

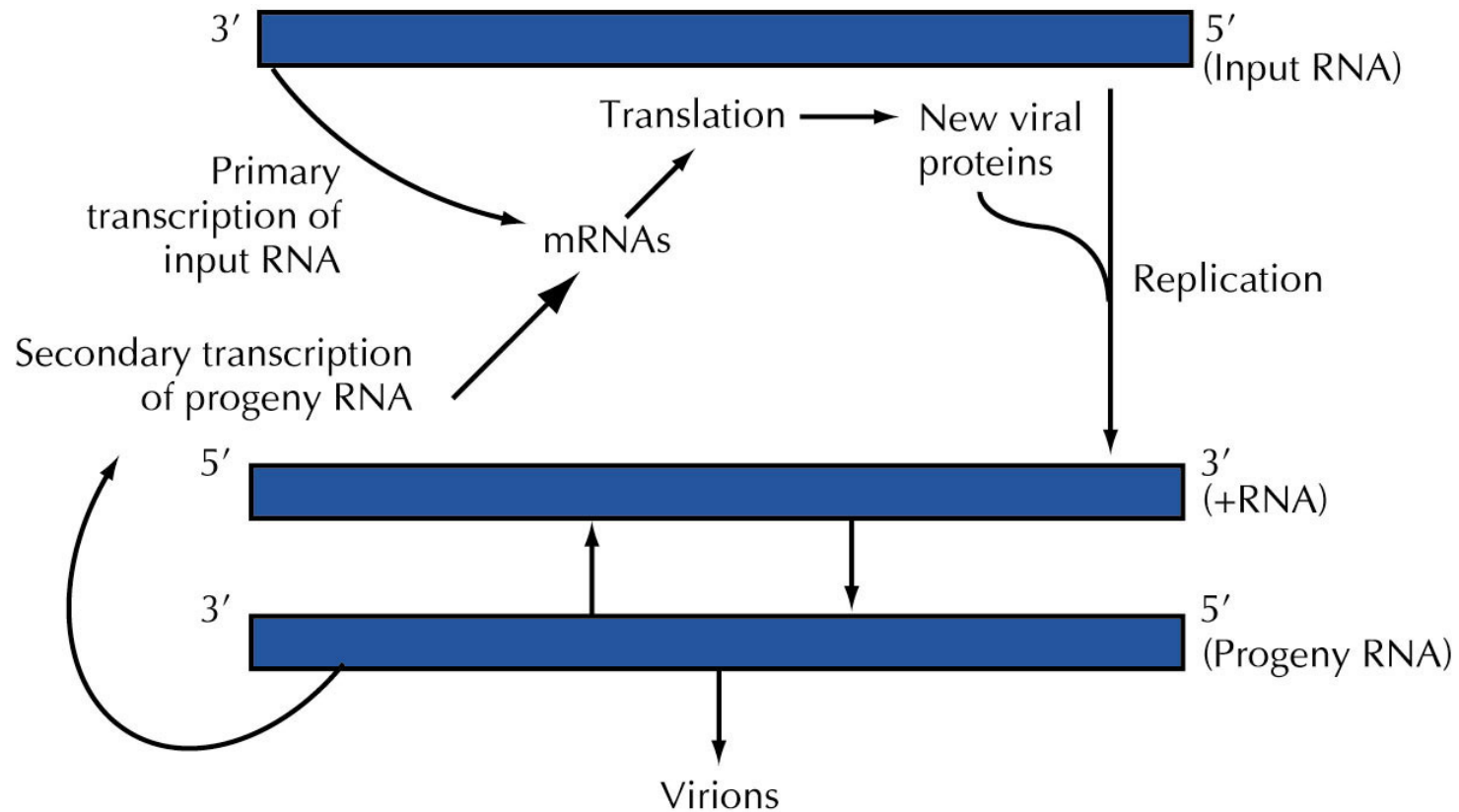
Parti del testo “Introduzione alla Virologia Moderna” da consultare per questa lezione

- **Capitolo 8 – par. 8.5**
- **Capitolo 11 – par. 11.6, 11.7, 11.9 (Regolazione trascrizionale dell’espressione genica)**

# Genomi a RNA (-)

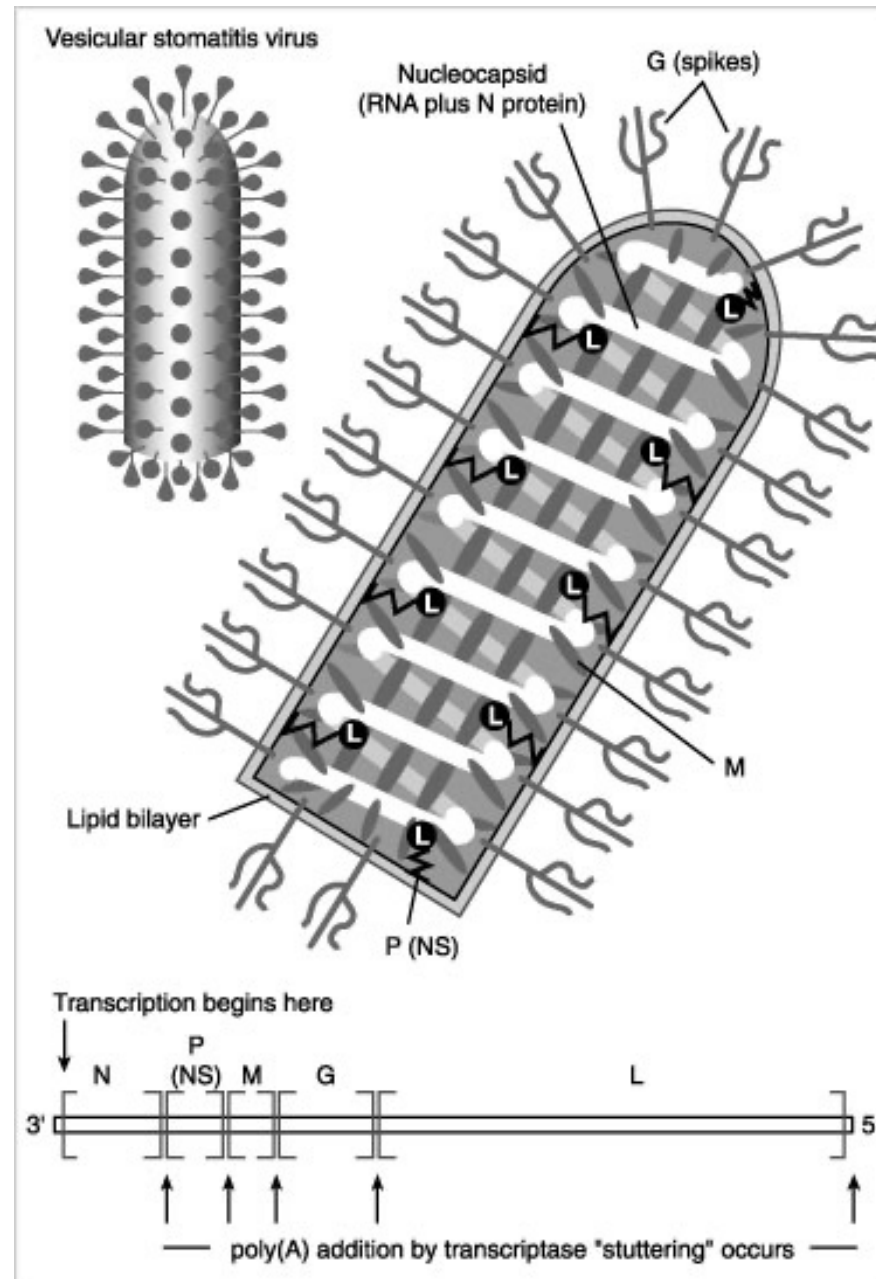
- In questa classe sono presenti virus con genoma costituito da una molecola continua (*Mononegavirales*) o suddiviso in più segmenti.
- Nessuno di questi genomi è infettivo come RNA purificato in quanto non è riconosciuto come mRNA
- Tutti i virioni possiedono associata al genoma la polimerasi virale (RNA polimerasi RNA-dipendente) che sarà utilizzata, all'inizio dell'infezione, per produrre i messaggeri a partire dallo stampo RNA(-). Lo stesso enzima è utilizzato per la replicazione del genoma

# ssRNA (-) viruses



# RNA (-) Rhabdoviridae (VSV)

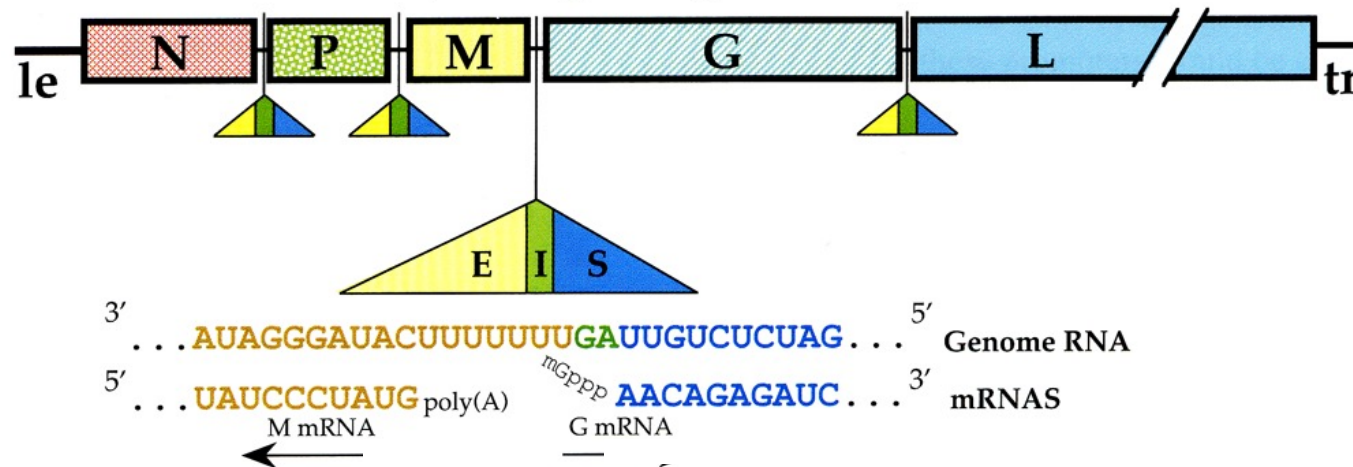
La fase precoce è caratterizzata da attiva trascrizione. Lo stampo è la ribonucleoproteina (vRNA + proteina N)



# RNA (-), esempio: Rhabdoviridae (VSV)

Organizzazione del genoma

A. Location of intergenic sequences of VSV (a rhabdovirus), and detailed view of the M/G intergenic region

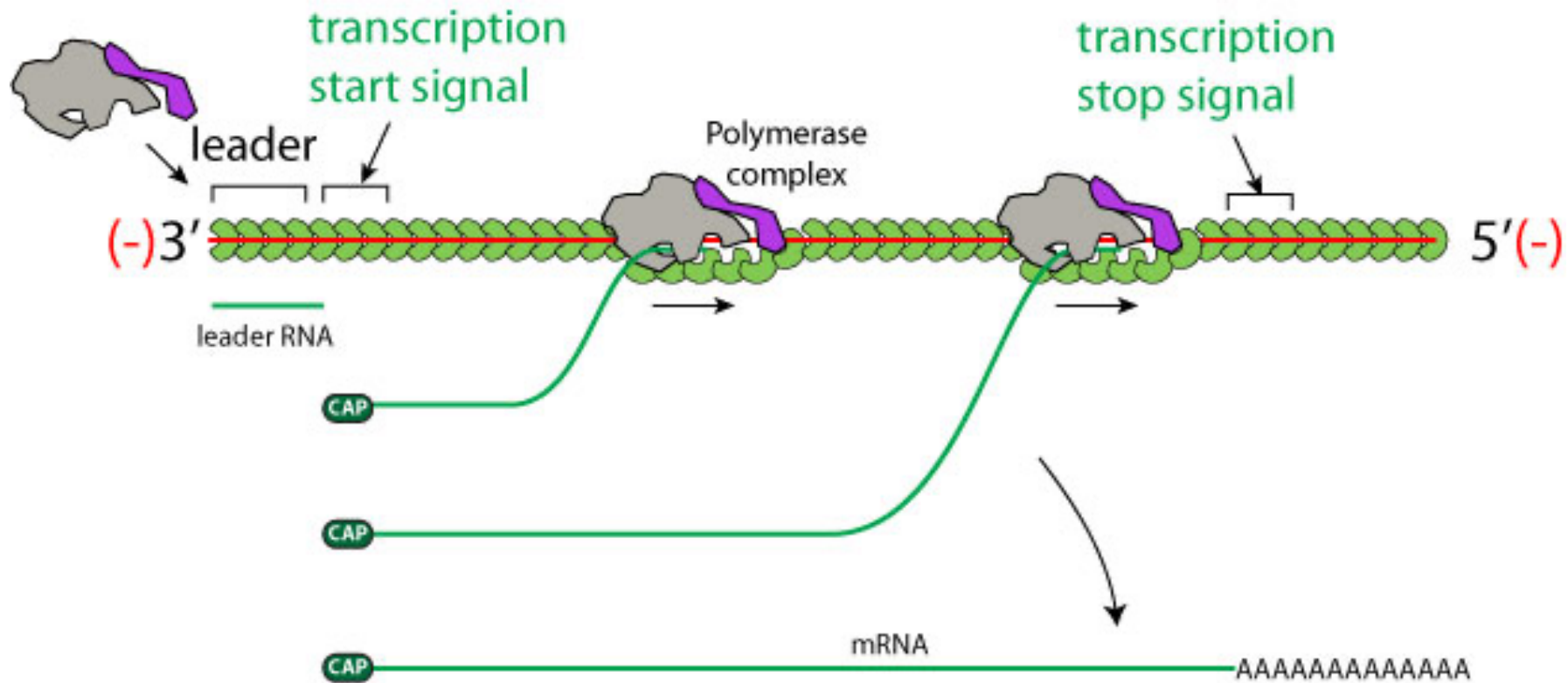


B. Genomic sequences at other intergenic regions in the VSV genome

3' 5'  
 N/P ... CGAUGUAUACUUUUUUUGAUUGUCUAUAG ...  
 P/M ... CAUCUGAUACUUUUUUUCAUUGUCUAUAG ...  
 G/L ... UUA AAAAUACUUUUUUUGAUUGUCGUUAG ...

E=end  
 I=intergenic  
 S=start

# RNA (-), esempio: Rhabdoviridae (VSV)



The RNA dependent RNA polymerase (RdRp) complex initiates transcription by binding to the leader sequence in 3' of the genomic negative strand RNA. The RdRp transcribes a 5' triphosphate-leader RNA, then stop and restart on the transcription initiation signal of the N gene. The RNA initiated on this signal is capped.

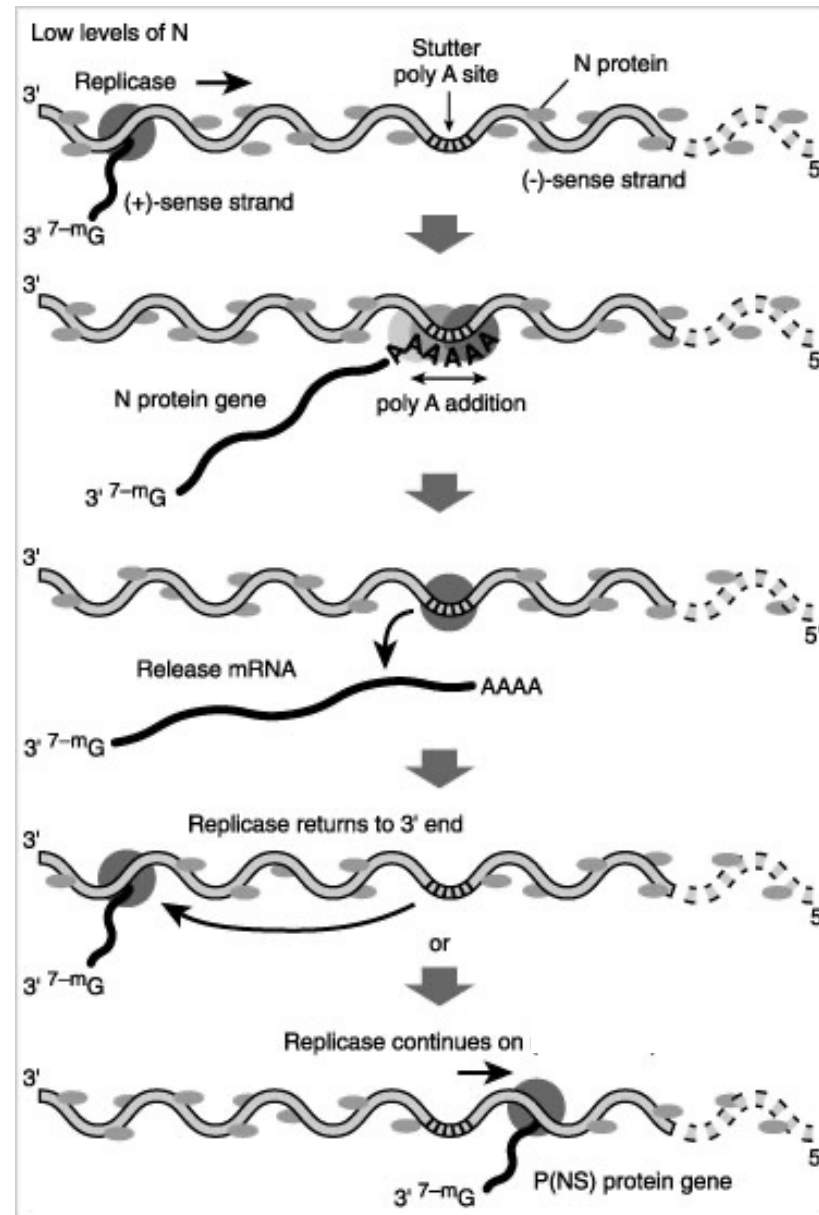
# RNA (-), esempio: Rhabdoviridae (VSV)

## Trascrizione con un meccanismo stop and start

Inizia con il capping dell'mRNA nascente e procede lungo il primo gene (la proteina N). Alla fine del gene la trascrittasi (proteina L) incontra la sequenza intergenica a livello della quale si ferma e aggiunge una coda di A attraverso la lettura ripetuta delle 7 U. Quindi l'mRNA viene rilasciato.

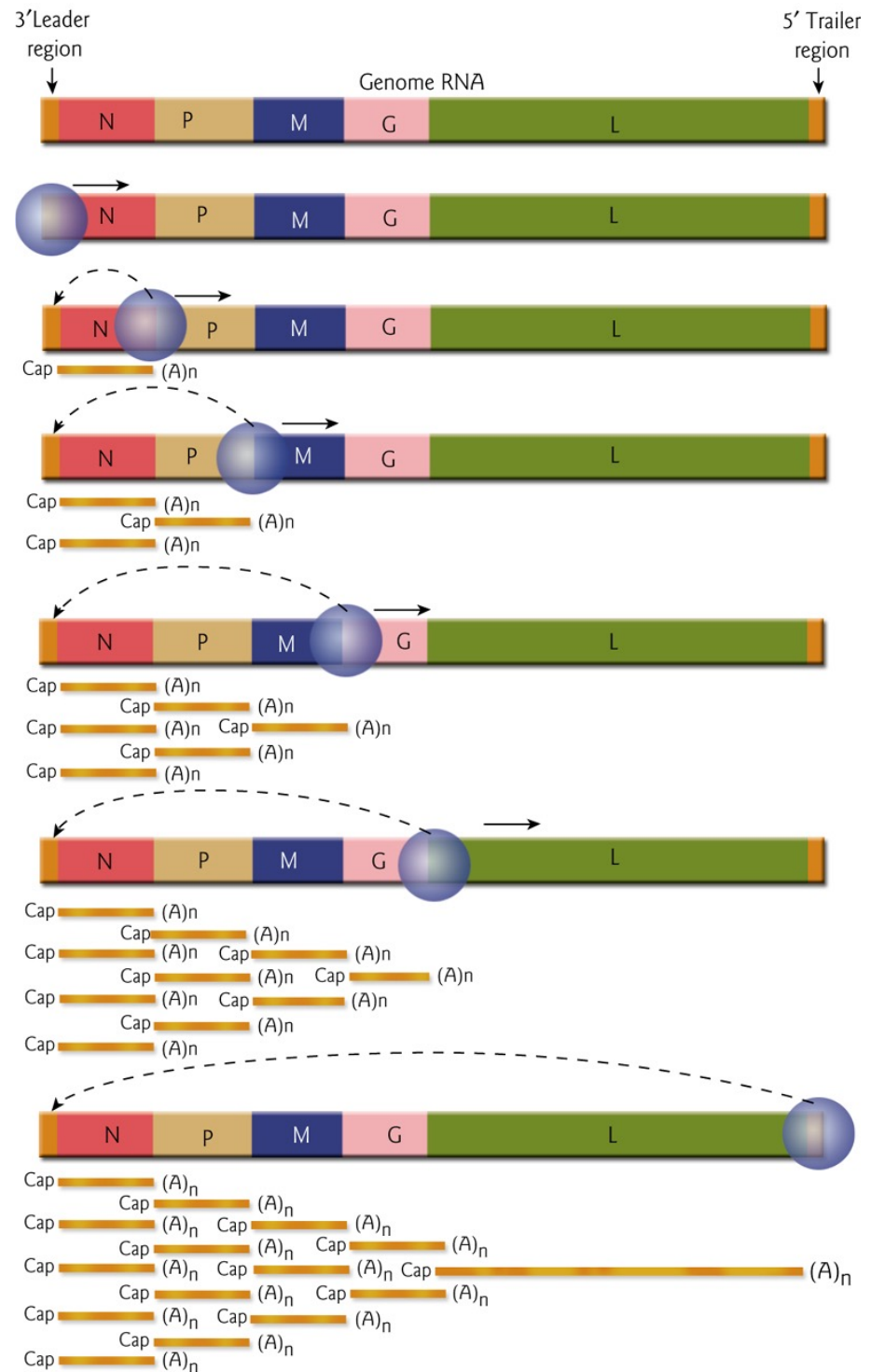
Nel 70% dei casi la trascrittasi continua sullo stampo e si lega alla sequenza start del gene successivo. Nel circa 30% dei casi si stacca anche il complesso polimerasico che si legherà nuovamente alla sequenza leader e inizierà nuovamente a trascrivere da N. Il risultato di questo processo è un gradiente proteico.

$N > P > M > G > L$



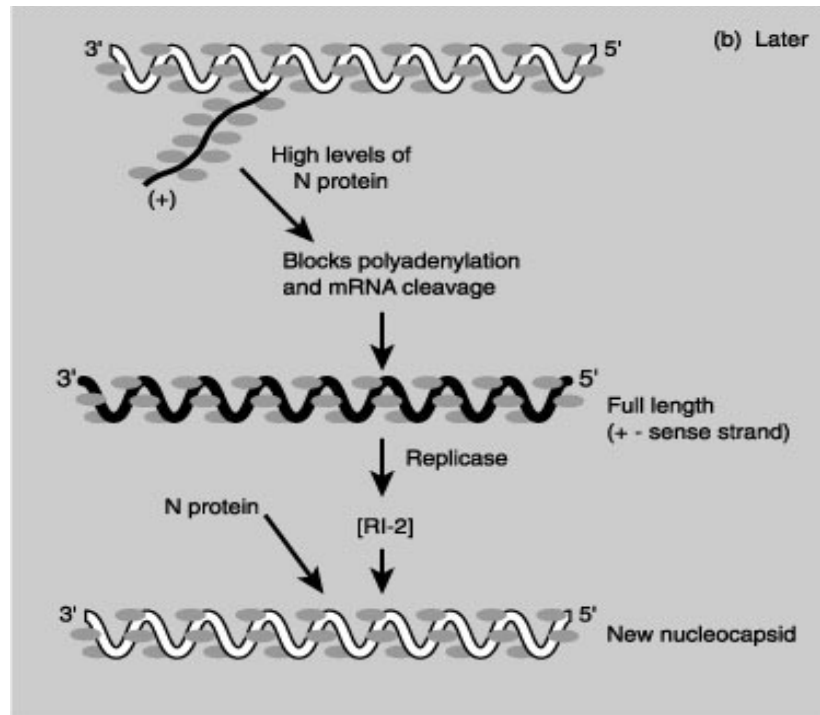
# RNA (-), esempio: Rhabdoviridae (VSV)

Abbondanza dei 5 trascritti e quindi delle 5 proteine





# Shift da trascrizione a replicazione

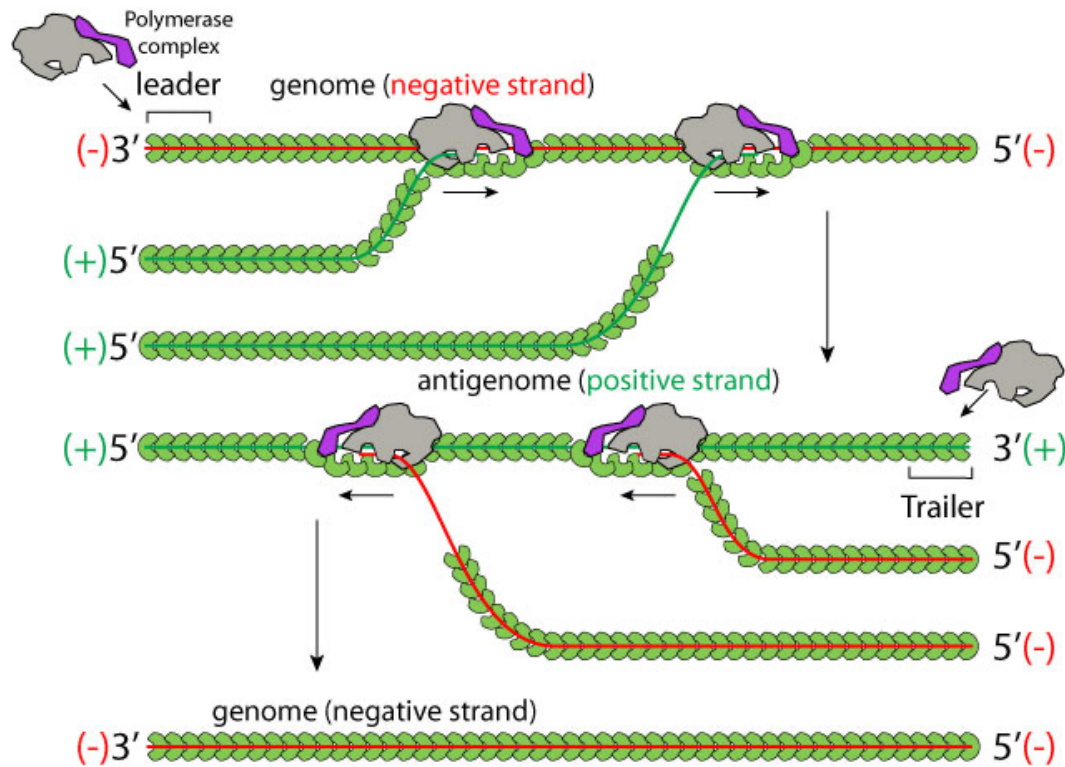


Si pensa che l'accumulo delle diverse proteine possa regolare la transizione dalla fase trascrizionale a quella replicativa.

## Possibile meccanismo:

Man mano che la sintesi proteica procede, si accumula proteina N che si lega ai filamenti (+) nascenti, impedendo il capping, bloccando la poliadenilazione e la produzione di mRNA a favore della sintesi di un filamento (+) full-length che costituirà lo stampo per i nuovi genomi virali.

# Shift da trascrizione a replicazione



The RNA dependent RNA polymerase complex binds to the leader sequence on the RNA genome, and starts replication. The antigenome is concomitantly encapsidated during replication. The RNA dependent RNA polymerase complex ignores all transcription signals when in replication mode. The antigenome is then replicated under the same process, the viral polymerase complex binding first to the trailer sequence.

The viral RdRP complex is presumably the same for replication and transcription. It may be a transcriptase by default and turn into the replicase mode depending on nucleocapsid concentration.

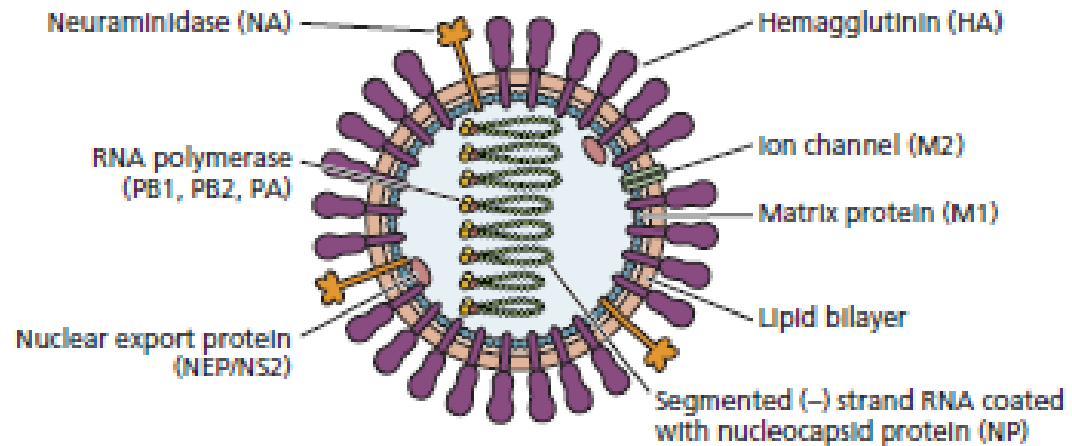
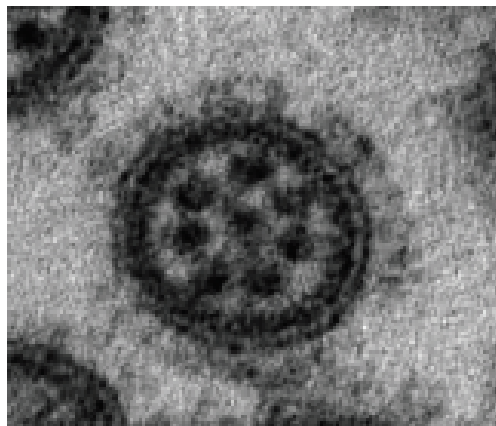
The genome/antigenome ratio is about 10 for many viruses. Presumably the trailer sequence is a stronger replication promoter than the leader sequence.

# RNA (-), virus influenza A (*Orthomyxoviridae*)

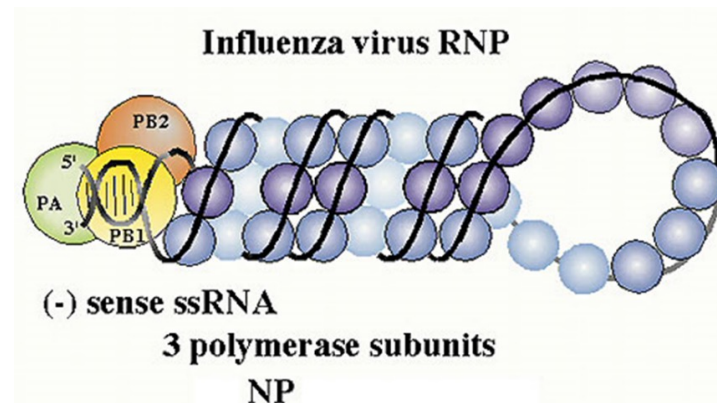
Replicano nel nucleo!

I segmenti genomici hanno sequenze nucleotidiche comuni al 5' e al 3' importanti per la replicazione: sono complementari tra di loro e all'interno del virione i segmenti genomici sono ripiegati grazie all'appaiamento di basi presenti alle estremità

A

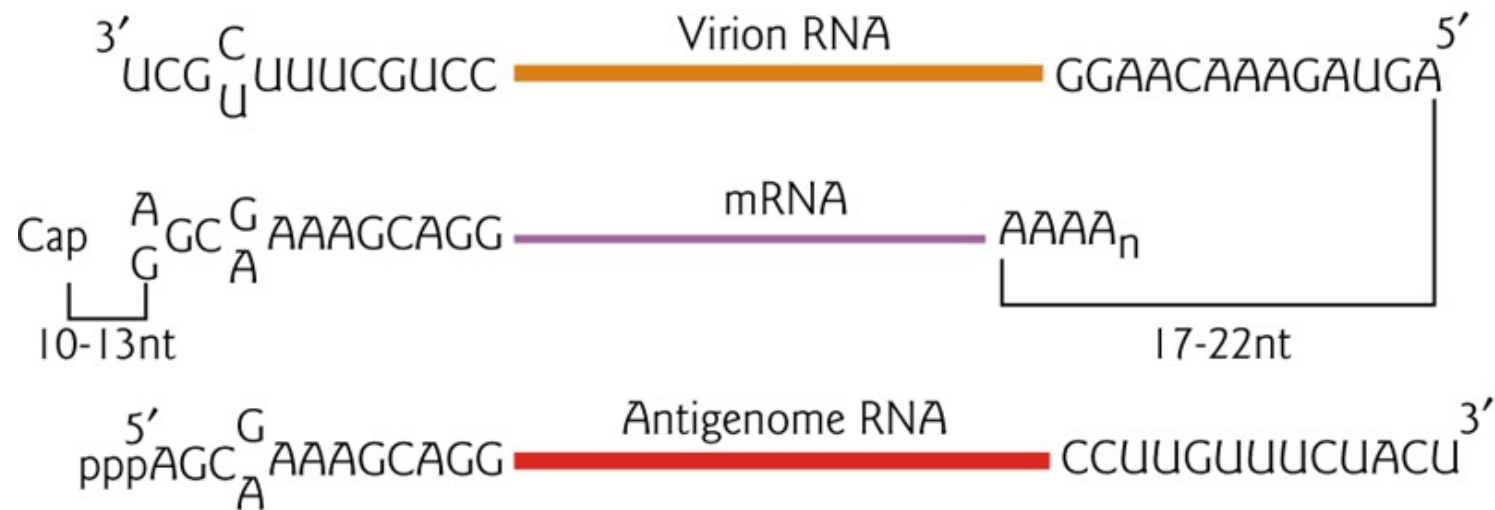


-

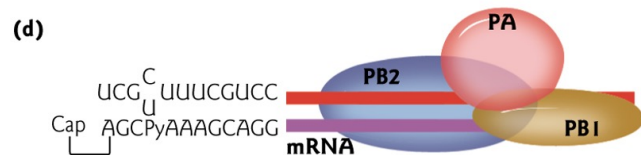
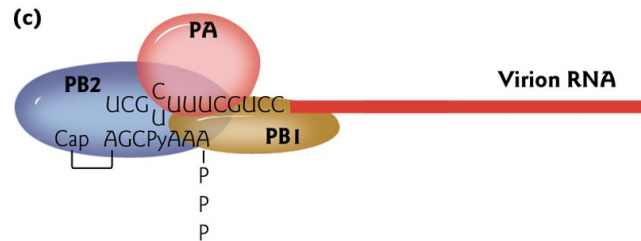
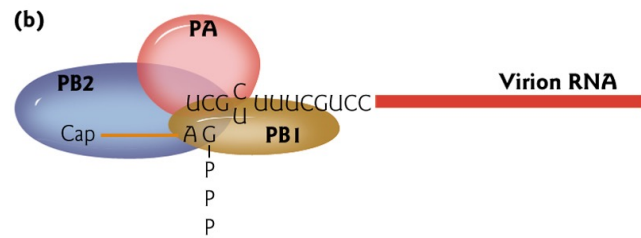
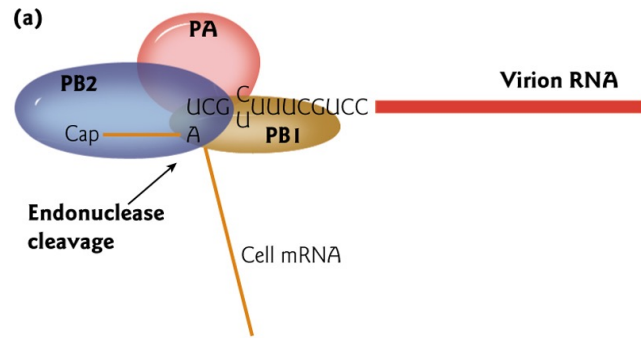


# RNA (-), virus influenza A (Orthomyxoviridae)

Specie di RNA presenti nella cellula infettata



# RNA (-), virus influenza A (Orthomyxoviridae) Trascrizione



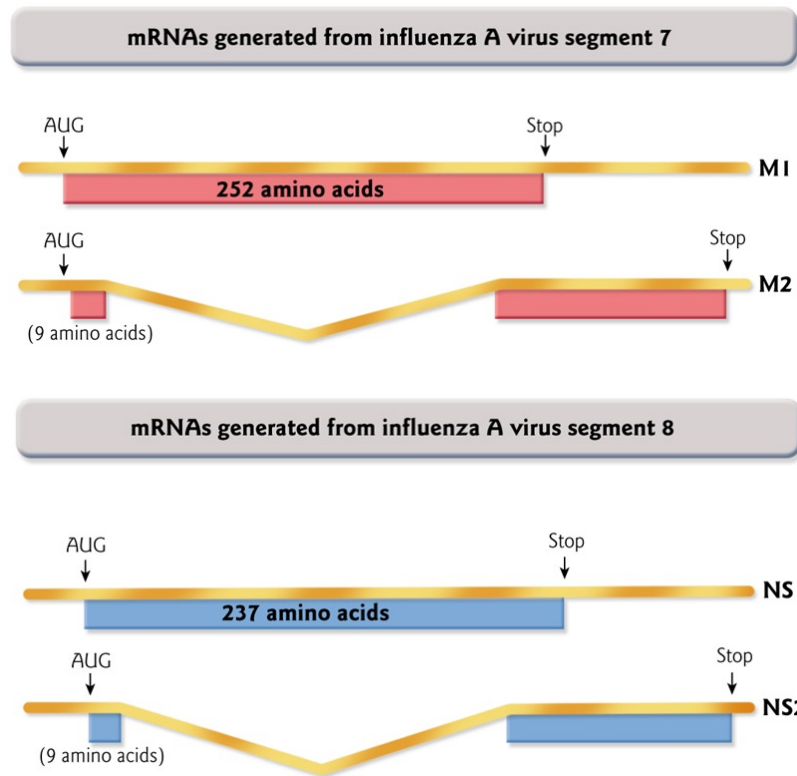
PB2: cap binding

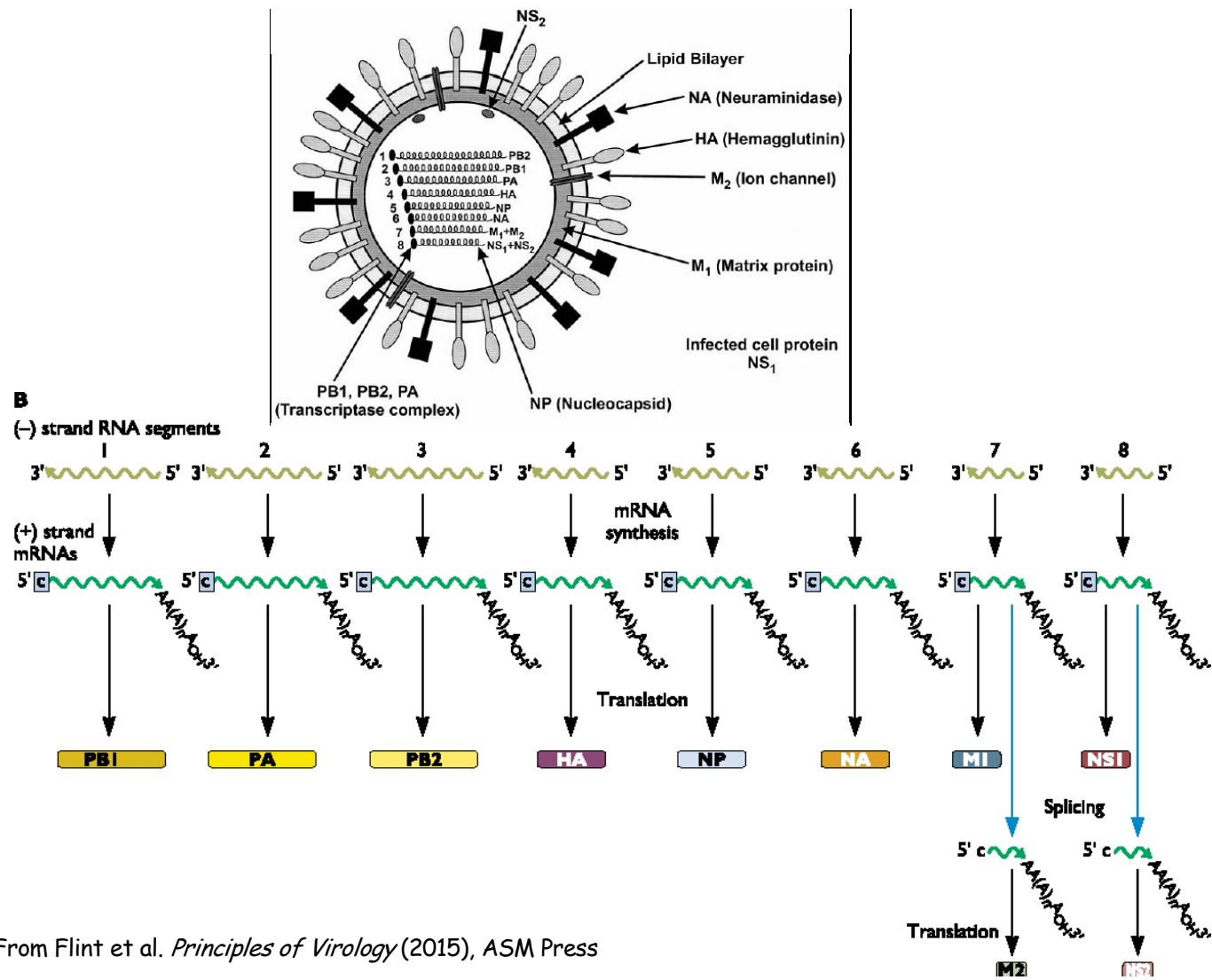
PB1: initiation and elongation

PA: endonuclease activity.

Primer-independent initiation of replication?

## Splicing degli mRNA del virus dell'influenza A





From Flint et al. *Principles of Virology* (2015), ASM Press

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

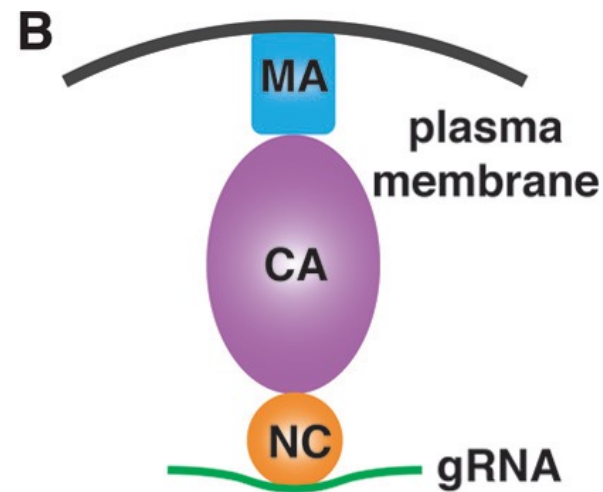
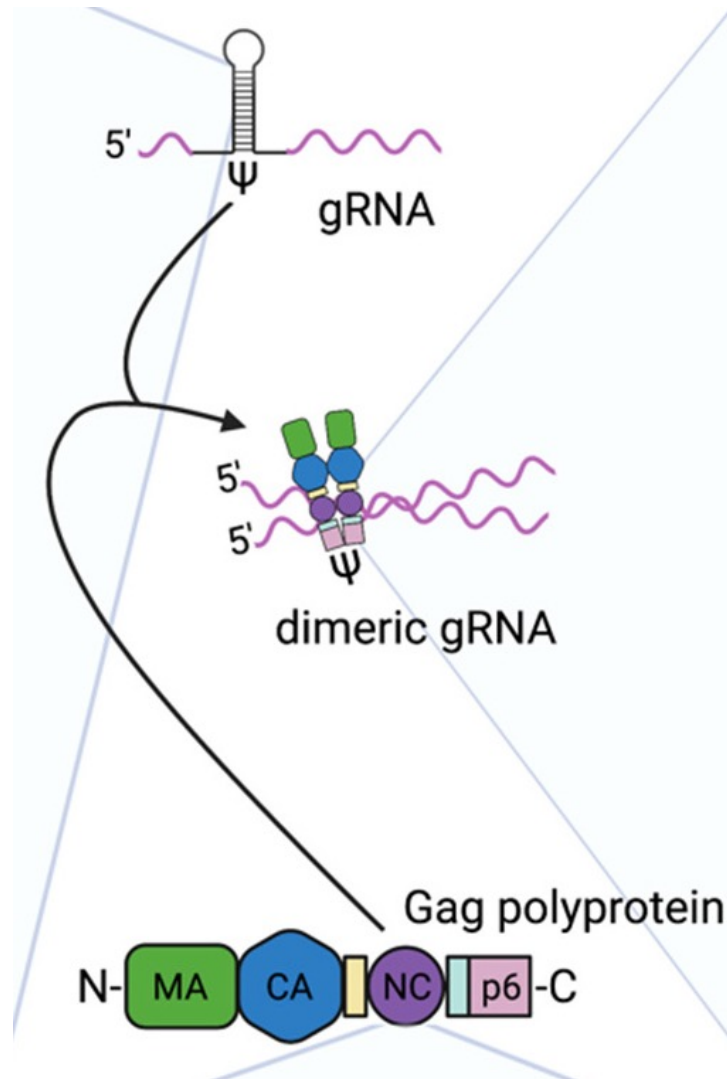
- **Capitolo 12 – par. 12.6 (Acquisizione dell’envelope lipidico), 12.7, 12.8**
- **Capitolo 27 – par. 27.3**



# Assemblaggio del capside e impacchettamento del genoma

- Il sito di assemblaggio e impacchettamento dipende dal sito di replicazione e/o dal meccanismo attraverso il quale il virus viene rilasciato
- Nei picornavirus, **poxvirus**, reoviruse Mononegavirales l'assemblaggio avviene nel citoplasma
- Negli adenovirus, poliomavirus, parvovirus, herpesvirus **orthomyxovirus** l'assemblaggio avviene nel nucleo

# Packaging retrovirus (cytoplasm)



# Maturazione

- La maturazione è lo stadio del ciclo replicativo durante il quale il virus diventa infettivo
- Comprende modificazioni strutturali del virione che possono essere il risultato di processamenti specifici delle proteine del capsido o modificazioni conformazionali durante l'assemblaggio
- Proteasi virali sono spesso coinvolte nel processo di maturazione, sebbene alcune volte possono intervenire sia enzimi virali che cellulari
- Così come per gli stadi precoci del ciclo replicativo non sempre è possibile identificare singolarmente l'assemblaggio, la maturazione e il rilascio

# Rilascio

Possono essere utilizzati due meccanismi principali:

- I virus litici (la maggior parte dei virus nudi) abbandonano la cellula a seguito della lisi della stessa

- I virus rivestiti possono lasciare la cellula infettata

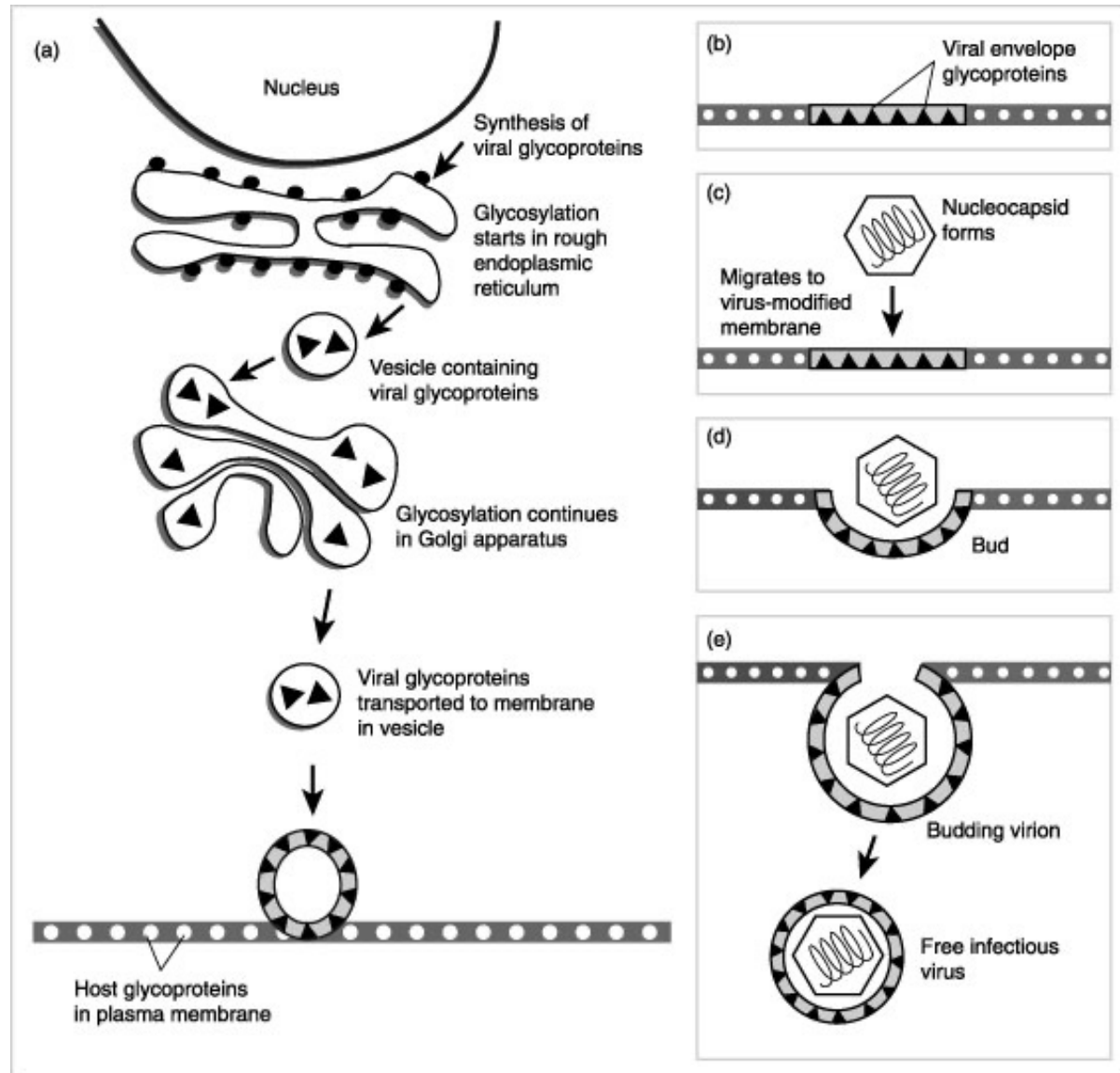
1) gemmando direttamente dalla membrana plasmatica esterna che formerà il rivestimento pericapsidico

oppure

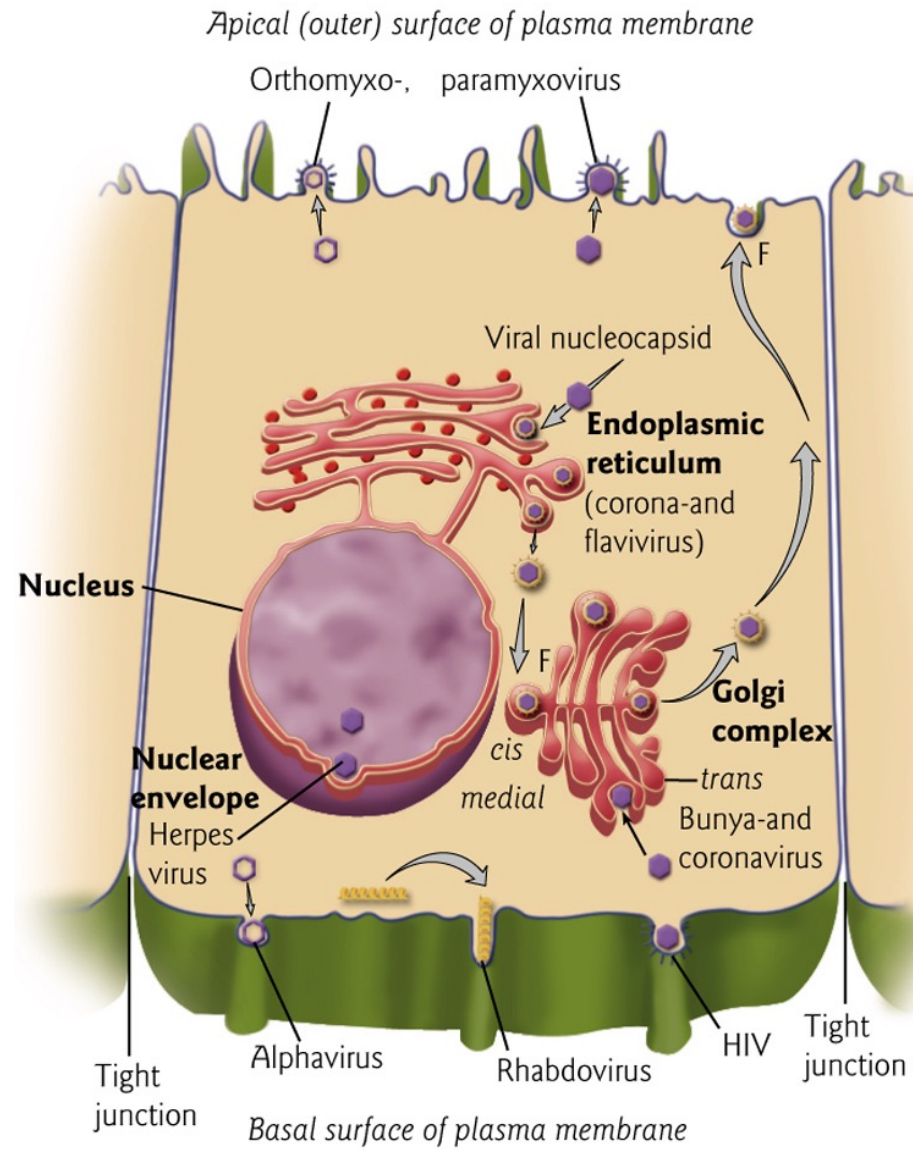
2) trasportati all'interno di vescicole intracellulari, dopo la gemmazione dalle membrane cellulari interne

- Durante il processo di **gemmazione**, insieme alla membrana lipidica sono acquisite le proteine virali dell'envelope.

# GEMMAZIONE

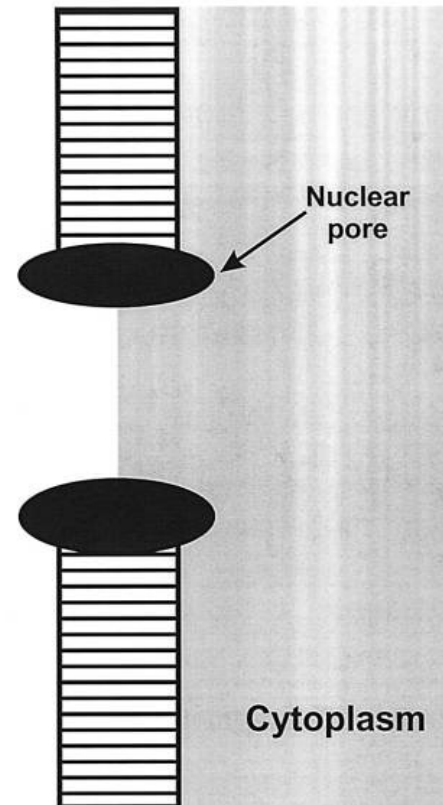
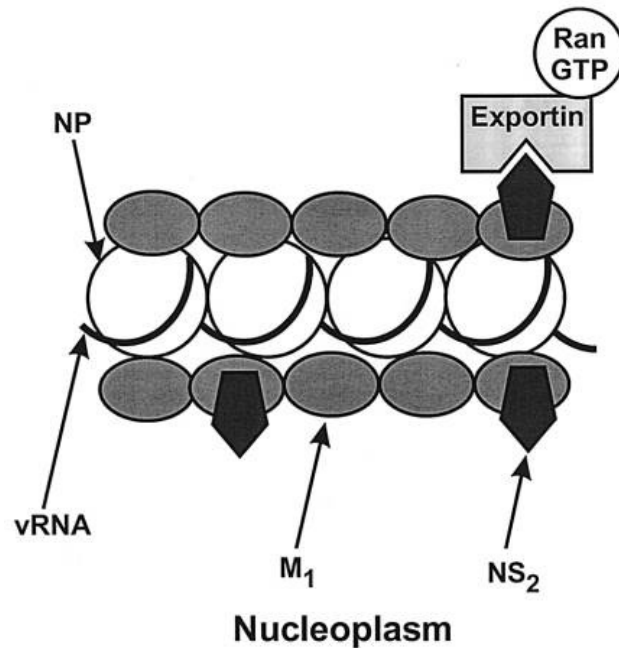


# GEMMAZIONE

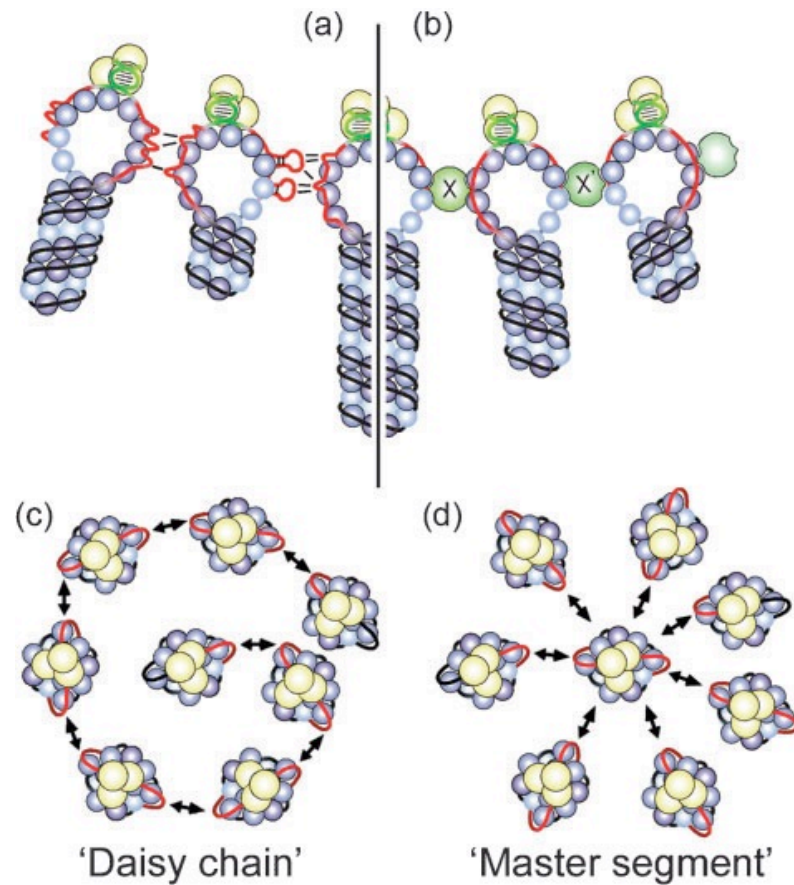
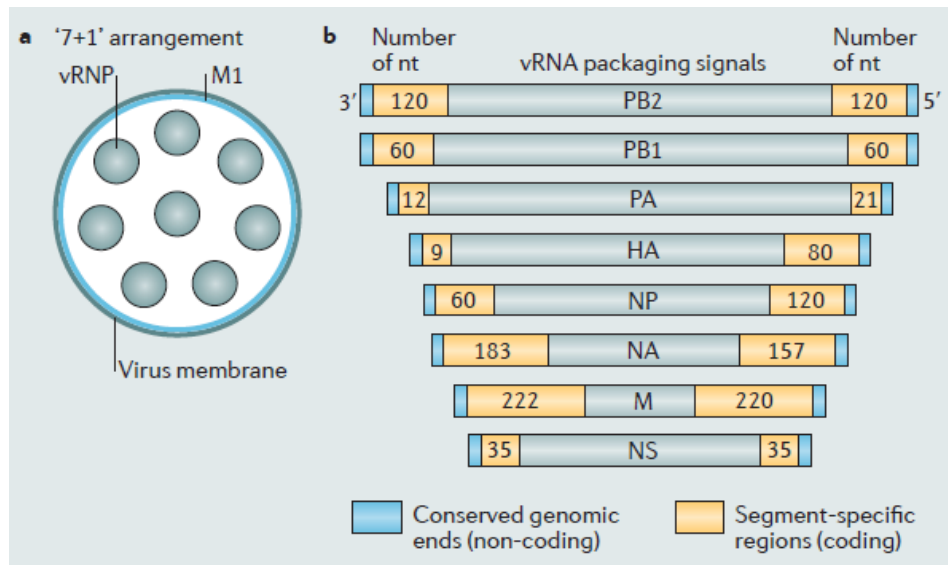


# vRNP nuclear export

- Un segnale di esporto nucleare in NS2 interagisce con un membro della famiglia delle esportine cellulari. Verosimilmente l'esportina è associata con la proteina RAN-GTP per mediare l'esporto del complesso RNP-M1-NS2 dal nucleo.



# Assemblaggio dei segmenti genomici nelle nuove particelle del virus dell'influenza





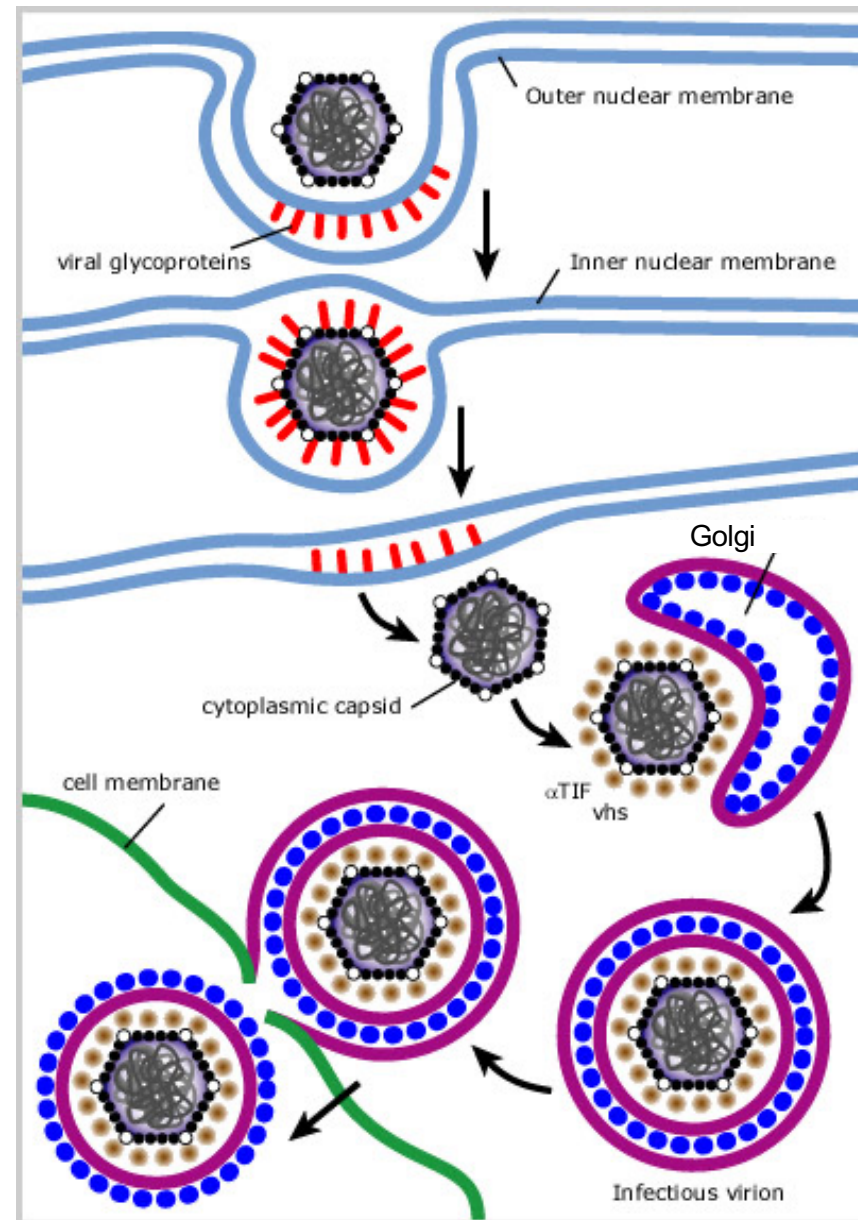
# Life cycle (budding)

The new viral particles are gradually released by budding from the cell for a period of few hours. The cells are not lysed, but eventually die (due to interference with the normal synthesis of cellular macromolecules)



Nature 439, 490-2, 2006

# GEMMAZIONE (HSV-1)



# Terapia antivirale

## Rilascio

### Influenza virus

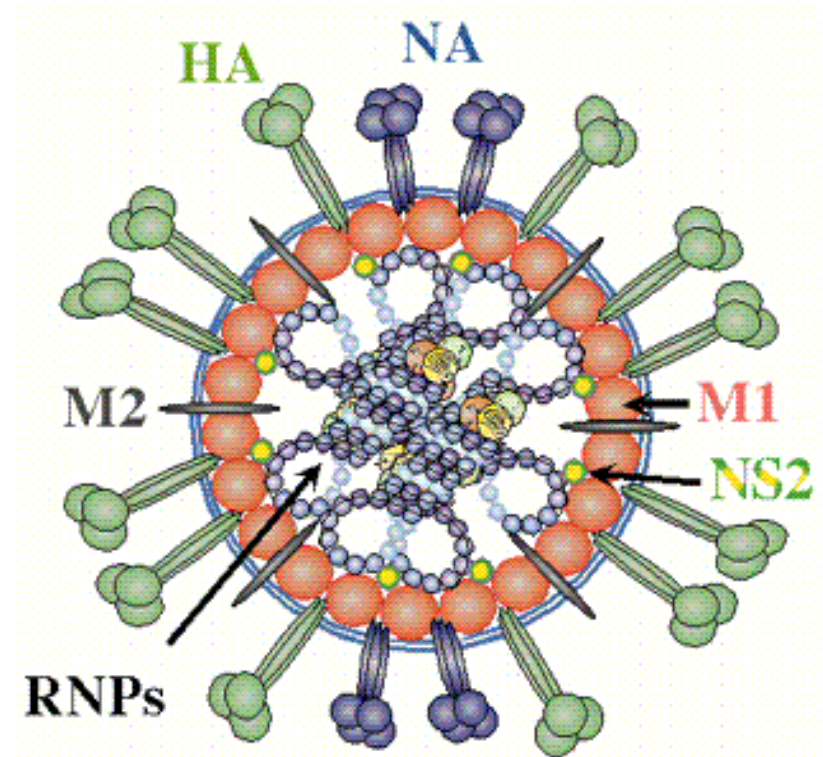
Richiede la neuroaminidasi per uscire dalla cellula infettata

**RELENZA (zanamivir)**

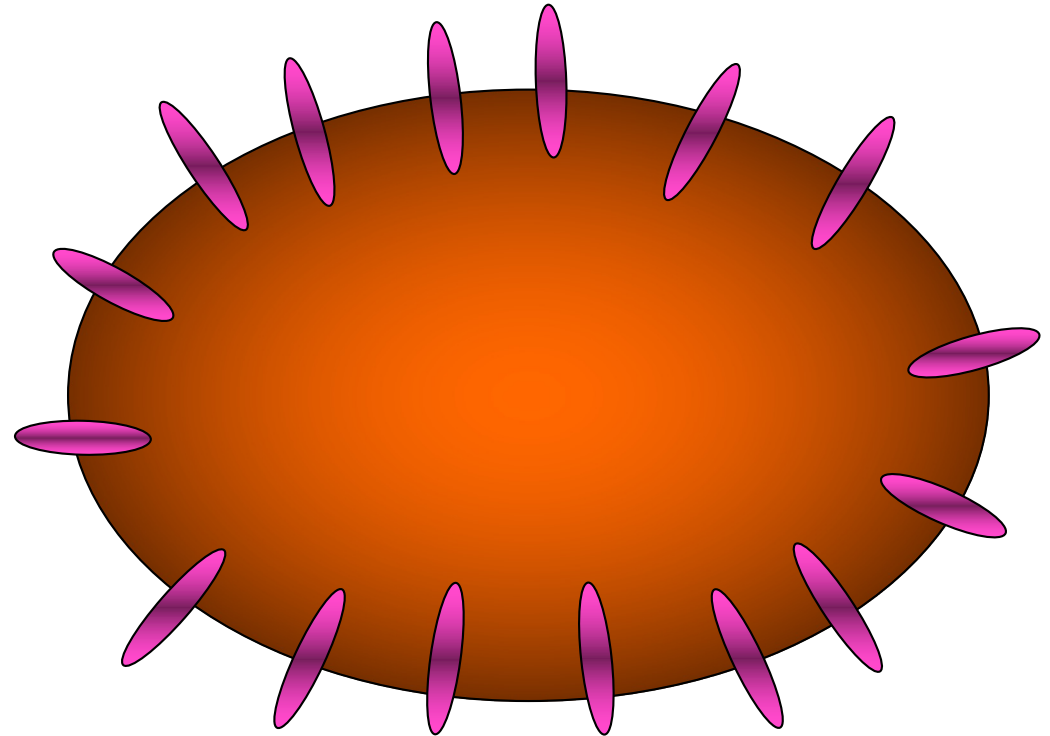
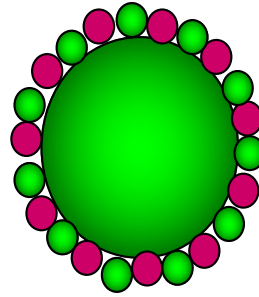
**TAMIFLU (oseltamivir)**

Inibitori della Neuraminidasi

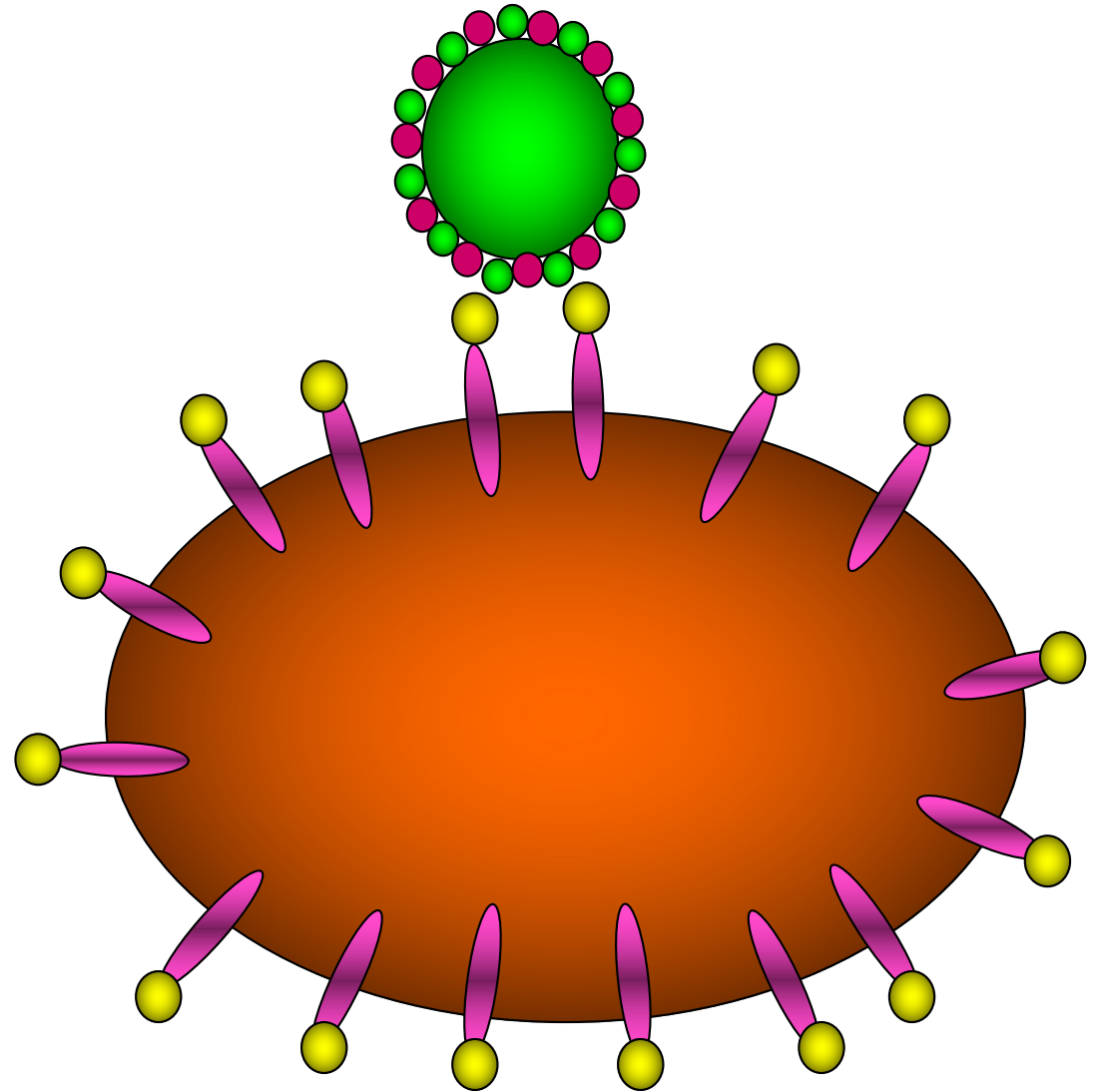
Attivi contro Influenza A e Influenza B



**La Neuraminidasi  
rimuove i residui di  
acido sialico dalla  
superficie cellulare  
permettendo il  
rilascio del virus**



**In presenza  
dell'inibitore il virus  
rimane adeso alla  
superficie cellulare  
attraverso  
l'interazione  
emagglutinina-acido  
sialico. Inibizione del  
rilascio**



# Terapia antivirale

## Maturazione Retrovirus

Gli inibitori della proteasi prevengono la maturazione dei virioni rilasciati

