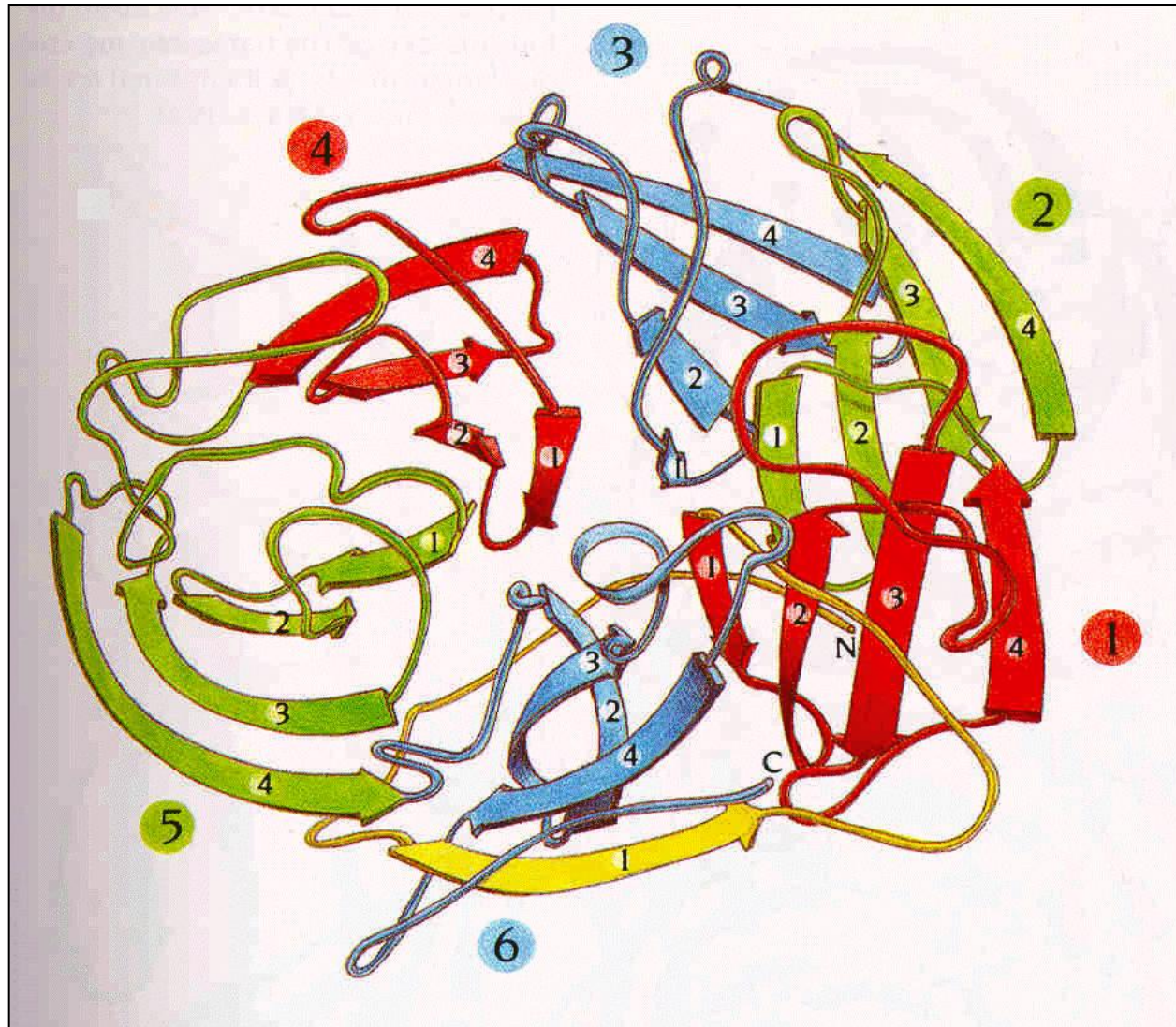
- l'ingresso virus nella cellula ospite, e questo passaggio consiste, per i virus forniti di envelope, nella fusione della membrana virale con la membrana cellulare.
- Il [meccanismo molecolare di questo processo](#), cruciale per la capacità infettiva dei virus, è tutt'ora poco conosciuto, ma presenta un grande interesse in quanto può rappresentare un bersaglio per nuovi farmaci.

- La proteina F è responsabile della fusione tra l'Envelope virale e la membrana della cellula ospite
- Le proteine fusogene dei virus sono di norma inattive e richiedono un evento specifico, quali un cambiamento di pH o un legame con uno o più recettori, per essere attivate.
- Il processo di attivazione della proteina della proteina fusogena è di fondamentale importanza per l'infezione virale.
- Una corretta comprensione di tale fenomeno diventa, quindi, di estremo interesse anche applicativo

HN: struttura

- Proteina di 63,4 kDa, con una sequenza di 575 aa;
- Proteina integrale di membrana di tipo 2, con N-terminale citosolica e C-terminale extracellulare;
- La regione C-terminale solubile (cHN), di 444 aa è ottenuta mediante in taglio triptico a livello della Arg 131 e mantiene le stesse proprietà cinetiche (V_{max} e K_m) del virus intatto;
- Presenta una sola regione idrofobica: il dominio TM (di ancoraggio) dalla parte N-terminale, dall'aa 36 all'aa 58;
- Proteina glicosilata con 5 siti di glicosilazione con mannosio, galattosio, glucosio, glucosammina, manca acido sialico;
- Presente come omodimero (con ponti disolfuro) e omotetramero (in cui i dimeri sono uniti da legami non covalenti);
- La struttura ipotizzata è quella del “**rocket propeller**”: superstruttura a botte data da sei foglietti β , ciascuno dei quali è formato da 4 filamenti β antiparalleli;

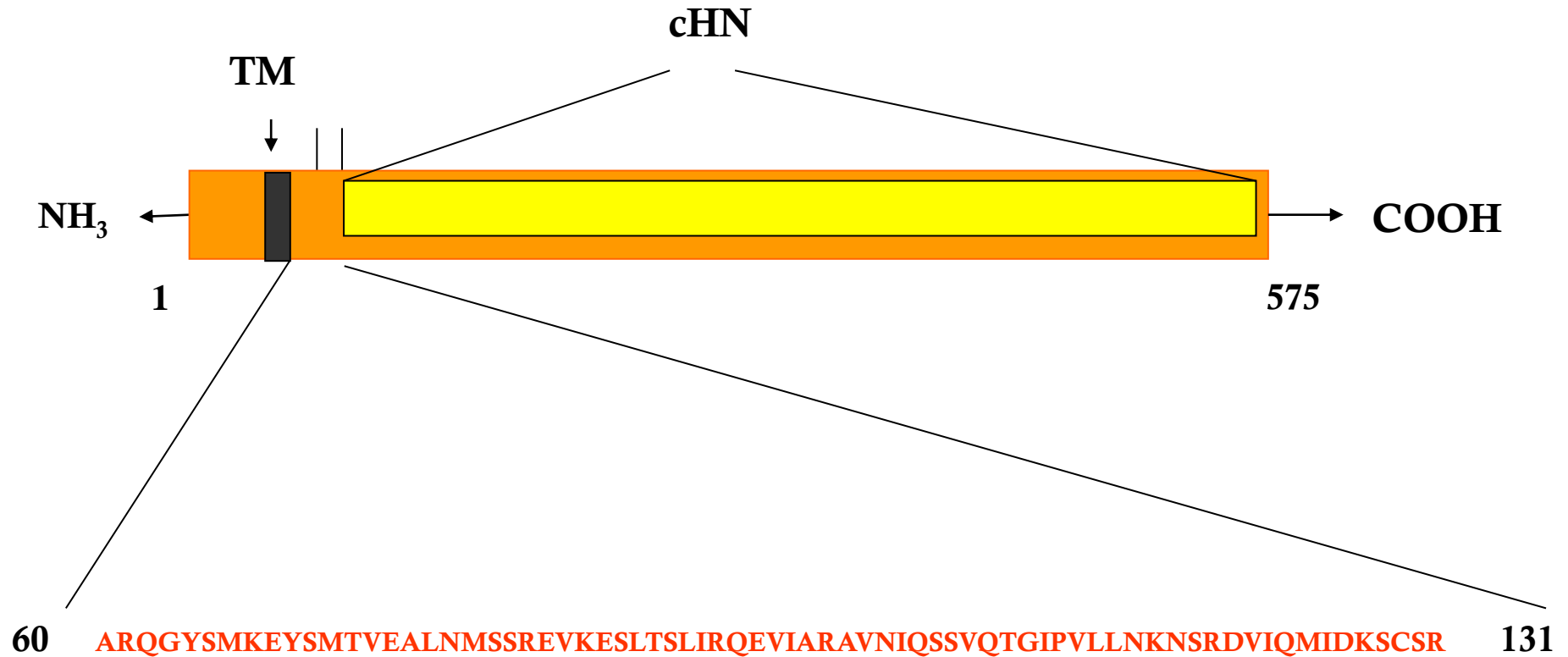
Struttura del ROCKET PROPELLER



I foglietti β sono collegati da 6 loop tra β_4 e β_1 di due motivi adiacenti

Altri 6 loop sono tra i filamenti $\beta_{2,3}$ dello stesso foglietto

Il sito di legame si trova in una tasca ad imbuto formata dalle 12 regioni loop orientate nello stesso modo

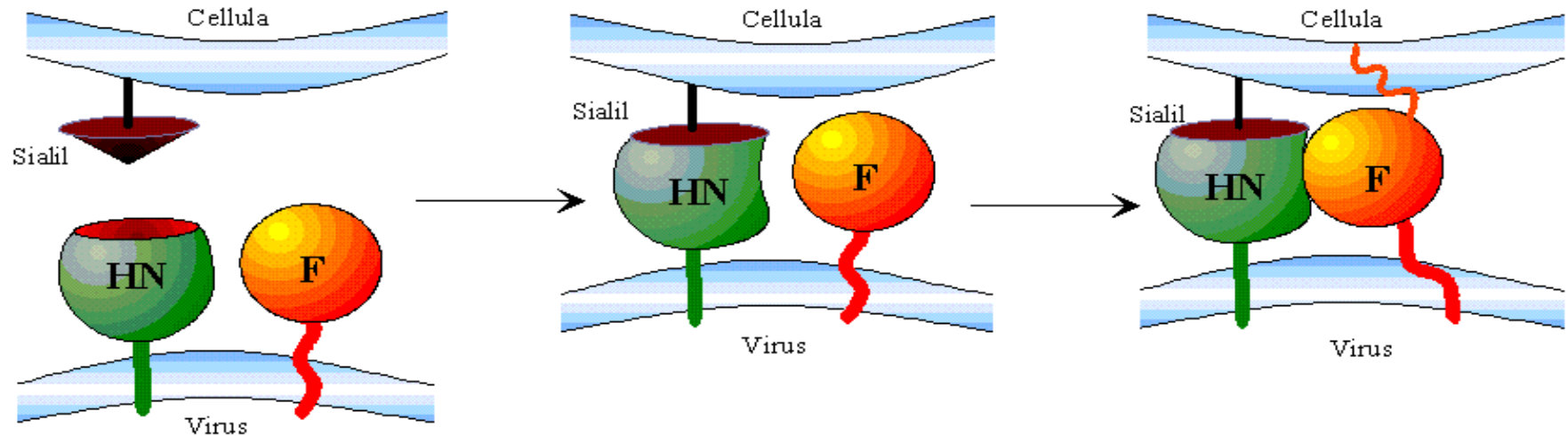


- L'interazione di F avviene con la parte globulare di HN e abbiamo studiato la parte della proteina dall'Arg 131 (**cHN**)
- La breve sequenza extracellulare che precede l'Arg 131 è poco conosciuta.

HN: Funzione

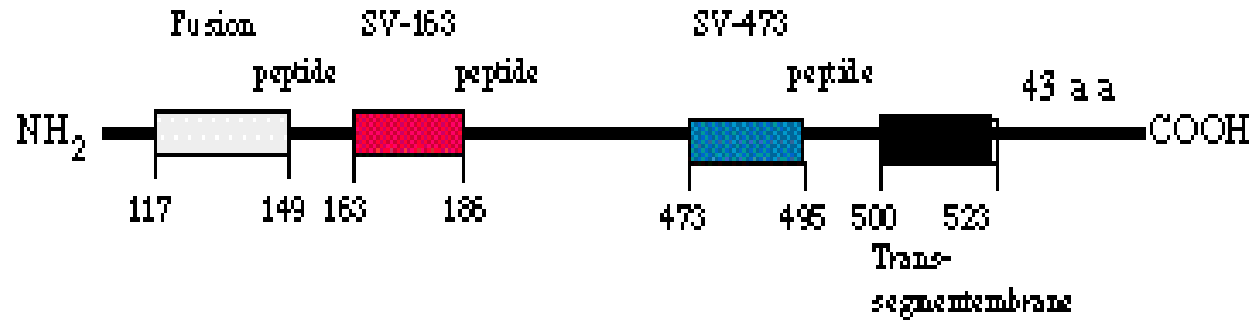
- Proteina multifunzionale: con attività emoagglutinante, neuraminidasica e con un ruolo nella fusione virus-cellula;
- Come Emoagglutinina induce, nelle prime fasi dell'infezione, l'adsorbimento dei virioni alla membrana della cellula ospite, attraverso il legame ai recettori di acido sialico; l'attività emoagglutinante richiede un pH fisiologico ed è indipendente dalla temperatura (è stabile a 4°C).
- Come Neuraminidasi facilita la fuoriuscita dei virioni dalle cellule infette, in uno stadio più avanzato dell'infezione, catalizzando l'idrolisi dei residui di acido sialico; l'attività neuraminidasica è ottimale ad un pH compreso tra 4,8 e 5,5 e ad una temperatura di 37°C;
- Come interviene HN nella Fusione?

Meccanismo di fusione virus-cellula

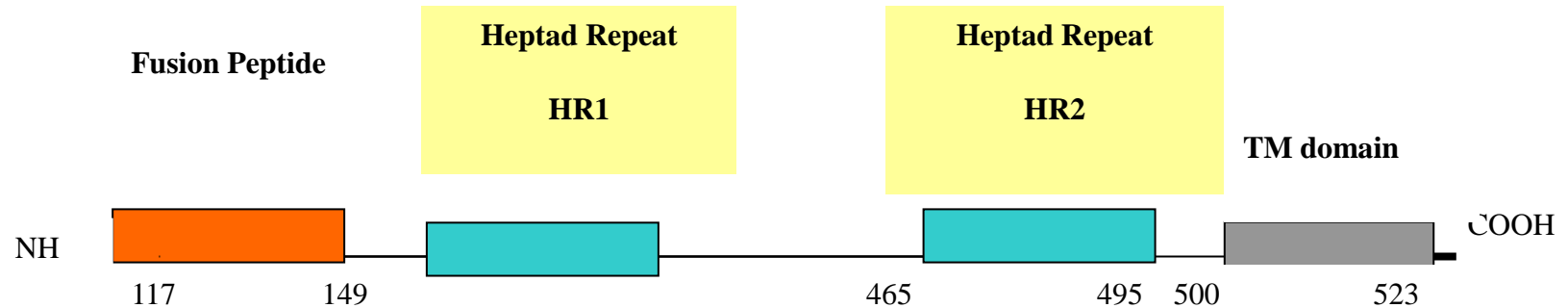


- Nella fusione HN interviene perché il legame di HN al substrato provoca una variazione conformazionale di HN con l'esposizione di un sito allosterico e il legame di F ad HN a livello di tale sito, da una lato inibisce l'attività neuraminidasica di HN, e dall'altro attiva F con l'estrusione del Peptide Fusogeno e la successiva fusione.

Proteina F: struttura



- Proteina integrale di membrana di tipo 1, con N-terminale extracellulare e C-terminale citosolico; Come precursore inattivo F_0 ha un peso di 61,5 kDa e una sequenza di 565 aa; tale precursore viene attivato con taglio proteolitico tripsino-simile in Arg 116;
- Nella forma attiva è costituita da due subunità: F_1 (di 51 kDa) ed F_2 (di 15 kDa) unite da un ponte disolfuro (Cys 70 di F_2 e Cys 199 di F_1)
- F_1 presenta due regioni idrofobiche: il Peptide Fusogeno, dato da circa 20 aa ad N-terminale, che provoca la fusione; il dominio TM, dall'aa 500 all'aa 523 di F_0 , con funzione di ancoraggio; dopo il TM c'è la porzione idrofila C-terminale citosolica che interagisce con la proteina M;
- F_1 contiene due sequenze ripetitive, dette Heptad Repeat date aa idrofobici, HRA (vicino al Peptide Fusogeno) ed HRB (vicino al TM domain) coinvolte nel meccanismo di fusione;
- Proteina glicosilata con 4 siti di glicosilazione (1 su F_2 e 3 su F_1) con mannosio, galattosio, glucosio, glucosammina, manca acido sialico;
- Presente nella forma attiva come omotetramero, costituito da due dimeri;

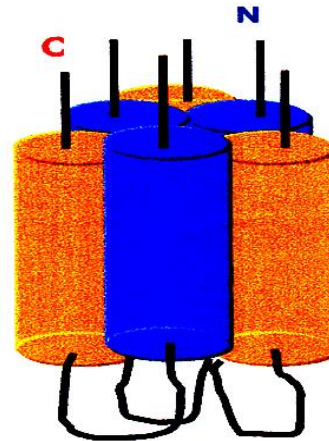


- Le proteine che provocano la fusione tra il pericapside virale e la membrana cellulare contengono due sequenze ripetitive (Heptad Repeat) di aminoacidi idrofobici, una dalla parte N terminale, vicino al cosiddetto Peptide Fusogeno (HR1) e l'altra (HR2) vicino al segmento transmembrana (TM) dalla parte C-terminale della proteina.

Struttura F

- **Diverse evidenze sperimentali dimostrano che nelle forme attive delle proteine fusogene gli HR si dispongono in un modo particolare:**

Nelle proteine fusogene di cui si conosce la struttura tridimensionale, queste sequenze formano una superstruttura formata da un fascio di sei α -eliche, con tre α -eliche all'interno, formate dalle sequenze ripetitive N-terminali, e tre α -eliche all'esterno disposte in senso antiparallelo, formate dalle sequenze ripetitive C-terminali.



Modello schematico della struttura trimerica che mostra i peptidi N e C terminali

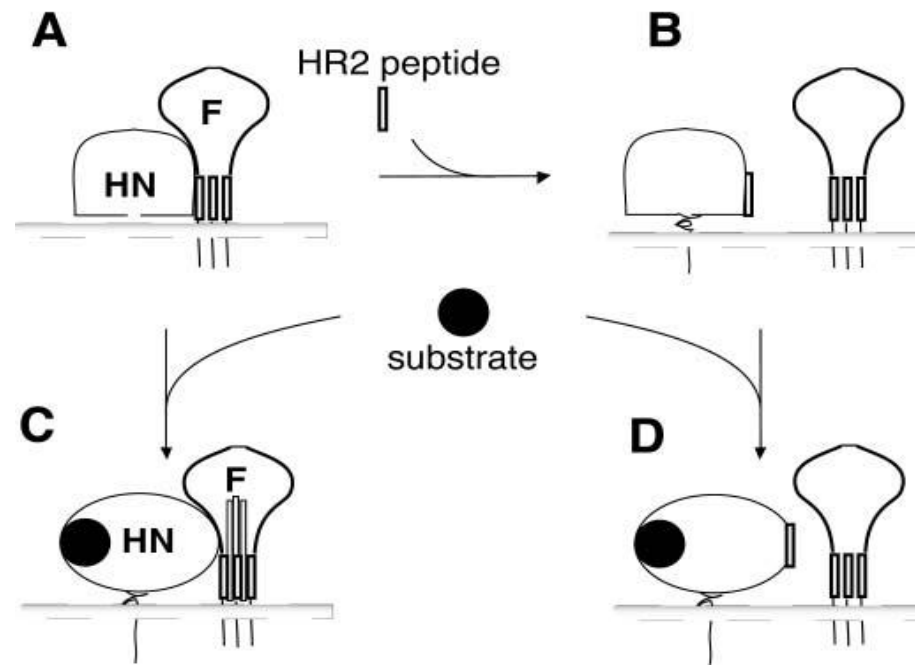
Proteina F: Funzione

- Responsabile della fusione virus-cellula.
- Attività fusogena e attività emolitica.
- La fusione avviene con un meccanismo indipendente dal pH, ottimo a pH 7 (compreso tra 5 e 9) ed è ottimale a 37° C.
- Nella fusione viene esposto il Peptide Fusogeno come ancora in seguito ad un cambio conformazionale di F indotto da HN dopo che è avvenuto il legame con il substrato.

Come avviene l'attivazione di F?

- La comune capacità dei peptidi sintetici, contenenti le sequenze ripetitive (Heptad Repeat) delle proteine fusogene, di inibire virus molto differenti tra loro suggerisce un comune meccanismo di interferenza nell'attivazione del meccanismo di fusione.

- **Il processo di attivazione è scatenato da differenti eventi:**
 - 1) nei virus influenzali e in HIV il legame al recettore è promosso da una subunità della proteina di fusione stessa (HA1-HA2, gp120-gp41),
 - 2) nei paramyxovirus è una diversa proteina (HN) a legare il recettore, mentre la proteina fusogena isolata non è fusione-competente.
 - 3) In questi virus la proteina fusogena (F) non contiene una subunità con funzione recettoriale, funzione questa che è presente in una seconda proteina dell'envelope, la proteina HN appunto!



A) L'ectodominio (la parte C terminale) di HN interagisce con la regione corrispondente agli Heptad Repeat (HR2) vicini al dominio di transmembrana della proteina F

C) Quando HN si lega al recettore induce un cambio conformazionale di F (che porta ad una inibizione dell'attività neuraminidasi di HN e nell'attivazione di F

B) Il peptide sintetico corrispondente alla regione HR2 compete con il legame di F proprio nella regione HR2

D) impedendo il corretto orientamento delle proteine HN e F nel sito di legame e come conseguenza con perdita dell'attivazione di F e dell'inibizione di HN da parte di F

Infatti nel virus il principale contributo all'aumento dell'attività neuraminidasi indotto dal peptide sintetico HR2 proviene dalla soppressione dell'inibizione da parte di F.