

LA MOLTIPLICAZIONE DEI VIRUS

I virioni, rappresentano la fase biologicamente inattiva, dei singoli virus. Le diverse famiglie di virus utilizzano strategie replicative a causa della differente organizzazione del genoma. È facilmente intuibile infatti che le esigenze di un virus con genoma a **DNA** non possono essere identiche a quelle di un virus ad **RNA**.

Il ciclo di moltiplicazione virale

La moltiplicazione dei virus avviene all'interno della cellula infetta ed è assolutamente peculiare in quanto **1)** il virus perde la unità morfologica che caratterizza il virione nella fase extracellulare, **2)** l'acido nucleico e le proteine strutturali della progenie virale vengono sintetizzati separatamente in un gran numero di copie che si riuniscono poi in altrettanti virioni maturi al termine del ciclo di moltiplicazione. Innanzitutto perché un virus possa moltiplicarsi è necessario che esso infetta una cellula. Abbiamo virus in grado di infettare quasi ogni tipo di cellula in numerose specie animali, e virus strettamente limitati ad un solo tipo di cellula di un'unica specie. Le cellule che possono essere infettate da un virus sono dette **cellule sensibili**. Perché l'infezione virale, infatti, sia produttiva, occorre che la cellula sia non solo sensibile, ma anche permissiva. Una cellula è permissiva, quando offre le condizioni necessarie e sufficienti a consentire la completa trascrizione del genoma e la sintesi di tutte le proteine virus-specifiche. L'infezione virale di una cellula può tradursi in un'infezione produttiva, restrittiva, latente o abortiva.

- **l'infezione produttiva:** richiede che la cellula sia non solo sensibile ma anche permissiva
- **l'infezione restrittiva:** si osserva quando la cellula sensibile presenti condizioni di permissività non costanti e legate a particolari condizioni fisiologiche o a particolari fasi del ciclo cellulare. Ex: **in parvovirus B19** che infetta esclusivamente le cellule nucleate (precursori) della serie eritroide e si replica solo in coincidenza con un'attiva moltiplicazione delle cellule ospiti.
- **L'infezione latente:** si verifica quando il DNA del virus infettante si integra nel genoma della cellula infetta, replicandosi ad ogni ciclo cellulare e conferendo, alla cellula peculiari caratteri fenotipici per la parziale espressione del genoma, o rimanendo completamente silente, sino a che non si creino condizioni idonee alla deintegrazione del genoma virale da quello cellulare o, comunque, all'avvio del processo trascrittivo del genoma virale ed all'inizio di un ciclo replicativo completo. Ex: **herpesvirus e retrovirus**.
- **Infezione abortiva:** si verifica quando una cellula sensibile non è completamente permissiva per l'espressione di tutti i geni virali, sicché l'infezione si esaurisce nella produzione di alcuni prodotti precoci virus-specifici senza un ciclo completo di replicazione e senza la produzione di progenie virale.

Molto schematicamente un ciclo di moltiplicazione virale è suddiviso in 5 fasi:

- 1) attacco del virione alla superficie della cellula
- 2) penetrazione del virus all'interno della cellula
- 3) esposizione dell'acido nucleico virale
- 4) sintesi delle macromolecole virus specifiche
- 5) montaggio dei virioni neoprodotti e liberazione della progenie virale.

Attacco dei virus alla cellula

Il contatto iniziale tra virus e cellula è il risultato di collisioni casuali, perché una collisione si traduce in un attacco efficiente, è necessario che una proteina presente alla superficie del virione collida con una struttura complementare (recettore) presente sulla membrana cellulare. In altre parole, un virus può stabilire un iniziale rapporto solo con quelle cellule che possiedono alla superficie recettori idonei a reagire con gli antirecettori presenti alla superficie del virione. L'attacco tra antirecettore virale e recettore cellulare richiede un ambiente sufficientemente ricco di ioni in grado di neutralizzare le cariche di superficie delle strutture complementari in modo da ridurre la repulsione elettrostatica. La sensibilità di una cellula nei confronti di un particolare virus è definita dalla presenza di idonei recettori. Ovviamente, i recettori non si trovano alla superficie cellulare al solo scopo di permettere l'ancoraggio dei virus. Si tratta di strutture che hanno altre funzioni e che occasionalmente presentano zone complementari all'antirecettore virale. EX: il virus di epstein-barr trova alla superficie dei linfociti B il suo ancoraggio nel recettore per il complemento, il virus della rabbia interagisce con i recettori per l'acetilcolina presenti nelle giunzioni neuromuscolari, il virus dell'HIV hanno i loro recettori in alcune proteine di membrana con la funzione di ligandi intercellulari, per la loro struttura appartenenti alla superfamiglia delle Ig. Data la fondamentale funzione svolta dall'antirecettore virale, nel condizionare la prima fase dell'infezione, è intuitivo che gli anticorpi che agiscono contro l'antirecettore virale sono quelli che risultano provvisti della capacità di neutralizzare la capacità infettante del virus. Alcune specie di virus comprendono diversi tipi antigenici di virioni, pur ancorandosi alla cellula sensibile in corrispondenza dello stesso recettore. Per spiegare l'apparente paradosso fra la presenza di un unico recettore sulla cella sensibile e l'esistenza di diversi tipi antigenici è stata avanzata la teoria del canyon, ipotizza che l'antirecettore virale sia situato in una depressione della molecola proteica, raggiungibile dalla molecola che funziona da recettore cellulare ma che è inaccessibile alla molecola anticorpale.

Penetrazione dei virus nella cellula ed esposizione (uncoating) dell'acido nucleico virale.

La penetrazione del virus all'interno della cellula sensibile si verifica quasi istantaneamente dopo l'attacco al recettore. Nei caso dei virus privi di involucro pericapsidico, subito dopo il legame con il recettore, essi vengono internalizzati mediante traslocazione attraverso la membrana cellulare o sono trasferiti all'interno del citoplasma contenuti in una vescicola endocitica. In ambedue i casi il processo di internalizzazione favorisce la disintegrazione del capsido e la liberazione del genoma nel citosol. Nel caso di virus provvisti di peplomo la penetrazione può avvenire o per fusione dell'involucro lipoproteico con la membrana cellulare esterna, con immediata liberazione del nucleocapside nudo all'interno del citoplasma, oppure per introduzione in una vescicola endocitica e successiva fusione dell'involucro lipoproteico virale con la membrana della vescicola e liberazione del nucleocapside nel citoplasma. La fusione del peplomo virale con la membrana plasmatica richiede l'intervento di specifiche proteine fusogene presenti nell'involucro del virione.

Sintesi delle macromolecole virus-specifiche.

I virus dipendono dalla cellula ospite per l'approvvigionamento dell'energia e dei precursori a basso peso molecolare necessaria alla sintesi delle macromolecole virali, nonché per la fornitura delle strutture (ribosomi) e degli enzimi necessari alla sintesi proteica. Le macromolecole virus-specifiche sintetizzano nei batteri infettati dal DNA di alcuni batteriofagi in un ordine cronologico ben definito. Subito dopo l'infezione, ma prima della sintesi del DNA fagico, compaiono una serie di nuovi enzimi. Dopo l'inizio della sintesi del DNA, la sintesi degli

enzimi iniziali si arresta e inizia la sintesi delle proteine tardive e cioè delle proteine dell'involucro proteico e del lisozima fagico. Nella replicazione dei virus le diverse sintesi macromolecolari non si presentano in una così rigorosa sequenza temporale. Nel caso di alcuni deossiribovirus è però possibile distinguere, in linea di massima, le sintesi proteiche virus-specifiche in precoci e tardive a secondo che per essere attuate non richiedano (precoci) o necessitano (tardive) la preventiva replicazione dell'acido nucleico virale. Le proteine precoci comprendono essenzialmente gli enzimi necessari alla replicazione dell'a.n. virale e le proteine che inibiscono le sintesi macromolecolari della cellula ospite. Le proteine tardive sono sintetizzate dopo la replicazione dell'a.n. virale e comprendono proteine strutturali della progenie virale.

LE STRATEGIE REPLICATIVE DEI VIRUS

L'evento chiave della replicazione virale è rappresentato dalla sintesi di proteine virali ad opera del macchinario proteino-sintetico della cellula infetta. Pertanto, perché la replicazione abbia luogo, il virus deve essere in grado di presentare al macchinario proteino-sintetico della cellula, uno o più RNA-messaggeri che la cellula possa riconoscere come tali e tradurre nelle relative proteine. Per raggiungere questo obiettivo, un virus deve essere in grado di superare alcuni ostacoli:

- 1) nella cellula eucariotica, gli RNA mes vengono sintetizzati nel nucleo, per trascrizione del DNA ad opera della trascrittasi cellulare e, dopo adeguata elaborazione, trasferiti nel citoplasma dove vengono tradotti nelle rispettive proteine. La cellula eucariotica, quindi, è priva di enzimi in grado di sintetizzare RNA-mes per trascrizione di una molecola di RNA, sia nel nucleo sia nel citoplasma, nonché di enzimi in grado di trascrivere il DNA nel citoplasma. La conseguenza di questo fatto è che solo i virus il cui genoma sia formato da DNA e sia in grado di raggiungere il nucleo della cellula e possieda necessari segnali per l'attacco alla trascrittasi cellulare, sono in grado di utilizzare il sistema trascrittivo cellulare, a proprio vantaggio e per sintetizzare i proprio RNA-mes. Tutti gli altri virus devono possedere delle trascrittasi virus-specifiche.
- 2) Il macchinario proteino-sintetico della cellula eucariotica è, predisposto esclusivamente per la traduzione di messaggi monocistronici, in quanto incapace, di norma, a riconoscere segnali di inizio della sintesi proteica all'interno dell'RNA-mes. Da ciò deriva il fatto che alcuni RNA-mes virali, che trascrivono per 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 RNA-mes che sono favoriti nel processo di trascrizione, o hanno evoluto meccanismi in grado di bloccare o limitare le sintesi macromolecolari della cellula ospite.

Deossiribovirus Hanno il genoma formato da una molecola di DNA che normalmente è bicitenario e lineare. La sintesi degli RNA-mes virali avviene sempre nel nucleo della cellula infetta, ad opera della trascrittasi cellulare, ed il nucleo cellulare è la sede della replicazione del genoma e dell'assemblaggio dei nucleocapsidi.

I ribovirus hanno il genoma formato da RNA. In base alla presenza di una o più molecole di RNA ed alla polarità ed alla struttura del RNA, si distinguono diversi gruppi, e precisamente:

- **ribovirus a genoma positivo:** hanno tutti il genoma formato da una molecola di RNA monocatenario e lineare che ha la stessa polarità dell'RNA-mes e che funziona appunto da messaggero immediatamente dopo la penetrazione nella cellula bersaglio, sicché non è

richiesta una trascrizione del genoma virale. La sintesi macromolecolare e l'assemblaggio dei nucleocapsidi hanno luogo nel citoplasma.

- **Retrovirus:** possiedono un genoma diploide formato da 2 identiche molecole di RNA monocatenario e lineare. La trascrizione del genoma è necessaria per la formazione degli RNA messaggeri, ed avviene, nel citoplasma ad opera di una trascrittasi virale presente nel virione e pure nel citoplasma avviene la replicazione del genoma ed il montaggio dei nucleocapsidi.
- **Reovirus:** genoma formato da 10-20 molecole di RNA bicatenario, la trascrizione del genoma è necessaria per la formazione degli RNA-mes, nel citoplasma, ad opera di una trascrittasi virale presente nel virione. La replicazione del genoma e l'assemblaggio dei nucleocapsidi ha luogo nel citoplasma.

Deossiribovirus

Si possono distinguere 4 gruppi:

- 1) **herpesviridae e papovaviridae** qui il DNA virale viene trascritto dall'apparato trascrittivo della cellula in una serie di RNA-mess. La trascrizione è in genere simmetrica, ossia viene operata su ambedue le catene polinucleotidiche del genoma che vengono trascritte in direzione opposta e, messaggeri che codificano per proteine precoci e proteine tardive. I messaggeri precoci sono trascritti dal genoma del virus infettante, mentre i messaggeri tardivi sono trascritti dalle nuove molecole di DNA neoformato. Le proteine precoci sono in genere proteine che consentono la replicazione del genoma o che interferiscono con le sintesi macromolecolari della cellula ospite, le proteine tardive sono in genere proteine strutturali della progenie virale.
- 2) **Virus con genoma formato da una molecola lineare di DNA bicatenario:** svolgono il processo di trascrizione e sintesi grazie a trascrittasi virus-specifiche presenti nel virione infettante. La trascrizione iniziale con la produzione di proteine precoci consentono l'esposizione del genoma virale e l'avvio delle successive tappe della replicazione. La duplicazione del genoma virale e la trascrizione dei messaggeri tardivi, si produce una seconda serie di sintesi proteiche che comprende enzimi e proteine strutturali che concorrono a formare i virioni.
- 3) **I parvovirus:** nel caso dei parvovirus autonomi, la replicazione è possibile solo in cellule in attiva moltiplicazione ed è dipendente dalla fase S del ciclo cellulare (in cui avviene la replicazione del DNA cromosomico) della cellula ospite. Il loro genoma, costituito da DNA monocatenario, deve raggiungere il nucleo cellulare dove le DNA polimerasi cellulari provvedono alla sintesi della catena polipeptidica complementare ed alla replicazione del genoma. Il modello replicativo proposto prevede la formazione di intermedi replicativi formati da molecole di DNA bicatenario. Le estremità delle molecole di DNA monocatenario sono caratterizzate da sequenze nucleotidiche ripetute e invertite che consentono un ripiegamento a forcina della porzione terminale della molecola. Si forma così un innesco per la DNA polimerasi che sintetizzano una catena polinucleotidica complementare a quella originale, con la produzione di una molecola bicatenaria che è poi tagliata dando luogo a 2 catene polinucleotidiche lineari, complementari. Le 2 catene così completate sono poi separate fra loro ad opera di proteine ad attività elicasi, portando alla formazione di 2 molecole in grado di iniziare un nuovo ciclo replicativo, oppure di essere incapsidate separatamente in virioni diversi. La trascrizione del genoma virale può avvenire una volta che la molecola di DNA monocatenaria sia stata convertita nella forma replicativa bicatenaria. La trascrizione del genoma virale è opera dell'apparato trascrittivo cellulare con produzione di RNA messaggeri che sono poi tradotti nelle proteine non-strutturali e strutturali.

- 4) **Hepadnavirus il virus dell'epatite B dell'uomo.** Subito dopo l'infezione e l'esposizione del genoma, il DNA del virus, che è circolare e parzialmente bicatenario, viene trasferito nel nucleo dove, viene trasformato in DNA completamente bicatenario e superspiralizzato, a questo punto il genoma virale viene trascritto con la formazione di 2 classi di RNA rappresentate rispettivamente da una serie di **RNA-mes subgenomici** e da una serie di molecole di **RNA (+) pre-genomico** in cui è trascritta l'intera sequenza della catena polinucleotidica completa (-) del genoma del virus infettante. **Gli RNA-mes** e **gli RNA pre-genomici** sono quindi trasferiti nel citoplasma. La traduzione degli **RNA-mes** subgenomici porta alla produzione delle proteine virus-specifiche che verranno inserite nell'involucro pericapsidico e della proteina X con funzioni transattivanti. **Gli RNA pre-genomici**, invece, sono bifunzionali e, precisamente, funzionano sia da **RNA-mes** che, parzialmente tradotti, danno luogo alla produzione delle proteine del capsido virale e dell'enzima che presiede alla replicazione del genoma virale, sia come stampo per la sintesi del DNA genomico della progenie virale. Dopo la sintesi delle proteine tradotte dagli **RNA pre-genomici**, **gli RNA pre-genomici**, vengono incapsidati dalle proteine del core in una struttura che prende il nome di **provirione**, al cui interno vengono trascritti il DNA, as opera (trascrittasi inversa) virus-specifica, con la formazione di un complesso intermedio RNA/DNA. La rimozione dello stampo e la successiva sintesi della catena complementare di DNA, porta, infine, alla formazione del genoma virale di progenie, circolare, e parzialmente bicatenario. **Il provirione** che acquisisce l'involucro pericapsidico ed è liberato all'esterno della cellula.

Ribovirus

Anche tra i ribovirus è possibile, distinguere 4 fondamentali gruppi di virus con diverse strategie replicativa.

- 1) Ribovirus con genoma moncatenario a polarità positiva il cui genoma è formato da una molecola di RNA che ha la stessa polarità **dell'RNA-mes (+)** e che può funzionare immediatamente come tale nella cellula infetta. Il genoma è formato da una molecola di RNA. All'estremità 3' la molecola **poliadenilata**, mentre all'estremo 5' è legata covalentemente ad una molecola proteica di piccole dimensioni. Il genoma virale ha 2 funzioni essenziali. La prima funzione è quella di agire come messaggero virale. Subito dopo l'infezione e l'esposizione del genoma, la proteina in posizione 5' viene rimossa e l'RNA si lega ai ribosomi e viene tradotto interamente in un'unica catena a.a. (**poliproteina**). **La poliproteina**, viene quindi scissa nelle varie proteine funzionali. La seconda funzione del genoma virale è quella di servire come stampo per la sintesi di una molecola complementare di (-) RNA, ad opera di una polimerasi virale formata da una delle proteine derivate dalla scissione della poliproteina iniziale. **La molecola di (-) RNA** serve quindi, a sua volta, come template per la sintesi, sempre ad opera della polimerasi virale, di una serie di molecole di (+) **RNA**, identiche al genoma virale, queste, a loro volta, possono funzionare come ulteriori messaggeri con produzione di nuove copie di poliproteina, o da genoma per le particelle virali neoformate, e così fino alla lisi della cellula infetta.
- 2) Il cui genoma è formato da una o più molecole di (-) RNA. il genoma dei ribovirus a genoma negativo, deve svolgere una doppia funzione di stampo sia per la trascrizione dei messaggeri, sia per la propria replicazione. La trascrizione è opera di una trascrittasi virale presente nel virione. L'enzima RNA-polimerasi **RNA-dipendente**. Nei ribovirus con genoma non segmentato a polarità negativa, la trascrizione di (-) RNA genomico porta alla formazione di una serie di (+) **RNA-mes** che vengono tradotti nelle varie proteine virus-specifiche, tra cui RNA-polimerasi **RNA-dipendente**.

- 3) Il terzo gruppo è formato dai retrovirus il cui genoma è **monopartito**, ma **diploide** con le 2 molecole parzialmente embriate all'estremo 5' mediante legami a H o per la presenza di sequenze complementari. La sola funzione dell'RNA gnomico è quella di fungere da stampo per la sintesi di una molecola complementare di **DNA bicatenario**, che viene sintetizzato nel citoplasma ad opera della trascrittasi inversa presente nel virione. **Il DNA neosintetizzato (provirus)** migra quindi nel nucleo e si integra nel genoma della cellula ospite. **Il DNA del provirus** contiene una serie di sequenze riconosciute dall'apparato trascrittivo cellulare che provvede alla traduzione di una serie di (+) RNA, alcuni dei quali, di dimensioni **subgenomiche**, sono dei **messaggeri policistronici** che vengono tradotti in poliproteine, successivamente scisse nelle varie proteine funzionali, mentre altri vanno a formare il genoma della progenie virale.
- 4) Il quarto gruppo è formato da ribovirus con genoma mutipartito, formato da RNA bicatenario.