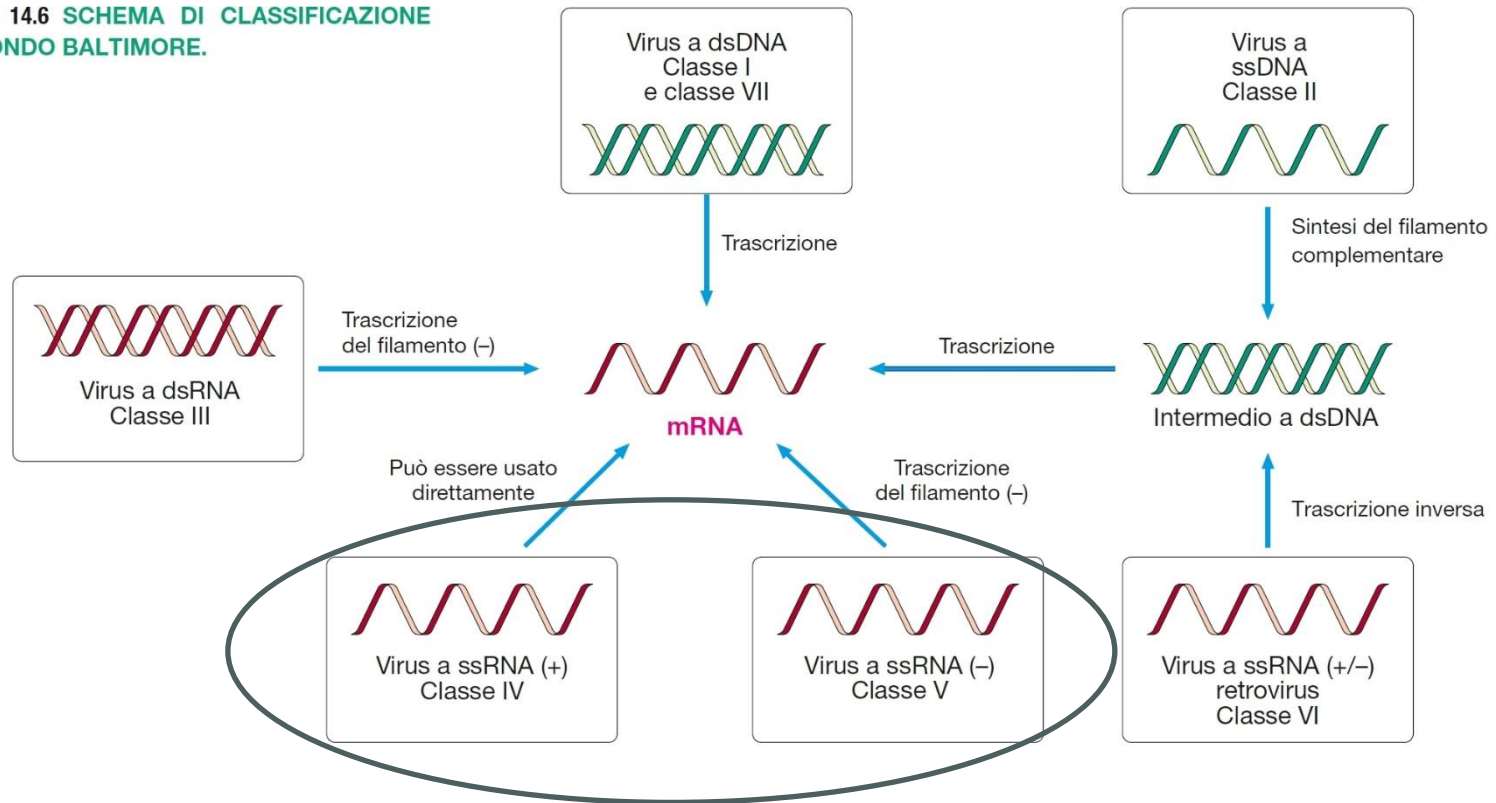


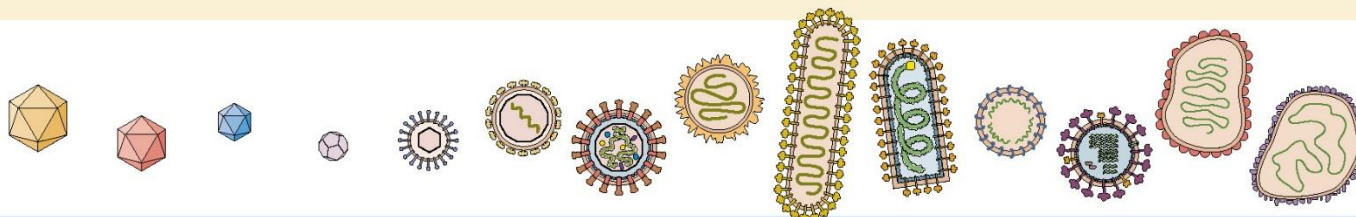
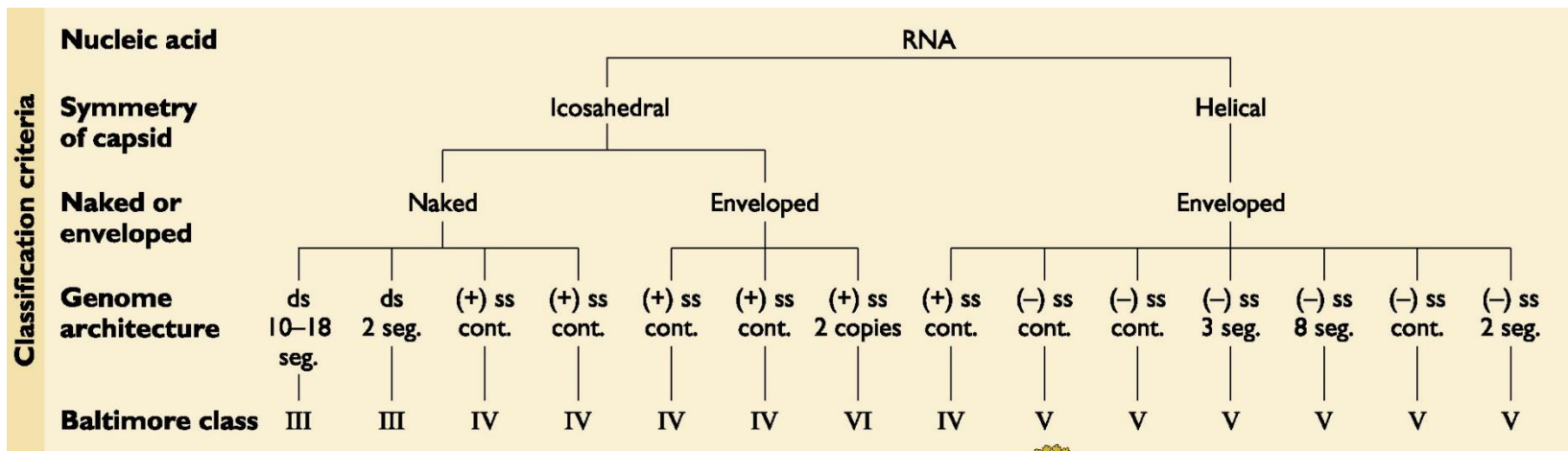
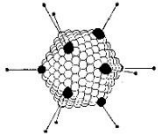
# Parti del testo "Introduzione alla Virologia Moderna" da consultare per questa lezione

- **Capitolo 8 – par. 8.1, 8.4**
- **Capitolo 11 – par. 11.1, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8,11.9**

# Classificazione secondo Baltimore (suddivisione in classi di replicazione)

Figura 14.6 SCHEMA DI CLASSIFICAZIONE SECONDO BALTIMORE.

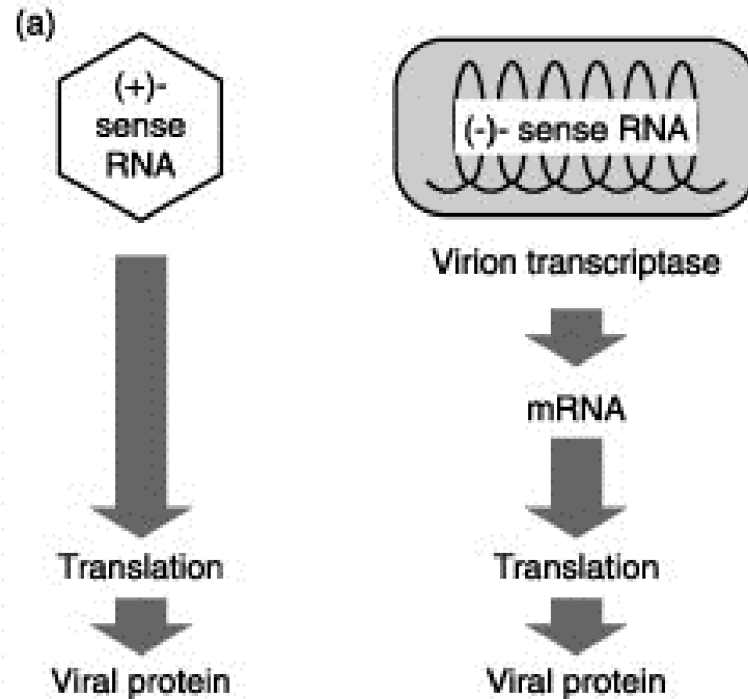




Properties	Family name	Reo	Birna	Calici	Picorna	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Ortho-myxo	Para-myxo	Arena
Virion polymerase		(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Virion diameter (nm)		60–80	60	35–40	28–30	40–50	60–70	80–130	80–160	80 x 790–14,000	70–85 x 130–380	90–120	90–120	150–300	50–300
Genome size (total in kb)		22–27	7	8	7.2–8.4	10	12	3.5–9	16–21	12.7	13–16	13.5–21	13.6	16–20	10–14

I genomi ad ssRNA di virus animali variano dai piccoli genomi dei picornaviridae ai lunghi genomi dei corona viridae (fino a 30kb)

# Virus Classe IV e V



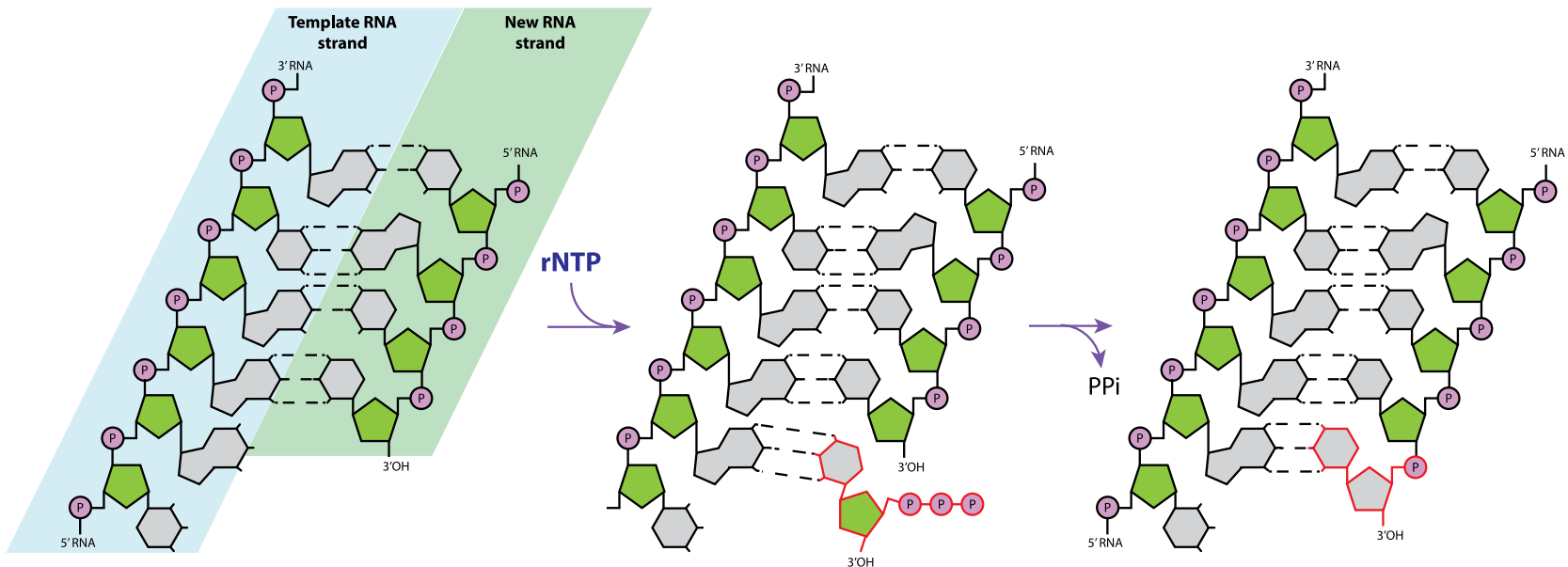
Caratteristiche comuni: genomi lineari, RNAdependent RNA polymerase (RdRP), intermedi dsRNA

Le RNAPolRNAdip sono o nel virione (-) o prodotte in fase precoce (+)

# RNA dependent RNA polymerase

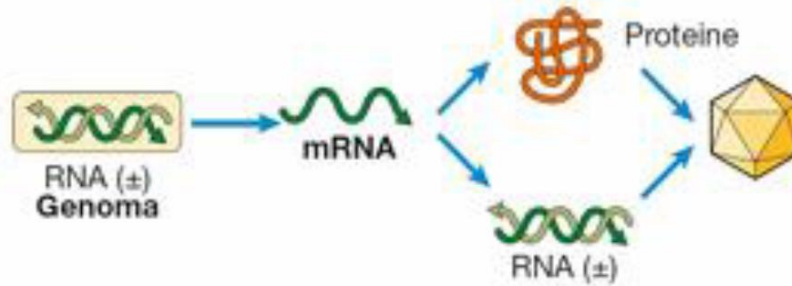


## RNA-dependent RNA polymerase

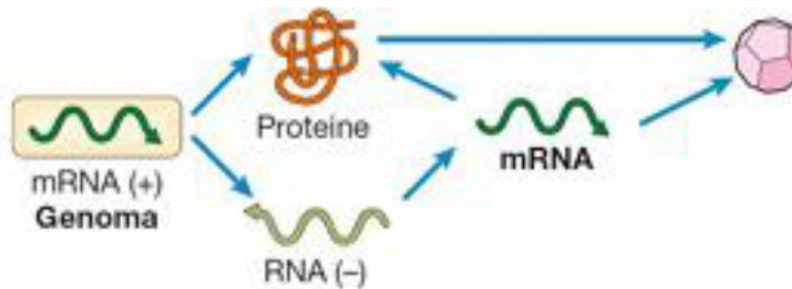


Le RNAPolRNAdip mancano di attività di correzione di bozze (proofread)  $\Rightarrow$  tassi di mutazione più elevati rispetto ai virus a DNA

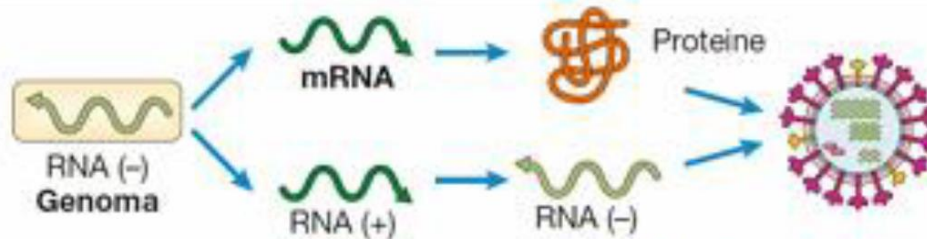
**Classe III**  
*Reoviridae*



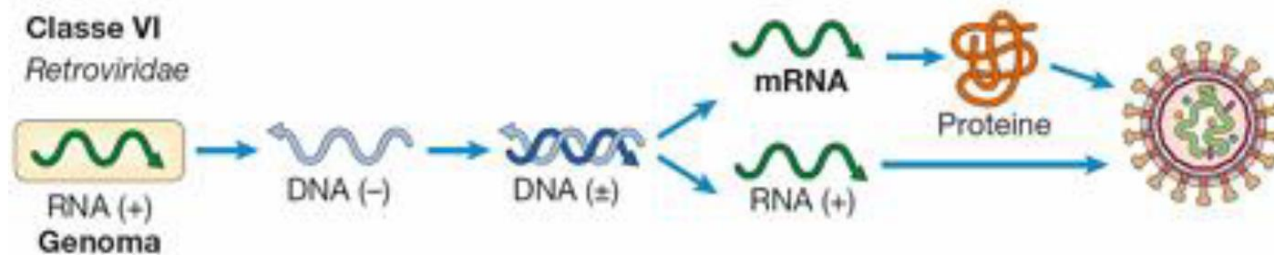
**Classe IV**  
*Picornaviridae*  
*Togaviridae*  
*Flaviviridae*  
*Coronaviridae*



**Classe V**  
*Orthomyxoviridae*  
*Paramyxoviridae*  
*Rhabdoviridae*



**Classe VI**  
*Retroviridae*



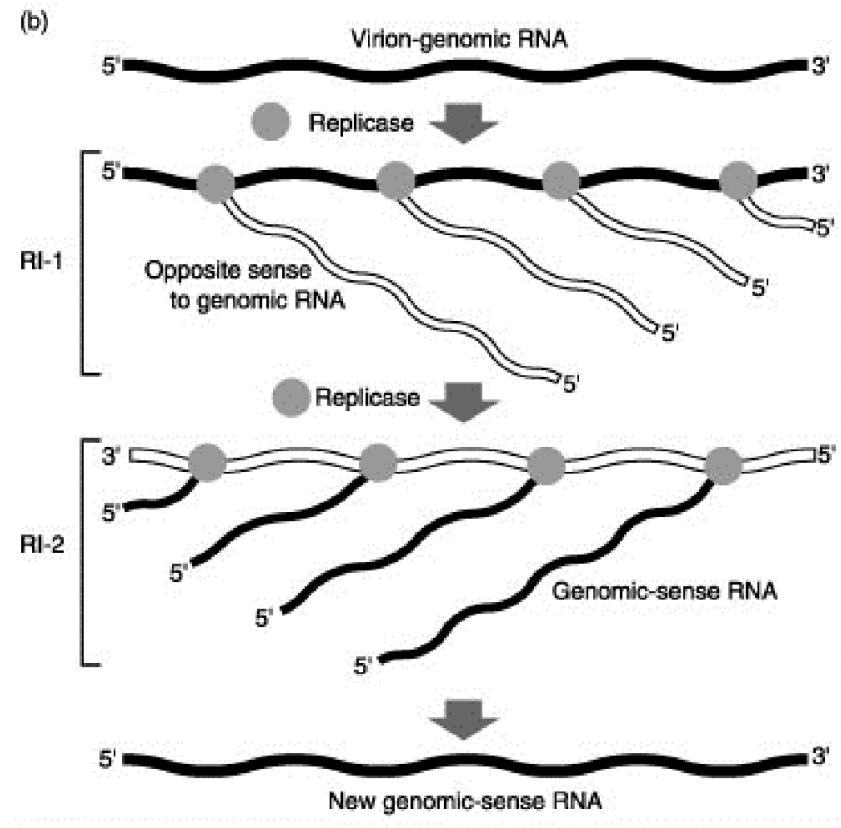
# Replicazione genomi ad RNA dei virus delle Classi IV e V

Per la replicazione, indipendentemente dalla polarità del genoma ad RNA del virus, la RdRp genera, a partire dall' RNA virionico un filamento complementare (antigenoma) della stessa lunghezza del genoma.

In RI-1 viene prodotto lo stampo di polarità opposta al vRNA (intermedio di replicazione)

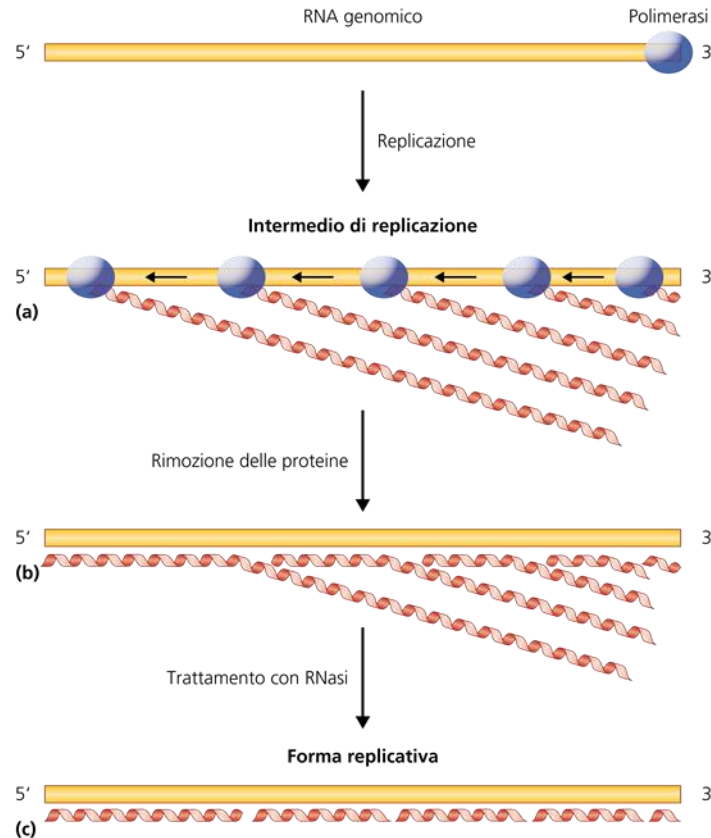
L'RNA complementare al vRNA (o **antigenoma**) è lo stampo in RI-2

In RI-2 viene sintetizzato l'RNA della stessa polarità di quello presente nel virione (vRNA)



RI= Intermedio di Replicazione

# Replicazione genomi ad RNA dei virus delle Classi IV e V



**FIGURA 8.4** Replicazione del genoma a RNA dei picornavirus. La replicazione avviene utilizzando uno stampo che è mantenuto in una forma circolare grazie all'azione di tre proteine; qui, per semplicità, lo stampo è rappresentato in forma lineare. (a) Struttura proposta per una molecola di intermedio di replicazione (RI) prima della deproteinizzazione. (b) RI dopo deproteinizzazione. (c) Effetto del trattamento di RI deproteinizzato con RNasi per produrre una forma replicativa (RF) a RNA.

# RNA polimerasi RNA-dipendente: meccanismi di inizio della sintesi di RNA

Inizio della sintesi de novo:

la sintesi dei nuovi filamenti di RNA a partire dall'inizio dello stampo, senza avere bisogno di nessun primer;

-la sintesi di un nuovo filamento di RNA comincia da una porzione più interna dello stampo per poi tornare indietro, anche qui in maniera indipendente dal primer

Inizio della sintesi primer dipendente:

Richiede la presenza di un primer

## De novo Initiation

3'-terminal initiation



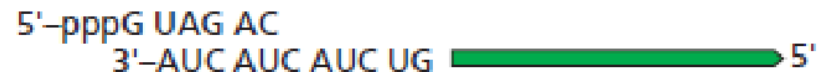
Internal initiation



Elongation



Slip back



## Primer-dependent Initiation

Protein primer

Terminal protein



Capped primer



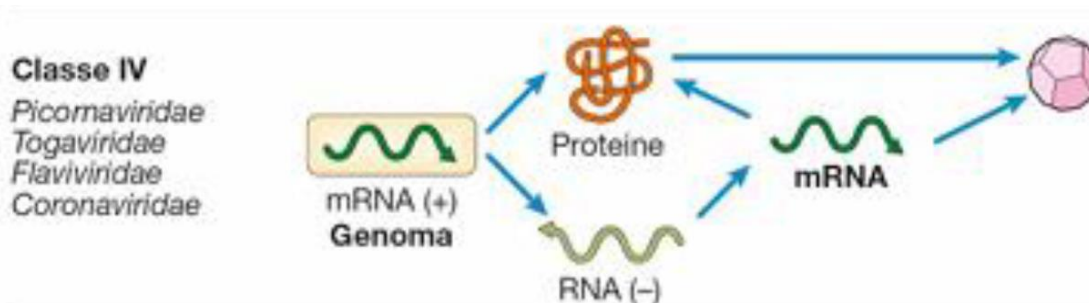
# ssRNA(+) viruses (IV classe)

Il genoma nudo di questi virus è infettivo

Il primo evento nel ciclo infettivo di questi virus è la **traduzione** del vRNA nelle proteine virali.

Se il genoma virale è trasfettato in una cellula, in assenza di ogni altra componente proteica virale, l'infezione può procedere e possono essere prodotte nuove particelle virali

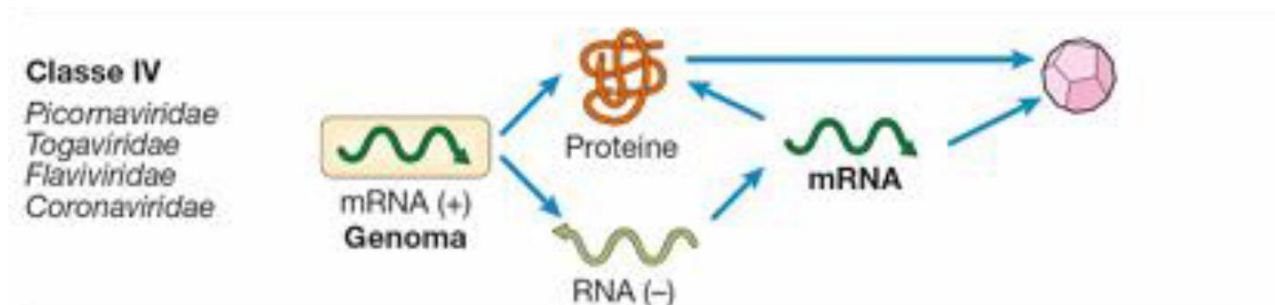
Questi virus, quindi, non richiedono una fase di trascrizione che precede l'espressione delle proteine virale. Ne consegue che il nucleo della cellula eucariotica è superfluo, e l'infezione può procedere, più o meno efficientemente in una cellula priva di nucleo.



# ssRNA(+) viruses (IV classe)

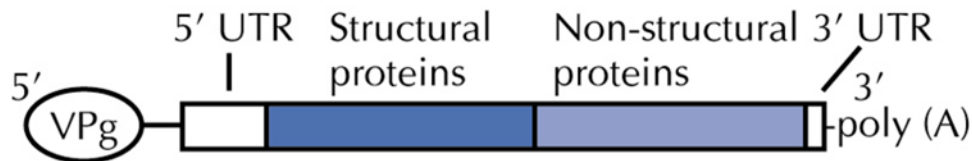
All'interno dei virus di classe IV si riconoscono due gruppi che si distinguono dall'aver una o più open reading frame all'interno del genoma e dalla posizione delle sequenze che codificano per le componenti strutturali e per quelle non strutturali sul genoma.

- **I gruppo** -> si distingue un'unica open reading frame.  
(*Picornaviridae*, *Flaviviridae*)
- **II gruppo** -> si distinguono più orf e l'espressione del genoma segue una regolazione temporale maggiore.  
(*Togaviridae*, *Coronaviridae*)



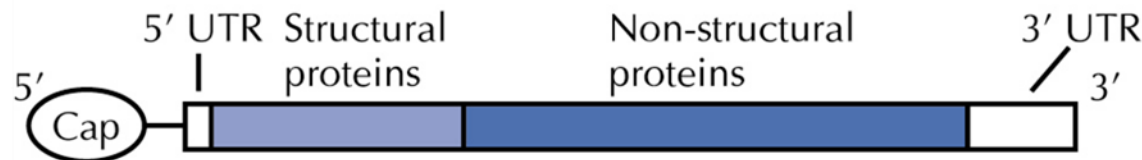
# Genomi a RNA (+)

Picornaviruses:



**da 7.2 a 8.5 kb**

Flaviviruses:



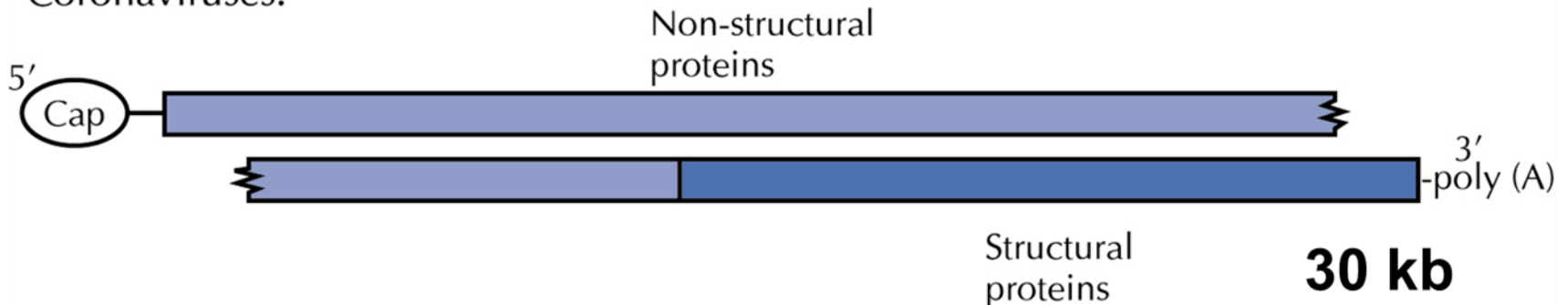
**10.5 kb**

Togaviruses:



**11.7 kb**

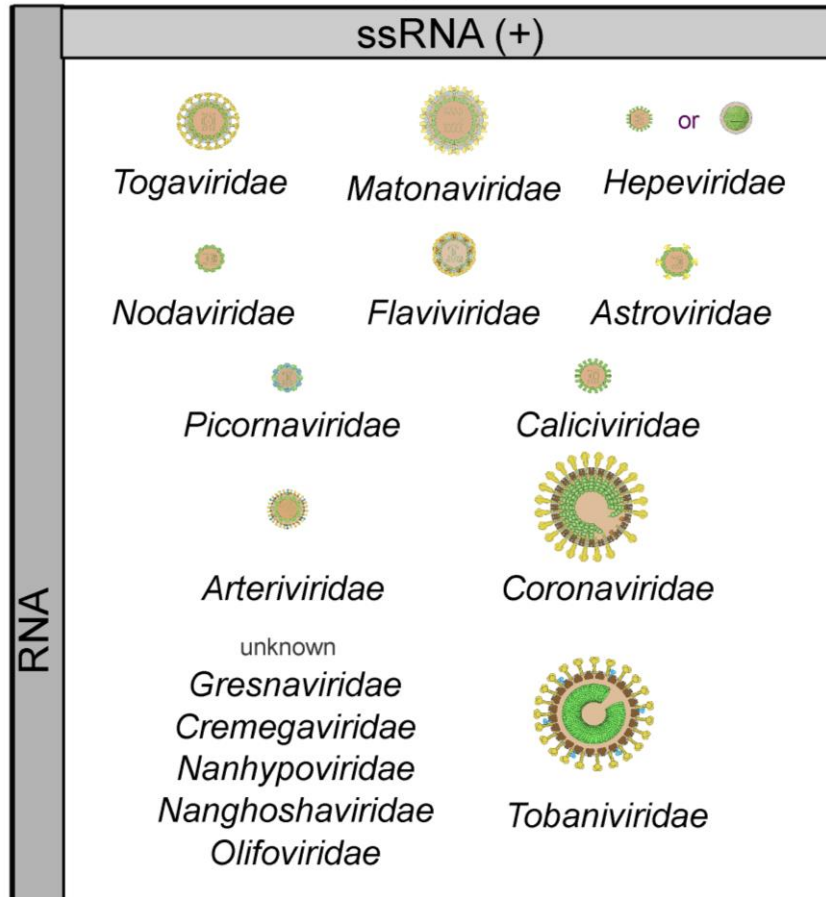
Coronaviruses:



**30 kb**

# ssRNA(+) viruses (IV classe)

## Viruses infecting vertebrates (4)



Picornaviridae

Togaviridae

Coronaviridae

Flaviviridae

Caliciviridae

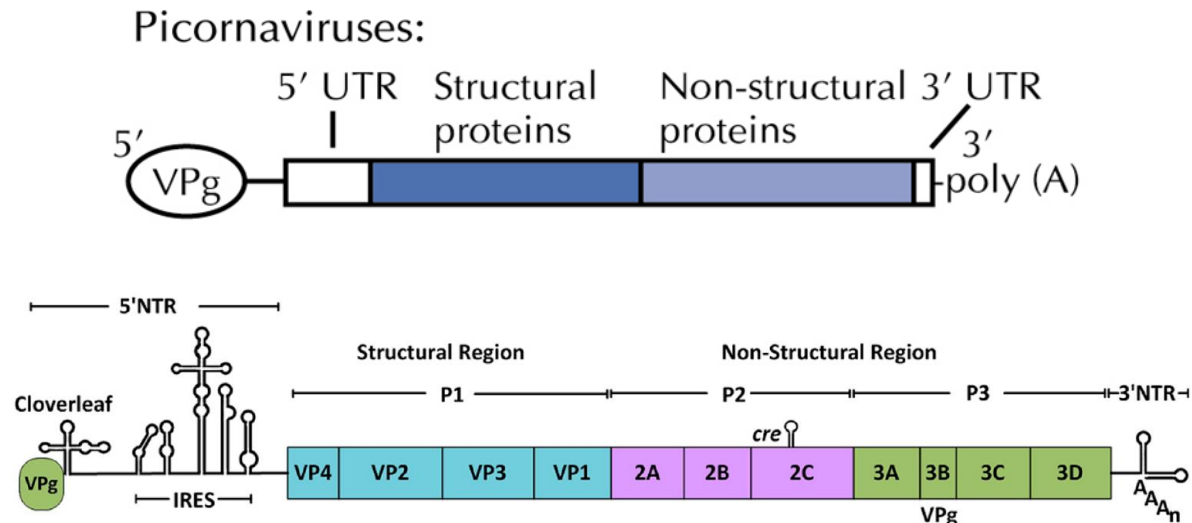
Hepeviridae

Astroviridae

...

# ssRNA(+) viruses (IV classe) Picornaviridae

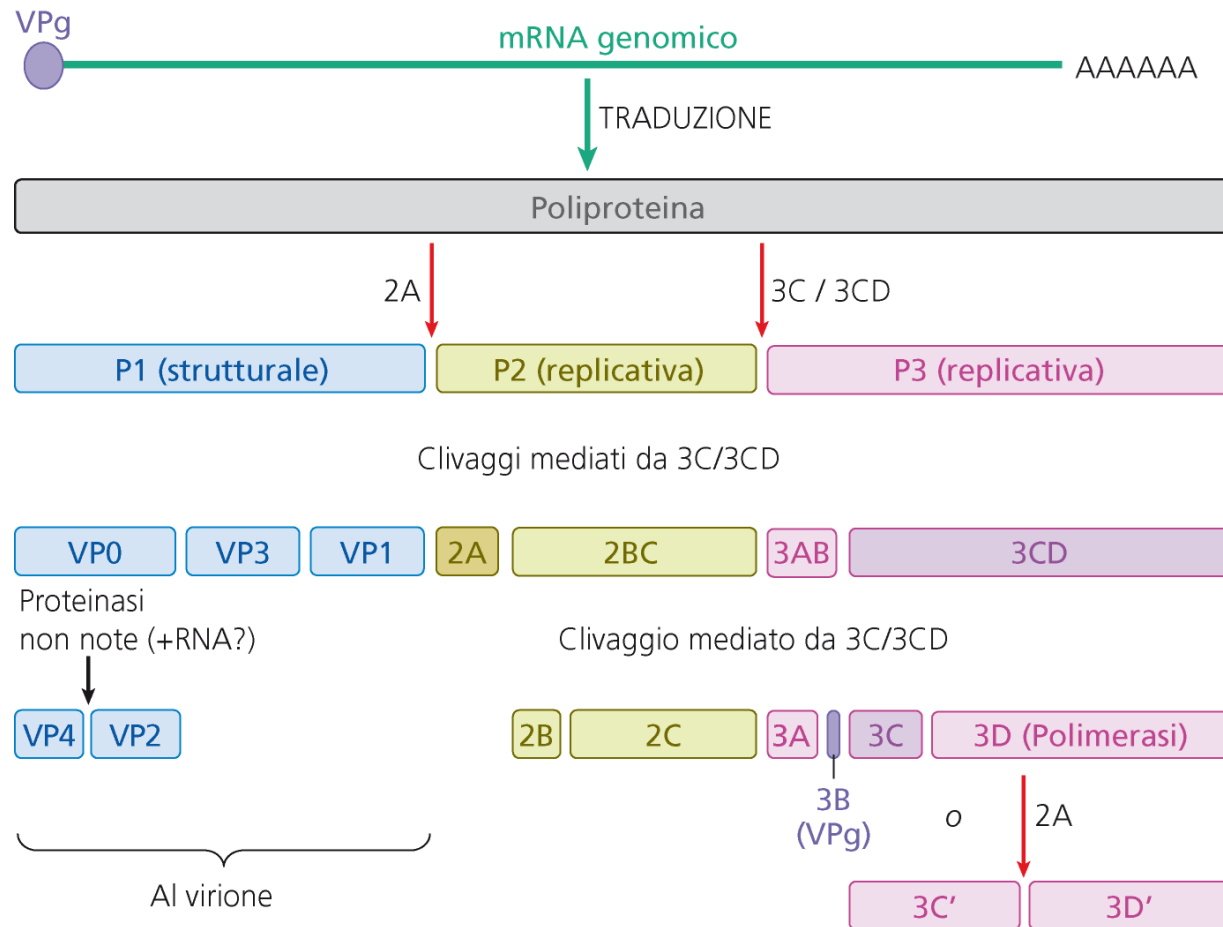
Dimensioni dalle 7.2 alle 8.5 kb, contiene una lunga UTR al 5' (600-1200nt) importante per la traduzione, sequenze IRES (Internal Ribosome Entry Site); UTR al 3' più corta (50-100 nt) importante per la sintesi del filamento (-)  
Entrambe le estremità del genoma sono modificate: VPg al 5' e poliadenilazione al 3'



Codifica una unica poliproteina  
le proteine strutturali al 5', le non strutturali al 3' tradotte tutte allo stesso momento

# ssRNA(+) viruses (IV classe) Picornaviridae

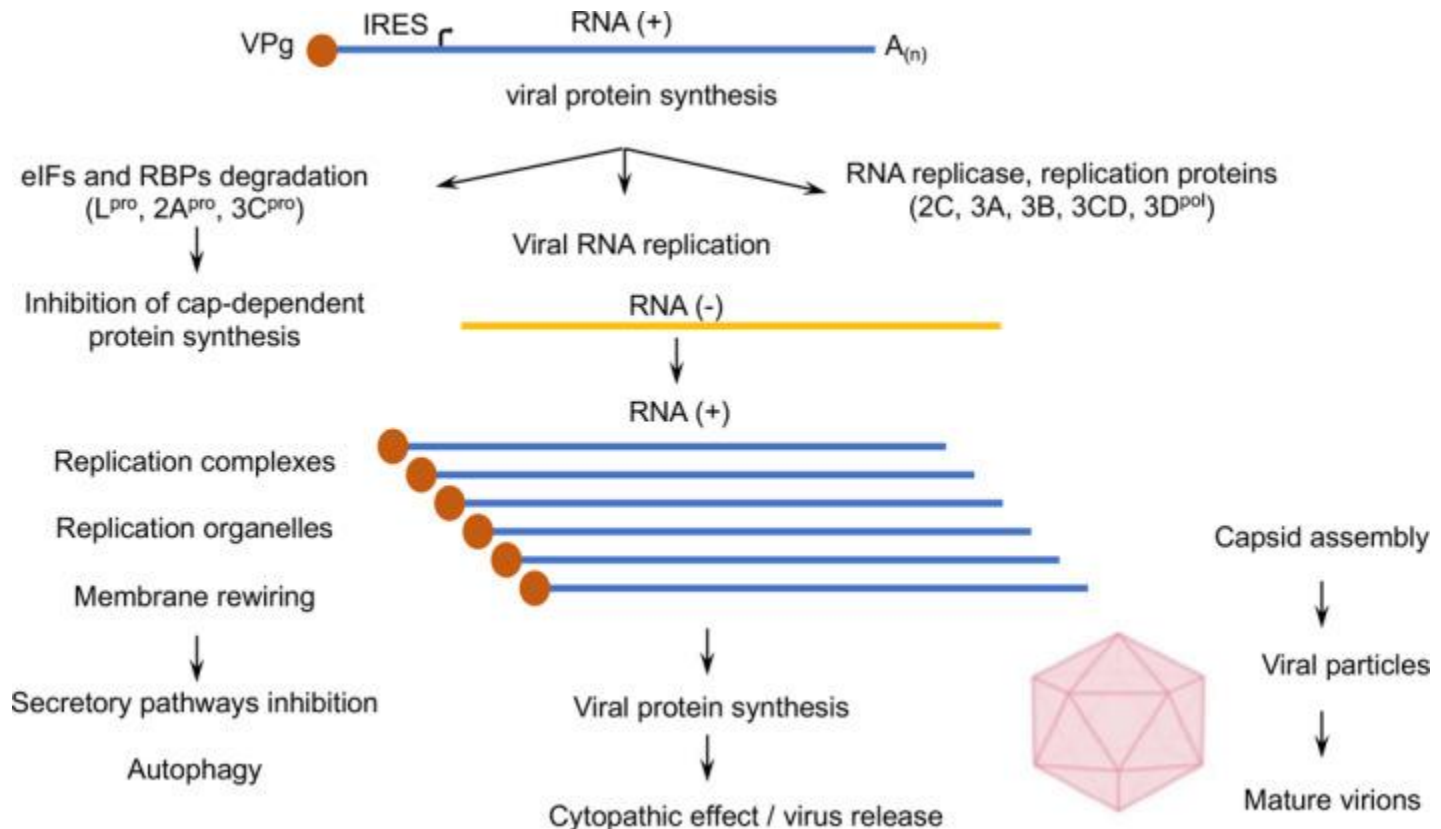
Formazione di una poliproteina che a seguito di una reazione intramolecolare dà origine a tre polipeptidi che vanno ulteriormente incontro a maturazione attraverso tagli proteolitici. Il processamento della poliproteina co-traduzionale e viene effettuato da attività autocatalitiche virali associate alla **proteasi 2A** e la **proteasi 3C**.



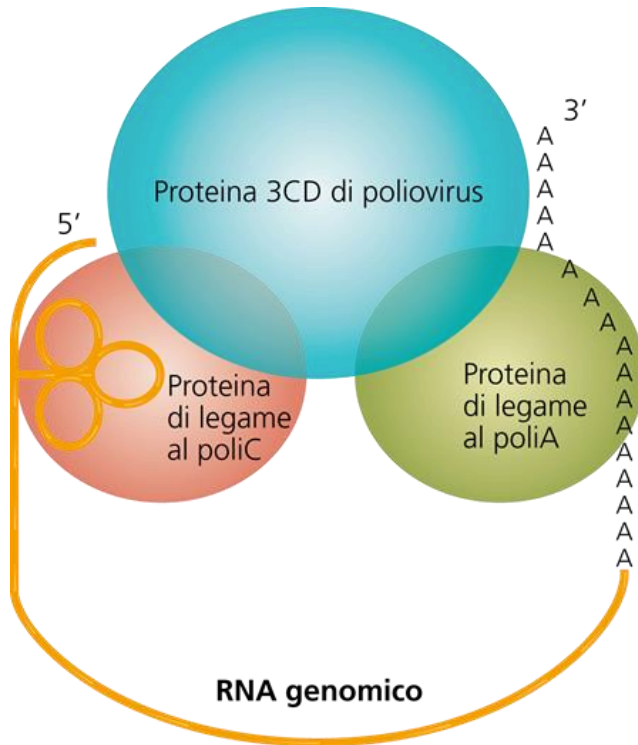
# ssRNA(+) viruses (IV classe) Picornaviridae

La traduzione degli mRNA cellulari è cap-dipendente, quella degli mRNA dei picornavirus IRES dipendente.

Questi virus hanno la capacità di bloccare la traduzione dei messaggeri cellulari attraverso la degradazione proteolitica di componenti del cap binding complex (eIF4GI, eIF4GII)



# Replicazione del genoma a RNA dei picornavirus



La polyA binding protein e la polyC binding protein sono proteine cellulari

La PolyC lega la struttura ricca di pirimidine al 5' (cloverleaf)

**FIGURA 8.3.** Circolarizzazione del genoma a RNA dei picornavirus nel complesso di replicazione.

# Replicazione del genoma a RNA dei picornavirus

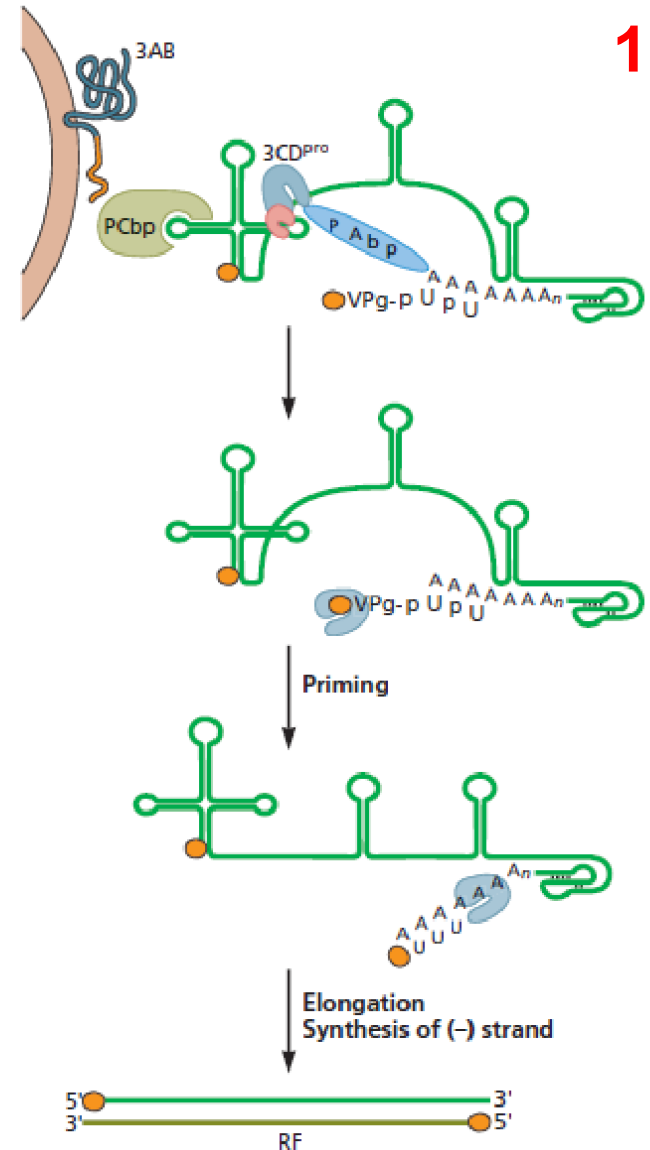
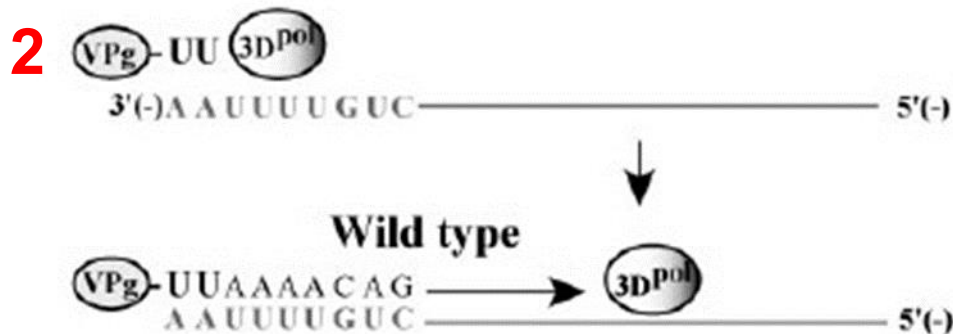
## Priming

L'RNA polimerasi RNA dipendente di *Picornavirus* lavora in maniera primer dipendente (VPg fa da primer per la sintesi di RNA- e +)

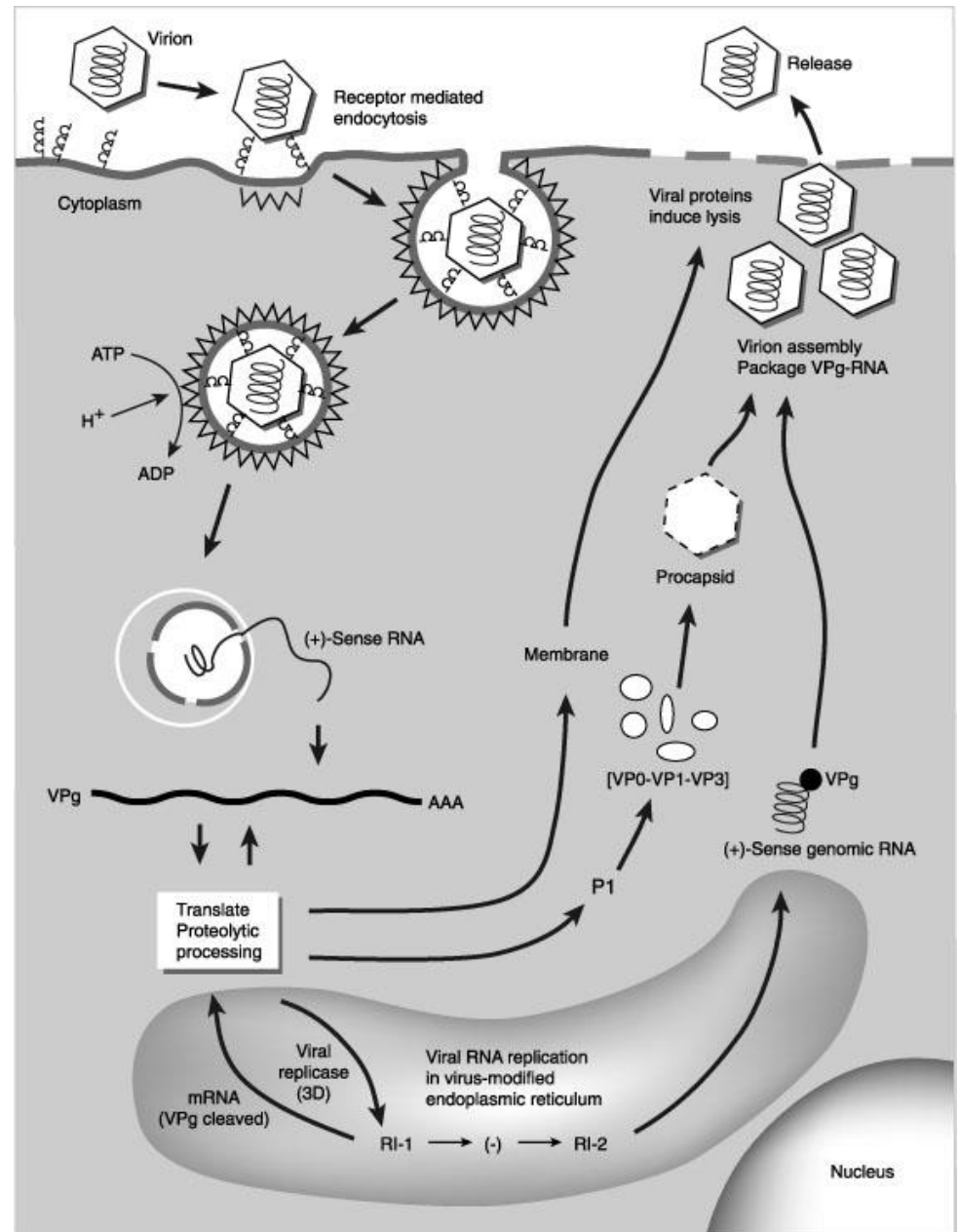
Uridilazione della VPg permette appaiamento con polyA (1) o con adenine al 3'dell'antigenoma (2)

**1** Sintesi RNA(-)

**2** Sintesi RNA(+)



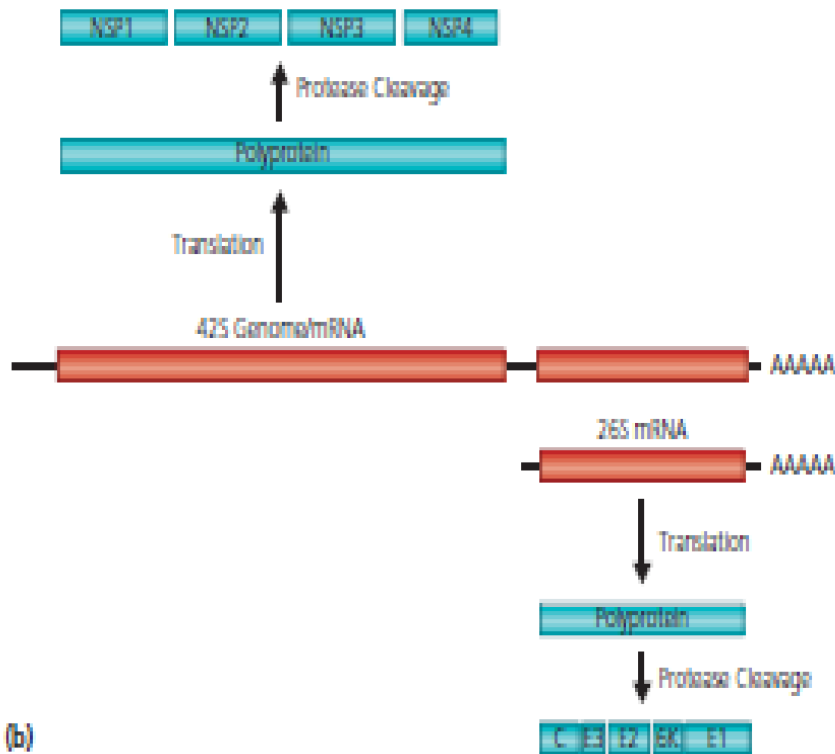
# Ciclo replicativo di poliovirus



# ssRNA (+) viruses: Togaviridae



Il genoma contiene due ORF. Soltanto quella al 5' è tradotta all'inizio dell'infezione. La seconda ORF è invece tradotta da un mRNA subgenomico



Genoma: 11.4 kb coefficiente di sedimentazione 42S

Nella cellula troviamo due mRNA: 42S e 26S cap-RNA-polyA, i prodotti di entrambi processati da proteasi

RNA (-): solo 42S  
Internal initiation site per il 26S

mRNA<sub>26S</sub> prodotto solo a seguito di replicazione (regolazione temporale)  
Ed in maniera molto efficiente (molte copie delle proteine strutturali)

# ssRNA (+) viruses: Togaviridae

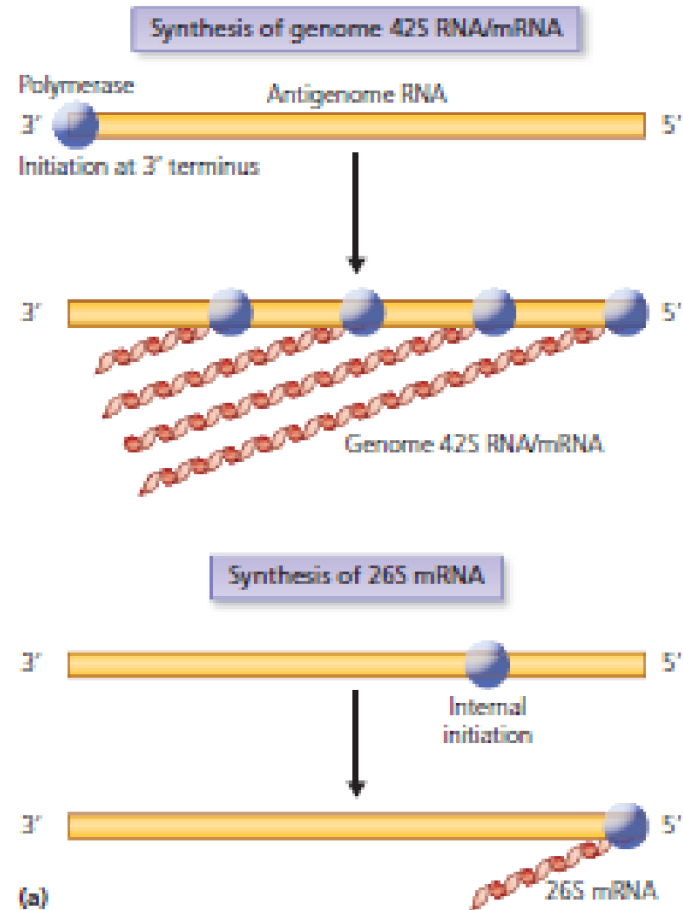
## *Sintesi dell'RNA genomico e dell'RNA subgenomico*

Il prodotto della **traduzione primaria** è una poliproteina che viene maturata dalle attività autocatalitiche proteasiche virali e poi maturata ulteriormente da altre proteasi.

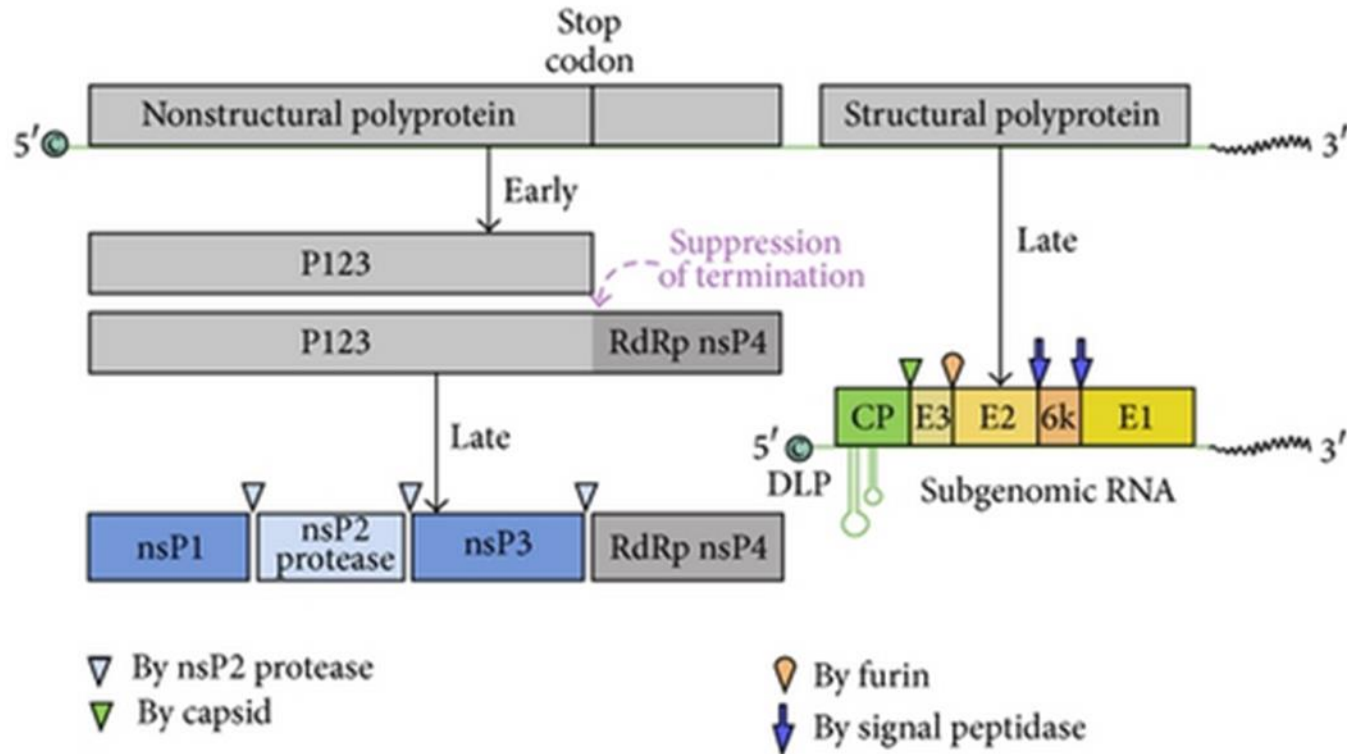
Tra le proteine non strutturali viene prodotta l'RNA polimerasi RNA dipendente la quale, utilizzando come stampo il genoma liberato nel citoplasma, sintetizza l'**antigenoma** (filamento a polarità -).

L'antigenoma verrà utilizzato come stampo per sintetizzare nuovi genomi virali (42S RNA).

Tra le proteine non strutturali vengono prodotti fattori che portano alla formazione di complessi polimerasici con specificità diverse per quanto riguarda l'inizio della trascrizione in grado di sintetizzare l'mRNA 26S  $\Rightarrow$  traduzione delle proteine strutturali



# ssRNA (+) viruses: Togaviridae

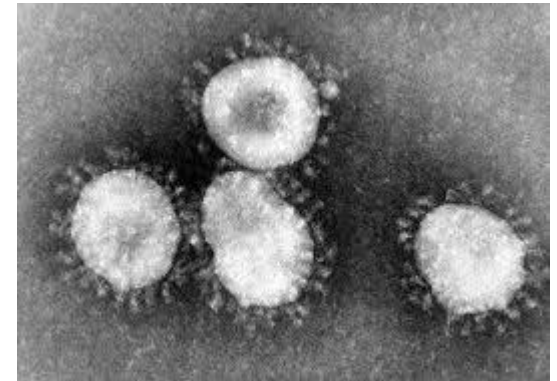
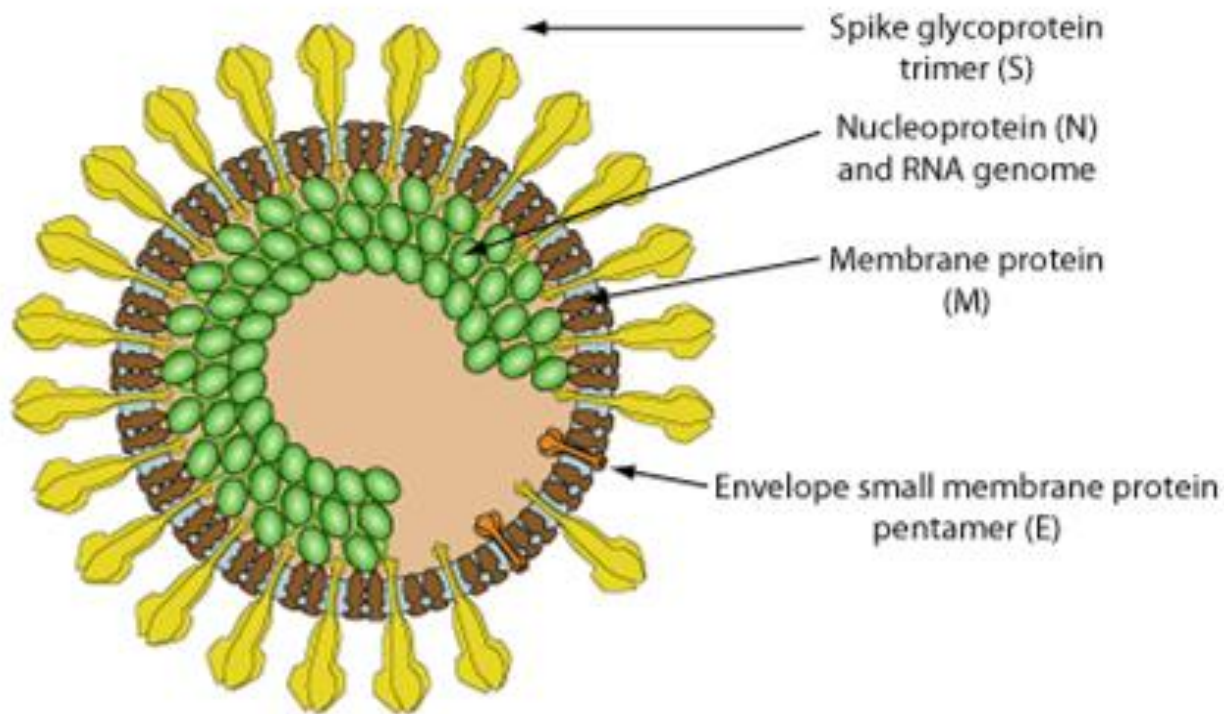


The virion RNA is infectious and serves as both genome and viral messenger RNA. The whole genome is translated into a non-structural polyprotein which is processed by host and viral proteases. RdRp is expressed by [suppression of termination](#) at the end of 10% of nsP polyproteins.

In late phase of infection, structural polyprotein is expressed through a [subgenomic mRNA](#). The mRNA contains a [Downstream Hairpin Loop](#) (DLP) to avoid the translation shutoff induced by the [host PKR](#) in the late phase of infection.

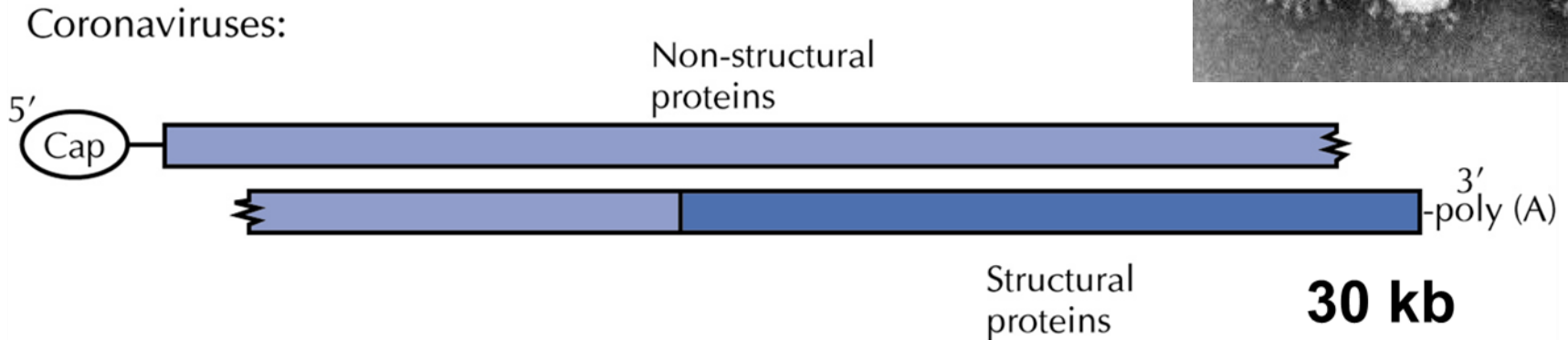
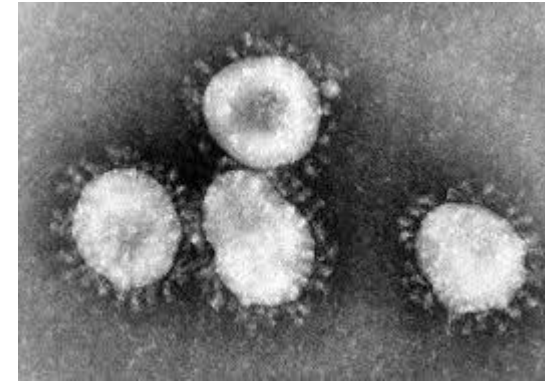
# ssRNA (+) viruses: Coronaviridae

## Coronavirus virion



Proteina S maggiore bersaglio di anticorpi neutralizzanti, responsabile del legame al recettore cellulare

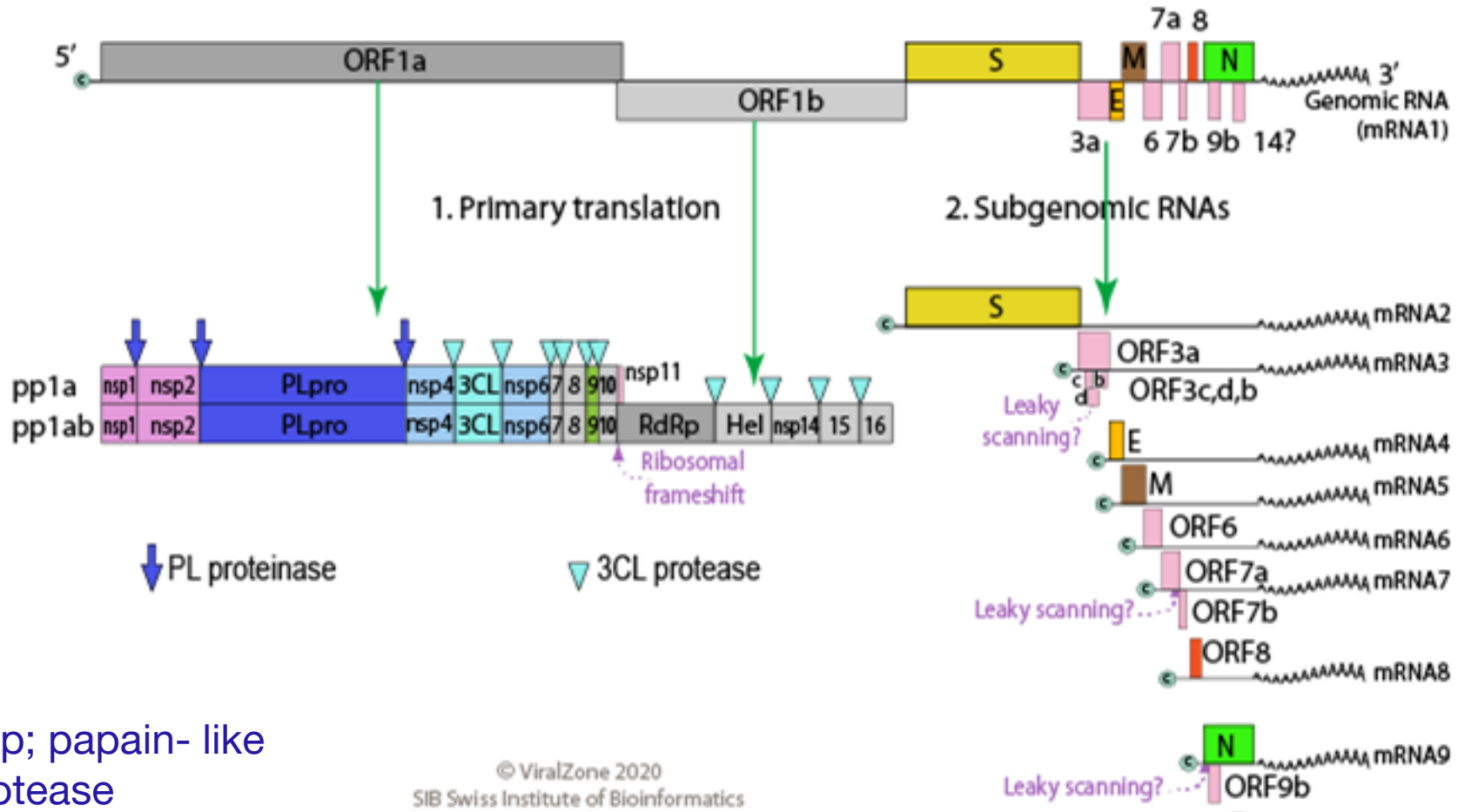
# ssRNA (+) viruses: Coronaviridae



La temporalità della produzione delle proteine virali è simile a quanto osservato per i Togaviridae.

Nei Coronaviridae è presente una lunga porzione al 5' che viene tradotta durante la traduzione primaria e che porta alla produzione di due poliproteine che verranno maturate dall'azione di due proteasi virali e formeranno fino a 16 proteine non strutturali

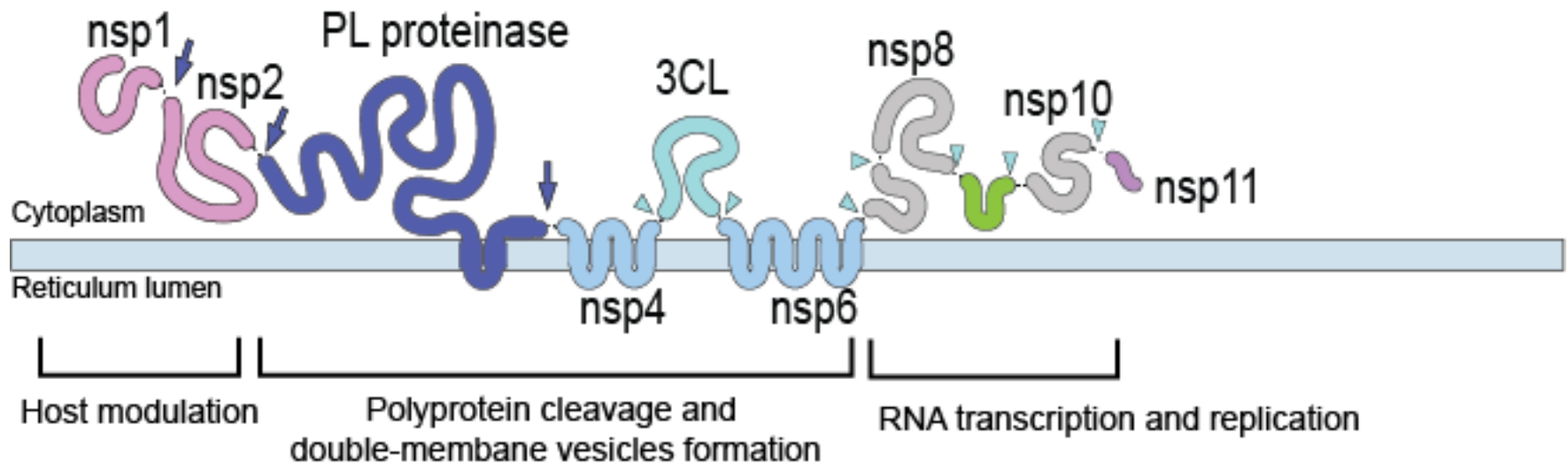
# SARS-CoV-2 genome



PLp; papain- like  
protease  
3CLp; chymotrypsin- like  
protease or Major (M<sup>pro</sup>) protease

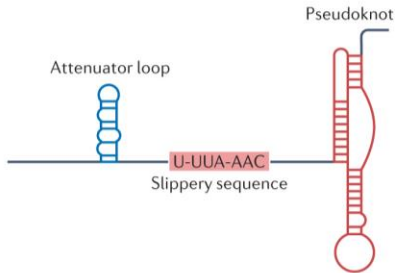
# Polyprotein product expression

## pp1a topology



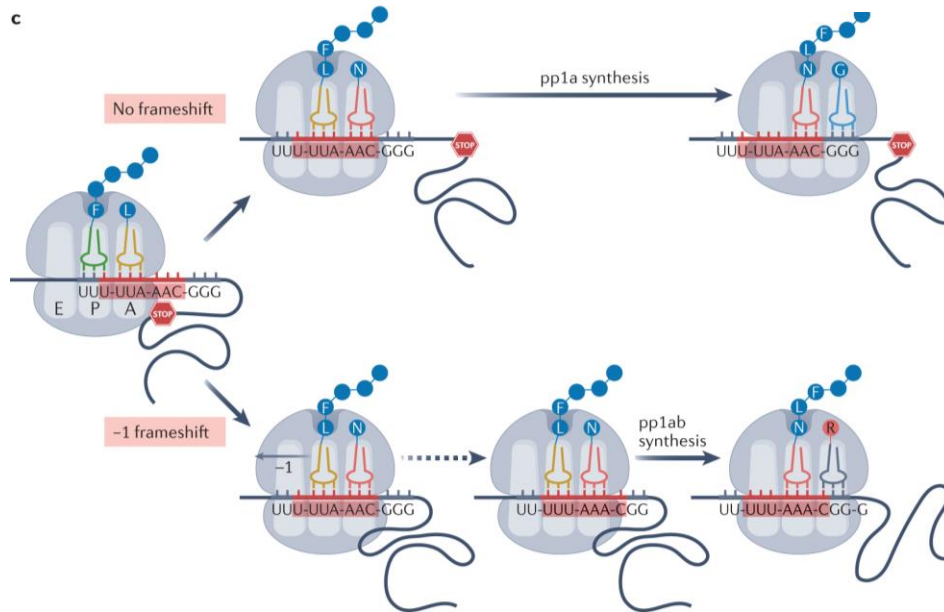
# Ribosomal frameshift

## b Programmed ribosomal frameshifting elements



An attenuating loop, a slippery sequence, and a pseudoknot promote ribosomal frameshifting

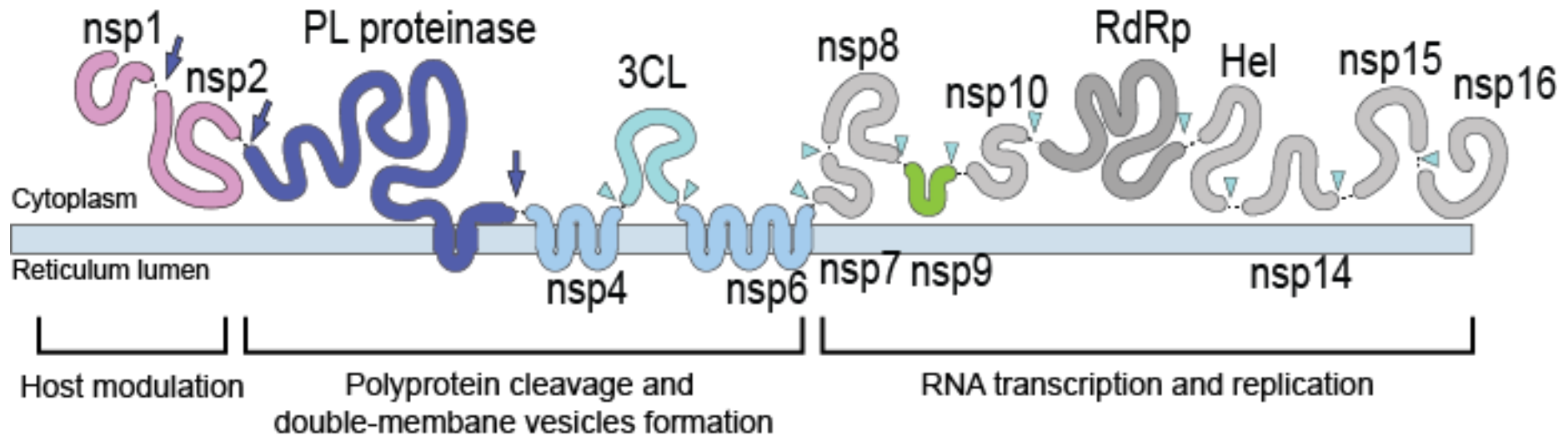
**b** | RNA motif and structures that promote a frameshift from ORF1a to ORF1b, thereby controlling the synthesis of pp1ab. The key programmed ribosomal frameshifting (PRF)-stimulating RNA structure — a **pseudoknot** — interacts with the ribosome and induces its **pausing**, which generates tension in the gRNA template. As a result, ribosomes can slip one nucleotide backwards on the '**slippery sequence**' (−1 PRF). An attenuating RNA loop located upstream of the slippery sequence also contributes to modulating PRF frequency.



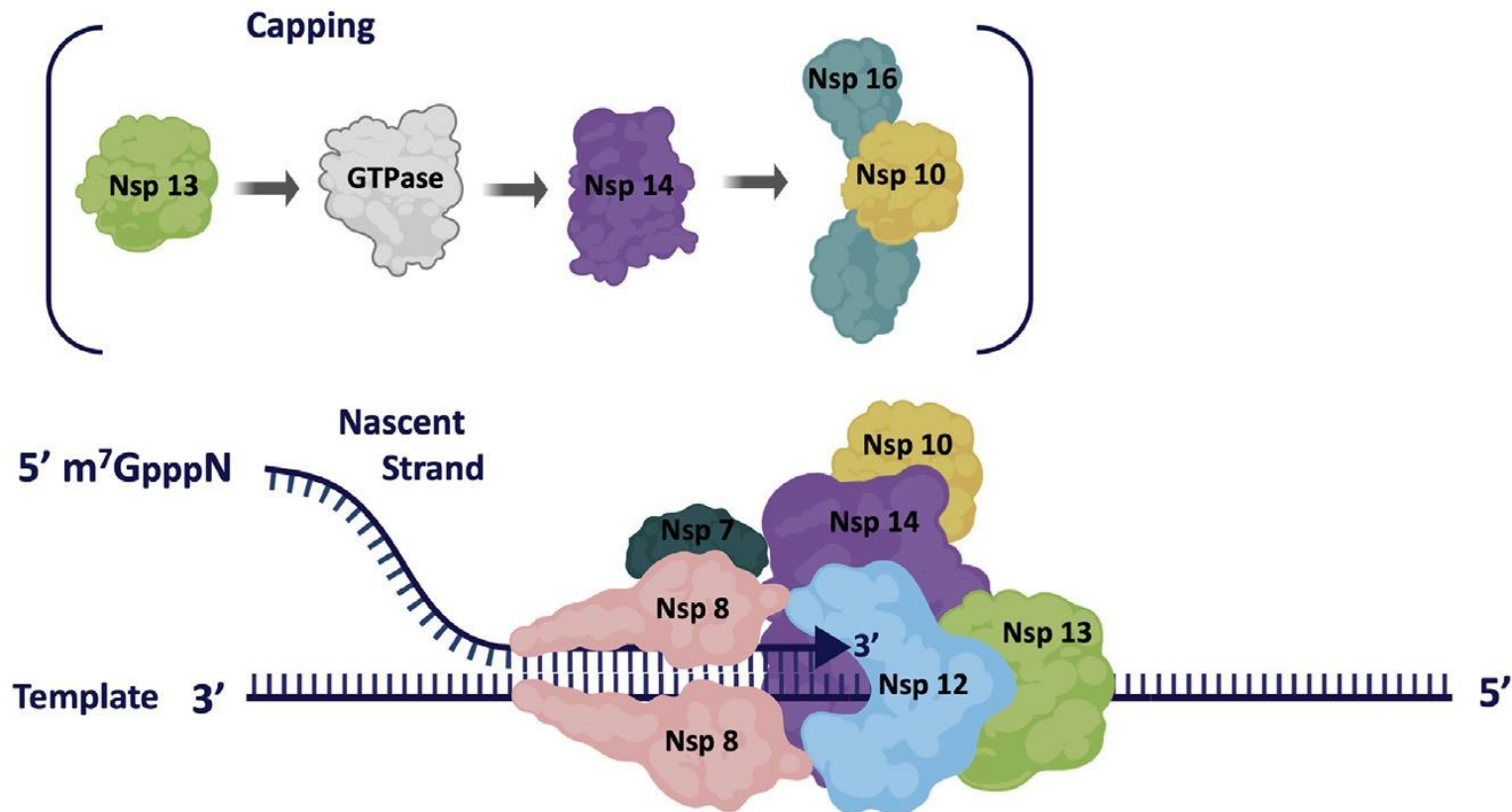
**c** | Model of −1 PRF at the ORF1a–ORF1b junction, showing the regulatory RNA elements inducing a simultaneous −1 shift of the tRNAs bound to the A and P sites of the ribosome, which can then translate ORF1b. The one-letter code for amino acids (circles) is used. A stop sign represents the ORF1a stop codon.

# Polyprotein product expression

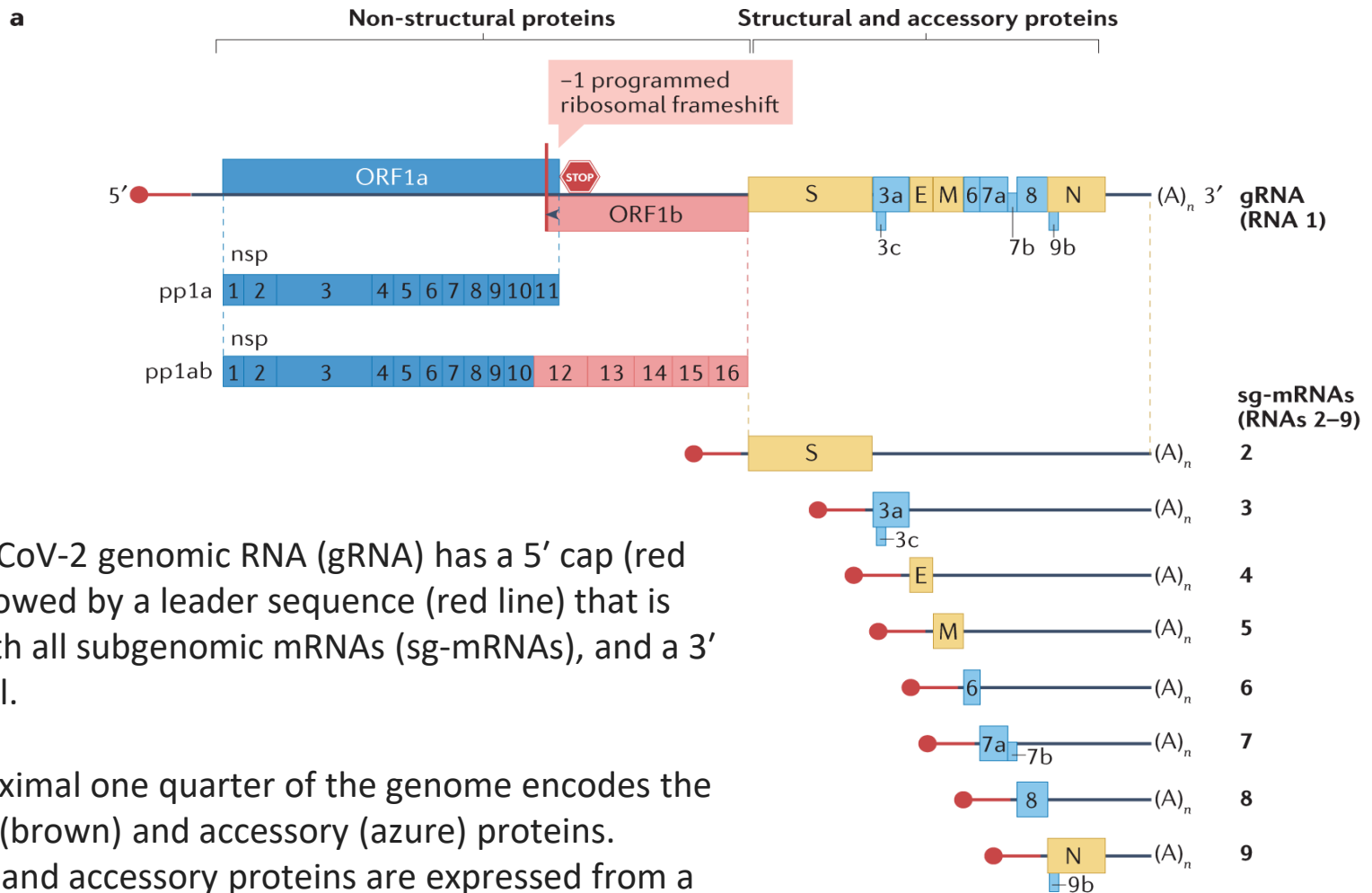
## pp1ab topology



**Model of the Core Replication and Proofreading Complex of SARS-CoV** Nsp12-RdRp replicates and transcribes the genome and sgRNAs. Nsp7/nsp8 proteins confer processivity to the polymerase. Nsp13 unwinds dsRNA ahead of the polymerase. Nsp14-ExoN complexed with its co-factor nsp10 proofreads the nascent RNA strand and excises misincorporated nucleotides. Nsp13, an unknown GTPase, Nsp14- N7-methyltransferase, and the Nsp16-20-O-methyltransferase/Nsp10 complex are involved in the capping mechanism.



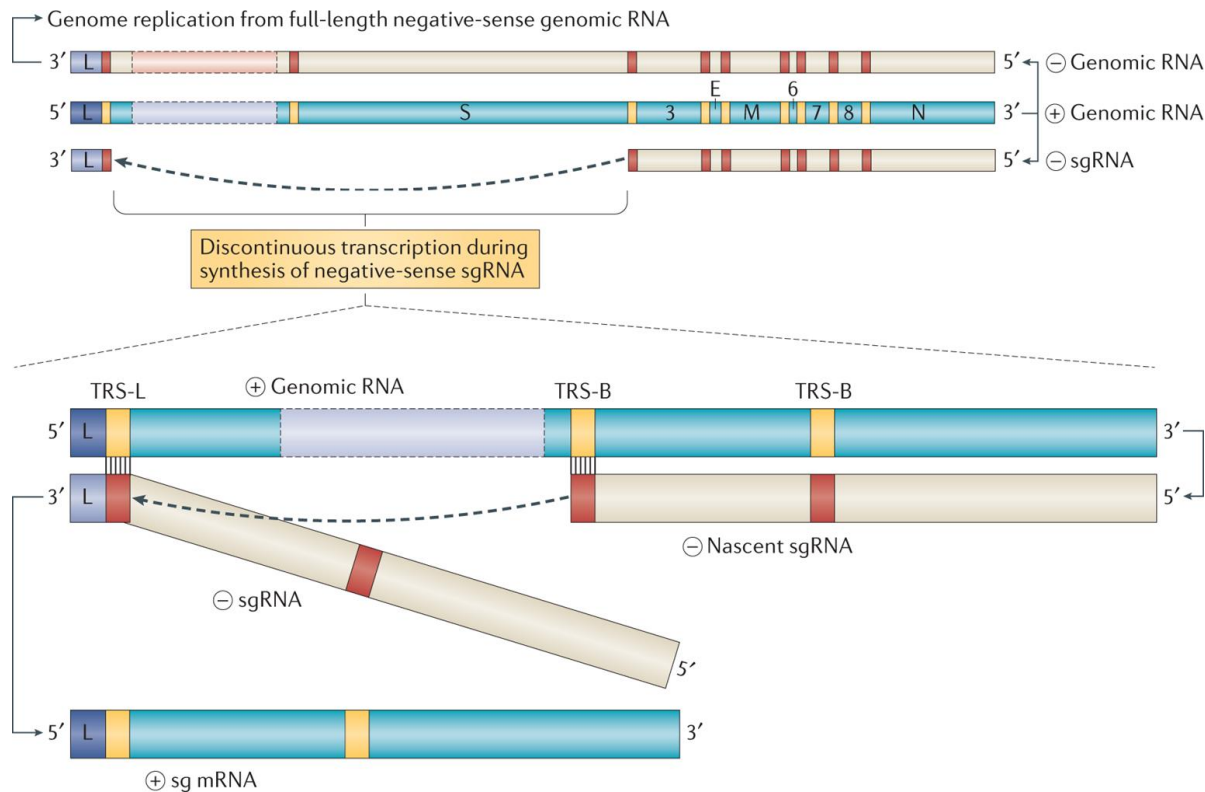
# Subgenomic mRNAs



The SARS-CoV-2 genomic RNA (gRNA) has a 5' cap (red circle) followed by a leader sequence (red line) that is shared with all subgenomic mRNAs (sg-mRNAs), and a 3' poly(A) tail.

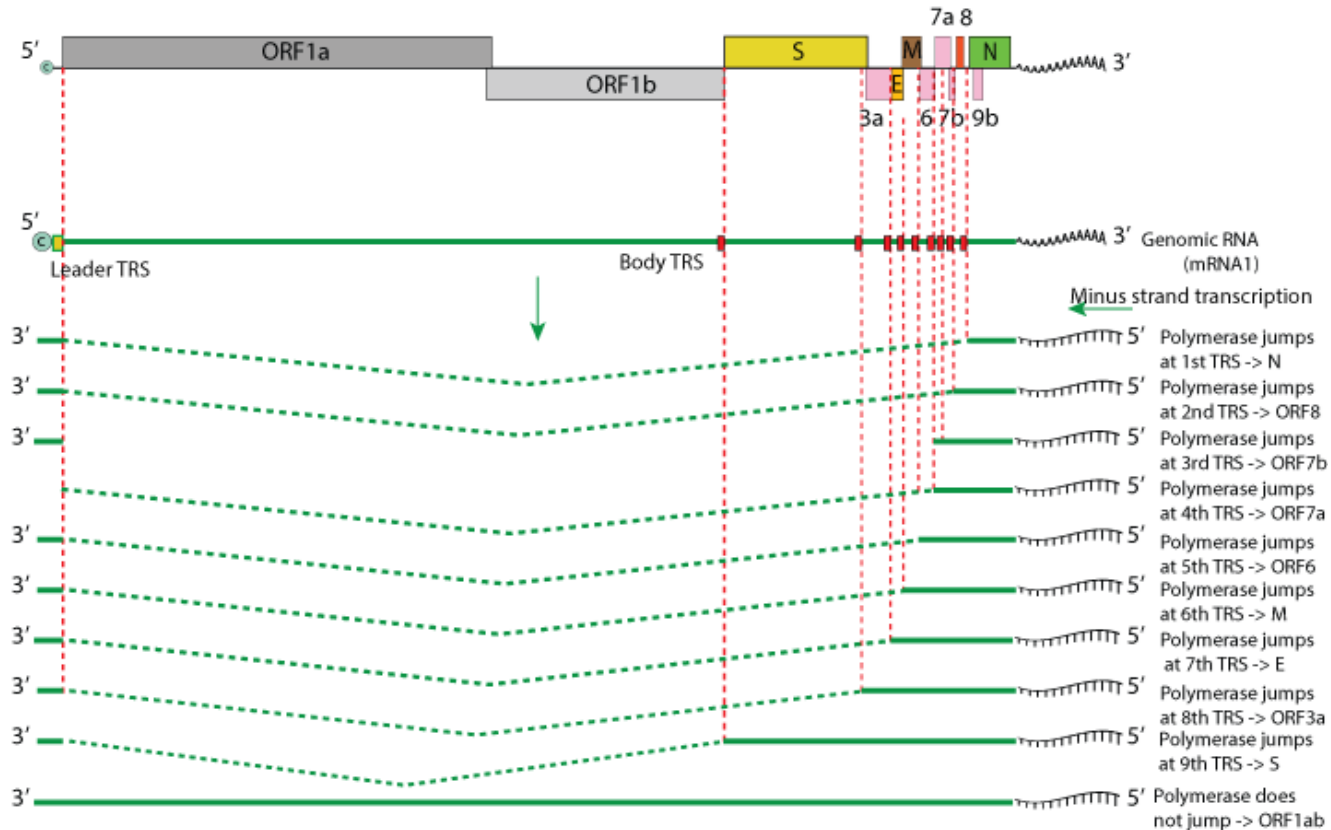
The 3'-proximal one quarter of the genome encodes the structural (brown) and accessory (azure) proteins. Structural and accessory proteins are expressed from a nested set of sg-mRNAs, with *ORF3c*, *ORF7b* and *ORF9b* being expressed via ribosomal 'leaky scanning'.

# Coronavirus discontinuous transcription.



Full-length +genomic RNA is used as a template to produce both full-length negative-sense copies for genome replication and subgenomic negative-sense RNAs (–sgRNA) to produce the subgenomic mRNAs (sg mRNA). The negative strand RNA synthesis involving a template switch from a body transcription regulatory sequence (TRS-B) to the leader TRS (TRS-L) is illustrated to produce one sg mRNA. This process can take place at any TRS-B and will collectively result in the production of the characteristic nested set of coronaviral mRNAs.

## Discontinuous transcription



Subgenomic RNAs (sgRNAs) are created by discontinuous transcription. During transcription of minus strand RNA, the polymerase have chances to pause on **transcription-regulating sequences (TRS)** and jump to leader TRS, thereby creating a major deletion. This creates a set of 9 (-)RNAs that are subsequently replicated and translated. sgRNAs allow translation of all the structural proteins. The figure illustrate the discontinuous transcription leading into 10 different RNAs. Only mRNA1 is encapsided and assembled in virions.

# Coronavirus subgenomic mRNA products

Subgenomic mRNA are translated into four structural proteins: S, E, M and nucleocapsid (N) proteins and accessory proteins.

**S** (spike glycoprotein) is responsible for host cell receptor recognition and binding, and for fusion of virion envelope with endosomal membrane

**E** proteins are small integral membrane proteins with roles in virus morphogenesis, assembly and budding. In the absence of E proteins, virus release is inhibited completely or partially. The E protein also possesses ion channel activity, which is required for optimal virus replication.

**M** protein is the most abundant protein in the coronavirus virion. It is a multipass transmembrane protein. Homotypic interaction between M protein provides the scaffold for virion assembly, while heterotypic interaction recruits other structural protein and genomic RNA to the assembly site.

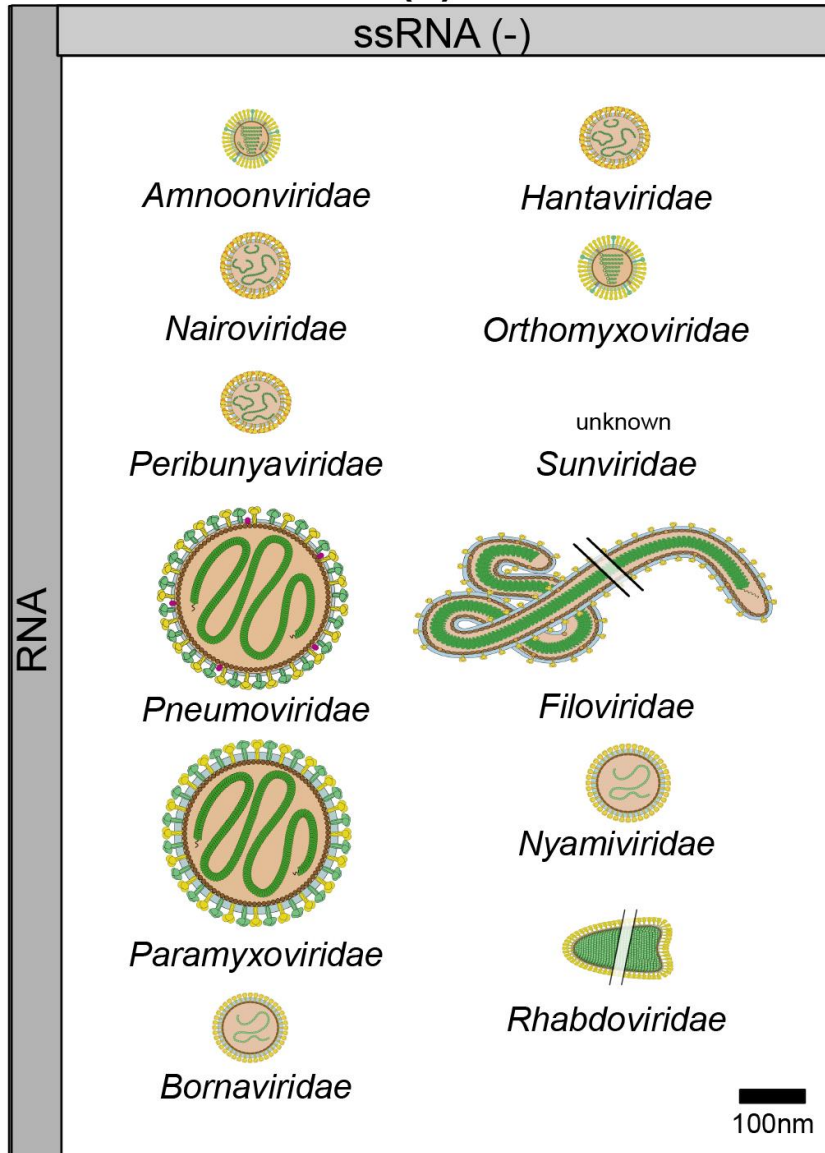
**N** protein is important for encapsidation of viral RNA and acts as an interferon (IFN) antagonist.



# Classe V di Baltimore: ssRNA (-)

- 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
- I virioni sono rivestiti (envelope) e il capsido ha simmetria elicoidale

## Viruses infecting vertebrates (3)



## ssRNA (-) viruses

Paramyxoviridae (parotite, morbillo, Nipah, hendra)

Rhabdoviridae (VSV, rabbia)

Orthomyxoviridae (Influenza)

Filoviridae (Ebola, Marburg)

Hantaviridae

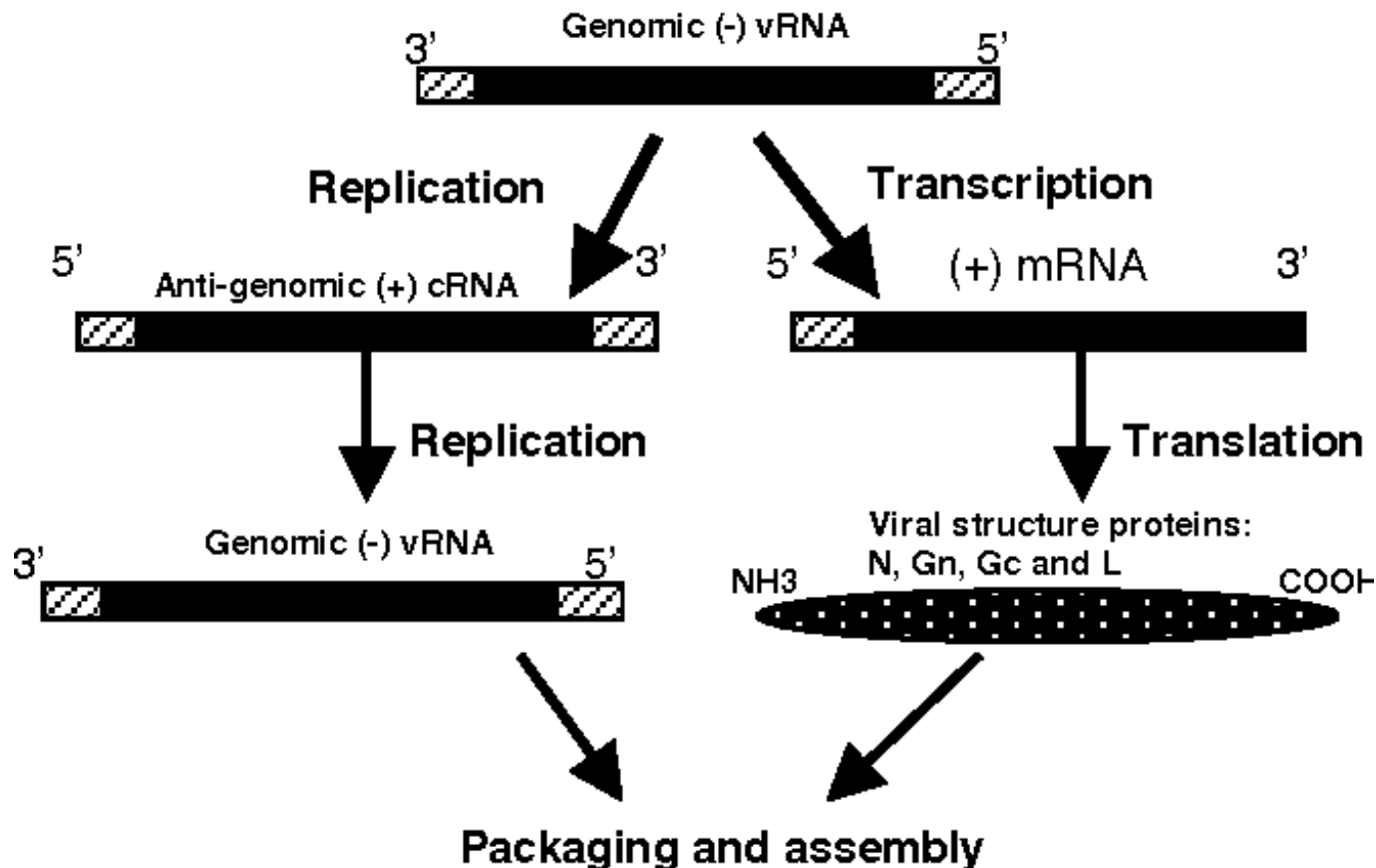
Pneumoviridae (RSV, Metapneumovirus)

Arenaviridae (LCMV, Lassa)

Peribunyaviridae (Oropouche)

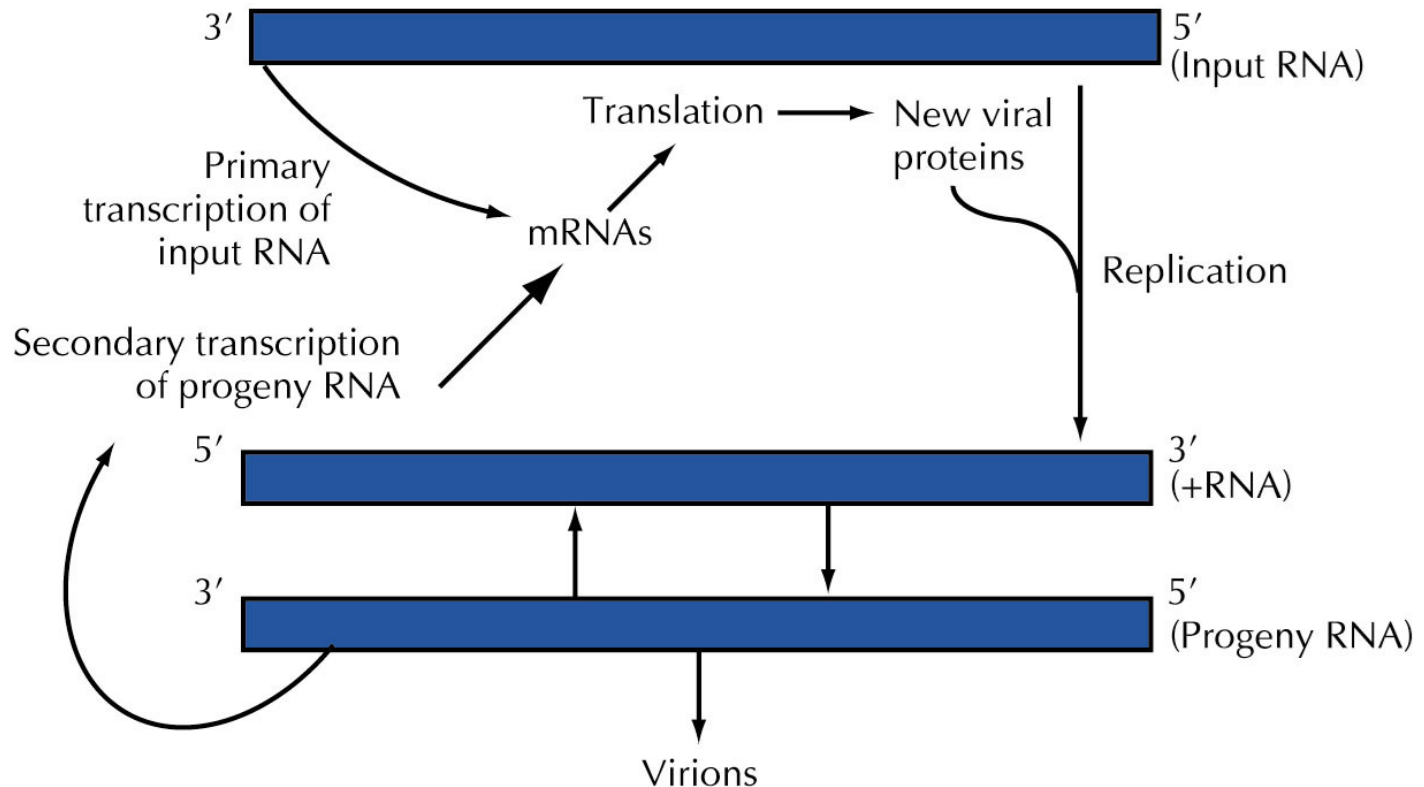
Phenuiviridae (Toscana virus)

# ssRNA (-) viruses



Trascrizione e replicazione due processi separati

# ssRNA (-) viruses



## Regolazione temporale:

il passaggio dalla fase trascrizionale a quella di replicazione viene regolato dalla concentrazione delle proteine strutturali tradotte

RdRp=Trascrittasi e Replicasi

# ssRNA (-): Rhabdoviridae (VSV)

I Rhabdovirus sono virus con envelope a forma di proiettile

Virus della stomatite vescicolare o VSV determina infezione in bovini ed equidi con conseguenze sanitarie ed economiche

VSV funge da modello paradigmatico della strategia replicativa dei virus non segmentati della V classe di Baltimore

Alla stessa famiglia appartiene il virus della rabbia (genere *Lyssavirus*)

## 5 geni:

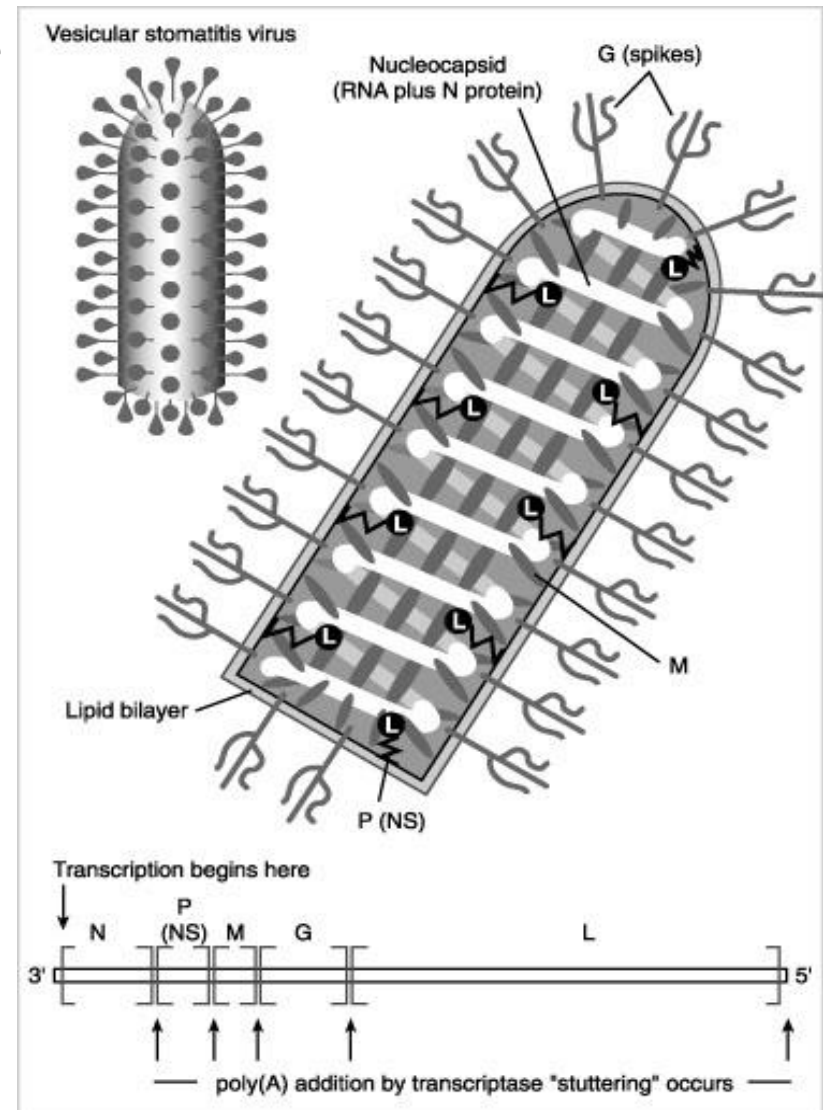
**N** nucleoproteina N che riveste l'RNA virale,

**P** fosfoproteina componente della polimerasi

**M** proteina di matrice

**G** glicoproteina che lega i recettori cellulari

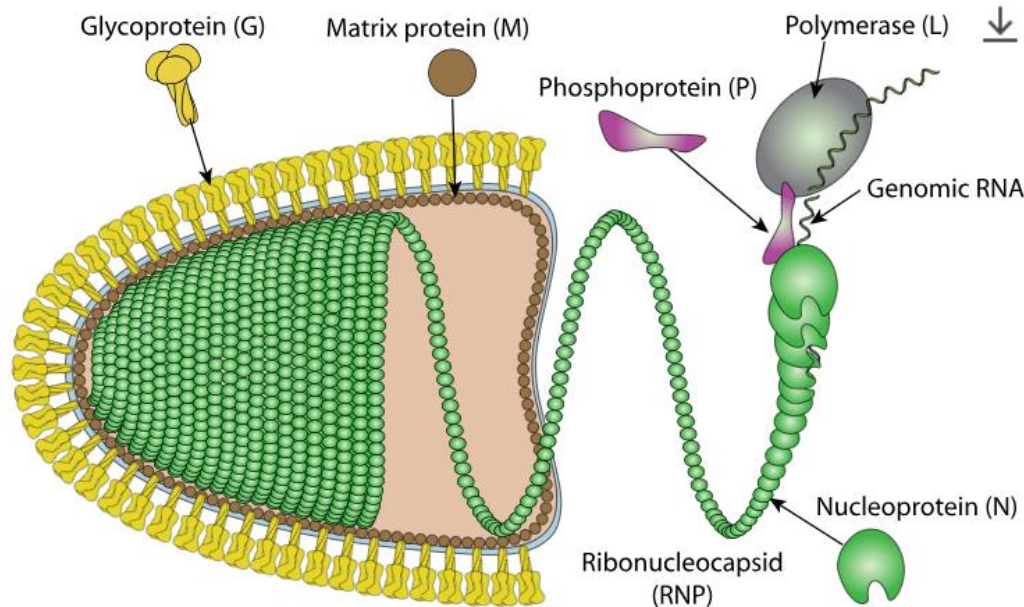
**L** polimerasi.



dal gr. ῥάβδος «bastoncino, bacchetta»

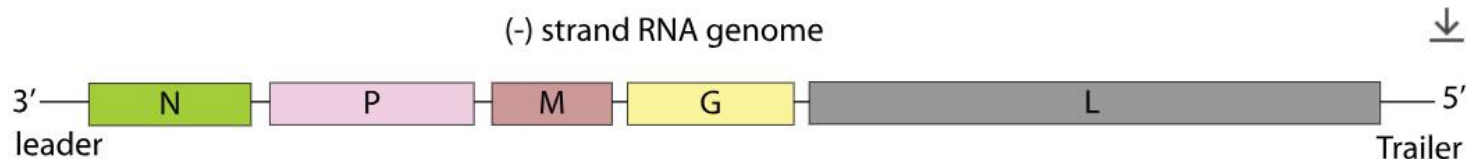
# ssRNA (-): Rhabdoviridae (VSV)

## VIRION



Enveloped, bullet shaped. 180 nm long and 75 nm wide. Certain plant rhabdoviruses are bacilliform in shape and almost twice the length.

## GENOME



Negative-stranded RNA linear genome, about 11-15 kb in size. Varicosavirus genomes consists in two segments. Encodes for 5 to six proteins.

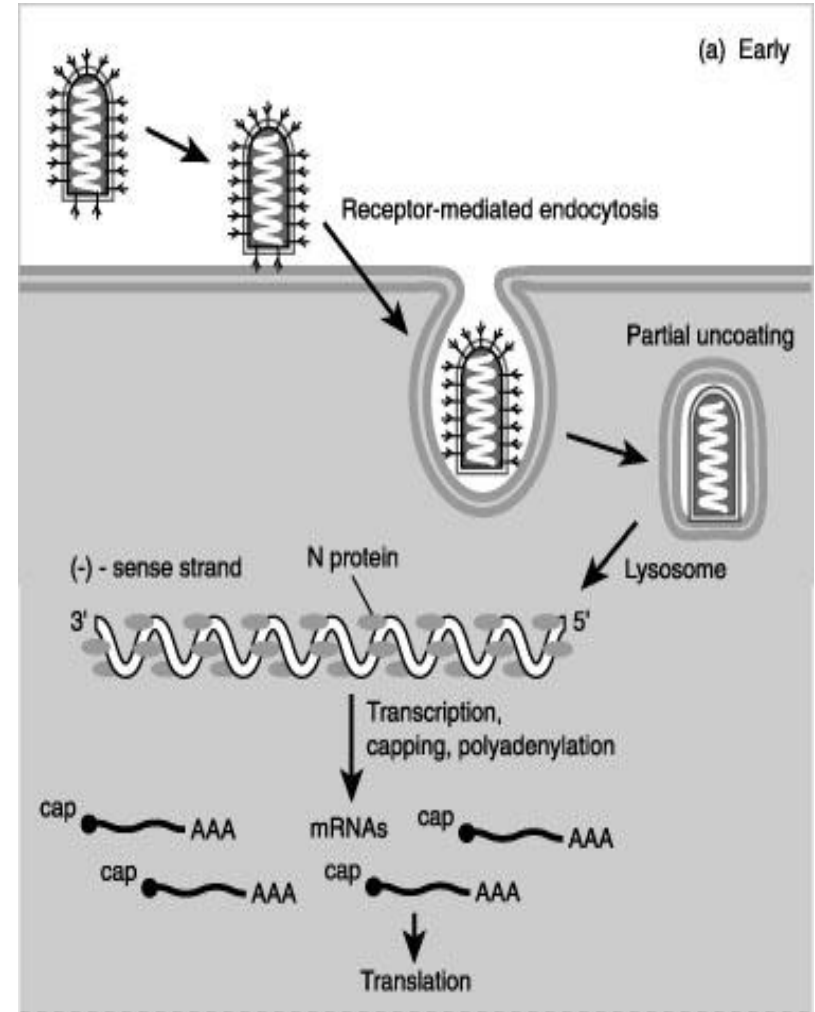
# Fase precoce



La fase precoce è caratterizzata da attiva trascrizione.

Il complesso trascrizionale è la ribonucleoproteina (RNP) costituita da vRNA associato a molte molecole di N, alcune di P e poche di L

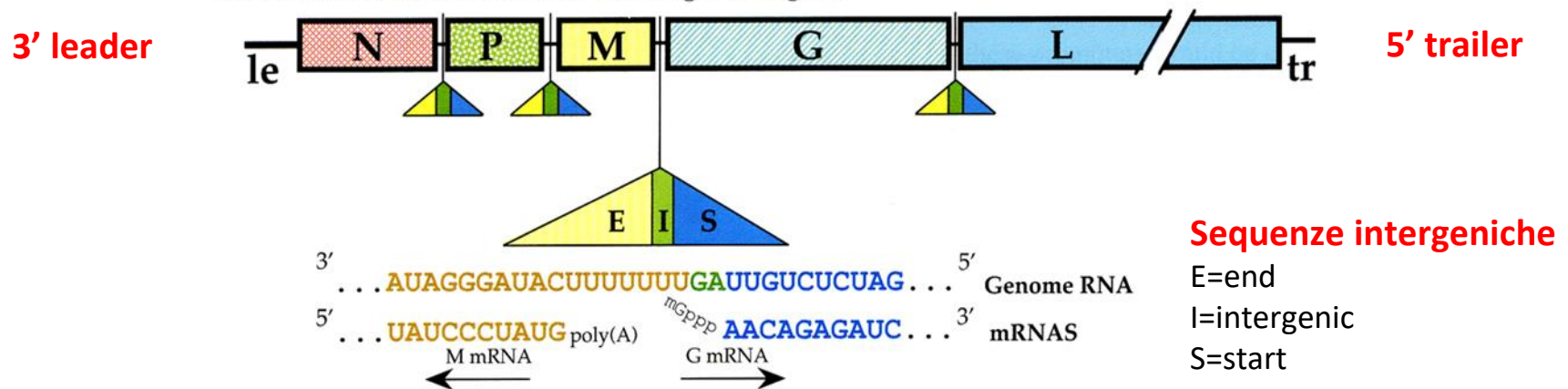
L ha attività di sintesi di RNA e di capping



# ssRNA (-): Rhabdoviridae (VSV)

## Organizzazione del genoma

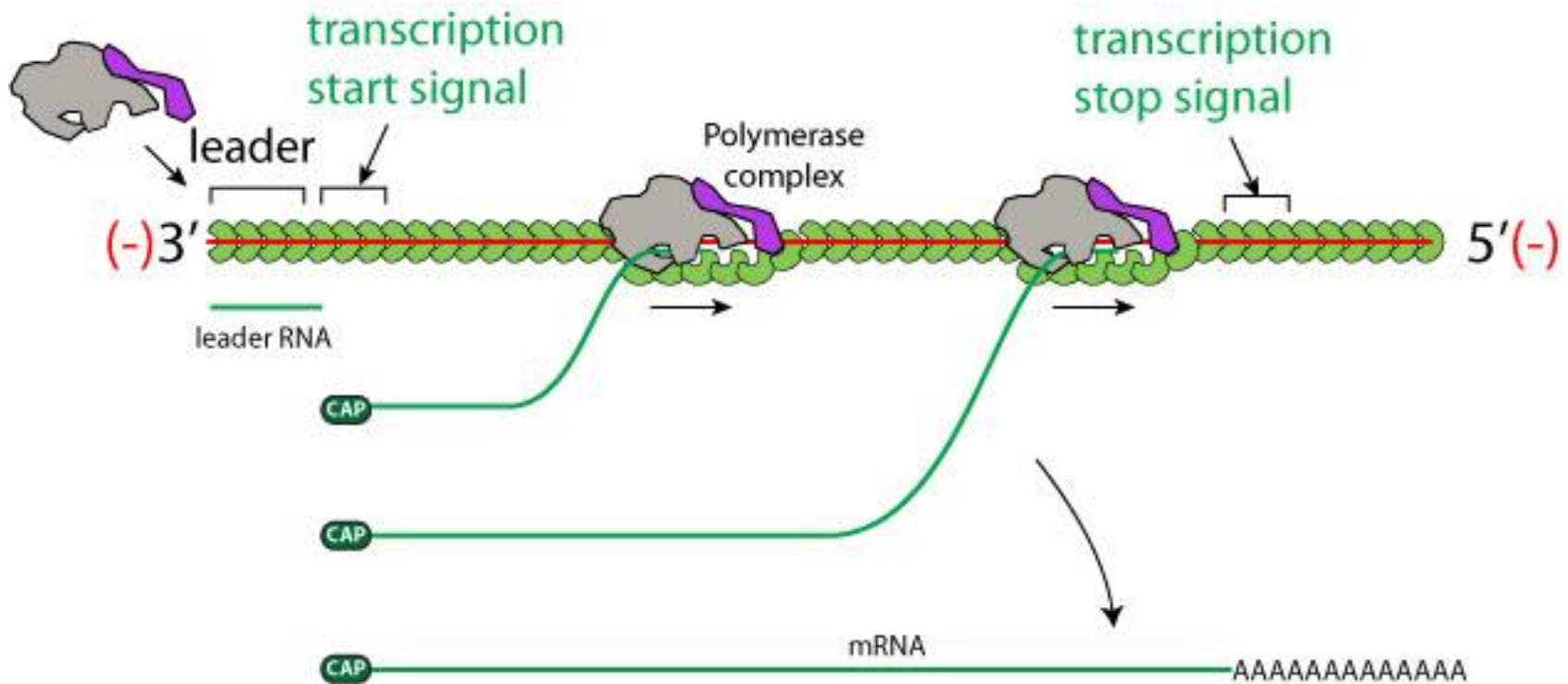
A. Location of intergenic sequences of VSV (a rhabdovirus), and detailed view of the M/G intergenic region



Presenti brevi sequenze non codificanti importanti per la regolazione al 3', 5' e quattro intergeniche

La Trascrizione avviene con un meccanismo stop and start regolato dalle sequenze intergeniche che hanno segnale di fine e inizio della trascrizione

# ssRNA (-): Rhabdoviridae (VSV)

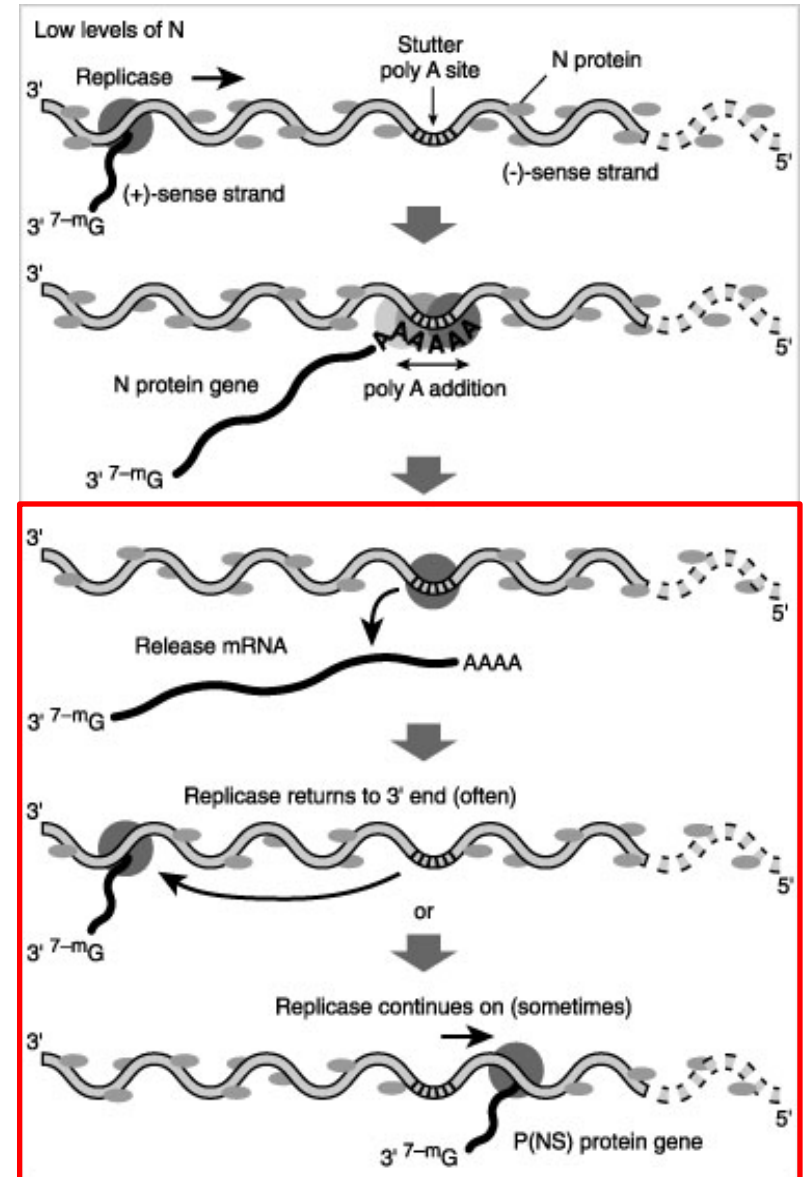


Il complesso trascrizionale si lega alla sequenza leader al 3' del genoma e produce un 5' triphosphate-leader RNA (di 49nt nel VSV) la cui funzione non è nota e che non ha cap. la polimerasi poi si ferma e ricomincia la trascrizione al segnale di inizio del gene N. L'RNA da qui prodotto avrà un cap

# ssRNA (-): Rhabdoviridae (VSV)

La trascrizione 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.

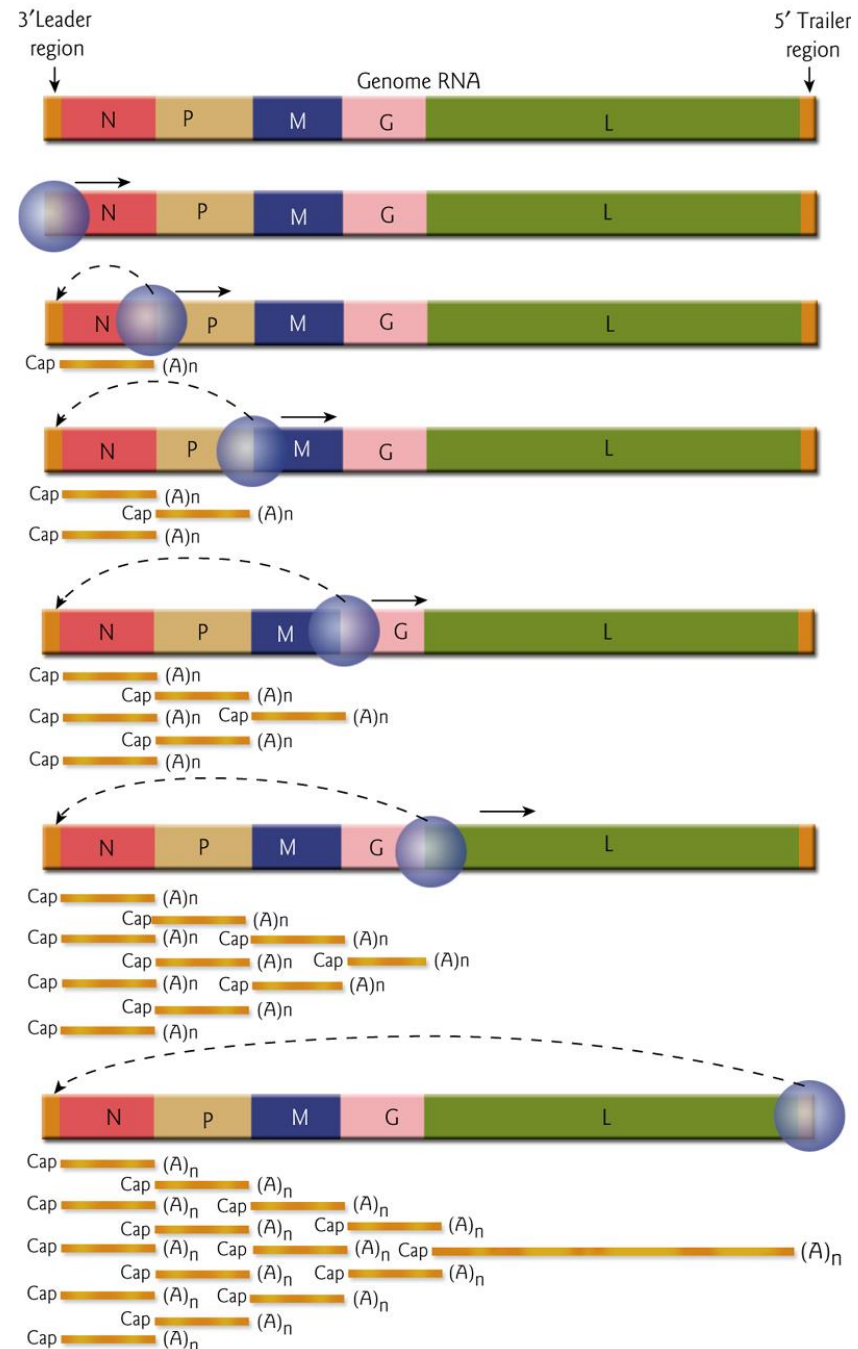
La polimerasi non è in grado di legare direttamente le sequenze intergeniche o continua dal gene N o si dissocia e ricomincia dal 3'



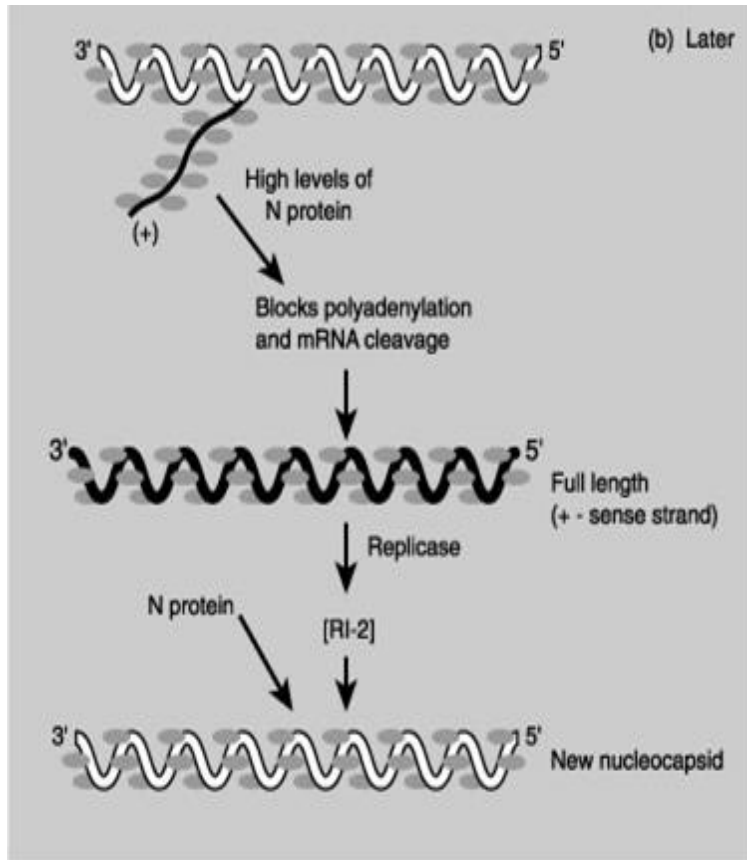
# ssRNA (-): Rhabdoviridae (VSV)

A causa della maggiore affinità della trascrittasi per la sequenza leader al 3' del genoma, le probabilità di ricominciare a trascrivere dal gene N sono maggiori rispetto a quelle di continuare sullo stampo e trascrivere il gene successivo. Si crea così un gradiente di concentrazione proteica

$N > P > M > G > L$



# Shift da trascrizione a replicazione

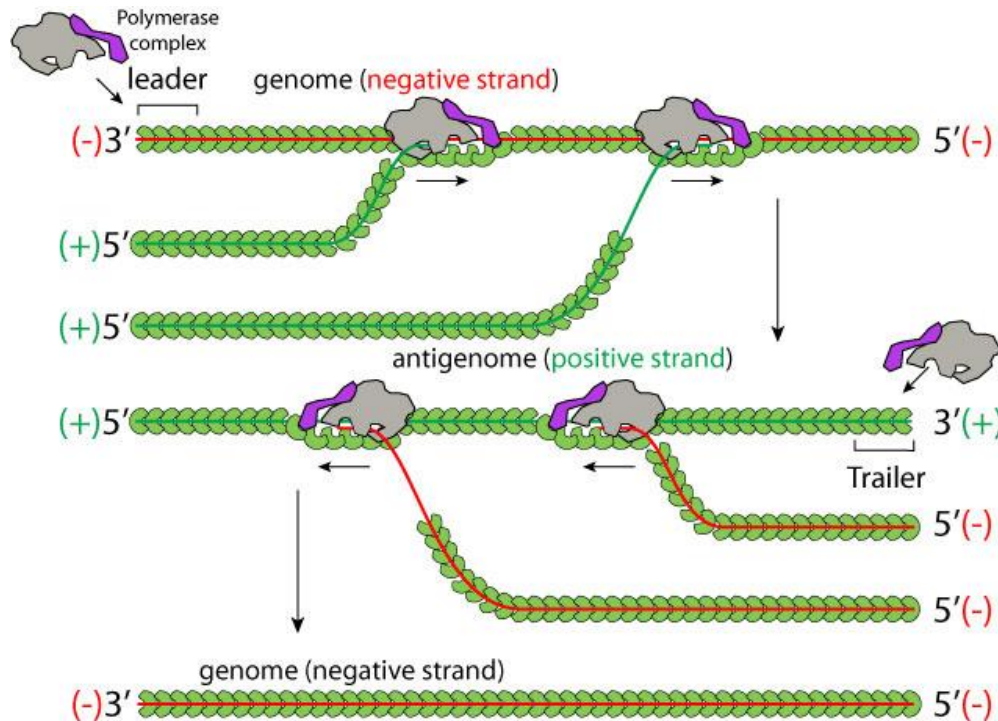


Si pensa che l'accumulo delle diverse proteine possa regolare la transizione dalla fase trascrizionale a quella replicativa.

## 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

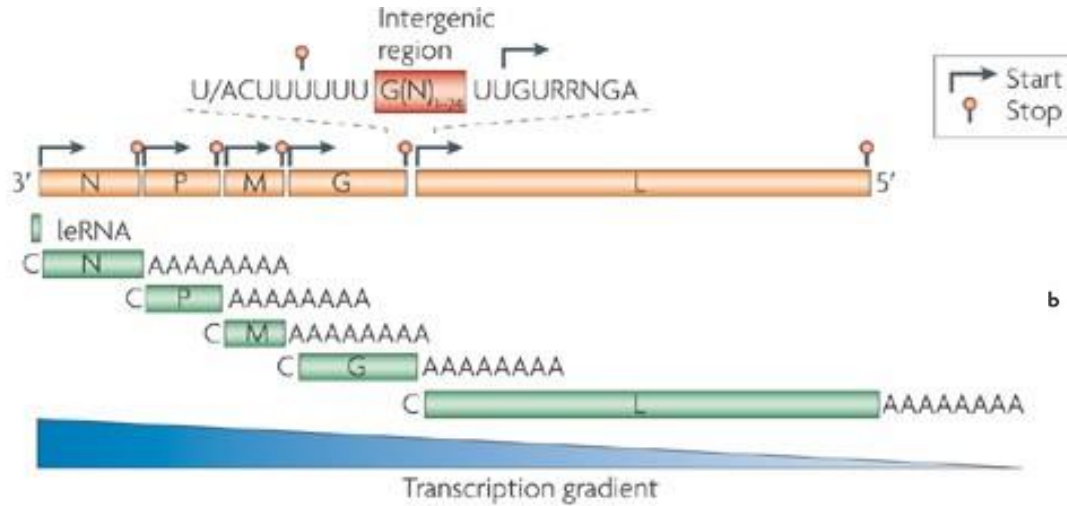


The RNA dependent RNA polymerase complex binds to the leader sequence on the RNA genome, and starts replication. The antigenome is concomitantly encapsidated during replication. The RNA dependent RNA polymerase complex ignores all transcription signals when in replication mode. The antigenome is then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

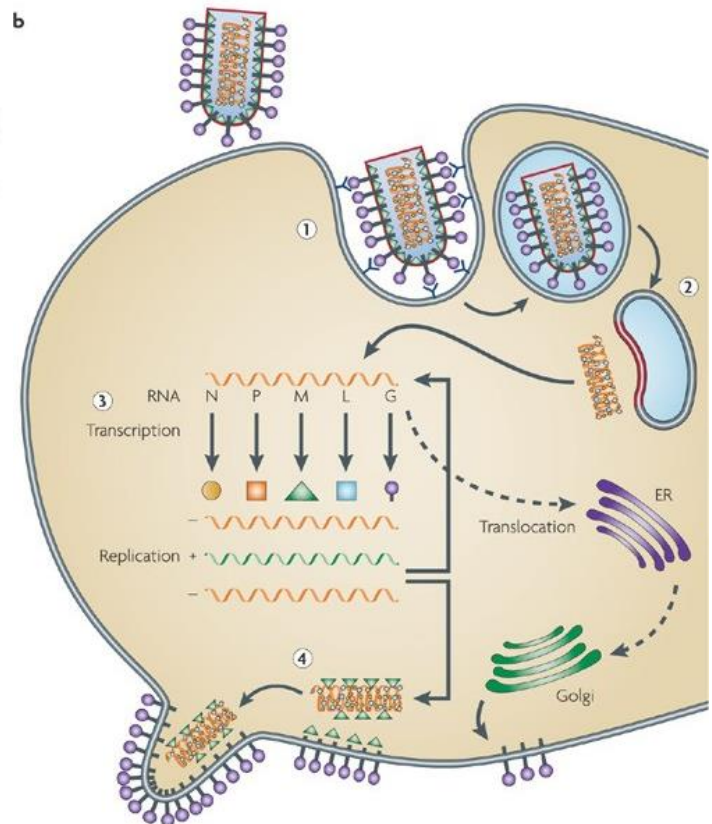
The viral RdRP complex is presumably the same for replication and transcription. It may be a transcriptase by default and turn into the replicase mode depending on nucleocapsid concentration. The genome/antigenome ratio is about 10 for many viruses. Presumably the trailer sequence is a stronger replication promoter than the leader sequence.

# Rhabdoviridae









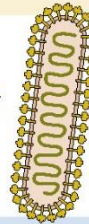
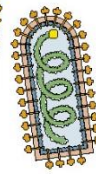

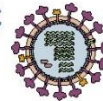
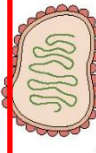
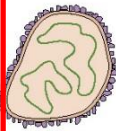
a



b



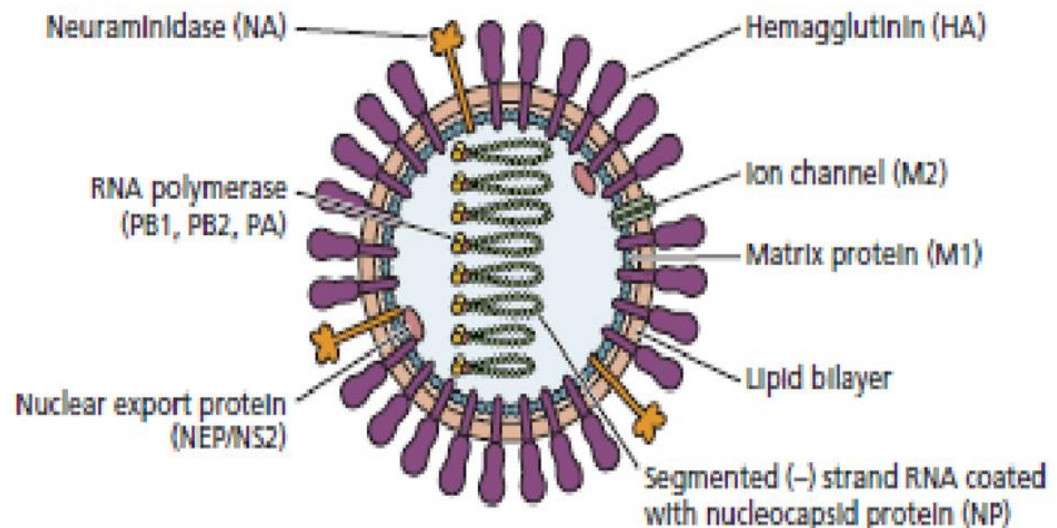
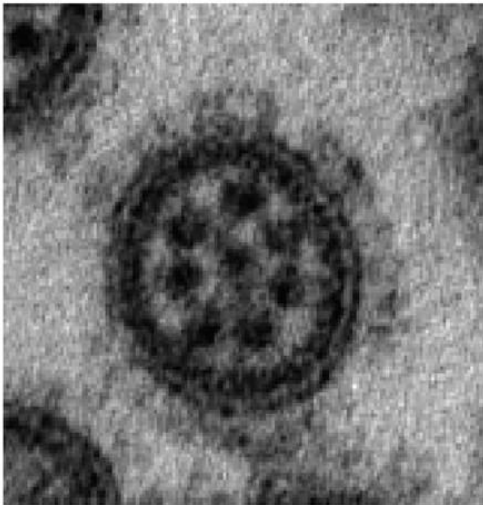
# Segmented ssRNA (-)

Classification criteria	RNA														
	Icosahedral							Helical							
	Naked				Enveloped			Enveloped							
	ds 10–18 seg.	ds 2 seg.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss 2 copies	(+) ss cont.	(–) ss cont.	(–) ss cont.	(–) ss 3 seg.	(–) ss 8 seg.	(–) ss cont.	(–) ss 2 seg.	
	III	III	IV	IV	IV	IV	VI	IV	V	V	V	V	V	V	
             															
Properties	Family name	Reo	Birna	Calici	Picorna	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Orthomyxo	Paramyxo	Arena
	Virion polymerase	(+)	(+)	(–)	(–)	(–)	(–)	(+)	(–)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Virion diameter (nm)	60–80	60	35–40	28–30	40–50	60–70	80–130	80–160	80 x 790–14,000	70–85 x 130–380	90–120	90–120	150–300	50–300
	Genome size (total in kb)	22–27	7	8	7.2–8.4	10	12	3.5–9	16–21	12.7	13–16	13.5–21	13.6	16–20	10–14

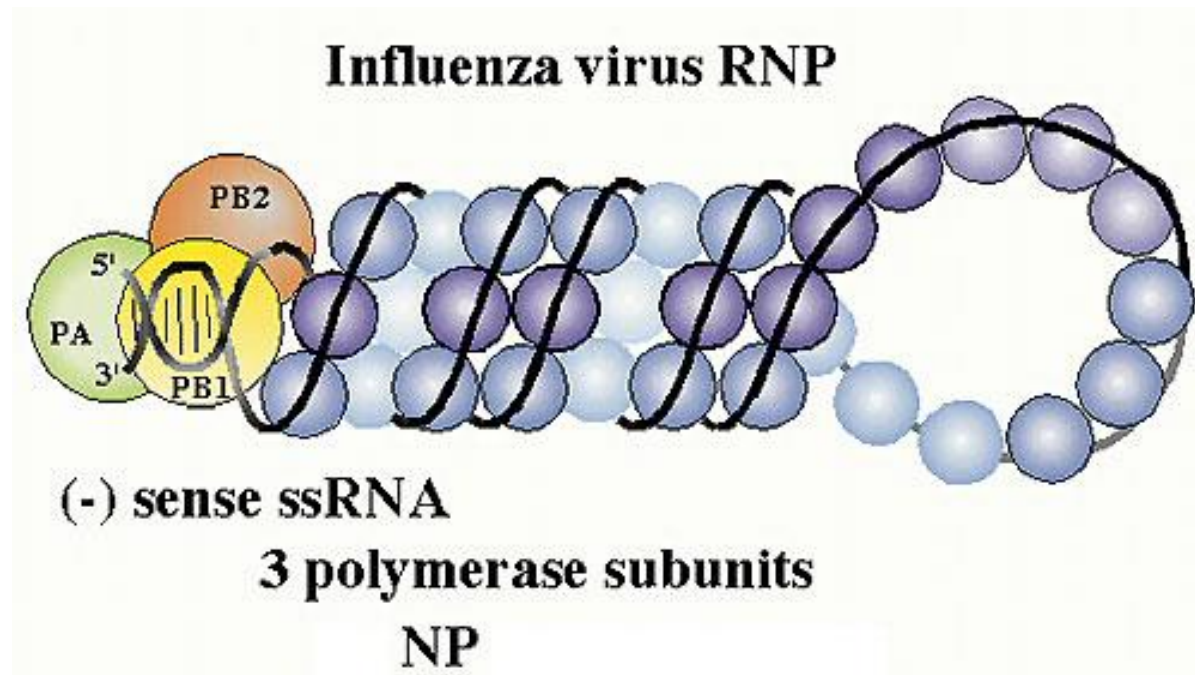
# Segmented ssRNA(-): Orthomyxoviridae virus dell' Influenza A (IAV)

Influenza A presenta 8 segmenti genomici ognuno ricoperto dalla nucleoproteina con simmetria del capside elicoidale, I segmenti 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



# Genome ssRNA (-) 8 SEGMENTS



**v-RNP:** RNA + nucleoprotein (**NP**). The components of the **RNA-dependent RNA polymerase complex (PB1, PB2 and PA)** associates to each segment

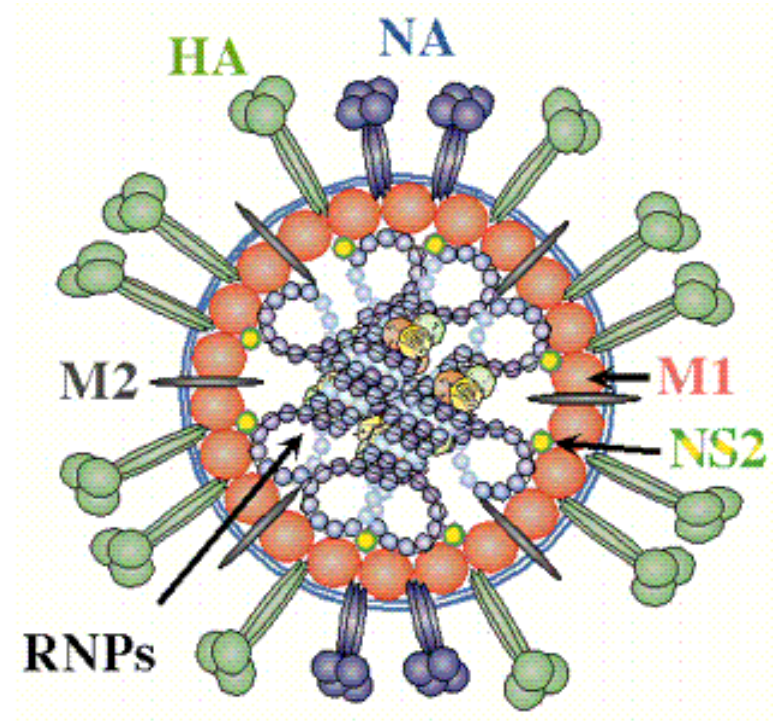
# Structure and components

The outer layer of the lipid envelope is spiked with multiple copies of **Hemagglutinin (HA)** trimers and **Neuraminidase (NA)** tetramers.

A small number of **M2** proteins forms the ion channels across the envelope

The **M1** (**Matrix protein**) molecules keep **vRNPs** attached to the inner layer

**NS2**, nuclear export protein (NEP)



Segment	Size (nt)	Protein	Function
1	2341	PB2	Cap-binding (transcription)
2	2341	PB1 PB1-F2 N40	RNA-dependent RNA polymerase (transcription and replication) Apoptosis, inflammation, enhances polymerase activity Unknown
3	2233	PA PA-X	Endonuclease Shutoff of host protein expression at late stage of infection
4	1778	HA	Hemagglutinin, receptor binding, fusion
5	1565	NP	Nucleoprotein, cytoplasm-nucleus translocation of v-RNP
6	1413	NA	Neuraminidase: virion release (main)
7	1027	M1 e M2	M1= matrix M2= ion channel
8	890	NS1 e NS2	NS1 = host function interference, absent inside the virion NS2 or NEP = v-RNP nuclear export



# Replicano nel nucleo!

# Replicano nel nucleo!

Dopo l'uncoating il virus viene trasportato al nucleo dove avviene la sintesi degli mRNA.

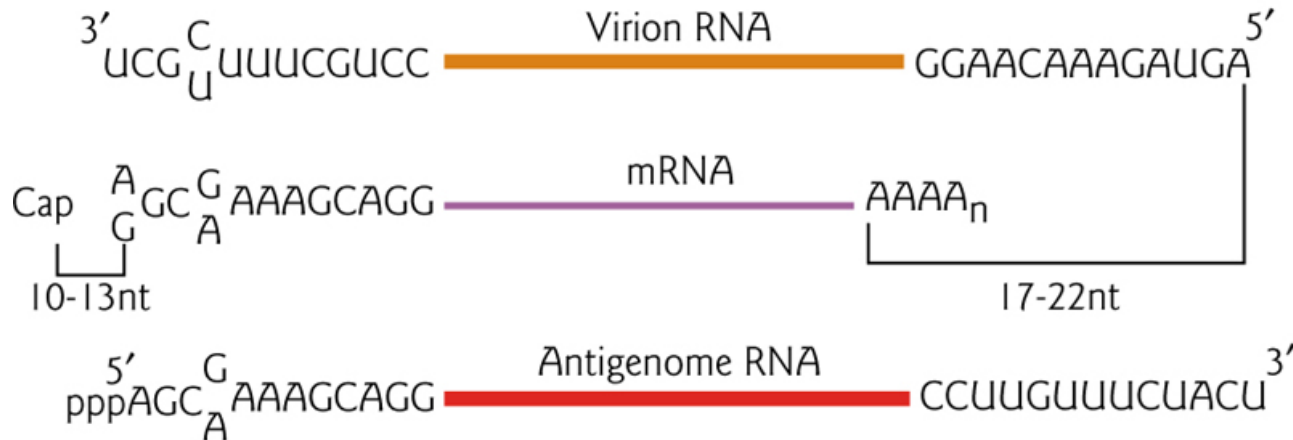
Gli mRNA vengono poi portati al citoplasma per essere tradotti, nelle fasi successive alcune delle proteine vengono trasportate nel nucleo

Questi virus hanno bisogno di funzioni enzimatiche cellulari che sono presenti nel nucleo

Due processi importanti per la loro espressione genica li rendono dipendenti dalla localizzazione nucleare: l'inizio della trascrizione e lo splicing

# Segmented ssRNA (-): virus influenza A

Specie di RNA presenti nella cellula infettata



Nella cellula infettata si riconoscono 3 tipi di RNA per ogni segmento: il genoma, l'mRNA (più breve) e l'antigenoma.

Ogni segmento contiene 12 nt al 3' con il segnale di inizio della trascrizione e 13 nt al 5'

# Segmented ssRNA (-): virus influenza A

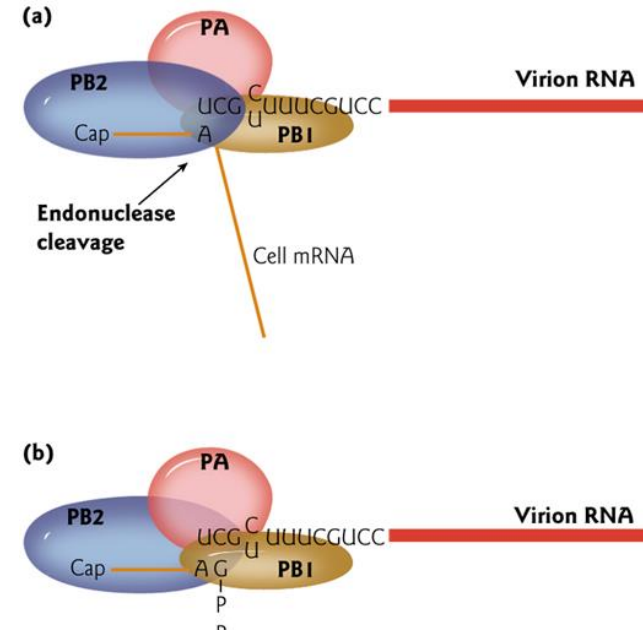
## Trascrizione

Il complesso della polimerasi trascrive in maniera primer dipendente e non presenta attività di capping o metilazione

L'inizio della trascrizione avviene tramite **Cap-snatching**: i) il complesso della polimerasi con il vRNA associato lega tramite PB2 il 5'cap di un mRNA cellulare; ii) la PA taglia a 10-13nt dal cap; iii) il segmento tagliato viene utilizzato come primer e fornisce il cap agli mRNA virali nascenti

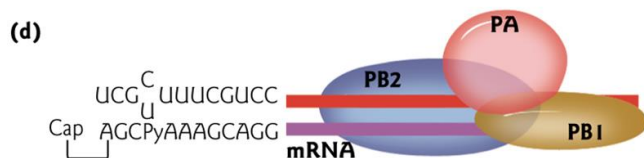
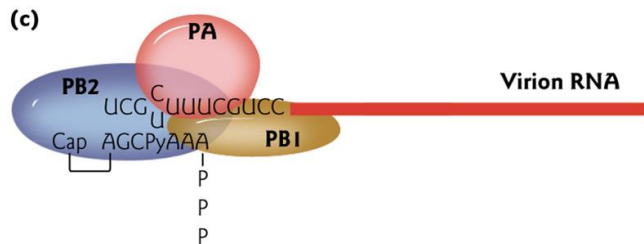
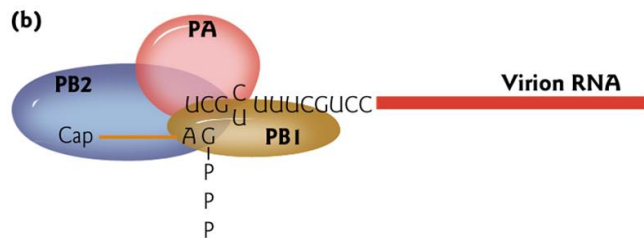
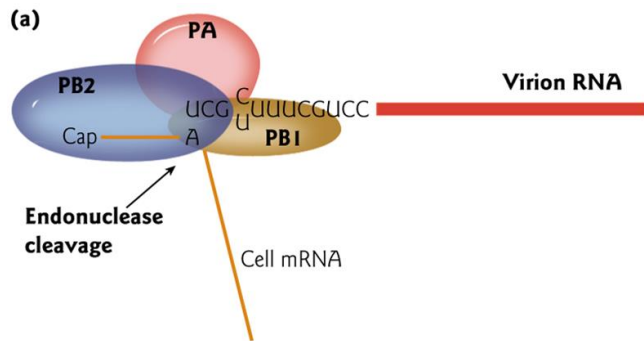
Nigel J. Dimmock, Andrew J. Easton, Keith N. Leppard  
*Introduzione alla Virologia moderna* Casa Editrice Ambrosiana. 2017

Complesso della polimerasi:  
PB2: cap binding  
PB1: initiation and elongation  
PA: endonuclease activity



# Segmented ssRNA (-): virus influenza A

## Trascrizione



Seguirà la fase di allungamento del messaggero fino al segnale di terminazione. Analogamente ad altri virus della classe V si arriverà ad uno stretch di U (17-22nt prima del 5') che sono copiati a formare la polyA con un meccanismo di copia ripetuta.

Il complesso della polimerasi trascrive in maniera primer dipendente mentre la replicazione sarà primer indipendente

# Segmented ssRNA (-): virus influenza A

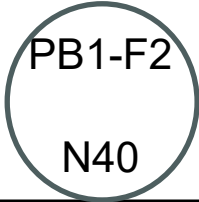



## **Controllo temporale della trascrizione:**

Tutti quanti i geni vengono trascritti in tutte le fasi del ciclo vitale dell'IAV ma si osserva una certa regolazione temporale

Durante le prime fasi dell'infezione si producono quantità simili di ciascuna mRNA virale

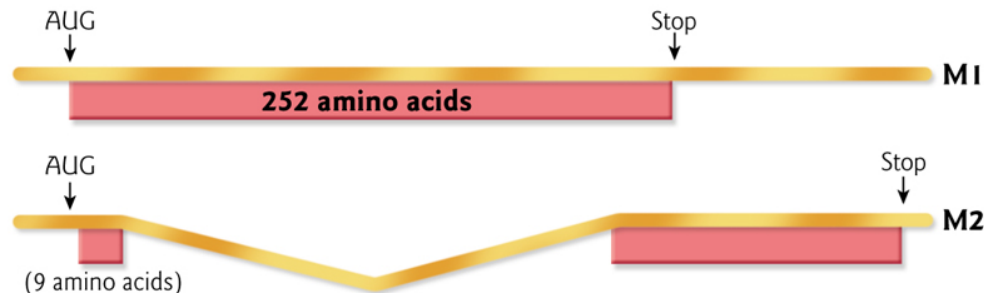
Dopo circa un'ora dall'infezione si cominciano ad osservare quantità più elevate dell'mRNA codificante per la nucleoproteina e di quello per la NS1

A seguito della replicazione osserveremo invece una maggiore produzione degli mRNA codificanti per le proteine strutturali HA, NA e M1

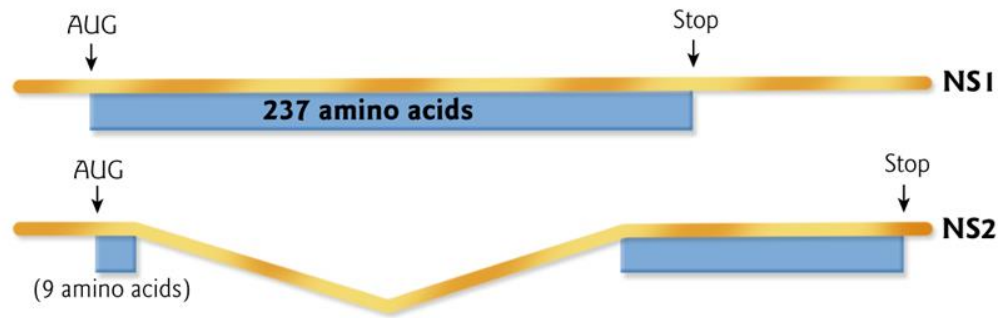
Segment	Size (nt)	Protein	Function
1	2341	PB2	Cap-binding (transcription)
2	2341	PB1  PB1-F2 N40	RNA-dependent RNA polymerase (transcription and replication) Apoptosis, inflammation, enhances polymerase activity Unknown
3	2233	PA  PA-X	Endonuclease Shutoff of host protein expression at late stage of infection
4	1778	HA	Hemagglutinin, receptor binding, fusion
5	1565	NP	Nucleoprotein, cytoplasm-nucleus translocation of v-RNP
6	1413	NA	Neuraminidase: virion release (main)
7	1027	M1 e  M2	M1= matrix M2= ion channel
8	890	NS1 e  NS2	NS1 = host function interference, absent inside the virion NS2 or NEP = v-RNP nuclear export

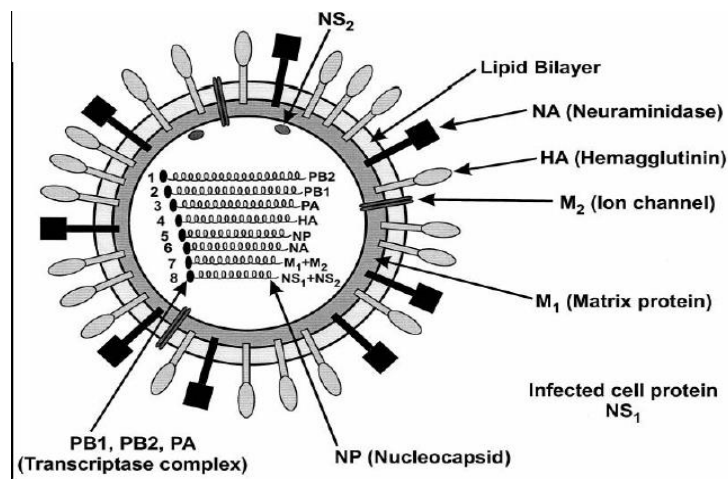
# Splicing degli mRNA del virus dell'influenza A

## mRNAs generated from influenza A virus segment 7



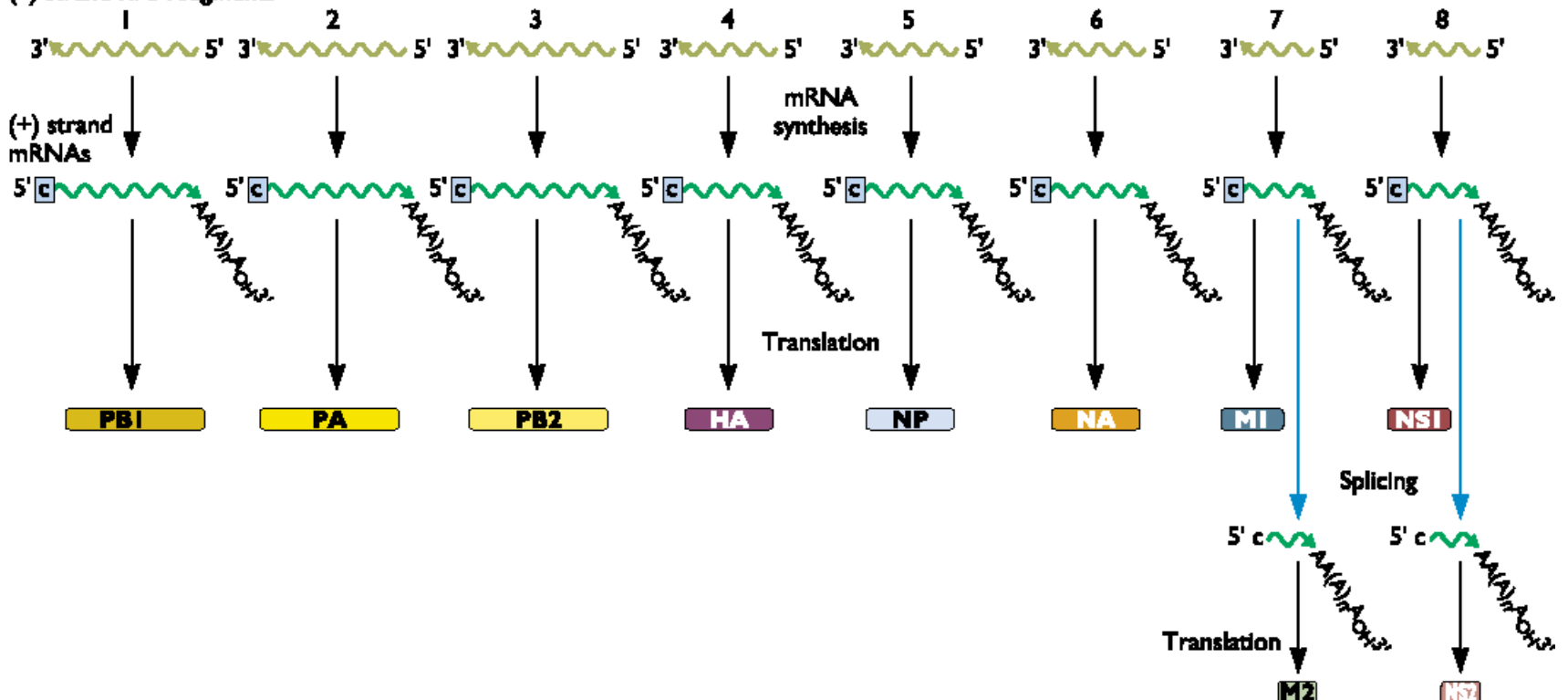
## mRNAs generated from influenza A virus segment 8



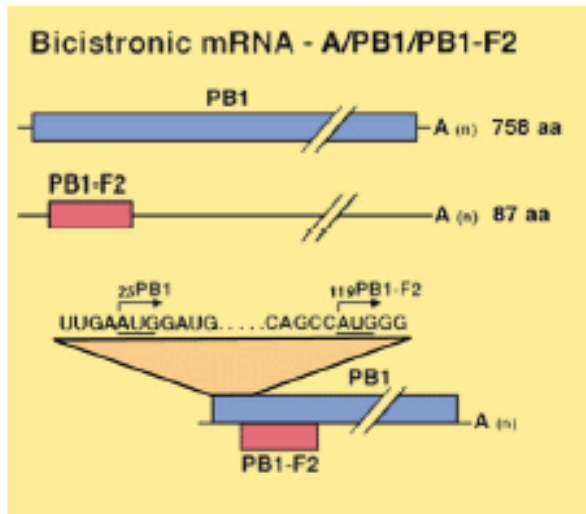


**B**

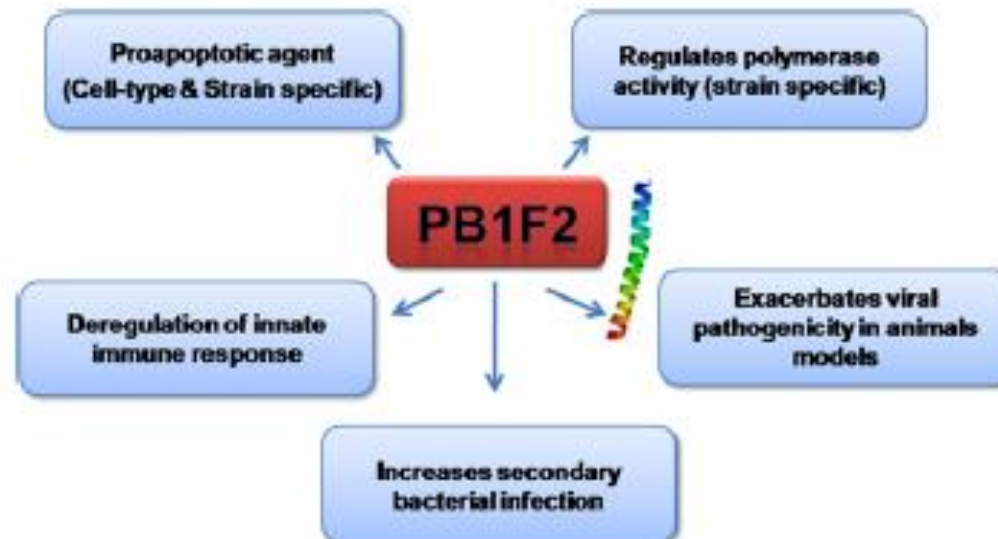
(-) strand RNA segments



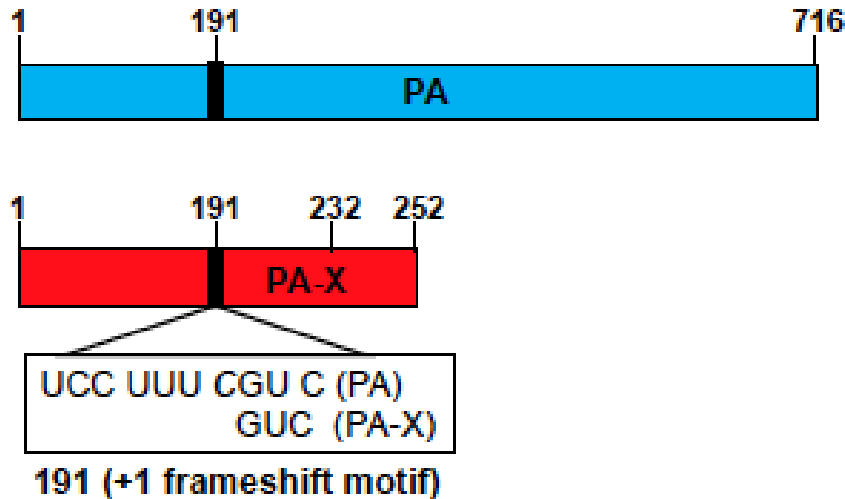
# Regolazione traduzionale



Here we see the **two open reading frames** of the PB1 gene segment of Influenza A Virus. The red segment corresponds to **the alternate reading frame that encodes the PB1-F2** protein whose start site is 120 bp downstream of the PB1 polymerase gene.



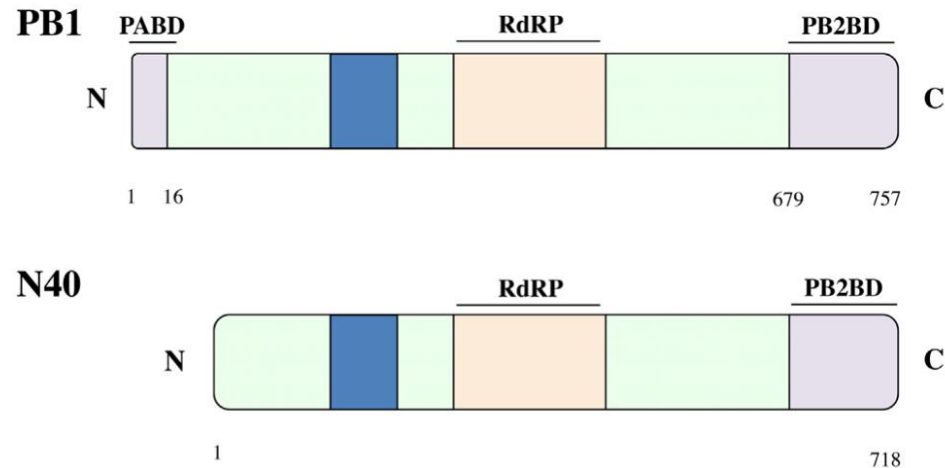
# Regolazione traduzionale: ribosomal frameshift



A schematic representation of the IAV PA viral segment and the PA and PA-X open reading frames (ORFs). Blue and red boxes indicate the ORF for PA and PA-X, respectively. The +1 frameshift motif (UCC UUU CGU C) at position 191 is indicated. Bold and italics in the frameshift motif (C nucleotide) indicate that the nucleotide C is not read during PA-X translation. PA-X proteins containing 232 or 252 amino acids if the C-terminal region has a 41 or 61 amino acid extension, respectively, are indicated. PA-X selectively degrades host RNA polymerase II (Pol II)-transcribed mRNAs and non-coding RNAs in the nucleus of infected cells, while sparing the products of polymerases I and III.

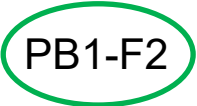




# Regolazione traduzionale: alternative frame truncated protein

## Genome segment 2 N40



**A leaky ribosomal scanning process** is involved in N40 expression due to the presence of a strong Kozak translation initiation context in the 5<sup>th</sup> in frame AUG codon of PB1 gene. This initiation codon is located 115 nucleotides downstream from the first AUG in PB1 mRNA and thus, the N40 protein is an amino-terminally truncated version of the PB1 protein that lacks the first 39 amino acids, residues where the PA binding domain is located.

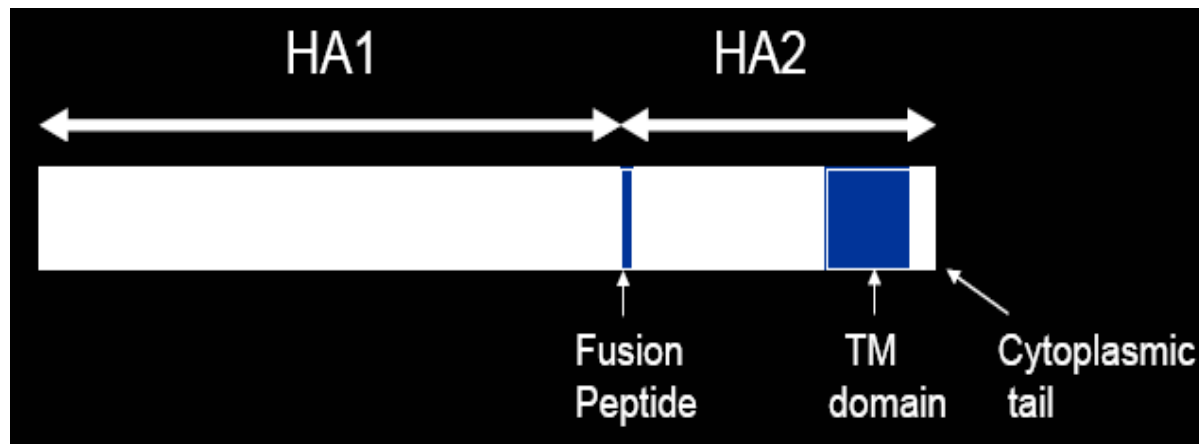
 Splicing alternativo  
  Orf alternativa  
  Ribosomal frameshift  
  Leaky scanning

Segment	Size (nt)	Protein	Function
1	2341	PB2	Cap-binding (transcription)
2	2341	PB1  PB1-F2  N40	RNA-dependent RNA polymerase (transcription and replication) Apoptosis, inflammation, enhances polymerase activity Unknown
3	2233	PA  PA-X	Endonuclease Shutoff of host protein expression at late stage of infection
4	1778	HA	Hemagglutinin, receptor binding, fusion
5	1565	NP	Nucleoprotein, cytoplasm-nucleus translocation of v-RNP
6	1413	NA	Neuraminidase: virion release (main)
7	1027	M1 e  M2	M1= matrix M2= ion channel
8	890	NS1 e  NS2	NS1 = host function interference, absent inside the virion NS2 or NEP = v-RNP nuclear export

# Regolazione post-traduzionale

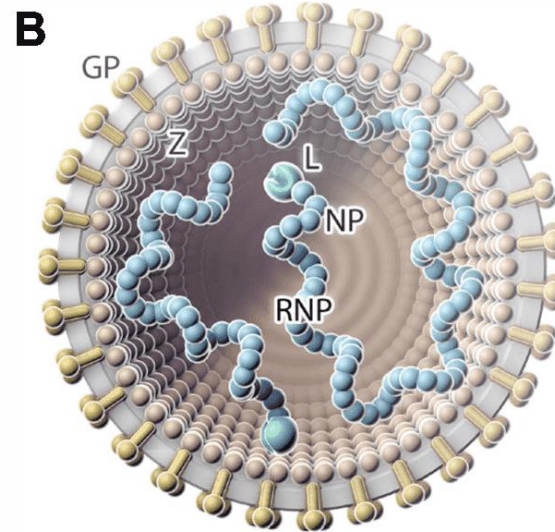
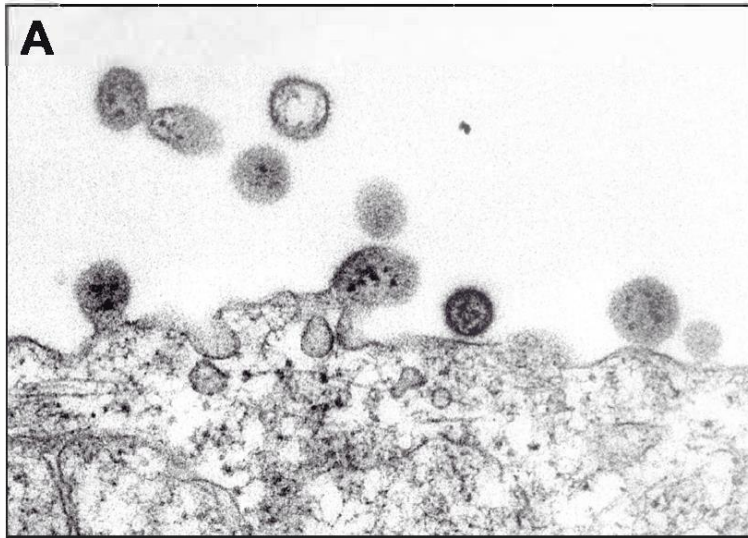
Il taglio proteolitico della HA da parte di proteasi cellulari è fondamentale per la sua funzione.

HA is synthesized as a precursor (HA0), which is cleaved (trypsin-like enzymes or furin) into HA1 (responsible for interaction with the receptor) and HA2, which includes the trans-membrane domain and the fusion peptide (responsible for envelope fusion with endosomal membrane). The HA1 and HA2 fragments are held together by disulfide bridges.



# Segmented ssRNA(-): ambisense genome (Arenavirus)

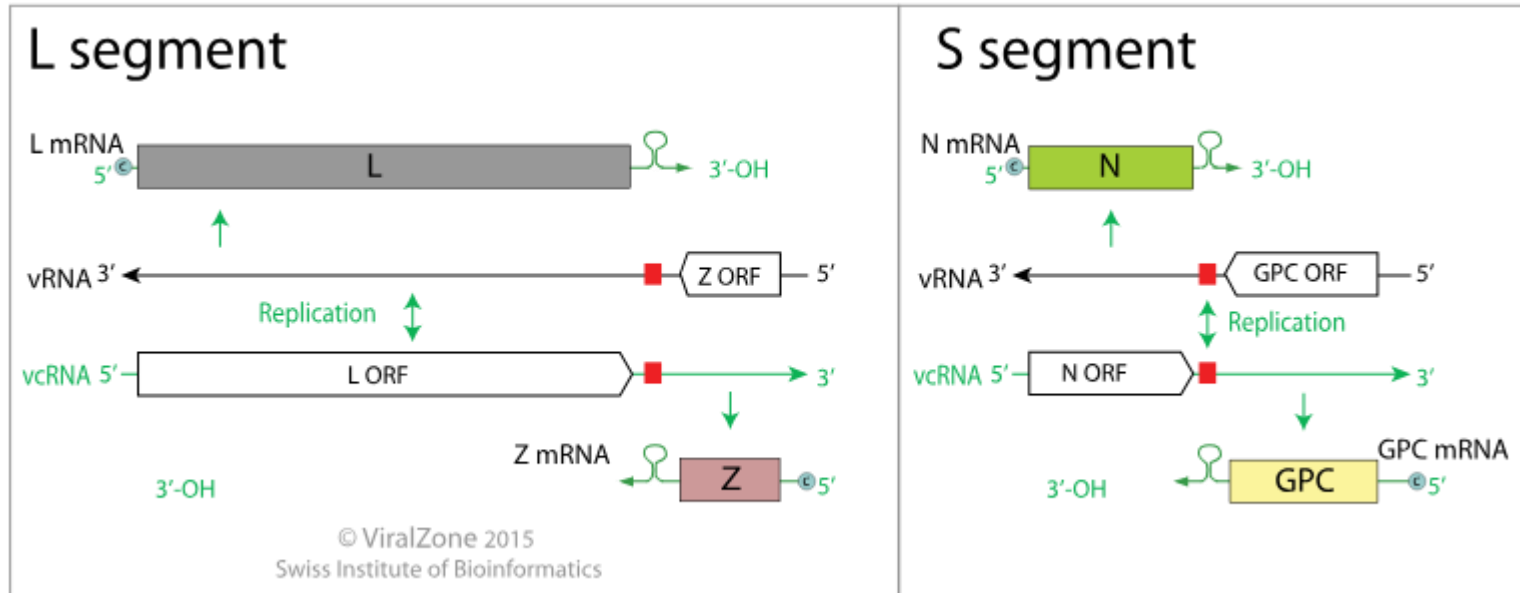
L segment is about 7,5 kb and S segment 3,5 kb



- (A) Electron micrograph of LCMV particles, showing dark internal inclusion bodies (Latin: *arena*, sand) budding from an infected cell.
- (B) Illustration of a (mammalian) arenavirid particle). The small (S) and large (L; green) ribonucleoprotein (RNP) complexes inside the particle consist of nucleoprotein (NP; blue) and L protein.

Enveloped, pleomorphic virions 40–200 nm  
in diameter with trimeric surface spikes

# Segmented ssRNA(-): ambisense genome

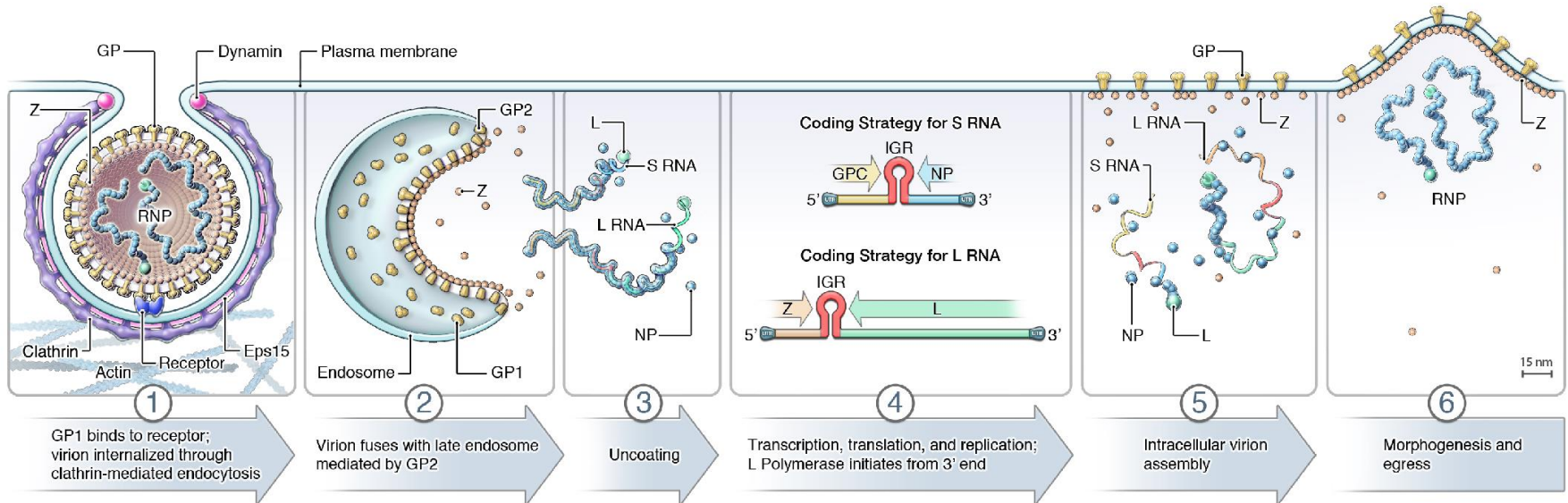


mRNAs are capped, probably by L protein during synthesis.

Per entrambi i segmenti si può osservare la trascrizione sia dal genoma (NP, L) che, a seguito della replicazione, dall'antigenoma (GPC e Z)

Segmento S dà origine a NP (nucleoproteina) e GPC (glicoproteina)  
Segmento L a L (polimerasi) e Z (zinc binding protein)

# Segmented ssRNA(-): ambisense genome



**Arenaviridae.** Lifecycle of arenavirids. (1) Virion uptake; (2) virus-cell membrane fusion; (3) uncoating; (4) transcription, translation, and replication; (5) virion assembly; and (6) virion budding. GP, glycoprotein; IGR, intergenic region; L, large protein; NP, nucleoprotein; RNP, ribonucleoprotein; Z, zinc-binding protein.

Per entrambi i segmenti si può osservare la trascrizione sia dal genoma (NP, L)  
Che, a seguito della replicazione, dall'antigenoma (GPC e Z)

Segmento S dà origine a NP (nucleoproteina) e GPC (glicoproteina)  
Segmento L a L (polimerasi) e Z (zinc binding protein)

