

1. Cicli replicativi: classe I, genoma a dsDNA trascritto da un RNA polimerasi spesso dall'RNA polimerasi della cellula ospite per produrre un messaggero. Una volta che questo genoma a doppio filamento viene liberato dove deve essere liberato su stampo di DNA viene trascritto un mRNA; **classe II**, genoma a ssDNA + o -, succede la stessa cosa della prima classe ossia questo ssDNA deve essere convertito in un dsDNA che può essere poi essere letto da un'RNA polimerasi per la trascrizione dei vari messaggeri virali; **classe III** dsRNA che per produrre un mRNA trascrivono il filamento "-." di RNA che compone il dsRNA del loro genoma; **classe IV** ssRNA +, cioè il loro genoma è già un mRNA e quindi verranno direttamente tradotti; **classe V** ssRNA -, quindi questo genoma non è un mRNA ma è un suo antisenso quindi dovrà essere trascritto e verrà usato come stampo di trascrizione di mRNA da parte di un enzima viro-specifico che è un RNA polimerasi che dovrà essere RNA dipendente; **classe VI** ssRNA +, ma al contrario dei virus appartenenti alla classe quarta questo genoma non viene immediatamente tradotto ma viene utilizzato come stampo da un particolare enzima, la trascrittasi inversa la quale lo converte in una molecola di dsDNA e a questo punto questo intermedio di replicazione dei retrovirus sarà lo stampo usato dall'RNA polimerasi II dell'ospite per trascrivere i messaggeri virali; **classe VII**, che viene definita tale non per la strategia che usa per sintetizzare il messaggero in quanto si comporta come la classe I perché presenta un genoma a dsDNA, ma perché è una vera e propria settima classe di replicazione per quanto riguarda il percorso attraverso il quale genera i nuovi genomi virali a dsDNA.

2. Gli IRES servono per la traduzione? No. Gli IRES o siti d'inizio interni per i ribosomi sono particolari strutture che si possono trovare al livello del 5' di alcuni mRNA e in particolare favoriscono la traduzione di mRNA privi del cap al 5' come ad esempio nei Picornaviridae → questa sequenza al 5' è altamente strutturata ed ha una forma a quadrifoglio: è importante durante il processo di replicazione perché interagisce con alcune proteine di questo genoma e ne permette la replicazione. In particolare è importante per la sintesi del filamento '-' (meno).

3. Trasfezione: si intende un genoma nudo di un virus che è rapidamente infettivo, perché si può prendere la sequenza nucleotidica semplice di questo genoma nudo, privo di qualsiasi proteina associata, si può trasferire, introdurre all'interno della cellula, poiché il genoma di un virus della IV classe non è altro che un RNA messaggero e viene riconosciuto immediatamente dalla cellula come tale e viene immediatamente tradotto. A questo punto vengono prodotte le proteine virali che si occuperanno della replicazione e quindi di produrre nuovi genomi virali, altre proteine virali e si formeranno nuove particelle virali.

4. Le particelle virali si replicano per divisione? No. I virus si moltiplicano; i virus sono metabolicamente inerti e incapaci di moltiplicarsi per divisione binaria. Si moltiplicano attraverso la replicazione separata dei diversi componenti del virione e il successivo assemblaggio dei componenti virali neofornati nella progenie virale. La moltiplicazione avviene quando il virus, penetrato nella cellula, è stato denudato dalle protezioni proteiche.

5. Tropismo: la tendenza di un microrganismo o di un farmaco di localizzarsi o accumularsi prevalentemente in determinati organi o apparati.

6. Mescolamento fenotipico: quando il genoma di un virus viene incorporato nel capsido di un altro virus della stessa specie ma con caratteri antigeni diversi (transcapsidazione).

7. Mescolamento genotipico: quando i nucleocapsidi di due virus correlati ma differenti per qualche carattere genetico sono inglobati nello stesso involucro pericapsidico. Si ha così la segregazione dei due genotipi.

8. Interferenza: la presenza di un virus in una cellula impedisce la moltiplicazione di un altro virus superinfettante. Tale interferenza può essere causa della produzione di interferon.

9. Complementazione: la moltiplicazione di uno o più virus in una infezione virale doppia o multipla, è dovuta all'utilizzazione di proteine del genoma di un virus coinfettante. Si può verificare tra virus della stessa specie o molto diversi.

10. Il DNA di Poliomavirus è superavvolto? Sì. Il genoma di SV40, ad esempio, è composto da dsDNA circolare ed all'interno del virione è in configurazione superavvolta; infatti il genoma è complessato agli istoni H2A, H2B, H3 e H4 a formare un minicromosoma

11. Gli RNA (+) sono modificati al 5'? Sì. In Picornavirus, ad esempio, l'estremità 5' è legata covalentemente ad una piccola proteina basica VPg e non presenta dunque il solito cap al 5' (la proteina non è analoga a un cap)

12. Gli RNA hanno tutti replicazione citoplasmatica? No. Ad esempio nella classe V gli Orthomyxoviridae replicano nel nucleo essenzialmente per due motivi: 1° gli mRNA subiscono splicing che avviene solo nel nucleo, 2° gli mRNA non hanno cap sul 5', quindi usano quelli dei trascritti primari della cellula

13. Gli RNA(-) non segmentati sono monocistronici? Sì. Troviamo ad esempio l'ordine dei mononegavirales: il loro genoma è cosiddetto monopartito, ovvero rappresentato da un'unica molecola di acido nucleico (rna a singolo filamento -)

14. Gli RNA(+) sono tradotti tutti come una singola poliproteina? No. In Togaviridae ad esempio vi sono due Orf che non vengono tradotte nello stesso momento e quella al 5' è tradotta all'inizio dell'infezione in due poliproteine e contiene l'informazione per le proteine non strutturali.

15. I Retrovirus sono gli unici ad avere la Trascrittasi Inversa? No. Nei retrovirus la trascrittasi viene usata subito con conversione immediata dell'RNA in un dsDNA, mentre nella VII classe la trascrittasi inversa viene usata alla fine del ciclo vitale per produrre nuovi genomi virali. Il trascritto di 3.5kb viene anche chiamato RNA pregenomico ed è esattamente quell'RNA che viene utilizzato come stampo della trascrittasi, cosicché inizierà produrrà nuovi genomi dal filamento -, inizierà la sintesi dal filamento +, che però verrà interrotto perché il capsido va incontro a maturazione e la retrotrascrizione si interrompe.

16. Il 2',5'-Oligo A sintetasi degrada l'RNA? Sì. Vi sono almeno quattro specie molecolari di 2',5'-Oligo A sintetasi introdotte da diverse forme di interferone che attivano un enzima; la RNasi L, che digerisce l'RNA genomici virali, gli mRNA virali e cellulari e gli RNA ribosomi cellulari.

17. Latenza: Intervallo di tempo che va da subito dopo la penetrazione del virus o del suo genoma, alla comparsa delle prime nuove particelle virali nell'ambiente extracellulare; nella fase di latenza il virus è entrato nella cellula, il genoma è stato esposto, stanno avvenendo le sintesi virali e non si trova virus infettante.

18. L'envelope ha una composizione lipidica uguale alla membrana plasmatica cellulare? Sì. In quanto deriva dalle membrane cellulari come risultato della gemmazione della particella virale.

19. Antigene T (SV40): Una volta che l'antigene viene prodotto va a legare la proteina del retinoblastoma e la proteina p53, la proteina del retinoblastoma è un controllore negativo del ciclo cellulare e la proteina p53 viene attivata in risposta a stress cellulare; large T lega queste due proteine, inibendone la funzione, poiché se questo virus infettasse una cellula quiescente allora questa non esprimerebbe le proteine che fanno parte dei complessi di replicazione del DNA, quindi il ciclo vitale del virus si fermerebbe con la liberazione del genoma nel nucleo. Ha anche altre importanti funzioni: si lega infatti all'origine di replicazione del genoma virale e questo lo fa dopo che ha riprogrammato la cellula, per dare segnale di inizio per la sintesi di DNA virale

20. I vaccini attenuati sono più efficaci per la replicazione virale? Sì. La risposta immunitaria è potente, quasi come se fosse indotta dal patogeno selvatico. Per quanto riguarda la sicurezza, essendo colture batteriche possono esserci contaminazioni a causa della loro dispersione in quanto organismo OGM. Conoscendo il microorganismo si può attenuare mutagenizzandolo, togliendo cioè le strutture che potenzialmente creano problemi e rafforzando quelle che stimolano il sistema immunitario.

21. Interferone: Gli interferoni fanno parte di una grande famiglia di proteine chiamate citochine e sono molecole che diffondendosi nei tessuti/organi in cui vengono prodotte, o in cui sono trasportate dal circolo sanguigno, permettono la comunicazione a distanza tra le cellule. Gli interferoni agiscono sulle cellule legandosi a molecole presenti sulla superficie cellulare, i recettori, che innescano una serie di reazioni. Essi sono in grado, a seguito di un'infezione virale, di prevenire l'infezione di altre cellule.

22. Shutoff: Cessazione della sintesi della maggior parte delle macromolecole della cellula ospite che si verifica durante alcune infezioni virali e che risulta nel danno e/o morte cellulare.

I geni oncogeni sui virus a DNA sono indispensabili per la replicazione? Sì. Infatti essi attivano geni cellulari necessari alla moltiplicazione cellulare come ad esempio LargeT in Sv40 che è un prodotto immediato precoce, il quale va a interferire con i due oncosoppressori Rb e p53, perché questi sono virus a DNA che necessitano di tutto il macchinario deputato alla sintesi di DNA e quindi del macchinario per replicare il proprio genoma virale. Se questi virus si trovano ad infettare una cellula quiescente, se non succedesse nulla, il genoma di questi virus non potrebbe essere replicato.

24. Gli interferoni interferiscono con la replicazione virale? Sì. Ma solo nelle fasi più precoci e stimolate dall'interferone, le cellule producono enzimi che entrano in azione contro il virus non appena questo le raggiunge.

25. **Le foci di trasformazione possono servire a determinare il titolo dei retrovirus trasformanti acuti?** **Si.** Poiché questo saggio viene utilizzato per quei virus che non causano morte cellulare, ma hanno capacità di indurre trasformazioni cellulari.

26. **La fusione dell'envelope con la membrana dell'ospite è sempre pH-dipendente?** **No.** Un'interazione specifica induce delle modificazioni nell'anti-recettore o in glicoproteine con attività fusogena, in modo tale da indurre la fusione dell'envelope con la membrana plasmatica, con successiva liberazione del capsido all'interno del citoplasma. Questa fusione tra envelope e membrana citoplasmatica non richiede una modificazione del pH, perciò avviene a pH neutro (pH indipendente).

27. **Una cellula può essere suscettibile ma non permissiva?** **Si.** Se il virus infetta una cellula suscettibile all'infezione, che presenta quindi i recettori per il virus, ma che non contiene tutti i fattori che consentono di andare avanti nel ciclo replicativo, e che quindi non è permissiva per lo svolgimento del ciclo replicativo del virus (esempio: SV40 infetta le cellule delle scimmie, che sono permissive, ma se si infetta cellule di topo, esse non sono permissive), allora non si avrà la produzione di progenie virale.

28. **La polimerasi di Adenovirus utilizza una proteina come innesco?** **Si.** Il priming per la polimerasi è rappresentato da una proteina chiamata PTP (proteina terminale) modificata in modo tale che fornisca un 3'OH alla polimerasi per iniziare la sintesi del filamento.

29. **Per la simmetria icosaedrica c'è solo il pentone come struttura?** **No.** Esiste anche l'esone, capsomeri formati dall'interazione di sei protomeri.

30. **Da dove deriva l'envelope? Ha la stessa struttura della membrana citoplasmatica?** Deriva dalla membrana cellulare dell'ospite come risultato della gemmazione. Si, è di natura lipidica ed è costituito da un doppio strato.

31. **Curva di crescita a ciclo unico, eclissi, maturazione, latenza, rilascio:** eclissi (1), periodo in cui non sono presenti particelle infettive della cellula; maturazione (2), espressione tardiva e assemblaggio dei nuovi virioni all'interno della cellula; periodo latenza (3), comprende il periodo 1 e 2, in cui non sono rilevabili nuovi virioni nell'ambiente extracellulare; fase di scoppio, rilascio della progenie virale nell'ambiente extracellulare.

32. **Attacco del virus alla cellula ospite:** il virus per avviare l'infezione deve trovare la cellula specifica, superando barriere, interagendo con le sue proteine di superficie alle particelle del tessuto della cellula ospite; le interazioni sono aspecifiche e piuttosto labili (reversibili) non comportando alcuna modificazione del virione. La proteina virale o anti-recettore si lega al recettore sulla superficie della cellula e l'espressione di specifici recettori sulla superficie cellulare determina il tropismo della maggior parte del virus e la suscettibilità della cellula all'infezione di virus specifici.

33. **Gli RNA(-) hanno tutti gli enzimi necessari per la replicazione?** **Si.** Hanno l'enzima RNA polimerasi RNA-dipendente virale associata al genoma, quindi non necessitano di enzimi cellulari dell'ospite.

34. **Definizione di Antigenic Drift/Shift: Antigenic Drift o Deriva antigenica:** modificazioni che si vengono ad accumulare nel tempo e non sono altro che il risultato di un accumulo di modificazioni puntiformi che si verificano inevitabilmente durante la replicazione dei nuovi genomi virali. Comparsa di ceppi con proteine di superficie lievemente, ma spesso sufficientemente alterate da evadere la risposta dell'ospite e permetterne la diffusione nella popolazione. È particolarmente evidente in virus con genoma a RNA, i cui genomi sono inizialmente processati da enzimi, quali RNA polimerasi RNA-dipendenti o trascrittasi inversa, molto poco fedeli e senza attività di correzione delle bozze, quindi i neosintetizzati accumuleranno mutazioni su mutazioni fino a che queste si tradurranno in modificazioni antigeniche. Di fatto è quella responsabile del fatto che ogni anno dobbiamo progettare e disegnare un nuovo vaccino per il virus dell'influenza, perché da un anno all'altro l'accumulo di queste mutazioni porta a modificazioni non esagerate ma tali da renderlo un po' diverso da quello dell'anno precedente. **Antigenic Shift o Spostamento antigenico:** acquisizione di proteine di superficie completamente nuove attraverso il riassortimento genico, ma anche attraverso ricombinazione tra genomi a RNA. In presenza di un antigenic shift, la maggior parte degli individui presenta una bassa o assente protezione verso il nuovo virus riassortante, parliamo quindi di virus a genoma segmentato e in particolare del virus dell'influenza. Uno dei responsabili principali di questo spostamento antigenico è proprio il riassortimento genico.

35. **Infezione latente:** il virus non uccide le cellule in cui si moltiplica, instaura un rapporto di parassitismo controllato, non si replica e la cellula può sopravvivere e duplicarsi. Un'infezione latente è preceduta dall'infezione acuta che prevede la produzione di progenie virale quindi, nel momento in cui il virus ha accesso all'individuo segue subito un'infezione primaria acuta con produzione di progenie virale. La risposta dell'ospite in tempi abbastanza brevi tende ad eliminare il virus ma ci saranno sempre delle particelle virali che riescono a raggiungere le cellule in cui poi di fatto stabiliscono l'infezione latente. All'interno di queste cellule viene liberato il genoma nel nucleo della cellula e qui rimane in forma episomale. Il genoma è tutto silenziato tranne alcuni geni specifici della fase latente. Non viene prodotta progenie virale. Il sistema immunitario tende ad eliminare il virus. Ecco perché nella fase di latenza il virus tende a tenere silenziato tutto il suo genoma e l'espressione tipica della latenza è un'espressione che comunque non viene "vista" dal sistema immunitario e quindi le cellule infettate latentemente vengono preservate. Da questo stato latente, grazie a stimoli esterni di varia natura, il virus può essere riattivato, anche se poco frequentemente.

36. **Vaccino Attenuato, Inattivato e a Subunità: Vaccino Attenuato:** si basa sull'uso di virus con ridotta patogenicità per stimolare la risposta immune senza causare la malattia. Il ceppo virale del vaccino può essere un virus presente in natura od attenuato in vitro. Essi sono dei buoni immunogeni ed inducono un'ideale immunità di lunga durata. **Svantaggi:** possono perdere l'infettività (diventando inutili) o riacquistare virulenza. **Vaccino Inattivato:** si produce esponendo il virus ad un agente denaturante in condizioni controllate causandone la perdita d'infettività senza perderne l'antigenicità. Questo tipo di vaccino ha come vantaggio di

essere (se propriamente inattivato) un efficace immunogeno, di essere relativamente stabile ed a basso rischio di infezione. **Svantaggi:** non è possibile produrre virus inattivati per tutti i virus poiché la denaturazione delle proteine virali può portare alla perdita di antigenicità, inoltre non sono spesso efficaci come i vaccini attenuati a causa del fallimento nello stimolare un'immunità protettiva mucosale e cellulosa-mediata della stessa intensità. **Vaccino a Subunità:** in questi vaccini vengono usate solo alcune componenti del virus sufficienti ad indurre una risposta immune, ma senza consentire alcun rischio associato all'infezione. Sono solitamente sicuri, di rado possono causare risposte immuni dannose. **Svantaggi:** sono poco efficaci e molto costosi, poco antigenici e necessitano di nuovi sistemi di veicolazione. Questi vaccini sono di tipo: **SINTETICO:** cioè corti peptidi sintetizzati chimicamente. **Svantaggi:** solitamente non sono immunogeni efficaci e sono molto costosi (anche se il fatto di essere prodotti sotto ordinazione per qualsiasi sequenza desiderata, sono una grande potenzialità per il futuro). Non sono attualmente utilizzati vaccini di questo tipo. **RICOMBINANTE:** prodotti con ingegneria genetica, sono considerati migliori dei vaccini sintetici poiché tendono ad originare risposta immune efficace. Sono usati, ad esempio, contro l'epatite B ed un vaccino sicuro contro l'epatite B (HBV) è prodotto in cellule di lievito. - **VETTORI VIRALI:** sono virus ingegnerizzati per esprimere antigeni protettivi di virus non correlati. Si usa il genoma di un virus attenuato noto (es. virus vaccino VV) per esprimere antigeni e presentarli al sistema immunitario. **Svantaggi:** sono difficili da produrre e seppur sicuro in genere il VV è pericoloso per ospiti immuno-compromessi (infettati da HIV), inoltre il vaccino del vaiolo dura tutta la vita, ma può dare una debole risposta ai vaccini ricombinanti. Per risolvere in parte questi problemi si può usare un vettore a base di Poxvirus aviari ("vettori suicidi") che stabiliscono infezioni abortive dando i seguenti vantaggi: Espressione di alti livelli di proteine estranee; Nessun pericolo di patogenesi (infezioni abortive); Nessuna immunità naturale nell'uomo (virus aviari)

37. **Le placche servono per la conta dei virioni?** **Si.** Questo saggio permette di determinare il titolo virale espresso in p.f.u./ml tramite una serie di successive diluizioni che ci porterà, dal momento che ad ogni placca corrisponde particella infettiva, a conoscere il numero medio dei virioni presenti nella piastra di cultura.

38. **Cos'è e calcola il M.O.I. di 105 cell in cultura infettate da 3*106 p.f.u. di virioni?** M.O.I.: numero medio di particelle virali infettive per cellula utilizzate in una data infezione. Si calcola dividendo il numero totale di virioni per il numero totale di cellule infettate. Nella fattispecie: M.O.I.=

$$\frac{3 \cdot 10^6 \text{ p.f.u.}}{10^5 \text{ cell}} = 30 \text{ p.f.u./cell}$$

39. **Ciclo replicativo di Rabdovirus(VSV) e SV40:** VSV → classe V ssRNA -; presenta 5 geni diversi, rispettivamente dal 3' al 5' N, P, M, G, L, l'ultimo gene al 5' è quello che codifica l'RNA polimerasi che si trova associata al genoma della cellula ospite sottoforma di complesso con la fosfoproteina. Tra un gene e l'altro ci sono delle brevissime sequenze chiamate intergeniche che separano tutti i geni che contengono elementi regolativi. Queste sequenze intergeniche le troviamo quindi tra i geni e contengono segnali per la terminazione della trascrizione del gene precedente e il segnale d'inizio per il gene successivo. La trascrizione di questi genomi

infatti è detta stop e start: ad eccezione del gene N che inizia grazie al legame dell'Rna polimerasi con la sequenza al 3' del genoma che è la sequenza leader ed è sempre il primo gene trascritto, la trascrizione di tutti gli altri geni non avrà inizio se non è terminata la trascrizione del gene precedente. Questo significa che il complesso polimerasico non è in grado di legarsi se non ha prima terminato quella del gene precedente. La sequenza di terminazione della trascrizione è caratterizzata da 6-7 residui di uridina che permettono la poliadenilazione dei messaggeri. Una volta terminata la trascrizione di N, il complesso polimerasico ha una affinità più elevata per la sequenza leader che è presente al 3' del gene N che fa sì che oltre al messaggero di N si stacca anche il complesso polimerasico che può ricominciare a trascrivere da N. Ciò succede nel 30% dei casi. All'interno della cellula si forma un gradiente di messaggeri da N a L gradualmente minore. A questo gradiente corrisponde anche un gradiente proteico dove la proteina N è la più rappresentata. Lo stampo per l'Rna polimerasi non è rappresentato dalla molecola di ssRna negativo, ma è rappresentato dall'Rna genomico associato alla nucleoproteina. Quest'accumulo di proteina N sembra avere un ruolo fondamentale per il passaggio dalla fase trascrizionale alla fase di replicazione. **SV40** → virus nudo a dsDNA complessato a formare un minicromosoma; il genoma è circolare e vengono trascritti entrambi i filamenti, il genoma è quindi tutto codificante. La replicazione è divisibile in due fasi *precoce* e *tardiva*. Nella prima fase è trascritta la regione precoce del DNA virale; viene prodotta una singola molecola di RNA come trascritto primario della RNA polimerasi cellulare e successivamente processata in due specie di mRNA, una grande ed una piccola (Large T e Small T). Il DNA ha degli introni, in SV40, che sono eliminati dal trascritto primario. Nel citoplasma gli mRNA sono tradotti in due proteine, una di queste l'*Antigene T*, una proteina multifunzionale che si legava pRb e a p53, inibendone la funzione. Gli mRNA tardivi sono sintetizzati dal DNA parentale che è complementare a quello impiegato per la sintesi degli mRNA precoci. La trascrizione inizia in un promotore vicino all'origine di replicazione. L'mRNA tardivo è poi processato tramite "splicing", "capping" e poliadenilazione a produrre mRNA corrispondenti a tre proteine del capsido VP1, VP2 e VP3, i cui geni sono sovrapposti. Questi mRNA vengono poi trasportati nel citoplasma e tradotte nelle proteine corrispondenti poi trasportate nuovamente nel nucleo dove si assemblano i virioni il cui rilascio avviene per lisi cellulare.

40. Ciclo Adenovirus ed Herpes Virus: Adenovirus: virus dsDNA lineare; l'assemblaggio della Dna pol e della proteina preterminale al livello dell'origine determina il legame covalente di dCMP ad uno specifico residuo di serina di ptp catalizzato dalla pol. Il 3'OH fornito al complesso ptp-dCMP innesca la sintesi continua del Dna virale; quando un solo filamento viene replicato ad ogni round, il filamento scalzato, grazie alla presenza di sequenze ripetute invertite terminali può formare per appaiamento un breve duplex terminale, identico all'estremità del genoma a ds e può essere replicato con lo stesso meccanismo. In questo modo si ricrea il sito adatto per la pol al livello dell'ori al 3' e quindi ricomincia il complesso. Per intervento di una proteasi si formano così nuovi genomi provvisti di una TP associata al 5' di ogni filamento. Un filamento viene replicato, uno viene scalzato. Il priming per la pol è una

proteina PTP modificata in modo tale che fornisca un 3'OH alla pol per iniziare la sintesi del filamento. Grazie alle ITR questo singolo filamento scalzato si richiude a manico di padella cosicché si viene a ricreare un sito perfetto per l'assemblaggio DNA polimerasi proteina preterminale a livello dell'ori al 3' del primo filamento a livello del quale avviene la modificazione della proteina preterminale con aggiunta di cmp e ricomincia il processo. L'ori viene riconosciuta solo quando è in configurazione di doppio filamento. Ecco perché sono importanti le ITR, per far sì che si formi la configurazione a manico di padella e quindi venga riconosciuto il filamento. **Herpesvirus:** L'espressione è regolata temporalmente con distinzione tra geni alfa (immediati precoci) codificano 5 fattori coinvolti nella regolazione della trascrizione virale; Geni beta (precoci) codificano proteine regolatrici per lo più coinvolte nella replicazione del genoma; Geni gamma (tardivi) codificano proteine strutturali ed il fattore aTIF (a transcription initiation factor) - o VP16. L'espressione dei geni di *Herpes virus* è un'espressione a cascata in cui per esempio i prodotti dei L'espressione dei geni precoci, una volta attivati a loro volta inibiscono la trascrizione dei geni dei prodotti immediato- precoci e indirettamente attivano quella dei geni dei prodotti tardivi. I prodotti dei geni alfa, in particolare uno che si chiama ICP4, ad un certo punto del ciclo replicativo inibisce se stesso (autoregolazione negativa). L'espressione precoce è non-dipendente da fattori cellulari, quindi una volta liberato nella cellula ospite non sono immediatamente trascritti i geni precoci. L'espressione efficiente dei geni immediato precoci è fortemente regolata da fattori virali, in particolare VP16 che è un TF prodotto dai geni tardivi e assemblato nelle particelle virali nuove, che lo trasportano nelle cellule da infettare in modo tale da indurre l'attivazione dei geni immediato-precoci. I geni alfa sono regolati da ICP4, necessario per la progressione del ciclo infettivo oltre la fase immediato precoce ed è ritenuto essere il principale attivatore trascrizionale; stimola la trascrizione dei geni beta e gamma e agisce come repressore dell'espressione immediato precoce. Anche ICP0 agisce sui geni alfa come attivatore trascrizionale ma non presenta domini di legame al DNA ed è un derepressore generalizzato. Quindi il fattore limitante che permette di attivare l'espressione di tutti i geni a cascata è di fatto VP16 che il virus deve essere in grado di produrre nella fase tardiva del proprio ciclo vitale per inserirlo nei nuovi virioni e trasportarlo nella nuova cellula infettata. **41. I geni alfa sono regolati da ICP4, necessario per la progressione del ciclo infettivo oltre la fase immediato precoce ed è ritenuto essere il principale attivatore trascrizionale; stimola la trascrizione dei geni beta e gamma e agisce come repressore dell'espressione immediato precoce. Anche ICP0 agisce sui geni alfa come attivatore trascrizionale ma non presenta domini di legame al DNA ed è un derepressore generalizzato. Quindi il fattore limitante che permette di attivare l'espressione di tutti i geni a cascata è di fatto VP16 che il virus deve essere in grado di produrre nella fase tardiva del proprio ciclo vitale per inserirlo nei nuovi virioni e trasportarlo nella nuova cellula infettata.**

42. I geni alfa sono regolati da ICP4, necessario per la progressione del ciclo infettivo oltre la fase immediato precoce ed è ritenuto essere il principale attivatore trascrizionale; stimola la trascrizione dei geni beta e gamma e agisce come repressore dell'espressione immediato precoce. Anche ICP0 agisce sui geni alfa come attivatore trascrizionale ma non presenta domini di legame al DNA ed è un derepressore generalizzato. Quindi il fattore limitante che permette di attivare l'espressione di tutti i geni a cascata è di fatto VP16 che il virus deve essere in grado di produrre nella fase tardiva del proprio ciclo vitale per inserirlo nei nuovi virioni e trasportarlo nella nuova cellula infettata.

43. I geni alfa sono regolati da ICP4, necessario per la progressione del ciclo infettivo oltre la fase immediato precoce ed è ritenuto essere il principale attivatore trascrizionale; stimola la trascrizione dei geni beta e gamma e agisce come repressore dell'espressione immediato precoce. Anche ICP0 agisce sui geni alfa come attivatore trascrizionale ma non presenta domini di legame al DNA ed è un derepressore generalizzato. Quindi il fattore limitante che permette di attivare l'espressione di tutti i geni a cascata è di fatto VP16 che il virus deve essere in grado di produrre nella fase tardiva del proprio ciclo vitale per inserirlo nei nuovi virioni e trasportarlo nella nuova cellula infettata.

44. I geni alfa sono regolati da ICP4, necessario per la progressione del ciclo infettivo oltre la fase immediato precoce ed è ritenuto essere il principale attivatore trascrizionale; stimola la trascrizione dei geni beta e gamma e agisce come repressore dell'espressione immediato precoce. Anche ICP0 agisce sui geni alfa come attivatore trascrizionale ma non presenta domini di legame al DNA ed è un derepressore generalizzato. Quindi il fattore limitante che permette di attivare l'espressione di tutti i geni a cascata è di fatto VP16 che il virus deve essere in grado di produrre nella fase tardiva del proprio ciclo vitale per inserirlo nei nuovi virioni e trasportarlo nella nuova cellula infettata.

45. I geni alfa sono regolati da ICP4, necessario per la progressione del ciclo infettivo oltre la fase immediato precoce ed è ritenuto essere il principale attivatore trascrizionale; stimola la trascrizione dei geni beta e gamma e agisce come repressore dell'espressione immediato precoce. Anche ICP0 agisce sui geni alfa come attivatore trascrizionale ma non presenta domini di legame al DNA ed è un derepressore generalizzato. Quindi il fattore limitante che permette di attivare l'espressione di tutti i geni a cascata è di fatto VP16 che il virus deve essere in grado di produrre nella fase tardiva del proprio ciclo vitale per inserirlo nei nuovi virioni e trasportarlo nella nuova cellula infettata.

interagiscono le proteine del capsido e fanno sì che vengano impacchettati in unità genomiche.

Ciclo replicativo Poliovirus: virus ad RNA della IV classe quindi il loro genoma, una volta liberato nel citoplasma, è immediatamente tradotto. Il genoma è riconosciuto direttamente come messaggero dalla cellula ospite, anche se ha una struttura un po' diversa da un messaggero cellulare perché manca di un Cap al 5'; al suo posto è presente la proteina PPG, importante nella fase di replicazione del genoma del virus perché viene utilizzata come primer per la sintesi sia dell'antigenoma che per la sintesi dei nuovi genomi. Non svolge la funzione del Cap infatti al livello della PPG non si assembla il ribosoma, anzi addirittura prima dell'inizio della traduzione pare che venga eliminata da delle proteasi cellulari. Quindi, la traduzione di questo genoma è Cap-indipendente e parte grazie alla presenza al 5'-UTR della così detta sequenza "sito di assemblaggio interno del ribosoma". Una volta tradotto, vengono prodotte anche le proteasi virali (sono 2); la proteasi 2A di *Poliovirus* va a riprogrammare completamente la sintesi proteica cellulare a favore di una sintesi proteica virale perché va a tagliare il complesso di inizio della traduzione coinvolto nella traduzione Cap-dipendente e fa sì che una delle componenti del complesso venga utilizzata proprio per la traduzione IRES-dipendente. Grazie alla proteina 2A viene completamente inibita la traduzione Cap-dipendente a favore della traduzione virale. Oltre che per la modalità con cui si esprime questo genoma (tutto insieme nello stesso momento), anche per il fatto che viene completamente inibita la traduzione cellulare e quindi rapidamente la cellula è danneggiata, questi virus hanno un ciclo replicativo piuttosto breve (spesso neanche 24h). Il virus deve sbrigarci a produrre nuova progenie virale prima che la cellula muoia.

43. I DNAs sono potenti induttori di interferone? No. In generale i virus a DNA sono induttori relativamente deboli ad eccezione dei *Poxvirus* che sono induttori molto potenti.

44. Nella particella virale sono presenti subunità proteiche ripetute? Sì. Il capsido è costituito da subunità proteiche ripetute assemblate a formare una struttura simmetrica ripetitiva. Le principali classi di simmetria sono quella elicoidale (vuol dire che queste proteine che formano il capsido si assemblano interagendo direttamente tutte con l'acido nucleico a formare una struttura ad elica) e quella icosaedrica (l'assemblaggio dei componenti proteiche del capsido si assemblano tra di loro in modo tale da formare una struttura che si approssima sempre di più con a ferma e l'iterazione con il genoma non è così stretta come si osserva nella simmetria elicoidale piuttosto l'interazione con il genoma virale nel capsido a simmetria icosaedrica è stabilita solo da poche subunità che compongono il capsido icosaedrico).

45. Durante l'infezione latente c'è replicazione virale? No. Nell'infezione latente, l'RNA o il DNA virale restano nella cellula ospite senza replicarsi e senza causare la patologia, possono permanere in tale stato per molto

tempo, a volte anche per anni. Tuttavia, durante la fase di latenza, l'infezione può essere trasmessa durante il periodo asintomatico, facilitando la diffusione da persona a persona. A volte uno stimolo (in particolare l'immunosoppressione) ne provoca la riattivazione.

46. I virus a RNA(-) nudi sono capaci di infettare una cellula ospite? No. Nessuno di questi genomi a polarità negativa è infettivo come RNA purificato in quanto non è riconosciuto come mRNA; l'azione della polimerasi è fondamentale per la trascrizione del genoma in messaggeri, altrimenti il virus non è infettivo.

47. Ricombinazione e Complementazione: Ricombinazione: Nei genomi a Dna la modalità è quella del taglio -rottura - riunione; nei virus a Rna si osserva solo nella fase di sintesi di nuovo Rna attraverso la 'scelta della copia' e in ogni caso ci troviamo all'interno di una stessa cellula, perché le interazioni genetiche avvengono soltanto durante la superinfezione della stessa cellula nella quale sono presenti i genomi dei due virus diversi. L'Rna pol durante la replicazione inizia a sintetizzare e se c'è una certa omologia la pol salta da uno stampo all'altro e così il nuovo genoma comprende parte del genoma derivante da uno e parte derivante dall'altro. **Complementazione:** Interazione di prodotti genici virali all'interno di cellule infettate da due virus difettivi che permette la replicazione e l'aumento della resa di uno od entrambi i mutanti virali in assenza di alterazioni genetiche. I mutanti riescono a produrre un corredo completo di prodotti se hanno difetti in geni diversi; la nuova particella virale utilizza le proteine codificate dai due virus diversi mentre nessuno dei due potrebbe replicare da solo.

48. Infezione di SV40 in un organismo non idoneo: Nelle cellule non permissive il virus entra ma non produce progenie virale. Con il tempo, nella coltura si ritrovano delle zone di cellule trasformate. Il virus entra e il genoma viene trasportato all'interno del nucleo. C'è espressione precoce del virus e produzione della proteina T-Grande, la cui funzione precocissima è quella di legare Rb per indurre o mantenere la cellula nella fase S del ciclo cellulare e quella di legare p53 per continuare a mantenere la cellula nella fase S del ciclo cellulare e per inibire l'apoptosi. Large-T si accumula nella cellula e continua a svolgere la propria funzione. Si lega anche all'origine di replicazione del genoma virale (a volte) ma non ci sono le condizioni adatte per cui questo genoma venga processato dalla DNA-polimerasi cellulare, quindi non viene replicato. Il ciclo replicativo viene bloccato qui, prima dell'inizio della sintesi dei nuovi genomi virali. Nel frattempo, viene prodotto l'antigene T-Grande che continua a mantenere la cellula nella fase S del ciclo cellulare e continua ad inibire l'apoptosi. Questo fenotipo trasformato sarà un fenotipo transiente nel momento in cui il genoma virale rimane in forma episomale; ma occasionalmente, molto raramente, con una bassissima frequenza, questo genoma virale potrebbe integrarsi nel genoma cellulare di questa cellula non permissiva.

49. Le proteine di matrice del capsid servono all'assemblaggio? Si. Queste proteine sono presenti nella faccia interna dell'envelope ed hanno varie funzioni ed una di questa è quella di connettere, fare da ponte, tra l'envelope e il nucleocapside, in modo da stabilizzare la particella virale. Hanno anche una funzione importante nell'assemblaggio del virione, cioè guidano l'assemblaggio del capsid e l'interazione del capsid con le

proteine dell'envelope che faranno sì che poi un virione maturo o pseudo-maturo emergerà dalla cellula e verrà liberato nell'ambiente extracellulare.

50. La gemmazione avviene solo nella membrana plasmatica? No. La gemmazione è il processo attraverso cui i virus acquisiscono l'envelope. La gemmazione può avvenire a livello della membrana plasmatica, con conseguente rilascio del virus nello spazio extracellulare, o a livello delle membrane intracellulari con rilascio all'interno della cellula stessa.

51. Esperimento del ciclo unico: Questo esperimento mette in evidenza il fatto che esistono tre principali fasi della replicazione che sono: Attacco del virus e penetrazione, in cui il virione si attacca alla cellula ospite suscettibile ed il suo genoma o il virione stesso penetrano nella cellula; Espressione e replicazione del genoma virale, assemblaggio delle nuove particelle virali, in cui il virione modifica il macchinario biosintetico dell'ospite che produrrà enzimi virus-specifici, verrà replicato il genoma e sintetizzate ed assemblate le componenti virioniche; Rilascio di virioni maturi dalla cellula infetta. Questo esperimento è stato condotto utilizzando un fago virulento litico nudo che alla fine del ciclo replicativo porta alla lisi della cellula batterica ospite per la liberazione dei nuovi batteriofagi.

Classe I: dsDNA, Polyomaviridae, genoma circolare; **Adenoviridae,** genoma sempre lineare, virus nudi con simmetria icosaedrica, 2 sequenze ITR (contengono le ori); **Herperviridae,** genoma lineare nel virione, poi circolarizza nell'ospite, due regioni uniche UL e US e due sequenze invertite, infezione latente target cellule epiteliali o neuroni, virus rivestiti e capsid icosaedrico; **Poxiviridae,** genoma lineare; svolgono tutti il ciclo nel nucleoperché non hanno una propria pol, tranne i Poxiviridae che rimangono nel citoplasma perché codificano un proprio RNA pol **Classe II: ssDNA, Circoviridae; Parvoviridae** genoma sia + che - **Classe III: dsRNA, Reoviridae: Rotavirus,** genoma segmentato, entrato nell'ospite rimanendo nello pseudocapsid e ha un proprio RNA pol **Classe IV: ssRNA (+) Picornaviridae: Poliovirus; Togaviridae; Coronoviridae; Flaviviridae;** genoma direttamente traducibile in quanto è proprio un mRNA, quindi rimane nel citoplasma senza arrivare al nucleo; hanno un proprio RNA pol **Classe V: ssRNA (-) Mononegavirales,** genoma monopartito; **Rhabdoviridae; Orthomixoviridae: Virus influenza A e B,** genoma segmentato; **Parmaixoviridae: Rhabdoviridae; Filoviridae: Ebolavirus.** Il genoma è un antisense del messaggero e hanno un proprio RNA pol **Classe VI: ssRNA con intermedio a DNA, Retroviridae,** utilizzano la trascrittasi inversa, ovvero un enzima in grado di convertire un RNA + in un DNA - (è una DNA pol che lavora su stampo di RNA); sono virus diploidi, capsid icosaedrico e rivestiti; **Genoma (direzione 5'-3'): R** → corta ripetizione presente sia al 3' che al 5' importante per il processo di replicazione (segnale poliA); **U5** → sequenza unica non codificante, sito importante per l'integrazione; **PBS** → 18nt complementari al 3' del tRNA, primer binding site per il tRNA che è un primer per la trascrittasi inversa; **Leader** → non tradotta, contiene un sito donatore di splicing e contiene il sito psi, sequenza specifica per l'impaccettamento; **PPT** → sito d'inizio del

filamento + del DNA; **U3** → regione unica non codificante contenente elementi promoter ed enhancer, regione regolativa responsabile della trascrizione del genoma virale quando sarà integrato; **4 geni codificanti** → Gag, proteine del capsid, nucleoproteina, proteina della matrice; Pro, proteasi virale; Pol, trascrittasi inversa, integrasi; Env, proteine superficie e transmembrana **Classe VII: dsDNA con intermedio a RNA, Hepadnaviridae,** DNA a doppio filamento incompleto, circolare, aperto. Una volta che entra all'interno della cellula ospite, il filamento incompleto (+) viene completato e si forma così un DNA a doppio filamento completo, che sarà lo stampo dall'RNA polimerasi II dell'ospite per trascrivere i vari messaggeri che verranno tradotti. Tra i vari messaggeri, ce ne sono alcuni molto lunghi, anche più del genoma stesso, che vengono utilizzati come stampo per la produzione dei nuovi genomi virali ad opera di una trascrittasi inversa. Questo enzima però non è portato all'interno del virione ma è prodotta attraverso la traduzione dei messaggeri che vengono sintetizzati ad opera dell'RNA polimerasi II dell'ospite.

Trascrittasi inversa: Dna pol che lavora su stampo di RNA o DNA con anche attività elicasi; possiede un dominio di RNAasi H, nucleasi che degrada l'RNA quando si trova ibrido rna-dna; usa come primer un tRNA cellulare associato al genoma dei retrovirus. A questo punto la trascrittasi inversa, utilizzando questo tRNA come primer, inizia a sintetizzare il filamento "-" di DNA e la prima regione che viene copiata è la **regione unica 5,** ovvero la regione unica che si trova al 5' del genoma retrovirale ad RNA. Copia un 5 e copia infine la ripetizione **R,** a questo livello si ferma perché non trova più lo stampo. La trascrittasi inversa comincia a sintetizzare in direzione 5'-3', fino a copiare **R,** a questo punto interviene l'attività di RNAasi H, che nella maggior parte dei retrovirus è associata alla stessa proteina che porta l'attività polimerasica, solo a volte la troviamo sottoforma di un singolo polipeptide, parla del **primo salto dell'RNA polimerasi:** si porta dietro il neosintetizzato che contiene la ripetizione **R,** che va ad appaiarsi con la sequenza **R** al 3' dell'RNA stampo. In questo modo la polimerasi, una volta che **R** neosintetizzato filamento "-" di DNA e **R** al 3' sullo stampo di RNA si appaiano e la trascrittasi inversa continua a leggere lo stampo, cioè **U3,** la sequenza codificante e **PBS.** La DNA polimerasi, cioè la trascrittasi inversa, continua a sintetizzare copiando tutto lo stampo. A questo punto, lo stampo ad RNA è stato copiato interamente e inizia la sintesi del filamento "+" del DNA, interviene nuovamente l'attività di RNAasi H che degrada tutto lo stampo ad RNA tranne la sequenza **PPT,** poiché appare essere particolarmente resistente alla degradazione da parte dell'RNAasi H. Rimane quindi questa sequenza di una decina di nucleotidi, che viene salvata dall'attività di RNAasi H e viene utilizzata come primer per l'inizio della sintesi del filamento "+" del DNA su stampo di DNA. Ora la trascrittasi inversa sta lavorando sempre come DNA polimerasi, ma utilizzando come stampo il filamento "-" di DNA che ha appena sintetizzato. A partire dalla sequenza **PPT** inizia quindi la sintesi in direzione 5'-3' del filamento "+" del DNA, viene copiata la regione **U3,** la regione **R,** la regione **U5** e la sequenza del tRNA, esattamente complementare alla sequenza **PBS** alla quale il tRNA si trova associato nel virione e che viene utilizzato inizialmente come primer per la sintesi del filamento "-". Abbiamo un nuovo intervento dell'attività di RNAasi H che degrada il tRNA, un RNA che si trova come

ibrido con il PBS appena sintetizzato e degrada anche la sequenza PPT. Assistiamo a quello che viene definito il **secondo salto della polimerasi**. La sequenza PBS del filamento "+" neosintetizzato si appaia con la sequenza PBS del filamento "-" di DNA, la trascrittasi inversa è associata a queste sequenze. Si appaia e forma una configurazione perfetta per completare la sintesi dei due filamenti: il filamento "-" in direzione 5'-3', così che vengono copiate U5, R e U3; e il completamento del filamento "+" a partire da PBS, viene copiata tutta la parte codificante della formazione genetica del retrovirus e anche la parte del filamento "-" non tradotta, U3, R e U5. Si viene in questo modo a formare un doppio filamento di DNA che, se confrontato con il genoma ad RNA presente all'interno del virione, risulta di fatto più lungo dell'RNA genomico. Durante il processo di retrotrascrizione sono state duplicate due regioni, le regioni uniche del genoma ad RNA all'interno del virione: **U5**: che ritroviamo sia al 5' che al 3' del DNA provirale; **U3**: che è presente come sequenza unica nel genoma ad RNA del retrovirus e che viene duplicata nel DNA provirale e che quindi sarà presente sia al 3' che al 5' del DNA provirale. In questo modo si sono formate le sequenze che prendono il nome di **LTR (long terminal repeat)**.