

4. Sintesi delle componenti virali

Una volta che il genoma virale si è liberato del capsid e ha raggiunto la propria sede, inizia la **SINTESI DELLE MACROMOLECOLE VIRALI**.



TRASCRIZIONE, TRADUZIONE, REPLICAZIONE



produzione di numerose copie di componenti **STRUTTURALI** e **GENOMICI** necessari per la formazione della nuova progenie (i virus sfruttano l'apparato bio-sintetico cellulare)

IMPORTANTE:

Per poter utilizzare il metabolismo cellulare per sintetizzare le proprie proteine e replicare il proprio acido nucleico

un virus deve essere in grado di superare alcuni ostacoli imposti dalla organizzazione della cellula ospite

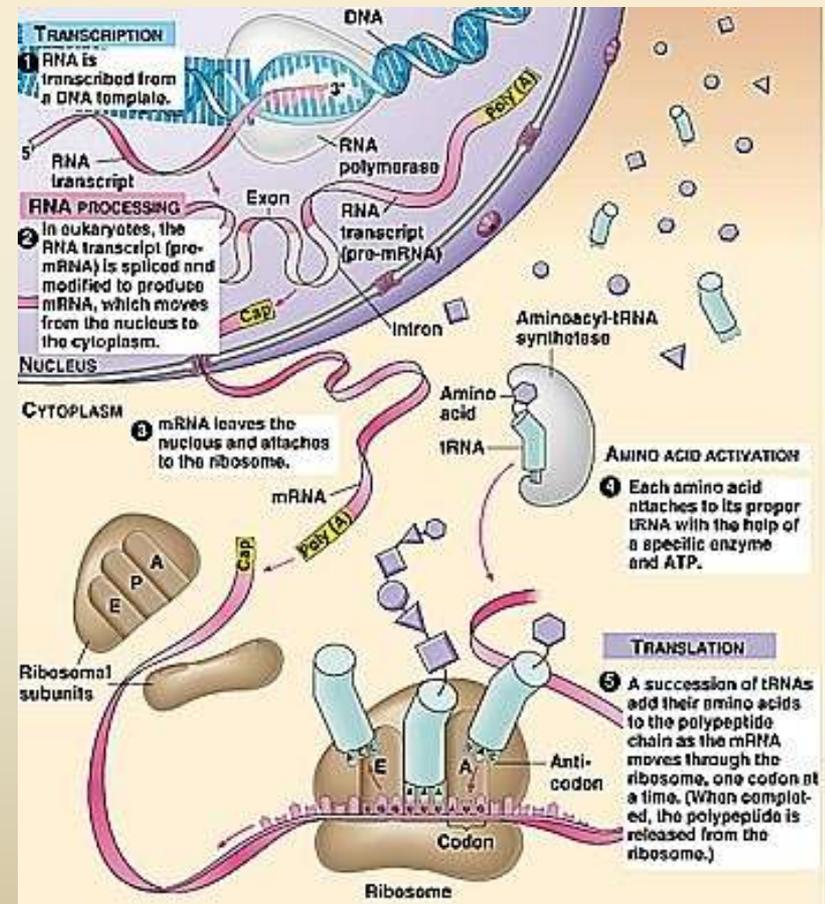
OSTACOLO 1

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.

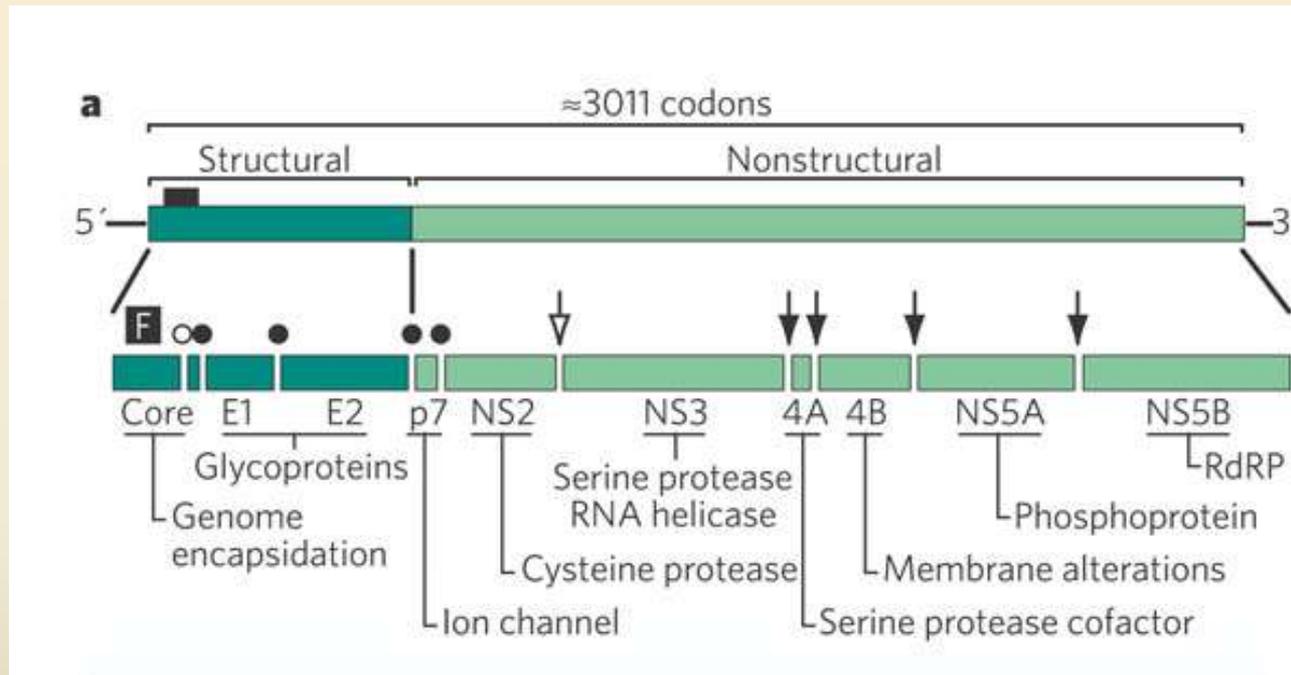
Quindi i soli virus in grado di utilizzare il sistema di trascrizione cellulare a proprio vantaggio per sintetizzare i propri mRNA, sono quelli con **genoma formato da DNA**, che sia in grado di raggiungere il nucleo della cellula, e possieda i necessari segnali per l'attacco dei vari fattori di trascrizione e polimerasi cellulari necessari.

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



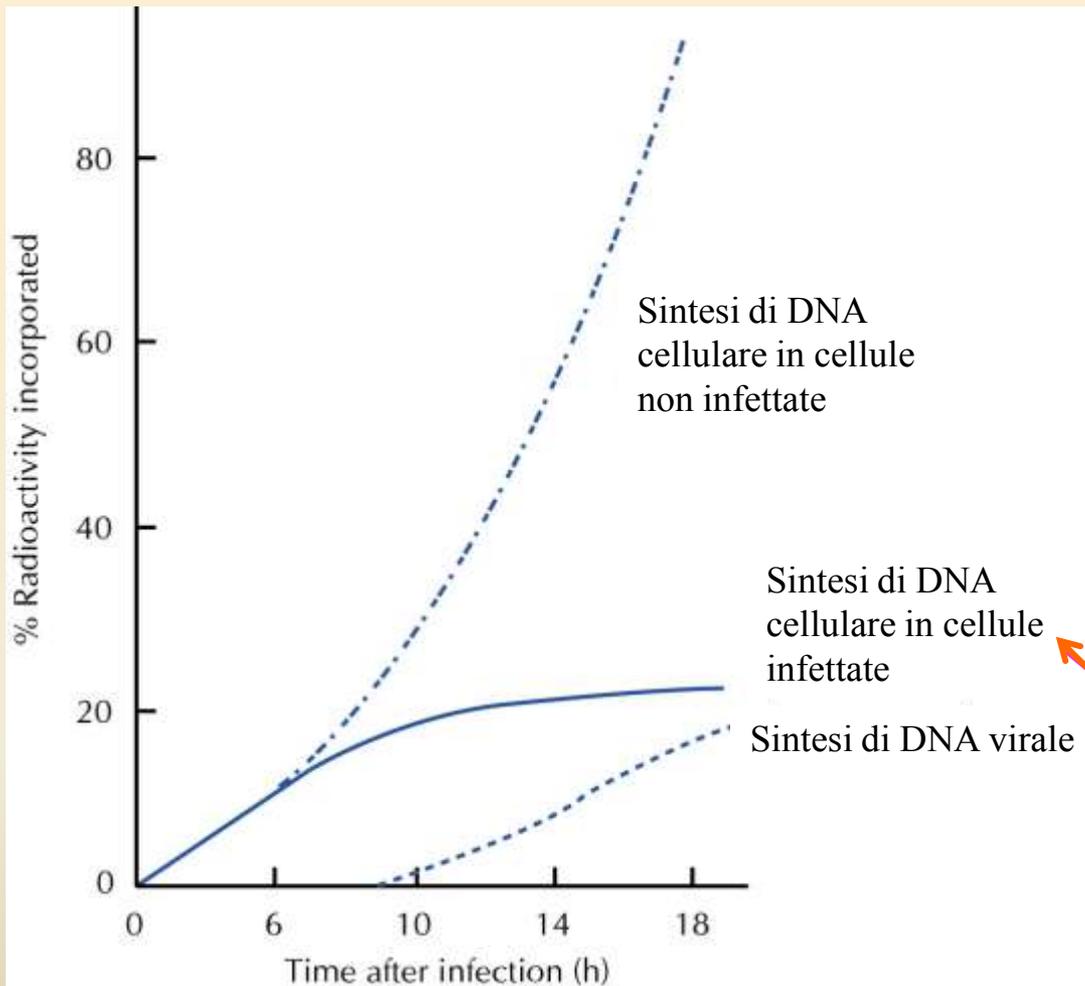
OSTACOLO 2

La cellula riconosce **messaggeri monocistronici** (= 1mRNA/1 proteina; i segnali di inizio della sintesi proteica devono essere all'inizio dell'mRNA). Quindi molti virus a RNA (che hanno messaggeri **policistronici**) sintetizzano una poliproteina che poi viene tagliata nelle singole componenti.



Es. HCV – Struttura del genoma, con i geni strutturali e non strutturali, e le regioni 5' and 3' NCRs. Il processamento della poliproteina è mostrato sotto, con i segnali di taglio per le peptidasi.

OSTACOLO 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** (sia DNA che proteine) = **SHUT OFF**

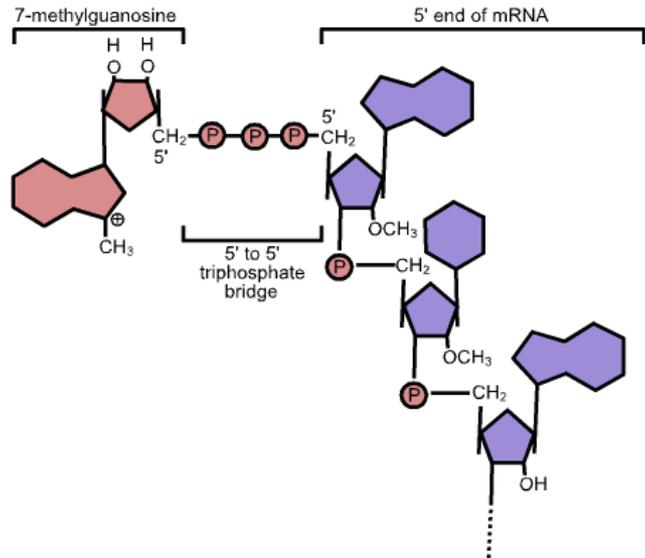
Meccanismi virali per la TRADUZIONE

Il **legame dell'mRNA virale al ribosoma** della cellula ospite è mediato dal **CAP** in 5' (guanosina metilata) o dalla struttura **IRES** (internal ribosome entry sequence). **Molti, ma non tutti gli mRNA hanno una coda di poliA** (promuove l'uscita dal nucleo, protegge da degradazione).

I virus hanno diverse strategie per **favorire la traduzione dei loro mRNA, rispetto a quelli cellulari:**

- alta concentrazione mRNA virali,
- blocco dell'uscita dal nucleo degli mRNA cellulari,
- inibizione sintesi cellulari,
- degradazione acidi nucleici cellulari (herpesvirus, poxvirus)
- inattivazione della proteina che lega il CAP (e quindi utilizzo di IRES per legare il ribosoma) (picornavirus).
- “cap stealing” (influenza): la proteina virale PB2 stacca il cap agli mRNA cellulari e lo attacca all'mRNA virale

Nelle cellule eucariotiche l'aggiunta del **CAP** è accoppiata alla trascrizione: subito dopo l'inizio della trascrizione il 5'-end dell'RNA è legato al **cap-synthesizing complex** associato all'RNA polimerasi, il quale catalizza le reazioni necessarie al capping dell'mRNA.

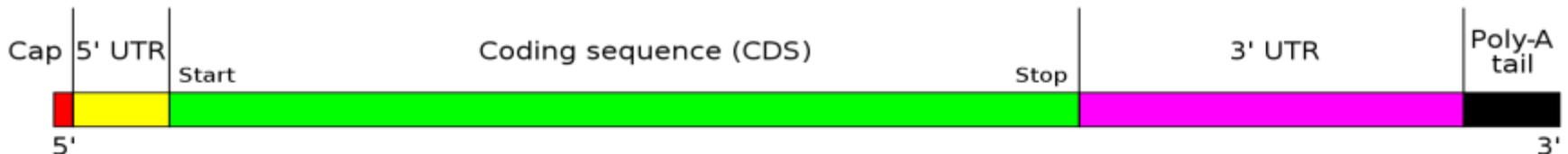


Il CAP in 5' ha 4 funzioni principali:

1. Regolazione del nuclear export
2. Prevenzione della degradazione da esonucleasi
3. Promozione della traduzione
4. Promozione della excisione degli introni prossimali a 5'

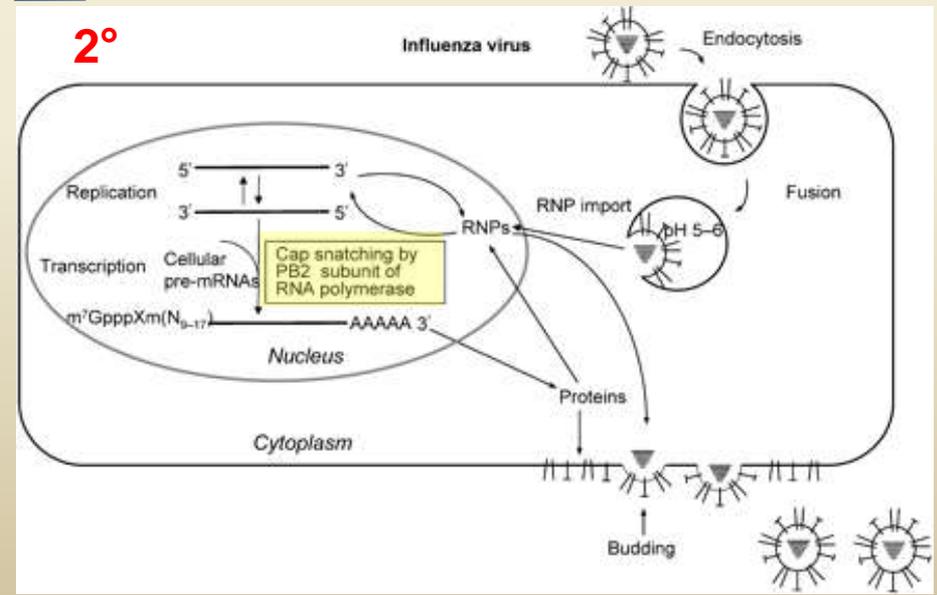
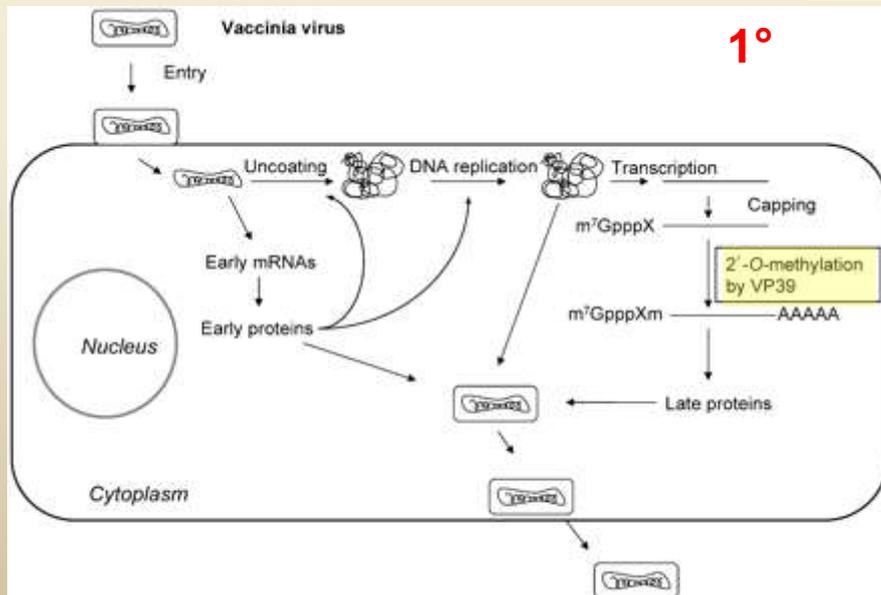
L'esportazione dal nucleo è regolata dal Cap binding complex (CBC), che lega esclusivamente il CAP-RNA. Il CBC viene riconosciuto dal complesso del poro nucleare ed esportato nel citoplasma, dove il CBC è rimpiazzato dai fattori di traduzione eIF-4E e eIF-4G. Il complesso viene quindi riconosciuto da tutti gli altri fattori della macchina traduzionale, inclusi i ribosomi.

The structure of a typical human protein coding mRNA including the untranslated regions (UTRs)



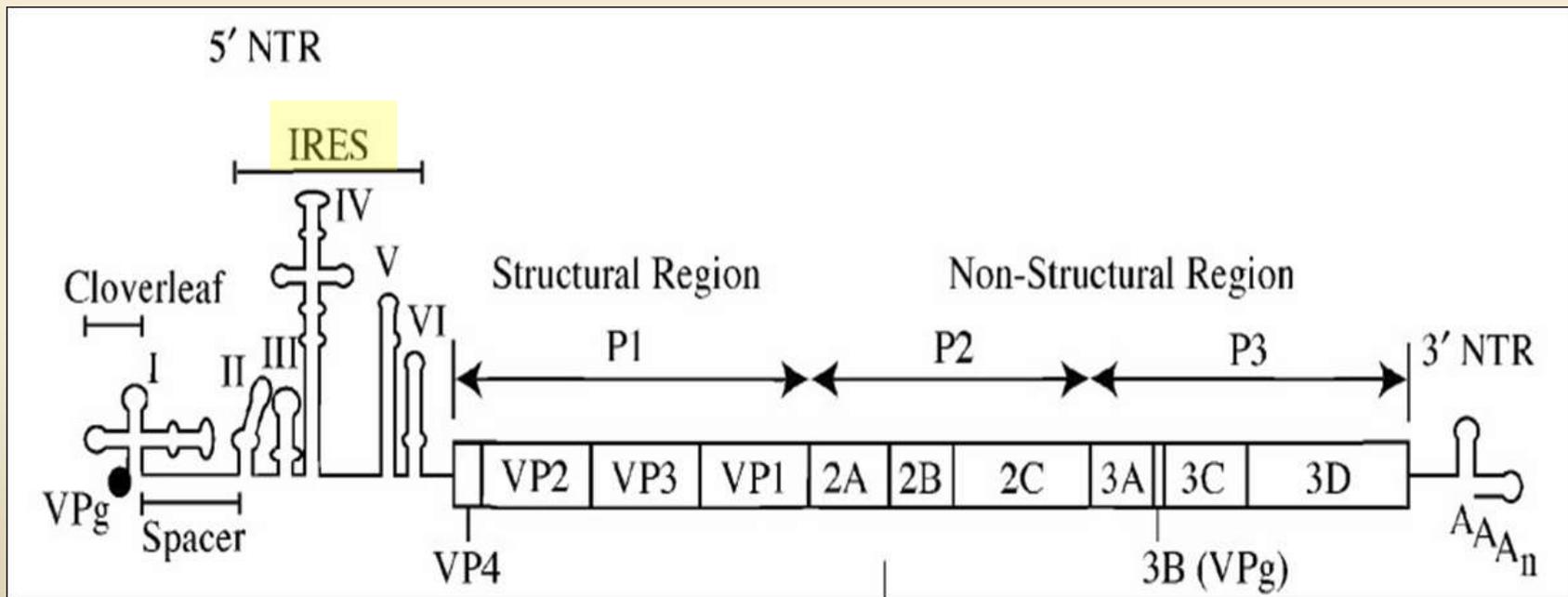
CAPPING

- Alcuni virus usano il meccanismo di **capping della cellula** (es. Retroviruses).
- Altri virus hanno invece evoluto un **proprio meccanismo**, e possono essere divisi in **2 gruppi**:
 - 1°**: virus che replicano nel citoplasma e hanno una proteina propria (Poxvirus, Coronavirus, Flavivirus, Reovirus). Nei Poxvirus **VP39** → maturazione degli mRNA virali: in 5' agisce da 2'-O-methyltransferase, metilando il ribosio del 1° residuo del CAP, e in 3' agisce allungando la coda di poliA.
 - 2°**: virus a RNA(-) che replicano nel nucleo (Orthomyxovirus) o nel citoplasma (Bunyavirus). Questi virus non hanno una proteina propria, ma hanno evoluto un meccanismo per staccare il CAP dagli mRNA della cellula ospite (CAP stealing). La polimerasi virale si lega ai CAP-mRNA cellulari, la sua attività endonucleasica taglia il CAP e lo usa per i propri mRNA.



IRES (Internal Ribosome Entry Site)

Può essere presente al posto del CAP. Queste sequenze sono state per la prima volta scoperte nel 1988 nei Poliovirus (RNA+) . Sono regioni localizzate in 5'UTR dell'RNA capaci di attrarre i ribosomi eucariotici e quindi permettere l'inizio della traduzione.

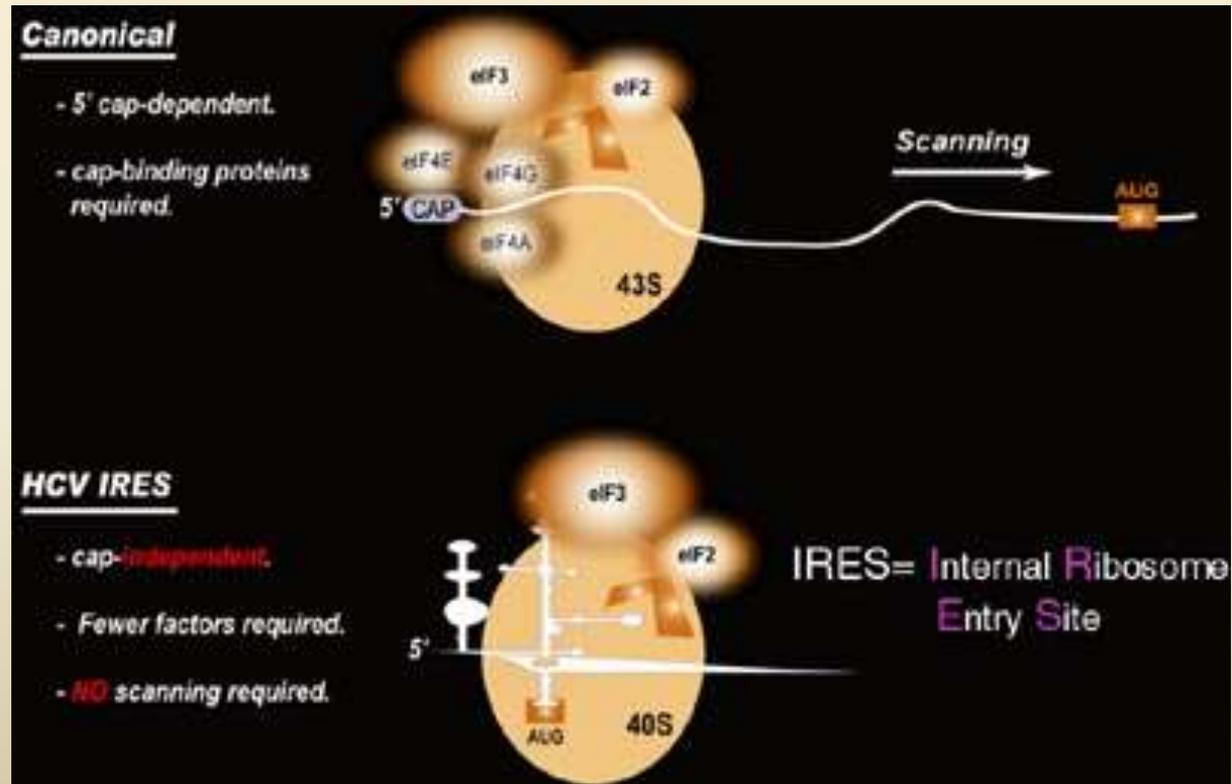


Esempio di IRES

L'RNA di **HCV** viene tradotto in una poliproteina usando un IRES.

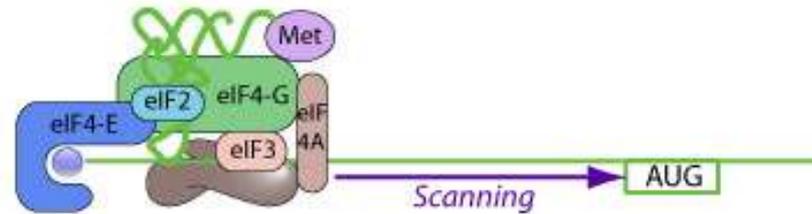
La traduzione eucariotica via meccanismo CAP-dipendente coinvolge moltissimi fattori di iniziazione nel recruitment della subunità 40S e nel successivo scanning del 1° start codon ATP-dipendente.

Invece, la traduzione dell'RNA di HCV avviene con un **meccanismo CAP-indipendente**, la subunità 40S si lega direttamente all'IRES e solo un sottogruppo di fattori di iniziazione sono necessari.

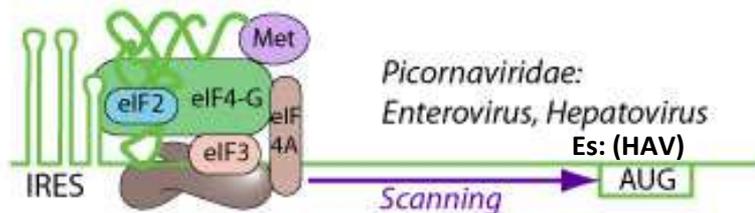


Meccanismi usati dai virus per l'inizio della traduzione.

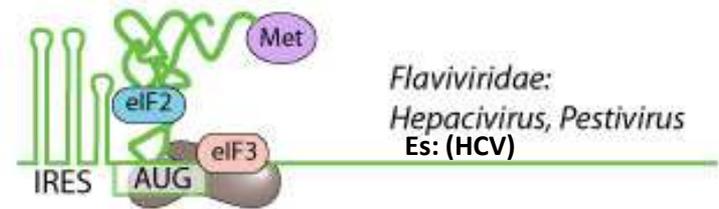
Canonical cap-dependent initiation



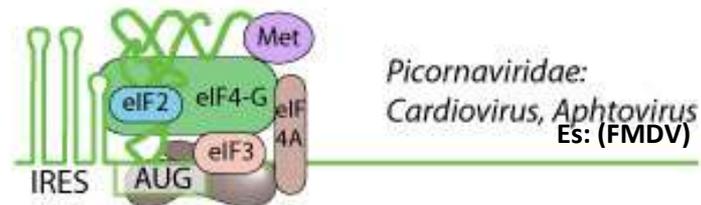
initiation on IRES, scan to AUG



initiation on IRES, directly on AUG



initiation on IRES, directly on AUG



non-AUG initiation on IRES



TRADUZIONE proteine virali

Generalizzando, le proteine virali si possono dividere in:

• **Precoci**: sintetizzate subito dopo la spoliatura, sono soprattutto di natura enzimatica e regolatoria, intervengono nella replicazione dell'acido nucleico e comprendono le polimerasi virali.

• **Tardive**: sintetizzate subito dopo la replicazione dell'acido nucleico, sono soprattutto strutturali, e vengono prodotte in abbondanza (progenie).

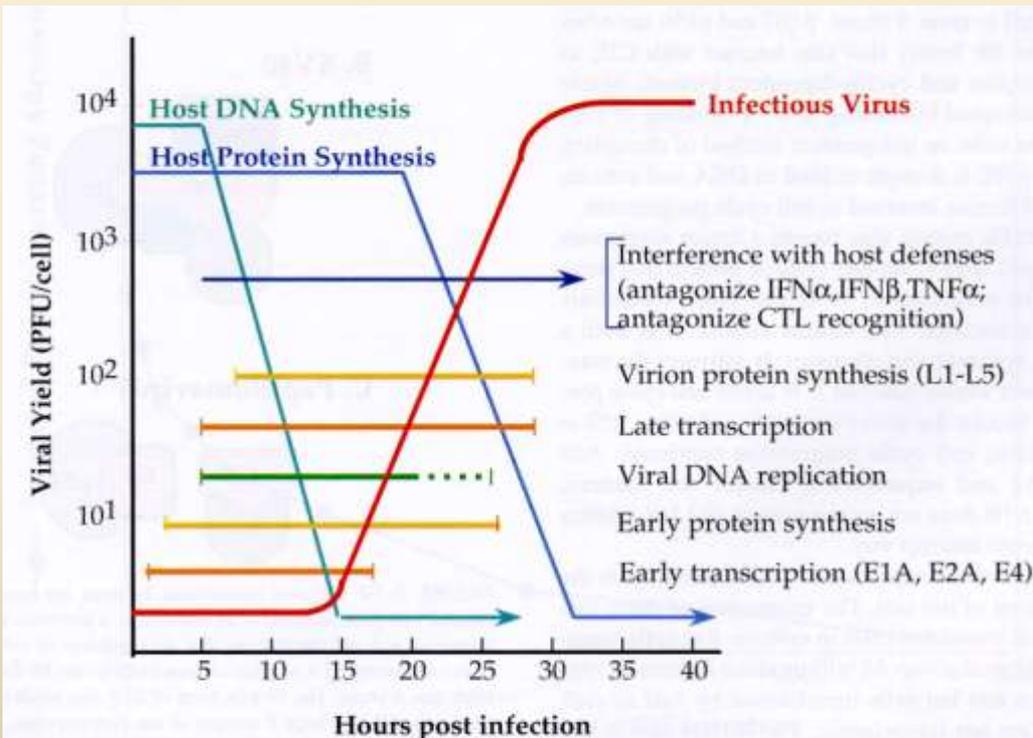


FIGURE 6.18 Relative timing of major events during the adenovirus life cycle. Example shown is for HeLa cells infected with adenovirus at a multiplicity of infection (MOI) of 10. L1-L5 are the major late transcription units mapped in Figure 6.17. [From Fields *et al.* (1996, p. 2119) and Ginzberg (1984, Fig. 1, p. 2).]

Di solito, le proteine precoci hanno minor potere antigene di quelle tardive, sia perchè sono espresse per lo più all'interno della cellula, sia perchè sono prodotte in minore quantità

REPLICAZIONE dell'acido nucleico

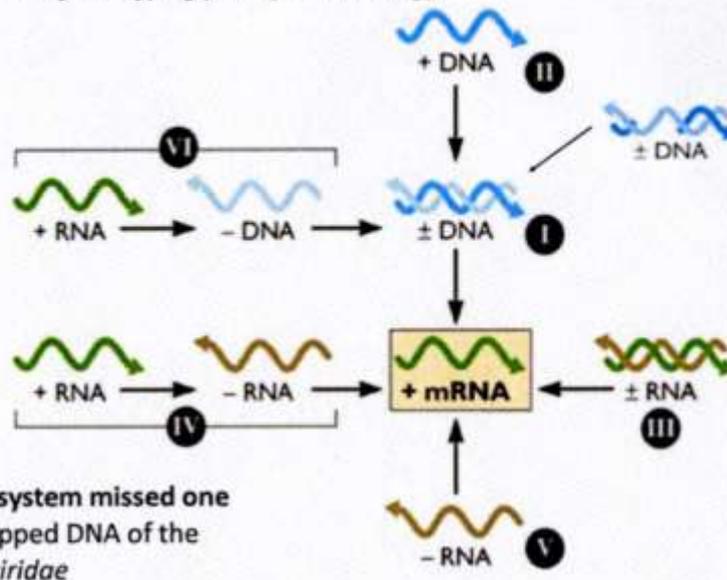
Distinzione in **7 classi replicative** (genoma e strategie di replicazione).

Principio basato sul fatto che **tutti i virus devono sintetizzare mRNA leggibile dai ribosomi cellulari**, non importa che tipo di genoma abbiano.

NB - Sapendo che tipo di genoma ha un virus, è possibile dedurre le tappe fondamentali della sua replicazione.

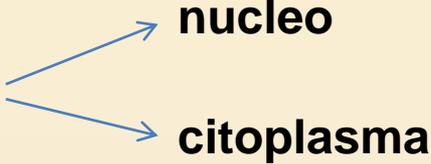
David Baltimore (Nobel laureate) used this insight to describe a simple way to think about virus genomes

- a major unifying principle in virology



The original Baltimore system missed one genome type: the gapped DNA of the *Hepadnaviridae*

Virus a DNA

- CLASSE I** – Genoma dsDNA
- CLASSE II** – Genoma ssDNA
- CLASSE VII** – Genoma parzialmente dsDNA
- 
- ```
graph LR; A[CLASSE I – Genoma dsDNA] --> B[nucleo]; A --> C[citoplasma]
```

Pertanto all'interno del gruppo di virus a DNA si trovano 4 diverse strategie replicative, 3 per i virus a genoma bicitenario e 1 per quelli a genoma monocatenario (parvovirus)

# Classe I

## 1° gruppo

**Genoma dsDNA**

**Replicazione nel NUCLEO**

**Herpesvirus**

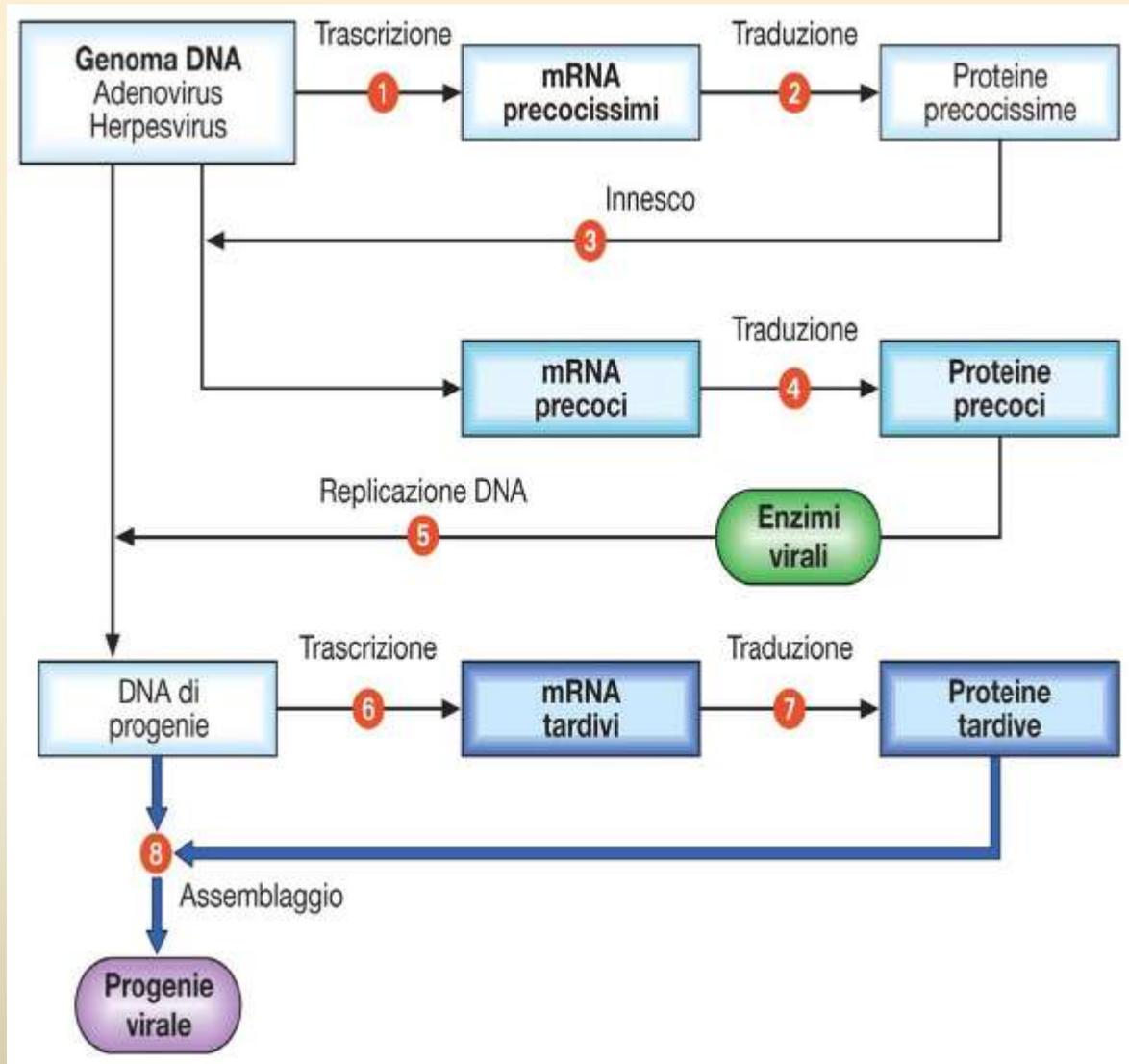
**Adenovirus**

**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 2 tempi, quello degli Herpesvirus e degli Adenovirus in 3 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 virus a dsDNA



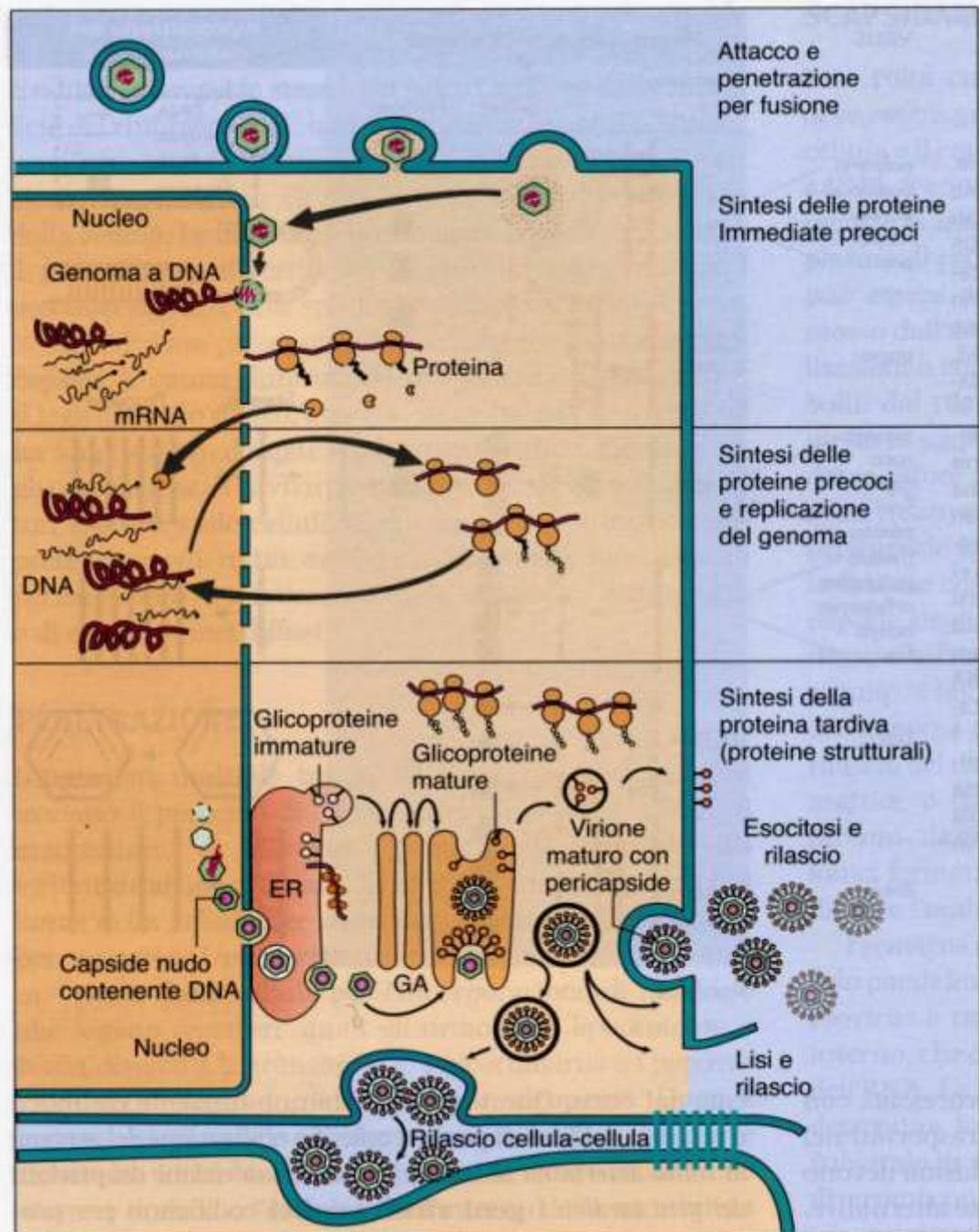
1. trascrizione del DNA in mRNA precocissimi
2. traduzione dei messaggeri precocissimi
3. innesco della sintesi dei messaggeri precoci da parte delle proteine precocissime
4. traduzione degli mRNA precoci
5. replicazione del DNA virale ad opera di enzimi virali neoformati
6. e 7. trascrizione e successiva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

## Esempio: replicazione del Virus dell'herpes simplex (dsDNA)

Il virus entra per fusione, il nucleocapside è trasportato al nucleo dove rilascia il DNA genomico.

Trascrizione e traduzione si svolgono in **3 fasi**: **immediata precoce**, **precoce** e **tardiva**.

Le proteine **precocissime (IE)** prendono il controllo della cellula e promuovono la trascrizione dei geni precoci. Le proteine **precoci (E)** sono per lo più enzimi, e comprendono la DNA polimerasi virale. A questo punto si ha **replicazione** del genoma. Dopo sono sintetizzate le proteine **tardive (L)**, che sono strutturali (capside e involuppo). Le proteine capsidiche migrano nel nucleo, si assemblano e vengono riempite col DNA virale. I capsidi gemmano attraverso le varie membrane cellulari modificate dalle glicoproteine virali (nucleare, Golgi, citoplasmatica).



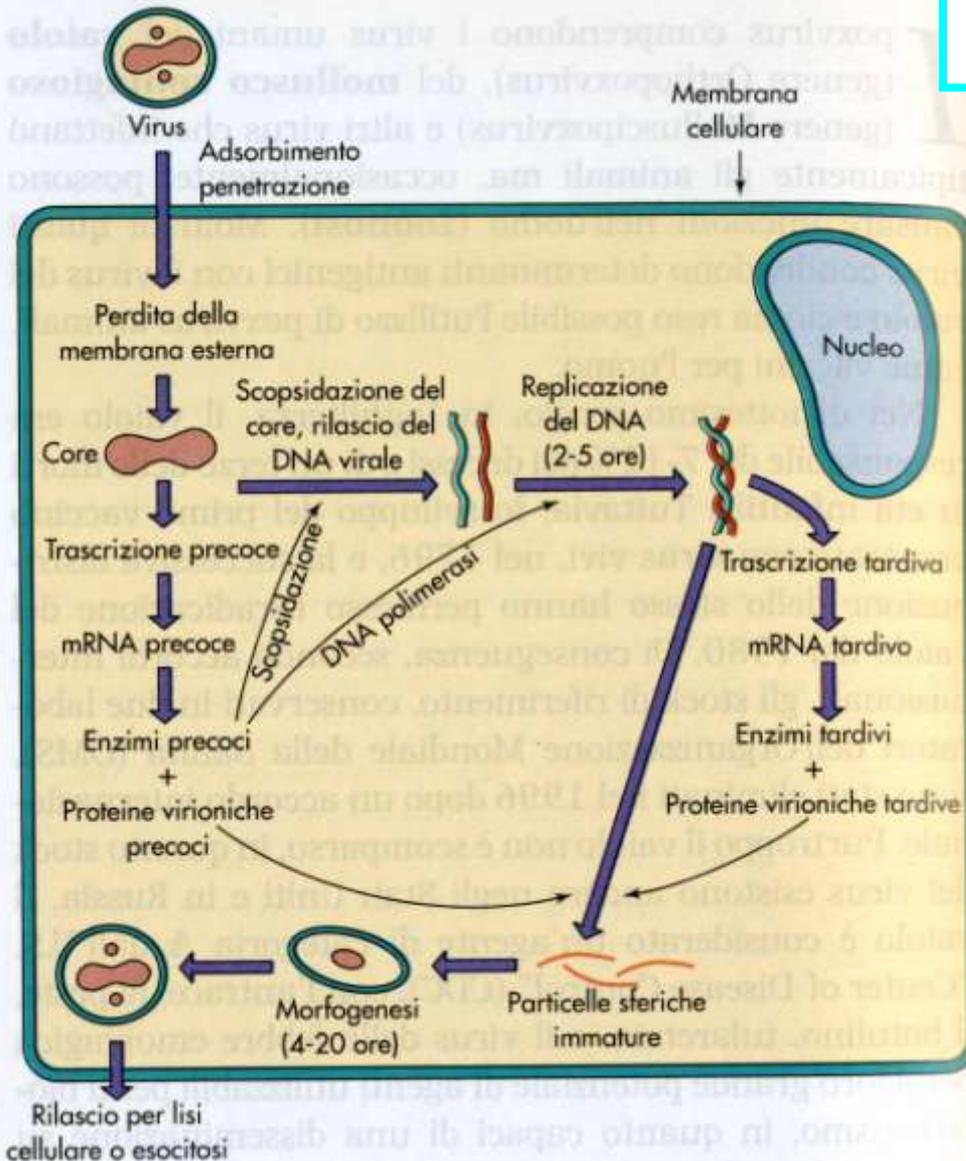
# Classe I

2° gruppo

**Genoma dsDNA**

**Replicazione nel CITOPLASMA**

**Poxvirus**



Hanno **replicazione CITOPLASMATICA**, perchè nel virione è presente una **RNA polimerasi virale (RpDd)**.

Il core viene rilasciato nel citoplasma, dove la RpDd inizia la trascrizione. La spoliatura è completata da enzimi virali. La **DNA polimerasi virale** neosintetizzata replica il genoma, poi avviene la trascrizione tardiva. DNA e proteine vengono assemblate con la membrana del core, che ingloba i corpi laterali e gli enzimi virali. Il virione esce per gemmazione o per lisi

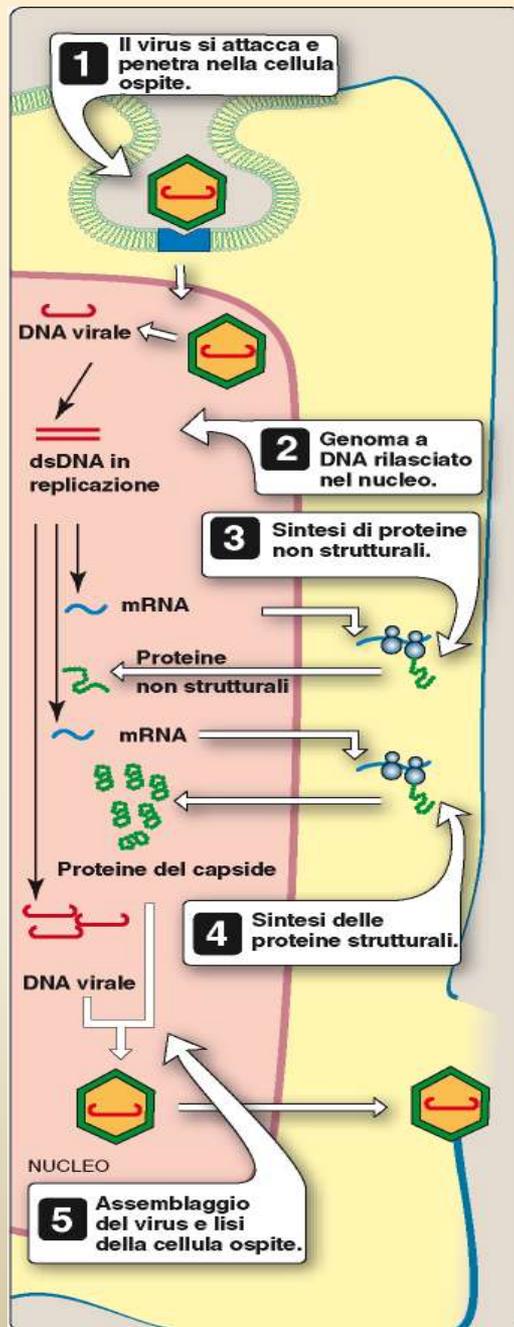
# Classe II

Genoma ssDNA

Replicazione nel NUCLEO

Parvovirus

Circovirus



Replicano nel **NUCLEO** dove formano come intermedio replicativo dsDNA.

Sono virus con piccoli genomi e non codificano polimerasi: utilizzano le **polimerasi della cellula** (sia RpDd che DpDd). Poichè nella cellula l'RNA può essere sintetizzato solo utilizzando uno stampo di DNA a doppia elica, il genoma ssDNA **DEVE** essere convertito in dsDNA **PRIMA** della produzione dell'mRNA.

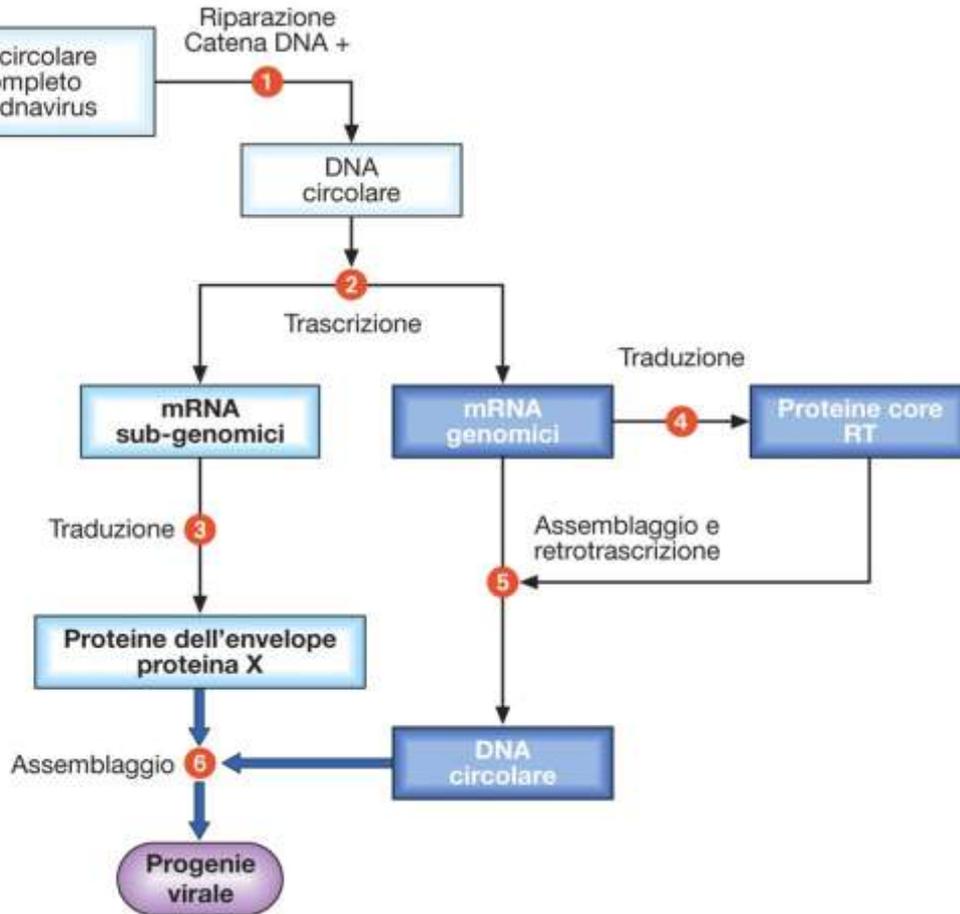
Le **DNA polimerasi cellulari** sono presenti solo in cellule in crescita attiva (es: precursori eritroidi). Trascrizione, replicazione e assemblaggio avvengono nel nucleo. Uscita per lisi.

*Parvovirus: B19*

*Circovirus: il più noto è il TTV, diffuso nella popolazione, che infetta in modo asintomatico diversi organi*

# Classe VII

## Genoma parz dsDNA Replicazione nel NUCLEO Hepadnavirus



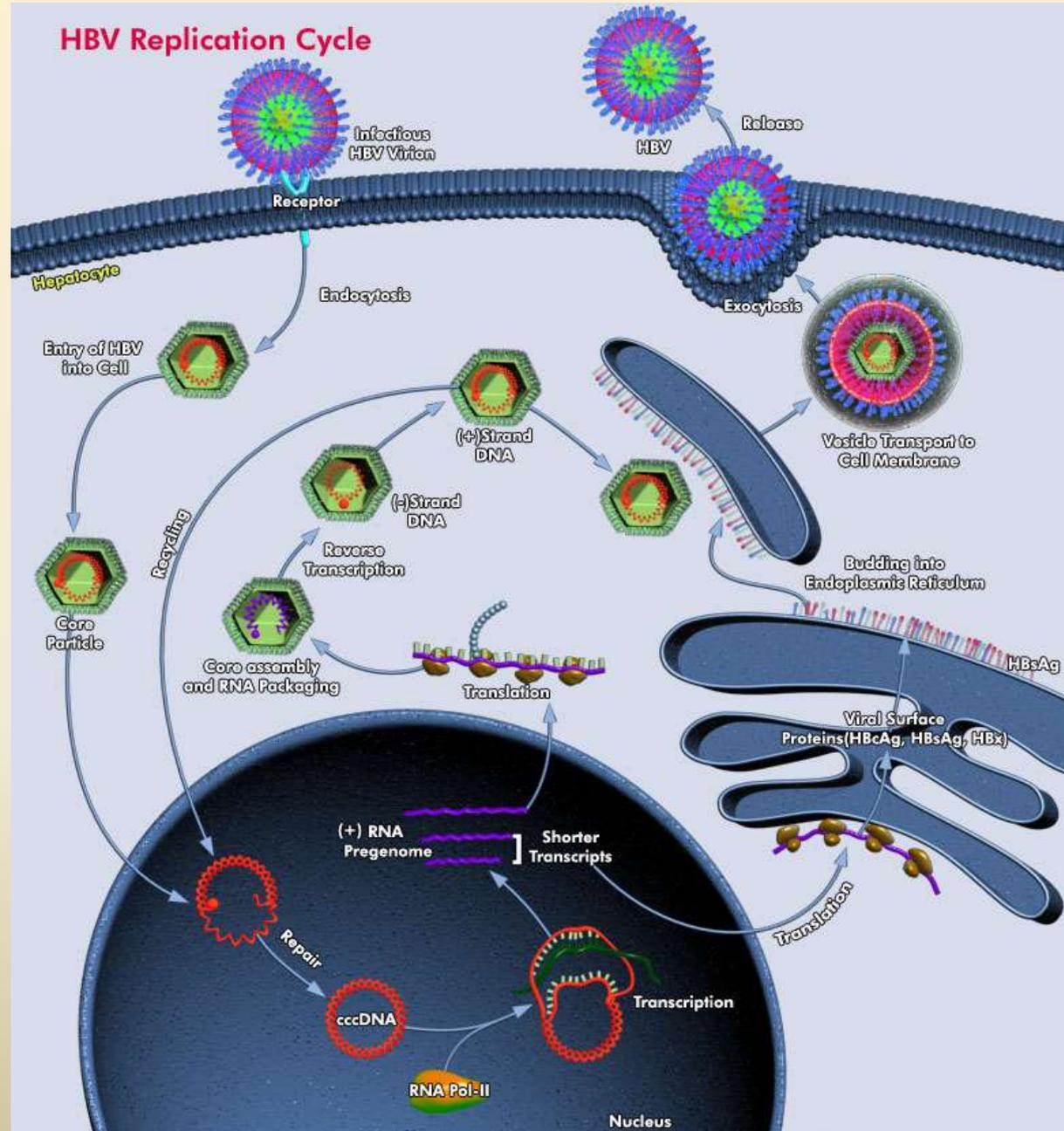
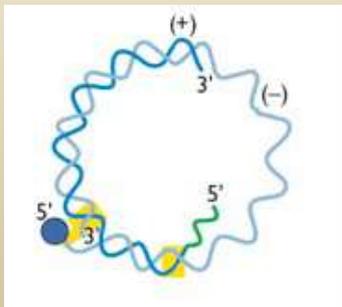
Genoma circolare dsDNA con un'interruzione nella catena a polarità positiva. Mediante **enzimi cellulari nucleari di riparo (NUCLEO)**, il tratto mancante viene sintetizzato con produzione di una molecola interamente bicatenaria che si superavvolge.

Successivamente, ad opera di **RpDd 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 (RT) virale.

# Es: Replicazione virus dsDNA con intermedio di RNA

## (virus Epatite B)

Genoma DNA parzialmente ds: solo emielica (-) è completa. In 5' da una parte c'è una proteina, dall'altra una piccola molecola di RNA. Il DNA viene "riparato" nel nucleo → cccDNA da cui viene trascritto l'RNA(+) genomico e messaggero. Il pregenoma RNA(+) viene assemblato nei capsidi → RT sintetizza il 1° filamento di DNA (-), l'RNA viene degradato e viene iniziata la sintesi del 2° filamento di DNA, che però non termina in quanto il virione esce dalla cellula.



# **Virus a RNA**

NB - Per utilizzare l'RNA come stampo è necessario un enzima specifico: **RNA polimerasi RNA-dipendente (RpRd)**

- Le cellule non codificano RpRd
- L'enzima necessario è codificato dal virus
- Le RNAPol virali producono sia mRNA che RNA genomico
- L'mRNA prodotto è traducibile dai ribosomi cellulari

All'interno dei virus a RNA si distinguono **4 strategie replicative:**

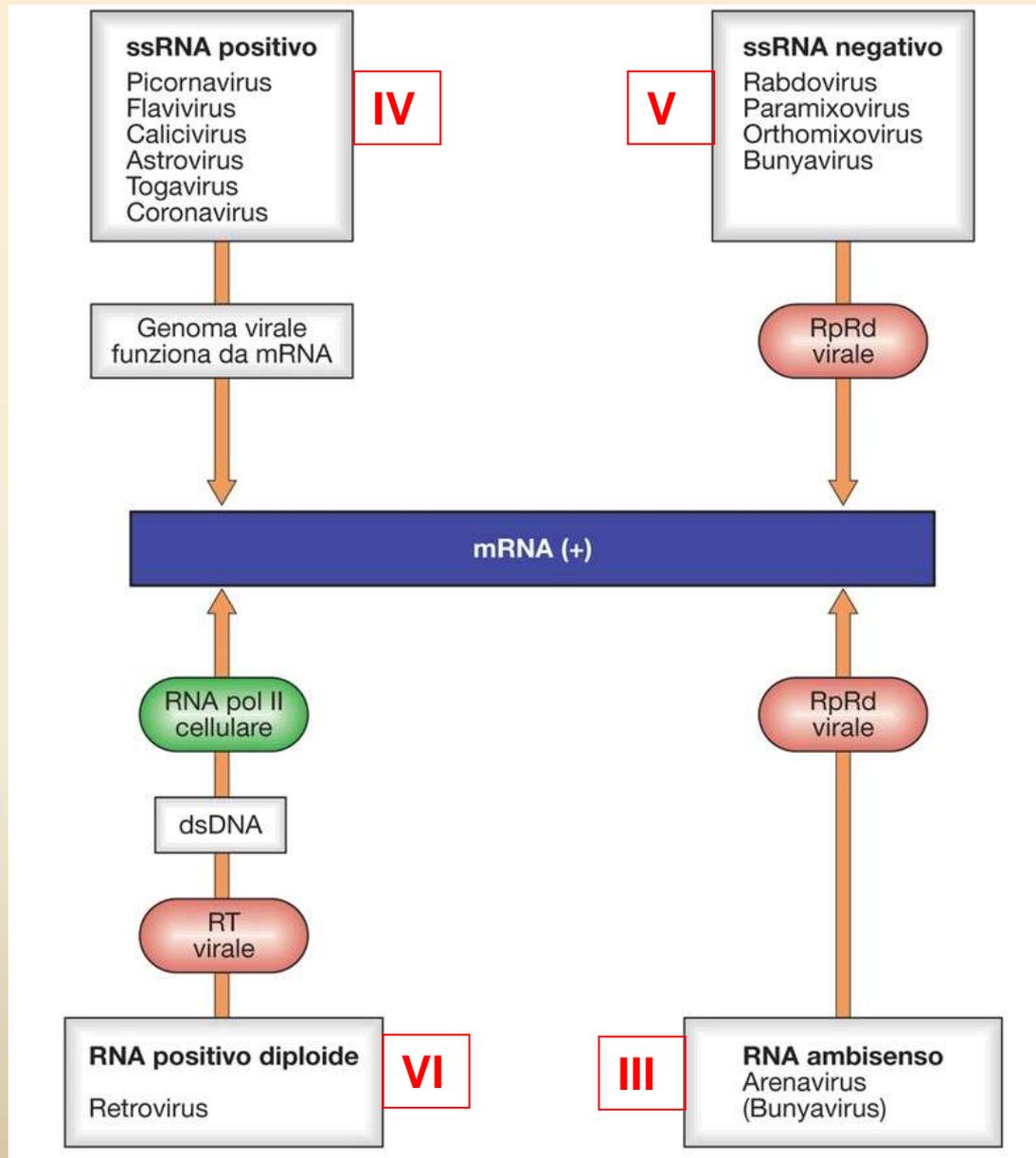
**CLASSE III** – Genoma dsRNA

**CLASSE IV** – Genoma ssRNA(+)

**CLASSE V** – Genoma ssRNA(-)

**CLASSE VI** – Genoma ssRNA(+) → Retrovirus

# Le 4 principali strategie dei virus a RNA



**IV.** Il ssRNA(+) viene immediatamente tradotto.

**V.** Il ssRNA (-) necessita di essere trascritto da una RNA polimerasi-RNA dipendente (RpRd).

**III.** dsRNA

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

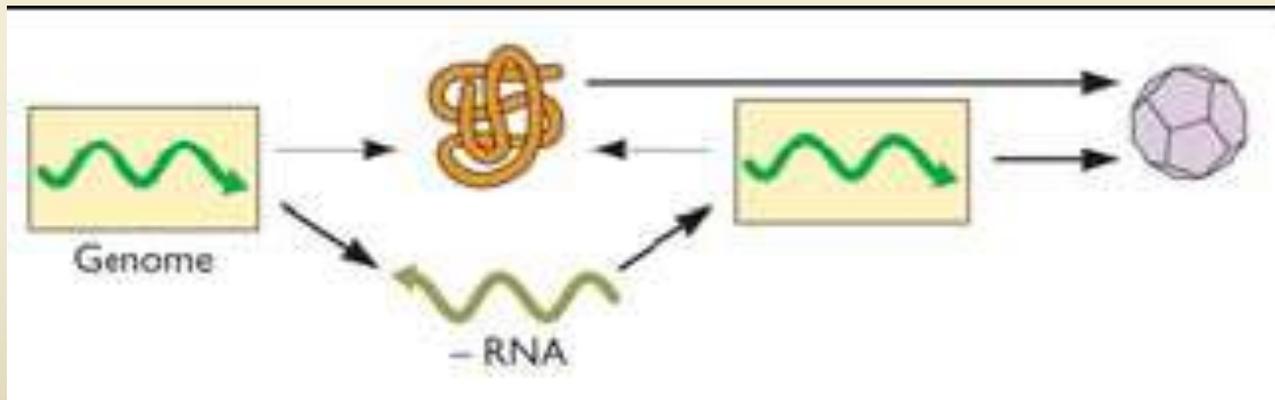
# Classe IV

## Genoma ssRNA+ Replicazione nel CITOPLASMA

Il genoma ha la **stessa polarità dell'mRNA**, può essere direttamente tradotto, quindi il genoma virale è infettante anche se inoculato da solo.

NB - Il genoma virale ha 2 funzioni:

- 1) Agisce come mRNA
- 2) Serve da stampo per sintesi RNA(-) da usare a sua volta come stampo per sintesi RNA(+)



Hanno 2 diverse strategie replicative. Alcuni sono **POLICISTRONICI**: l'RNA è tradotto in una poliproteina, che poi viene tagliata nelle singole proteine, altri hanno una traduzione **COMPLESSA**.

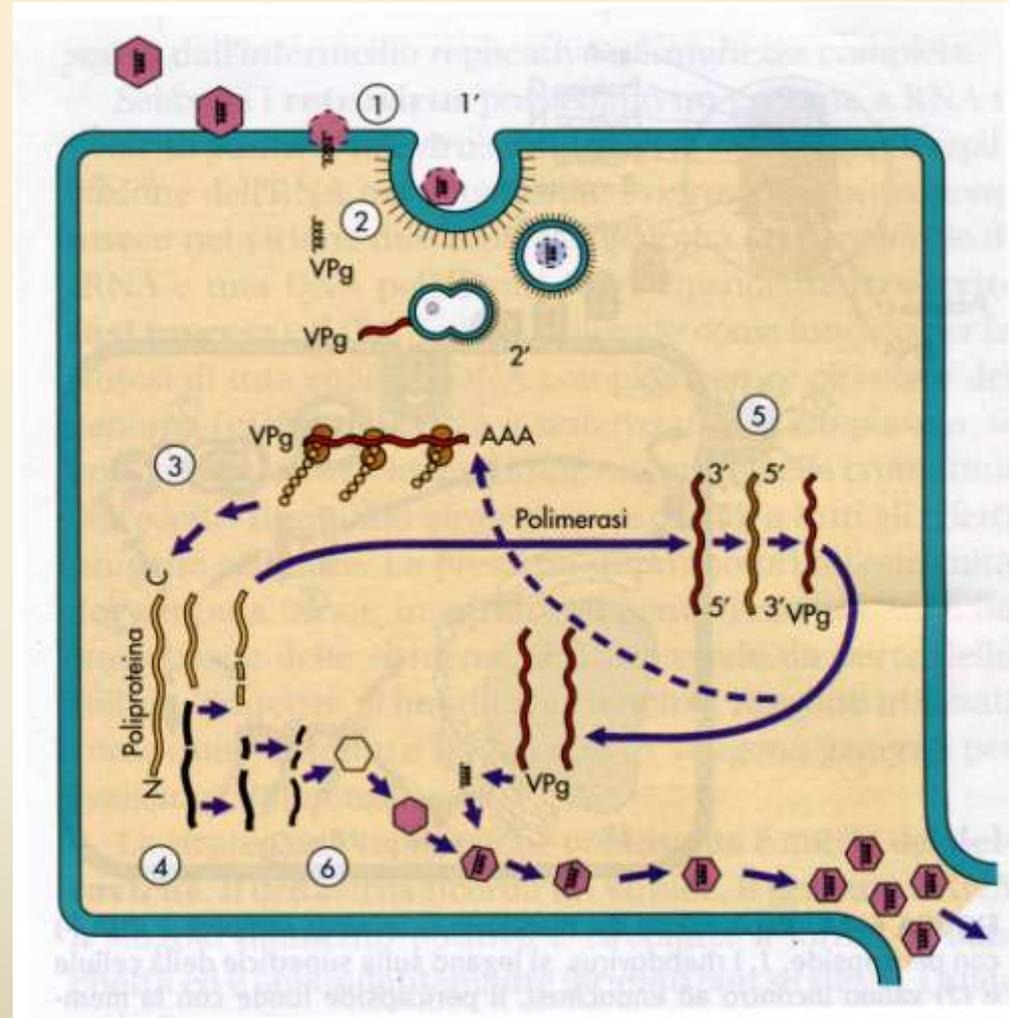
**1. Replicazione POLICISTRONICA.** Nei **Picornavirus** e nei **Flavivirus** (tra cui **HCV**) il prodotto della traduzione è **un'unica poliproteina** che viene successivamente scissa nelle varie proteine codificate per opera di proteasi virali.

**2. Replicazione COMPLESSA.** Nei **Togavirus**, **Coronavirus** e **Calicivirus (HEV)** 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'.

# Esempio replicazione con traduzione policistronica:

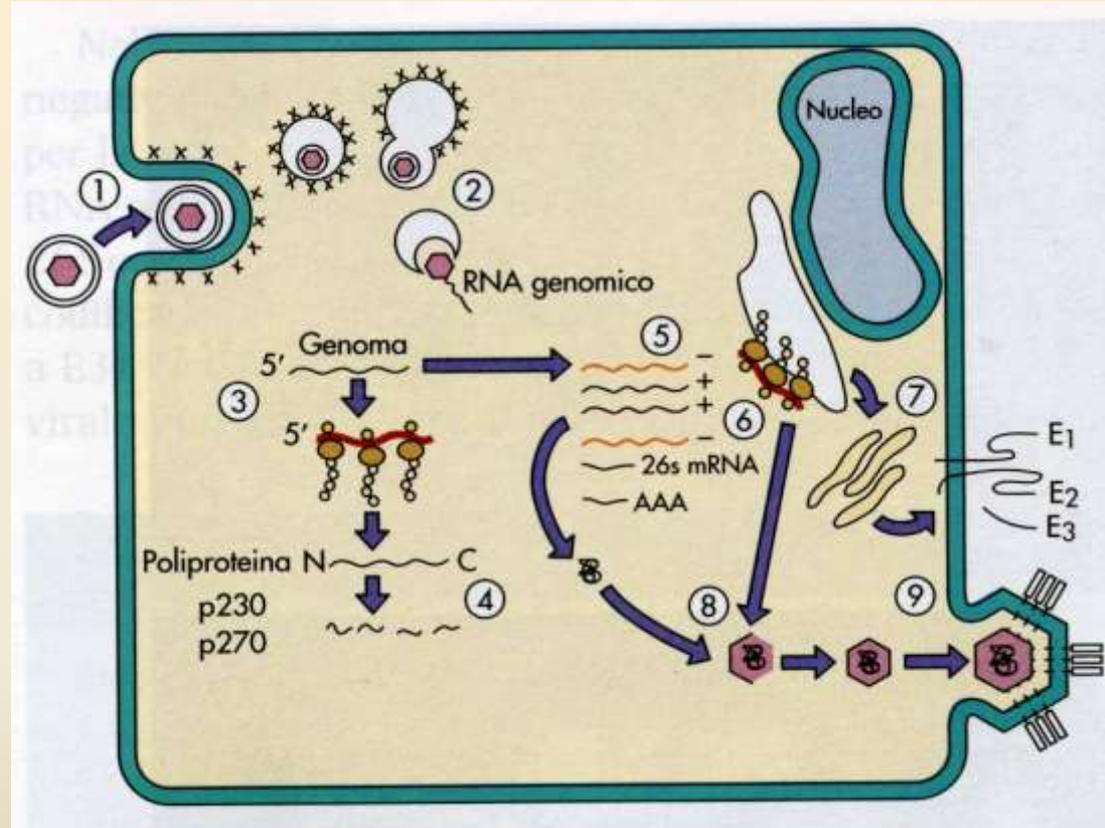
## Picornavirus

- 1) Il legame col recettore destabilizza il capsid
- 2) Il genoma è iniettato attraverso la membrana o, alternativamente, c'è endocitosi e successivo rilascio del genoma
- 3) Il genoma è utilizzato come mRNA, viene sintetizzata **un'unica poliproteina**
- 4) **Taglio proteolitico** delle singole proteine, tra cui una RpRd
- 5) La RNAPol sintetizza (-)RNA sullo stampo del genoma, e poi l'elica +.
- 6) Assemblaggio e rilascio per lisi cellulare.



# Esempio replicazione con traduzione complessa: Togavirus (Alphavirus e Rubivirus)

- 1) Legame al recettore
- 2) Fusione envelope-endosoma e rilascio
- 3) Traduzione parziale, con sintesi di **poliproteine PRECOCI**
- 4) Taglio proteolitico e formazione delle singole proteine
- 5) Replica RNA genomico con intermedio a polarità (-) : (+)  $\Rightarrow$  (-)  $\Rightarrow$  (+)
- 6) Traduzione delle **proteine TARDIVE**
- 7) Glicoproteine dell'involuppo sulla membrana
- 8) Assemblaggio
- 9) Rilascio per gemmazione

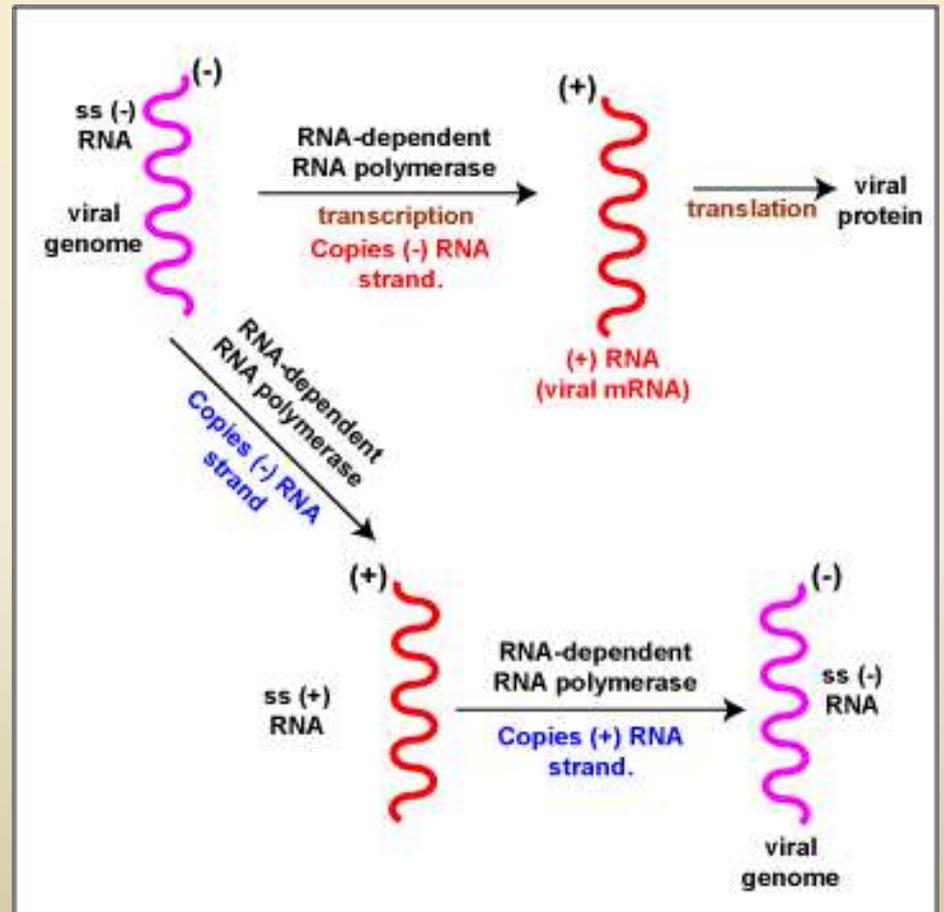


# Classe V

## Genoma ssRNA- Replicazione nel CITOPLASMA

Il genoma non può funzionare come mRNA, ma ha solo una doppia funzione di stampo:

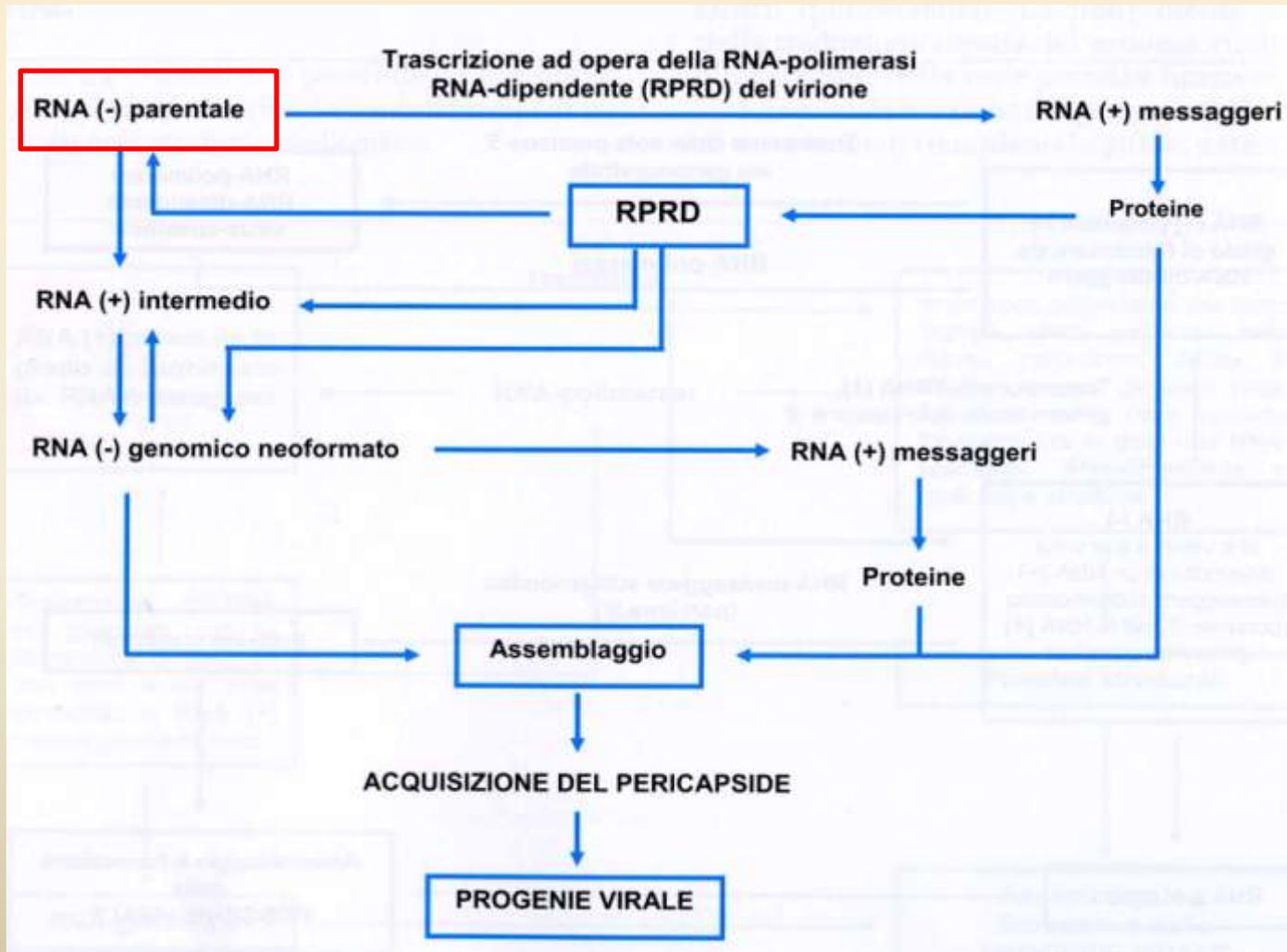
- 1) per la trascrizione dei messaggeri
- 2) per la propria replicazione (sintesi di un intermedio di (+)RNA)



# Replicazione virus ssRNA(-)

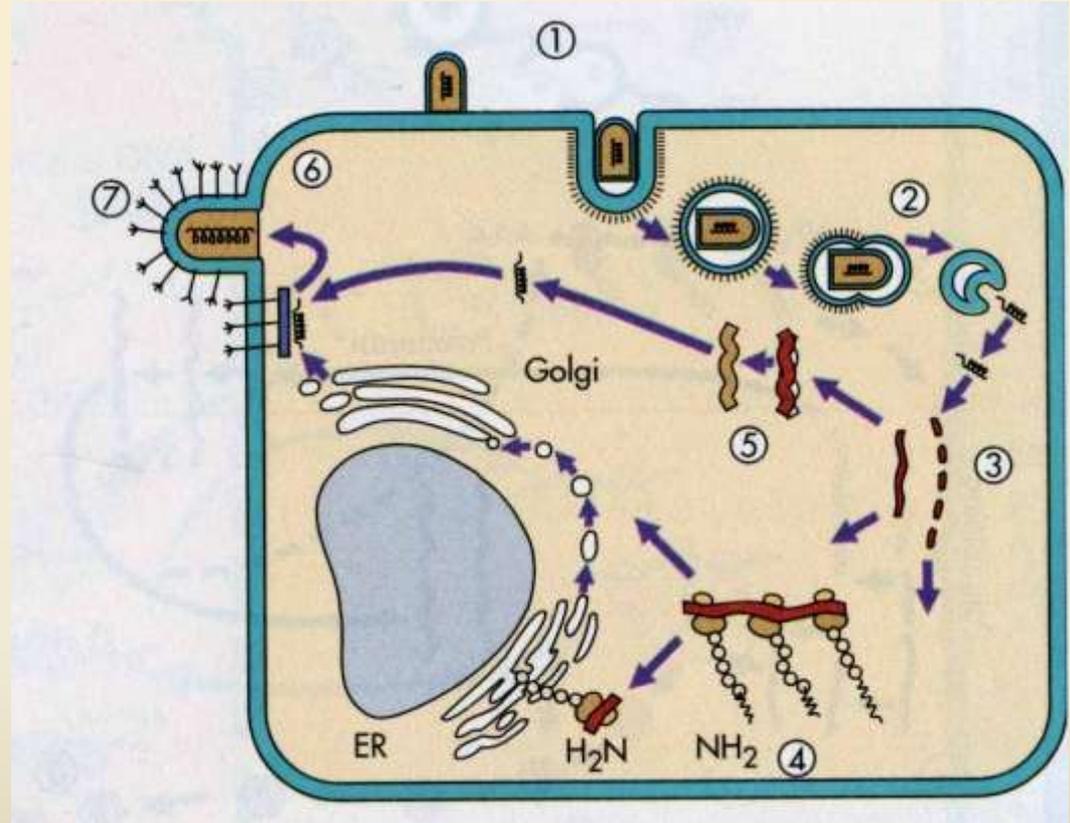
La RpRd DEVE essere presente nel virione.

La RpRd sintetizza mRNA funzionali utilizzando come stampo l'RNA (-) genomico e replica anche il genoma.



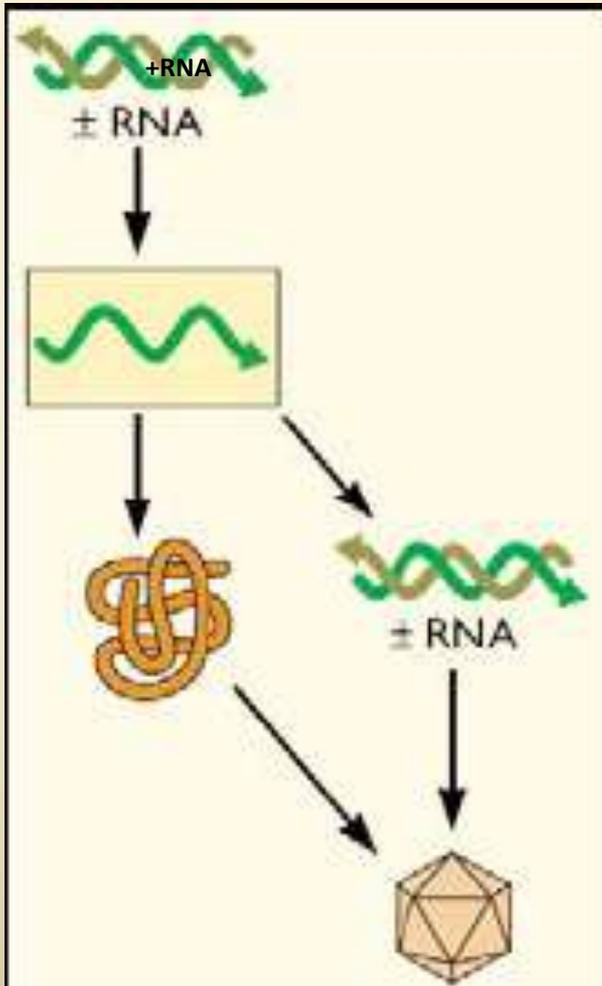
# Esempio replicazione ssRNA(-): Rabdovirus

- 1) Legame col recettore
- 2) Endocitosi
- 3) La RpRd del virione trascrive sia gli mRNA che lo stampo di (+) RNA
- 4) Sintesi proteica
- 5) Replicazione genoma sullo stampo (+)
- 6) Assemblaggio a livello della membrana plasmatica
- 7) Gemmazione



# Classe III

## Genoma dsRNA Replicazione nel CITOPLASMA



RNA bicatenario. E' necessaria una **RpRd** virale per iniziare il ciclo replicativo.

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

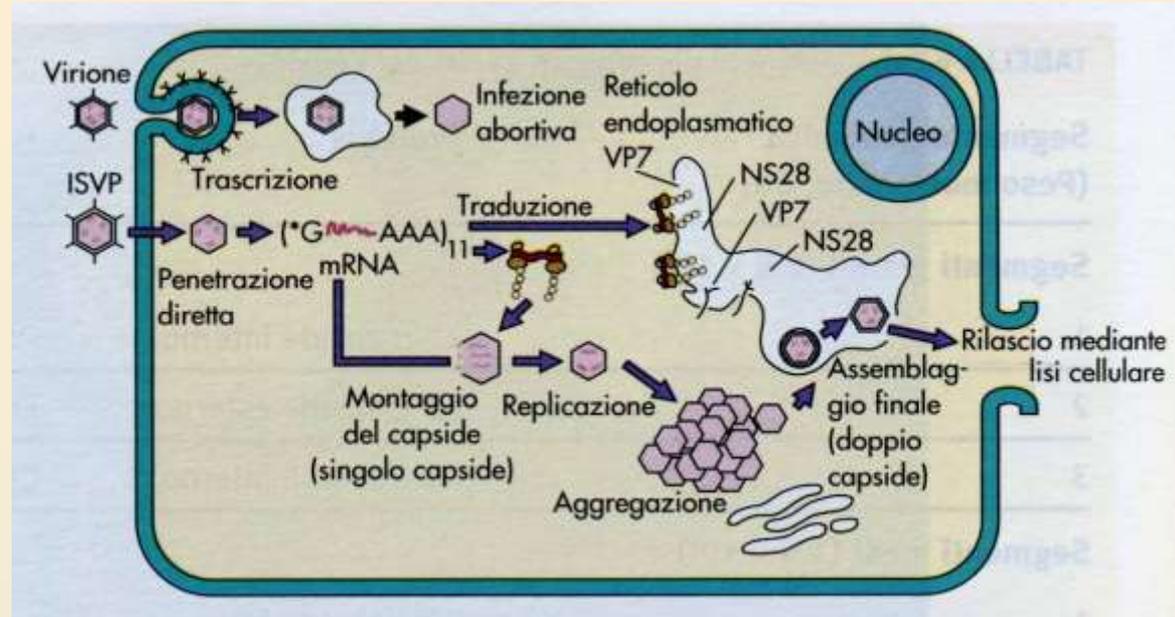
- 1) quella di messaggero
- 2) quella di stampo per la sintesi di molecole di (-)RNA complementari: (+)RNA e (-)RNA rimangono uniti generando RNA ds

## Esempio replicazione dsRNA: Reovirus

Replicazione

**CITOPLASMATICA.**

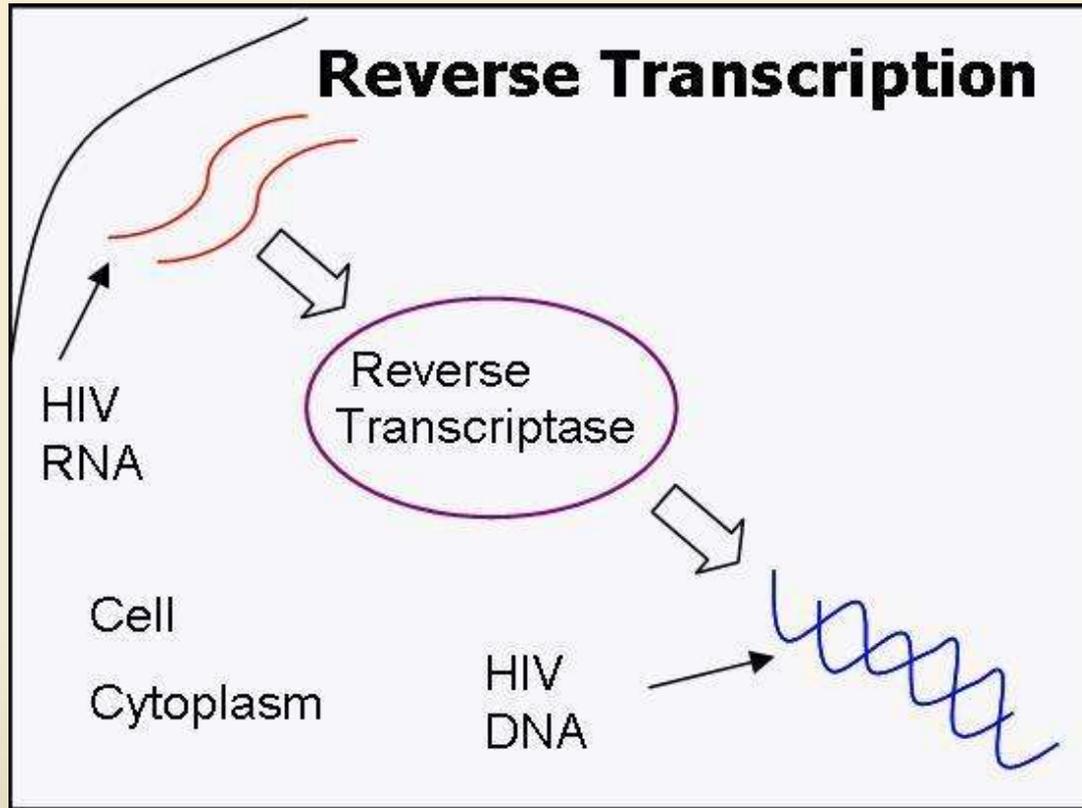
Genoma segmentato (10+ segmenti), da ogni frammento viene trascritto un solo mRNA monocistronico



Replicazione di **Rotavirus**. I virioni sono attivati da proteasi (tratto GI) a formare ISVP (infective subviral particle). L'ISVP si lega alla cellula, penetra e perde il capside esterno. Il capside interno contiene l'RNAPol RNAdip che trascrive l'mRNA sul genoma a doppio filamento. Alcuni segmenti sono trascritti precocemente, altri tardivamente. Enzimi del core modificano l'mRNA (cap, poliA). Parte dell'mRNA viene inglobato nei capsidi interni, e funge da stampo per il genoma ds. I capsidi si aggregano, entrano nel RE, acquisiscono temporaneamente un envelope, che poi viene perso. Il virus esce alla lisi della cellula.

# Classe VI

**Genoma ssRNA+ (RT)  
Replicazione nel NUCLEO**

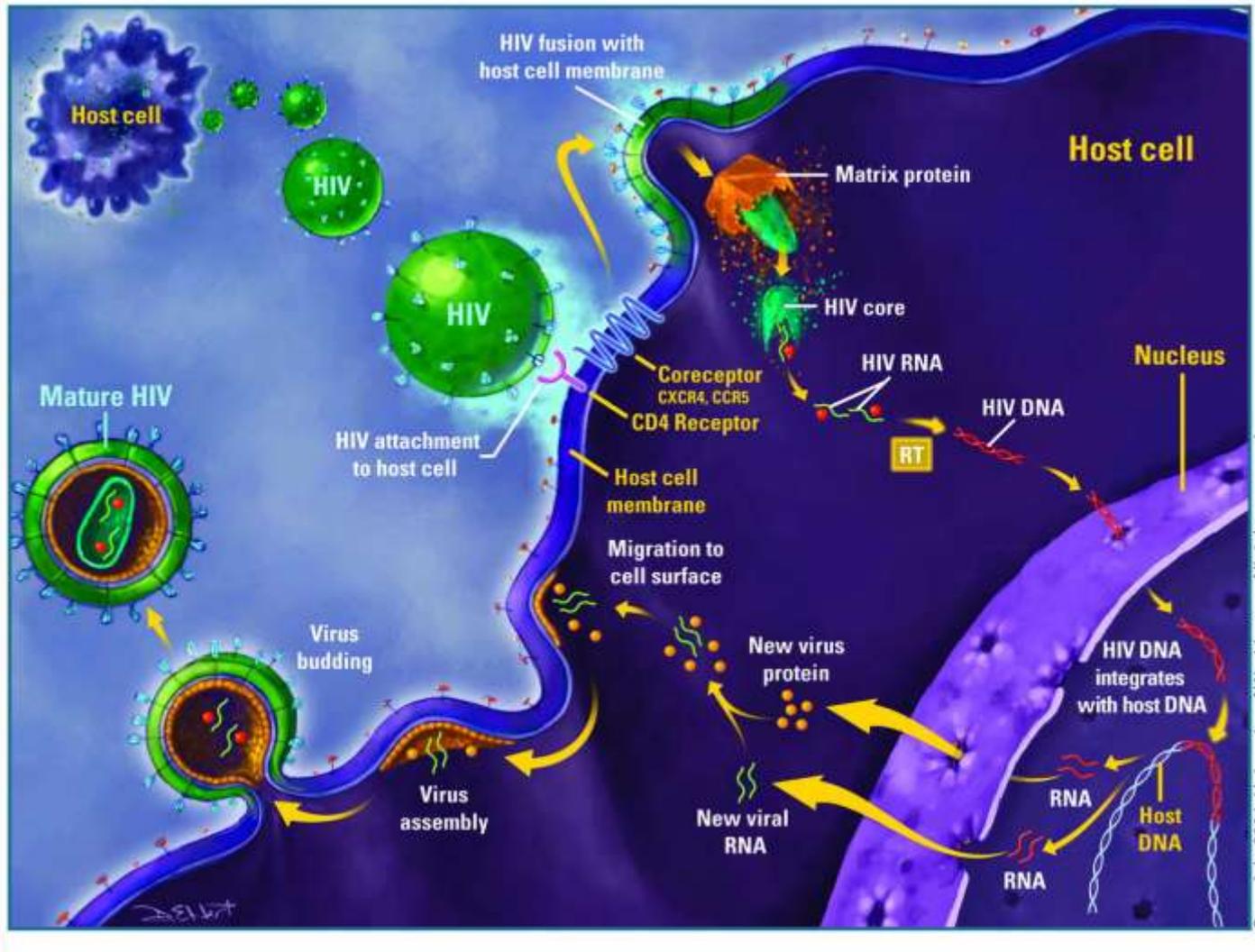


**2 molecole di RNA(+) lineare, legate insieme a formare un dimero (genoma diploide).**

**Non funziona come mRNA.**

**La sola funzione dell'RNA genomico è di fungere da stampo per la sintesi di dsDNA.**

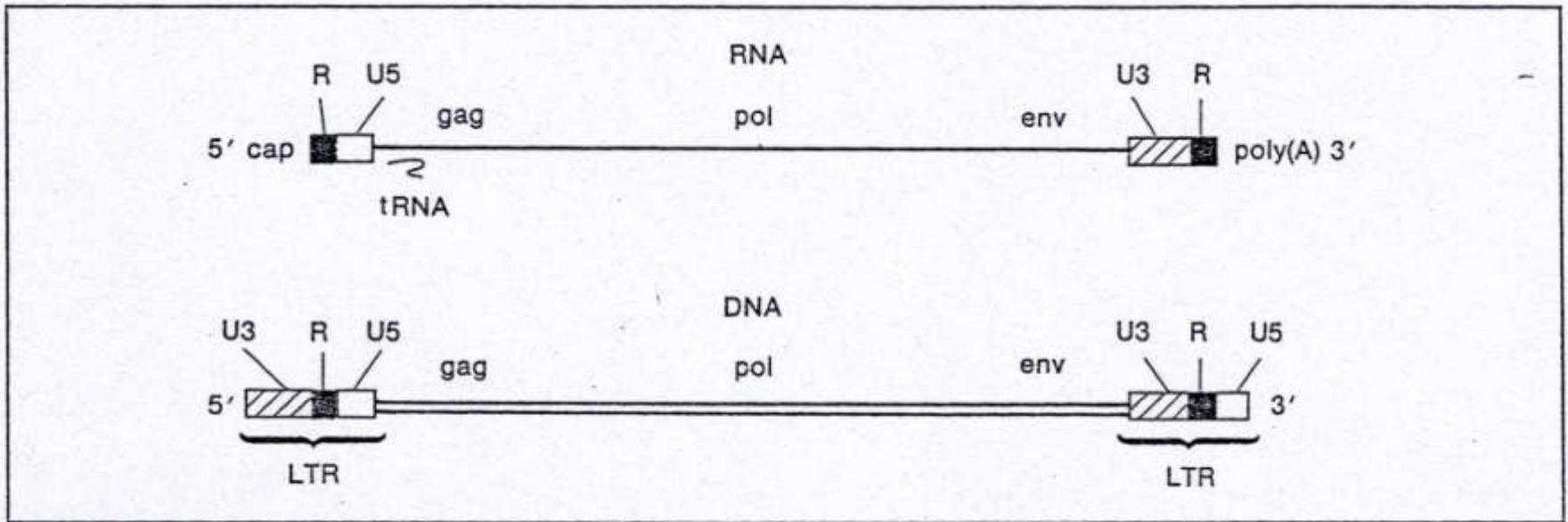
# Esempio replicazione Retrovirus: HIV



1. Retrotrascrizione RNA genomico in DNA ad opera della RT virale
2. Integrazione del genoma virale nel DNA cellulare
3. Trascrizione del genoma virale ad opera della RNA polimerasi II
4. Splicing dell'RNA
5. Traduzione dell'mRNA
6. Assemblaggio delle proteine strutturali e nuovi genomi

NB – Prodotte 2 specie di RNA: spliced (geni regolatori) e non spliced (nuovo genoma o poliproteina)  
 Il taglio della poliproteina (componenti strutturali) è fatto da una proteasi virale.

**N.B.- In realtà la replicazione dei retrovirus è più complessa, specialmente la retrotrascrizione e trascrizione – le vedremo entrambe più in dettaglio quando studieremo i retrovirus**



**Figura 50.7.**

Schema generale della molecola di RNA di un retrovirus e della molecola di DNA del rispettivo provirus.

La struttura dell'RNA genomico e del DNA provirale sono diverse!!

## **5. Assemblaggio**

Una volta sintetizzato un adeguato numero di copie di acido nucleico e proteine virali, i virioni possono essere assemblati.

In gran parte dei virus il capside è la parte montata per prima, tramite l'**AUTOASSEMBLAGGIO** dei capsomeri virali.

I capsidi sono successivamente riempiti di acido nucleico virale.

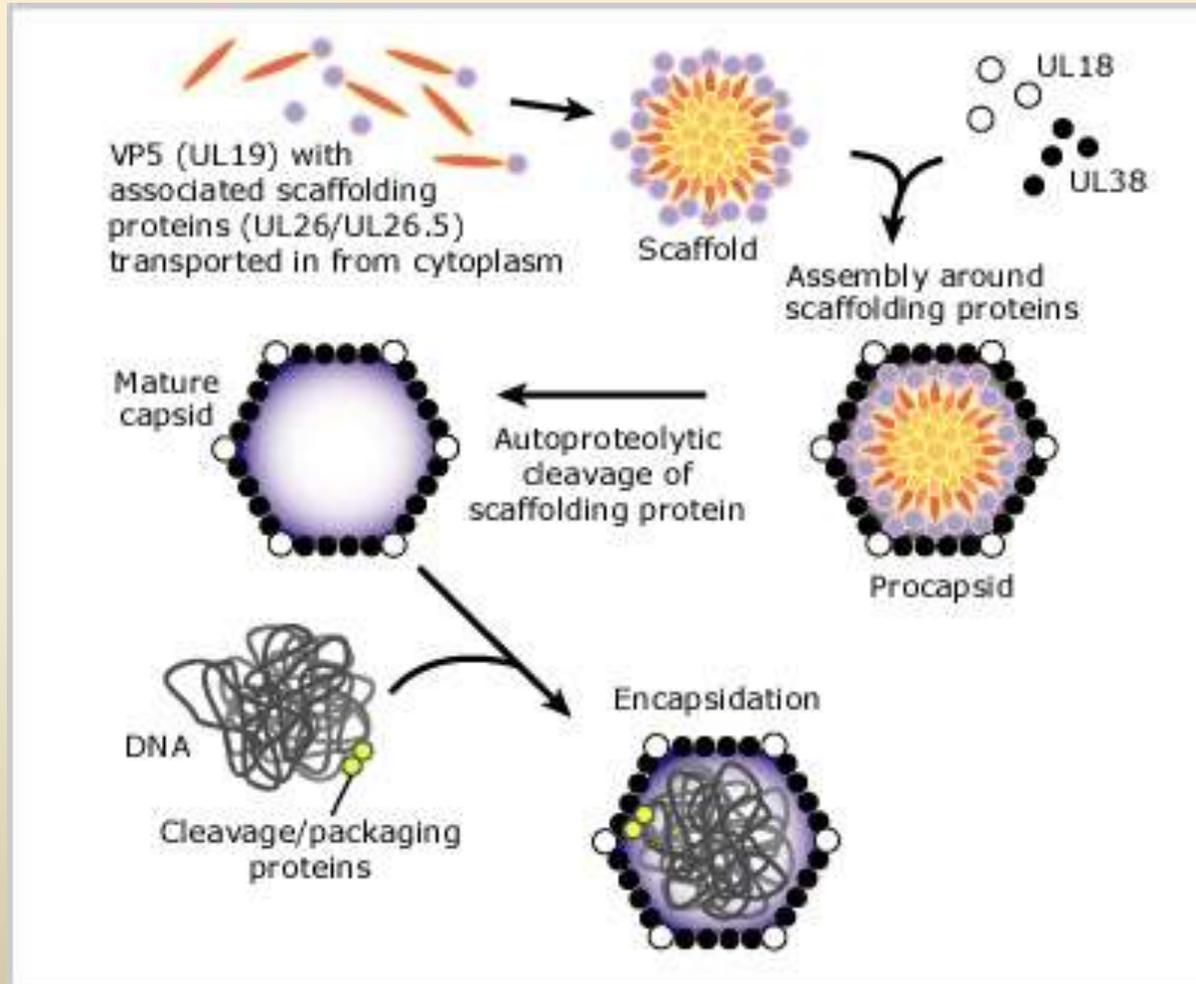
**L'autoassemblaggio di proteine strutturali porta alla formazione di un **pro-capside** in cui entra l'acido nucleico virale, infine si ha la maturazione finale del virione mediante l'intervento di proteine enzimatiche.**

**Es. Picornavirus:**

- 1) formazione di un procapside con 60 capsomeri, ciascuno formato da VP0, VP1 e VP3;**
- 2) l'RNA entra nel procapside**
- 3) una funzione enzimatica taglia VP0 in VP2 e VP4, causando il riarrangiamento finale del capside**

## Es. assemblaggio: HSV

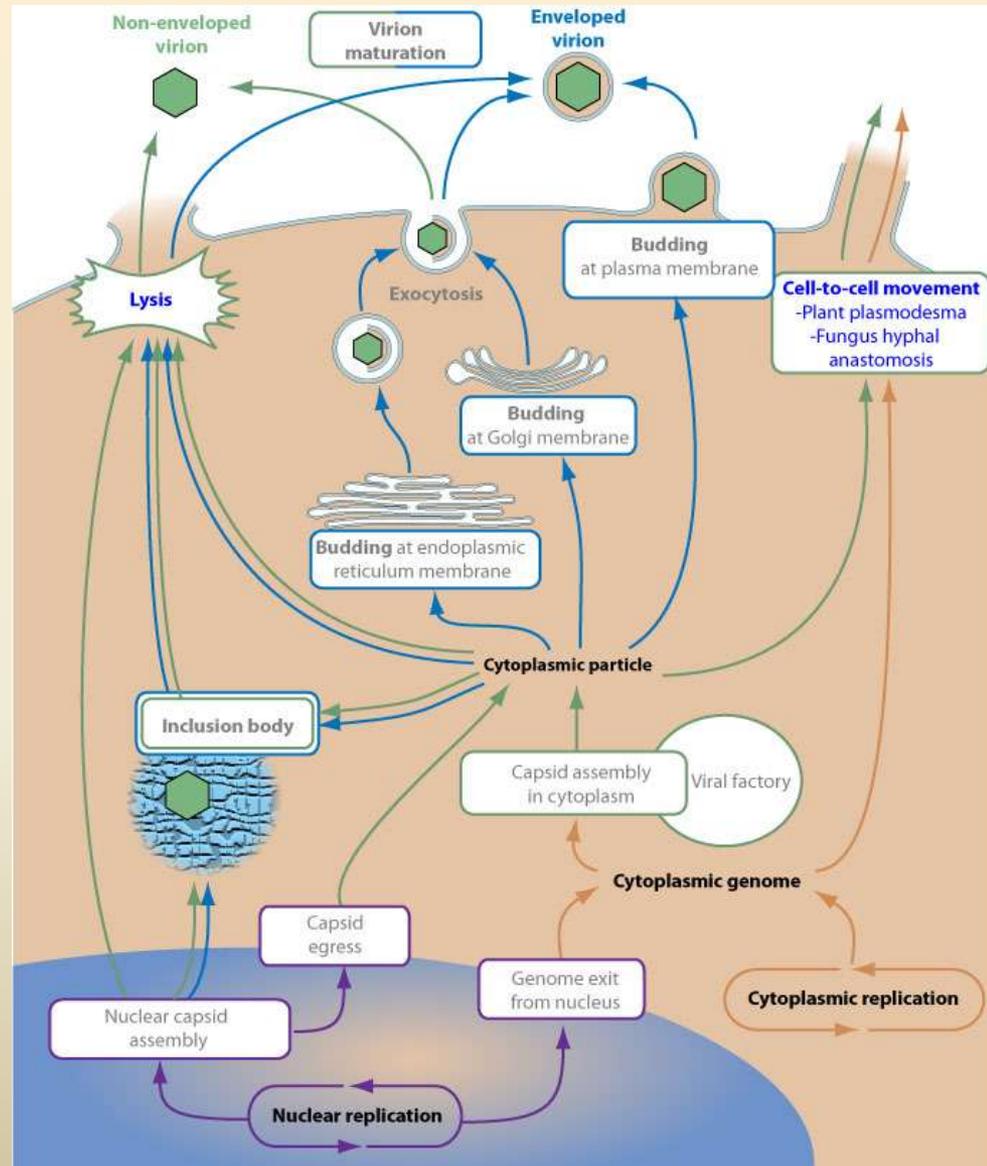
Proteine “scaffold” che fungono da impalcatura.



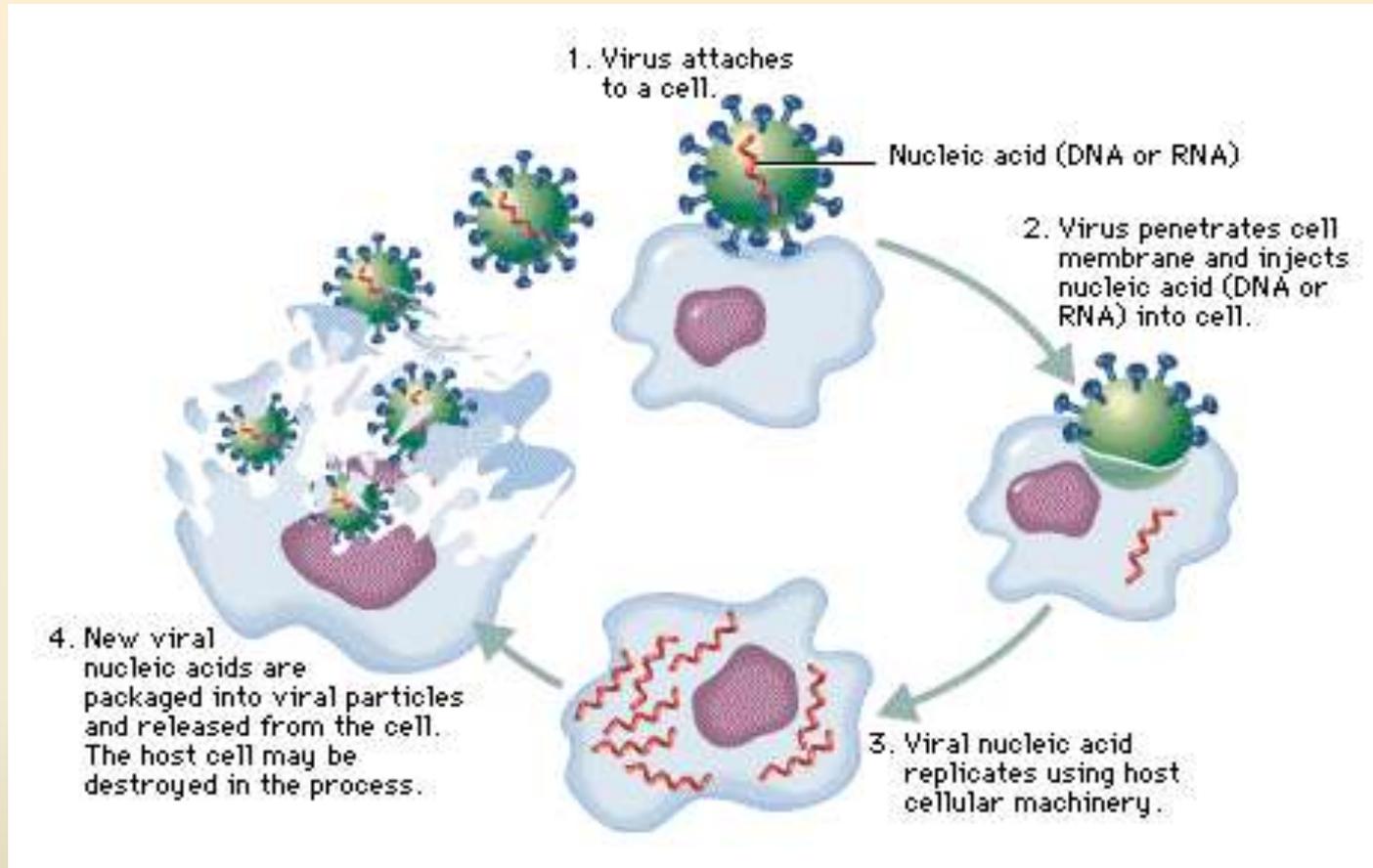
# 6. Liberazione della progenie virale dalla cellula ospite

Le progenie virale neoformata può uscire dalla cellula per:

- lisi cellulare
- esocitosi
- gemmazione



## Es: rilascio dei virioni per **lisi** dalla cellula infettata (Batteriofago, HSV, ecc)

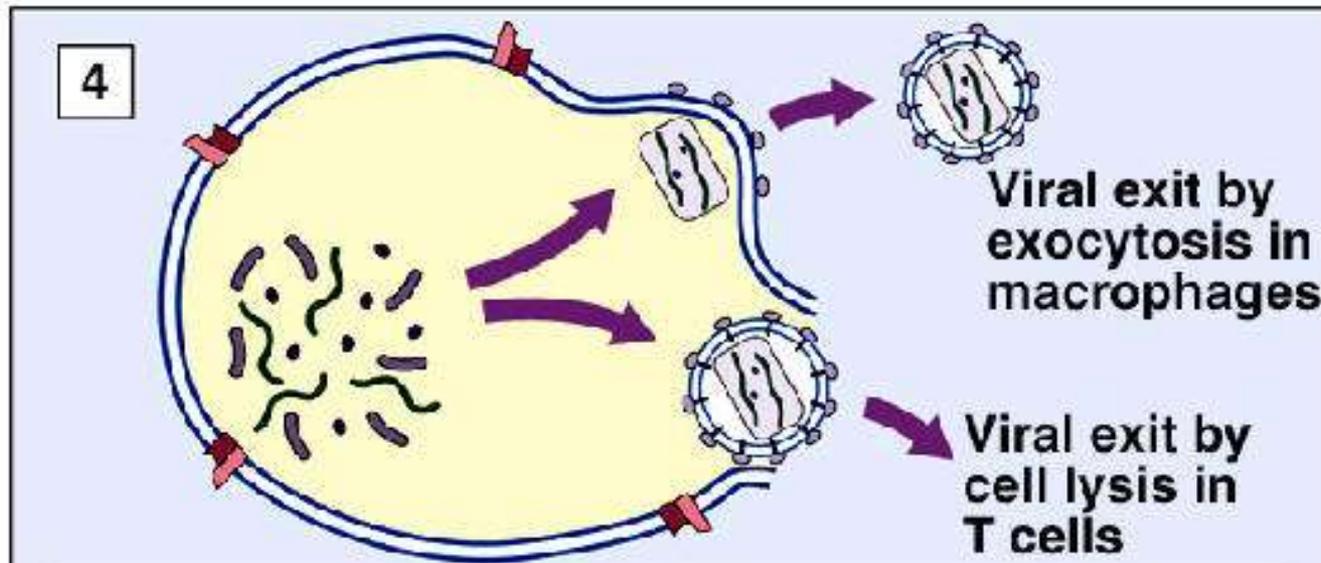


La lisi cellulare è indotta dalle modifiche di **permeabilità** della membrana e dal **blocco metabolico**.  
Inoltre molti virus producono fattori che inducono **apoptosi** e/o **autofagia**.

Es. *HIV*: rilascio dei virioni per **esocitosi** o **lisi** dalla cellula infettata

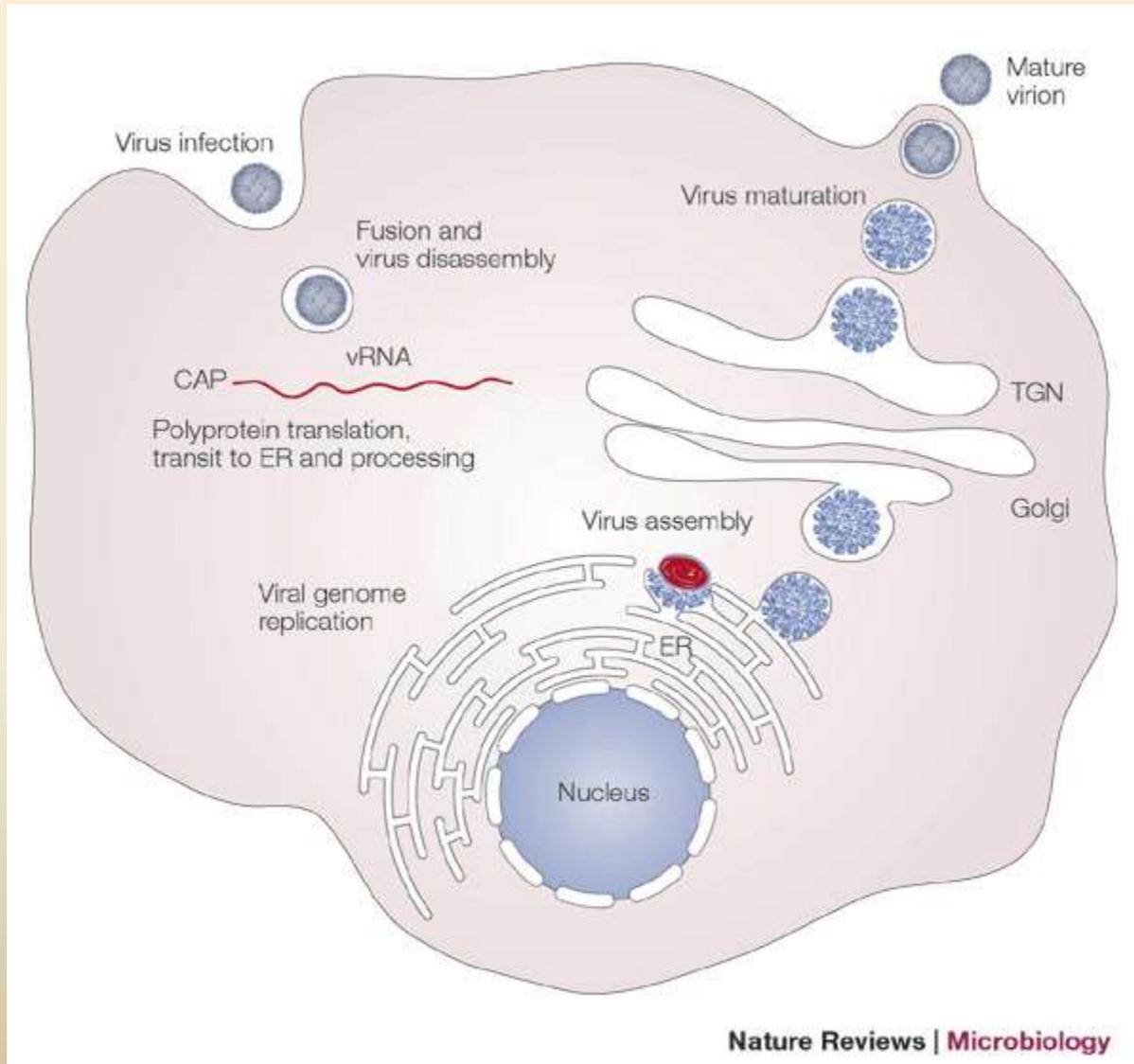
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

## HIV Infection Cycle – Step 4



**Complete HIV particles are assembled. In macrophages, HIV buds out of the cell by exocytosis. In T cells, however, HIV ruptures the cell, releasing free HIV back into the bloodstream.**

# Es. *Flavivirus*: rilascio dei virioni per **esocitosi** dalla cellula infettata



Es: rilascio dei virioni per **gemmazione** dalla cellula infettata (Orthomyxovirus, HSV, ecc).

Nei virus con **involuppo**, mentre le proteine del capside si combinano fra loro e attorno al genoma, alcune proteine e glicoproteine virali si inseriscono sulla **membrana citoplasmatica**, il capside si accosta a queste zone e vi aderisce (tramite le proteine della matrice), si verifica una estroflessione e la **gemmazione**.

