

LA REPLICAZIONE VIRALE

- I virus sono parassiti intracellulari obbligati
 - Replicazione solo in cellule "vive"
 - Attività biologica del virus = processo replicativo intracellulare
 - Protagonista = genoma virale (→ esigenze replicative diverse)
-
- Inizialmente → replicazione solo negli animali
 - Agli inizi degli anni trenta → replicazione su embrioni di pollo
 - Agli inizi degli anni sessanta → allestimento, con successo, delle prime colture cellulari

LA REPLICAZIONE VIRALE

- In generale: *"un virus penetrato in una cellula perde la propria personalità morfologica ed infettante - ECLISSI - e nessun elemento virale durante questa fase risulta possedere proprietà infettanti."*
- *Si realizzano le sintesi macromolecolari virus indotte che culminano con la produzione e maturazione di nuovi virioni → termina la fase di eclisse.*
- *I virioni, liberati dalla cellula, ripetono il processo di replicazione infettando altre cellule. → il virus si ritrova come entità biologica e morfologica perfettamente uguale al virus parentale".*

LA REPLICAZIONE VIRALE

Sono sette i momenti essenziali della vita di un virus che descrivono lo stato e la funzionalità del parassita:

- *contaminazione*
- *adsorbimento* del virione alla superficie cellulare o *attacco*
- *penetrazione*
- *esposizione* del genoma virale (uncoating)
- *sintesi* dei componenti virali (sintesi precoci e tardive)
- *assemblaggio* dei componenti virali della progenie
- *maturazione e liberazione* dei virioni completi

CONTAMINAZIONE ED ADSORBIMENTO

- La contaminazione dell'animale da parte del virus si può avere per qualsiasi via ma non altrettanto l'infezione.
- Il virus deve trovare cellule permissive.
- Contatto iniziale tra virus e cellula = ancoraggio del virus se la membrana cellulare possiede recettori esattamente complementari ai determinanti del virus (virus con envelope → peplomeri; virus nudi → capsomeri).
- Siti recettoriali cellulari → natura glicoproteica e lipoproteica.
- La distruzione di tali siti (enzimi) inibisce il fenomeno dell'adsorbimento.
- Tali siti sono anche i protagonisti di un particolare tipo di interferenza virale ("interferenza recettoriale")

CONTAMINAZIONE ED ADSORBIMENTO

- **Riconoscimento VAP (virale) - Recettore (cellulare)**
VIRAL ATTACHMENT PROTEIN (V.A.P.)

Le molecole recettoriali possono essere:

- Proteine (di solito glicoproteine) → recettori specifici
- Residui di carboidrati presenti su glicoproteine o glicolipidi → recettori meno specifici

Alcuni virus complessi usano più di un recettore e, quindi, hanno vie alternative di ingresso nelle cellule.

Esistono diverse classi di recettori, come:

- le immunoglobuline o immunoglobuline-like
- i recettori associati alle membrane
- i trasportatori e i canali di membrana

CONTAMINAZIONE ED ADSORBIMENTO

Alcuni recettori:

Immunoglobuline di transmembrana
Strutture simili alle Immunoglobuline di transmembrana
(CD4: **HIV**)
Recettori di chemochine (CCR: **HIV**)
Recettore del C' (CR2)
Decay accelerating factor (**Echovirus**)
ICAM-1 (**Rhinovirus, Coxsackie A**)
Aminopeptidasi N (**Coronavirus gruppo I**)
Glicoproteine biliari (**Coronavirus gruppo II**)
Glicoforine (**Virus Sendai**)
Acido sialico (**Virus influenzale**)
Recettore dell'acetilcolina (**Virus della rabbia**)

CONTAMINAZIONE ED ADSORBIMENTO

- I determinanti virali possono essere di natura proteica, glicoproteica o lipoproteica.
- FASE INIZIALE dell'ADSORBIMENTO (5-20 min) mediata da forze di natura elettrostatica (influenzata dalle forze ioniche dell'ambiente, dal pH e dalla temperatura) → REVERSIBILE.

Gli anticorpi neutralizzanti sono ancora in grado di neutralizzare l'infettività del virus. In caso di distacco del virus rimangono integri sia i determinanti virali che i recettori cellulari.

pH → neutro (leggermente acido può risultare vantaggioso per la cellula)

Temperatura → imp spt per la cellula. I recettori cellulari sono max mobili a 37°C (inattivazione del virus se non trova i recettori)

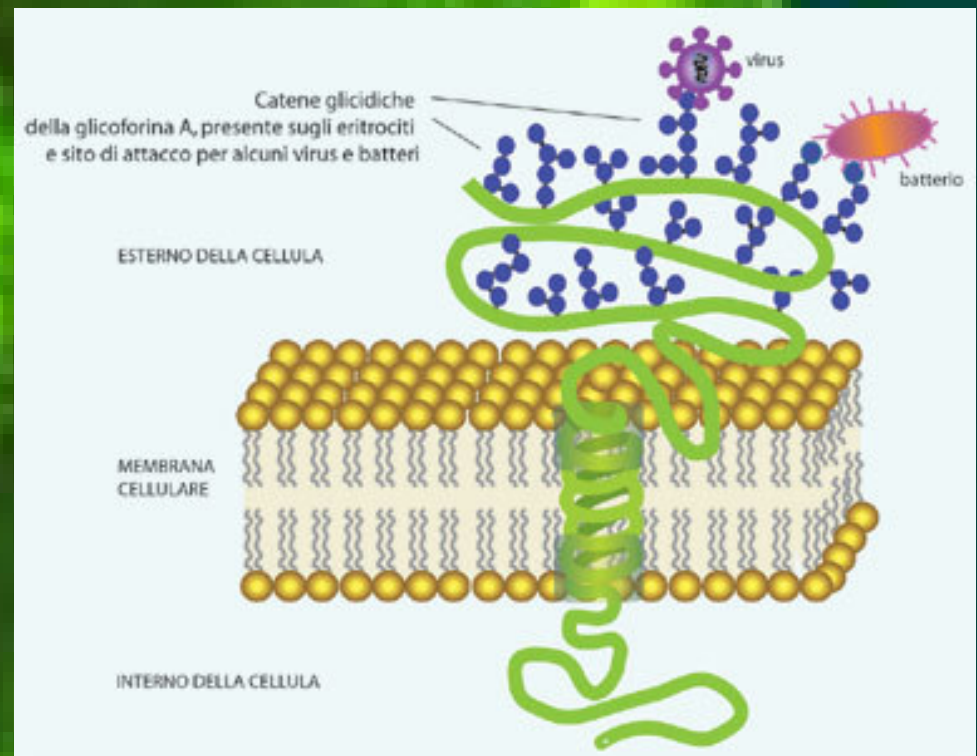
- FASE (IRREVERSIBILE) instaurazione di legami più stabili → iniziale penetrazione del virus.

CONTAMINAZIONE ED ADSORBIMENTO

- ADSORBIMENTO nell'arco di pochi minuti (anche a basse temperature 4°C e senza una partecipazione attiva della cellula).

- Non è detto che tutti i virioni adsorbiti riescano a penetrare (particelle virali difettive → determinante per adsorbire ma non per penetrare o anche incapaci di esporre il genoma o di procedere alla replicazione).

- Si parla di **unità infettanti** (in vitro → *concentrazione minima di virioni in grado di portare a termine un ciclo replicativo*; in vivo → *quantità di unità infettanti necessarie per far ammalare l'animale*)



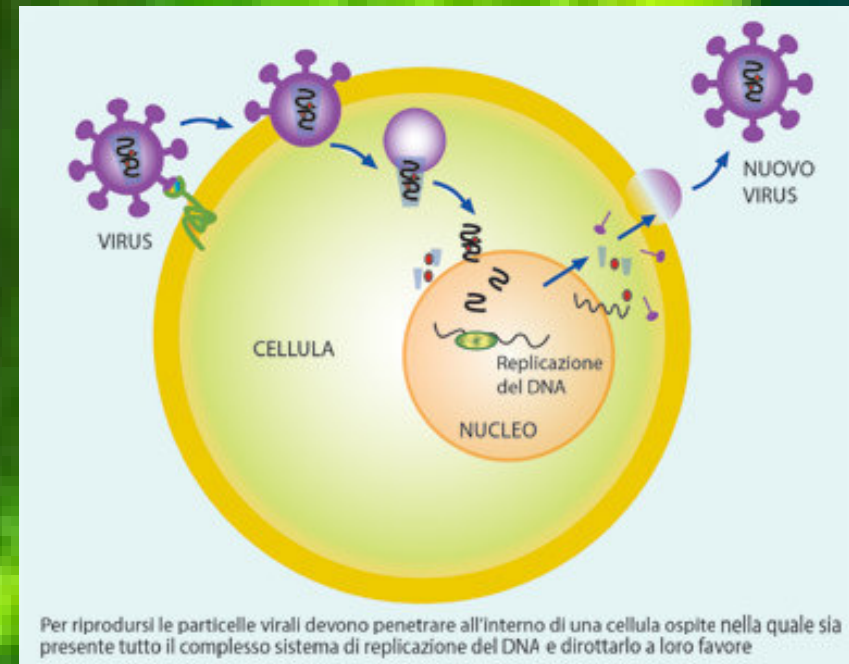
PENETRAZIONE

- All'attacco segue la **penetrazione**, spesso coadiuvata da specifici enzimi litici (lisine) che digeriscono la parete cellulare dell'ospite permettendo il rilascio del materiale virale dentro di essa.
- Parte attiva della cellula.
- Penetrazione solo a T°C permissive per l'attività metabolica della cellula.

Gli Ab neutralizzanti non hanno più effetto.

Smantellamento degli involucri virali
(I determinanti vengono digeriti.
L'envelope viene perso o modificato
Il capsido perde la sua compattezza).

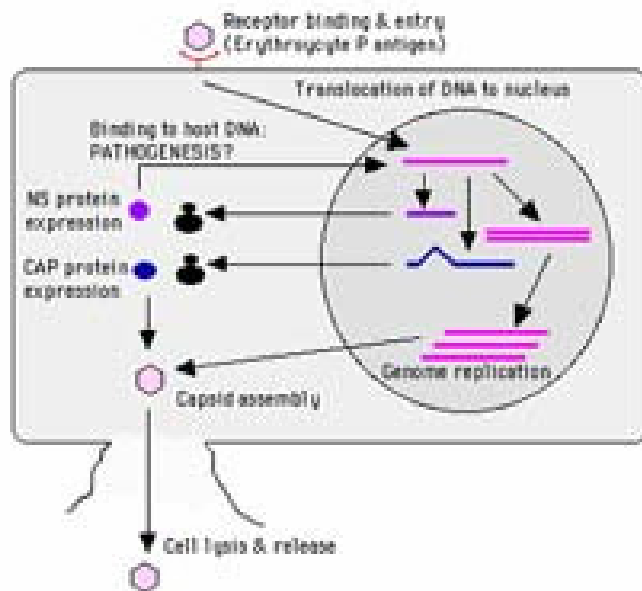
La penetrazione è tanto più rapida
quanto più la cellula è metabolicamente
attiva.



PENETRAZIONE

Modalità di penetrazione

- Traslocazione: l'intero virione viene trasferito all'interno della membrana cellulare
- Endocitosi: dell'intero virus all'interno di un vacuolo intracellulare. Imp il ruolo della CLATRINA
- Fusione: dell'envelope virale con la membrana cellulare. Richiede la presenza di una proteina di fusione virale (proteina F)



Già all'inizio della penetrazione il virus perde la sua infettività.

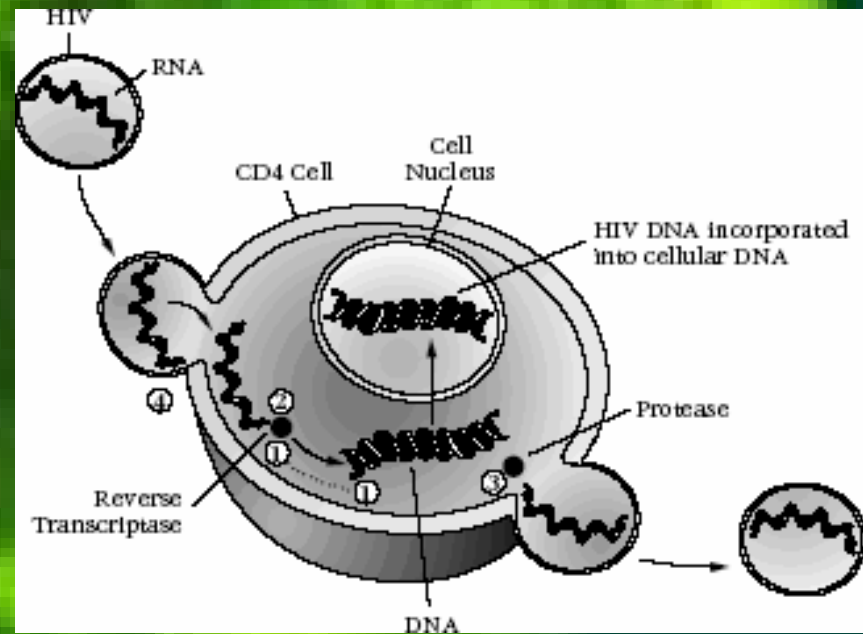
Replicazione Parvovirus

Dott.ssa ATTILI
La replicazione virale

PENETRAZIONE

1. Virus provvisti di envelope → fusione dell'envelope con la membrana citoplasmatica → liberazione del nucleocapside nel citoplasma → digestione del capsido da enzimi di membrana
2. Virus nudi → penetrazione per viropessi (pinocitosi da parte della membrana cellulare)

Paramyxoviridae → **fattore F** o fattore di fusione. Proenzima clivato ad enzima solo quando il virus è a contatto con cellule permissive. Durante la penetrazione determina lesioni della mem. citoplasmatica di cell contigue e fusione dei relativi lembi → sincizio



ESPOSIZIONE DEL GENOMA VIRALE (Uncoating)

- Si completa l'eliminazione degli involucri proteici (enzimi proteolitici cellulari e eventualmente completato da enzimi "virus-indotti")
- esposizione del genoma virale → fase di ECLISSI

Particella virale non più morfologicamente evidenziabile e il materiale virale presente nella cellula non ha proprietà infettante.

Prima della completa eliminazione delle proteine capsidiche, il genoma virale è già in grado di trascrivere alcune info per la sintesi delle proteine "precoci", tra le quali c'è l'**enzima uncoating** (deputato alla completa eliminazione delle proteine strutturali del virus).

ESPOSIZIONE DEL GENOMA VIRALE (Uncoating)

PERCORSO INTRACELLULARE dei virus a DNA :

- il nucleocapside si porta nel citoplasma e poi nel nucleo.
- la trascrittasi (RNA polimerasi-DNA dipendente) presente nel nucleo permette di trascrivere il messaggio genetico per l'enzima uncoating.
- altri virus a DNA sono provvisti di trascrittasi propria (*Poxviridae*) per cui già nel citoplasma possono indurre la sintesi dell'enzima → uncoating nel citoplasma e poi il nucleocapside si porta nel nucleo.

PERCORSO INTRACELLULARE dei virus a RNA :

- virus che possiedono un RNA monocatenario di segno positivo (in grado cioè di fungere da messaggero) → il nucleocapside si porta nel citoplasma e poi nel nucleo.
- virus che possiedono una propria trascrittasi (> dei casi).

SINTESI DEI COMPONENTI VIRALI

Successivamente alla fase di uncoating, il genoma parentale fornisce info per la sintesi di proteine o enzimi virali aventi la fx di innescare la replicazione dell'ac. nucleico virale e di inibire le sintesi macromolecolari della cell. ospite → **sintesi delle proteine precoci** (proteine funzionali; prima manifestazione della replicazione virale).

→ il genoma virale della progenie codifica per le **proteine tardive** (proteine strutturali ed eventuali proteine con fx inibitorie sulla sintesi delle macromolecole virus indotte).

La replicazione del genoma virale coinvolge il nucleo (virus a DNA) e il citoplasma (virus a RNA; eccezione Fam. *Orthomyxoviridae* e Gen. *Morbillivirus*).

→ Trascrizione del genoma virale in mRNA

→ traduzione dei messaggi virali in proteine

→ replicazione del genoma virale.

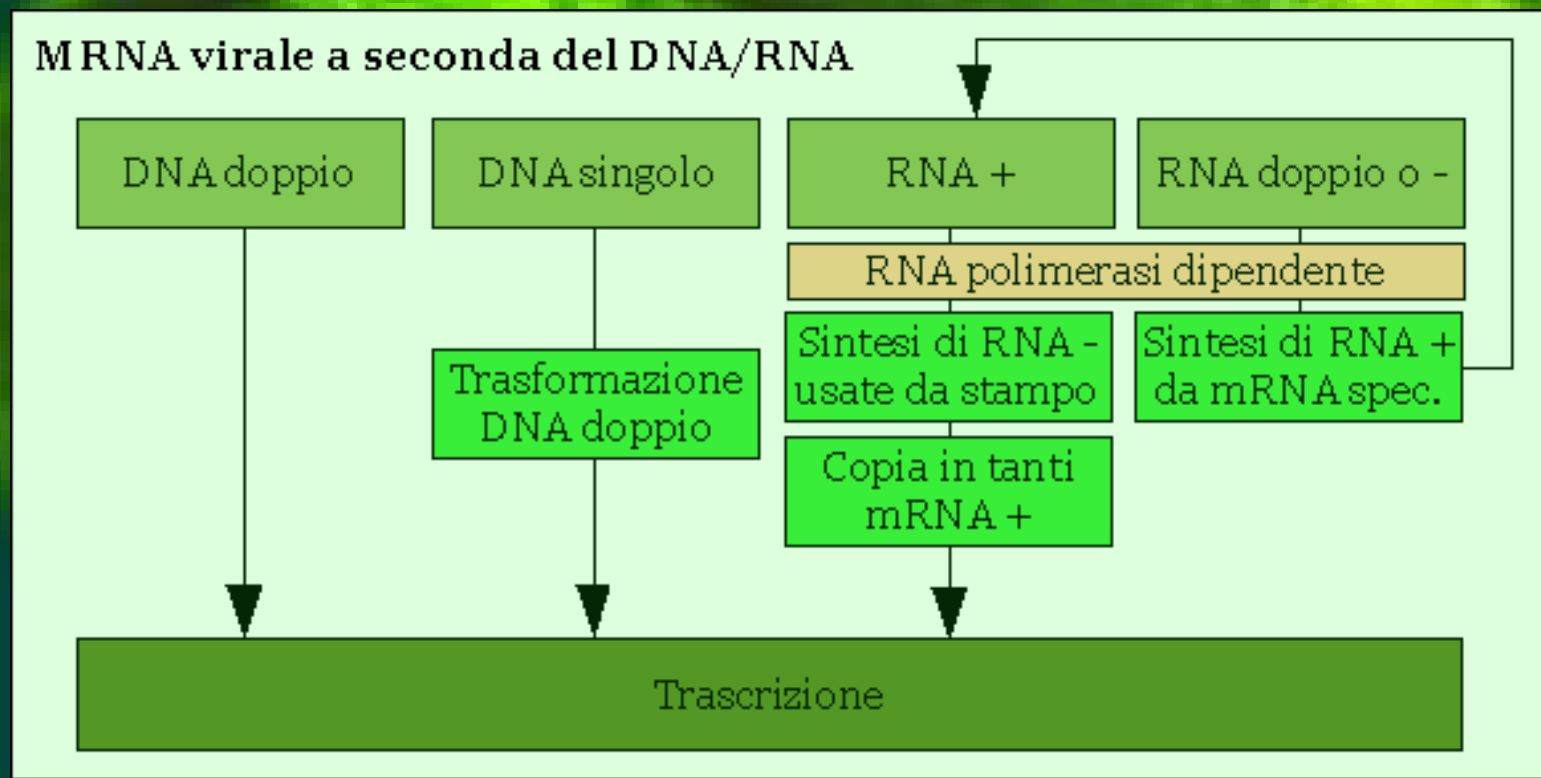
SINTESI DEI COMPONENTI VIRALI

SINTESI PRECOCI

- **Polimerasi II** o **replicasi** - necessaria al virus per la sintesi del proprio genoma al fine di formare il genoma della progenie (i virus non possono utilizzare quella cellulare)
- **Nucleasi** - stabiliscono la lunghezza dell'ac. nucleico
- enzimi che regolano la formazione dei polisomi
- enzimi che spostano i polisomi nella sede adatta (sintesi in posizione paranucleare, a ridosso della m. citoplasmatica o associati ad organuli cellulari)
- enzimi che regolano le vie metaboliche cellulari
- enzimi che autoregolano le sintesi macromolecolari del virus
- enzimi di clivaggio.

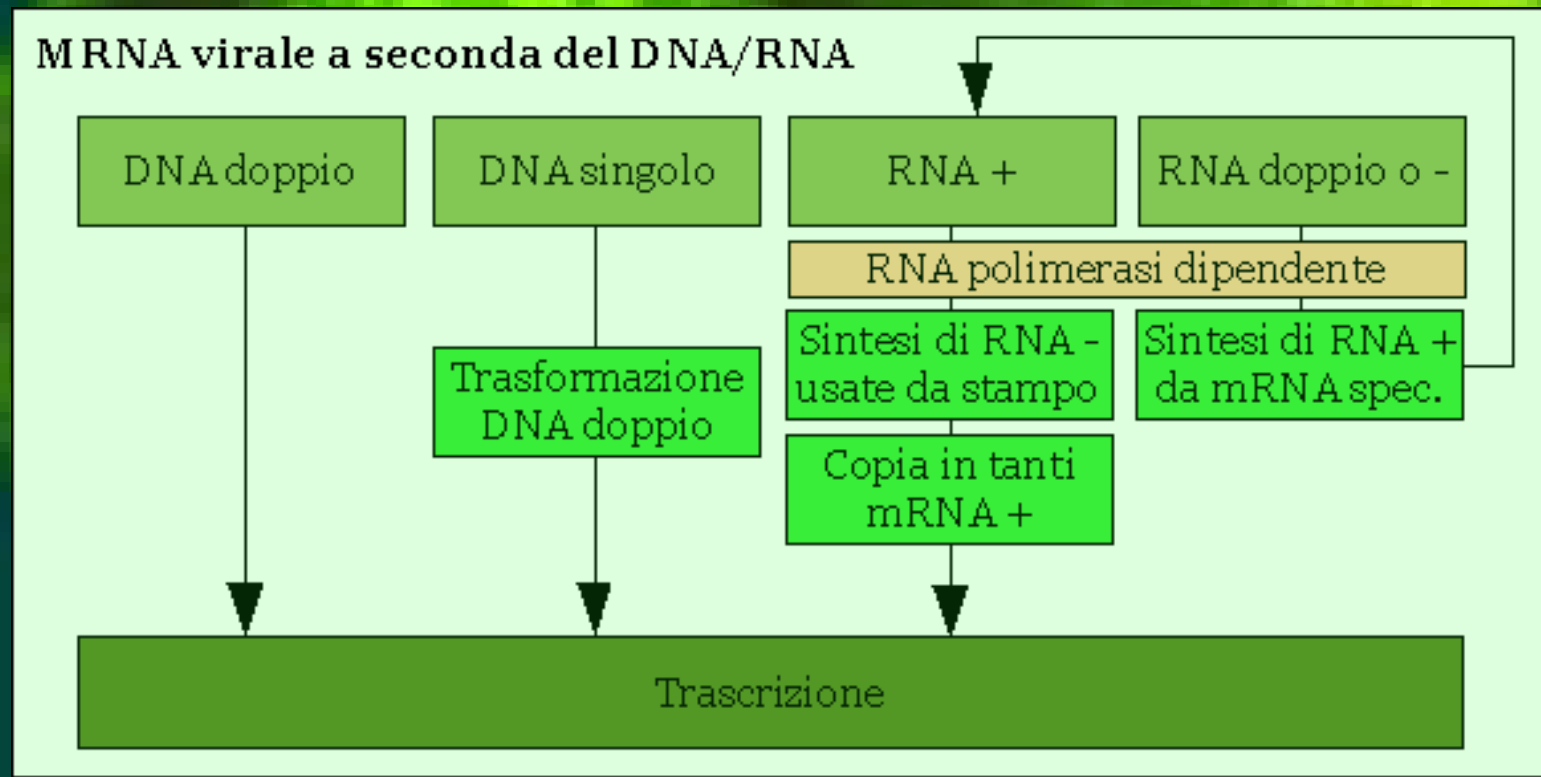
Nella cellula l'enzima che presiede alle sintesi di mRNA è la RNA polimerasi-DNA dipendente che ha sede nel nucleo. E' una molecola altamente specifica e capace di lavorare esclusivamente con una doppia elica di DNA.

- virus a DNA a doppia elica
- virus a DNA a singola elica (conversione a DNA a doppia elica).



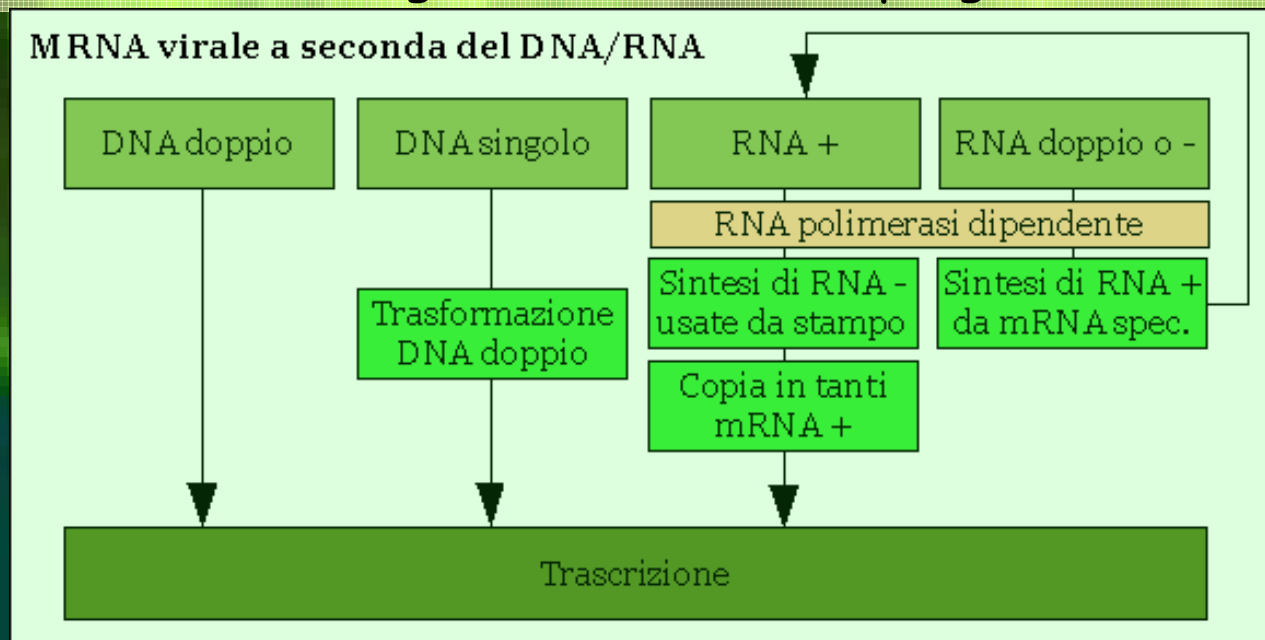
SINTESI DEI COMPONENTI VIRALI

- **virus a RNA** → la molecola di RNA polimerasi, originariamente presente nella cellula, non funzionerà affatto e per portare a termine la sintesi proteica è necessario che il virus si affidi ad una molecola di RNA polimerasi dipendente.



SINTESI DEI COMPONENTI VIRALI

- **virus a RNA +** (uguale all'mRNA) → vengono automaticamente sintetizzate molecole di RNA - che, a loro volta, risintetizzano molecole di RNA +.
- **virus a RNA a doppia elica** oppure di polarità - → viene prodotta una polimerasi che codifica per una seconda catena detta catena operativa di segno opposto alla prima → si forma una forma bcatenaria detta **RF** o **Forma Replicativa** o intermedio replicativo instabile, che funge da template per la sintesi del genoma virale della progenie.



SINTESI DEI COMPONENTI VIRALI

LE CLASSI DI REPLICAZIONE

- Ia:** Double-stranded DNA (es: Adenoviruses; Herpesviruses)
- Ib:** Double-stranded DNA con propria RNA polimerasi-DNA dipendente (Poxviruses)
- II:** Single-stranded (+)sense DNA (Parvoviruses)
- III:** Double-stranded RNA (Reoviruses; Birnaviruses)
- IV:** Single-stranded (+)sense RNA (es: Picornaviruses; Togaviruses)
- V:** Single-stranded (-)sense RNA (es: Orthomyxoviruses, Rhabdoviruses)
- VI:** Single-stranded (+)sense RNA with DNA intermediate in life-cycle
→ trascrittasi inversa (Retroviruses)
- VII:** Double-stranded DNA with RNA intermediate (Hepadnaviruses)

ASSEMBLAGGIO, MATURAZIONE E LIBERAZIONE DEI VIRIONI COMPLETI

L'assemblaggio:

- ha inizio quando è stato prodotto un numero sufficiente di copie del genoma virale e delle proteine strutturali.
- comporta la definizione morfologica esatta del capside completo non più sensibile all'azione degli enzimi proteolitici.
- implica la raccolta di tutti i componenti necessari per la formazione del virione maturo in un punto particolare della cellula (viroplasma) dove si forma la struttura di base della particella **virale**.
- il sito di assemblaggio dipende dal sito di **replicazione** e dal meccanismo usato dal virus per uscire dalla cellula

ASSEMBLAGGIO, MATURAZIONE E LIBERAZIONE DEI VIRIONI COMPLETI

Maturazione:

- fase avanzata dell'assemblaggio.
- completo montaggio delle strutture virali.
- termina con il fissaggio del genoma al capsido o con l'avvolgimento del capsido da parte dell'envelope.

SEDI di maturazione:

- a ridosso della membrana nucleare (es: *Herpesvirus*)
- nel complesso membranario della cellula (es: *Orthomyxovirus*)
- in posizione paranucleare dalla parte del citoplasma
- a ridosso della membrana citoplasmatica

Liberazione della progenie virale

Il rilascio prevede la rottura di piccole porzioni della membrana cellulare dell'ospite dalla quale fuoriusciranno i virus, nudi o con involucro, pronti ad attaccare altre cellule viventi.

Per i **virus litici** (la maggior parte dei virus senza pericapside) il rilascio all'esterno della particella neoformata è un processo semplice: accumulo di virioni neoformati in corrispondenza del punto di maturazione (strutture paracristalline) → la cellula si rompe rilasciando il contenuto all'esterno.

Per i virus provvisti di envelope → progenie liberata a getto continuo attraverso la membrana cellulare variamente modificata, per la presenza di proteine virali (virus-indotte) dalla quale il virione assume l'involucro lipoproteico esterno (**GEMMAZIONE** o budding). In questo caso il processo di maturazione coincide con quello di liberazione.

Per i **virus non litici** coesistono due meccanismi:
ESOCITOSI E GEMMAZIONE

Liberazione della progenie virale

Liberazione anche attraverso altri meccanismi.

- *Herpesvirus* → envelope nel nucleo per poi fuoriuscire per digitazione della membrana nucleare a formare dei canalicoli che permettono al virus di raggiungere la mem. citoplasmatica senza attraversare il citoplasma.

Tutti i virus lasciano una traccia dell'avvenuta maturazione.

Effetto citopatico dato da:

- lisi della cellula
- inclusi nucleari o citoplasmatici (in base alla sede di assemblaggio del virus)
- vacuoli citoplasmatici o nucleari
- sincizi