

Parti del testo “Introduzione alla Virologia Moderna” da consultare per questa lezione

- **Capitolo 7 – par. 7.1, 7.3, 7.4 (Adenovirus)**
- **Capitolo 10 – par. 10.1, 10.2, 10.4, 10.5**
- **Capitolo 27 – par. 27.1, 27.2**

Virus di Classe I: dsDNA

- Alcuni genomi di virus a DNA sono complessati ad istoni cellulari a formare una struttura simile alla cromatina all'interno dei virioni. Una volta all'interno del nucleo della cellula ospite si comportano come cromosomi satellite in miniatura seguendo i dettami degli enzimi cellulari e del ciclo cellulare
- Lo studio di questi virus ha portato all'identificazione degli elementi che guidano la sintesi di pre-mRNA e mRNA (promotori e enhancer; SV40)
- I primi mRNA poliadenilati al 3'osservati sono stati quelli di *Vaccinia virus*
- Geni composti da **introni** non codificanti e **esoni** codificanti, così come spliced mRNA, sono stati scoperti per la prima volta in Adenovirus da Roberts & Sharp in 1977.

Virus di Classe I: dsDNA

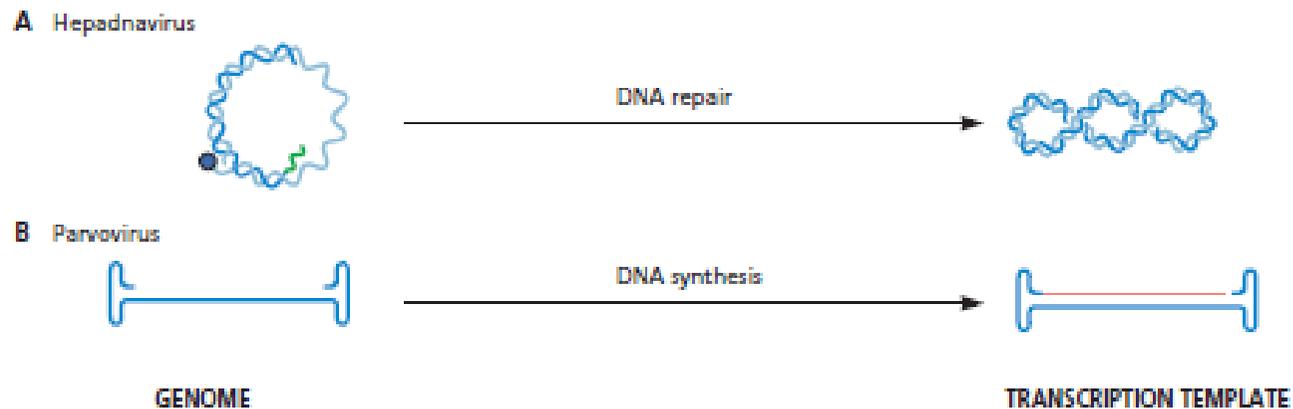
Può essere suddivisa in due ulteriori gruppi

- A. Ciclo replicativo esclusivamente nucleare, replicazione del genoma relativamente dipendente da fattori cellulari, trascrizione tutto a carico della cellula **NON CODIFICANO ALCUNA RNA POLIMERASI**
- B. Replicazione citoplasmatica (*Poxviridae*). Questi virus sono provvisti di tutti i fattori necessari per la trascrizione e replicazione del loro genoma e sono largamente indipendenti dall'ospite per questi processi

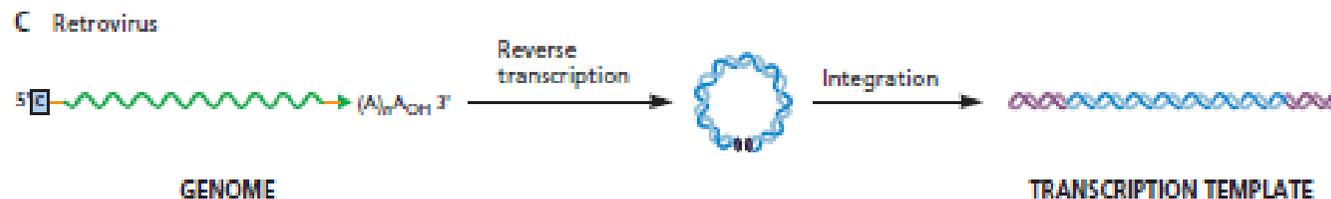
La trascrizione è la prima reazione biosintetica che si osserva in una cellula infettata da virus con genoma a dsDNA

Stampo per la RNA pol II

Per formare uno stampo adatto alla trascrizione, i genomi a DNA a doppio filamento incompleto o a singolo filamento sono convertiti in molecole di dsDNA da parte degli enzimi cellulari

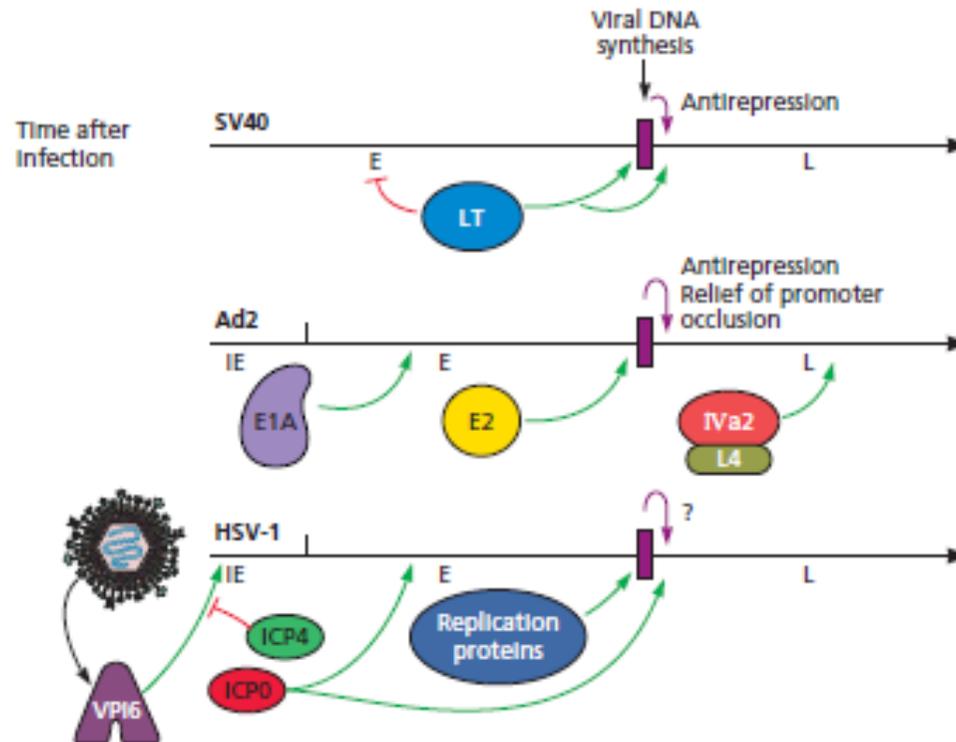


Il genoma a RNA dei retrovirus è convertito in una molecola di dsDNA provirale e integrato nel genoma della cellula infettata da enzimi virali

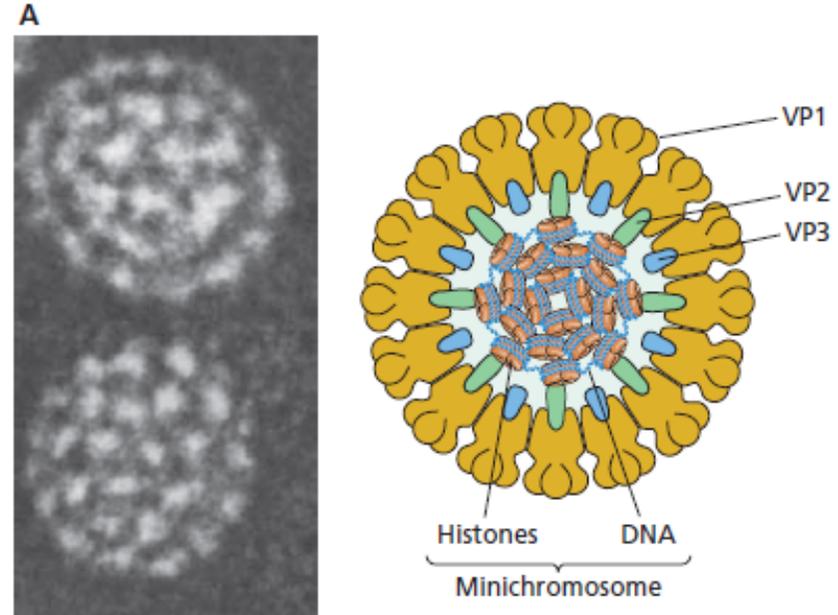
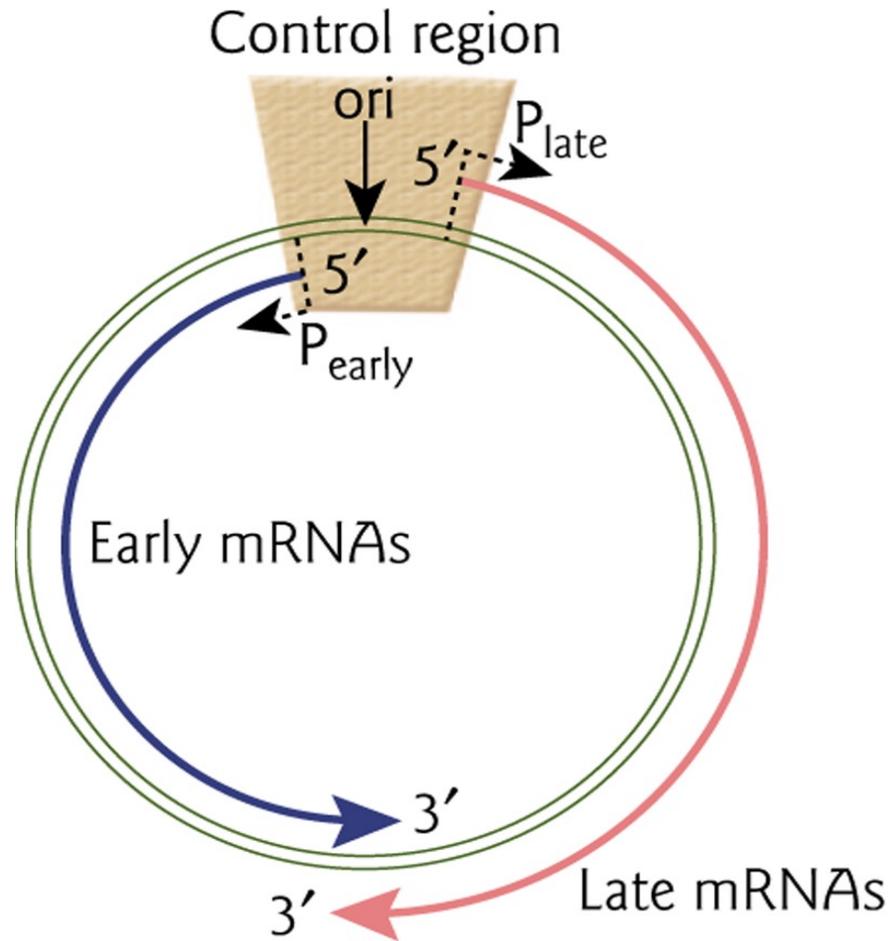


Virus di Classe I: dsDNA

La trascrizione dei geni virali in periodi temporali distinti (fasi) è una caratteristica del ciclo riproduttivo di tutti i virus con genoma a DNA. La transizione da una fase all'altra dipende dall'attività di fattori virali e dalla sintesi dei genomi della progenie



Simian Virus 40 (SV40)



Il genoma virale è complessato agli istoni cellulari H2A, H2B, H3 e H4 a formare un minicromosoma

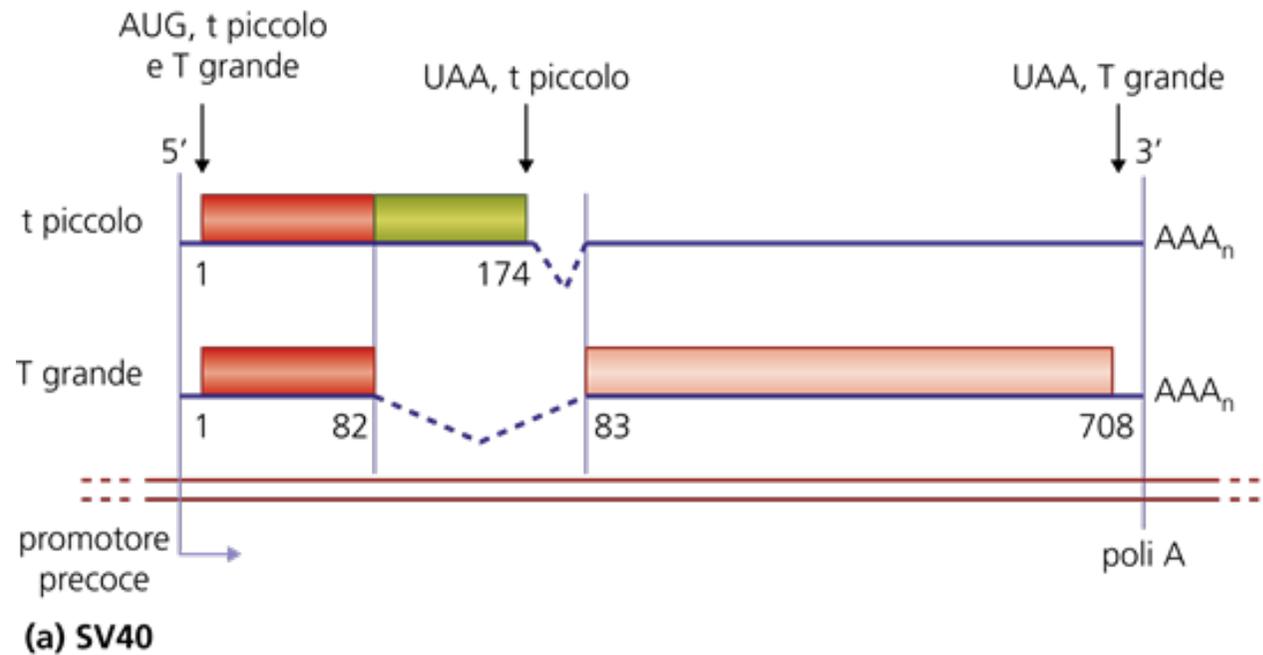
Contiene due unità trascrizionali: precoce e tardiva

Proteine precoci: Large T e small t

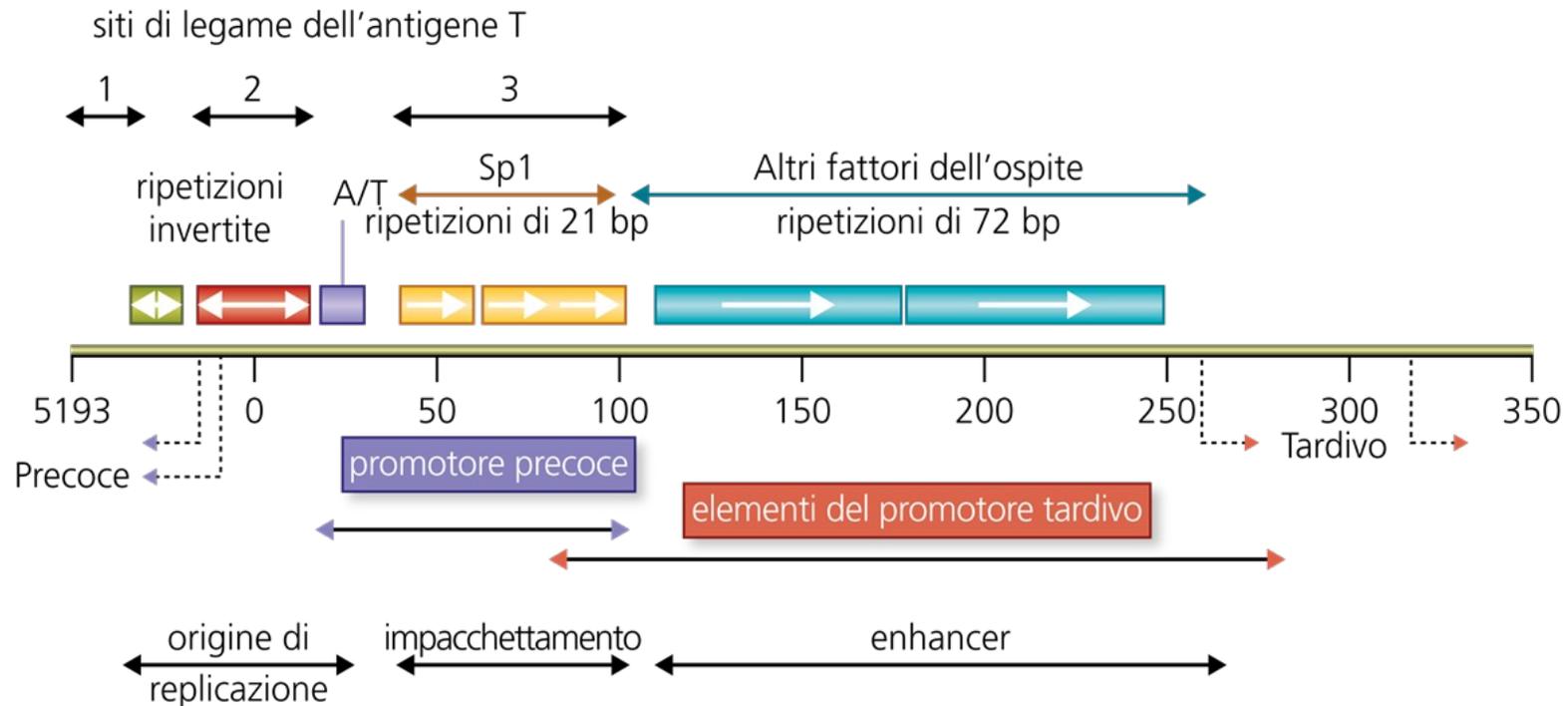
Replicazione del genoma

Proteine tardive: VP1, VP2, VP3 e Agnoproteina

Espressione precoce in SV40



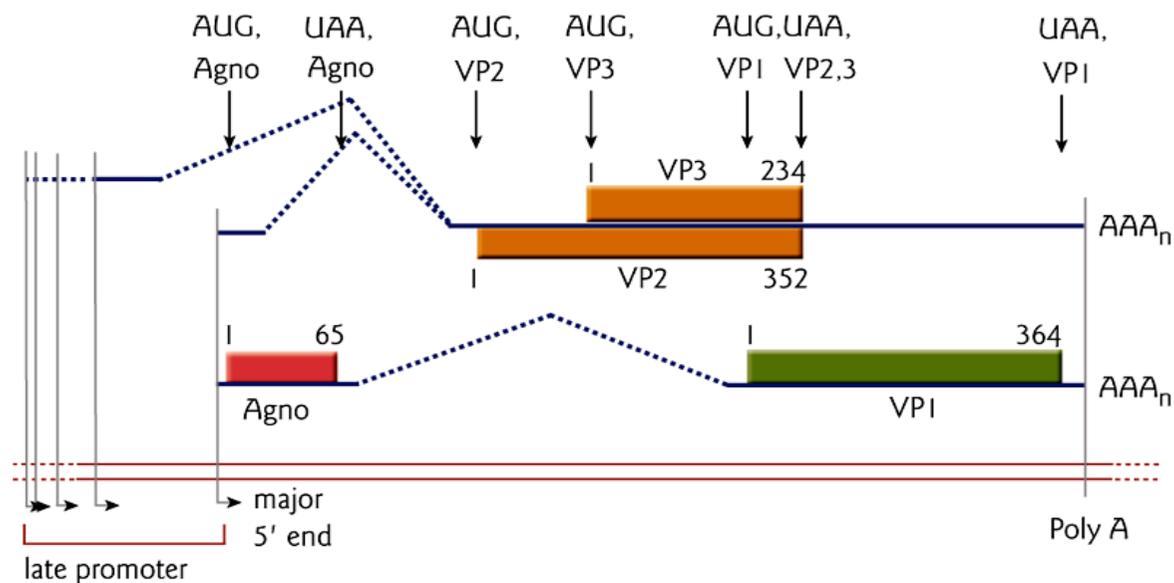
Espressione: SV40



SV40 LT Ag

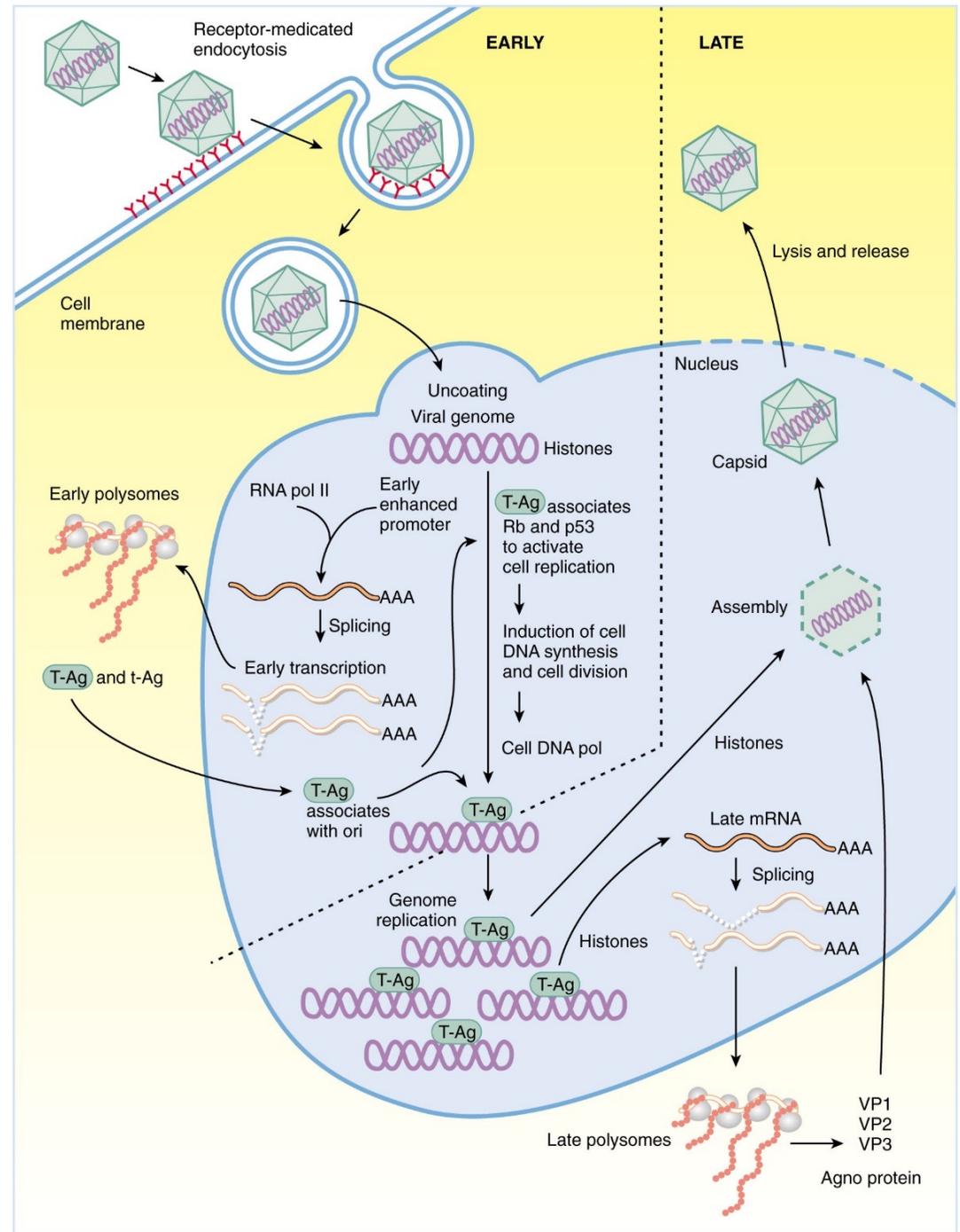
- Si lega a pRb e p53: attivazione sintesi DNA nell'ospite
- Blocco dell'apoptosi grazie all'interazione con p53
- Si lega ad ori per iniziare la sintesi del DNA virale (elicasi ATP dipendente)
- Spegne la trascrizione precoce legandosi al proprio promotore
- Attiva la trascrizione tardiva
- E' coinvolta nell'assemblaggio del virione

Espressione tardiva di SV40

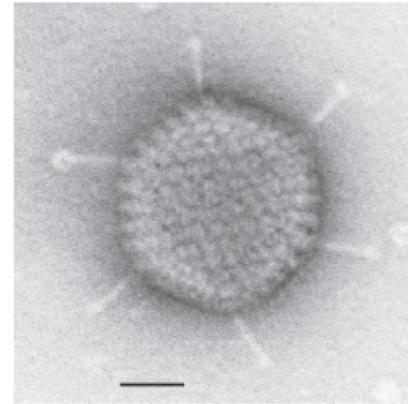


Gli mRNA tardivi contengono estremità 5' eterogenee dovute alla mancanza di una TATA box nel promotore tardivo, che serve normalmente a stabilire la posizione precisa dell'inizio della trascrizione.

CICLO REPLICATIVO DI SV40



Adenoviridae



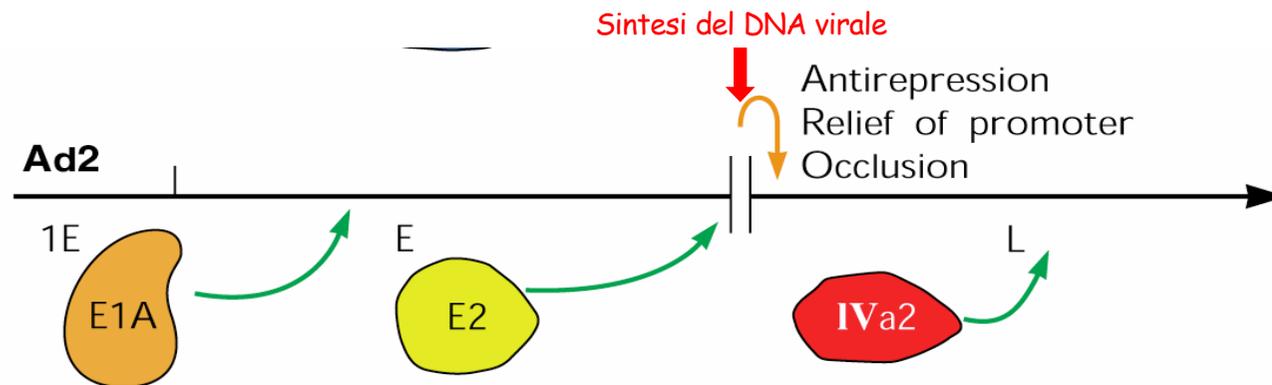
Doppio filamento lineare di 30-38 kbp, contenente 30-40 geni

La sequenza terminale di ciascun filamento è una ripetizione invertita di 100-150 bp (ITR), importante durante la replicazione. Le ITR contengono le origini di replicazione. Al 5' di ogni filamento è associata una proteina di 55 kDa nota come proteina terminale (TP)

I geni sono organizzati in cluster e sono espressi a partire da un ridotto numero di promotori; da ogni promotore sono espresse più proteine (spliced mRNA e splicing alternativo)

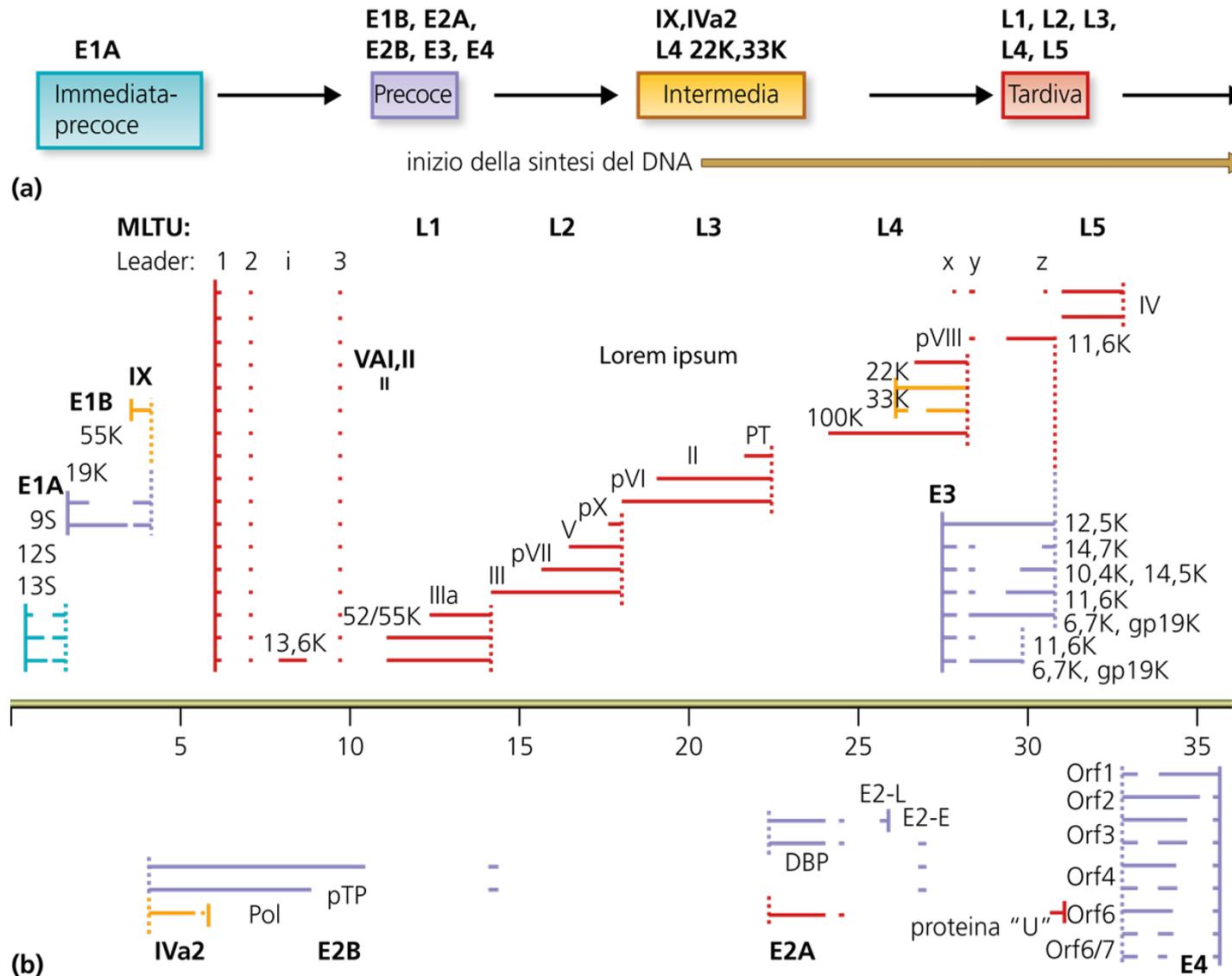


Sequenza temporale degli eventi in Adenovirus

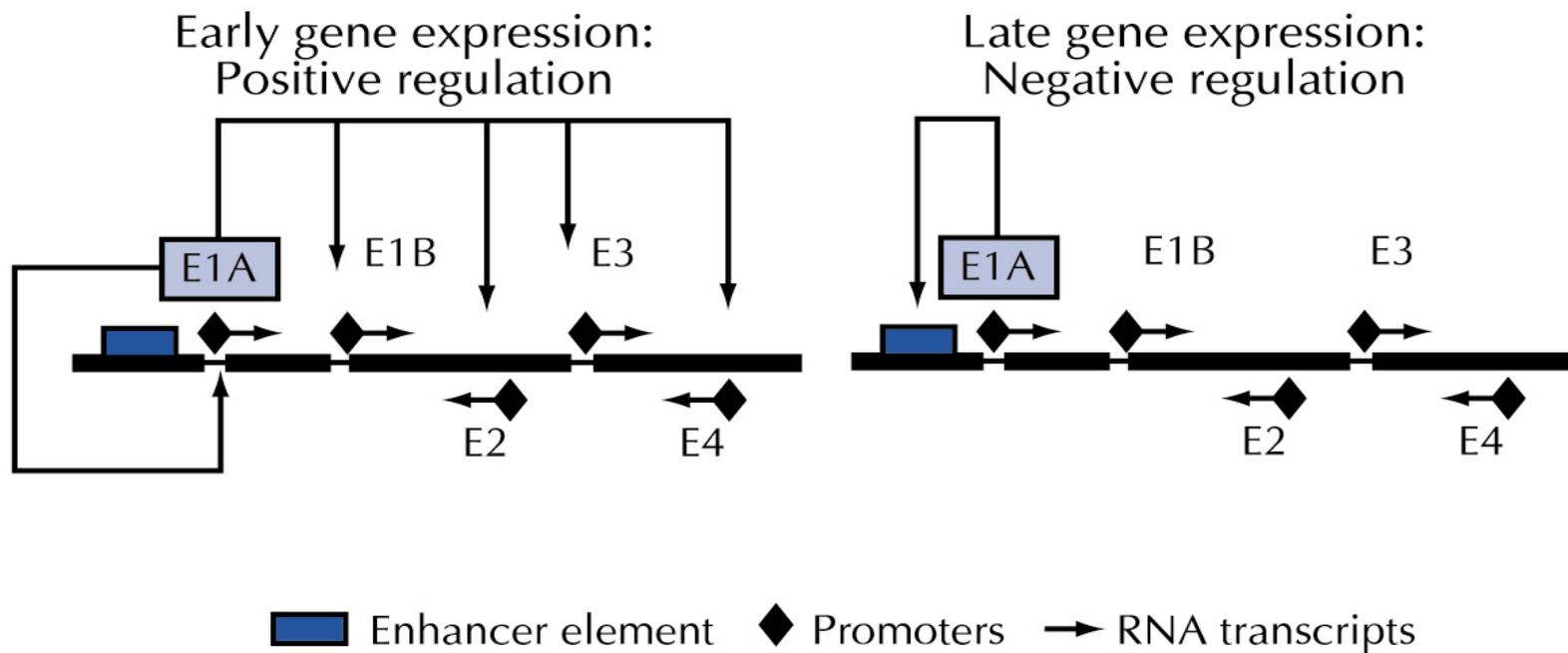


Le Proteine immediato-precoci E1A, alle quali sono associate molteplici funzioni, sono necessarie per l'attivazione dell'espressione delle unità trascrizionali precoci. Tra queste c'è la regione E2, che codifica proteine richieste per la sintesi del DNA virale. L'accumulo dei nuovi genomi virali a DNA porta alla derepressione della trascrizione del gene che codifica la proteina di legame al DNA IVa 2 e conseguente attivazione della trascrizione a partire dal principale promotore tardivo. Questo promotore controlla la sintesi della maggior parte delle proteine strutturali.

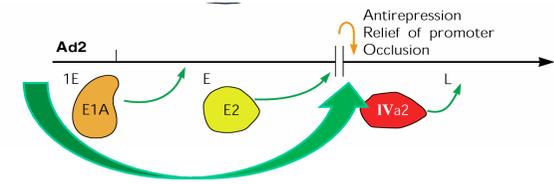
Espressione in Adenovirus



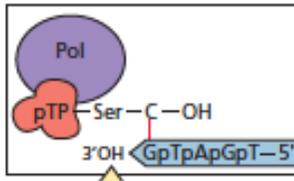
Espressione in Adenovirus



Replicazione genoma di Adenovirus

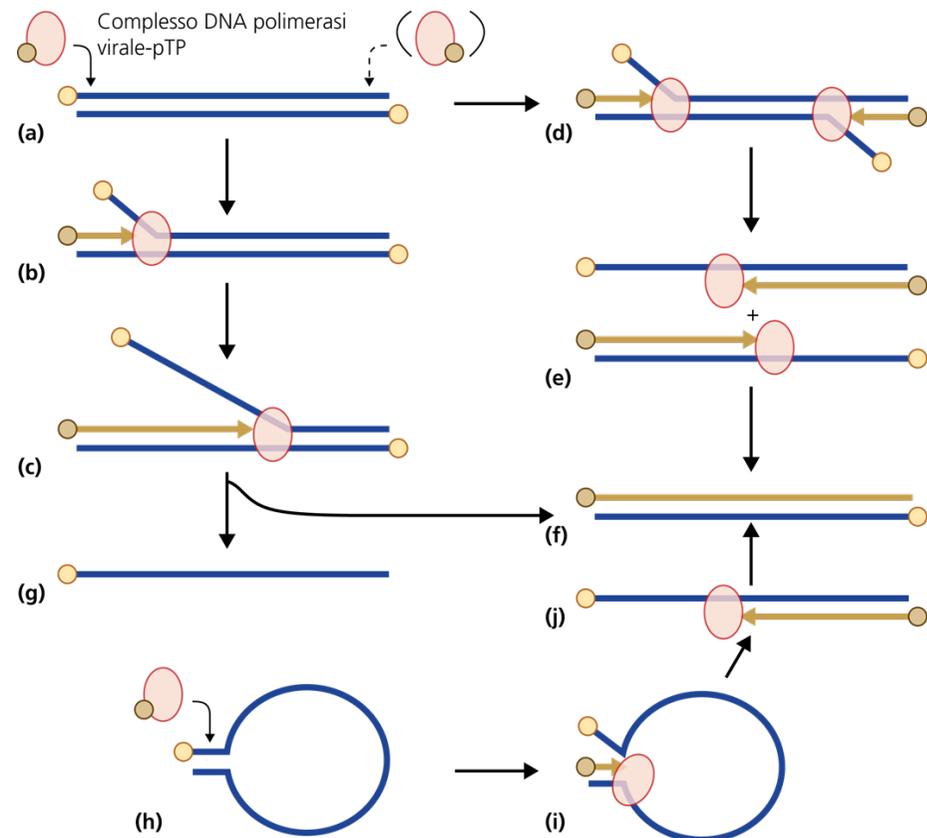


L'assemblaggio della DNA polimerasi (Pol) e della proteina preterminale (pTP) a livello dell'origine di replicazione è seguito dal legame covalente di dCMP (desossicitidina 5'-monofosfato) ad uno specifico residuo di serina di pTP catalizzato da Pol.



Il 3' OH fornito dal complesso pTP-dCMP innesca la sintesi continua del DNA virale. Quando un solo filamento viene replicato ad ogni round, il filamento scalzato, grazie alla presenza di sequenze ripetute invertite terminali può formare per appaiamento un breve duplex terminale, identico all'estremità del genoma a doppio filamento e può essere replicato con lo stesso meccanismo.

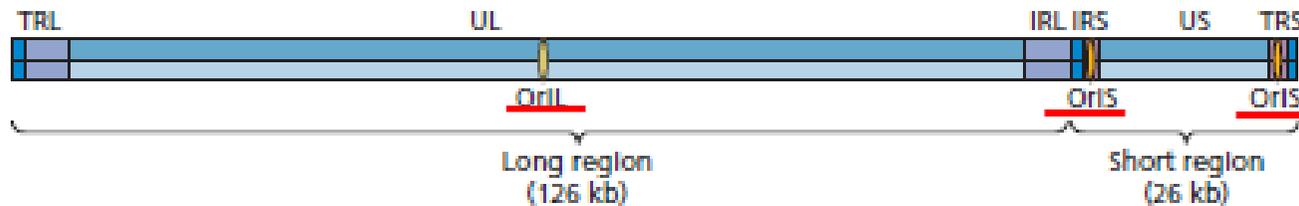
Per intervento di una proteasi si formano così i nuovi genomi provvisti di una TP associata al 5' di ogni filamento.



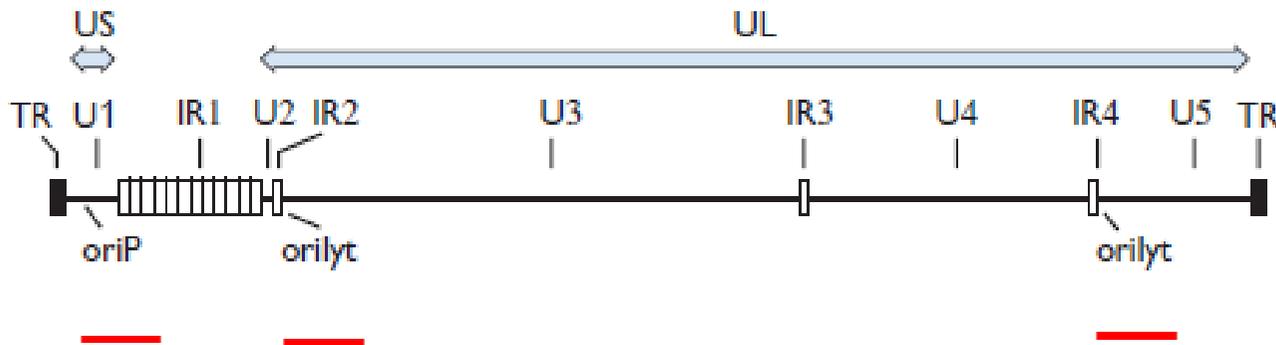
Herpesviridae

I vari membri sono piuttosto diversi in termini di sequenza genomica, ma condividono una struttura e organizzazione comune: il genoma (lungo da 120 kbp a 220 kbp) contiene due regioni uniche (UL e US) fiancheggiate da ripetizioni invertite (TR e IR)

HSV-1

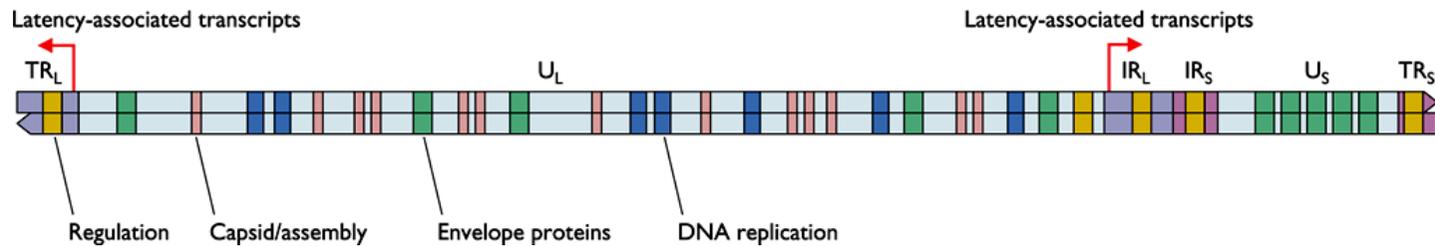
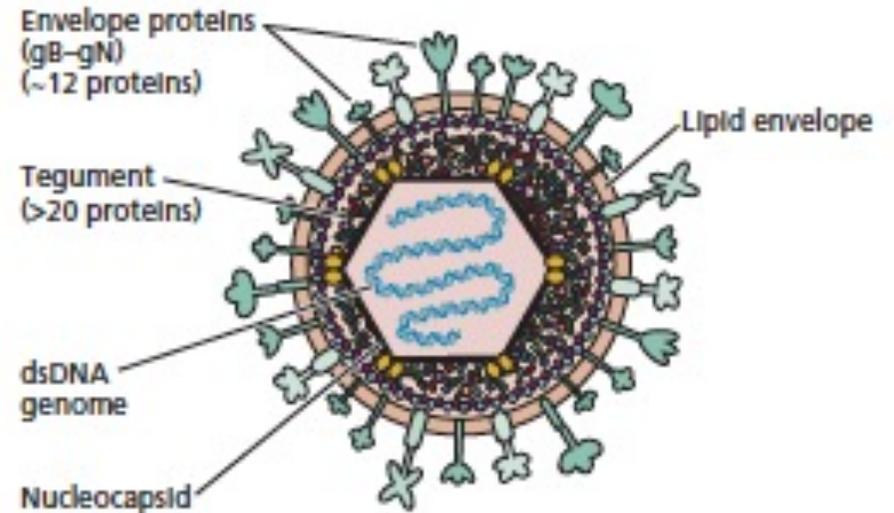


EBV



Contiene tra i 60 e i 120 geni, a questo corrispondono virioni complessi contenenti circa 35 proteine. Poiché tutti i virus appartenenti a questa famiglia condividono le funzioni base per una infezione produttiva, la diversità nella complessità dei genomi è dovuta alla presenza di geni “dispensabili” per la moltiplicazione, ma coinvolti in aspetti specifici della patogenesi di ciascun tipo di virus.

Herpesviridae HSV1



HSV 1 - circa 84 ORF. E' indicata la localizzazione approssimativa dei geni e delle unità di trascrizione associate alla latenza. Geni codificanti funzioni simili sono evidenziati con lo stesso colore. Geni interspersi piuttosto che raggruppati come in Adenovirus. Assenza di splicing durante il ciclo litico.

Espressione del genoma di HSV 1

Espressione a cascata e regolazione circolare

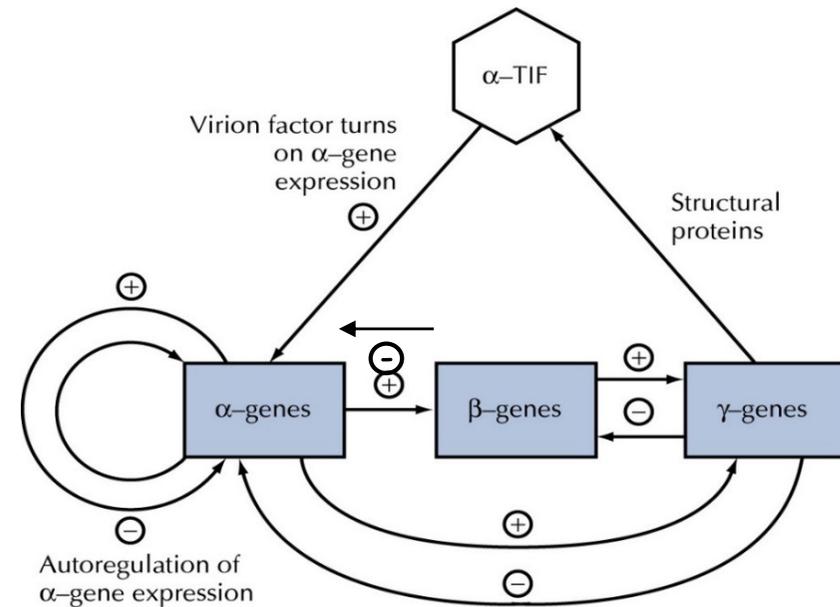
Geni α (immediati precoci) codificano 5 fattori coinvolti nella regolazione della trascrizione virale

Geni β (precoci) codificano proteine regolatrici per lo più coinvolte nella replicazione del genoma

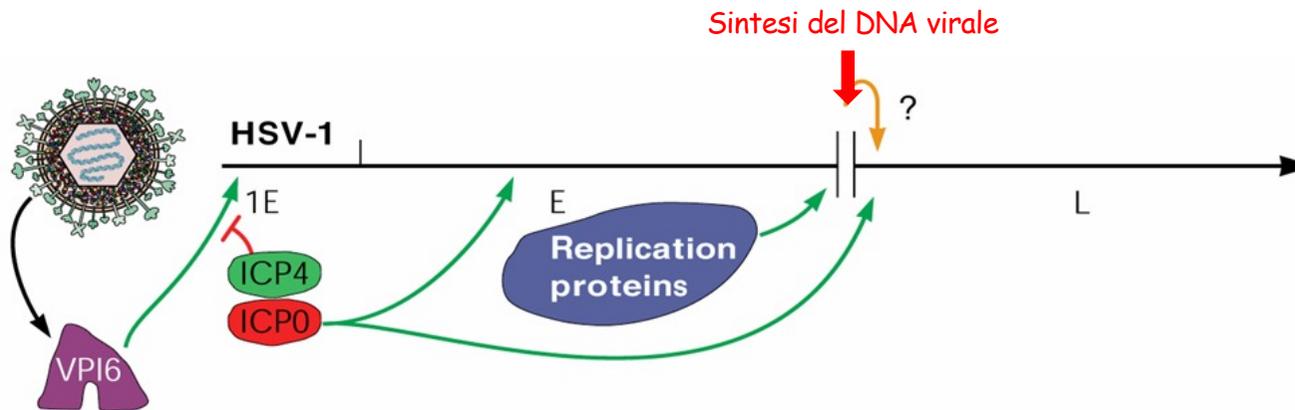
Geni γ (tardivi) codificano proteine strutturali ed il fattore α TIF (α transcription initiation factor) o VP16

I prodotti precoci inibiscono la trascrizione dei geni α e iniziano la replicazione del genoma

L'espressione dei geni immediato-precoci (α) dipende fortemente dal fattore virale VP16 (proteina del tegumento)

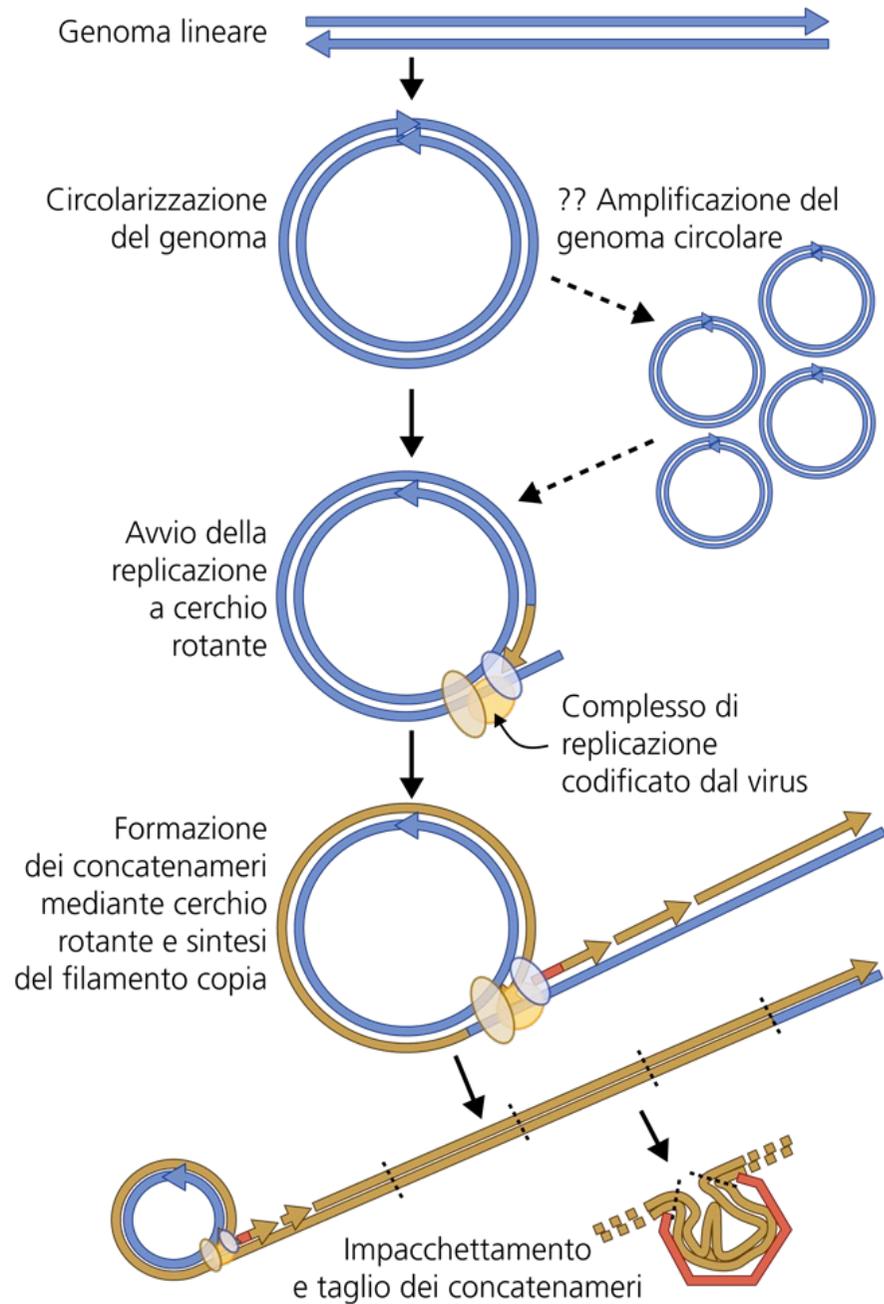
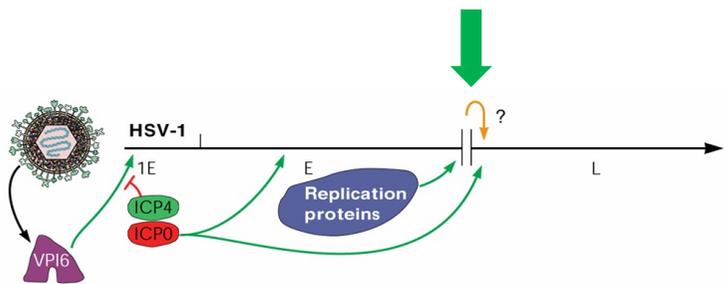


Espressione del genoma di HSV 1



I prodotti dei geni immediati precoci (geni α) comprendono due regolatori trascrizionali, ICP4 e ICP0. Come E1A di Adenovirus, ICP4 è necessario per la progressione del ciclo infettivo oltre la fase immediato-precocce. Insieme a ICP0 è ritenuto essere il principale attivatore trascrizionale. Stimola la trascrizione sia dei geni precoci (geni β) che tardivi (geni γ) ed agisce anche come repressore dell'espressione immediato-precocce. ICP4 è un classico fattore di trascrizione che lega il DNA target mentre ICP0, sebbene anche lui sia un attivatore trascrizionale, non presenta domini di legame al DNA.

Replicazione genoma negli Herpesvirus



Terapia antivirale

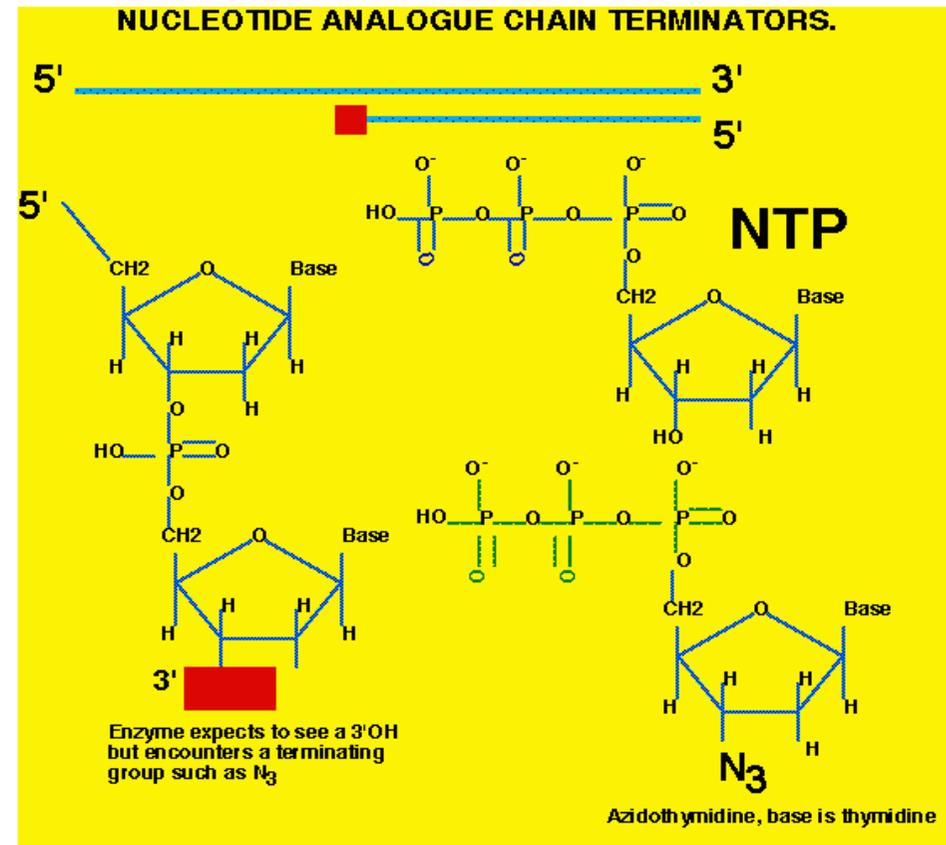
Sintesi degli acidi nucleici

**Come sfruttare gli enzimi virali coinvolti nella
sintesi degli acidi nucleici come bersaglio
della terapia antivirale**

**L'esempio della TIMIDINA KINASI di Herpes
Simplex**

Terapia antivirale

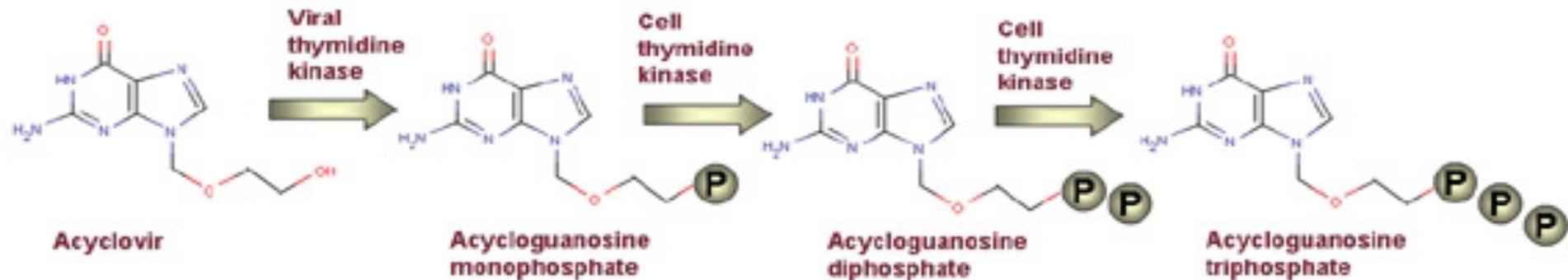
- Replicazione del genoma: basata sulla specificità delle polimerasi virali, utilizzo di analoghi di nucleosidi



Terapia antivirale

Sintesi degli acidi nucleici

HSV Timidina Kinasi

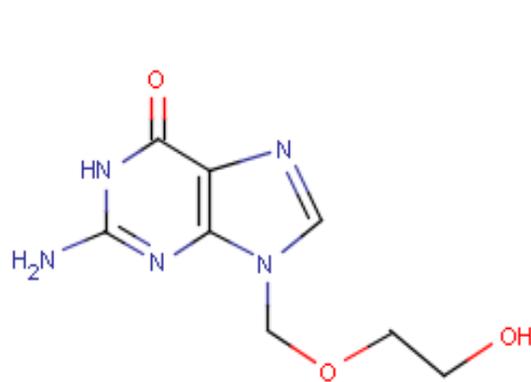


La timidina kinasi virale aggiunge il primo fosfato: attivazione

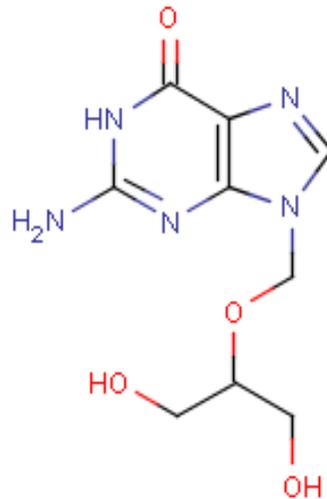
La chinasi cellulare aggiunge gli altri due fosfati

Terapia antivirale

Sintesi degli acidi nucleici



Acyclovir



Ganciclovir

Analoghi della guanina

Acyclovir (ACV) =
acycloguanosine = Zovirax

Ganciclovir = Cytovene

- Attivati dalla TK virale

- ACV attivata è legata e utilizzata preferenzialmente dalla **DNA polimerasi virale** (10X rispetto a quella cellulare)

Excellent anti-herpes drug

Terapia antivirale contro le infezioni da HSV-1

