

## Virologia

### 1-Introduzione

Più ho biodiversità e più posso avere problemi di diffusione dei virus, i virus sono polifagi. Quando introduco specie nuove emergono anche nuovi virus. La propagazione agamica è uno dei principali modi in cui si propagano i virus, se la pianta madre è malata ho il 100% di probabilità di diffusione del virus, la propagazione avviene velocemente.

Alcuni esempi di virus:

-Tospovirus

-Cucumovirus (Afdi sono vettori di questi virus)

-Tobamovirus, non hanno vettori però sono molto stabili, persistono nel terreno, nell'acqua e negli attrezzi, esempio il virus mosaico del tabacco, sopravvive anche nel tabacco post lavorazione.

-Virus nei cereali autunno vernini, la perdita cambia a seconda del momento dell'attacco, in primavera più danni.

-CTV, virus devastante per il citrus, in Italia se riconosciuto in tempo si riesce a trattenere.

-GFLV, attacca la vite, riduce il contenuto di zuccheri

#### •Da dove arrivano i virus?

I virus sono stati scoperti filtrando succhi di piante malate, il filtrato inoculato in una pianta sana da origine alla malattia. Il filtro trattiene batteri ecc.

-Ipotesi 1: Sviluppo della cellula primordiale, nascita vita, virus la attacca. Derivano da una stessa cellula ancestrale, coevoluzione.

-Ipotesi 2: Evoluzione cellula primordiale, poi si formano i virus. Evoluzione separata

-Ipotesi 3: Si è formata una prima protocellula che non si è sviluppata, ne è nata un'altra, dalla prima si sono sviluppati i virus. Coevoluzione

Silenziamento genico post trascrizionale: Metodo usato da alcuni organismi per difendersi dai virus, è stato scoperto nei nematodi, i lieviti non lo hanno come metodo di difesa. Scoperto questo metodo si è capito meglio come il virus interagisce con la pianta, posso usare questo metodo per difendere le piante.

Le problematiche con i virus sono nate quando l'uomo ha iniziato ad addomesticare le piante, con gli spostamenti sono nati i primi problemi, nuova coltura, in torno ho piante spontanee, porto specie sane e li trovano il patogeno in più ho la diffusione tramite vettori.

Es: Virus abbronzatura pomodoro, 1990 in Italia, diffuso dai tripidi, inizialmente in Italia era controllato, poi con l'importazione di un'altra coltura (attaccata da un altro virus), è stato introdotto un altro vettore che trasporta entrambi i virus.

#### •I virus delle piante possono fare il salto di specie?

Spesso i virus sono presenti sulle verdure, possono infettare l'uomo? Attualmente no, però alcuni appartengono a famiglie che comprendono geni i cui ospiti sono i mammiferi. Il salto di specie per

ora l'hanno fatto nei confronti delle piante, virus che attaccavano gli insetti ora attaccano anche le piante, aumento diffusione.

•**Simbiosi virus:** Alcune piante infette sono più resistenti alla siccità, in alcuni casi la presenza di virus rende la pianta più resistente alla siccità. I vettori possono avere vantaggi dalla presenza di virus, come ad esempio la resistenza ai pesticidi, in alcuni casi il virus fornisce all'ospite la tossina che dà origine alla malattia.

•**Vantaggi virus rispetto agli altri patogeni:**

- Numericamente più abbondanti
- Diffusi ovunque
- Biodiversità elevata
- Velocità di moltiplicazione elevata, più il genoma è piccolo e più è veloce e più varia
- I virus infettano anche i batteri (Batteri molto diffusi)
- I virus hanno colonizzato tutti gli ambienti, anche quelli estremi
- Nella replicazione commettono tanti errori, mutazioni.

Es mutazioni: Aumento affinità con i vettori, superare resistenza piante (Si creano delle varianti mutate che prendono il sopravvento). I virus inoltre possono scambiarsi pezzi di genoma tra di loro o con l'ospite, alcuni virus hanno incluso la proteina usata dalle piante per resistere alle alte temperature, i virus dopo averla inclusa nel genoma ne hanno modificato la funzione e la usano per muoversi.

•**Definizione virus:** Agente infettivo costituito da una o più molecole di RNA o DNA, a seconda del virus, che contengono l'informazione per la sintesi di proteine virali e servono da stampo per la formazione di nuove molecole di acido nucleico, racchiuse in un involucro protettivo di natura proteica o lipoproteica, capaci di replicarsi solo all'interno di una cellula ospite. Solitamente RNA/DNA sono incapsidate in un rivestimento, il capsido (Non sempre, virioni no).

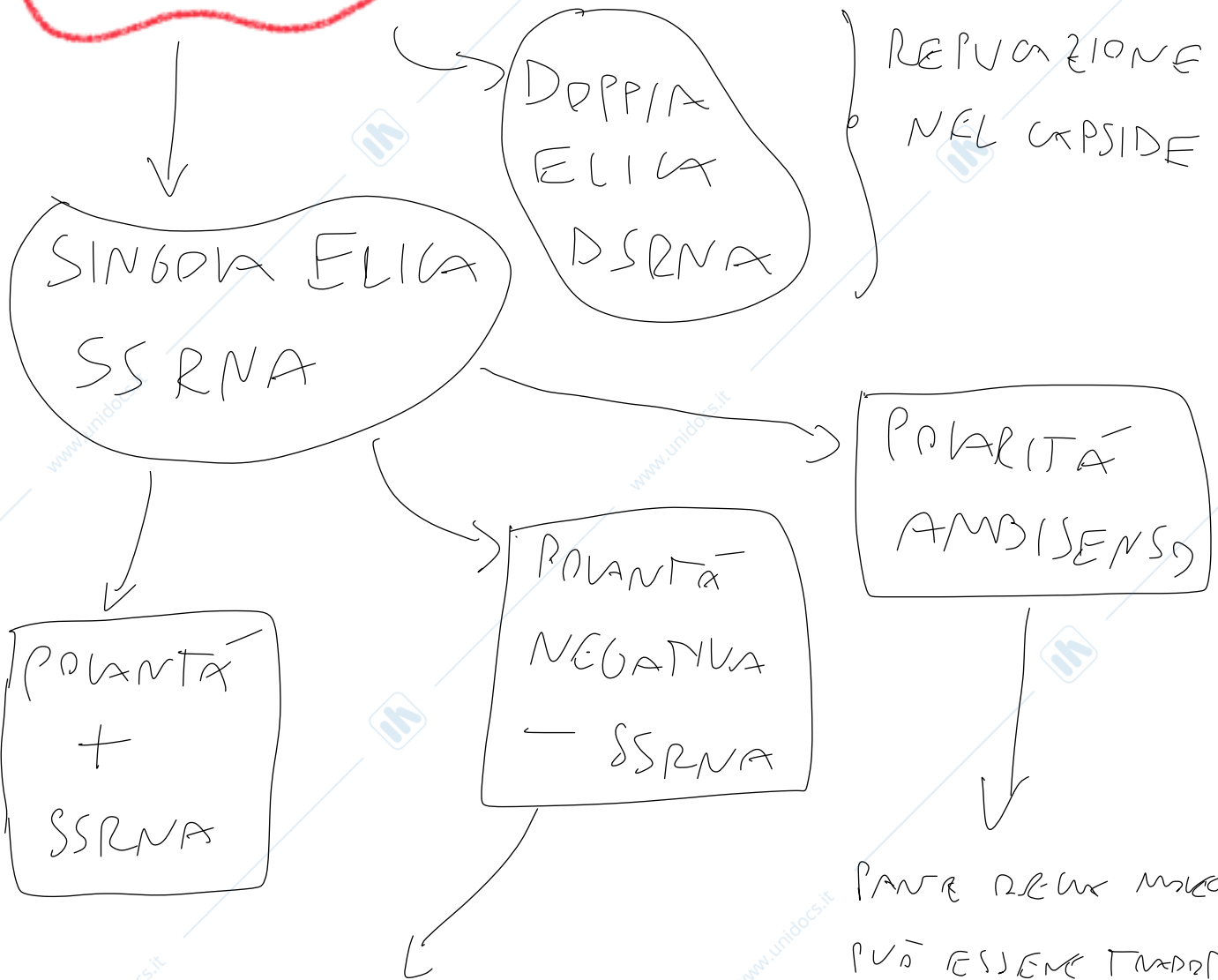
I virus non hanno organizzazione cellulare, no ribosomi ed enzimi che catalizzano sintesi atp, sono quindi privi di attività fisiologiche e biochimiche proprie sono inoltre privi di membrana. Non possono essere considerati organismi viventi. La loro replicazione dipende dal meccanismo di sintesi proteica e dai nucleotidi della cellula ospite e avviene tramite la sintesi e l'assemblaggio dei costituenti virali.

- I virus sono dipendenti dalla cellula ospite, ma non sono gli unici, non basta per identificarli
- La maggior parte sono piccoli, alcuni però sono più grossi di certi batteri, anche in questo caso non basta per classificarli
- Sono gli unici che non si replicano in modo autonomo, caratteristica unica

**Divido i virus in due gruppi:**

- Codifica capsido
- Non codifica capsido

# RNA LINEARI



DEVE ESSERE LA POLIMERASI,  
SE NON C'È SI RECAPSIDANO  
DEVONO INOLTRARE RNA  
POLIMERASI

PAUTE DELLA MATRICE  
PUÒ ESSERE TRASCRITTA  
E PAUTE DEVE  
ESSERE TRASCRITTA

DNA circolari: Traducono DNA in RNA.

## 2-Architettura dei fitovirus

Un **gene** è l'unione di sequenze genomiche che codificano per un set coerente di prodotti funzionali potenzialmente sovrapponibili. I geni corrispondono a porzioni di genoma localizzate in precise posizioni all'interno della sequenza di DNA (o più raramente di RNA in certi virus) e contengono le informazioni necessarie per codificare in ultima istanza molecole che hanno una funzione, come RNA o proteine.

I fitovirus sono caratterizzati da un involucro protettivo, detto capside, composto da subunità proteiche, che racchiude uno o più molecole di RNA o di DNA che costituiscono il genoma. Soltanto nei virus a RNA a singolo filamento a polarità negativa o ambisenso, oppure a RNA a doppio filamento è presente l'enzima trascrittasi, necessario per la trascrizione dell'RNA genomico in RNA in grado di agire da messaggero (mRNA). Nell'acido nucleico è contenuta tutta l'informazione genetica di un virus e quindi anche le sue proprietà infettive.

**La/le proteina del capside svolge diverse funzioni:** (Rivestimento proteico che circonda acido nucleico, formato da piccole subunità proteiche, dette unità strutturali, identiche le une alle altre, il capside dei virus di uno stesso genere contiene il medesimo numero di subunità proteiche organizzate con la stessa simmetria).

-Protezione dell'acido nucleico

-Determina le caratteristiche antigeniche del virus: Un antigene è una molecola riconosciuta come estranea (disposizione atomi diversa) o potenzialmente pericolosa dal sistema immunitario di un organismo, che la combatte attraverso la produzione di anticorpi (Antigene stimola risposta immunitaria). La maggior parte degli antigeni è in grado di produrre una risposta immunitaria specifica, L'antigenicità è la capacità dell'antigene di combinarsi specificamente con anticorpi e recettori ad esso specifici, l'immunogenicità, o potere "immunogeno", riflette invece la capacità dell'antigene di indurre una risposta immunitaria (mediata da cellule T e B). Pertanto, ogni molecola immunogenica è anche antigenica, ma non tutti gli antigeni sono immunogeni. Gli antigeni sono macromolecole, formate quindi da tante piccole molecole che da sole raramente inducono la produzione di anticorpi, se legate a proteine di trasporto assumono proprietà antigeniche. Un antigene singolo può promuovere la risposta di vari anticorpi, infatti gruppi specifici di atomi, denominati "determinante antigenico o epitopo", costituiti da 5-8 amminoacidi, ciascuno porta alla produzione di uno specifico anticorpo.

-Riconoscimento per la trasmissione tramite vettori

-In alcuni casi è alla base della specificità del virus nei riguardi della sua gamma di ospiti

-Movimento locale e sistemico

-Soppressore del silenziamento genico (TCM)

-Elicitore delle risposte della pianta ospite

-Modula la risposta dei sintomi

-Necessaria per la trascrizione (Alfamovirus)

### •Proteine presenti nei virus:

-Proteine funzionali: permettono ad esempio all'acido nucleico di replicarsi (DNA o RNA polimerasi)

-Proteine strutturali: Indispensabili per l'organizzazione del capside e per l'assemblaggio dell'acido nucleico virale con le subunità proteiche.

-Proteine non strutturali: Funzioni relative alla replicazione dell'acido nucleico, alla diffusione dei virus nei tessuti dell'ospite e al trasferimento delle particelle virali da una pianta all'altra da parte dei vettori.

**•Distribuzione informazione genica: Come raggruppamento DNA/RNA nella particella virale?**

L'informazione genetica dei virus è contenuta in una o più molecole di RNA o di DNA, mai presenti assieme nello stesso virus, le quali possono essere a filamento singolo (SS: Single stranded), con l'RNA della maggior parte dei fitovirus o avere un'organizzazione a doppia elica (ds: double stranded). Nei fitovirus la dimensione dell'acido nucleico è molto limitata. Nei virus delle piante le molecole di RNA sono sempre lineari, mentre quelle di DNA sono sempre circolari.

La distribuzione dell'informazione genetica può essere racchiusa in un'unica molecola di acido nucleico oppure ripartita in più molecole. Nel primo caso si parla di genoma monopartito, nel secondo caso di genoma multipartito.

-Genoma monopartito o indiviso: informazione genica racchiusa in una sola molecola di acido nucleico, sia esso RNA o DNA, genoma più complesso, molto lungo. ES: Caulimovirus, CTV, BYV, fagi (Virus batteri). Tutti i geni sono localizzati in un'unica molecola di RNA o di DNA.

-Genoma multipartito o segmentato: Tutti i geni sono localizzati in più molecole di acido nucleico, informazione portata su più molecole. La suddivisione in diversi frammenti del genoma complica le cose, i frammenti di dna/rna possono scambiarsi. Ho un virus A che porta tre informazioni, un virus B uguale ma con mutazioni, si forma il virus C. Nei genomi multipartito, in alcuni virus i diversi filamenti di acido nucleico sono incapsidati in un unico tipo di particella, vengono perciò chiamati virus monocomponenti a genoma diviso. In altri virus, il corredo genetico è suddiviso in più particelle e perciò sono denominati virus multicomponenti. A seconda poi che il genoma sia diviso in due, tre o più molecole di acido nucleico incapsidate singolarmente in particelle distinte si distinguono virus a genoma bipartito, tripartito o multipartito. La segmentazione del genoma è un meccanismo per evitare la presenza di parecchi geni in una singola molecola di RNA o DNA. Nei virus multicomponenti perché si realizzi l'infezione di una cellula, la formazione di particelle virali e la diffusione dell'infezione nell'ospite occorre che più tipi di particelle siano introdotte al suo interno.

ES: Cucumovirus, il genoma è costituito da tre segmenti di RNA monocatenario, di cui il primo e il secondo incapsidati separatamente in due diversi tipi di particelle, mentre l'ultimo è incapsidato insieme ad un RNA subgenomico in un terzo tipo di particelle. Per l'avvio dell'infezione servono le tre particelle. Vi sono virus multicomponenti in cui le informazioni per la loro replicazione sono portate da un unico filamento genomico, mentre i geni che codificano altre proteine funzionali e quella capsidica si trovano in altri filamenti. In questi virus l'inoculazione anche di un solo tipo di particelle può causare l'infezione di una cellula e causare i sintomi senza però la sua diffusione nell'ospite e la replicazione. Ad esempio l'inoculazione delle particelle di maggior lunghezza di TRV determina l'infezione di piante ospiti e la comparsa di sintomi simili a quelli tipici del virus, ma non la formazione di particelle virali e la loro trasmissibilità da parte dei nematodi vettori, la quale è legata alla proteina del capsido. I virus a genoma segmentato vanno in contro a ricombinazione genetica. Il CMV provvisto di genoma tripartito, presenta una grande varietà di isolati, collegati al fenomeno della ricombinazione che possono differenziarsi tra di loro per una o più caratteristiche relative alle specie di piante ospiti, ai sintomi e agli afidi vettori.

I filamenti di acido nucleico che dirigono la sintesi di un unico polipeptide, contenenti quindi una sola ORF, sono detti monocistronici, mentre i filamenti contenenti due o più ORF sono detti bicistronici o policistronici.

Ogni particella del virus contiene un'informazione specifica, se non ci sono tutte le particelle non ho infezione. ES: CMV (Virus mosaico cetriolo). Se ho un genoma con tre particelle, 2 formate da RNA e una vuota, ho comunque infezione, bastano le prime due. Stesso virus, quadri sintomatologici diversi, scambiano tra di loro le particelle.

-L'RNA virale che funziona direttamente da messaggero (mRNA) e dirige la sintesi di una o più molecole proteiche, è detto di polarità positiva (RNA+).

-L'RNA o DNA con la sequenza complementare a quella dell'RNA che funge da messaggero sono dette di polarità negativa (RNA-). Sono molecole non codificanti, per essere tradotte in proteine, devono essere trascritte nel loro filamento complementare, il quale agisce da messaggero per la sintesi proteica. La trascrizione dell'mRNA è catalizzata dall'enzima RNA trascrittasi contenuto nel rivestimento proteico di questi virus.

-Metà di una polarità e metà dell'altra, polarità ambisenso.

#### •Organizzazione del genoma dei fitovirus:

-In testa ho i geni precoci: Espressi all'inizio del ciclo infettivo di un virus, prima dell'avvio della replicazione. Danno luogo a proteine che agiscono sulla replicazione RNA polimerasi RNA dipendenti, servono alla replicazione. Ha la funzione di copiare il genoma che origine all'infezione e formare nuove molecole (Replicazione del genoma). Inoltre in testa ho i geni che codificano le proteine di movimento. I geni precoci esprimono anche proteine che promuovono il movimento dell'infezione da cellula a cellula.

-Altri geni tardivi: Espressi successivamente, servono per il movimento e per le proteine strutturali, codificano proteine che portano informazioni per il capsido sono in fondo, servono dopo. Inoltre ho i soppressori del silenziamento genico. I geni tardivi codificano la sintesi di altre proteine funzionali, che contribuiscono ad esempio alla trasmissione delle particelle virali da parte dei vettori.

#### •Principali proteine codificate:

-RNA polimerasi: Serve per la replicazione/trascrizione dell'RNA genomico, catalizza l'unione di un residuo nucleotidico al successivo sullo stampo di una catena di RNA. La replicazione e trascrizione avviene grazie alla RNA polimerasi e ad un'elicasi, l'enzima che rompe i legami a idrogeno che uniscono le catene a doppia elica dell'RNA che si formano durante la replicazione virale ristabilendo delle catene di RNA a singolo filamento. Inoltre l'elicasi può rimuovere le strutture secondarie presenti nel filamento di RNA che serve da stampo per la sintesi di un filamento complementare. Nei virus che non hanno elicasi è la polimerasi a separare le catene di RNA a doppia elica che si formano durante la replicazione oppure un enzima della cellula ospite.

RNA replicasi indica l'enzima che la sintesi di progenie di filamenti di RNA di polarità positiva o negativa.

RNA trascrittasi indica l'enzima presente nei virus con RNA di senso - e lo trascrive sintetizzando una molecola di mRNA

RNA polimerasi quando non può essere distinta l'attività di trascrizione (sintesi di mRNA) da quella di duplicazione dell'RNA virale.

DNA polimerasi RNA dipendente (Trascrittasi inversa), trascrive l'RNA virale in DNA genomico.

-Proteasi: Le proteine espresse dai singoli geni sono codificate come poliproteine di grandi dimensioni, il loro rilascio dalla catena polipeptidica come proteine individuali è effettuato dalle proteasi che scindono la poliproteina in corrispondenza di particolari amminoacidi.

-Proteina del capsido

-Proteine di movimento: Una o più proteine che consentono il passaggio da cellula a cellula

-Proteina per la trasmissione mediante vettori: Alcuni virus codificano una proteina specifica che consente la loro trasmissione mediante vettori

### •Virus a RNA e virus a DNA:

Gli RNA virali singolarmente codificano più proteine, quelli eucariotici solo una. La traduzione degli RNA virali avviene nel citoplasma, a livello dei ribosomi. Per cui gli mRNA devono essere riconosciuti dalla cellula per consentire la sintesi proteica

#### 1) SSRNA a singolo filamento con polarità positiva (+):

Ho un'unica molecola di RNA che porta informazioni per codificare le proteine. Ho sequenze differenti, con funzione identica, nel genoma ho geni strutturali (Subunità proteica capsido) e geni funzionali (Polimerasi). Nei virus piccoli ad esempio, bastano due geni, uno codifica la polimerasi, l'altro la proteina capsidica. Lo scopo dell'RNA virale è ingannare i sistemi di traduzione della cellula (ribosomi), farsi passare l'RNA messaggero, le informazioni del virus passano così ai ribosomi → trascrizione. Il fattore di inizio traduzione è importante per l'inizio dell'infezione, se l'RNA virale non viene riconosciuto, l'infezione non avviene. (Resistenza delle piante, alcuni virus per superarla perdono una "cap"). L'RNA infettante agisce da mRNA e viene direttamente tradotto a livello dei ribosomi della cellula ospite con la produzione delle proteine virali. Inizialmente si ha traduzione in proteine delle informazioni contenute nell'RNA infettante, la proteina codificata dall'RNA polimerasi è necessaria per catalizzare la replicazione dello stesso RNA virale.

Gli RNA virali a singolo filamento a polarità positiva all'estremità 5' possiedono una delle seguenti strutture:

-Cappuccio o cap: Proteggere RNA dalla degradazione e regolare la sua efficienza di traduzione. L'aggiunta al 5' della molecola di RNA avviene subito dopo la sintesi del filamento di RNA.

-Proteina di origine virale (VPg): in alcuni virus è necessaria per dare inizio alla sintesi dei filamenti complementari, in altri sostituisce la funzione di regolazione del cap.

Gli RNA virali di polarità + o - all'estremità 3' terminano con una delle seguenti strutture:

-Coda poli (A): proteggere RNA dalla degradazione

-Sequenza ripiegata simile alla struttura a trifoglio tipica degli RNA di trasferimento tRNA.

-Gruppo OH

Come è fatto un RNA virale:

-5'CAP: Ha la funzione di regolare l'efficienza di traduzione, alcuni virus la perdono per infettare.

-Sequenza necessaria per sito attacco ribosomi

-Sequenze non codificanti, non portano informazioni di sintesi delle proteine

-Codone inizio traduzione

-ORF: Strutture codificanti, qui ho la lettura, inizio traduzione. Fase di lettura che consente di codificare un'intera proteina, senza incontrare codoni di stop prematuri e quindi formare una proteina tronca, una ORF corrisponde a una parte di un gene piuttosto che al gene completo. Griglia di lettura aperta, rappresenta una sequenza di nucleotidi nella molecola di RNA messaggero che potenzialmente codifica per una proteina. Tale griglia corrisponde ad un gene.

-Codone arresto

L'RNA virale deve somigliare il più possibile all' RNA messaggero della cellula, così può ottenere da esse le proteine per il proprio ciclo.

### **La posizione delle ORF varia nel genoma:**

Virus con RNA a singolo filamento, a polarità positiva, non hanno inizialmente bisogno di trascrivere il proprio genoma perché il loro RNA può essere subito tradotto dai ribosomi della cellula.

### **Il genoma virale ha due funzioni essenziali:**

A) Agisce come mRNA

B) Serve da stampo per formare una molecola complementare di (-)(RNA) ad opera di una polimerasi virale (RNA polimerasi)

C)(-)RNA a sua volta serve come stampo per la sintesi di (+)RNA identica al genoma virale. Le nuove molecole (+)RNA possono a loro volta servire come mRNA per altre proteine oltre che rappresentare il genoma per i virus neoformati.

### **Schema replicazione RNA(+) monocistronico:**

-RNA genomico → funziona da mRNA → tradotto in poliproteina → si autoscinde in RNA polimerasi e altre proteine (coinvolte in vari processi, movimento, capsidica, trasmissione virale).

-RNA polimerasi catalizza la formazione di RNA complementari (-), sullo stampo del filamento positivo, i quali sono usati per la sintesi di nuovi filamenti genomici (+).

-Accumulo nel citoplasma di filamenti di RNA e molecole di proteina capsidica → si formano nuove proteine capsidiche.

### **Schema replicazione RNA (+) policistronico:**

-ORF all'estremità 5' dell'RNA genomico è tradotta direttamente e codifica una proteina che svolge la funzione di RNA polimerasi e catalizza la formazione di filamenti di RNA complementare (-).

-Questi filamenti sono usati come stampo per produrre l'RNA genomico e sono parzialmente

### **Silenziamento genico:**

In alcuni organismi (Uomo, insetti...) se in una cellula ho RNA a doppia elica, vengono riconosciute come estranee e tagliate in piccole porzioni di nucleotidi (21/23), grazie all'enzima "Dicer", i doppi filamenti piccoli ottenuti vengono così riconosciuti e agganciati dal complesso enzimatico e ulteriormente tagliati, diventano così a singola elica. Viene eliminata la proteina che codifica, non

avviene più la codifica, replicazione bloccata, replicazione bloccata, non sono più prodotte polimerasi.

Ho una sequenza che codifica, arriva il dicer, taglia in piccole porzioni di nucleotidi, replicazione interrotta. Usato come difesa nelle piante, il dicer taglia in tanti punti. Con questo meccanismo creo ogm con resistenza.

Trasformazione della pianta con costrutti che determinano la formazione di dsRNA capaci di indurre l'RNAi: Se nella pianta inserisco geni con un pezzo del virus (Filamento di gene complementare opposto al virus), si forma RNA, forma una molecola di dsRNA, si formano sequenze di molecole complementari, quando arriva il virus, si appaia, viene tagliato. Nella pianta non ho proteine del virus ma solo sequenze complementari. Funziona ma vietato (OGM). Il segnale può essere trasportato, sistemico, si muove nel floema, trasportato dalla pianta, posso quindi modificare il portainnesto, non serve trasformare geneticamente la varietà (Viene comunque considerato ogm).

I virus però nel tempo hanno sviluppato sistemi di difesa: Soppressori del silenziamento genico.

Es: Silenzio gene nitrato reductasi, non viene prodotto l'enzima, la pianta non cresce. Se la stessa pianta è infettata con il cmv, la pianta cresce, il virus sblocca il gene che forma l'enzima nitrato reductasi che era stato silenziato (Soppressori silenziamento genico).

**2) SSRNA a singolo filamento polarità negativa (-):** Al genoma deve essere legata la polimerasi, se no non si duplicano, resto uguale al positivo. Il genoma virale non può funzionare come mRNA. Anche in questo caso ci vuole un enzima virale, in grado di sintetizzare un intermedio di (+) RNA che potrà agire come mRNA per la sintesi delle proteine virali, ma contemporaneamente come stampo per la sintesi di (-) RNA che costituisce il genoma delle particelle virali.

Nei virus a polarità negativa, l'infettante non funziona da filamento codificante ma deve essere trascritto nel suo complemento (Filamento positivo), il quale agisce da mRNA per la sintesi proteica. Questi virus necessitano dell'enzima (Contenuto nel capsido) RNA trascrittasi per la trascrizione dell'RNA infettante in mRNA. Il processo infettivo inizia solo se si inocula l'intera particella virale oppure RNA più frazione del capsido che contiene enzima RNA trascrittasi. In questi virus la trascrizione del genoma virale è la prima cosa che avviene nella cellula ospite dopo la sua liberazione dal rivestimento proteico.

#### **Schema replicazione RNA (-) monocistronico:**

L'RNA genomico non agisce da messaggero, serve da stampo per la sintesi di RNA (+) ad opera di una trascrittasi presente nel rivestimento proteico. Questo RNA +, svolge la funzione di messaggero monocistronico e codifica una poliproteina che si autoscinde nelle proteine virali.

**3)RNA ambisenso:** Contengono una porzione di polarità positiva e una di polarità negativa, ciascuna contenente una ORF. In alcuni di questi virus, gli RNA per svolgere la funzione di mRNA necessitano dell'aggiunta del cap. Il ciclo replicativo inizia con la trascrizione del filamento di RNA a polarità negativa in quello complementare a polarità positiva.

**4)RNA a doppio filamento (dsRNA):** L'informazione genetica è contenuta solo in un filamento di ogni molecola di RNA, però questi filamenti non sono in grado di funzionare direttamente da messaggeri, è necessaria la loro trascrizione ad mRNA da parte di enzimi incorporati nel rivestimento proteico.

### 3 – Replicazione dei virus con genoma a RNA positivo

#### Fasi del ciclo di replicazione:

- Subito dopo la penetrazione nella cellula ospite, per inoculazione meccanica o tramite vettori, i virioni vengono a contatto con i ribosomi. In seguito a tale interazione si ha una rimozione parziale del capsido e l'esposizione dell'estremità 5' dell'RNA che agisce da messaggero per la sintesi proteica.

- La traduzione dell'RNA può avvenire direttamente se l'RNA è monocistronico e indirettamente se l'RNA è policistronico.

-Traduzione diretta: RNA agisce da messaggero e codifica la sintesi di una poliproteina che viene poi scissa in diversi segmenti (da una proteasi contenuta nella poliproteina), ciascuno dei quali corrisponde ad una proteina matura con attività di replicazione dell'RNA (RNA polimerasi, elicasi...), il movimento dell'RNA virale all'interno dell'ospite, la trasmissione dei virioni e la funzione di formare nuovi capsidi (Proteina strutturale). A questo punto le proteine coinvolte nella replicazione dell'RNA promuovono la sintesi di un filamento complementare sullo stampo di quello infettante con la formazione di una struttura a doppio filamento (Forma replicativa). Il filamento complementare funge da stampo per la sintesi di nuovi filamenti identici a quello iniziale. Infine le subunità della proteina del capsido e gli RNA di nuova formazione si riuniscono a formare nuove particelle virali.

-Traduzione indiretta: L'RNA genomico si comporta da messaggero solo per l'ORF contenuta nella regione 5' terminale che codifica una proteina, definita precoce, con i domini necessari sia per la trascrizione dell'informazione genetica contenuta nella regione centrale e 3' prossimale dell'RNA genomico in RNA subgenomici sia per la replicazione dell'RNA. A questo punto inizia la sintesi di un filamento complementare a quello genomico, questo filamento funge da stampo per la sintesi di filamenti di RNA identici a quello infettante iniziale e di RNA subgenomici che codificano le proteine funzionali non espresse direttamente dall'RNA genomico e quella strutturale.

- L'ultima fase del processo replicativo è l'assemblaggio delle subunità della proteina del capsido e dei filamenti di RNA genomico in particelle virali.

**1) Ingresso del virus nella cellula:** Per dare inizio al processo infettivo i fitovirus devono entrare direttamente in contatto con il protoplasma cellulare, in quanto non sono in grado di attraversare la cuticola e la parete cellulare.

**2) Decapsidazione e traduzione geni precoci che esprimono proteine funzionali:** In seguito all'ingresso del virus nella cellula ospite, la parte proteica si separa dal materiale genetico attraverso la decapsidazione e simultaneamente inizia la sintesi di proteine funzionali (Precoci), che catalizzano la trascrizione/replicazione del genoma virale. La separazione del rivestimento proteico dall'RNA virale, avviene in seguito al collegamento dei virioni con i ribosomi durante il processo di traduzione dell'RNA (Disassemblaggio co-traduzionale). Alla superficie del capsido potrebbero trovarsi dei siti con la proprietà di legarsi ai ribosomi.

-Collegamento ribosomi all'estremità 5' dell' RNA virale → disassemblaggio co-traduzionale in direzione 5' → 3' che porta alla liberazione dei 2/3 dell'RNA e alla sintesi delle proteine della replicazione (RNA polimerasi) codificate dalla orf 1 e 2

-La fase successiva del processo di disassemblaggio procede in direzione  $3' \rightarrow 5'$ , l'RNA polimerasi neosintetizzata interagisce con l'estremità 3' dell'RNA virale e progredisce in direzione 5' dando luogo al disassemblaggio co-replicazionale della restante parte della particella virale e nello stesso tempo alla sintesi di un filamento di RNA complementare a quello genomico.

**3) Replicazione (trascrizione) del genoma virale:** L'RNA infettante, dopo aver codificato la sintesi di proteine della replicazione, dirige la sintesi di nuovi filamenti di RNA con la partecipazione di un complesso enzimatico di tipo RNA replicasi codificato dal virus e di altre proteine sia virali e sia della cellula ospite. La sintesi del nuovo RNA virale si svolge attraverso due stadi:

-Formazione di una nuova catena polinucleotidica complementare a quella dell'RNA infettante, a iniziare da 3', con la costituzione di una struttura a doppia elica (Forma replicativa, RF), composta dal filamento parentale (+) e dal suo complementare (-), uniti da legami ad idrogeno.

-Nel secondo stadio si ha la sintesi ripetuta di nuovi filamenti positivi (+) lungo il filamento complementare (-), identici all'RNA parentale che progressivamente si distaccano. In tal modo si formano molteplici copie di RNA a polarità positiva su un filamento complementare.

Nella cellula la sintesi del nuovo materiale genetico può avvenire nel citoplasma o nel nucleo, a seconda del virus.

**4) Traduzione dei geni tardivi che esprimono altre proteine funzionali e una o più proteine strutturali:**

I nuovi filamenti di RNA formatasi vengono tradotti e si ha la sintesi di proteine funzionali, cosiddette tardive, con diverse funzioni (movimento, trasmissione per vettori) e della proteina dell'involucro.

**5) Assemblaggio delle particelle virali:** In seguito all'incremento di filamenti di RNA genomico e di molecole proteiche del capsido nella cellula infettata, si ha l'associazione dei due componenti per costruire particelle virali complete. Il processo di associazione è diverso, a seconda che si tratti di capsidi a simmetria icosaedrica o elicoidale.

-Capsidi a simmetria icosaedrica:

A) Interazione sequenza-specifica tra RNA e la catena peptidica della proteina dell'involucro (Complesso di iniziazione).

B) Interazioni sequenza-indipendenti tra l'RNA e gli amminoacidi che si trovano all'estremità amminoacidica della proteina capsidica.

C) Interazioni fra le subunità proteiche che contribuiscono a stabilizzare il capsido.

-Capsidi a simmetria elicoidale (TMV): Assemblaggio regolato da una regione situata vicino all'estremità 3' del filamento di RNA (Sequenza di iniziazione).

**6) Diffusione nell'ospite:** Trasmissione da cellula a cellula attraverso il sistema vascolare.

**7) Trasmissione infezione da pianta a pianta:** In seguito alla formazione di nuove particelle virali può avvenire la loro trasmissione ad altre piante mediante diverse modalità.

#### 4-Traduzione del genoma dei fitovirus (RNA singolo filamento +)

•**Traduzione introduzione:** Per traduzione si indica la traduzione in proteine delle informazioni contenute nel materiale genetico, i fitovirus utilizzano i ribosomi, i tRNA e gli amminoacidi delle cellule ospiti. I virus devono quindi mettere a disposizione dei ribosomi delle cellule eucariotiche degli mRNA in grado di essere riconosciuti come tali e di essere tradotti.

-**L'RNA messaggero** (noto con l'abbreviazione di mRNA o con il termine più generico di trascritto) è un tipo di RNA che codifica e porta informazioni durante la trascrizione dal DNA ai siti della sintesi proteica, per essere sottoposto alla traduzione. Durante la trascrizione, la RNA polimerasi "copia" l'informazione contenuta in un gene sul DNA in una molecola di mRNA. Questo processo è simile nei procarioti e negli eucarioti. Una differenza notevole, invece, è che l'RNA polimerasi degli eucarioti si associa con gli enzimi di verifica dell'mRNA durante la trascrizione, in modo da far procedere velocemente la modificazione dopo l'inizio della trascrizione.

Le regioni codificanti sono composte da codoni che vengono decodificati e tradotti in proteine dai ribosomi. Le regioni codificanti cominciano con un codone di inizio e terminano con tre possibili codoni di stop.

L'mRNA si dice monocistronico quando porta l'informazione per un solo gene mentre si dice policistronico se porta l'informazione per più geni (il trascritto di mRNA corrispondente è in grado di tradurre per più catene polipeptidiche diverse, in sequenza).

-**L'RNA transfer** (o RNA di trasporto), abbreviato in tRNA, è una piccola catena di RNA (costituita da circa 70-90 nucleotidi) che trasferisce un amminoacido specifico di una catena polipeptidica in crescita al sito ribosomiale della sintesi proteica durante la traduzione. Il tRNA ha un sito di attacco per l'amminoacido ed una regione con tre basi (nucleotidi), chiamata anticodone, che riconosce il corrispondente codone a tre basi dell'mRNA attraverso l'appaiamento di basi complementari. Ogni tipo di molecola di tRNA può legarsi ad un solo tipo di amminoacido, ma essendo presenti nel DNA tipi diversi di codoni che specificano uno stesso amminoacido, molti tipi di tRNA con anticodoni differenti possono portare lo stesso amminoacido.

**La molecola di RNA transfer è dunque il dispositivo "adattatore" ipotizzato da Francis Crick, che media il riconoscimento della sequenza del codone nell'mRNA e permette la sua traduzione nell'amminoacido appropriato.**

### **Sono però presenti 3 problemi per i virus:**

-Le cellule eucariotiche sintetizzano, tramite l'RNA polimerasi II gran parte del mRNA nel nucleo utilizzando come stampo una molecola di DNA, sono quindi prive degli enzimi in grado di effettuare la trascrizione dell'RNA virale in filamenti di mRNA. Soltanto i fitovirus che contengono DNA provvisto degli opportuni segnali di riconoscimento possono utilizzare l'RNA polimerasi II per trascrivere il DNA in mRNA. Tutti gli altri virus devono sintetizzare i propri enzimi per la replicazione e la trascrizione del loro genoma.

-I ribosomi eucariotici traducono mRNA monocistronici, iniziano la sintesi proteica in corrispondenza del primo codone AUG situato dopo l'estremità 5' di una catena di mRNA e continuano fino al codone che specifica la terminazione della catena peptidica, raramente iniziano la sintesi proteica da un codone AUG interno. Questo meccanismo di lettura degli mRNA da parte dei ribosomi eucariotici non consente quindi di esprimere i geni situati all'interno di una catena nucleotidica, svantaggioso per gli mRNA virali, i quali sono solitamente policistronici (poligenici), ossia una molecola di mRNA contiene informazioni per più proteine diverse. Questa caratteristica

dipende dalla limitata dimensione dei genomi virali che porta alla compattezza delle informazioni geniche. Per adattarsi a questo sistema di lettura i virus hanno sviluppato meccanismi.

Gli mRNA eucariotici presentano all'estremità 5' la cuffia o cap, mentre al termine 3' sono provvisti di una serie di adenine detta coda poli (A). Queste formazioni alle estremità dell'mRNA eucariotico stabilizzano il suo attacco ai ribosomi per un'efficiente traduzione secondo un modello di traduzione co-dipendente, in assenza del cappuccio (o di una struttura simile) e della coda si ha una diminuzione dell'efficienza di traduzione. Ho interazione fra le due strutture alle estremità dell'mRNA che si collegano tra di loro nella fase di inizio del processo di traduzione, quando le subunità ribosomiali 40s e 60s si associano tra di loro in corrispondenza del codone di partenza AUG e formano un ribosoma di tipo 80s funzionalmente attivo.

### **Formazione del ribosoma eucariotico funzionale:**

- Associazione di specifiche proteine chiamate fattori d'inizio eucariotici
- Legame delle subunità ribosomiale leggera (40s) con la sequenza leader, per formare il complesso d'inizio il quale scorre lungo la catena di mRNA alla ricerca del primo codone AUG.
- Poi avrò il collegamento fra l'anticodone del tRNA e il codone AUG.
- Successivamente si avrà la combinazione della subunità ribosomiale pesante (60s) in corrispondenza del codone di partenza AUG.
- Si forma così il ribosoma 80s funzionalmente attivo.

### **Modello di traduzione co-dipendente di un mRNA eucariotico:**

Meccanismo di interazione tra le due strutture terminali di una molecola di mRNA.

- Le proteine che agiscono come fattori di inizio si legano prima al cappuccio e poi alla coda.
- Si forma un complesso stabile tra le due estremità dell'mRNA permettendo un efficace riutilizzo dei ribosomi.

Gli mRNA privi di cappuccio e/o coda, hanno sviluppato delle formazioni terminali che svolgono le stesse funzioni del cappuccio o della coda.

- mRNA del TMV provvisto di cappuccio ma privo di coda poli (A), nella regione 3' possiede quindi brevi segmenti a doppio filamento che danno origine a cinque pseudonodi. Due servono per la replicazione dell'RNA e i restanti tre intensificano la traduzione dell'mRNA virale.
- mRNA privi di cappuccio ma provvisti di coda: interazione diretta della sequenza non tradotta al termine 5' con la coda.
- mRNA privi sia di cappuccio che di coda: interazione tra sequenza leader al termine di 5' e una sequenza di attivazione situata all'estremità 3'.

•**Meccanismi di traduzione degli RNA virali:** Per adattarsi al sistema di produzione delle proteine da parte delle cellule eucariotiche i fitovirus hanno sviluppato diversi meccanismi. Questi meccanismi intervengono attraverso il trasferimento delle informazioni geniche dall'RNA virale ad RNA trascritti tramite la sintesi di mRNA subgenomici e intervengono anche durante la trasformazione delle informazioni geniche contenute nell'mRNA in amminoacidi (Traduzione).

**1) Sintesi di mRNA subgenomici:** Questa strategia consente ai virus di esprimere geni situati all'interno del loro RNA genomico. In questo caso la regione in prossimità del termine 3' del filamento di RNA virale non viene tradotta in proteine ma serve da matrice per la sintesi di uno o più RNA subgenomici in grado di fungere da messaggeri. Ogni mRNA subgenomico è trascritto ad iniziare da una specifica sequenza promotrice. Quando sono presenti più geni vengono trascritti più mRNA subgenomici. Inoltre con questa strategia ho una regolazione temporale della sintesi proteica determinata dalla trascrizione dei vari mRNA subgenomici in tempi diversi del ciclo infettivo. Ad esempio nel TMV la poliproteina coinvolta nella replicazione del genoma (codificata direttamente dell'RNA genomico), e la proteina di movimento, codificata da un mRNA subgenomico, sono prodotte soltanto durante la fase iniziale del processo infettivo, mentre quella capsidica codificata da un altro mRNA subgenomico è espressa durante la fase finale dell'infezione. Questo fenomeno è governato dalle sequenze del filamento complementare a quello genomico che costituiscono i siti d'interazione con l'RNA polimerasi (siti promotori) per la sintesi degli mRNA subgenomici.

**2) Sintesi di una poliproteina:** L'RNA virale viene tradotto come monocistronico e dirige la sintesi di una lunga catena polipeptidica la quale viene scissa nei prodotti proteici dei singoli geni da una o più proteasi rilasciate dallo stesso polipeptide. Questa strategia consente di produrre parecchie proteine funzionali con il minimo di informazione genetica, il problema è che le singole proteine sono prodotte in quantità equimolare. La presenza di elevate quantità di proteine coinvolte nella replicazione dell'RNA genomico potrebbe ostacolare il suo incapsidamento, portandolo ad una continua replicazione anziché all'unione con le subunità del capsido. Per evitare questo problema i virus abbinano la produzione della poliproteina ad altre strategie di espressione del genoma. Nei virus che usano solo questa strategia il meccanismo per regolare la disponibilità cellulare delle proteine prodotte con la traduzione dell'RNA virale si basa sulla formazione di inclusioni proteiche in modo da rendere inoperative le proteine virali presenti in quantità eccedente.

**3) Inizio della sintesi proteica dal secondo codone AUG sul filamento di mRNA o scansione scorrevole:**

La ORF situata all'estremo 5' dell'mRNA virale, non viene tradotta regolarmente dai ribosomi perché il codone di partenza AUG si trova inserito in una sequenza nucleotidica debole, poco favorevole all'avvio della traduzione. La subunità ribosomiale 40S legata all'mRNA si sposta quindi in direzione del termine 3' dell'mRNA alla ricerca di una tripletta AUG contenuta in una sequenza nucleotidica intensificatrice che rende più favorevole l'avvio della traduzione. Il processo è casuale, in tal modo è assicurata la traduzione sia della prima che della seconda ORF nel filamento di mRNA.

**4) Scorrimento del modulo di lettura dei ribosomi:** Tipica dei virus con corredo genetico costituito da ORF parzialmente sovrapposte o contigue. La maggioranza dei ribosomi completa il processo di traduzione in corrispondenza del codone di arresto della prima ORF, però alcuni ribosomi (1 su 10), in corrispondenza di una sequenza detta scivolosa, interrompono il loro scorrimento lungo la catena dell'mRNA permettendo a due tRNA situati sui siti di legame P e A (del ribosoma) di scivolare all'indietro o in avanti di una base sul complesso mRNA-ribosoma (meccanismo chiamato -1 o +1 frameshift). Dopo riprendono il loro movimento traducendo la sequenza nucleotidica tramite un nuovo modulo di lettura. In tal modo i ribosomi riescono a superare il codone di arresto della prima griglia di lettura.

**5) Suddivisione del genoma in diversi segmenti di RNA:** Alcuni virus per evitare RNA policistronici presentano il genoma diviso in più segmenti di RNA, ciascuno dei quali contiene una griglia di lettura.

**6) Soppressione saltuaria del codone di arresto della griglia di lettura 5' prossimale:** Questo meccanismo di traduzione del genoma consente ad alcuni ribosomi di non distaccarsi regolarmente dalla molecola di mRNA virale in corrispondenza del codone d'arresto della prima ORF ma di proseguire la fase di allungamento della catena peptidica fino al codone di arresto della ORF successiva. Si ha così la produzione di una proteina, denominata proteina di fusione, comprendente gli amminoacidi codificati da entrambe le ORF. Però si formano sia la proteina specificata dalla prima ORF che quella di fusione dal momento che la soppressione del codone d'arresto non avviene regolarmente ma dipende dalla presenza di appropriati tRNA (tRNA soppressori). La proteina codificata dalla prima ORF è sempre più abbondante di quella di fusione, quella di fusione solitamente svolge la funzione di RNA polimerasi. Questo meccanismo svolge la medesima funzione dello scorrimento del modulo di lettura dei ribosomi, infatti essi consentono ai virus di limitare la produzione della proteina espressa con questa modalità rispetto alle altre proteine codificate dal genoma virale.

**7) Collegamento dei ribosomi all'interno della catena mRNA:** In questo tipo di meccanismo le subunità ribosomiali 40S anziché congiungersi alla struttura a cappuccio presente all'estremità 5' dell'mRNA e poi spostarsi a valle lungo la sequenza leader fino al primo codone AUG dove si forma il complesso d'inizio della traduzione, si collegano all'interno della sequenza leader in corrispondenza di una regione con complesse strutture secondarie, chiamata sito interno di entrata dei ribosomi (IRES), la cui presenza induce il loro spostamento fino al codone d'inizio di una ORF interna. Questo processo di associazione ribosomi-mRNA indipendente dalla struttura a cappuccio al 5' dell'mRNA è stato implicato nell'espressione del gene per la proteina capsidica di PVX e di un isolato di TMV da crucifere. In entrambi i virus la proteina capsidica normalmente è espressa mediante un mRNA subgenomico monocistronico provvisto di cappuccio. In alcuni isolati questa proteina può essere espressa anche da un mRNA subgenomico bicistronico privo di cappuccio, con il gene per la proteina di movimento 5' prossimale e quello per la proteina capsidica distale, attraverso il collegamento dei ribosomi al sito IRES e avvio della traduzione dal secondo codone AUG.

**8) Scorrimento discontinuo dei ribosomi:** Questo meccanismo non gli riguarda i virus ad RNA ma riguarda i virus a DNA. In presenza di un mRNA contenente una serie di ORF molto brevi che possono interferire con la traduzione della ORF principale, le subunità ribosomiali 40S anziché scorrere regolarmente lungo la sequenza leader, si trasferiscono da un sito donatore situato all'estremità 5' della molecola di RNA ad un sito accettore situato in prossimità del codone AUG della prima ORF principale.

**• Principali strategie d'espressione del genoma dei fitovirus con RNA a singolo filamento positivo:**

**1) Traduzione monocistronica dell'RNA:** Il genoma funge da monocistronico e dirige la sintesi di un lungo polipeptide il quale viene scisso proteoliticamente nelle proteine dei singoli geni.

**2) Parziale traduzione dell'RNA genomico e sintesi di mRNA subgenomici:** La regione dell'RNA virale prossimale alla terminazione 5' agisce da messaggero e codifica una proteina che catalizza dapprima la formazione di un filamento di RNA (-) sullo stampo di quello genomico e quindi la formazione di corti segmenti di RNA sullo stampo del filamento (-) co-terminali con la regione 3' dell'RNA genomico, i quali funzionano da messaggeri (mRNA subgenomici) e consentono la conversione in proteine della sequenza del genoma virale non espressa nella prima lettura. Tipica organizzazione genomica dei Potexvirus, l'informazione genetica di questi virus è contenuta in una molecola di RNA con 5 o 6 ORF. L'RNA genomico agisce direttamente da messaggero per la ORF

all'estremità 5', mentre l'espressione delle restanti ORF avviene attraverso due mRNA subgenomici. L'ORF1 codifica RNA polimerasi.

**3) Segmentazione del genoma e produzione di una poliproteina:** Il genoma è costituito da due molecole di RNA, entrambe monocistoniche e codificano ciascuna una poliproteina che viene scissa per formare le proteine dei singoli geni. Ad esempio nei Comoviridae la poliproteina codificata dall'RNA di maggiore dimensione (RNA1) viene scissa in 5 proteine diverse, tra cui quelle che compongono la replicasi virale, mentre quella espressa dall'RNA di minore lunghezza (RNA2) è scissa nella proteina di movimento e in una o due proteine capsidiche a seconda dei generi. Queste scissioni sono operate da una proteasi rilasciata dalla poliproteina codificata dall'RNA-1.

**4) Segmentazione del genoma e sintesi di un mRNA subgenomico:** I due RNA di maggiore dimensione (RNA1 e RNA2) sono monocistronici e codificano le proteine che catalizzano la replicazione dell'RNA virale. Il terzo segmento genomico (RNA3) possiede due ORF separate da una regione intergenica contenente la sequenza promotrice che avvia la sintesi del filamento di RNA subgenomico. La ORF situata all'estremità 5' dell'RNA3 viene tradotta direttamente in una proteina necessaria a regolare il movimento delle particelle virali da cellula a cellula, mentre l'altra ORF (con le info per la proteina capsidica) è espressa tramite un mRNA subgenomico trascritto a iniziare dalla sequenza promotrice sul filamento di RNA(-).

**5) Soppressione del codone d'arresto della prima griglia di lettura e sintesi di mRNA subgenomici:** Una molecola di RNA contenente 4 o 5 ORF, le ORF 1 e 2 sono espresse direttamente dall'mRNA genomico, la ORF1 codifica una proteina con elementi caratteristici delle metiltransferasi e per soppressione saltuaria del suo codone di arresto contribuisce all'espressione della ORF2 con la produzione di una proteina di fusione con elementi caratteristici delle RNA polimerasi virali. Le restanti ORF sono espresse mediante mRNA subgenomici trascritti ad opera degli enzimi codificati dalle ORF 1 e 2.

**6) Segmentazione del genoma, scorrimento del modulo di lettura dei ribosomi e sintesi di un mRNA subgenomico:** Il genoma è costituito da due segmenti di RNA, l'RNA di maggiore dimensione (RNA1), contiene tre ORF. Le ORF 1 e 2 contengono la sequenza scivolosa che permette lo spostamento dello schema di lettura dei ribosomi all'indietro e quindi il superamento del codone di arresto della ORF1. L'RNA viene così tradotto e si ha la sintesi di una poliproteina (con motivi tipici della RNA polimerasi), composta dalle proteine codificate dalle ORF 1 e 2. La ORF3 è espressa mediante la formazione di un mRNA subgenomico e codifica la proteina capsidica. L'RNA minore è monocistronico e dirige la sintesi di una proteina che regola il movimento dell'RNA virale da cellula a cellula.