

Protein ovojnica koronavirusa

Sarjanović, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:955625>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Josipa Sarjanović

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

PROTEIN OVOJNICA KORONAVIRUSA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2021 godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

14. travnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

24. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Virusi.....	1
1.2. Koronavirusi.....	4
<i>1.2.1. Alfa koronavirusi.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2. Beta koronavirusi.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.3. Gama koronavirusi</i>	<i>6</i>
<i>1.2.4. Delta koronavirusi</i>	<i>7</i>
§ 2. PROTEIN OVOJNICA KORONAVIRUSA.....	8
2.1. Struktura.....	8
2.2. Položaj i kretanje	9
2.3. Izgled unutar membrane	10
2.4. Interakcije protein – protein.....	12
<i>2.4.1. Unutar virusa</i>	<i>12</i>
<i>2.4.2. Virus i stanice domaćina.....</i>	<i>14</i>
2.5. Funkcija protein ovojnice koronavirusa	15
<i>2.5.1. Nastanak ovojnice koronavirusa.....</i>	<i>15</i>
2.6. Posttranslacijske modifikacije	17
2.7. Patogeneza	18
<i>2.7.1. Imunološka reakcija.....</i>	<i>18</i>
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XX

§ Sažetak

Koronavirusi su pripadnici skupine RNA virusa te su podijeljeni na alfa, beta, gama i delta koronavirusa. Prvobitno su imali sposobnost zaraze nekih ptica i sisavaca, ali uslijed nastalih mutacija su postali zarazni za ljude. Uslijed nastalih mutacija mnogi koronavirusi normalno kruže populacijom. Nakon pojave SARS-CoV i MERS-CoV, koji su beta koronavirusi i uzorkuju teške bolesti kod ljudi, započeta su detaljnija istraživanja segmenata koronavirusa. Dijelovi koronavirusa su šiljasti glikoprotein (S), nukleoprotein (N), membranski protein (M) i protein ovojnice (E). Ovaj rad se fokusira na protein ovojnice tj. E protein.

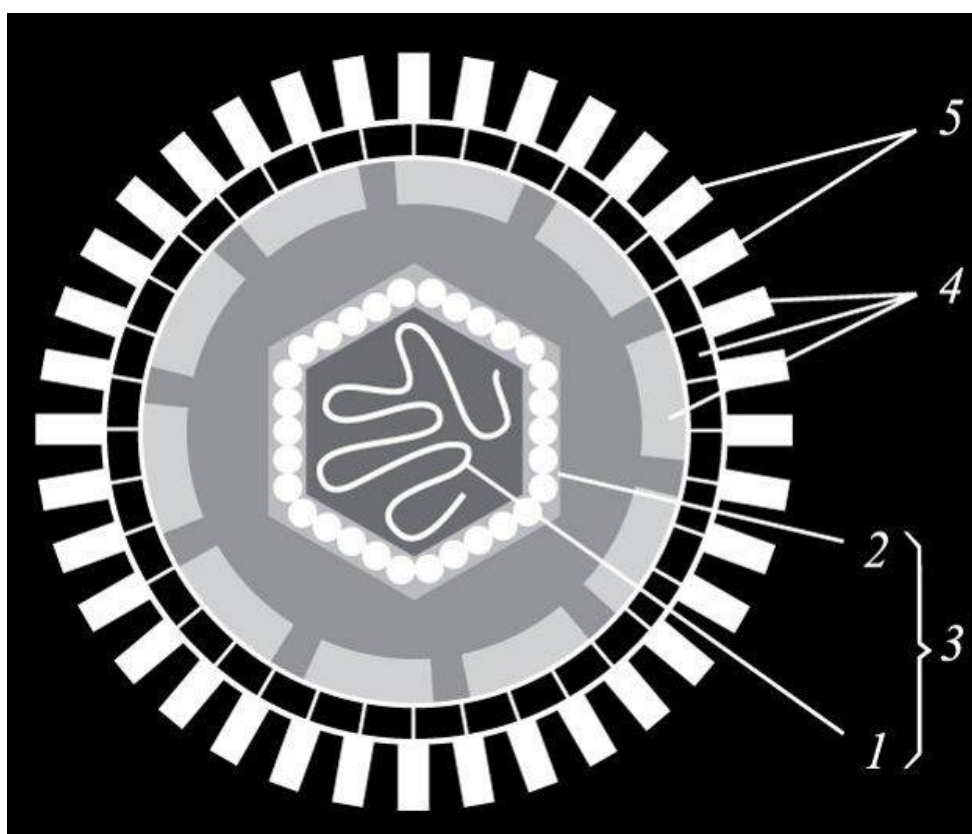
E protein se pokazao kao jedna od ključnih jedinica u životnom ciklusu koronavirusa. Smatra se da sudjeluje u njegovom nastanku, razmnožavanju i transportu. Sastoji se od 3 domene, od kojih je najvažnija transmembranska domena. Unutar nje dolazi do nastanka ionskog kanala, prilikom interakcija protein – protein. Ionski kanal je viroporin koji je selektivan prema kationima. On je pogodno mjesto za tretman sprječavanja patogeneze koronavirusa pomoću inhibicije. Međutim, kod SARS-CoV je uočeno da preko dodatnih mutacija dolazi do vraćanja aktivnosti ionskog kanala. E protein se nalazi u ERGIC-u i Golgijevom aparatu. Od tamo prilikom interakcija protein – protein sudjeluje u stvaranju ovojnice novonastalih koronavirusa. E protein je podložan posttranslacijskim modifikacijama od kojih je ubikvitinacija imala najveći utjecaj na stabilnost E proteina i patogenezu virusa.

Iako je provedeno puno istraživanja, još je mnogo toga ostalo neobjašnjeno. Trebat će provesti daljnja istraživanja kako bi se saznala točna funkcija E proteina u životnom ciklusu koronavirusa. Također, treba otkriti u kojim interakcijama sudjeluje E protein s drugim dijelovima virusa i koji su njihovi mehanizmi djelovanja.

§ 1. UVOD

1.1. Virusi

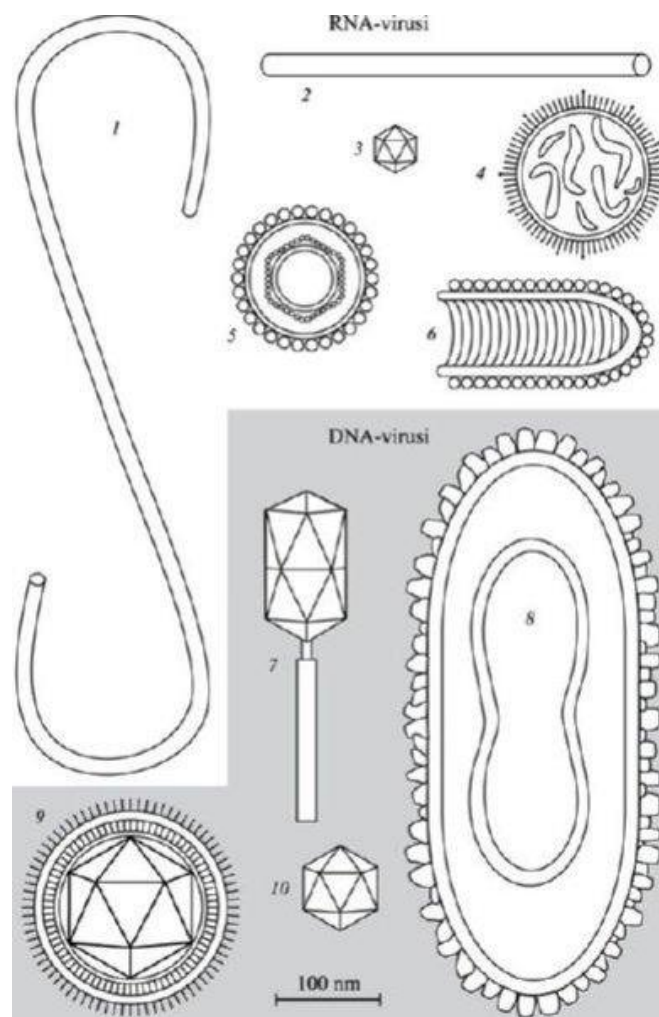
Virusi su čestice veličine 20-300 nm, koji uzrokuju zarazne bolesti u biljkama, životinjama i ljudima. Zbog njihove veličine možemo ih vidjeti jedino elektronskim mikroskopom, a veličina, oblik i građa im se jako razlikuju. Građeni su od nekoliko elemenata (Slika 1.), a glavni među njima je nukleinska kiselina. Ona klasificira podjelu na dvije velike skupine – RNA i DNA viruse (Slika 2.). Sadrže genetski materijal i proteinski omotač (kapsida), a ta dva elementa zajedno čine nukleokapsidu. Neki virusi također imaju ovojnicu na kojoj se nalaze glikoproteinski izdanci. Oni im služe kako bi se lakše pričvrstili za stanicu domaćina koju će napasti.¹



Slika 1. Građa virusa. 1 – nukleinska kiselina, 2 – kapsida, 3 – nukleokapsida, 4 – ovojnica, 5 – glikoproteinski izdanci (preuzeto iz ref. 1)

Virusi su organizmi koji ne mogu preživjeti samostalno, nego moraju biti u živoj stanici u kojoj se mogu razmnožavati. Nakon što virus uđe u organizam domaćina, on se pomoću svojih površinskih antireceptora povezuje s receptorima na površini stanice domaćina. Nakon toga, u stanicu može ući cijeli virus ili može ubaciti samo nukleokapsidu. Nakon oslobađanja nukleinske kiseline virusa unutar stanice, ona počinje upravljati njenim radom tako što sintetizira virusne strukture potrebne za razmnožavanje. Iz zaražene stanice virusi se mogu

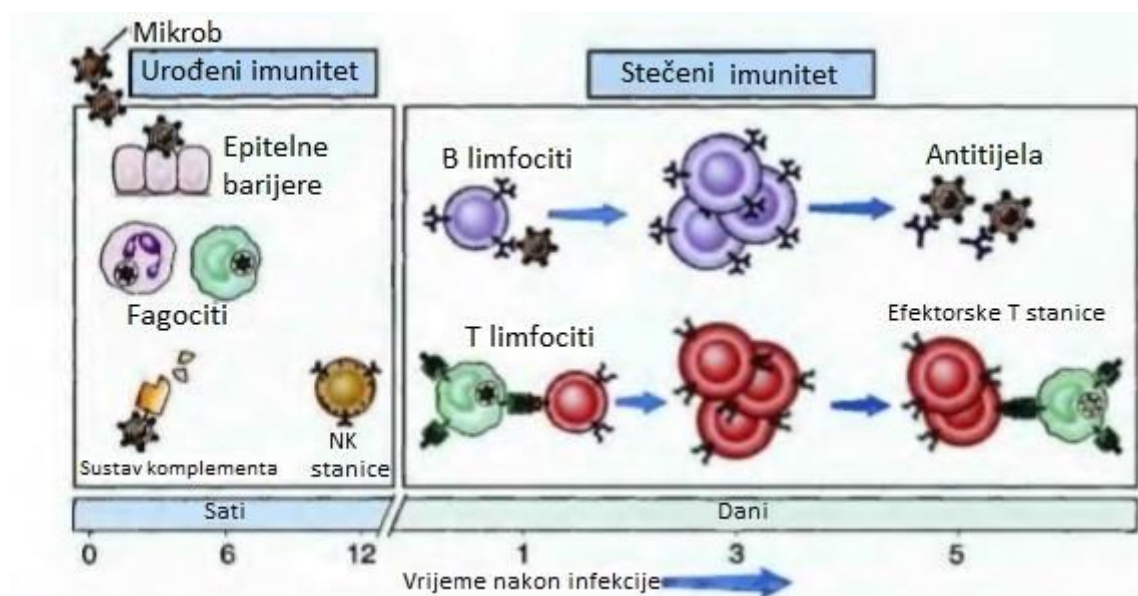
otпустiti u organizam preko pumpanja kroz membranu stanice ili uništavanjem stanice domaćina.^{1,2}



Slika 2. Oblici nekih RNA (gore) i DNA (dolje) virusa. 1 – virus žutice šećerne repe, 2 – virus mozaika duhana, 3 – virus poliomijelitisa, 4 – virus influence, 5 – virus HIV-a, 6 – virus bjesnoće, 7 – bakteriofag, 8 – virus velikih boginja, 9 – herpes-virus, 10 – virus mozaika cvjetače (preuzeto iz ref. 1)

Imunološki sustav služi kako bismo se obranili od stranih tijela koja mogu ugroziti naš organizam. Dijeli se na dvije vrste imunosti: stečenu i urođenu (Slika 3.). Stečenu još dijelimo na pasivnu i aktivnu imunost. Pasivna imunost stječe se prijenosom antitijela od imune osobe te nas može zaštititi u kratkom periodu, do nekoliko mjeseci. Stjecanjem aktivne, imunost može trajati tokom cijelog života. Pod aktivnu imunost spadaju prirodno i umjetno stečena imunost. Prirodna imunost se odnosi na direktni kontakt s izvorom zaraze, a umjetna se pripisuje cijepljenju, koje namjerno izaziva reakciju imunološkog sustava. Bitna stvar za imunološki sustav je stvaranje antitijela za svaku bolest, koja nam pomažu braniti tijelo ukoliko dođe do ponovne zaraze. U slučaju ponovne zaraze, naš imunološki sustav već sadrži antitijela te može ranije započeti borbu protiv stranih tijela. Ulaskom virusa u stanicu započinje niz reakcija u kojima sudjeluju bijele krvne stanice, tj. limfociti B i T. Povećava se njihova koncentracija te se blokira daljnja mogućnost razmnožavanja virusa pomoću brojnih mehanizama. Nakon prvog prebolijevanja i odvijanja mehanizama nastajanja antitijela, stječe se prirodna imunost.

Umjetno stjecanje imuniteta za virusne bolesti postiže se cjepivom. U organizam se unose tijela slična specifičnom virusu, koja onda pokreću reakciju limfocita B i T. Unesena tijela su oslabljena tako da sama ne bi uzrokovala bolest. Urođena imunost je prisutna od rođenja te uključuje epitelne barijere, fagocite, NK stanice i sustav komplementa. Sustav komplementa pomaže fagocitima u uklanjanju štetnih stanica iz organizma. Urođeni imunitet se pokreće kroz nekoliko sati, za razliku od stečenog imuniteta kojem treba nekoliko dana. Međutim, urođeni imunitet nema imunološku memoriju, kao što je to slučaj kod stečenog. Ukoliko se zarazimo virusom, kao mehanizam obrane mogu nam poslužiti antivirusici, makar njihov razvoj nije toliko isplativ kao razvoj antibiotika. Virusi se za razliku od bakterija ne mogu uzgajati na hranjivim podlogama, nego nam za njihovo razmnožavanje treba živi organizam. Interakcija između virusa i stanice je kompleksnija, što može dovesti do prevelike toksičnosti antivirusika da bi se mogao učinkovito ukloniti virus.^{1,2}

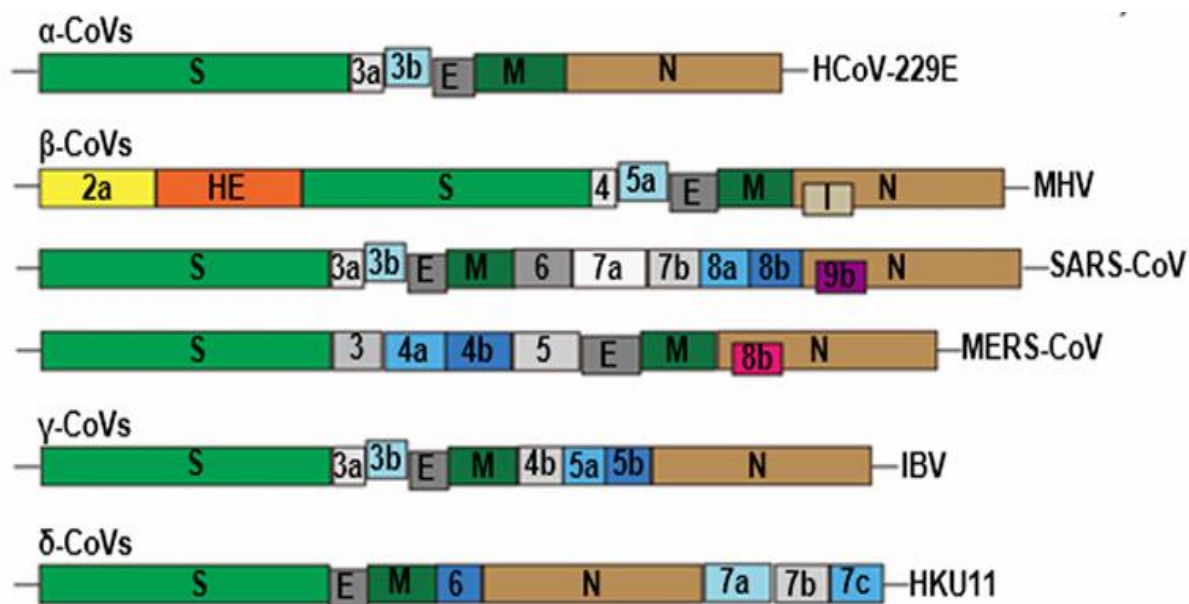


Slika 3. Glavni mehanizmi urođenog i stečenog imuniteta (preuzeto i prilagođeno iz ref. 2)

1.2. Koronavirusi

Koronavirusi spadaju u porodicu *Coronaviridae*, monofiletne skupine reda *Nidovirales*. Jedni su od najvećih pripadnika skupine RNA virusa zbog veličine genoma 26-32 kilobaza. Po svojoj građi se razlikuju te se dijele u četiri skupine, od kojih svaka tvori zasebnu monofiletičku skupinu (Slika 4.).

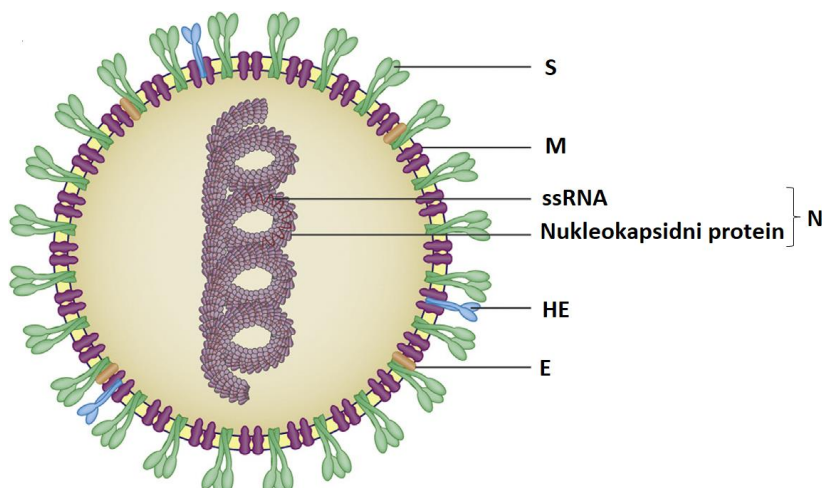
- Alfa koronavirusi
- Beta koronavirusi
- Gama koronavirusi
- Delta koronavirusi



Slika 4. Prikaz genoma predstavnika α , β , γ i δ koronavirusa. S – šiljasti glikoprotein, M – membranski protein, N – nukleoprotein, E – protein ovojnice, HE – membranski protein s aktivnošću hemaglutinacije i esteraze (preuzeto i prilagođeno iz ref. 3)

Sferne su građe promjera 118-136 nm s prepoznatljivim šiljastim glikoproteinom (S) koji se nalazi na ovojnici virusa i proteže se 16-21 nm od nje. Osim S dijela, koronavirusi sadrže nukleokapsidu koja ima RNA povezanu s nukleoproteinom (N). Na membrani se još nalaze membranski protein (M) i protein ovojnice (E) (Slika 5.). Uz osnovne dijelove N, S, M i E, neke vrste beta koronavirusa imaju dodatni membranski protein s aktivnošću hemaglutinacije i esteraze koji se zove HE.⁴

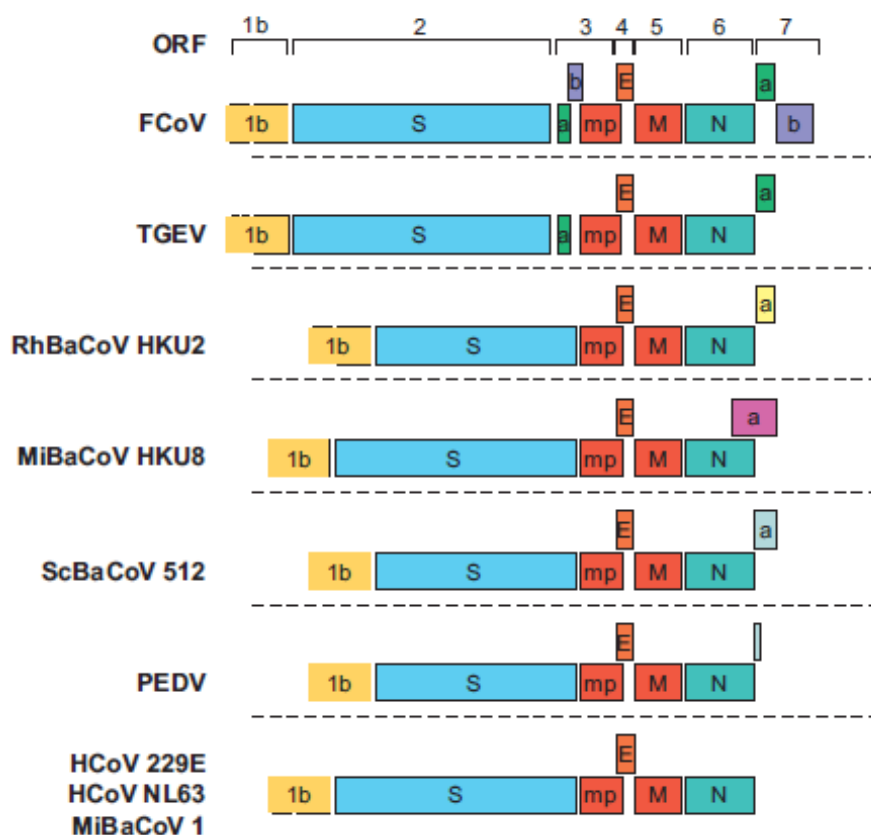
Koronavirusi mogu uzrokovati različite bolesti kod ptica i sisavaca. Kod ptica uzrokuju bolesti gornjih dišnih sustava, a kod nekih sisavaca uzrokuju proljev. Kod ljudi uzrokuju bolesti gornjeg dijela dišnih puteva, npr. prehlada, ili zahvaćaju donji dio dišnih puteva u vidu bronhitisa i upale pluća. Jačina bolesti kod ljudi može varirati od blage do smrtonosne. Prvotno su bili vezani uz životinjske bolesti, a s vremenom su uspjeli mutirati i tako si omogućili prelazak na ljude. Posljedica te mutacije stvorila je vrste beta koronavirusa zarazne za ljude, a to su teški akutni respiratorni sindrom koronavirusa (SARS-CoV), teški akutni respiratorni sindrom koronavirusa 2 (SARS-CoV-2) i Bliskoistočni respiratorni sindrom koronavirusa (MERS-CoV). Nakon pojave SARS-CoV i MERS-CoV u svijetu je proglašena epidemija dok je izbijanjem SARS-CoV-2 proglašena pandemija. Većina istraživanja provedena za koronavirus je istraživala SARS-CoV.⁵



Slika 5. Građa koronavirusa. S – šiljasti glikoprotein, M – membranski protein, N – nukleoprotein, E – protein ovojnice, HE – membranski protein s aktivnošću hemaglutinacije i esteraze (preuzeto i prilagođeno iz ref. 4)

1.2.1. Alfa koronavirusi

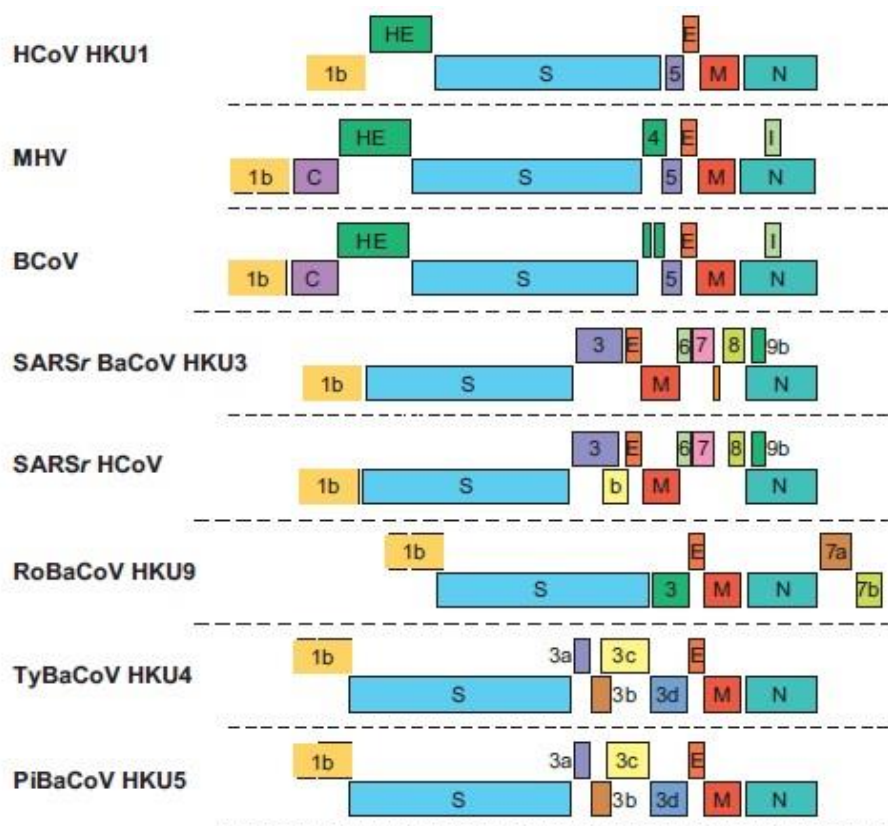
Alfa koronavirusi od ostatka se razlikuju po svom karakterističnom tipu nestrukturnih proteina koji su određeni veličinom i redoslijedom (Slika 6.). Specifičnost im je i postojanje zajedničkog pomoćnog gena membranskog proteina alfa koronavirusa (*amp*).⁶



Slika 6. Genom alfa koronavirusa. S – šiljasti glikoprotein, M – membranski protein, N – nukleoprotein, E – protein ovojnice (preuzeto iz ref. 6)

1.2.2. Beta koronavirusi

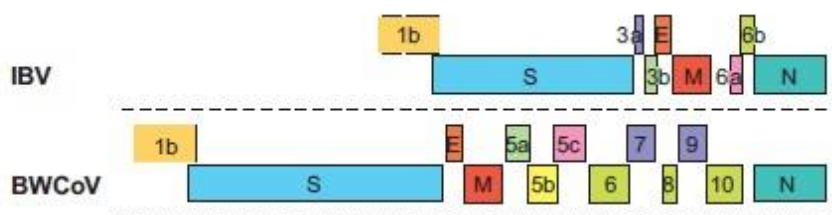
Beta koronavirusi se razlikuju po svojim nestrukturnim proteinima koji su određeni veličinom i redosljedom slaganja (Slika 7.). Neki beta koronavirusi posjeduju dodatni membranski protein s aktivnošću hemaglutinacije i esteraze (HE). Ova vrsta koronavirusa je zarazna za ljude.⁶



Slika 7. Genom beta koronavirusa. S – šiljasti glikoprotein, M – membranski protein, N – nukleoprotein, E – protein ovojnice, HE – membranski protein s aktivnošću hemaglutinacije i esteraze (preuzeto i prilagođeno iz ref. 6)

1.2.3. Gama koronavirusi

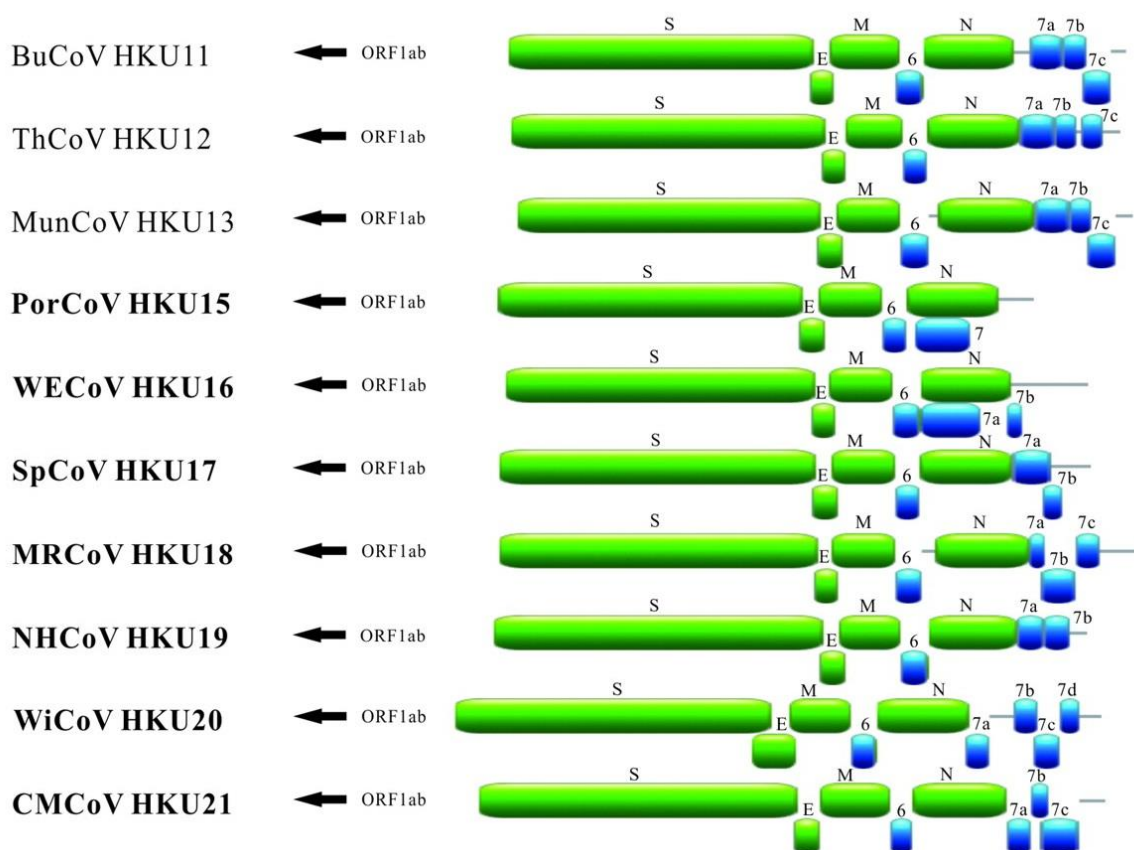
Gama koronavirusi nemaju neke posebne zajedničke značajke po kojima bi bili prepoznatljivi od ostalih koronavirusa (Slika 8.).⁶



Slika 8. Genom gama koronavirusa. S – šiljasti glikoprotein, M – membranski protein, N – nukleoprotein, E – protein ovojnice (preuzeto iz ref. 6)

1.2.4. Delta koronavirusi

Delta koronavirusi imaju najmanji genom među koronavirusima. Genom im je veličine 25421-26674 kilobaza (Slika 9.). Također, imaju proteazu u genu nsp3 koja je slična papaja proteazi. Pretpostavlja se da svi imaju isti niz za regulaciju transkripcije ACACCA. Zanimljivo je da su svi otkriveni oblici ove vrste koronavirusa isključivo pronađeni u pticama i svinjama.⁷

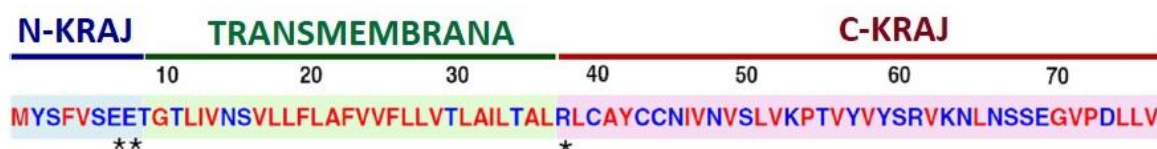


Slika 9. Genom delta koronavirusa. S – šiljasti glikoprotein, M – membranski protein, N – nukleoprotein, E – protein ovojnice (preuzeto i prilagođeno iz ref. 7)

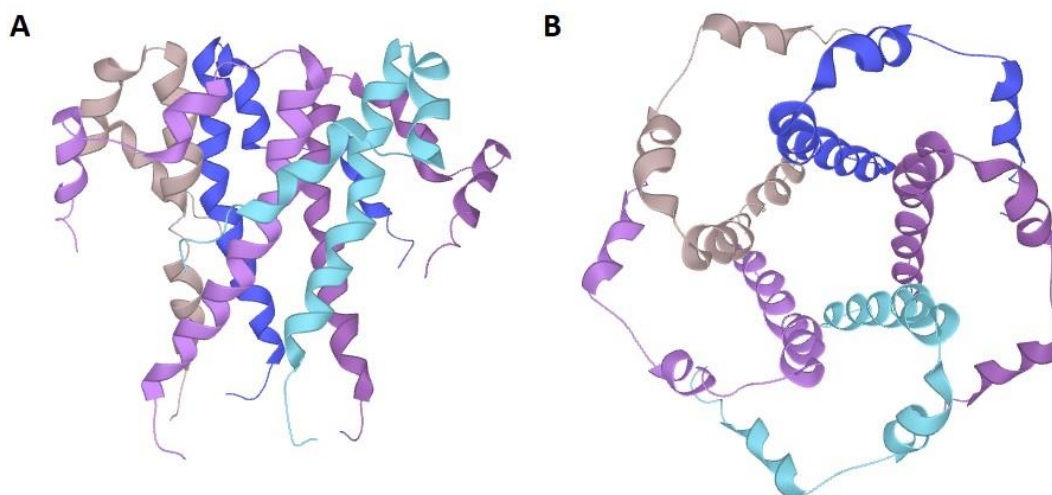
§ 2. PROTEIN OVOJNICA KORONAVIRUSA

2.1. Struktura

Protein ovojnica koronavirusa, u daljnjem tekstu E protein, je mali polipeptid, integriran u membranu (Slika 5.) te sadrži 76 do 109 aminokiselina. Analizom primarne strukture E proteina je otkriveno da se sastoji od 3 domene (Slika 10.). Prva domena je hidrofilni N-kraj, koji sadrži desetak aminokiselina. Zatim dolazi transmembranska domena koja je hidrofobna. Treća, ujedno i najveća domena, je hidrofilni C-kraj. Pretpostavlja se da transmembranski dio E proteina sadrži α -zavojnica koja prilikom oligomerizacije sudjeluje u stvaranju ionskog kanala u membrani (Slika 11.). Taj kanal je izrazito bitan kod interakcija između virusa i stanice domaćina. Smatra se da posreduje u transportu novonastalih virusnih čestica iz zaražene stanice tijekom patogeneze.⁸⁻¹⁰



Slika 10. Slijed aminokiselina i domena u SARS-CoV E proteinu. Svojstva aminokiselina su označena: hidrofobne (crveno), hidrofilne (plavo), polarne, nabijene (zvjezdica) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 11)

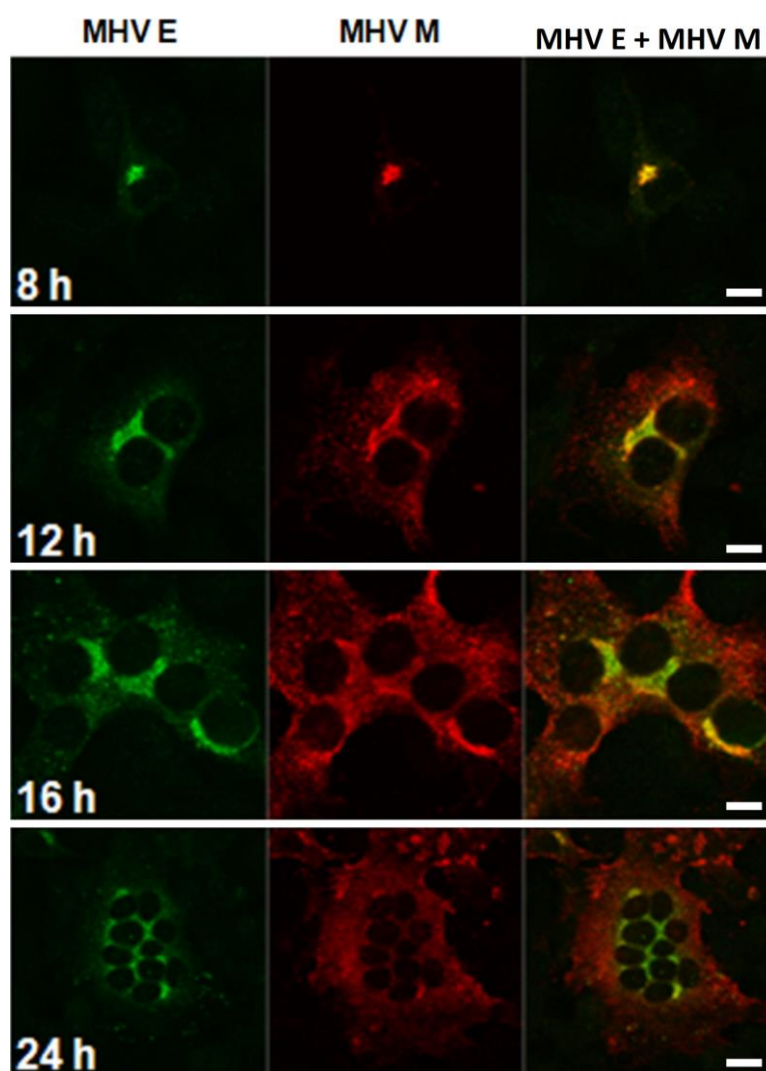


Slika 11. Sekundarna struktura SARS-CoV E proteina 8-56 pozicija. Pentamer E proteina: A – bočni prikaz, B – prikaz odozgora (preuzeto i prilagođeno iz ref. 12)

Hidrofobna karakteristika transmembranske domene potječe od njenog većinskog dijela koji čine aminokiseline leucin i valin. One su također prisutne u C-kraju, ali u mnogo manjoj količini pa utjecaj drugih aminokiselina ipak prevladava što ga čini hidrofilnim. Leucin, osim što pogoduje stvaranju hidrofobne sredine, uz alanin pridonosi stvaranju α -zavojnica u transmembranskoj domeni. U domeni C-kraja je identificiran cistein koji može tvoriti disulfidne mostove, o kojima će biti riječ nešto kasnije kod opisivanja interakcija proteina.^{13,14}

2.2. Položaj i kretanje

Kod koronavirusa do nastajanja proteinske ovojnice dolazi prilikom vezanja s ERGIC-om (engl. *Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*). To je organel koji se nalazi između hrapavog endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata. E protein se nakon nastanka većinom nalazi u ERGIC-u i/ili Golgijevom aparatu. Informacije za vezanje E proteina na ERGIC se primarno nalaze u C-kraju proteina. Međutim, kod SARS-CoV je uočeno da se informacije za lokalizaciju uz C-kraj nalaze i na N-kraju proteina. Nedavno istraživanje provedeno s mišjim koronavirusom hepatitisa A59 (MHV) je istražilo gdje se nalazi E protein tijekom infekcije. Za kontrolu su bili obilježeni M i S protein, no rezultati za S protein nisu bili prikazani. Nakon što su mišje stanice zaražene s MHV A59, u idućih 24 sata je pomoću imunofluorescencije praćeno gdje se nalaze E i M proteini (Slika 12.). Nakon provedenog istraživanja je zaključeno da tijekom praćenja infekcije E protein ostaje lokaliziran između ERGIC-a i Golgijevog aparata, dok ostali proteini odlaze dalje u stanicu.¹⁵⁻¹⁷



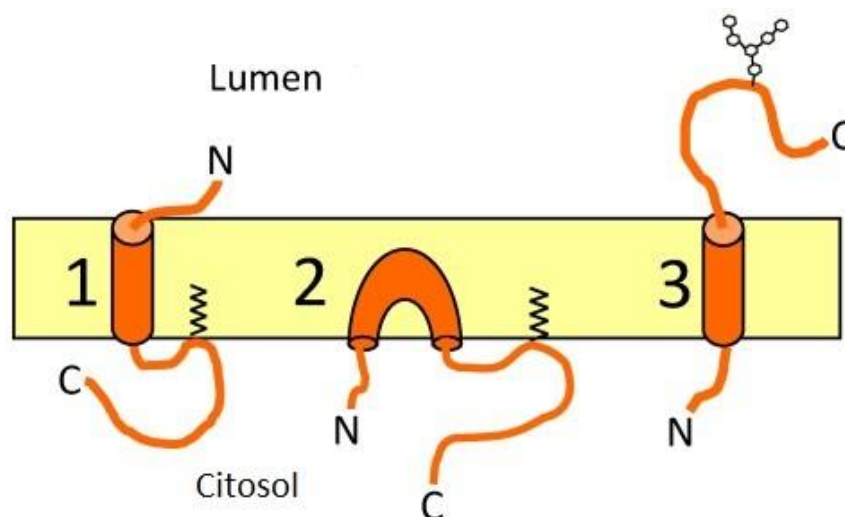
Slika 12. Mišje stanice zaražene MHV A59. Indirektnom imunofluorescencijom su detektirani E (zeleni) i M (crveni) proteini kroz određeni period vremena. U MHV E + MHV M žuto obojani dijelovi prikazuju preklapanje proteina. Skala: 10 μm (8, 12 i 16 h nakon infekcije) i 20 μm (24 h nakon infekcije). (preuzeto i prilagođeno iz ref. 16)

Također je razmatrano mogu li se E proteini slobodno kretati unutar i između ERGIC-a i Golgijevog aparata. U tu svrhu korištena je metoda fluorescentnog oporavka nakon fotoizbjeljivanja na MHV E-TC tretiranim stanicama. Poslije 8 sati stanice su bile fotoizbjeljene i promatrao se period od 300 sekundi fluorescentnog oporavka. Rezultati su pokazali da je nakon tog perioda došlo do regeneracije tretiranog mjesta. Regeneracija nije bila konstantna, no ukazuje na to da se E protein može slobodno kretati unutar ERGIC/Golgijevog kompleksa.¹⁶

2.3. Izgled unutar membrane

Pretpostavlja se da je izgled E proteina u membrani tipa II ili tipa III. Za tip II vrijedi da se N-kraj nalazi u lumenu, a C-kraj u citosolu stanice, dok za tip III vrijedi obrnuto. Na temelju poznatih koronavirusa su dobiveni različiti rezultati kako je E protein smješten unutar membrane (Slika 13.). Kod IBV E proteina, koji je gama koronavirus, je primijećeno da daje E protein tipa III. MHV E protein spada pod beta koronavirus i dao je strukturu ukosnice, dok je TGEV E protein, koji pripada alfa koronavirusima, pokazao strukturu tipa II. Struktura ukosnice podrazumijeva da se N- i C-kraj oba nalaze u lumenu ili u citosolu.

Topologija se bavi proučavanjem načina na koji su sastavni dijelovi međusobno povezani. Na taj odnos ne utječu promjena oblika ili veličine promatranih dijelova. U biokemiji se koristi za predviđanje interakcija i položaja proteina pomoću programa. Došlo je do neslaganja u rezultatima između tipiziranja obilježenog N- i C-kraja proteina te neobilježenog proteina. Također, još jedan problem je nastao kada je korišteno nekoliko programa za predviđanje moguće strukture E proteina nekih vrsta koronavirusa (Tablica 1). Programi nisu davali jednake rezultate te su često davali rezultate drugačije od onih koji su dobiveni eksperimentalno. Općenito, metode predviđanja topologije nisu pouzdane za utvrđivanje položaja proteina, no mogu pomoći u razumijevanju i pretpostavljanju mehanizama koji se onda eksperimentalno dokazuju.¹⁷



Slika 13. Prikaz vrsta membranskih proteina. 1 – tip III, 2 – ukosnica, 3 – tip II (preuzeto i prilagođeno iz ref. 17)

Postoji mogućnost da E protein mijenja svoju strukturu tijekom procesa infekcije, ovisno o tome za koju funkciju se koristi. Također, treba uzeti u obzir da izgled E proteina vrlo vjerojatno ovisi i o samoj vrsti koronavirusa, jer su uočene razlike prilikom analize IBV E, MHV E i

TGEV E proteina. Zanimljivo je primijetiti da su samo u slučaju IBV E proteina svi programi pretpostavili da će imati dvije transmembranske domene. Za točna predviđanja potrebna su daljnja istraživanja i bolje razumijevanje djelovanja E proteina tijekom infekcije.¹⁷

Tablica 1. TM Pred, HMMTop, TMHMM 2.0, MEMSAT3 i MEMSAT-SVM su korišteni programi za predviđanje položaja N- i C-kraja kod četiri različita E proteina koronavirusa. Također je prikazan broj transmembranskih domena. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 17)

Program	IBV E			MHV E			SARS E			TGEV E		
	N	C	TM	N	C	TM	N	C	TM	N	C	TM
TM Pred	lumen	lumen	2	lumen	citosol	1	lumen	citosol	1	lumen	citosol	1
HMMTop	lumen	lumen	2	citosol	citosol	2	lumen	citosol	1	citosol	citosol	2
TMHMM 2.0	lumen	lumen	2	lumen	citosol	1	citosol	lumen	1	lumen	citosol	1
MEMSAT-SVM	lumen	lumen	2	lumen	lumen	2	lumen	lumen	2	citosol	lumen	1
MEMSAT3	citosol	citosol	2	lumen	citosol	1	lumen	lumen	2	lumen	citosol	1

2.4. Interakcije protein – protein

Interakcije protein – protein su fizički kontakti visoke specifičnosti koji se javljaju između proteina kao posljedica elektrostatske sile, vodikovih veza i hidrofobnog efekta. Proteini se gotovo uvijek nalaze u ovim interakcijama. Na taj način se postiže bolja provedba i regulacija metaboličkih puteva unutar stanice.

2.4.1. Unutar virusa

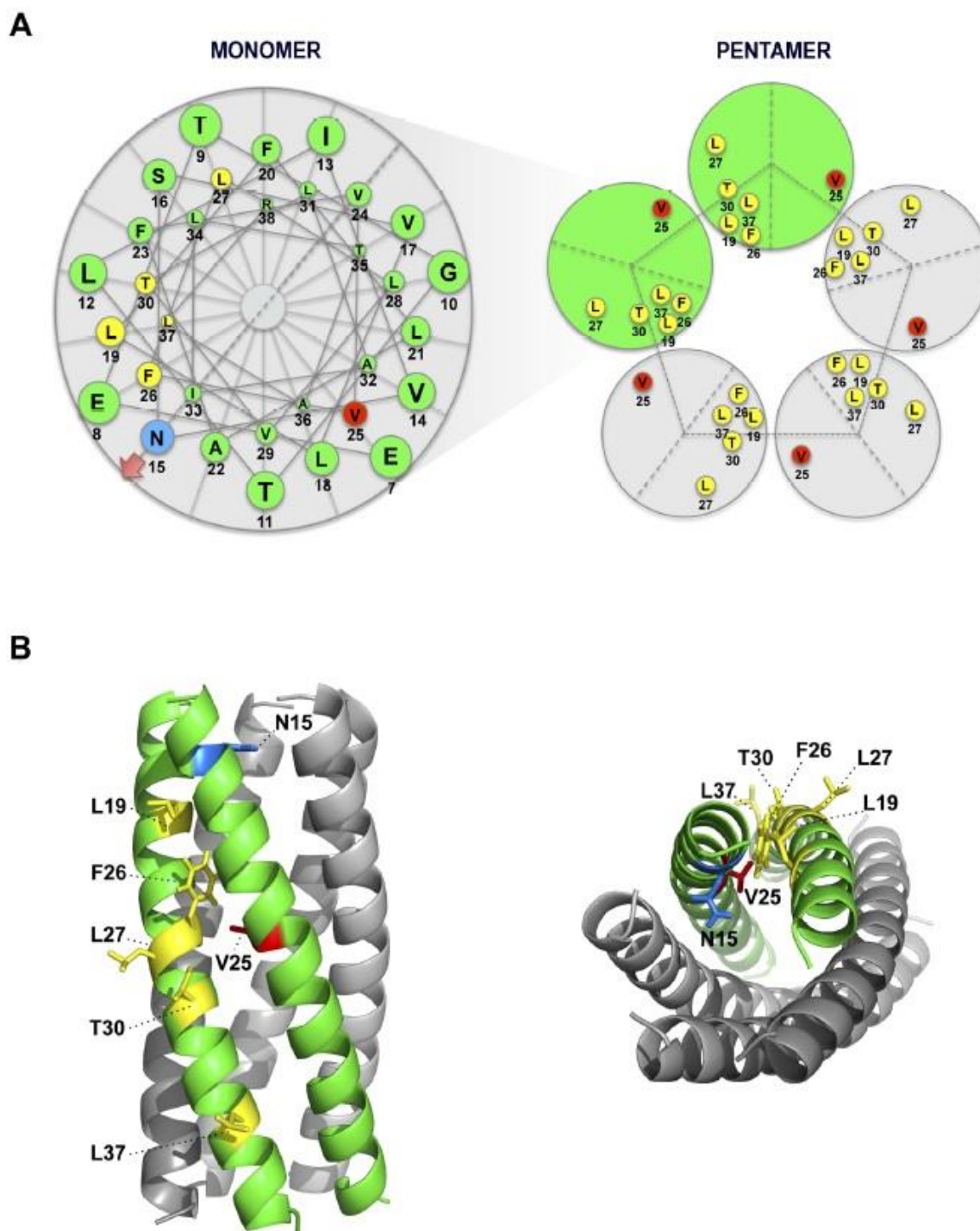
Koronavirus se sastoji od nekoliko osnovnih dijelova: šiljastog glikoproteina (S), nukleoproteina (N), membranskog proteina (M) i protein ovojnice (E) (Slika 5.). E protein može interagirati sa svim dijelovima koronavirusa.

Smatra se da je interakcija E i M proteina ključna za proces nastanka koronavirusa. Istraživanje je provedeno nad IBV E i M proteinima, a oba se nalaze u ERGIC/Golgijevom kompleksu. Pomoću označavanja i praćenja proteina (kod E proteina je to bio C-kraj) je uočeno da se nalaze u istom dijelu stanice. Zanimljivo je primijetiti da iako se M protein primarno veže uz Golgijev aparat, zbog interakcije s E proteinom on se translocira u dijelove koji su primarno vezani za lokalizaciju E proteina. To nam ukazuje na vrlo vjerojatno stvaranje domene koja povezuje E i M protein, a ako uklonimo tu domenu, dolazi do smanjene interakcije proteina.¹⁸

Do interakcija također može doći između E i E proteina. Pretpostavlja se da transmembranska regija E proteina sadržava α -zavojnica. Ona može sudjelovati u oligomerizaciji te se pretpostavlja da nastaje viroporin u obliku ionskog kanala. Kod SARS-CoV E proteina, koji se sastoji od 76 aminokiselina, je uočeno da nastaje pentamer α -zavojnica (Slika 11.) koji se ugrađuje u membranu. Nastali ionski kanal je selektivan prema kationima, ali on ne pokazuje specifičnost za određeni kation te tako mogu proći K^+ i Na^+ . Ovisno u kojim uvjetima se provodi istraživanje, moguća je preferencija za određeni kation. Ukoliko se izvrši jedna mutacija na E proteinu, on kroz nekoliko pasaža može vratiti aktivnost ionskog kanala. Ukoliko se zamijene N15A i V25F u E proteinu i tako ukinu aktivnost ionskog kanala, neće doći do promjene u lokalizaciji E proteina unutar stanice. Također, u kratkom vremenskom periodu ne dolazi do velike razlike u brzini nastajanja virusa u stanicama, ukoliko virus nema aktiviran ionski kanal. Promatranjem stanica sa ili bez aktiviranog ionskog kanala tijekom duljeg vremenskog perioda je uočeno da ionski kanal doprinosi brzini nastanka virusa u stanicama.

Promatrani su E proteini koji sadrže mutacije N15A i V25F, koji imaju ukinutu aktivnost ionskog kanala, u *in vivo* uvjetima. Provedeno je pasažiranje i promatrane su promjene nakon 0, 8, 16 i 24 pasaža. E proteini koji su sadržavali N15A su ostali uglavnom nepromijenjeni, eventualno uz mutaciju A15D, koja bi nastala nakon 24 pasaže. E proteini koji su imali V25F mutaciju su uveli dodatne mutacije u E protein: L19A, L29S, T30I. Nakon promatranog perioda ti su proteini sintetizirani kako bi se ustanovilo je li dodatnim mutacijama vraćena aktivnost ionskog kanala (Slika 14). Rezultati pokazuju da su mutacije, koje su nastale nakon evolucije virusa, uspjele vratiti aktivnost ionskog kanala na približnu razinu, kao kod divljeg tipa virusa.^{10,15,19,20}

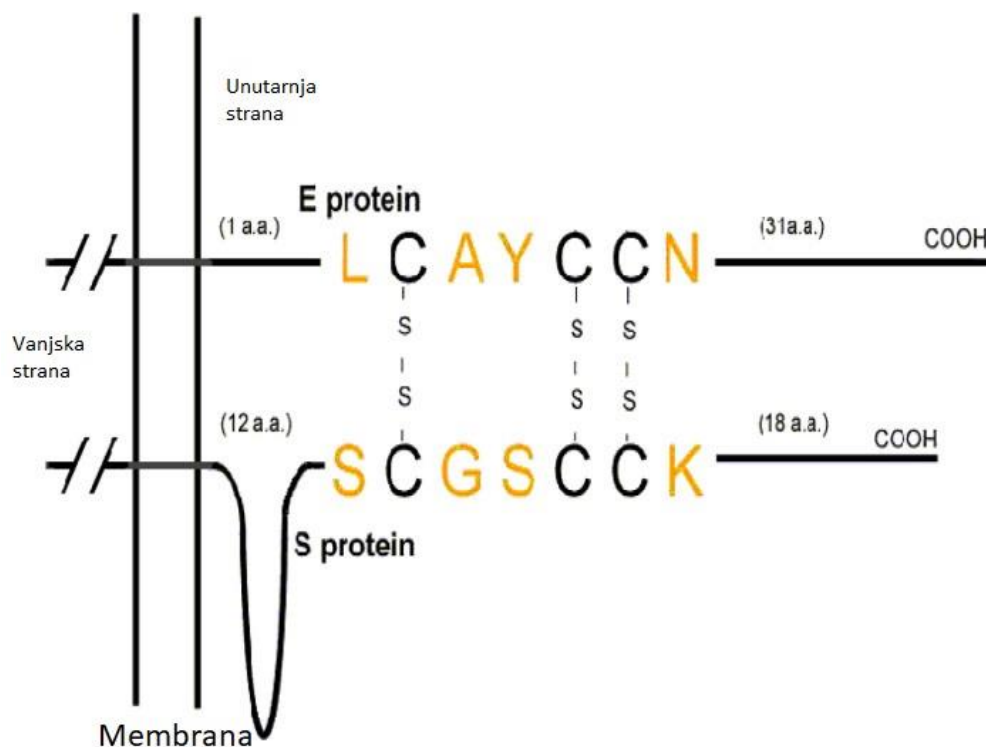
Nije u potpunosti sigurno kako E protein interagira s nukleoproteinom, odnosno dolaze li oni uopće u interakciju. Međutim, smatra se da E protein i nukleoprotein zajedno s M proteinom sudjeluju u sintezi virusnih čestica. Kod SARS-CoV i MHV je dokazano da do interakcije dolazi preko C-krajeva oba proteina. Ukoliko se ukloni C-kraj, on ne utječe previše na stvaranje novih virusnih čestica. Nema puno istraživanja vezano za ovu interakciju te zbog toga ne možemo biti sigurni ima li, i koliko su bitne interakcije između E proteina i nukleoproteina.²¹



Slika 14. Prikaz mutacija nastalih u rSARS-CoV-EIC⁻ nakon nekoliko infekcija. A – gornji prikaz transmembranske regije E proteina i raspored aminokiselina unutar α -zavojnice (lijevo). Plavi i crveni krugovi odgovaraju aminokiselinama N15 i V25 koje su mutirane zbog ukidanja aktivnosti ionskog kanala. Žuti krugovi predstavljaju mutacije koje su nastale evolucijom V25F mutacije. Strelica na poziciji 15 prikazuje položaj lumena pore ionskog kanala. Desni prikaz prikazuje interekcije E proteina koji tvore ionski kanal. B – bočni i gornji prikaz sekundarne strukture E proteina koji tvori pentamer. Početne mutacije N15(plavo) i V25(crveno) te mutacije nakon evolucije označene žuto. (preuzeto iz ref. 10)

Kao što smo prije spomenuli, u posljednjoj domeni E proteina su pronađena 3 cisteina. Oni su također pronađeni kod analize S proteina koronavirusa. Pretpostavlja se da je moguća interakcija tih cisteina, kao i tvorba disulfidnih mostova između dva proteina, ali to još nije eksperimentalno dokazano. Iako je kod SARS-CoV dokazana interakcija E i S proteina (Slika 15.), ona nije dodatno istražena da bi se saznala njezina važnost.⁵

Interakcije E proteina s ostalim proteinima, koji ovise o vrsti koronavirusa, nisu previše istraživane.



Slika 15. Pretpostavljena interakcija E i S proteina preko disulfidnih mostova kod SARS-CoV. (preuzeto i prilagođeno iz ref 13.)

2.4.2. Virus i stanice domaćina

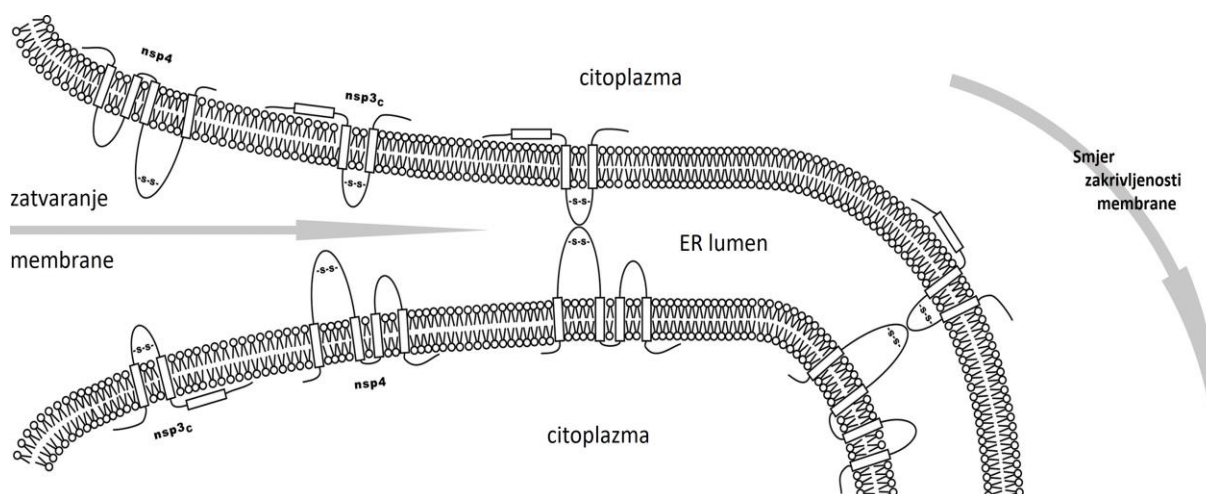
Virusi nisu sposobni samostalno preživjeti, nego moraju imati stanicu domaćina preko koje se mogu razmnožavati. Nju koriste tako da unesu svoj genom u stanicu i počinju replikaciju svog genoma u stanici. Zbog epidemije SARS-CoV, koja je bila 2002. i 2003. godine, najviše istraživanja je provedeno vezano za taj virus. Nekoliko istraživanja je uspjelo dokazati interakcije E proteina s proteinima domaćina. Ukupno se radi o 5 proteina: Bcl-xL (engl. *B-cell lymphoma-extra large*), *Caenorhabditis elegans* lin-7 protein 1 (PALS1), sintenin, Na⁺/K⁺ ATP-aza α -1 podjedinice i stomatin. Za sada su dane samo pretpostavke kako pojedina interakcija E proteina s određenim proteinom domaćina utječe na zdravlje domaćina. Za interakciju Bcl-xL i E proteina se smatra da uzrokuje limfopeniju. Interakcija PALS1 i E proteina uništava alveolne zidove u plućima, a za interakciju s Na⁺/K⁺ ATP-aza α -1 podjedinice i stomatinom se vjeruje da narušava aktivnost natrijevih kanala u stanici.⁵

2.5. Funkcija protein ovojnice koronavirusa

Dosadašnja istraživanja E proteina su uspjela dokazati da on sudjeluje u tri bitna procesa. Prvi proces uključuje nastanak virusa. Taj dio je kratko spomenut u 2.4.1. te se vjeruje da u tome ne sudjeluje sam, nego preko interakcije s M proteinom. Također, u 2.4.1. je spomenuta interakcija E proteina kojom nastaje ionski kanal. Zadnja stvar u koju je uključen E protein je patogeneza koronavirusa. Treba uzeti u obzir da E protein i njegovi mehanizmi još uvijek nisu dovoljno istraženi te on možda sudjeluje u još bitnih procesima životnog ciklusa virusa.

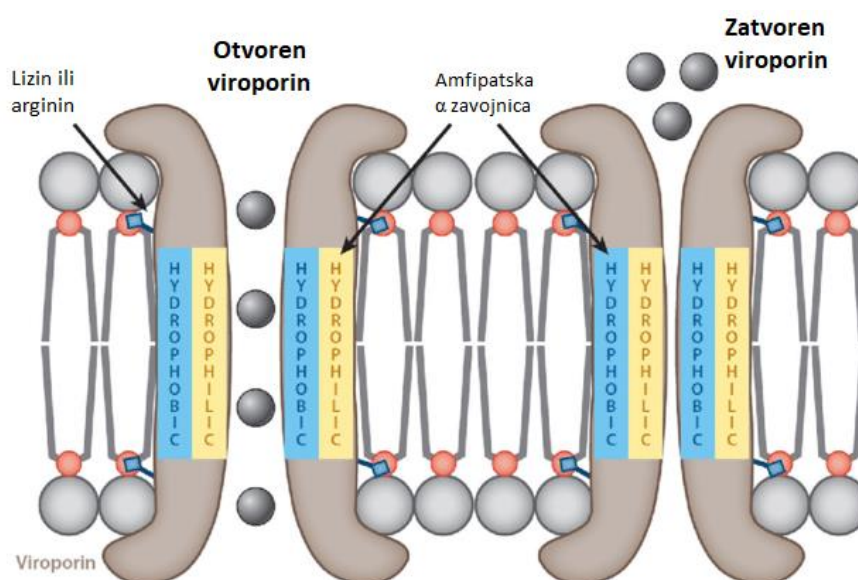
2.5.1. Nastanak ovojnice koronavirusa

Jedna od glavnih karakteristika koja odvaja koronavirus od ostalih proteinskih virusa je proces stvaranja njihove ovojnice koji se odvija u ERGIC-u. Tamo nastaju virioni koji se otpuštaju u lumen i zatim izlaze iz stanice domaćina. U procesu stvaranja ovojnice koronavirusa sudjeluje E protein pomoću interakcija s M proteinom. Do interakcija dolazi u citoplazmatskim repovima te počinje sinteza virusnih čestica. Kako bi M protein uopće sudjelovao u sintezi, on mora interagirati s E proteinom. Potreba za tom interakcijom je premještanje M proteina u dijelove u kojima je zastupljen E protein, jer on sam nije sposoban sintetizirati ovojnicu koronavirusa. Kada se to dogodi, moguće je započeti sintezu. Istraživanje koje je provedeno nad MHV E proteinom je dovelo do važnog zaključka. Ako se na C-kraju E proteina naprave određene mutacije, može doći do nastanka nepravilnih virusnih čestica, a ne sfernih, koje su normalan oblik koronavirusa. Time je dokazano da je E protein ključan za nastanak virusnih čestica. Osim interakcije E proteina s M proteinom, uočeno je da postoje još neke interakcije ključne za stvaranje pravilnog oblika membrane. Istraživanja su provedena vezano uz dva koronavirusa: SARS-CoV i MHV. Nestrukturirani proteini 3 i 4 (nsp3 i nsp4) su potrebni da dođe do stvaranja pravilnog oblika membrane (Slika 16.). Pretpostavlja se da su oni odgovorni za sferni oblik. S obzirom da mutacijom E proteina dolazi do izduženih oblika novonastalih virusnih čestica, moguće je da se time prekida dio mehanizma u kojem dolazi do interakcije E proteina s nsp3 i 4. Potrebno je provesti još istraživanja kako bi se utvrdila točna uloga i interakcije E proteina u nastanku koronavirusa. Bitno je napomenuti da su nsp3 i 4 ključni za daljnji nastanak novog virusa. Oni zakrivljuju membrane, koje su inače linearne po svojoj prirodi. Zahvaljujući tome, omogućeno je nastajanje malih pupova virusa, koji će se daljnjim procesom odvojiti od membrane i otići iz stanice.^{15,18,22-24}



Slika 16. Predloženi model za stvaranje zakrivljenosti ER membrane. Proteini nsp3 i 4 su potrebni za pokretanje zakrivljenosti ER membrane. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 23)

Nakon nastanka virusa u lumenu ERGIC-a, on se odvaja i izlazi iz stanice domaćina. Glavni korak prije odvajanja je bio stvaranje malih pupova na membrani, koji će se tada moći zatvoriti i odvojiti. Za odvajanje je potreban niz reakcija koje su pokrenute pomoću jednog ili više čimbenika: proteaze, kationi i stanični receptori. Ima li u tome kakvu ulogu E protein, za sada nije poznato. Zna se da E protein tvori ionski kanal, viroporin, koji propušta katione Na^+ i K^+ . Treba još istražiti jesu li u ovom slučaju kationi jedan od inicijatora reakcija potrebnih za izlazak virusa iz stanice domaćina. ^{5,25}



Slika 17. Ilustracija tipične viroporinske strukture. Pore viroporina (smeđe) sastoje se od amfipatske α -zavojnice i viroporin je usidren u lipidnom dvosloju pomoću pozitivno nabijenih bočnih ogranaka (lizin ili arginin). Konformacijske promjene u strukturi reguliraju protok iona kroz viroporin otvaranjem (lijevo) i zatvaranjem (desno). (preuzeto i prilagođeno iz ref. 5)

2.6. Posttranslacijske modifikacije

Nakon sinteze proteina, na njih se pomoću određenih enzima mogu vezati različite funkcijske skupine. Taj proces se naziva posttranslacijska modifikacija i njom se proširuju funkcije sintetiziranih proteina. Osim toga, proteini mogu biti označeni za uništavanje zbog grešaka u sintezi. Miristoilacija, ubikvitinacija, glikozilacija i palmitoilacija su vrste posttranslacijskih modifikacija koje su proučavane za E protein.

Miristoilacija je posttranslacijska modifikacija u kojoj se miristoinska kiselina (C14:0) kovalentno veže na alfa amino skupinu N-kraja proteina te je takav proces ireverzibilan. Uglavnom se događa na glicinu, no nije uvijek nužno. Istraživanje je provedeno na svinjskom reproduktivnom i respiratornom sindromu (PRRSV) E proteina zato što sadrži motiv za miristoilaciju, iako PRRSV ne pripada skupini koronavirusa. Uočeno je da miristoilacija utječe na njegovu replikaciju. E protein koronavirusa strukturno jako nalikuje PRRSV E proteinu. Najveća sličnost je vidljiva kod stvaranja ionskog kanala. Međutim, kod E proteina koronavirusa nije zabilježeno da dolazi do miristoilacije.¹³

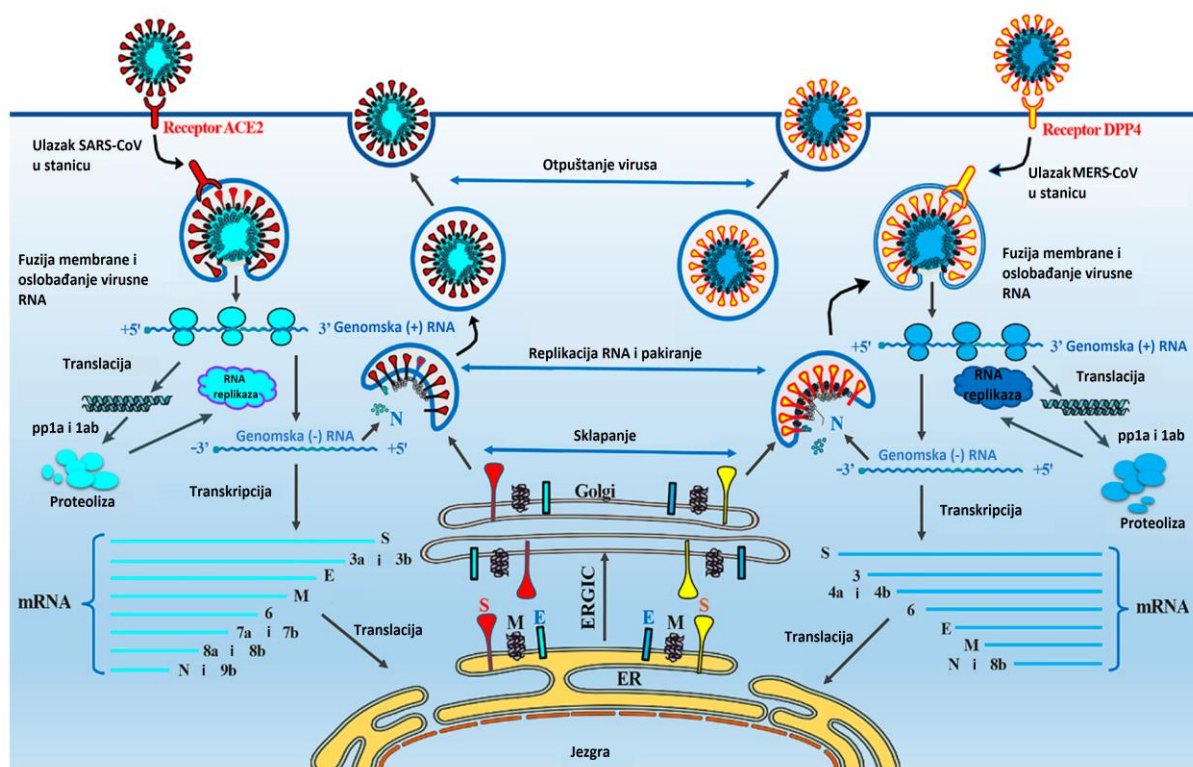
Ubikvitinacija je još jedan model posttranslacijske modifikacije. Na protein se dodaje ubikvitin i time se označava za razgradnju. Ovim načinom se osigurava da krivo smotani proteini ne završe u bitnim metaboličkim putevima. Virusi mogu upravljati ovim mehanizmom u stanici domaćina ili kodirati svoje enzime za ubikvitinaciju. Time osiguravaju da se ne unište svi novonastali proteini kada dođe do povećanog broja smotanih proteina u stanici, koji nastupa uslijed zaraze. Za sada je ta regulacija primijećena jedino kod SARS-CoV. Pretpostavlja se da preko 8b proteina može doći do regulacije nastanka virusnih čestica. Ona se dešava preko regulacije E proteina, koji je odgovoran za nastajanje protein ovojnice virusa uz M protein. Preko nestrukturnog proteina 3, koji interagira s E proteinom, dolazi do ubikvitinacije na N-kraju. Međutim, može doći i do ubikvitinacije samog E proteina te taj proces ima direktan učinak na njegovu stabilnost.^{26,27}

Palmitoilacija je vezanje palmitinske kiseline (C16:0) na cisteinske bočne ogranke proteina. Nastaje tioesterska veza te je reakcija reverzibilna. Svrha ove modifikacije je povećavanje hidrofobnosti proteina te ima ulogu kod protein-protein interakcija. Preko njih sudjeluje u lokalizaciji proteina s membranom. E proteini koronavirusa kod kojih je uočena ova modifikacija su: IBV, SARS-CoV, MHV. Prilikom mutacije cisteina kod MHV E proteina u alanin, uočen je smanjeni nastanak novih virusnih čestica. Također je uočen raspad E proteina prilikom tih mutacija. Ovime je dokazano da je palmitoilacija kod MHV ključna za nastanak novih virusnih čestica. Kod IBV E proteina je uočeno da palmitoilacija nema utjecaj na lokalizaciju E proteina s ERGIC-om. Isto je uočeno kod SARS-CoV E proteina. Ukoliko se naprave dodatne mutacije, uz zamjene cisteina u alanin, primjećuje se da dolazi do poremećaja u lokalizaciji E proteina s ERGIC-om.^{5,16}

Glikozilacija je modifikacija u kojoj se dodaju glikani na proteine. Glikani imaju strukturne uloge u membrani, a ovisno o njihovoj vrsti, postoji nekoliko načina glikozilacije. U ovom slučaju je promatrana N-vezna glikozilacija, u kojoj dolazi do vezanja na asparagin koji se nalazi u slijedu Asn-X-Ser/Thr. O glikozilaciji E proteina se zapravo zna jako malo te su uglavnom predložene funkcije temeljene na topologiji E proteina za IBV i SARS-CoV. Za IBV E protein se smatra da ima jedno mjesto za glikozilaciju, dok se za SARS-CoV smatra da ima dva. S obzirom da topološke metode ne moraju biti precizne, treba provesti dodatna istraživanja kako bi se saznala točna uloga i kako bismo znali dolazi li do glikozilacije na tim mjestima.⁵

2.7. Patogeneza

Unutar endoplazmatskog retikuluma se događa velik broj metaboličkih procesa. Zbog toga endoplazmatski retikulum može podnijeti sintezu velikog broja proteina. Međutim, kada virus uđe u stanicu, on koristi te sustave za sintezu svojeg genoma i proteoma (Slika 18). Prilikom takve sinteze dolazi do velikog rasta potrebe za sintezom proteina. Nakon nekog vremena stanica postaje preopterećena stalnom sintezom novih proteina. Posljedica toga je nastajanje velikog broja nesmotanih ili krivo smotanih proteina te počinje njihovo nagomilavanje u stanici. Kao odgovor na to, pokreće se signal koji javlja da postoji prevelika količina nesmotanih proteina. Taj signal je uzrokovan stresom endoplazmatskog retikuluma. Zatim se pokreće kaskada reakcija pomoću kojih se situacija rješava. Takva reakcija je način obrane organizma od štetnih posljedica koje mogu nastati zbog krivo smotanih ili nesmotanih proteina. Za sada je samo kod SARS-CoV E proteina primijećeno da ima antiapoptotsku funkciju u zaraženim stanicama. Odnosno, primijećeno je da E protein stupa u interakciju s jednim od dijelova zaslužnih za signaliziranje viška nesmotanih ili krivo smotanih proteina. Na taj način se nastavlja repliciranje genoma virusa na duži vremenski period prije nego se stanica uništi. Dolazi do ispuštanja više novonastalih virusa u organizam i veće zaraze. Takav utjecaj E proteina je zapravo način preživljavanja virusa unutar stanice domaćina. ^{28,29}



Slika 18. Životni ciklus SARS-CoV i MERS-CoV u stanici domaćina. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 30)

2.7.1. Imunološka reakcija

Imunološki sustav nam služi za obranu od stranih tijela (virusa, bakterija) koja mogu ugroziti funkciju naših stanica, a time i života. Ako dođe do ulaska stranog tijela kao odgovor na to, u našem organizmu se javlja upala. E protein koronavirusa u svom transmembranskom dijelu sadržava α -zavojnica. Ona može oligomerizirati te nastaje ionski kanal (Slika 5). Prilikom

inhibicije tog ionskog kanala je uočena smanjena mogućnost patogeneze. To bi možda mogao biti jedan od načina kojim bismo mogli tretirati koronavirus. Međutim, treba uzeti u obzir da je kod SARS-CoV uočena mogućnost popravka ionskog kanala. Također, u patogenezi sudjeluju razni kemijski, fizikalni i razni drugi procesi koji su međusobno ovisni. Zbog toga treba dobro proučiti načine kojima se može inhibirati razmnožavanje virusa, a da ne dođe do oštećenja mehanizama stanice domaćina.^{5,10}

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=64800> (datum pristupa 16. ožujka 2020.)
2. A. K. Abbas, A. H. Lichtman, *Basic Immunology*, Saunders, Philadelphia, 2004., str. 1-8.
3. Y. Chen, Q. Liu, D. Guo, *J. Med. Virol.*, **92** (2020) 418-423
4. S. Payne, *Viruses From Understanding to Investigation*, Academic Press, Massachusetts, 2017., str. 149-158.
5. D. Schoeman, B. C. Fielding, *Virol. J.*, **16** (2019) 1-22.
6. A. M.Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz, *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier, Nizozemska, 2011, 806-828.
7. P. C. Y. Woo, S. K. P. Lau, C. S. F. Lam, C. C. Y. Lau, A. K. L. Tsang, J. H. N. Lau, R. Bai, J. L. L. Teng, C. C. C. Tsang, M. Wang, B-J. Zheng, K-H. Chan, K-Y. Yuen, *J. Virol.*, **86** (2012) 3995-4008
8. L. Kuo, D. Escors, H. Laude, L. Enjuanes, *J. Virol.*, **81** (2007) 2249-2262.
9. Y. Li, W. Surya. S. Claudine, J. Torres, *J. Biol. Chem.*, **289** (2014) 12535-12549.
10. J. L. Nieto-Torres, M. L. DeDiego, C. Verdiá-Báguena, J. M. Jimenez-Guardeño, J. A. Regla-Nava, R. Fernandez-Delgado, C. Castaño-Rodríguez, A. Alcaraz, J. Torres, V. M. Aguilella, L. Enjuanes, *PLoS Pathog.*, **10** (2014) 1-19.
11. C. Verdiá-Báguena, J. L. Nieto-Torres, A. Alcaraz, M. L. DeDiego, L. Enjuanes, V. M. Aguilella, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1828** (2013) 2026-2031.
12. <https://www.uniprot.org/uniprot/P59637> (datum pristupa 30. ožujka 2020.)
13. Q. Wu, Y. Zhang, H. Lü, J. Wang, X. He, Y. Lui, C. Ye, W. Lin, J. Hu, J. Ji, J. Xu, J. Ye, Y. Hu, W. Chen, S. Li, J. Wang, J. Wang, Bi S, H. Yang, *Genomics, Proteomics Bioinf.*, **1** (2003) 131-144.
14. Y. Du, F. A. Zuckermann, D. Yoo, *Virus Res.*, **147** (2010) 294-299.
15. J. W. Westerbeck, C. E. Machamer, *J. Virol.* **89** (2015) 9313-9923.
16. P. Venkatagopalan, S. M. Daskalova, L. A. Lopez, K. A. Dolezal, B. G. Hogue, *Virology*, **478** (2015) 75-85.
17. T. R. Ruch, C. E. Machamer, *Viruses*, **4** (2012) 363-382.

18. K. Lim, D. Lui, *J. Biol. Chem.*, **276** (2001) 17515-17523.
19. K. Parthasarathy, L. Ng, X. Lin, D. X. Liu, K. Pervushin, X. Gong, J. Torres, *Biophys. J.*, **95** (2008) L39-41.
20. C. Verdía-Báguena, J. L. Nieto-Torres, A. Alcaraz, M. L. DeDiego, J. Torres, V. M. Aguilella, L. Enjuanes, *Virology*, **432** (2012) 486-494.
21. Y-T. Tseng, S-M. Wang, K-J Huang., C-T. Wang, *J. Biomed. Sci.*, **21** (2014) 34.
22. B. Yount, R. S. Roberts, A. C. Sims, D. Deming, M. B. Frieman, J. Sparks, M. R. Denison, N. Davis, R. S. Baric, *J. Virol.*, **79** (2005) 14909-14922.
23. M. C. Hagemeijer, I. Monastyrska, J. Griffith, P. van der Sluijs, J. Voortman, P. M. van Bergen en Henegouwen, A. M. Vonk, P. J. Rottier, F. Reggiori, C. A. de Haan, *Virology*, **458** (2014) 125-135.
24. F. Fischer, C. F. Stegen, P. S. Masters, W. A. Samsonoff, *J. Virol.*, **72** (1998) 7885-7894.
25. J. S. Rossman, R. A. Lamb, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **29** (2011) 551-569.
26. M. K. Issacson, H. L. Ploegh, *Cell Host Microbe*, **5** (2009) 559-570.
27. C. T. Keng, S. Akerström, C. S. Leung, L. L. Poon, J. S. Peiris, A. Mirazimi, Y. J. Tan, *Microbes Infect.*, **13** (2011) 179-188.
28. Y. X. Lim, Y. L. Ng, J. P. Tam, D. X. Liu, *Diseases*, **4** (2016) 26.
29. M. L. DeDiego, J. L. Nieto-Torres, J. M. Jiménez-Guardeño, J. A. Regla-Nava, E. Álvarez, J. C. Oliveros, J. Zhao, C. Fett, S. Perlman, L. Enjuanes, *PLoS Pathog.*, **7** (2011) 1-19.
30. Z. Song, Y. Xu, L. Bao, L. Zhang, P. Yu, Y. Qu, H. Zhu, W. Zhao, Y. Han, C. Qin, *Viruses*, **11** (2019) 59