

I virus

Elementi genetici che si replicano all'interno delle cellule ospiti, in modo indipendente dai cromosomi cellulari (**parassiti intracellulari obbligati**).



Essi sfruttano l'apparato metabolico della cellula ospite per potersi moltiplicare.

Si ipotizza che i primi virus siano comparsi sulla terra prima dell'ultimo antenato comune universale (LUCA)



Entità in grado di replicarsi molto simili a virus ad ssRNA

Possono esistere in 2 fasi

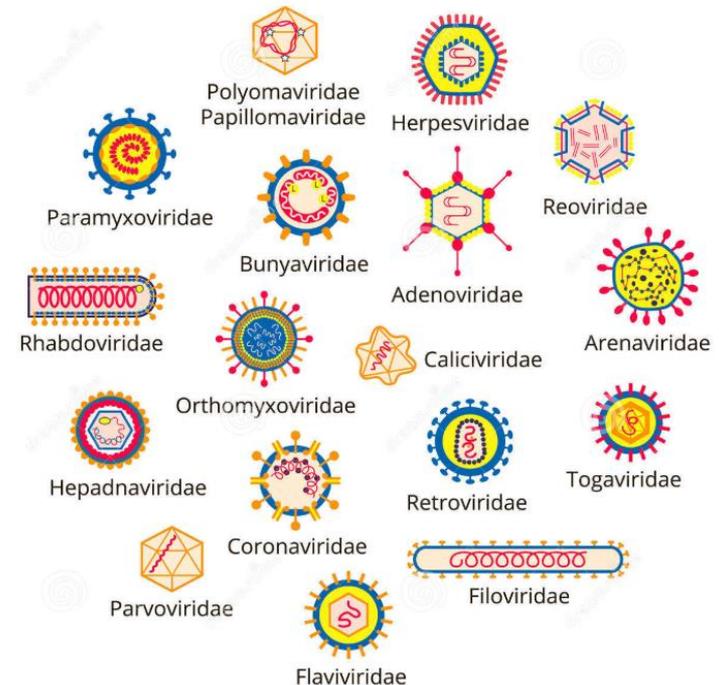
- fase cellulare
- fase extracellulare (**virione**)

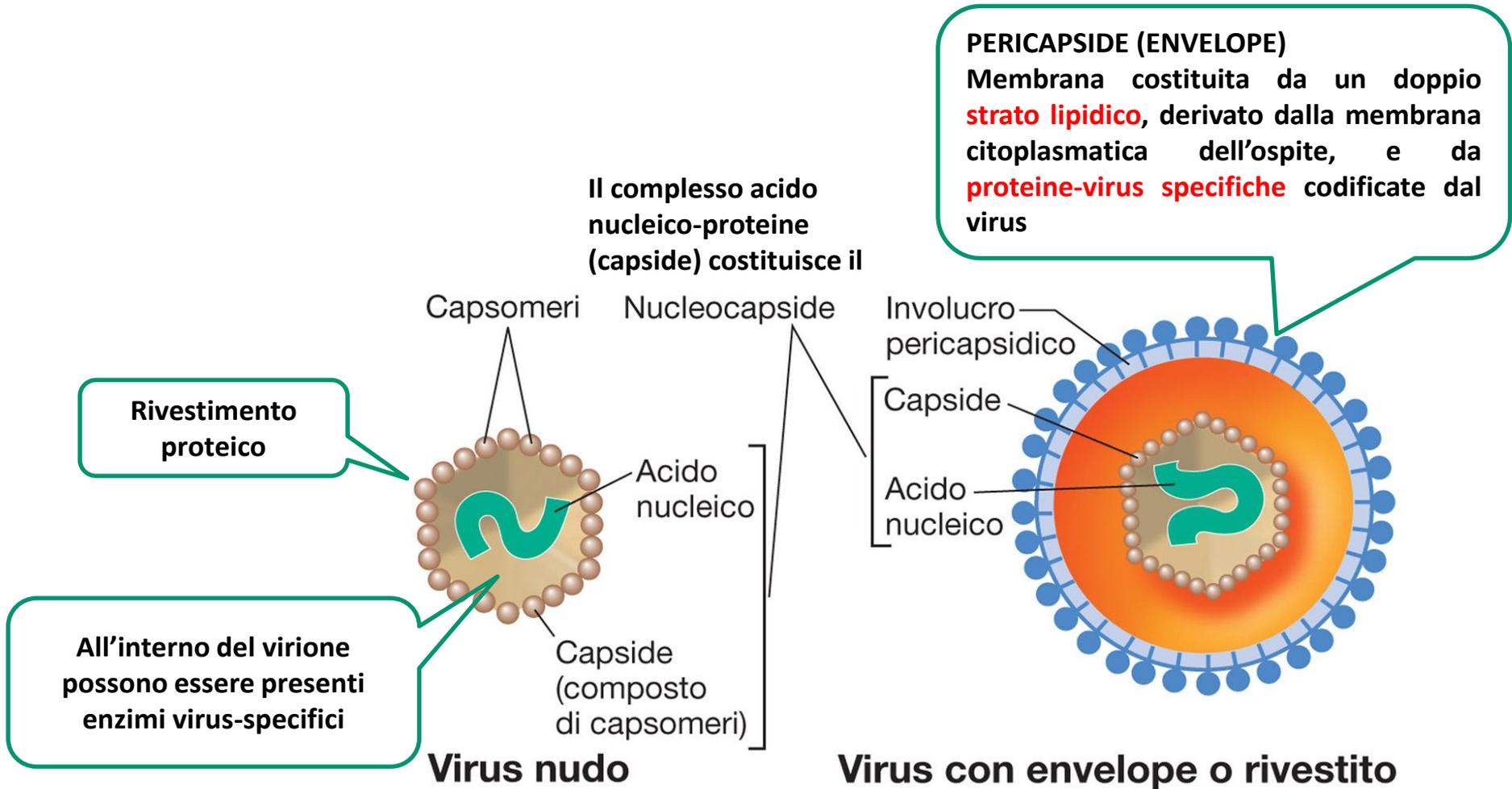
Virione

- Rappresenta la particella virale completa
 - **acido nucleico**,
 - **rivestimento proteico**,
 - **altro materiale macromolecolare**;
- È metabolicamente inerte.

I virus differiscono per

- **dimensione (20-400 nm)**,
- **forma**,
- **composizione chimica**,
- **potere codificante**,
- ...





Anche se i virus, fuori della cellula ospite, sono **metabolicamente inerti** essi possono contenere uno o più enzimi (**lisozima, trascrittasi inversa, RNA replicasi, etc.**)

I genomi dei virus possono essere organizzati sotto forma di **cromosomi circolari o lineari**.

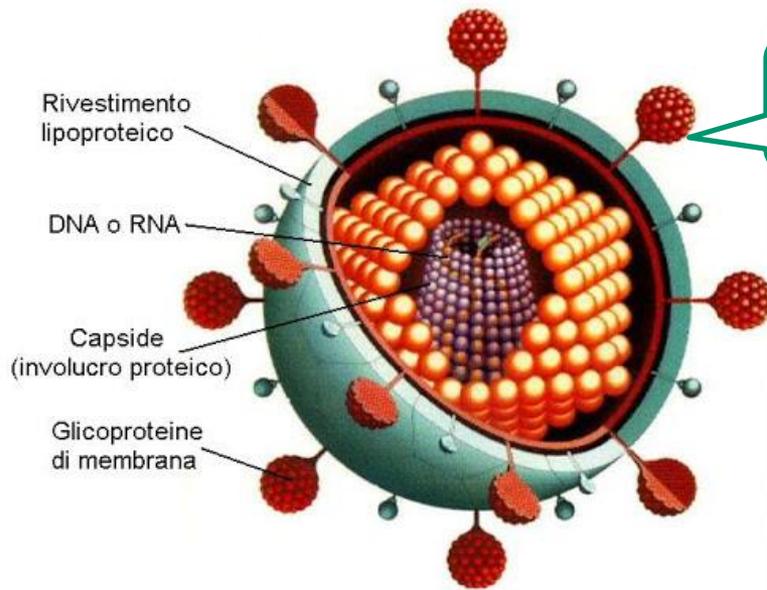
Alcuni virus presentano un **genoma segmentato** (distribuito in più molecole di acidi nucleici).

Tab. 9.1 Principali tipi di genomi virali^a

Virus	Ospite	Genomi virali			
		Tipo di acido nucleico	Struttura	Numero di molecole	Dimensioni ^a
Parvovirus H-1	Animali	DNA a singolo filamento	Lineare	1	5176 basi
ΦX174	Batteri	DNA a singolo filamento	Circolare	1	5386 basi
Virus 40 delle scimmie (SV40)	Animali	DNA a doppio filamento	Circolare	1	5243 paia di basi
Poliovirus	Animali	RNA a singolo filamento	Lineare	1	7433 basi
Virus del mosaico del cavolfiore	Piante	DNA a doppio filamento	Circolare	1	8025 paia di basi
Virus del mosaico delle leguminose	Piante	RNA a singolo filamento	Lineare	2 diverse	9370 basi (in tutto)
Reovirus tipo 3	Animali	RNA a doppio filamento	Lineare	10 diverse	23 549 paia di basi (in tutto)
Batteriofago λ	Batteri	DNA a doppio filamento	Lineare	1	48 514 paia di basi ^b
Virus herpes simplex tipo 1	Animali	DNA a doppio filamento	Lineare	1	152 260 paia di basi
Batteriofago T4	Batteri	DNA a doppio filamento	Lineare	1	168 903 paia di basi
Citomegalovirus umano	Animali	DNA a doppio filamento	Lineare	1	229 351 paia di basi

^a Le dimensioni dei genomi virali scelti per questa tabella sono note esattamente, dato che i genomi sono stati sequenziati. Tuttavia, questa accuratezza può essere fuorviante, poiché è stato sequenziato solo un particolare ceppo o un singolo isolato di un dato virus; conseguentemente, la sequenza e il preciso numero di basi può essere leggermente differente per altri isolati. Non è stato fatto nessun tentativo di scegliere i più grandi o i più piccoli tra i virus noti, piuttosto si è cercato di dare esempi rappresentativi delle dimensioni e della struttura dei genomi virali, costituiti da DNA e RNA sia a singolo sia a doppio filamento.

^b Il totale include le estensioni di 12 nucleotidi a singolo filamento a ognuna delle estremità della forma lineare del DNA (vedi par. 9.11).



Glicoproteine importanti per il riconoscimento delle cellule ospiti

Nel virione è presente un solo tipo di acido nucleico, che può codificare fino a ~350 geni

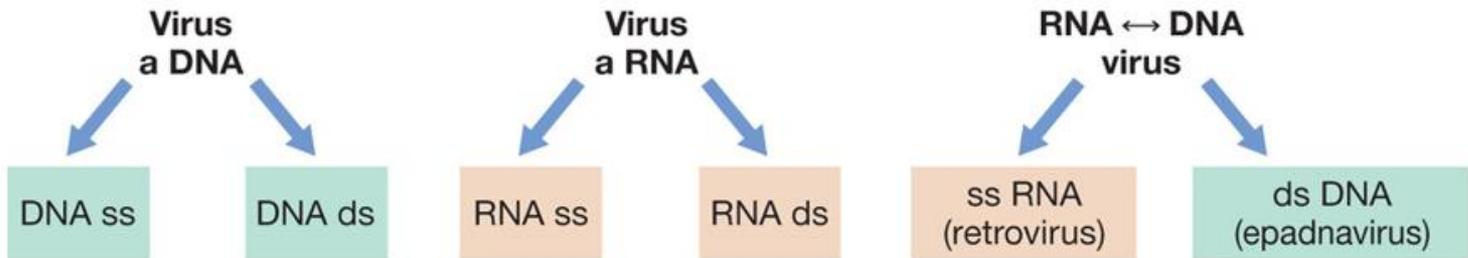
Alcuni virus possono presentare entrambi i tipi di acido nucleico, a seconda del loro ciclo di replicazione.

I virus possono essere classificati in base a

- **materiale genetico** (DNA o RNA),
- **organizzazione** (singolo o doppio filamento),
- **forma** (lineare o circolare).

Classe di virus

Genoma nel virione



I cromosomi a singolo filamento possono essere a **polarità positiva (+)** o **negativa (-)**.

Polarità + → sequenza delle basi con lo stesso orientamento dell'mRNA

Dopo l'infezione, il virus deve avviare la sua **moltiplicazione**



Per potersi moltiplicare, il virus ha bisogno di effettuare nuove copie del proprio **genoma** e sintetizzare **proteine virus-specifiche** mediante la **sintesi di mRNA**.

Modalità sintesi mRNA

Via classica per la formazione di mRNA e replicazione del genoma virale

La **RNA polimerasi** utilizza come stampo solo **DNA-ds!**
Prima di produrre mRNA, la cellula deve sintetizzare il filamento complementare di DNA, con formazione di un intermedio a doppio filamento

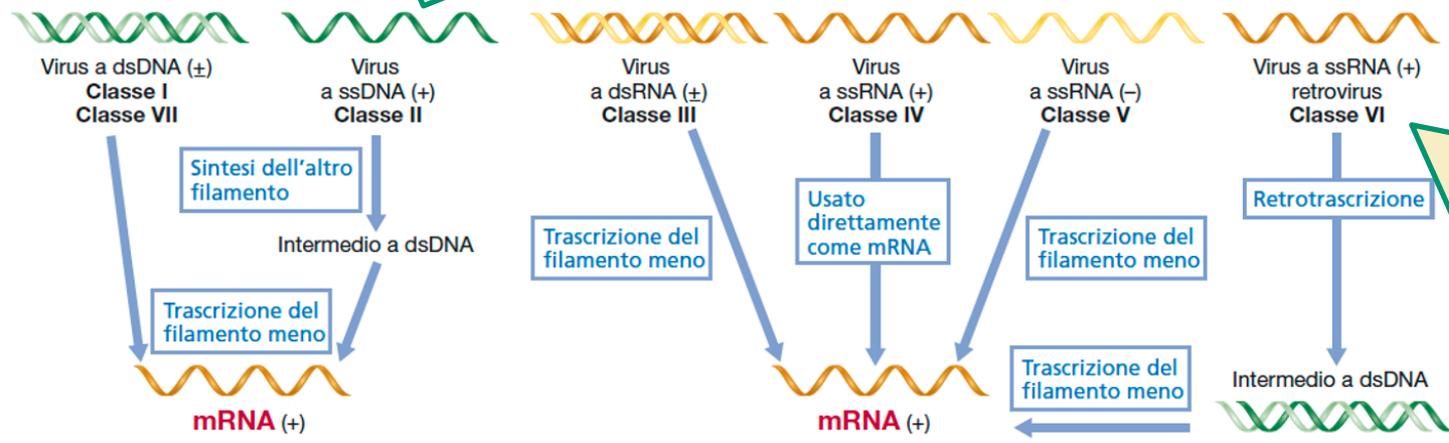
In virologia l'**mRNA** è nella **configurazione più (+)**, mentre il suo complementare è detto **meno (-)**.
Per sintetizzare mRNA a partire da un genoma ad RNA è necessaria una **RNA polimerasi RNA-dipendente**.

Nei virus con RNA ds solo il filamento (-) viene trascritto in mRNA (+)

Nei virus a polarità positiva l'RNA ss (+) può essere utilizzato direttamente come mRNA

Nei virus con RNA ss a polarità negativa il filamento deve essere **trascritto in mRNA (+)**

I **retrovirus** sono virus animali che si replicano sintetizzando, mediante la **trascrittasi inversa**, prima un **intermedio di DNA** a singolo filamento e poi a doppio filamento



Replicazione del genoma:
Classe I, Classe II, Classe VII, classica, semiconservativa, il filamento (-) è eliminato
 Classe VII, trascrizione seguita da retrotrascrizione
Virus a DNA

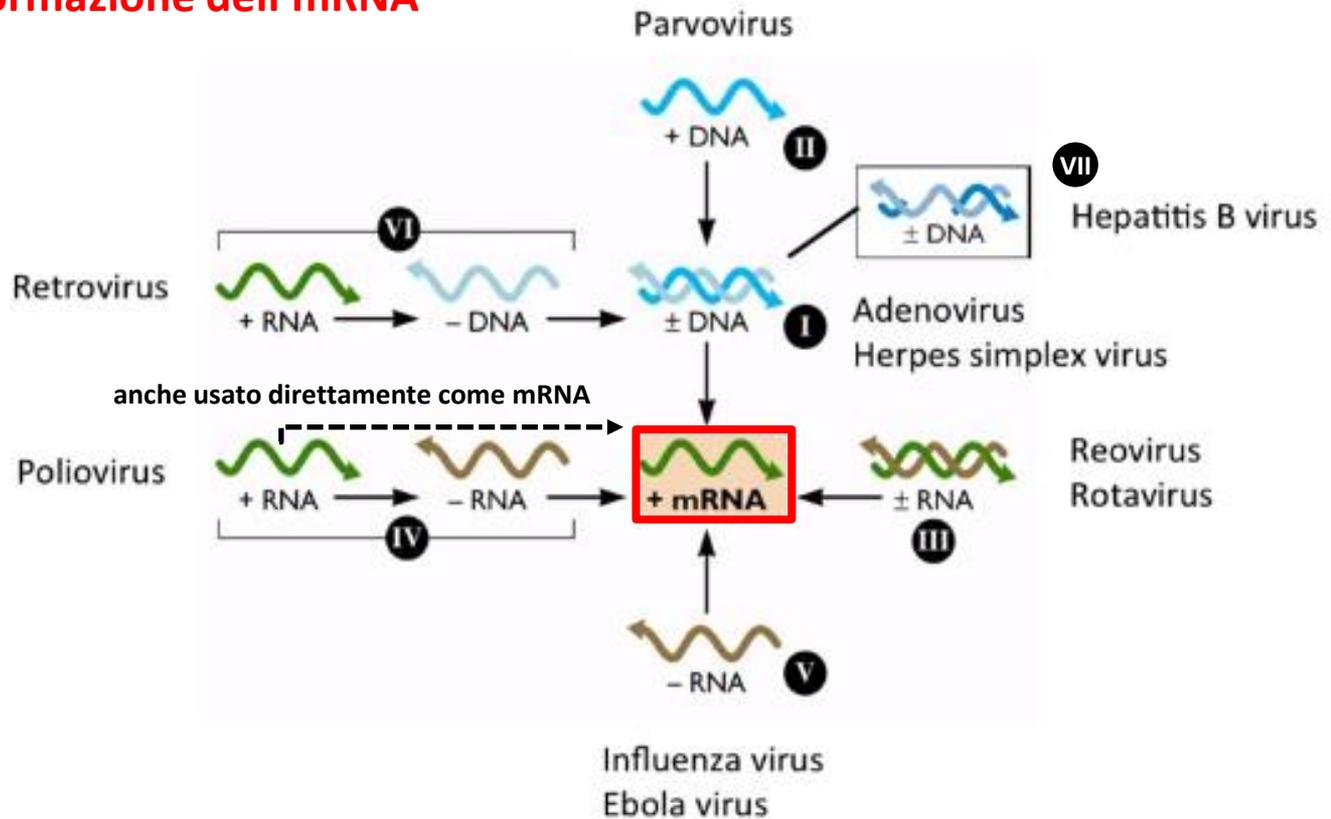
Replicazione del genoma:
Classe III, producono ssRNA (+) e da questo trascrivono il secondo filamento ssRNA (-) del doppio filamento di RNA genomico
Classe IV, sintetizzano ssRNA (-) che viene trascritto nei nuovi genomi a ssRNA (+)
Classe V, sintetizzano ssRNA (+) che viene trascritto nei nuovi genomi a ssRNA (-)
Classe VI, sintetizzano l'RNA genomico a singolo filamento (+) mediante trascrizione del filamento (-) del DNA provirale integrato nel genoma della cellula ospite
Virus a RNA

I virus di **Classe VII (HBV)** hanno un genoma a dsDNA ma si replicano attraverso un **intermedio ad RNA**.

Classificazione di David Baltimore



Modalità di formazione dell'mRNA



Tre Asp Ser

RNA (+) ---UIACCI GAUIUCGIGACICGUA---

RNA (-) ---AIUGGICUA IAGCICUGIGCAIU---

Trip Leu Ser

Tab. 9.2 Classificazione dei virus secondo il sistema di Baltimore

Classe	Descrizione del genoma e delle strategie di replicazione	Esempi	
		Virus batterici	Virus animali
I	DNA a doppio filamento	Lambda, T4	Herpesvirus, pox virus
II	DNA a singolo filamento	Φ X174	Virus dell'anemia del pollo
III	RNA a doppio filamento	Φ 6	Reovirus (► vol. 2B, cap. 24.9)
IV	RNA a singolo filamento, polarità positiva	MS2	Poliovirus
V	RNA a singolo filamento, polarità negativa		Virus dell'influenza, virus della rabbia
VI	RNA a singolo filamento che si replica attraverso un intermedio a DNA		Retrovirus
VII	DNA a doppio filamento che si replica attraverso un intermedio a RNA		Virus dell'epatite B

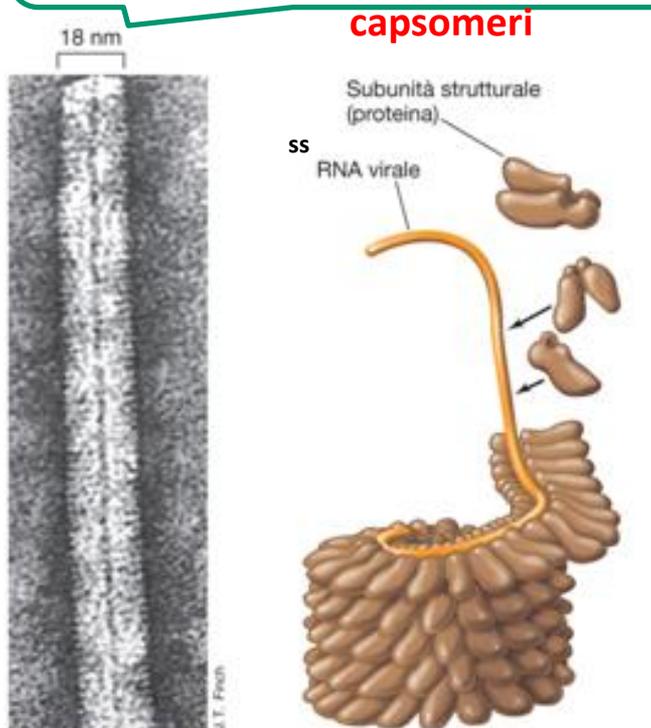
I virus possono essere classificati in base a

- **struttura**
- **tipo di cellula che infettano (tropismo)**
 - Virus animali
 - Virus vegetali
 - Virus batterici (**batteriofagi** o **fagi**)
- ...

Struttura virioni

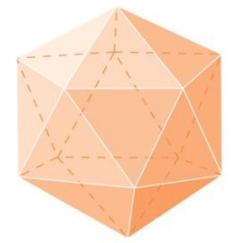
I nucleocapsidi possono presentare diversi **tipi di simmetria** (tipo di organizzazione dei capsomeri nella formazione del capside).

Virus del mosaico del tabacco (capside a forma bastoncellare o filamentosa a **simmetria elicoidale**)

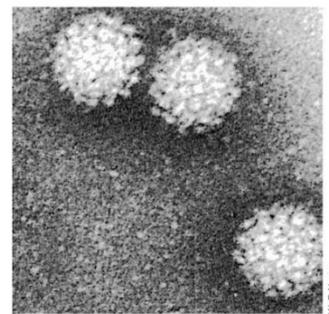


Due principali classi di simmetria

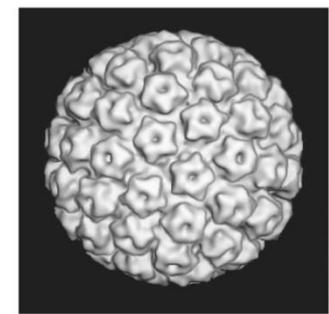
- Virus bastoncellari → **simmetria elicoidale**
 - Virus sferoidali → **simmetria icosaedrica**
- Esistono anche virus a struttura complessa



20 facce triangolari



(b)

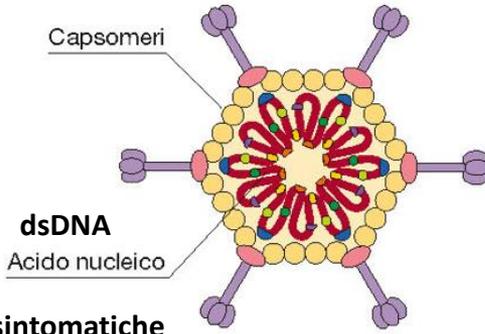


(c)

Virus del papilloma umano (particelle sferoidali con **simmetria icosaedrica** → **20 facce**): modello, micrografia al microscopio elettronico e ricostruzione tridimensionale.

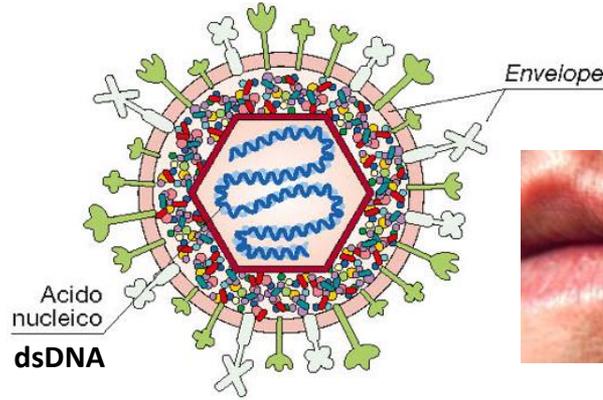
Virus nudi

Alcuni virus presentano un *envelope* L'*envelope* media il processo di infezione

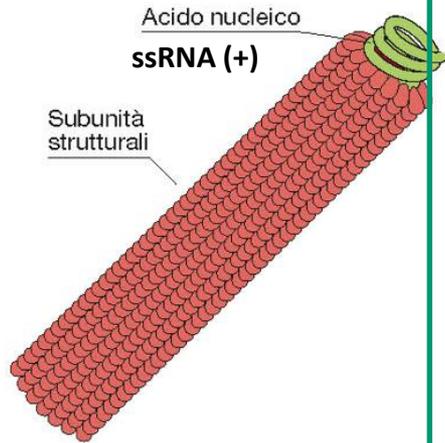


Nelle infezioni sintomatiche causano febbre e sintomi delle vie respiratorie superiori (faringite, otite media, tosse e tonsillite, ...)

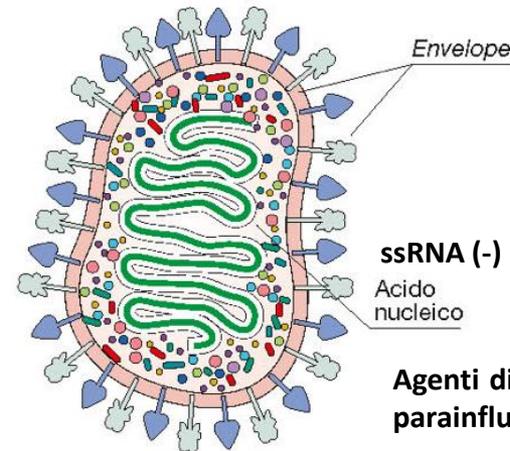
Virione nudo con capside icosaedrico (es. Adenovirus)



Virione rivestito con capside icosaedrico (es. Herpesvirus)



Virione nudo con capside elicoidale (es. TMV)



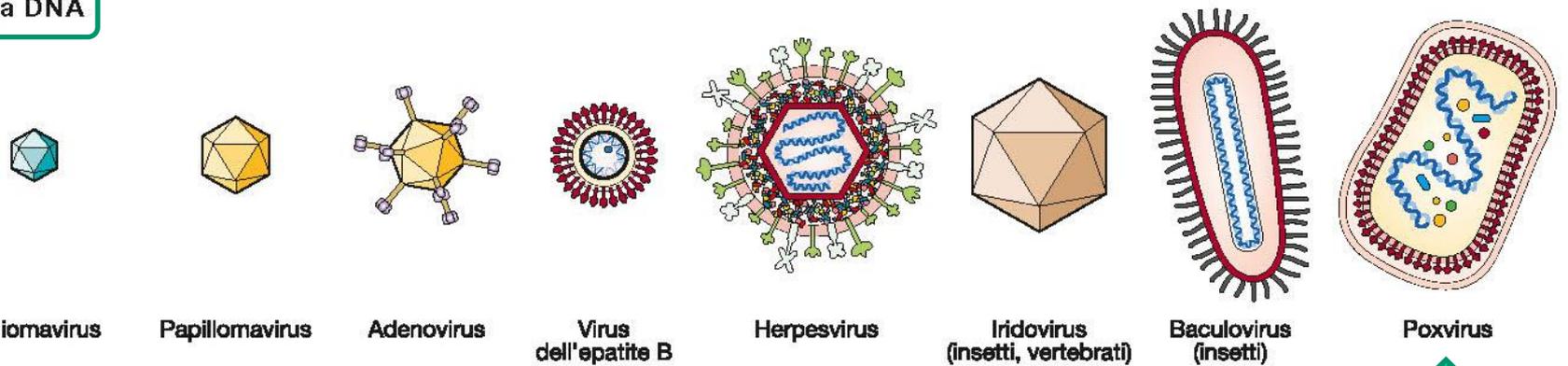
Agenti di infezioni respiratorie sindromi parainfluenzali, morbillo e parotite.

Virione rivestito con capside elicoidale (es. Paramyxovirus)

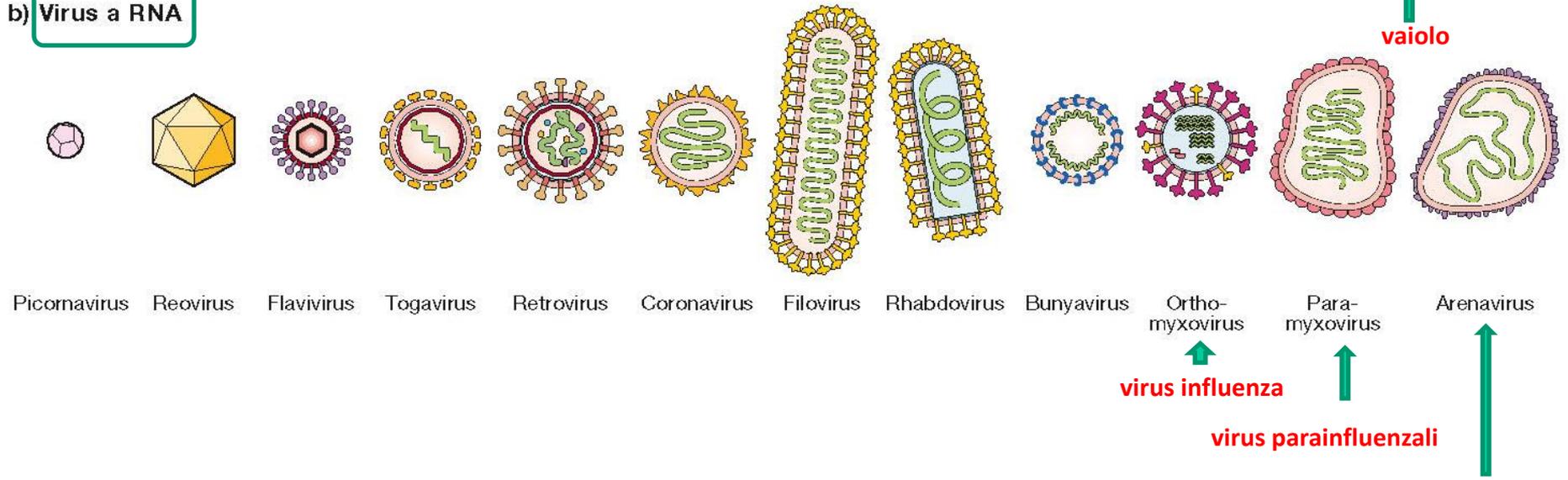


Oltre a virus con capsidi a simmetria icosaedrica o elicoidale, possono esistere capsidi con una **organizzazione strutturale molto complessa** (Poxvirus, molti batteriofagi, etc.)

a) **Virus a DNA**



b) **Virus a RNA**



↑
vaiolo

↑
virus influenza

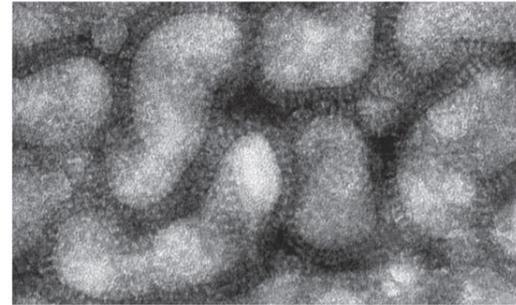
↑
virus parainfluenzali

↑
malattie (zoonosi) trasmesse dai roditori all'uomo (stati febbrili, febbre emorragica, ...)

Tra i virus è possibile riscontrare **strutture più complesse**.

Virus dell'influenza (Orthomyxovirus)

- con involucro pericapsidico
- senza forma ben definita
- genoma segmentato ad RNA a singolo filamento



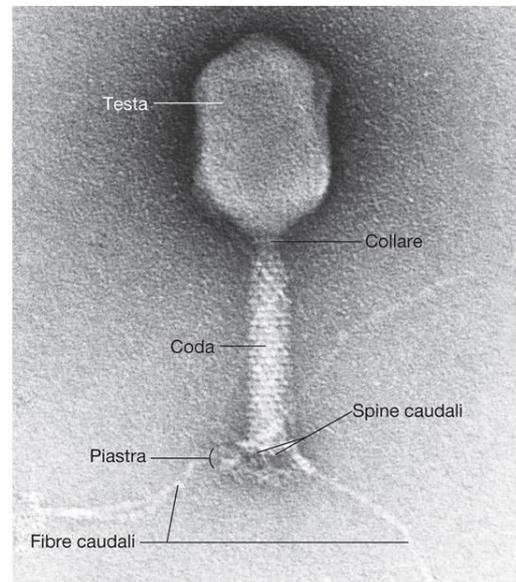
(a)

Alcuni **virus batterici** sono composti da **Testa a simmetria icosaedrica + coda elicoidale**

Batteriofago T4 di *E. coli*

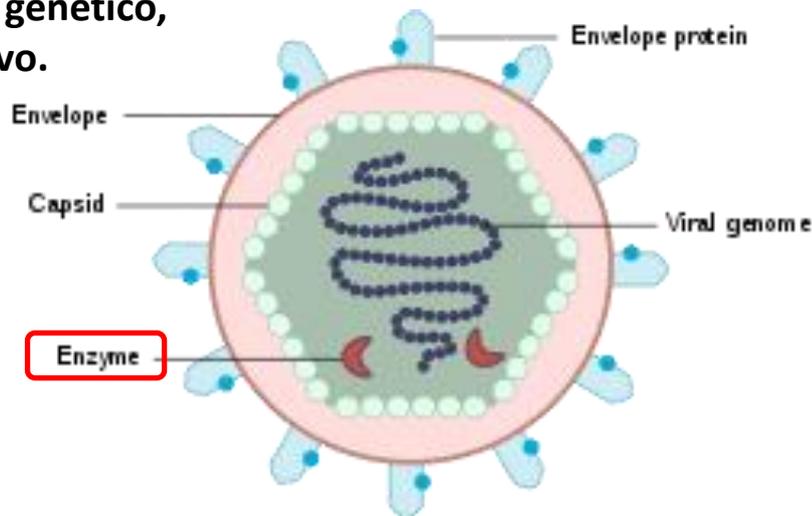
- genoma a DNA a doppio filamento.

Le componenti caudali sono coinvolte nell'attacco del virione alla cellula ospite e nell'iniezione dell'acido nucleico.



(b)

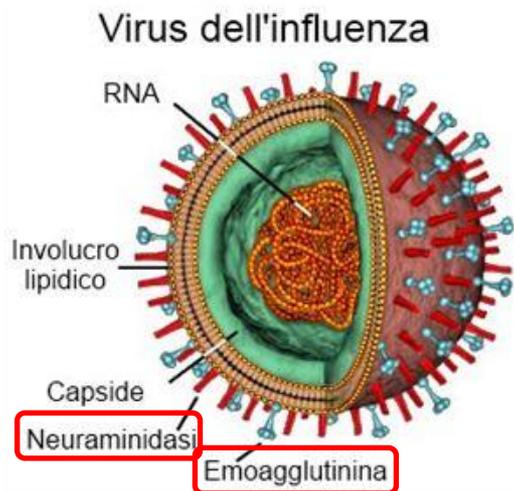
Alcuni virioni, all'interno del capsid, oltre al materiale genetico, contengono **enzimi** fondamentali per il processo infettivo.



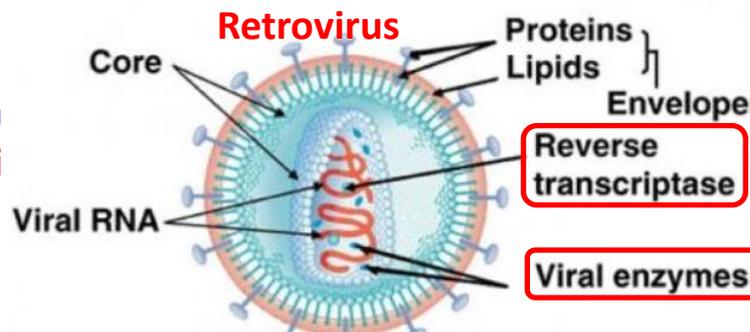
Lisozima → degrada il peptidoglicano delle cellule batteriche
RNA replicasi → sintetizza mRNA da un genoma ad RNA

Altri virus presentano sulla superficie enzimi che contribuiscono alla lisi della cellula ospite ed alla fuoriuscita dei virioni.

Emoagglutinina → proteina che permette al virus di penetrare nella cellula ospite.
Neuraminidasi → distruzione glicoproteine e glicolipidi delle membrane cellulari.

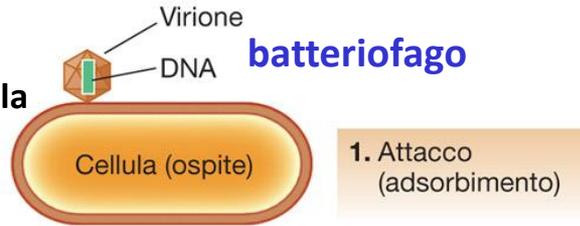


I **retrovirus** si replicano attraverso un **intermedio a DNA**, (**retrotrascrizione**) grazie alla **trascrittasi inversa (DNA polimerasi RNA-dipendente)**.

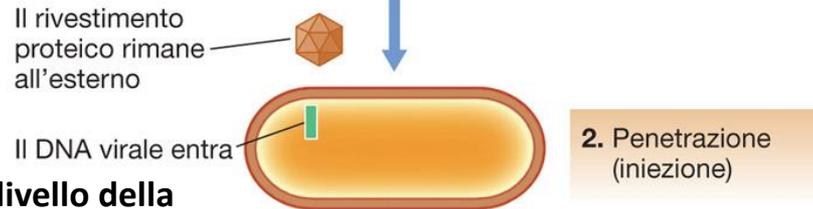


Per potersi replicare, il virus deve infettare una cellula e sfruttare il suo apparato biosintetico → **Il ciclo virale** può essere diviso in **5 fasi**.

1) **Attacco (adsorbimento)** del virione, mediante proteine, ai **recettori** della cellula ospite sensibile.

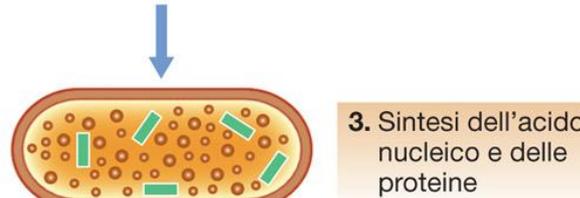


2) **Penetrazione (iniezione)**
Del virione o del suo genoma nella cellula ospite **permissiva**;
La **spoliazione** del virus (rimozione del capsido) avviene a livello della membrana citoplasmatica, del citoplasma o della membrana nucleare.

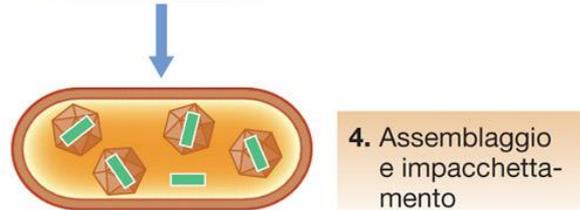


Il fago T4 possiede un enzima che induce la formazione di un piccolo poro nel peptidoglicano.

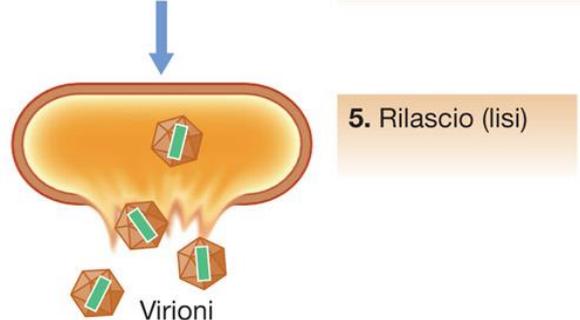
3) **Sintesi dell'acido nucleico virale** e delle **proteine precoci** da parte dell'apparato metabolico della cellula ospite.



4) **Maturazione: assemblaggio** dei capsomeri ed **impacchettamento** del genoma nei nuovi virioni.



5) **Rilascio** dei virioni maturi in seguito a lisi, gemmazione o escrezione della cellula ospite.



Durata ciclo replicativo
~20-60' → virus batterici
~8-40 h → virus animali

Curva di crescita a ciclo unico (a gradino singolo)

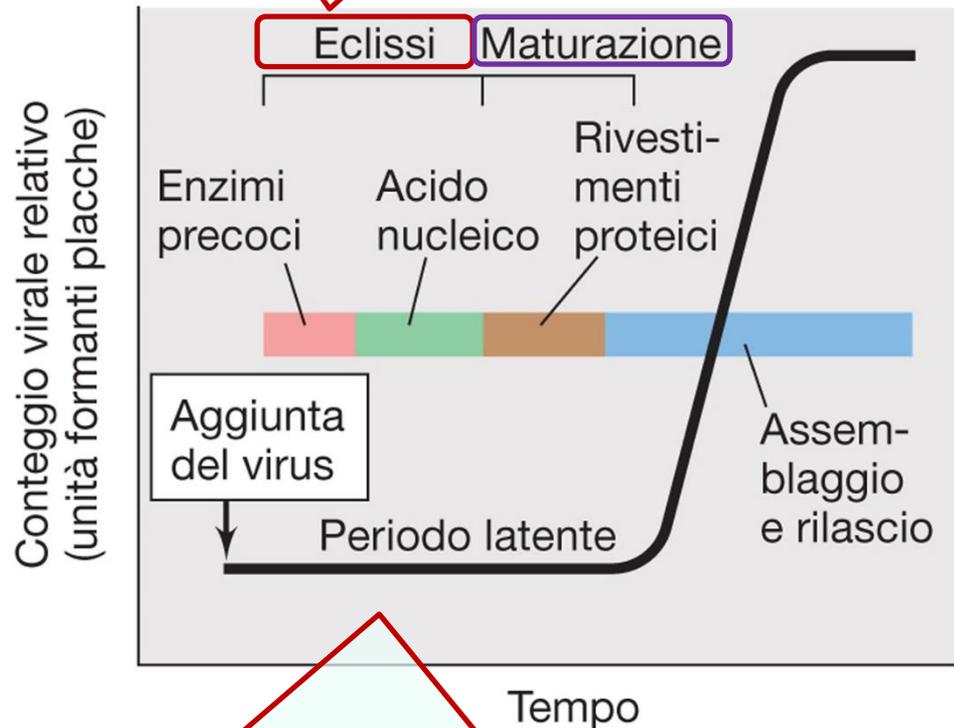
Subito dopo l'infezione le particelle virali infettive non vengono più rilevate nel terreno di coltura.



Dopo pochi minuti avviene l'adsorbimento dei virioni alle cellule sensibili (inizio del **periodo di eclissi**).

Nel caso che il virione integro penetri all'interno della cellula, durante questo periodo il materiale genetico viene separato dal capsido proteico (**rimozione del capsido**).

La **maturazione** ha inizio quando i genomi neosintetizzati e le proteine virali cominciano ad essere **impacchettati** dentro i capsidi.



Nel corso del **periodo di latenza** avviene la **replicazione del materiale genetico** e la **sintesi delle proteine virali**.

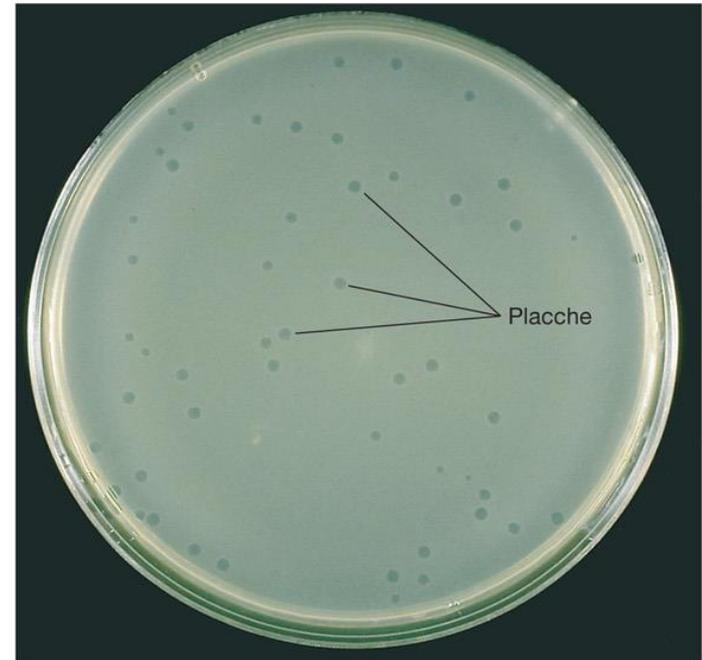
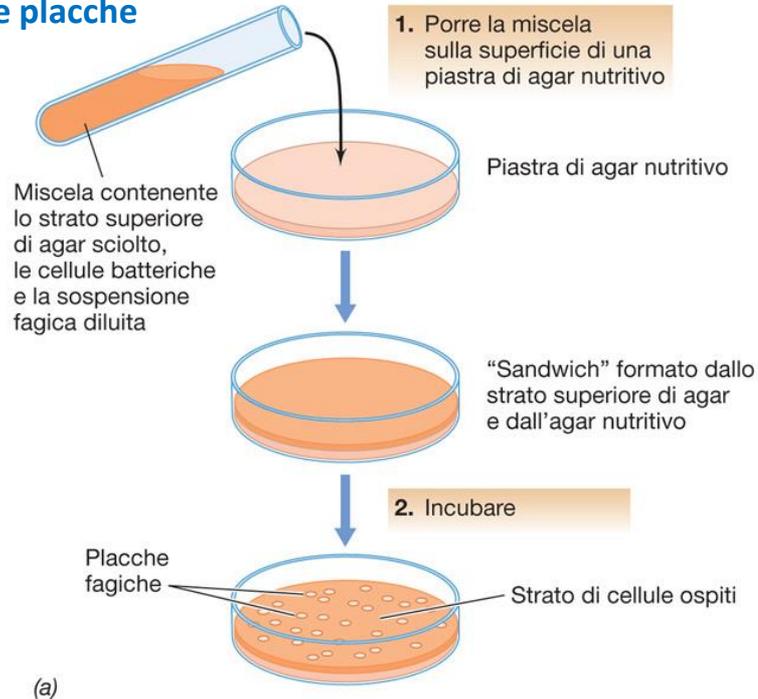
Non viene ancora rilevata la presenza di virioni nell'ambiente extracellulare.

Coltivazione e quantificazione dei virus

Per potersi replicare in laboratorio, i virus hanno bisogno di **specifici tipi cellulari** (cellule procariotiche, vegetali ed animali)

I virus batterici sono i più semplici da coltivare.

Determinazione del titolo virale Saggio delle placche



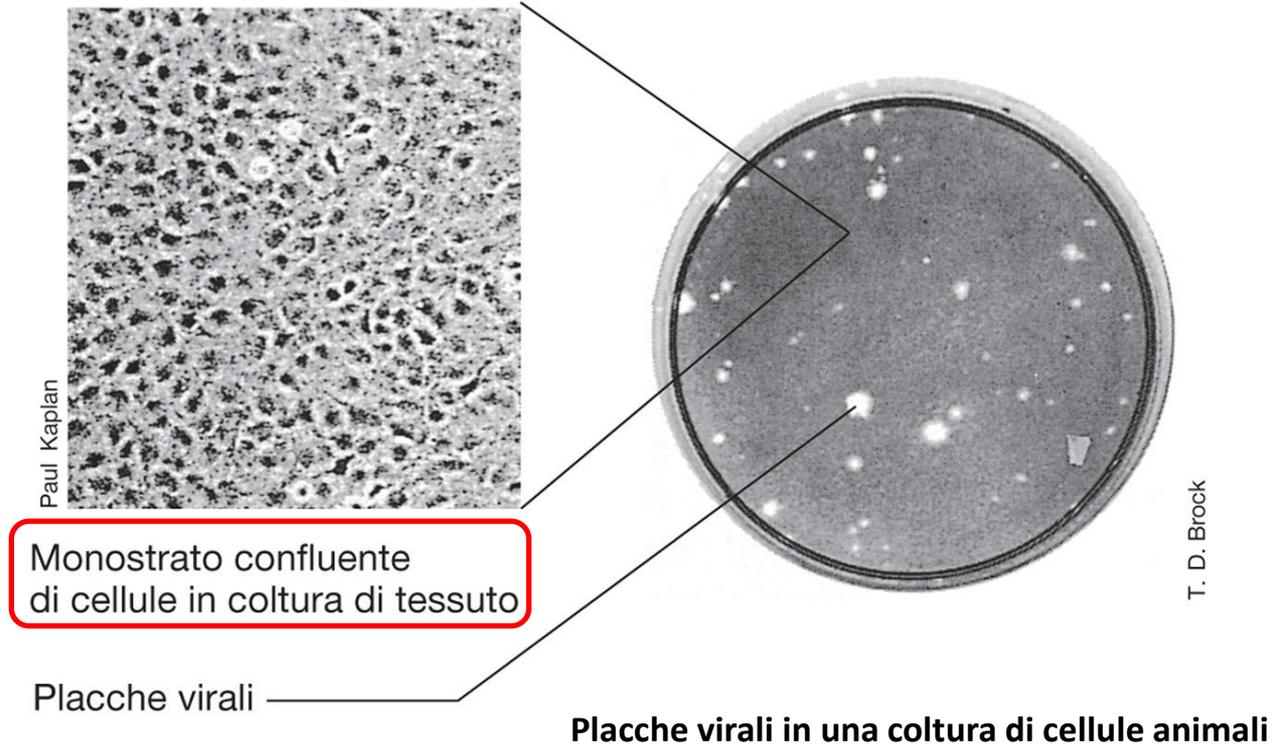
(b) Dalle placche è possibile ottenere **ceppi puri** di virus

In linea teorica, ogni **placca di lisi** è dovuta alla replicazione di una singola particella virale.

Il **titolo** delle unità infettive virali viene espresso come **unità formanti placche** (pfu/ml).

L'**unità infettiva virale** rappresenta la più piccola unità in grado di causare un effetto rilevabile quando viene in contatto con un ospite sensibile.

Per la coltivazione dei virus animali è possibile utilizzare colture di cellule animali



M.T. Madigan, J.M. Martinko

Brock, *Biologia dei Microrganismi*

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

Quando la conta delle particelle virali effettuata al microscopio elettronico non corrisponde al numero delle placche si parla di bassa **efficienza di piastramento**:

- *Virioni difettivi*
- *Virioni danneggiati*
- *Condizioni non idonee per avviare l'infezione*
- ...

I virus animali presentano una più bassa efficienza di piastramento (<1%) rispetto ai virus batterici (>50%)

Cicli vitali batteriofagi

A causa della presenza della parete cellulare nelle cellule ospiti, i virus batterici presentano un diverso modello di adsorbimento.

Modello di adsorbimento del fago T4 alla parete cellulare di *E. coli*

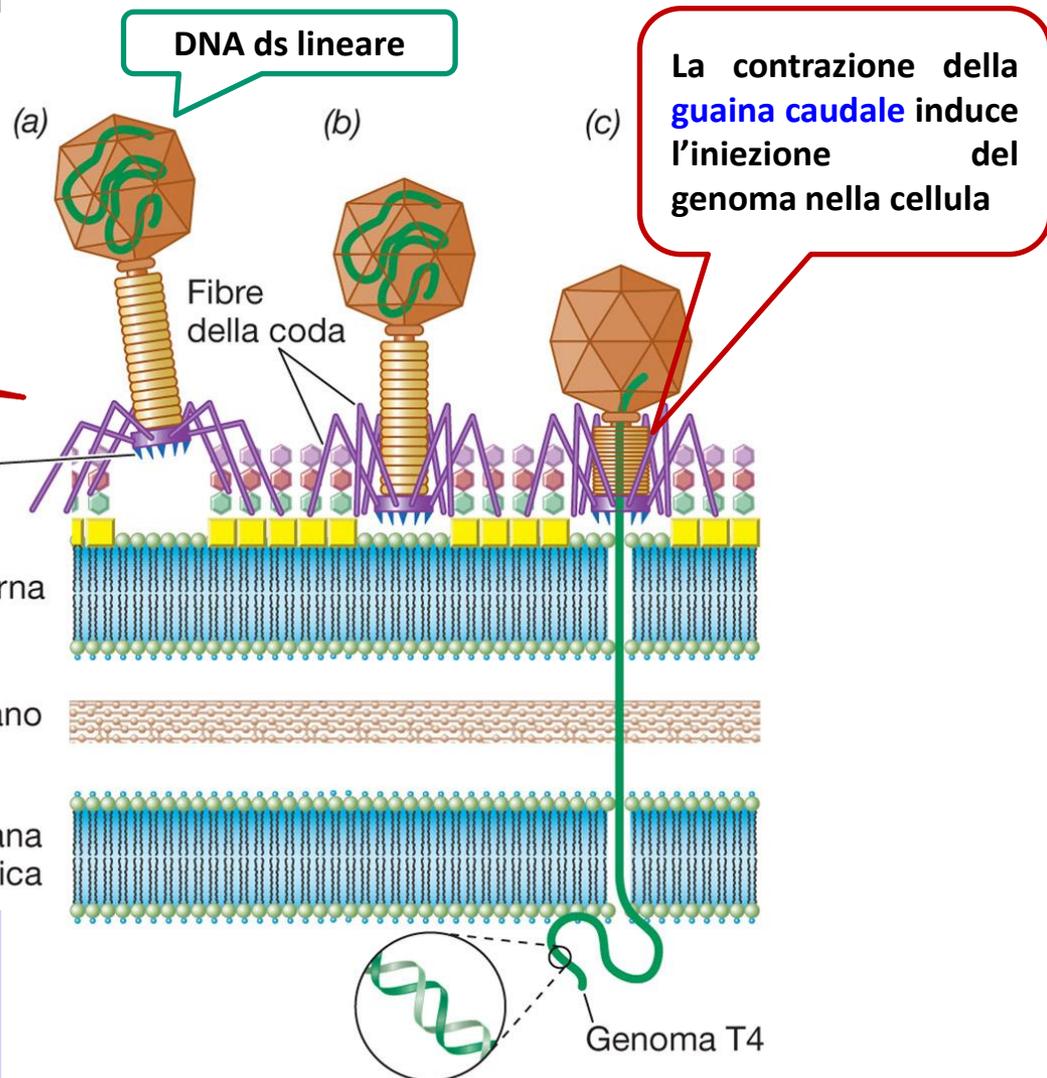
la parte terminale delle fibre caudali virali interagisce con i lipopolisaccaridi (recettori) della parete cellulare del batterio.

Esistono diversi sistemi di difesa per inattivare il materiale genico virale:

- *RNA interference* (eucarioti)
- *CRISPR* (procarioti)
- *Restrizione* (procarioti)

Nei procarioti in alcuni casi il DNA genomico a doppio filamento, iniettato all'interno della cellula, può essere distrutto dalle **endonucleasi di restrizione** cellulari (meccanismo di difesa).

M.T. Madigan, J.M. Martinko



Brock, *Biologia dei Microrganismi*

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

Il **fago T4** è uno dei batteriofagi più studiati.

Fago **virulento**



Testa icosaedrica

DNA ds lineare

Coda

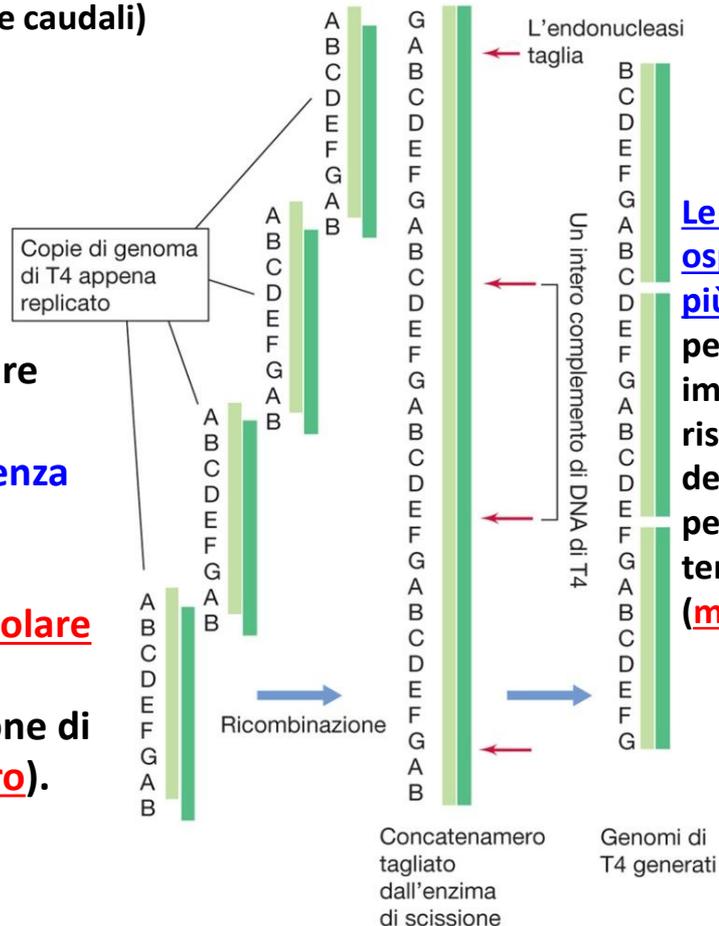
collo con collare
guaina

piastra basale (spine e fibre caudali)

Il genoma del T4 codifica per una propria **DNA polimerasi** e per altre proteine (elicasi, primasi, ...).

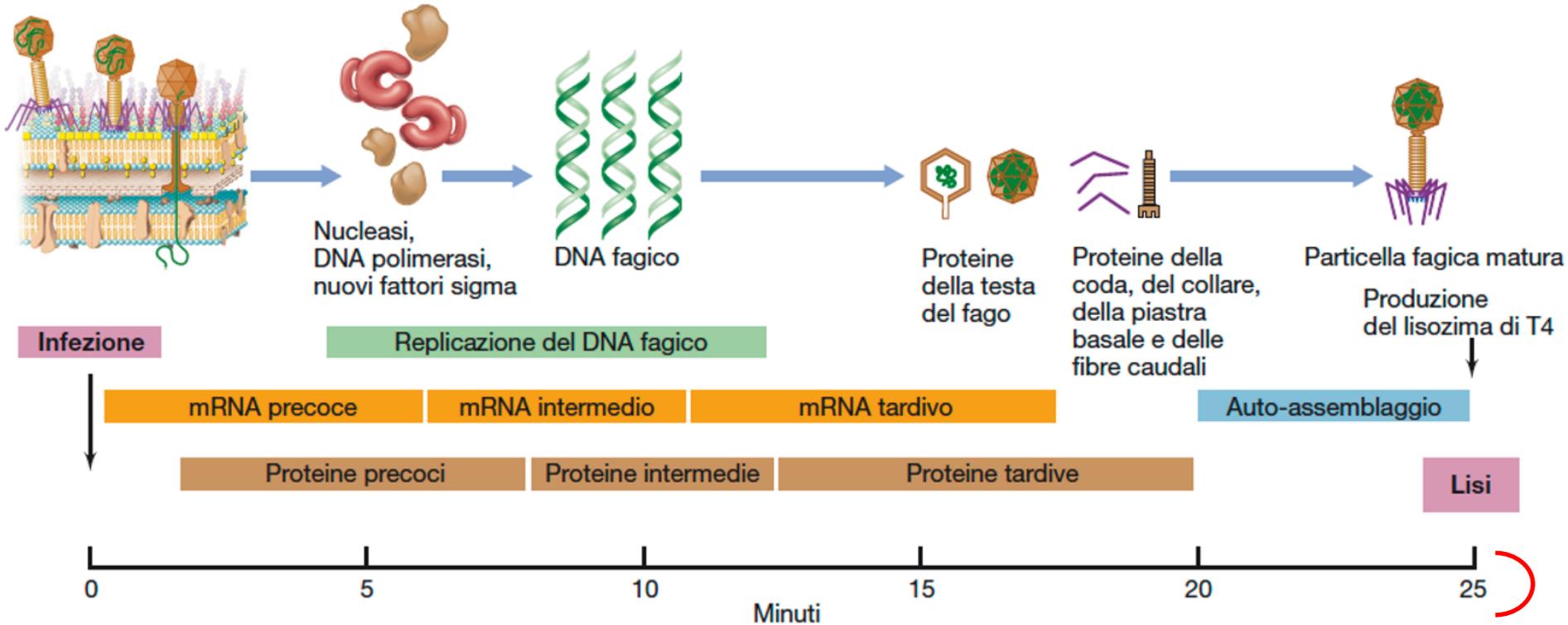
Pur riconoscendo una sequenza lineare unica, il genoma contenuto in alcuni virioni può essere diverso dalla **sequenza tipo** (unità genomica).

Conseguenza della **permutazione circolare** e della presenza di **sequenze ripetute terminali** che consentono la formazione di lunghe catene di DNA (**concatenamero**).



Le teste del virus possono ospitare molecole leggermente più lunghe della sequenza tipo, per cui possono essere impacchettati DNA più lunghi rispetto al genoma tipo, determinando la comparsa di permutazioni circolari e terminazioni ridondanti (**meccanismo a testa piena**).

Fasi dell'infezione e replicazione del fago T4

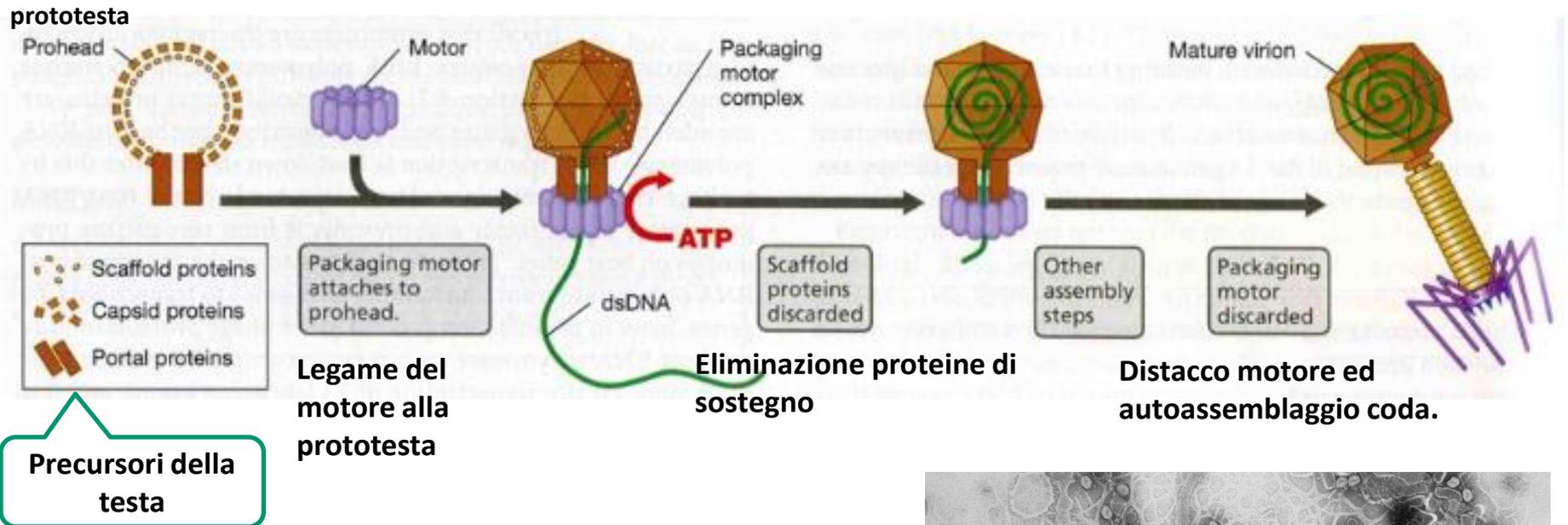


Proteine (enzimi) coinvolti nella trascrizione e replicazione del DNA fagico. Sintesi della **5-idrossimetilcitosina** (sostituisce la **timina**) e successiva **glicosilazione**, che conferisce protezione dalla restrizione batterica).

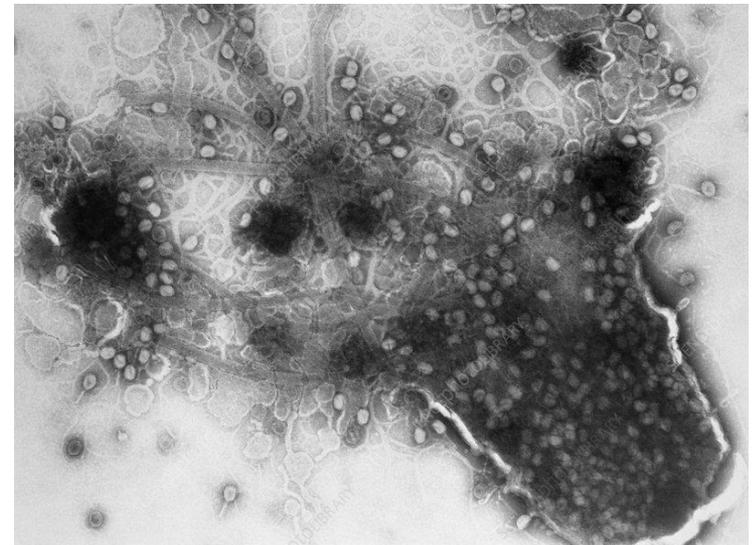
Proteine della testa e della coda ed enzimi necessari per la fuoriuscita dei fagi maturi (T4 → **lisozima**).

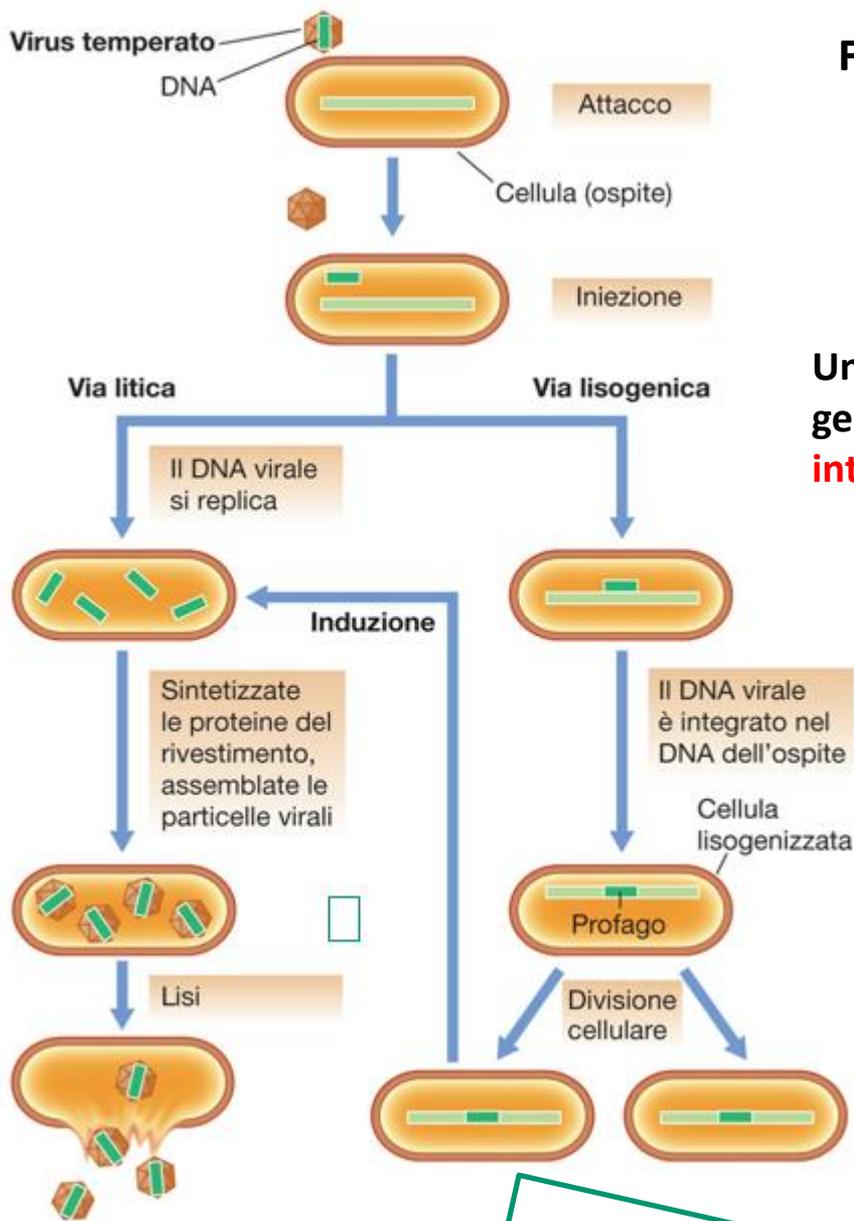
Non utilizzando una propria RNA polimerasi, T4 sintetizza anche **proteine che modificano le RNA polimerasi dell'ospite** in modo che sia più efficiente nel riconoscimento dei promotori virali.

Impacchettamento (*packaging*) del fago T4



Lisi cellula e liberazione di
~100 virioni T4





Fasi dell'infezione di un **virus** o **fago temperato**

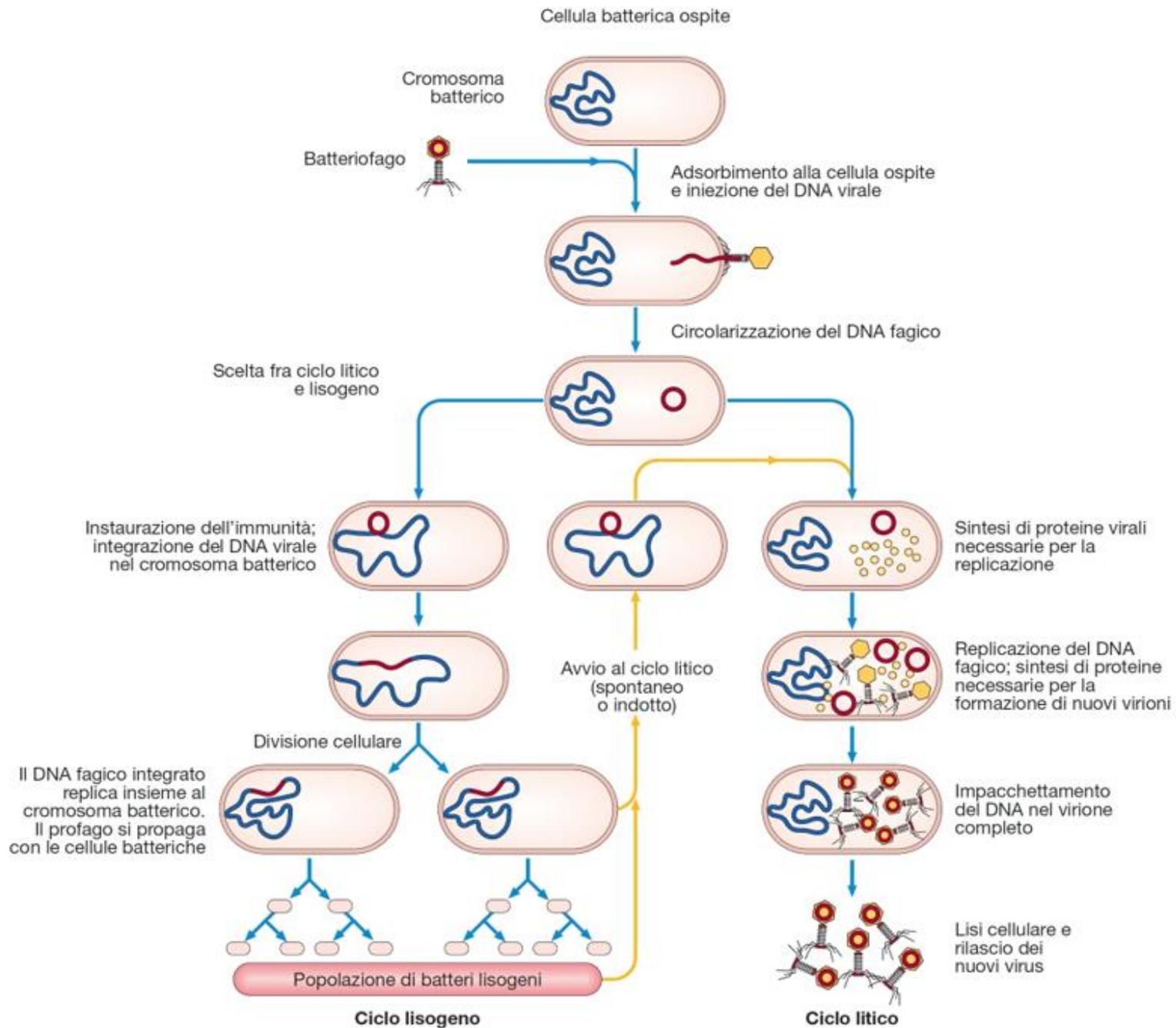
Una volta penetrato nella cellula ospite, il genoma **non esprime i geni fagici**, ma **si integra (profago)** nel cromosoma dell'ospite.

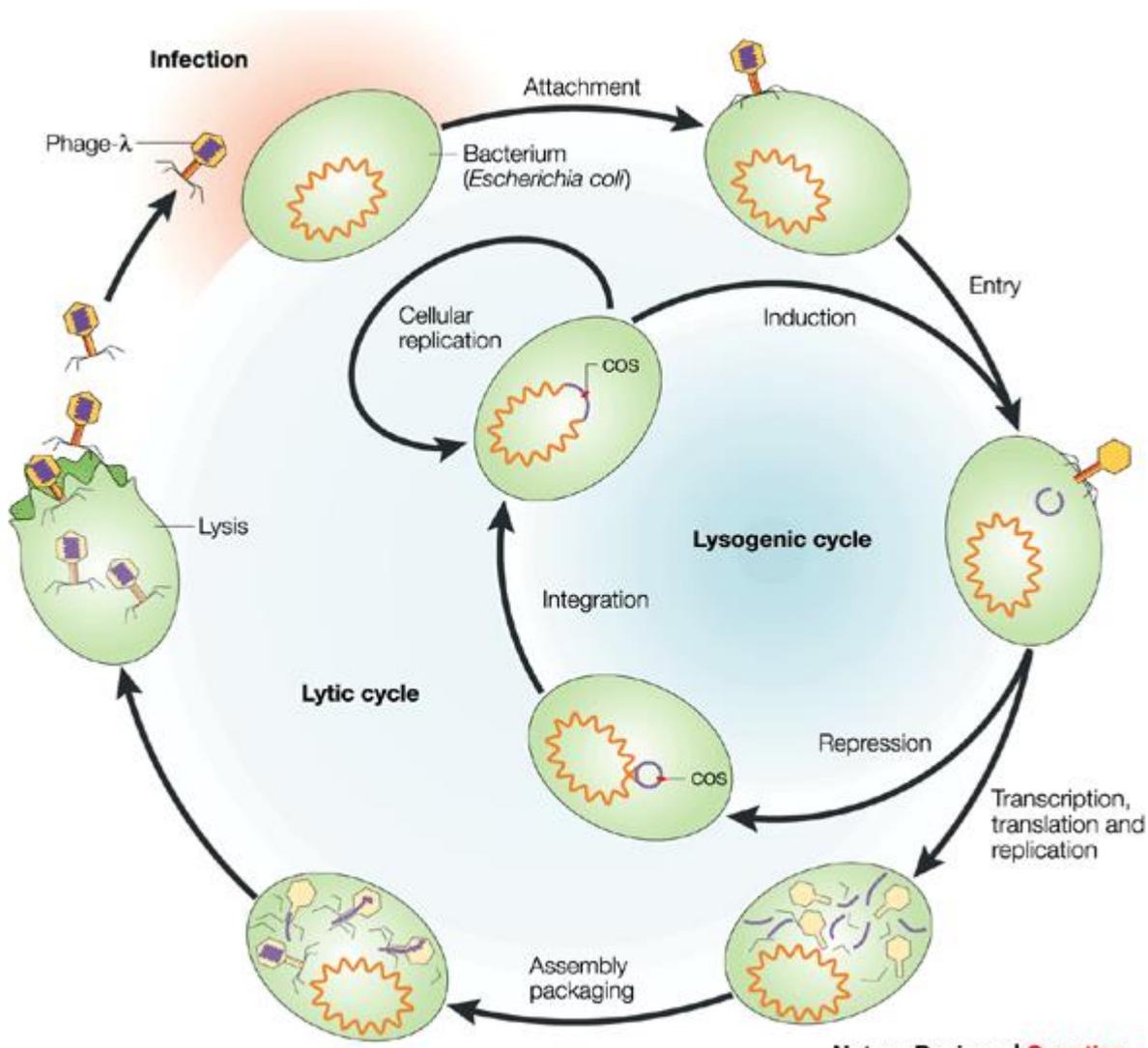
Lo **stato lisogenico** è mantenuto da una proteina (**repressore dei processi litici**) codificata dal virus.

Il genoma fagico si replica in sincronia con il cromosoma dell'ospite e resta integrato anche nelle cromosoma delle cellule figlie.

In seguito a stimoli ambientali, quando viene a mancare il controllo del ciclo lisogenico, si attiva l'espressione dei geni virali ed il virus entra nel ciclo litico.

La maggior parte dei batteri è lisogena per uno o più batteriofagi, questo lascia supporre che il processo rivesta una certa **importanza ecologica**.





Nature Reviews | **Genetics**

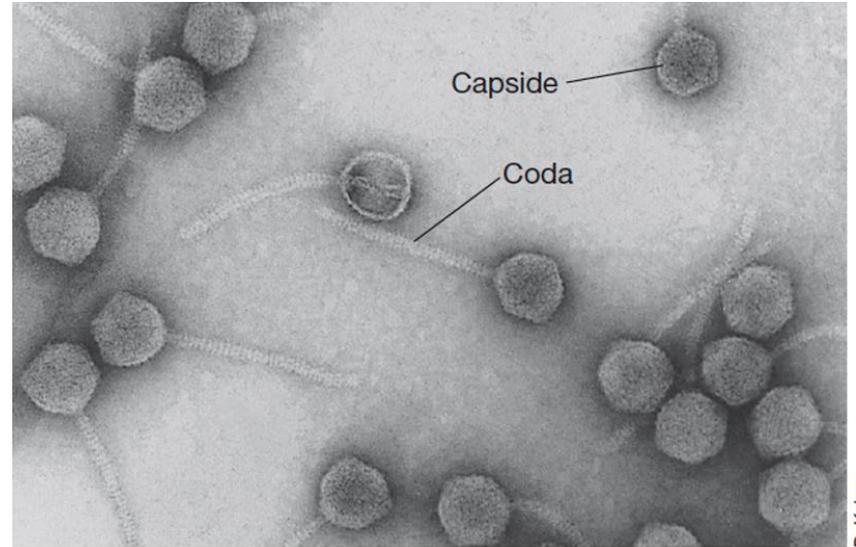
Campbell, A. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet* 4, 471–477 (2003)

Batteriofago lambda (λ)

uno dei fagi temperati più studiati.

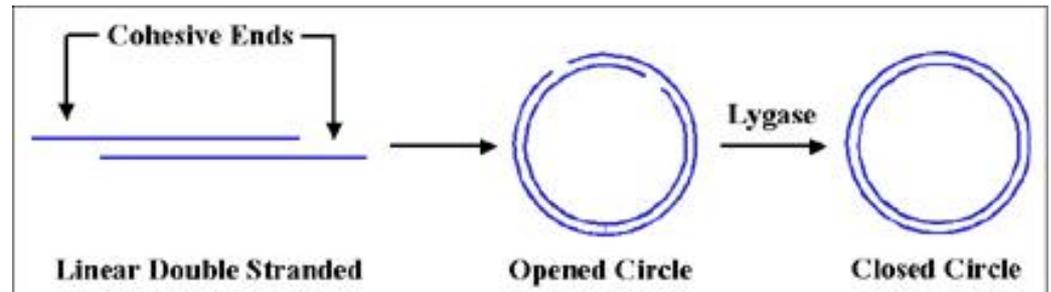


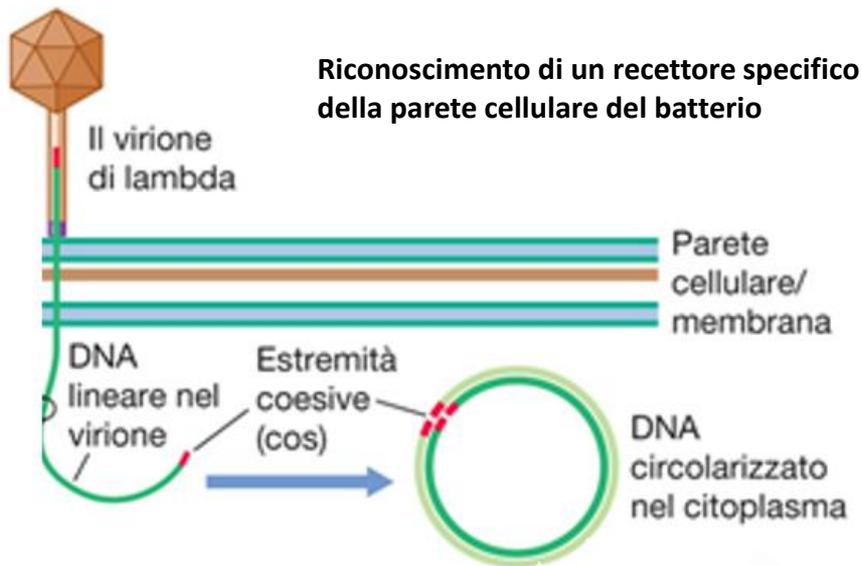
infetta *E. coli*.



Brook, Biologia dei microrganismi – 1 Microbiologia generale - Perason

- Assenza di fibre caudali.
- DNA ds lineare.
- Presenza alle estremità 5' del DNA di una coda di 12 nucleotidi a singolo filamento.
- Quando le sequenze terminali sono **coesive** (complementari), all'interno della cellula ospite, esse si associano fino a formare un DNA a forma circolare.



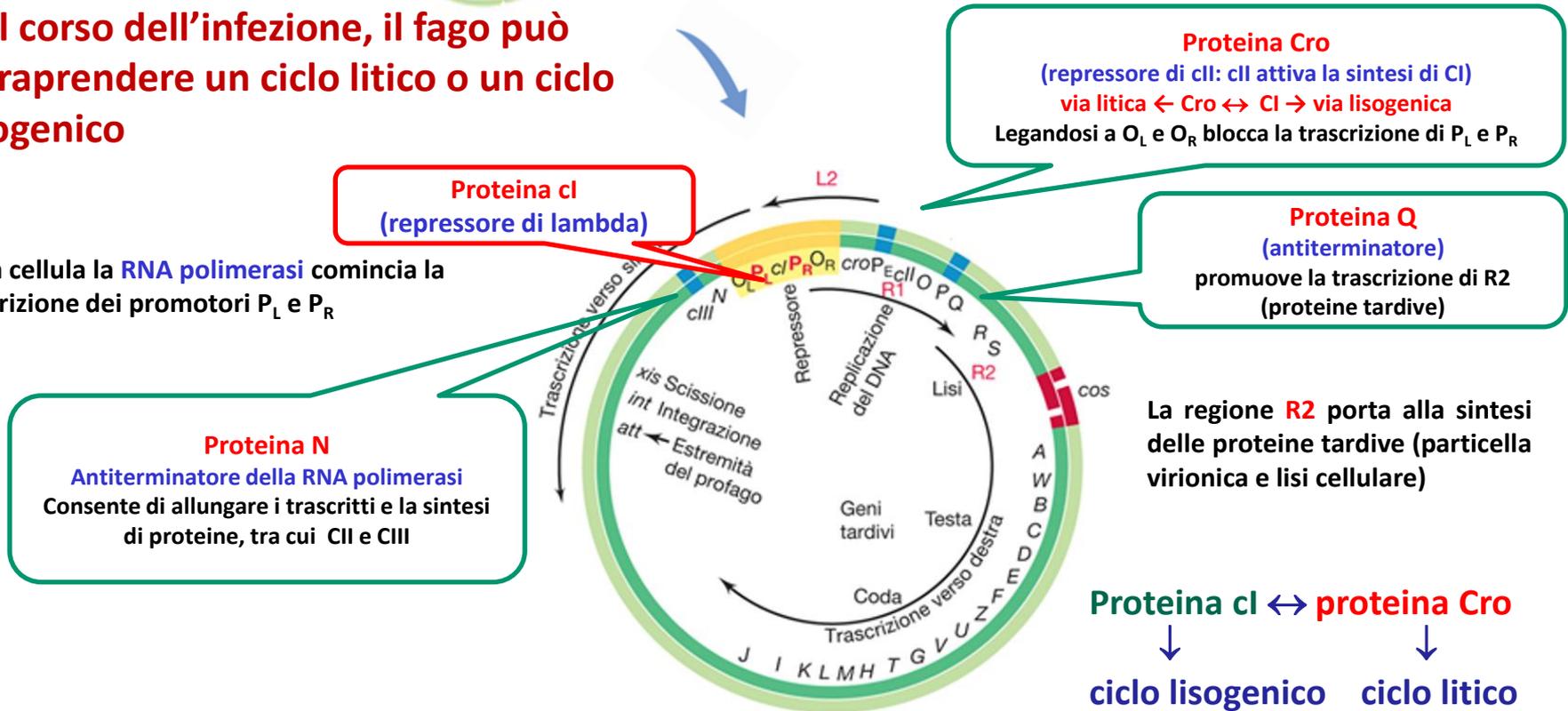


Ciclo infettivo fago lambda

Per la presenza di code coesive a singola elica (12 nucleotidi) si ha conversione del genoma fagico dalla **forma lineare** alla **forma circolare**

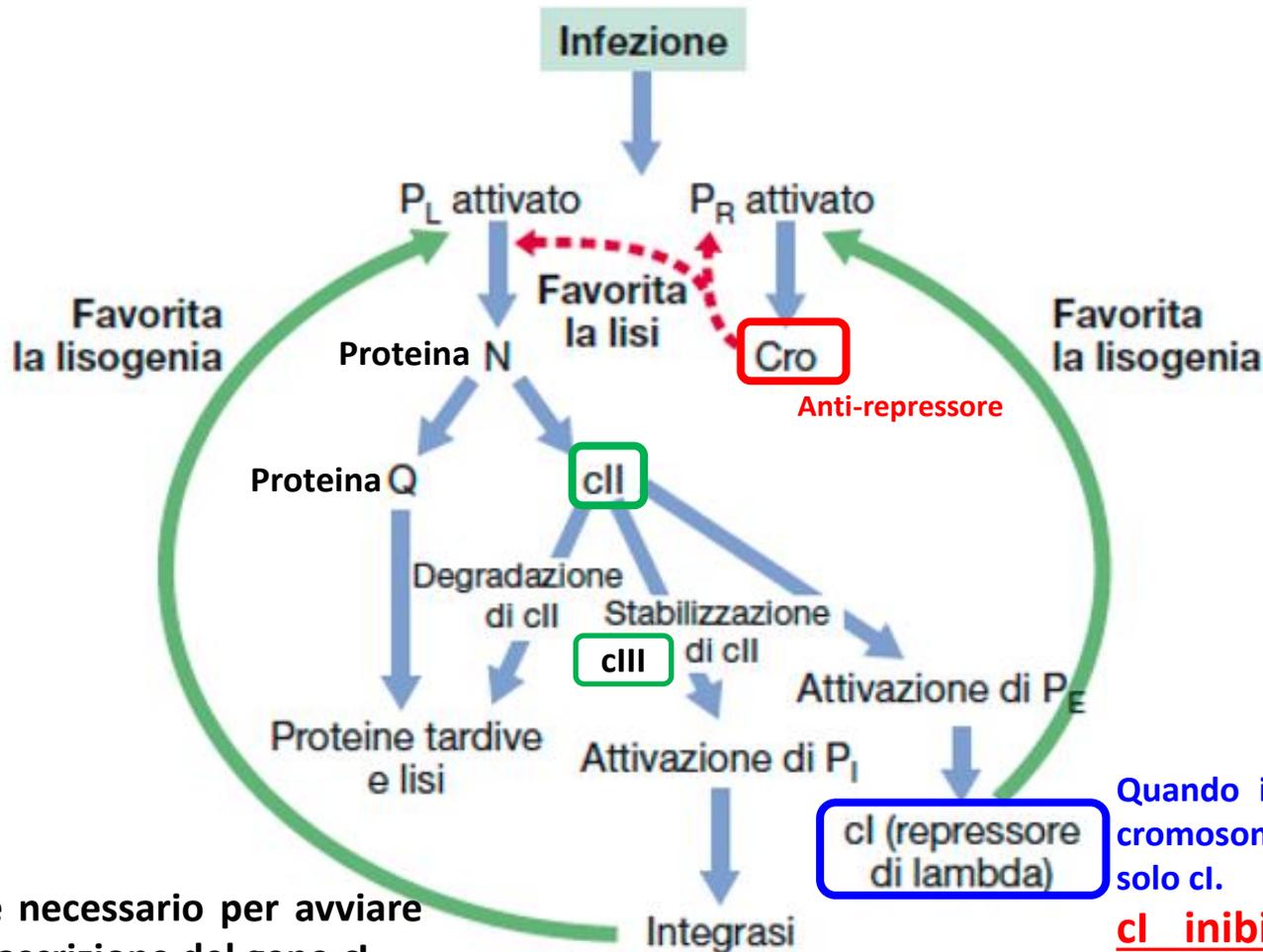
Nel corso dell'infezione, il fago può intraprendere un ciclo litico o un ciclo lisogenico

Nella cellula la **RNA polimerasi** comincia la trascrizione dei promotori P_L e P_R



Dopo l'infezione

- se prevale la sintesi di **cl** si instaura un ciclo lisogeno;
- se prevale **Cro** viene avviato un ciclo litico.



cII è necessario per avviare la trascrizione del gene **cl**.
L'attività di **cII** è sensibile ai fattori ambientali.

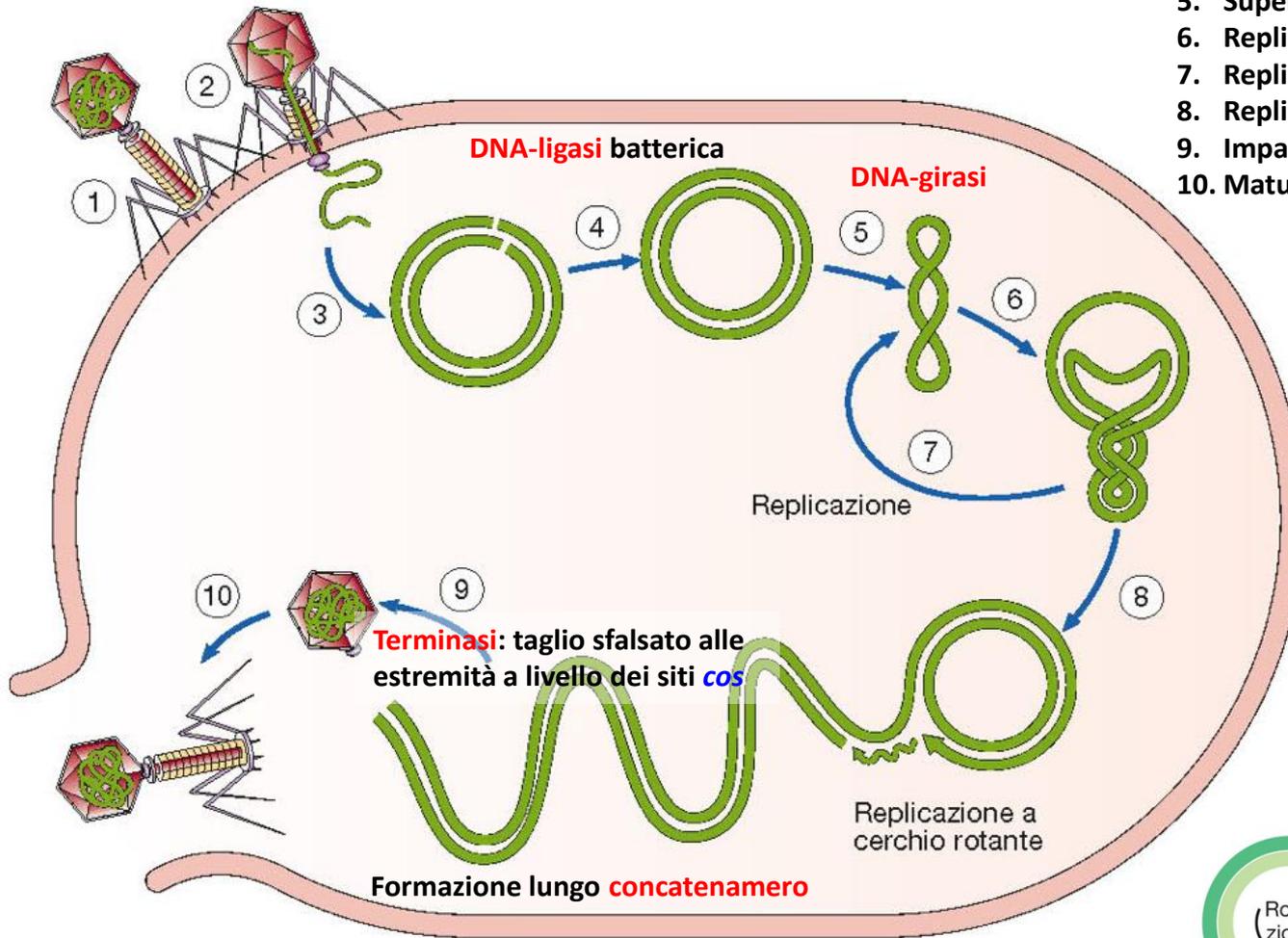
↑
cIII stabilizza **cII**.

Quando il profago λ è integrato nel cromosoma batterico, viene prodotto solo **cl**.

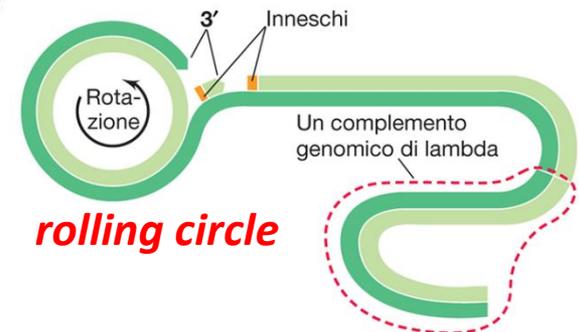
cl inibisce l'espressione dei geni litici.

Ciclo replicativo ed impacchettamento del fago λ

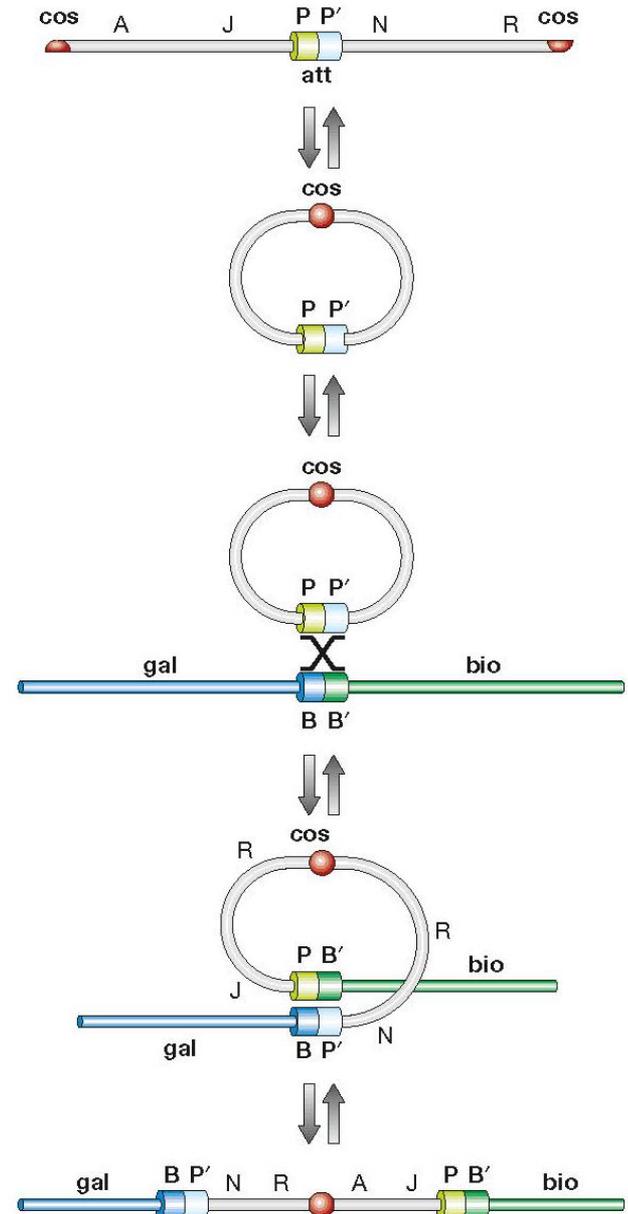
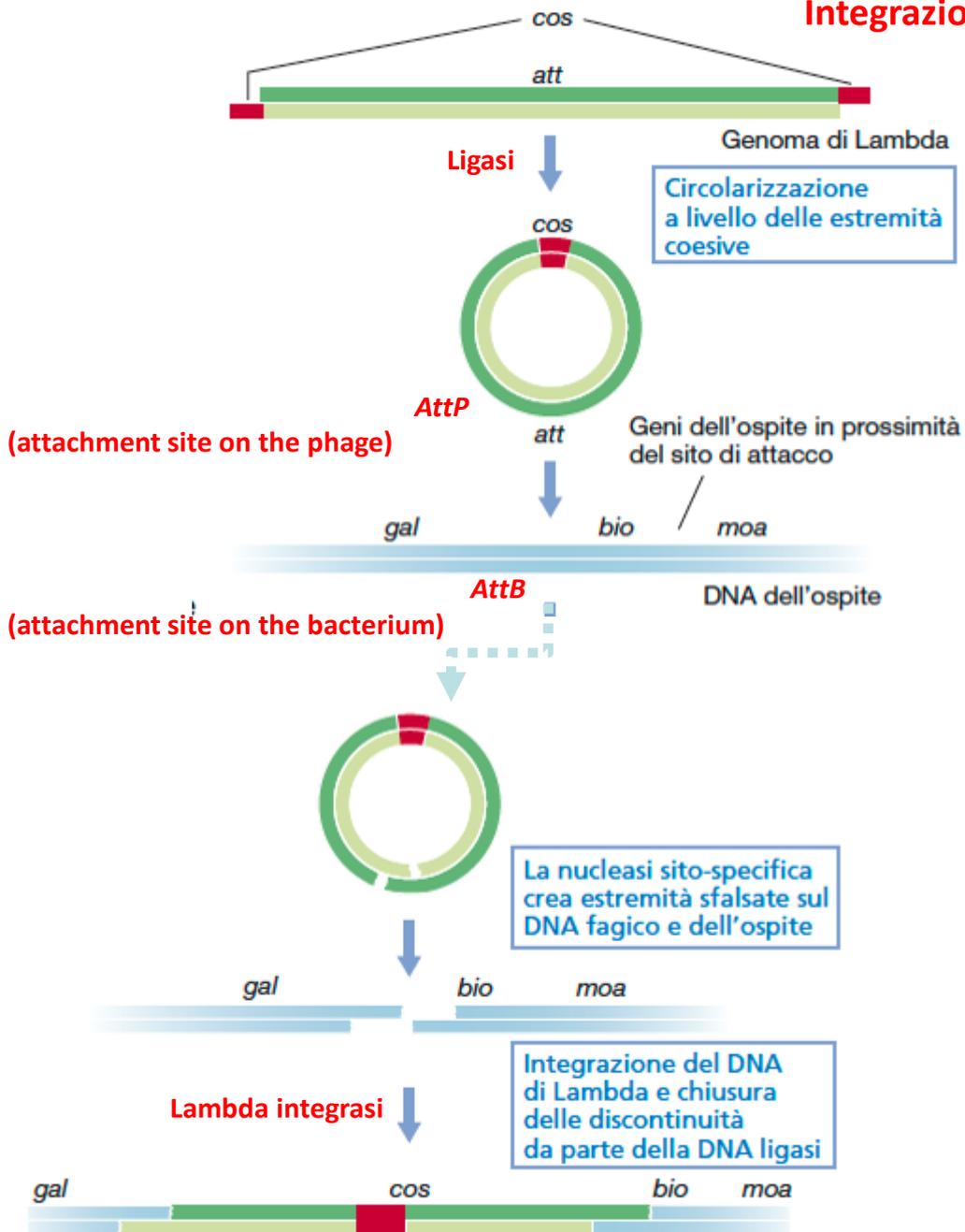
Il fago λ non presenta spine e fibre caudali



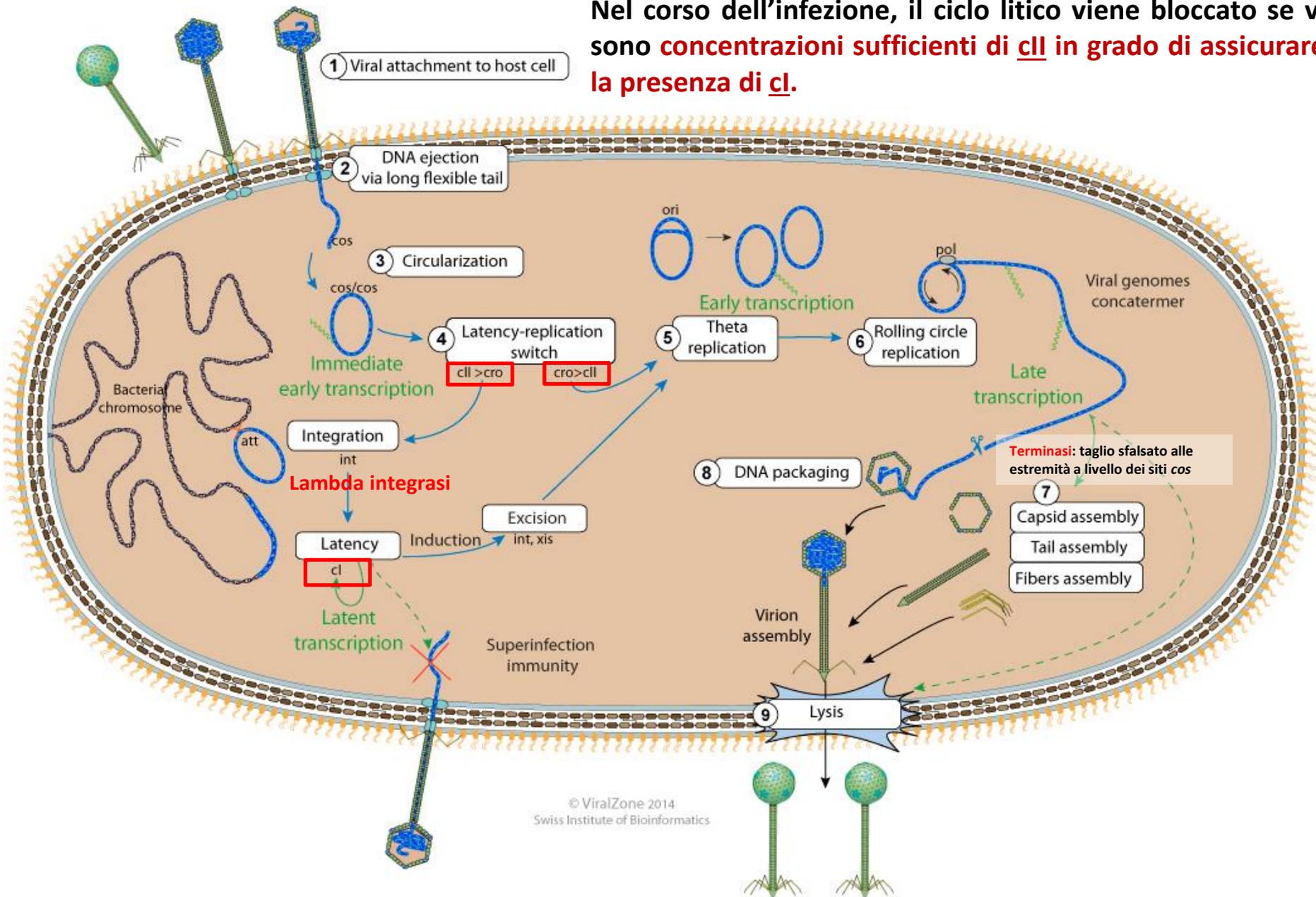
1. Adsorbimento
2. Iniezione DNA ds lineare
3. Circularizzazione
4. Ligazione
5. Superavvolgimento
6. Replicazione Θ
7. Replicazione Θ
8. Replicazione β (cerchio rotante)
9. Impacchettamento
10. Maturazione virione e lisi cellulare



Integrazione del DNA del fago λ



Nel corso dell'infezione, il ciclo litico viene bloccato se vi sono **concentrazioni sufficienti di cll** in grado di assicurare la presenza di **cl**.



Diversità virus batterici

MS2

ssRNA lineare (+),
per la duplicazione necessita di **RNA replicasi**.

ΦX174 ed M13

ssDNA circolare (+),
per la duplicazione il DNA deve essere trasformato in forma replicabile a doppio filamento.

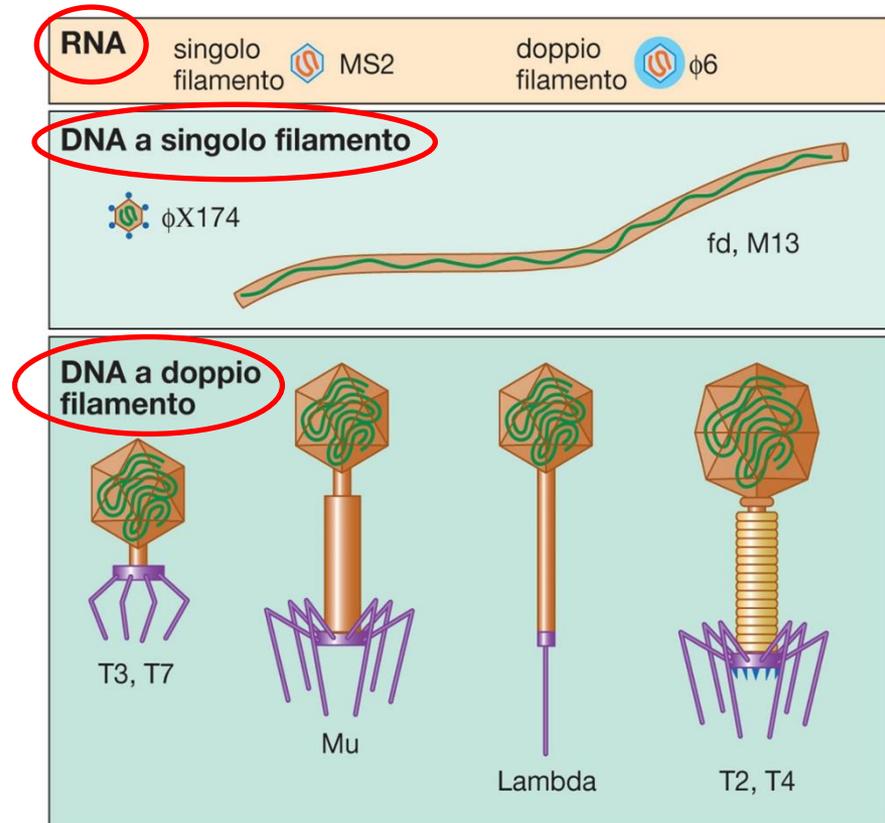
Virus (a DNA o RNA) di piccole dimensioni possono presentare **geni sovrapposti** (cornice di lettura aperto: *open reading frame*).

Batteriofagi con testa e coda

possono differenziarsi per diversa lunghezza della **coda**, presenza di **piastra terminale**, **fibre caudali**, **spine caudali**, **guaina**, **collare**, lunghezza del DNA, ...

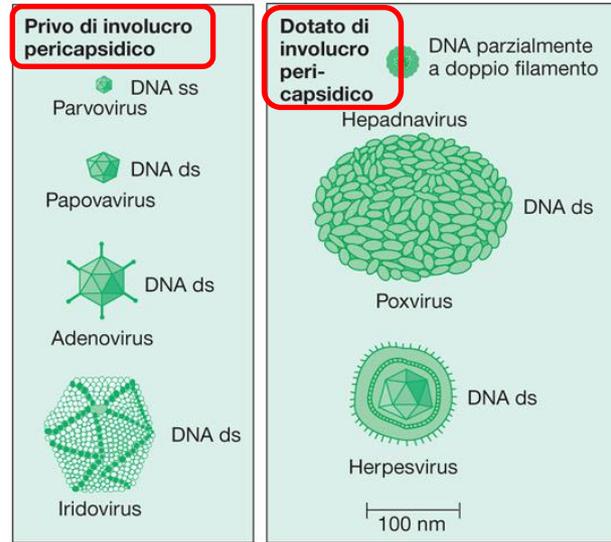
I **virus batterici (batteriofagi o fagi)** possono avere forme diverse.

Solitamente il genoma è a DNA ds, ma non mancano forme ad RNA ss, RNA ds, RNA ds segmentato e DNA ss.

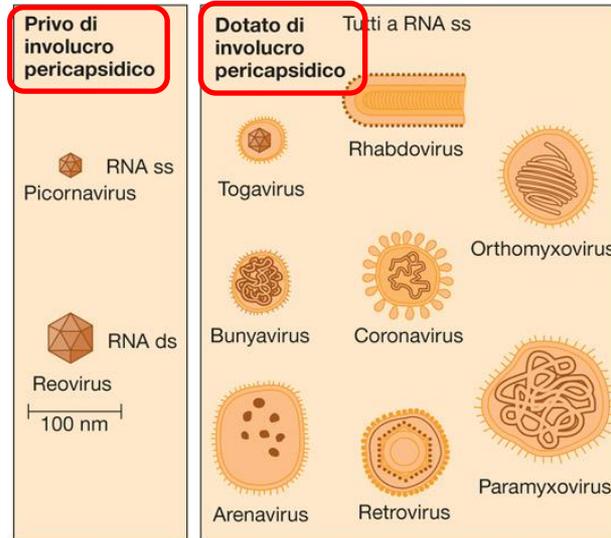


Le code contrattili dei batteriofagi Mu, T2 e T4 contribuiscono all'iniezione dell'acido nucleico virale nella cellula ospite.

Diversità virus animali



(a) Virus a DNA



(b) Virus a RNA

Diversità virus animali

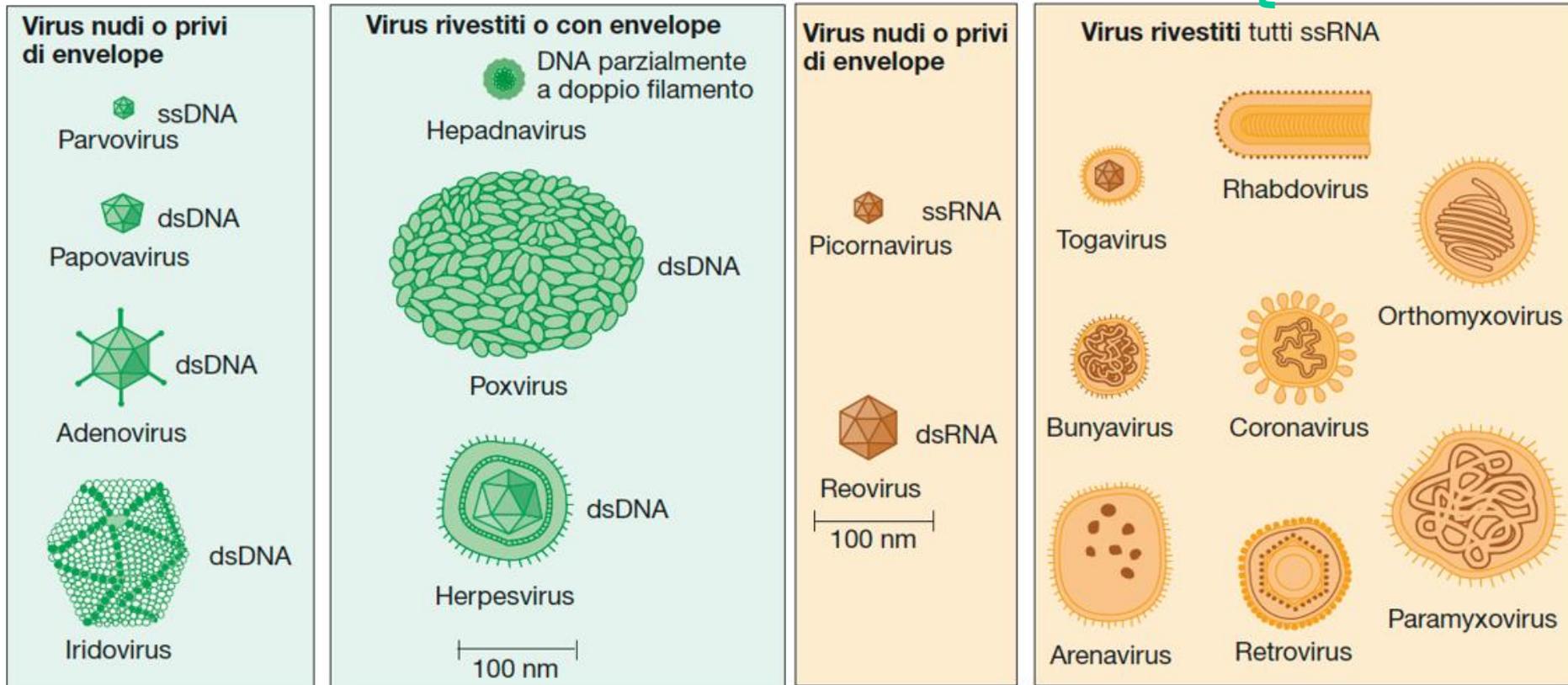
Alcune caratteristiche strutturali ed alcuni aspetti del processo replicativo sono comuni a tutti i virus (batterici, animali, vegetali).

Negli animali

- L'intero virione, di solito, penetra nella cellula ospite.
- Alcuni virus si replicano nel nucleo della cellula eucariotica.

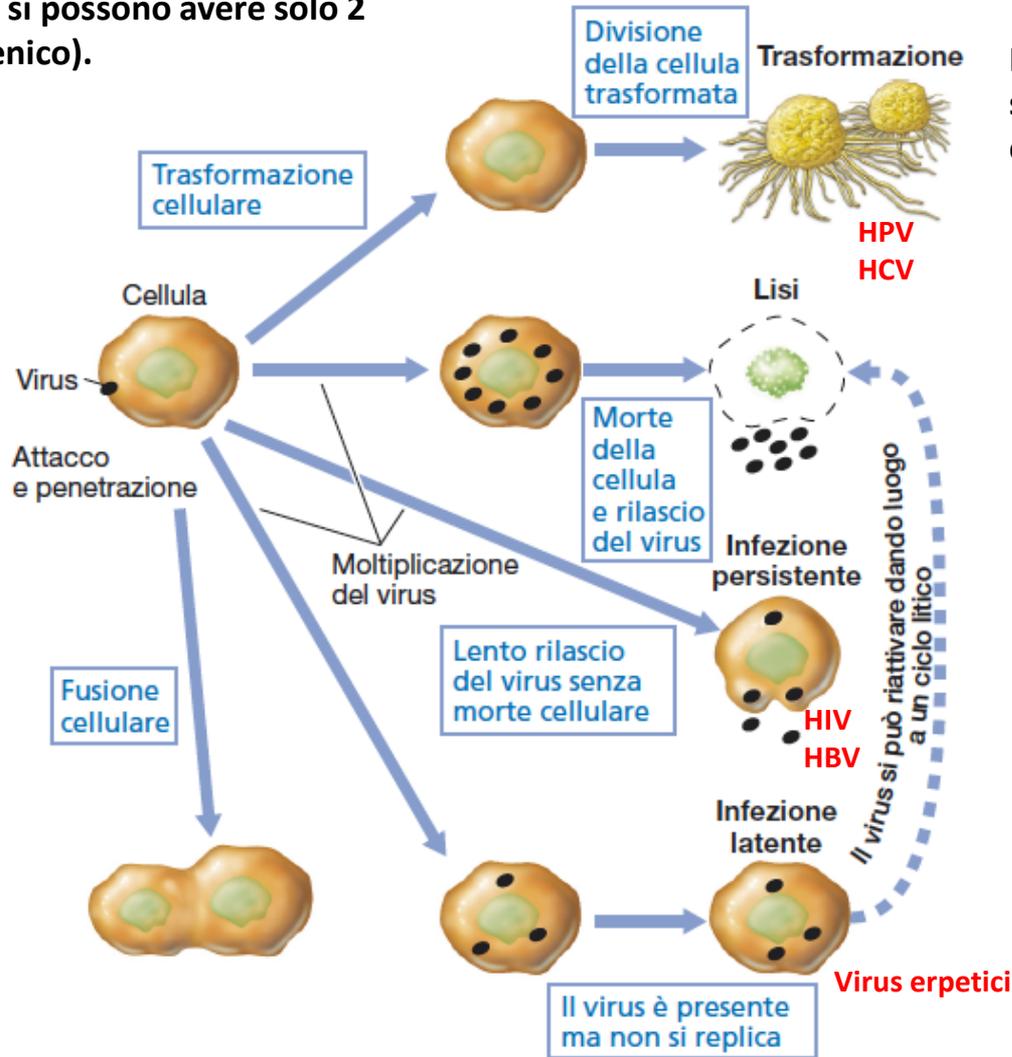
Diversità strutturali e genomiche

Simmetria
Dimensioni
Envelope
Genoma
...



Effetti dei virus sulle cellule animali

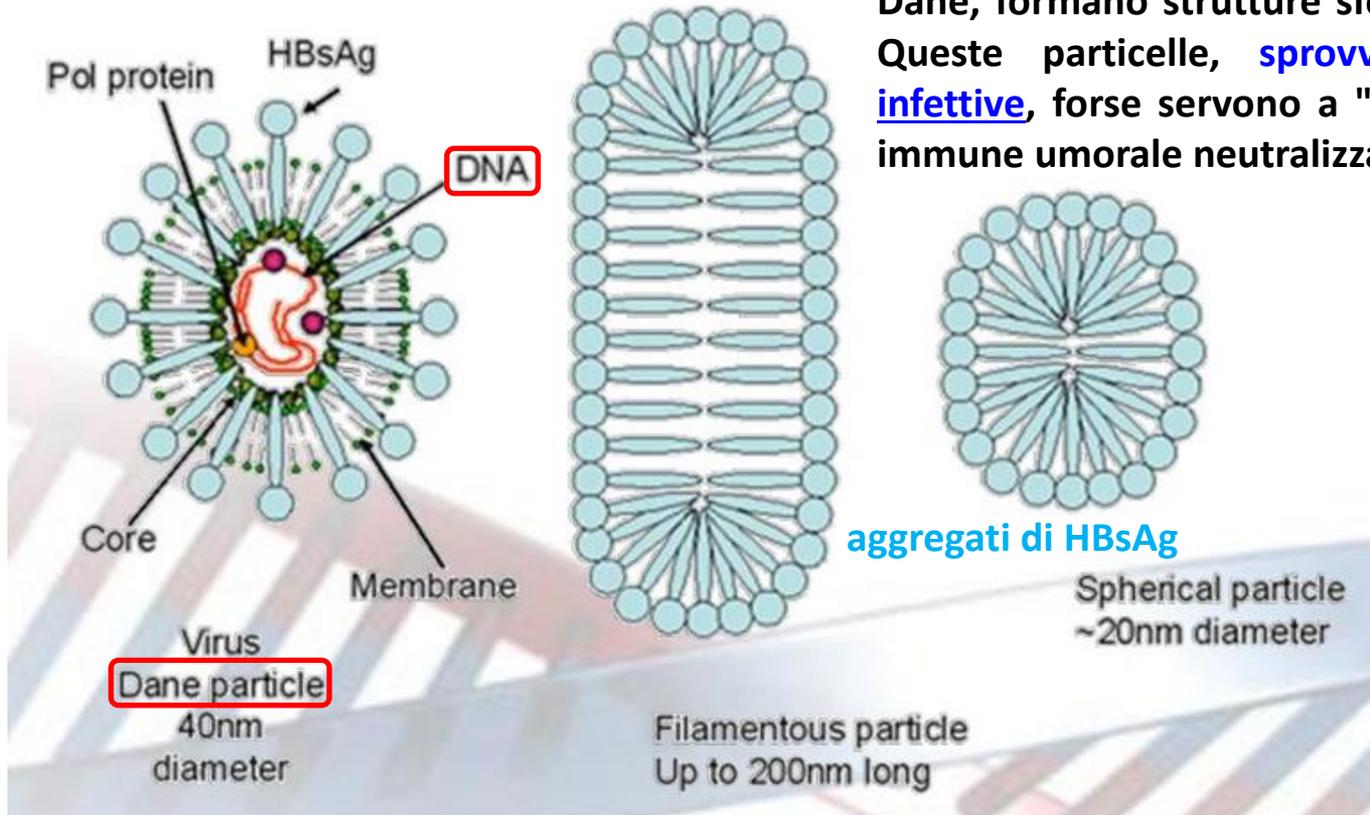
Nei virus batterici si possono avere solo 2 cicli (litico e lisogenico).



Il virus può interferire con i sistemi di regolazione delle cellule ospiti

Figura 9.22 Possibili effetti dei virus animali sulle cellule infettate. La maggior parte dei virus animali è litica e soltanto pochi sono associati allo sviluppo del cancro.

Virus hepatitis (HBV)



Le proteine dell'involucro esterno, quando prodotte in eccesso rispetto alle particelle di Dane, formano strutture sferiche o filamentose. Queste particelle, **sprovviste di core**, **non infettive**, forse servono a "distrarre" la risposta immune umorale neutralizzante.

costituite da aggregati di molte particelle sferiche

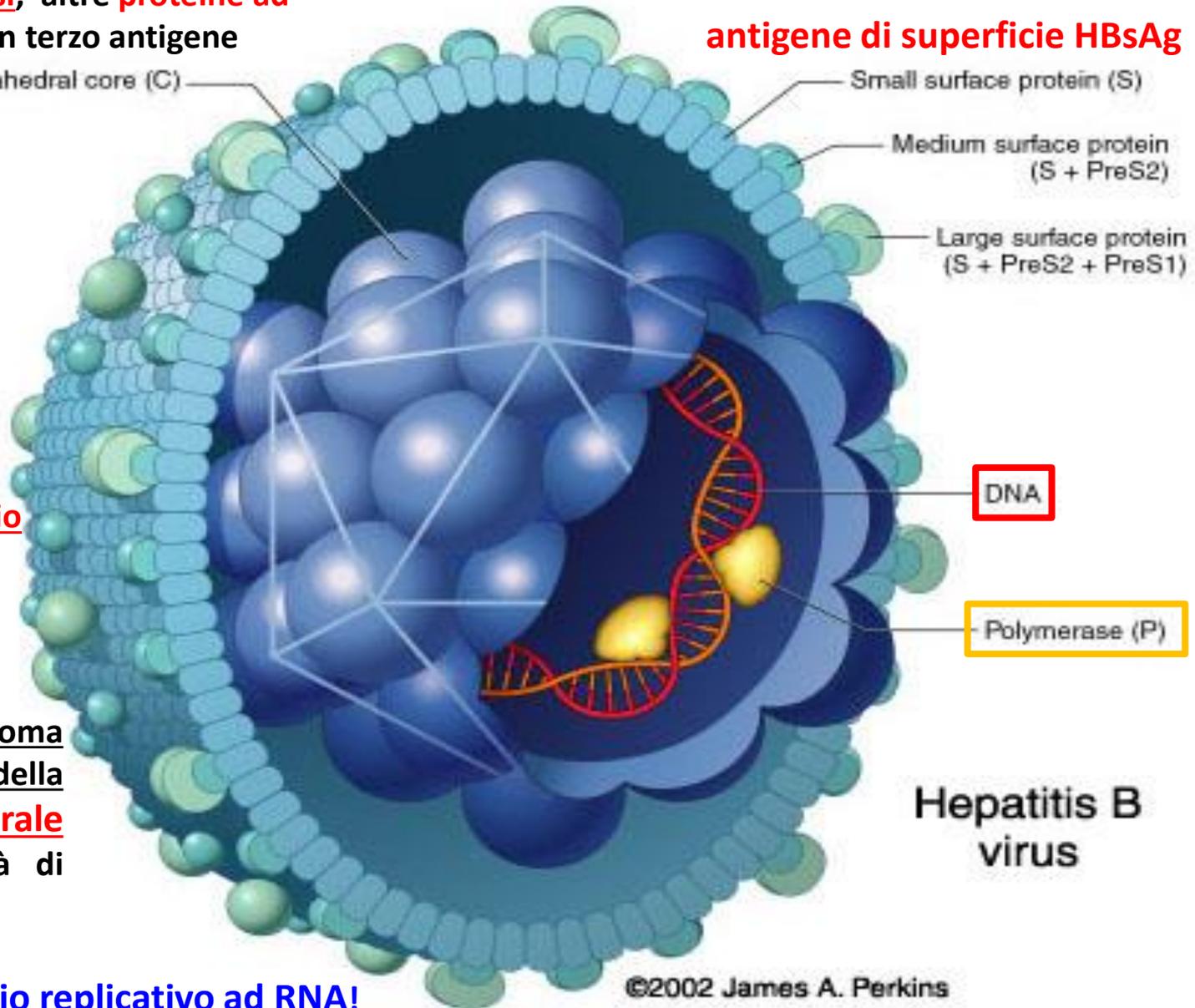
HBV (famiglia Hepadnavirus)

3 diverse forme: sferica, filamentosa, sferica (**particella di Dane**).

La particella di Dane è la forma meno comune, ma l'unica infettante!

Virus epatite B (gruppo VII di Baltimore)

Il core è costituito da HBcAg e contiene il **DNA**,
l'enzima **DNA polimerasi**, altre **proteine ad
attività enzimatica** ed un terzo antigene
chiamato **HBeAg**



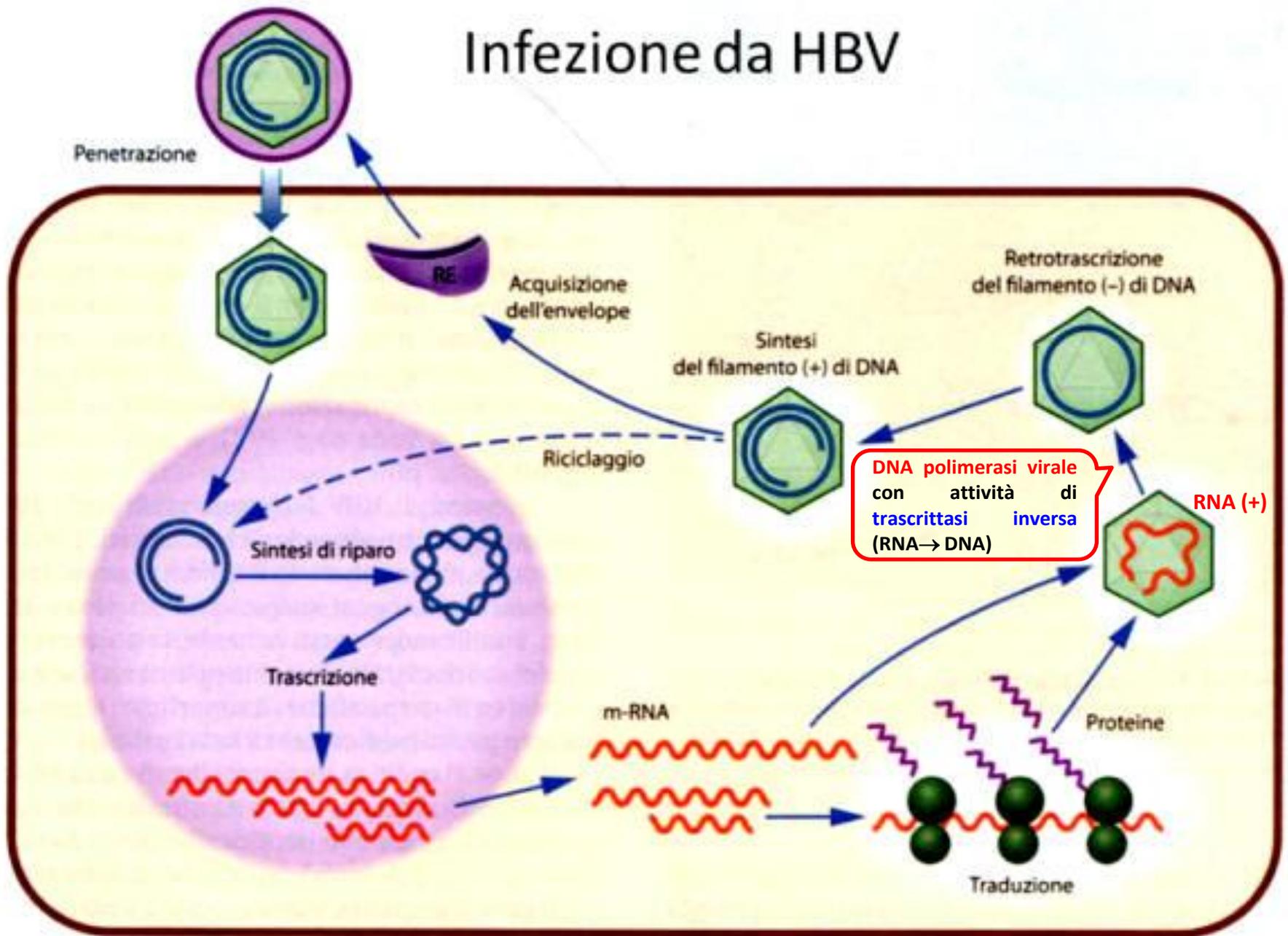
Il genoma è a
**DNA circolare
parzialmente bicatenario**

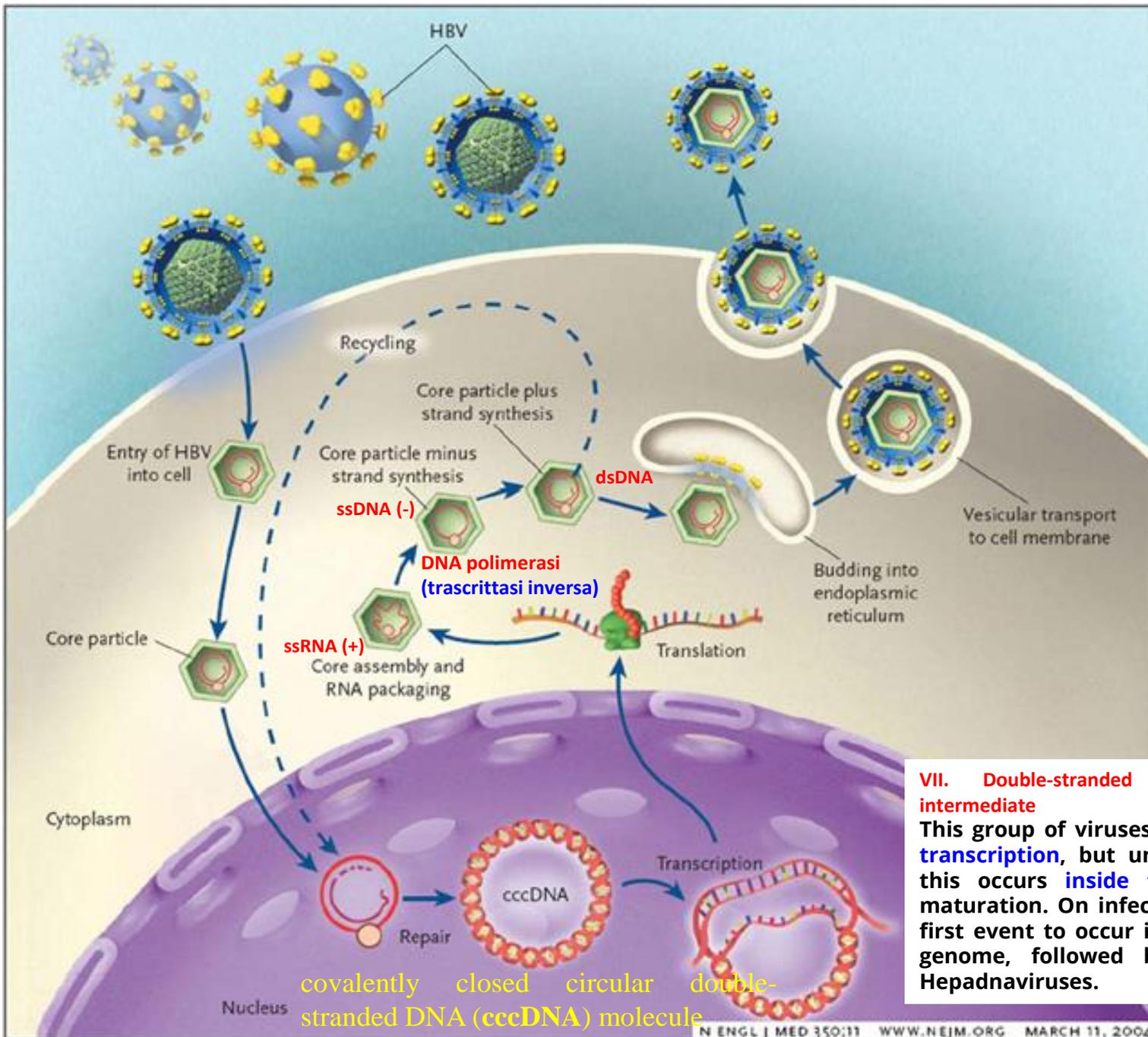
La replicazione del genoma
avviene ad opera della
DNA polimerasi virale
che ha anche attività di
trascrittasi inversa



utilizza un **intermedio replicativo ad RNA!**

Infezione da HBV



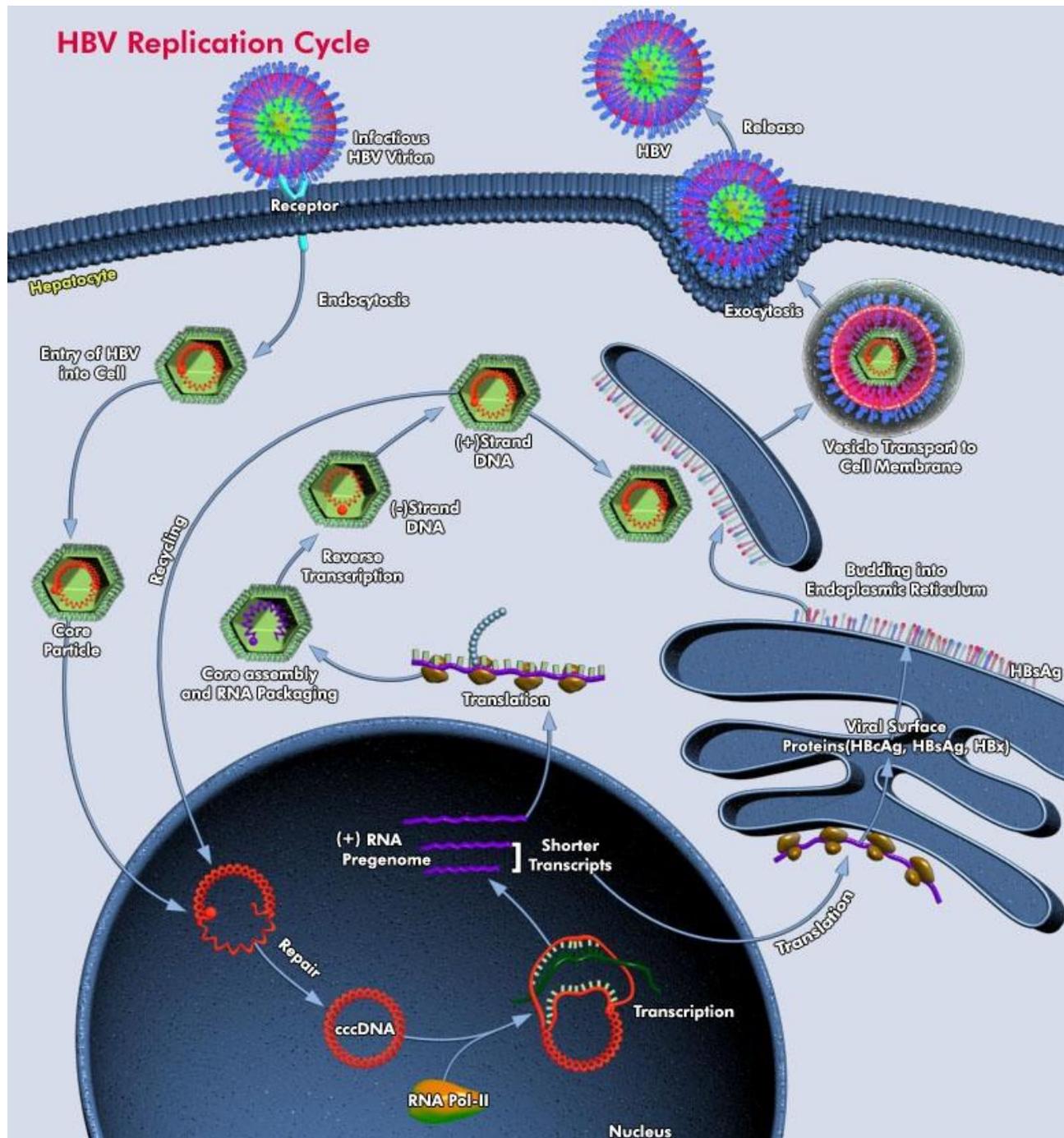


VII. Double-stranded DNA viruses with RNA intermediate

This group of viruses also relies on reverse transcription, but unlike the Retroviruses, this occurs inside the virus particle on maturation. On infection of a new cell, the first event to occur is repair of the gapped genome, followed by transcription. e.g., Hepadnaviruses.

covalently closed circular double-stranded DNA (cccDNA) molecule

HBV Replication Cycle



RETROVIRUS (ssRNA)

HIV (Human Immunodeficiency Virus)

RSV (Respiratory Syncytial Virus)

I retrovirus sono virus rivestiti

Patologie

- Tumori
- AIDS
- ...

2 molecole identiche (+) RNA

diploidi

Enzimi
(trascrittasi
inversa,
integrasi,
proteasi)

Doppio
strato
lipidico
di membrana

Proteina
core del
capside

Proteina core

Proteina di superficie dell'envelope

Proteina
transmembrana
dell'envelope

(a)

All'interno del virione (core) sono presenti:

• tRNA (specifico del ceppo di virus)

• 7 proteine

4 funzioni strutturali

3 funzioni enzimatiche

• **trascrittasi inversa,**

• **integrasi,**

• **proteasi retrovirale-specifica**

Mappa genetica di

un retrovirus



(b)

Proteine strutturali interne

gag

pol

env

Proteine envelope

Ripetizioni dirette

(necessarie per la replicazione)

Replicazione dei retrovirus

Legame con i recettori della cellula ospite, fusione con la membrana citoplasmatica e perdita dell'envelope

Long Terminal Repeats

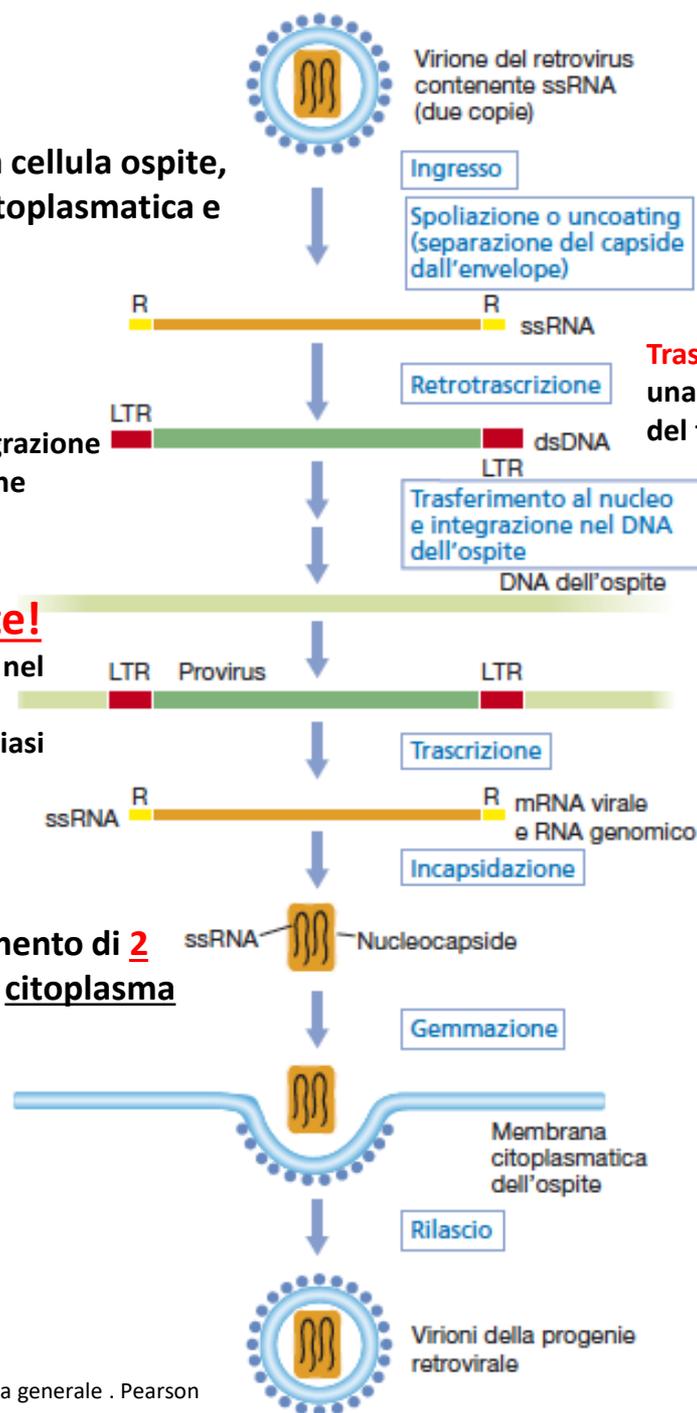
- Partecipano al processo di integrazione
- Promotori forti per la trascrizione

Integrazione permanente!

del dsDNA retrovirale (**provirus**) nel cromosoma dell'ospite (**integrasi**).

L'integrazione può avvenire in qualsiasi punto del cromosoma.

Assemblaggio ed impacchettamento di 2 **ssRNA** in ogni nucleocapside nel citoplasma

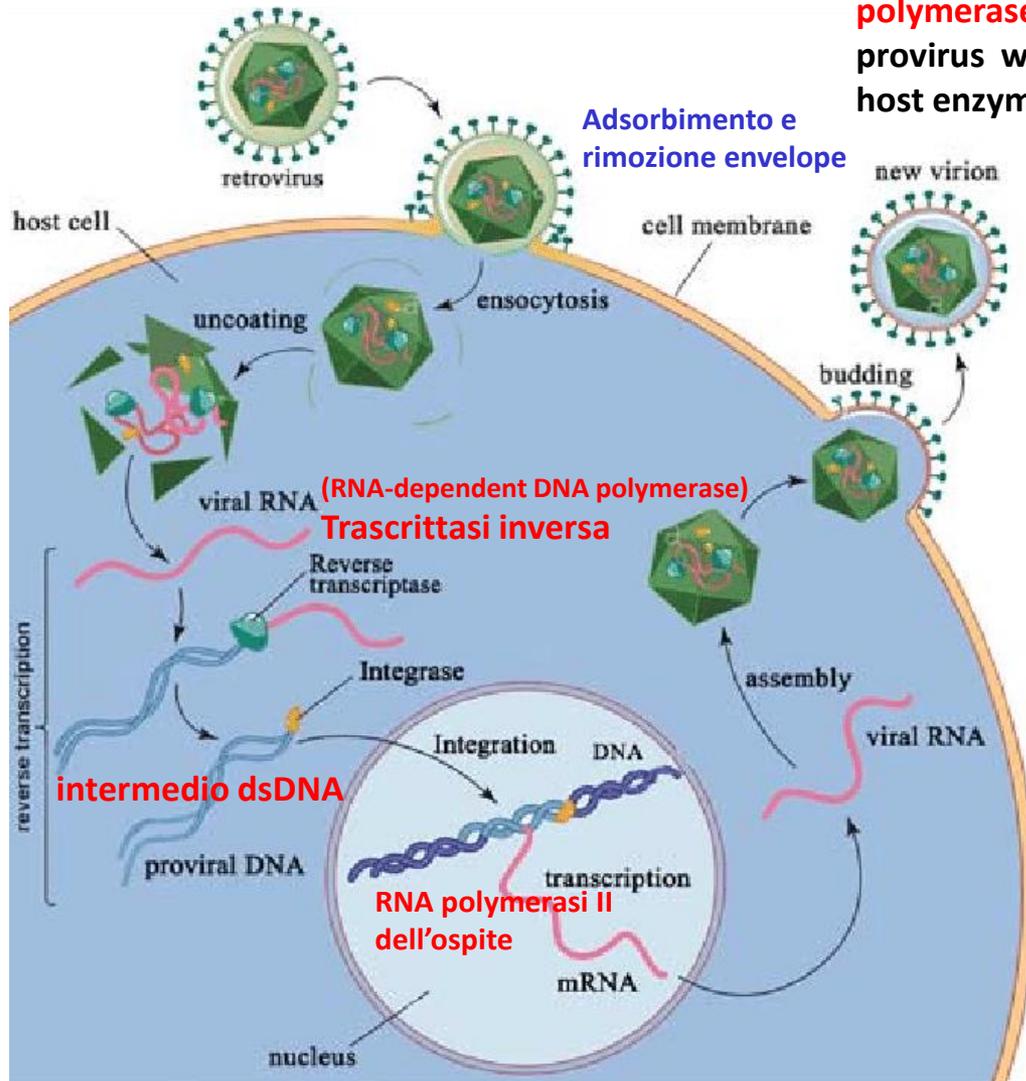


Trascrizione inversa, avviata da un **tRNA (innesco)**, di una delle molecole di **ssRNA** in **ssDNA** e poi sintesi del filamento complementare → **dsDNA**

Se il promotore della **LTR dx** viene attivato, la **polimerasi II cellulare** trascrive il provirus in **mRNA o RNA genomico** da impacchettare nelle particelle virali.

Replicazione retrovirus

2 ssRNA (+)



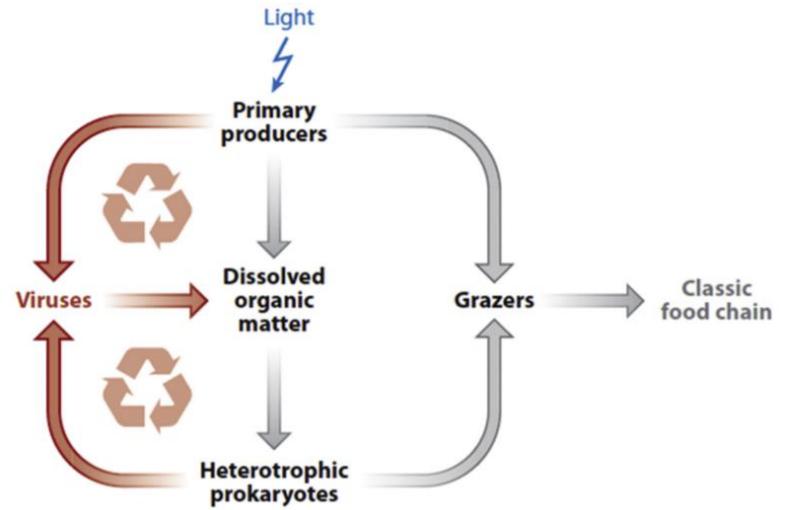
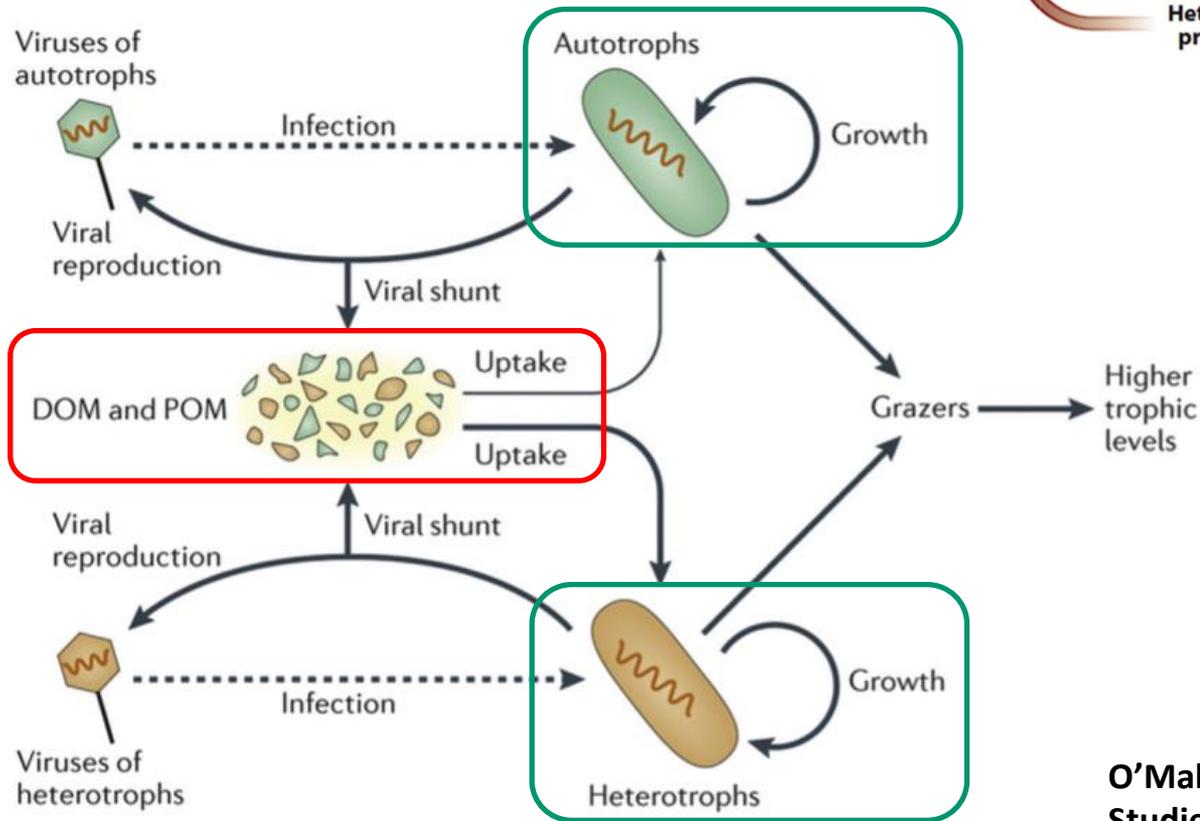
VI. Single-stranded (+) sense RNA viruses with DNA intermediate in life-cycle

RNA genome is (+) sense but unique among viruses in that it is **DIPLOID**, and does not serve as mRNA, but as a template for reverse transcription (e.g. Retroviruses).

Retroviruses therefore encodes an **RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase)** to make the DNA provirus which then is transcribed to genomic RNA by a host enzyme, RNA polymerase II.

Sono i soli virus a RNA con filamento a polarità positiva il cui genoma non serve direttamente come mRNA subito dopo l'infezione.

Ecologia virale



O'Malley (2016). **The ecological virus.** *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 59:71-79

Entità subvirali

Viroidi Prioni

Viroidi

Molecole di **RNA circolare a singola elica** (246-399 nucleotidi) prive proteine del capside.

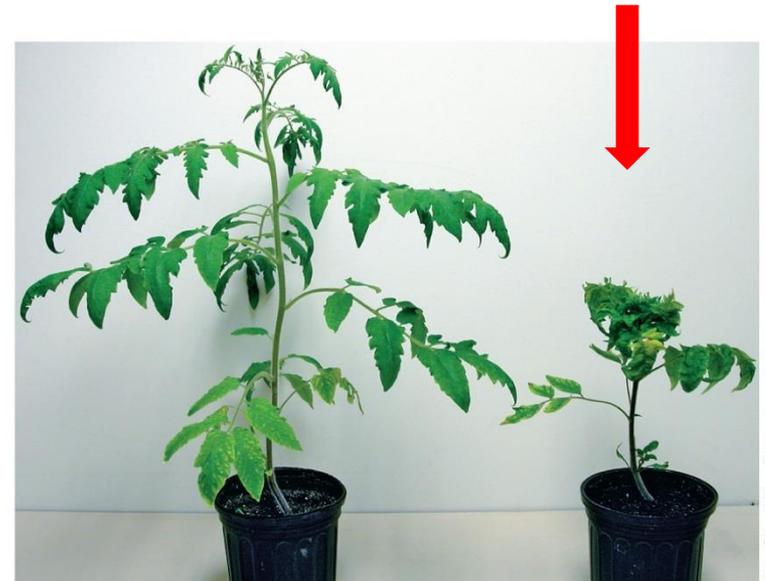
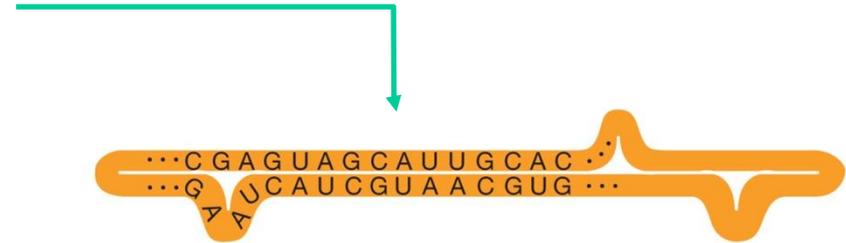
Sono causa di malattie in alcune piante (agrumi, patate, pomodori, ...).

La forma extracellulare è rappresentata da una **molecola di RNA nuda**.

Il viroide penetra nella cellula e si replica nel nucleo della cellula ospite mediante una **RNA polimerasi (con attività di RNA replicasi)** della pianta.

L'RNA che costituisce il viroide non contiene geni che codificano proteine.

Potrebbe trattarsi di RNA regolatori che hanno perso il loro ruolo fisiologico.



Prioni

Al contrario dei viroidi, la forma extracellulare dei prioni è di **natura proteica** (non contengono acidi nucleici).

La particella prionica proteica è infettiva

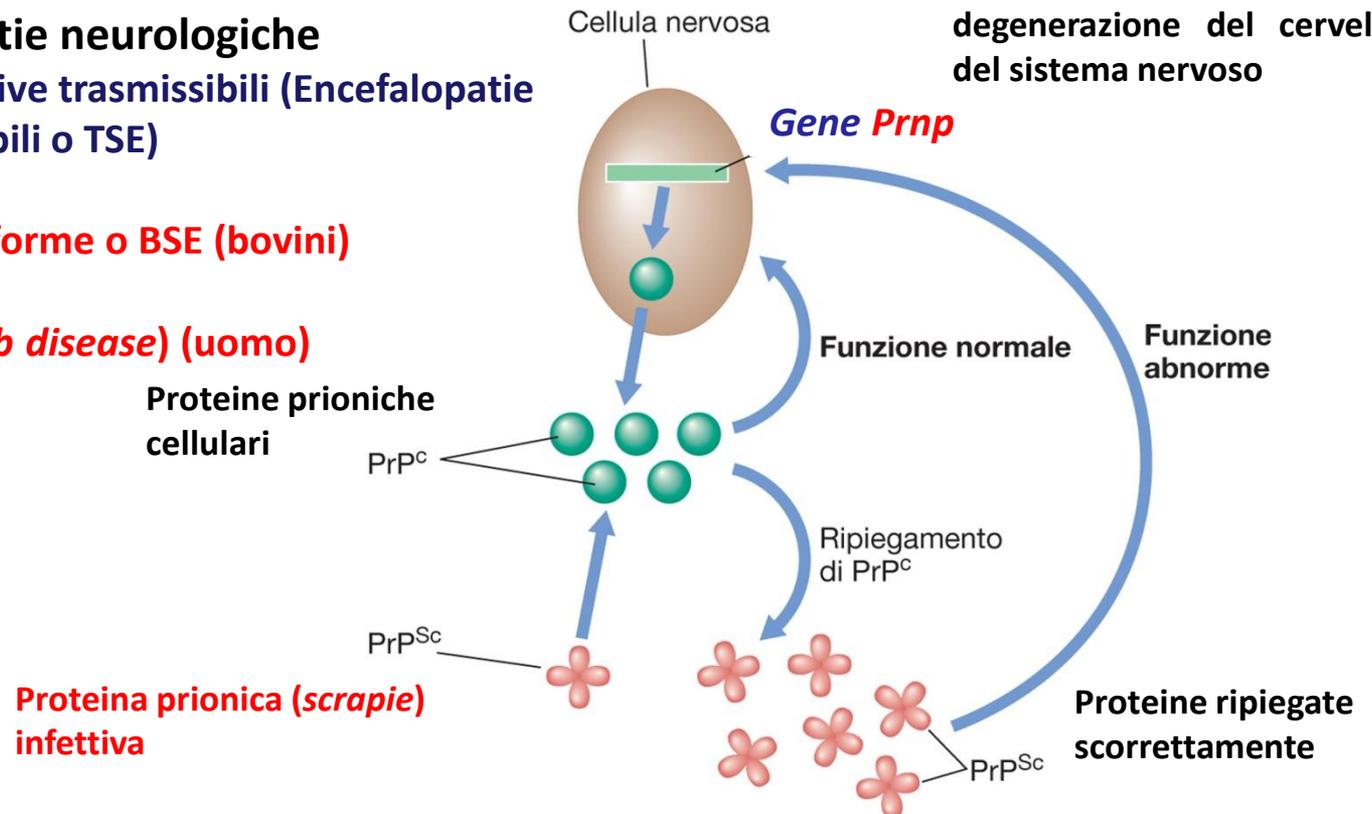


Il **kuru** rappresenta una malattia infettiva che causa degenerazione del cervello e del sistema nervoso

Sono causa di malattie neurologiche

Malattie neurovegetative trasmissibili (Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili o TSE)

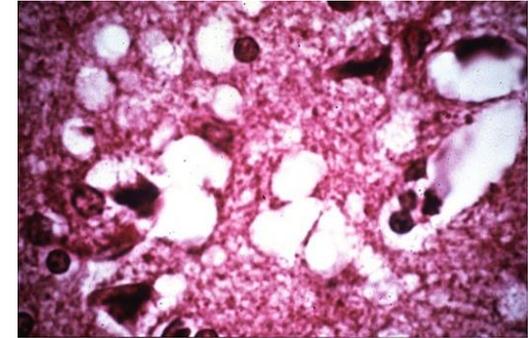
- **Scrapie (pecora)**
- **Encefalopatia spongiforme o BSE (bovini)**
- **Kuru (uomo)**
- **CJD (Creutzfeldt-Jacob disease) (uomo)**
- **nvCJD (uomo)**



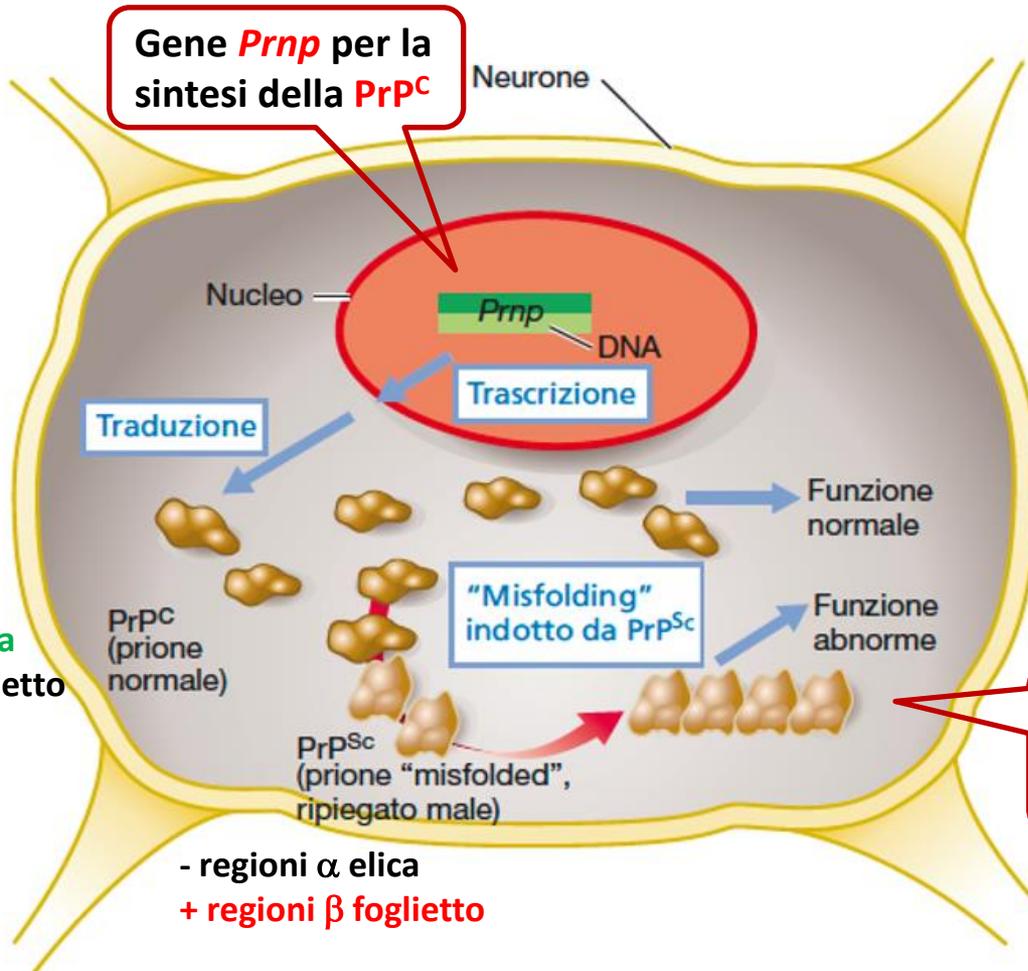
Gene *Prnp* per la sintesi della **PrP^C**

Neurone

Tessuto cerebrale con presenza di vacuoli



+ regioni α elica
- regioni β foglietto



I prioni modificati si accumulano, formando degli **aggregati insolubili**

- regioni α elica
+ regioni β foglietto

Non avvengono variazioni nella sequenza amminoacidica
ma nella **conformazione tridimensionale** del prione.

Quando un prione modificato (**PrP^{Sc}**) penetra nella cellula ospite converte la forma nativa (**PrP^C**) in forma modificata.

I sintomi della malattia sono conseguenti al **legame del prione modificato alla membrana della cellula nervosa**.

CORONAVIRUS

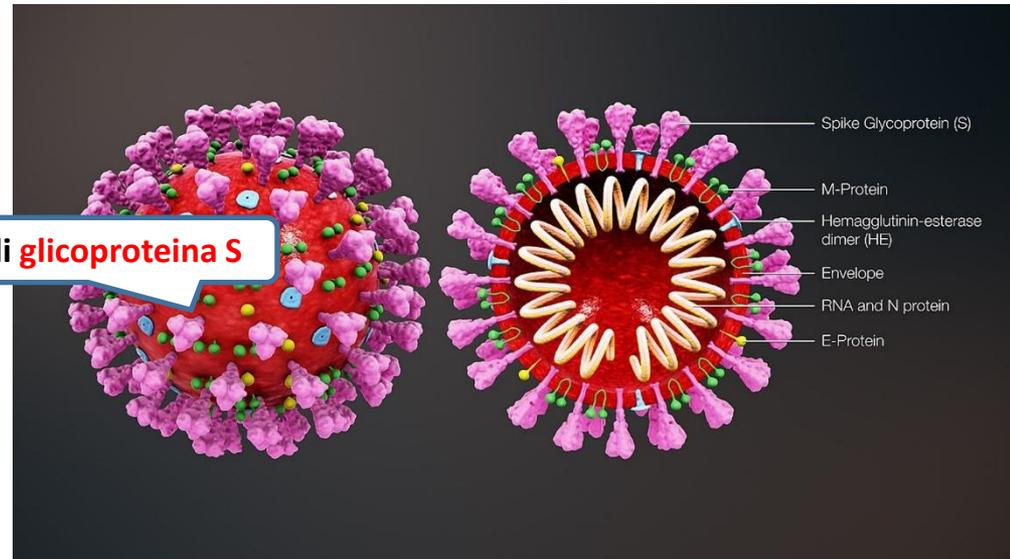
Virus rivestiti ad ssRNA (+)



Spicole **glicoproteina S** (*spikes* o peplomeri)
20 nm

Trimerico di **glicoproteina S**

morfologia → rotondeggiante
dimensioni → 100-150 nm Ø

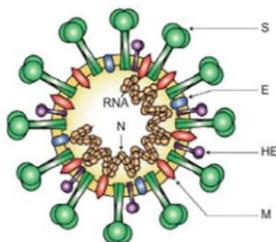


La glicoproteina S, specifica per i diversi coronavirus, è alla base della specificità del virus per le cellule epiteliali del tratto respiratorio.

Tra tutti i virus ad RNA, i coronavirus sono quelli con il genoma più grande.

ssRNA (+) può fungere da mRNA!

Non tutte le proteine virali derivano dalla traduzione dell'RNA genomico.



CORONAVIRUS Virus rivestiti ad ssRNA (+)

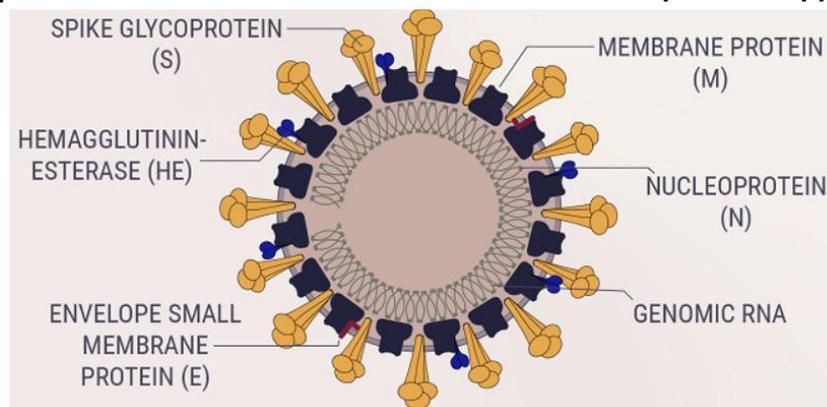
Envelope: rivestimento del virus, costituito da una membrana che il virus riceve dalla cellula ospite quando fuoriesce.

Nucleocapside: nei CoV umani il nucleocapside ha una simmetria elicoidale.

La glicoproteina S (trimeri): specifica per i diversi coronavirus, è alla base della specificità del virus per le cellule epiteliali del tratto respiratorio.

Proteina M (membrane): a forma di S, attraversa 3 volte il rivestimento (envelope) interagendo all'interno del virione con il complesso RNA-proteina. Favorisce l'adesione del nucleocapside all'apparato di Golgi per formare l'envelope.

Emagglutinina-esterasi (dimeri): proteina del rivestimento, interviene nella fase di rilascio del virus. Protrude dall'envelope sotto forma di piccole *spikes*.



Proteina N (nucleocapsid): legata all'ssRNA, aumenta la stabilità del genoma.

Proteina E (envelope): aiuta la glicoproteina S del virus ad attaccarsi alla membrana della cellula bersaglio.

Genoma: costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva di grande taglia (~30 kb) e da origine a 7 proteine virali.

<https://www.legacyias.com/explained-why-is-covid-19-not-a-pandemic-yet/>

<https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/genoma-covid-19/>

CORONAVIRUS

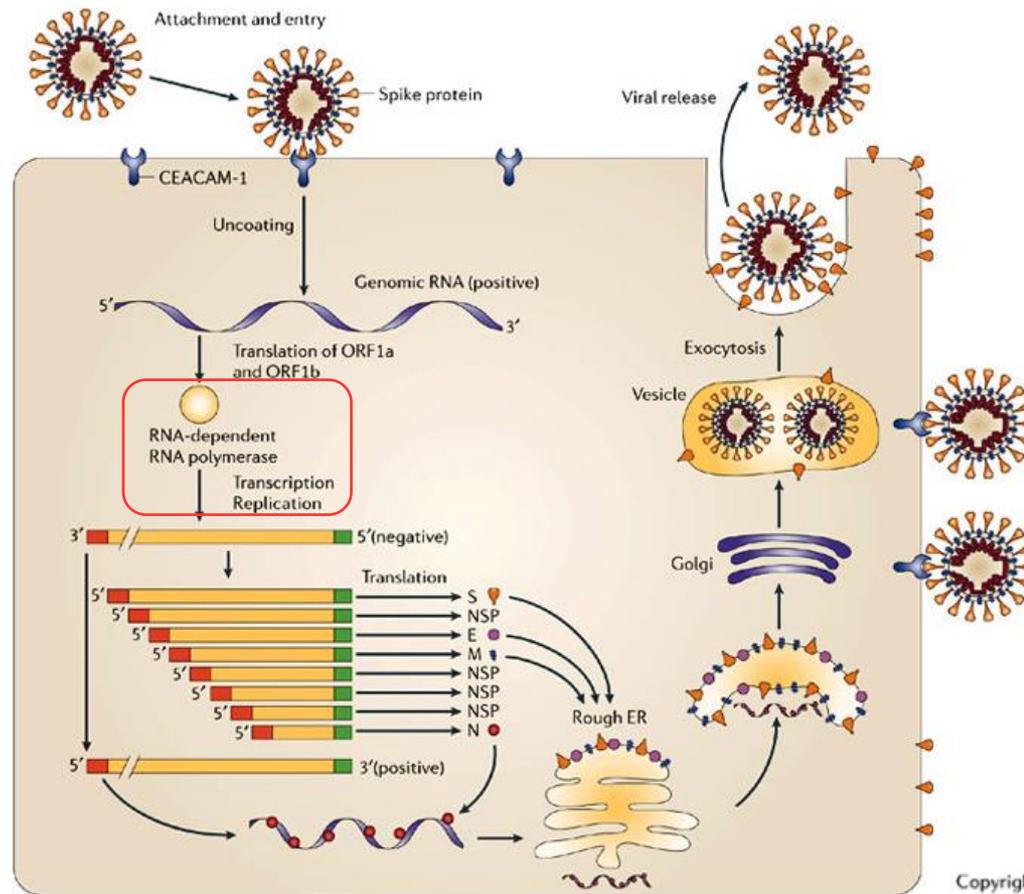
Fasi della replicazione

Replicazione citoplasmatica

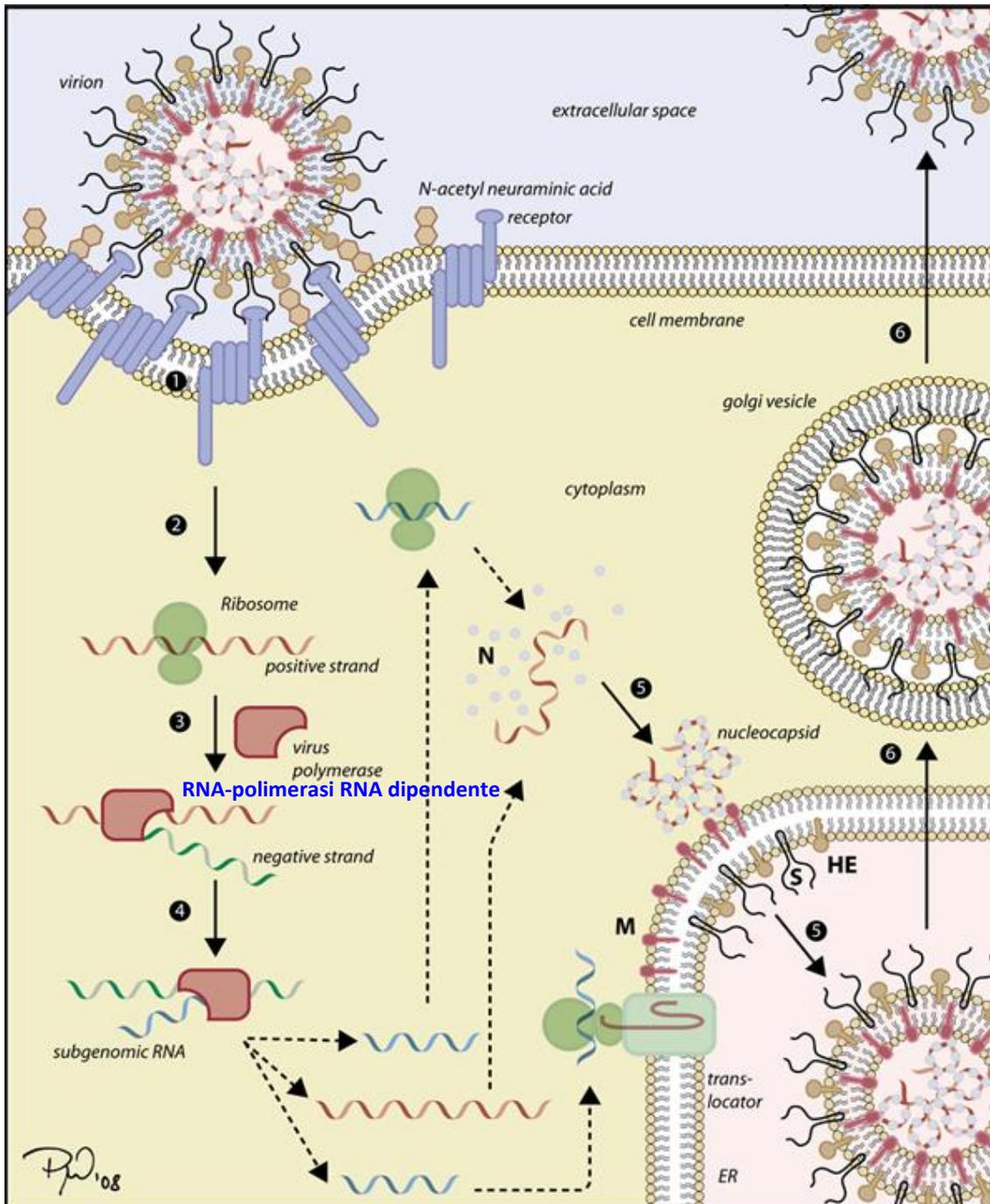
Dopo l'infezione, solo una parte del genoma viene tradotto: RNA-polimerasi RNA dipendente, ...

Dal filamento negativo vengono sintetizzati:

- mRNA per la traduzione di proteine virali,
- RNA (+) genomico completo.



Replication of Coronavirus



1 With their S-protein, coronaviruses bind on cell surface molecules such as the metalloprotease »amino-peptidase N«. Viruses, which accessorily have the HE-protein, can also bind on N-acetyl neuraminic acid that serves as a co-receptor.

2 So far, it is not clear whether the virus get into the host cell by fusion of viral and cell membrane or by receptor mediated endocytosis in that the virus is in-corporated via an endosome, which is subsequently acidified by proton pumps. In that case, the virus have to escape destruction and transport to the lysosome.

3 Since coronaviruses have a single positive stranded RNA genome, they can directly produce their proteins and new genomes in the cytoplasm. At first, the virus synthesize its RNA polymerase that only recognizes and produces viral RNAs. This enzyme synthesize the minus strand using the positive strand as template.

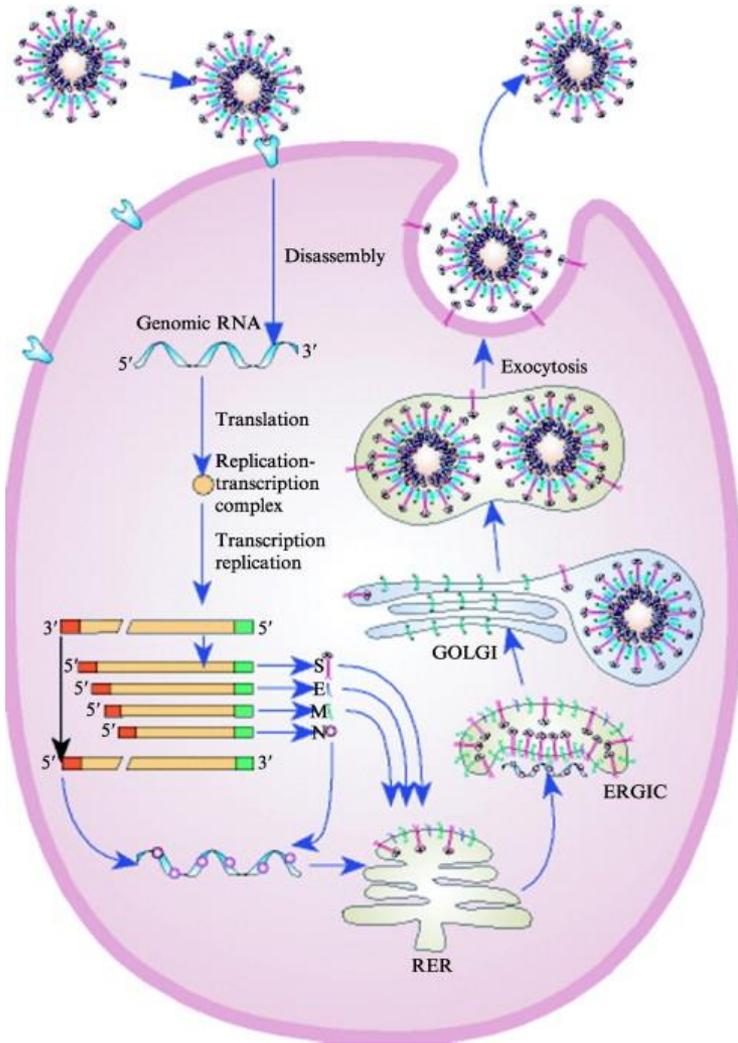
4 Subsequently, this negative strand serves as template to transcribe smaller subgenomic positive RNAs which are used to synthesize all other proteins. Furthermore, this negative strand serves for replication of new positive stranded RNA genomes.

5 The protein N binds genomic RNA and the protein M is integrated into the membrane of the endoplasmatic reticulum (ER) like the envelope proteins S and HE. After binding, assembled nucleocapsids with helical twisted RNA bud into the ER lumen and are encased with its membrane.

6 These viral progeny are finally transported by golgi vesicles to the cell membrane and are exocytosed into the extracellular space.

Not drawn to scale! Not all cellular compartments and enzymes are shown. Colors: positive strand RNA (red), negative strand RNA (green), subgenomic RNAs (blue).

Based on: Lai MM, Cavanagh D (1997). The molecular biology of coronavirus. Adv. Virus Res (48) 1-100.



La replicazione dell'RNA difetta dei meccanismi di correzione degli errori che le cellule utilizzano quando copiano il DNA.



i virus a RNA possono presentare **errori** durante la replicazione.

Tra i virus, i coronavirus hanno il **genoma ad RNA più lungo** (~30.000 basi)



quanto più materiale viene replicato/copiato, tante più sono le probabilità di commettere errori



questi virus mutano molto rapidamente ed alcune di queste mutazioni possono conferire nuove proprietà (capacità di infettare nuovi tipi di cellule o capacità di infettare nuove specie).

<https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/>
<https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>

I coronavirus (CoV) → ampia famiglia di virus respiratori, comuni in tutto il mondo.

Possono causare malattie da lievi a moderate.

- comune **raffreddore**;
- **sindromi respiratorie**:
MERS (sindrome respiratoria mediorientale);
SARS (sindrome respiratoria acuta grave).

A partire dalla prima metà degli anni sessanta, sono stati identificati **7 coronavirus umani**.

Coronavirus umani (comuni)

- 1 - 229E → α-CoV
- 2 - NL63 → α-CoV
- 3 - OC43 → β-CoV
- 4 - HKU1 → β-CoV

Altri coronavirus umani

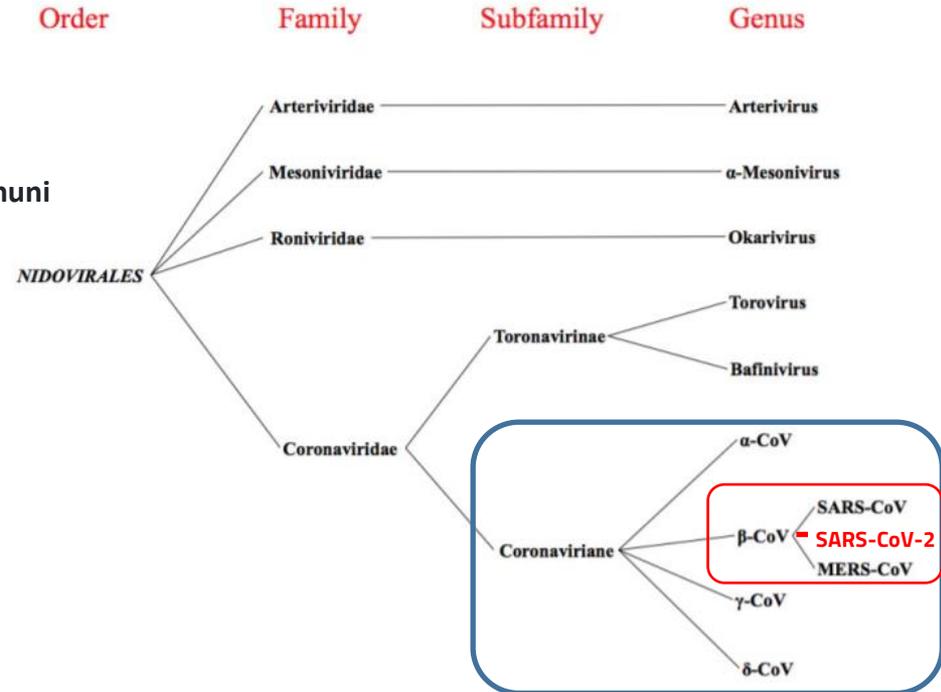
- 5 - MERS-CoV → β-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome*)
- 6 - SARS-CoV → β-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome*)
- 7 - **SARS-CoV-2** (2019-nCoV) → β-CoV (**COVID-19: CoronaVirus Disease**)

Dal momento che le varietà umane conosciute causavano malattie molto lievi, la ricerca sui coronavirus è andata molto a rilento. A partire dal 2003, con l'inizio dell'epidemia di SARS tutto è cambiato.



Salto di specie

Talvolta, i coronavirus animali possono evolvere ed infettare l'uomo (new human coronavirus).



<http://www.salute.gov.it/portale/nuovocoronavirus/dettaglioContenutiNuovoCoronavirus.jsp?lingua=italiano&id=5337&area=nuovoCoronavirus&menu=vuoto>

Nella prima metà del mese di febbraio 2020 l'**International Committee on Taxonomy of Viruses** (ICTV), che si occupa della designazione e della denominazione dei virus (specie, genere, famiglia, ecc.), ha assegnato al nuovo coronavirus il nome definitivo:

SARS-CoV-2 → "**Sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2**".

Secondo l'ICTV, il nuovo coronavirus è molto simile a quello che ha provocato la SARS (SARS-CoV), da qui il nome di SARS-CoV-2.

Il nuovo nome del virus (**SARS-Cov-2**) sostituisce quello precedente (**2019-nCoV**).

11 febbraio 2020

l'**OMS** annuncia che la malattia respiratoria causata dal nuovo coronavirus è denominata **COVID-19**. La nuova sigla è la sintesi dei termini **CO**-rona **VI**-rus **D**-isease e dell'anno d'identificazione, **2019**.

<https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/sintomi-diagnosi>

I **sintomi più comuni** di un'infezione da coronavirus nell'uomo comprendono **febbre, tosse, difficoltà respiratorie**. Nei casi più gravi, l'infezione può causare **polmonite, sindrome respiratoria acuta grave, insufficienza renale** e persino **morte**.

Coronavirus umani comuni

di solito causano malattie del tratto respiratorio superiore da lievi a moderate, come il comune **raffreddore**, che durano per un breve periodo di tempo.

I coronavirus umani a volte possono causare malattie del tratto respiratorio inferiore, come **polmonite** o **bronchite**. Questo è più comune nelle persone con preesistenti patologie croniche dell'apparato cardio-vascolare e/o respiratorio, nei soggetti con un sistema immunitario indebolito, nei neonati e negli anziani.

Sintomi

- naso che cola
- mal di testa
- tosse
- gola infiammata
- febbre
- sensazione di malessere generale.

•**Altri coronavirus umani** (salto specie o *spillover*: **MERS-CoV** e **SARS-CoV**) possono causare sintomi gravi.

I sintomi della **MERS**, di solito, includono febbre, tosse e respiro affannoso che spesso progrediscono in **polmonite** e circa 3 o 4 casi su 10 sono risultati letali. I casi di MERS continuano a verificarsi, principalmente nella penisola arabica.

I sintomi della **SARS**, per la quale non si registrano più casi dal 2004 in nessuna parte del mondo, includevano febbre, brividi e dolori muscolari che di solito progredivano in **polmonite**.

COVID-19

L'11 febbraio 2020, l'OMS ha annunciato che la malattia respiratoria causata dal nuovo coronavirus è stata denominata **COVID-19** (*CORona Virus Disease*).

I sintomi della COVID-19 non sono specifici e l'infezione può decorrere in maniera del tutto asintomatica o manifestarsi con sintomi da lievi a gravi (polmonite) che possono risultare anche fatali.

sintomi tipici	Febbre	(87,9%),
	tosse secca	(67,7%),
	Affaticamento	(38,1%),
	produzione di espettorato	(33,4%),
	respiro corto	(18,6%),
	mal di gola	(13,9%),
	mal di testa	(13,6%),
	mialgia o artralgia	(14,8%),
	Brividi	(11,4%),
	nausea o vomito	(5,0%),
	congestione nasale	(4,8%),
	Diarrea	(3,7%)
	Emottisi	(0,9%)
congestione congiuntivale	(0,8%).	

Le persone con COVID-19, generalmente, manifestano segni e sintomi in media 5-6 giorni dopo l'infezione.

Periodo di incubazione medio 5-6 giorni
intervallo 1-14 giorni

Coronavirus

che causano un raffreddore



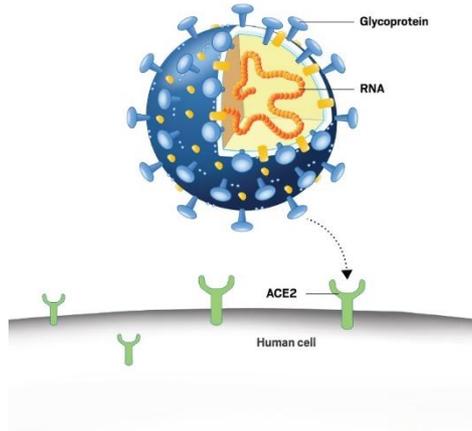
infettano principalmente le vie aeree superiori (naso, gola).

Coronavirus

che causano una grave malattia



Infettano le vie aeree inferiori (i polmoni) e possono portare alla polmonite.



Il SARS-CoV-2, come il SARS-CoV, riconosce come possibile recettore l'**ACE2** per entrare nelle cellule.

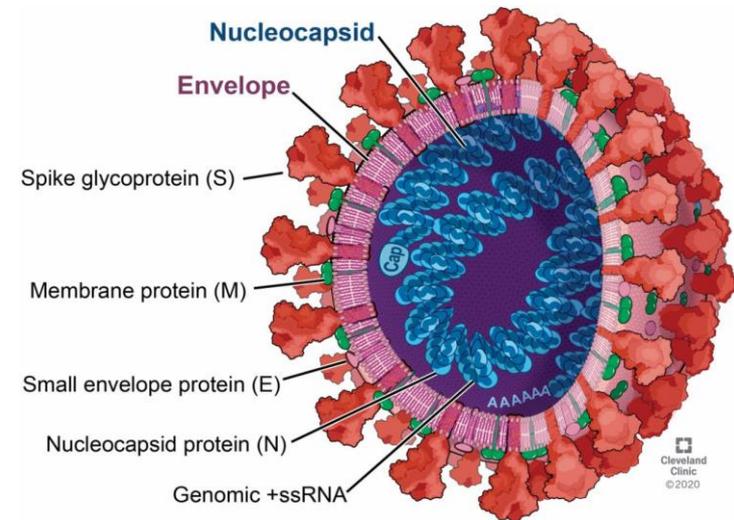
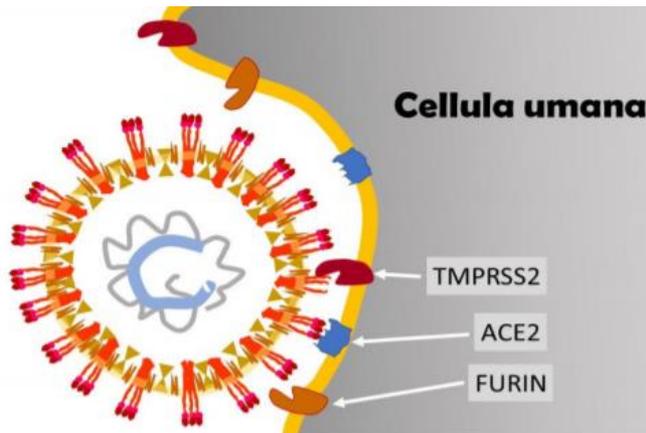
Stranezza

il recettore ACE2 è espresso prevalente nel cuore, tuttavia la SARS non infetta le cellule del cuore. Secondo il biologo molecolare B. Fielding della University of Western Cape di Città del Capo (Sudafrica) questa è una chiara indicazione che sono coinvolti anche altri recettori o co-recettori.

https://www.lescienze.it/news/2020/02/06/news/coronavirus_ca_usano_infezioni_raffreddore_polmonite-4673102/

il SARS-CoV-2 infetta l'organismo ospite sfruttando una proteina di superficie, la *spicola* (**glicoproteina S**), che si lega ad un recettore della membrana cellulare in un processo facilitato da diversi enzimi.

Li Hua (Università di Scienze e Tecnologie di Huazhong di Wuhan) ipotizza che la spicola del SARS-CoV-2 sia diversa da quelle di altri coronavirus, e che sulla superficie di questa proteina vi sia un sito attivato da un enzima delle cellule ospiti, la **furina** (polmoni, fegato, intestino tenue, ...).



Jason McLellan (Università del Texas ad Austin) sostiene che la spicola del nuovo coronavirus si lega a un recettore delle cellule umane (ACE2: enzima di conversione dell'angiotensina 2), 10 volte più saldamente di come farebbe il virus della SARS.

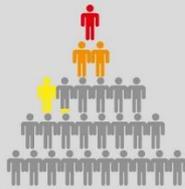
<https://www.focus.it/scienza/salute/coronavirus-come-fa-a-infettare-così-facilmente-uomo>

Attracco e penetrazione nella cellula umana (Seminara et al., 2020).

Nella porzione più esterna degli aggregati trimerici delle molecole spike vi è una zona detta Receptor Binding Domain (RBD) che si lega ad alta affinità ad un enzima presente sulla superficie di molte cellule umane, l'Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE-2). Una volta avvenuto l'attracco, due enzimi proteolitici, la **TMPLRSS2** (Transmembrane Protease Serine 2) e la **Furin**, anche questi comunemente espressi sulla superficie delle cellule umane, tagliano le proteine spike. Dopo il taglio, i frammenti delle proteine spike connessi con il pericapside espongono alcuni peptidi che permettono la fusione tra la membrana della cellula e quella del virus [Hoffman et al., 2020].

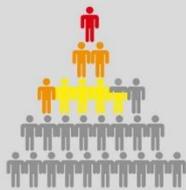
Quanto è contagiosa la malattia?

Gli scienziati usano R_0 , «erre con zero», per stimare quante altre persone saranno probabilmente contagiate da un paziente infetto



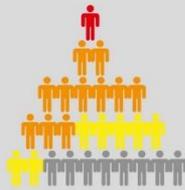
SARS-CoV-2
2-3,11

(questa stima è preliminare e probabilmente cambierà)



Zika*
3-6,6

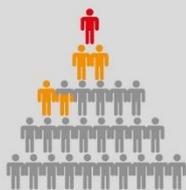
*Una stima preliminare basata sullo scoppio dell'epidemia in Colombia nel 2015



Morbillo
11-18



Ebola
2



HIV*
3,6-3,7



Influenza stagionale
1,3



Norovirus
1,6-3,7

*Una stima basata su un'epidemia nell'Isola di Réunion nel 2006

Focus

FONTE: Travel Medicine, PLOS One, JAMA Pediatrics, MDPI, NCBI, New England Journal of Medicine, The Spread and Control of Norovirus Among Hospital in a Region

Focus

Indice di riproduzione (R_0) rappresenta il numero medio di **infezioni secondarie prodotte da ciascun individuo infetto** in una popolazione completamente suscettibile

L'**indice di riproduzione (R_0)** dipende da

- quante persone al giorno incontra un individuo malato e contagioso;
- quanto tempo un individuo malato e contagioso rimane tale;
- probabilità di trasmissione dell'infezione per singolo contatto.

modelli matematici

$R_0 > 1$: si ha un'epidemia

$R_0 < 1$ (cioè ogni malato contagia meno di una persona)
l'epidemia si estingue

In Lombardia, all'inizio della pandemia, R_0 era stato stimato con un valore pari a 2,6 valore ← piuttosto alto.

R_0 indica la potenziale trasmissibilità di una malattia infettiva nella sua fase embrionale (cioè allorquando tutta la popolazione è infettabile, non avendo alcun tipo di anticorpo),

R_t descrive il tasso di contagiosità, in un certo periodo di tempo, dopo l'applicazione di misure rigorose, idonee a contenere la diffusione del virus.