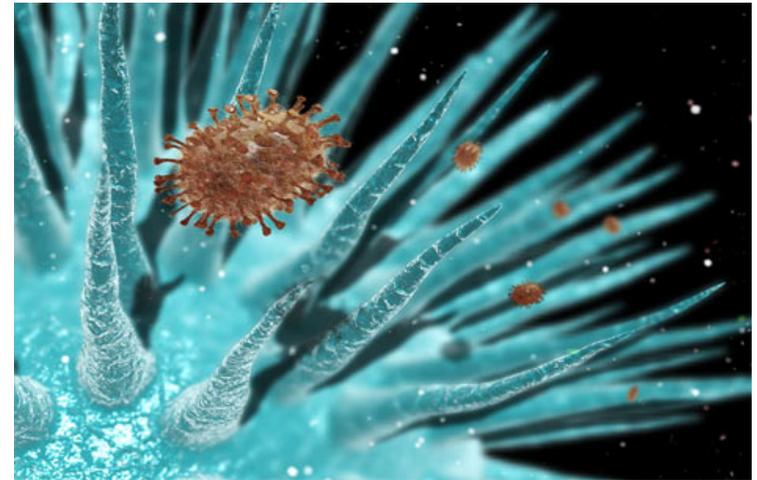
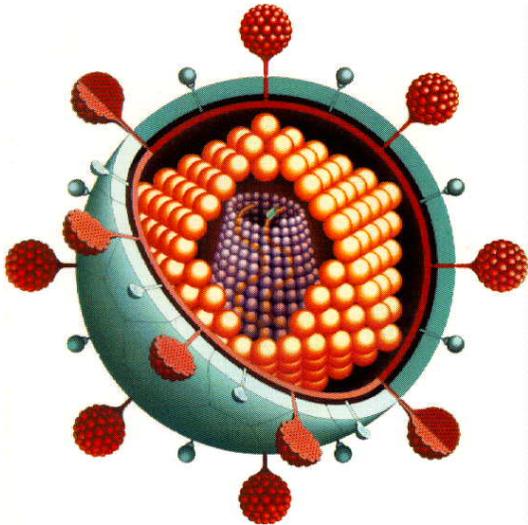


REPLICAZIONE VIRALE



GENERALITA'

A causa della natura di **PARASSITA INTRACELLULARE OBBLIGATO**,
il virus può esprimere la sua attività biologica solo all'interno
di una **CELLULA OSPITE** che permetta la completa espressione
del suo genoma e la produzione di nuove particelle virali

- Il virus si lega sulla superficie della cellula ospite e vi introduce il proprio genoma.
- Il genoma deve essere in grado di esprimersi e di utilizzare l'apparato sintetico della cellula per la sintesi dei costituenti virali.
- Questi costituenti si combineranno in modo da formare i nuovi virioni.
- I virioni prodotti, liberati dalla cellula estenderanno l'infezione ad altre cellule dell'ospite.
- La replicazione virale può avvenire solo in cellule sensibili, capaci di fare esprimere completamente il genoma virale.



LA CELLULA OSPITE DEVE AVERE 2 CARATTERISTICHE PRINCIPALI :

SENSIBILITA': strettamente condizionata dalla presenza di adeguati recettori cellulari che permettono l'attacco del virus alla cellula ospite (**ADSORBIMENTO**)

PERMISSIVITA': dipende da tutti quei meccanismi molecolari-cellulari che risultano adeguati alla completa **trascrizione del genoma virale** e alla **sintesi** di tutte le **proteine** virus-codificate

L'INFEZIONE PUO'ESSERE:

- Infezione produttiva

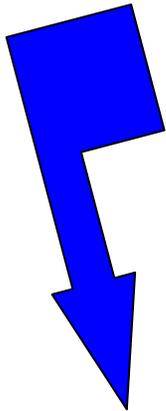
Infezione di una cellula permissiva da parte di un virione completo che porta alla produzione di virioni di progenie in numero variabile a seconda del tipo di virus o di cellula

- Infezione abortiva

In alcuni casi l'infezione può non completarsi. Ciò si verifica quando il virus infettante è difettivo (mancano ad es. parti essenziali del proprio genoma) o quando la cellula consente l'espressione di solo alcuni geni virali portando all'arresto dell'infezione

- Infezione restrittiva

Quando le cellule sono permissive solo in una certa fase del loro ciclo vitale



Le infezioni di tipo abortivo e restrittivo possono consentire la persistenza del virus all'interno della cellula ospite → infezione latente: il DNA virale infettante può integrarsi nel genoma della cellula ospite o mantenersi all'interno di essa in forma episomale. Ad ogni ciclo cellulare, il virus viene replicato, ma solo nel momento in cui si hanno le condizioni ambientali favorevoli il genoma virale può dare inizio al processo di trascrizione

CICLO REPLICATIVO VIRALE

PUO' ESSERE SUDDIVISO IN 6 FASI:

1. ADSORBIMENTO
2. PENETRAZIONE
3. SCAPSIDAZIONE
4. REPLICAZIONE
5. MATURAZIONE
6. LIBERAZIONE

Il periodo che intercorre tra la penetrazione del virus nelle cellule e la maturazione della progenie virale viene definito **periodo di eclissi**, non essendo il virus più reperibile come entità morfologica nella cellula.

ADSORBIMENTO

PENETRAZIONE

SINTESI VIRALE

SCAPSIDAZIONE

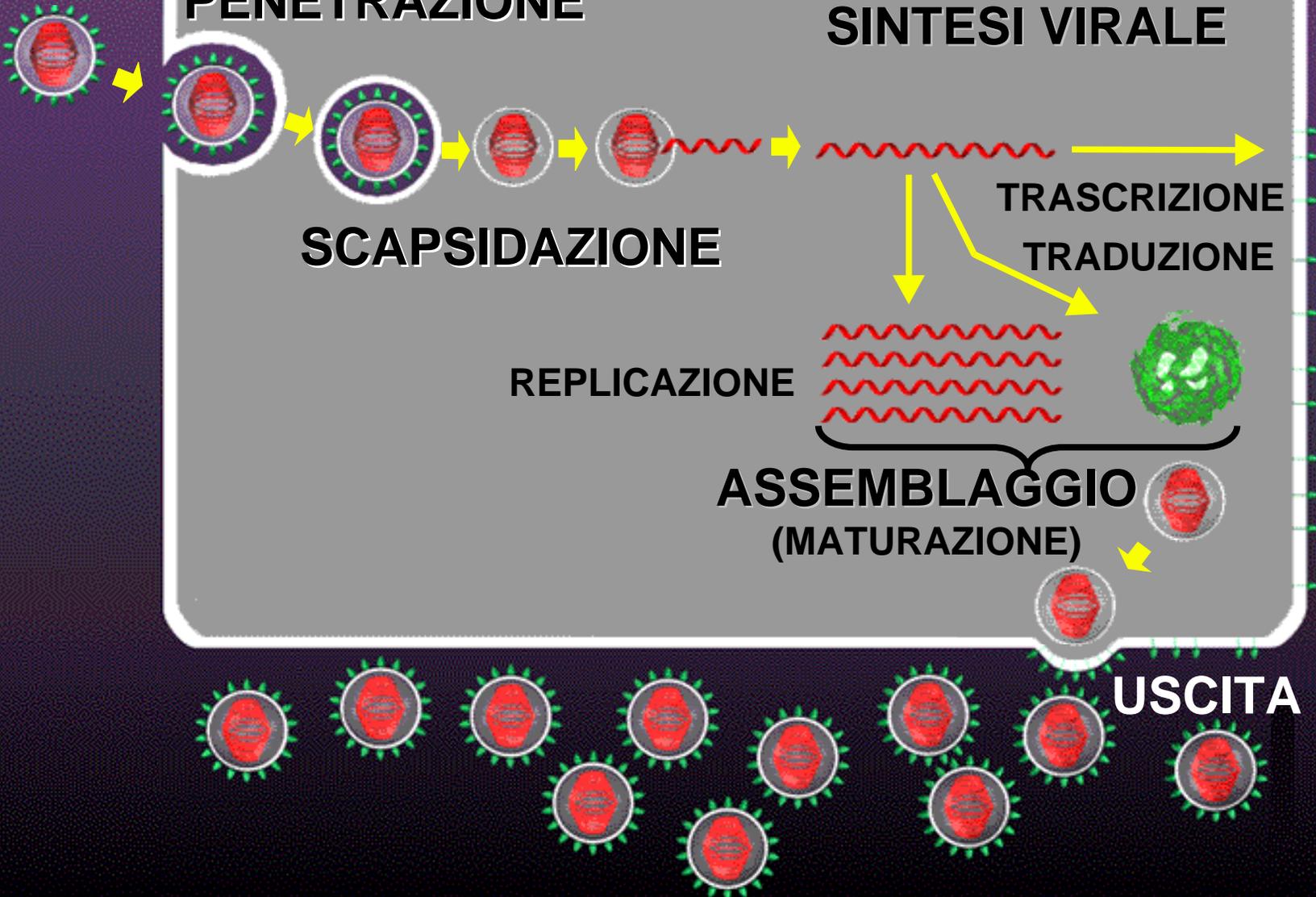
TRASCRIZIONE

TRADUZIONE

REPLICAZIONE

**ASSEMBLAGGIO
(MATURAZIONE)**

USCITA



1. ADSORBIMENTO

Fenomeno che richiede un'interazione tra specifiche strutture di superficie del virione (**antirecettori**) con **recettori** della membrana citoplasmatica della cellula.

La specificità del legame determina il **tropismo** virale, cioè la proprietà dei virus di infettare prevalentemente (o addirittura esclusivamente) determinate specie animali (o tessuti e organi).

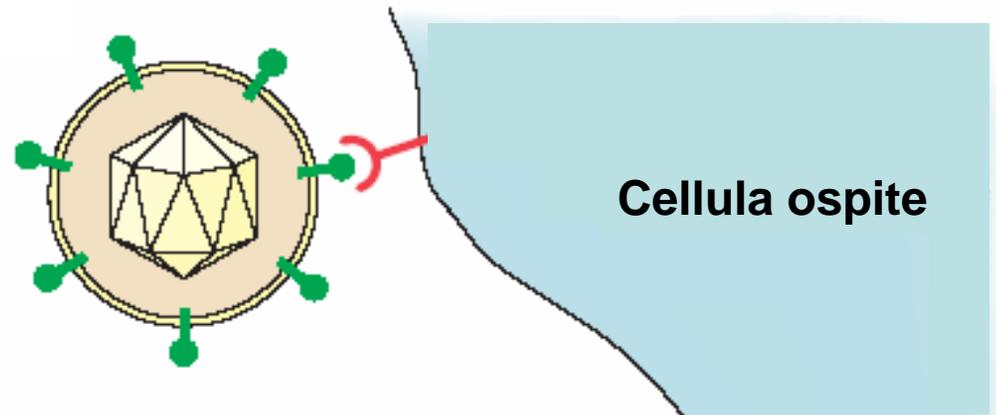
Il legame può essere molto stabile (es.tra l'emoagglutinina del virus influenzale e l'acido sialico delle glicoproteine della membrana cellulare)

In altri casi (la maggior parte dei virus nudi) il legame è meno stabile e avviene attraverso una complementarità di cariche tra molecole sulla superficie del virus e sulla membrana della cellula ospite.

Molti degli antirecettori sono stati identificati e caratterizzati: in genere sono le glicoproteine nei virus con envelope e proteine semplici nei virus nudi.

I recettori sono strutture che nella cellula svolgono normalmente una funzione fisiologica ben precisa (che il virus si è evolutivamente adattato ad utilizzare ai propri "fini").

L'adsorbimento richiede solo una partecipazione passiva della cellula.



2. PENETRAZIONE

In questo processo è necessario un intervento attivo da parte della cellula (es. è possibile solo a temperatura ottimale per la cellula).

Può avvenire in diversi modi.

Traslocazione

L'intero virione oltrepassa la membrana citoplasmatica ed entra come tale nel citoplasma (virus nudi).

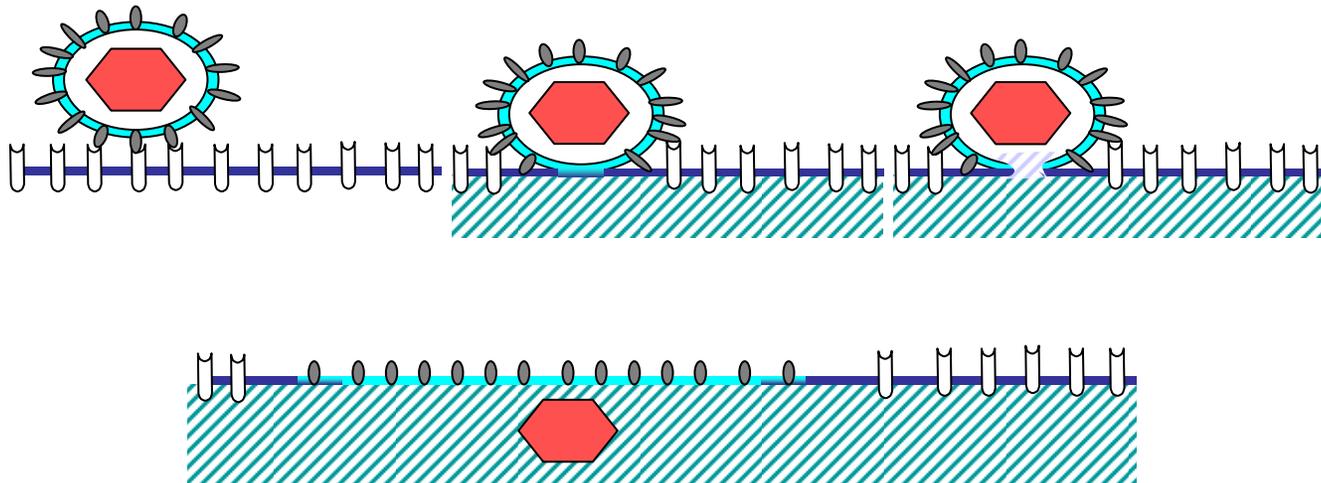
Endocitosi

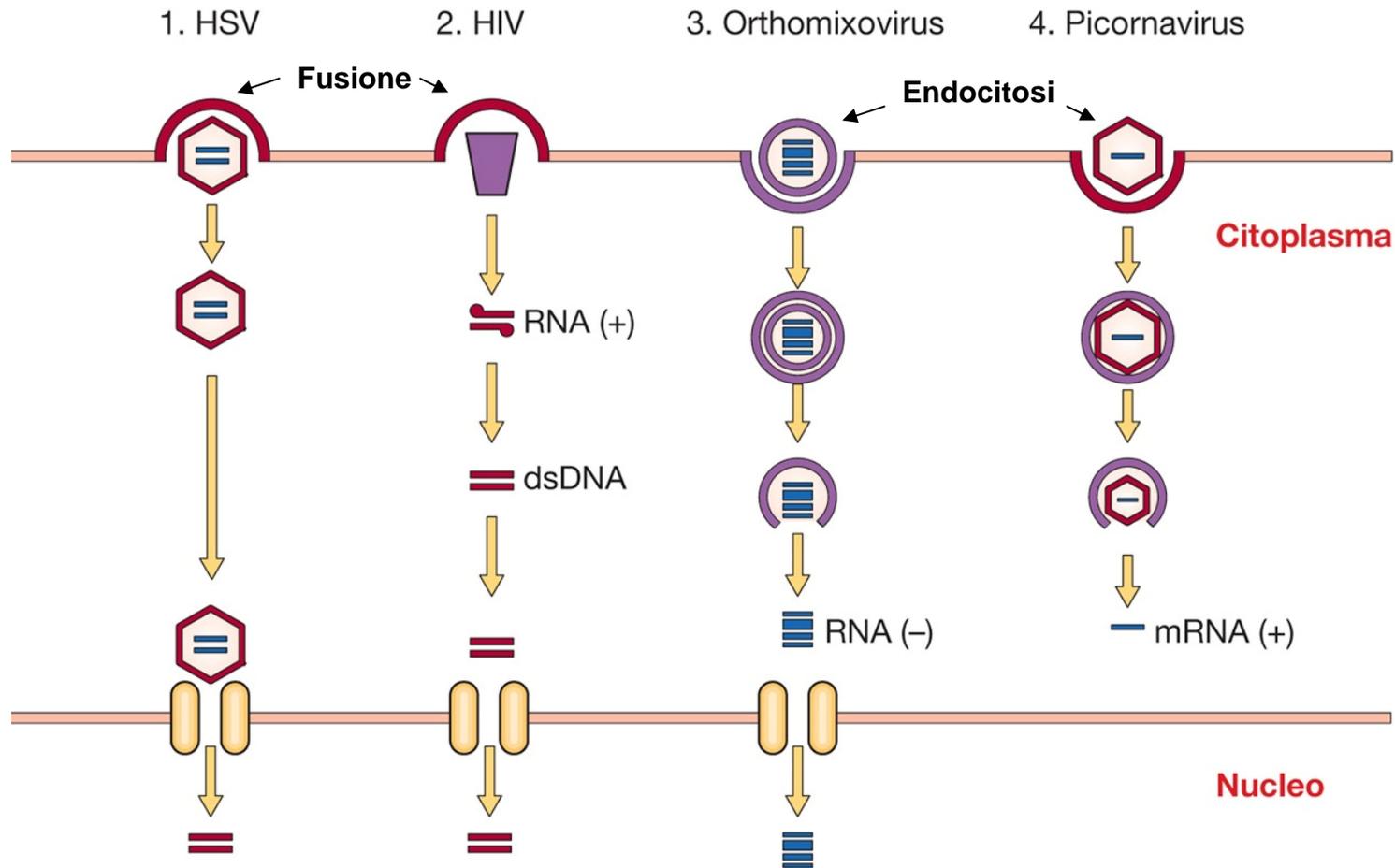
L'adesione del virus sulla membrana ne provoca l'introflessione che trasporta il virus nel citoplasma racchiuso in un vacuolo fagocitario (virus nudi, virus con involucro)

Fusione

L'involucro lipoproteico del virus si fonde con la membrana citoplasmatica (lipoproteica). Il nucleocapside entra nel citoplasma.

In alcuni virus (*Paramyxovirus*, *Herpesvirus*) questo processo è facilitato da proteine fusogene (virus con involucro).





G. Antonelli e M. Clementi

Principi di Virologia Medica

Copyright 2008 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

Meccanismi di entrata per diverse classi di virus

3. SCAPSIDAMENTO

Evento che segue l'entrata del virus e precede la replicazione del genoma attraverso il quale il **genoma virale si separa dalle proteine che lo rivestono.**

Meccanismo che può avvenire attraverso varie modalità.

Il meccanismo non è ben chiaro ed è possibile che lo stesso virus possa seguire vie diverse a seconda delle situazioni e del tipo di cellula ospite.

Per molti virus le proteine virali si **disaggregano spontaneamente** o con l'intervento di **proteasi cellulari** o **enzimi lisosomiali** che si riversano all'interno di vacuoli fagocitari (fagolisosomi o virosomi).

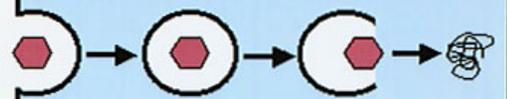
Nel virus influenzale una proteina dell'involucro M2, agisce da canale ionico e provoca **l'acidificazione del virus all'interno del vacuolo fagocitario**; ne consegue la fusione del pericapside con la membrana del vacuolo e la liberazione del nucleocapside nel citoplasma.

Penetrazione

Scapsidamento

Endocitosi

1. Poliovirus



Virus **nudi** a RNA

Fusione

2. Newcastle Disease Virus



Virus con **envelope** a RNA

Endocitosi

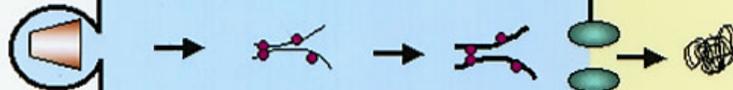
3. Influenza Virus



Virus con **envelope** a RNA

Fusione

4. HIV



Virus con **envelope** a RNA

Fusione

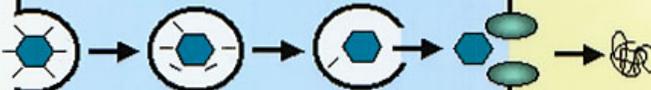
5. Vaccinia Virus



Virus con **envelope** a DNA

Endocitosi

6. Adenovirus



Virus **nudi** a DNA

Fusione

7. Herpes Virus

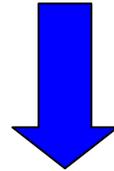
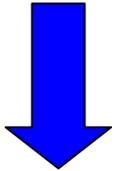


Virus con **envelope** a DNA

cytoplasm
nucleus

4. REPLICAZIONE

Una volta che il genoma virale si è liberato dal capsido ed ha raggiunto la propria sede, inizia la sintesi delle macromolecole virali



**PRODUZIONE DI NUMEROSE COPIE DI COMPONENTI STRUTTURALI E GENOMICI NECESSARI PER LA FORMAZIONE DELLA NUOVA PROGENIE
(I VIRUS SFRUTTANO L'APPARATO BIO-SINTETICO CELLULARE)**

STRATEGIE REPLICATIVE

Nel corso della loro evoluzione i virus hanno sviluppato diverse strategie rispetto alla organizzazione ed espressione dei geni virali, alla replicazione dei genomi virali ed all' assemblaggio delle particelle virali neoformate.

**Un virus deve essere in grado di superare alcuni ostacoli
imposti dall' organizzazione della cellula ospite**

1) Nella cellula eucariotica gli mRNA vengono sintetizzati nel nucleo per trascrizione del DNA ad opera di polimerasi cellulari e quindi trasferiti nel citoplasma dove vengono tradotti nelle rispettive proteine.

La cellula non possiede enzimi in grado di sintetizzare mRNA per trascrizione di una molecola di RNA, sia nel nucleo che nel citoplasma, nonché di enzimi in grado di trascrivere il DNA nel citoplasma.

Quindi solo i virus il cui genoma sia 1) formato da DNA, 2) in grado di raggiungere il nucleo della cellula, 3) possieda i necessari segnali per l'attacco dei vari fattori di trascrizione e polimerasi cellulari necessari, sono in grado di utilizzare il sistema di trascrizione cellulare a proprio vantaggio per sintetizzare i propri mRNA.

Tutti gli altri virus devono possedere polimerasi virus-specifiche con caratteristiche di volta in volta necessarie (es Poxvirus: deossiribovirus a replicazione citoplasmatica; Ribovirus a genoma negativo.)

2) Il sistema della sintesi proteica della cellula eucariotica è predisposto per la traduzione di messaggi monocistronici. Quindi alcuni mRNA virali che trascrivono più di un gene, vengono tradotti in una poliproteina che viene poi tagliata nelle varie proteine funzionali.

3) Nella cellula infetta l'espressione dei geni virali è in competizione con i geni cellulari. Per poter avere il sopravvento, i virus o producono mRNA che sono favoriti nel processo di traduzione, o hanno evoluto meccanismi in grado di bloccare o limitare le sintesi macromolecolari della cellula ospite.

STRATEGIE DI REPLICAZIONE DEI VIRUS A DNA

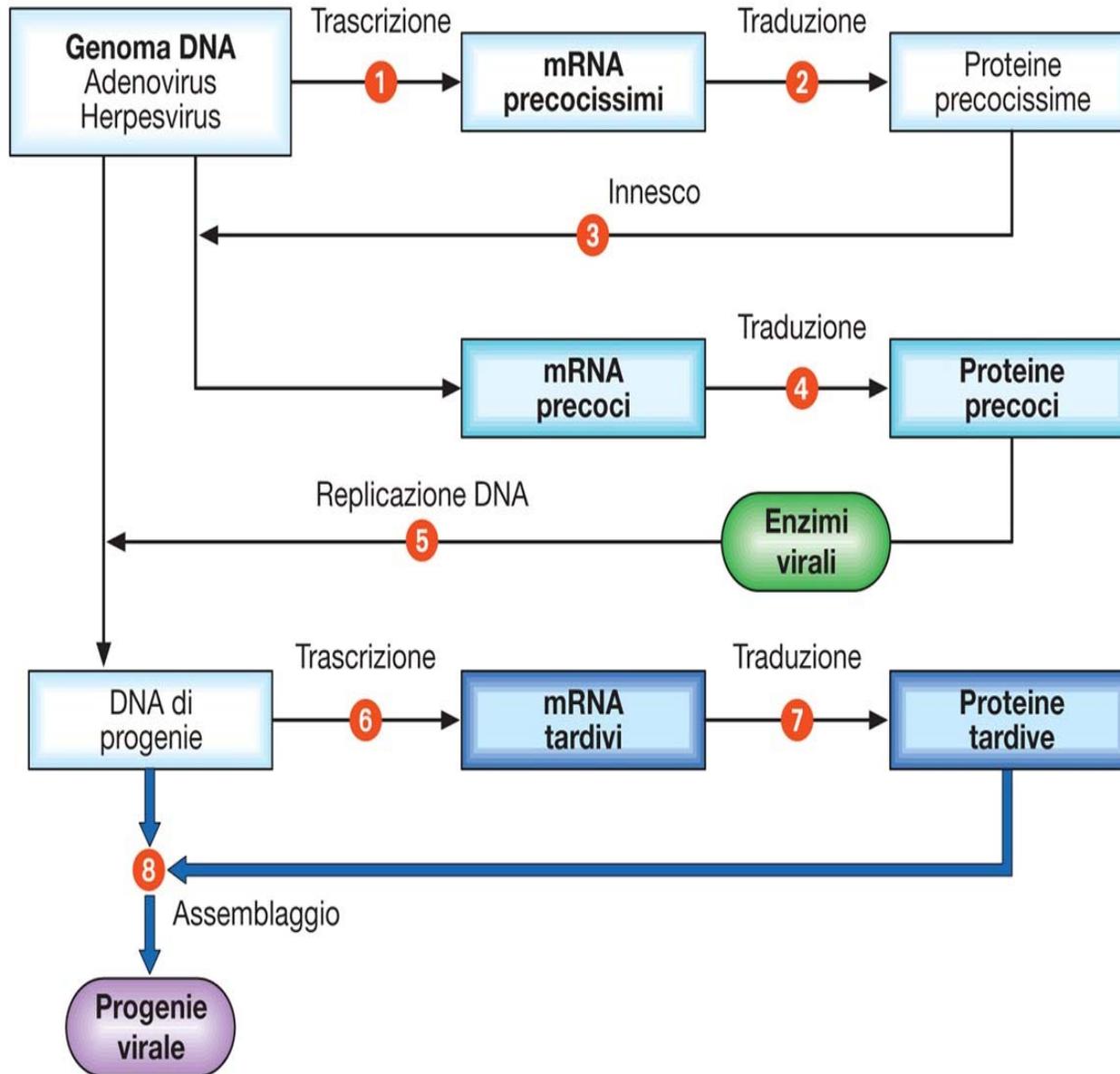
I virus a DNA seguono 4 diverse strategie replicative, 3 per i virus a genoma bicitenario e 1 per quelli a genoma monocatenario (parvovirus).

| | | |
|--------------------|-------------------|--------------------|
| <u>1° gruppo</u> | | |
| Herpesvirus | Adenovirus | Papovavirus |

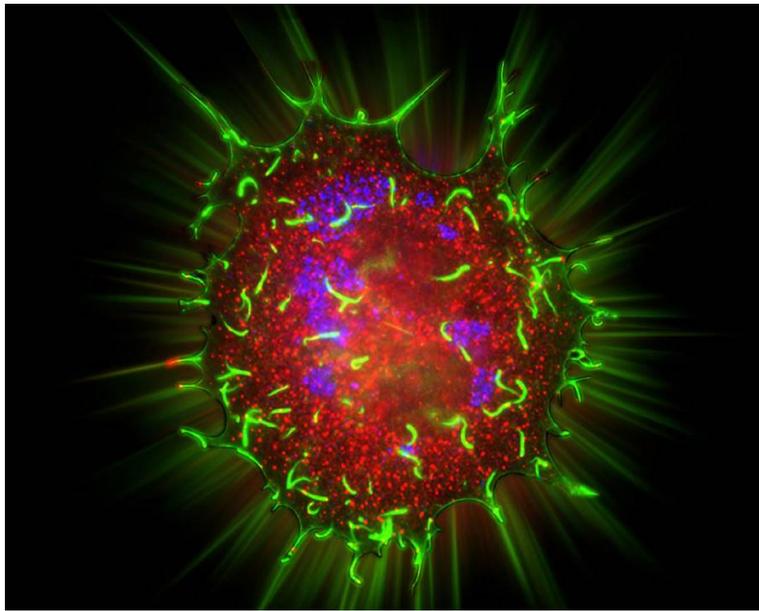
Questi virus usano per la trascrizione le RNA polimerasi DNA-dipendenti della cellula e pertanto debbono iniziare la loro trascrizione nel nucleo della cellula, dove ci sono gli enzimi necessari.

Il genoma dei **papovavirus** viene trascritto in **due tempi**, quello degli **herpesvirus** e degli **adenovirus** in **tre tempi**, con produzione rispettivamente di due e tre distinti gruppi di mRNA, l'ultimo dei quali destinato alla produzione delle proteine strutturali del virione.

REPLICAZIONE DI ALCUNI VIRUS CON GENOMA dsDNA



1. trascrizione del DNA in mRNA precocissimi
2. traduzione dei messaggeri precocissimi
3. innesco della sintesi dei messaggeri precoci da parte delle proteine precocissime
4. traduzione degli mRNA precoci
5. replicazione del DNA virale ad opera di enzimi virali neoformati
6. e 7. trascrizione e successiva traduzione degli mRNA tardivi del DNA neoformato
8. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

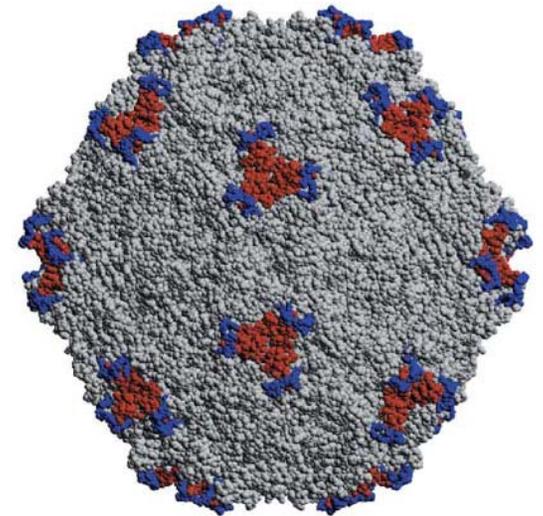


2° gruppo Poxvirus

In questi virus l'intero ciclo di replicazione si compie nel citoplasma pur essendo virus a DNA, utilizzano per la trascrizione una polimerasi veicolata dal virione.

3° gruppo Parvovirus

Possiedono un **DNA monocatenario** che per opera di **enzimi cellulari** dovrà dirigere la sintesi di una catena complementare di DNA e la trascrizione di mRNA. Questi eventi si verificano nel nucleo della cellula.



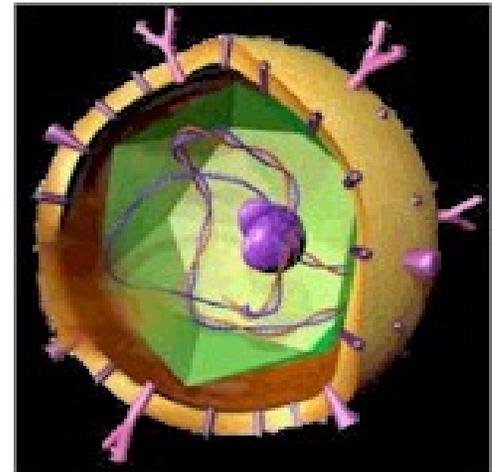
4° gruppo Hepadnavirus

L'unico patogeno per l'uomo è il **virus dell'epatite B**.

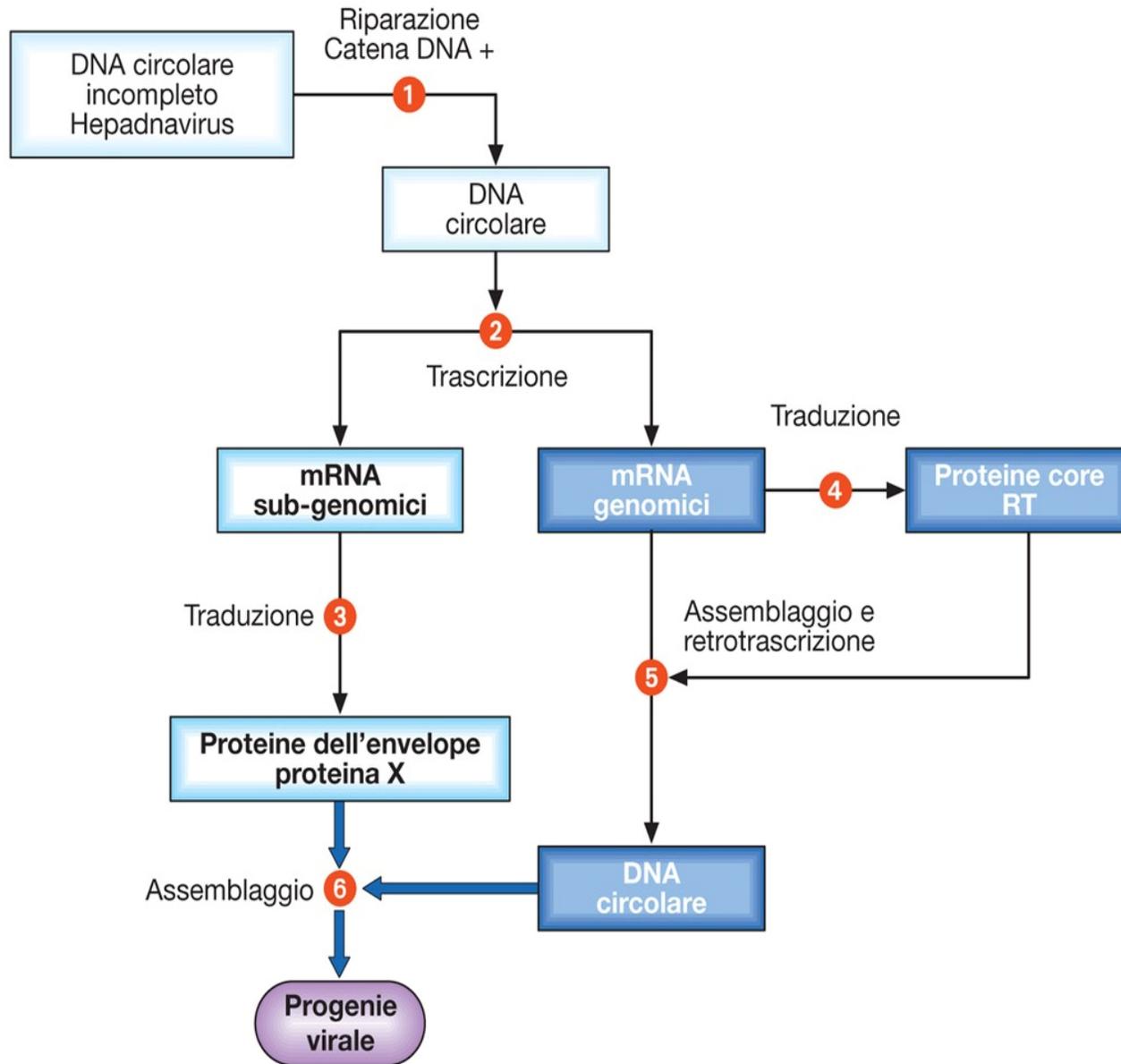
Questi virus hanno un genoma circolare costituito da DNA bicatenario con un'interruzione nella catena a polarità positiva.

Mediante **enzimi cellulari nucleari** di riparo, il tratto mancante viene sintetizzato con produzione di una molecola interamente bicatenaria che si superavvolge.

Successivamente, ad opera di **enzimi cellulari** nucleari, vengono trascritti una serie di mRNA subgenomici che codificano per le proteine strutturali e un RNA genomico che, incorporato nel nucleocapside, verrà **retrotrascritto** in DNA dalla **DNA-polimerasi RNA-dipendente virale**.



REPLICAZIONE DEGLI HEPADNAVIRUS



1. riparazione della catena di DNA(+) interrotta
2. trascrizione del DNA in RNA genomici e sub-genomici
3. traduzione degli mRNA subgenomici
4. traduzione degli mRNA genomici
5. retrotrascrizione dell'RNA genomico in DNA ad opera della trascrittasi inversa (RT) virale
6. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

STRATEGIE DI REPLICAZIONE DEI VIRUS A RNA

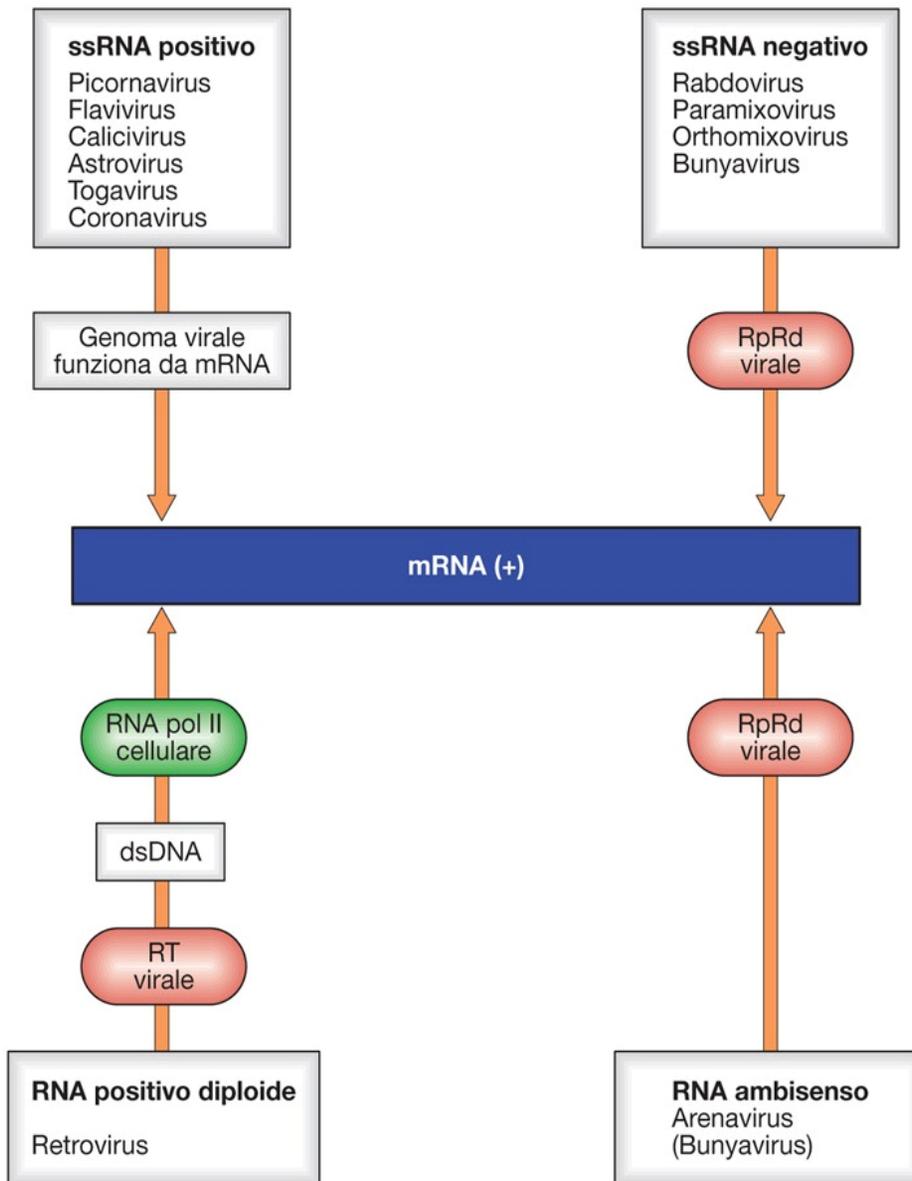
I **virus a RNA** seguono **4 principali strategie**, due delle quali con significative variazioni a seconda dei gruppi di virus.

Virus con RNA monocatenario, monofilamento, a polarità positiva, non hanno inizialmente bisogno di trascrivere il proprio genoma perché il loro RNA può essere subito tradotto dai ribosomi della cellula.

Nei **Picornavirus** e nei **Flavivirus** (tra cui il **virus dell'epatite C**) il prodotto della traduzione è un'unica **poliproteina** che viene successivamente scissa nelle varie proteine codificate per opera di proteasi virali.

Nei **Togavirus**, **Coronavirus** e **Calicivirus (epatite E)** viene prima tradotto un tratto del genoma all'estremità 5', che codifica per proteine funzionali, e dopo la replicazione del genoma vengono prodotti mRNA sub-genomici per le proteine strutturali corrispondenti all'estremità 3'.

PRINCIPALI STRATEGIE REPLICATIVE DEI VIRUS A RNA



L'RNA virale monofilamento (ssRNA) a polarit  positiva viene immediatamente tradotto; l'RNA virale a polarit  negativa necessita di essere trascritto da una RNA polimerasi-RNA dipendente (RpRd).

Nei retrovirus la trascrittasi inversa (RT) retrotrascrive l'RNA virale in una doppia catena di DNA (dsDNA).

REPLICAZIONE DEI VIRUS CON GENOMA A RNA (+)

Schema di replicazione

-RNA a singola catena con polarità di RNA messaggero: (+)RNA.

-Può funzionare subito come mRNA.

- Il genoma virale ha due funzioni essenziali:

1) Agisce come mRNA

2) Serve da stampo ad una molecola complementare di (-)(RNA) ad opera di una polimerasi virale

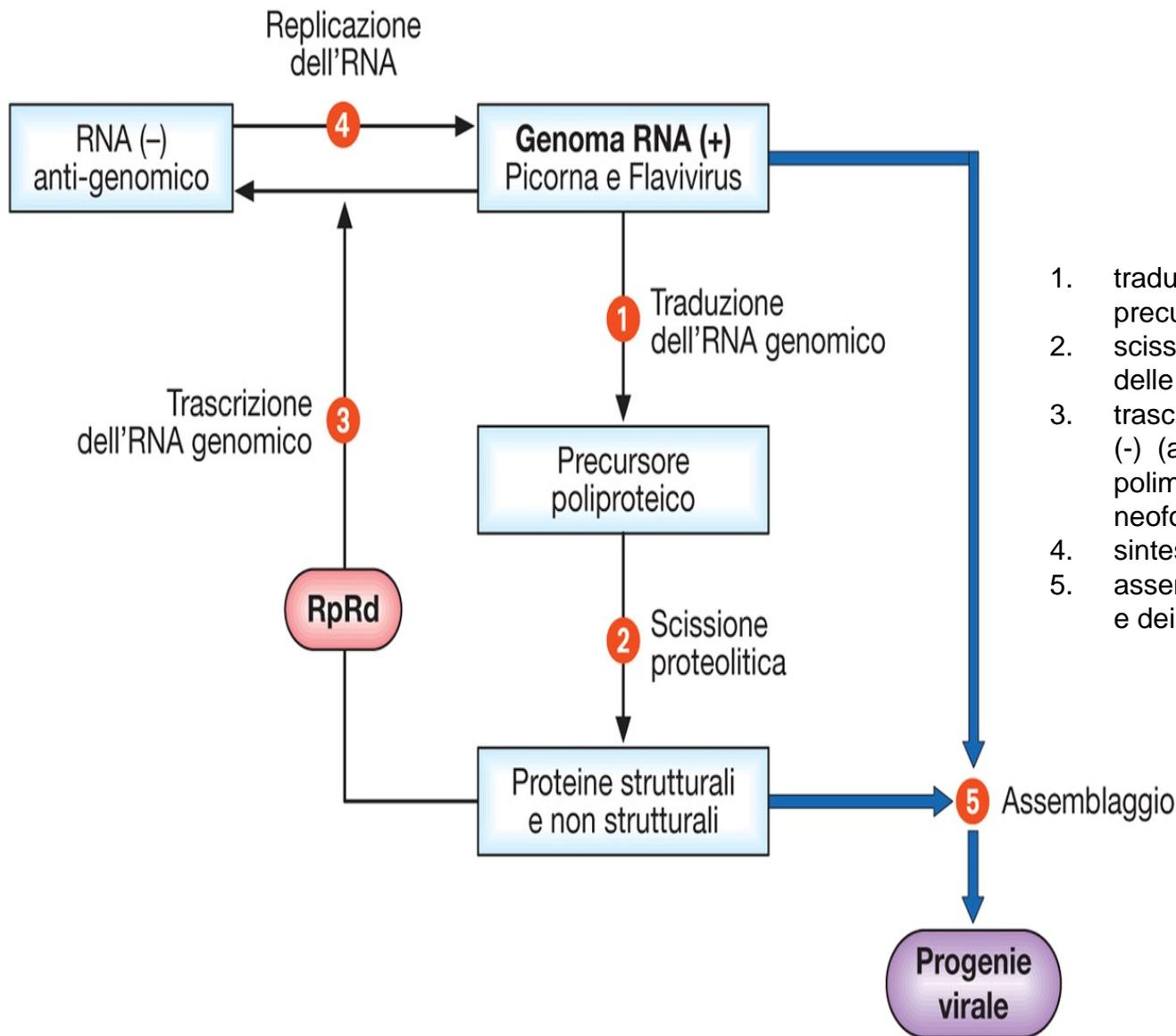
-(-)RNA a sua volta serve come stampo per la sintesi di (+)RNA identica al genoma virale

- Le nuove molecole (+)RNA possono a loro volta servire come:

1)mRNA per altre proteine

2)genoma per i virus neoformati

REPLICAZIONE DI ALCUNI VIRUS CON GENOMA A RNA (+)



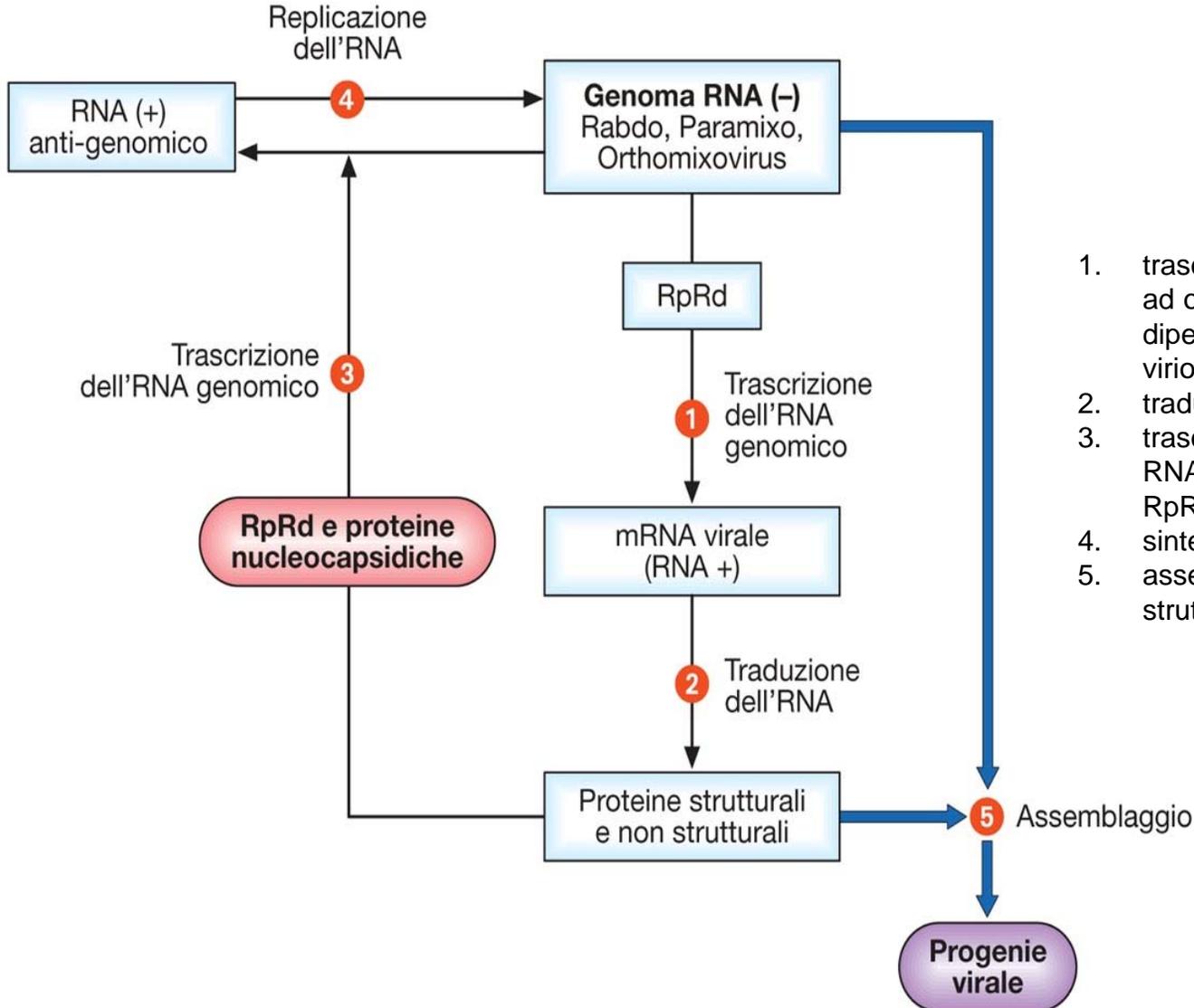
1. traduzione dell'RNA genomico in un precursore poliproteico
2. scissione proteolitica e formazione delle proteine strutturali e funzionali
3. trascrizione dell'RNA genomico in RNA (-) (antigenoma) ad opera della RNA polimerasi-RNA dipendente (RpRd) neoformata
4. sintesi di nuovo RNA (+)
5. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

REPLICAZIONE DEI VIRUS CON GENOMA A RNA (-)

Schema di replicazione

- RNA singola catena con **polarità negativa**, antisenso: (-)RNA
- Non può funzionare come mRNA
- Questo genoma ha una doppia funzione di stampo:
 - 1) per la trascrizione dei messaggeri
 - 2) per la propria replicazione (sintesi di un intermedio di (+)RNA)
- La trascrizione avviene per una **trascrittasi virale** presente nel virione
- La molecola di (+)RNA serve come stampo per la sintesi di (-)RNA che costituirà il genoma delle particelle virali.

REPLICAZIONE DI ALCUNI VIRUS CON GENOMA A RNA (-)



1. trascrizione dell'RNA (-) in RNA (+) ad opera della RNA polimerasi-RNA dipendente (RpRd) associata al virione
2. traduzione dell'RNA (+) neoformato
3. trascrizione dell'RNA genomico in RNA (+) (antigenoma) ad opera della RpRd virale
4. sintesi del nuovo RNA di progenie
5. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

RIBOVIRUS CON RNA BICATENARIO: REOVIRUS

-RNA bicatenario

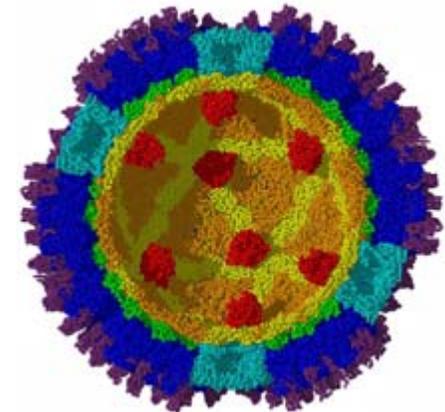
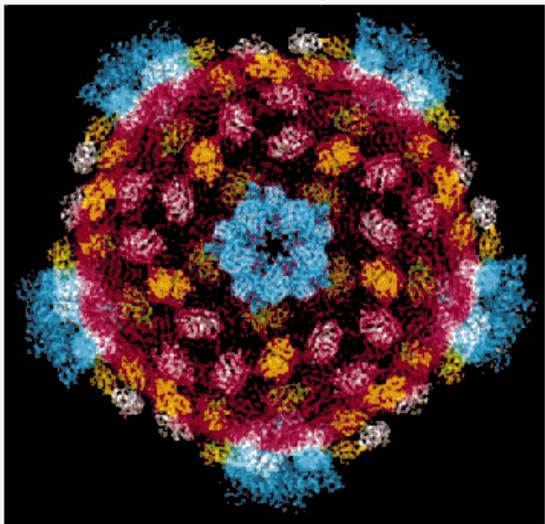
-E' necessaria una trascrittasi virale (RNA-polimerasi RNA-dipendente) per iniziare il ciclo replicativo

-Solo la catena (-)RNA del genoma viene trascritta per formare molecole di (+)RNA che hanno duplice funzione:

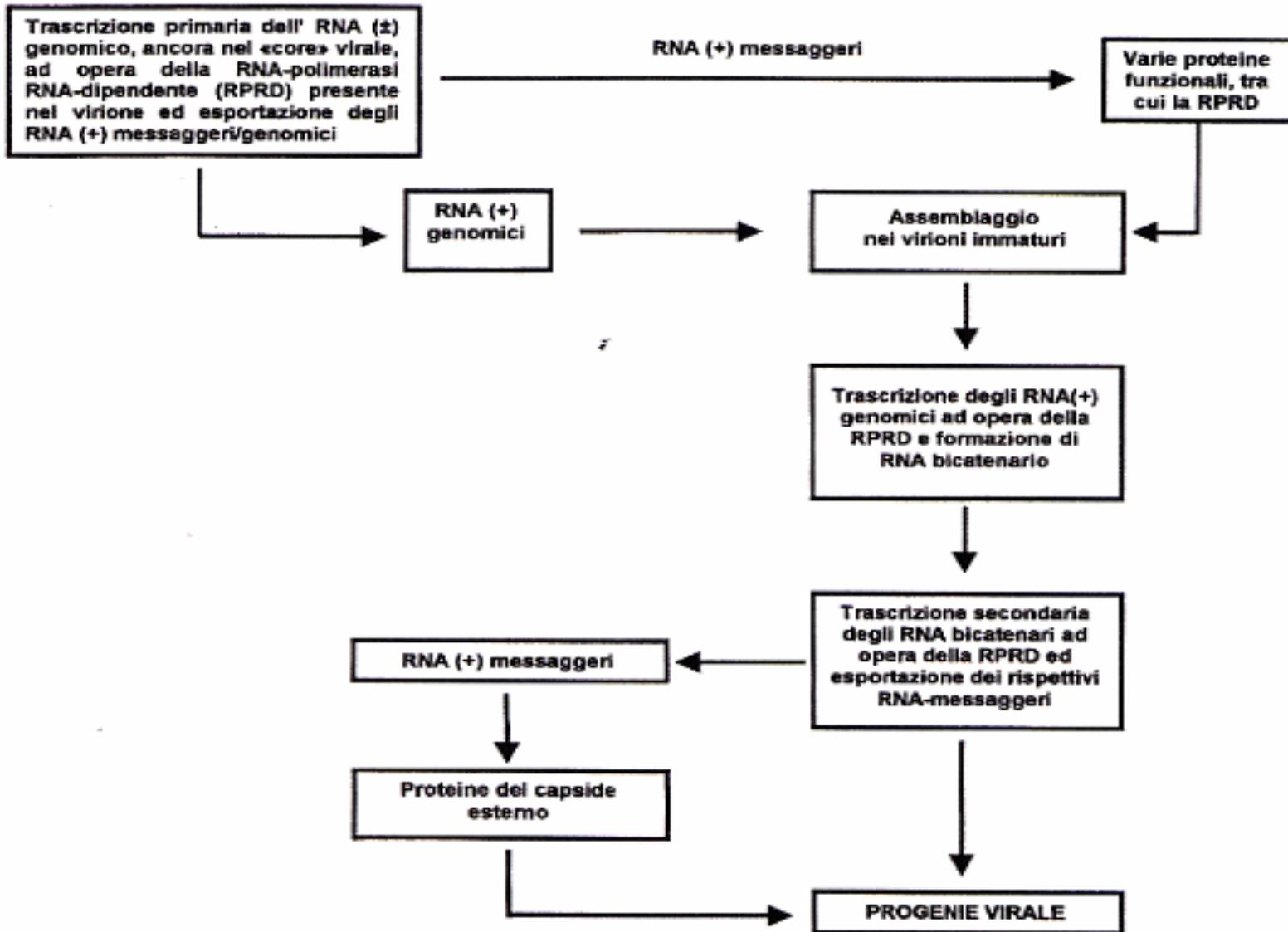
1) quella di messaggero

2) quella di stampo per la sintesi di molecole di (-)RNA complementari:

(+)RNA e (-)RNA rimangono uniti generando RNA doppio filamento del genoma virale



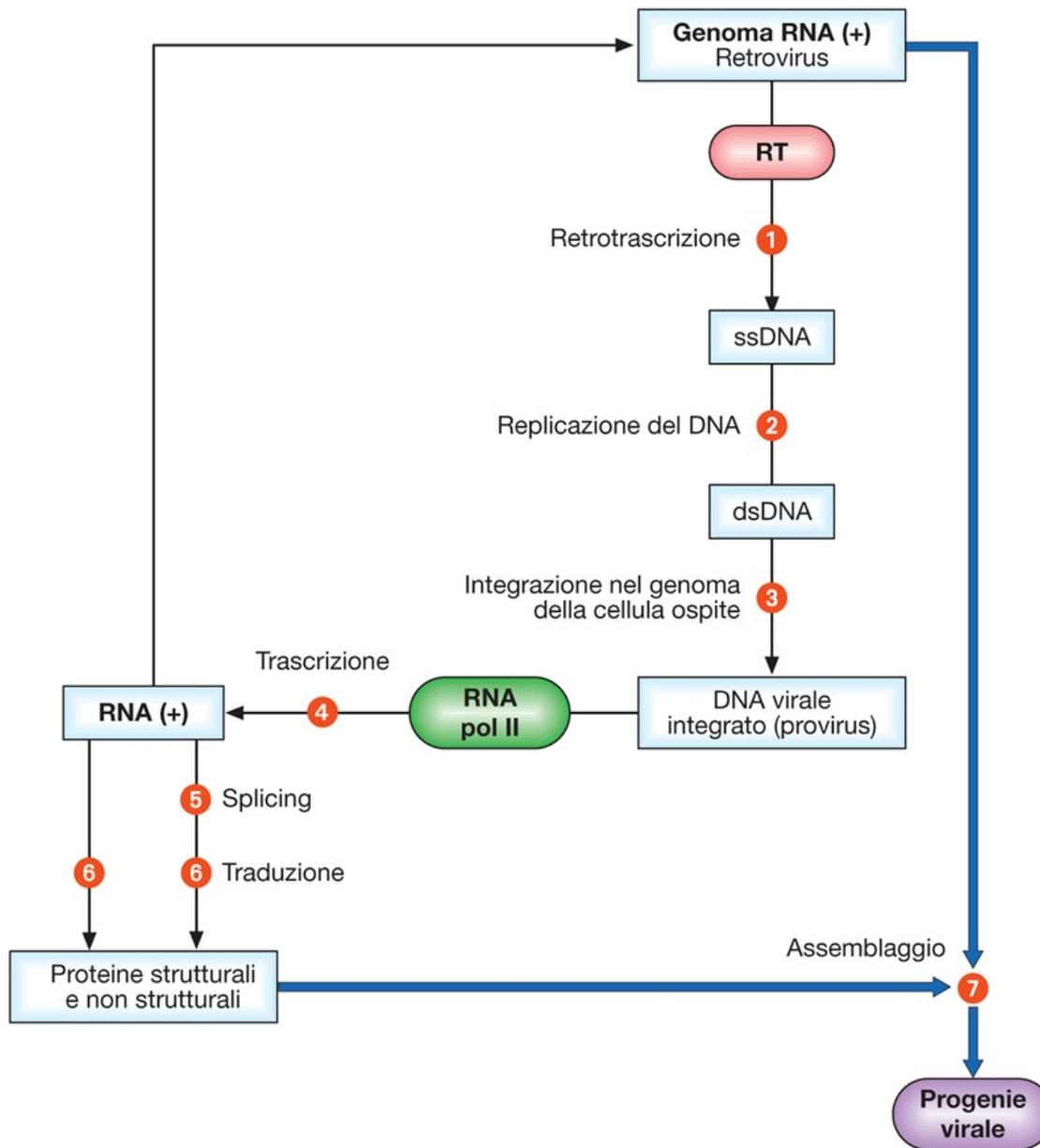
SCHEMA DELLE PRINCIPALI TAPPE DELLA REPLICAZIONE DEI REOVIRUS



RIBOVIRUS CON GENOMA DIPLOIDE: RETROVIRUS

- **2 molecole di RNA lineare a polarità positiva**, (+)RNA, legate insieme a formare un dimero
- Non funziona come mRNA
- La sola funzione dell'RNA genomico è di fungere da stampo per la sintesi di DNA bicatenario
- E' necessaria una polimerasi virale, **trascrittasi inversa**, per sintetizzare DNA a partire da RNA
- Il nuovo DNA migra nel nucleo e si integra nel genoma della cellula ospite (provirus), per mezzo di una **integrasi virale**
- Il DNA integrato può trascrivere una serie di (+)RNA: alcuni sono mRNA per la sintesi di proteine virali, altri formano il genoma della progenie virale
- Inizia il montaggio delle proteine strutturali con i genomi
- La maturazione avviene attraverso la membrana citoplasmatica
- La liberazione avviene per gemmazione

REPLICAZIONE DEI RETROVIRUS



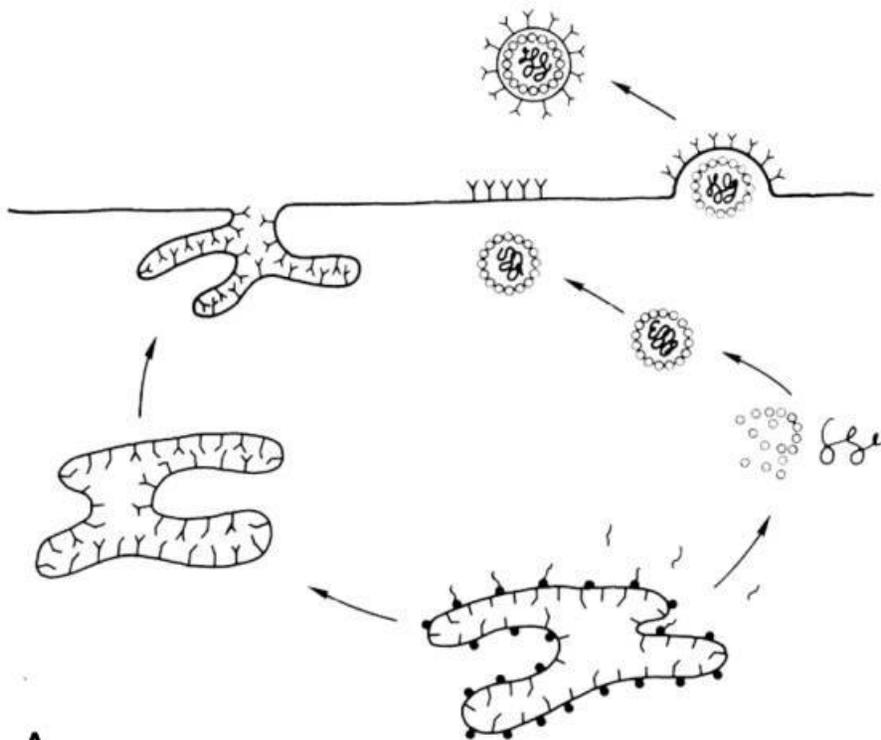
1. e 2. retrotrascrizione dell'RNA genomico in DNA ad opera della trascrittasi inversa (RT) virale
3. Integrazione del genoma virale nel DNA cellulare
4. Trascrizione del genoma virale ad opera della RNA polimerasi II
5. Splicing dell'RNA
6. Traduzione dell' mRNA (sottoposto e non a splicing)
7. Assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

5.- 6. MATURAZIONE E LIBERAZIONE

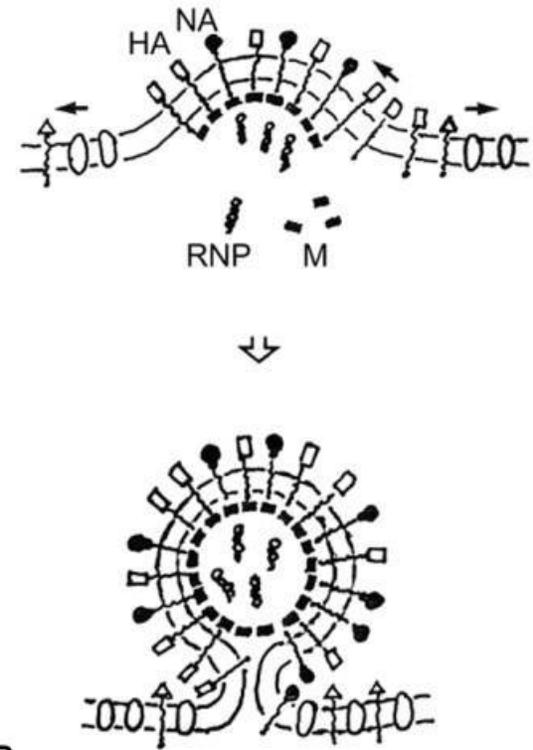
Una volta sintetizzati i genomi e le proteine, questi componenti devono associarsi in modo da **costituire i nuovi virioni**

Le nuove particelle virali **devono fuoriuscire dalle cellule** che le hanno prodotte per poter infettare altre cellule

LIBERAZIONE DI VIRUS CON ENVELOPE (I)

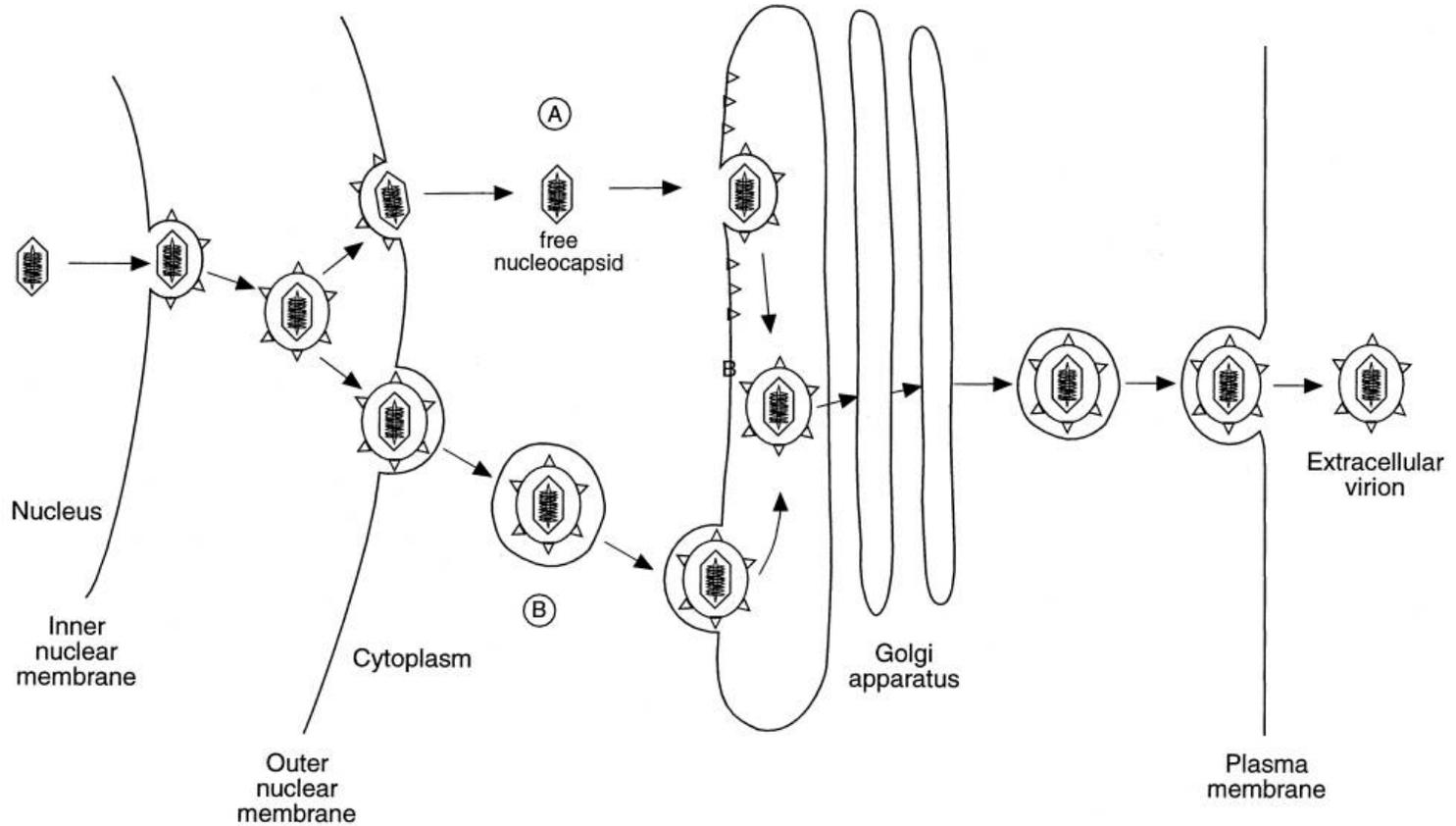
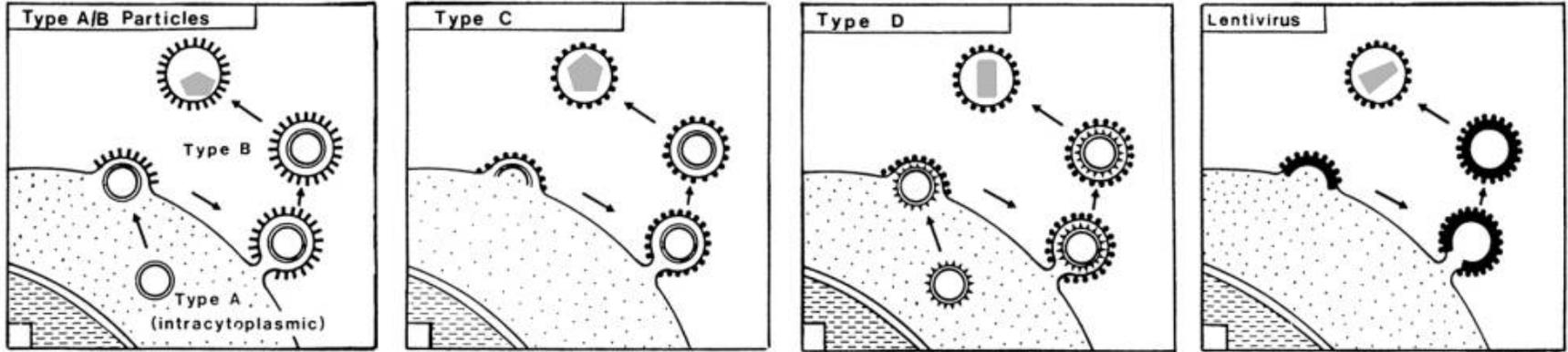


A
Biosintesi degli alfavirus

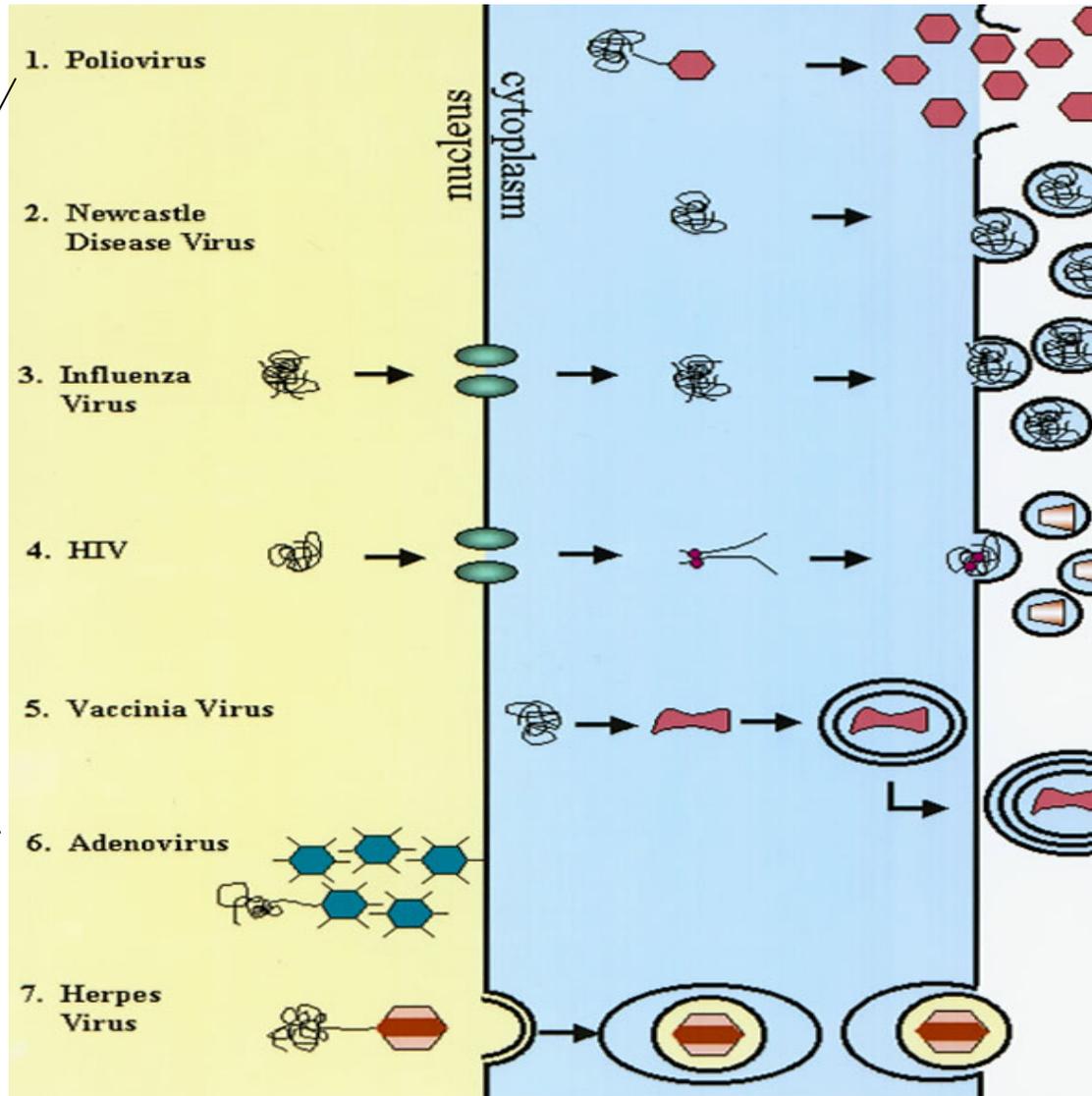


B
Liberazione del virus influenzale

LIBERAZIONE DI VIRUS CON ENVELOPE (II)



VIE DI USCITA PER DIFFERENTI CLASSI DI VIRUS



Virus **nudi** a **RNA**

Virus con **envelope** a **DNA**

Virus **nudi** a **DNA**

Virus con **envelope** a **DNA**

Lisi
cellulare

FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

