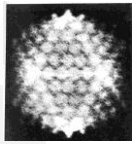
13.
La genetica dei batteriofagi

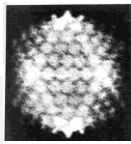


I virus: caratteristiche generali

- I **virus sono agenti infettivi con le seguenti caratteristiche distintive**:

- Dimensioni estremamente piccole (sono filtrabili) , 20-400 nm
- **Parassitismo intracellulare obbligato** (non possono produrre energia o sintetizzare a. nucleici e proteine al di fuori di una cellula ospite).
- Per esistere in natura **devono essere infettanti**
- Organizzazione strutturale semplice non cellulare
- Presenza di un **solo tipo di acido nucleico (DNA o RNA)**

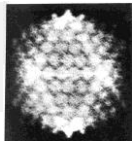
- La molecola può essere
  - singola o doppia;
  - lineare o circolare; intera o segmentata.
- Il genoma virale può possedere da 2000 a 200.000 basi nucleotidiche;
- da 5 a più di 100 geni.



I virus: caratteristiche generali (cont)

- Possiedono:
  - un **involucro proteico** (**capside**)
  - a volte, un **involucro lipoproteico** (**pericapside** o peplos/envelope, involucro/mantello)
- Presentano in **superficie strutture proteiche** (**antirecettori**)
  - queste si legano a specifici recettori della cellula bersaglio
- Si moltiplicano per **sintesi separata** e
  - successiva **riunione dei loro componenti**

I virus: caratteristiche generali (cont.)



- **Spettro d'ospite**. I virus si moltiplicano solo in particolari cellule ospiti e di conseguenza vengono suddivisi in tre classi principali:

  - **virus batterici (o batteriofagi)**
  - **virus animali**
  - **virus vegetali**

- In generale, i **genomi** **a RNA sono più diffusi tra i virus vegetali** sebbene si conoscano diversi virus delle piante a DNA, ad esempio i Geminiviridae e i Caulimoviridae.
- Negli animali,
  - i virus a RNA tendono a diffondersi e passare a ospiti di specie diverse compiendo il cosiddetto **"salto di specie",**
  - mentre i virus animali a DNA tendono a essere più specie-specifici per gli ospiti in cui si replicano.

Origine dei virus

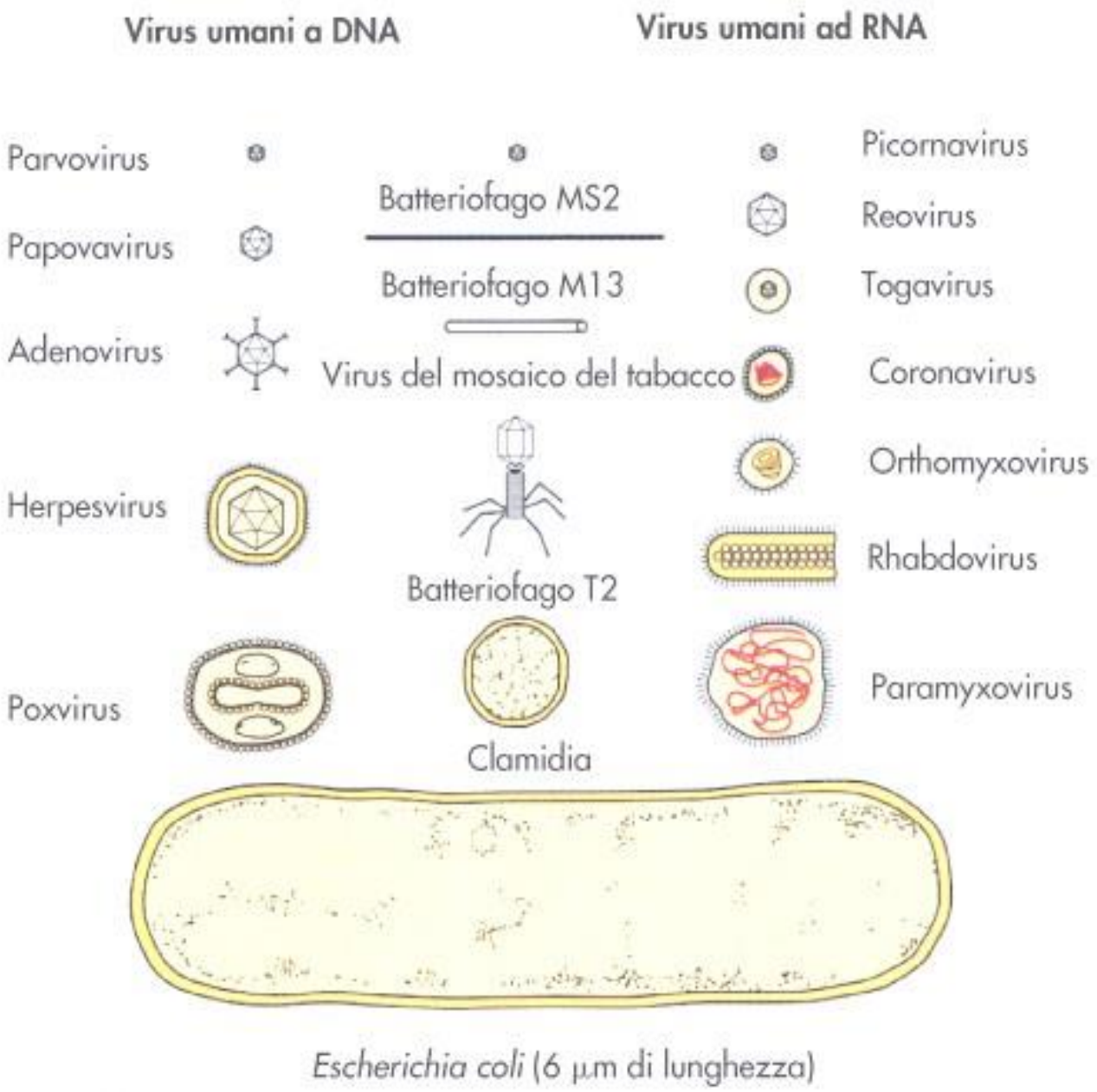
- **Evoluzione retrograda**
  - **forme degenerate di parassiti intracellulari**:
    - i loro genomi si sarebbero progressivamente ridotti in quanto la maggior parte delle funzioni vengono fornite dalla cellula ospite.
    - Questa ipotesi potrebbe spiegare l'origine di virus complessi quali i Poxvirus

- **Teoria della "evasione dei geni"**
  - Si sarebbero **evoluti da elementi genetici capaci di replicazione autonoma** (plasmidi e trasposoni)

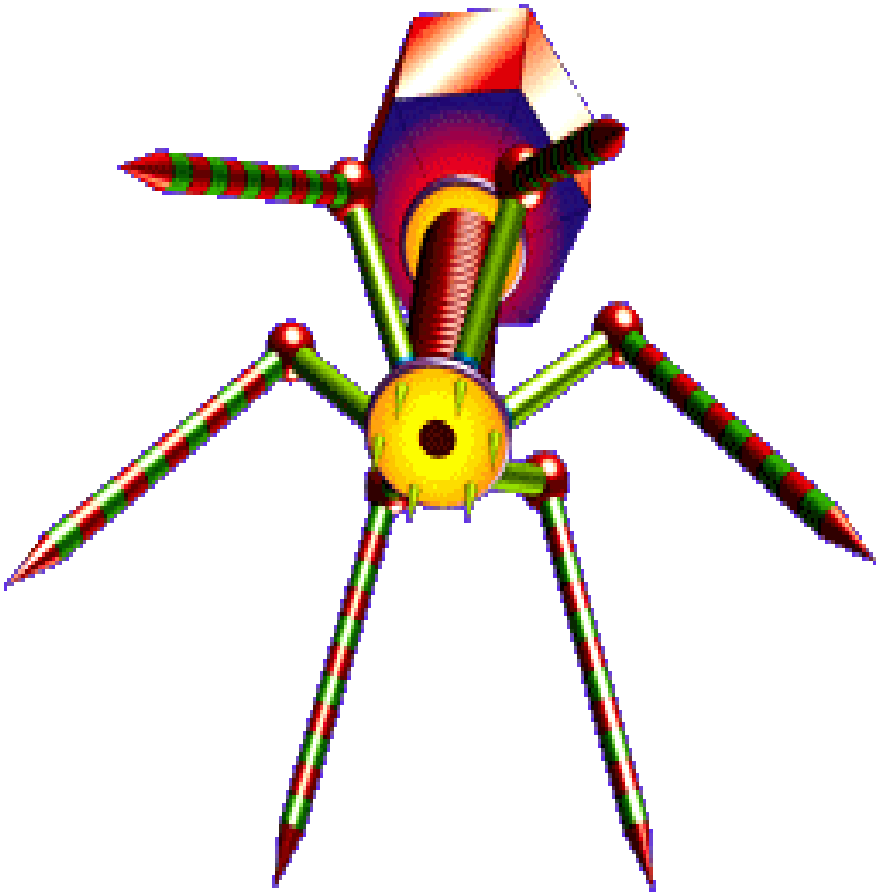
Principali differenze fra procarioti e virus

	Eubatteri	Micoplasmi	Ricketsie	Clamidie	Virus
Presenza contemporanea di DNA ed RNA	+	+	+	+	-
Presenza di ribosomi	+	+	+	+	-
Capacità biosintetiche autonome	+	+	+	+	-
Sensibilità agli antibiotici	+	+	+	+	-
Presenza di sistemi enzimatici per la produzione di energia	+	+	+	-	-
Crescita in terreni artificiali acellulari	+	+	-	-	-
Sensibilità all'interferone	-	-	-	+	+

Confronto tra le dimensioni di virus e batteri



Classificazione Batteriofagi



- Attualmente,
  - > 5.000 batteriofagi sono stati studiati al microscopio elettronico
  - Possono essere divisi in **13 famiglie di virus**.

Classificazione: 13 famiglie di batteriofagi

Double stranded DNA, Non-enveloped



P2

Myoviridae



T2



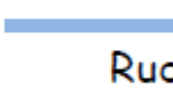
λ

Siphoviridae



P22

Podoviridae



SIRV 1, 2

Rudiviridae



Fusselloviridae

SSV1



Tectiviridae

PRD1



Corticoviridae

PM2

Double stranded DNA, Enveloped



Plasmaviridae



TTV1

Lipothrixviridae

Single-stranded DNA



M13 & fd

Inoviridae



Microviridae

ΦX174

Single stranded RNA



MS2

Leviviridae

Double stranded RNA



phi6[66]

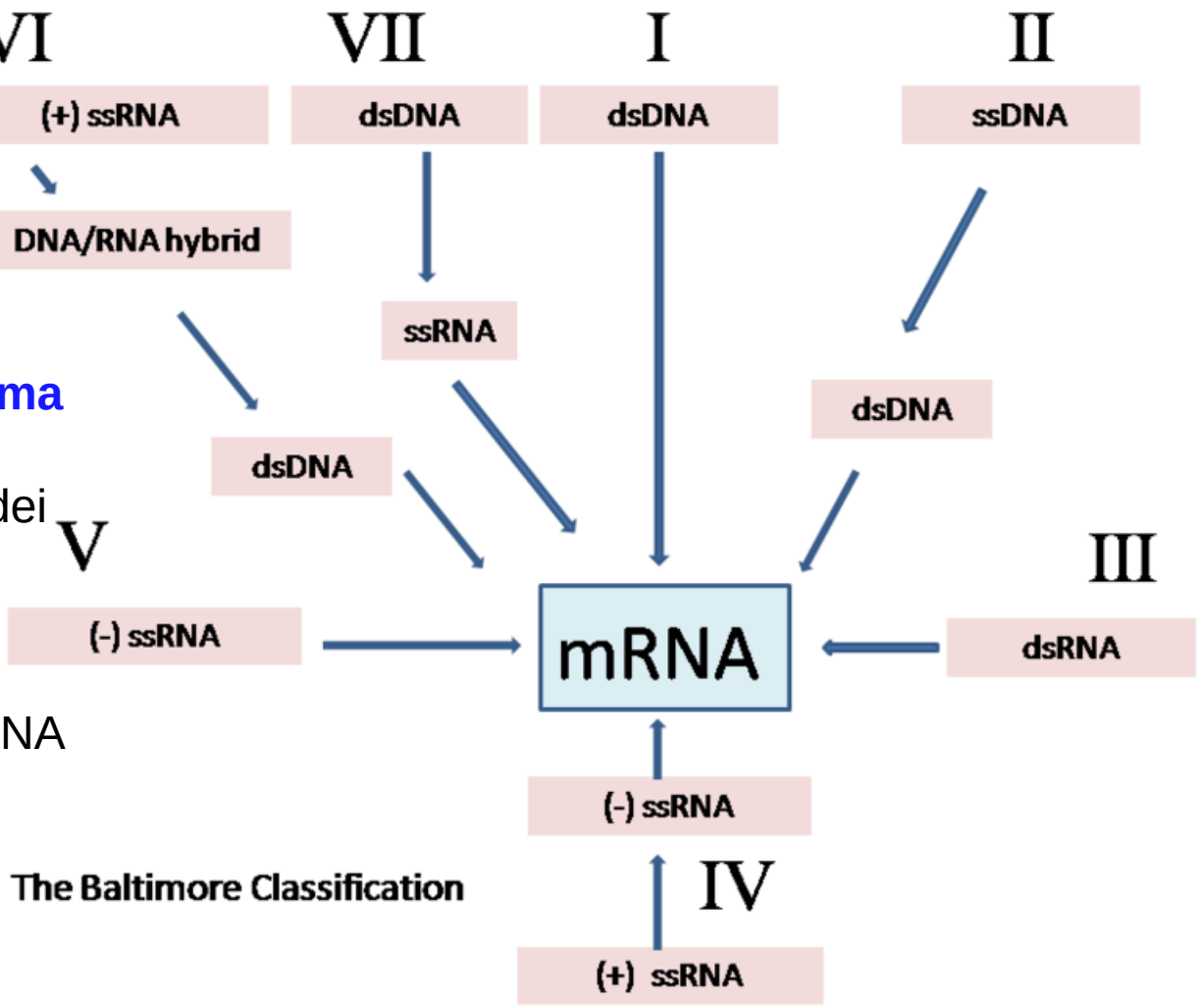
Cystoviridae

Sistema di classificazione secondo Baltimore.

-il riconoscimento del **ruolo centrale della sintesi obbligatoria di mRNA** virus-specifici per **produrre le proteine virali in ogni ciclo** replicativo ha ispirato David Baltimore a proporre uno **schema classificativo basato** su:

- s**truttura** (natura e polarità) dei genomi presenti nel virione
- **differenti meccanismi molecolari** con cui i diversi genomi virali producono gli mRNA e dirigono la loro replicazione.

- In questo modo vengono definite 7 classi di virus Illustrate in figura



Struttura e funzione del fago T4

- **Un fago infettante inietta il proprio DNA mediante la sua struttura centrale nella cellula batterica.**

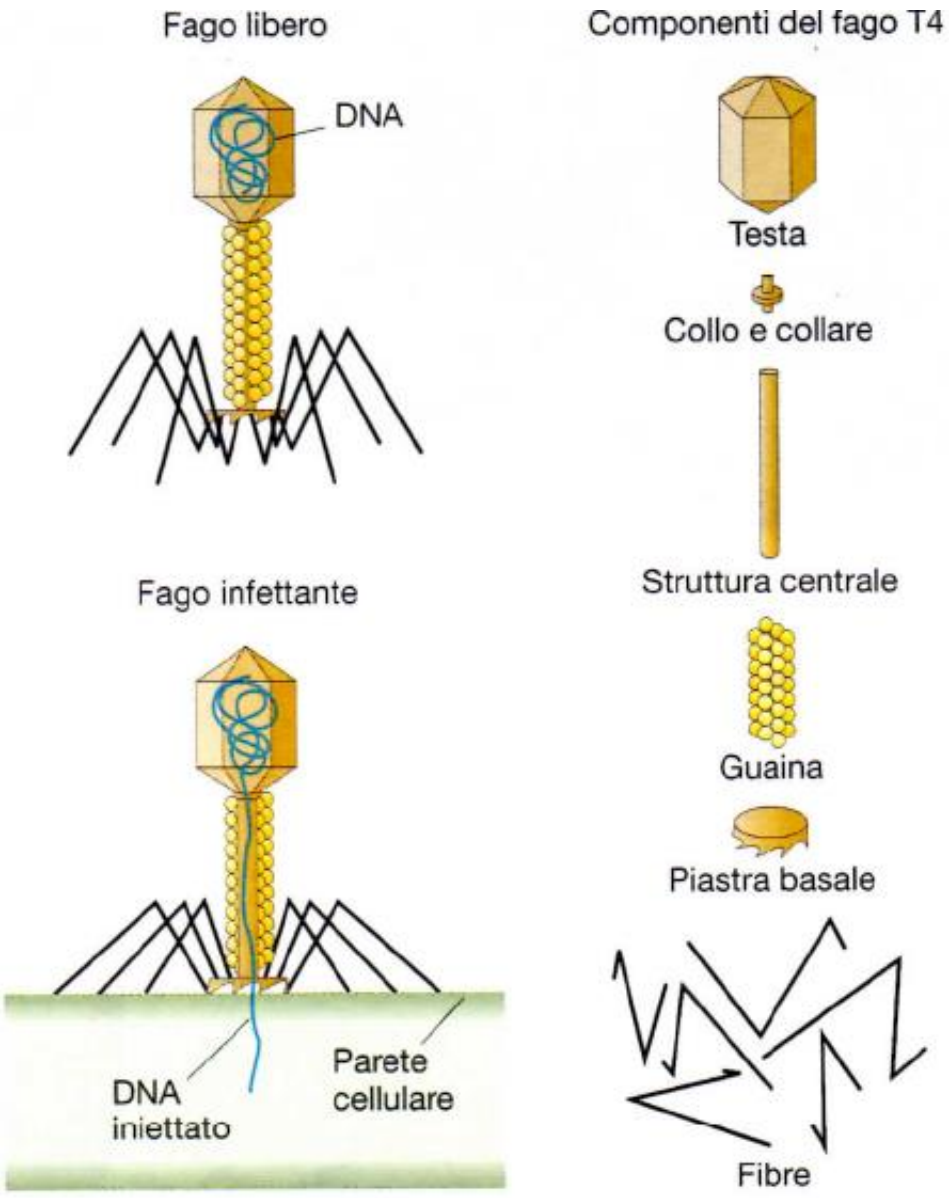
- *(A sinistra)*
  - Il batteriofago T4 è mostrato nel suo stato libero

e

- poi durante il processo di infezione di una cellula di *E. coli.*

- *(A destra)*
  I **principali componenti strutturali del fago T4.**

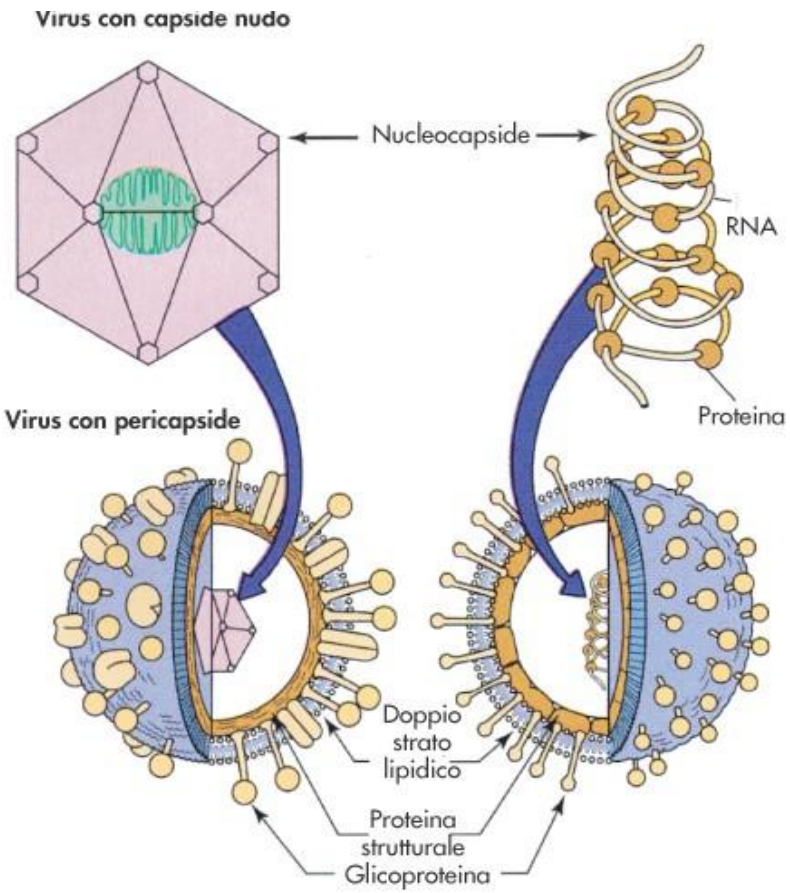
principali componenti strutturali



Struttura dei virus

- Le particelle virali, o **virioni**, sono costituite da una o più molecole di DNA o RNA rivestite da un involucro proteico o **capside.**

- In alcuni virus il **nucleocapside** (acido nucleico + capside) può essere avvolto da un rivestimento membranoso (virus con involucro-mantello/envelope)

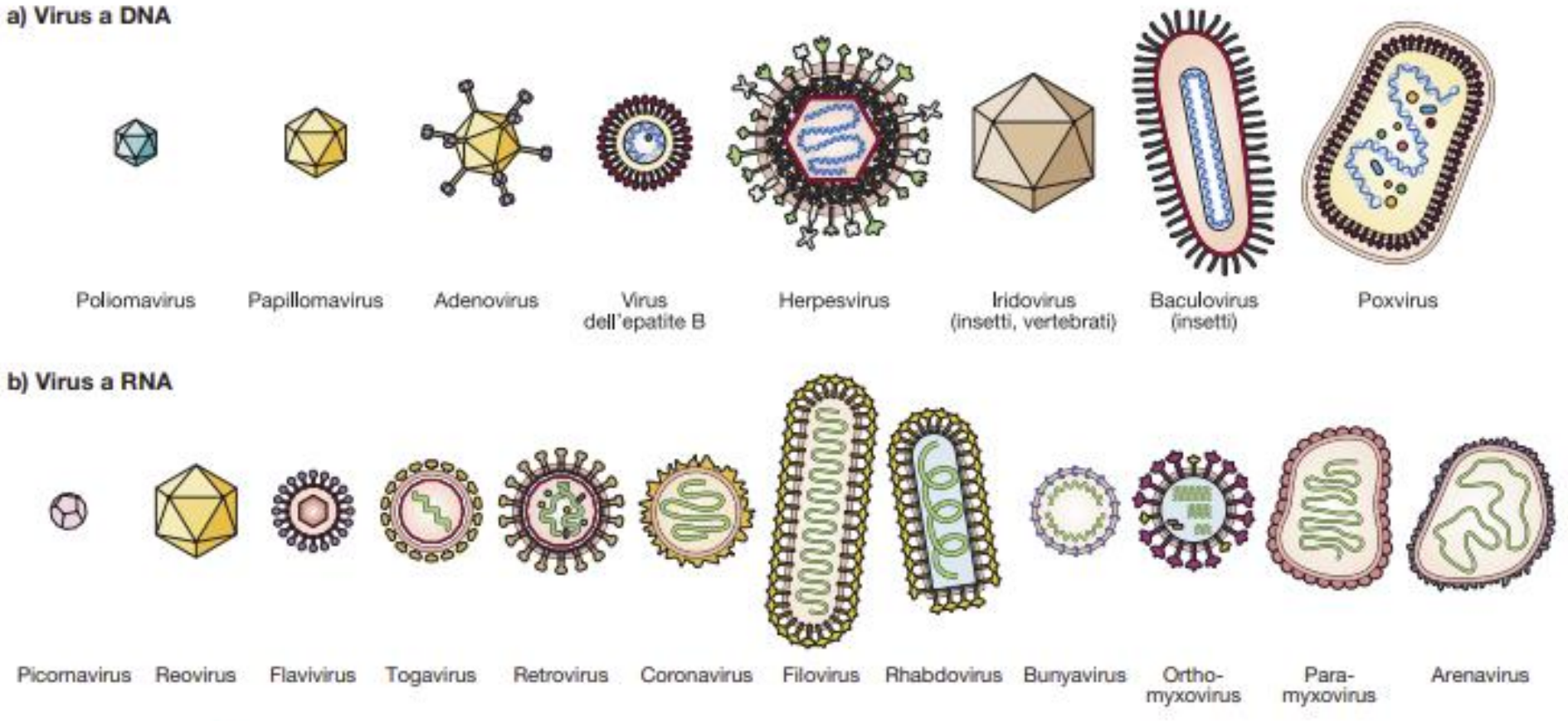


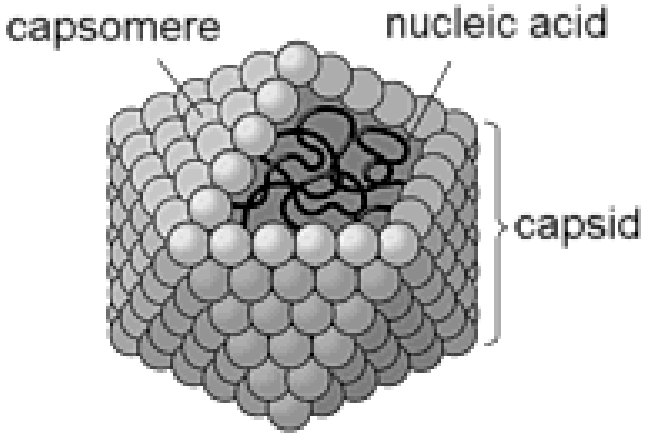
- Le dimensioni possono variare da 10 a 400 nm

- In base alle caratteristiche morfologiche è possibile individuare 4 gruppi principali:
  - Virioni con capside icosaedrico
  - Virioni con capside elicoidale
  - Virioni dotati di pericapside o involucro-mantello/envelope
  - Virioni complessi

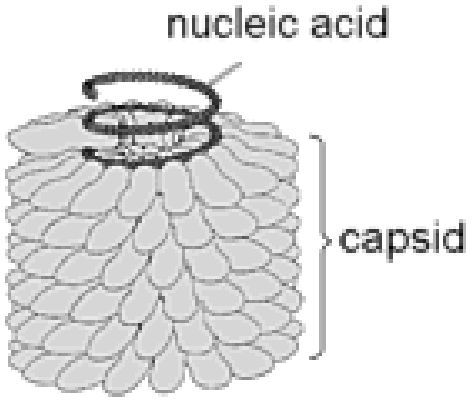
- Sia i **capsidi elicoidali che icosaedrici** **sono strutture macromolecolari costruite da una o poche subunità proteiche**, dette **capsomeri**, ripetute un gran numero di volte.
  - Questa strategia costruttiva ha il vantaggio di utilizzare con la massima efficienza l'informazione immagazzinata nel genoma virale

DIVERSITÀ DI FORME E DIMENSIONI DEI VIRUS ANIMALI.

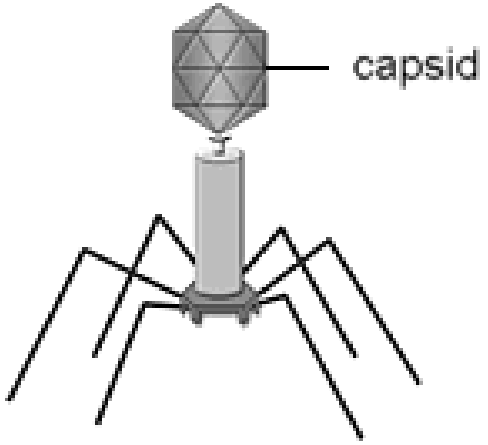




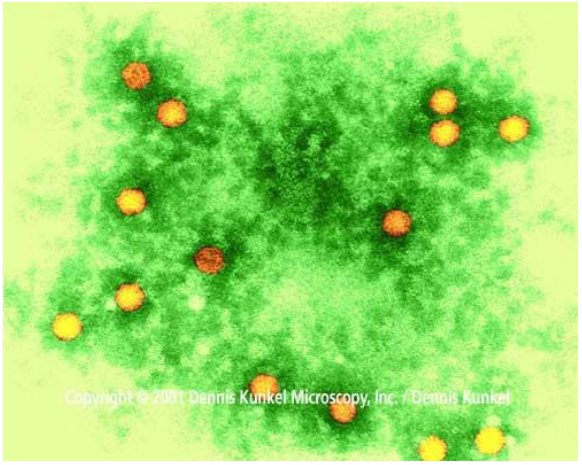
Polyhedral

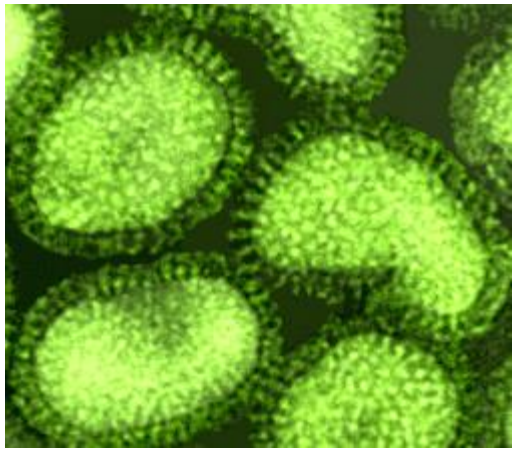


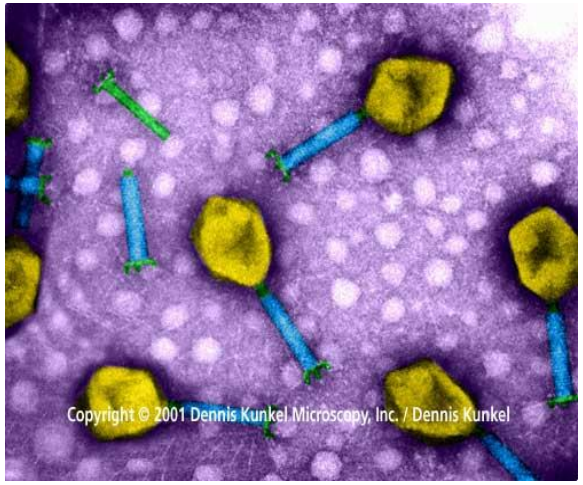
Helical



Binal

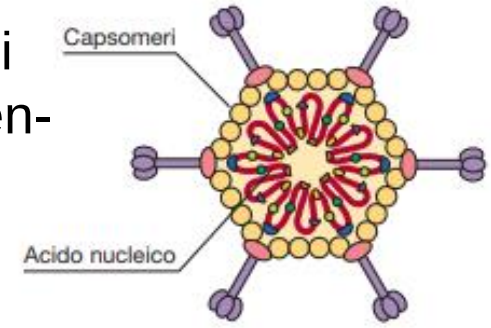




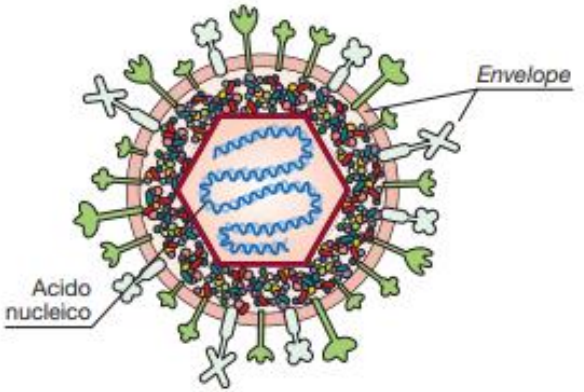


Capside

- è una struttura che **protegge il genoma virale** da eventuali danni fisici, chimici o enzimatici
- permette, quindi, la persistenza del virus nell'ambiente extra-cellulare.
- è inoltre **essenziale nell'interazione con la cellula ospite** nella prima fase dell'infezione.

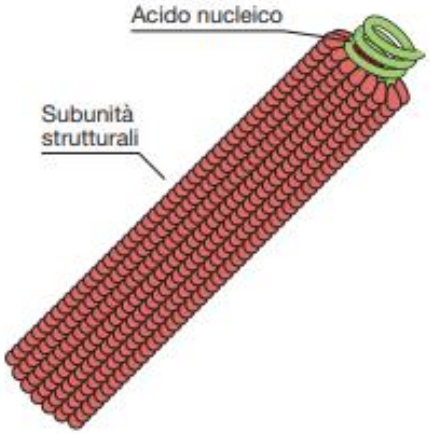


Virione nudo
con capside icosaedrico
(es. Adenovirus)

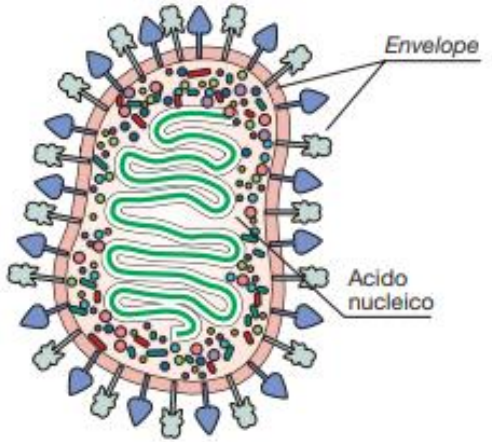


Virione rivestito
con capside icosaedrico
(es. Herpesvirus)

- Il capside può quindi essere paragonato a una struttura metastabile la cui architettura è **funzionale**
- non solo all'impacchettamento e al mantenimento del genoma virale al suo interno,
- ma anche alla sua rapida liberazione al momento dell'infezione



Virione nudo
con capside elicoidale
(es. TMV)

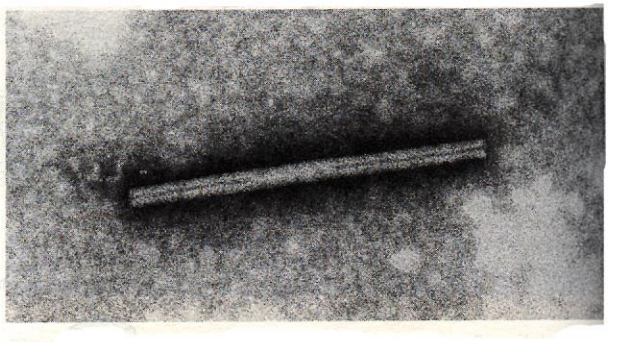


Virione rivestito
con capside elicoidale
(es. Paramyxovirus)

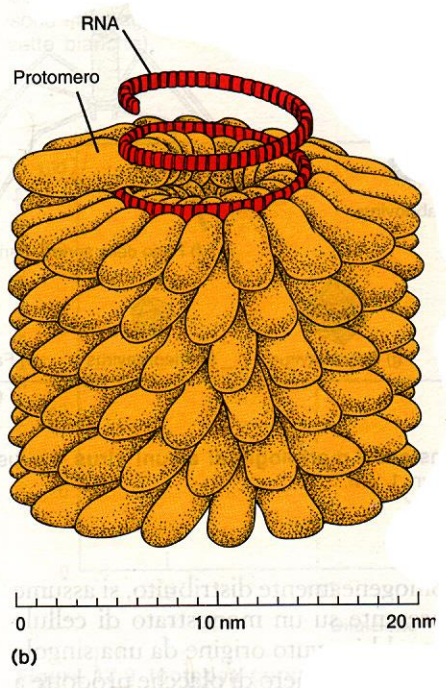
1. Capsidi a simmetria elicoidale

- Di **forma cilindrica**, costituiti da un unico tipo di capsomero (monomeri proteici) **avvolto a spirale attorno all'asse centrale** contenente l'acido nucleico

- I capsidi possono essere r**igidi** (virus del mosaico del tabacco e il batteriofago M13) o f**lessibili** (virus influenzali)



(a)



Esempio: virus del mosaico del tabacco (TMV)

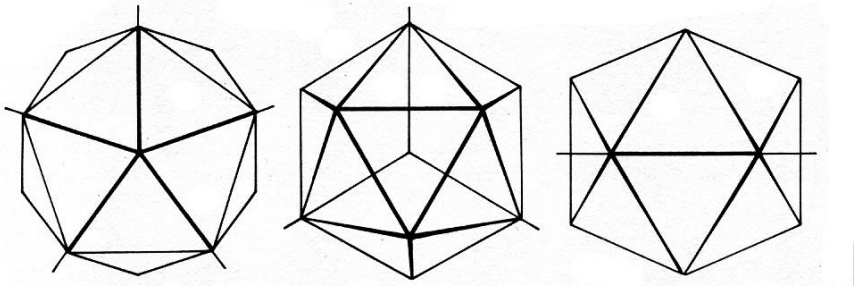
- Capside cilindrico rigido di 15-18 nm di diametro e circa 300 nm di lunghezza.
- L'unica proteina del **capsomero è di 158 aa**
- Acido nucleico: RNA a singolo filamento di 6000 nucleotidi

Cristallizzato da Stanley nel 1935

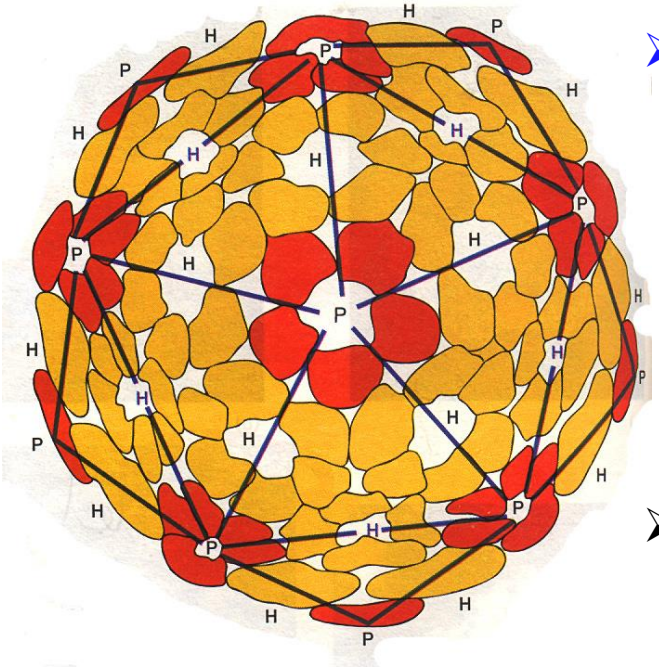
- **Spesso la ripetizione di una sola proteina rappresenta l'unica possibilità di rivestire un acido nucleico di piccole dimensioni**

2. Capsidi a simmetria icosaedrica

- Icosaedro: solido regolare
a 20 facce triangolari
e 12 vertici



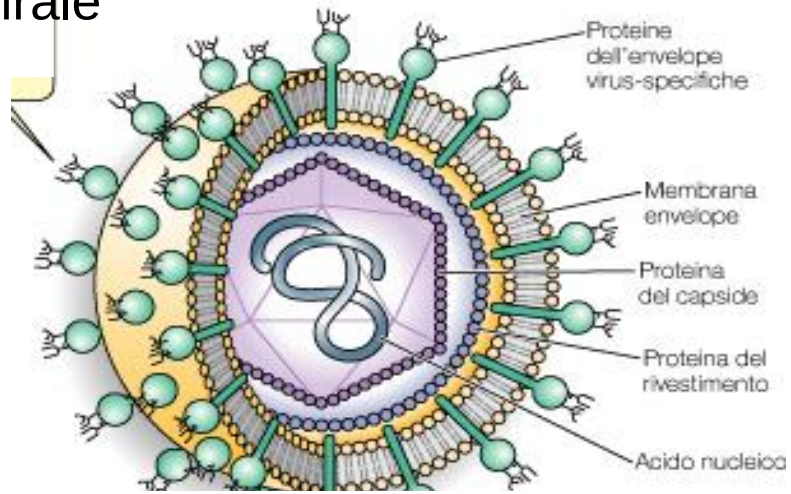
- I **capsomeri sono formati da 5 o 6 protomeri** che possono essere anche tutti identici

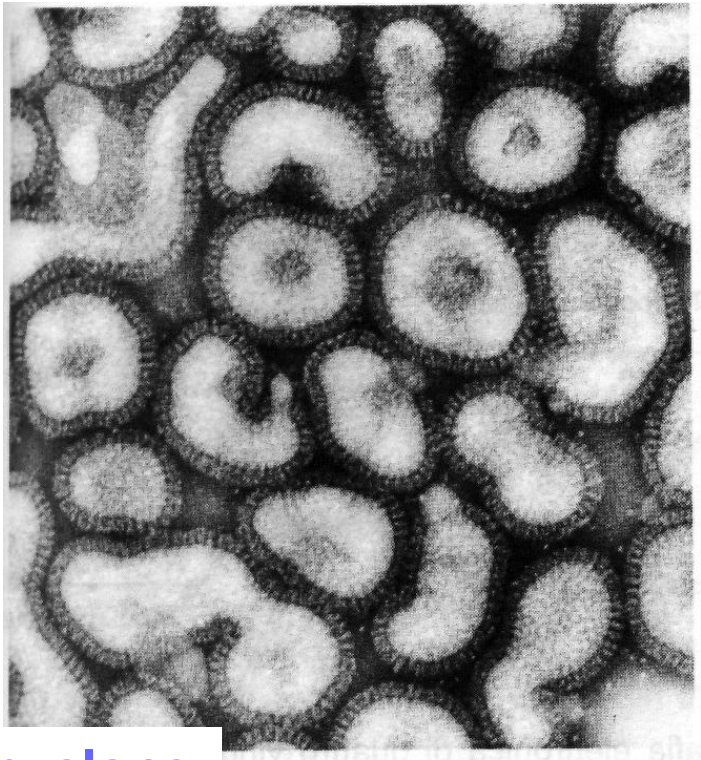


- I **pentoni o pentameri** possiedono 5 subunità e sono disposti ai vertici dell'icosaedro;
- gli **esoni** o **esameri** hanno 6 subunità e costituiscono le facce
  - Il numero totale di capsomeri per i diversi virus assume valori definiti da equazioni derivate dalla cristallografia;
  - sono possibili solo i valori 12, 32, 42, 60, 72, 92, 162, 252 ecc
- Esempi: i batteriofagi ΦX174, MS2, Qb parvovirus (12 capsomeri), p**oliovirus** (32 capsomeri), papilloma virus (72 capsomeri), adenovirus (252)

3. Virus dotati di involucro/mantello (envelope)

- Presentano il **nucleocapside rivestito da strutture membranarie complesse (involucro pericapsidico)**
- I virus con **involucro** sono comuni nel mondo animale, ma si conoscono anche virus batterici
- **L'involucro pericapsidico** è generalmente costituito da un **doppio strato lipidico** in cui sono inserite **glicoproteine** (spicole)
- La membrana deriva dalla cellula infettata in seguito al processo di liberazione dei virioni; le glicoproteine sono di origine virale





Virus con involucro pericapsidico o envelope

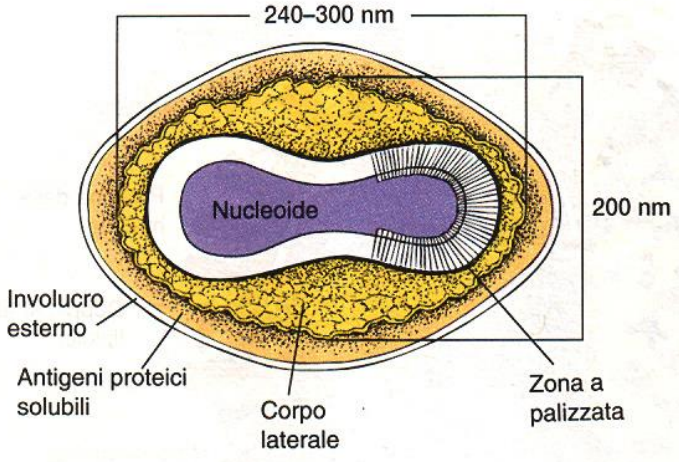
Virus con envelope

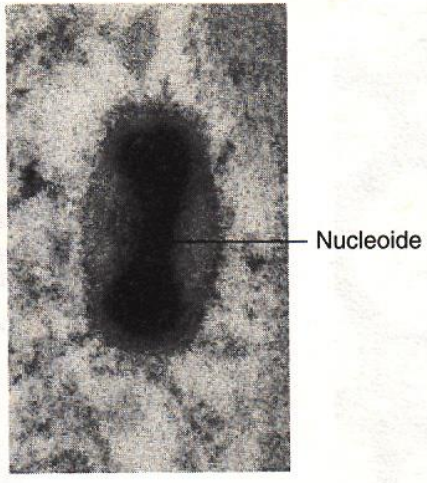
Il capside all'interno può avere simmetria elicoidale o icosaedrica

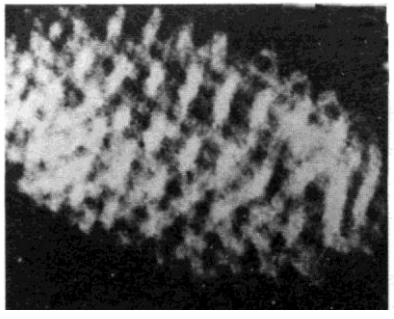
5.Virus con capsidi a simmetria complessa

- Hanno una **struttura complessa non assimilabile**
  - né a quella **elicoidale**
  - né a quella **icosaedrica**
- Rappresentanti: i poxvirus e i grandi batteriofagi

- **I poxvirus: -** forma ovoidale o a mattone, sono i virus animali più grandi
  - possono essere osservati anche al microscopio ottico





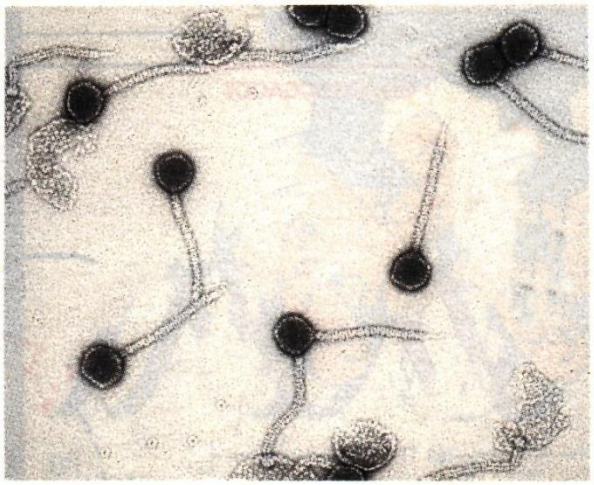


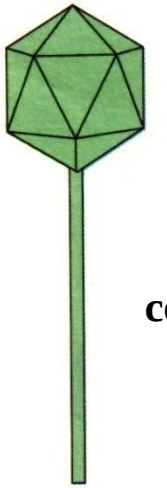
- **Il genoma (DNA a doppio filamento)** è associato a proteine e racchiuso in un nucleoide, a forma di disco biconcavo, delimitato da una membrana.
- Due corpi laterali, di forma ellittica, sono disposti tra il nucleoide e l'involucro esterno.
- L'involucro è di natura membranaria, rivestito da tubuli e fibre

6. Virus con capsidi a simmetria complessa

- I batteriofagi **T1, T5 e λ** hanno una testa icosedrica,
  - la coda è priva di guaina,
  - e non termina con una base piatta ma con rudimentali fibre caudali

Il batteriofago lambda





testa icosaedrica

coda non contrattile

- I batteriofagi **T3** e T7 possiedono una testa icosedrica, la coda breve non contrattile e priva di fibre caudali

- Tutti questi batteriofagi sono detti virus a **simmetria binaria:**
  - hanno sia la **simmetria icosaedrica** (testa) che **elicoidale** (coda)

Composizione chimica dei virus

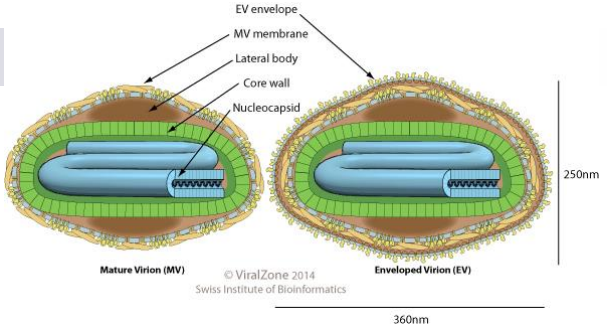
1. Core ⟹ **Acido nucleico: DNA**

Deossiribovirus:

- DNA bicatenario lineare (Herpesvirus, Poxvirus, Adenovirus)
- DNA bicatenario circolare (Papovavirus)
- DNA monocatenario lineare (Parvovirus)
- DNA parzialmente bicatenario circolare (Hepadnavirus)

1,5 - 2,2 / 130 - 240 milioni di daltons

POXVIRIDAE



- virus di dimensioni 300-450 x 170-260 nm
- Forma: ovoidale
- complesso rivestimento formato da strutture ricche di lipidi ad aspetto tubulare ed una struttura interna composta da un core centrale contenente il DNA e 2 corpi laterali.
- Genoma -> molecola di DNA bicatenario e lineare
- centinaio di proteine strutturali (quindi numerosi antigeni)
- **numerosi enzimi nel virione** (poli-A polimerasi, DNA topoisomerasi I, RNA metil-trasferasi; una trascrittasi necessaria alla sintesi degli mRNA precoci del ciclo replicativo.
- Liberazione dei virioni neoformati avviene con lisi della cellula infetta
- L'uomo unico ospite del virus del vaiolo (genere O*rthomyxovirus*) eradicato dal pianeta.
- Virus del mollusco contagiosi (genere M*olluscipoxvirus*) l'unico poxvirus oggi presente nell'uomo.

  L'infezione si accompagna alla comparsa di lesioni cutanee nodulari o pustole.

Composizione chimica dei virus

2. Core → Acido nucleico: RNA
Ribovirus

- RNA bicatenario frammentato (Reovirus)
- RNA monocatenario lineare a polarità positiva (Coronavirus, Flavivirus, Togavirus, Astrovirus, Calicivirus, Picornavirus)
- RNA monocatenario diploide a polarità positiva (Retrovirus)
- RNA monocatenario frammentato a polarità negativa (Orthomyxovirus)
- RNA monocatenario lineare a polarità negativa (Filovirus, Paramixovirus, Rhabdovirus)
- RNA monocatenario frammentato circolare a polarità negativa o ambisenso (in 2 o 3 distinti Arenavirus, Bunyavirus)

2,5 / 16 milioni di daltons

IL CICLO REPLICATIVO DEI VIRUS

- **L'infezione di una cellula ospite** inizia quando un virione viene a contatto con la superficie cellulare.
- Dopo questa prima fase,

- i **batteriofagi si distinguono** dagli altri virus perché, nella maggior parte dei casi, **il virione inietta l'acido nucleico nella cellula batterica ospit**e.

- per gli **altri virus**, invece, si ha **penetrazione nel citoplasma** sotto forma di virioni
- In questi è la componente proteica del virione che assicura l'ingresso nella cellula ospite e a volte partecipa alle prime fasi del processo riproduttivo

- . Durante la fase intracellulare, la struttura del virione viene distrutta e si libera il genoma virale.

IL CICLO REPLICATIVO DEI VIRUS (cont-)

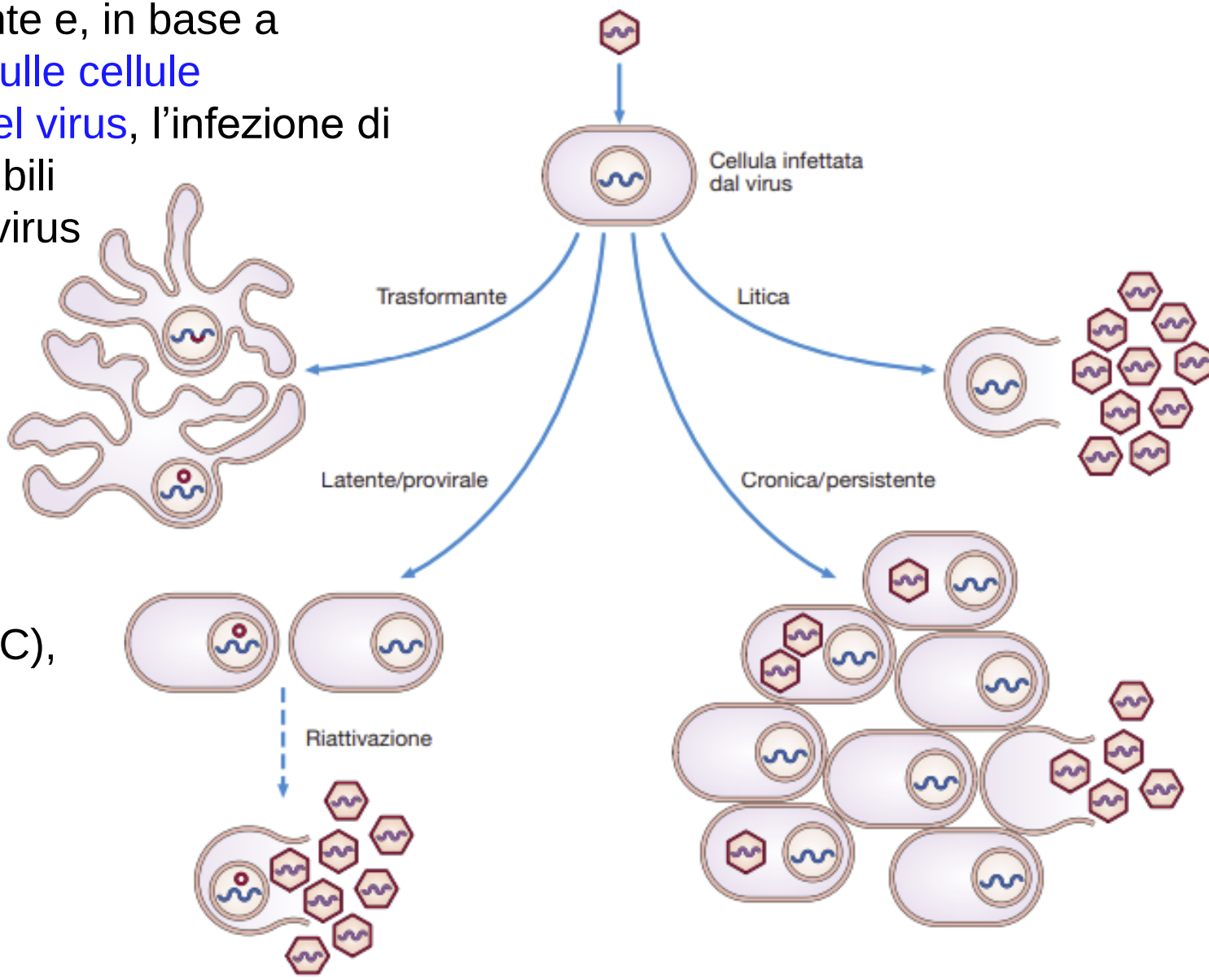
- Dopo questa fase precoce, in tutti i casi, **l'acido nucleico virale interagisce con l'apparato biosintetico dell'ospite per dirigere l'espressione dei propri geni**,
  - ovvero la **sintesi delle proteine virali e la sua** moltiplicazione.

- La replicazione virale avviene quindi sotto il controllo esclusivo dell'acido nucleico del virus, in cellule vive e con la partecipazione del metabolismo cellulare.
- La **durata del ciclo replicativo** può essere **molto variabile a seconda** del tipo di virus:
  - **da poche decine di minuti per i virus batterici**
  - **fino ad alcuni giorni per alcuni virus animali**

TIPI DIFFERENTI DI INFEZIONE DA VIRUS ANIMALI.

- L'esito di un'infezione virale può però essere differente e, in base a
  - effetti indotti sulle cellule
  - persistenza del virus, l'infezione di cellule suscettibili

ovvero in cui un virus animale può penetrare, può dare luogo a infezioni litiche e a infezioni persistenti di tipo cronico (virus epatite B o C), latente o trasformante



VIRUS ONCOGENI E CANCRO.

Famiglia virale	Cancro
VIRUS a RNA	
Flaviviridae (virus dell'epatite C, HCV)	Carcinoma epatocellulare
Retroviridae	Tumori ematopoietici, sarcomi e carcinomi
VIRUS a DNA	
Adenoviridae	Varie tipologie di tumore solido
Hepadnaviridae	Carcinoma epatocellulare
Herpesviridae	Linfomi, carcinomi e sarcomi
Papillomaviridae	Papillomi e carcinomi
Polyomaviridae	Varie tipologie di tumore solido
Poxviridae	Mixomi e fibromi

La cellula ospite
deve avere due caratteristiche principali

1.SENSIBILITA':

- strettamente condizionata dalla presenza di adeguati **recettori cellulari**
- questi permettono l'attacco del virus alla cellula ospite (**ADSORBIMENTO**)

2. PERMISSIVITA':

- dipende da tutti **quei meccanismi molecolari-cellulari** che risultano adeguati a:
  - completa **trascrizione del genoma virale**
  - **sintesi** di tutte le **proteine** virus-codificate

L'INFEZIONE PUO'ESSERE:

- **Infezione produttiva**

✓ **Infezione di una cellula permissiva da parte di un virione completo** che **porta alla produzione di virioni** di progenie in numero variabile a seconda del tipo di virus o di cellula

- **Infezione abortiva**

In alcuni casi l'infezione può non completarsi:

✓ si verifica quando

- il virus **infettante è difettivo** (mancano ad es. parti essenziali del proprio genoma)
- o la cellula consente l'espressione di solo alcuni geni virali portando all'arresto dell'infezione

- **Infezione restrittiva**

Quando le cellule sono permissive solo in una certa fase del loro ciclo vitale

❑ - Le infezioni di tipo abortivo e restrittivo possono consentire la persistenza del virus all'interno della cellula ospite: **infezione latente**:

- il DNA virale infettante può integrarsi nel genoma della cellula ospite o mantenersi all'interno di essa in forma episomale.

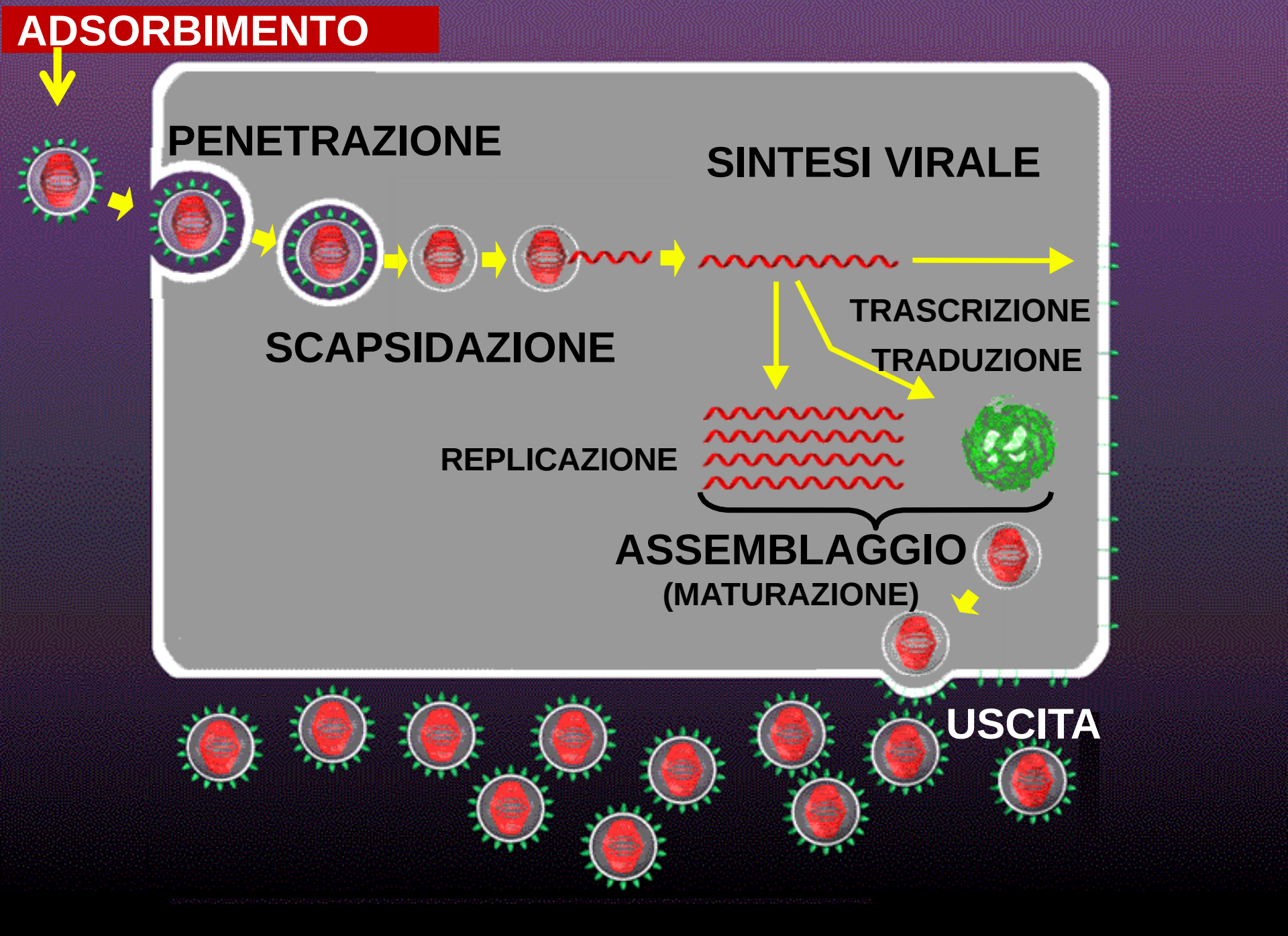
❑ Ad ogni ciclo cellulare, il virus viene replicato, ma solo nel momento in cui si hanno le condizioni ambientali favorevoli il genoma virale può dare inizio al processo di trascrizione

CICLO REPLICATIVO VIRALE

- ✓ . Per favorirne l'analisi e la comprensione, il ciclo replicativo di un virus
  - ❑ PUO' ESSERE SUDDIVISO IN **6 FASI**:

1. **ADSORBIMENTO**
2. **PENETRAZIONE**
3. **SCAPSIDAZIONE**
4. **REPLICAZIONE**
5. **MATURAZIONE**
6. **LIBERAZIONE**

- ➢ Il periodo che intercorre tra la penetrazione del virus nelle cellule e la maturazione della progenie virale viene definito **periodo di eclissi :** il virus non è più reperibile come entità morfologica nella cellula.


ADSORBIMENTO
PENETRAZIONE
SINTESI VIRALE
SCAPSIDAZIONE
TRASCRIZIONE
TRADUZIONE
REPLICAZIONE
ASSEMBLAGGIO
(MATURAZIONE)
USCITA

CICLO DI REPLI-CAZIONE DI UN VIRUS ANIMALE.

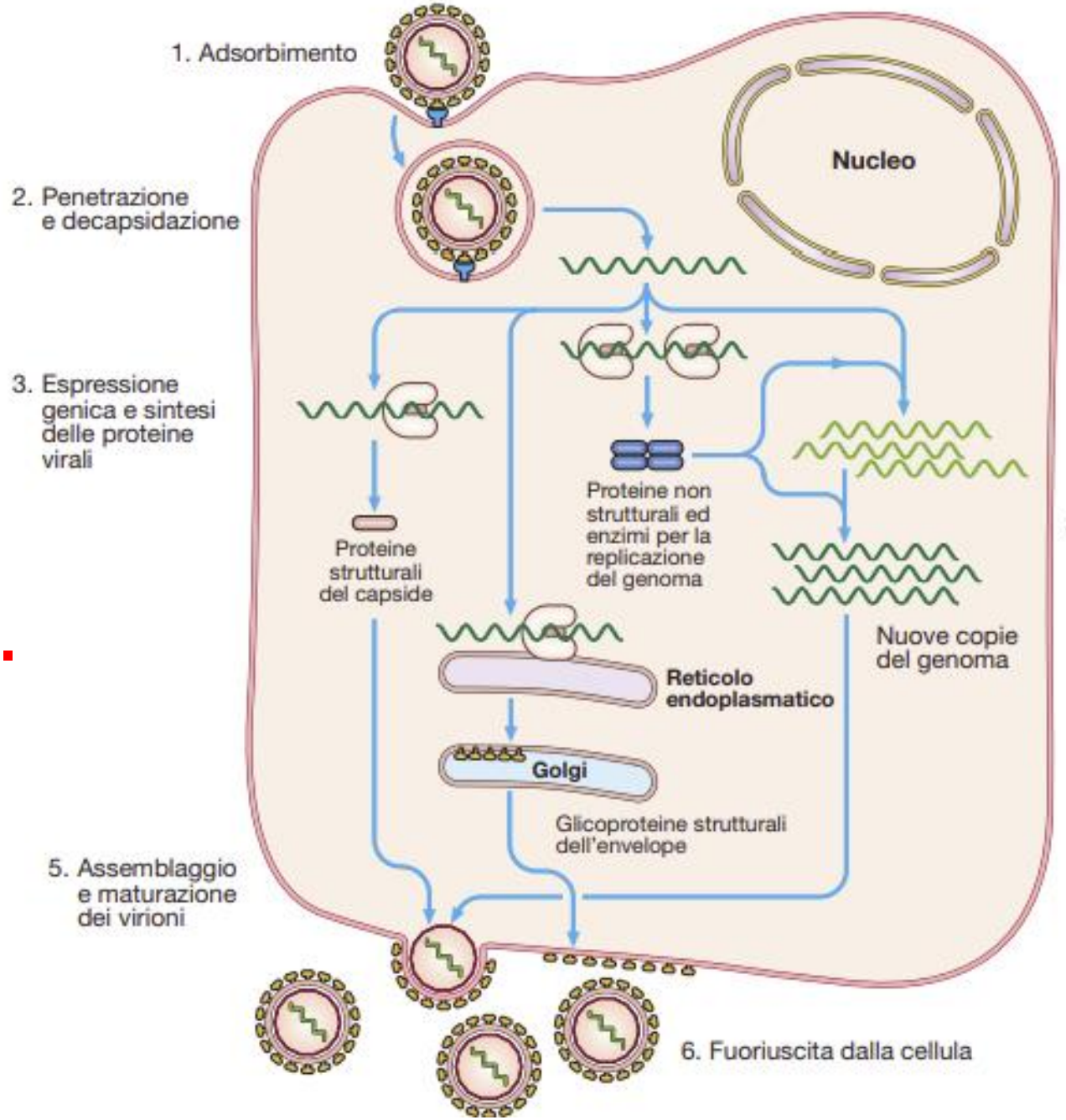
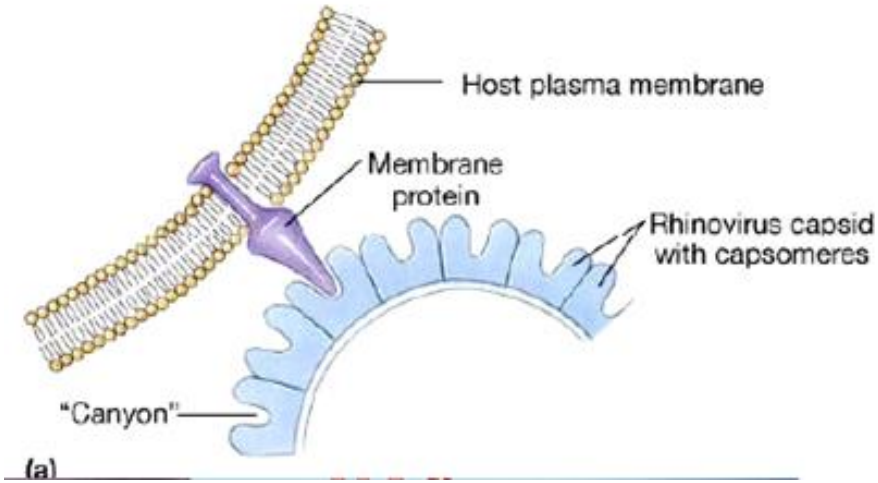


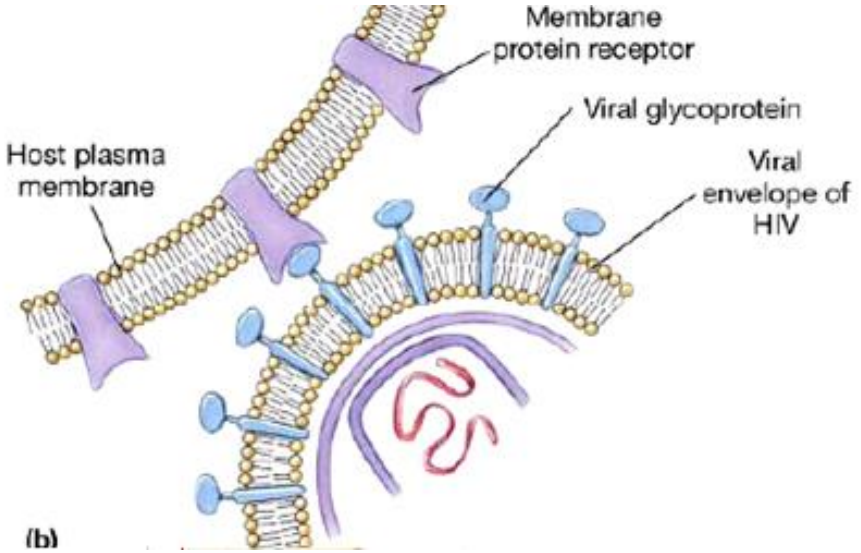
Figura 14.7 CICLO ANIMALE.

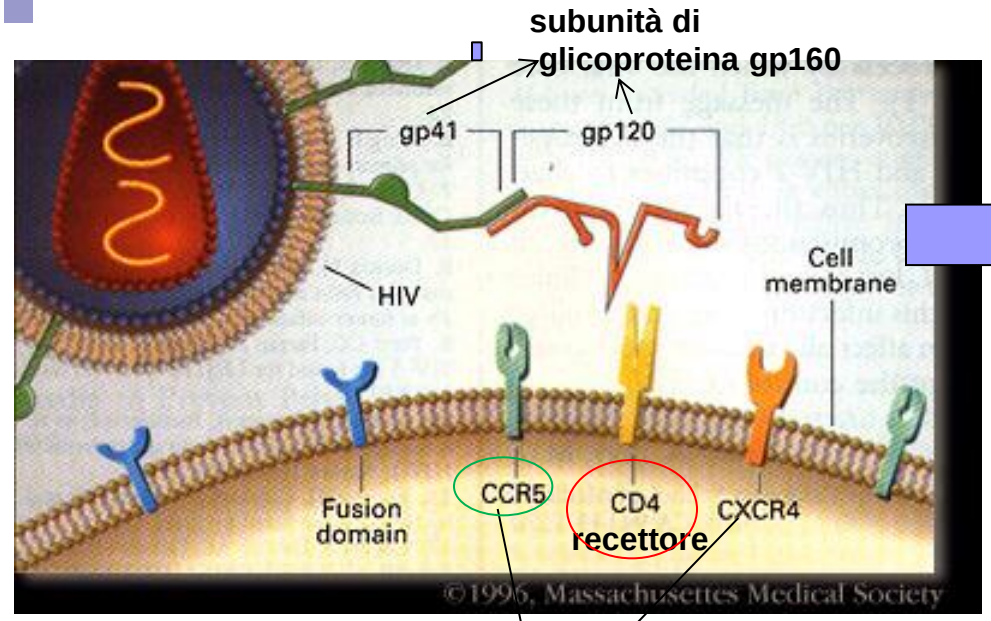
1. ADSORBIMENTO

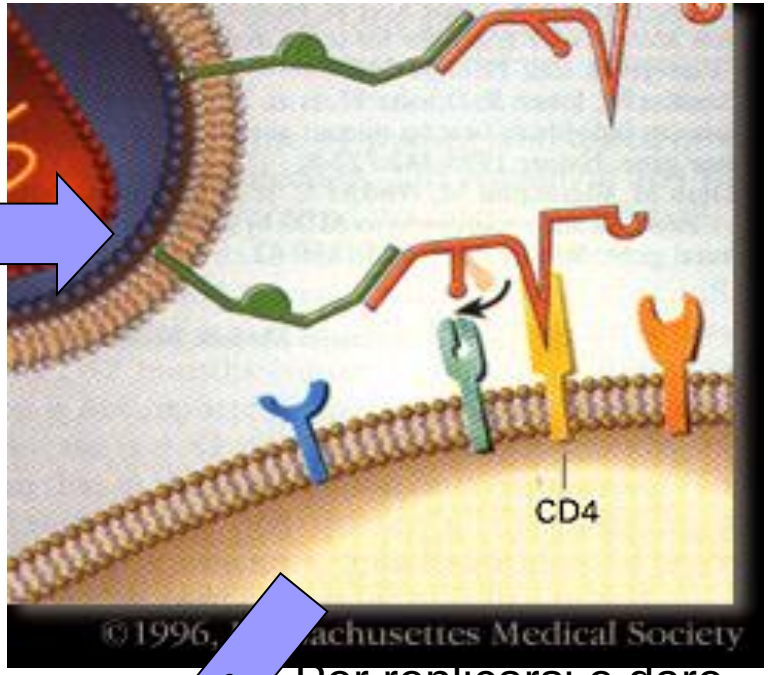
- Avviene **attraverso l'interazione fra molecole cellulari di superficie (recettori)** e **proteine (anti-recettori)** sulla superficie del virus

- **Recettori**: **proteine** (es.CD4 per HIV) **o molecole ricche di carboidrati** (es. virus dell'influenza)
- In alcuni casi è richiesto un **co-recettore**
- **Anti-recettori: glicoproteine** (per i virus con envelope) **o proteine capsidiche** (per i virus privi di envelope)
- Il riconoscimento di specifici recettori determina il **TROPISMO TISSUTALE**





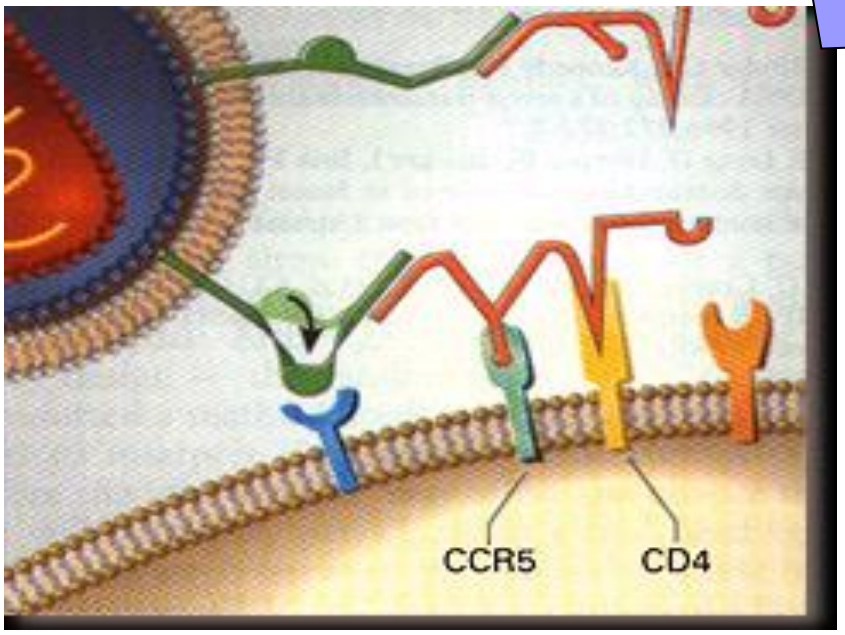




HIV,

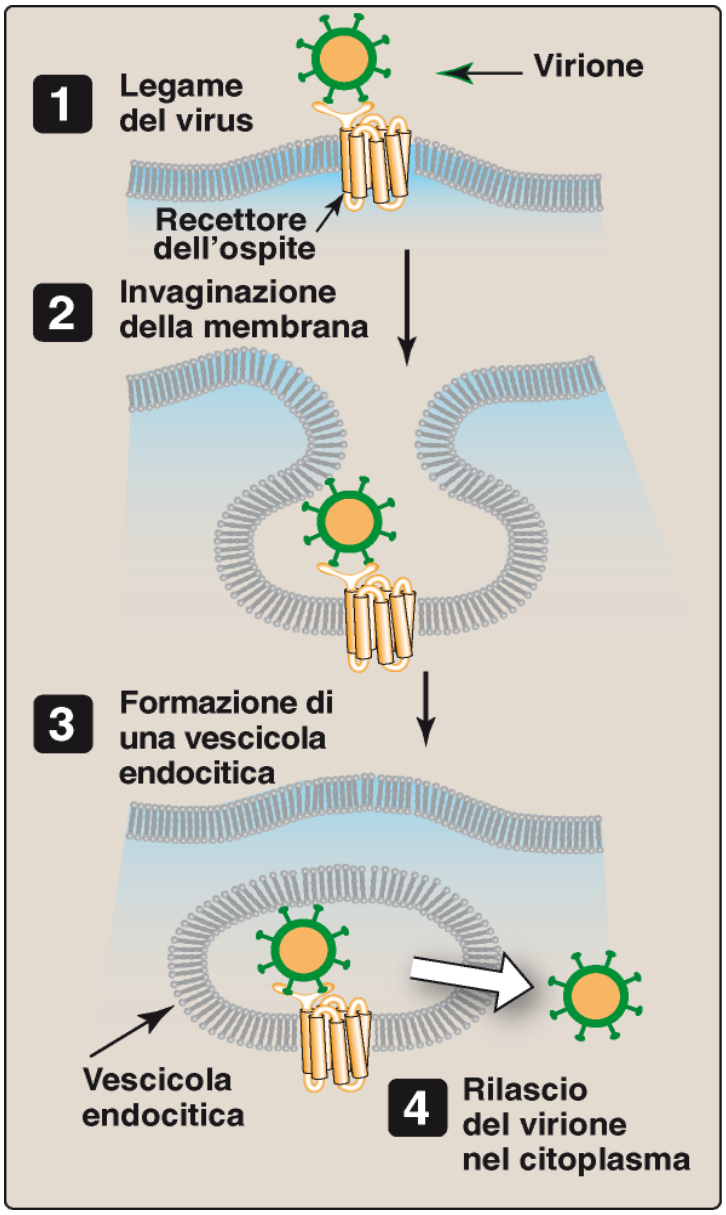
recettore,

co-recettore

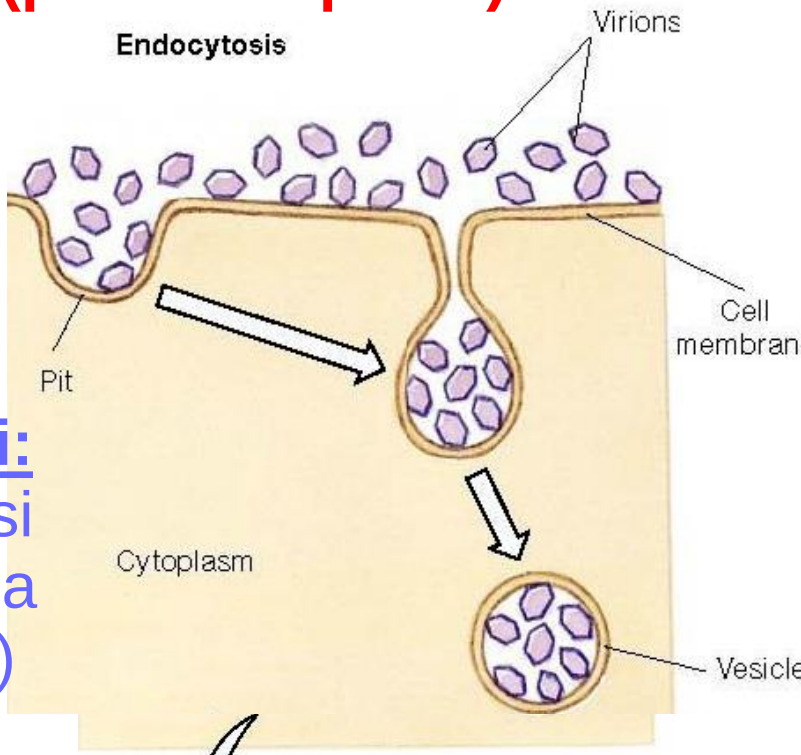


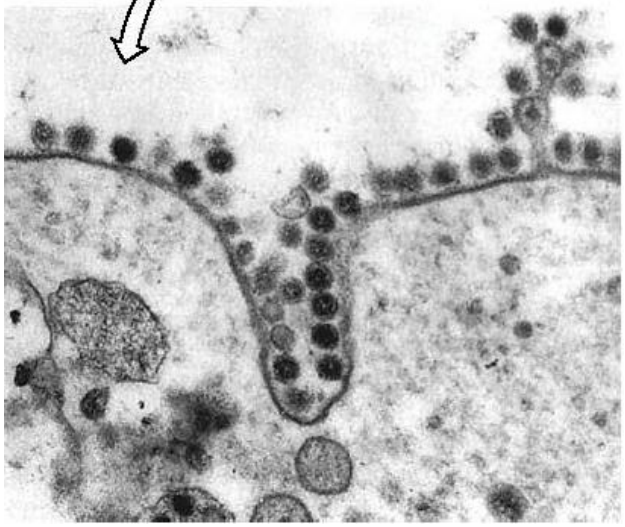
- Per replicarsi e dare luogo all'infezione, l'HIV deve riuscire a entrare nelle cellule CD4+.
- Un processo composto da una serie di interazioni - fra le **glicoproteine presenti sulla superficie del virus** e
- i **recettori presenti sulla superficie della cellula** CD4+ umana

2. PENETRAZIONE: VIRUS NUDI (privi di capside)



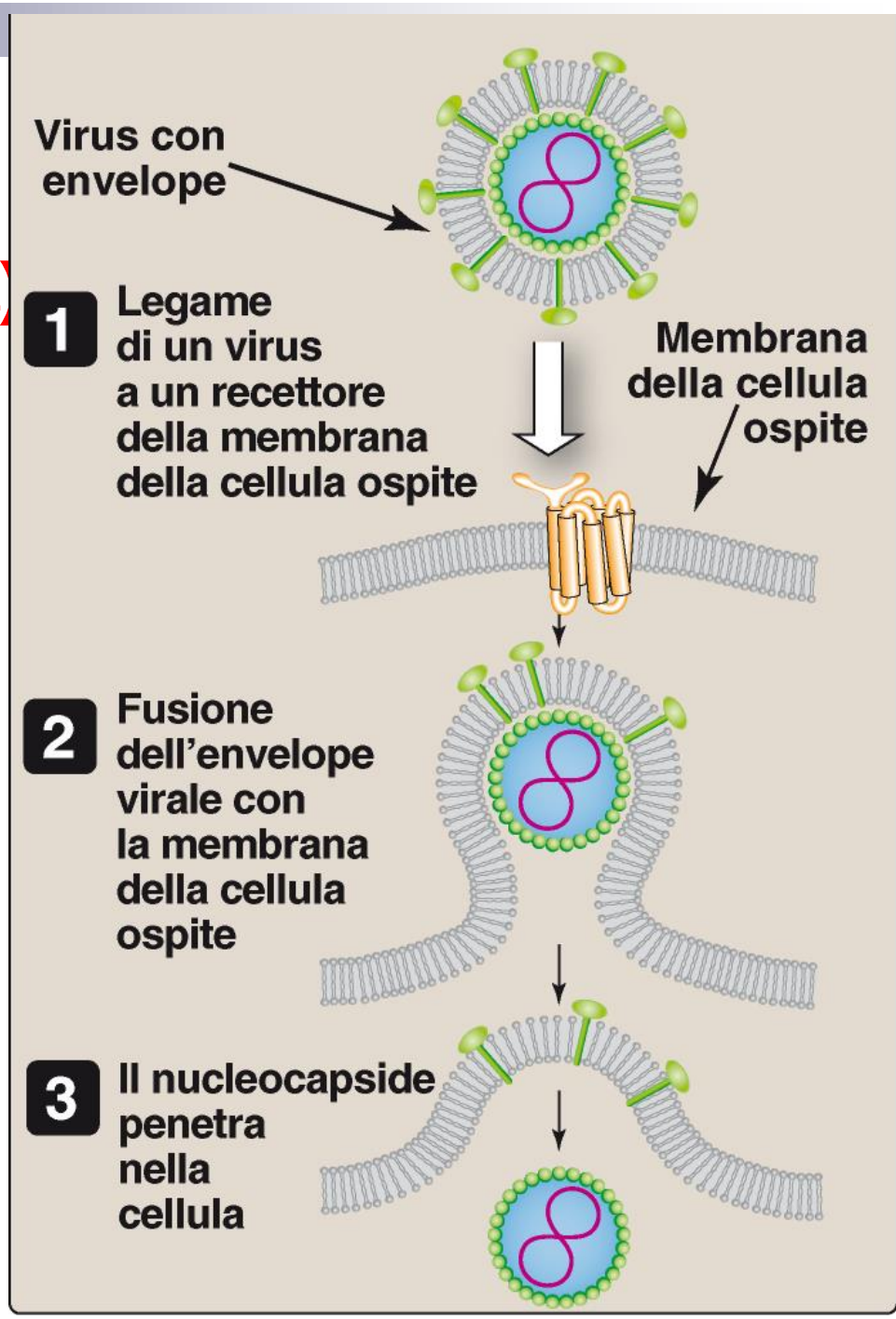
Viropessi:
(endocitosi mediata da recettore)





PENETRAZIONE:
2. VIRUS CON ENVELOPE (membrana periplasmatica)

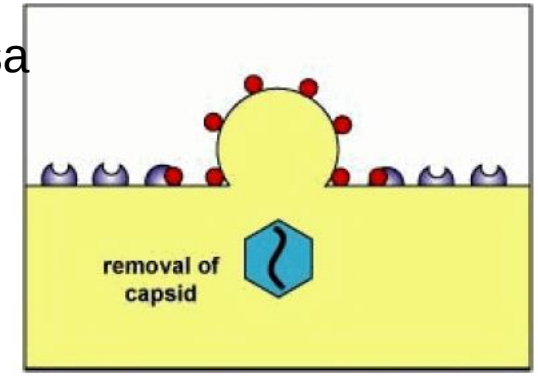
Fusione envelope virale con membrana plasmatica cellulare

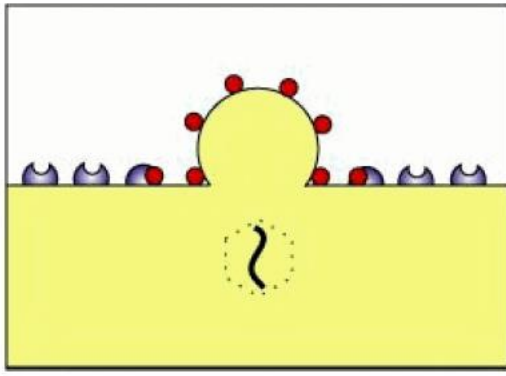


3. SCAPSIDAZIONE

- Evento che segue l'entrata del virus e precede la replicazione del genoma attraverso il quale il **genoma virale si separa dalle proteine che lo rivestono**.

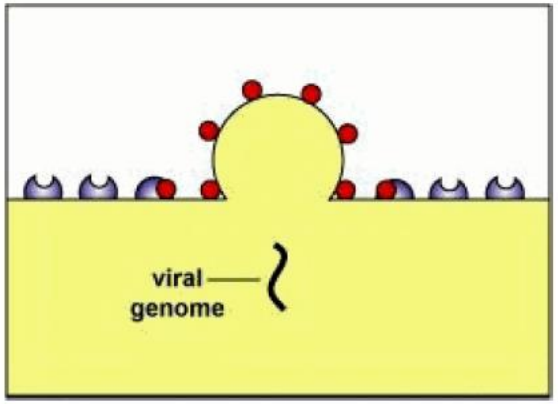
- Meccanismo che può avvenire attraverso varie modalità.
- Il meccanismo non è ben chiaro
  - è possibile che lo stesso virus possa seguire vie diverse a seconda delle situazioni e del tipo di cellula ospite.





- Per molti virus **le proteine virali si**
  - **disaggregano spontaneamente**

  con
  - **l'intervento di proteasi cellulari o enzimi lisosomiali** che si riversano all'interno di vacuoli fagocitari (fagolisosomi o virosomi).



- Nel virus influenzale una proteina dell'involucro M2,
  - agisce da canale ionico
  - provoca **l'acidificazione del virus all'interno del vacuolo fagocitario:**
  - ne consegue la fusione del pericapside con la membrana del vacuolo e la liberazione del nucleocapside nel citoplasma.

4. ESPRESSIONE E REPLICAZIONE DEL GENOMA VIRALE

- Sintesi dell'mRNA
- Sintesi delle proteine strutturali e non strutturali
- Replicazione dell'acido nucleico virale

- **Meccanismi diversi a seconda del genoma virale: DNA o RNA**

I genomi virali

- Per la maggior parte dei **virus a RNA il materiale genetico** è rappresentato da un **singolo filamento di RNA** (**ss RNA**)

- Se la **sequenza corrisponde a quella dell'mRNA virale** il filamento è definito **positivo o** + (elica codificante)

  Esempi: il virus polio, il virus del mosaico del tabacco, e il virus del sarcoma di Rous sono virus con genoma a ssRNA positivo

- Se la sequenza è **complementare a quella dell'mRNA** virale il filamento è **definito negativo o - ('elica complementare)**

  Esempi: il virus della rabbia, il virus del morbillo, e il virus dell'influenza sono virus con genoma a ssRNA negativo

- **I virus animali con filamento positivo** presentano modificazioni tipiche dei messaggeri eucariotici:
  - 7-metilguanosina (cap) al 5' e coda di poli-A al 3'

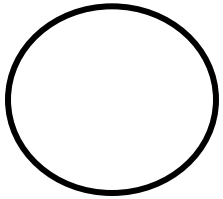
- Molti genomi a RNA risultano segmentati :
  - si ritiene che ogni segmento codifichi per una proteina virale

II: I genomi virali

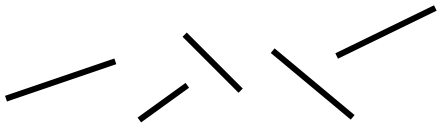
- **I virus contengono un unico tipo di acido nucleico in tutte e quattro le combinazioni:**
  - **DNA a singola elica**
  - **DNA a doppia elica**
  - **RNA a singola elica**
  - **RNA a doppia elica**

- **Anche la struttura del genoma è varia nei diversi virus**
  - **Il materiale genetico può essere organizzato in :**

un'unica molecola lineare



un'unica molecola circolare (DNA)



segmentato in più molecole

Dimensioni e contenuto in geni di genomi virali

Virus	Tipo di acido nucleico	Dimensioni (nucleotidi)	Numero di geni
Batteriofagi			
T4	dsDNA	~165.000	~200
ΦX174	ssDNA	5.387	11
MS2	ssRNA	3.569	4
Virus animali			
Vaccino	dsDNA	~187.000	~300
Reovirus	dsRNA	23.000	22
Influenza	ssRNA	13.500	12
Papovavirus	dsDNA	5.226	6
Parvovirus	ssDNA	5.000	5
Virus vegetali			
Del mosaico del tabacco	dsRNA	6.400	4

Genoma virale ridotto al minimo :

- **geni x Enzimi per replicazione del DNA/RNA virale**
- **geni x Formazione del capside**

I genomi virali

- La **capacità codificante** va
  - da 3-4 **proteine** dei virus più piccoli (MS2 e Qb)
  - ad oltre **100 proteine** dei batteriofagi della serie T-pari e dei Poxvirus

- Nella maggior parte dei **virus a DNA il genoma è costituito da un doppio filamento** (**ds DNA**) che può essere **lineare** oppure **circolare**

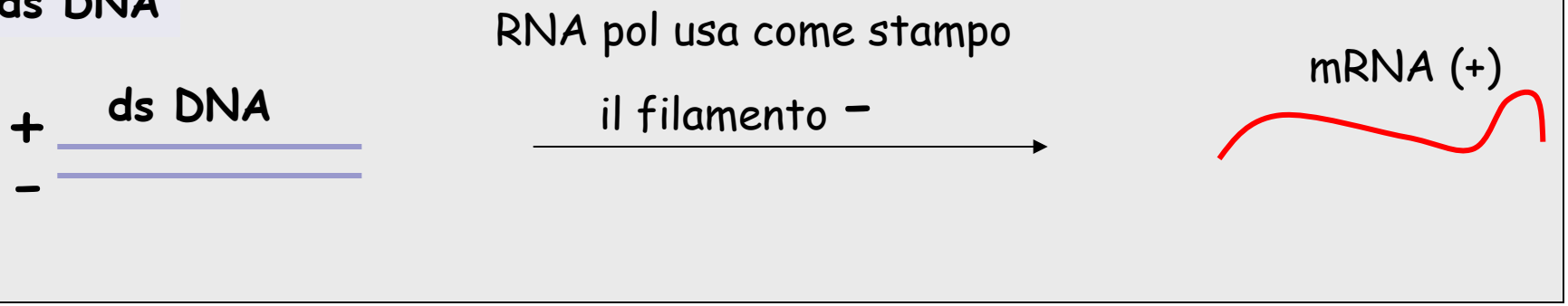


La formazione dell'RNA messaggero virale

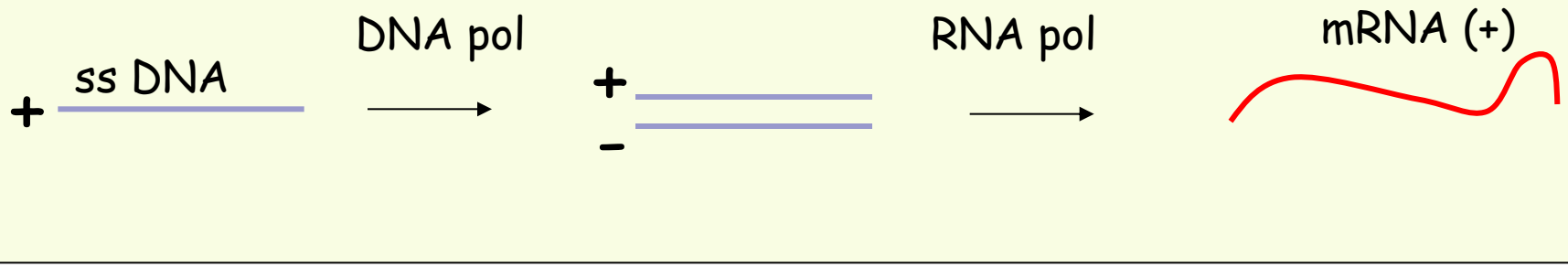
- Affinché possano essere sintetizzate le nuove proteine virali, è prima **necessario che siano sintetizzati nuovi messaggeri virali**

1. Virus a DNA

1.ds DNA



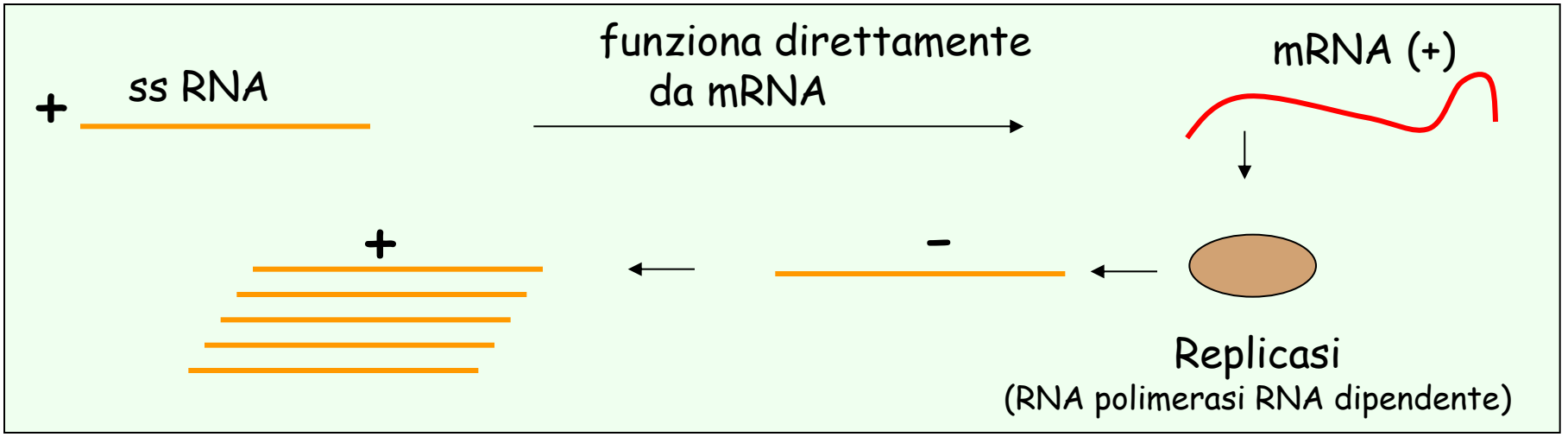
2.ss DNA



La formazione dell'RNA messaggero e replicazione virale

- N.B. Sia nelle cellule eucariotiche che procariotiche sono presenti solo **RNA polimerasi-DNA dipendenti** (non possono usare RNA come stampo)

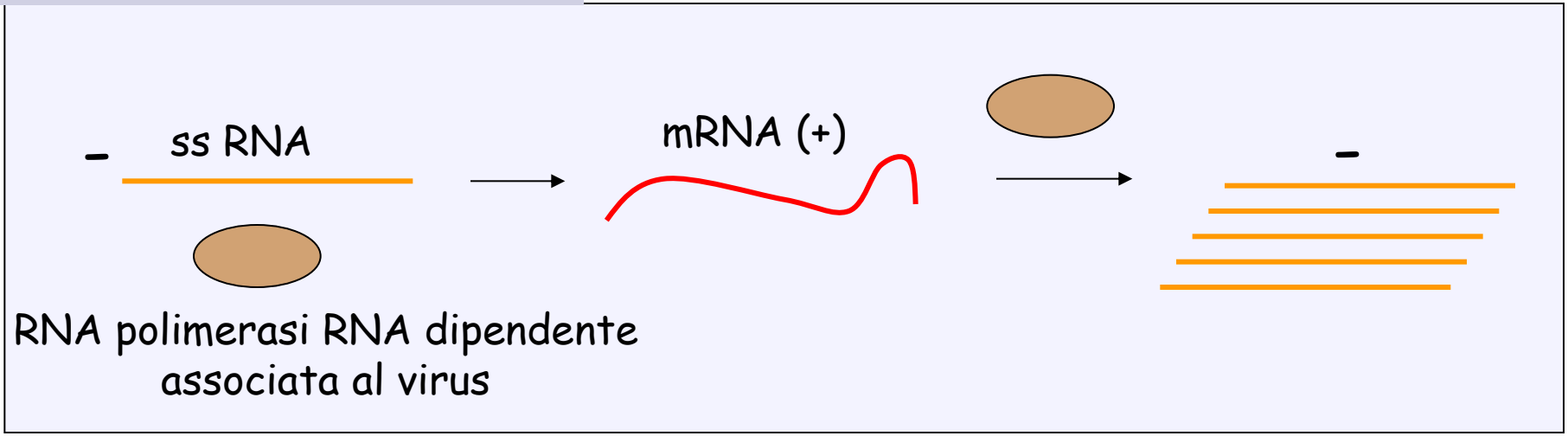
2. Virus a RNA positivo



- Il filamento + funge direttamente da mRNA che codifica, oltre alle altre proteine necessarie, anche la **Replicasi** (RNA pol-- RNA dipendente).
- Questa inizialmente sintetizza RNA negativi usando come stampo il filamento positivo del genoma, e
- quindi li usa come stampi per produrre ulteriori molecole positive che costituiranno i genomi della progenie virale

La formazione dell'RNA messaggero e replicazione virale

3. Virus a RNA negativo

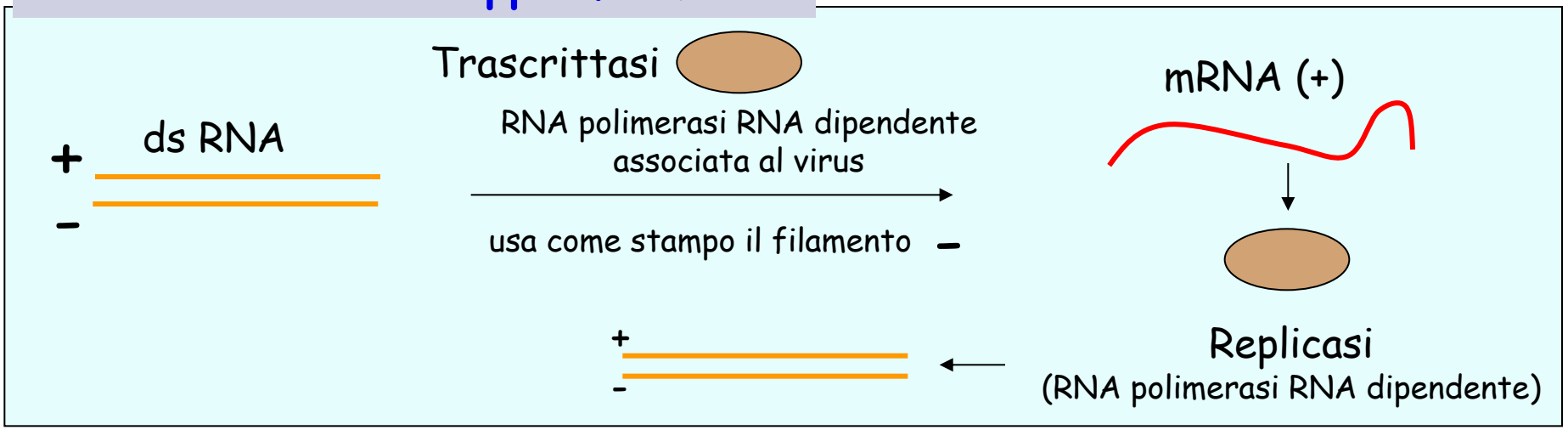


- L'RNA genomico non può funzionare come mRNA né le cellule ospiti hanno polimerasi capaci di trascrivere mRNA usando come stampo RNA.

- **Come può essere sintetizzato RNA messaggero?**
  - Per superare il problema questi virus portano, nel loro capside, alcune molecole di **Trascrittasi** (RNA pol- RNA dipendente) che inizialmente sintetizza RNA positivo che funge da messaggero, e da questo, in seguito sintetizzerà gli RNA negativi che costituiranno il genoma della progenie virale

La formazione dell'RNA messaggero e replicazione virale

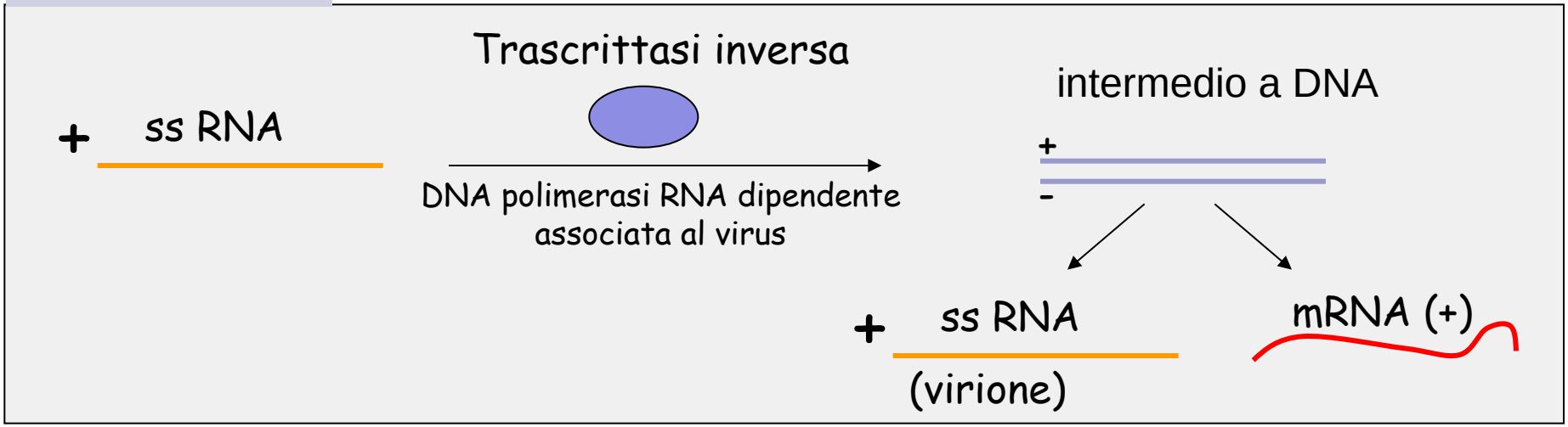
4. Virus a RNA a doppio filamento



- Anche in questo caso l'RNA genomico non può funzionare come RNA messaggero
- Alla sintesi del messaggero provvede una **Trascrittasi associata al virus e** inettata insieme al genoma virale.
- Il messaggero virale codifica per un'altra RNA pol RNA dipendente che svolge la funzione di **Replicasi** e sintetizzerà RNA a doppio filamento per le nuove particelle virali.

La formazione dell'RNA messaggero e replicazione virale

5. Retrovirus

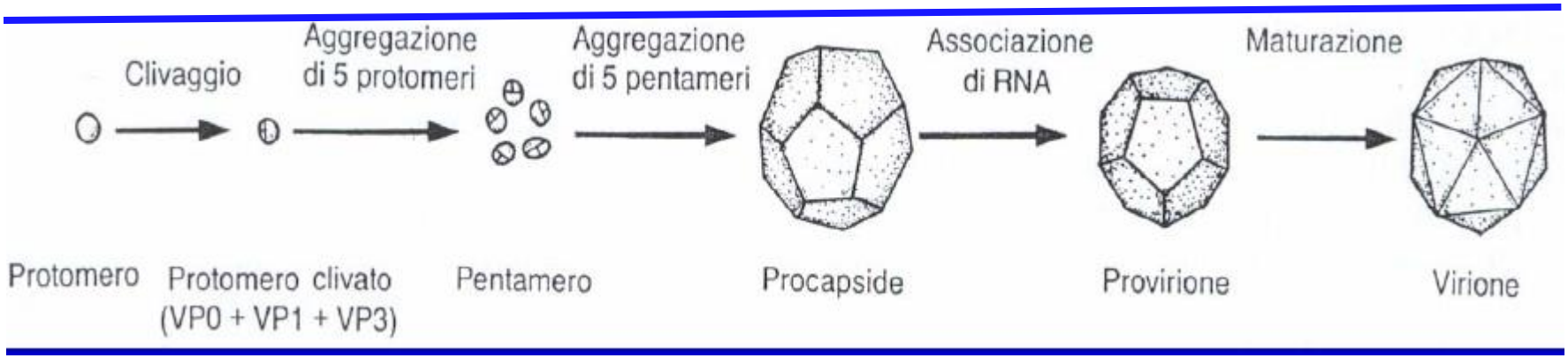


- Sono virus a singolo filamento di RNA + ma differiscono da tutti gli altri perché sintetizzano i propri mRNA e replicano il proprio genoma passando attraverso un **intermedio a DNA**

- Sono caratteristici anche per il fatto di essere "diploidi". Infatti, nel loro capside sono presenti sempre due filamenti di RNA.
- Associati al genoma sono anche **la Trascrittasi inversa** (DNA polimerasi RNA dipendente) e **tRNA** di origine virale che svolge la funzione di primer per la sintesi del DNA virale

5. ASSEMBLAGGIO

- avviene grazie alle **interazioni proteina-proteina**
- L'assemblaggio dei virioni ha inizio solo quando tutte le componenti virali sono state sintetizzate in quantità sufficienti all'interno della cellula ospite
- Localizzazione dell'assemblaggio è dipendente dal sito di replicazione del virus

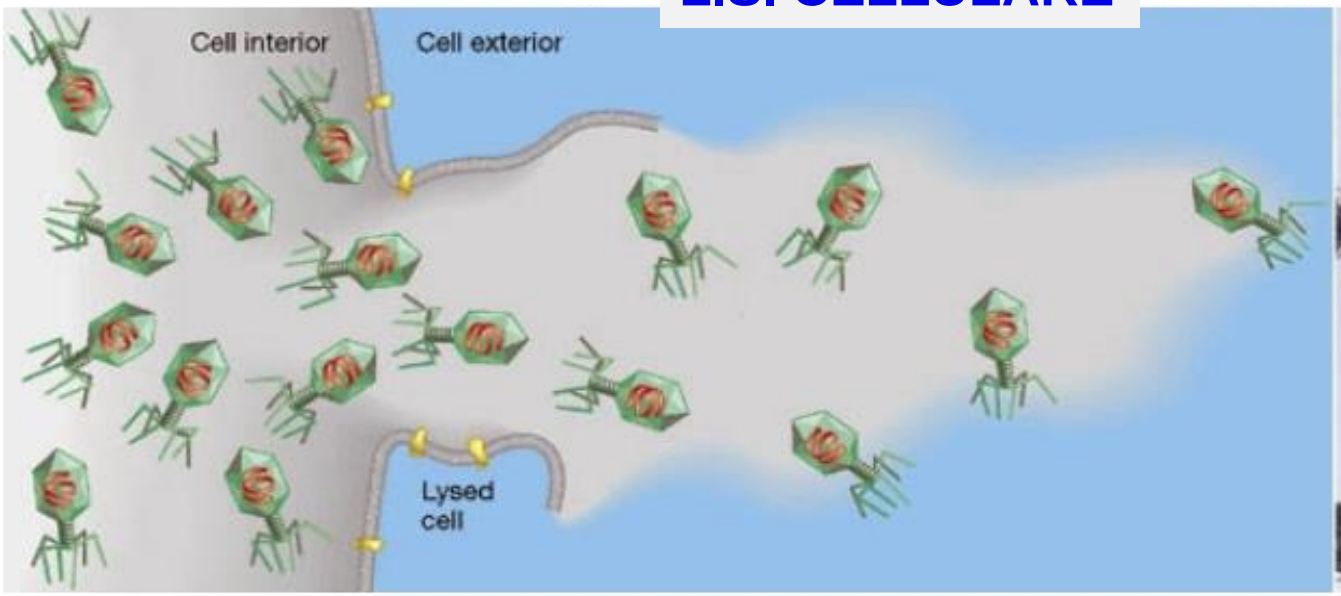


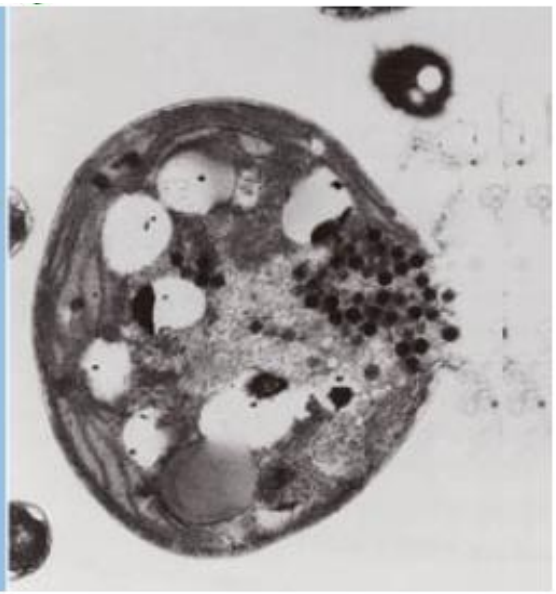
Rappresentazione schematica dell'assemblaggio di un Picornavirus

6. LIBERAZIONE DEL VIRIONE MATURO (1)

Virus nudi

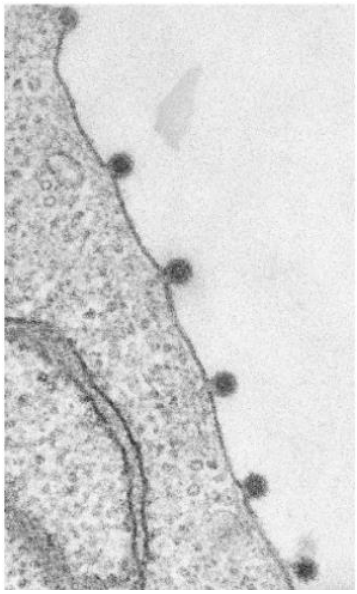
LISI CELLULARE

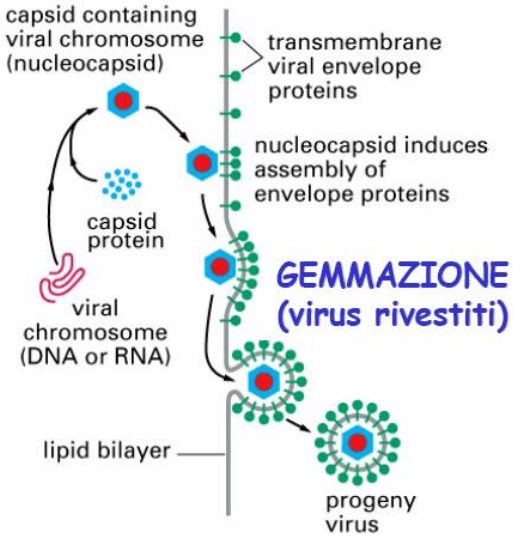


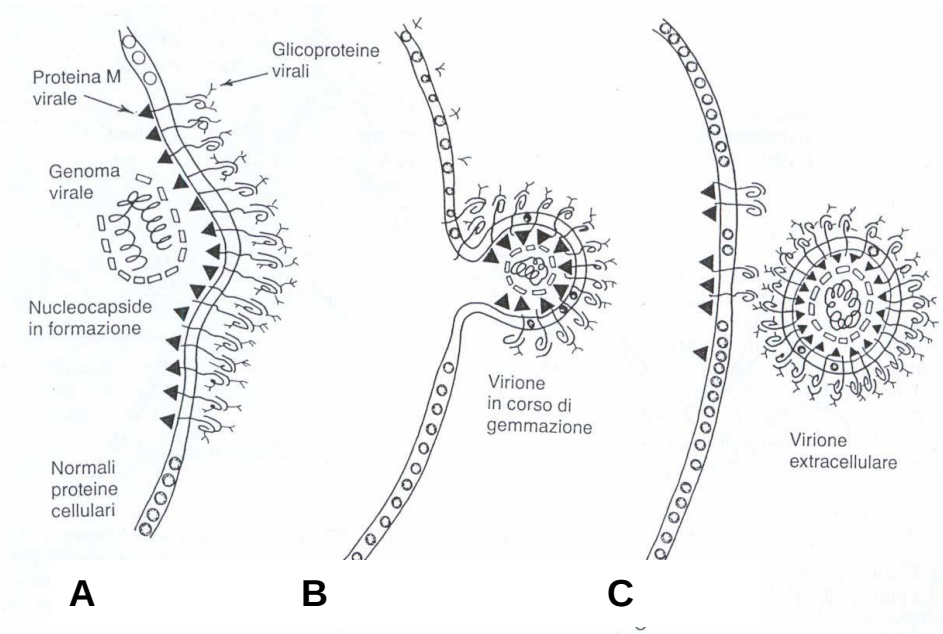


disgregazione cellulare: **lisi totale** (es. Poliovirus) **o parziale** (es. Adenovirus) della cellula

6. LIBERAZIONE DEL VIRIONE MATURO (2)







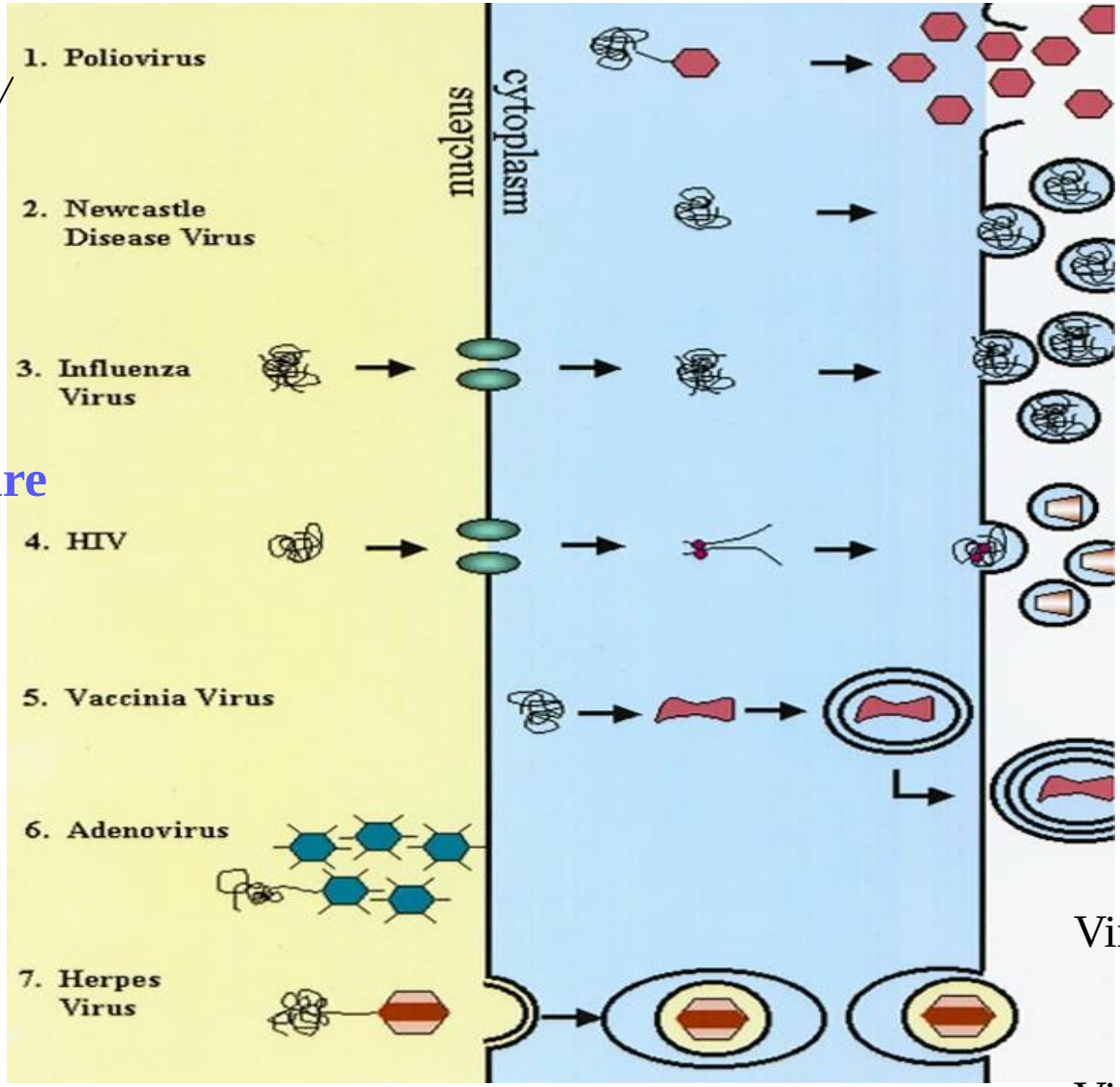
Gemmazione

A) Dopo l'assemblaggio, il nucleocapside si avvicina alla membrana modificata;

B) Inizia il processo di gemmazione;

C) Il virus fuoriesce avvolgendosi in parte della membrana modificata (pericapside)

VIE DI USCITA PER DIFFERENTI CLASSI DI VIRUS



Lisi cellulare

Virus **nudi** a **RNA**

Virus con **envelope** a **RNA**

Virus con **envelope** a **RNA**

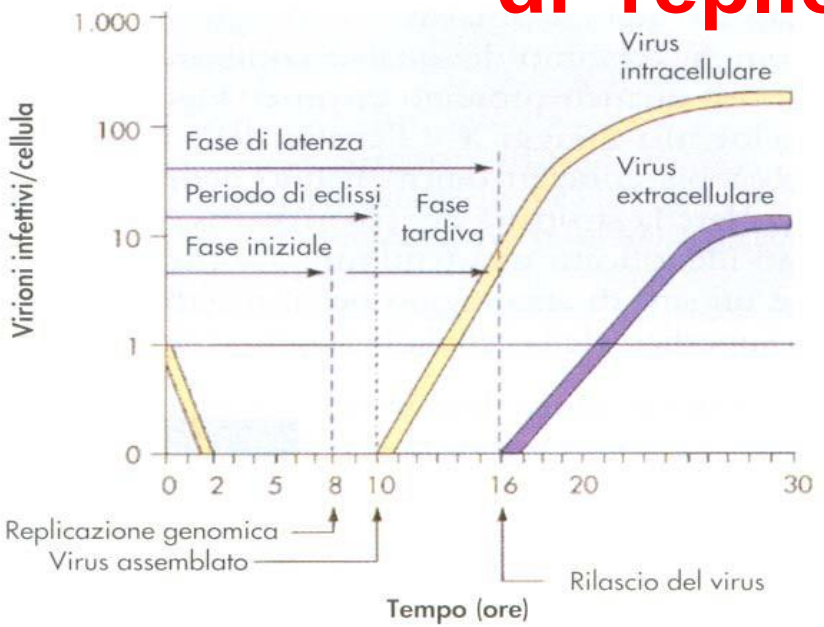
Virus con **envelope** a **RNA**

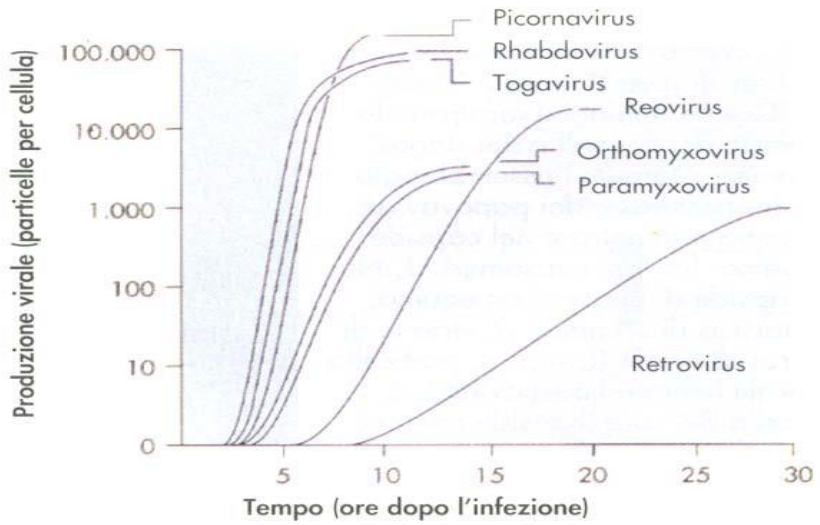
Virus con **envelope** a **DNA**

Virus **nudi** a **DNA**

Virus con **envelope** a **DNA**

Durata e cinetica del ciclo di replicazione virale





Curva *di un singolo ciclo di replicazione di un virus rilasciato con lisi cellulare*

- La **durata del ciclo è variabile nei** diversi gruppi di virus,
  - **da poche ore** nei Picornavirus
  - a **diversi giorni** nei virus di maggiori dimensioni
- **Numero di virioni prodotti/cellula**: **- 10^4 - 10^5 nei virus litici**
  - 10^6 e più negli altri

Tipi di infezione virale a livello cellulare

TIPO	PRODUZIONE VIRALE	DESTINO DELLA CELLULA
Abortiva	–	Nessun effetto
Citolitica	+	Morte
Persistente		
Produttiva	+	Senescenza
Latente	–	Nessun effetto
Trasformante		
Virus a DNA	–	Immortalizzazione
Virus a RNA	+	Immortalizzazione

Replicazione abortiva

- In determinate condizioni i virus possono penetrare nelle cellule, **esprimere parte** del proprio genoma e produrre parte delle proprie macromolecole, ma non riescono a dare origine a nuovi virioni infettanti

Virus normale - cellula restrittiva

(Cellule permissive, semipermissive, restrittive)

Virus difettivo - cellula normale (Virus helper → satellitismo virale)

- Per esempio: -virus sarcoma di Rous del pollo (deriva pericapside da altri retrovirus)
- - parvovirus adeno-associati
  - viroide epatite D, dipendente da virus epatite B (capside)

Interferenza virale

- **Fenomeno attraverso il quale un virus può impedire o ridurre la replicazione di un altro virus nelle stesse cellule o nello stesso organismo**

- **3 meccanismi possibili:**

1. **Competizione per i recettori cellulari**

   Recettori cellulari bloccati da anti-recettori prodotti in eccesso

2. **Competizione per eventi biochimici intracellulari**

   Apparati biosintetici cellulari impegnati da un virus, non disponibili (particelle difettive interferenti)

3. **Produzione di interferone**

Meccanismo più importante di interferenza: Glicoproteine a basso P.M. (20.000.-40.000 daltons)prodotte dalle cellule in seguito a diversi stimoli (tra cui l'infezione virale), ad attività antivirale e antineoplastica

Interferoni α e β:

- attivi su cellule infettate da virus o tumorali
- inducono stato antivirale e attivazione cellule NK

→ specie - specifici, ma non virus - specifici

Interferone γ:

- prodotto da linfociti TH1 e cellule NK
- attivo su macrofagi e linfociti T
- attivazione macrofagi - risposta immunitaria cellulo-mediata

Coltivazione dei virus

- I **virus animali** vengono coltivati i**noculando animali sensibili o uova embrionate di pollo** (uova fecondate e incubate per 6-8 giorni)
- Di recente i virus vengono coltivati su mono-strati di cellule animali; questa tecnica mette in evidenza aree localizzate di lisi cellulare chiamate placche, o foci proliferativi (virus oncogeni)

- **I virus vegetali** possono essere coltivati impiegando colture di tessuti vegetali, oppure piante intere.
  - Le foglie si inoculano meccanicamente spalmandole con una miscela di virus e una sostanza abrasiva.
  - Nelle aree infette si sviluppa una lesione necrotica localizzata

- **I batteriofagi** sono i virus più facilmente coltivabili.
  - L'infezione di una coltura di batteri sensibili porta nel giro di circa un'ora alla lisi dei batteri con produzione di una notevole quantità di virus (lisato)

virus animali

Si preferisce utilizzare un **UOVO EMBRIONATO DI POLLO,** terreno economico, e anche sicuro perché dotato di un guscio calcareo che assicura l'ossigenazione.

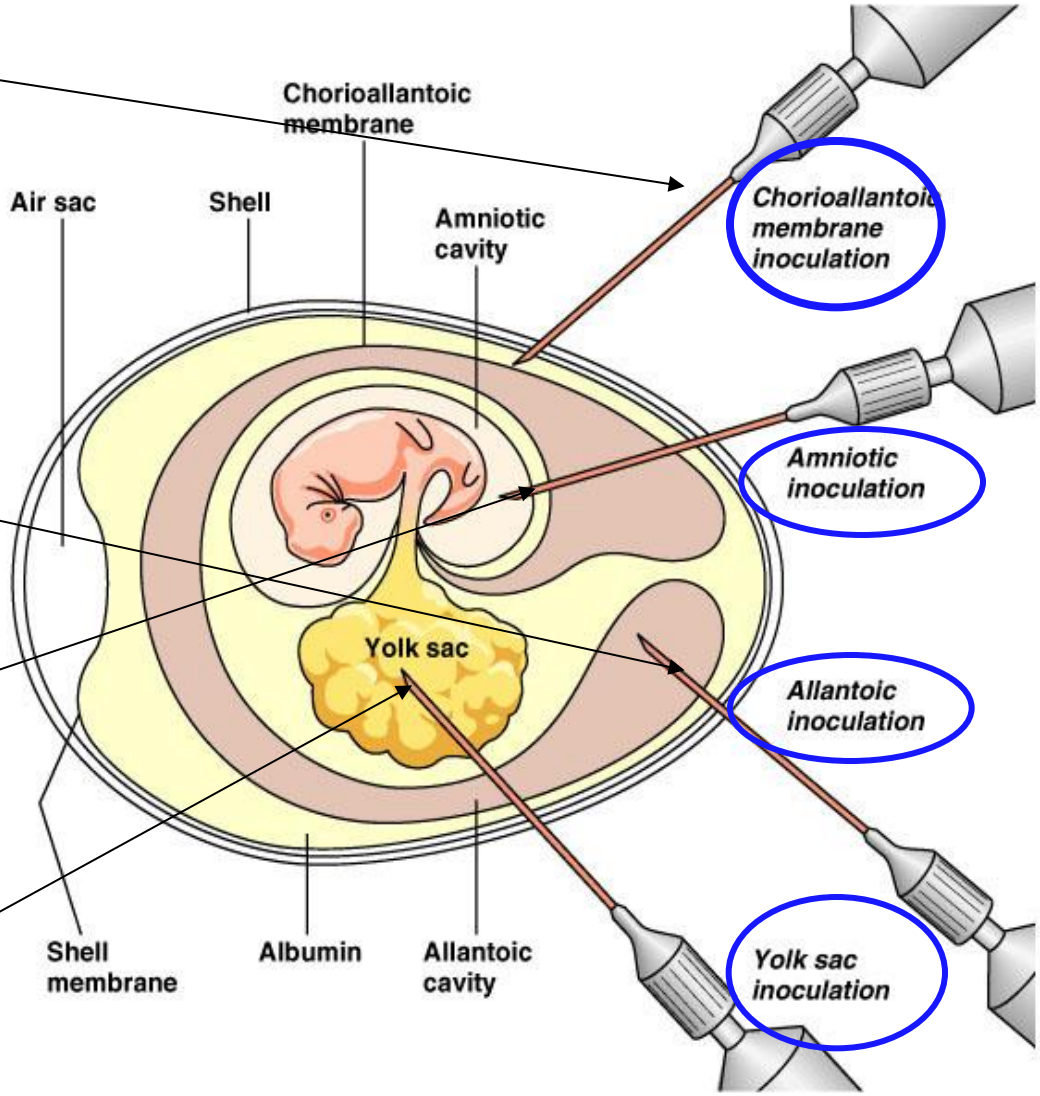
- L'uovo è embrionato perché solo la presenza dell'embrione - accertabile in trasparenza - garantisce la vitalità dell' uovo.

- **Per seminare il virus in un uovo, si prende quest'uovo e si pratica nel guscio una finestra richiudibile. Aperta la finestra, si insemina il materiale e si richiude sigillando il bordo con la cera.**
- Poi si procede all'incubazione, tenendo conto che i virus si sviluppano in poco tempo.

- Di solito **dopo pochi giorni si osserva la morte dell'embrione**: ciò significa che i virus si sono moltiplicati.
- Non rimane che aprire l'uovo e analizzare il tutto al microscopio elettronico.

a. Uova embrionate

- **Inoculazione sulla membrana corion-allantoidea**, sito ideale per la crescita di virus erpetici, dei poxvirus e del virus del cimurro del cane; provocano lesioni che appaiono come alterazioni macroscopiche circoscritte chiamate pocks (pustole).
- **Inoculazione nella cavità allantoidea,** sito ideale per la produzione di alte quantità di orthomyxovirus e paramixovirus da impiegare a scopo vaccinale.
- **Inoculazione nella cavità amniotica,** isolamento dei virus influenzali.
- **Inoculazione nel sacco vitellino,** adatta alla coltivazione delle clamidie.



b. Le colture cellulari.

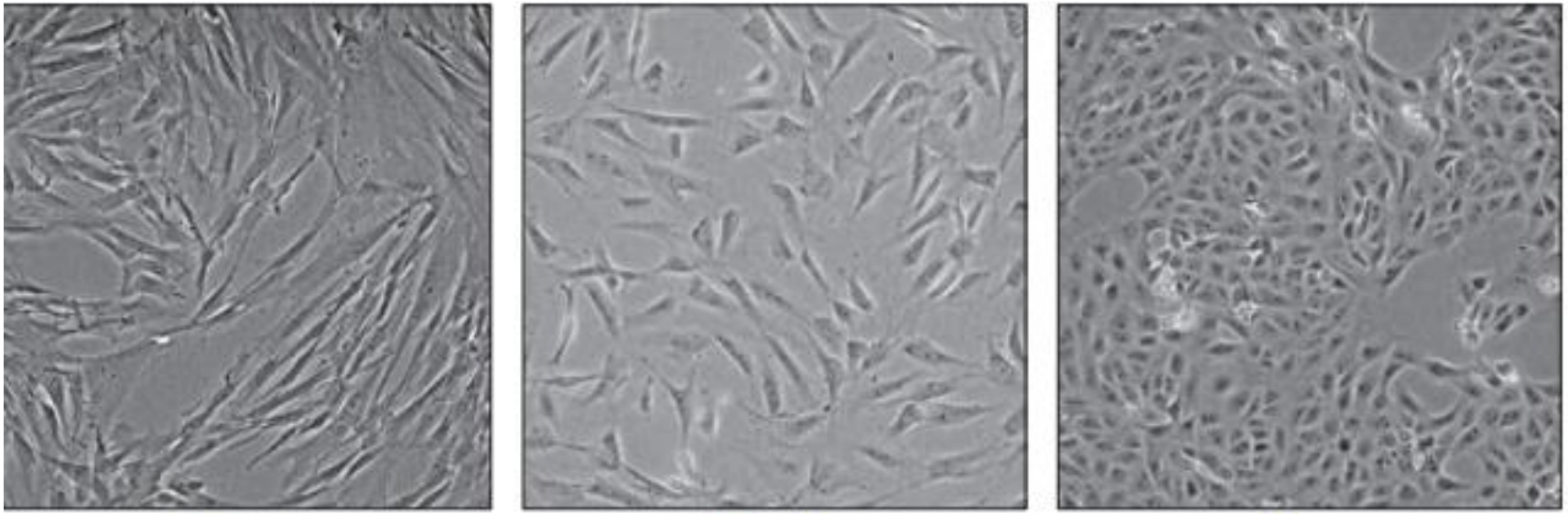
- **Colture primarie** (linee cellulari primarie) – ottenute direttamente da un organo o da un tessuto di un animale molto giovane, o da un feto o da un embrione

- **Colture semi-continue** (linee cellulari diploidi) – mantenute vitali per 30-80 passaggi – rappresentano per i virus un substrato molto simile a quello naturale

- **Colture continue** (linee stabilizzate) – coltivate senza limite di numero di passaggi, posseggono un patrimonio cromosomico alterato, definito genericamente aneuploide, spesso poliploide

b. Le colture cellulari.

- costituiscono invece il **sistema ospite più usato, più p**otente e più versatile per la propagazione e la titolazione dei virus animali.



TIPI DIFFERENTI DI COLTURE CELLULARI IMPIEGATE IN VIROLOGIA.

Sono riportate immagini al microscopio a contrasto di fase esempi di colture di cellule primarie

- **HFF, fibroblasti da polmone umano**), **ceppi diploidi**
- **(NIH 3T3, fibroblasti murini stabilizzat**i), linee continue
- **Vero**, linea di cellule epiteliali di rene di scimmia.

Metodi di saggio dei virus

- È possibile determinare la quantità di virus presente in un campione:
  1) contando il **numero di particelle virali**
  2) misurando la **concentrazione di unità infettanti**

- Il numero delle particelle virali può essere anche 1 milione di volte superiore al numero delle unità infettanti

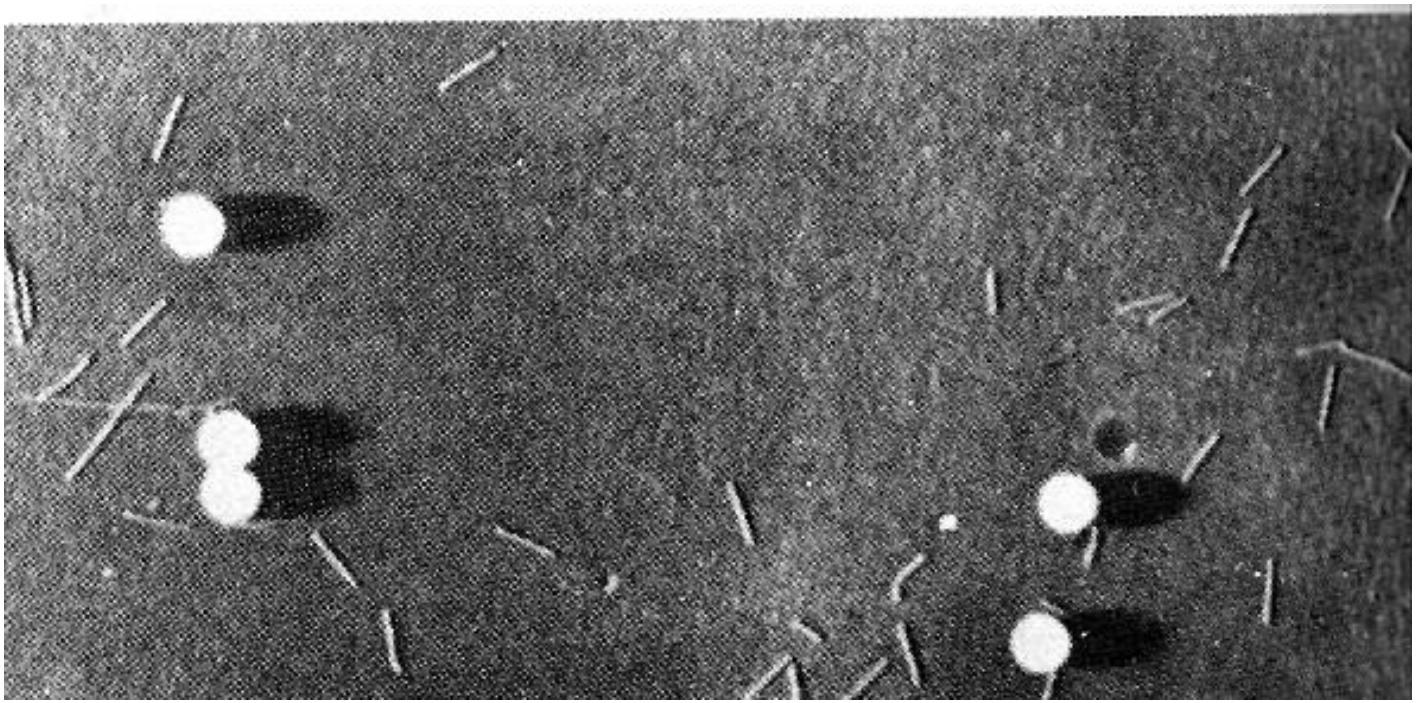
1. Conteggio del numero di particelle virali

- diretto: microscopio elettronico
- indiretto: saggio di emoagglutinazione

2. Conteggio delle unità infettanti

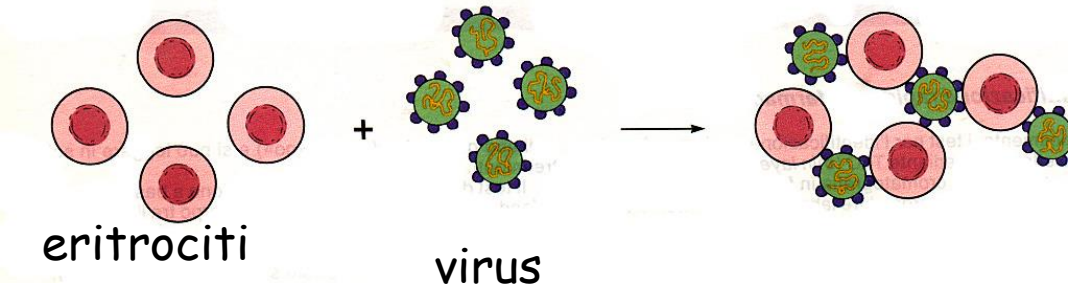
- saggio delle placche
- dose infettante (ID_{50}) e dose letale (LD_{50})

a. Conteggio al ME

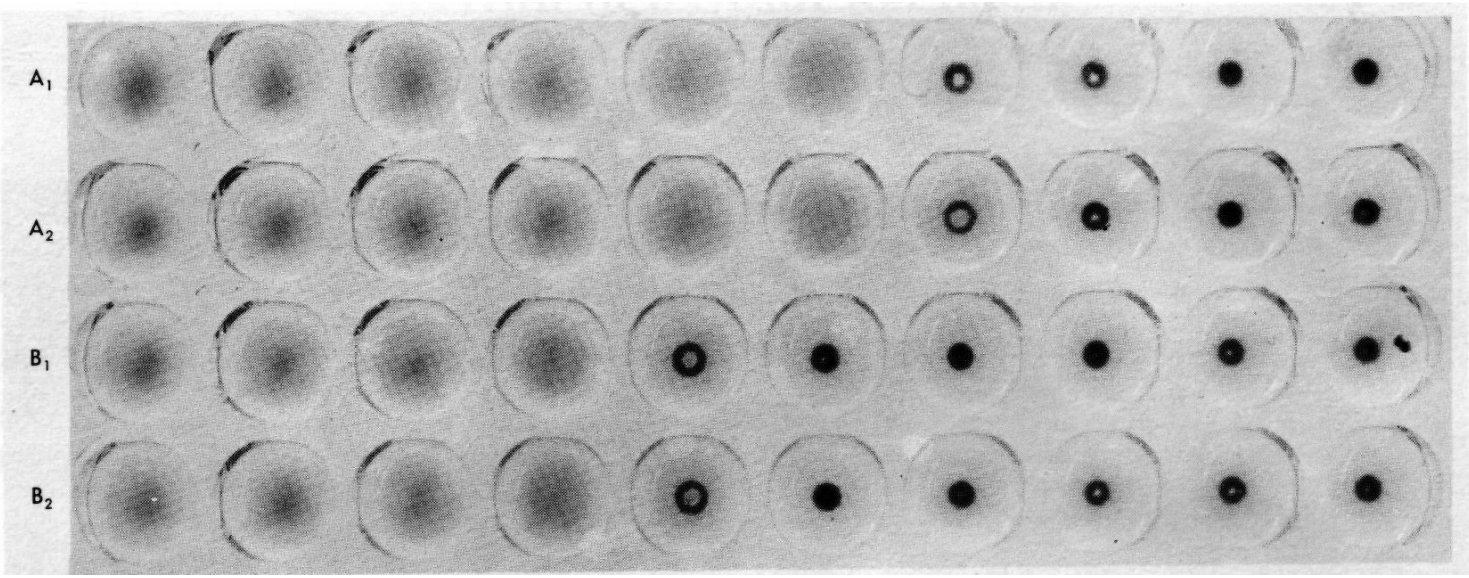


- Il campione virale viene mescolato a microscopiche sferette di latex a concentrazione nota.
- Per una determinata superficie si fa il
- **rapporto tra il numero di virus e il numero di sfere e**
- si risale quindi alla concentrazione virale

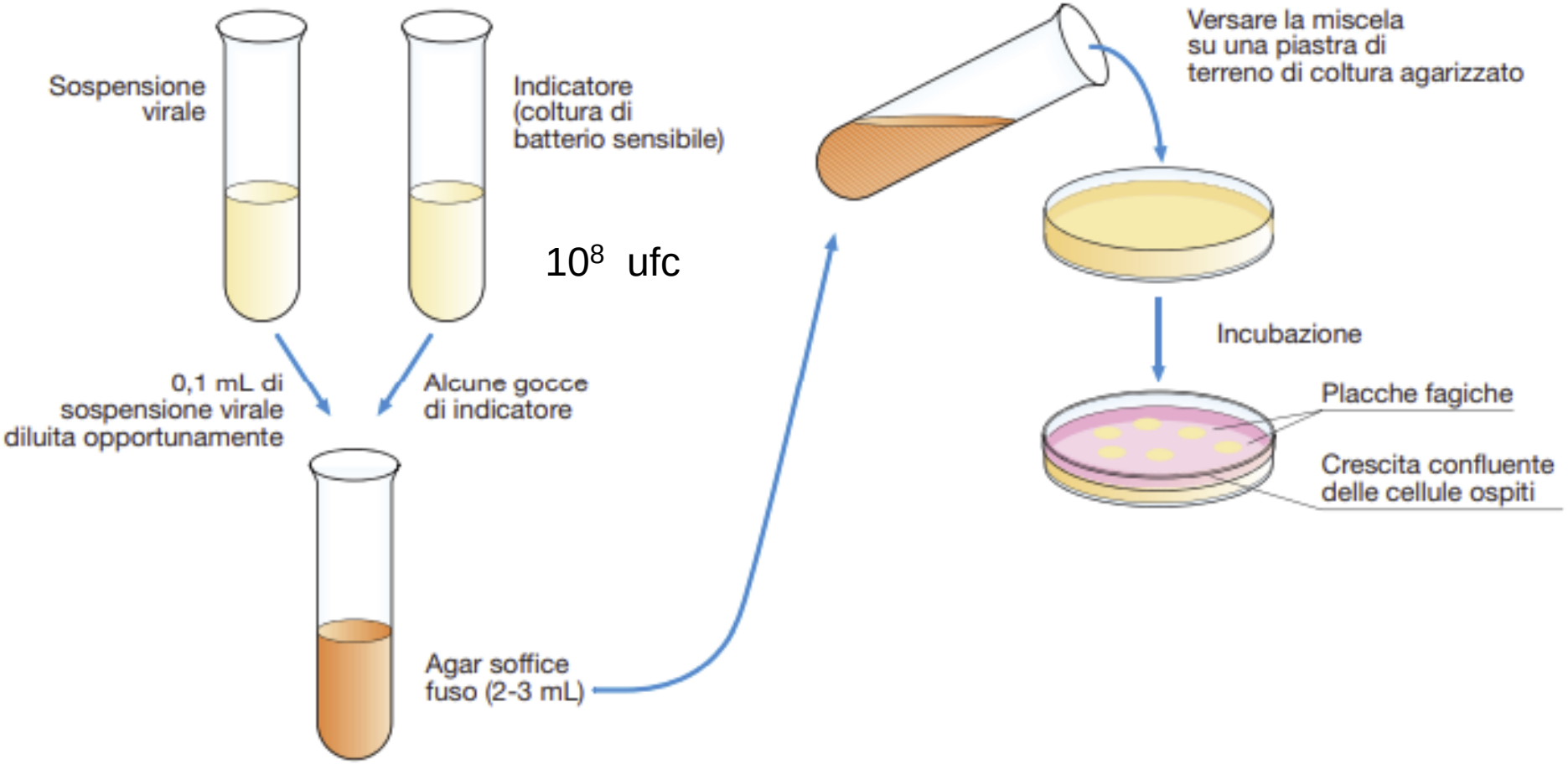
b. Saggio di emoagglutinazione



- Diluizioni seriali di sospensione virale vengono aggiunte ai globuli rossi.
- Il titolo emo-agglutinante è dato da **diluizione più alta che dà ancora agglutinazione**

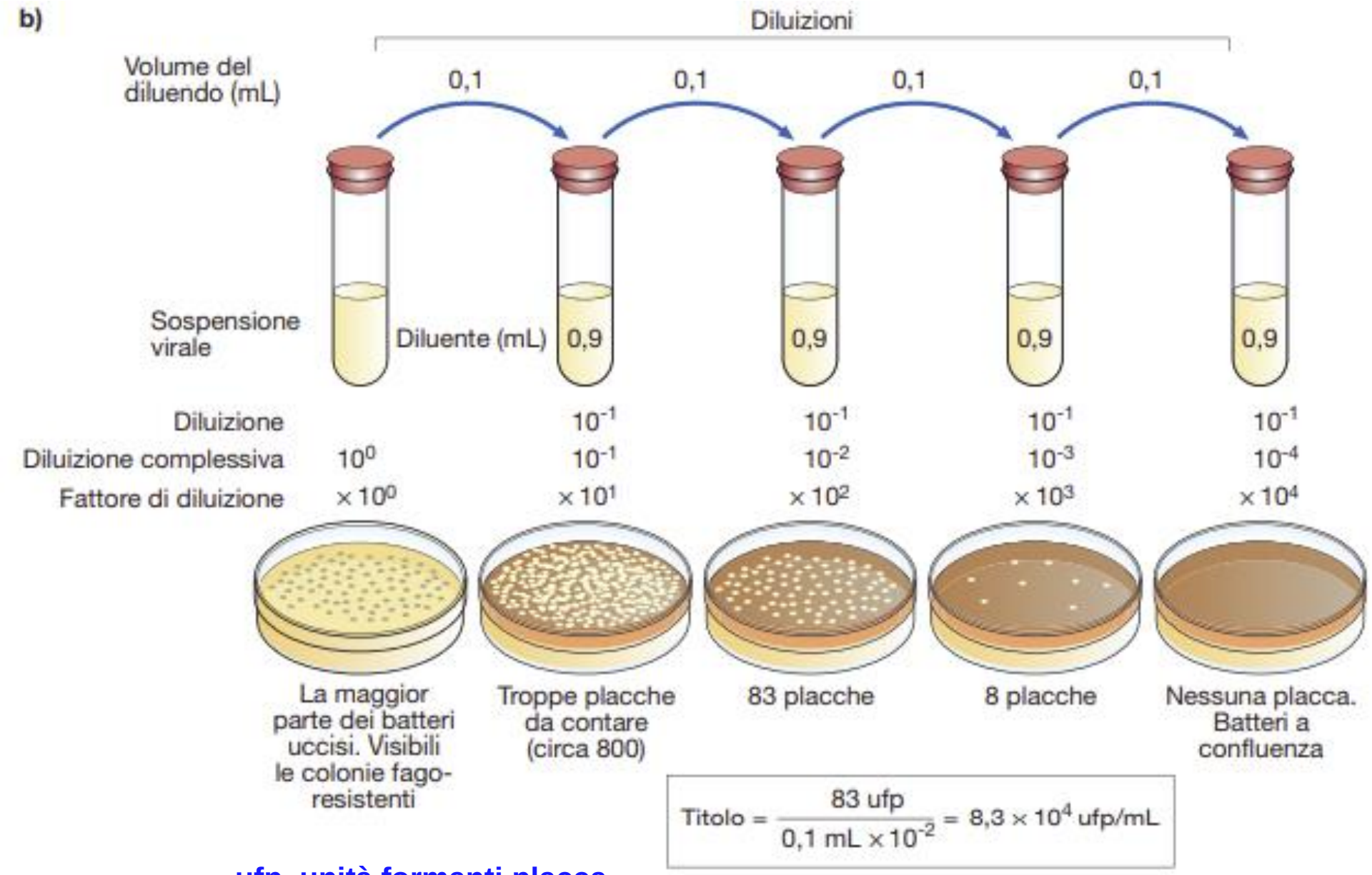


c. SAGGIO DI PLACCA



- Ogni placca ha avuto origine da una singola particella virale,
- quindi, il **numero delle placche prodotte equivale al numero di virioni infettanti o di unità formanti placca (PFU).**
- Dal numero delle placche e considerando la diluizione effettuata, si risale alla concentrazione di particelle infettanti.

TITOLAZIONE DEI BATTERIOFAGI.



$$\text{Titolo} = \frac{83 \text{ ufp}}{0{,}1 \text{ mL} \times 10^{-2}} = 8{,}3 \times 10^{4} \text{ ufp/mL}$$

ufp, unità formanti placca.

Il saggio delle placche: applicazioni

- Il saggio delle placche **può essere applicato anche a virus animali** e **vegetali** quando si dispone di cellule sensibili all'infezione che crescano *in vitro*
  - In alternativa, molti virus animali possono essere inoculati sulla membrana corion-allantoidea degli embrioni di pollo dove producono lesioni localizzate dette pustole
- Per i virus vegetali si spalma una sospensione di virus con una sostanza abrasiva su foglie sensibili. I virus daranno delle lesioni necrotiche
- In tutti i casi, moltiplicando il fattore di diluizione per il numero di pustole o lesioni necrotiche si ottiene la concentrazione di unità infettanti (ufp) di una sospensione virale

- **Quando è impossibile ricorrere al saggio delle placche si usa il metodo della diluizione finale.**
- Organismi viventi o colture cellulari sono inoculati con diluizioni seriali di una sospensione virale per **determinare la diluizione che uccide o danneggia il 50% delle cellule o degli organismi impiegati.**
  - **LD_{50}** = dose letale per il 50% del campione
  - **ID_{50}** = dose infettante per il 50 % del campione

Efficienza di piastramento

- Il **rapporto quantitativo tra il numero** delle **unità infettanti** e il **numero delle particelle virali** (determinato mediante conteggio al microscopio elettronico) è definita **efficienza di infezione.**

$$E.I = \frac{\text{Unità Infettanti}}{\text{Conteggio al ME}}$$

  - I conteggi ottenuti con il saggio delle placche sono sempre inferiori a quelli ottenuti con il microscopio elettronico.
  - **L'efficienza con cui i virus infettano le cellule ospiti raramente raggiunge il 100% e spesso può essere considerevolmente inferiore.**
  - Un'efficienza inferiore al 100% può essere in parte **dovuta alla presenza di particelle virali difettive**, ma più spesso è dovuta al fatto che, nelle condizioni usate, l'infezione da parte di queste particelle non ha avuto successo.
- Mentre per i virus batterici l'efficienza di piastramento supera spesso il 50%, nel caso di molti virus animali può essere molto bassa, tra lo 0,1 e 1%.
- **Anche se sono necessarie molti virus per infettare una cellula, l'infezione è iniziata sempre da un solo virus**

Esperimento di crescita a ciclo unico (*one-step*)

- L' **esperimento *one-step*** permette di **seguire le varie fasi della moltiplicazione virale partendo da un'infezione** sincrona di una coltura batterica

1) infezione di una coltura batterica (T=0 dell'esperimento). Tutti i batteriofagi inizieranno il ciclo di moltiplicazione contemporaneamente

2) lavaggio della coltura per eliminare i batteriofagi non ancora adsorbiti

3) ad intervalli di tempo viene determinato il numero di batteriofagi liberati mediante il saggio delle placche

Una cellula infettata produttivamente può produrre fino a 100.000 particelle virali (es. poliovirus), ma spesso il processo di infezione produttiva non è efficiente. Perché?

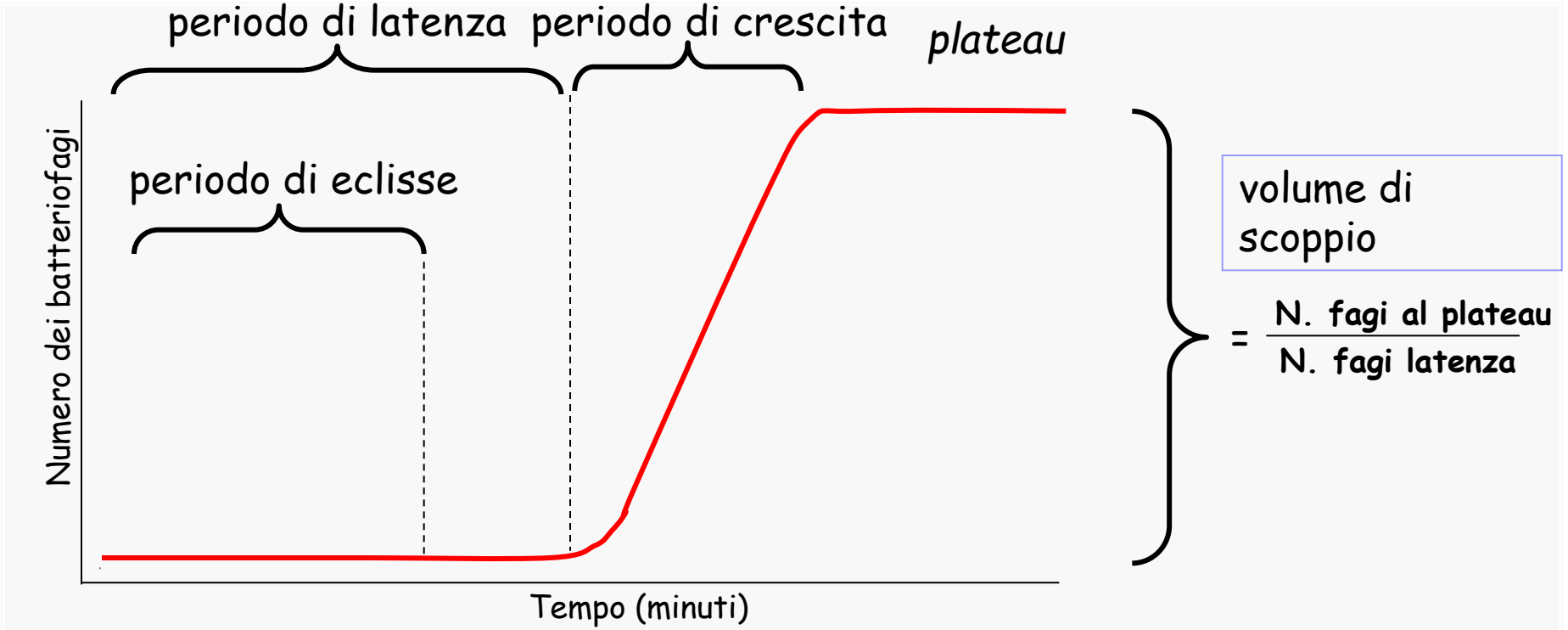
Table 2.2 Particle-to-PFU ratios of some animal viruses

Virus	Particle/PFU ratio
Adenoviridae	20–100
Alphaviridae	
Semliki Forest virus	1–2
Herpesviridae	
Herpes simplex virus	50–200
Orthomyxoviridae	
Influenza virus	20–50
Papillomaviridae	
Papillomavirus	10,000
Picornaviridae	
Poliovirus	30–1,000
Polyomaviridae	
Polyomavirus	38–50
Simian virus 40	100–200
Poxviridae	1–100
Reoviridae	
Reovirus	10

- **Il rapporto virioni infettanti/particelle totali** è circa
  - **1/1000 nei picornavirus,**
  - **1/200 negli herpesvirus;**
  - molte particelle sono **incomplete, o difettive.**

- **risultato di**
  - **mutazioni**
  - **errori di produzione ed assemblaggio del virione**

Curva di crescita a ciclo unico



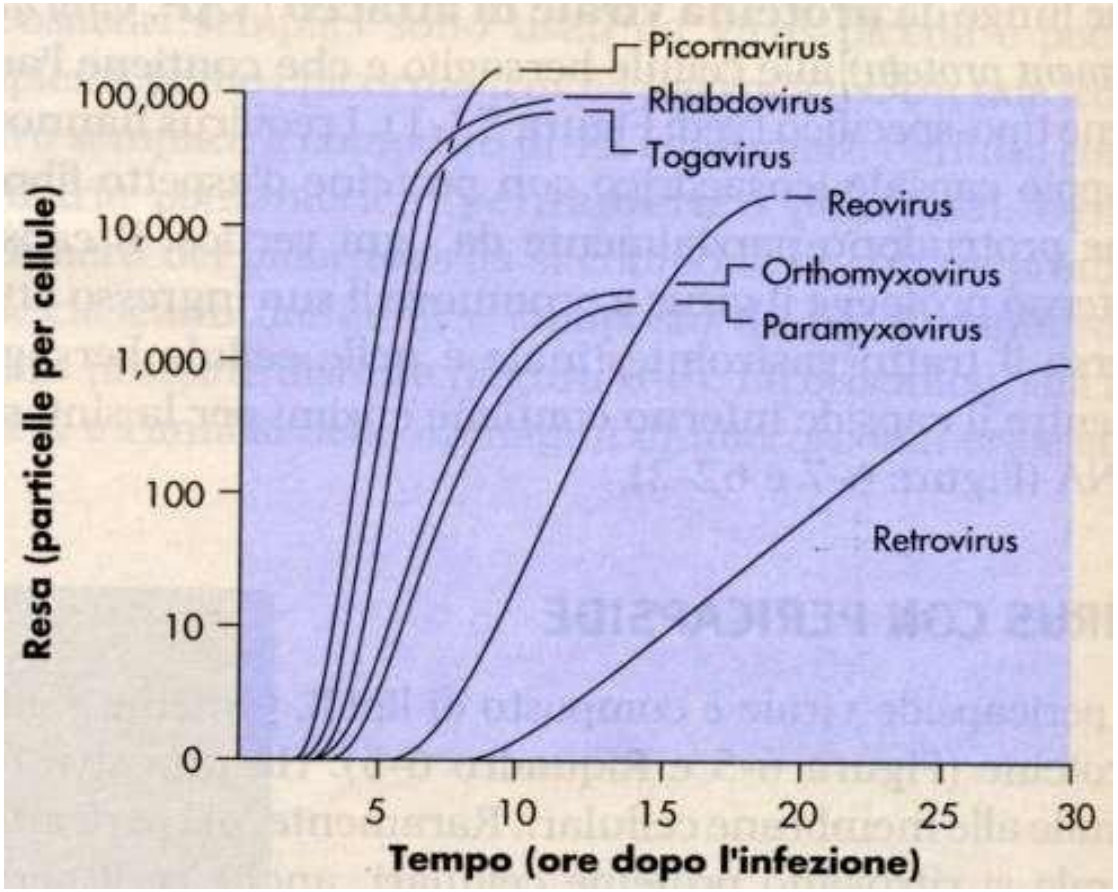
- **periodo di eclisse**: periodo durante il quale non è possibile rilevare la presenza di particelle virali infettive neanche all'interno dei batteri

- **periodo di latenza**: periodo di sviluppo dei fagi nel batterio infettato. I fagi non sono ancora liberati all'esterno. Nella fase finale sono presenti particelle mature nel batterio.

- **periodo di crescita**: le cellule vanno incontro a lisi liberando i fagi infettanti. Quando tutti i batteri infettati saranno lisati si raggiunge il *plateau*

Durata del ciclo replicativo

- Il **tempo** che passa **fra infezione di una cellula ed il rilascio** della **progenie virale infettante**
  - varia nei diversi virus,
  - e dipende anche dalla fase del ciclo cellulare in cui si trova la cellula al momento dell'infezione.



In linea di massima, varia
- **da 6-7 ore** (Picornavirus)
- a **18- 20** ore (herpes simplex)
- a **due-tre** giorni citomegalovirus)

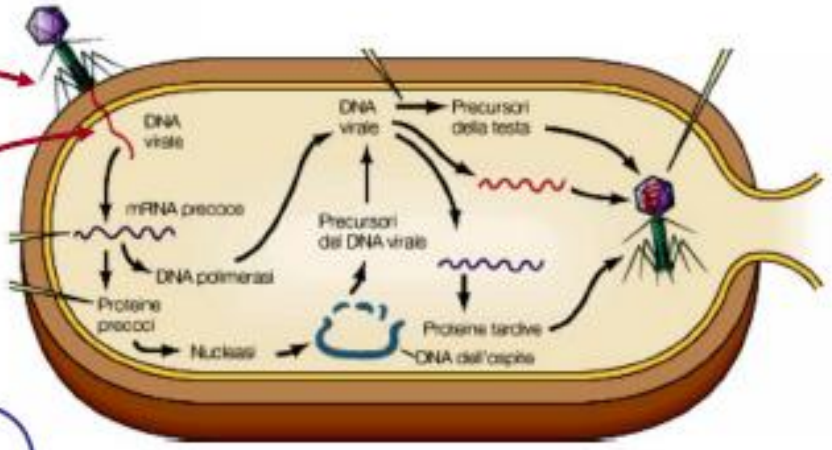
I batteriofagi

- I virus batterici si chiamano BATTERIOFAGI,
- hanno una struttura complessa per permettere loro di
  - (1) **aderire alla superficie esterna della parete batterica e**
  - (2) **perforare la spessa parete batterica**

Come si possono DIFENDERE i BATTERI dall'attacco dei BATTERIOFAGI?

1) Ostacolando l'adsorbimento dei FAGI sulla superficie della cellula batterica

2) Degradando il materiale nucleico del FAGO utilizzando Enzimi di Restrizione



In questo caso il batterio protegge il suo DNA utilizzando sistemi di MODIFICAZIONE (metilazione delle basi azotate)

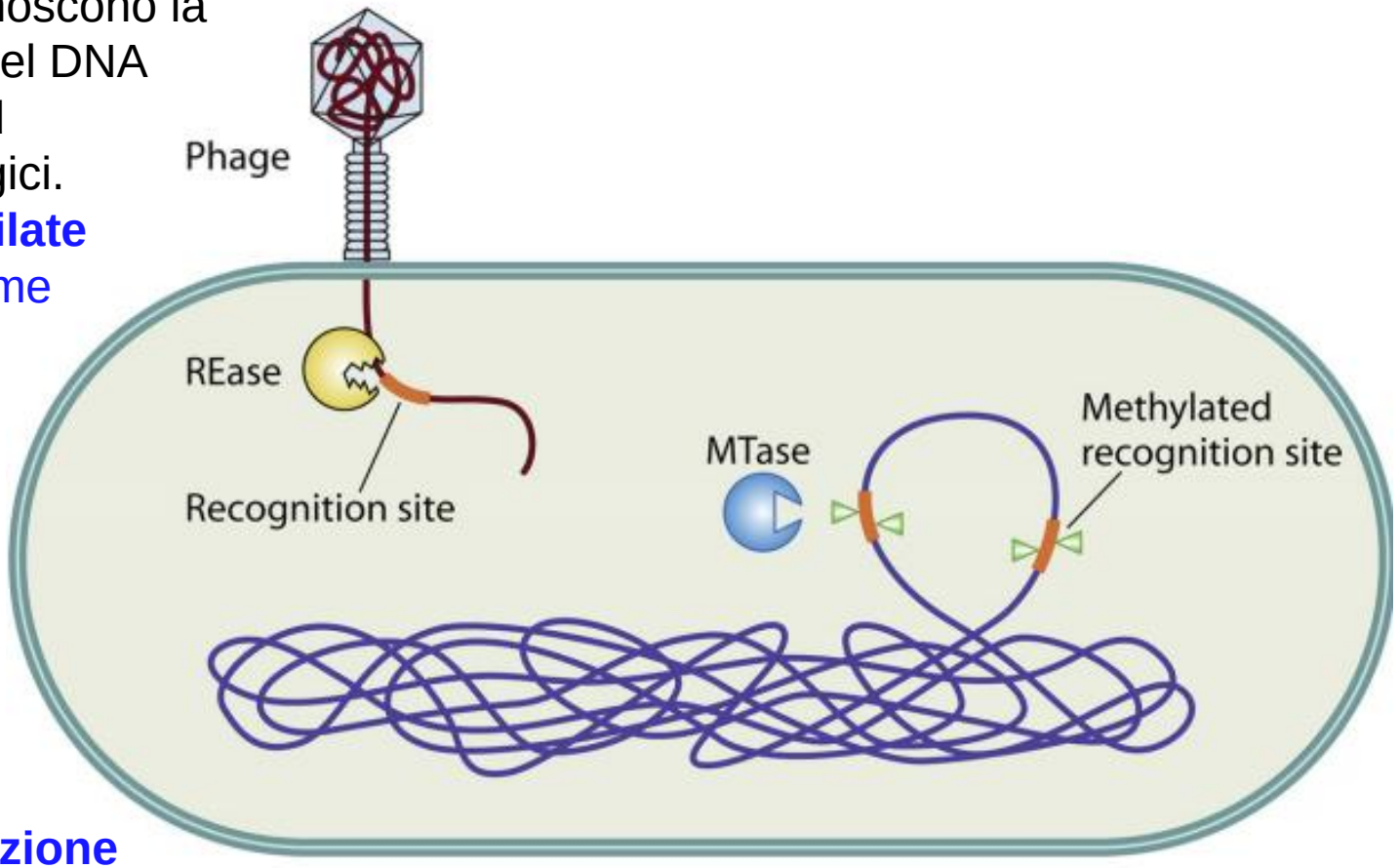
EcoRI G A A T T C
(*Escherichia coli* B55)

HindIII A A G C T T
(*Haemophilus influenza*)

BamHI G G A T C C
(*Bacillus amyloliquefaciens* H)

Sistemi di Restrizione-Modificazione (R-M) come meccanismi di difesa.

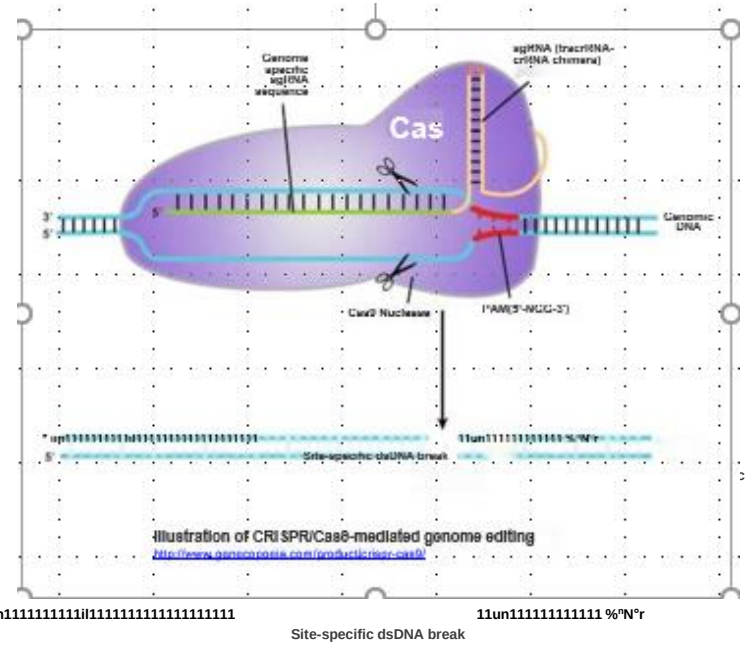
- I sistemi R-M riconoscono la stato di metilazione del DNA estraneo entrante, ad esempio, genomi fagici.
- Le **sequenze metilate** sono riconosciute come **self,** mentre il riconoscimento di DNA entrante**, privo di metilazione, è riconosciuto come non self**
- **È quindi tagliato da endonucleasi di restrizione (REase)**
- Lo **stato di metilazione** nei siti di riconoscimento genomico è fornito **dalla metiltransferasi affine (MTasi) del sistema R-M.**



Sistemi CRISPR-Cas

Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

- **CRISPR sono segmenti di DNA contenenti brevi sequenze ripetute.**
- **Ogni ripetizione è seguita da brevi frammenti di DNA «distanziatore»,** generato da una passata esposizione del batterio a virus, batteriofagi o plasmidi ed incorporate **nei proca-rioti**,
- derivante non solo da DNA virali, ma anche raccattate dall'ambiente ester-no, come molecole di DNA degradato.

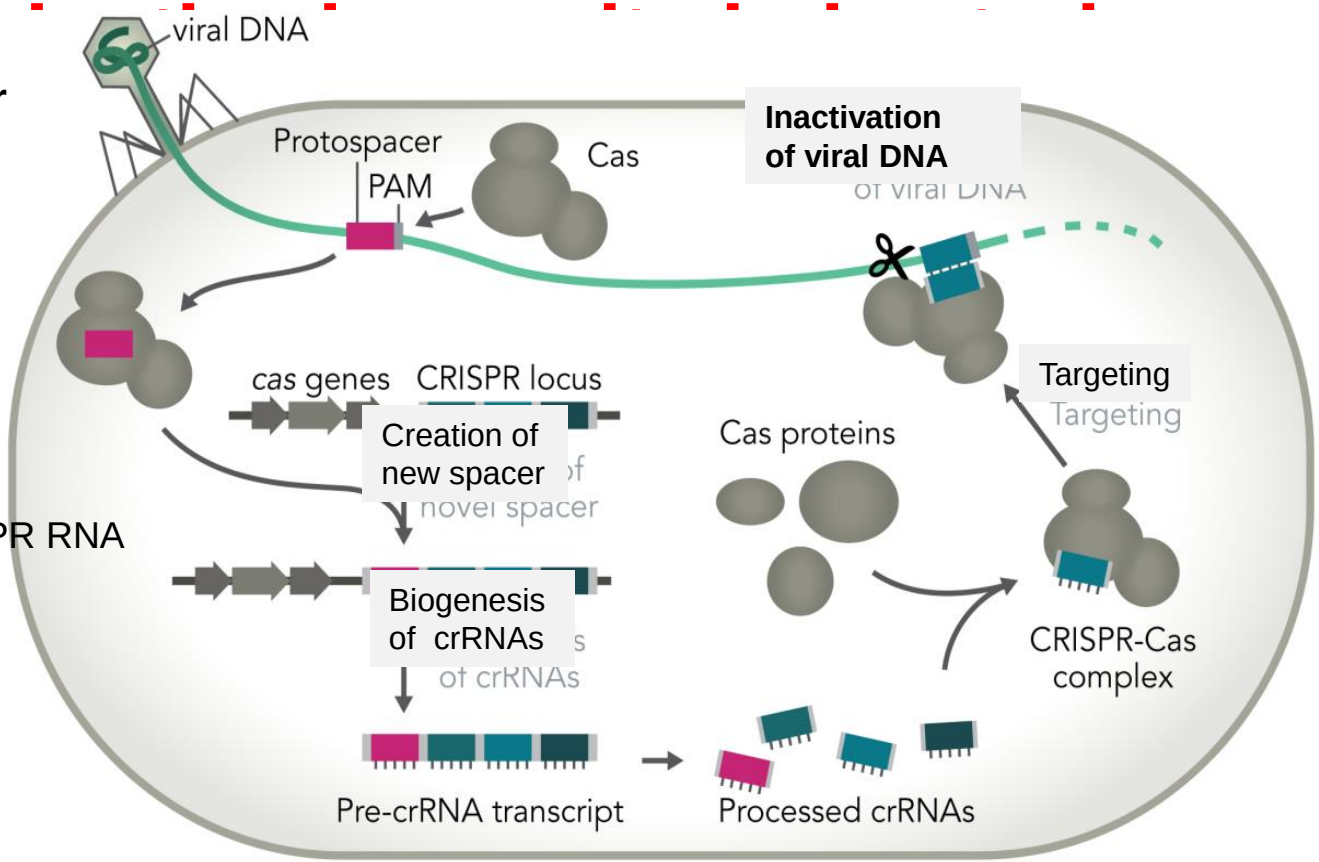


- CRISPR sono state scoperte per la prima volta nel 1987 in E. coli da Yoshizumi Ishino, ma a quell'epoca la loro funzione non era conosciuta. Nel 2000 furono identificati simili cluster di ripetizioni di sequenza in altri batteri e archeobatteri (SRSR), ma furono chiamati CRISPR solo nel 2002.
- La loro funzione ed importanza è stata compresa dopo la scoperta di un complesso di geni associati a tali sequenze, **denominati Cas (CRISPR-associated)**,
- questi in grado di **codificare per nucleasi ed elicasi, enzimi in grado di tagliare il DNA.**

Un sistema adattativo di difesa contro i fagi e plasmidi guidato da piccoli RNA

CRISPR-Cas system:

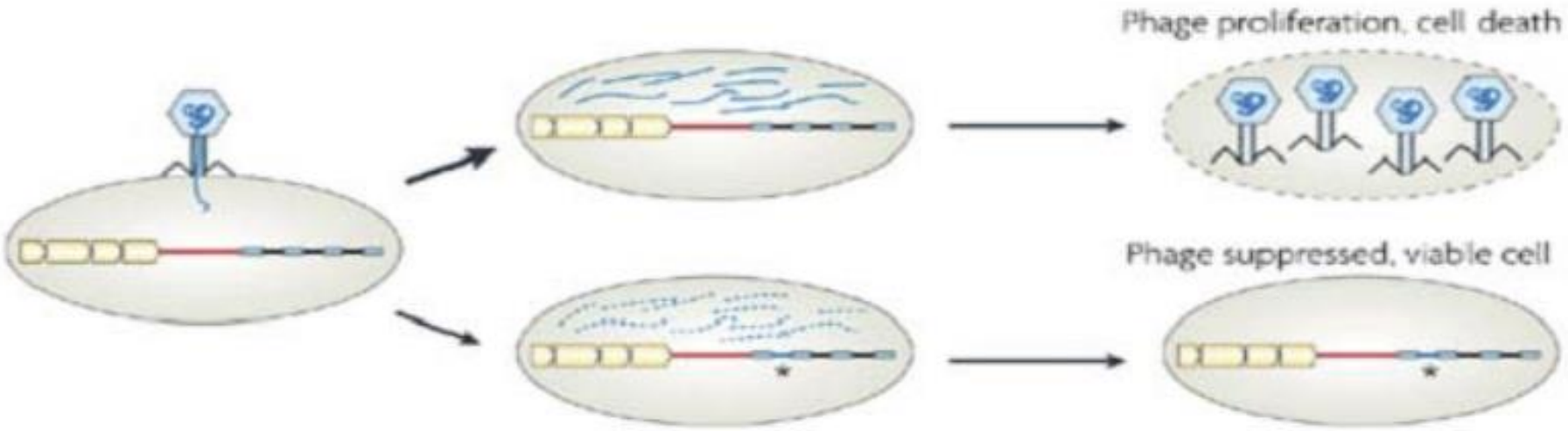
PAM: protospacer -adjacent motif



crRNA:CRIPR RNA

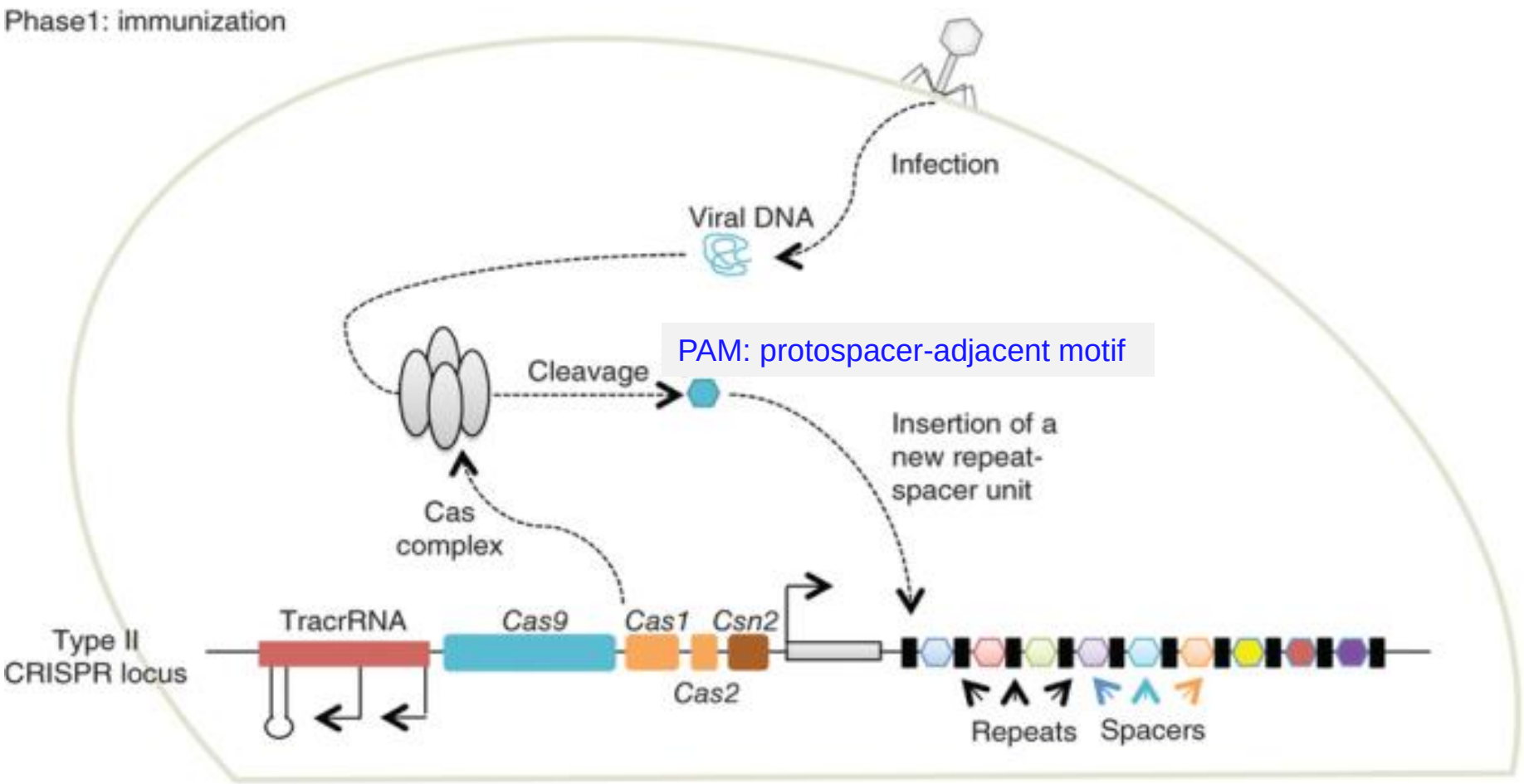
- Organizzazione di un locus CRISPR-Cas
- e specificità d'azione contro l'infezione di virus e plasmidi.

Come fanno le regioni CRISPR ad acquisire le regioni di DNA(SPACERS) che si intervallano tra le sequenze ripetute (REPEATS)?

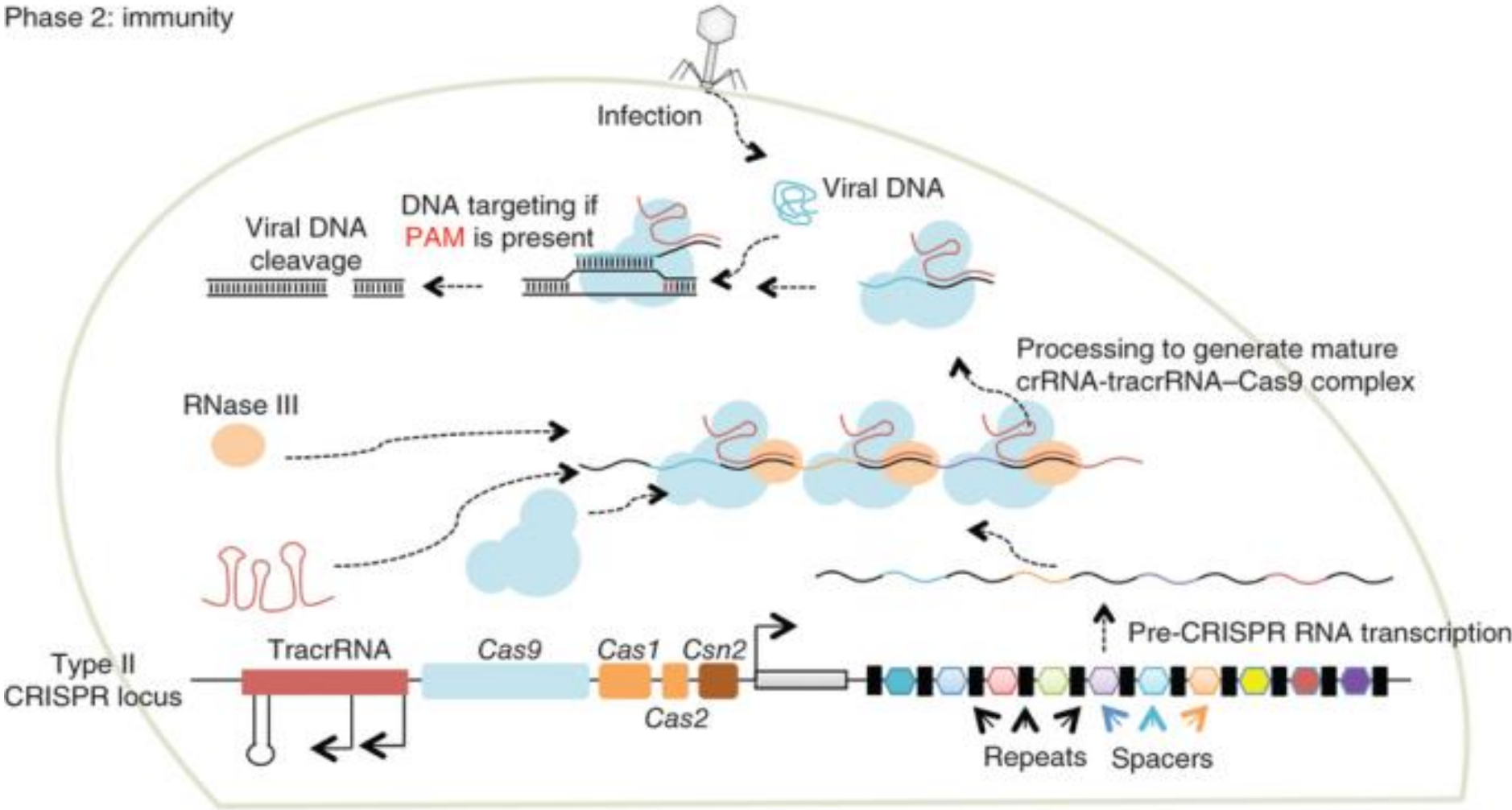


- In seguito all'attacco da parte di un fago, **gli acidi nucleici del fago si moltiplicano nella cellula e vengono prodotte nuove particelle fagiche** secondo un classico ciclo litico portando a morte le cellule sensibili.
- Un **piccolo numero di batteri riesce ad acquisire gli "spaziatori fagici" (SPACERS)** che permetteranno la sopravvivenza della cellula batterica tramite una degradazione CRISPR-mediata del DNA o mRNA fagico

Phase 1: immunizzation



Phase 2: immunity

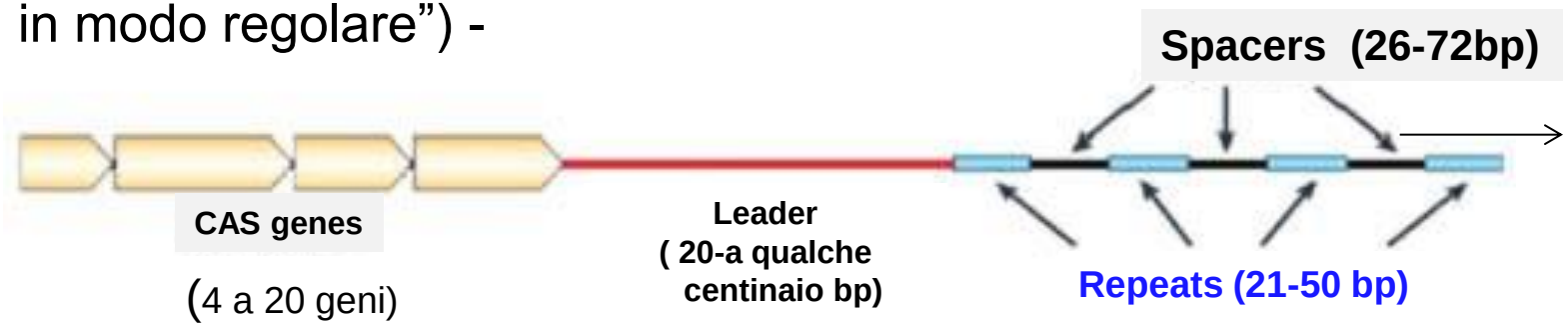


TracRNA: Trans activating CRISPR-RNA

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

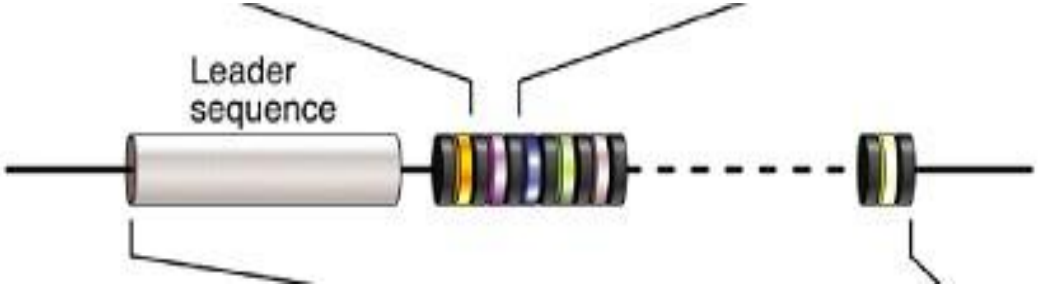
"brevi sequenze palindromiche ripetute raggruppate e distanziate in modo regolare") -



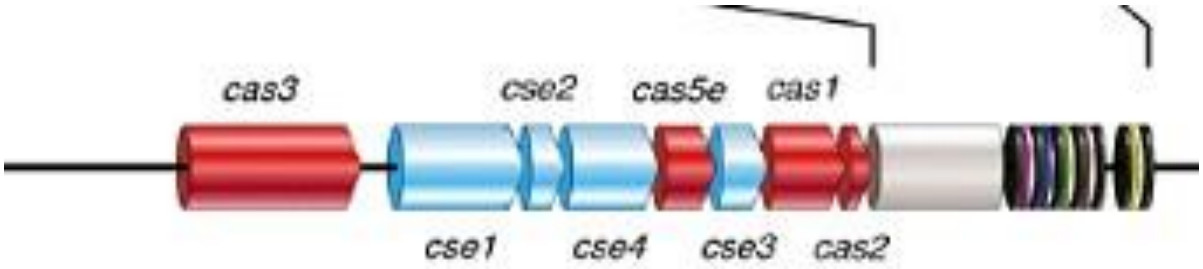
- Le regioni CRISPR sono essenzialmente **delle banche di memoria di sequenze fagiche ostili**.
- Una CRISPR è costituita da:
  - ripetizione di diversi frammenti fagici **(SPACERS) (da 1- a diverse centinaia)** e sono della stessa lunghezza in ciascun locus ma diversi per sequenza **alternate con**
  - **sequenze ripetute REPEATS (da 2- diverse centinaia),** parzialmente palindomiche , sono identiche in uno stesso locus
- Il sistema CRISPR conferisce resistenza ai fagi che contengono nel proprio genoma una sequenza identica o strettamente correlata a quella contenuta nei CRISPR.
- Sono quindi regioni presenti nel genoma della gran parte dei batteri (70% nei Batteri, 90% degli Archea)

Oltre a REPEATS e SPACERS il locus CRISPR è caratterizzato:

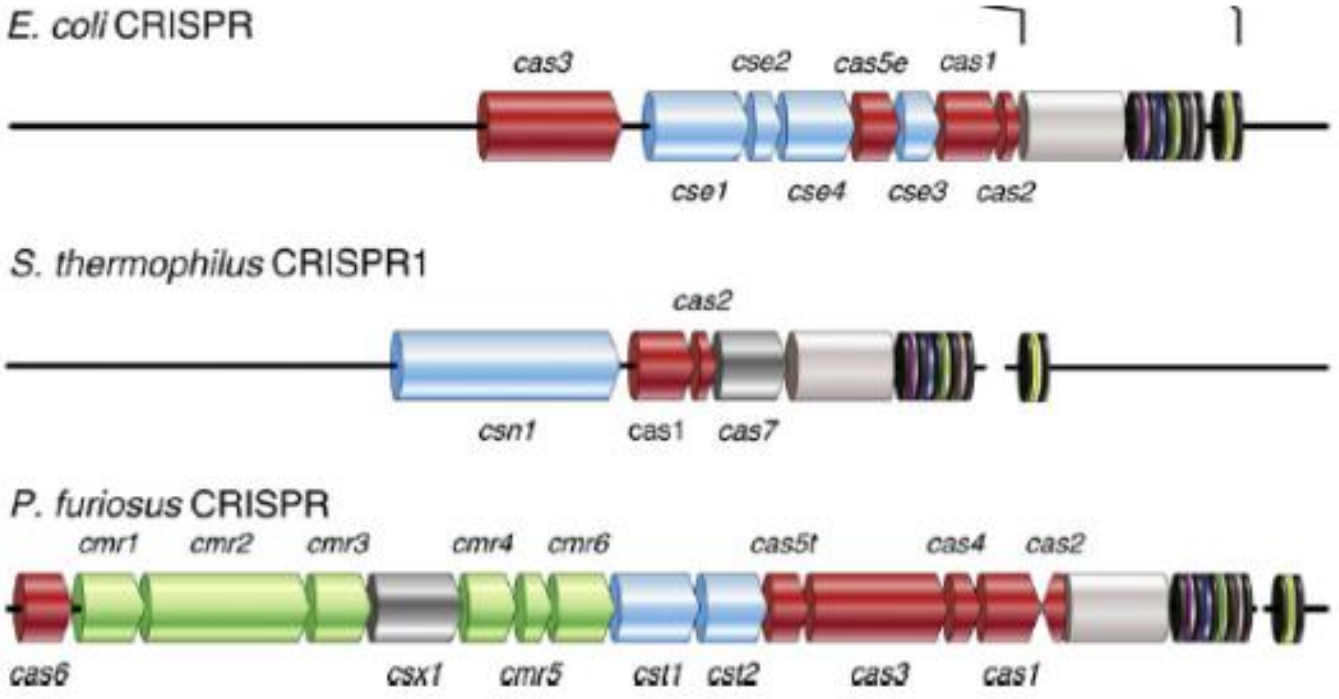
- Presenza di una regione definita LEADER lunga diverse **centinaia di basi** e non codificante posizionata sempre e solo ad una estremità del locus.



- **Proteine associate ai CRISPR (CAS) che sono codificate da geni localizzati a monte delle sequenze CRISPR**

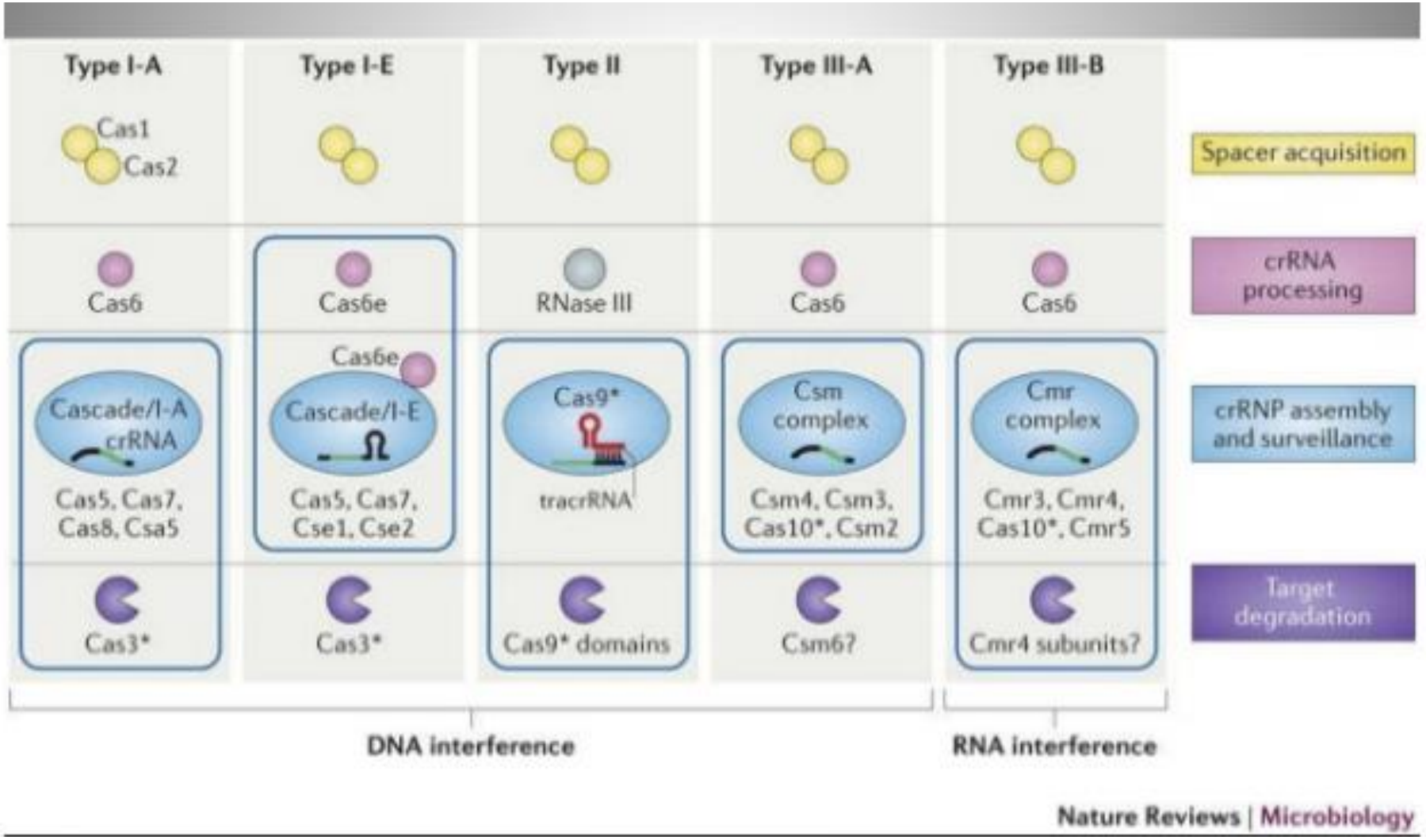


Le proteine CAS (CRISPR Associated Proteins)

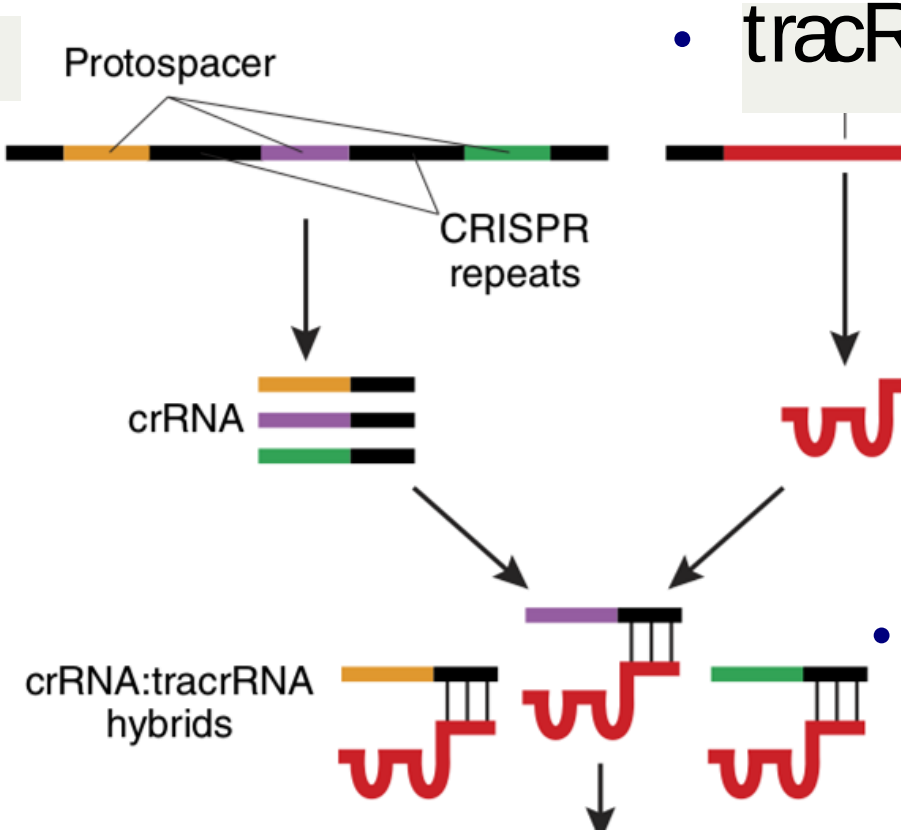


- I **CRISPR sono caratterizzati dalla presenza di una serie di proteine** CAS
- queste variano in numero e disposizione da locus a locus.
- L'analisi comparativa di diversi loci ha permesso di **identificare 4 tipi di proteine CAS (da 1 a 4)**
- esse costituiscono il core del sistema anche se spesso non sono tutte presenti

Classi dei sistemi CRISPR-Cas



How bacteria prevent DNA invasion from viruses

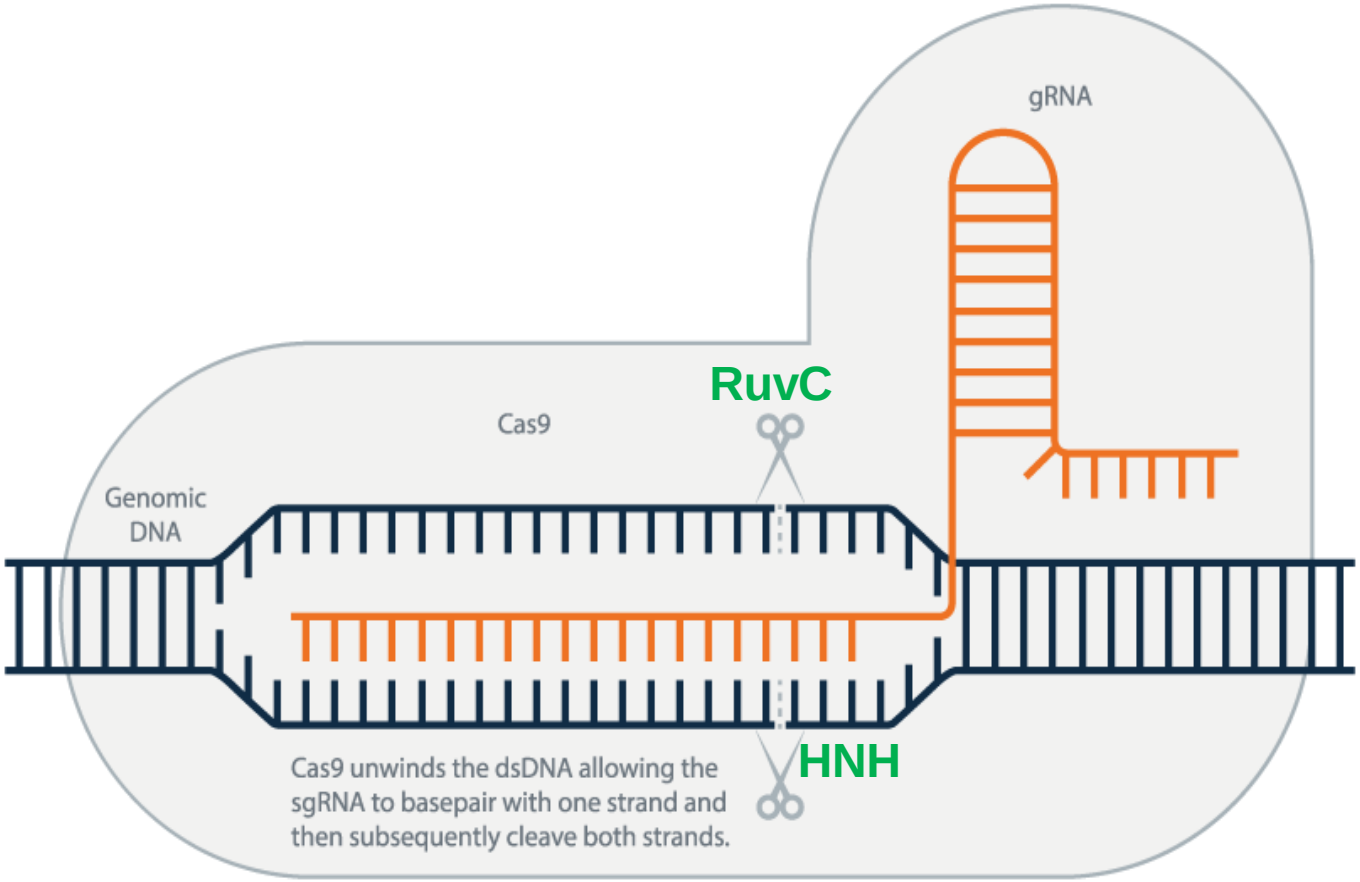


- tracRNA
- TracRNA : *trans activating*
- *CRISPR RNA*
- tracRNA

Crispr (cr) RNA + trans-activating (tra) crRNA combined
= **single guide (sg) RNA**

Sander *et al*, Nature Biotechnology, 32, 347-355, 2014

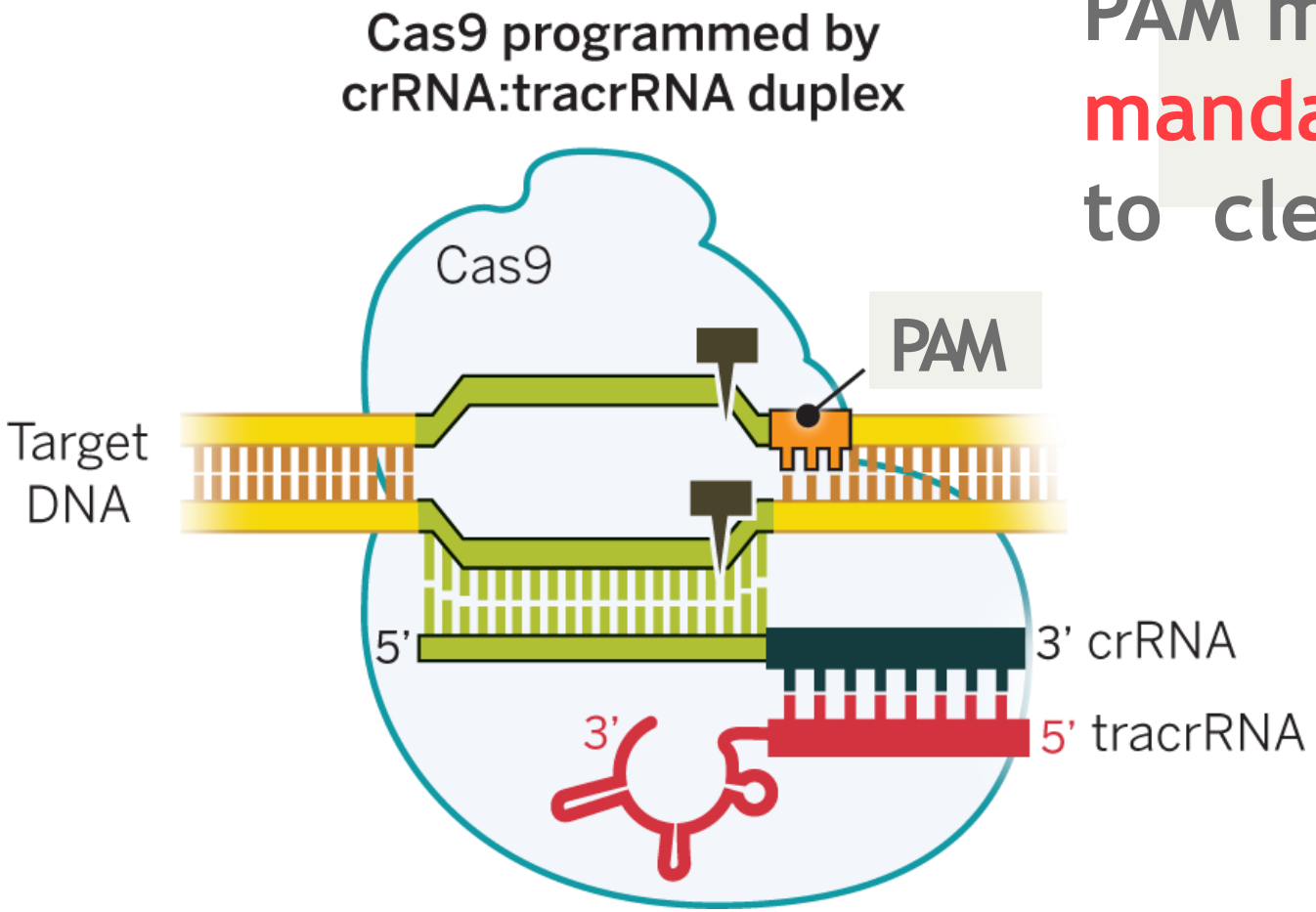
CRISPR-Cas9 | How does it work?



- **Crispr (cr) RNA + trans-activating (tra) crRNA combined = single guide (sg) RNA**

HNH: endonuclease homologous domains
RuvC: a member of RNase H family

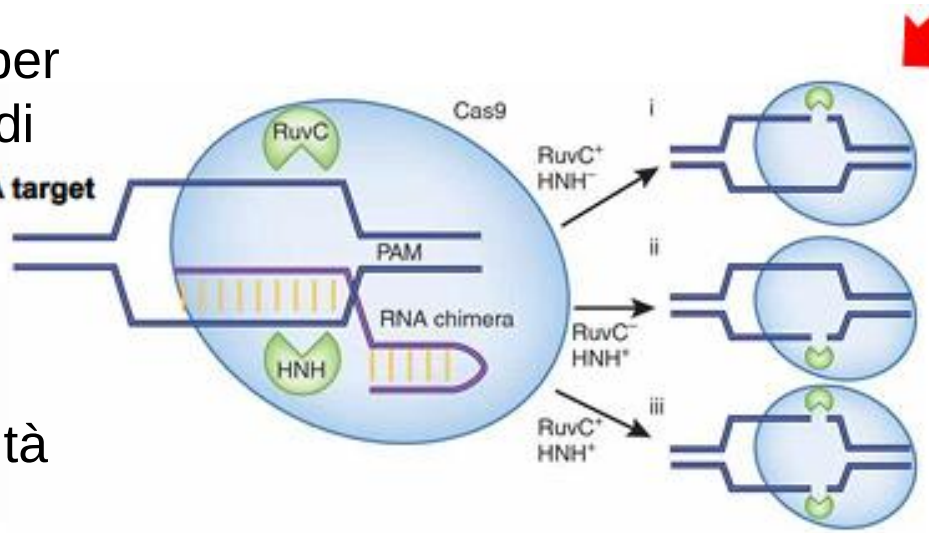
Cas9 mechanism

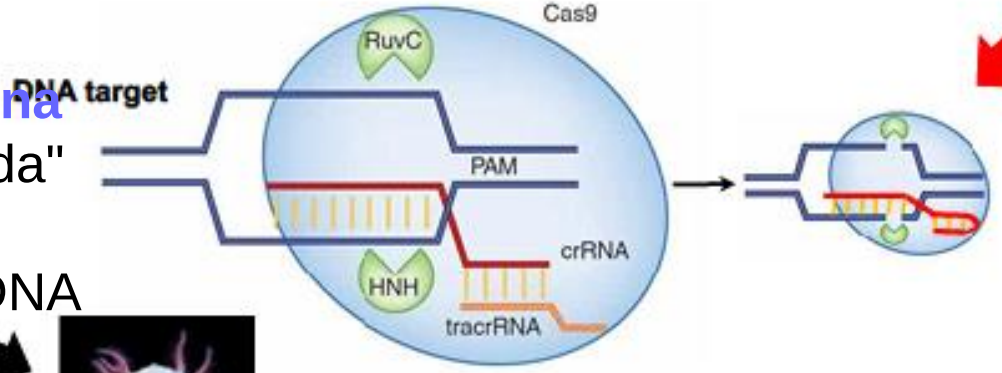


PAM motif ('NGG')
mandatory
to cleave DNA

CRISPR/Cas system e gene editing

- **Cas9 è una nucleasi specializzata nel taglio del DNA: ha due siti di taglio attivi (HNH and RuvC)**, uno per ciascun filamento della doppia elica di DNA.
- Il team di Doudna e Charpentier ha dimostrato che è possibile disabilitare uno o entrambi i siti, preservando la capacità della Cas9 di legare il suo DNA target.
- Nel **2012 Jinek** ha combinato tracrRNA e RNA **spaziatore in una singola molecola di "**RNA a guida" che, unita a Cas9,riusciva a riconoscere e tagliare i corretti DNA bersaglio.
- Jinek et al hanno proposto l'uso di questi **RNA guida sintetici per l'editing genetico**.



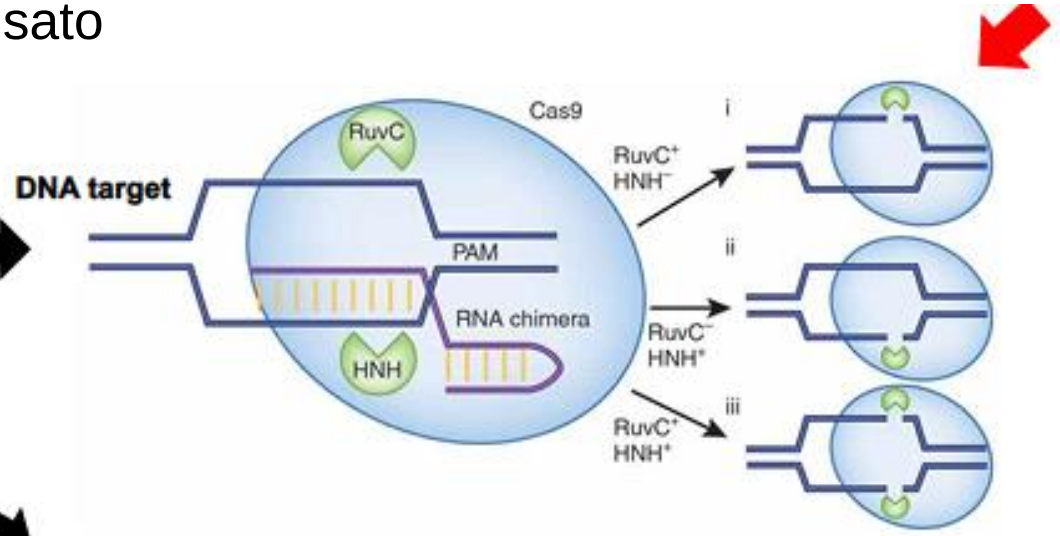


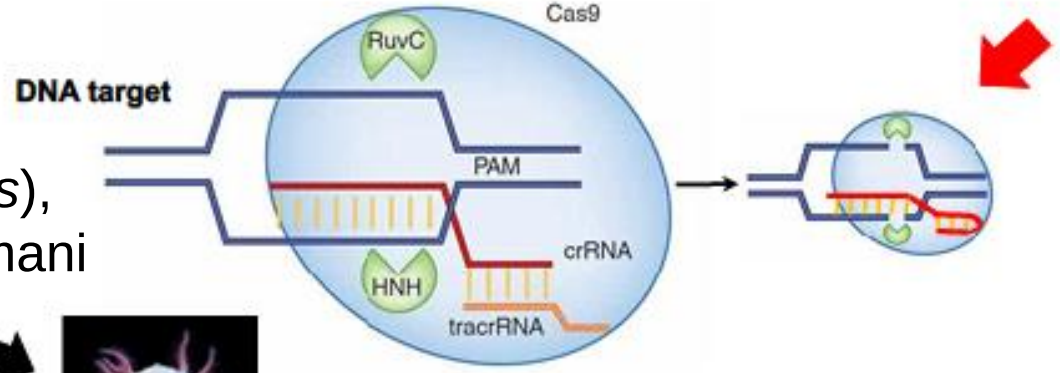


CRISPR/Cas system e gene editing (cont)

- Nel 2015 si è avuta la prima prova che CRISPR potesse essere usato per ingegneria **genetica e l'editing del genoma** in colture cellulari umane.
- . Da allora è stato impiegato in un ampio spettro di organismi tra cui il lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*), pesce zebra (*Danio rerio*),
- moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), axolotl (*A. mexicanum*), nematodi (*Caenorhabditis elegans*), piante, topi, scimmie, embrioni umani non vitali e vitali,

e altri organismi viventi





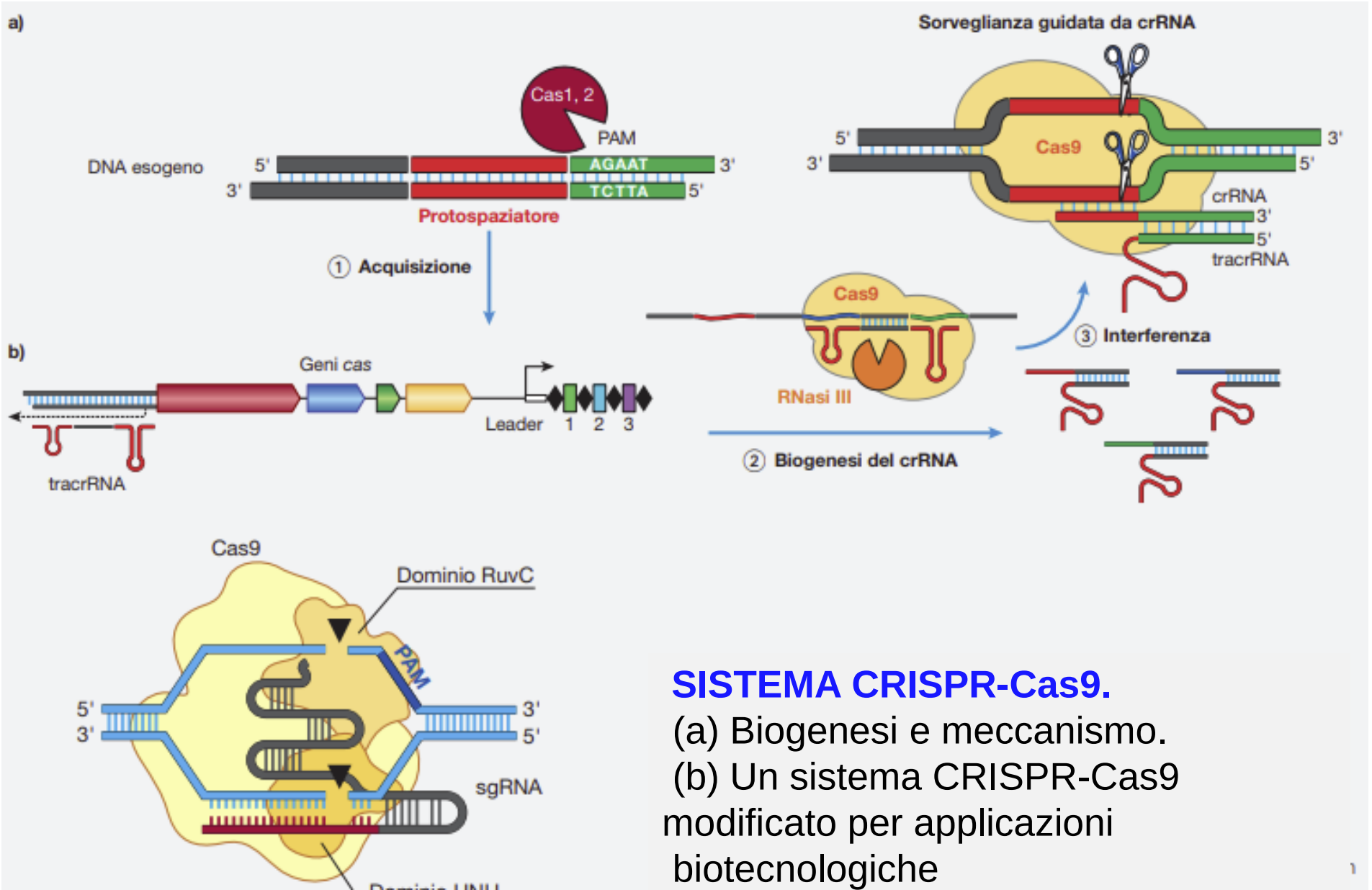


Altre funzioni cellulari controllate da sistemi CRISPR-Cas

.**PROCESSI CONTROLLATI DAI SISTEMI CRISPR-Cas.**

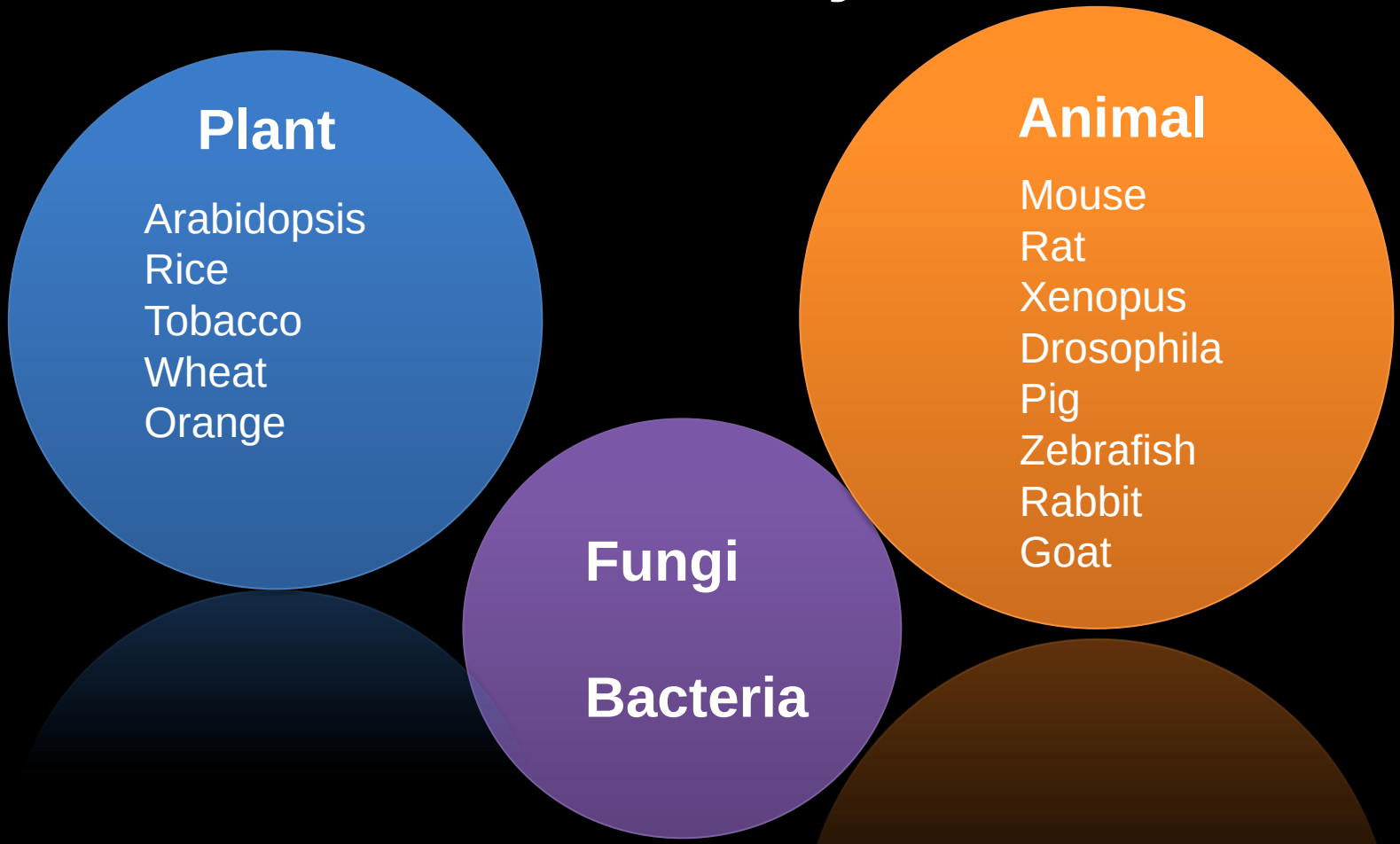
Funzione	Tipo CRISPR-Cas	Meccanismo	Richiede geni *cas*	Richiede CRISPR	Specie
Regolazione genica	III-B	Taglio di mRNA complementare	Si	Si	*Pyrococcus furiosus*
Regolazione di geni del comportamento sociale	I-F	Basato su complementarità parziale	Si	Si	*Pseudomonas aeruginosa*
	I-C	Ignoto	Si	Non noto	*Myxococcus xanthus*
Regolazione di geni di virulenza	II-C	Modificazione della superficie cellulare dipendente da Cas9	Si	No	*Campylobacter jejuni*
	II-B	Regolazione negativa della produzione di lipoproteine mediata da Cas9	Si	No	*Francisella novicida*
	II-B	Ignoto	Si	No	*Legionella pneumophila*
	Locus CRISPR orfano	Regolazione dell'operone *feoAB* basata su complementarità parziale	No	Si	*Listeria monocytogenes*
Rimodellamento del genoma	I-F	Rimozione di regioni genomiche mirate	Si	Si	*Pectobacterium atrosepticum*
Riparazione del DNA	I-E	Riparazione del DNA mediata da Cas1	Si	No	*Escherichia coli*
Competizione tra elementi genetici mobili	I-F	Competizione tra elementi genetici mobili per sequenze bersaglio specifiche	Si	Si	Fago ICP1 di *Vibrio cholerae*
Dormienza cellulare	Non specificato	Cas1e Cas2 fungono da sistema "tossina-antitossina" inducendo dormienza cellulare (ed eventuale morte cellulare) in seguito a infezione fagica	Si	No	Non specificato

CRISPR-Cas9: un sistema versatile di manipolazione genetica



SISTEMA CRISPR-Cas9.
(a) Biogenesi e meccanismo.
(b) Un sistema CRISPR-Cas9 modificato per applicazioni biotecnologiche

Virtually genomes of all living organisms can be modified by CRISPR/Cas9



In less than Two years after original discovery for Cas9
as “Programmable DNA endonculease”

L'enzima che rivoluziona l'ingegneria genetica

The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9

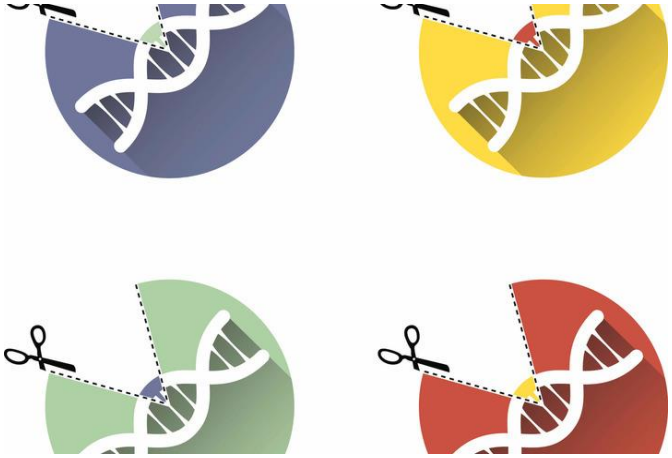
J. A. Doudna & E. Carpentier.

SCIENCE, 2014 , DOI: 10.1126/science. 1258096



- ✓ Il sistema CRISPR/Cas consente di modificare in modo rapido ed economico una precisa regione del DNA;

- ✓ **Ha catturato l'attenzione di tutta la comunità biotecnologica per la sua versatilità e le sue innumerevoli applicazioni.**



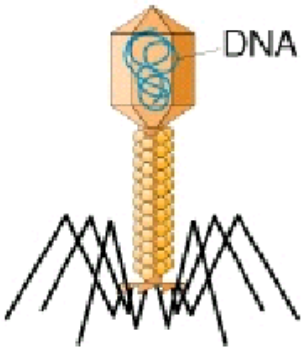
  - ➢ La **messa a punto di questa tecnica ha permesso a Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier di ricevere il premio Nobel per la Chimica del 2020**

Batteriofagi

- **Morphology of the T series of Phages**

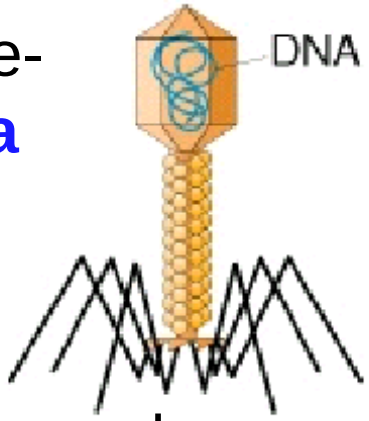
Name	Plaque size	Head (nm)	Tail (nm)	Latent period (min)	Burst size
T1	medium	50	150 x 15	13	180
T2	small	65 x 80	120 x 20	21	120
T3	large	45	invisible	13	300
T4	small	65 x 80	120 x 20	23.5	300
T5	small	100	tiny	40	300
T6	small	65 x 80	120 x 20	25.5	200-300
T7	large	45	invisible	13	300

Replicazione e sintesi delle proteine del fago T4



- T4 ha uno dei più grandi genomi virali (1,7 x 10^5 bp) costituito da DNA a doppio filamento lineare
- Immediatamente dopo l'ingresso del DNA vengono **sintetizzate le proteine precoci:**
  - gli **enzimi coinvolti nella trascrizione** e replicazione del DNA virale
  - enzimi che **degradano il DNA batterico** per fornire nucleotidi
- Vengono interrotte le attività del batterio (DNA, RNA e le proteine batteriche non vengono più sintetizzate).
- Dopo 5 minuti ha inizio la replicazione del DNA virale

Replicazione e sintesi delle proteine del fago T4



- La sintesi del DNA di T4 richiede una notevole preparazione perché contiene **idrossi-metil-citosina** al posto della citosina, che successivamente viene anche glucosilata.
- Questi residui glucosilati proteggono il DNA di T4 dall'attacco di alcune endonucleasi di *E. coli*, dette anche **enzimi di restrizione**, che altrimenti distruggerebbero il DNA virale effettuando tagli in siti specifici.
  - Questo meccanismo di difesa batterica è detto **restrizione.**
  - Il DNA batterico è protetto dall'azione di questi enzimi grazie alla presenza di **enzimi di modificazione**
  - questi effettuano modificazioni nei siti specifici riconosciuti dagli enzimi di restrizione

La replicazione del DNA di T4

❑ **Concatenamero: due o più molecole polimeriche circolari legate tra loro** da uno o più legami topologici non covalenti, in maniera simile agli anelli di una catena.

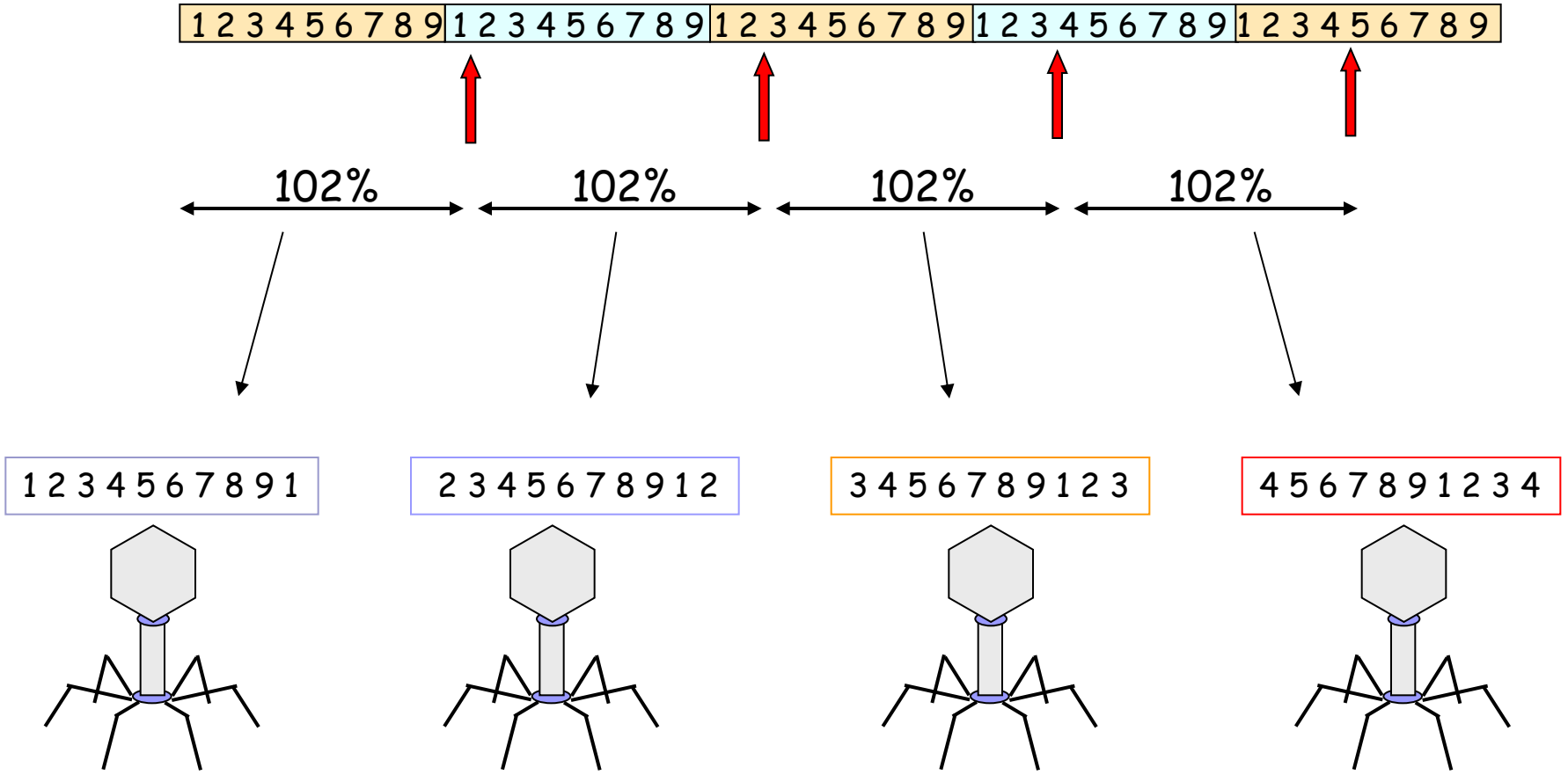
➢ Dopo diversi cicli di replicazione si vengono a formare **concatenameri** di lunghezza considerevole (fino a 20 copie di DNA)

➢ Il genoma di T4 è

- un dsDNA lineare
- presenta il fenomeno della
  - **permutazione circolare** e
  - ridondanza terminale (una stessa sequenza ripetuta alle estremità del DNA)

Organizzazione del genoma del fago T4

Ridondanza terminale (una stessa sequenza ripetuta alle estremità del DNA) **e permutazione circolare del genoma di T4**



Assemblaggio delle particelle fagiche

- **I geni tardivi dirigono la sintesi di tre tipi diversi di proteine:**

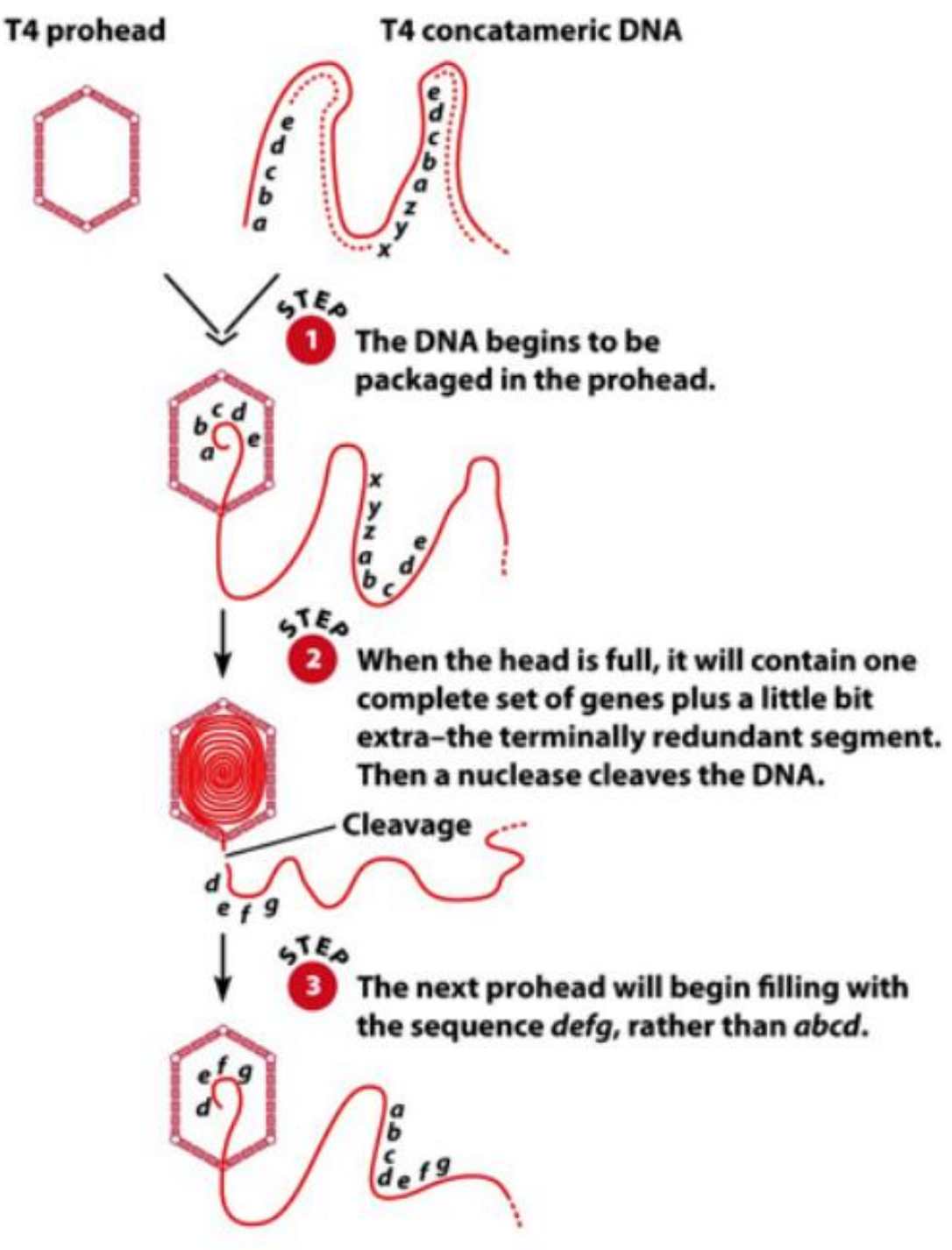
1) **proteine strutturali del fago**
2) **proteine che intervengono nell'assemblaggio ma non faranno parte del fago**
3) **proteine coinvolte nel processo di lisi batterica e liberazione dei fagi**

- Le proteine necessarie all'assemblaggio **vengono sintetizzate contemporameamente** e sono **utilizzate in "catene di montaggio"** quasi indipendenti fino ad avere il fago maturo

- L'impacchettamento del DNA avviene quando la testa è matura: circa 500 mm di DNA devono essere inseriti in una cavità di appena 0,1 mm.

- L'impacchettamento avviene secondo il meccanismo detto "**a testa piena**" a partire dai concatenameri sintetizzati.
- Quando il **volume della testa è totalmente riempito il concatenamero** viene tagliato. In questo modo entra il **102%** del genoma virale.
- Questo processo è responsabile della ridondanza terminale e della permutazione circolare del genoma di T4

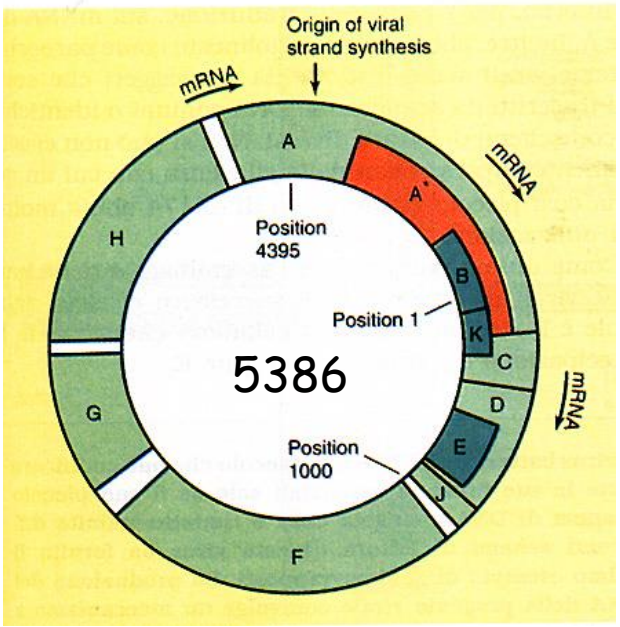
Generazion permutazioni circolari, terminallmente ridondanti dei cromosomi t T4 dal meccanismo "headful"



ΦX174 e il fenomeno dei geni sovrapposti

- **ΦX174 è un piccolo batteriofago** icosaedrico con genoma a DNA circolare a singolo filamento

- È un esempio di come **virus contenenti genomi di lunghezza limitata sfruttino al massimo l'informazione genetica** attraverso il fenomeno dei **geni sovrapposti**

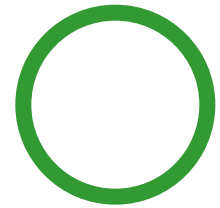


A sintesi della forma replicativa
A* inibizione della sintesi di DNA dell'ospite
E lisi della cellula ospite

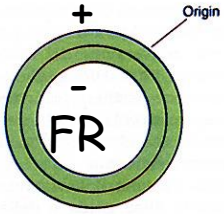
- ✓ I 5386 nucleotidi del genoma di ΦX174 non sarebbero sufficienti a codificare tutte le proteine virali identificate.
- ✓ Si è scoperto, quindi, che una sequenza può codificare anche per due proteine: **i geni sono sovrapposti.**

- Il gene *E* è contenuto all'interno di *D* su un altro schema di lettura.
- La proteina A* è parte della proteina A ed è ottenuta tramite un re-inizio della traduzione.

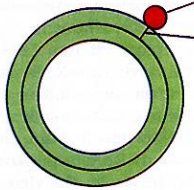
La replicazione a “cerchio rotante” di ΦX174



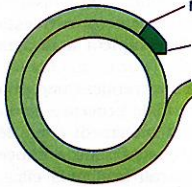
polarità +



forma replicativa a doppia elica

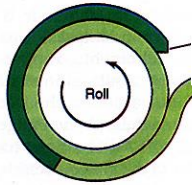


enzima che taglia la singola elica



elica nascente

filamento spiazzato

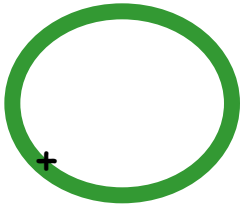


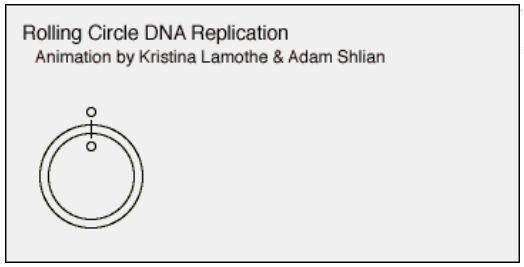
punto di crescita



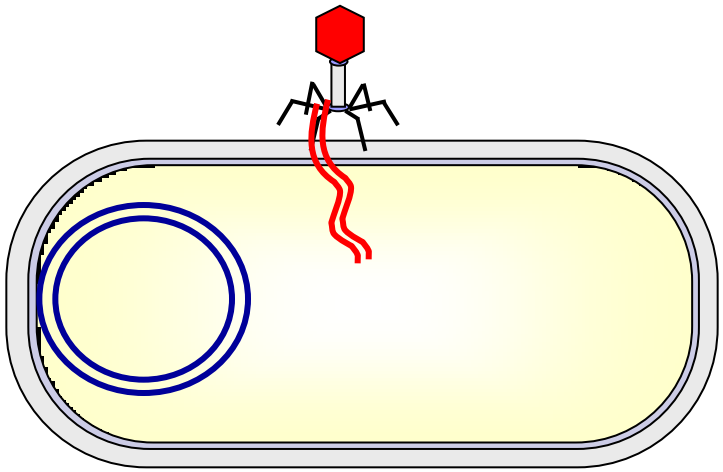
una rotazione completa

taglio e circolarizzazione di un genoma completo ad opera della proteina virale A



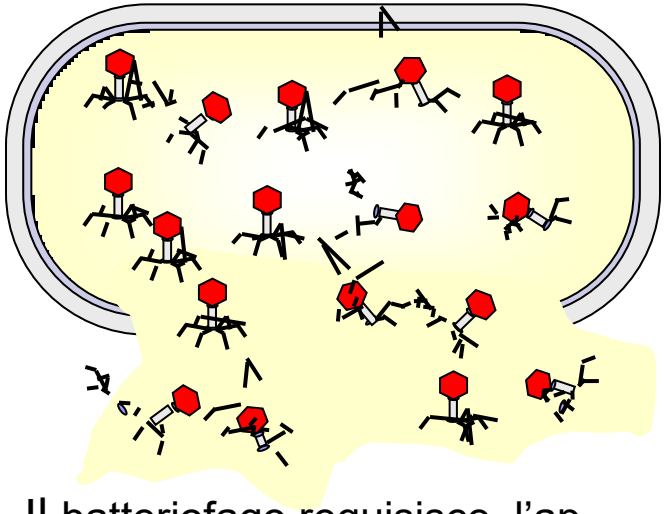


Batteriofagi temperati e lisogenia



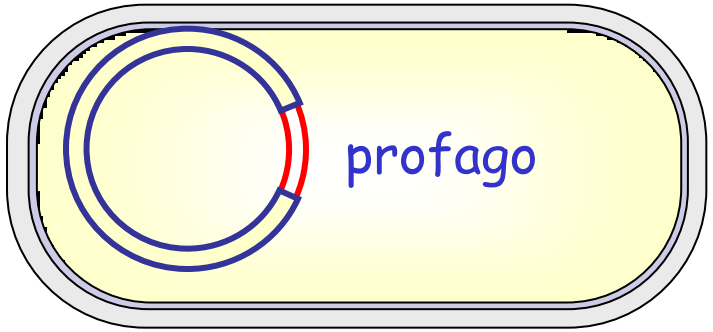
ciclo litico

ciclo lisogenico



Il batteriofago requisisce l'apparato sintetico della cellula

induzione



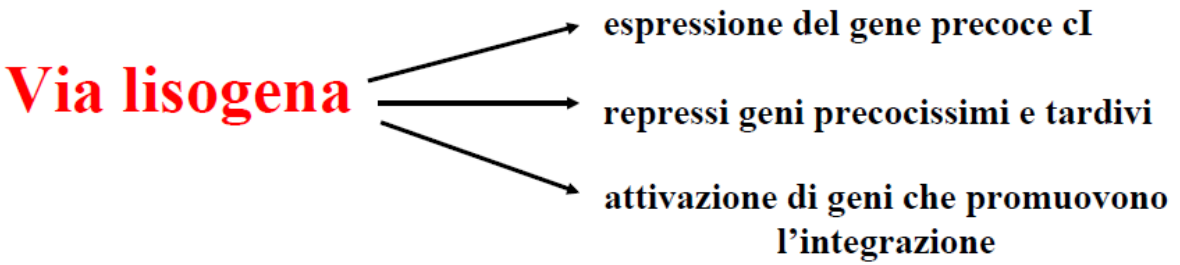
batterio lisogeno

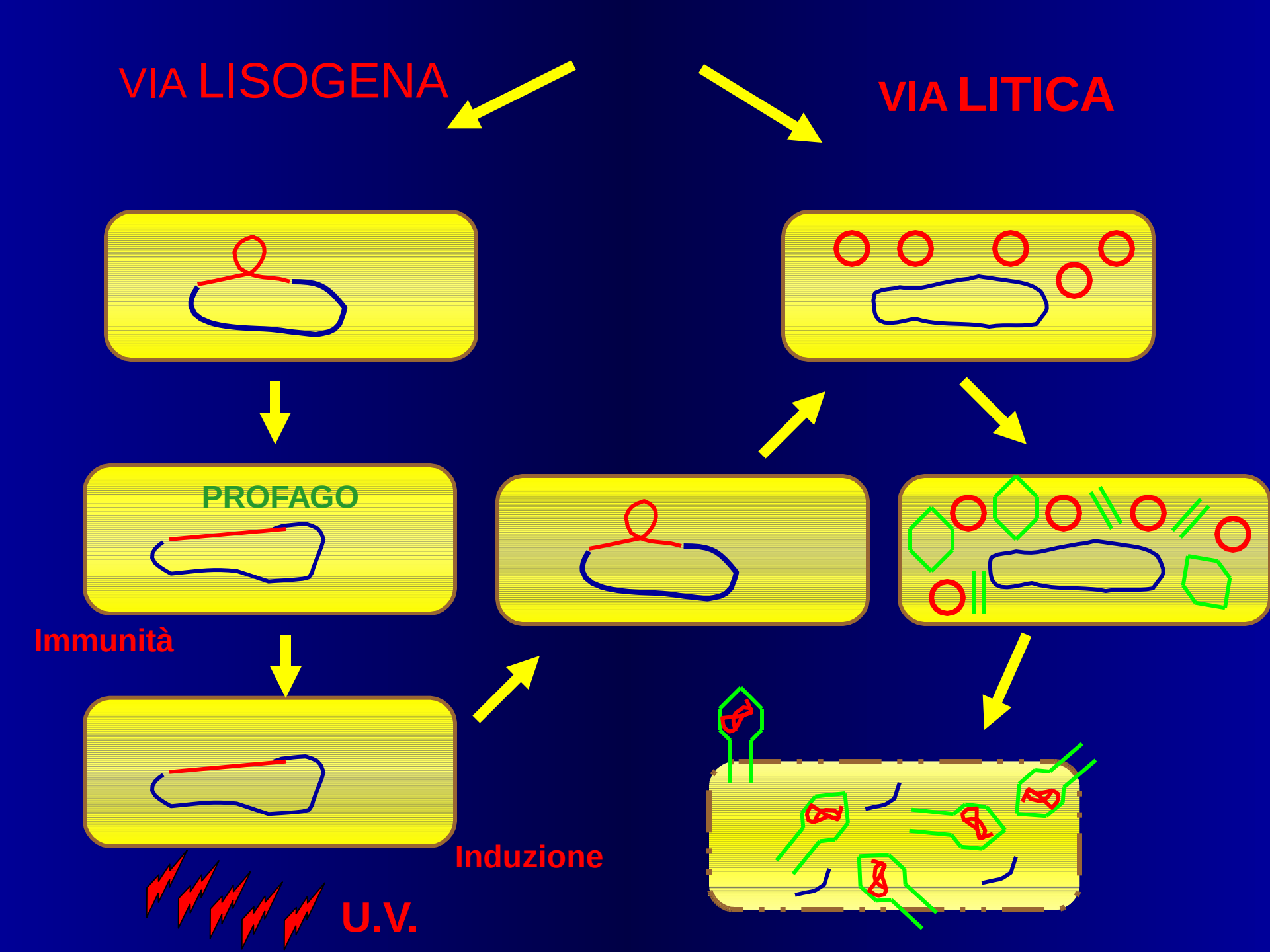
Il batteriofago si integra nel cromosoma batterico

DA CHE COSA DIPENDONO?

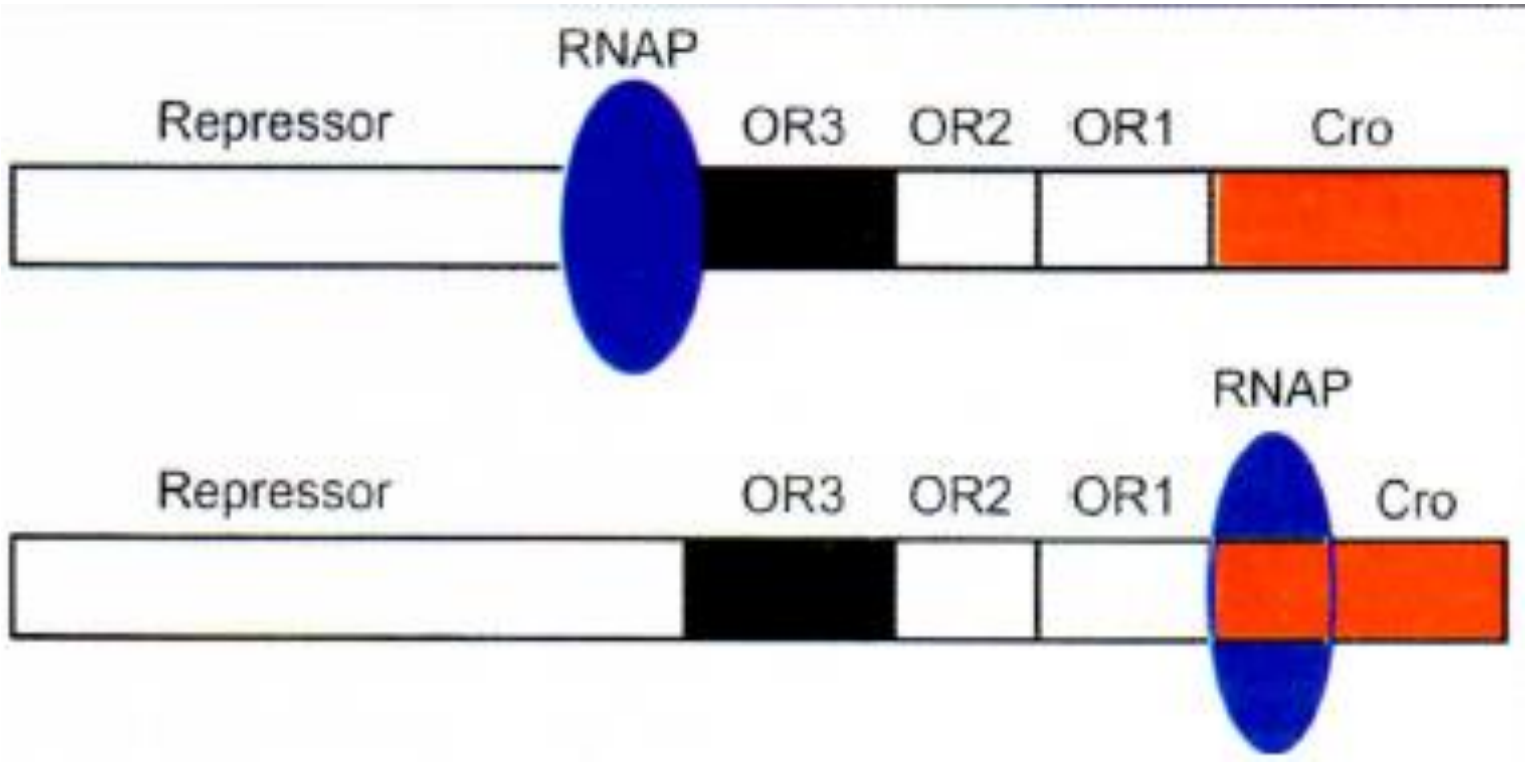
- **MOI = Molteplicità di infezione**
  - **se bassa** prevale il ciclo litico, perché vi sono molte cellule da infettare
  - **se alta** il ciclo lisogenico
- **Stato metabolico della cellula:**
  - **se buono** prevale il ciclo litico perché le sostanze nutritive sono elevate
  - **se carente** il ciclo lisogenico






VIA LISOGENA
VIA LITICA
PROFAGO
Immunità
Induzione
U.V.

Da cosa dipende il ciclo litica o lisogeno?



- Parte superiore, gene **repressore del fago lambda** is **"on",** mentre il **gene Cro è "off**". Il fago è nella fase dormiente

- Parte inferiore**, gene Cro gene è "on" e gene repressore è "off".**
  RNAP può ora trascrivere tutti i geni; Pertanto la fase litica è iniziata.
  RNAP = RNA polimerasi

Caratteristiche di un batterio lisogeno

- I batteri lisogeni hanno il DNA virale (profago) integrato nel loro cromosoma (nel caso del fago P1 il DNA provirale e libero nel citoplasma).

- Il DNA del profago viene duplicato insieme a quello dell'ospite e trasmesso da una generazione di batteri a quella successiva.

- All'interno di una popolazione di batteri lisogeni una piccola frazione (tra 10^{-3} e 10^{-6}) delle cellule produce virus e muore.

- Un batterio lisogeno per un fago è **immune** all'infezione con lo stesso fago. Rimane sensibile all'infezioni di fagi differenti. L'immunità è dovuta agli stessi sistemi regolativi virali che bloccano la via litica.

- In particolari condizioni quasi tutta la popolazione di batteri lisogeni può andare incontro a lisi e produrre nuovi fagi. Il fenomeno va sotto il nome **di induzione**.

- Un fago temperato può indurre cambiamenti fenotipici nel batterio. Tale cambiamento è **detto conversione lisogena**.

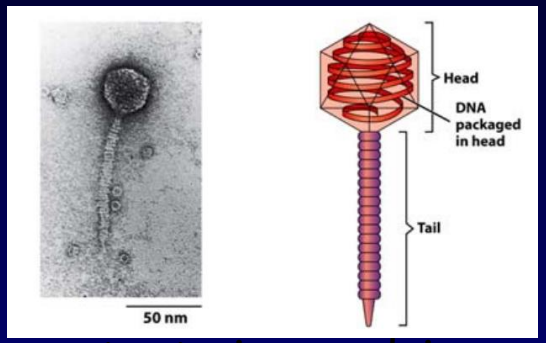
  Es.: il fago temperato b di *Corynebacterium diphteriae* produce la tossina responsabile della difterite

Perché la LISOGENIA?

Vantaggi ?

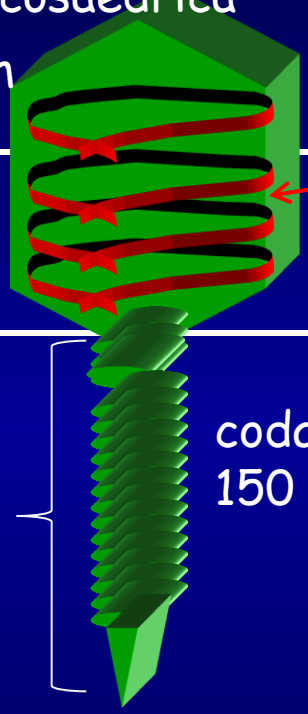
- **La lisogenia favorisce la persistenza e la diffusione di un virus più efficacemente della virulenza**

FAGO λ



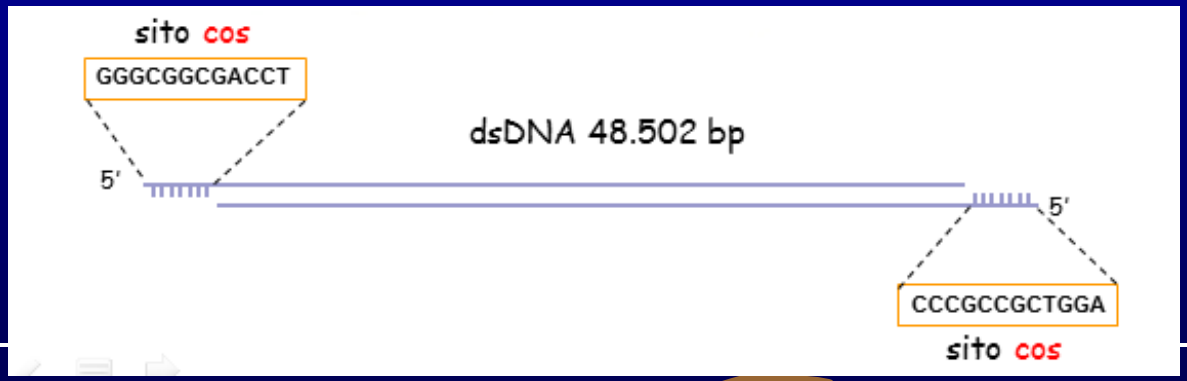
testa icosaedrica

testa icosaedrica
64 nm



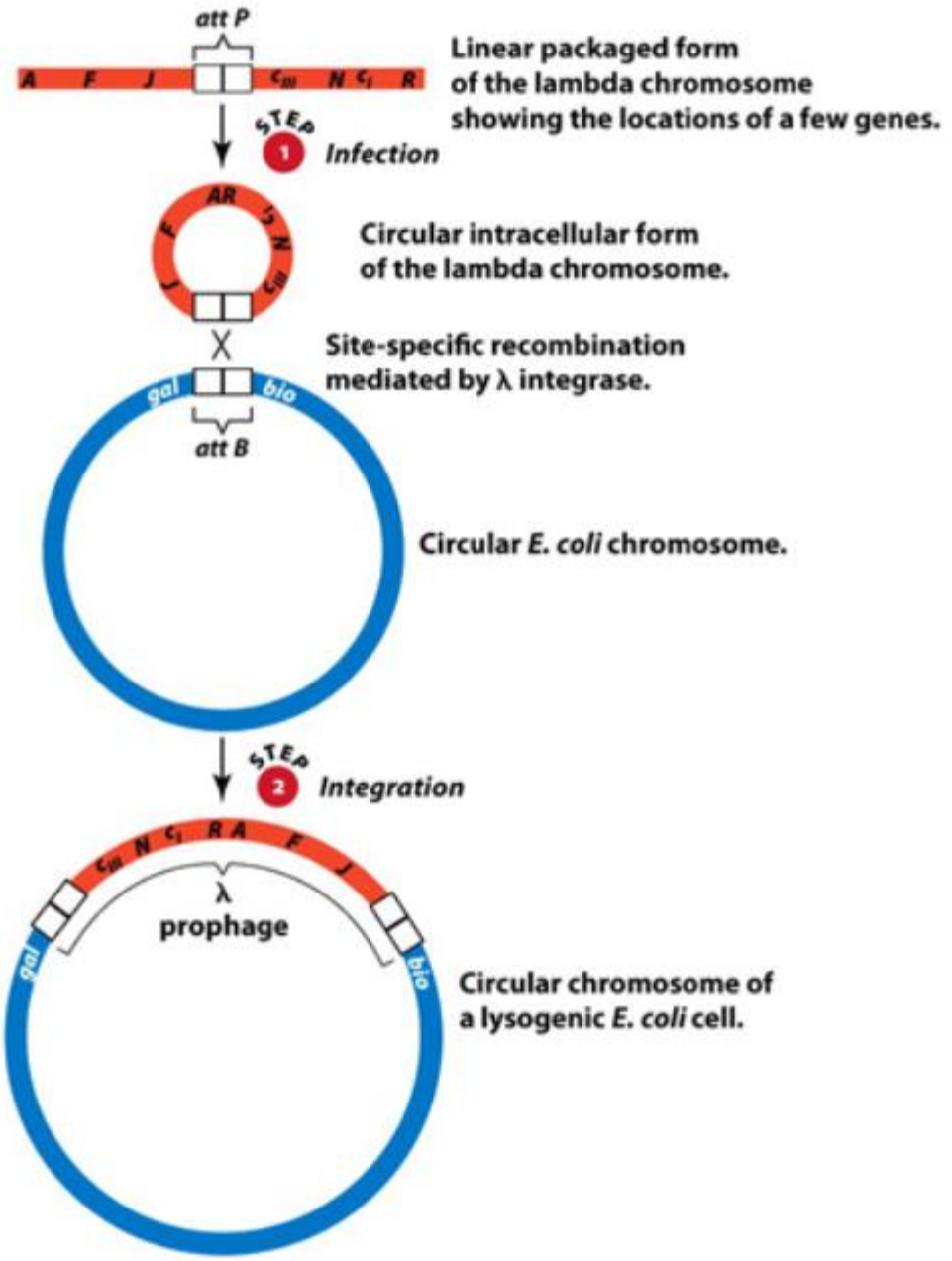
DNA a doppia elica lineare
dsDNA 48.502 bp

coda non contrattile
150 nm

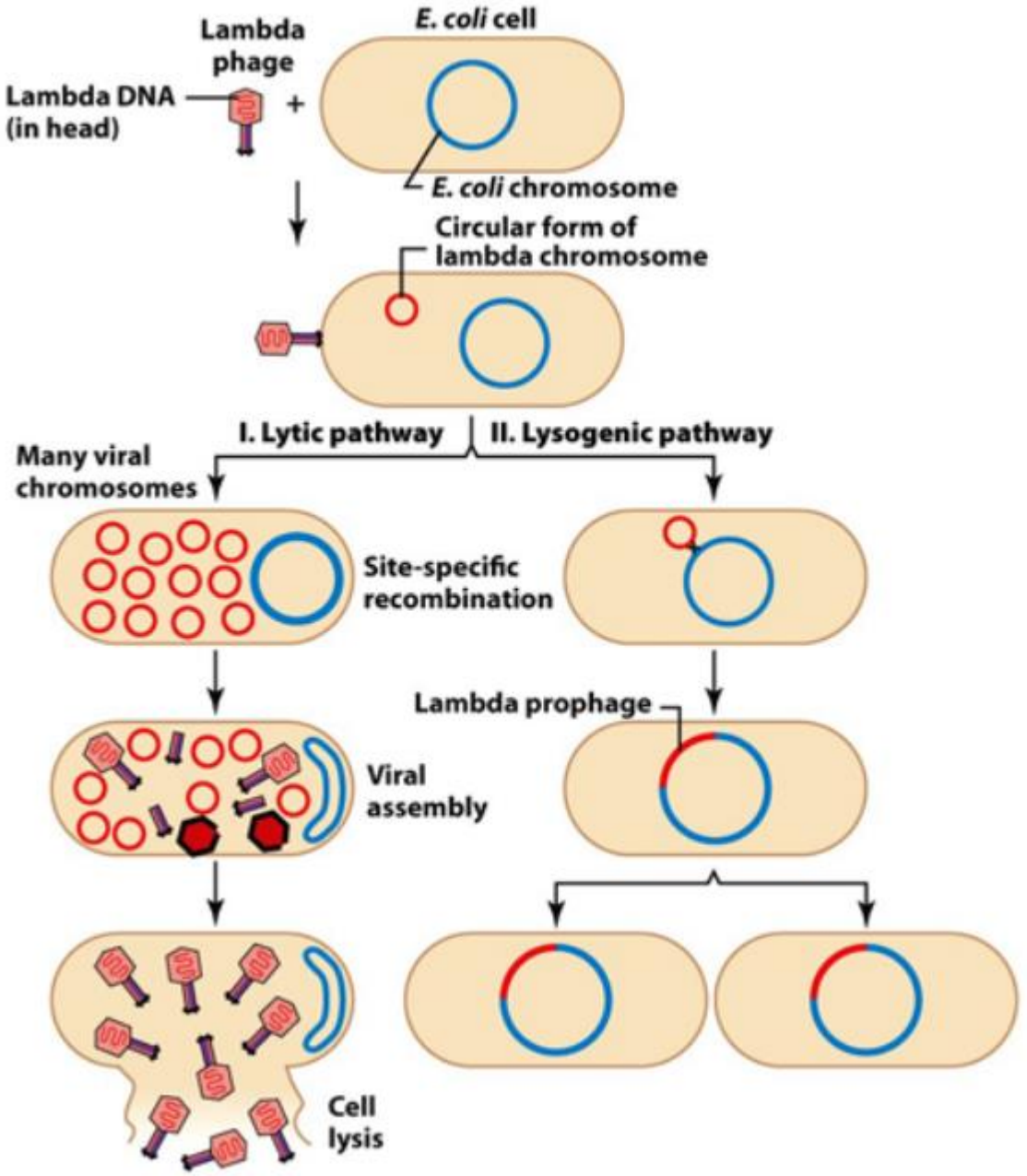


Escherichia coli

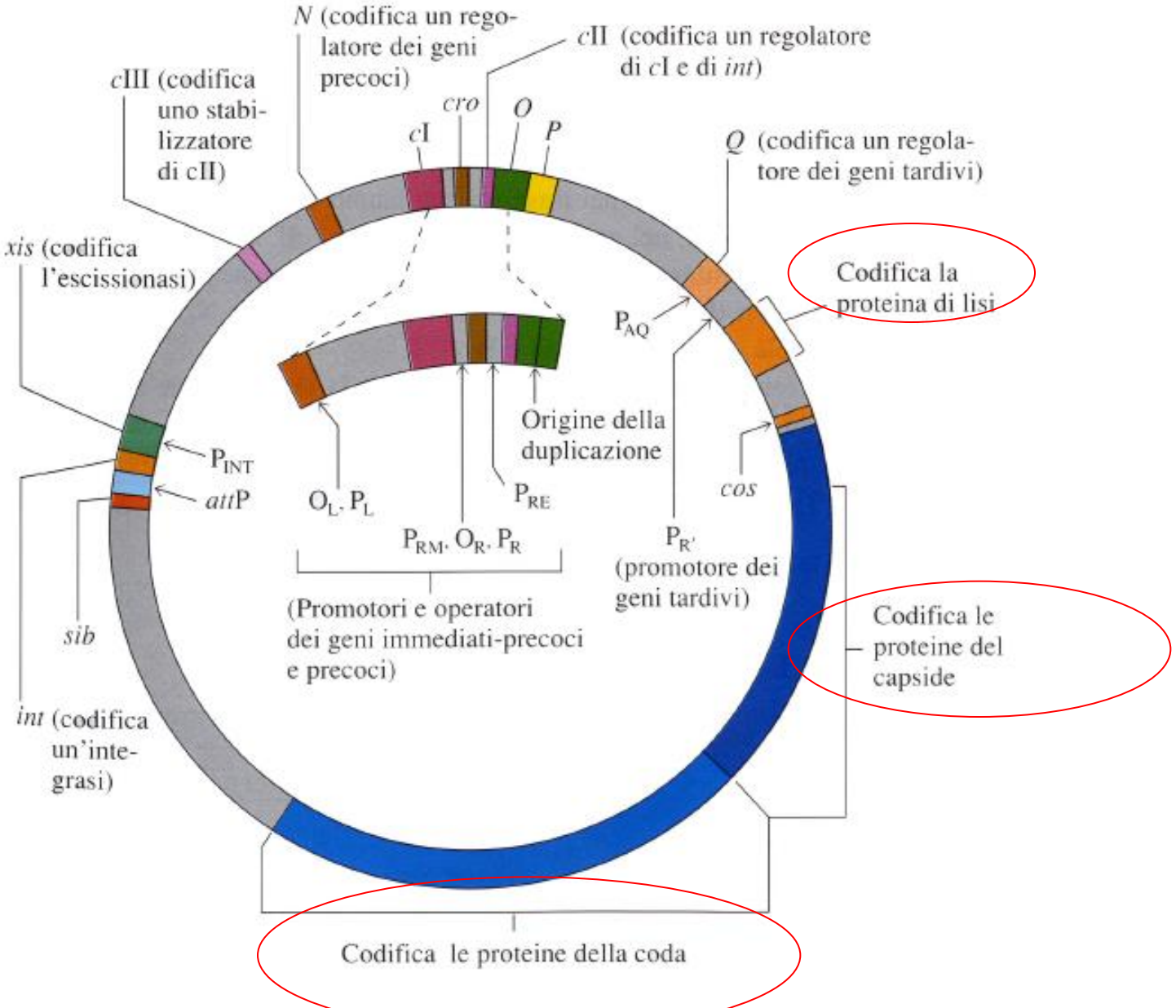
Integrazione di molecule del DNA di lambda entro il cromosome di E. coli.



Il ciclo vitale del batteriofago lambda con le vie ltica e lisogenica



Organizzazione del genoma

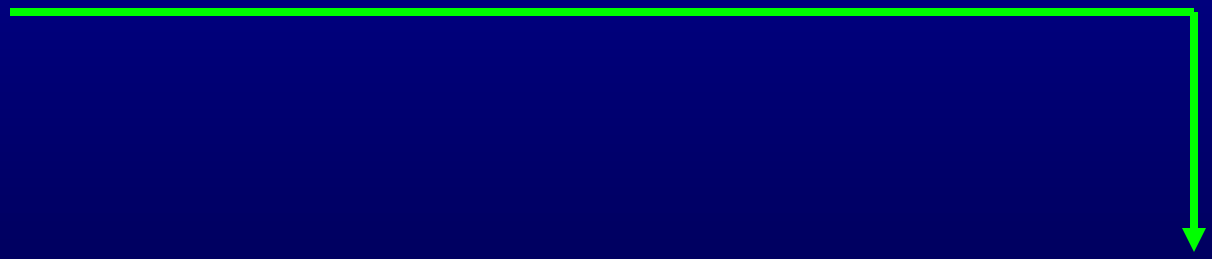



Geni PRECOCI
IMMEDIATI
cro
inibisce
cI
repressore
N
antiterminatore
attivano
cII e cIII
Geni PRECOCI
RITARDATI
7 geni RICOMBINAZIONE
2 geni REPLICAZIONE
Q antiterminatore
Geni TARDIVI
10 geni TESTA
11 geni CODA
2 geni LISI

Mutanti cI → Placche chiare → via litica

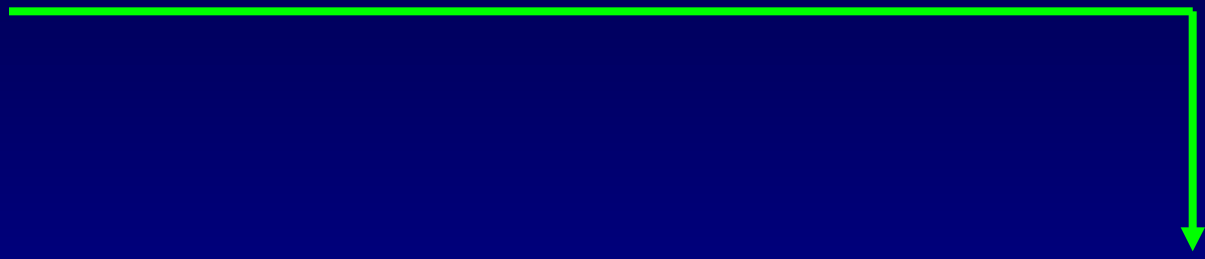
Mutanti cro → Placche torbide → via lisogena

cI necessario per l'instaurarsi della



via lisogena

cro necessario per l'instaurarsi della



via litica

Genetica dei batteriofagi

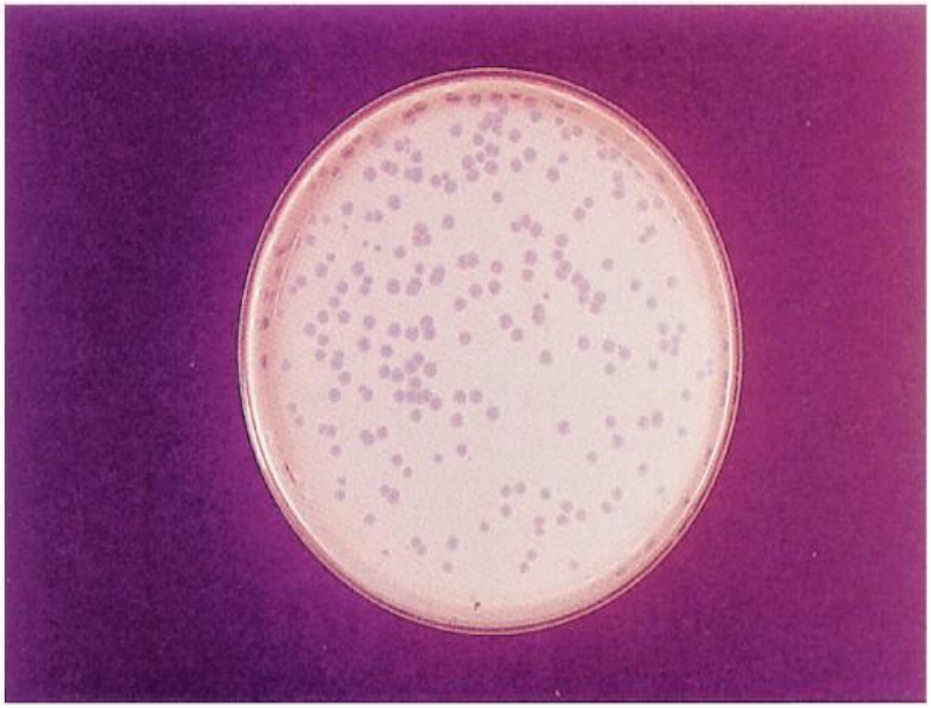
- **I virus possono essere usati nell'analisi genetica in due modi:**

1. **Si possono incrociare due fenotipi fagici diversi per**
   - **misurare la ricombinazione**
   - **e quindi mappare il genoma virale**

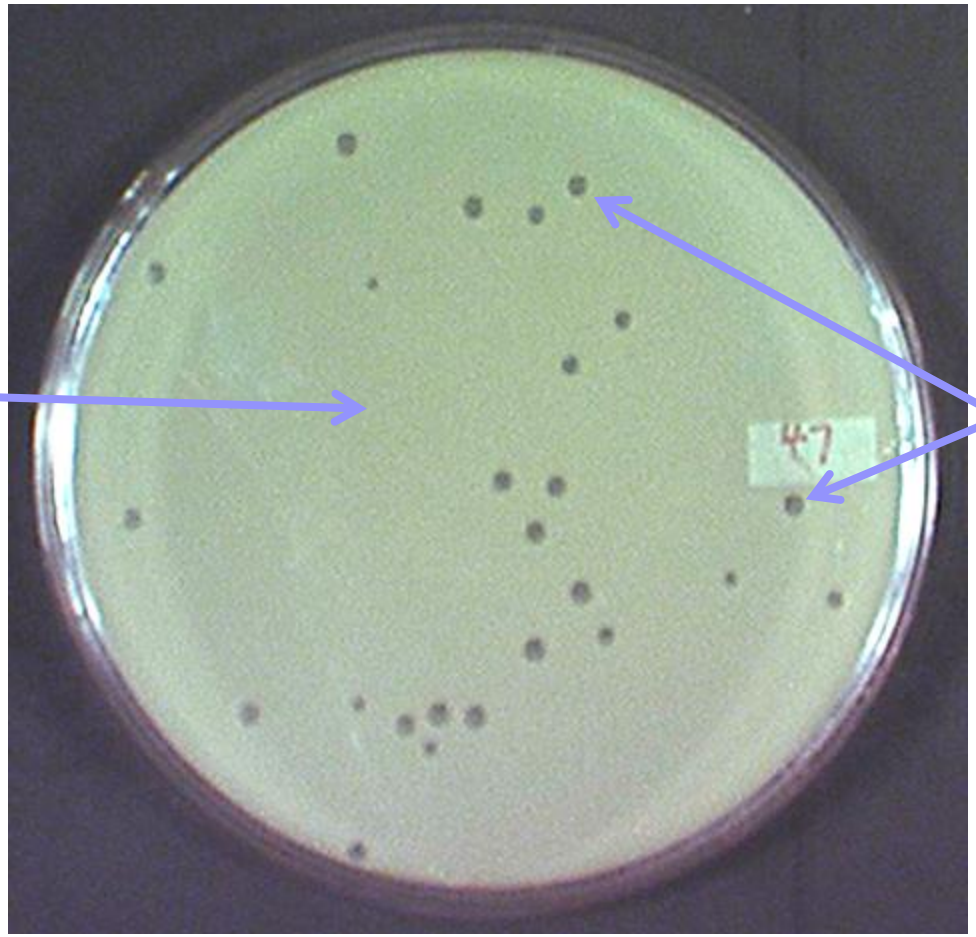
2. **Si usano i batteriofagi come mezzo per mettere insieme geni batterici per l'analisi di associazione**

Fenotipi fagici

- **Forma placche di lisi**: grande o piccola, liscia o frastagliata, ecc)
- **specificità d'ospite:** ceppo batterico che un fago è in grado di lisare)



Mappe genetiche nei batteriofagi



Il prato batterico

Fenotipi fagici:
lisi rapida, lisi lenta
rII ***r*⁺**

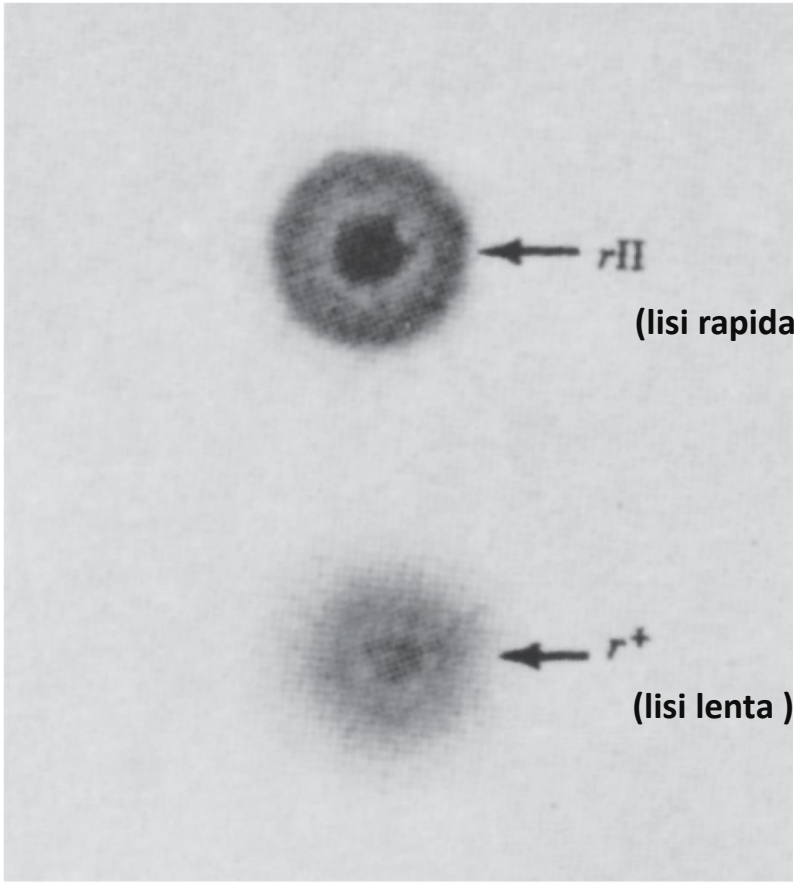
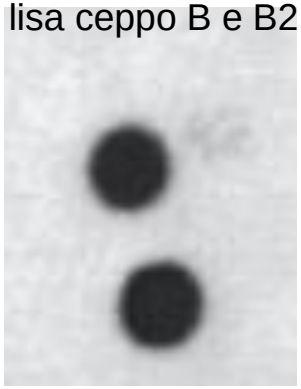


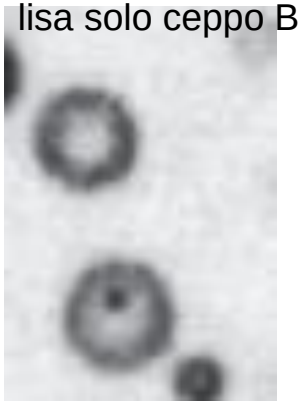
Figura 15.17

In un prato batterico con cellule di *E. coli* dei ceppi B e B/2,

Placca limpida
h
lisa ceppo B e B2



placca torbida
***h*⁺**
lisa solo ceppo B



- I fagi *h* formano placche chiare
- solo i virus di ceppo *h* **riescono a lisarle entrambe,**

- gli h^+ possono infettare **solo cellule di ceppo B**
- batteri B2 crescono nelle placche provocando torbidità delle placche

Mappe in fagi

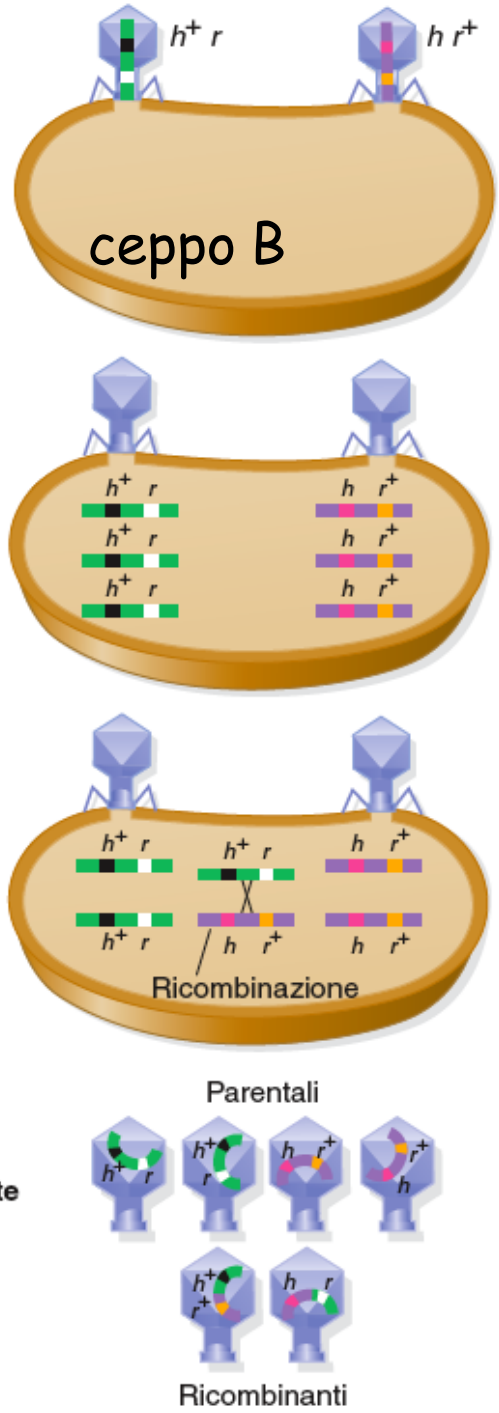
❑ **Esperimenti di infezioni miste (fagi T2) hanno mostrato la presenza di ricombinazione genica in batteriofagi.**

- h^+ lisa il ceppo B di *coli* ma non il ceppo B/2
- h lisa sia il ceppo B che il B/2
- r^+ placche piccole con margini indistinti
- r^- placche grandi con margini netti

➢ quando fagi h^+ crescono su uno strato misto di cellule B e B/2 formano placche torbide perchè lisano solo B

➢ i batteri B/2 crescono nelle placche provocando torbidità delle placche

➢ I fagi *h* formano invece placche chiare



Figura

Il lisato si piastra su una miscela di ceppi B e B/2

- **Placche prodotte dalla progenie di un incrocio tra ceppi T2**

  h r⁺ x h⁺ r.

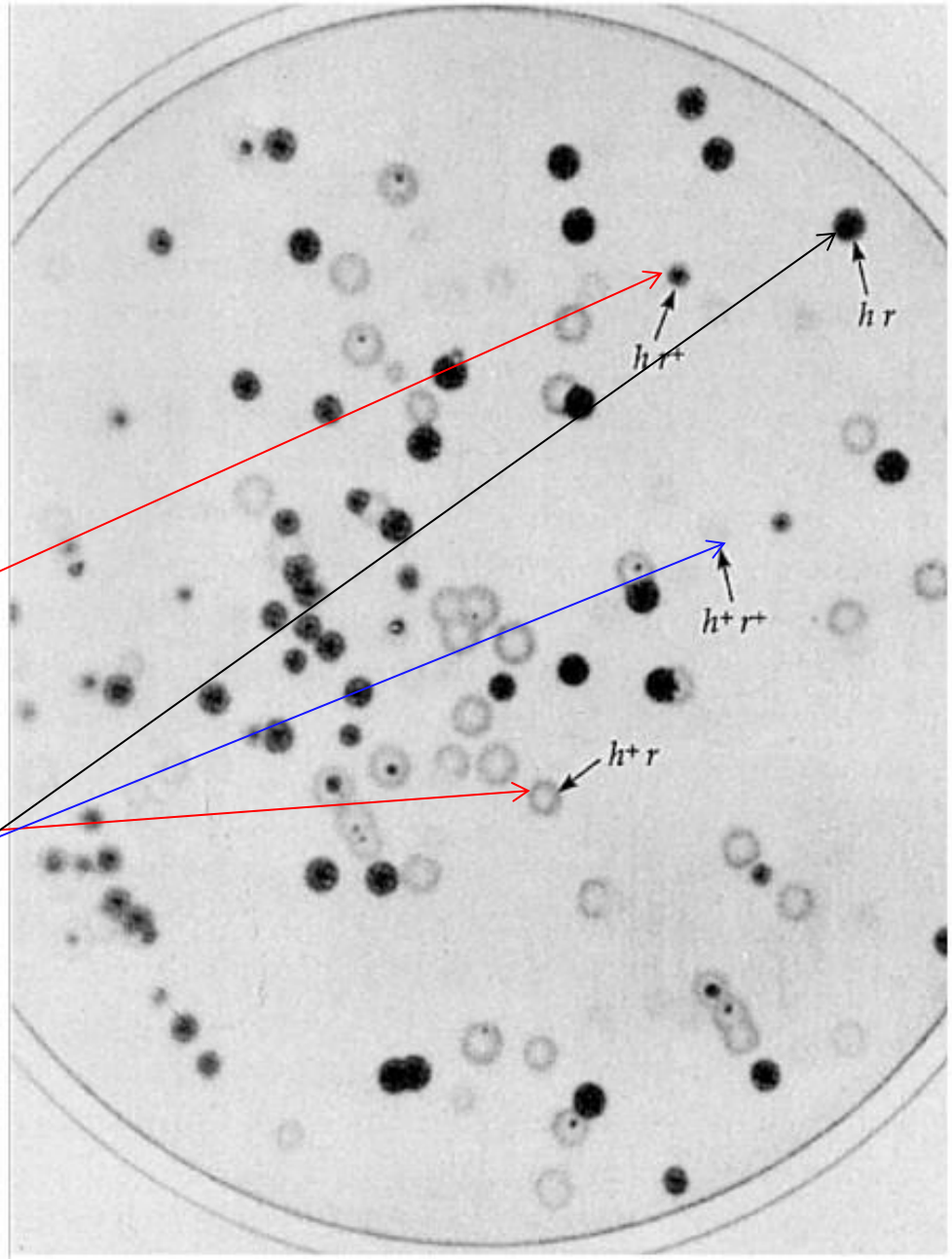
- Possono essere distinte quattro diverse morfologie di placca, due di tipo parentale e due di tipo ricombinante
  - **parentali:** **h r⁺ , h⁺ r**
- **ricombinanti:** **h r , h⁺ r⁺**

- Il fago parentale ***h r+*** *:* produce placche piccole, chiare e con margini indistinti;

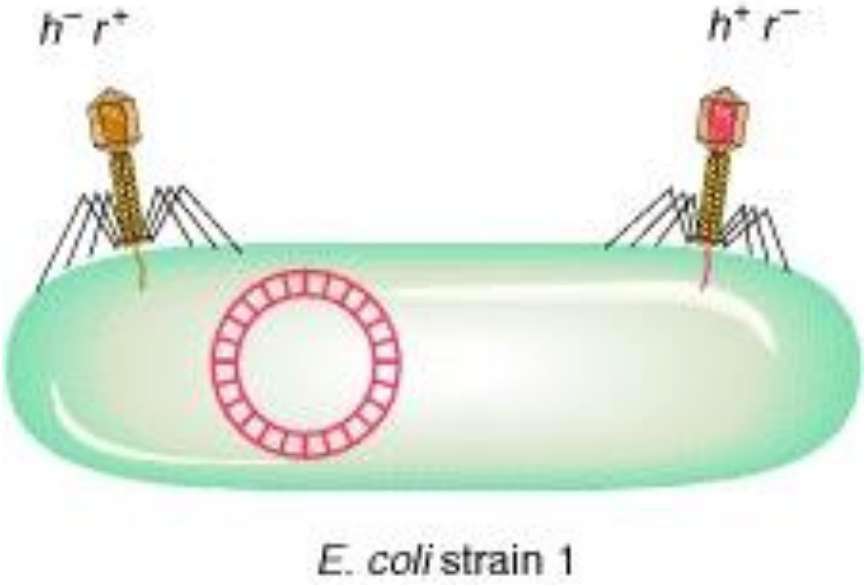
- l'altro parentale ***h+ r*** produce placche grandi, torbide con margini netti.

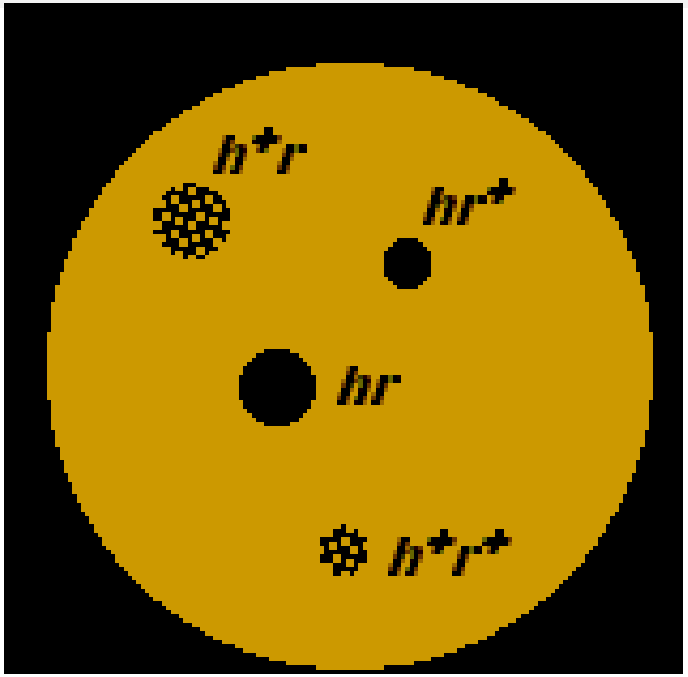
- Il ricombinante . ***h+ r+*** produce placche piccole, torbide con margini indistinti

-il ricombinante ***h r*** produce placche grandi, chiare con margini netti.



Stima della distanza fra due loci in fago T2: Doppia infezione di *E. coli* con diversi ceppi fagici





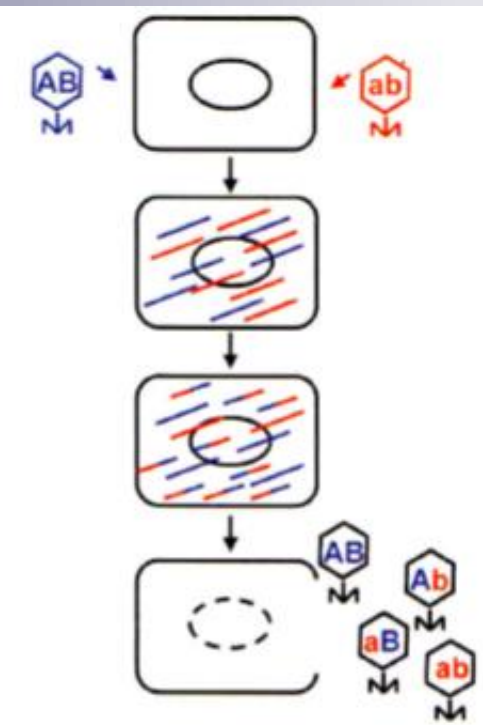
Distanza fra loci = NR / (NR + NP) = $\dfrac{N(h^+ r^+) + N(h\, r)}{N(h^+ r^+) + N(h\, r) + N(h^+ r) + N(h\, r^+)}$

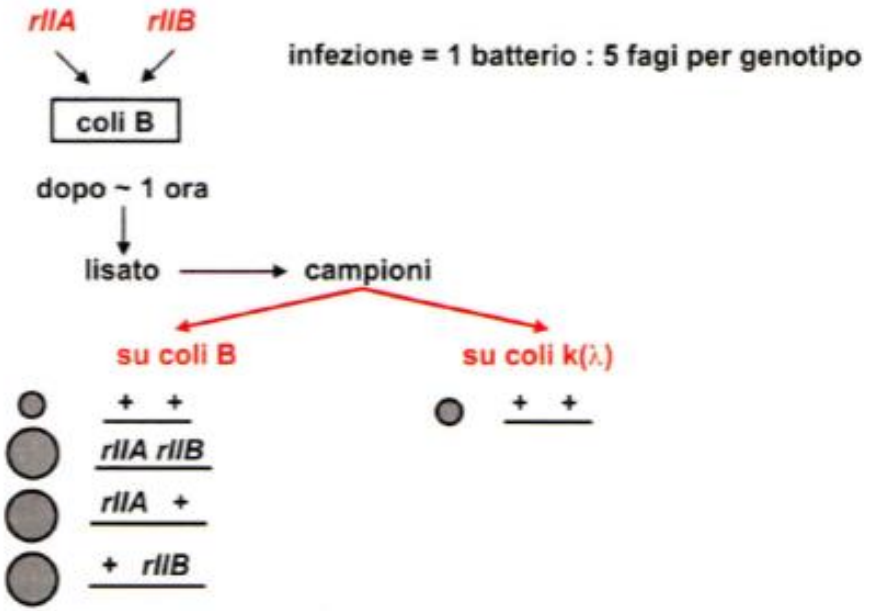
Frequenza di ricombinazione tra *h* ed *r*

$$= \frac{\text{Placche } (h^+ r^+) + (h\ r)}{\text{placche totali}} \times 100$$

Ricombinazione nei fagi

Freq.di ricombinazione tra *rIIA* e *rIIB* di T4



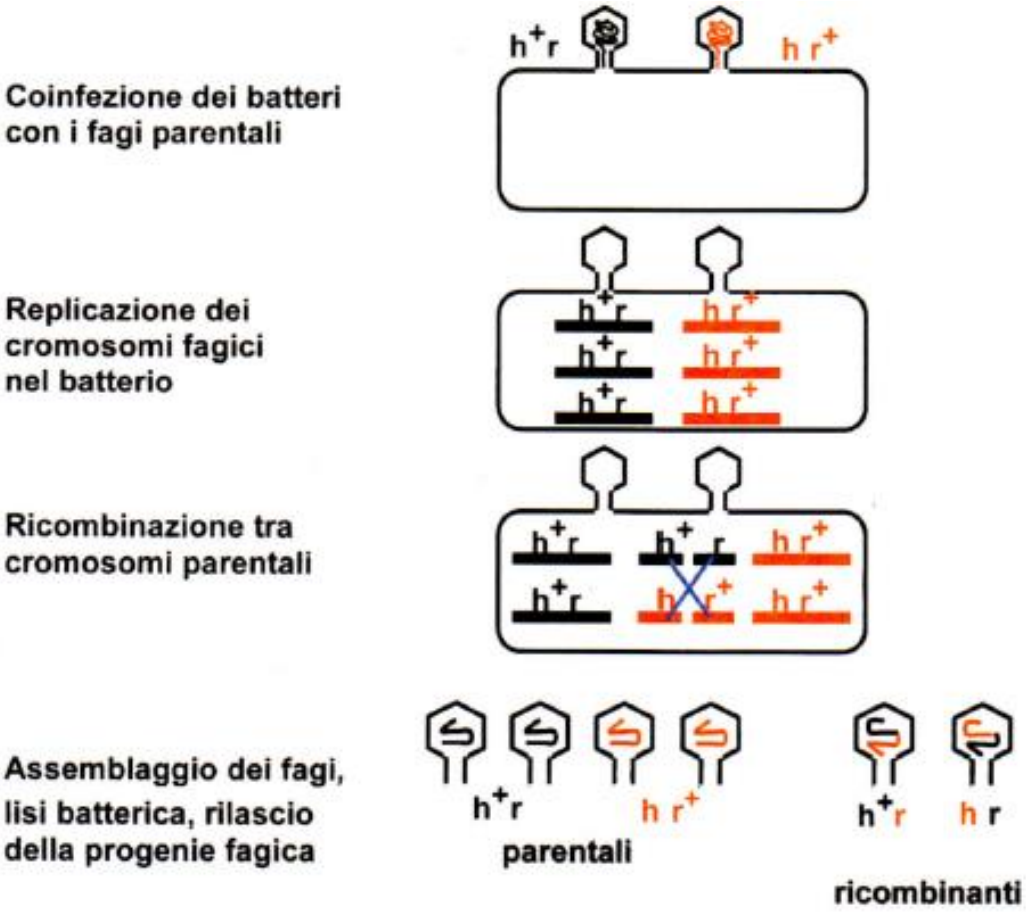


Determinazione della frequenza di ricombinazione tra *h* e *r*

Calcolo :

$$RF = \frac{(h^+r^+) + (h^- r^-)}{\text{n°totale placche}}$$

La **RF rappresenta** un valido i**ndic**e della distanza di mappa nei fagi



	Fenotipo	Genotipo	N placche	Progenie
P		$h\ r^+$	42	P = 76%
		h^+r	34	
R		h^+r^+	12	R = 24%
		$h\ r$	12	

Riassunto

- I virus sono **parassiti obbligati che** possono riprodursi soltanto infettando cellule ospiti vive.
- I batteriofagi sono virus che infettano i batteri.
- Il batteriofago T4 è un fago litico che infetta *E. coli*, si riproduce e lisa la cellula ospite.
- Il batteriofago lambda (λ) può seguire una via litica, come T4, oppure può seguire la via lisogenica, durante la quale il suo cromosoma si integra nel cromosoma del batterio.
- Quando è integrato, il cromosoma di λ è chiamato profago e i geni litici vengono mantenuti inattivi.
- Il fago T4 ha una mappa genetica circolare, ma un cromosoma lineare.
- La mappa circolare viene prodotta perché i cromosomi di T4 sono ridondanti terminalmente e permutati circolarmente.



Thanks for listening