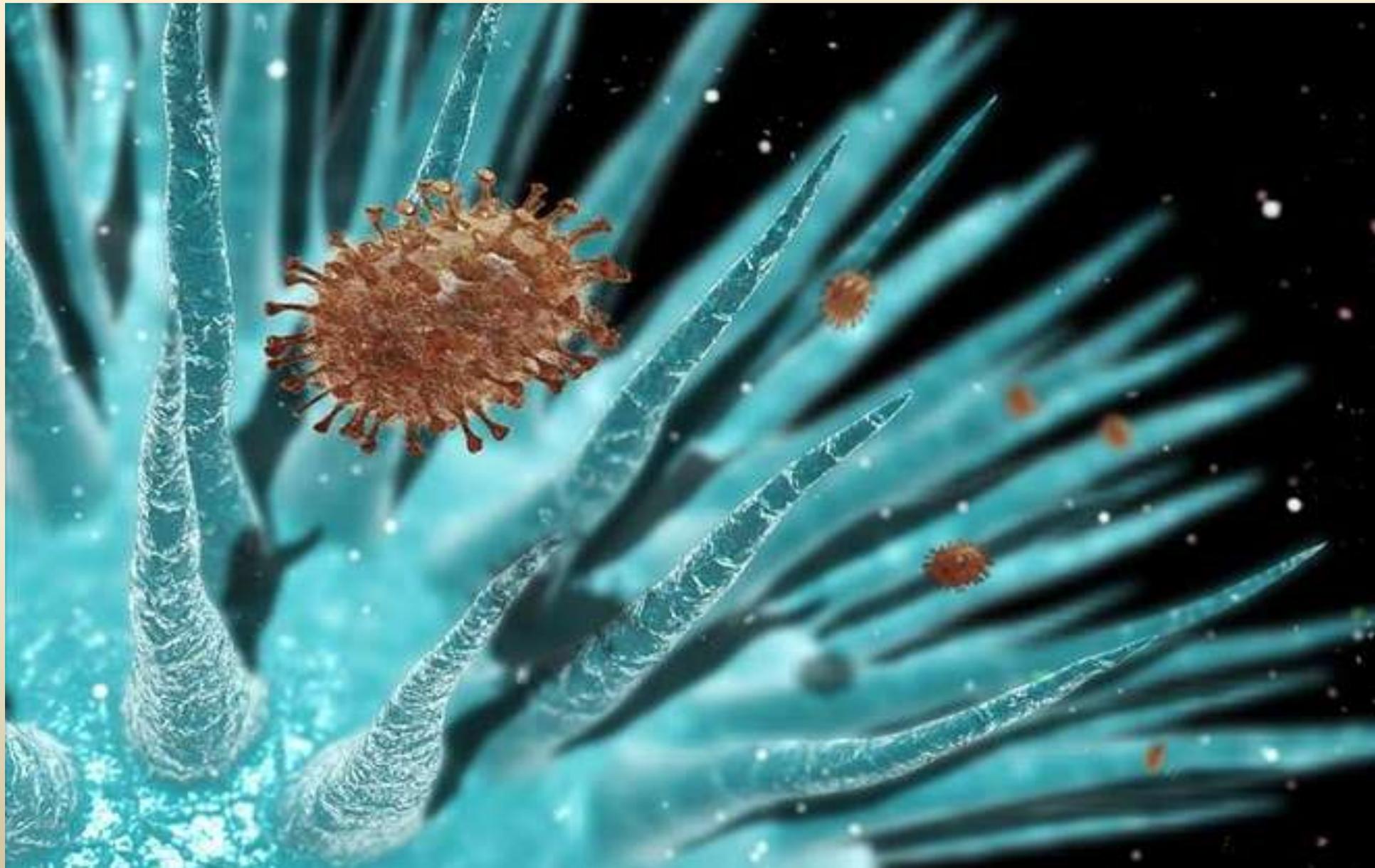


MOLTIPLICAZIONE DEI VIRUS



Un virus può riprodurre se stesso soltanto se penetra in una cellula ospite **suscettibile** e **permissiva** all'infezione virale.

MOLTIPLICAZIONE DEI VIRUS

Qualche definizione:

- **Spettro d'ospite:** animale o cellula che può essere infettata dal virus
- **Suscettibilità:** capacità di essere infettati
- **Permissività:** capacità di trascrivere il genoma ed esprimere tutte le proteine virali
- **Infezione produttiva:** quando viene prodotta una progenie virale infettante (cellule suscettibili e permissive)
- **Infezione abortiva:** ciclo non completo (virus difettivo o cellula non permissiva)

Cellule suscettibili possono essere non permissive

Una cellula infettata produttivamente può produrre fino a 100.000 particelle virali (es. poliovirus), ma spesso il processo di infezione produttiva non è efficiente. Perché?

Table 2.2 Particle-to-PFU ratios of some animal viruses

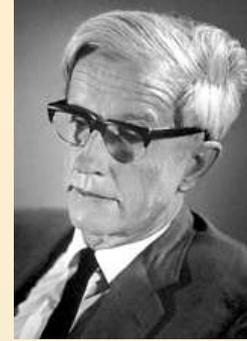
Virus	Particle/PFU ratio
<i>Adenoviridae</i>	20–100
<i>Alphaviridae</i>	
Semliki Forest virus	1–2
<i>Herpesviridae</i>	
Herpes simplex virus	50–200
<i>Orthomyxoviridae</i>	
Influenza virus	20–50
<i>Papillomaviridae</i>	
Papillomavirus	10,000
<i>Picornaviridae</i>	
Poliovirus	30–1,000
<i>Polyomaviridae</i>	
Polyomavirus	38–50
Simian virus 40	100–200
<i>Poxviridae</i>	1–100
<i>Reoviridae</i>	
Reovirus	10

Il rapporto virioni infettanti/particelle totali è circa 1/1000 nei picornavirus, 1/200 negli herpesvirus; molte particelle sono incomplete, o defettive.



risultato di mutazioni o di errori di produzione ed assemblaggio del virione

CICLO REPLICATIVO VIRALE

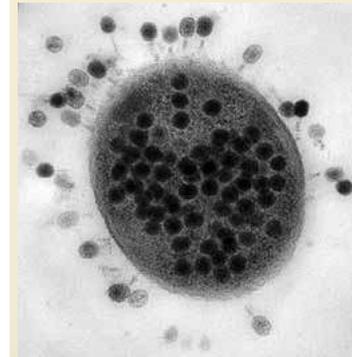
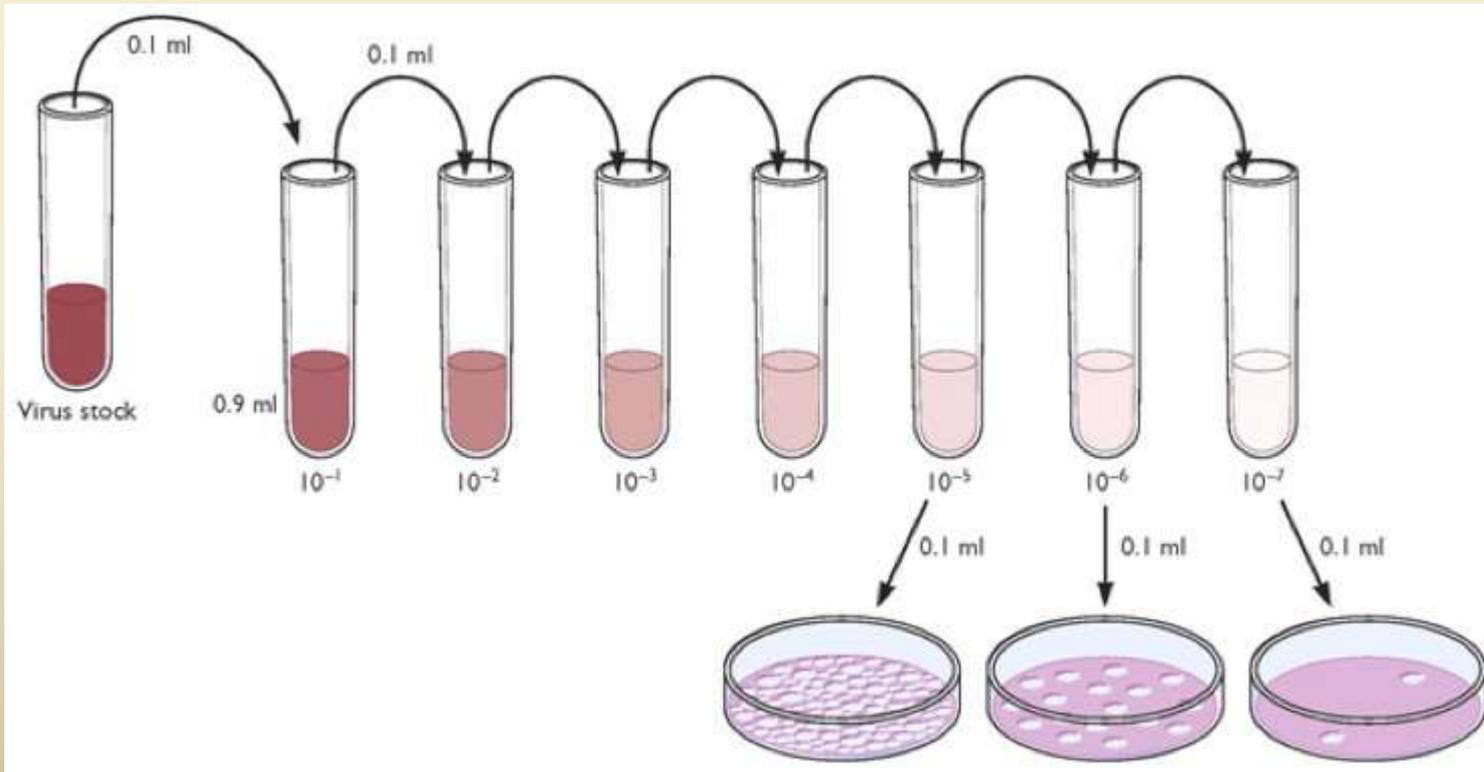


Delbrück, premio Nobel 1969 per le sue scoperte sulla replicazione virale

Esperimento di Ellis and Delbrück, 1939:

Infezione di E. coli con fago ad alta molteplicità di infezione (m.o.i.), per avere infezione simultanea di tutte le cellule.

Prelievo di campioni ad intervalli regolari per contare il numero di fagi (PFU – unità formanti placca).

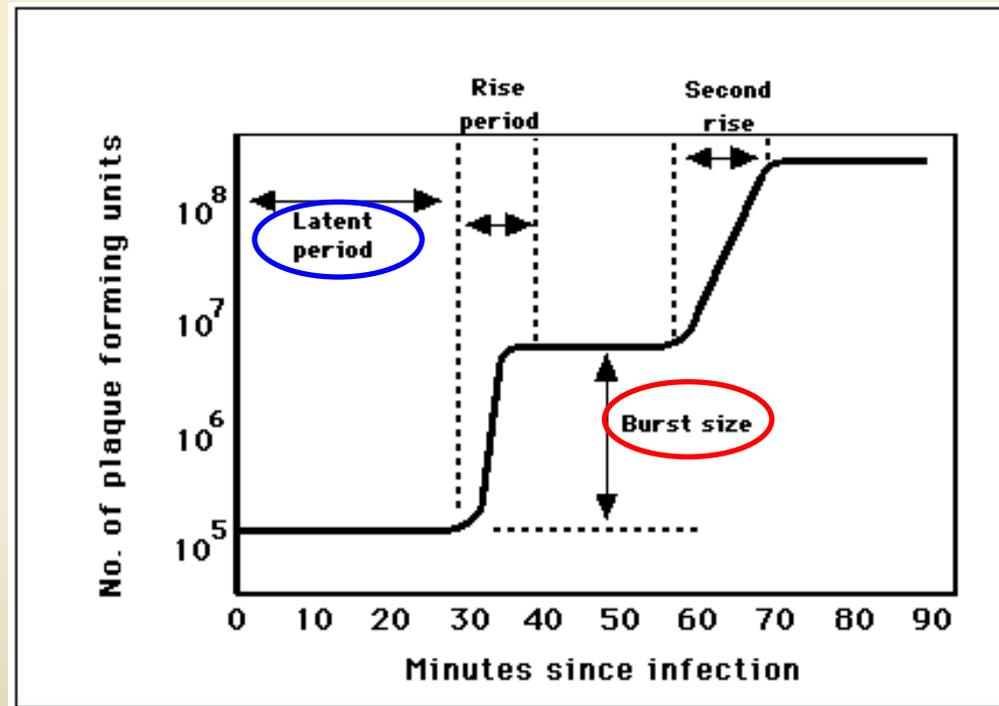


CICLO REPLICATIVO VIRALE

(Ellis and Delbruck, 1939)

Identificazione di una fase di **LATENZA** (o eclisse), e di una fase di **CRESCITA**

I virus si moltiplicano “**one step**” (improvvisamente di alcuni log), e non gradualmente ed esponenzialmente come fanno gli organismi cellulari.



Nella fase di **latenza** il virus è entrato nella cellula, il genoma è stato esposto, stanno avvenendo le sintesi virali e non si trova virus infettante. Nella fase di **crecita** c'è la liberazione della progenie infettante, con l'inizio di un nuovo ciclo replicativo (2° rise)

CONFRONTO CRESCITA VIRUS-BATTERI

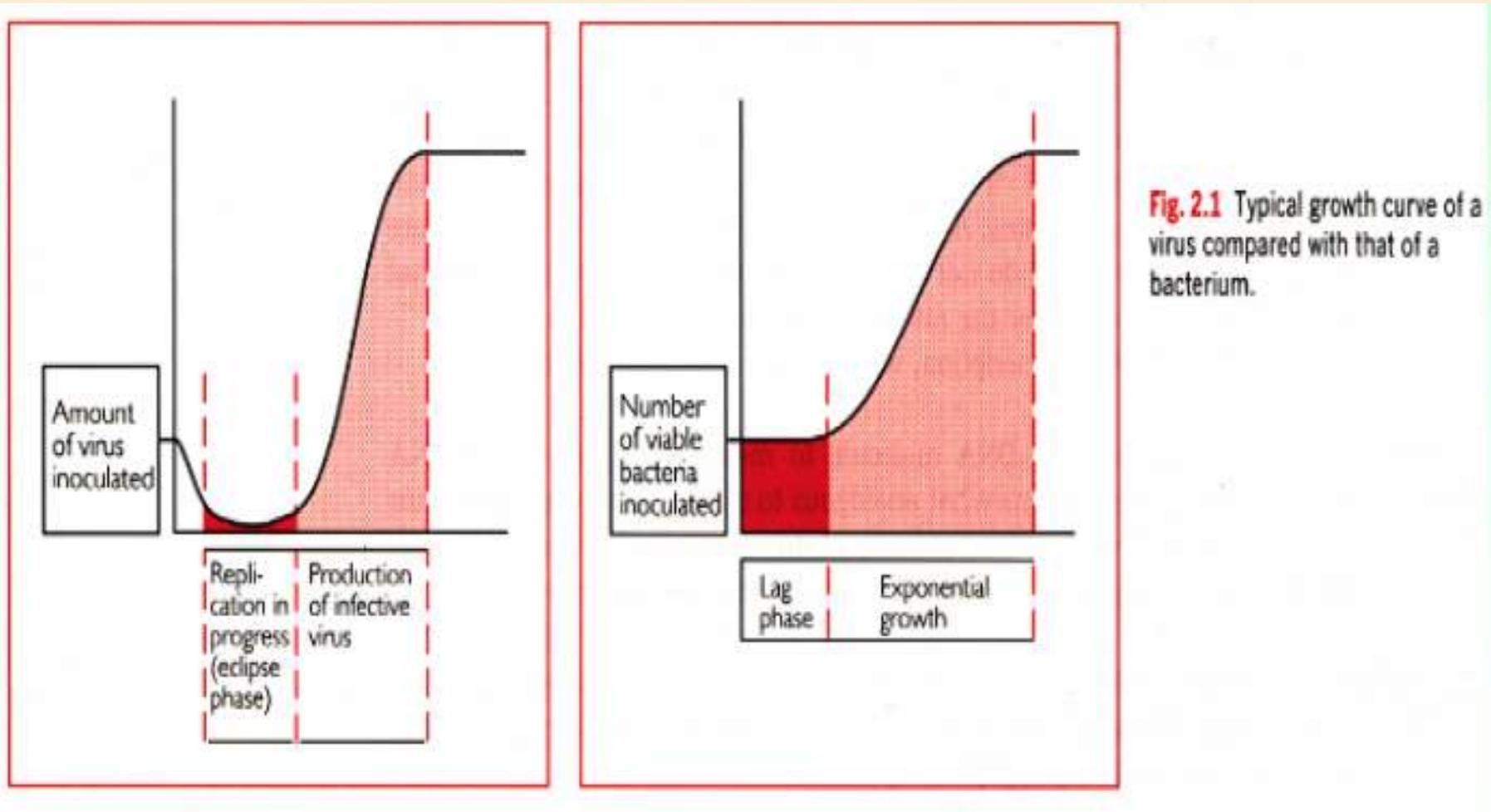
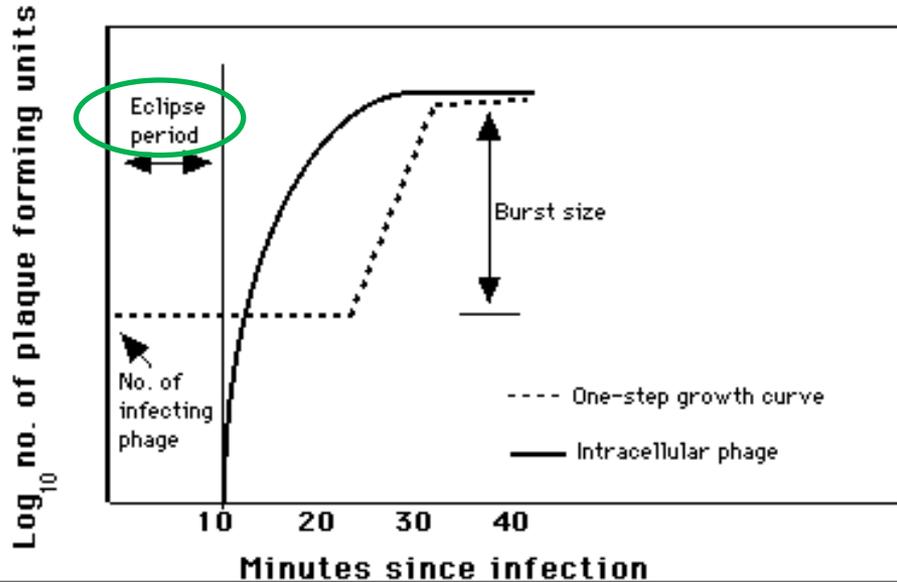


Fig. 2.1 Typical growth curve of a virus compared with that of a bacterium.

CICLO REPLICATIVO VIRALE

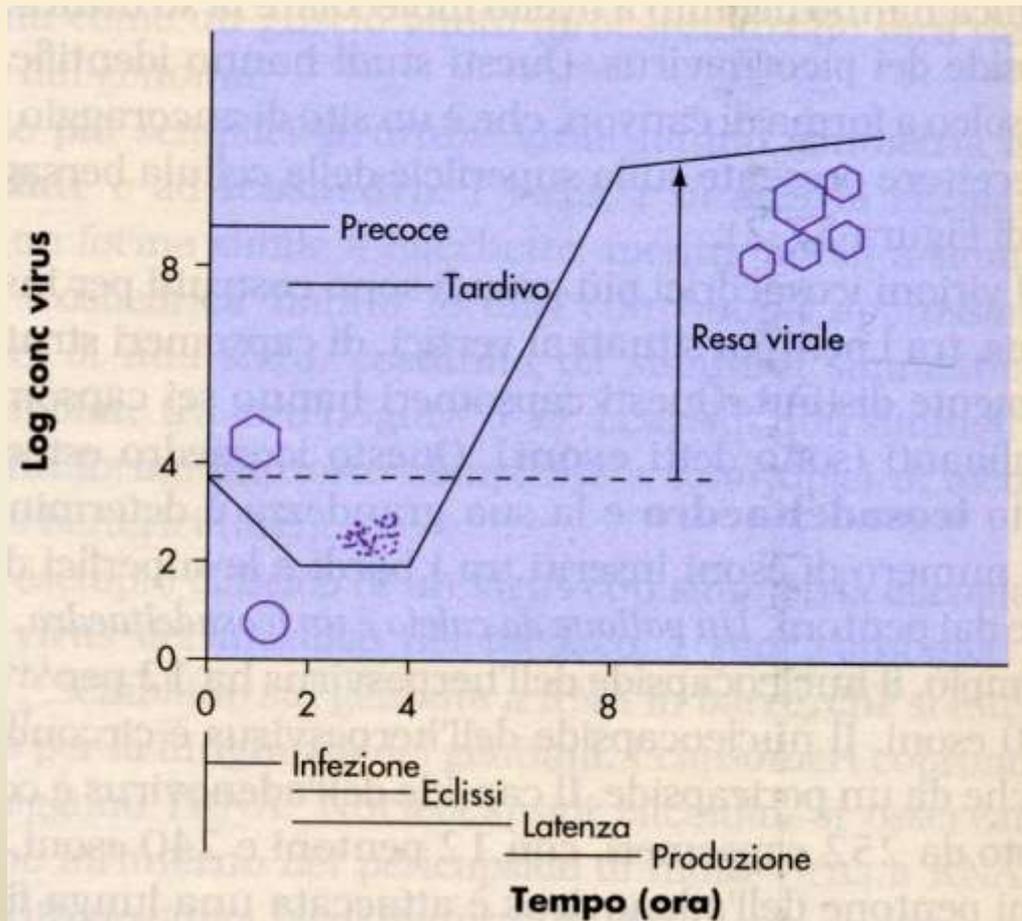
Doermann, 1952



Questi risultati, ottenuti dallo studio dei fagi, sono validi anche per tutti i virus degli organismi eucariotici

Identificazione della fase di ECLISSE:
se si misura la quantità di virus intracellulare, subito dopo l'infezione di cellule, per alcune ore sembra scomparire o se ne ritrova molto poco: fase in cui il virus perde l'integrità fisica e l'infettività, il genoma virale è esposto alla macchina metabolica cellulare e la progenie virale deve ancora essere prodotta.
Alla fase di eclisse segue una fase esponenziale, in cui le nuove particelle virali maturano, si accumulano nella cellula, e vengono poi rilasciate (burst).

Curva di crescita di un singolo ciclo replicativo virale

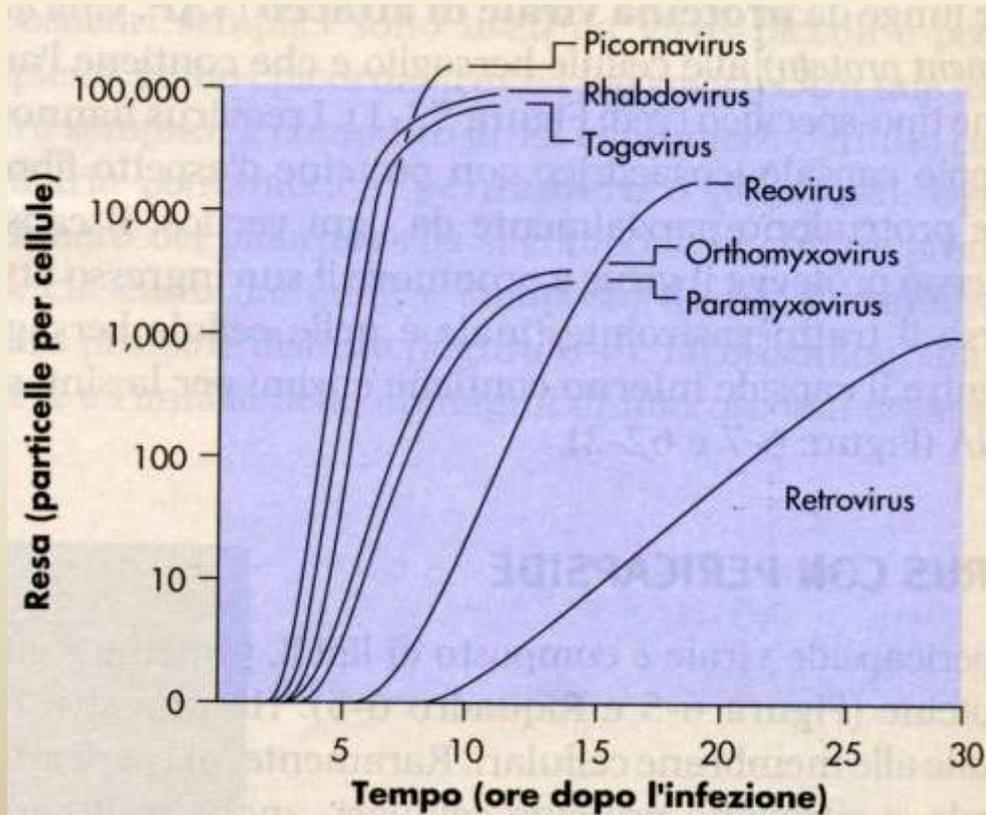


Dal momento dell'infezione ($t=0$), le diverse fasi sono definite da:

- **fase di ECLISSE:** assenza di componenti virali rilevabili
- è inclusa nella **fase di LATENZA**, al cui interno si ha la fase di sintesi macromolecolare (**fase PRECOCE/TARDIVA**)
- **Produzione:** presenza di virus infettante nel mezzo di coltura

Durata del ciclo replicativo

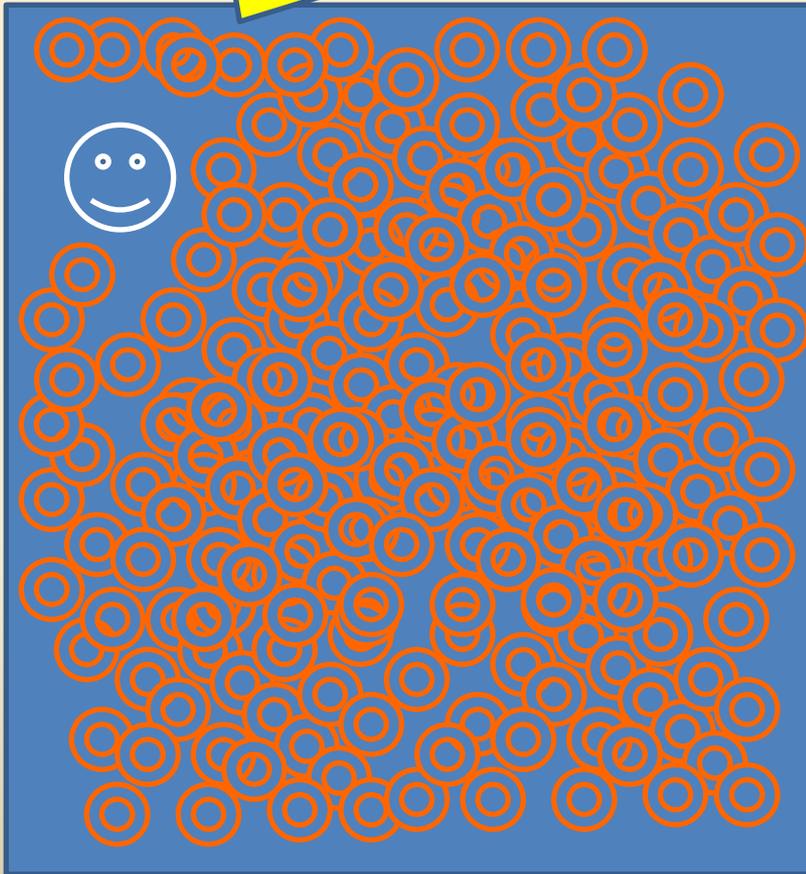
Il tempo che passa fra infezione di una cellula ed il rilascio della progenie virale infettante varia nei diversi virus, e dipende anche dalla fase del ciclo cellulare in cui si trova la cellula al momento dell'infezione.



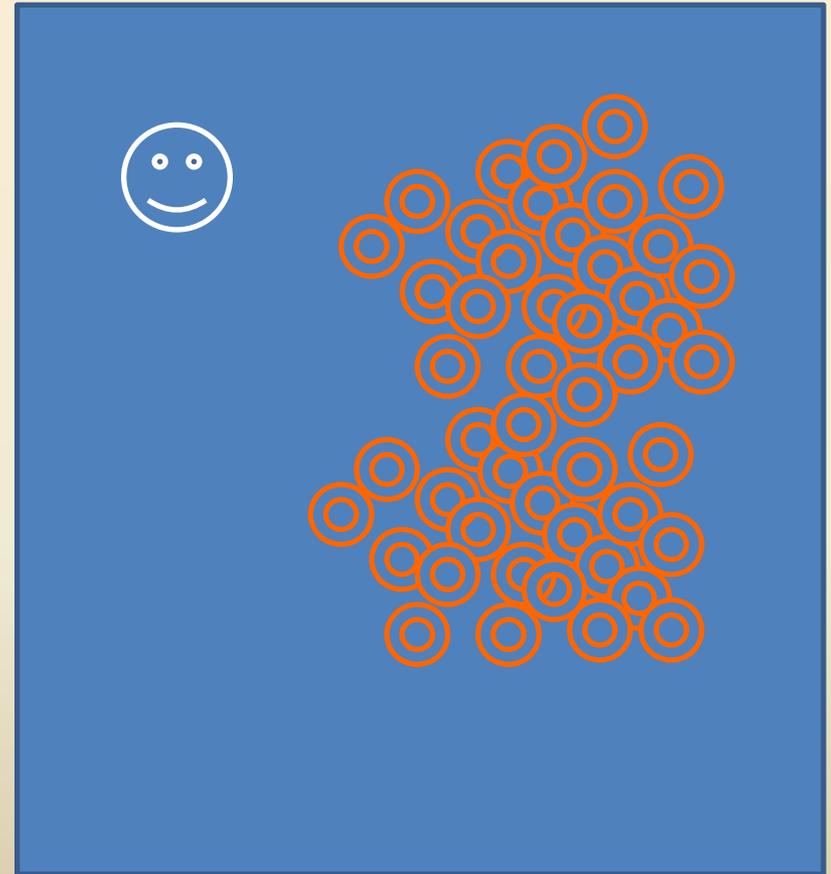
In linea di massima, varia da 6-7 ore (Picornavirus) a 18-20 ore (herpes simplex) a due-tre giorni (Citomegalovirus)

In 5 ore: da 1 unità virale → fino a 100.000 unità (one step)
da 1 unità batterica → 1024 unità (log)

Viral growth = Massive profits!



Viral growth



2x growth rate

TIPI DI INFEZIONE

A seconda delle condizioni di permissività dei vari tipi di cellule, l'infezione può essere:

1. **PRODUTTIVA**, quando viene compiuto un ciclo completo di moltiplicazione, con produzione di progenie infettante
2. **RESTRITTIVA**, quando la cellula presenta condizioni di permissività non costanti (es. fase S)
3. **LATENTE**, quando il genoma del virus si mantiene allo stato silente senza replicare, sino a che non si creino le condizioni per lo sviluppo di un ciclo
4. **ABORTIVA**, quando la cellula suscettibile non è completamente permissiva e il virus esprime solo alcuni prodotti (solitamente precoci) senza poter completare il ciclo

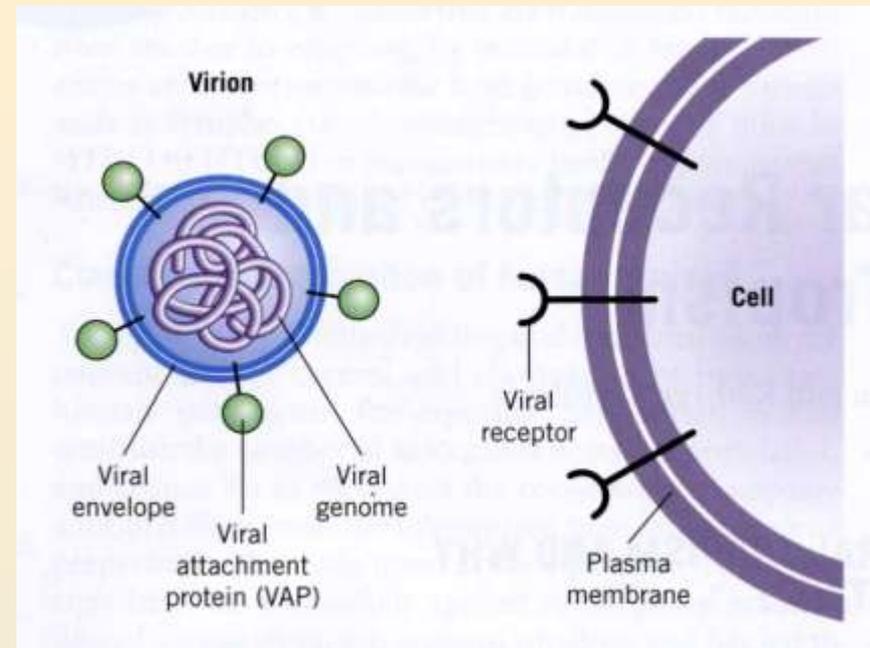
INFEZIONE PRODUTTIVA: FASI

- 1) ADSORBIMENTO (Attacco)**
- 2) PENETRAZIONE**
- 3) SPOLIAZIONE (Uncoating)**
- 4) SINTESI DELLE COMPONENTI VIRALI**
 - Proteine precoci
 - Acido nucleico
 - Proteine tardive
- 5) ASSEMBLAGGIO**
- 6) USCITA**

N.B. Si tratta di una schematizzazione per descrivere ciò che succede, ma in realtà si tratta di un processo unico, senza divisione in fasi diverse

1. Adsorbimento

Il contatto iniziale fra virus e cellula è il risultato di collisioni casuali.
Perchè la collisione si tramuti in attacco efficiente è necessario che ci sia un legame fra strutture del virus e cellulari.



Processo di **riconoscimento** delle strutture bersaglio, determina quali cellule possono essere infettate da un virus (TROPISMO).

Interazione specifica fra strutture virali (**viral attachment protein = VAP**, o antirecettore) e cellulari (**recettori**) sulla membrana plasmatica.

Processo indipendente dalla temperatura, **non richiede energia**.

1. Adsorbimento

Le caratteristiche del recettore determinano lo SPETTRO D'OSPITE: quali cellule possono essere infettate → caratteristiche della malattia e della via di trasmissione.

Esempi:

- un recettore presente *solo su linfociti* determina patologie emato-immunologiche e trasmissione ematica (HIV);
- un recettore comune su cellule di *diversi tessuti* determina patologie variabili (polmoniti, encefaliti, enteriti, ecc) e elevata trasmissibilità.

NB - I virus vegetali non usano recettori, ma entrano nelle piante attraverso danni fisici.



VAP = Antirecettore

TABELLA 6-5. Esempi di proteine virali di attacco (VAP)

Famiglia virale	Virus	VAP
Picornaviridae	Rhinovirus	VP1-VP2-VP3 complex
Adenoviridae	Adenovirus	Proteina fibra
Reoviridae	Reovirus	σ -1
	Rotavirus	VP7
Togaviridae	Semliki Forest virus	E1-E2-E3 complex gp
Rhabdoviridae	Virus della rabbia	G protein gp
Orthomyxoviridae	Virus dell'influenza A	HA gp
Paramyxoviridae	Measles virus	HA gp
Herpesviridae	Epstein-Barr virus	gp350 e gp220
Retroviridae	Murine leukemia virus	gp70
	Virus dell'immunodeficienza umana (HIV)	gp120

gp, glicoproteina; VAP, viral attachment protein.

I virus più complessi (Poxvirus, Herpesvirus) possiedono **più di un VAP** (antirecettore), e li usano per infettare diversi tipi di cellule.

Le **mutazioni** nei geni che codificano gli antirecettori possono condizionare la capacità del virus di interagire con specifici tipi cellulari.

Gli **anticorpi** diretti contro l'antirecettore "neutralizzano" la capacità infettante del virus (anticorpi neutralizzanti).

Recettori cellulari

I recettori sono strutture con funzioni specifiche e fisiologiche per la cellula, che però presentano una o più zone complementari alla VAP.

L'adsorbimento può essere facilitato da **corecettori**.

TABELLA 6-6. Esempi di recettori virali

Virus	Cellula bersaglio	Recettore*
Epstein-Barr virus	Cellule B	Recettore CR2 del frammento C3d del complemento (CD21)
Human immunodeficiency virus	Cellule T helper	Molecola CD4 e corecettori chemochinici
Rhinovirus	Cellule epiteliali	ICAM-1 (proteina della superfamiglia delle immunoglobuline)
Poliovirus	Cellule epiteliali	Proteina della superfamiglia delle immunoglobuline
Herpes simplex virus	Molte cellule	Proteina della superfamiglia delle immunoglobuline
Virus della rabbia	Neuroni	Recettore dell'acetilcolina
Virus dell'influenza A	Cellule epiteliali	Acido sialico
B19 parvovirus	Precursori eritroidi	Antigene P eritrocitario (globoside)

ICAM-1, Intercellular adhesion molecule.

*Per questi virus possono esistere anche altri recettori.

Esempio: Rhinovirus

VAP = VP1, 2 e 3

Recettore cellulare = ICAM-1

In ogni monomero del capside c'è un avvallamento (“canyon”) in cui si inserisce la molecola ICAM-1.

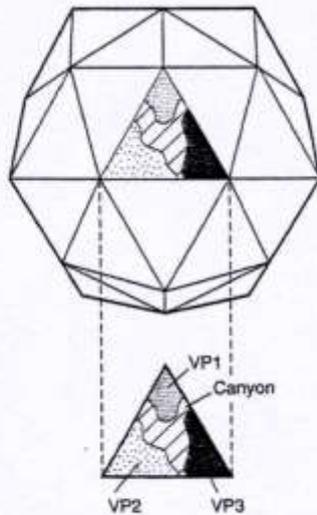


Figure 4.8 Rhinovirus particles have a deep surface cleft known as the 'canyon' between the three monomers (VP1, 2 and 3) making up each face of the particle.

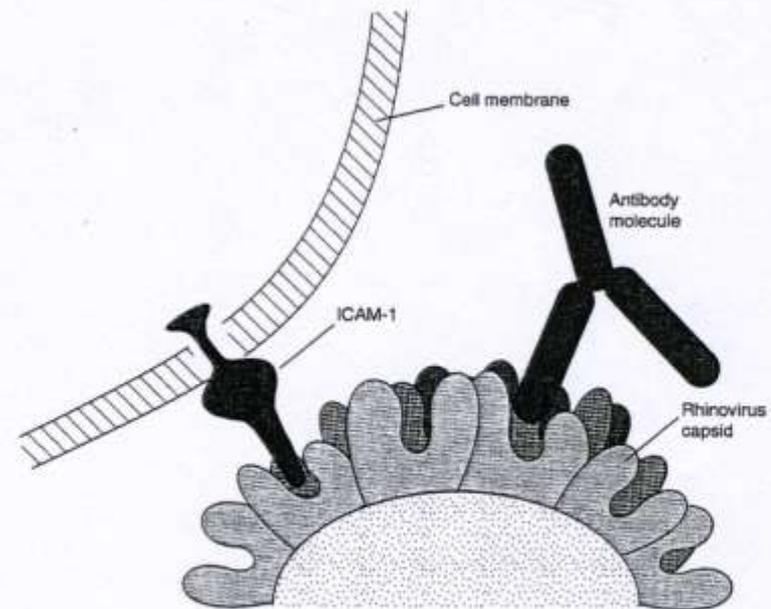
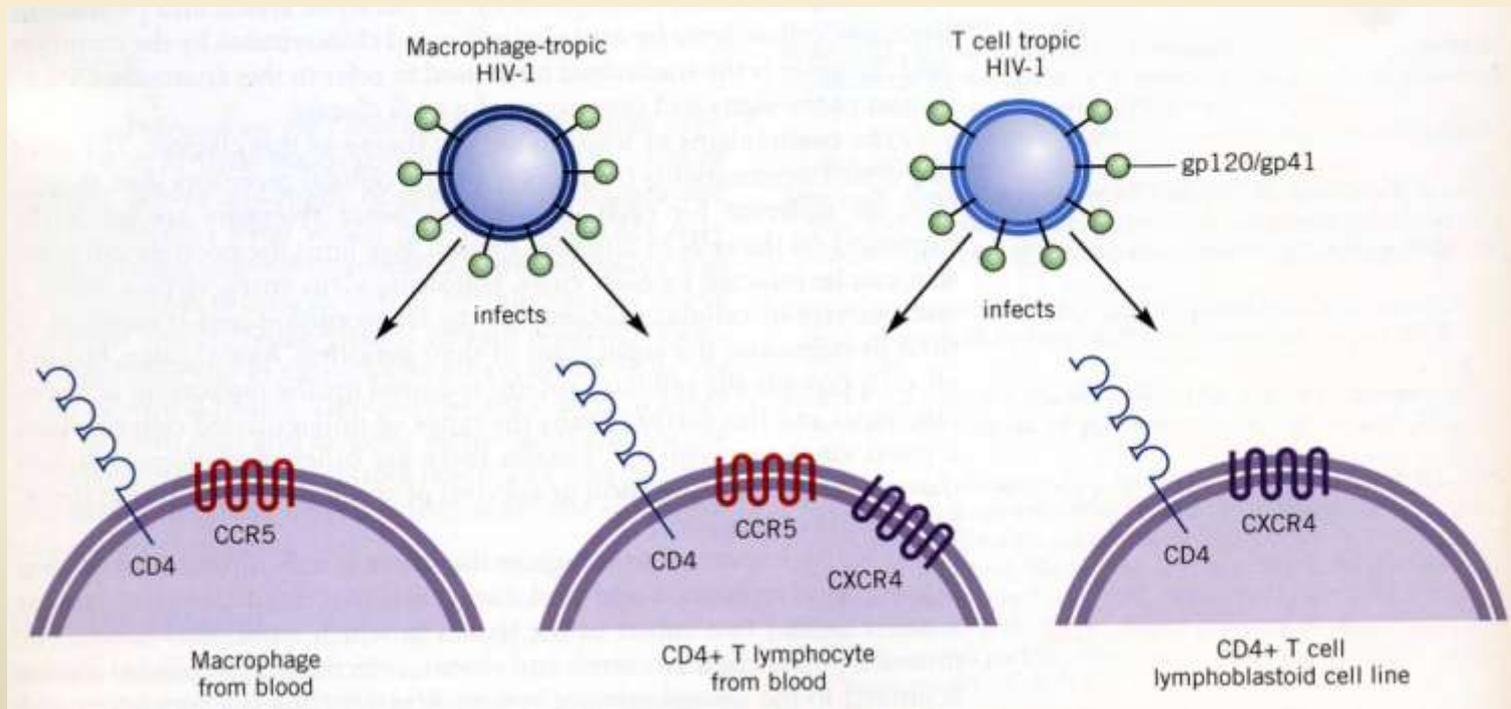


Figure 4.9 Receptor-binding by rhinoviruses. The cellular receptor (ICAM-1) is believed to interact with residues at the bottom of the 'canyon' on the surface of the virus particle (Figure 4.8). Antibody molecules are too large to penetrate the canyon, allowing the conserved receptor-binding site to avoid becoming a target for a neutralizing response.

Esempio: HIV

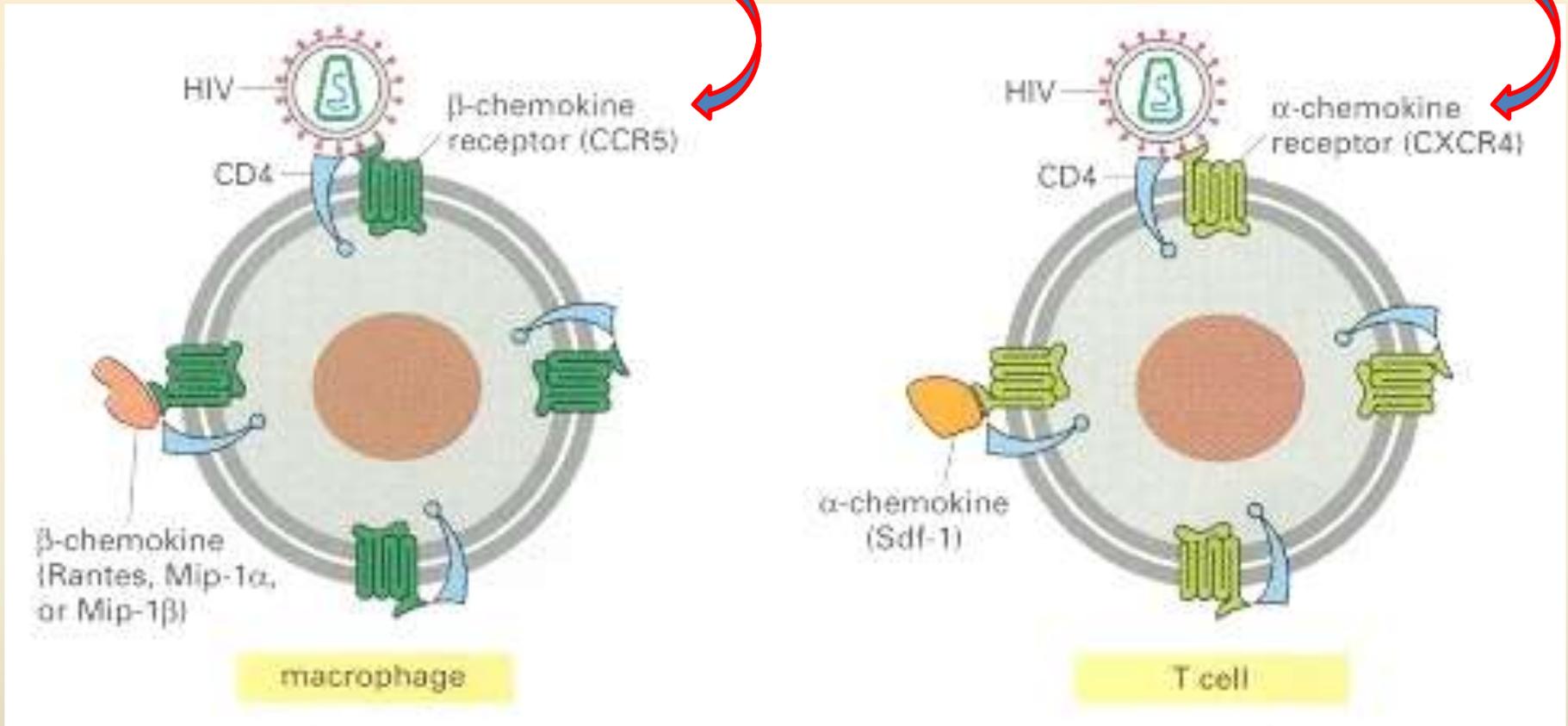
Interazione VAP/recettore più complessa: il virus si lega sia al **recettore** (CD4) che al **corecettore**, e penetra solo se c'è legame sia col R che col coR (eccezioni). A seconda del corecettore, HIV ha un **TROPISMO** per macrofagi (che esprimono il CCR5) o per i linfociti T (CCR4). Entrambi i ceppi infettano i linfociti T che esprimono entrambi i coR.



Alcuni ceppi di HIV sono **dual-tropici** (possono utilizzare entrambi i corecettori). **NB - HIV può infettare anche cellule CD4- (es. glia) legando il galattosilceramide, utilizzando una parte di gp120 diversa da quella che lega il CD4.**

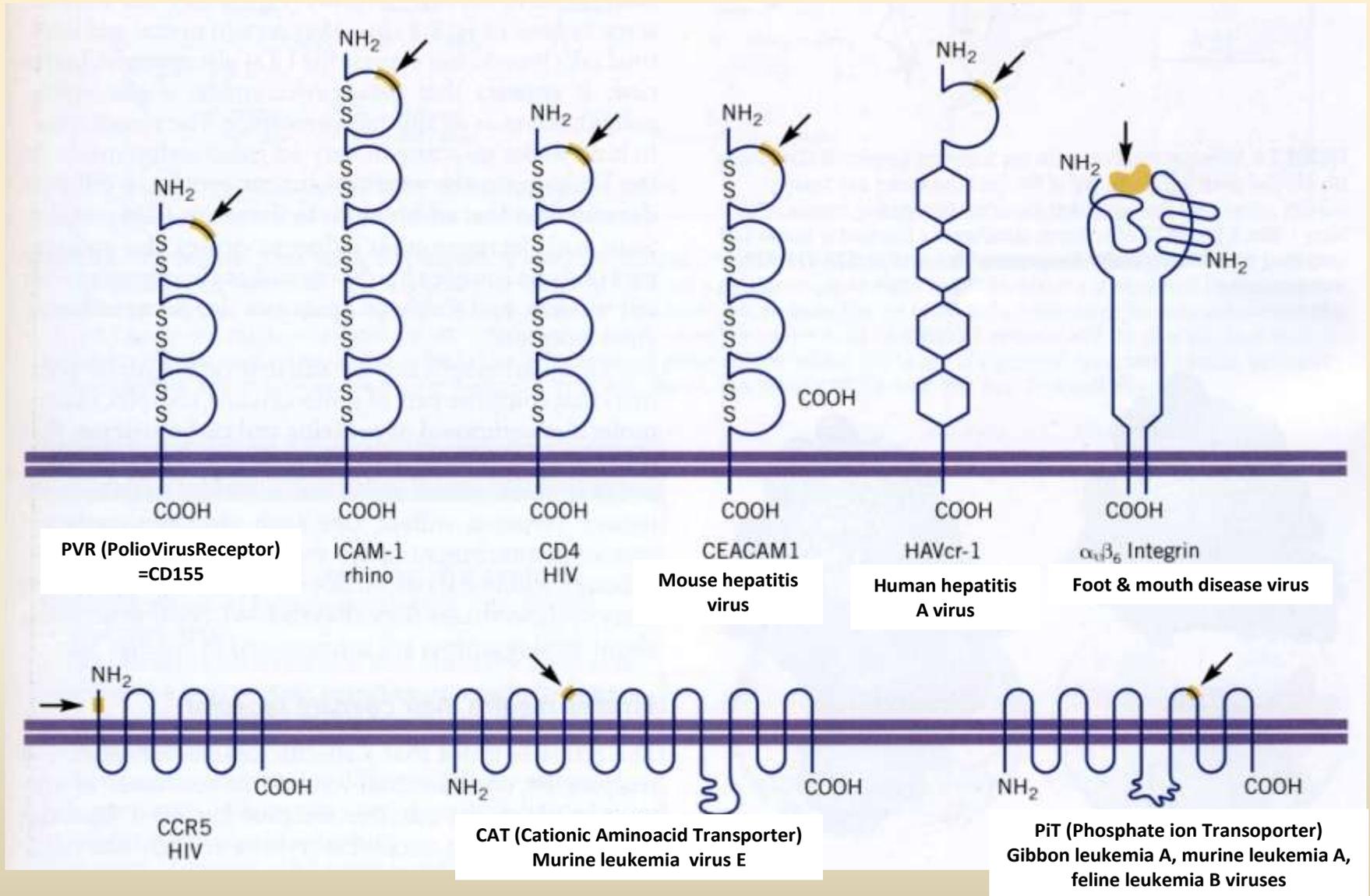
HIV: monotropic strain

HIV: lymphotropic strain



HIV: dualtropic strain

Esempi di R cellulari, col sito di legame del virus



NB - Mutazioni negli Aa del sito di legame rendono il virus incapace di infettare.

Importanza del recettore



Eliminando il recettore si elimina la possibilità di essere infettati

NB - Individui che mancano del recettore sono insensibili e geneticamente resistenti all'infezione

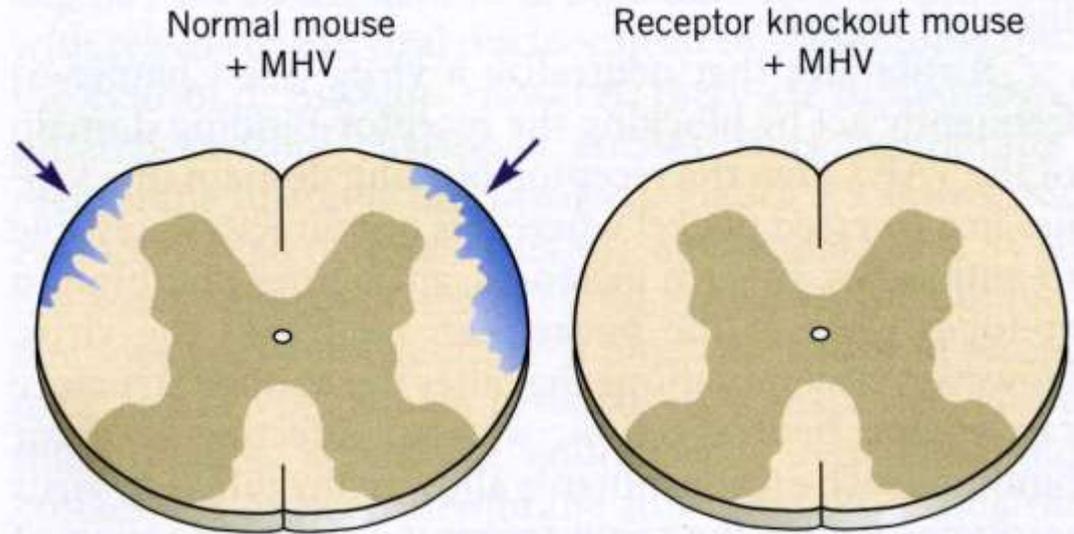


FIGURE 3.7 The cellular receptor is an essential requirement for susceptibility to the cognate virus. A comparison of control mouse (left) with a mouse in which the gene for CEACAM1a (carcinoembryonic antigen cellular adhesion molecule 1a) has been deleted (right). Both mice were infected with mouse hepatitis virus, a coronavirus that causes a late demyelinating disease of the spinal cord. The spinal cord of the control mouse shows severe demyelinating lesions of the ventral white matter (arrows), in contrast to the normal appearance of the spinal cord in the CEACAM1a^{-/-} mouse. The area of demyelination is shown in blue in this false color image. After Hemmila E, Turbide C, Olson M *et al.* CEACAM1a^{-/-} mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *Journal of Virology* 2004, 78: 10156–10165.

VAP e Recettori: riassunto

- ❑ Molte diverse molecole (proteine, glicoproteine, glicosamminoglicani, glicolipidi, ecc.) possono essere recettori cellulari
- ❑ Il domain del recettore che lega la VAP del virus può essere una sequenza polipeptidica o un residuo di carboidrati, spesso alla “punta” della molecola
- ❑ A volte è necessaria l’interazione anche con specifici corecettori
- ❑ L’espressione del recettore non implica che la cellula sostenga il ciclo replicativo del virus
- ❑ Virus diversi utilizzano recettori diversi
- ❑ Uno stesso virus può utilizzare come recettore diverse molecole alternative
- ❑ Ceppi diversi dello stesso virus possono utilizzare recettori diversi. Il passaggio seriale in animale o in cellule *in vitro* può selezionare una VAP mutata.

2. Penetrazione

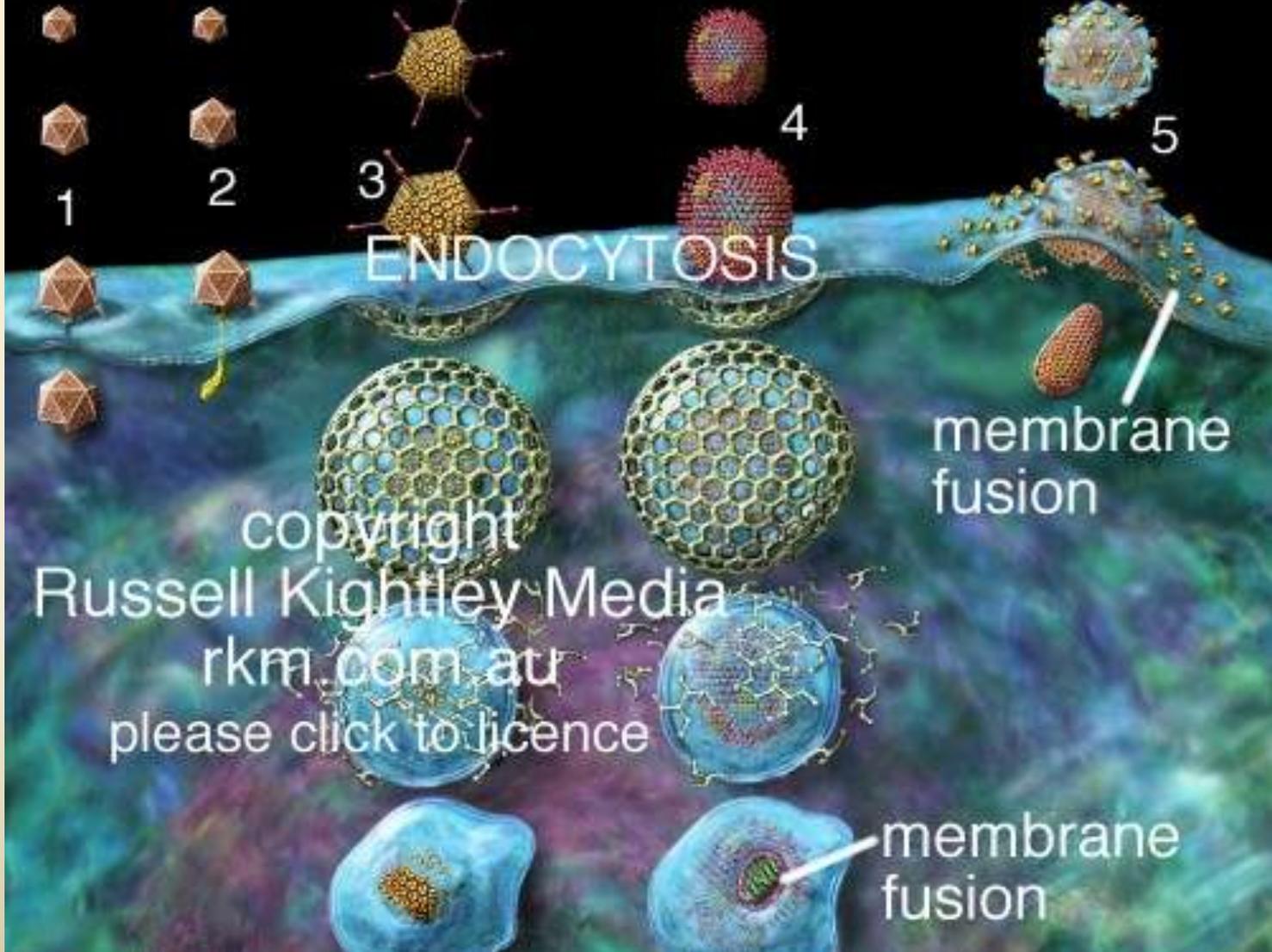
Richiede che la cellula sia metabolicamente attiva (l'assorbimento si verifica anche su cellule morte o porzioni isolate di membrana). Si verifica a **37°C** ed avviene quasi istantaneamente dopo l'attacco al recettore.

A seconda che il virus sia nudo o con envelope, può avvenire in diversi modi:

1. virus NUDI: **traslocazione** o **endocitosi**
2. virus ENVELOPED: **endocitosi** o **fusione** del pericapside con la membrana cellulare

NAKED

ENVELOPED



1) TRASLOCAZIONE del virione attraverso la membrana plasmatica

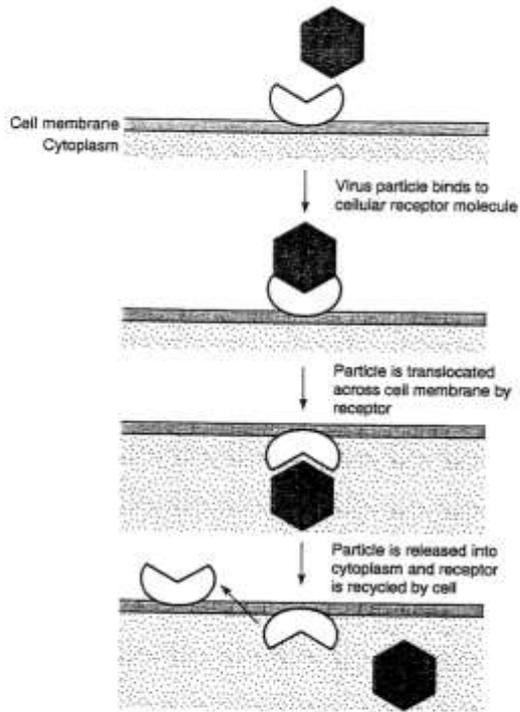
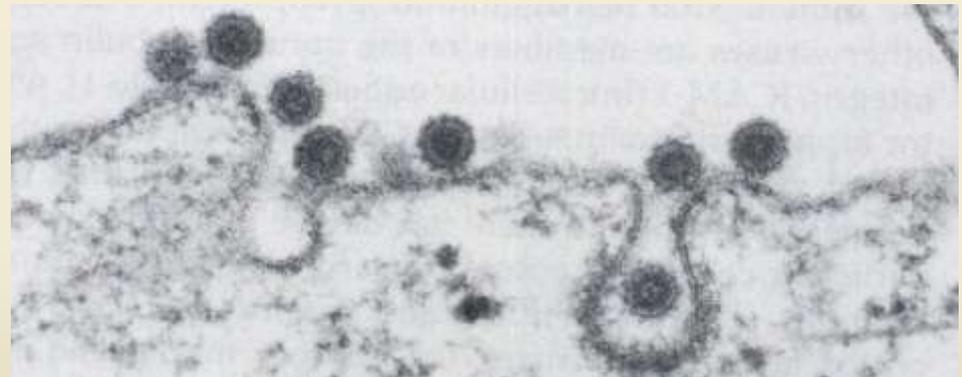
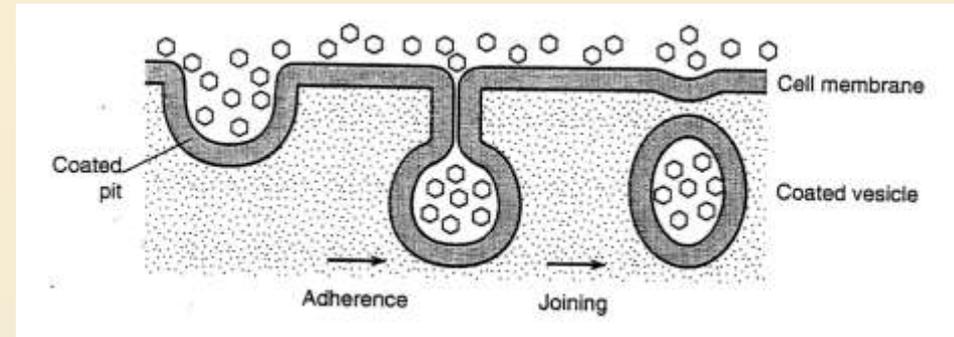


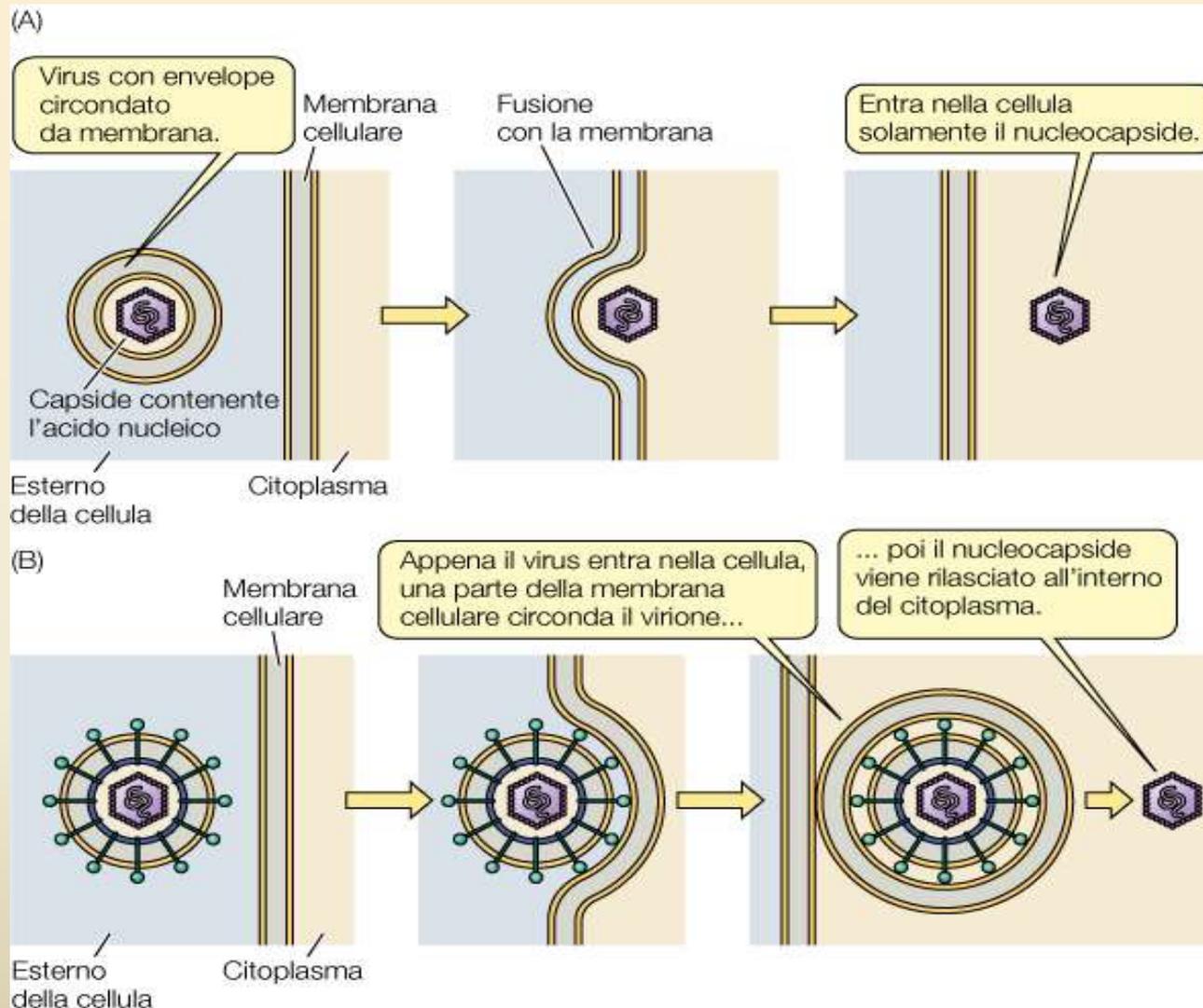
Figure 4.11 Translocation of entire virus particles across the cell membrane by cell surface receptors.

2) ENDOCITOSI in vescicole citoplasmatiche (detta anche viropessi)



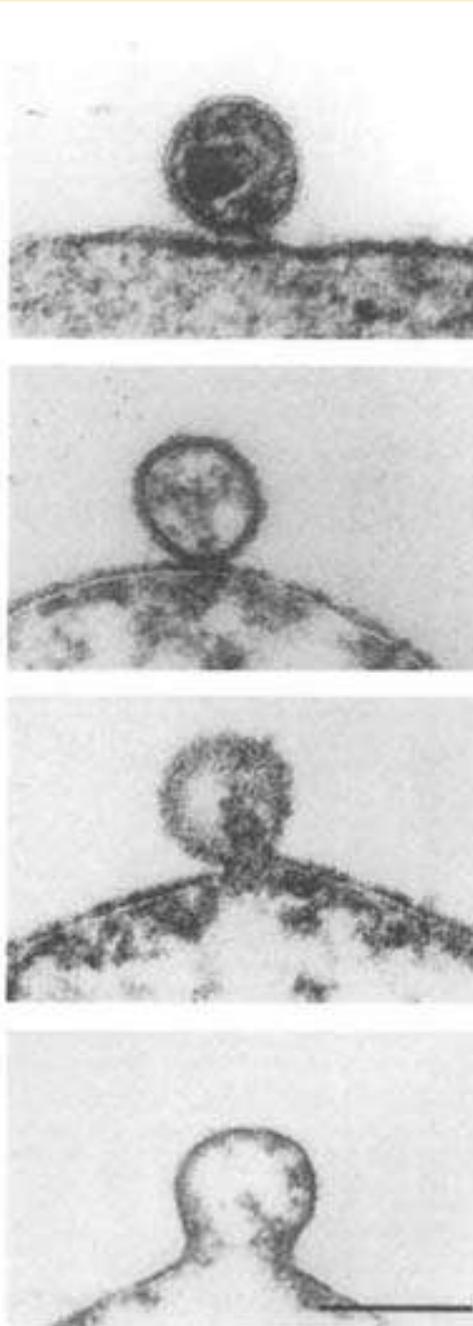
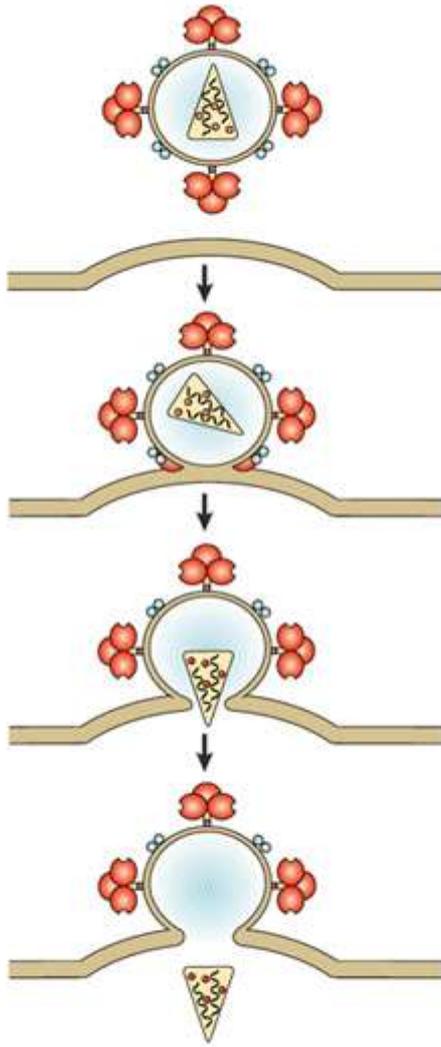
NB - Nel caso dei Poliovirus il virione è circondato dalla membrana plasmatica ma il solo acido nucleico penetra nel citoplasma

3) **FUSIONE** dell'envelope con la membrana plasmatica cellulare, o direttamente (es. Paramixovirus) o dopo endocitosi (es. Ortomixovirus)



Le vescicole endocitiche si fondono quasi immediatamente con lisosomi, e questo promuove la spoliatura

**b Non-endocytic route:
fusion at the cell surface**

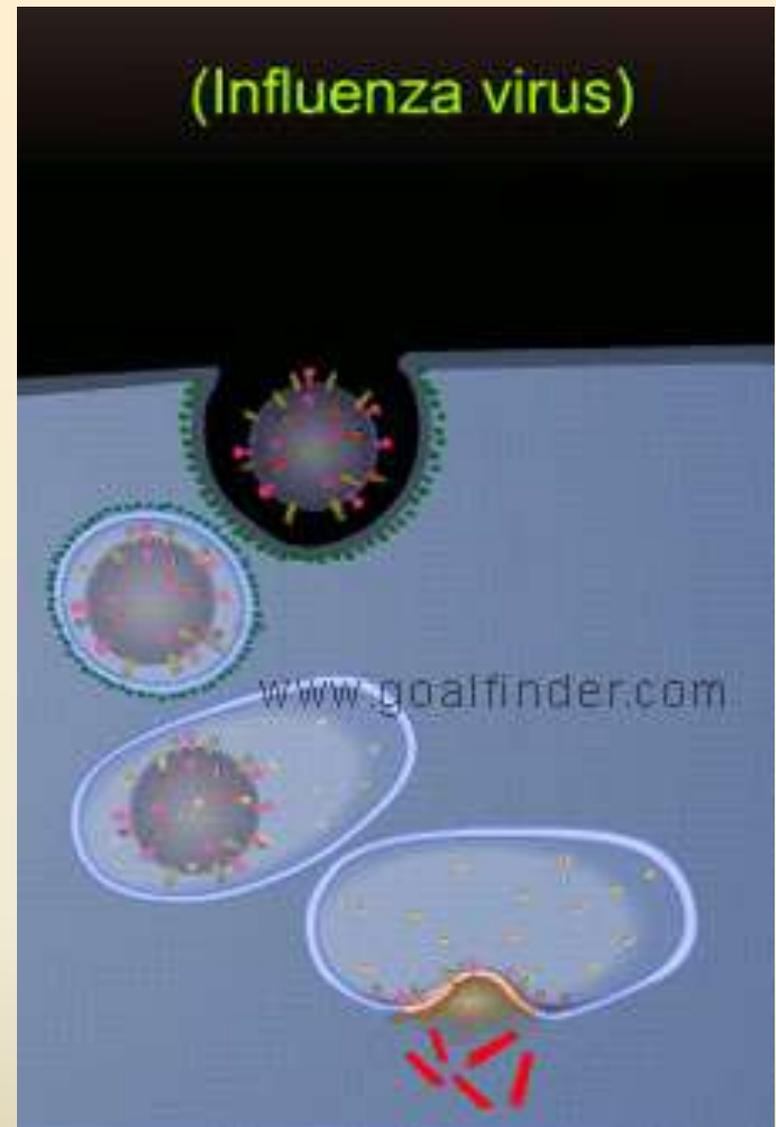
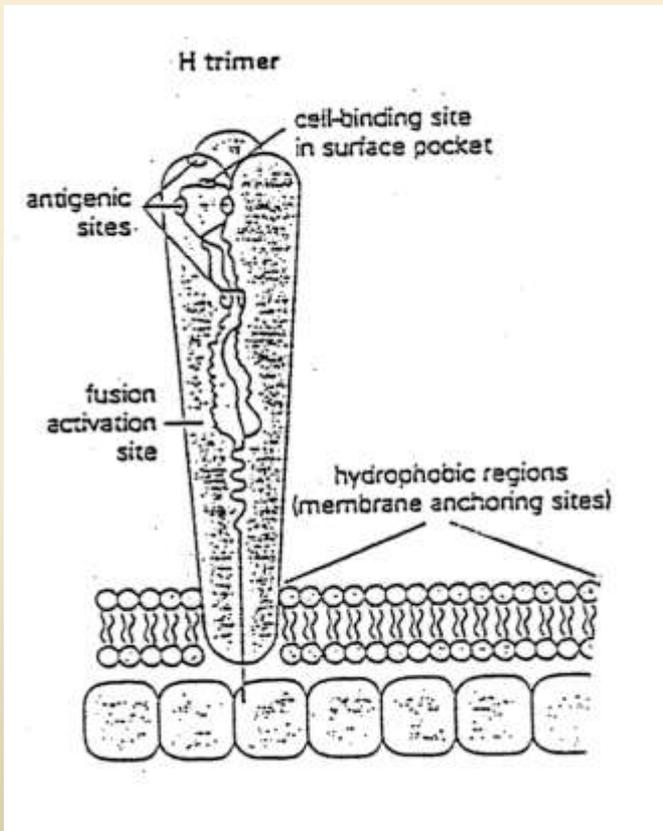


Esempio di FUSIONE: HIV

l'envelope si fonde con la membrana plasmatica cellulare, ed entra nel citoplasma solo il nucleocapside tronco-conico.

Esempio di FUSIONE dopo ENDOCITOSI: Ortomixovirus

Il VAP è HA (**emoagglutinina**, glicoproteina dell'envelope, formata da due subunità, l'antirecettore funzionale è un trimero di HA) e lega l'acido sialico. Il virus entra per endocitosi.



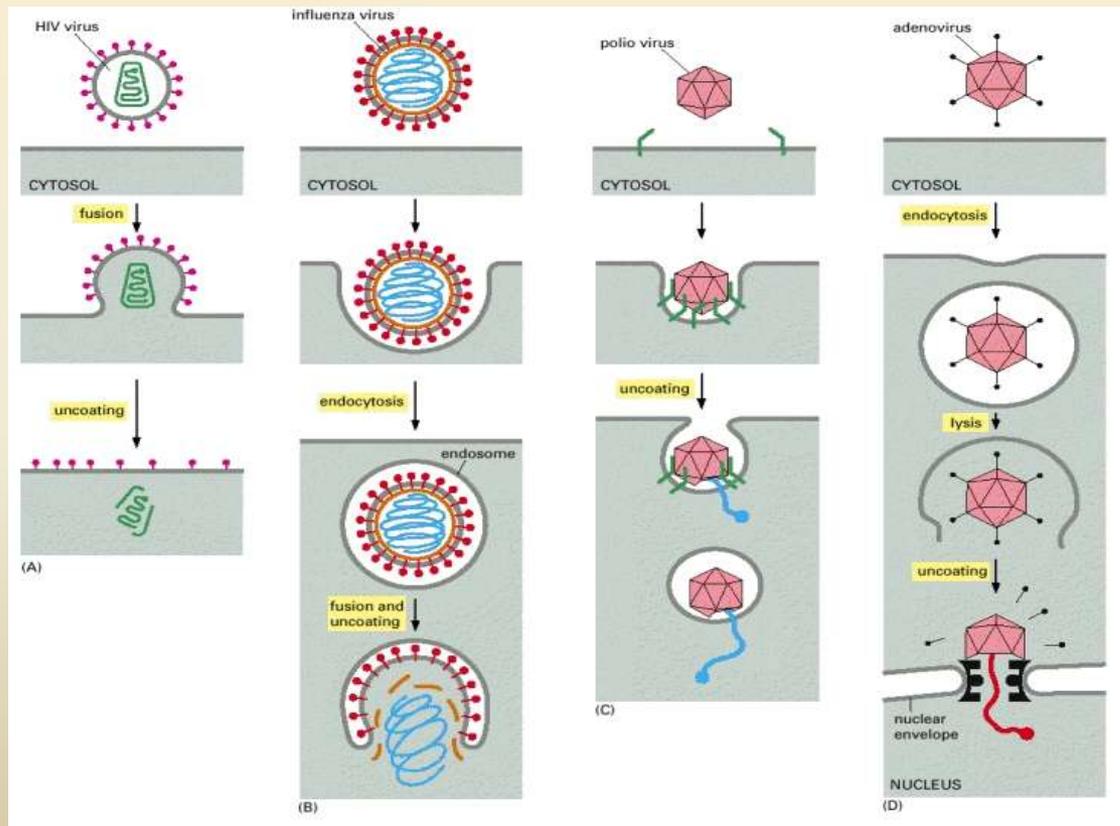
Una volta internalizzato il virione, avviene la fusione dell'envelope con la membrana della vescicola.

3. Spoliazione - Uncoating

Esposizione del genoma virale, di solito come complesso nucleoproteico: rimozione degli involucri (capside-pericapside) → il genoma viene guidato verso il sito di replicazione.

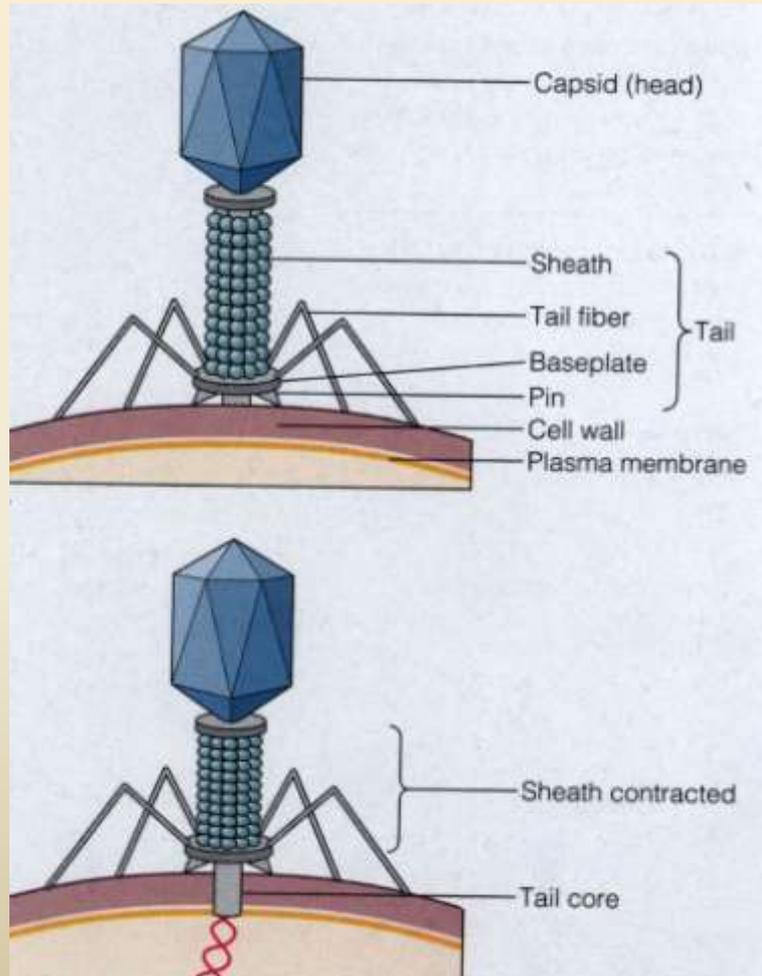
A seconda del tipo di virus, l'uncoating può avvenire:

- membr. plasmatica
- citoplasma
- membr. nucleare

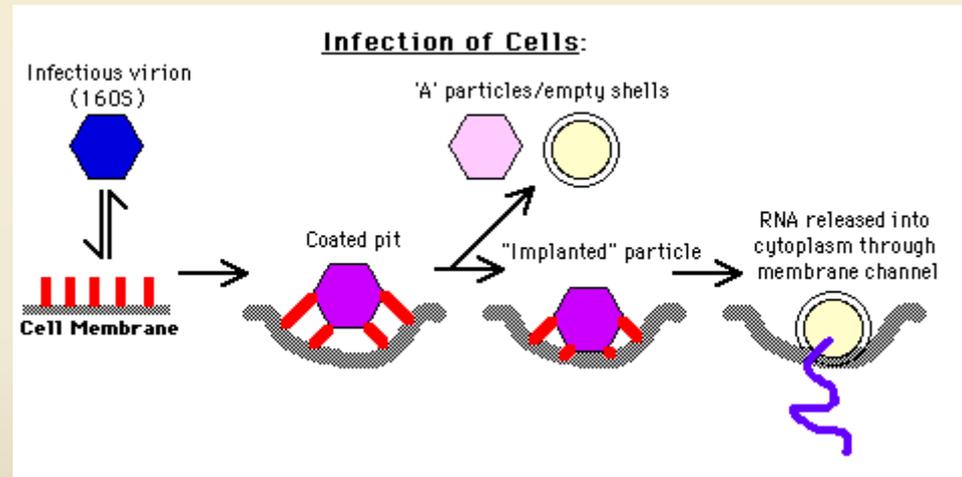


Esempi di spoliazione sulla MEMBRANA plasmatica

Nel caso del batteriofago T4, la spoliazione avviene sull'involucro esterno del batterio (penetra solo l'acido nucleico).

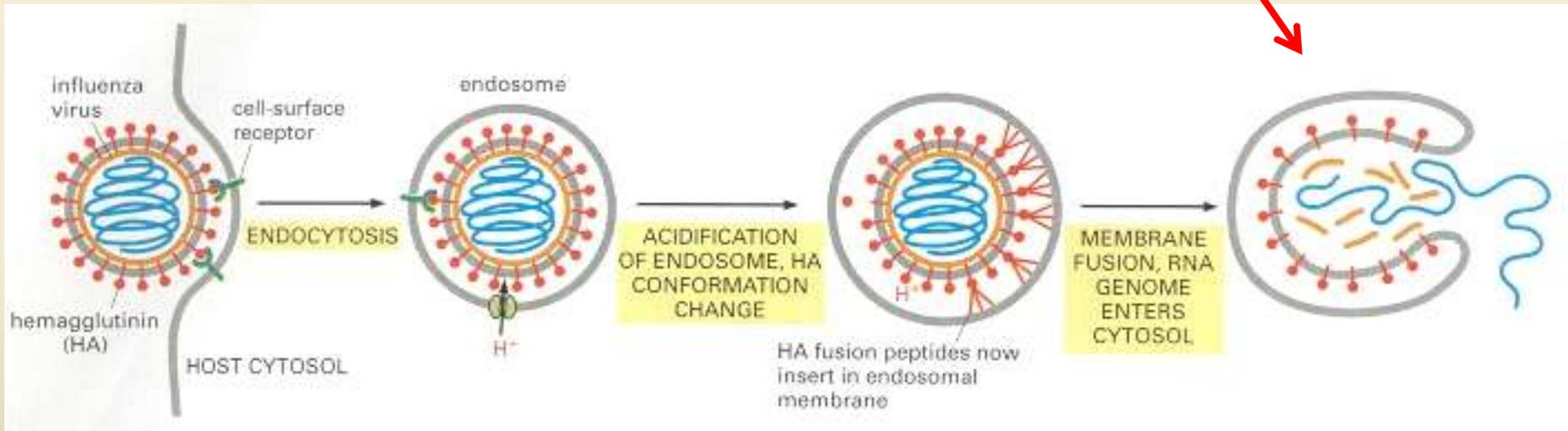


In alcuni Picornavirus, la spoliazione avviene sulla membrana plasmatica, entra solo il genoma (RNA).



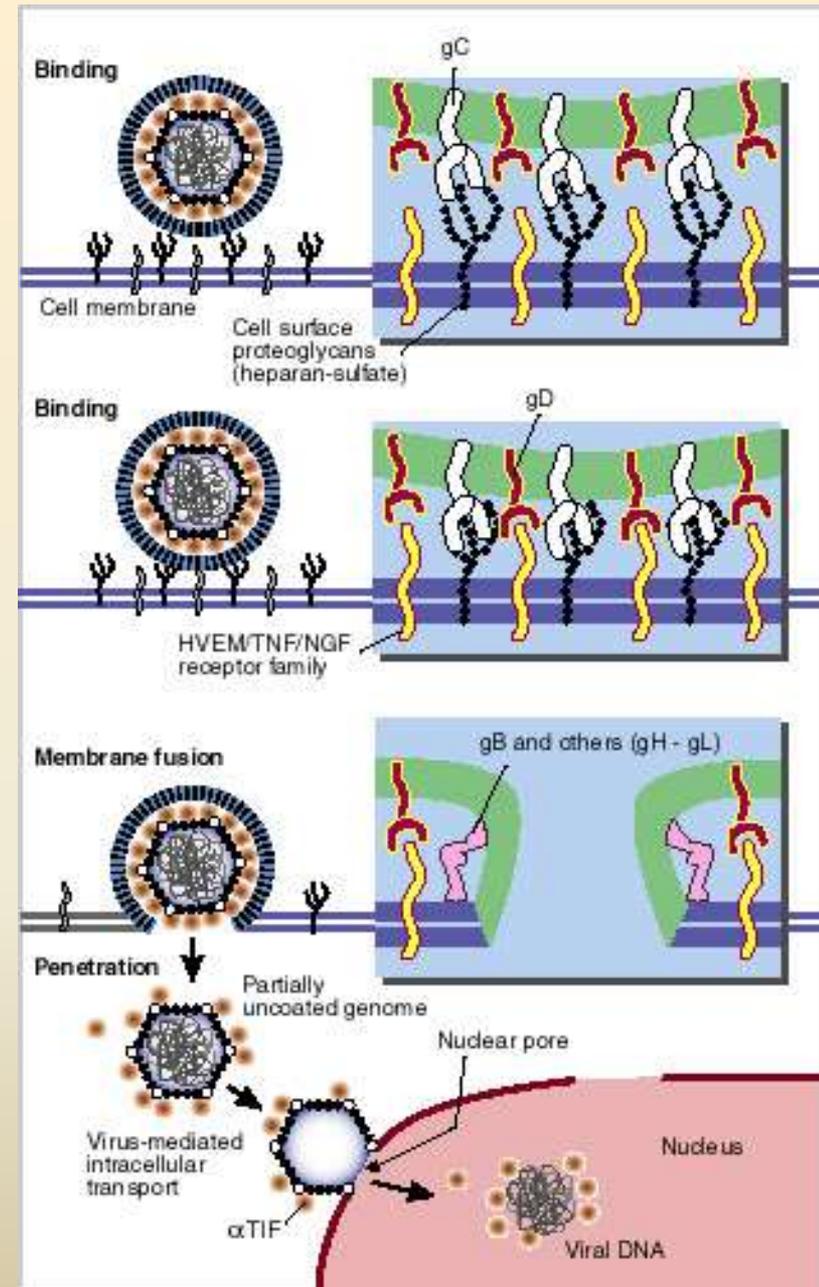
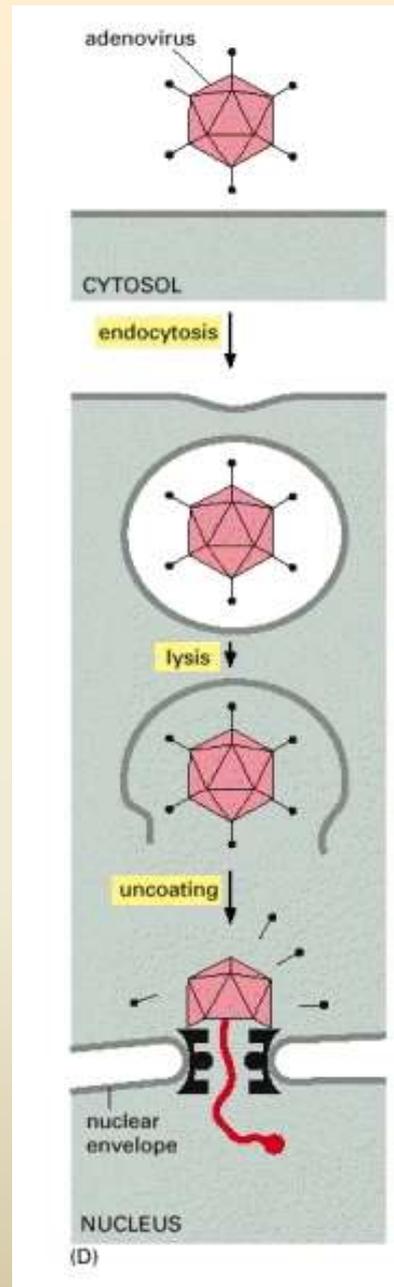
Esempi di spoliazione nel CITOPLASMA

Ortomixovirus: all'interno del trimero di HA c'è una porzione fusogena che viene esposta solo dopo acidificazione dell'endosoma. Ciò causa fusione fra envelope e membrana della vescicola, con rilascio nel citoplasma del nucleocapside.



Esempi di spoliazione nel NUCLEO

Nei **virus a DNA** (herpes, papova, adeno) di solito il capsid rimane pressochè integro, si attacca al citoscheletro e viene trasportato verso il nucleo. L'uncoating avviene ai pori nucleari.



NB - Nel caso dei **POXVIRUS** l'uncoating avviene in due fasi: all'inizio c'è una **parziale degradazione** dei rivestimenti nelle vescicole endosomiali, con rilascio del **core**; avviene la sintesi di mRNA da parte di enzimi virionici, viene così sintetizzato un **enzima virale di scapsidamento** che consente il rilascio del genoma nel citoplasma.

