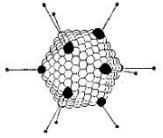


# Parti del testo “Introduzione alla Virologia Moderna” da consultare per questa lezione

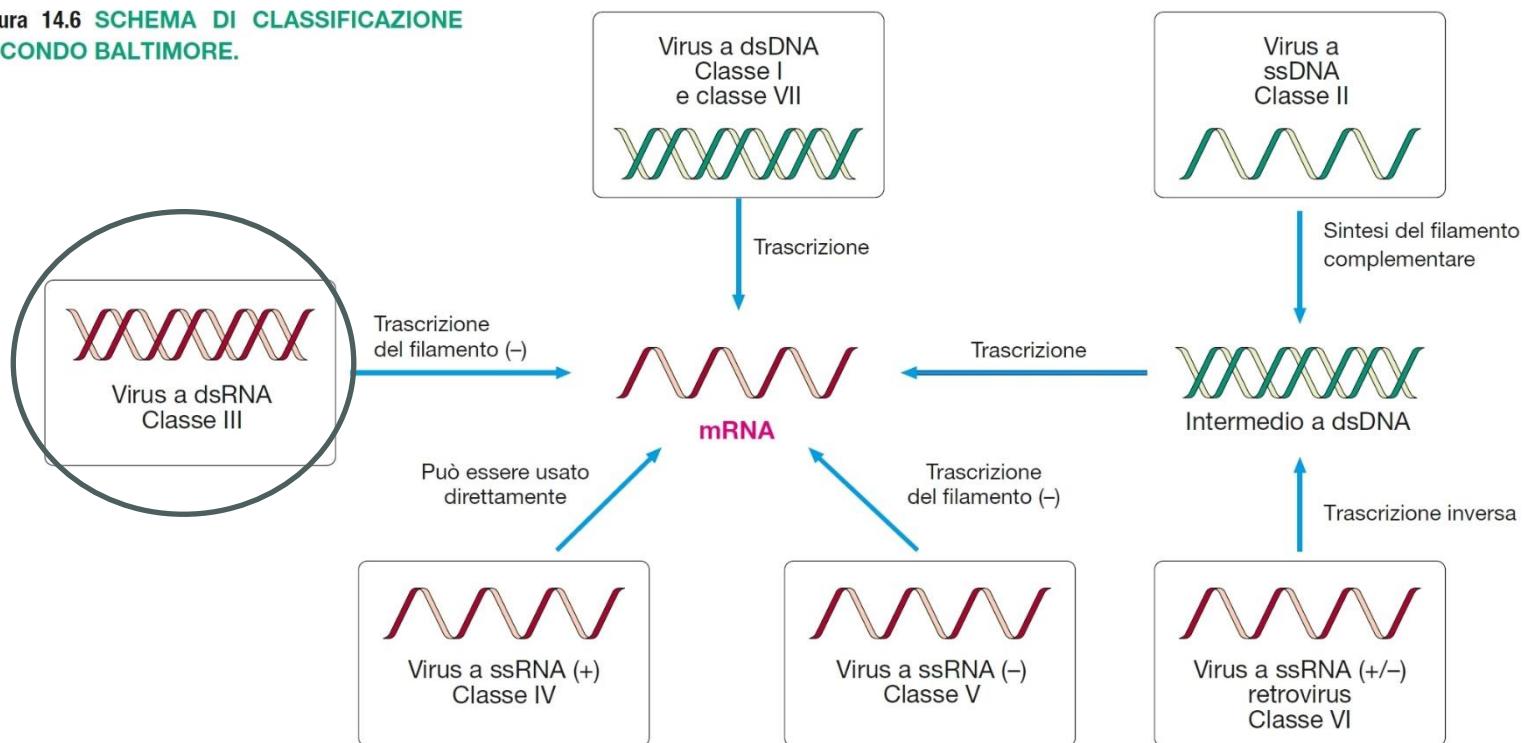
- **Capitolo 9 (tutto esclusi 9.7 e 9.10)**
- **Capitolo 10 – par. 10.8, 10.9**



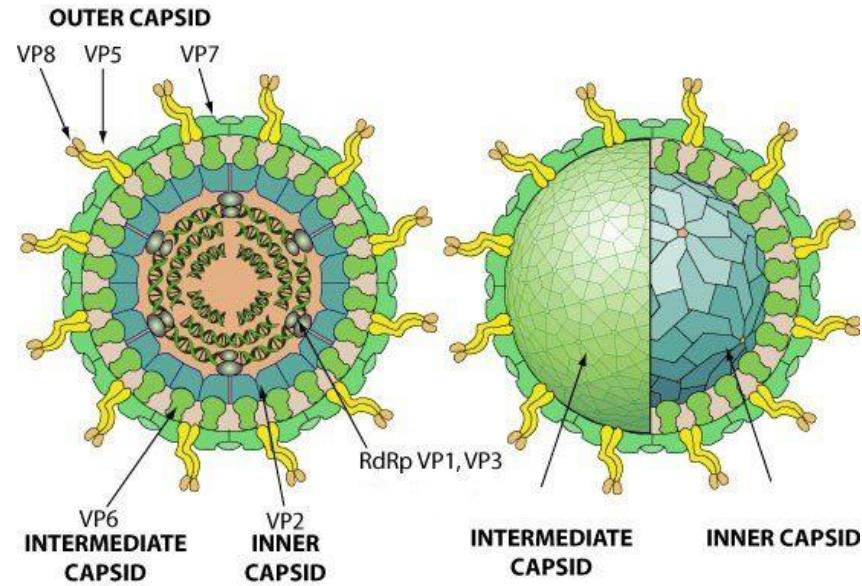
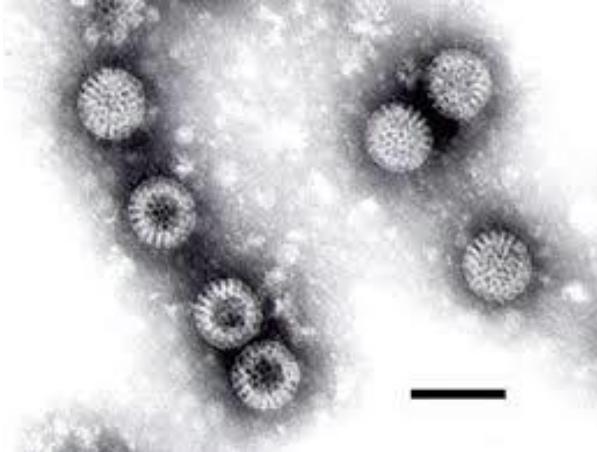
Classification criteria	Nucleic acid														
	RNA														
	Icosahederal														
	Symmetry of capsid														
	Naked or enveloped														
	Genome architecture														
Baltimore class	ds 10–18 seg.	ds 2 seg.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss 2 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	Picorn	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Orthomyxo	Parameyo	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

# Classificazione secondo Baltimore (suddivisione in classi di replicazione)

Figura 14.6 SCHEMA DI CLASSIFICAZIONE  
SECONDO BALTIMORE.



# Classe III: dsRNA Reovirales (es. Rotavirus ed Orbivirus)



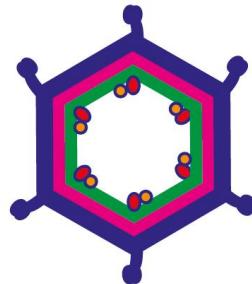
- Capside icosaedrico costituito da 2 o 3 involucri concentrici
- Il virione è costituito dalle proteine strutturali e da proteine non strutturali che comprendono la trascrittasi virus-associata e gli enzimi necessari per la produzione di mRNA virale, inclusi quelli coinvolti nel capping e nella metilazione

Esempi: Rotavirus (gastroenteriti) Blue Tongue Virus (ovini e bovini)

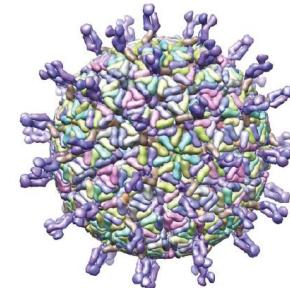
# Classe III: dsRNA Reovirales (es. Rotavirus ed Orbivirus)

*Rotavirus*

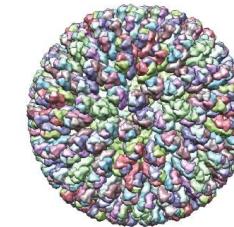
- VP2
- VP6
- VP4, VP7
- VP1
- VP3



Virion

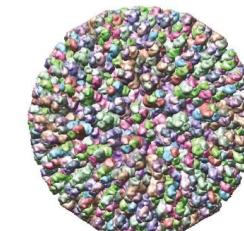
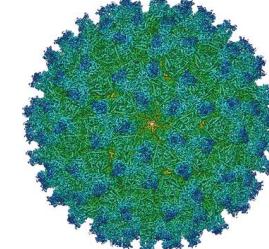


Core



*Orbivirus*

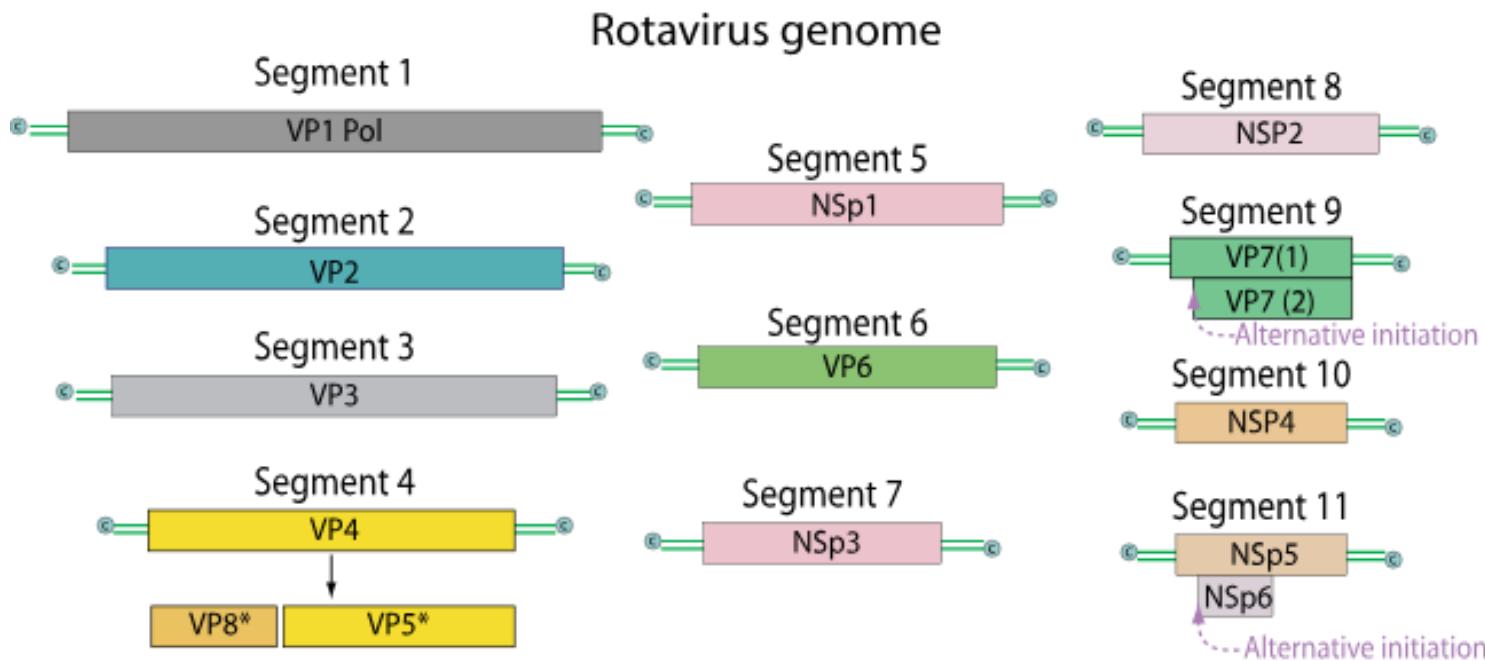
- VP3
- VP7
- VP2, VP5
- VP1
- VP6
- VP4



Particle morphologies of members of different genera of the order Reovirales

# Classe III: dsRNA Reovirales (es. Rotavirus ed Orbivirus)

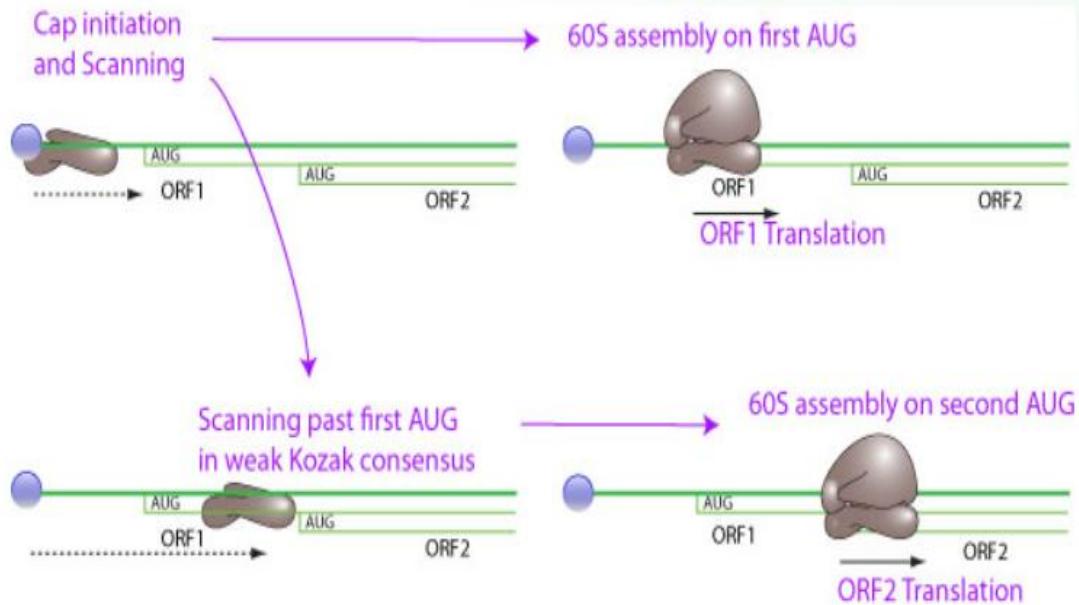
- Il genoma è costituito da 9 a 12 segmenti di RNA a doppio filamento



Segmented linear [dsRNA genome](#). Contains 10 to 12 segments coding for 10 to 14 proteins. Segments size range from 0.2 to 3.0 kb. Genome total size range from 18.2 to 30.5 kb.

Further proteins are produced by [leaky scanning](#) and protein processing.

# Leaky scanning



**Leaky scanning** is a phenomenon in which a weak initiation codon triplet on the mRNA is sometimes skipped by the ribosome during translation initiation. The ribosomal subunit 40S continues scanning to another initiation codon. The weak initiation codon can be an ACG or an ATG in a weak Kozak consensus context.

In this way, one mRNA can code for several different proteins if the AUG are not in frame, or for proteins with different N-termini if the AUG are in the same frame.

# Ciclo replicativo Rotavirus

La dsRNAdependent RNA polymerase nel virione diviene attiva durante l'uncoating

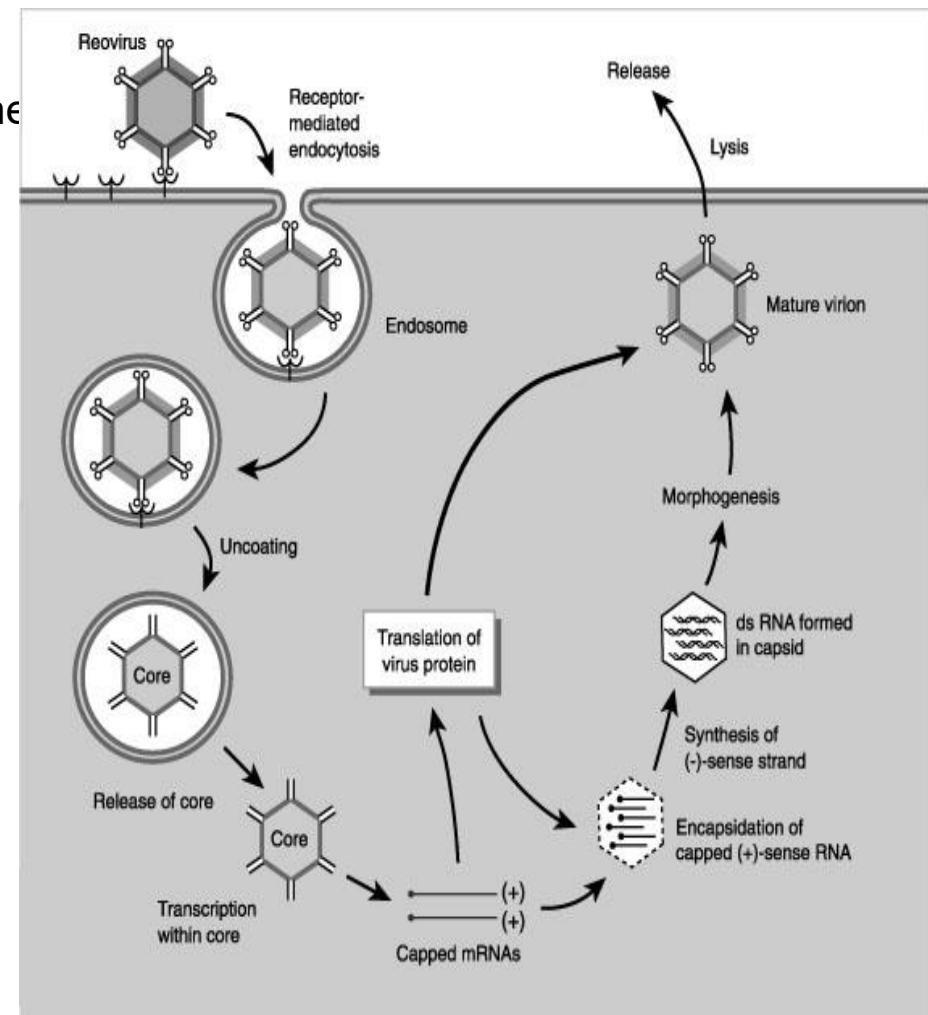
Ogni segmento è trascritto separatamente per produrre un mRNA

Solo uno dei due filamenti si usa come stampo per la trascrizione

La trascrizione avviene nel core virale

mRNA hanno cap non polyA

The dsRNA genome is never completely uncoated to prevent activation of antiviral state by the cell in response to dsRNA.



# Ciclo replicativo Rotavirus

## REPLICATION

### CYTOPLASMIC

1. Attachment to host receptors probably mediates endocytosis of virus into host cell.

2. Particles are partially uncoated in endolysosomes, but not entirely, and penetrate in the cytoplasm.

3. Early transcription of the dsRNA genome by viral polymerase occurs inside this sub-viral particle (naked core), so that dsRNA is never exposed to the cytoplasm.

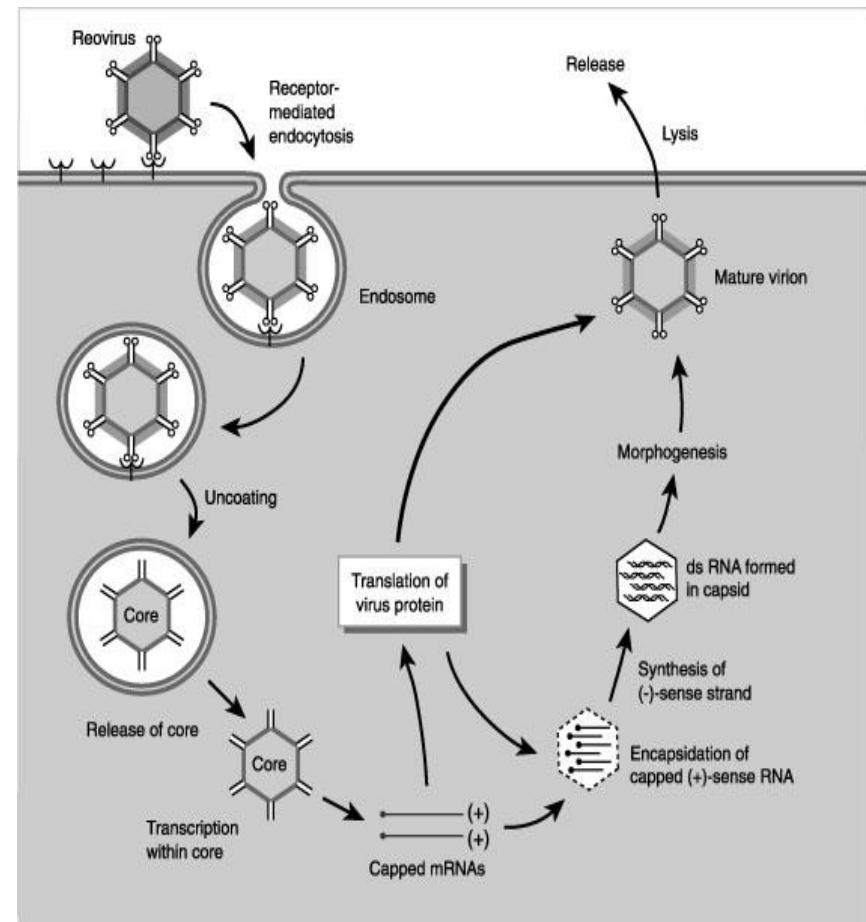
4. Transcription from each of the dsRNA segments produces mRNA templates for translation.

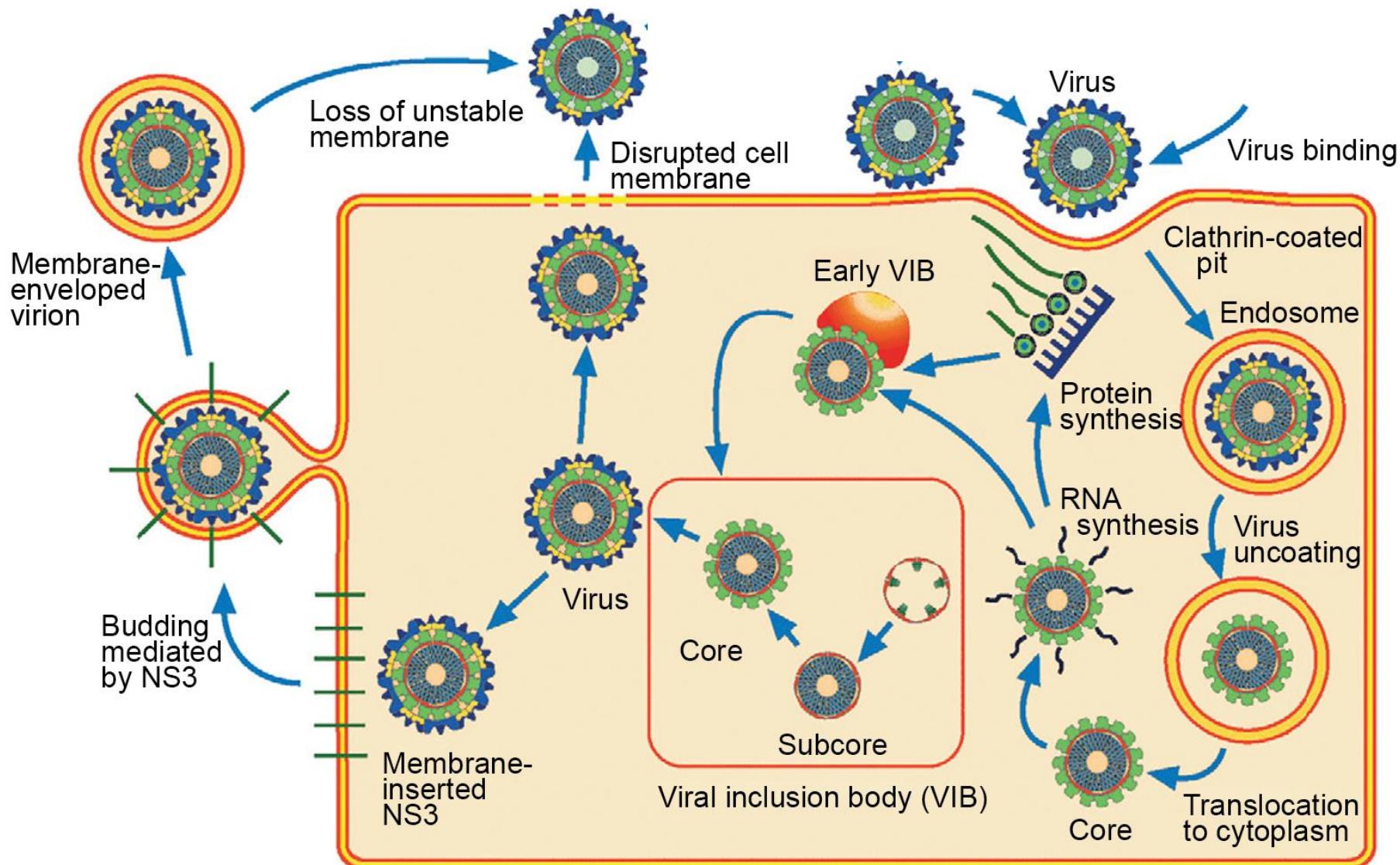
5. Viral proteins and genomic RNAs aggregates in cytoplasmic viral factories.

6. (+)RNAs are encapsidated in a sub-viral particle, in which they are transcribed to give RNA (-) molecules with which they become base-paired to produce dsRNA genomes.

7. The capsid is assembled on the sub-viral particle.

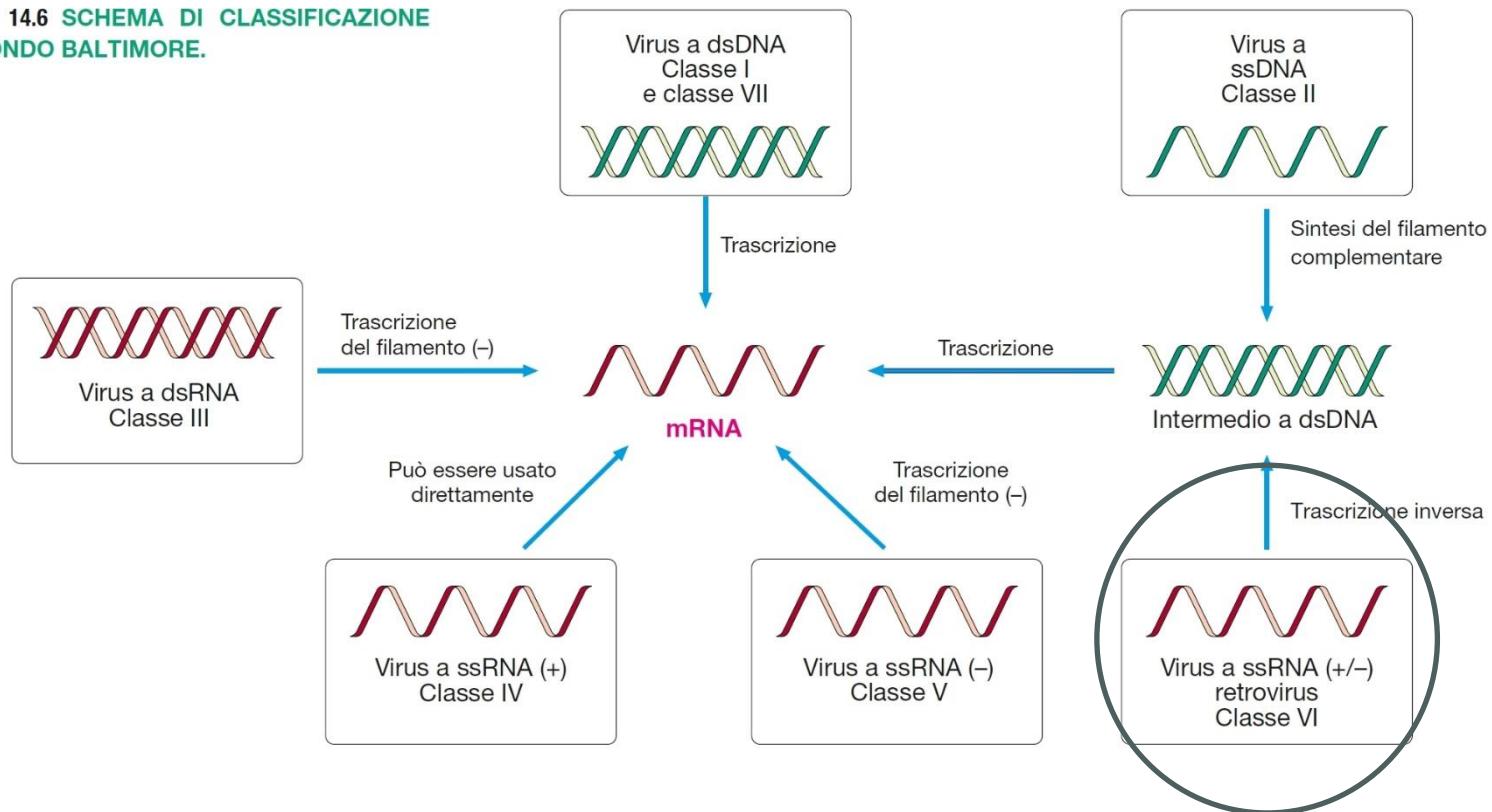
8. Mature virions are released presumably following cell death and associated breakdown of host plasma membrane.



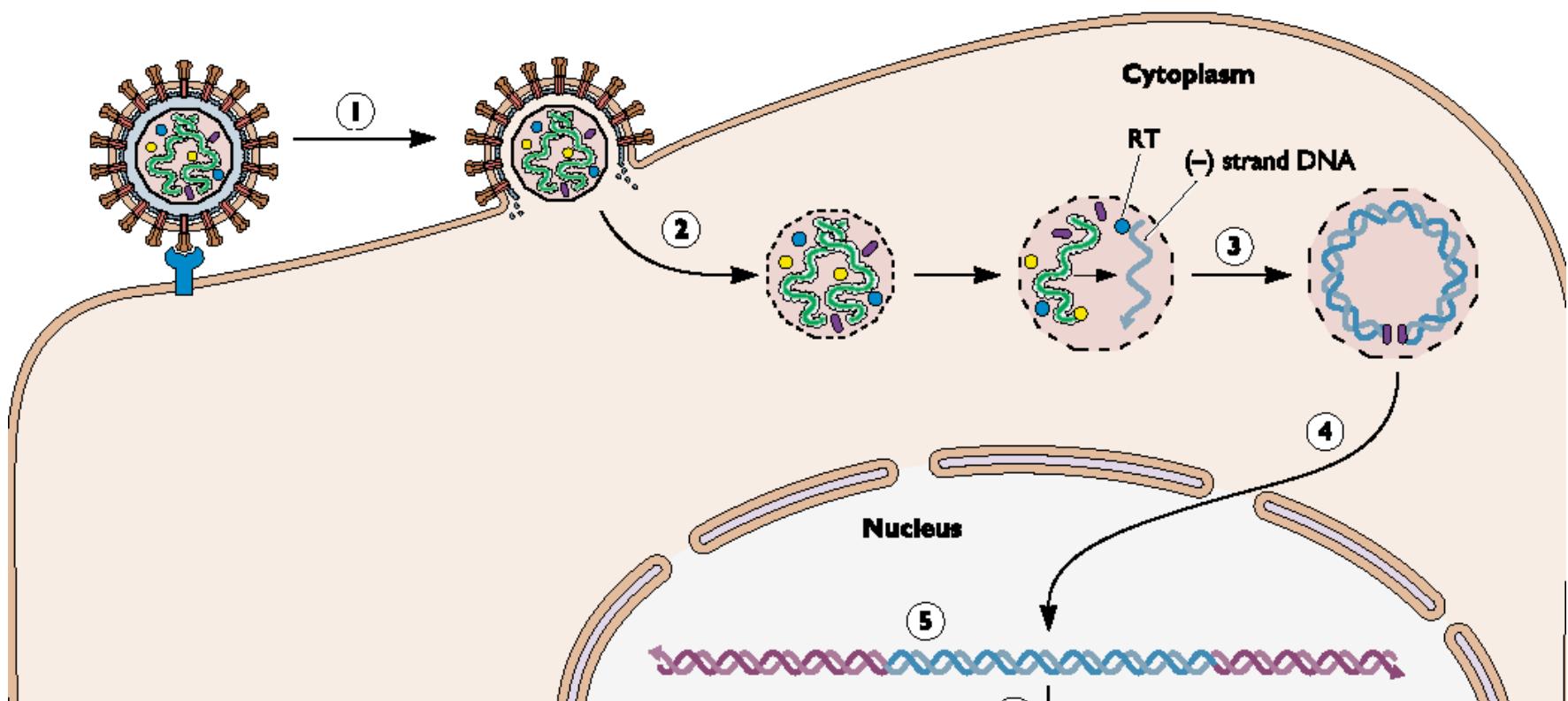


# Classificazione secondo Baltimore (suddivisione in classi di replicazione)

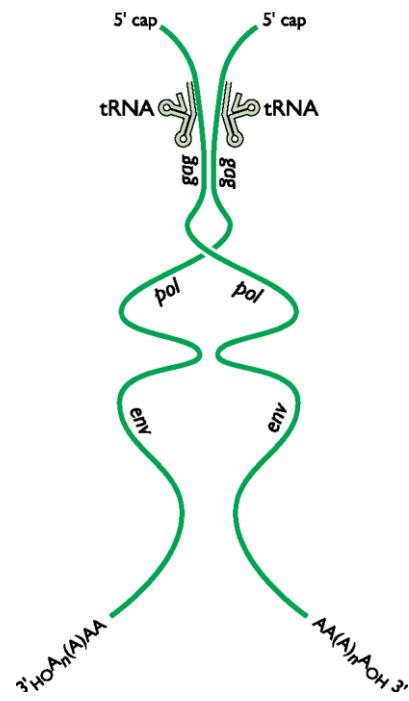
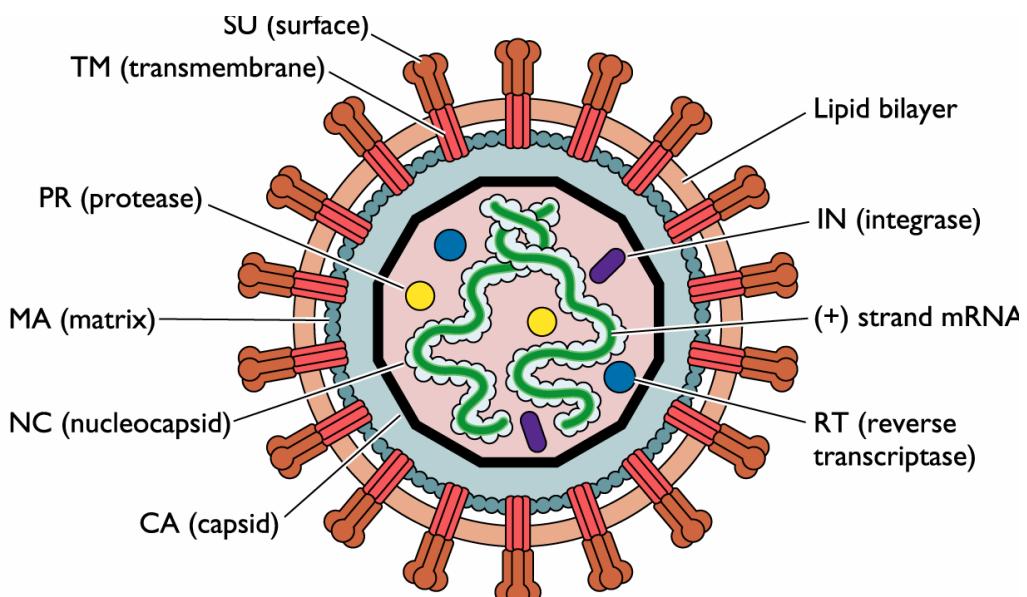
Figura 14.6 SCHEMA DI CLASSIFICAZIONE  
SECONDO BALTIMORE.



# Classe VI: Retroviridae



# Retroviridae



# Genoma dei retrovirus

**R** è una corta sequenza che forma ripetizioni dirette ad entrambe le estremità del genoma, importante durante il processo di replicazione, inizio della trascrizione e segnale di poliadenilazione

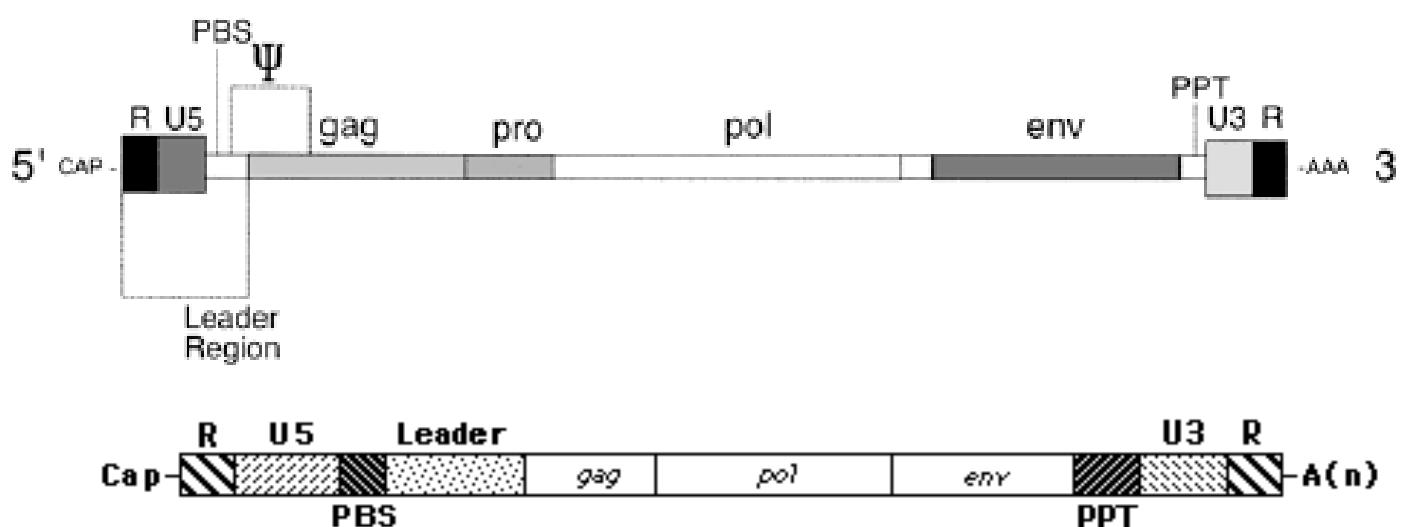
**U5** sequenza unica non codificante, prima parte del genoma ad essere retrotrascritta, sito importante per l'integrazione

**PBS** (primer binding site) 18nt complementari al 3' del tRNA

**Leader** (90-500nt) non tradotta, contiene  $\psi$  site (impacchettamento)

**PPT** (c.a. 10nt) sito di inizio del filamento + di DNA (tratto polipurinico)

**U3** regione unica non codificante (200-1200nt) contenente elementi promoter ed enhancer

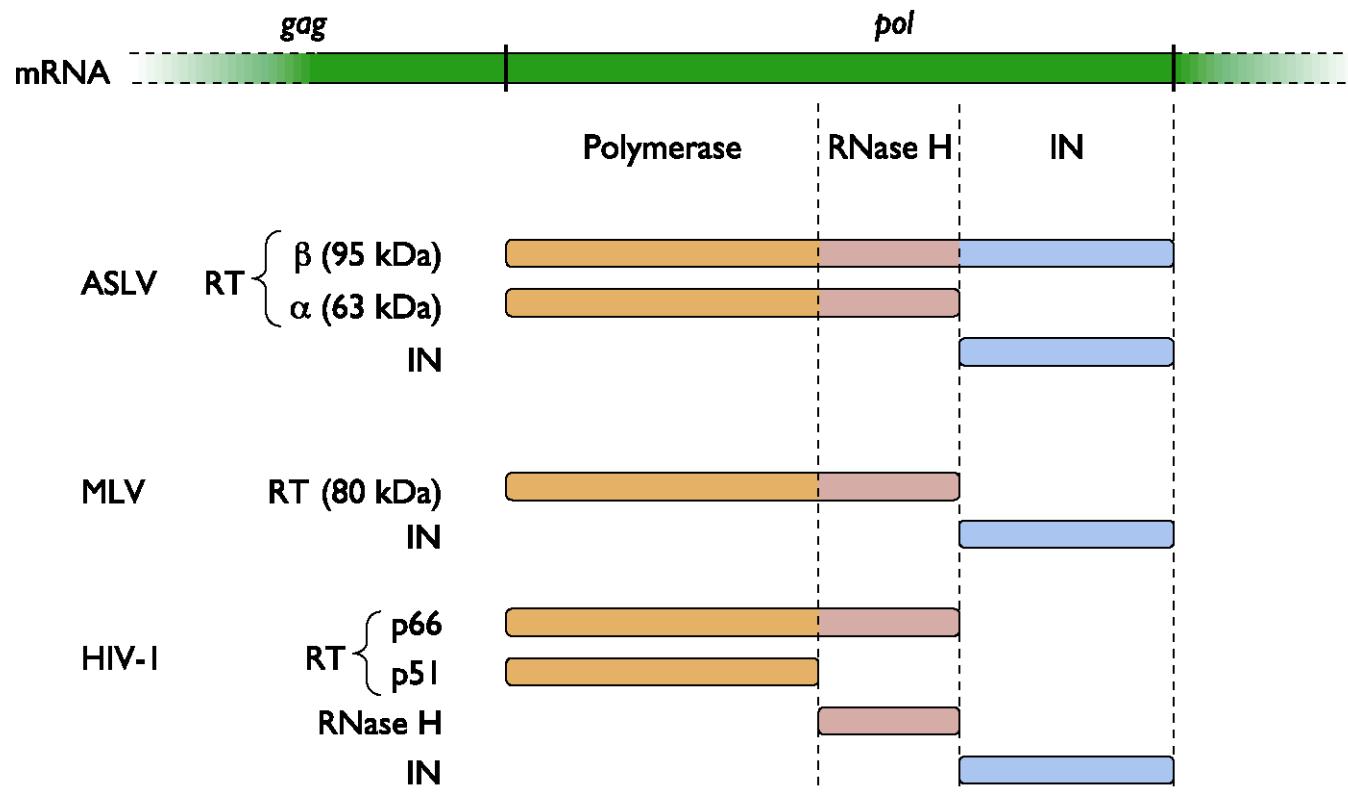


## Retroviridae

### Trascrittasi inversa

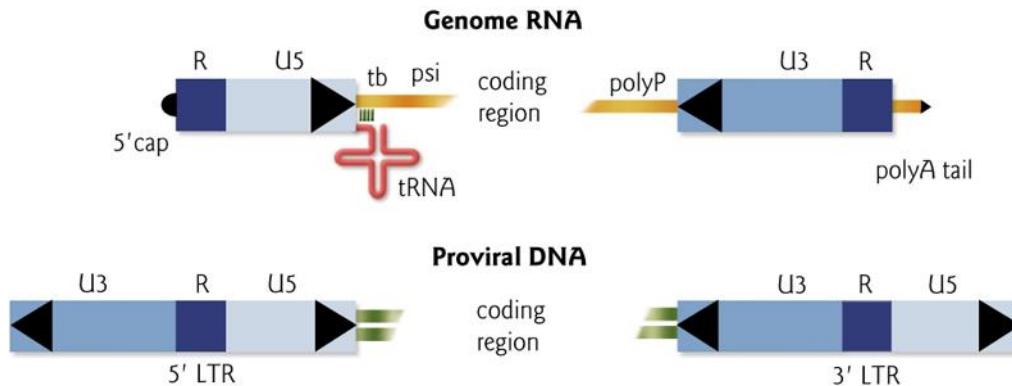
- DNA polimerasi RNA-dipendente
- DNA polimerasi DNA-dipendente
- Attività elicasica
- RNAsi H: degrada RNA quando presente sottoforma di ibrido RNA-DNA

# Trascrittasi inversa

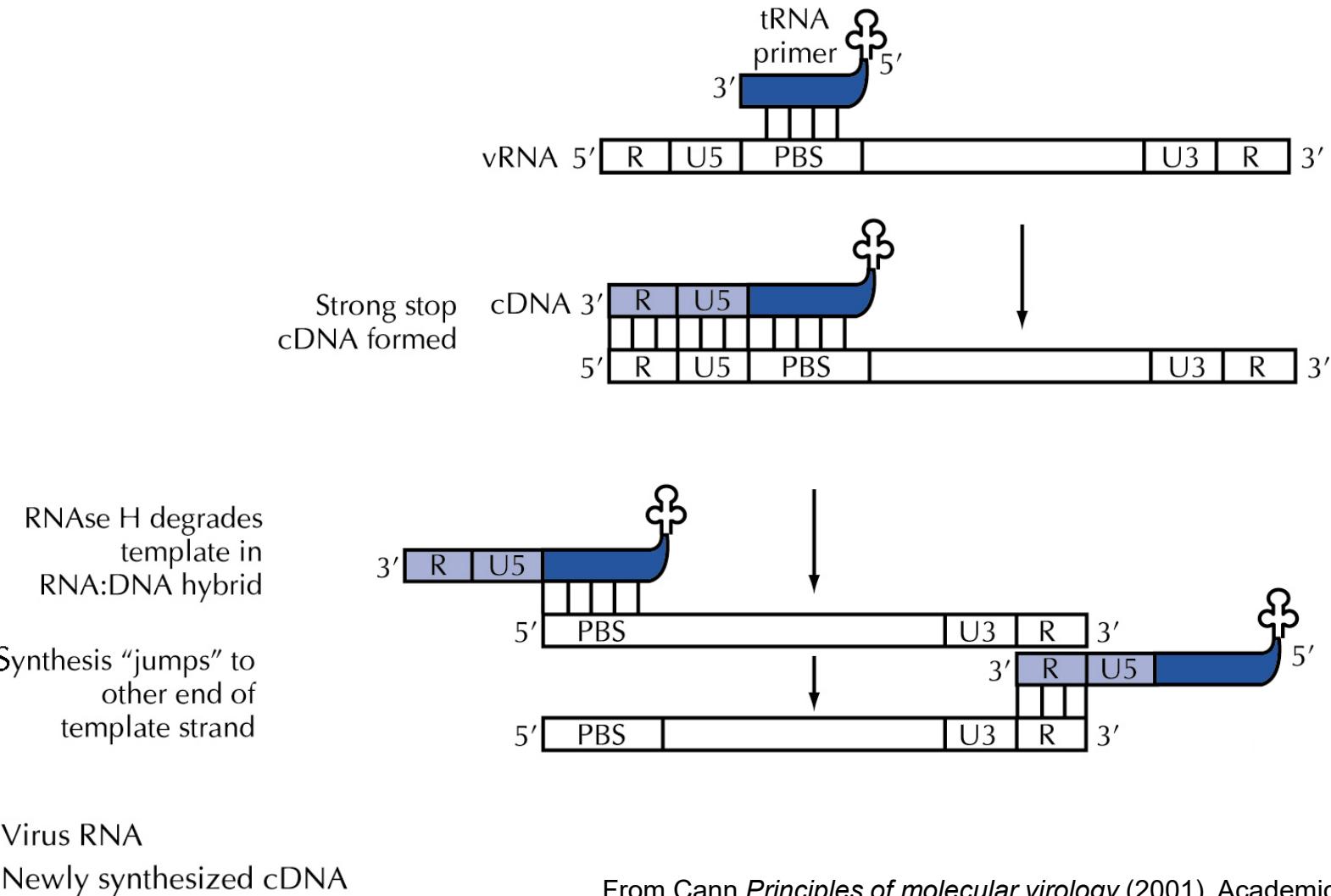


# Trascrizione inversa

- Il DNA a doppio filamento che si forma attraverso questa reazione è noto come **DNA provirale o provirus** e risulta essere più lungo del vRNA poiché ha una copia in più delle regioni U3 e U5. Quindi nel DNA provirale, ad ogni estremità, c' è una ripetizione diretta della sequenza U3-R-U5. Questa sequenza è nota come **LTR** (Long Terminal Repeat)

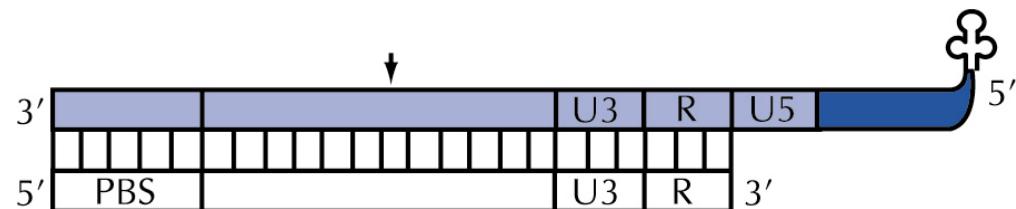


# Trascrizione inversa (1)

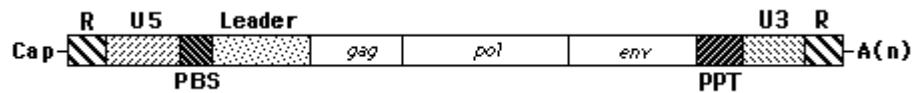
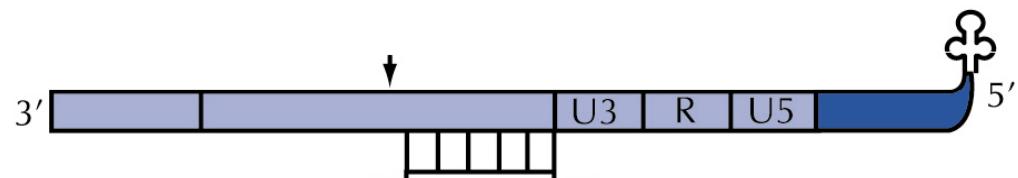


## Trascrizione inversa (2)

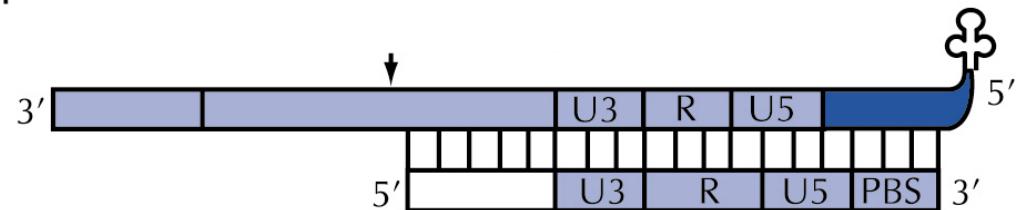
Extension of first strand



Second strand synthesis initiated



Second strand extension



Key



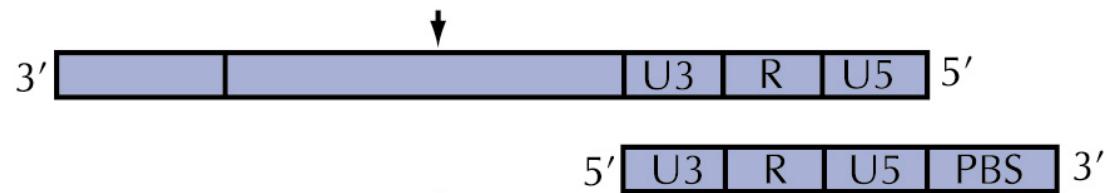
Virus RNA



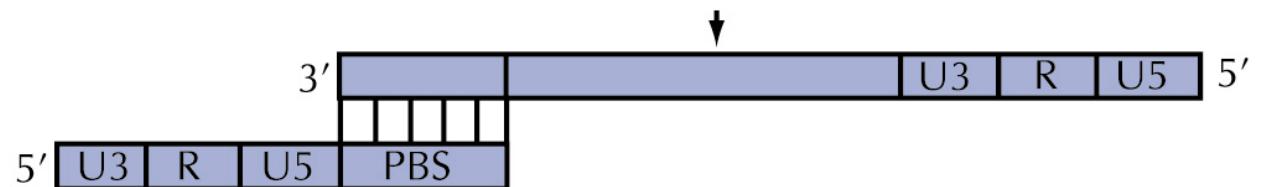
Newly synthesized cDNA

## Trascrizione inversa (3)

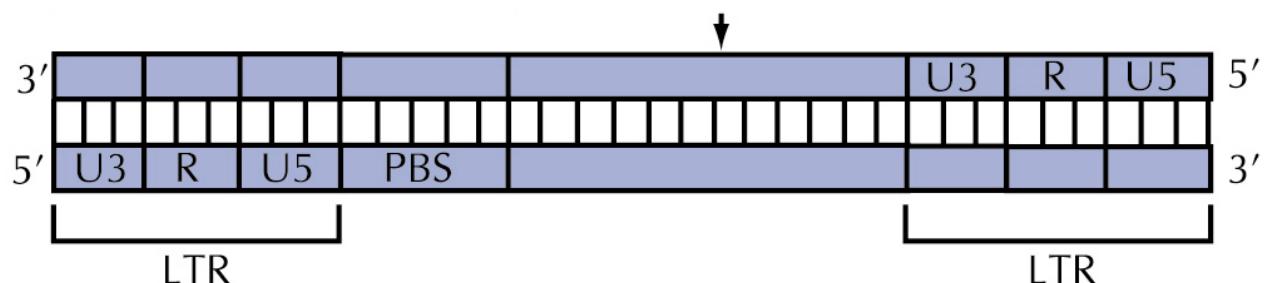
RNase H degrades  
tRNA primer



Second strand  
synthesis continues  
after "jump" to other  
end of first strand



Synthesis of both  
strands completed



Key

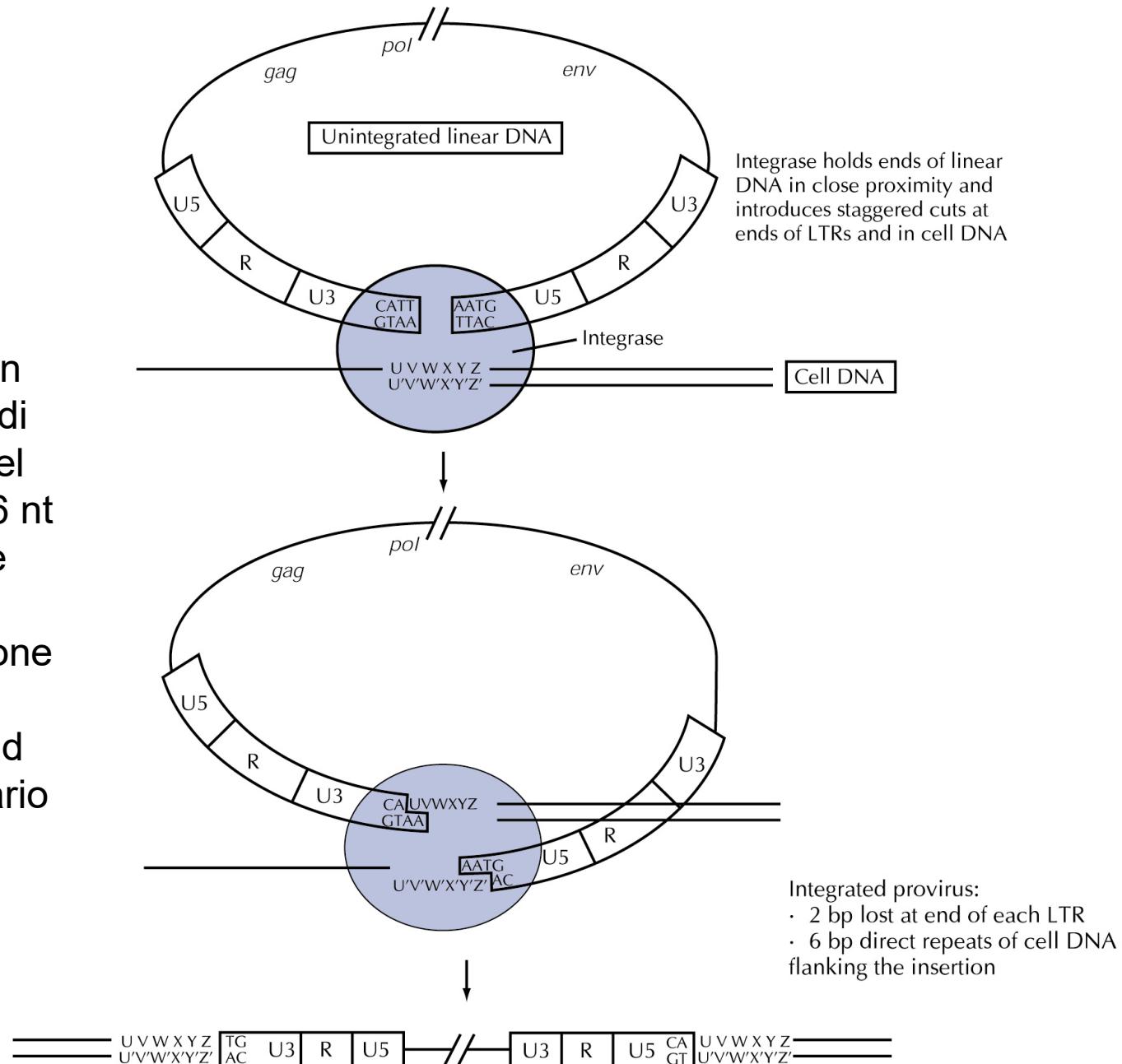
Virus RNA

Newly synthesized cDNA

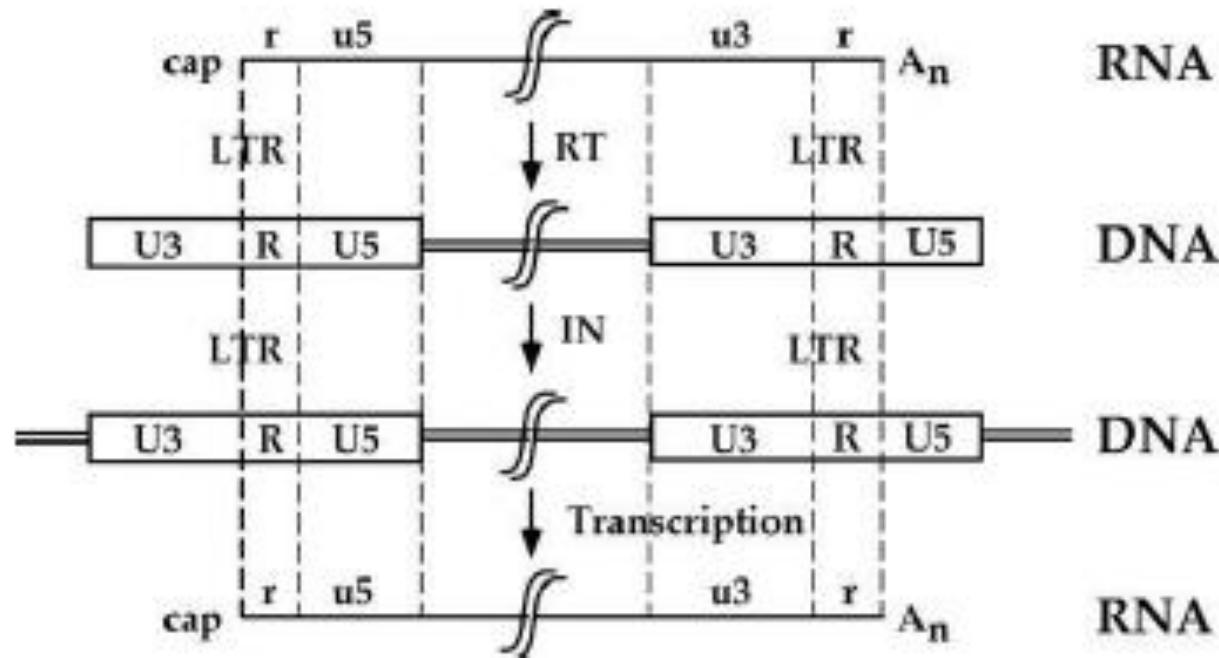
## Integrazione:

l'integrasi opera un taglio di 2 nucleotidi alle estremità 3' del DNA provirale e di 6 nt nel DNA cellulare  
e  
catalizza l'integrazione

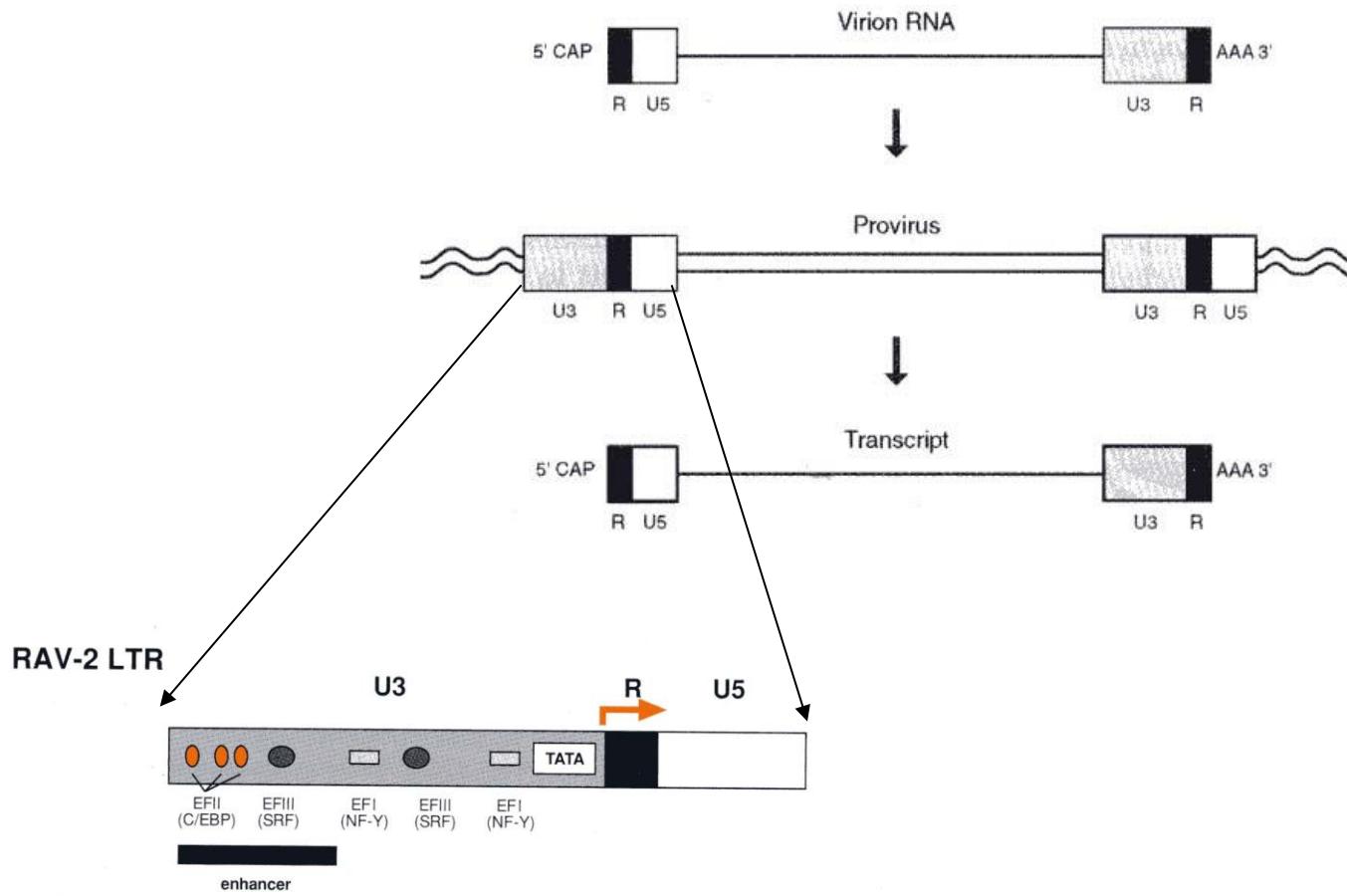
La riparazione è ad opera del macchinario cellulare



# Strutture alle estremità dell'RNA virale e del DNA provirale



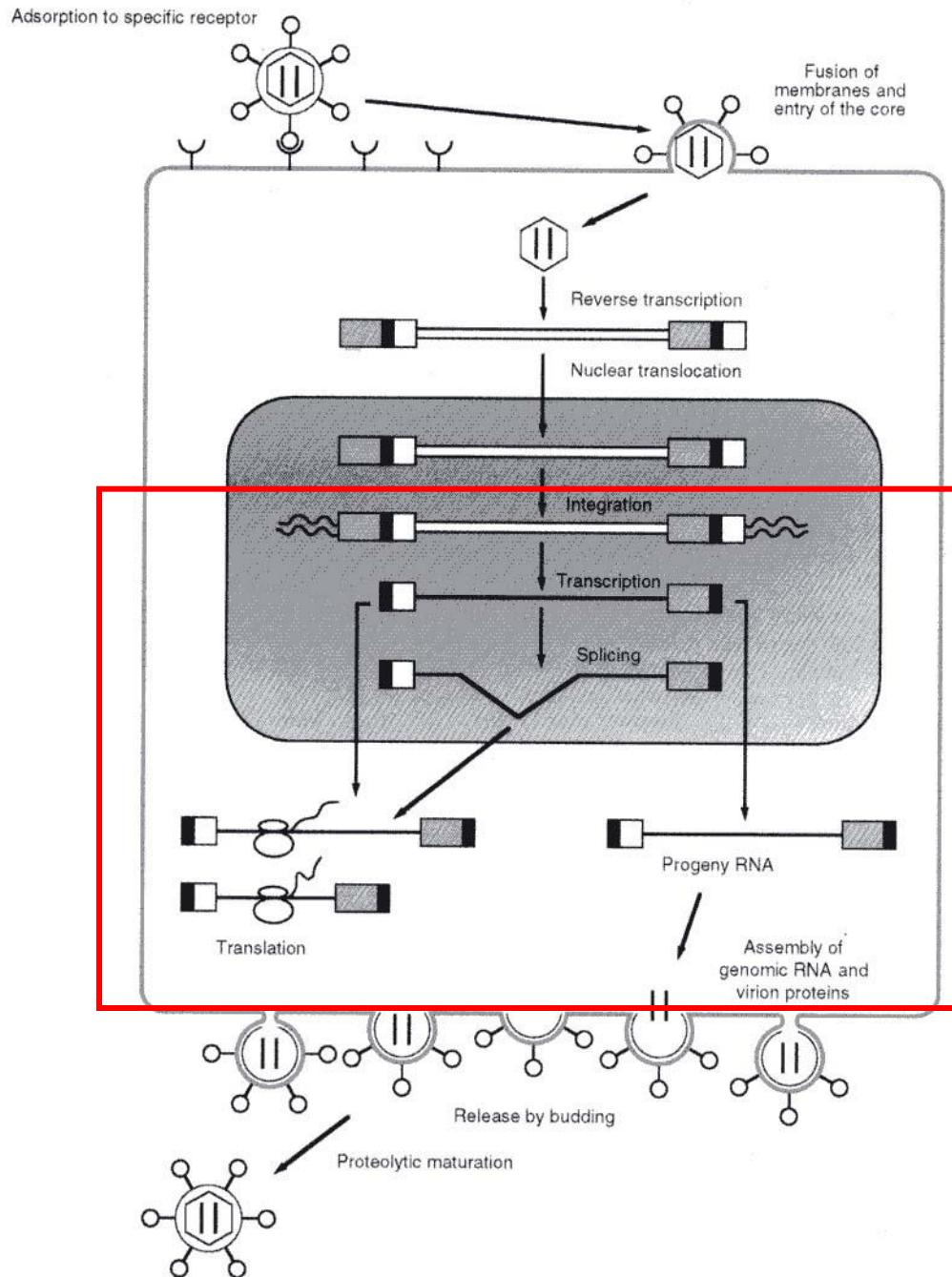
# Espressione dei retrovirus



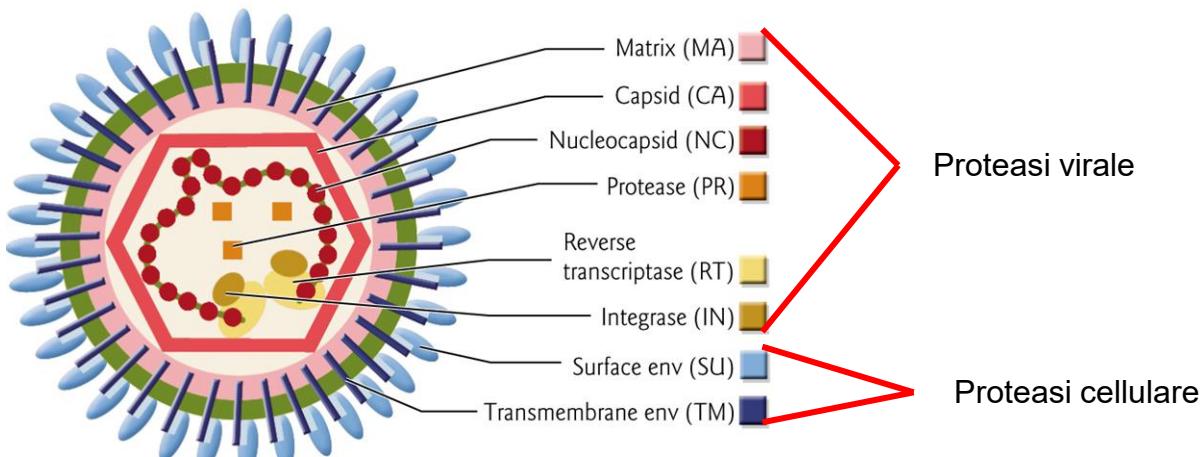
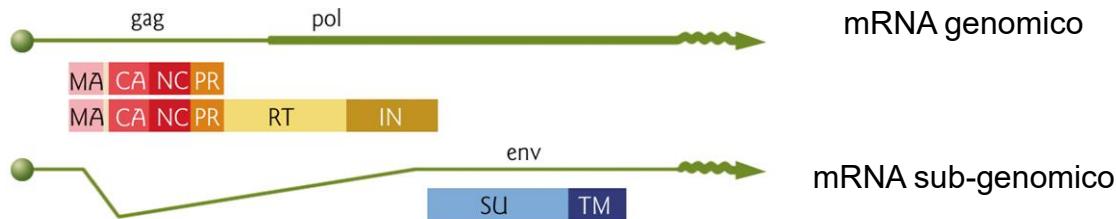
LTR di un retrovirus aviario. Nella regione U3 sono indicati importanti sequenze regolatrici e siti specifici per fattori di trascrizione cellulari. Il legame di tali fattori è determinante per l'attivazione della trascrizione del DNA provirale. Questi fattori sono sia ubiquitari che tessuto-specifici, così che il repertorio di fattori di trascrizione usati da un particolare retrovirus rappresenta un ulteriore grado di specificità per un determinato tipo cellulare.

# Trascrizione del DNA Provirale

La trascrizione del DNA integrato comincia dalle regioni R e si genera l'mRNA genomico e, a seguito di reazioni di splicing, mRNA subgenomico



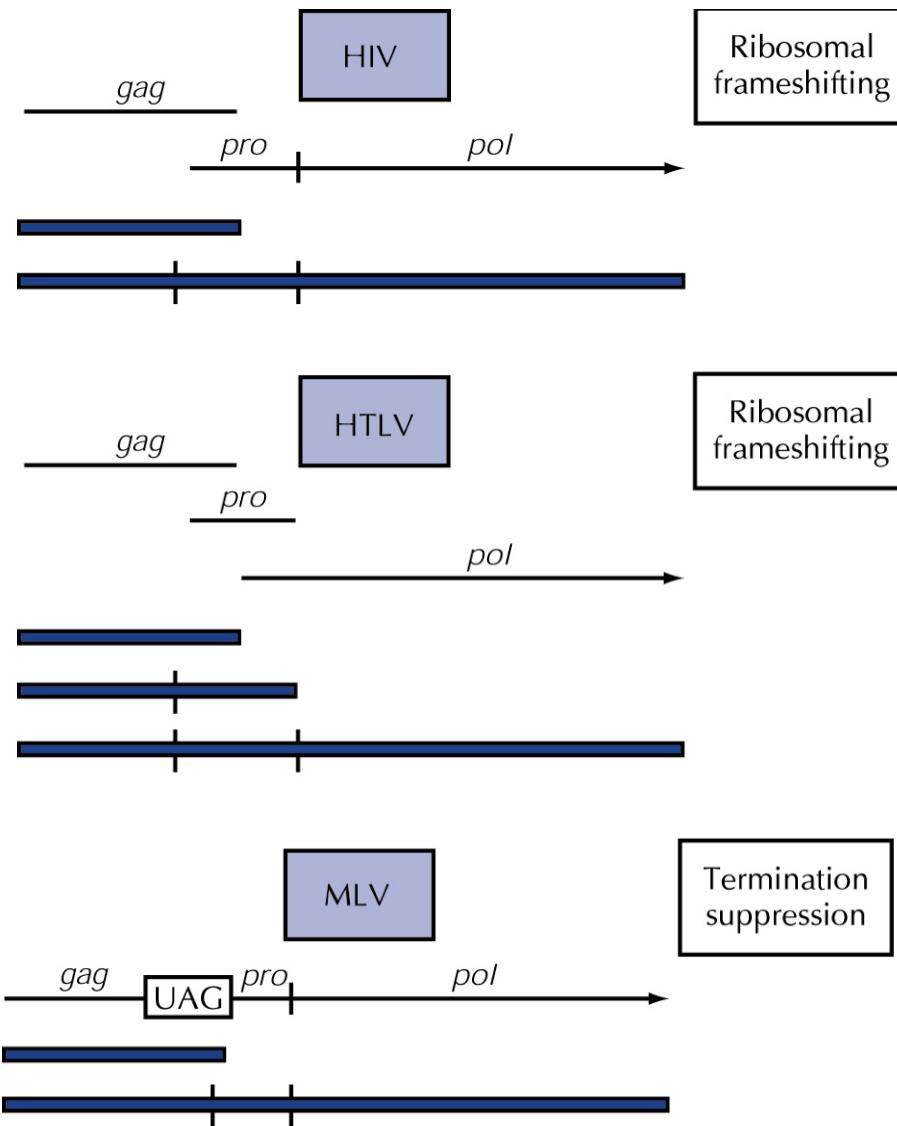
# Espressione retrovirus

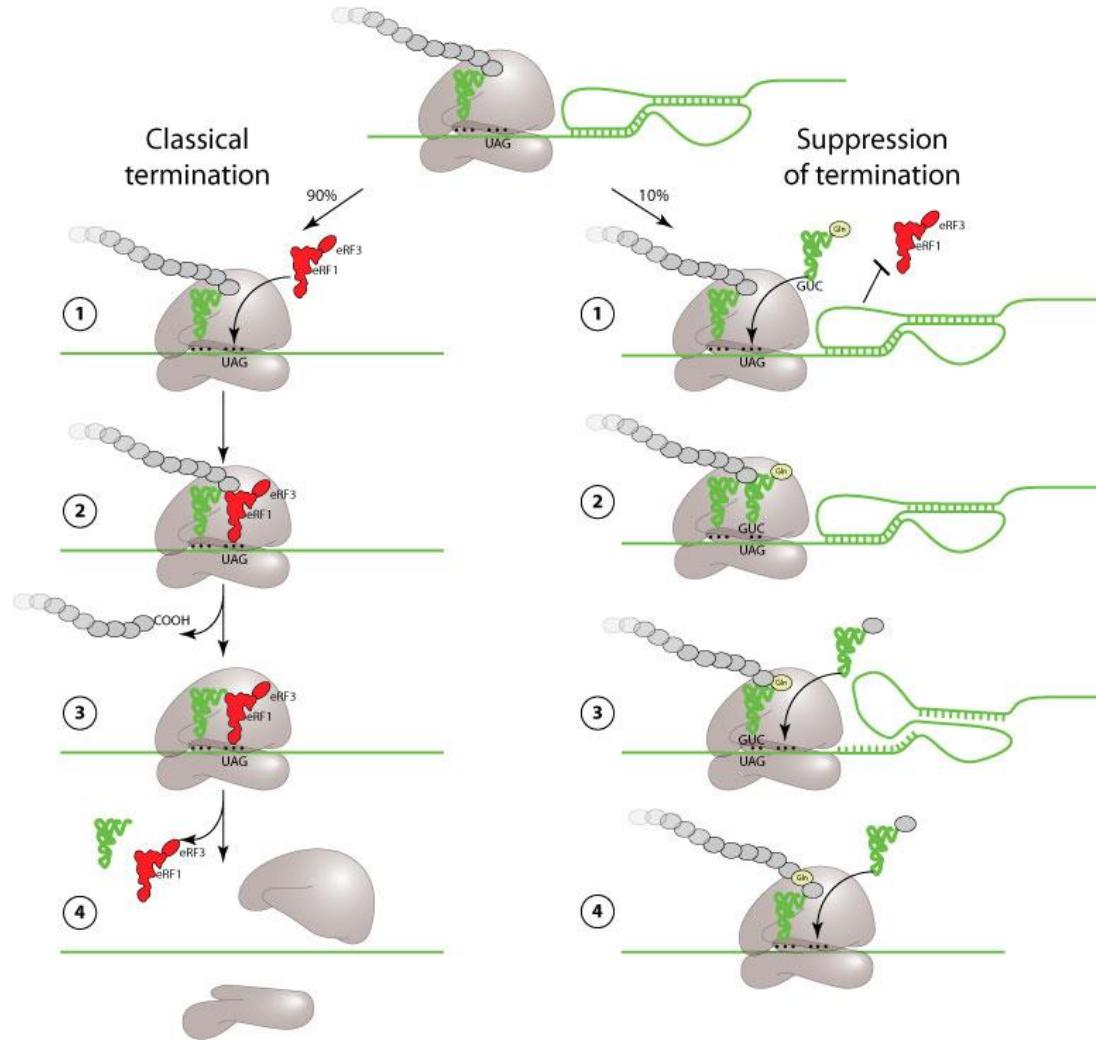


(b)

# Traduzione RNA genomico

UUUAAAC  
slippery sequence

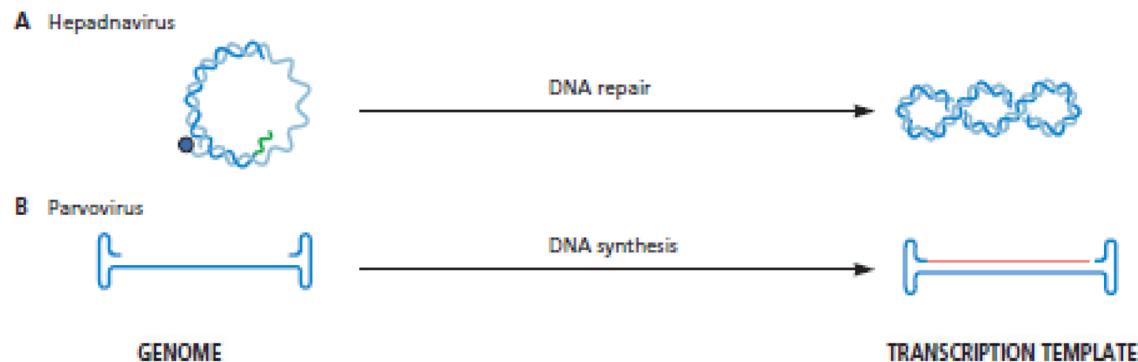




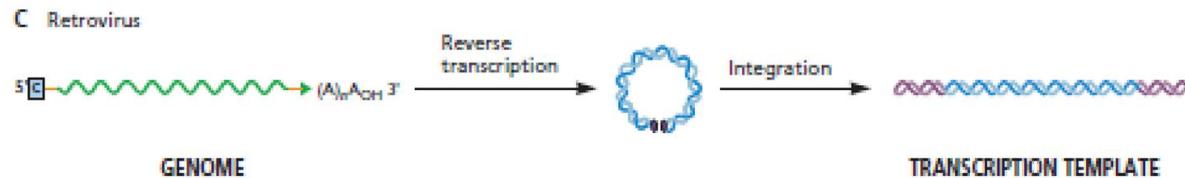
**Suppression of termination** (also referred to as stop codon readthrough) is an alternate mechanism of translation to produce a protein with an extended C-terminus.

# 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



## I Virus a DNA

I virus della classe VII (Hepadnavirus): hanno un genoma a DNA a Doppio filamento parziale, circolare aperto, con associata la DNA polimerasi RNA-dipendente

Hepadnavirus: Dei quali l'unico patogeno per l'uomo è il virus dell'epatite B. Questi virus hanno un genoma circolare costituito da DNA bicanettario con un'interruzione nella catena a polarità positiva. Mediante **enzimi cellulari nucleari di riparo**, il tratto mancante viene sintetizzato con produzione di una molecola interamente bicanettaria che si superavvolge.

Successivamente, ad opera di **enzimi cellulari nucleari**, vengono trascritti una serie di mRNA subgenomici che codificano per le proteine strutturali e un RNA genomico che, incorporato nel nucleocapside, verrà **retrotrascritto in DNA dalla DNA-polimerasi RNA-dipendente virale, seguita dalla sintesi della catena DNA complementare**

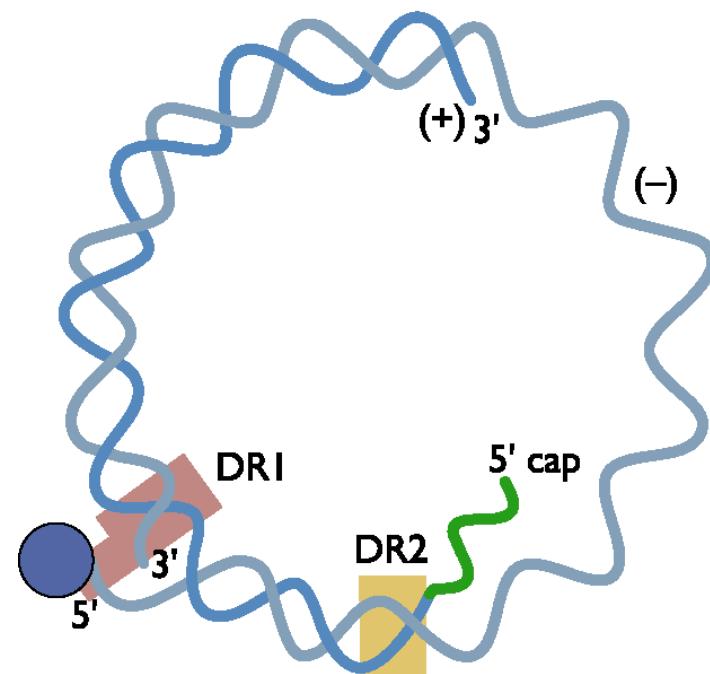
## Classe VII, Hepadnaviridae (HBV): dsDNA con intermedio a RNA

Doppio filamento parziale, circolare aperto, con associata la DNA polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa) al 5' del filamento (-)

Filamento (-) circa 3.2 kb, filamento (+) variabile nelle diverse particelle, 1.7-2.8 kb

Il filamento (+) presenta un RNA con cap al 5'

Alle terminazioni 5' sono presenti delle corte sequenze ripetute (DR1 e DR2), importanti durante la retrotrascrizione

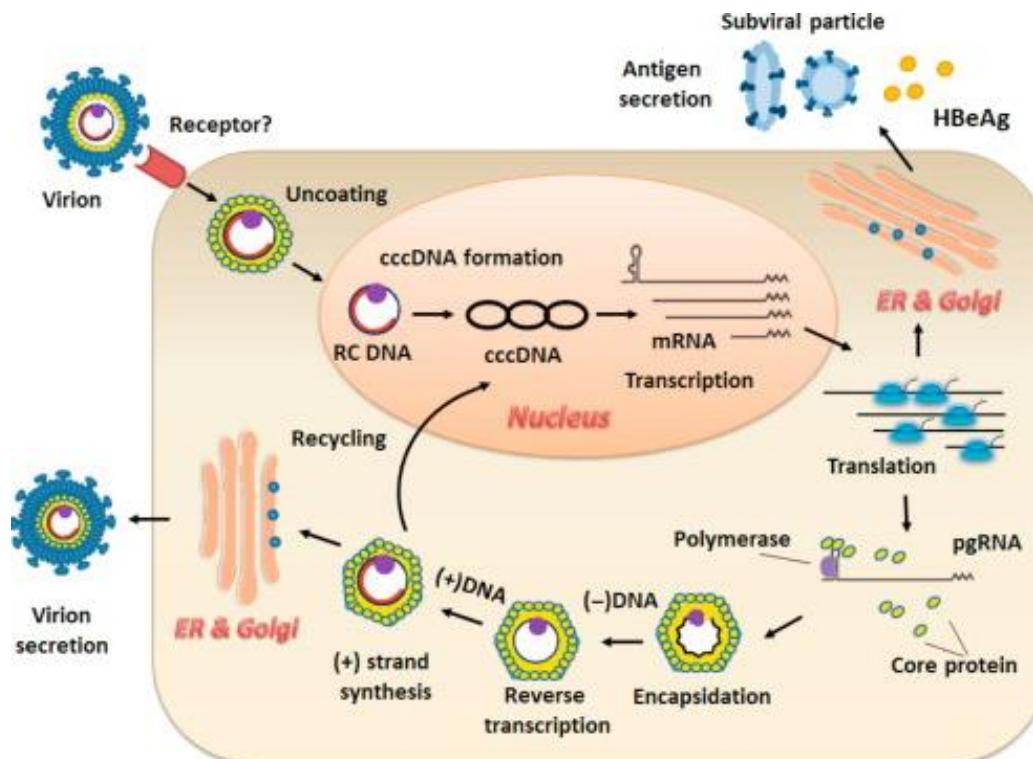


# Espressione-Replicazione Classe VII: dsDNA con intermedio a RNA (HBV)

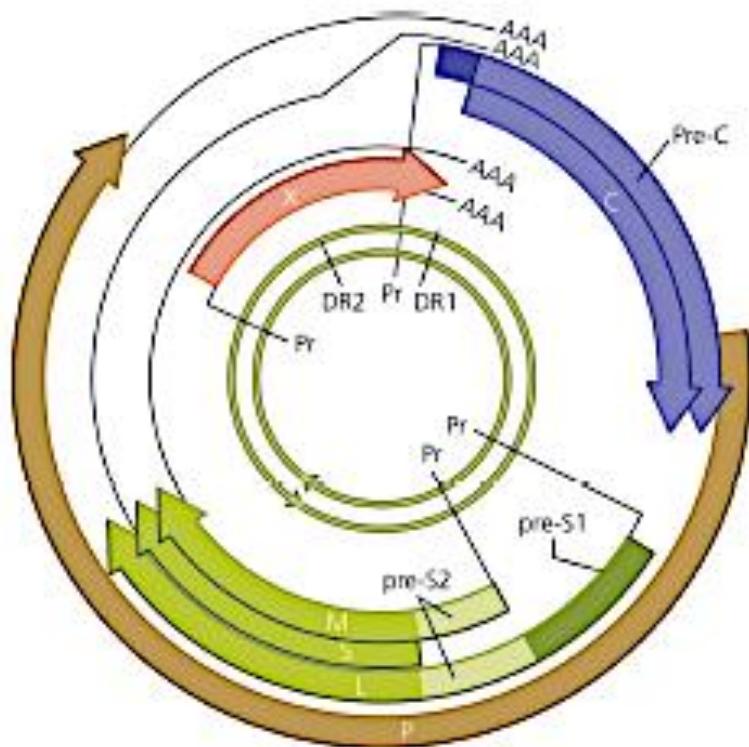
Anche questo gruppo di virus utilizza la trascrittasi inversa

Al contrario dei retrovirus la retrotrascrizione avviene all' interno della particella in maturazione

All'inizio dell' infezione il primo evento è il completamento della sintesi del filamento incompleto (RC-DNA) con formazione del cccDNA.



# Classe VII, Hepadnaviridae (HBV): Espressione

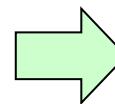


- Stampo: **cccDNA (covalently closed circular DNA)**
- RNA polimerasi: **cellulare (RNA pol II)**
- Trascritti **senza introni**
- Stesso sito di poli-adenilazione **per tutti gli RNA virali**
- **Quattro classi** di trascritti:
  - **3.5 kb**
  - **2.4 kb**
  - **2.1 kb**
  - **0.7 kb**

# Traduzione degli mRNA

Traduzione degli mRNA nell'ospite: meccanismo di 5' scanning (ribosomi iniziano dal primo AUG che incontrano)

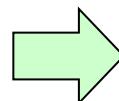
HBsAg (L, M, S)  
HBcAg (C)  
HBeAg  
X



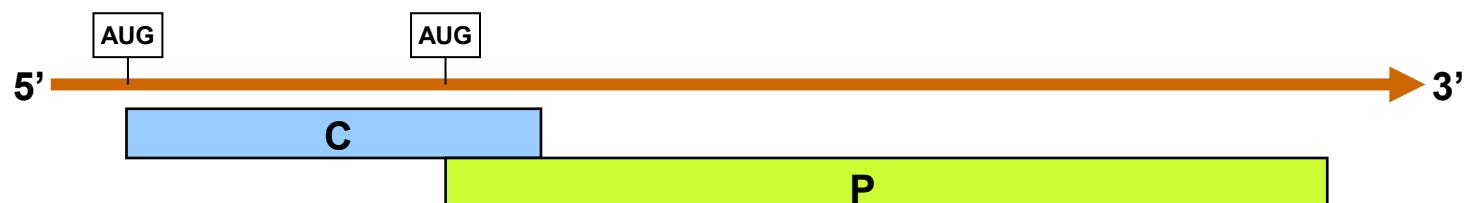
traduzione dal 1°  
AUG

**Eccezione:**

Polimerasi



traduzione con modalità ignote  
da AUG interno del pgRNA



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

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

# Replicative Cycle

**Attacco (adsorbimento)** del virione alla cellula ospite suscettibile ed interazioni con lo specifico recettore

**Penetrazione** del virione o del suo genoma all'interno della cellula

**Uncoating (spoliazione)** del genoma virale ed esposizione al macchinario genetico/biosintetico della cellula ospite

**Fase di espressione precoce** del genoma virale, in cui il macchinario biosintetico della cellula ospite è modificato, come preludio alla sintesi di acidi nucleici virali. In questa fase vengono prodotti enzimi virus specifici, prima ondata di espressione del genoma virale

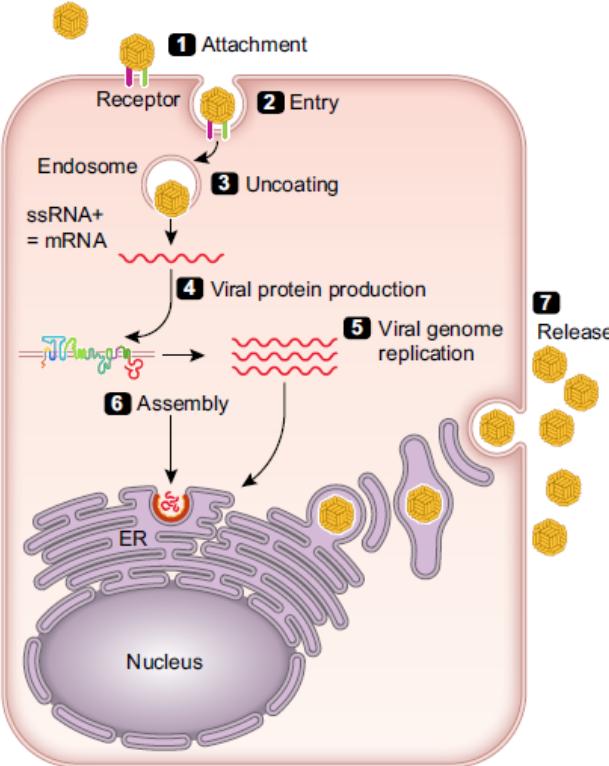
**Replicazione** del genoma virale

**Sintesi delle componenti virioniche** che includono le subunità proteiche del capsid e le proteine associate all'involucro pericapsidico

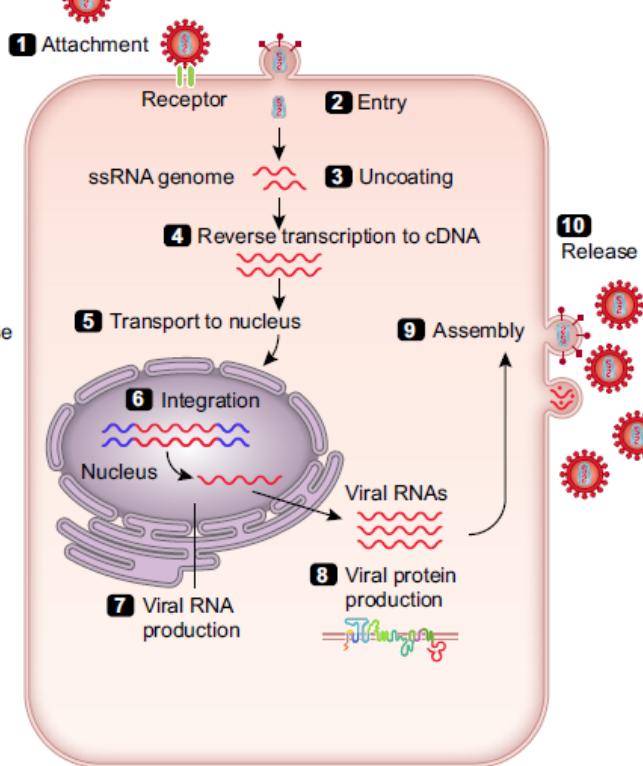
**Assemblaggio** delle subunità proteiche (e dei componenti di membrana per i virus rivestiti) e **impacchettamento** del genoma nelle nuove particelle virali

**Rilascio** dei virioni maturi dalla cellula

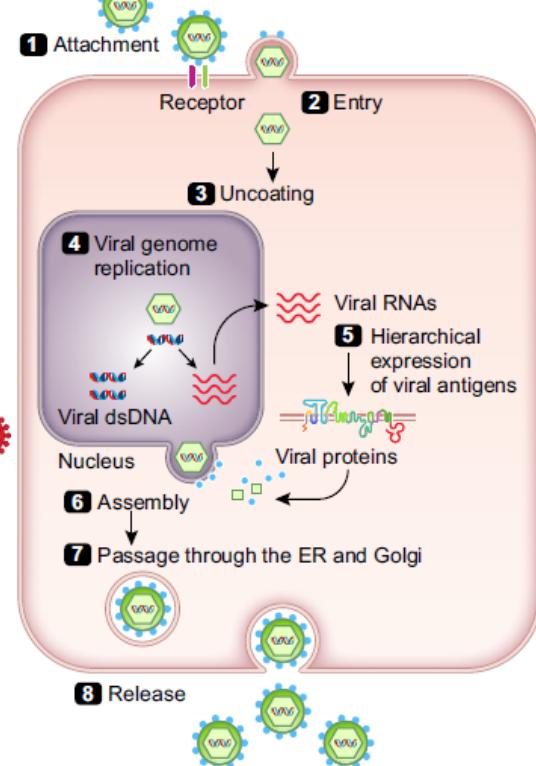
### A Flaviviridae



### B Retroviridae



### C Herpesviridae



## **ASSEMBLY, MATURATION & RELEASE OF NEW VIRIONS**

# VIRIONS RELEASE & MATURATION

## VIRIONS RELEASE

### 1. CELL LYSIS: NAKED VIRUSES

- Assembly in the cytoplasm (RNA virus) or in the nucleus (DNA virus)
- Virus release by cell lysis (destruction)

### 2. PLASMA MEMBRANE BUDDING : ENVELOPED VIRUSES (+++)

Assembly and release are closely associated.

from cell membrane regions where viral envelope proteins have been addressed.

No cell lysis → long period of virus release

### 3. EXOCYTOSE : ENVELOPED VIRUSES

When envelopment at the ER/Golgi

Reduce exposition of viral proteins to the cell surface

### 4. CELL to CELL: ENVELOPED VIRUSES

Without exposition to the extracellular environment

## MATURATION

Late in assembly or even following virions release

Proteolytic cleavage of structural viral proteins by viral protease



# NUCLEOCAPSID ASSEMBLY

➤ **Capsid proteins are addressed to the assembly site:**

Synthetised by ribosomes in the cytosol

- most DNA virus → move to the nucleus
- most RNA virus → stay in the cytoplasm

➤ **Viral genomes contain encapsidation signals**

➤ **Self-assembly process**

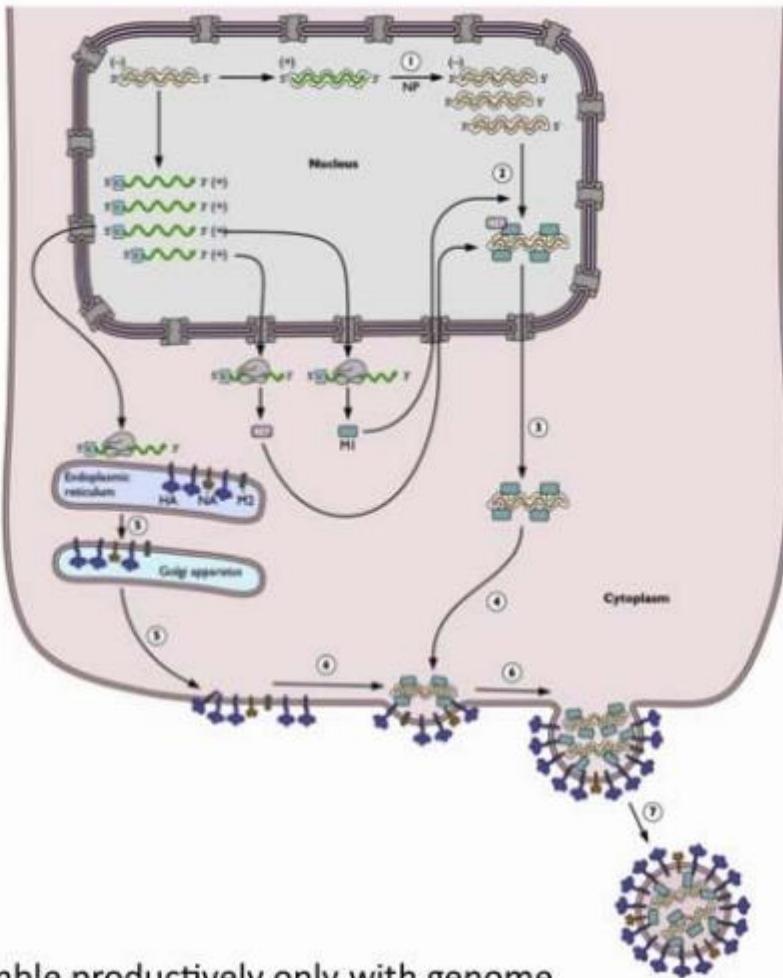
Capsid proteins

- assemble around new viral genomes
  - or
- make procapsids permeable to new viral genomes

# Assemblaggio del capsid e impacchettamento del genoma

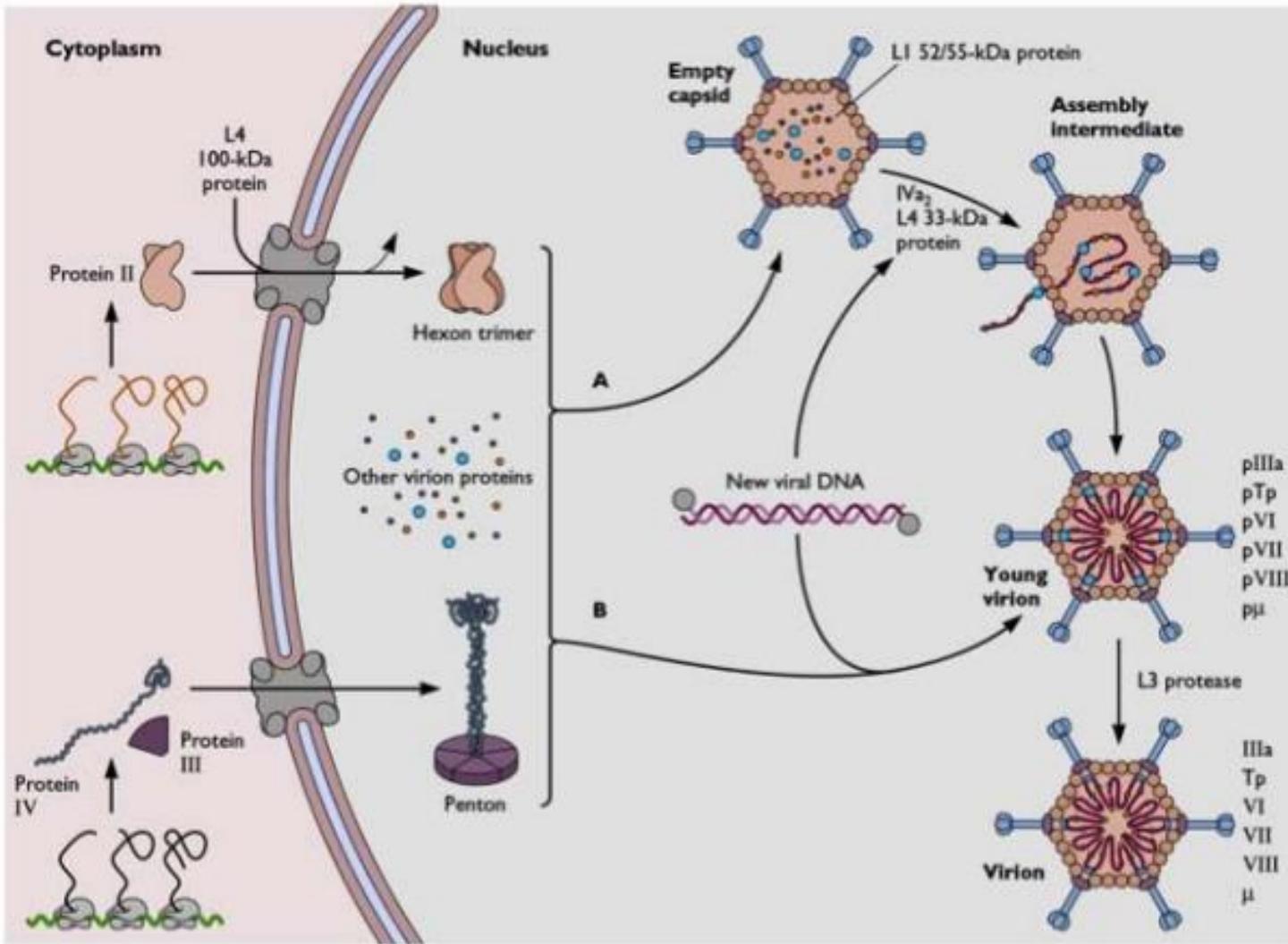
- Il sito di assemblaggio e impacchettamento dipende dal sito di replicazione e/o dal meccanismo attraverso il quale il virus viene rilasciato
- Nei picornavirus, **poxvirus**, reovirus e Mononegavirales l'assemblaggio avviene nel citoplasma
- Negli adenovirus, poliomavirus, parvovirus, herpesvirus **orthomyxovirus**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

# Virion Assembly



**Concerted assembly**  
Influenza virus

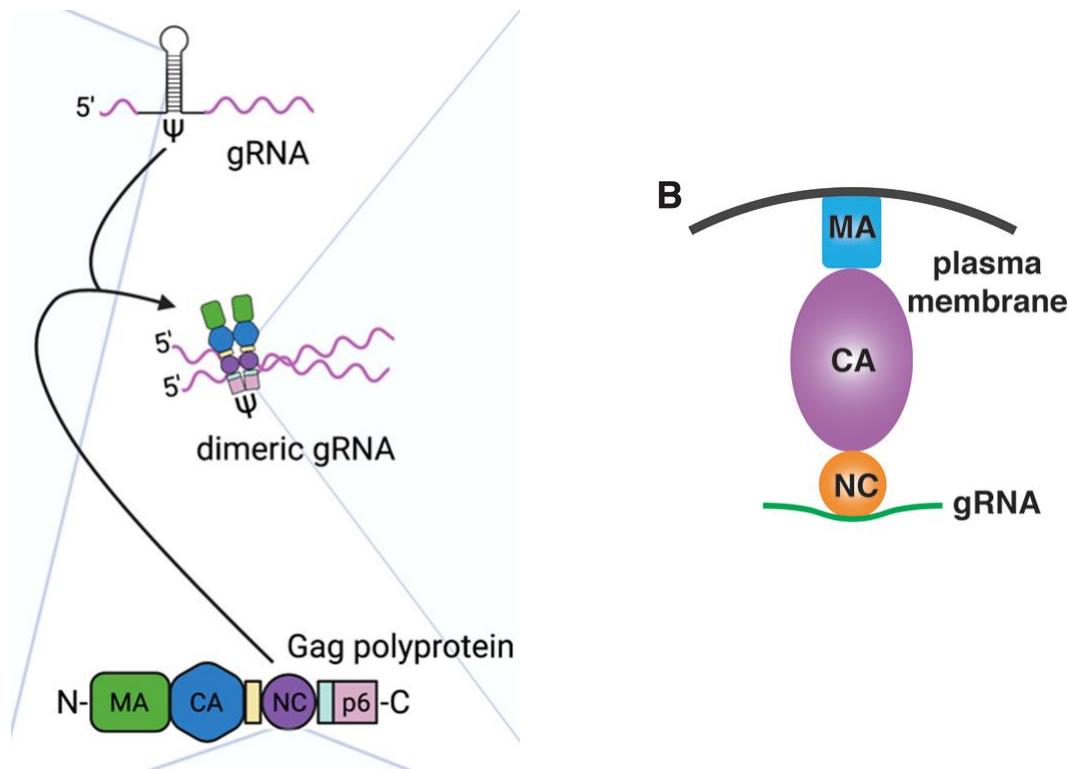
Structural units of shell assemble productively only with genome



**Sequential Assembly**  
Adenovirus

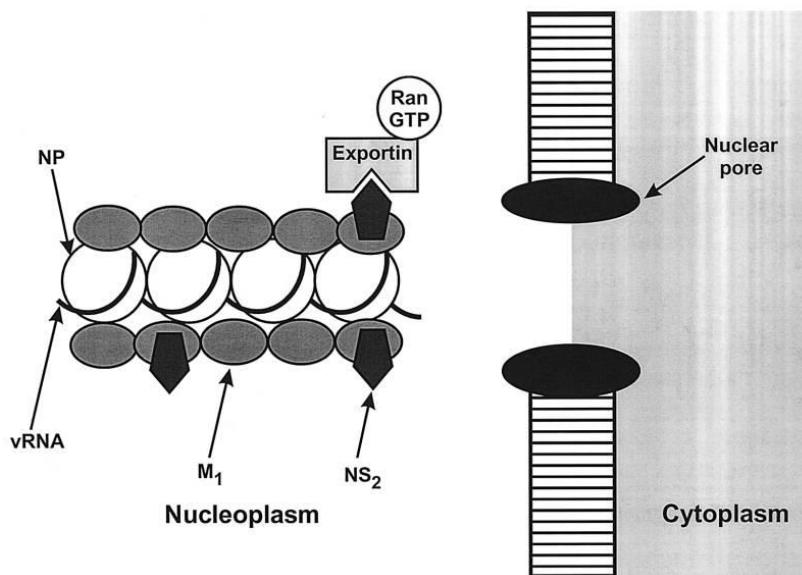
Viral genome is inserted into a preformed shell

# Packaging retrovirus (citoplasma)

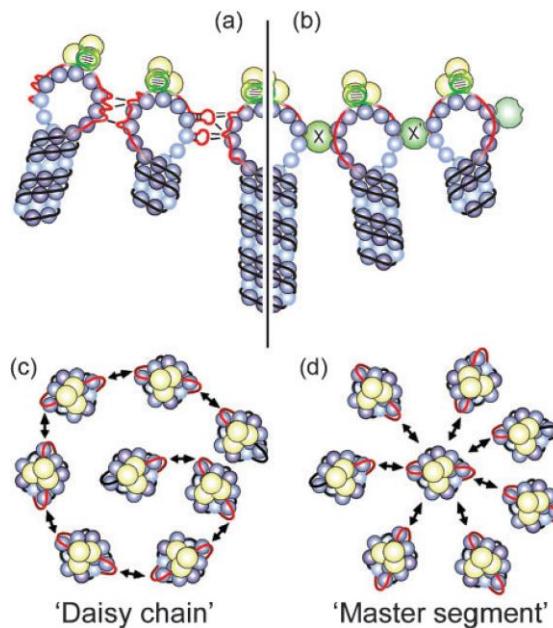
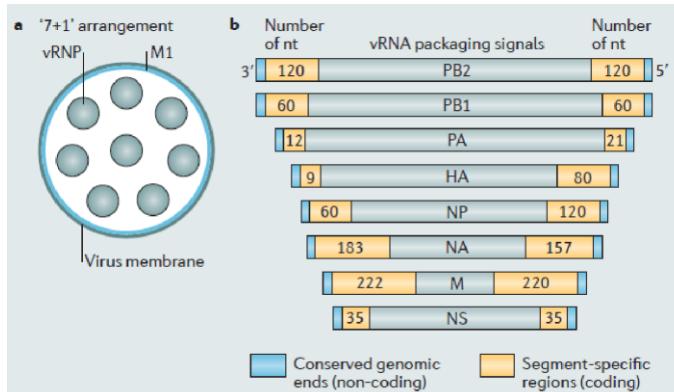


## vRNP nuclear export

- 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



# Rilascio

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 tramite

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

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.

# Acquisizione dell'envelope

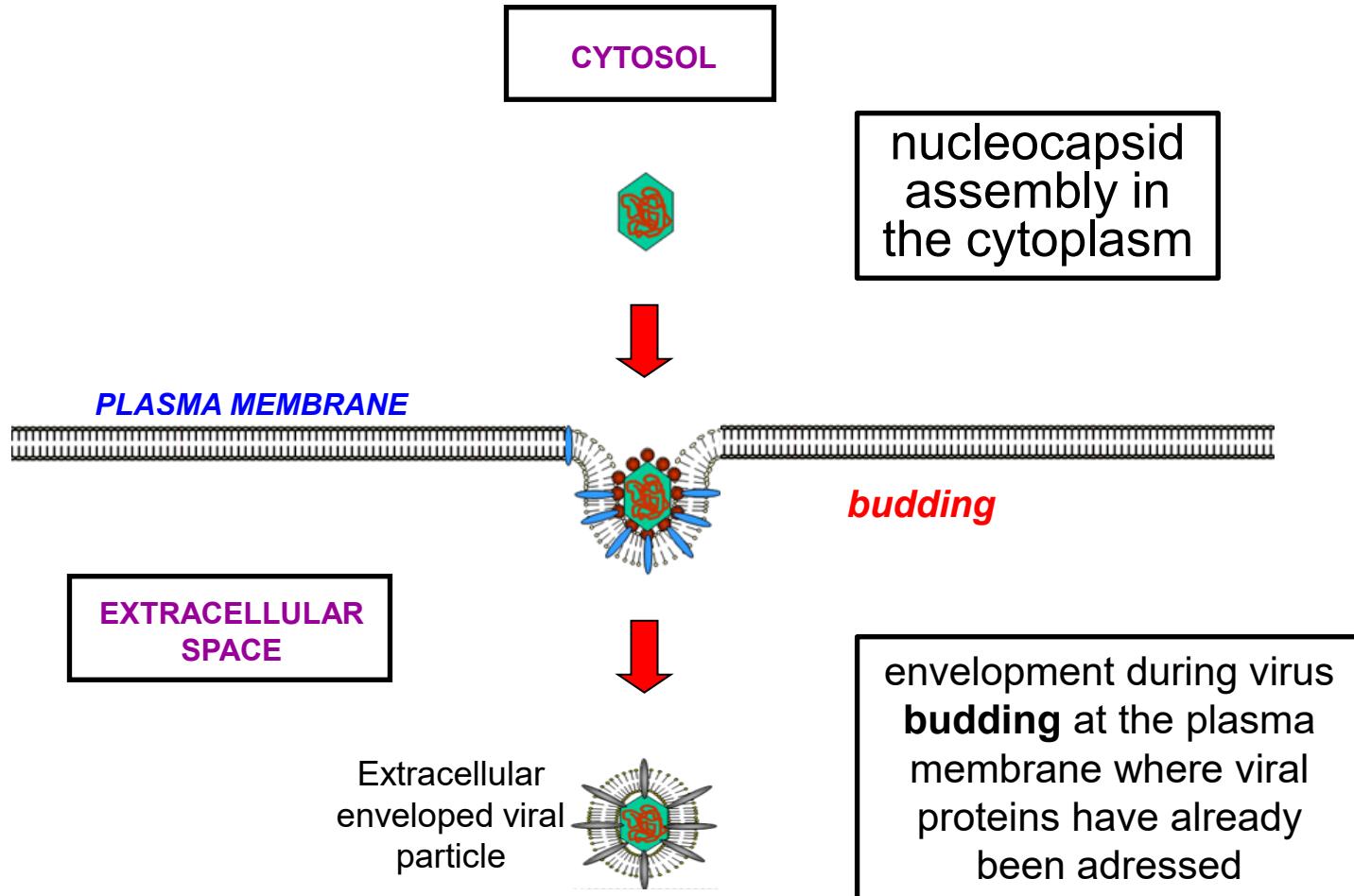
## ➤ ENVELOPE GLYCOPROTEINS:

synthesised by ribosomes associated to RER  
inserted, via an hydrophobic sequence in the RER membrane  
glycosylation (RE + Golgi), vesicle transport (proteolytic cleavages) to a cellular membrane

## ➤ Envelopment

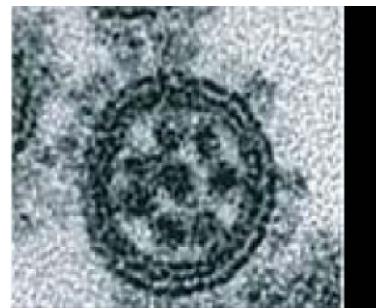
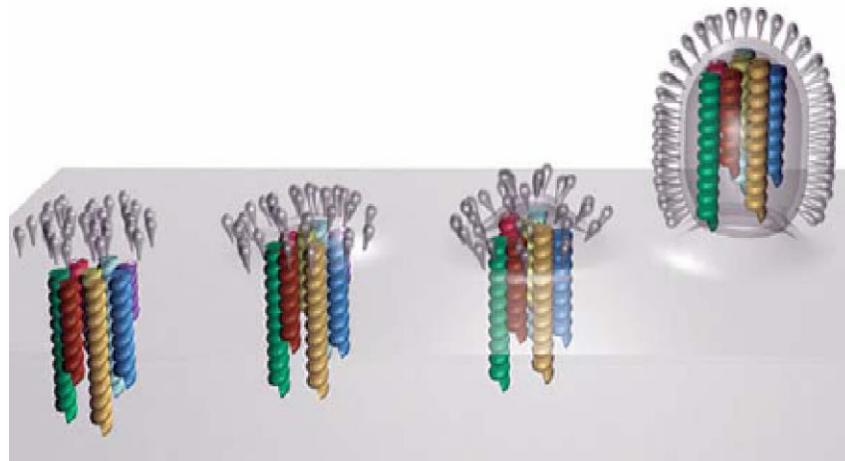
- at the plasma membrane
- in the ER/Golgi

*The most frequent case*



# Life cycle (budding)

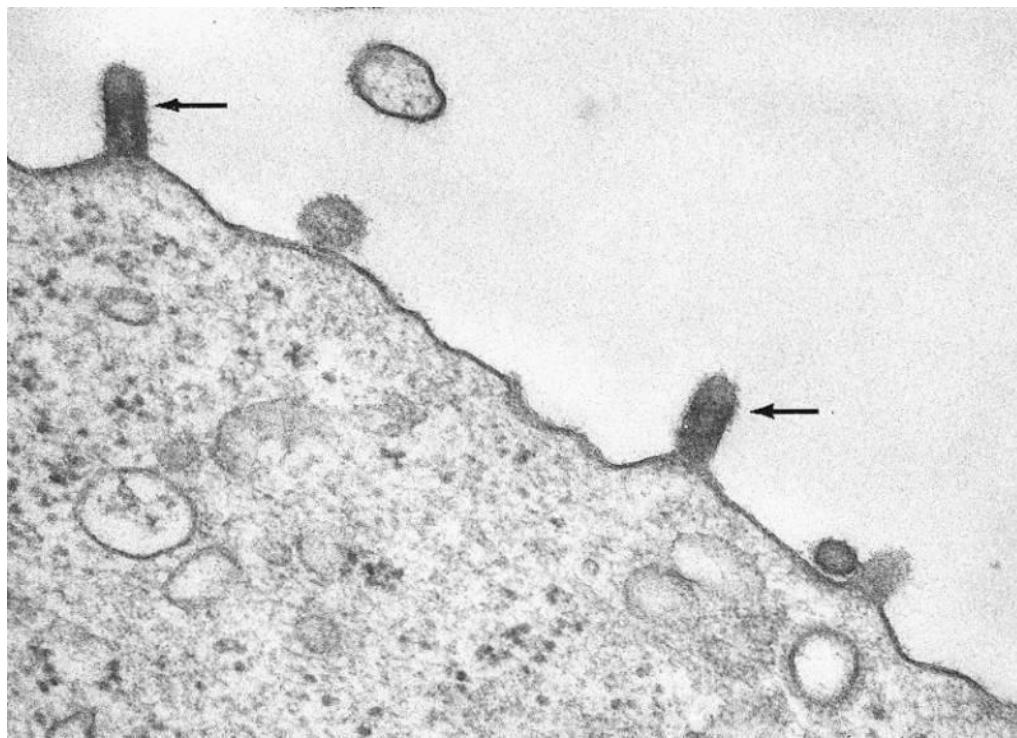
The new viral particles are gradually released by budding from the cell for a period of few hours. The cells are not lysed, but eventually die (due to interference with the normal synthesis of cellular macromolecules)



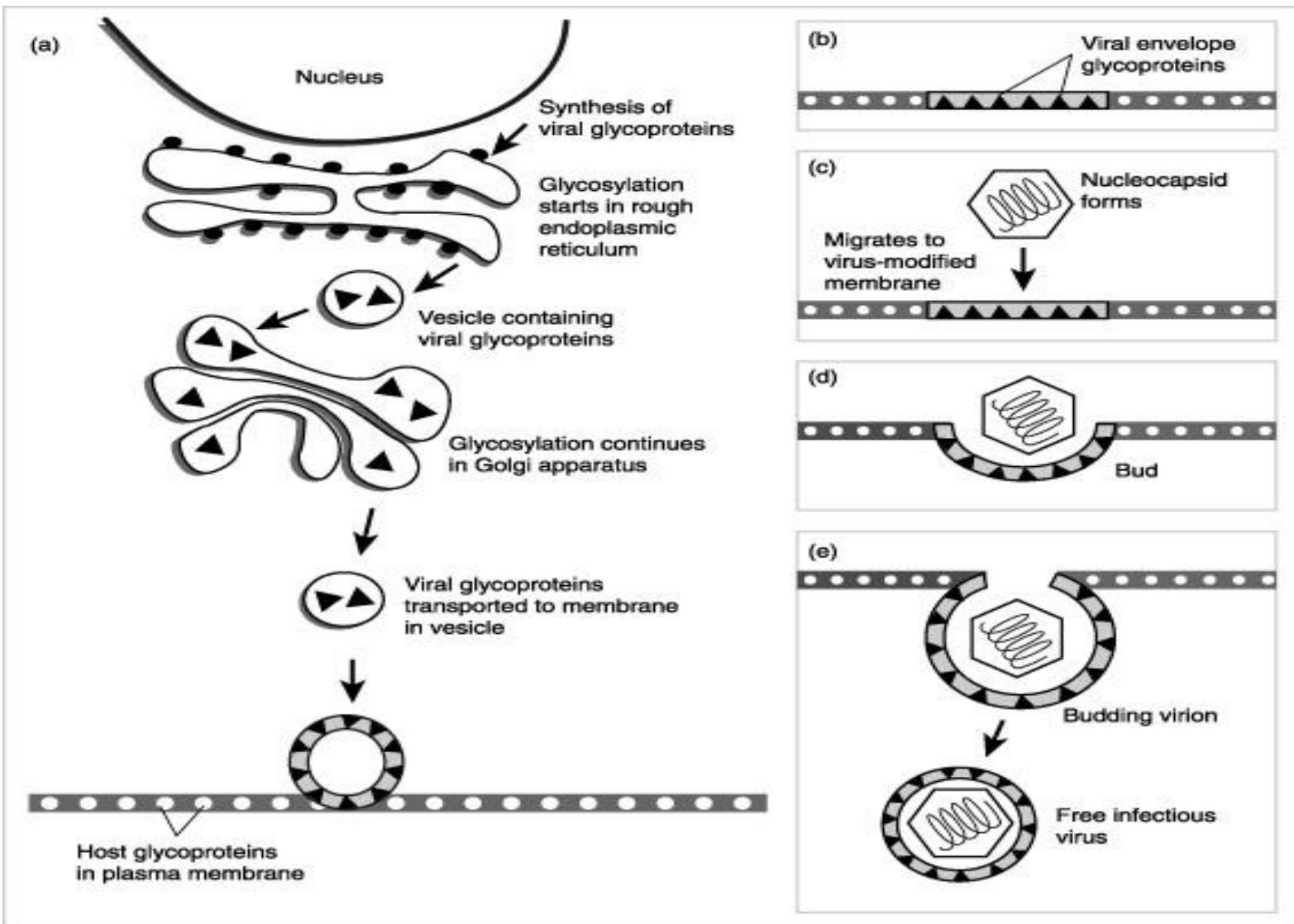
Nature 439, 490-2, 2006

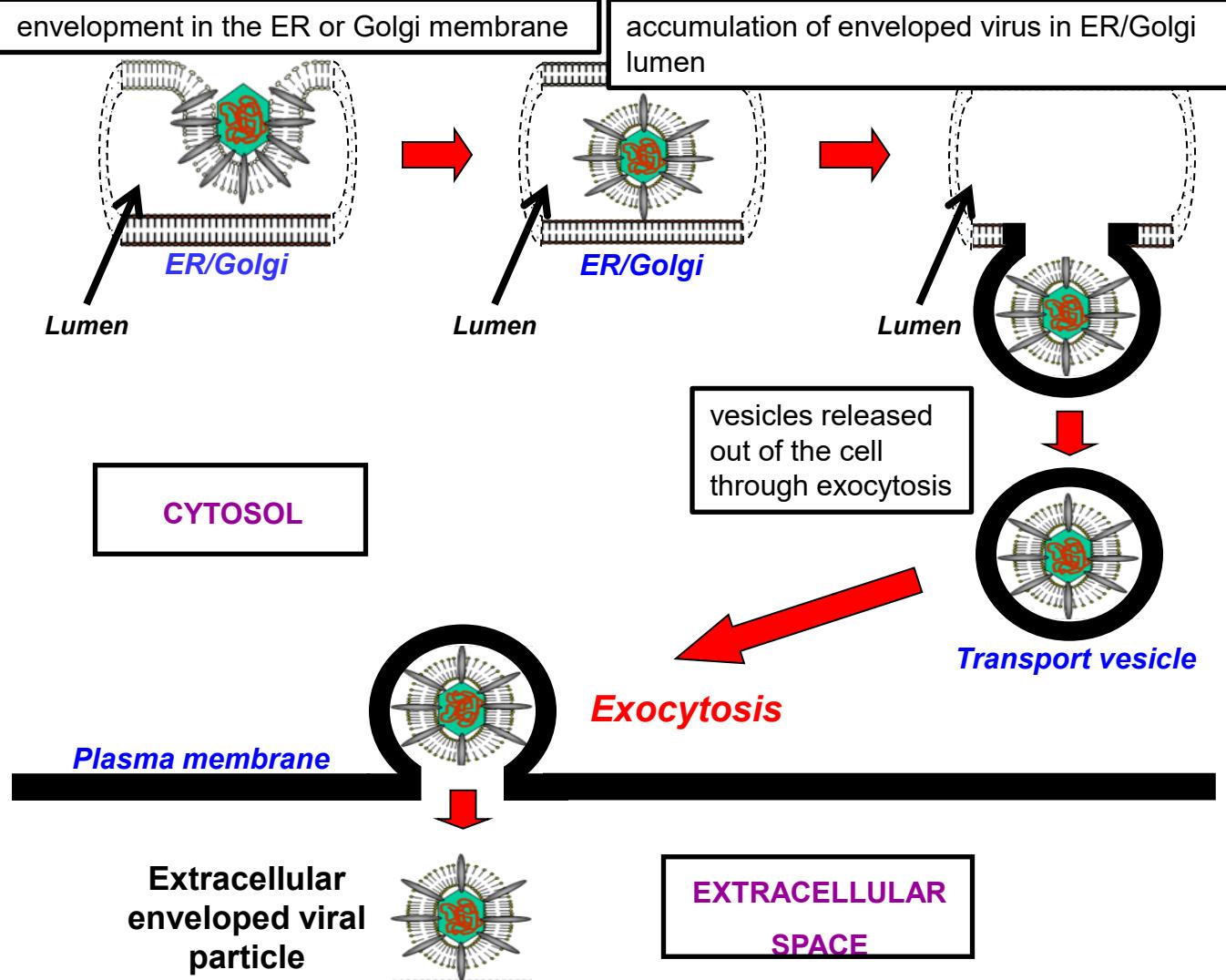
*Nature* 439, 490-492(26 January 2006)

## Fotografia al microscopio elettronico



# GEMMAZIONE

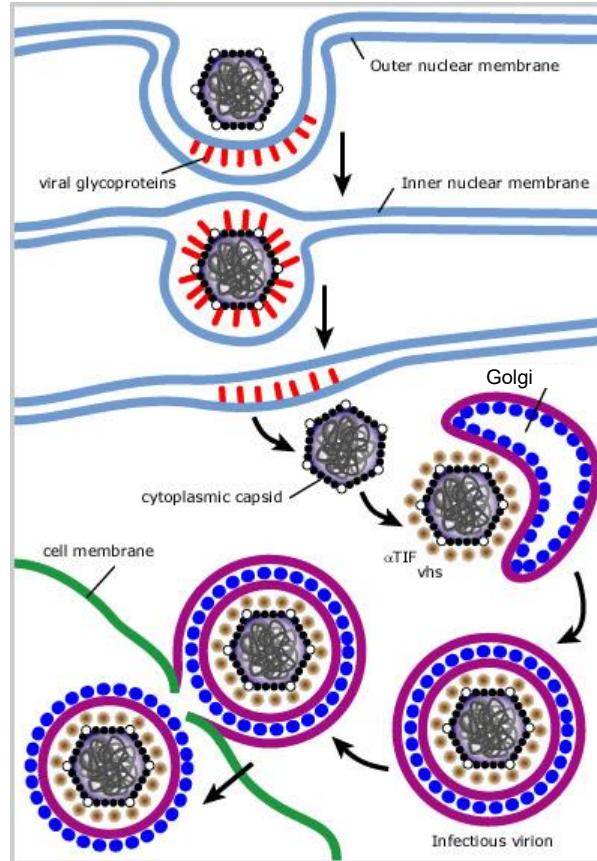




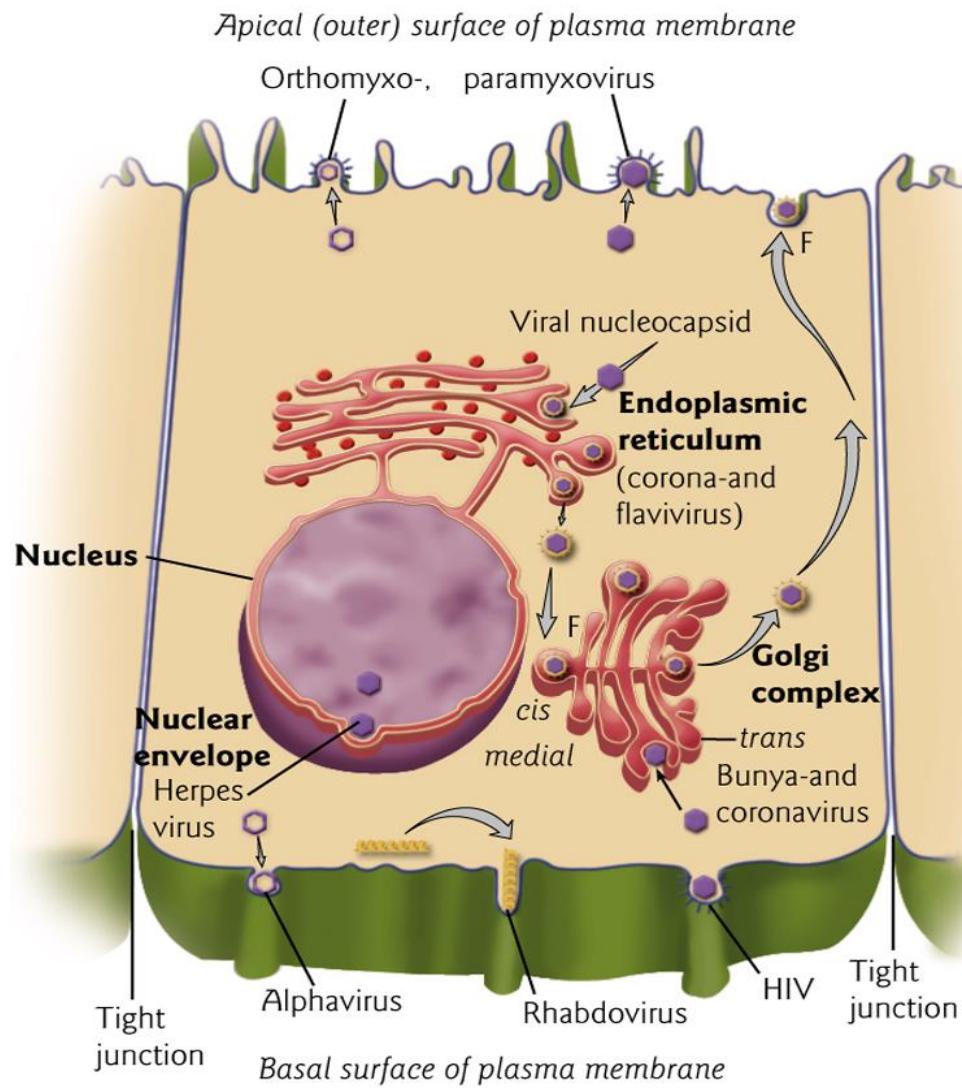
# GEMMAZIONE (HSV-1)

**Acquisizione del pre envelope nel nucleo  
Spoliazione e  
riacquisizione  
dell'envelope dal Golgi**

**Uscita dalla cellula per  
esocitosi**



# GEMMAZIONE



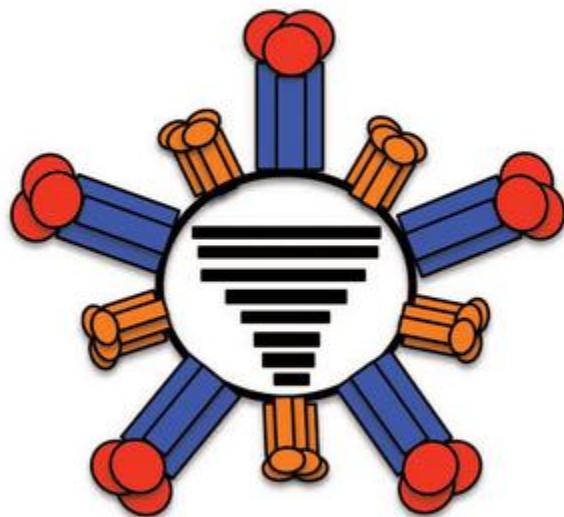
# Maturazione

La maturazione è lo stadio del ciclo replicativo durante il quale il virus diventa infettivo

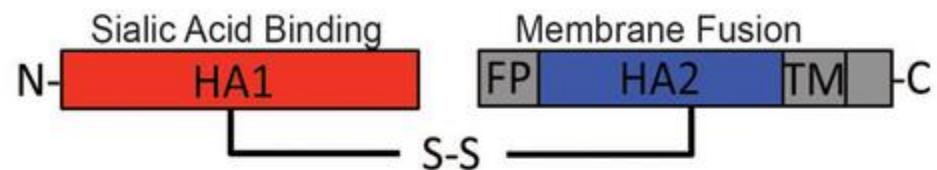
- Comprende modificazioni strutturali del virione che possono essere il risultato di processamenti specifici delle proteine del capsid o modificazioni conformazionali durante l'assemblaggio
- Proteasi virali sono spesso coinvolte nel processo di maturazione, sebbene alcune volte possono intervenire sia 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

## HA0 maturation to HA1 and HA2 before assembly

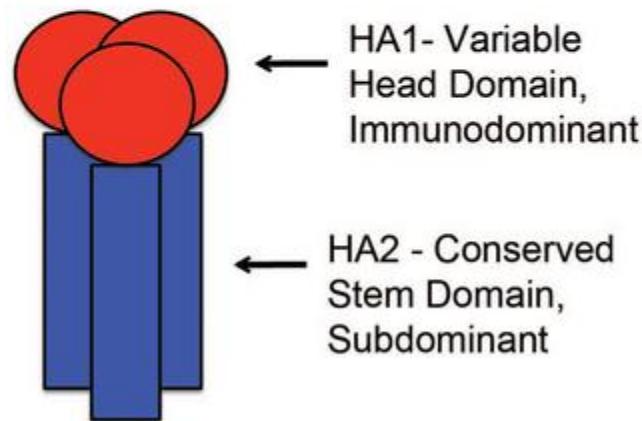
A



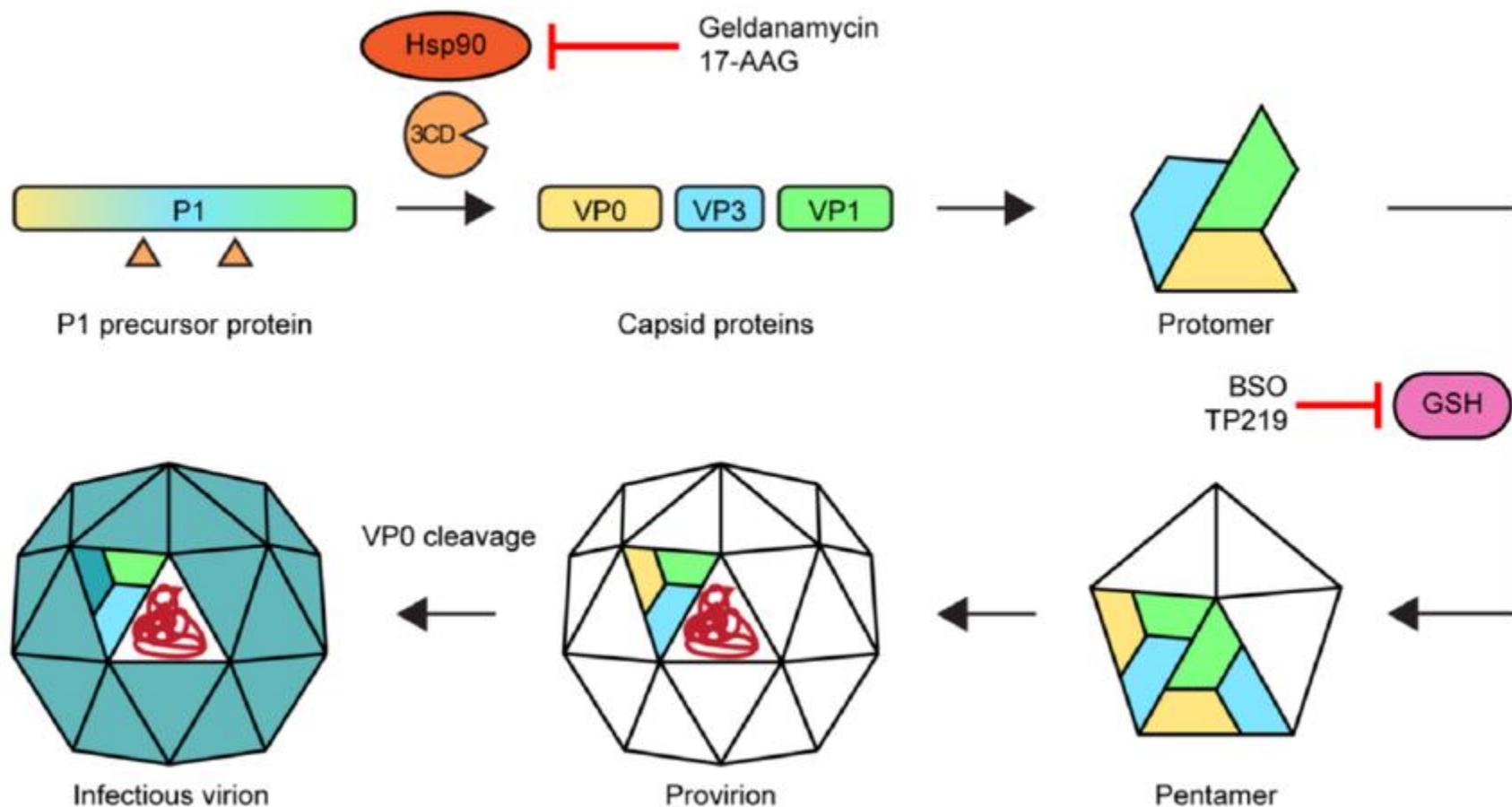
B



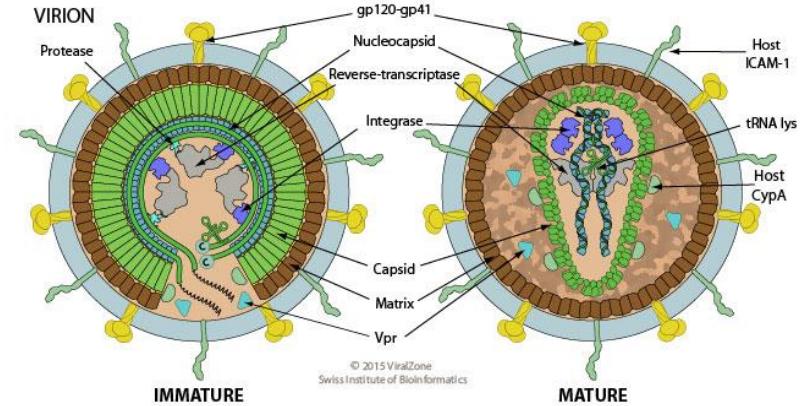
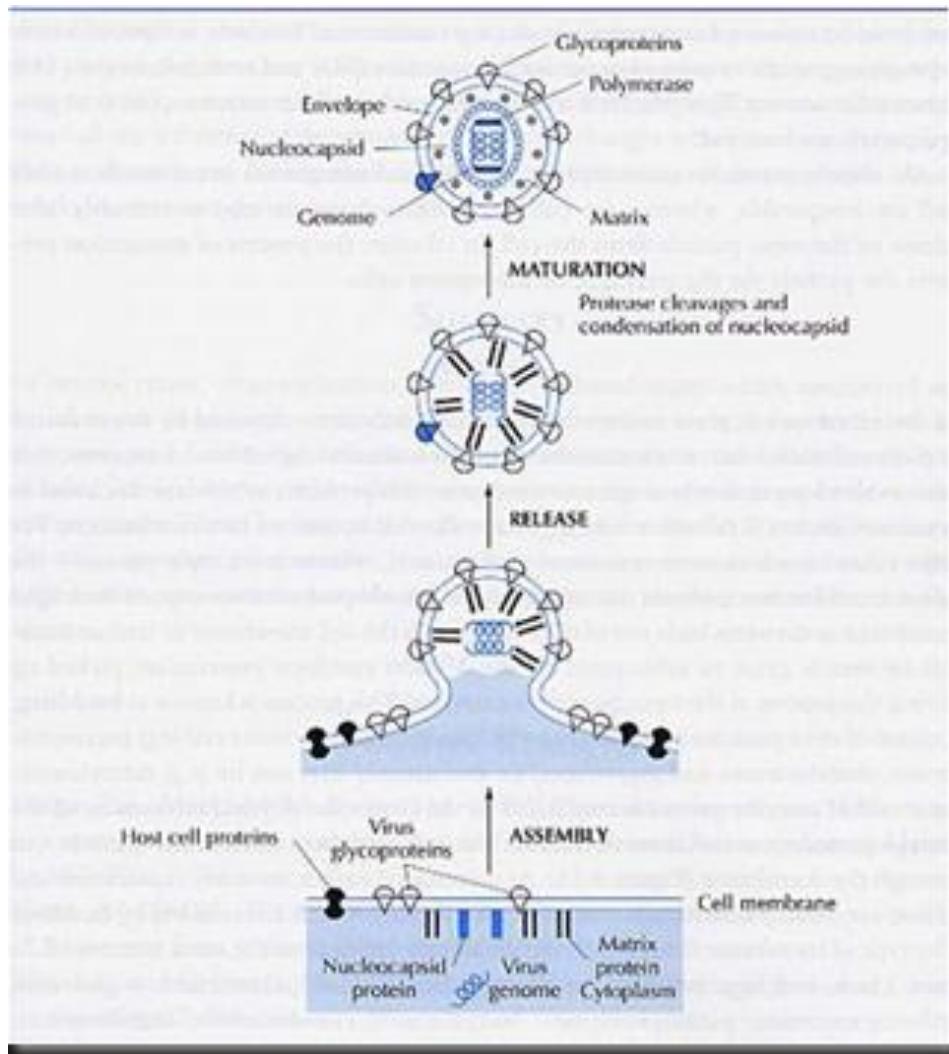
C



## VP0 maturation to VP2 and VP4 after assembly (poliovirus)



# Retrovirus: maturazione dopo il rilascio ad opera della proteasi virale che taglia la poliproteina gag in matrice, capsid e nucleocapside



HIV inserisce proteine cellulari nell'envelope

