



I VIRUS

SCOPERTA DEI VIRUS

- Verso la fine del 1800, i botanici stavano cercando la causa del mosaico del tabacco, una malattia in grado di arrestare la crescita della pianta del tabacco e di conferire alle foglie un aspetto punteggiato a mosaico.
- Il botanico olandese Beijerinck scoprì nel 1898 che l'agente che lo causava possedeva molte delle caratteristiche degli esseri viventi ma in grado di riprodursi solo all'interno di una cellula vivente
- lo denominarono virus (parola che in latino significa *veleno*).
- Negli anni '30 il microscopio elettronico ha permesso di vedere i virus per la prima volta.
- La maggior parte dei virus che infettano animali, piante e batteri sono stati identificati durante la II metà di XX secolo



Le aree gialle corrispondono a cellule morte, uccise dal virus del mosaico.

Viral Timeline

1911

Retroviruses discovered
(RSV)

1953

Adenovirus
discovered

1965

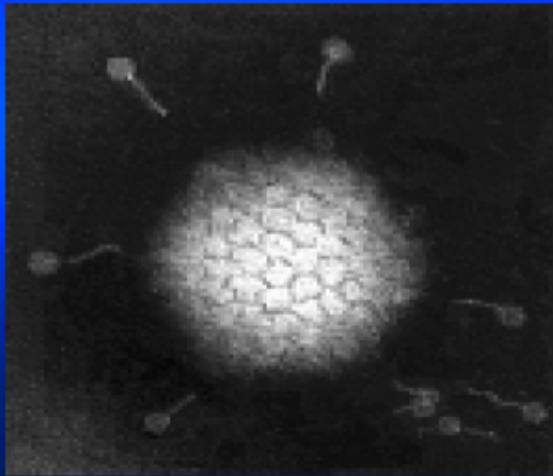
Adeno-associated
Virus (AAV) discovered

1969

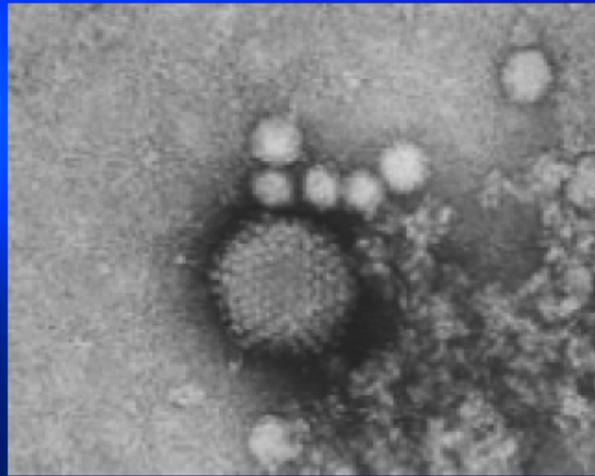
Viral Oncogene
Hypothesis Proposed

1981

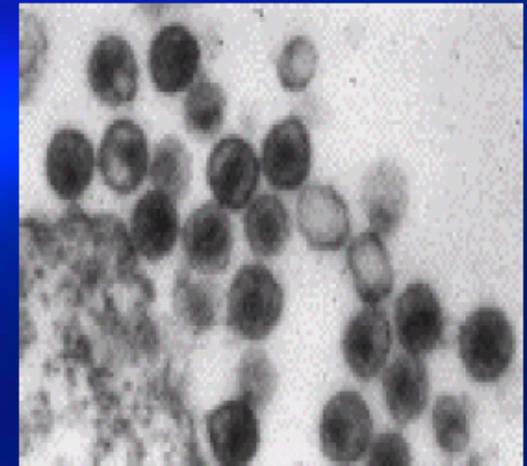
T-cell leukemia retrovirus
and HIV discovered



Adenovirus

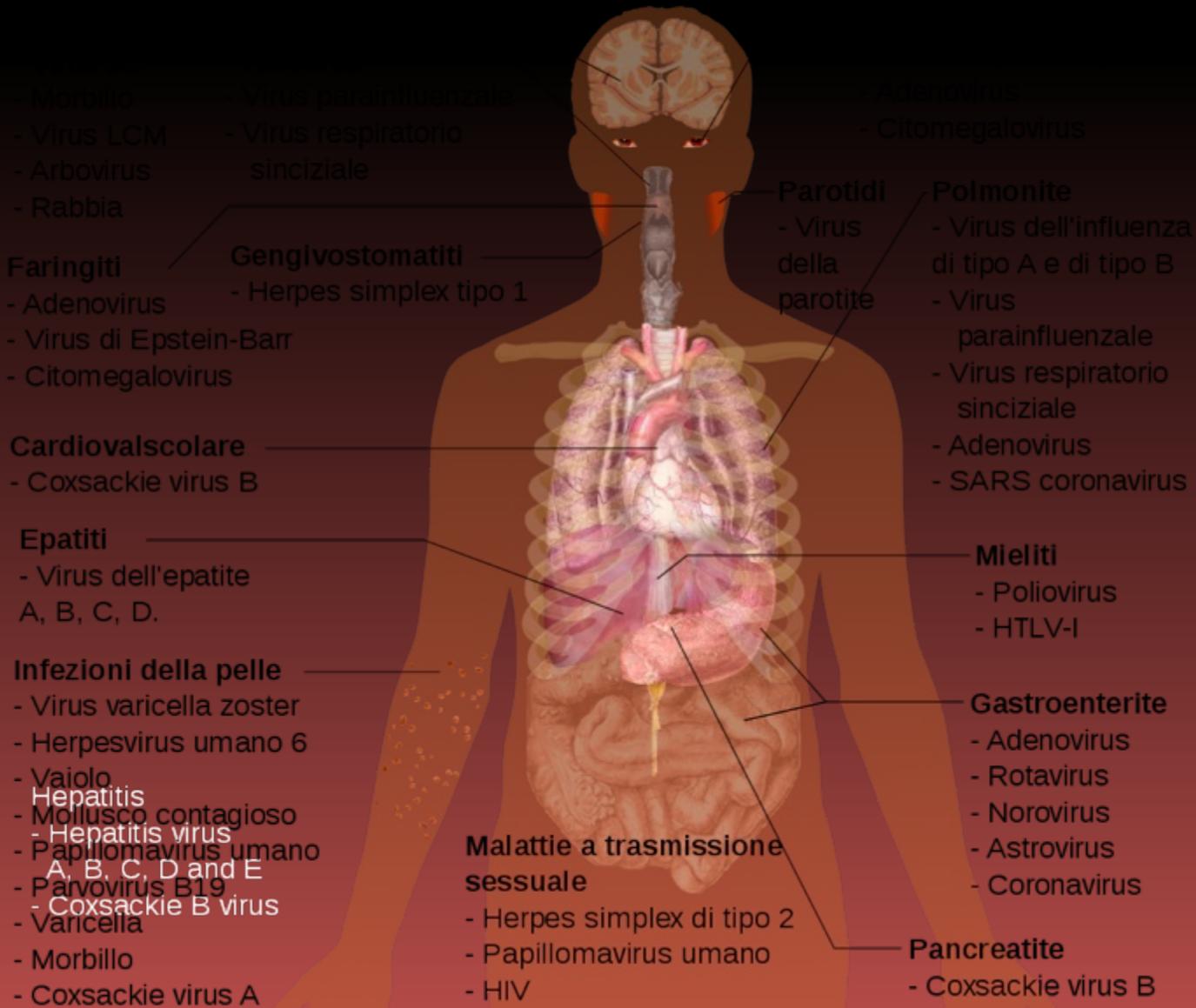


Adenovirus and Adeno-Associated
Virus



Human Immunodeficiency
Virus



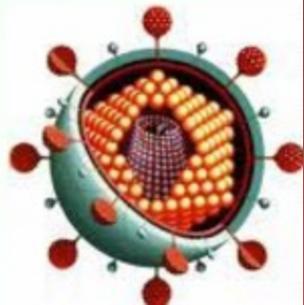


Virus: proprietà distintive

- Agenti patogeni in grado di infettare cellule animali, vegetali e batteriche.
- Le particelle virali complete, **virioni**, sono caratterizzate da dimensioni estremamente modeste: **10-300 nm**.
- Sono definiti **parassiti endocellulari obbligati** perché possono replicarsi soltanto all'interno di cellule viventi: essi non sono in grado di produrre e di immagazzinare energia né di provvedere alla replicazione delle proprie unità costitutive.

Sono caratterizzati da una semplicità di organizzazione strutturale.

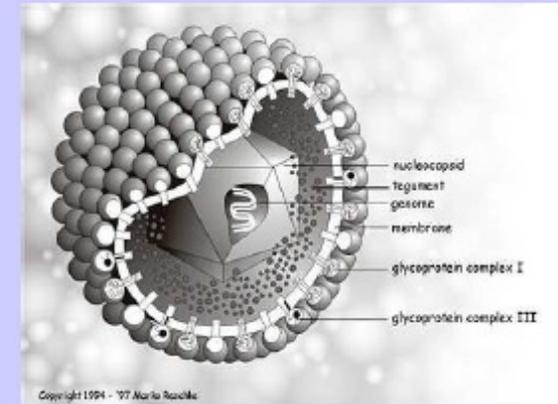
Possiedono particolari modalità di replicazione.



Struttura del virione

Nucleocapside

- Genoma
 - Una o poche molecole di acido nucleico (DNA oppure RNA) ad organizzazione lineare, circolare, doppia/singola elica, segmentata
- Capside (core)
 - Involucro proteico che circonda il genoma, generalmente composto da subunità proteiche chiamate capsomeri
- Peplos (pericapside, envelope)
 - Composta da fosfolipidi e glicoproteine; generalmente deriva dalle membrane della cellula ospite attraverso un processo di “gemmazione”. Lo spazio compreso tra il peplos ed il capside è di solito occupato da proteine virus-specifiche (tegumento o matrice virale)



VIRUS DIFETTIVI

Virus incapaci di replicazione autonoma

Si replicano in presenza del virus di tipo selvaggio (virus helper)

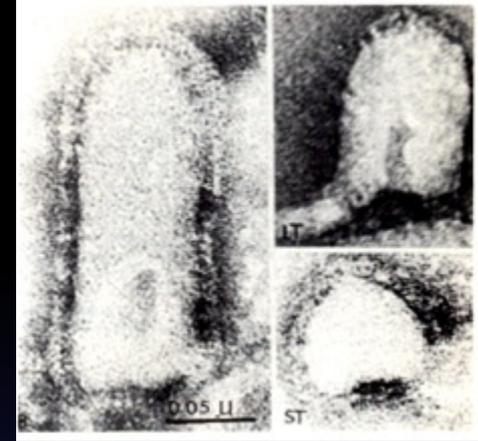
Complementazione tra virus difettivi

- Virus adeno-associati (*Parvoviridae*): DNA_{ss} codifica per poche proteine, si replica solo in presenza di Adenovirus o Herpesvirus
- Virus dell'epatite δ - il genoma a RNA codifica per 1 sola proteina; si replica solo in presenza del virus dell'epatite B

VIRUS SATELLITI

Virus difettivi che non hanno un virus selvaggio correlato

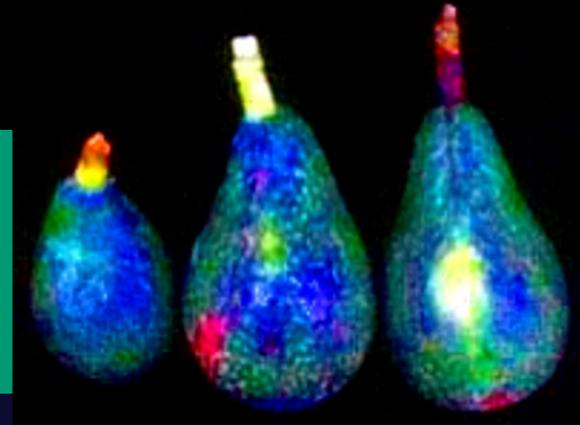
Sono presenti solo in cellule infettate da altri virus (virus helper)



VIROIDI

Malattie delle **PIANTE***

RNA circolare nudo (250 - 400 nt)
con struttura secondaria complessa



Replicano nel nucleo (nucleolo), inibiti da α -amanitina (RNA Pol II)

Non codificano per alcuna proteina

* Patate, agrumi, pesca, pomodori, avocado, palma da cocco (cadang-cadang, 4)
Meccanismo patogenetico ignoto

VIRUSOIDI

Satelliti di alcuni virus delle piante
genoma simile ai viroidi.

Replicano solo in presenza di virus helper

- Isomero conformazionale di una glicoproteina normalmente espressa
- Agente infettivo è una proteina: privo di acidi nucleici
- PrP glicoproteina idrofobica di 28 kDa
- Espressa costituzionalmente nel SNC, viene degradata da proteasi.

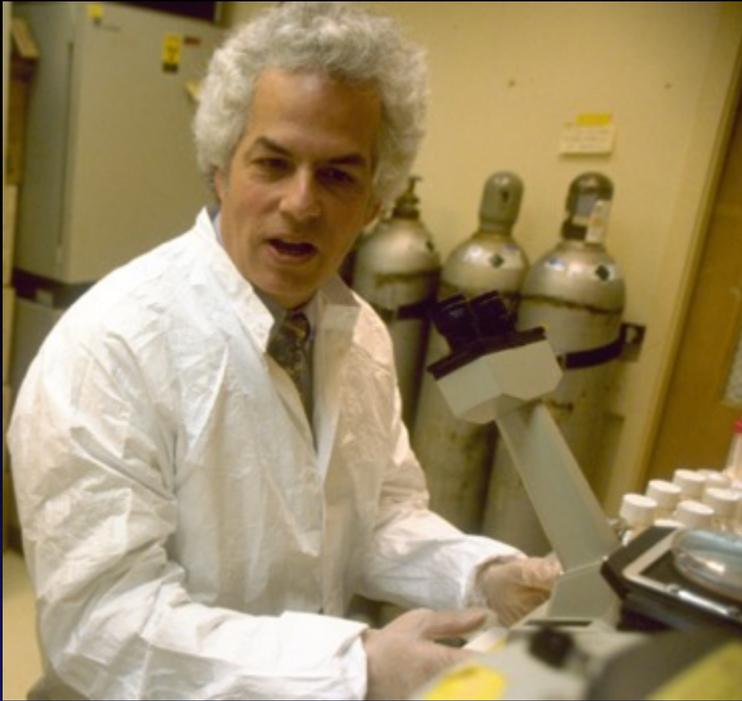
La forma patogena della proteina è:

- **resistente alla degradazione proteolitica.**
- **in grado di convertire la forma “sana” in patogena**

dell'individuo, ci fossero agenti infettivi privi di acidi nucleici costituiti soltanto da proteine (da qui ipotesi Protein-only).

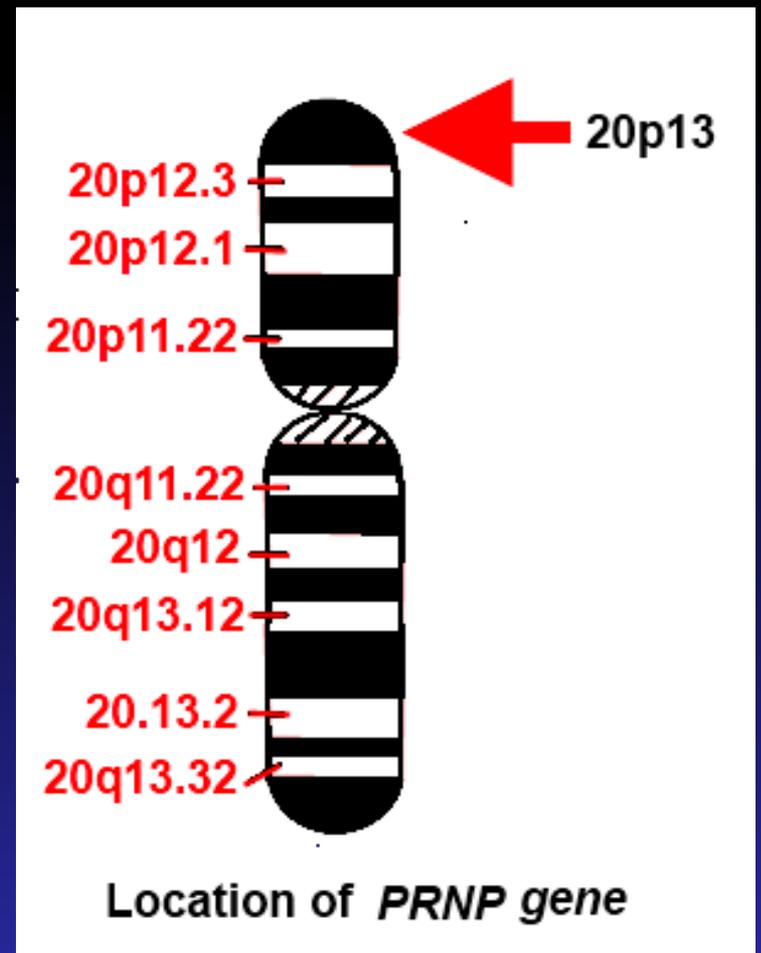
L'isolamento di questi agenti infettivi avvenne per opera di Stanley B. Prusiner, ricercatore statunitense nel campo delle “neuropatologie spongiformi” che coniò il termine Prion (PRoteinaceous Infective ONly particle).

Inizialmente gli scienziati ritenevano che le neuropatologie spongiformi, malattie nervose degenerative caratterizzate dall'aspetto spugnoso di cervello e gruppi di neuroni con presenza di placche amiloidi, fossero causate da virini (acidi nucleici avvolto o associato ad una proteina) o da viroidi (virus costituito esclusivamente da un frammento di RNA).



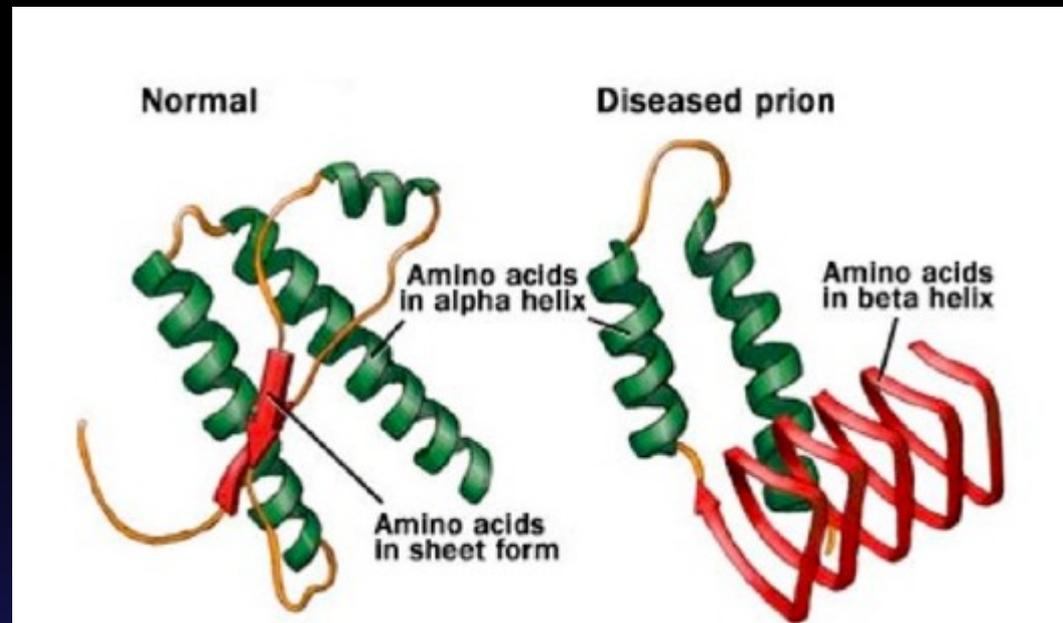
Prusiner interessatosi al caso della scrapie (neuropatia spongiforme degli ovini), nel 1982 riuscì a dimostrare che l'agente di tale neuropatia fosse di origine esclusivamente proteica e nel 1984 dimostrò che il gene della proteina prionica era presente nel genoma di tutti i mammiferi uomo compreso.

Il gene della proteina prionica è situato sul braccio *p* del cromosoma 20



soprattutto nei tessuti nervosi, è probabilmente coinvolta nel trasporto di ioni (quali rame) e nei processi di segnalazione cellulare o nella formazione di sinapsi.

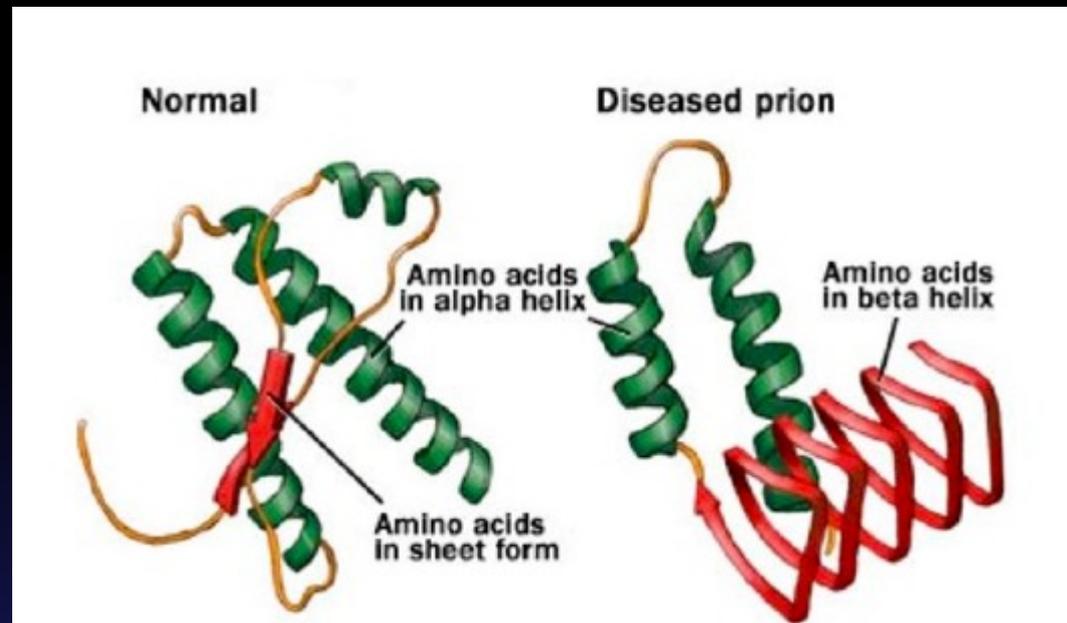
Nella proteina normale sono presenti più sequenze α -elica che sequenze foglietto β .



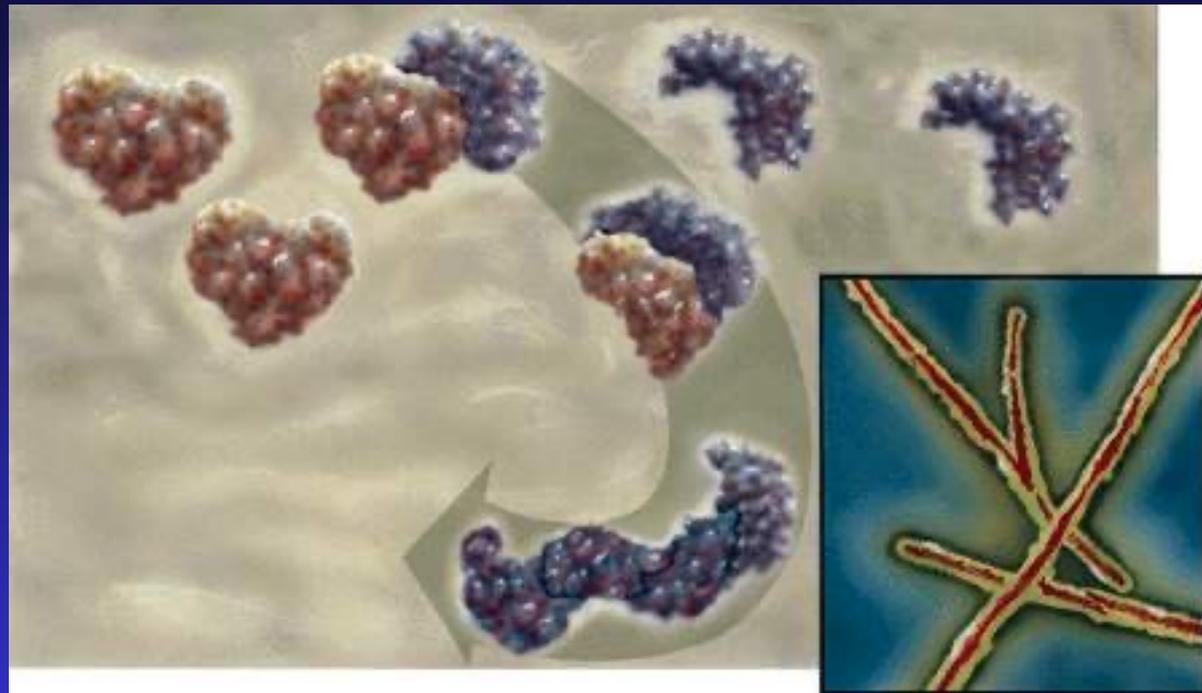
scrapie), il maggior numero di aminoacidi presente la struttura a foglietto β .

La proteina assume facilmente questa conformazione poiché più rilassata.

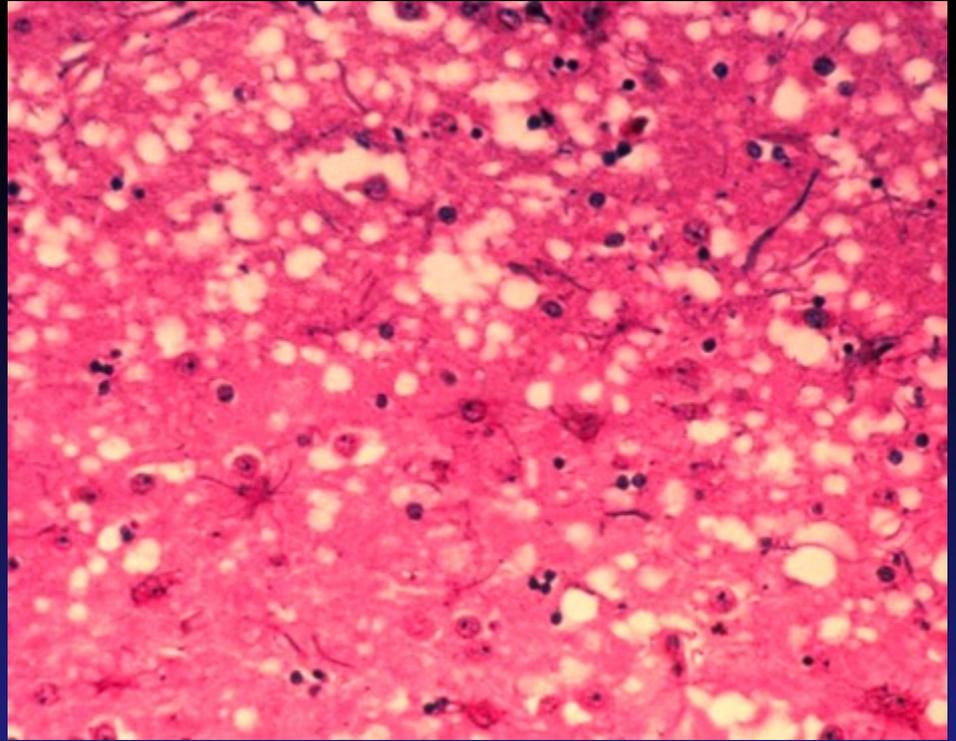
La struttura con prevalenza di sequenze a foglietto β , oltre ad essere nociva per l'organismo, è di gran lunga più resistente alle proteasi dunque meno degradabile.



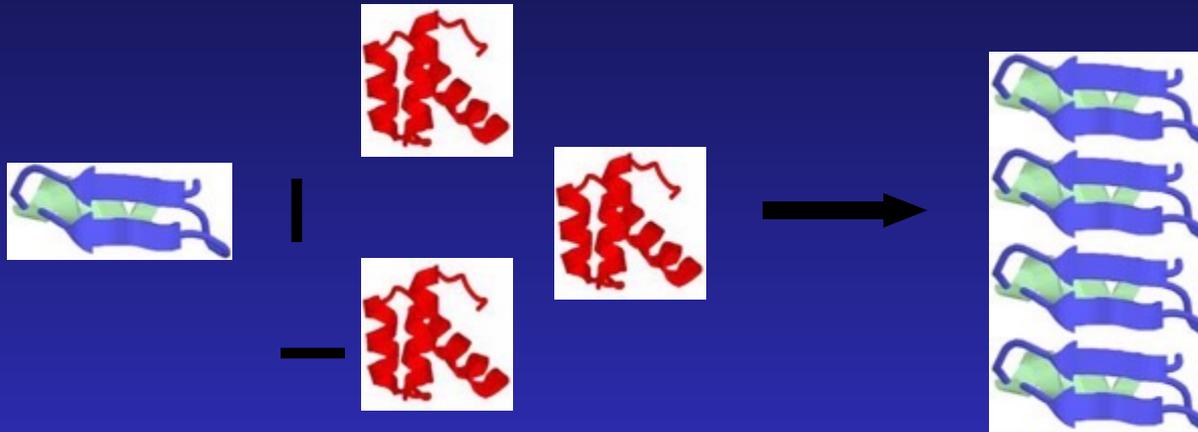
induce irreversibilmente la seconda, facendone assumere la sua stessa conformazione.



feed-back positivo. A causa della loro elevata resistenza alle proteasi, si accumulano nei tessuti nervosi, formando placche amiloidi e provocando la morte delle cellule. Questo fenomeno causa il tipico aspetto spongiforme del cervello.



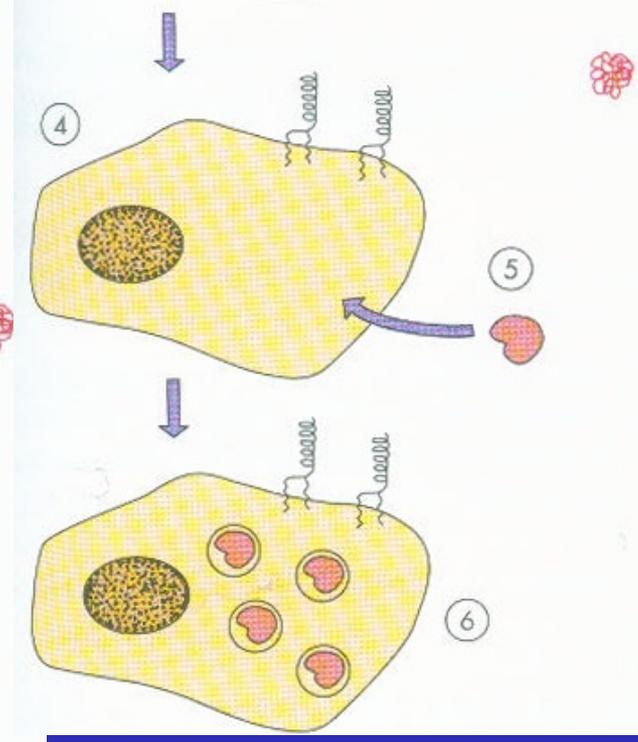
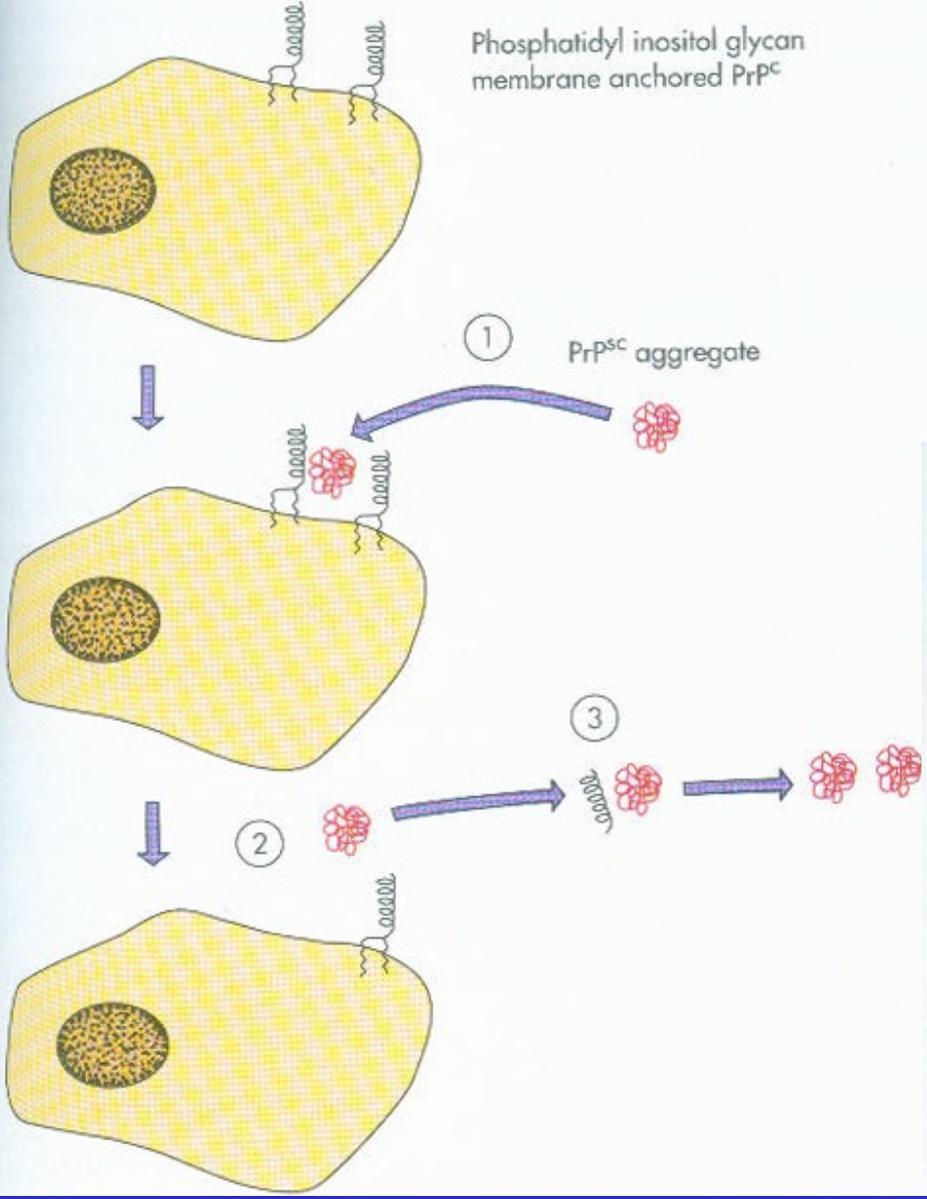
- Prions are misfolded proteins.
 - Prion conformation is rich in β -sheets.
- Prions aggregate in amyloids.
- Prions are infectious.
 - Prion proteins induce conformational changes in other like proteins.
- Prions can propagate into other cells.



Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) genetic anomaly in humans

1. PrP^c is normally found on the surface of brain cells.
2. In some individuals a rare mutation on chromosome 20 can cause PrP^c to misfold into PrP^{sc}.
3. PrP^{sc} dissociates from the cell membrane but causes PrP^c that is associated with the cell membrane to misfold and dissociate from the cell surface.
4. As PrP^{sc} dissociates from the cell surface, more PrP^c is translated in brain cell and translocated to the surface/ PrP^{sc} induces misfolding and release of these proteins. Etcetera.
5. The accumulation of cell free PrP^{sc} forms proteinaceous plaques between the brain cells
6. Aggregated PrP^{sc} is finally internalized into cells giving cells the spongiform appearance.

Phosphatidyl inositol glycan
membrane anchored PrP^C



Malattie da prioni:

- Scrapie
- Kuru
- Fatal familial insomnia
- BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)
- Creutzfeldt-Jacob

Resistono a:

- 360° C;
- bombardamento con radiazioni;
- immersione in formaldeide e varechina.



Esse si dissolvono solo se trattate con :

- **NaClO** (ipoclorito di sodio) per 1 h,
- **NaOH** (idrossido di sodio) a 121° C per 30min
- **HCHO** (aldeide formica) per un'ora.

VIRUS- caratteristiche

- ✓ **I virus sono parassiti intracellulari obbligati , possono cioè sopravvivere solo usando le risorse di una cellula ospite**
- ✓ **I virus infettano ogni tipo di cellula inclusi batteri, archea, protisti, piante , funghi ed animali.**
- ✓ **I virus infettano i batteri sono detti batteriofagi (mangiatori di batteri) o fagi**
- ✓ **Lo studio dei virus è definito virologia e coloro che li studiano sono Virologi**
- ✓ **I virus sono i microrganismi più abbondanti sulla terra**
- ✓ **Costituiti da core di acido nucleico**

VIRUS- caratteristiche

I virus sono piccole particelle infettive, visibili, solo al m.e.
Hanno dimensioni tra i 20nm ed i 300 nm

esempi.

I Poliovirus hanno un diametro di 30 nm

I Poxovirus causano il vaiolo e possono arrivare sino a 300 nm

Un virus contiene **DNA o RNA** , non entrambi

Un virus consiste di un CORE di acido nucleico

Il **CAPSIDE** è costituito da subunità proteiche dette **capsomeri**

Il **CAPSIDE** è il rivestimento proteico **che circonda il CORE.**

- Date le loro caratteristiche, i virus sono assolutamente incapaci di replicarsi al di fuori delle cellule bersaglio.
- Sopravvivono un tempo limitato (pochi minuti o alcuni giorni, a seconda del tipo virale) nell'ambiente extracellulare, senza mai replicarsi fuori dalle cellule.
- Come parassiti intracellulari obbligati, i virus necessitano non solo degli elementi nutritivi prodotti dalle cellule ospiti, ma soprattutto dei sistemi di trascrizione e traduzione di tali cellule.
- Contengono enzimi propri indispensabili per il ciclo replicativo (polimerasi, proteasi, ecc). Tutti gli altri enzimi sono resi disponibili dalla cellula ospite.

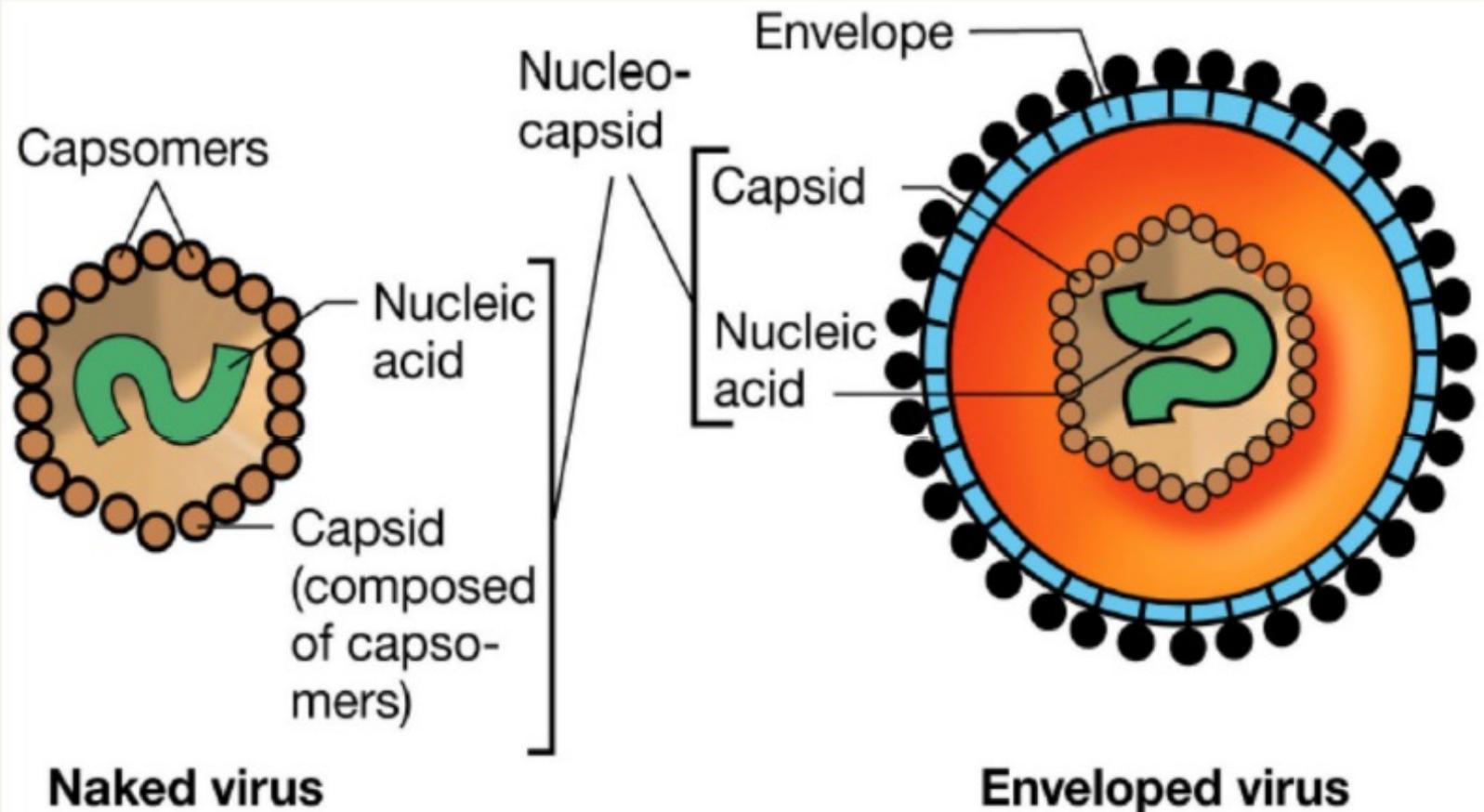
Virus: proprietà distintive

⇒ I virus rappresentano un sistema altamente sofisticato di trasferimento genetico da cellula a cellula.

Tramite i virus, e' possibile modificare il corredo genetico (e quindi fenotipico) di una cellula, favorendone, quindi, l'acquisizione di nuovi caratteri.

Data questa loro caratteristica naturale, sono usati, nella manipolazione genetica, come vettori finalizzati al trasferimento di nuovi caratteri a cellule infettabili da un determinato virus.

I VIRIONI o PARTICELLE VIRALI

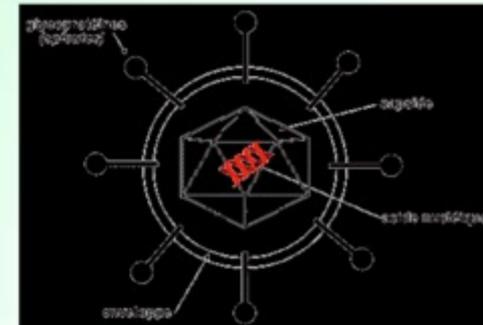


Virus nudi

Virus rivestiti

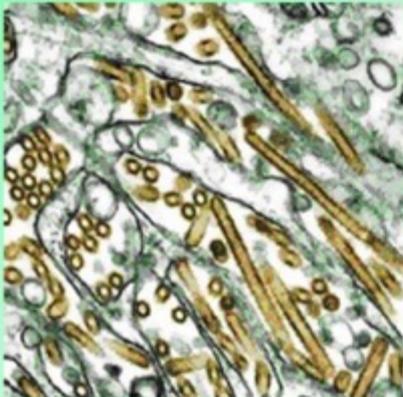
Costituenti virali

- Core** Acido nucleico più ogni molecola che ne determina la stabilità
- Capside** Struttura proteica che racchiude l'acido nucleico o il core
- Capsomero** Unità proteica che, ripetuta, forma il capside icosaedrico
- Nucleocapside** Acido nucleico più capside
- Envelope** Involucro lipoglicoproteico esterno
- Peplomeri** Proiezioni superficiali che protrudono dall'-envelope
- Virione** Particella virale completa come si può osservare al di fuori della cellula



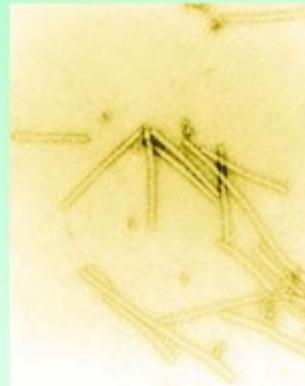
Virus: proprietà distintive

⇒ A seconda del loro specifico tropismo, possono infettare cellule vegetali (virus del tabacco, della patata, ecc), batteri (batteriofagi, ognuno specifico per una determinata specie batterica), e cellule animali (virus di insetti, pesci, uccelli, mammiferi).

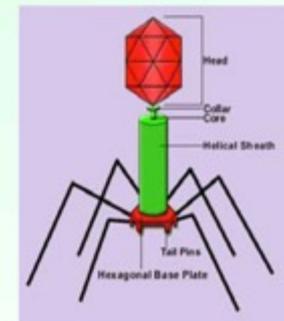


VIRUS H5N1 O

INFLUENZA AVIARIA



Electron micrograph of TMV particles



BATTERIOFAGO

Proteine virali

Si distinguono:

- **Proteine funzionali** che permettono ad es. all'acido nucleico virale di replicarsi (DNA-o RNA-polimerasi)
- **Proteine strutturali**: incorporate nelle nuove particelle virali come costituenti del capsido o come strutture particolari (es. le emoagglutinine) presenti nell'envelope
- **Proteine che alterano alcune funzioni e strutture della cellula ospite**
- **Proteine strettamente associate agli acidi nucleici**
- **Proteina di matrice** o M (Proteine strutturali sotto l'envelope)

MORFOLOGIA VIRALE

I virus, nella loro forma extracellulare (virione), hanno una struttura cristallizzata tipica

Di contro, all'interno delle cellule in cui si replicano, non sono mai reperibili in forma completa, eccetto che poco prima della loro uscita dalla cellula (fase di gemmazione)

Di norma, all'interno delle cellule e' possibile trovare materiale genetico del virus, e proteine virali piu' o meno assemblate

Morfologia virale

La struttura di base dei virus consiste nell'**acido nucleico** e in un rivestimento proteico detto **capside**.

Il genoma contiene tutta l'informazione genetica necessaria per la replicazione; è molto labile ad agenti denaturanti (nucleasi, esterasi, forza ionica ecc.) e non può da solo penetrare nella cellula ospite .

La quantità di acido nucleico è indice della complessità strutturale del virione.

Il capsid costituisce una struttura continua e impermeabile agli agenti esterni e protegge l'acido nucleico. Alcune proteine che lo compongono possiedono una specifica affinità per particolari recettori della membrana citoplasmatica della cellula ospite. Queste strutture permettono il legame del virus alla cellula e la penetrazione dell'acido nucleico.

Alcuni virus posseggono una membrana limitante esterna detta **envelope, (o pericapsid o peplos)**.

I virus con il solo capsid vengono definiti "**nudi**", quelli con envelope vengono definiti "**rivestiti**".

I virus più grandi possono avere una struttura più complessa.

Capside

E' proprio del virus, e' geneticamente determinato e costituito da subunità proteiche disposte in modo regolare, codificate dal genoma virale.

Dato il limitatissimo patrimonio genetico dei virus, le proteine costituenti i **capsomeri** (unità base del capsid) sono molto poche, specifiche del virus, e in grado di interagire con i componenti sulla superficie cellulare fungendo da recettori.

Conferisce resistenza al materiale genetico virale nei confronti delle nucleasi presenti nei fluidi.

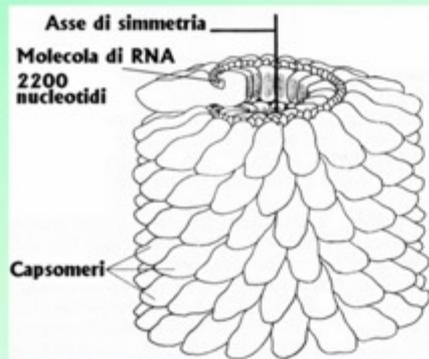
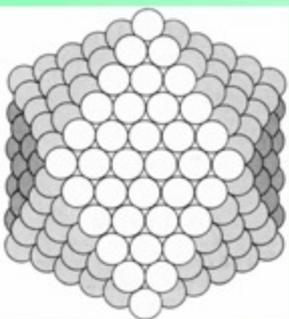
Simmetrie del capside

⇒ Il capside è costituito da proteine codificate dal genoma virale la cui ridotta lunghezza permette una sintesi limitata di proteine. Il capside in genere è quindi costituito da **unità ripetitive di una o poche proteine**.

○ Le proteine destinate a formare il capside sono capaci di autocombinarsi (**assemblaggio**) seguendo due schemi fondamentali definiti:

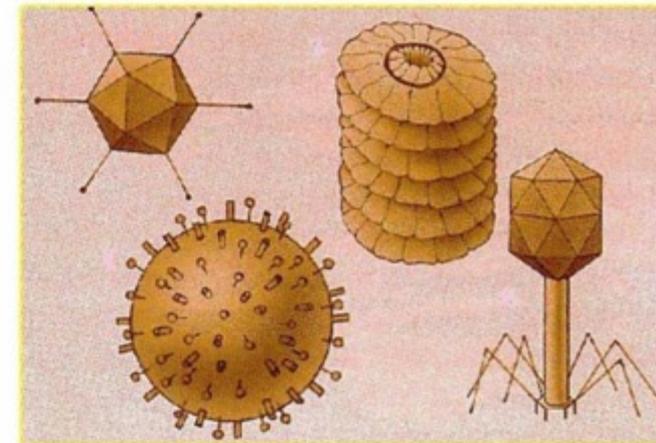
-a **simmetria elicoidale**

-a **simmetria cubica (detta anche icosaedrica)**



Virus à capside icosaédrique :
(Adénovirus)

Virus à capside hélicoïdale :
(Mosaïque du tabac)



Virus à envelope :
(Grippe)

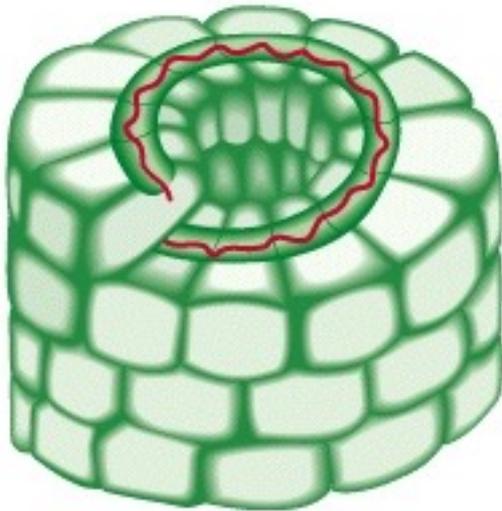
Bactériophage :
(T4 d'Escherichia coli)

La simmetria virale, dovuta all'interazione genoma-proteine, può essere:

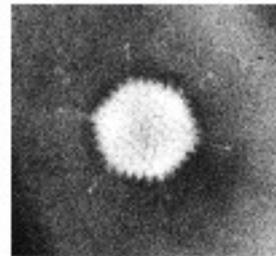
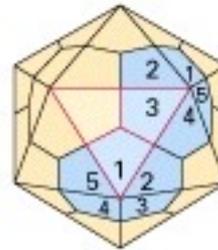
- a. **Elicoidale**, quando l'acido nucleico si avvolge sulla struttura proteica di base, determinando, al microscopio elettronico, una forma oblunga (virus del mosaico del tabacco, orthomyxovirus, rhabdovirus., ecc). Tutte le subunità proteiche sono identiche tra loro
- b. **Icosaedrica**, quando i capsomeri (unità base dell'icosaedro costituente il capsido) sono organizzati a costituire una struttura poliedrica regolare con 20 facce costituite da triangoli equilateri. All'interno è situato il nucleocapsido, aderente in alcuni punti ai capsomeri. È presente nella maggioranza dei virus
- c. **Complessa**, A struttura non classificabile secondo canoni ristretti: batteriofagi, poxvirus, ecc.

Tutti i virus di un determinato tipo saranno assolutamente uguali tra loro

(a) Section of a helical virus



(b) A small icosahedral virus



(c) A large icosahedral virus

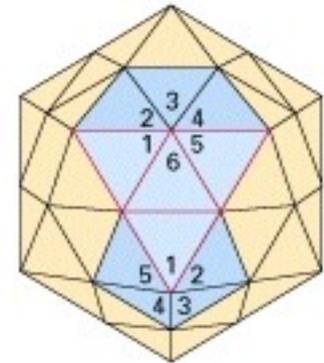


Figure 6-11

The protein coat (capsid) of a virus is constructed of multiple copies of a single or a few different proteins
Some virus capsids are also surrounded by an envelope consisting of a lipid bilayer and a few glycoproteins

Capside a simmetria elicoidale

Contenitore di forma simil-cilindrica, costituito da un numero variabile di copie dello tipo di capsomero (unità chimica) avvolte a spirale attorno ad un asse centrale ideale a formare uno spazio elicoidale in cui risiede il genoma (RNA).

I virus animali a simmetria elicoidale sono sempre provvisti di envelope.

I capsidi possono essere rigidi (TMV, batteriofago M13) o flessibili (virus influenzali).

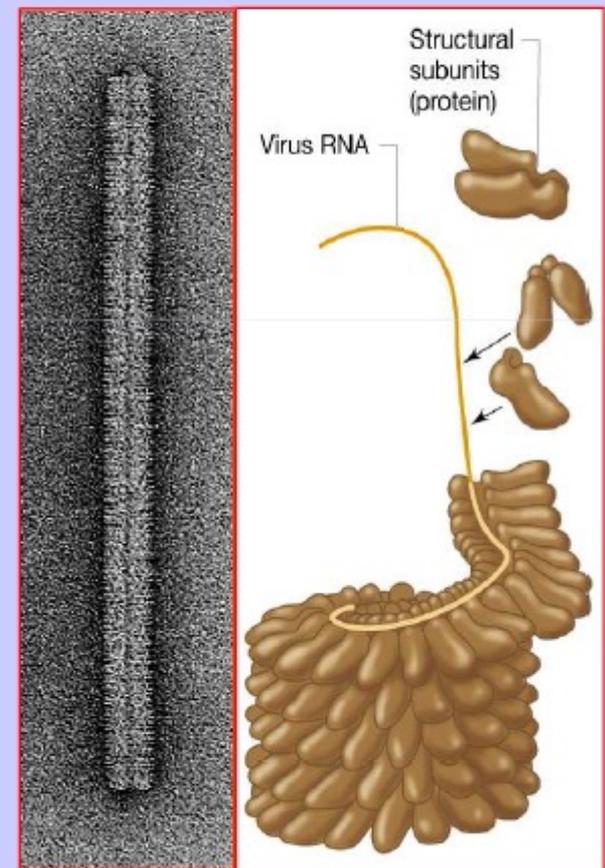
Esempio: virus del mosaico del tabacco (TMV)

Capside: cilindrico, rigido, 15-18 nm di diametro e circa 300 nm di lunghezza, formato da 2.130 capsomeri (158 aa)

Acido nucleico: RNA a singolo filamento di 6.000 nucleotidi

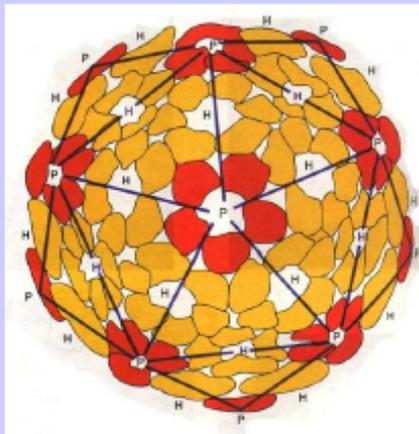
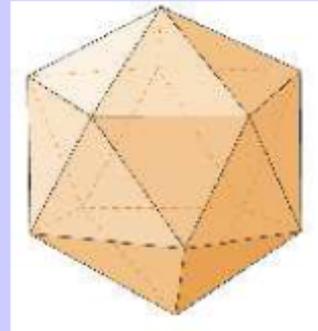
Cristallizzato da Stanley nel 1935

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



Capside a simmetria icosaedrica

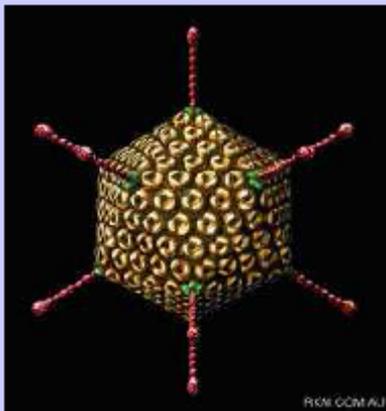
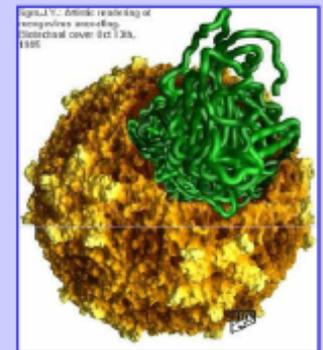
Costituito da due tipi di capsomero (pentone, esone = aggregati strutturali) disposti a formare un **icosaedro** (solido regolare a 20 facce triangolari e 12 vertici). Il genoma virale è impacchettato nel capside con cui non prende diretto contatto.



I **pentoni** o **pentameri** possiedono 5 subunità e sono disposti ai vertici dell'icosaedro (provvisi di fibra in *Adenovirus*); gli **esoni** o **esameri** hanno 6 subunità e sono localizzati sulle facce.

Negli *Adenovirus*: a) ogni pentone si prolunga in una o due strutture fibrose (**fibra**) in cui risiede l'antigenicità tipo-specifica; b) i pentoni e gli esoni sono antigenicamente differenti.

Il numero totale di capsomeri per i diversi virus assume valori discreti, calcolati mediante equazioni derivate dalla cristallografia: 12 (*Parvovirus* batteriofagi Φ X174, MS2, Qb), 32 (*Poliovirus*), 42, 60, 72 (HPV), 92, 162, 252 (*Adenovirus*), etc.



Adenovirus



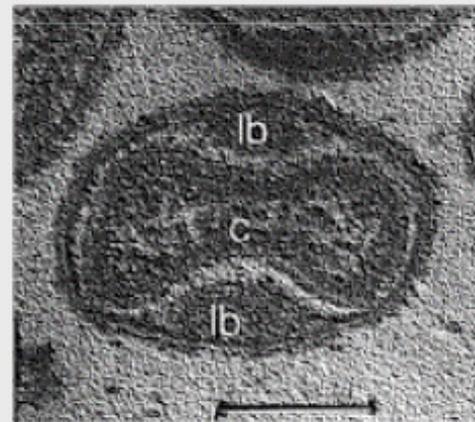
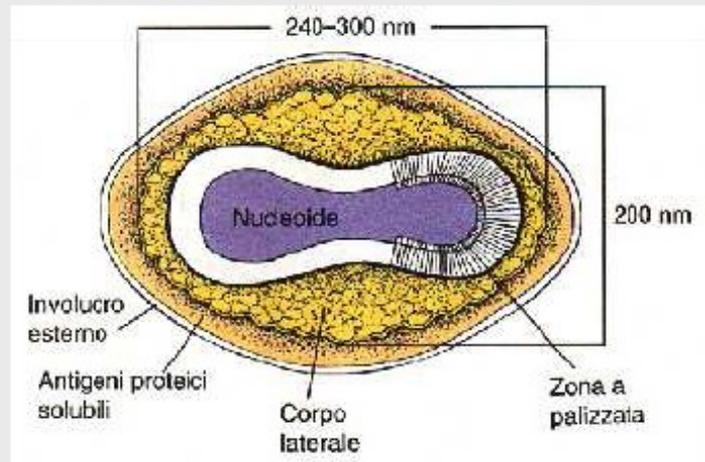
Papilloma virus

Capside a simmetria complessa

Hanno una struttura complessa non assimilabile né a quella elicoidale né a quella icosaedrica, in cui i rapporti tra i diversi componenti non sono stati ancora completamente chiariti.

Virus “complessi”: *Poxvirus* e batteriofagi di grosse dimensioni (T4).

I poxvirus, di forma ovoidale o “a mattone”, sono i virus animali più grandi e possono essere osservati anche al microscopio ottico (1886 – “spore di micrococchi”)



Il genoma (DNA lineare 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.

Crescita

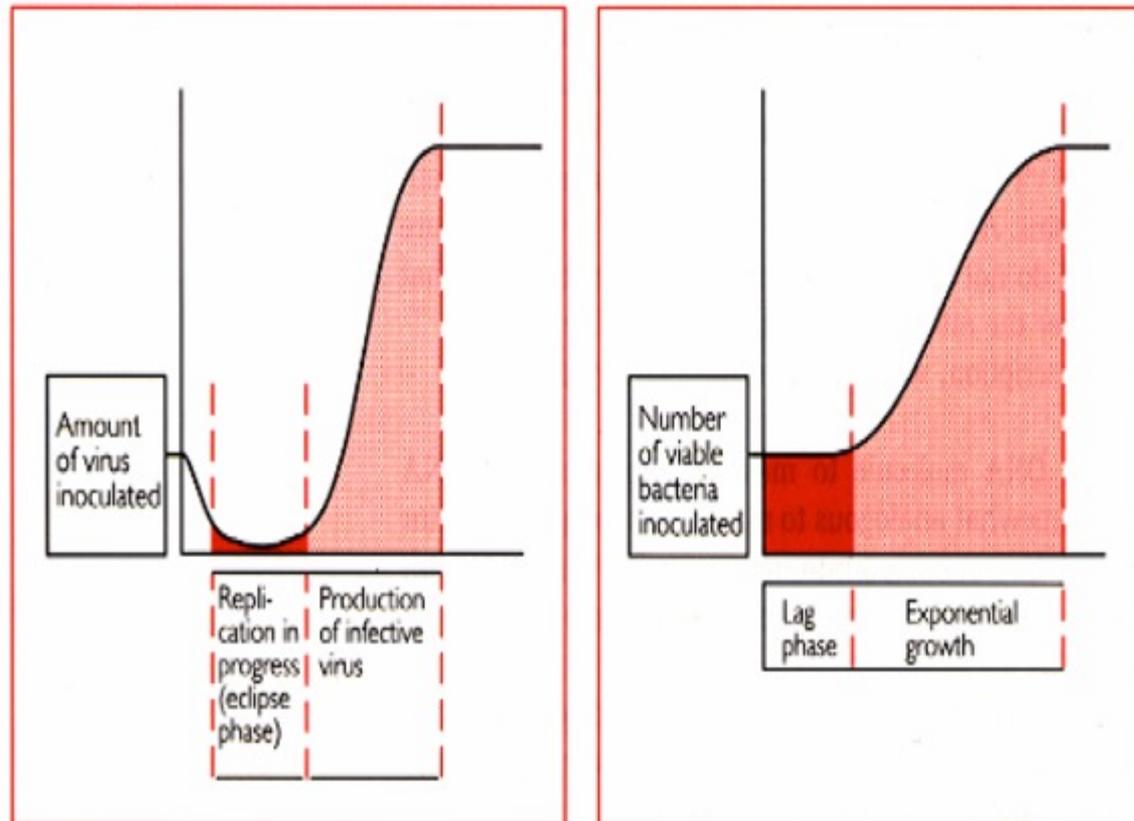
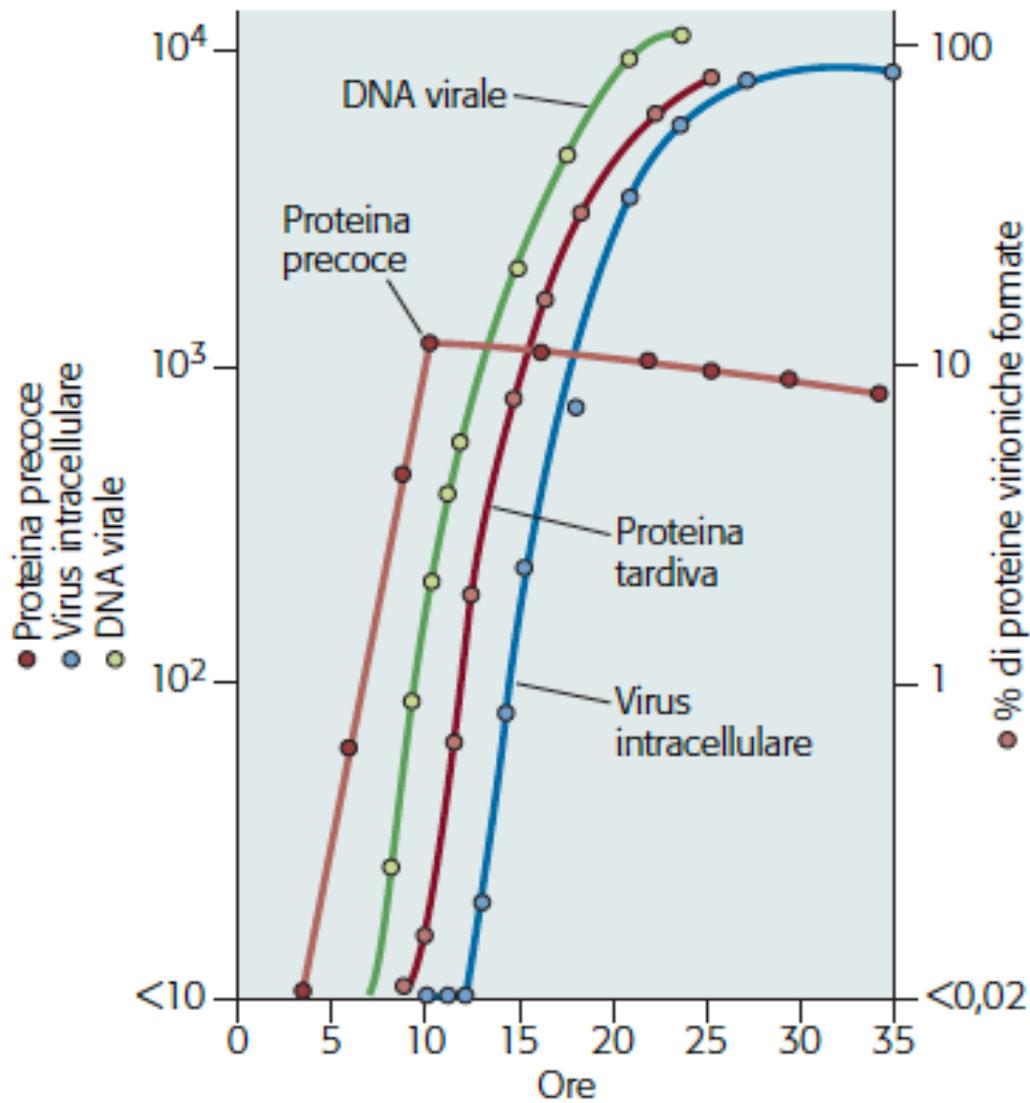
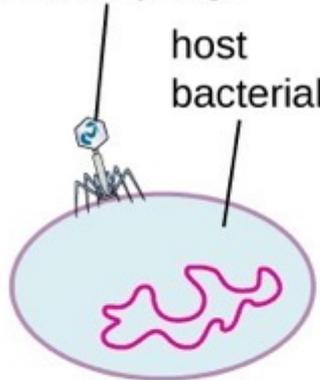


Fig. 2.1 Typical growth curve of a virus compared with that of a bacterium.



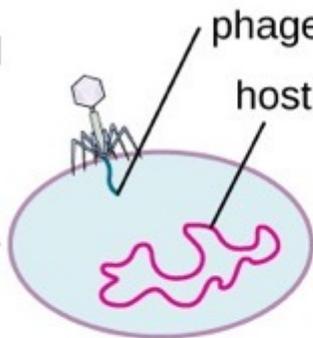
bacteriophage

host
bacterial cell

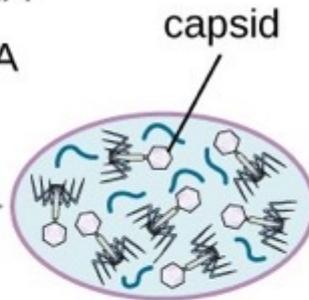


phage DNA

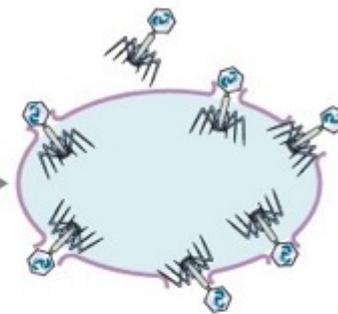
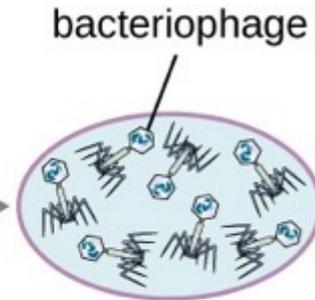
host DNA



capsid



bacteriophage



1 Attachment

The phage attaches to the surface of the host.

2 Penetration

The viral DNA enters the host cell.

3 Biosynthesis

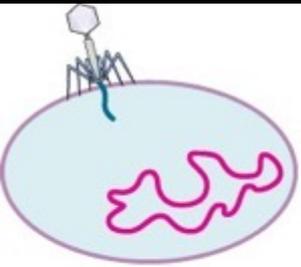
Phage DNA replicates and phage proteins are made.

4 Maturation

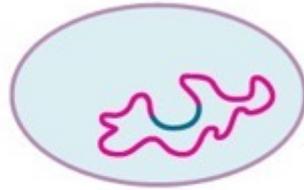
New phage particles are assembled.

5 Lysis

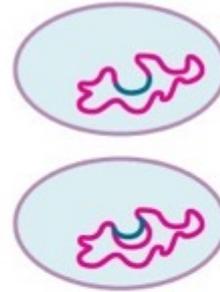
The cell lyses, releasing the newly made phages.



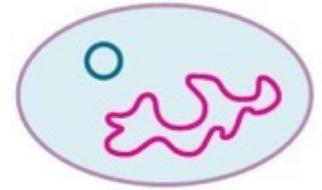
The phage infects a cell.



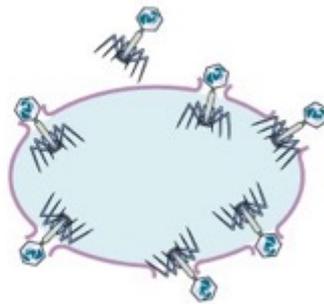
The phage DNA becomes incorporated into the host genome.



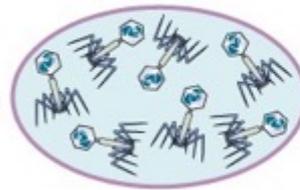
The cell divides, and prophage DNA is passed on to daughter cells.



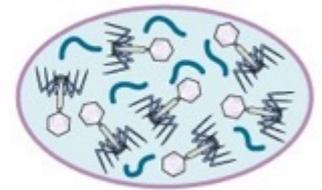
Under stressful conditions, the prophage DNA is excised from the bacterial chromosome and enters the lytic cycle.



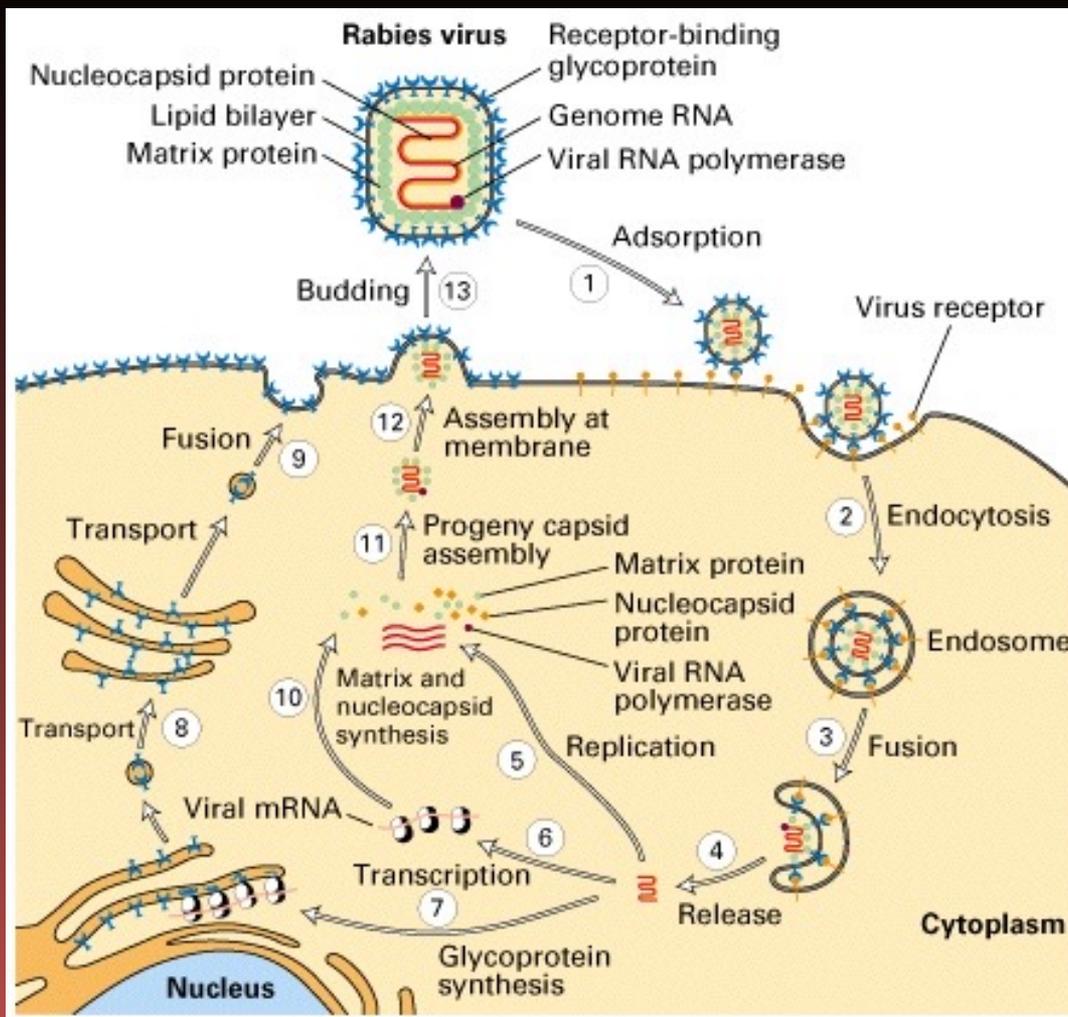
The cell lyses, releasing the newly made phages.



New phage particles are assembled.



Phage DNA replicates and phage proteins are made.



eucariotici possono essere diversi

- **Infezione produttiva:** le cellule sono permissive, consentono la replicazione virale e l'esito è il rilascio della progenie virale, con conseguente morte cellulare
- **Infezione abortiva:** cellule non permissive
- **Infezione restrittiva:** cellule transitoriamente permissive – pochi virus vengono prodotti e il genoma virale persiste in cellula ospite come infezione latente
- **Trasformazione cellulare:** immortalizzazione

Pericapside (peplos, envelope)

Strato lipidico (in alcuni casi glicoproteico) esterno all'involucro, presente solo in alcune famiglie di virus (orthomyxovirus, herpesvirus, retrovirus, poxvirus, ecc.).

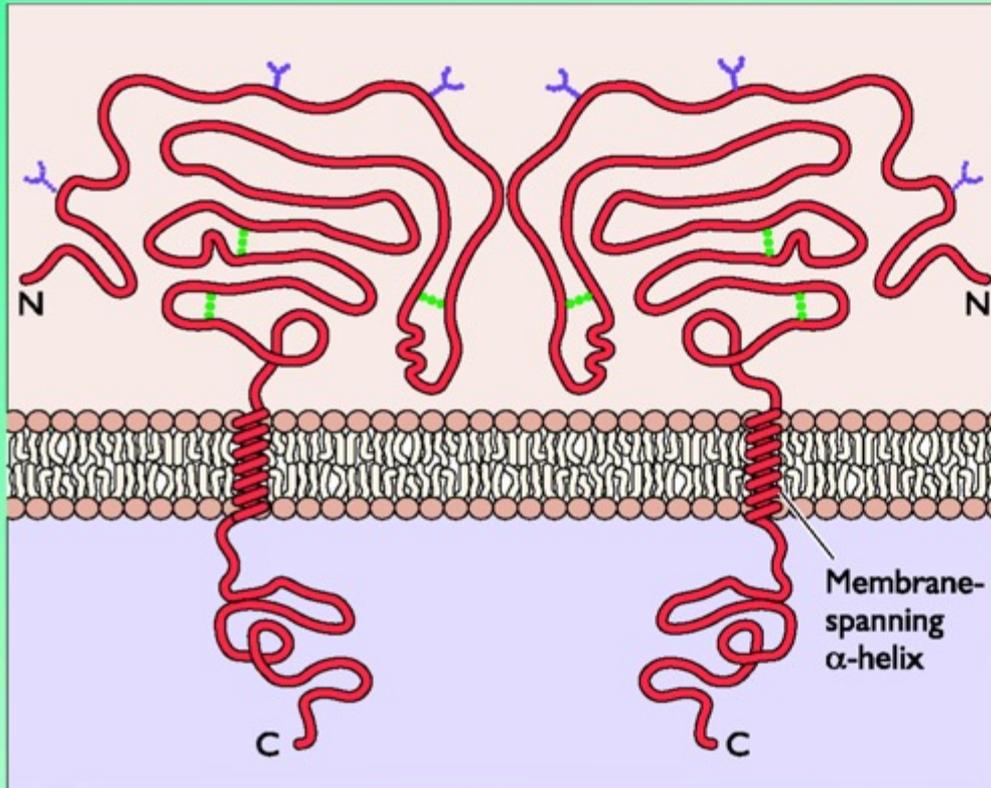
E' costituito da lipidi della membrana della cellula infettata, rimasti intorno al virus vero e proprio al momento della fuoriuscita dalla cellula stessa ("budding").

Contiene anche alcune glicoproteine virali, che fungono da primo recettore virale nei confronti delle cellule bersaglio.

Svolge funzione di protezione, di riconoscimento antigenico (emoagglutinina del virus influenzale) e di penetrazione nella cellula ospite tramite il meccanismo di fusione con la membrana cellulare.

La presenza del pericapside rende ragione della sensibilita' di alcuni virus ai disinfettanti organici (eteri, alcoli) in grado di sciogliere i lipidi.

Componenti dell'involucro virale (envelope)

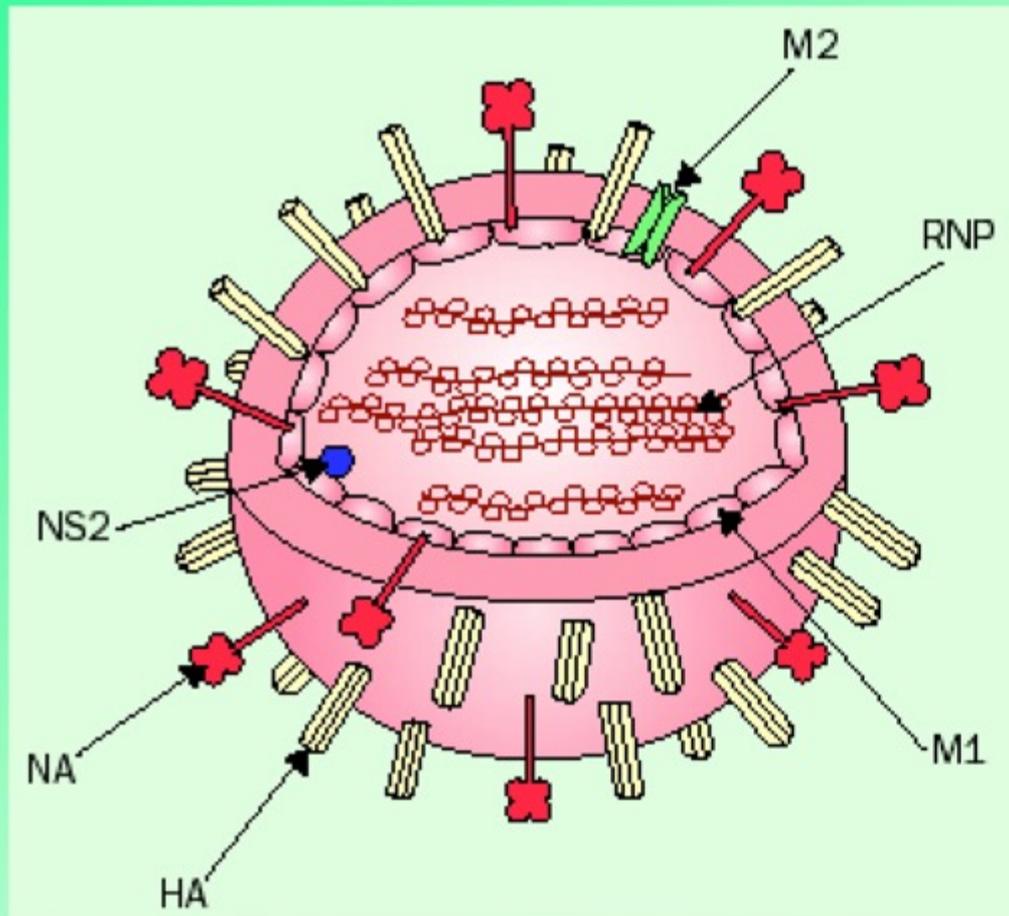


La base di tutti gli involucri virali è una **membrana lipidica** acquisita dalla cellula ospite durante l'assemblaggio.

Proteine virali vengono inserite nella membrana lipidica.

La grande maggioranza di queste sono **glicoproteine** (oligomeri).

Funzioni delle proteine dell'involucro



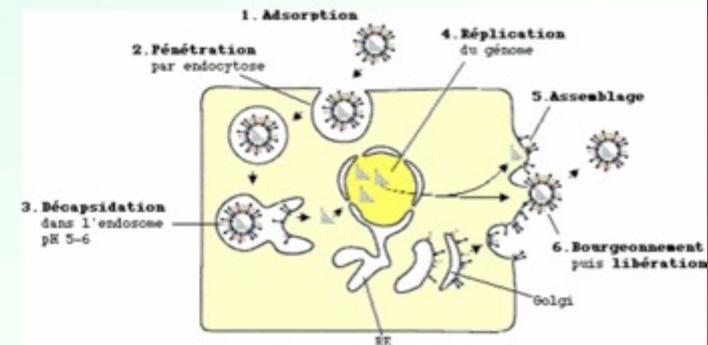
Orthomyxovirus

Aggancio, fusione ed entrata
(es. HA)

Attività enzimatica
(es. NA)

Canale ionico
(es. M2)

Antigeni principali
(es. HA, NA)



Genoma virale

Tutti i virus contengono un solo tipo di acido nucleico.

Quelli a RNA, in particolare, rappresentano un'eccezione in natura, in quanto la loro informazione genetica non è contenuta nel DNA. A seconda del tipo virale, il genoma codifica per un numero diverso di proteine, da un minimo di 3 a un massimo di alcune centinaia.

A seconda dei vari tipi di virus, il genoma (DNA o RNA) può essere a singolo o doppio filamento, lineare o segmentato in varie porzioni (es. virus influenzale) ognuna codificante per una proteina.

Tra i virus a RNA, alcuni hanno il filamento cosiddetto positivo (che funge anche da RNA messaggero), altri hanno il filamento negativo (che deve sintetizzare, sul suo stampo, un filamento complementare di RNA che fungerà da messaggero).

Genoma virale

⇒ E' costituito da un solo tipo di acido nucleico:

DNA o RNA

○ **Virus a RNA: Ribovirus**

Possiedono un RNA a singola elica (tranne la famiglia dei Reovirus che ha un RNA a doppia elica), del peso di circa $2-10 \times 10^6$ daltons, a volte (orthomyxovirus) diviso in frammenti. Nei reovirus e' a doppio filamento segmentato (piu' resistente del singolo filamento all'RNAsi e ai disinfettanti).

VIRUS AD RNA

Si dividono in 2 sottoclassi:

- Virus con RNA a **polarità positiva (+)** che può fungere nella cellula direttamente da RNA messaggero.
- Virus con RNA a **polarità negativa (-)** che funge da stampo per la sintesi dell'RNA messaggero- questi virus hanno l'enzima RNA polimerasi RNA dipendente associato al virione.

I Reovirus e alcune famiglie di virus a RNA a polarità negativa hanno un **genoma con sequenze indipendenti** di RNA (virus influenzale con 8 frammenti, bunyavirus con 3, Reovirus con 12).

Genoma virale

- Virus a DNA: **Deossiribovirus**

Normalmente hanno un DNA a doppia elica con filamento unico e lineare.

Alcuni virus (**Papovavirus ed Hepadnavirus**) contengono DNA circolare e altri (**Parvovirus**) hanno un DNA monocatenario.

La grandezza del genoma dà la misura della complessità del virus e della sua replicazione (più evidente nei virus a DNA rispetto ai virus a RNA).

VIRUS A DNA

- DNA: La molecola di DNA è unica, del peso da $1,5 \times 10^6$ daltons (parvovirus, gran parte dei batteriofagi) a 200×10^6 daltons (poxvirus), solitamente a doppio filamento lineare, con l'eccezione dei parvovirus (singolo), papovavirus (doppio filamento circolare), hepadnavirus (doppio filamento incompleto, circolare).

Il contenuto in guanina-citosina nei retrovirus (che si integrano nel genoma delle cellule ospiti) è simile a quello riscontrato nelle cellule stesse (circa 50% del totale), e questo probabilmente favorisce l'interazione tra i due DNA.

Proteine non strutturali

- Aiutano la replicazione virale ma **non sono incorporate nel virione**
- Enzimi necessari per la sintesi e la replicazione del DNA (es. RNR, TK, DNA polimerasi di Herpesviruses)
- Proteine che influiscono sulla fisiologia della cellule (es. E6/E7 di papillomavirus umani)
- Proteine che sopprimono le difese della cellula ospite (es. Inibitori della presentazione di antigeni)

Classificazione virale

- L'attuale classificazione si basa:

sul tipo di genoma (DNA o RNA) e la sua configurazione (mono o bicatenario, lineare o circolare, monofilamento o segmentato, a polarità positiva o negativa)

sul tipo di simmetria

sulla presenza di involucro pericapsidico

sul meccanismo di replicazione

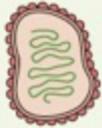
Molti virus non sono stati ancora classificati oppure lo sono solo provvisoriamente

Per alcuni agenti non è ancora stata accertata la natura virale (per es. gli agenti delle encefaliti spongiformi dell'uomo e di vari animali)

Virus a RNA



Virus dell'encefalite (vari tipi)



Virus di morbillo e parotite



Virus dell'influenza



Virus della rabbia



Virus Ebola



Virus della SARS



HIV



Reovirus



Virus della rosolia



Hantavirus



Virus West Nile



Norovirus

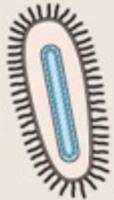


Poliovirus

Virus a DNA



Poxvirus



Baculovirus (insetti)



Iridovirus (insetti, pesci, rane)



Herpesvirus



Virus dell'epatite B



Adenovirus



Papillomavirus



Parvovirus

Classificazione ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses)



- 7 ordini principali: *Caudovirales*, *Herpesvirales*, *Ligamenvirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales* e *Tymovirales*
- 150 famiglie, 79 sottofamiglie, 1019 generi, circa 5560 specie

La struttura tassonomica generale è la seguente:

Ordine (-virales)

Famiglia (-viridae)

Sottofamiglia (-virinae)

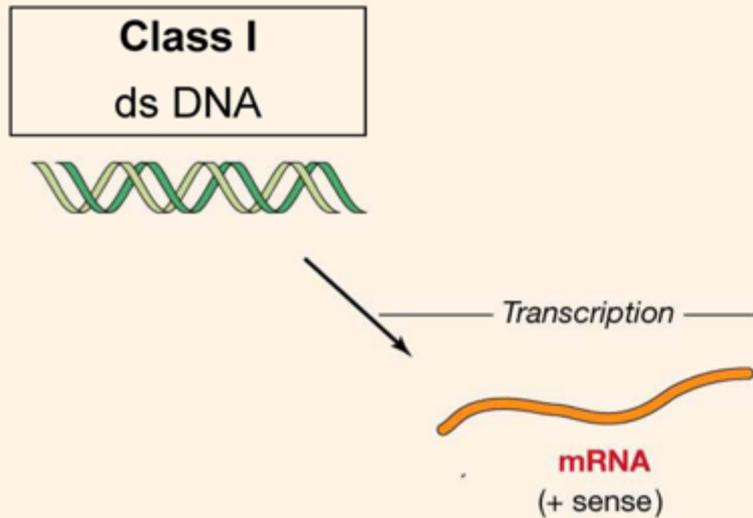
Genere (-virus)

Specie (-virus)

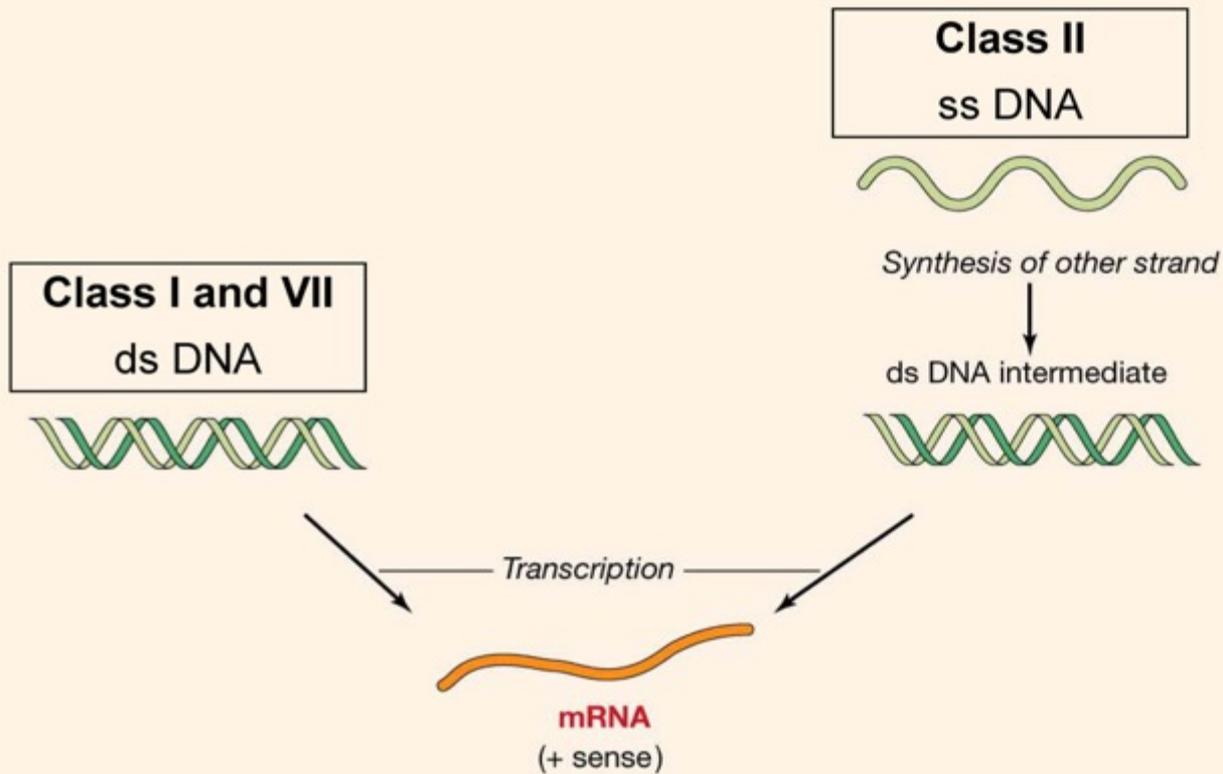
Il sistema di classificazione Baltimore

- **Basato sulla natura e polarità dei genomi virali**
- **Descrive le relazioni obbligatorie tra il genoma virale e il suo mRNA**

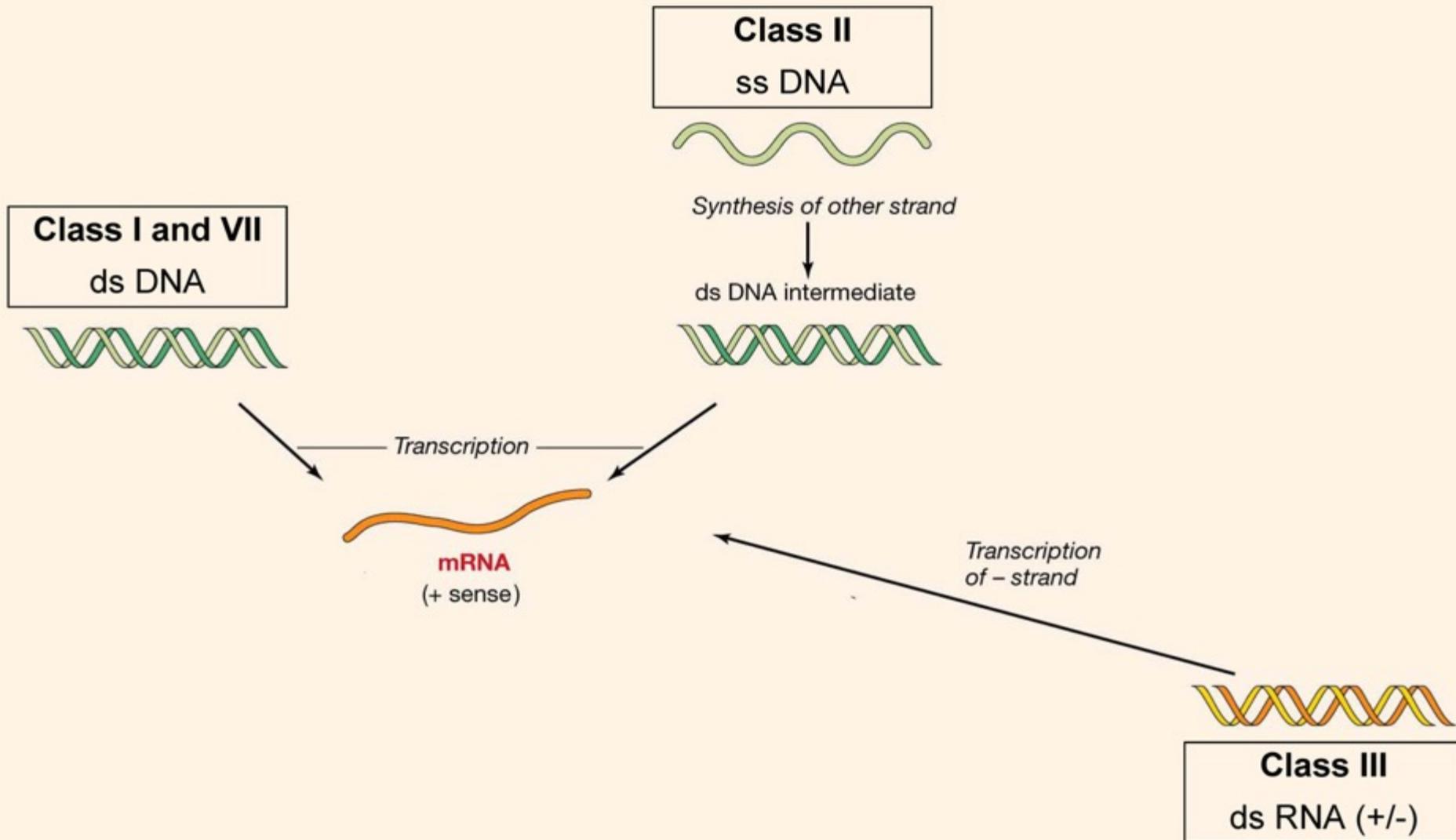
Il sistema di classificazione Baltimore



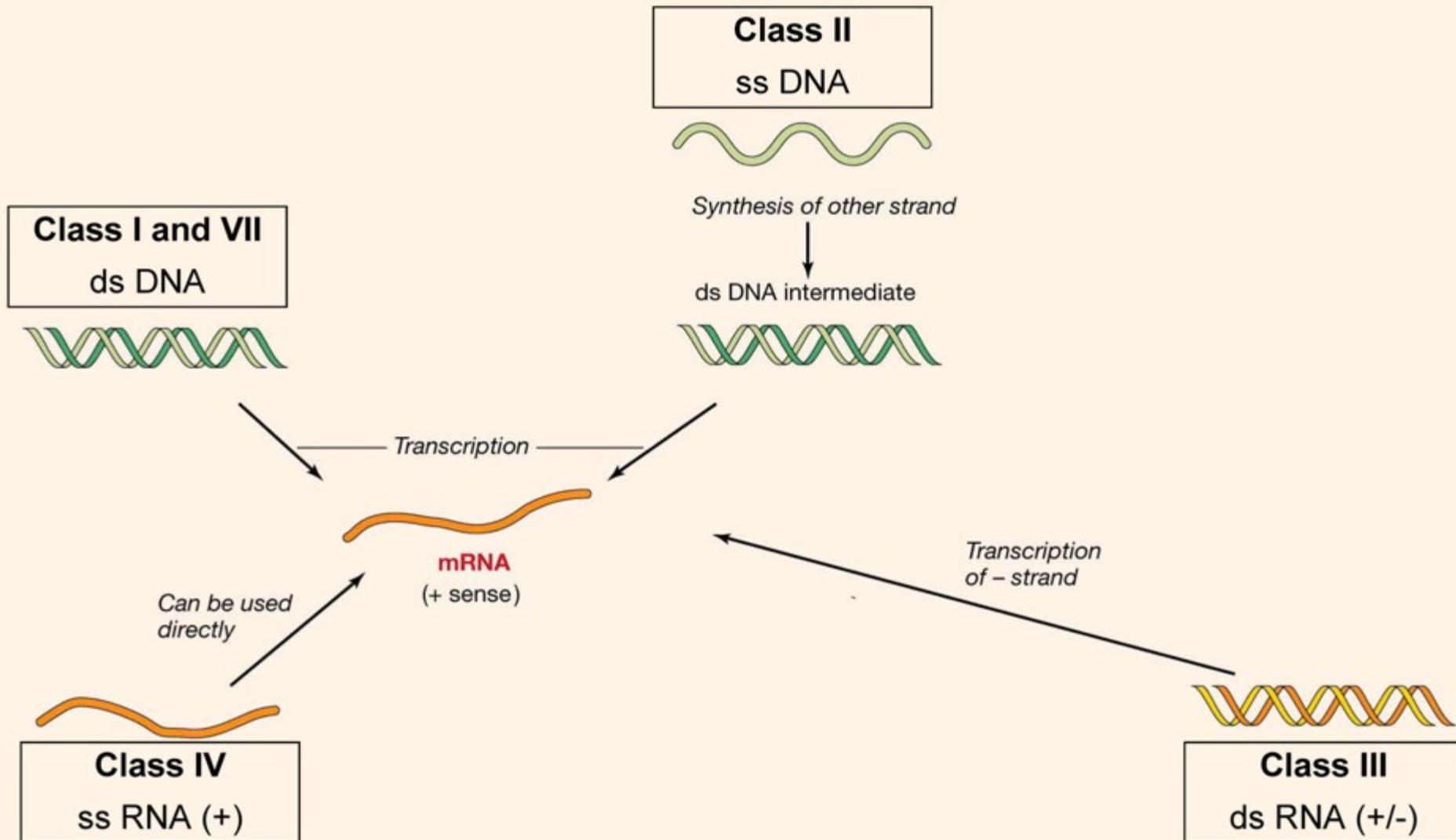
Il sistema di classificazione Baltimore



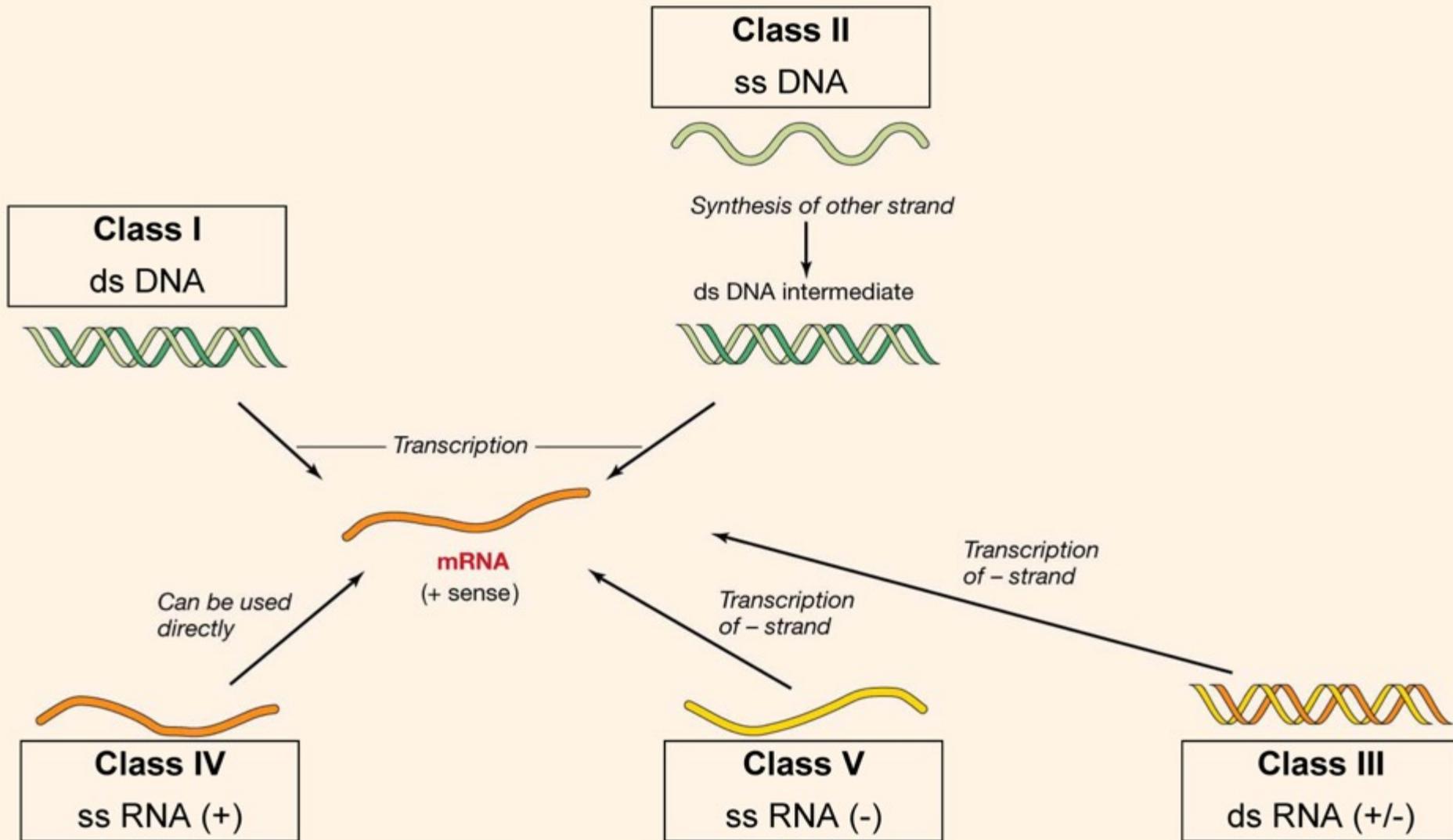
Il sistema di classificazione Baltimore



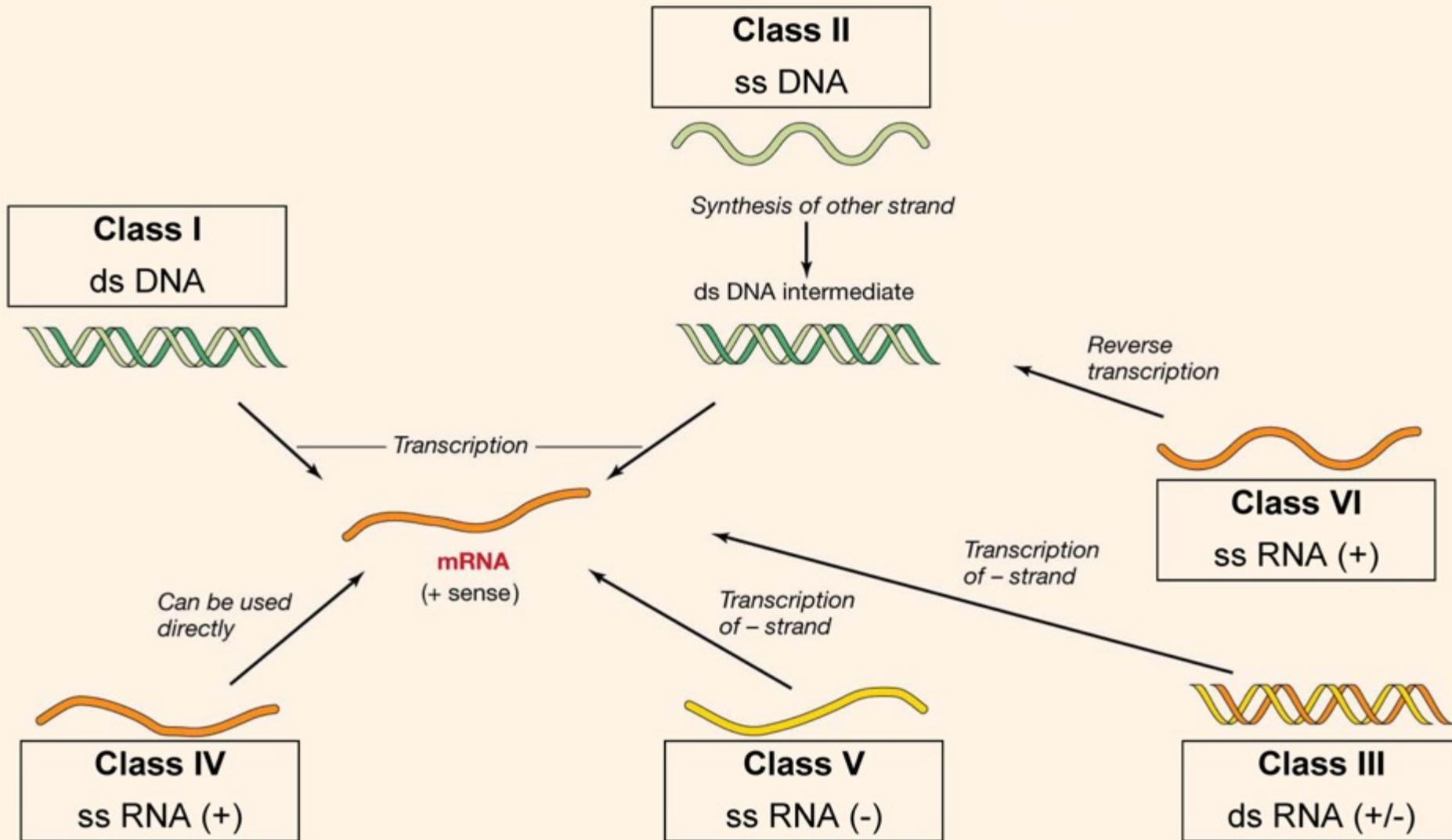
Il sistema di classificazione Baltimore



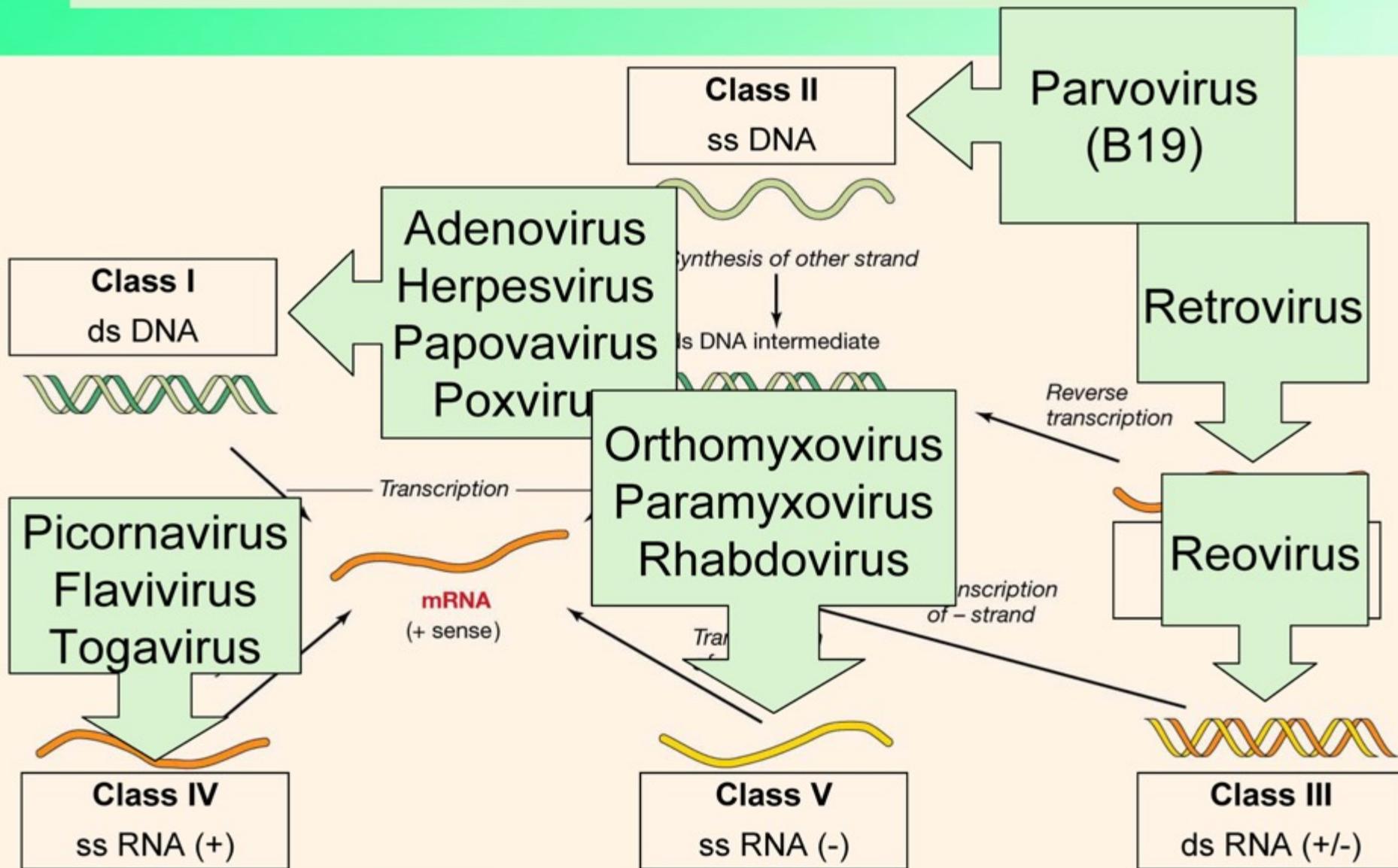
Il sistema di classificazione Baltimore



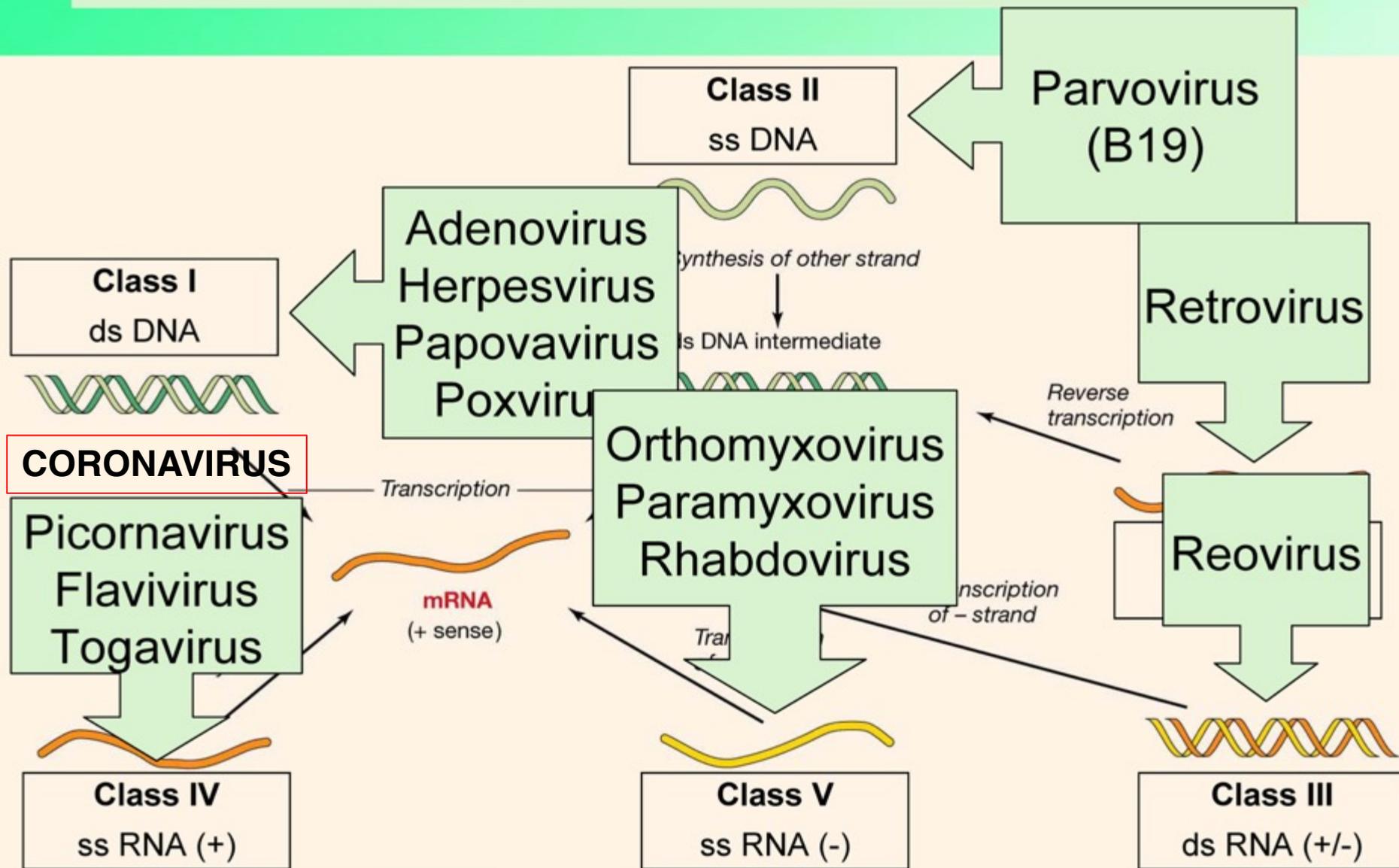
Il sistema di classificazione Baltimore



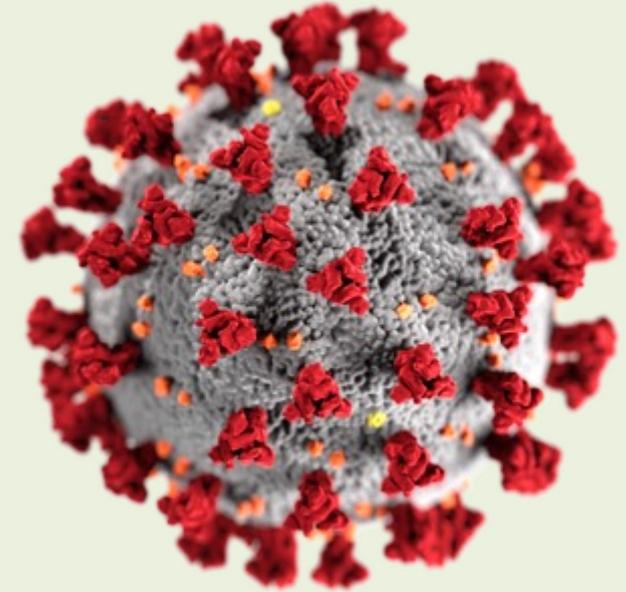
Il sistema di classificazione Baltimore



Il sistema di classificazione Baltimore

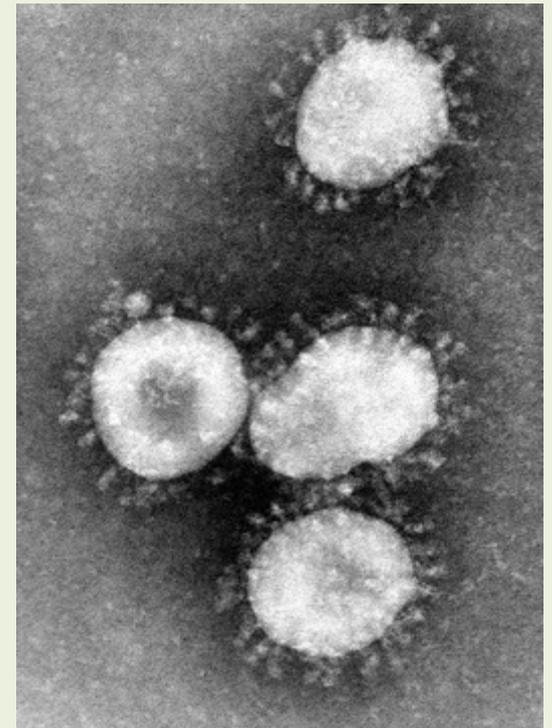


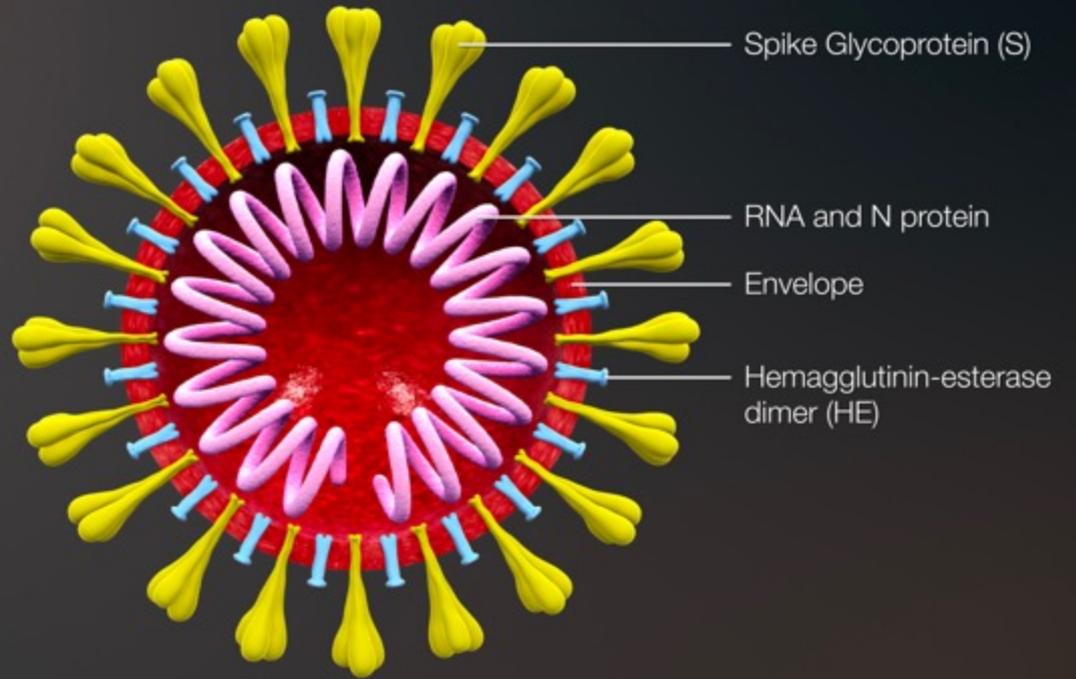
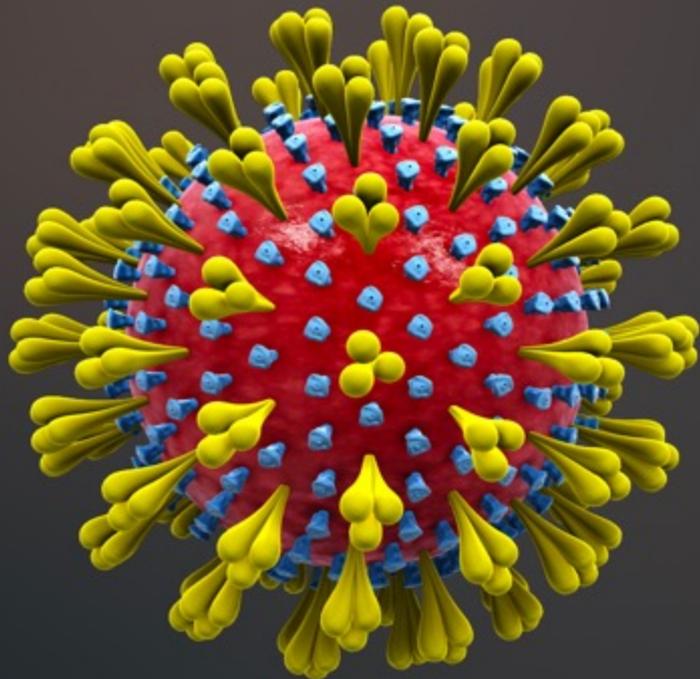
Coronavirus



- Virus a RNA positivo (ssRNA+), diametro 80-160nm
- Genoma 27-30kb che codifica per 7 proteine
- Nome deriva dall'aspetto caratteristico dei virioni, che presenta serie di glicoproteine superficiali disposte a corona
- Questi peplomeri sono i determinanti del tropismo

- Causano infezioni del tratto respiratorio: raffreddore, polmonite, bronchite
- Trasmissione attraverso *droplet* respiratori
- Responsabili delle gravi epidemie di SARS del novembre 2002, di quella della MERS del 2012 e della nuova pandemia di COVID-19 del 2019-2020





Spike Glycoprotein (S)

RNA and N protein

Envelope

Hemagglutinin-esterase dimer (HE)

A new coronavirus associated with human respiratory disease in China

Nature, February 2020

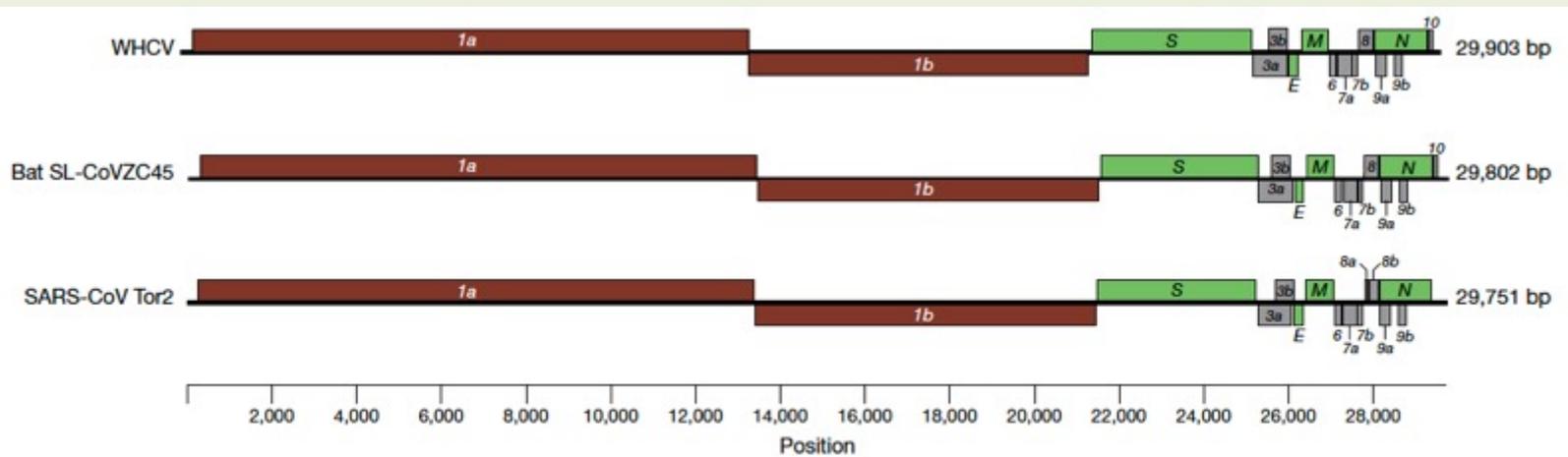
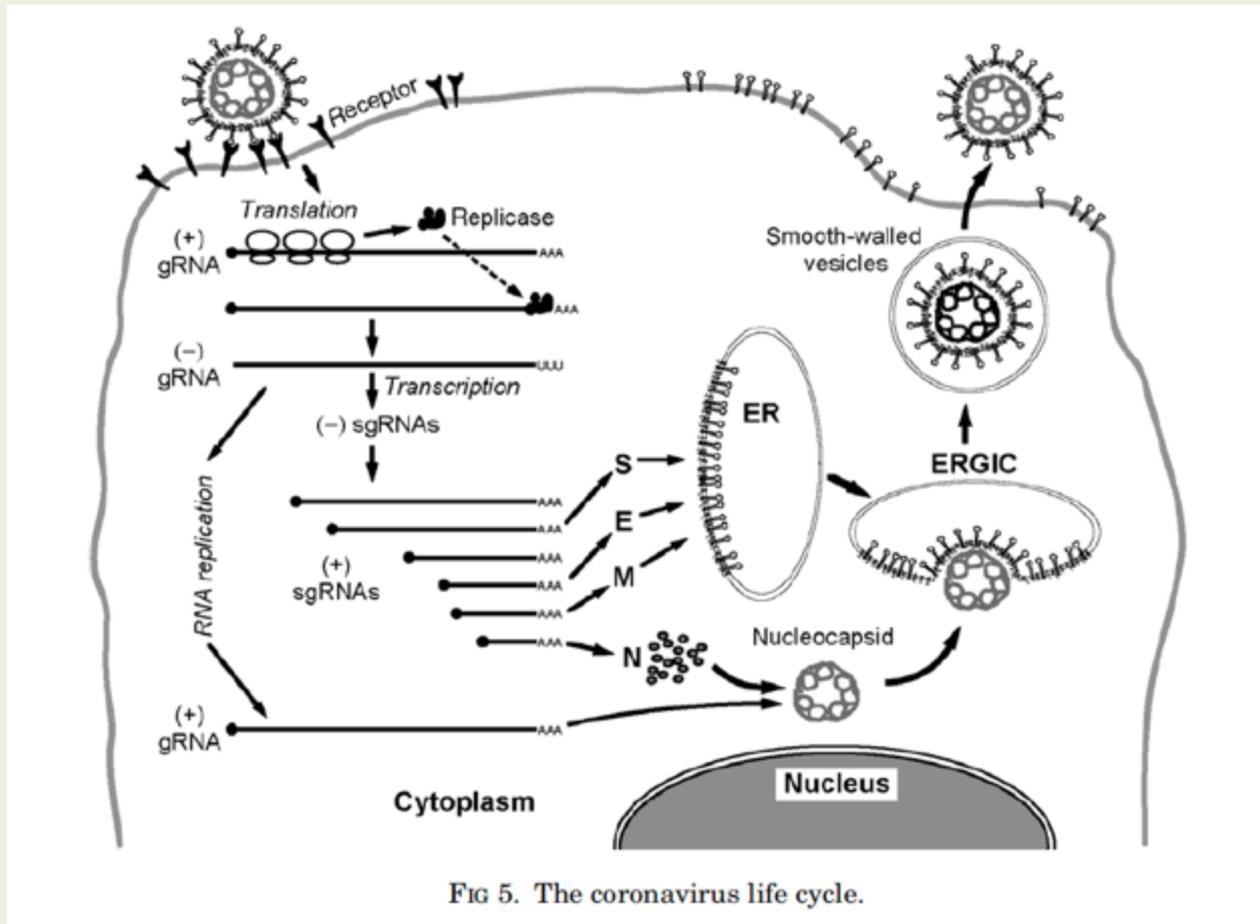
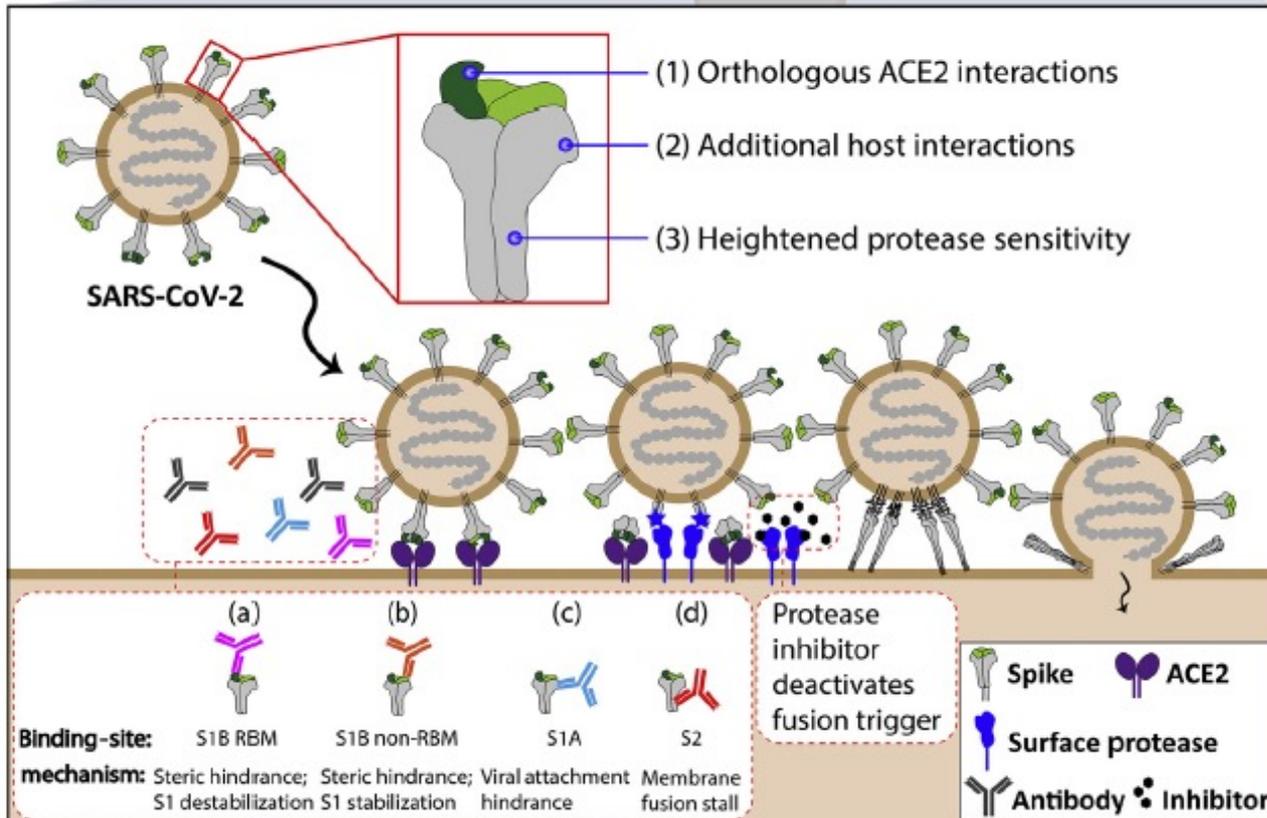
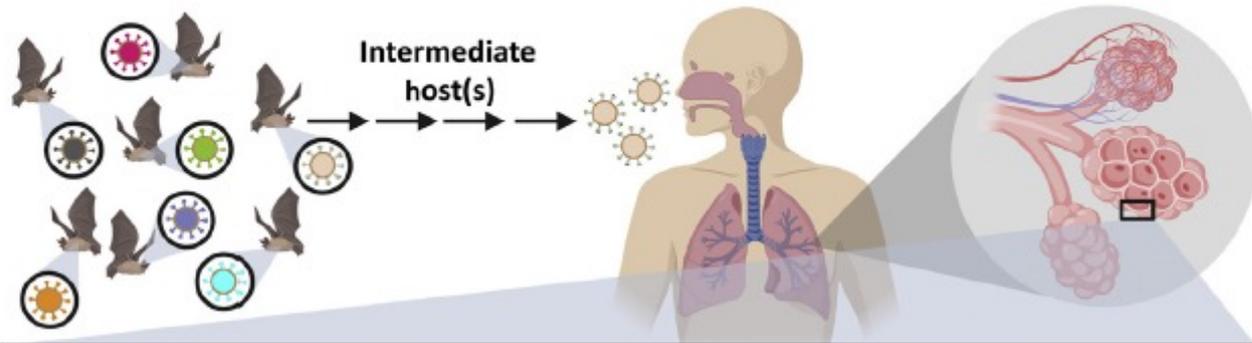


Fig. 1 | Genome organization of SARS and SARS-like CoVs. The organization of genes for WHCV, bat SL-CoVZC45 and SARS-CoV Tor2.

The SARS coronavirus infects human cells by attaching to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor





Trends in Immunology

Lines of attack

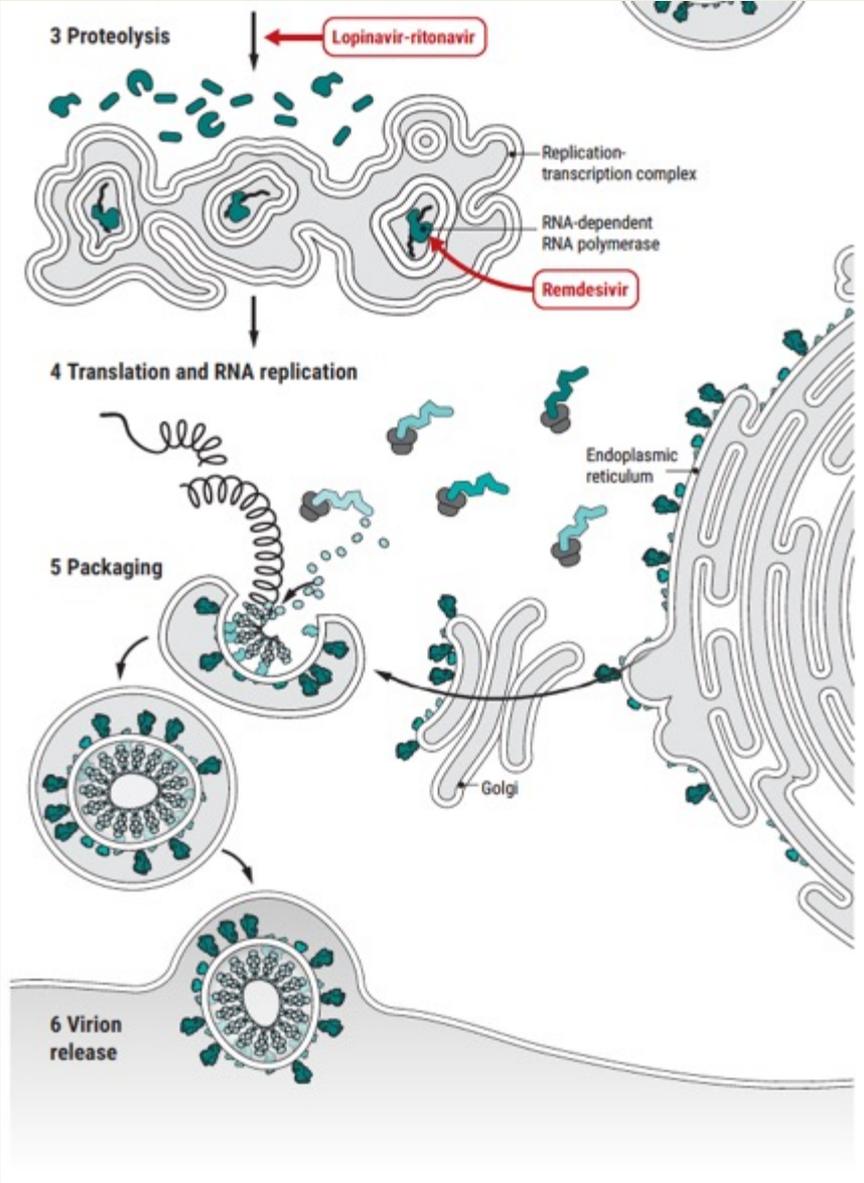
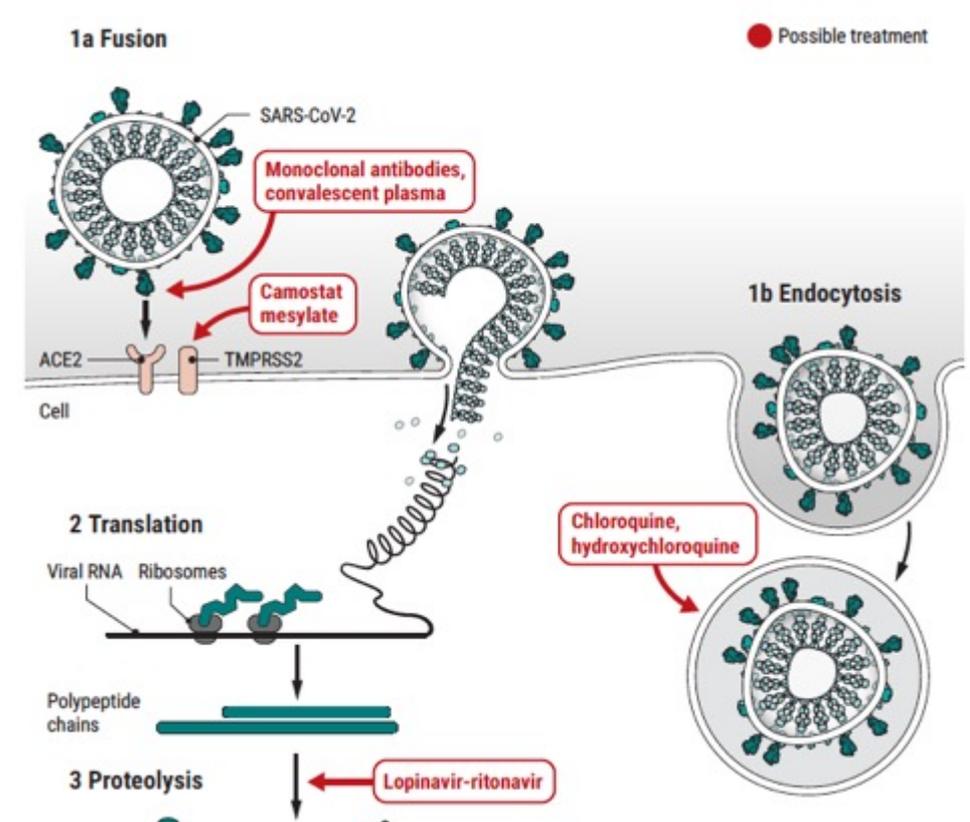
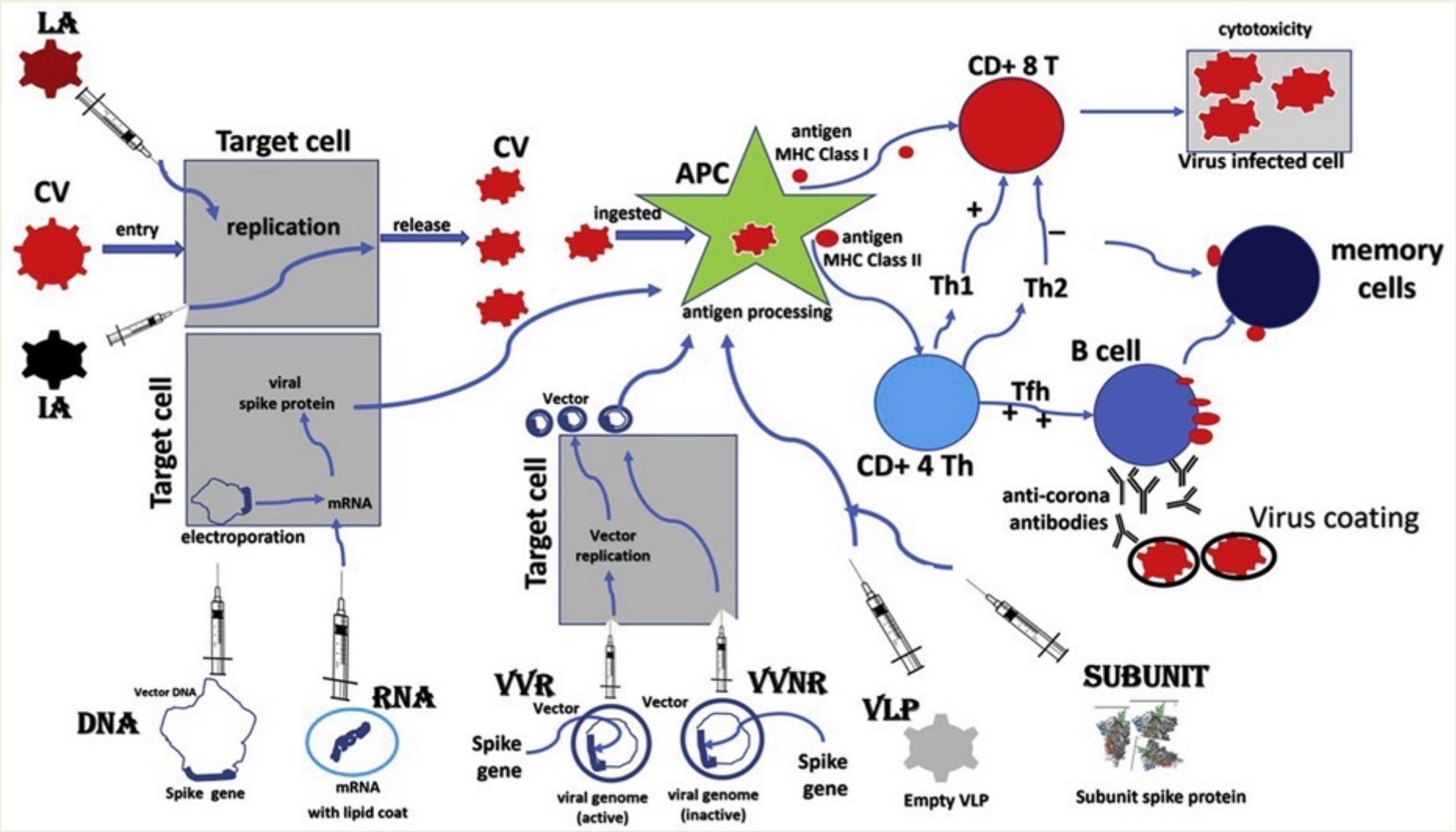


Figure 1
VACCINE STRATEGIES



<https://www.youtube.com/watch?v=I0TmBsHaGml>

Retrovirus

Classificazione:

La famiglia *Retroviridae* viene tradizionalmente suddivisa in 3 sottofamiglie

Basandosi sulla patogenicità:

- **Oncovirus** che causano trasformazione cellulare in vitro e in vivo
- **Spumavirus** che causano effetti citopatici in vitro ma non ancora associati ad alcuna patologia
- **Lentivirus** che inducono lentamente progressive compromissioni del sistema immunitario e neurologiche

Recentemente suddivisi in **7 generi**, molto diffusi nel regno animale, con tropismo per diversi tessuti e associati a patologie talvolta molto diverse

Isolati e caratterizzati due retrovirus patogeni per l'uomo:

HIV *human immunodeficiency virus* (un lentivirus): due sierotipi HIV-1 e HIV-2

HTLV *human T Lymphotropic virus* (un oncovirus): due sierotipi HTLV-1 e HTLV-2

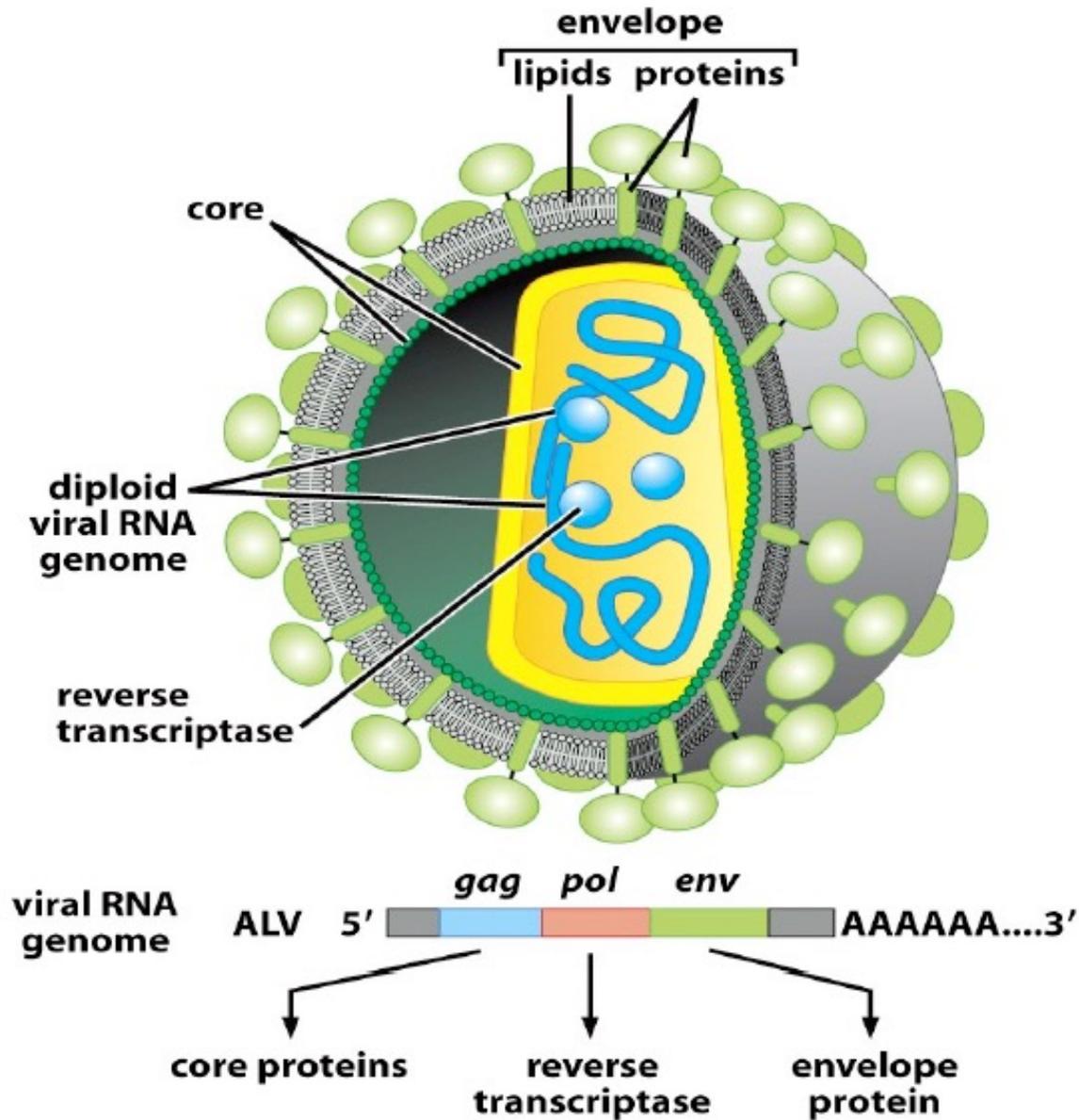
Retrovirus

Caratteristica:

Il virione, grossolanamente sferico, con diametro di 100-120 nm, contiene due catene identiche di **RNA genomico ss** a polarità positiva, un enzima DNA polimerasi RNA dipendente, la **trascrittasi inversa**, che **retrotrascrive** l'RNA virale in DNA, che viene poi **integrato** nel genoma della cellula ospite a opera dell'**integrasi virale**.

Tutti presentano **3 geni**: *gag*, *pol*, *env*

Retroviral structure



Retroviral transfer: Integration + receptors!!!

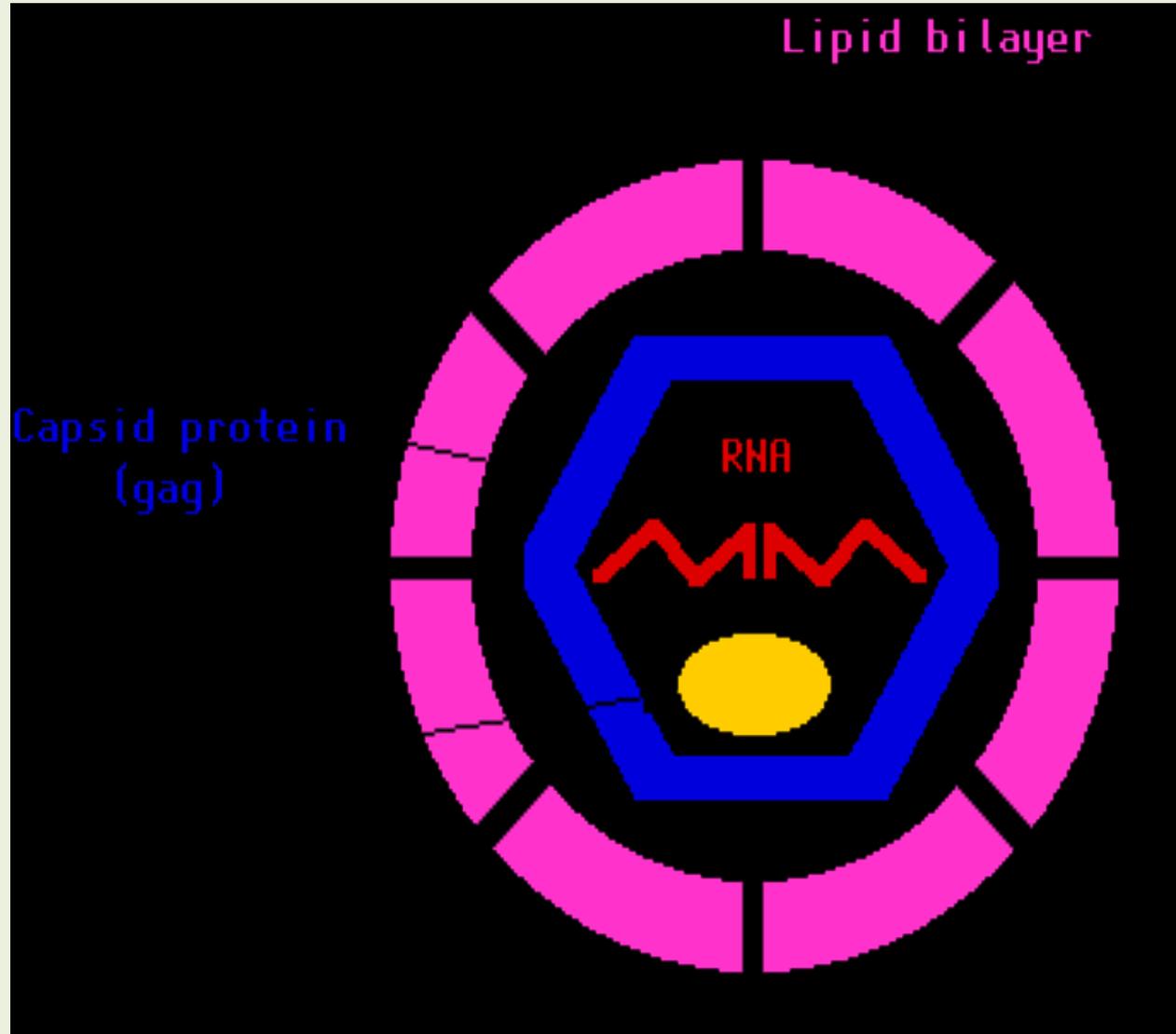
"minimal"
retrovirus

contains

Env

Gag

Pol



Scheme of retroviral genome

May also contain additional oncogene !!!



Genes for capsid, envelope, polimerase

packaging signal;
Allow encapsidation of
RNA

Repeated sequences:
Contains enhancer + allow insertion

TRASCRIPTASI INVERSA (RT/RNaseH)

Enzima virale essenziale per la replicazione con 3 funzioni:

- DNA-Polimerasi RNA-Dipendente
- DNA-Polimerasi DNA-Dipendente (simile alle DNA-Polimerasi cellulari).
- RNasi H (simile alle RNasi cellulari).

Circa 30 molecole per virione.

DNA-polimerasi ad alta percentuale di errore (1000/10.000 volte superiore alla DNA-Polimerasi cellulari). Ciò spiega, almeno in parte, la frequente insorgenza di mutanti.

Leggendo il filamento di RNA-transfer (primer) costruisce un filamento di DNA virale (Minus Strand analogo all'RNA virale) utilizzando le basi puriniche e pirimidiniche trifosforilate dagli enzimi cellulari.

Per la sua peculiarità è il principale bersaglio dei farmaci anti-HIV.

L'alta percentuale di errori rende le particelle virali antigenicamente disomogenee, e ciò rende conto della difficoltà di identificare vaccini efficaci contro i diversi ceppi virali.

6.3 The retroviral life cycle

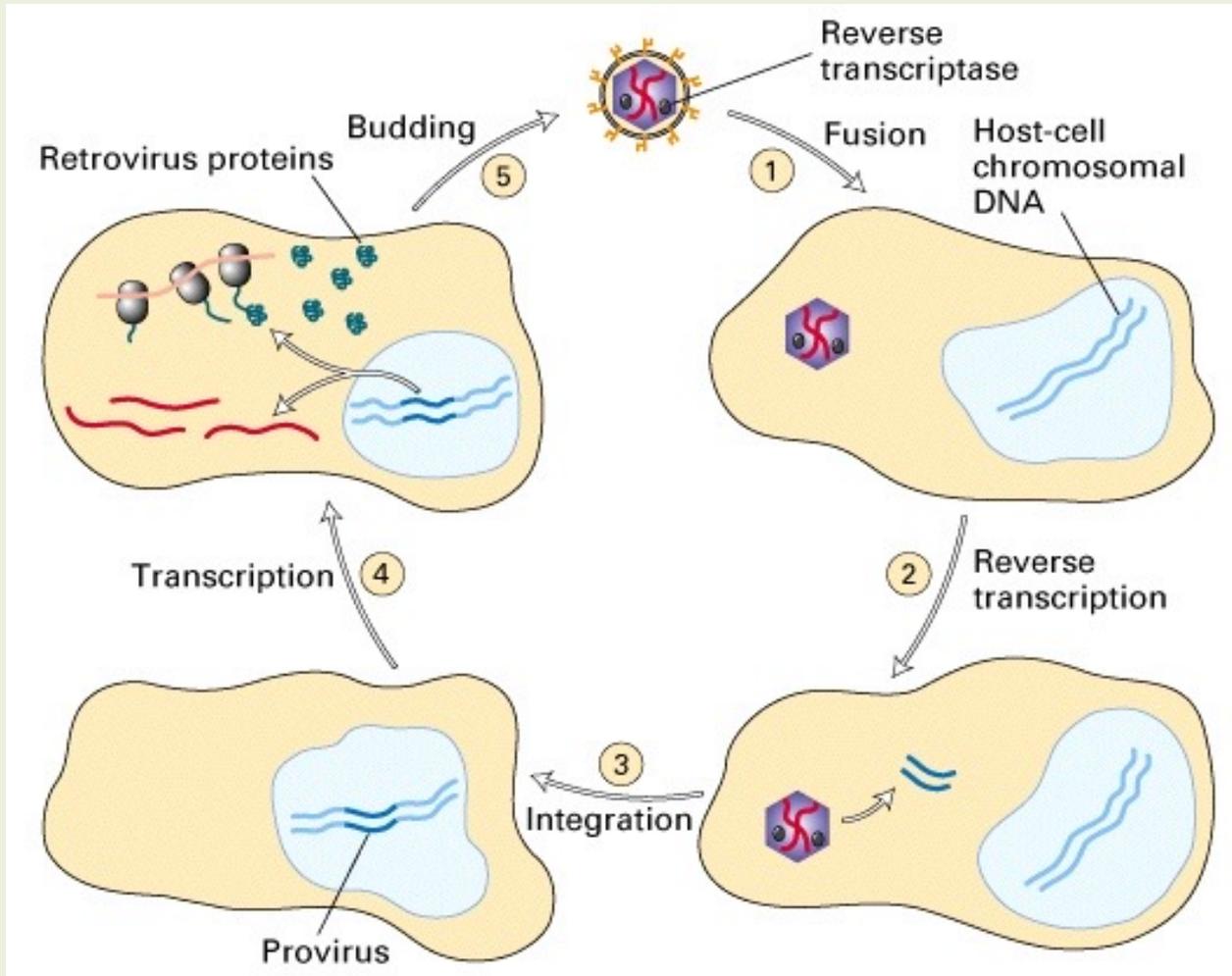


Figure 6-22

Retrovirus: ciclo replicativo

1. Legame VAP (gp)-Recettore
2. Fusione pericapside con membrana.
3. Penetrazione e Uncoating parziale
4. ssRNA → RT → dsDNA con LTR alle estremità (provirus)
5. DNA entra nel nucleo e si integra, per azione dell'integrasi (gene pol)
6. DNA trascritto dalla RNA pol cellulare
7. 2 specie RNA: spliced (codifica *env* e geni regolatori) e non-spliced (intero, nuovo genoma o poliproteina *gag/pol*)

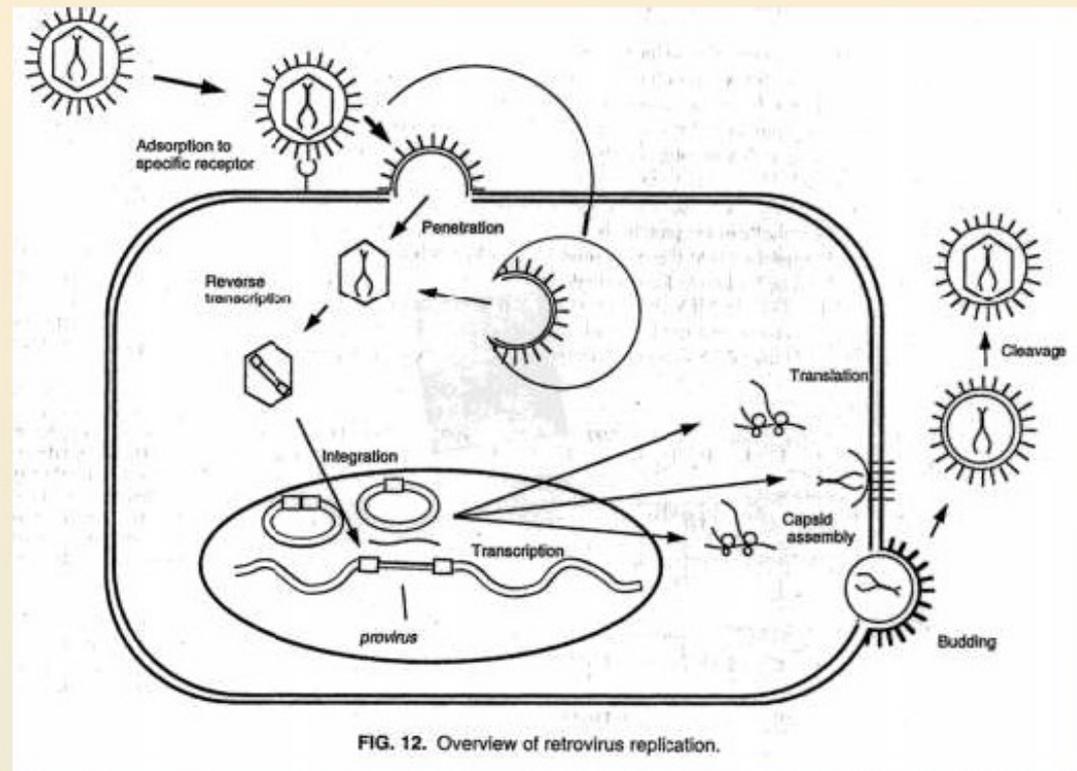
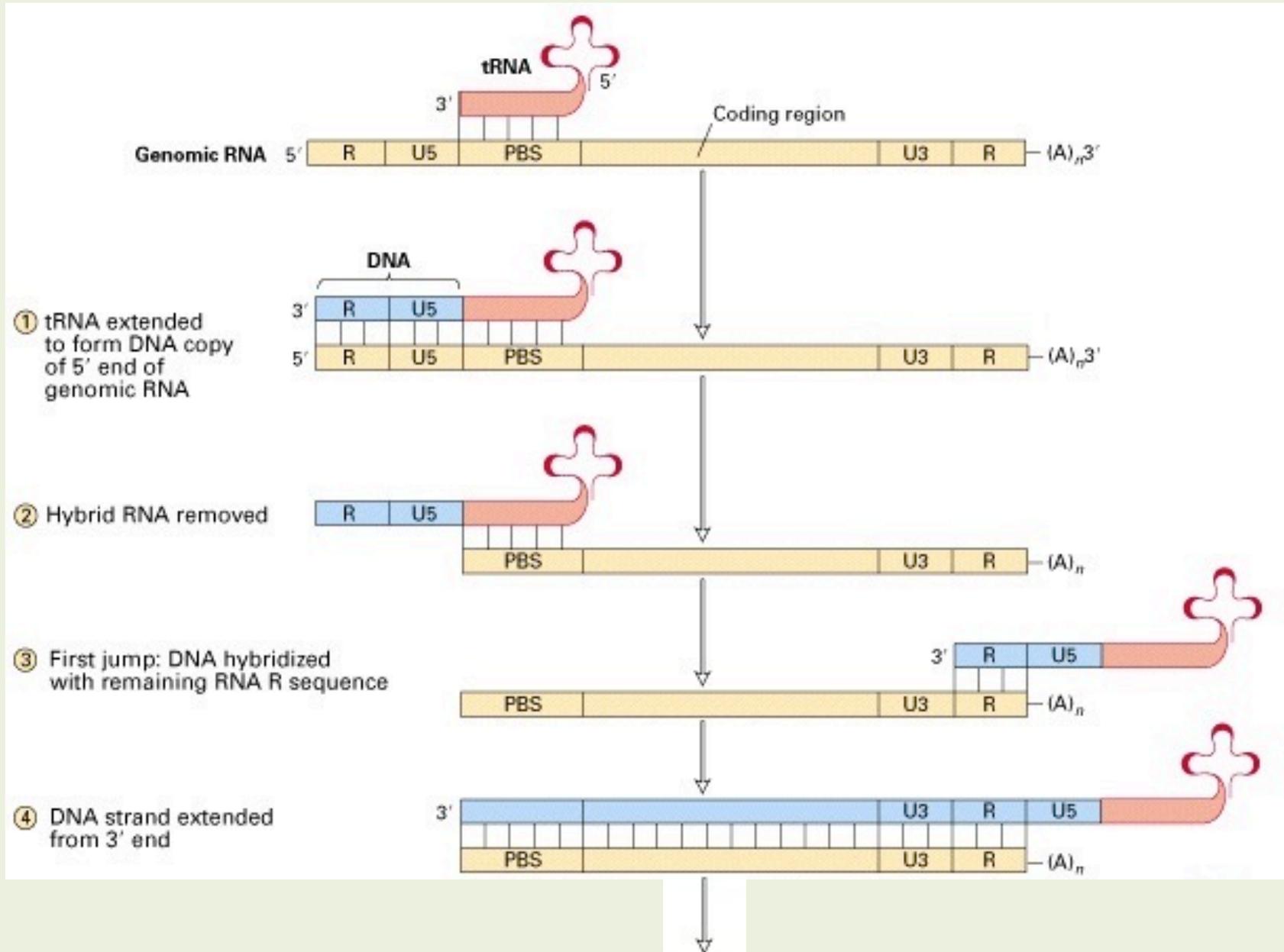


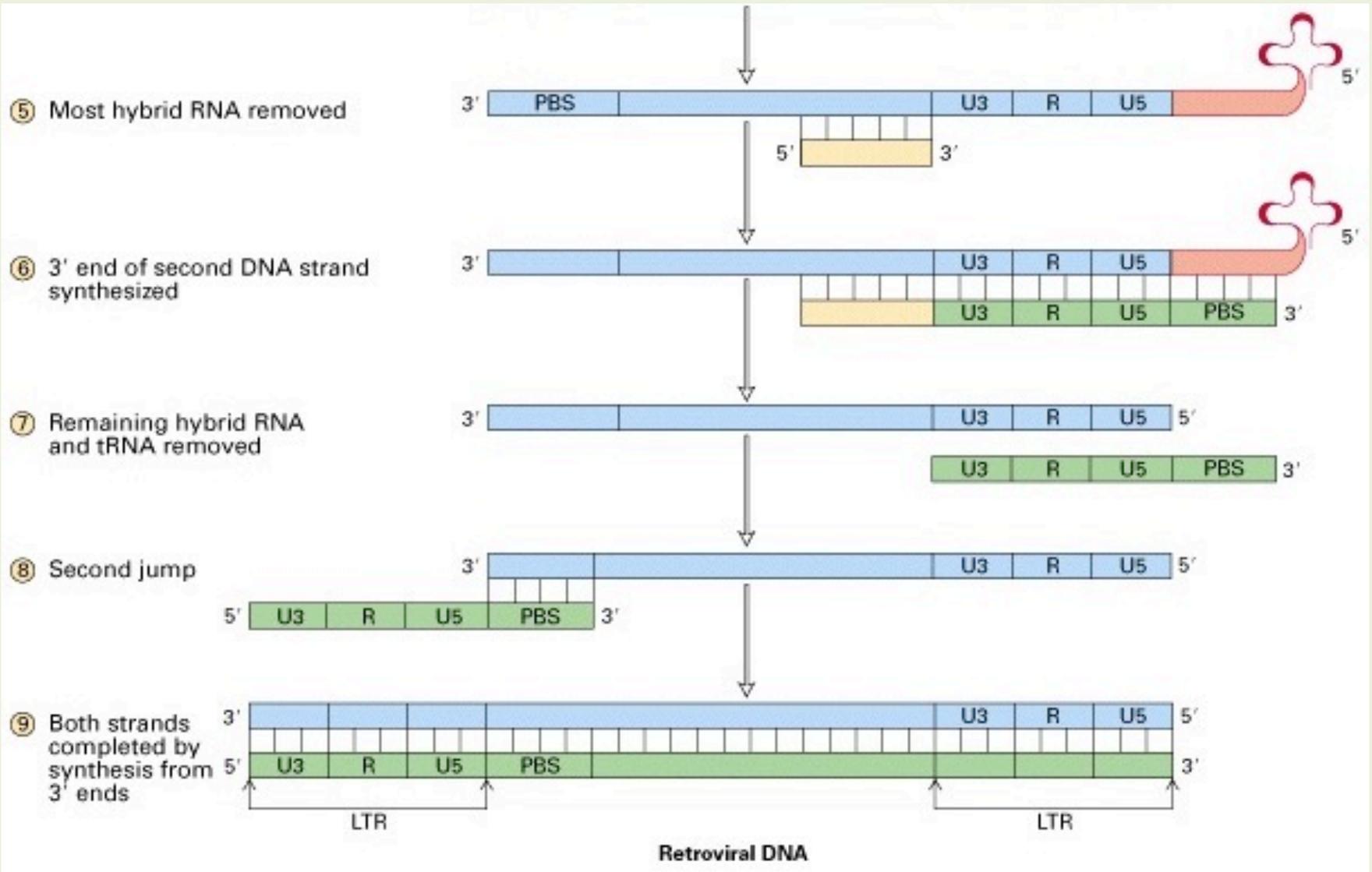
FIG. 12. Overview of retrovirus replication.

8. Le 2 proteine di membrana, codificate da *env*, attraverso RE e Golgi si inseriscono nella membrana cellulare: SU (riconosce il recettore) e TM (responsabile della fusione).
9. Taglio proteolitico delle proteine capsidiche (CA, MA, NC).
10. Le proteine capsidiche, codificate da *gag*, si assemblano attorno a genoma, RT e integrasi
11. Gemmazione attraverso la membrana, senza lisi o con lisi (soprattutto lentivirus)

Generation of LTRs during reverse transcription

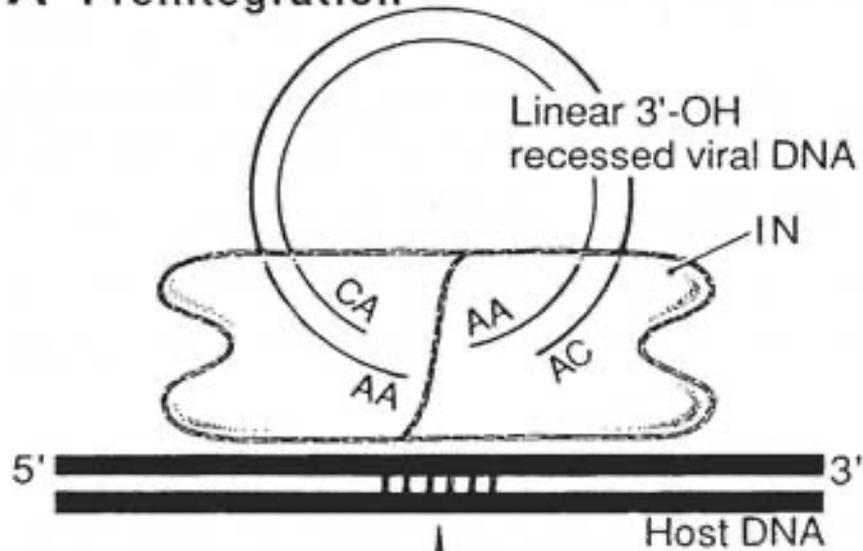


Generation of LTRs during reverse transcription of retroviral genomic DNA (2)

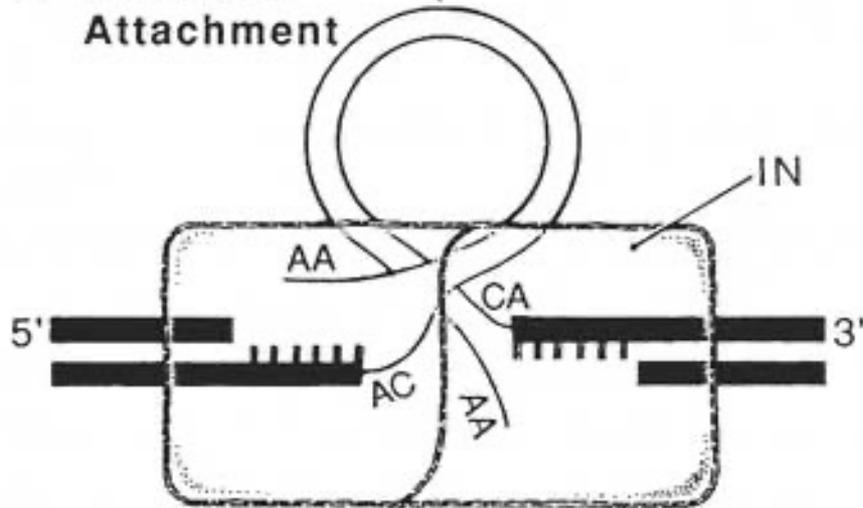


Retroviral integration

A Preintegration



B Covalent Attachment



9.3 Generation of retroviral genomic RNA from integrated retroviral DNA

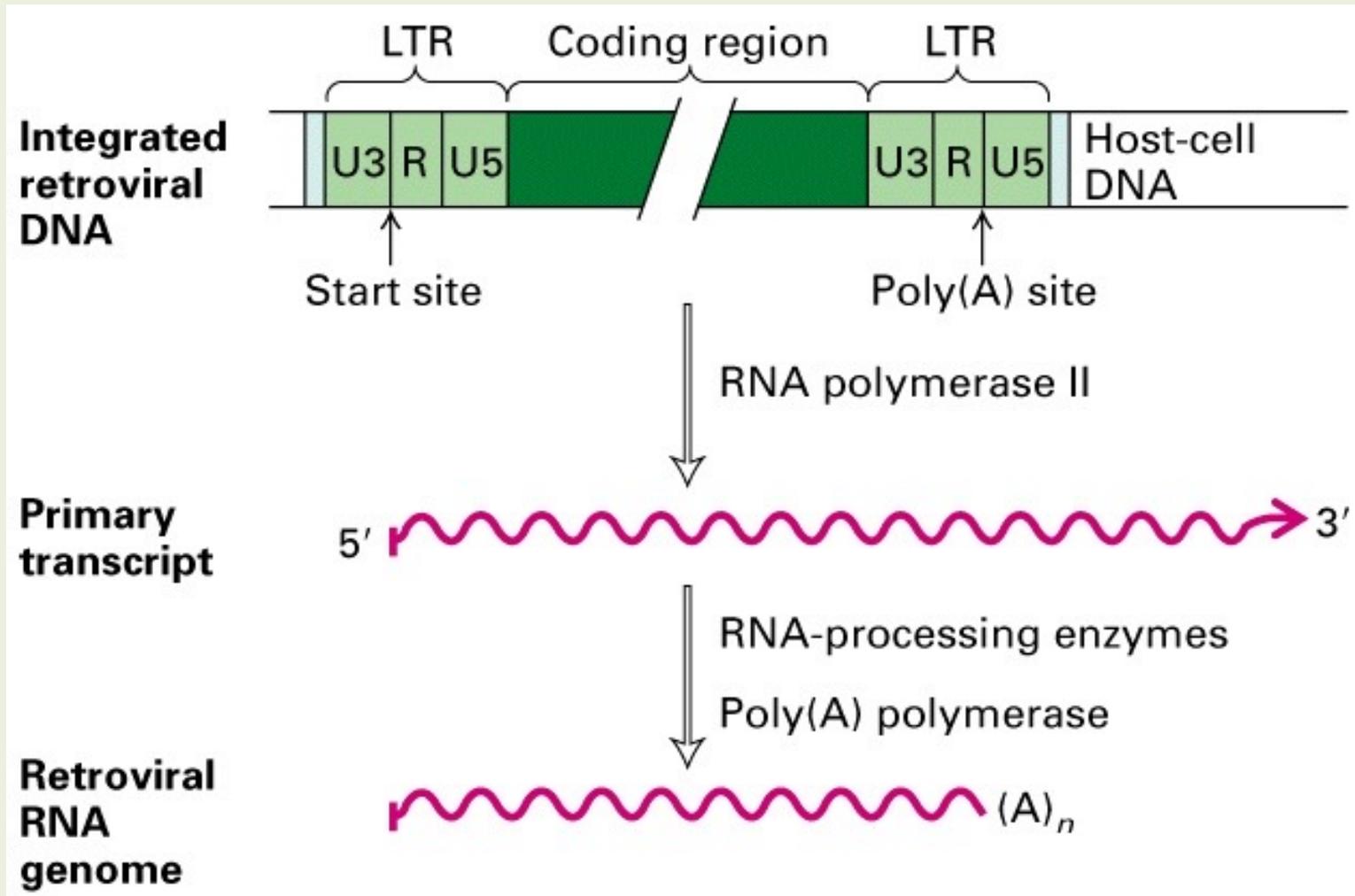
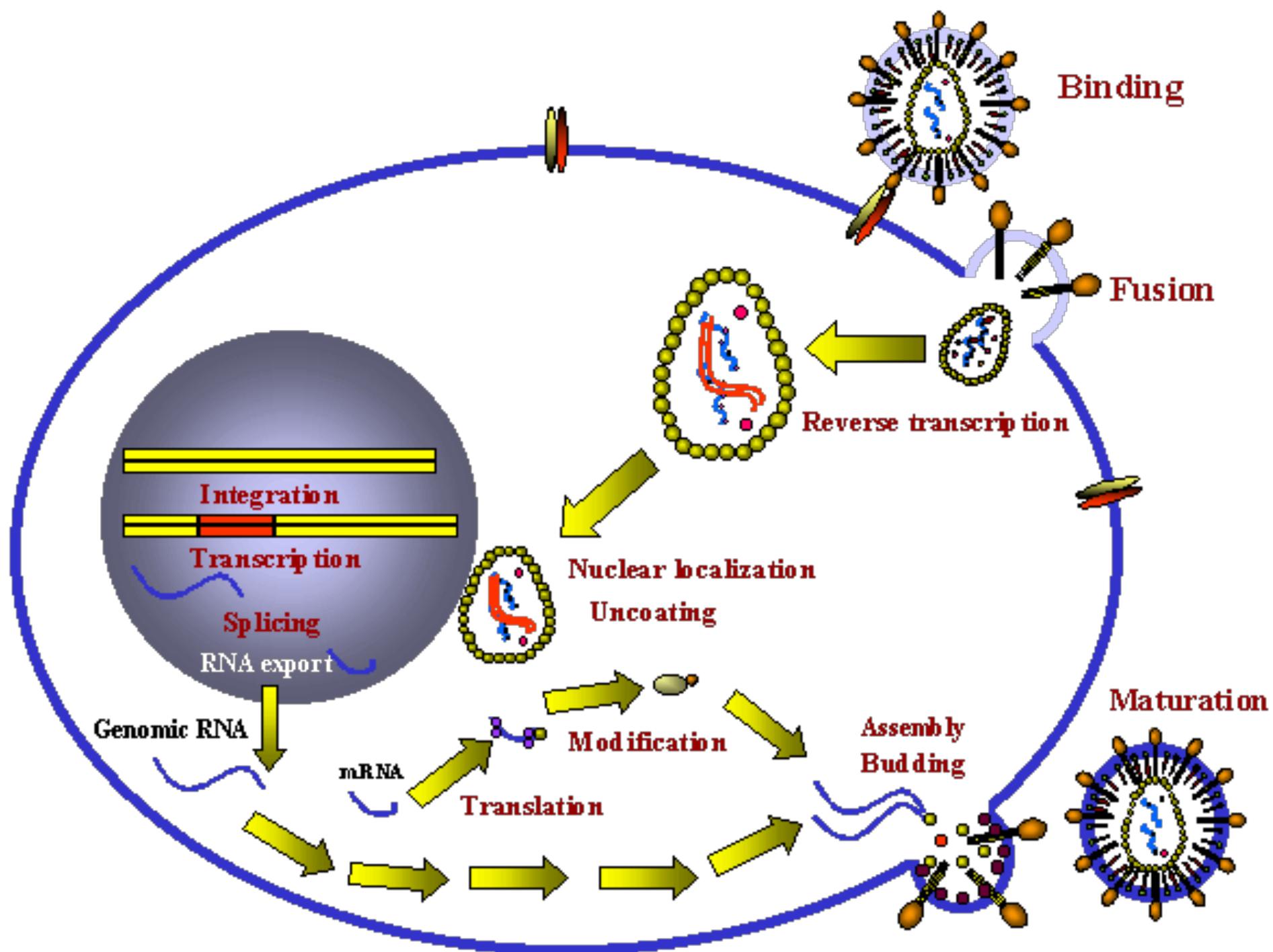
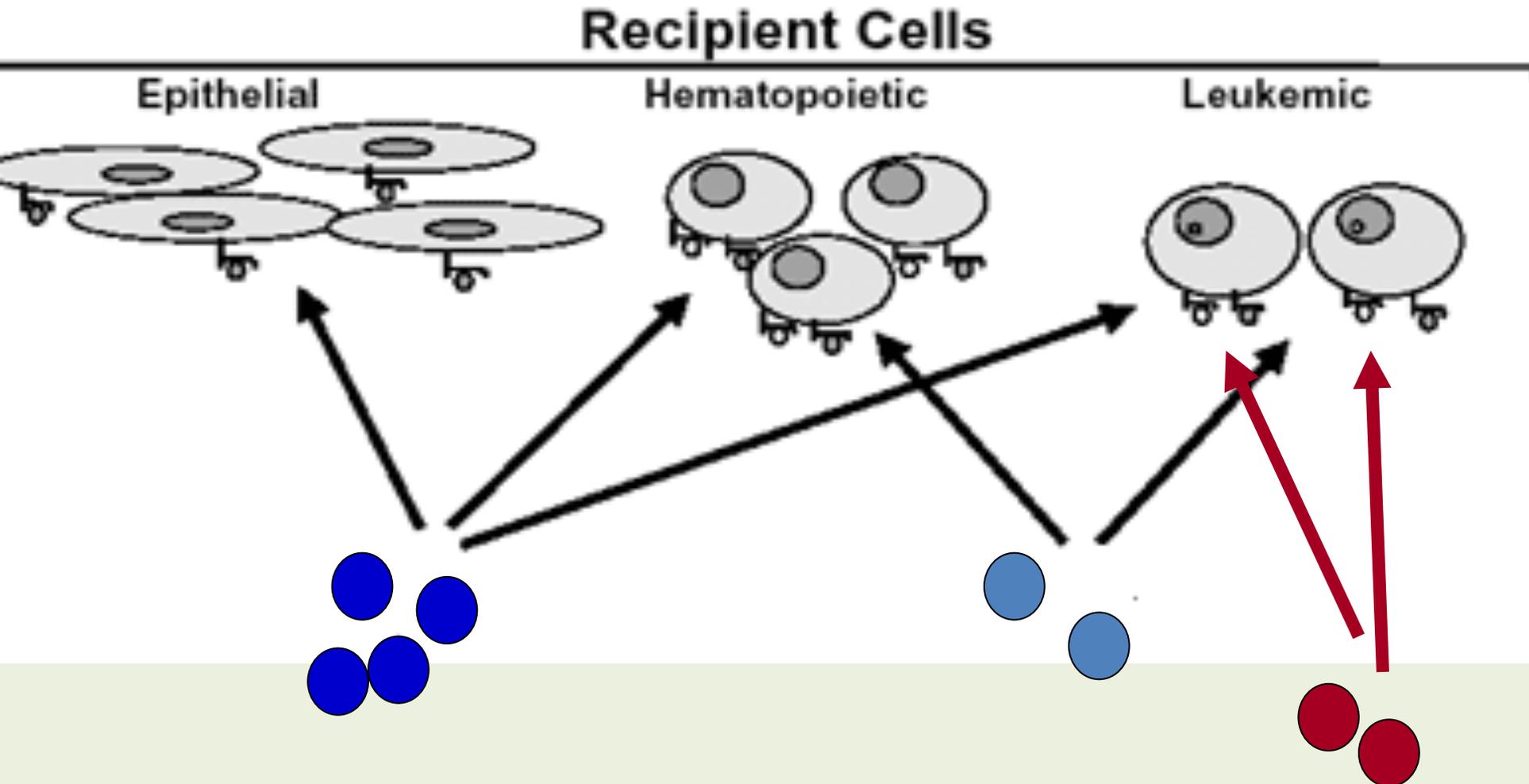


Figure 9-15



Specificity of Viral adhesion to the cell = specificity of viral delivery

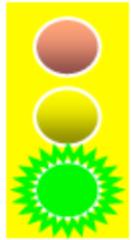


Il cancro e' una malattia dei geni: evidenze

Esistenza di anomalie cromosomiche associate ad alcune forme di tumori (Boveri, 1914).

- Raramente, alcuni tipi di tumori possono essere ereditari.**
- L'omogeneita' relativa delle cellule in un tumore suggerisce che le caratteristiche maligne di queste cellule siano geneticamente trasmesse alla progenie**
- La maggior parte delle sostanze cancerogene sono mutagene**
- Alcuni tumori possono essere indotti in animali attraverso dei virus che trasmettono un'informazione genetica (oncogene) nella cellula ospite (Retrovirus oncogeni acuti: Rous sarcoma virus; Harvey sarcoma virus).**

Geni che regolano la divisione cellulare



➤ Geni il cui prodotto proteico promuove un aumento del numero di cellule (**oncogeni**)

Oncogeni
= acceleratori



Oncosoppressori = freni



➤ Geni il cui prodotto proteico induce una riduzione del numero di cellule (**oncosoppressori**).

Oncogeni definiti come:

Geni che , quando attivati attraverso alterazioni genetiche, agiscono in maniera dominante (un singolo allele e' capace di produrre l'effetto oncogenico). La controparte normale degli oncogeni (i proto-oncogeni) puo' codificare per proteine coinvolte in vari meccanismi di controllo della crescita e della sopravvivenza cellulare

Esperimento di Peyton Rous

1911

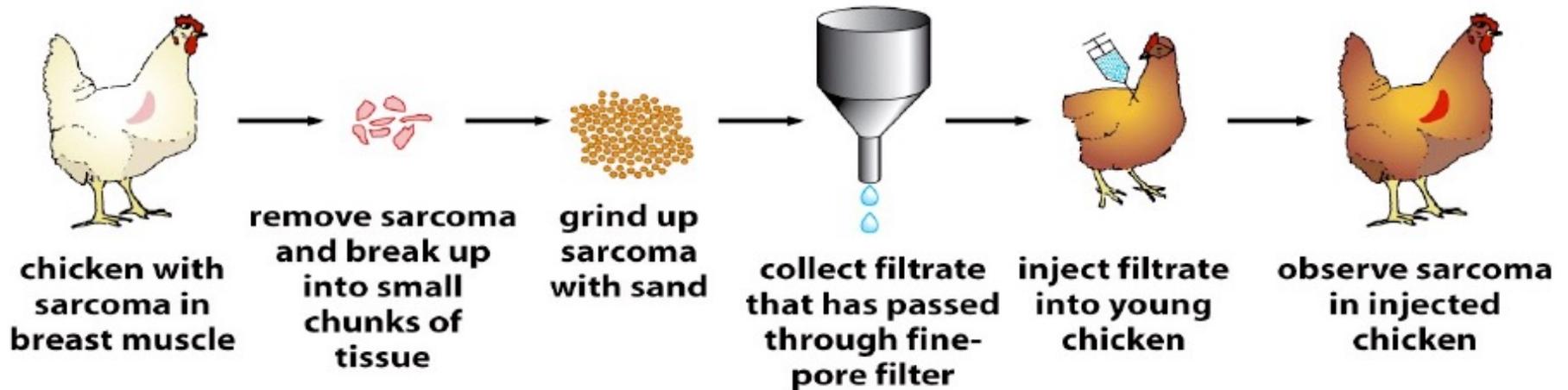


Figure 3.2 *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

Retrovirus oncogeni

Raggruppati in 3 gruppi principali in base al meccanismo di oncogenesi

**1. Trasduzione retrovirale di un oncogene
(retrovirus trasducenti acuti)**

**2. Attivazione oncogenica per inserzione retrovirale
(Cis-acting / retrovirus non trasducenti/lenti)
Replication competent viruses and insertional mutagenesis**

**3. Oncogenesi mediata da proteine essenziali del retrovirus
(retrovirus trans-attivanti / nontrasducenti a lunga latenza)
Replication competent viruses with transacting functions,
ad esempio HTLV-1**

1. Acutely transforming or transducing

- Contengono oncogeni (**v-onc**)
- Difettivi nella replicazione
- Inducono tumori policlonali (100% efficienza) in pochi giorni
- Trasmissione orizzontale

1. Acutely transforming or transducing

- **Il v-onc origina da un c-onc che viene incorporato nel genoma di un retrovirus che ha capacità replicativa**
- **Il v-onc differisce dal c-onc per:**
 - Mancanza di introni
 - Gene troncato (es. v-src)
 - Presenza di mutazioni puntiformi (es. v-ras)
 - Frequente fusione tra gene virale e oncogene (es. gag-onc or env-onc)
 - Espressione molto elevata sotto controllo dell'LTR

ALCUNI RETROVIRUS HANNO UN GENE EXTRA

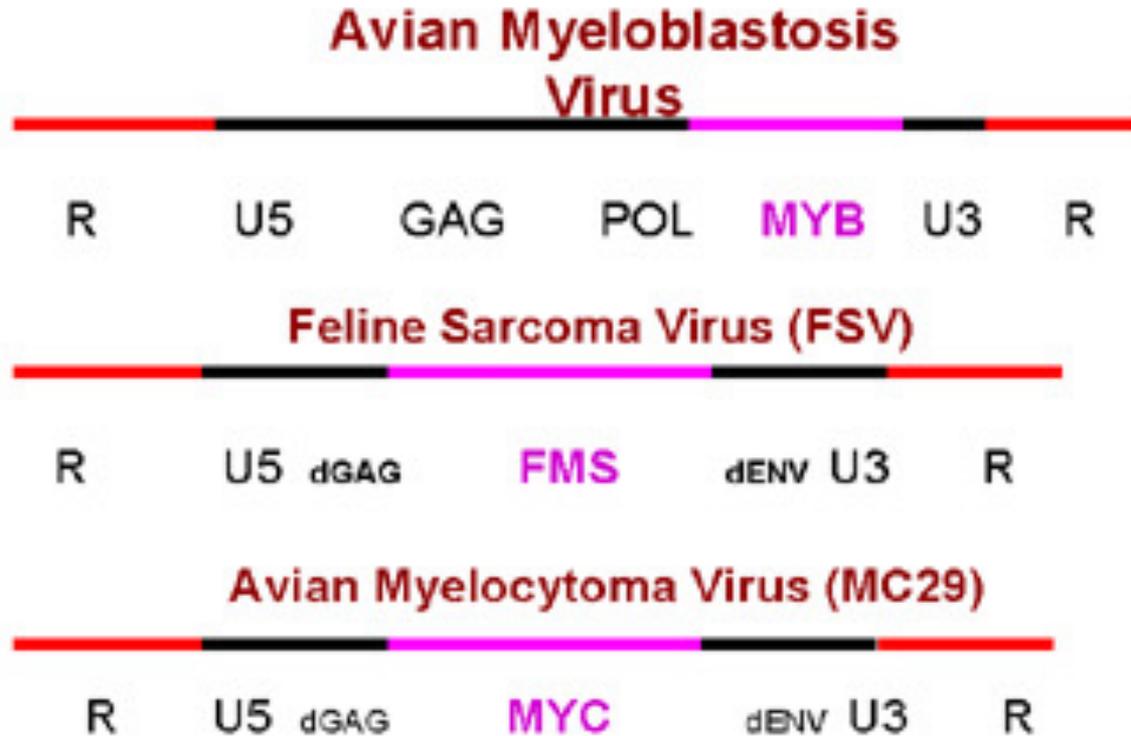
“typical retrovirus”



Rous Sarcoma Virus



ALCUNI RETROVIRUS PRESENTANO ONCOGENI AL POSTO DI GENI VIRALI



Quale è la normale funzione di un oncogene cellulare (proto-oncogeni)?

I c-onc sono geni normali cellulari che vengono espressi in alcune fasi del ciclo vitale della cellula (durante replicazione e differenziamento)

Sono generalmente proteine importanti per crescita cellulare (es. Fattori di crescita o recettori per fattori di crescita)

FUNCTION OF PROTO-ONCOGENE- ENCODED PROTEINS

EXAMPLE

Control of DNA transcription (found in nucleus)

myc

Signaling of hormone/growth factor binding such as a tyrosine kinase

src is a membrane-bound tyr kinase.

GTP-binding proteins involved in signal transduction from a surface receptor to the nucleus

ras

Growth factors

sis is an altered form of platelet-derived growth factor B chain

Growth factor receptors

erb-B is a homolog of the epidermal growth factor receptor (it is also a tyrosine kinase). *fms* is a homolog of the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) receptor

Simian Sarcoma Virus	v-sis	Fattore di crescita
Avian Erthyroblastosis Virus	v-erbB	Recettore del fattore di crescita
Rous sarcoma virus	v-src	Tirosin chinasi
Kirsten murine sarcoma virus	v-kras	Proteina G
Moloney murine sarcoma virus	v-mos	Serin/treonin chinasi
MC29 avian myelocytoma virus	v-myc	Fattore di trascrizione

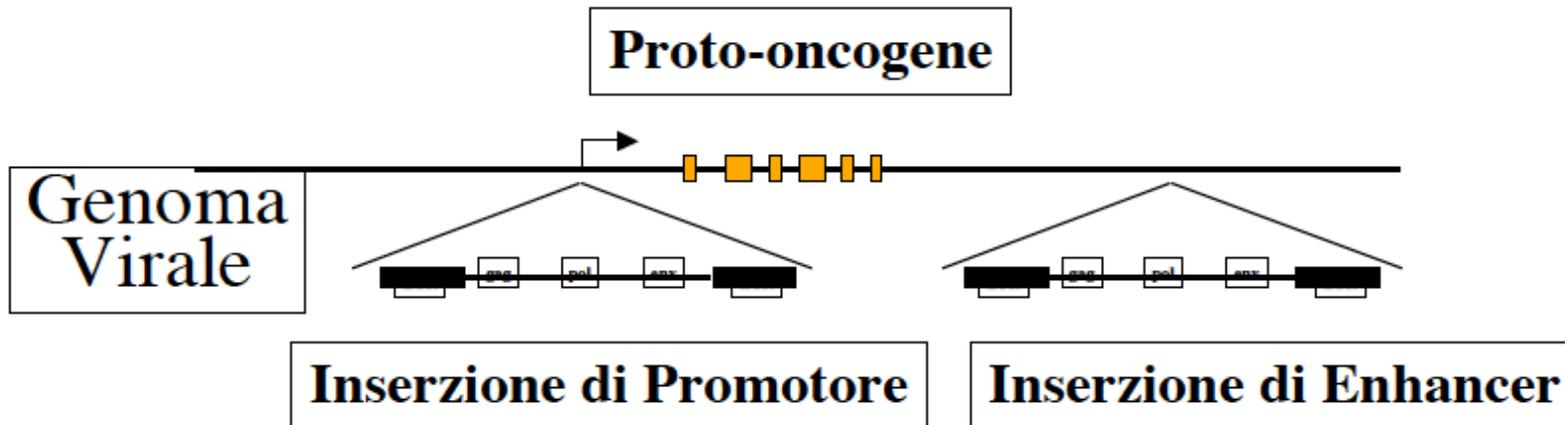
Retrovirus oncogeni

2. Attivazione oncogenica per inserzione retrovirale

**Replication competent viruses and insertional mutagenesis
(chronically transforming retroviruses)**

Un pathway alternativo per l'oncogenesi virale

I retrovirus che non hanno v-onc possono attivare c-onc



Alcuni retrovirus possono trasformare attraverso Mutagenesi Inerzionale

- inserzione di retrovirus in loci di proto-oncogeni
- Le LTR virali (promoter or enhancers) attivano l' espressione di c-onc

2. Replication competent viruses and insertional mutagenesis

Non hanno un v-onc. Es. avian leukosis virus (ALV).

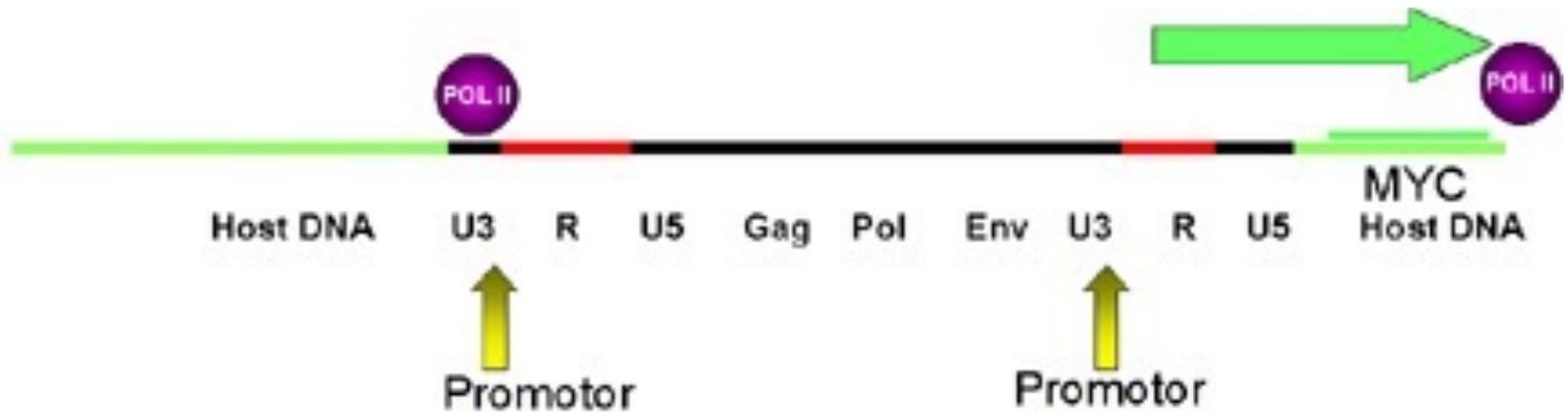
Provirus SEMPRE integrato nella stessa posizione del genoma cellulare (importante!!). Es. Nei tumori indotti da ALV, il provirus è sempre integrato vicino al gene c-myc

Evento cruciale per la trasformazione è perciò raro e le cellule che formano un tumore sono un clone (tumori monoclonali)

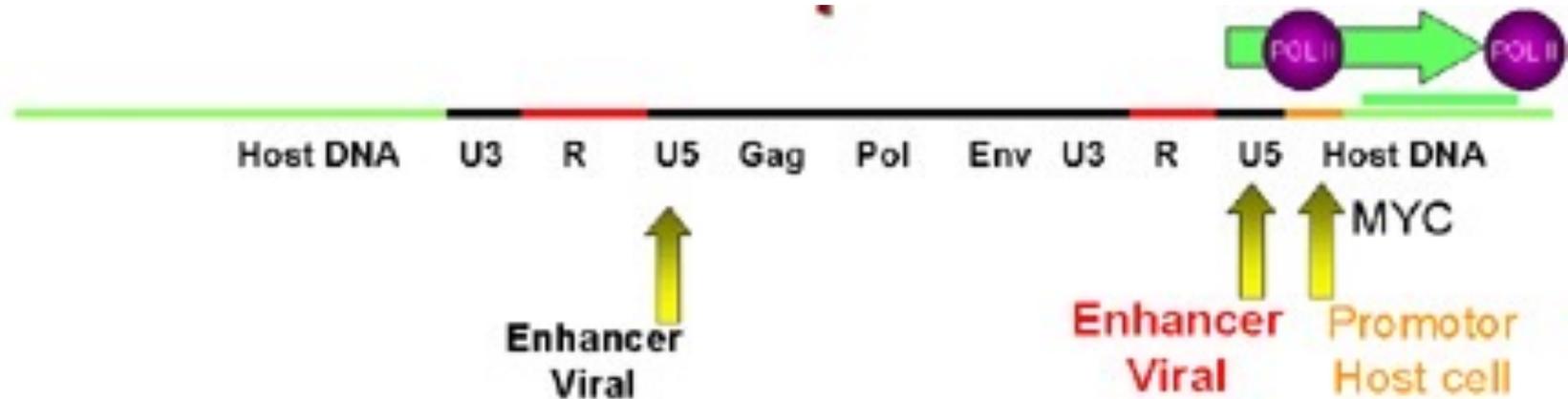
L'inserzione del retrovirus vicino a c-myc aumenta l'espressione della proteina cellulare e la rende indipendente dai normali sistemi di controllo

Il risultato finale è lo stesso che si avrebbe se il virus codificasse un v-onc

Attivazione della trascrizione di un gene cellulare da parte delle LTR virali



L'effetto può essere anche legato all'attività enhancer di specifiche sequenze virali



Mutagenesi inserzionale

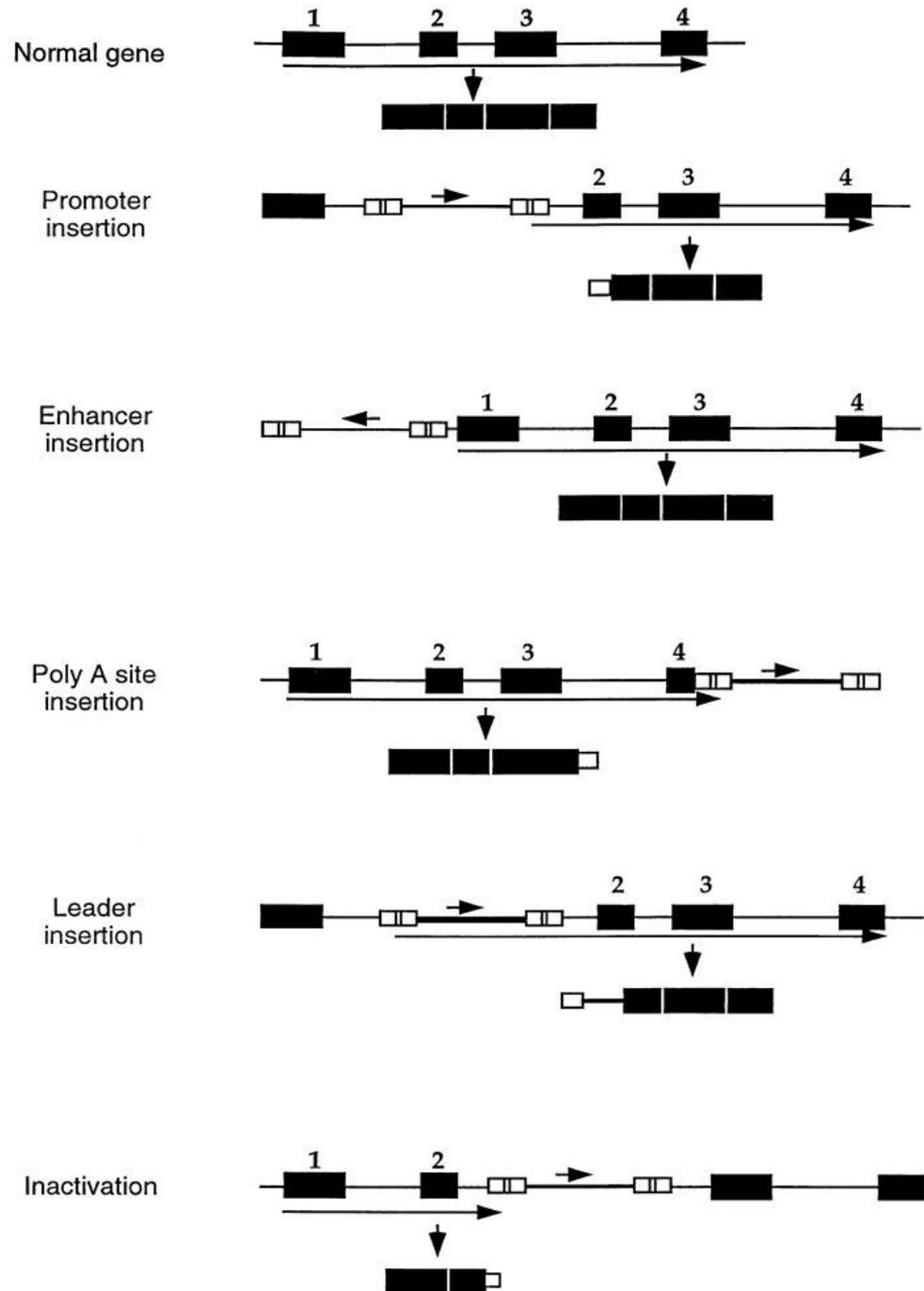
Target dell' attivazione inserzionale

Fattori trascrizionali [es. c-myc, N-myc, c-myb, Fli1, Fli2, Ets1, Evi1 (Fim3), Bmi1 (Flvi2), Spi1 (PU.1)]

Fattori di crescita [es. Wnt1 (Int1), Wnt3 (Int4), Int2 (Fgf3), and Fgf8]

Recettori per fattori di crescita [es. c-erbB, Int3 (Notch4), Mis6 (Notch1), c-fms (Fim2), recettore prolattina, Fit1]

Geni di segnali di trasduzione [es. serina/treonina kinasi Pim1 and Pim2]



Retrovirus oncogeni

3. Oncogenesi mediata da proteine essenziali del retrovirus (retrovirus trans-attivanti / nontrasducenti a lunga latenza)

Replication competent viruses with trans-activating functions

3. Replication competent viruses with trans-activating functions

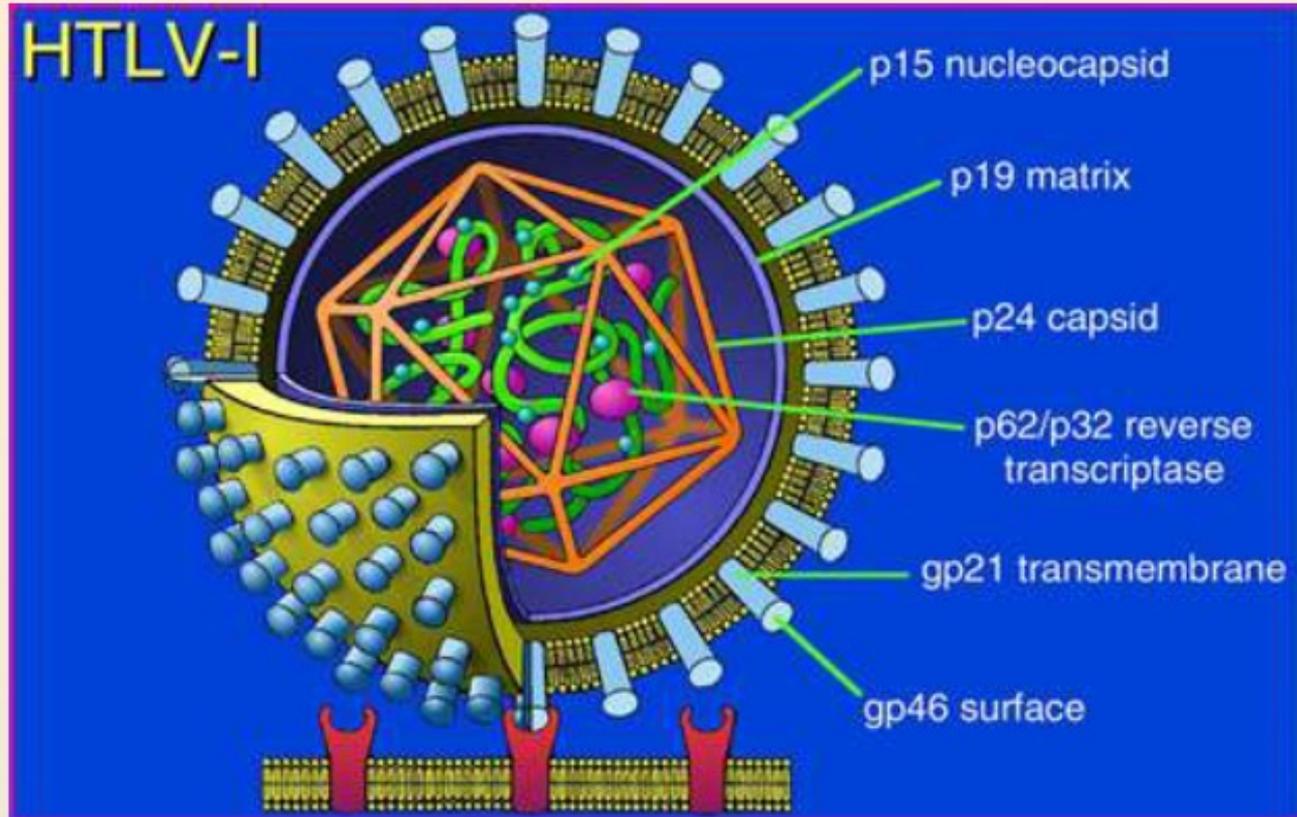
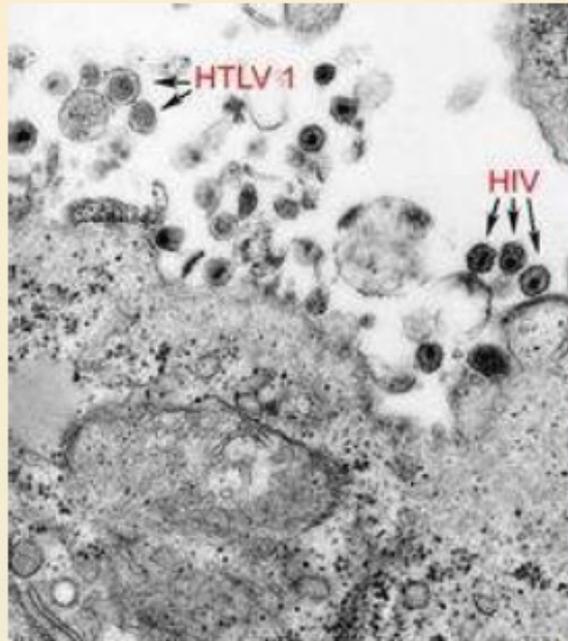
Trans-activating non-defective oncoviruses:

Human T Cell Leukaemia virus tipo I e II

HTLV-1

- Human T Cell Leukemia Virus
- Isolato nel 1980 da linea cellulare derivata da un linfoma T-cutaneo
- Agente eziologico della leucemia-linfoma a cellule T dell'adulto (ATL), forma molto aggressiva di leucemia che coinvolge anche la cute (linfoma cutaneo)
 - [HAM/TSP \(mielopatia associata a HTLV/paraparesi tropicale spastica\)](#)
- **Azione trasformante**, non citocida
- Morfologia di tipo C, con nucleocapside centrale e isometrico

HTLV-1: virione

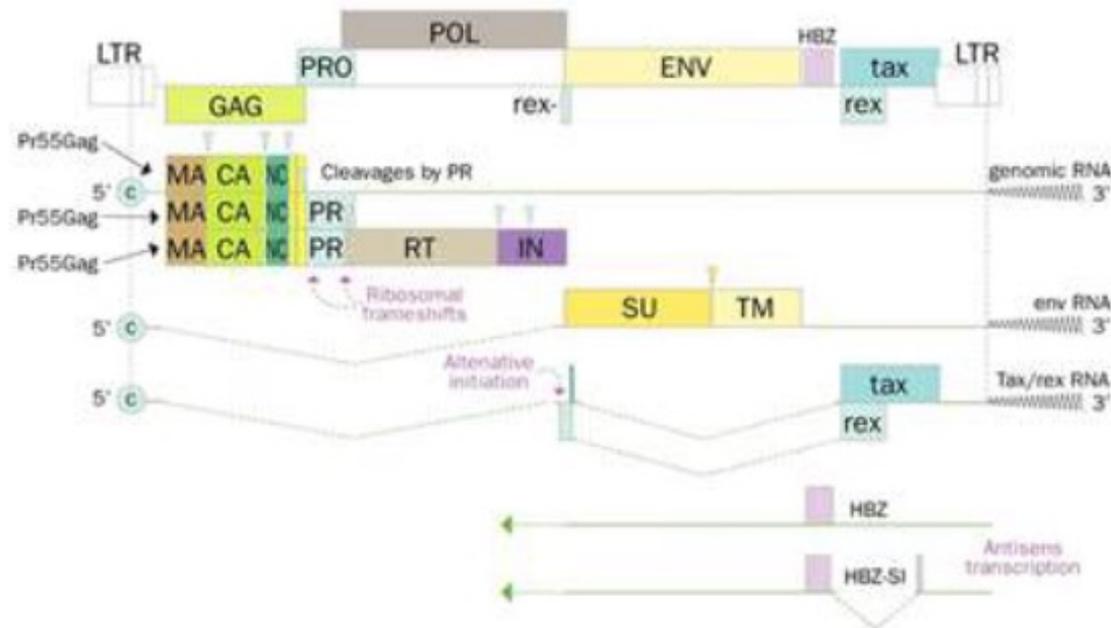


Genere Delta-retrovirus. Diametro 80-100 nm \emptyset . Contiene 2 copie di genoma ssRNA(+) con RT, integrasi e proteasi.

Distinto in 4 sottotipi: **A** (Cosmopolitan), **B** (Central African group), **C** (Melanesian group), **D** (New Central African group).

HTLV-1: Genoma

Regione PX



Proteine
strutturali

Proteine
regolatorie

Lineare, dimerico, ssRNA(+) di 8,5 kb, con 5'-cap e 3'poly-A tail. Due LTR di circa 600 nt alle terminazioni 5' e 3' (U3, R e U5). Contiene anche PBS in 5' e PPT in 3'.

Gag precursore p55: NC=p15, MA=p19, CA=p24

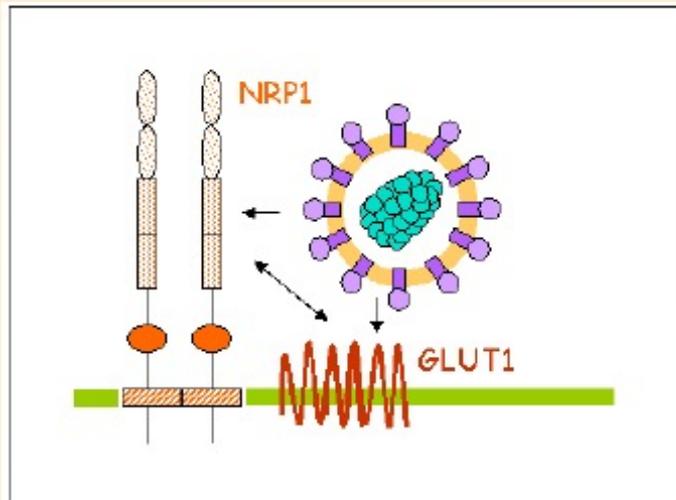
Pol: RT e altri enzimi (PRO=proteasi)

Env precursore gp61/68: SU=gp46, TM=gp21

Tax (p40) e **Rex** (p17, p21) geni spliced.

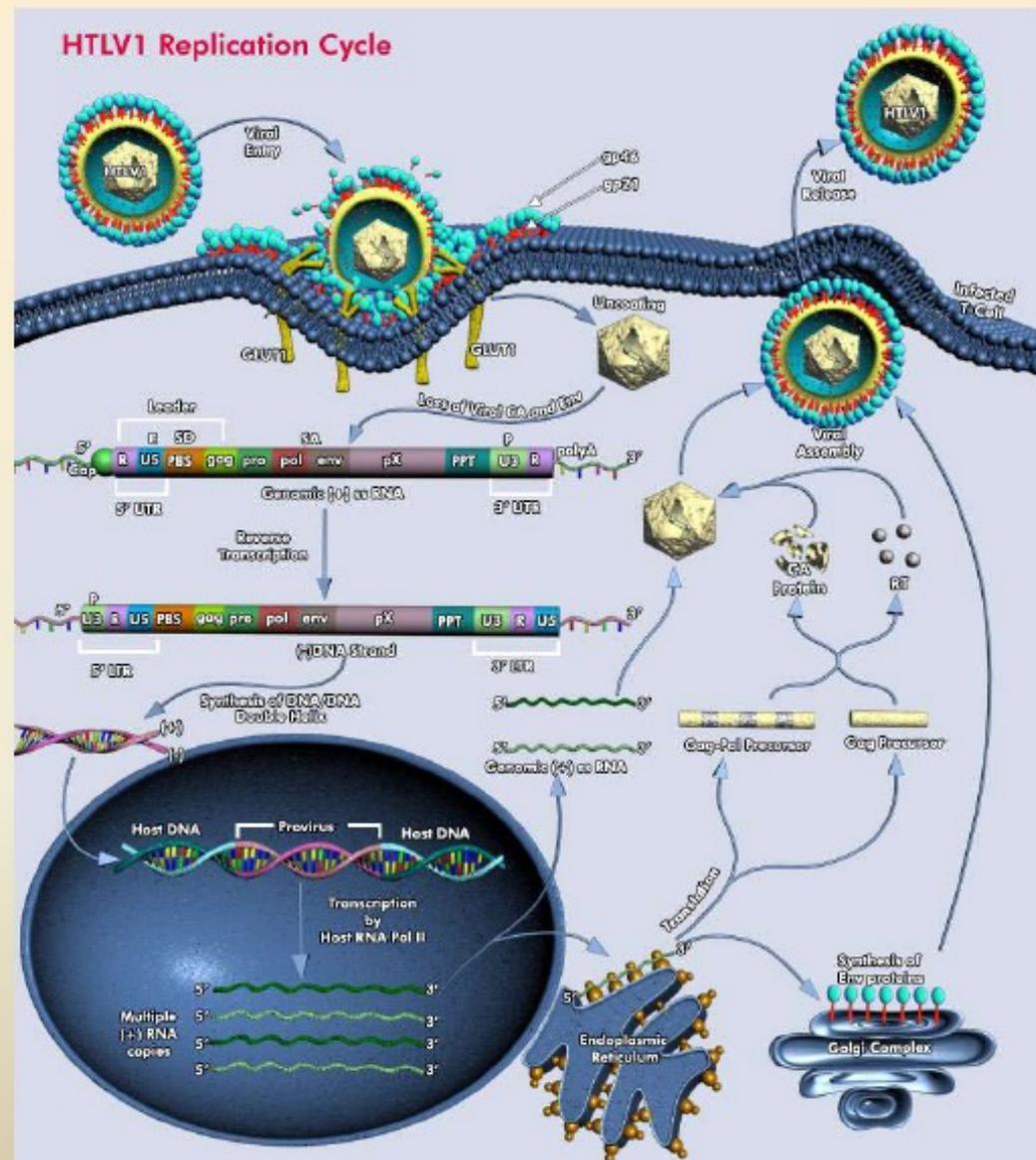
HBZ = proteina antisense (basic leucine zipper factor) importante nella regolazione della replicazione virale.

HTLV-1: Infezione



Primo recettore identificato (2003): **GLUT1** (ubiquitous glucose transporter). **HSPG** (heparan sulfate proteoglycans) sono necessari per l'entry efficiente del virus. Anche **NRP-1** (Neuropilin 1) funge da recettore per HTLV-1 (2006). GLUT1 è coinvolto anche nella trasmissione del virus cellula-cellula. Infetta pref. linf T CD4+ (ma non è il recettore).

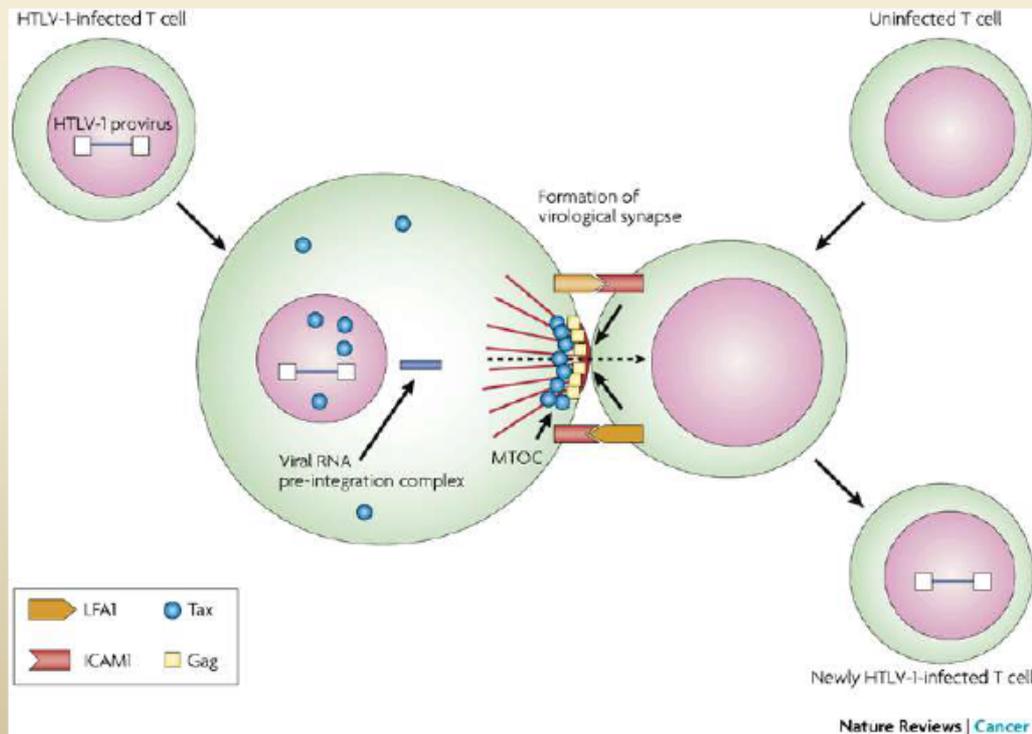
Ciclo replicativo tipico.



HTLV-1: trasmissione

A differenza di altri retrovirus, il virus isolato è scarsamente infettante; per l'infezione è necessario il **contatto fra un linfocita infetto ed un linfocita attivato** → difficile trasmissione interumana (**sangue**, rapporti **sessuali**, **madre-neonato**, **allattamento**).

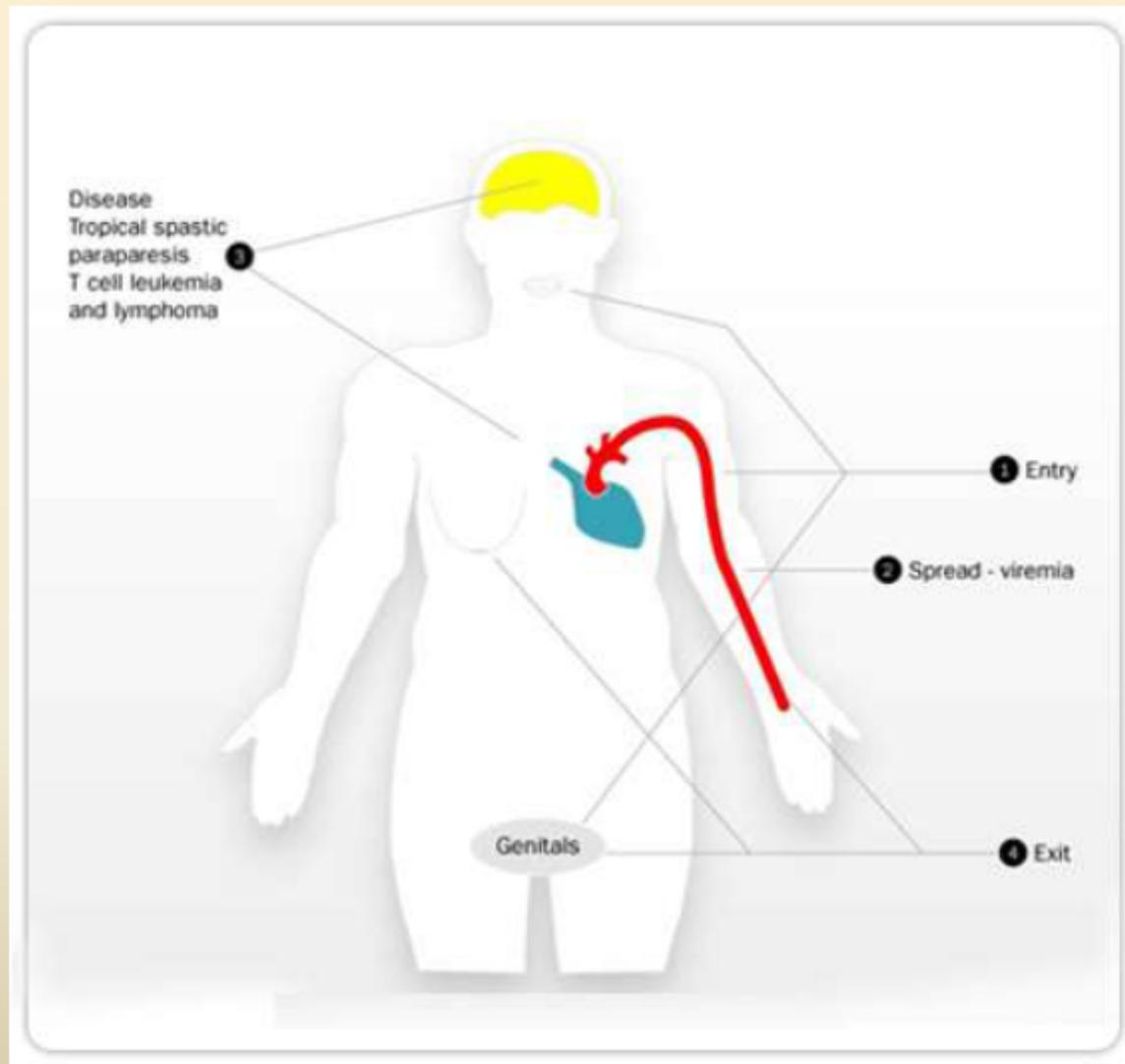
Il contatto crea una “sinapsi virale” attraverso cui il genoma è trasmesso dalla 1^a alla 2^a cellula. **LFA1** (Lymphocyte Function-associated Antigen1) e **ICAM** mediano la formazione del contatto. **Tax** contribuisce a formare il centro di organizzazione microtubulare (MTOC).



HTLV-1: importanza clinica

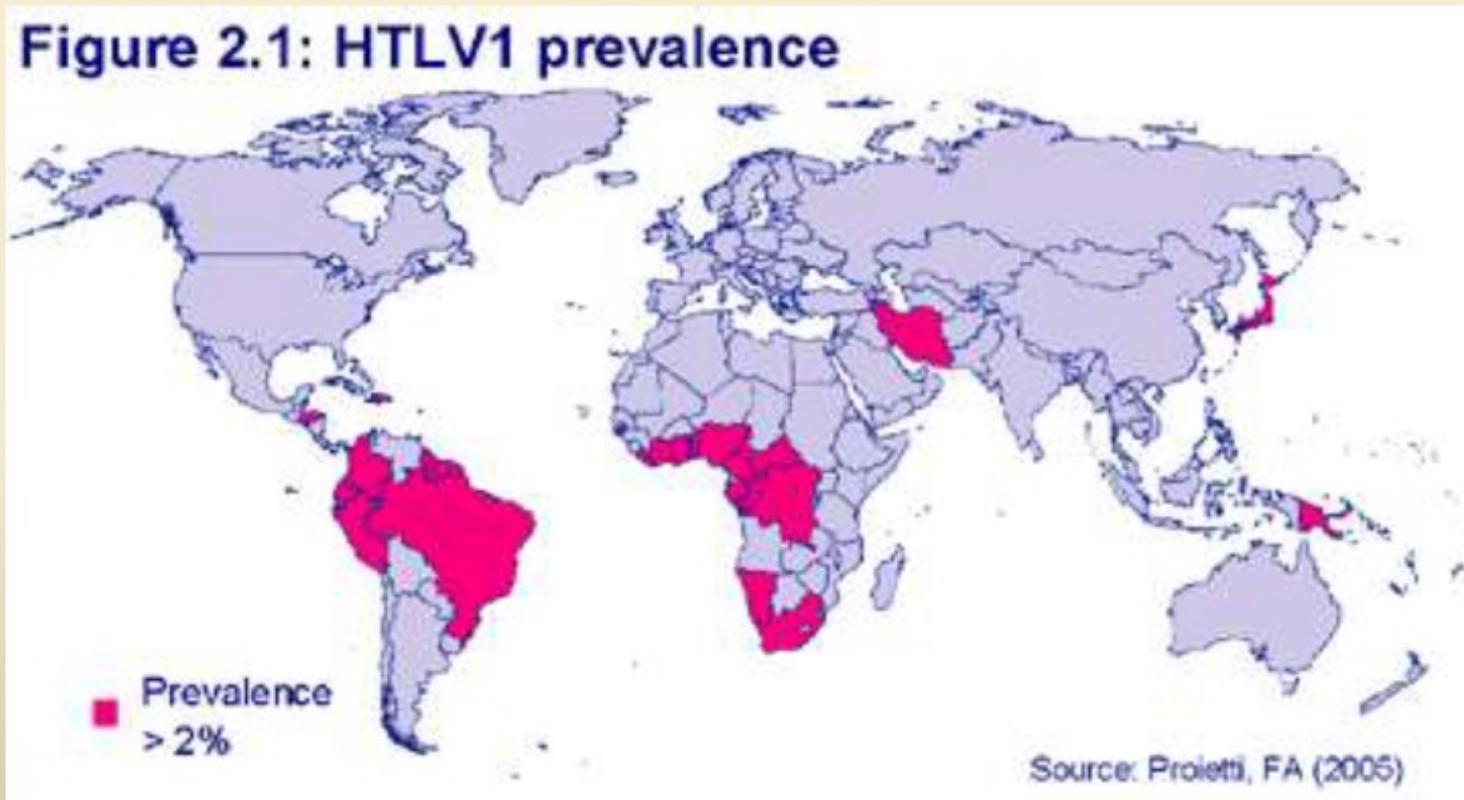
Associato a **leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto**, malattia abbastanza rara ed aggressiva. In Giappone l'incidenza della leucemia è di 1 caso ogni 1500 adulti infettati.

Associato anche a **encefalomielopatie croniche** (paraparesi spastica tropicale). Provoca inoltre infezioni **asintomatiche** (molto frequenti).



HTLV-1: prevalenza

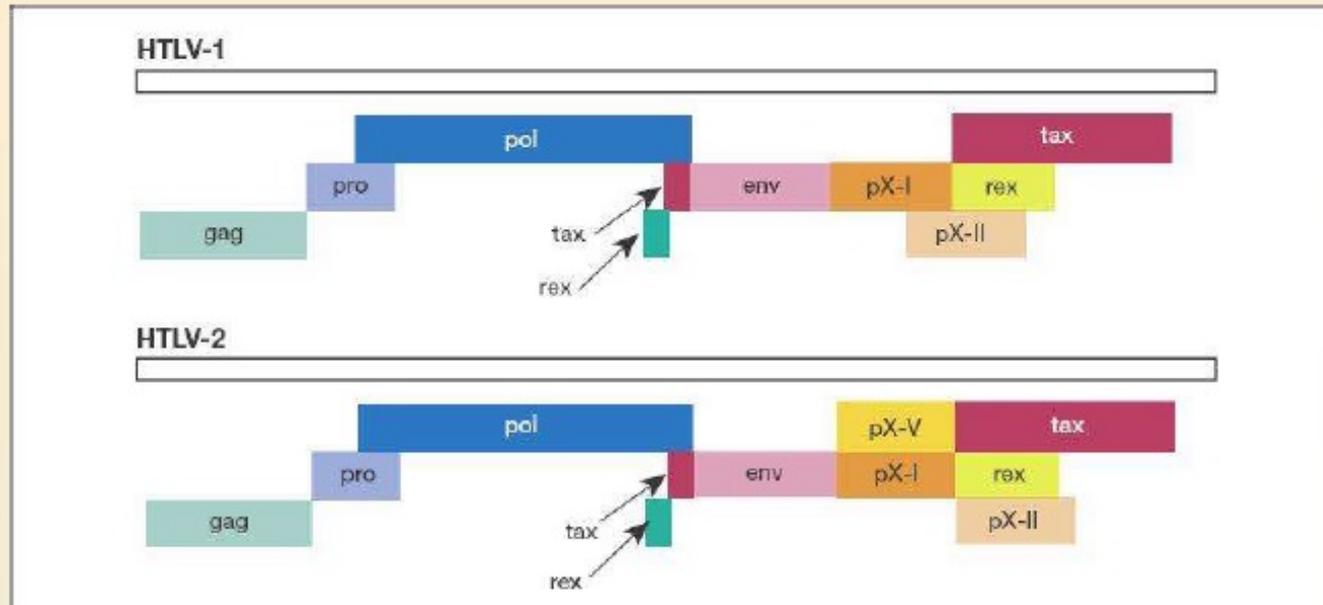
Il virus ha **distribuzione geografica** (Giappone, Caraibi, Africa, America centrale; sporadicamente anche in Italia meridionale e USA; abbastanza frequente e worldwide in tossicodipendenti).



HTLV-1

- **Se ne conoscono diversi tipi caratterizzati da un 8-10% differenza genetica**
- **COSMOPOLITAN**
 - A (Giappone, Caraibi, Colombia, Cile, India)
 - B (Giappone, India)
 - C (Caraibi, Africa)
- **MELANESIAN & ZAIRIAN**

HTLV-2



Molto simile a HTLV-2. Esprime funzioni analoghe.

Ciclo replicativo sovrapponibile.

Differente tropismo cellulare (SU, domain COOH-terminale).

Associato a **tricoleucemia** (leucemia “a cellule capellute”). Meno frequente di HTLV-1. Ruolo in patologia umana ancora da definire completamente. Immortalizza linfociti umani “in vitro”.

Mentre HTLV-1 infetta preferenzialmente i CD4+, HTLV-2 infetta i linfociti T CD8+ (HTLV-1 and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells, J. Virol. 2006).

HTLV-II

1982 isolato da una linea T derivata da paziente con hairy-cell leukemia

Associazione con malattie umane? Pochi casi

HTLV-I e HTLV-II condividono la stessa organizzazione genomica ma differiscono per la composizione nucleotidica e antigenica.

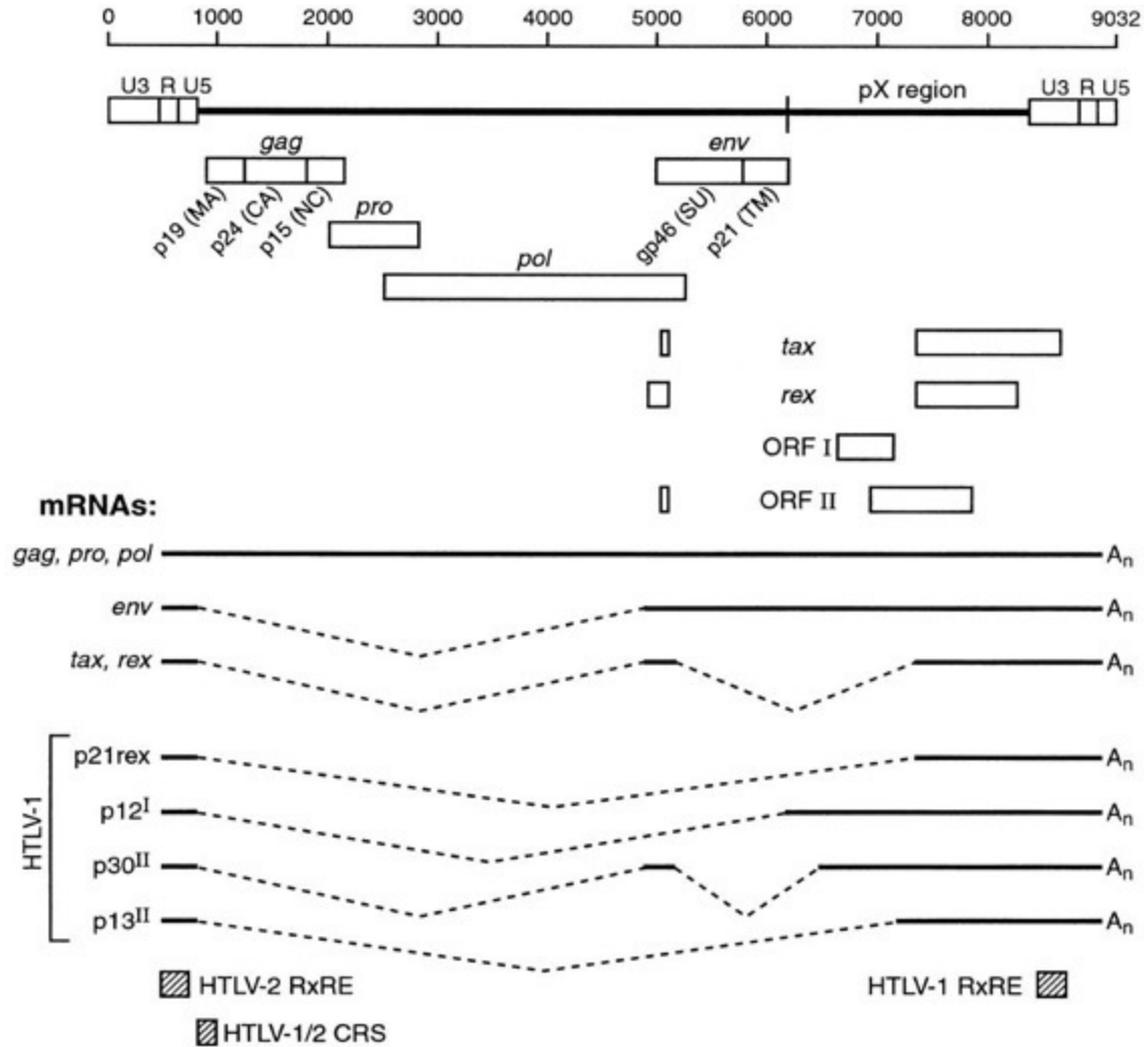
Profonde omologie strutturali con alcuni virus recentemente identificati negli animali (STLV, BLV).

Bassa omologia di sequenza con HIV-1 e HIV-2

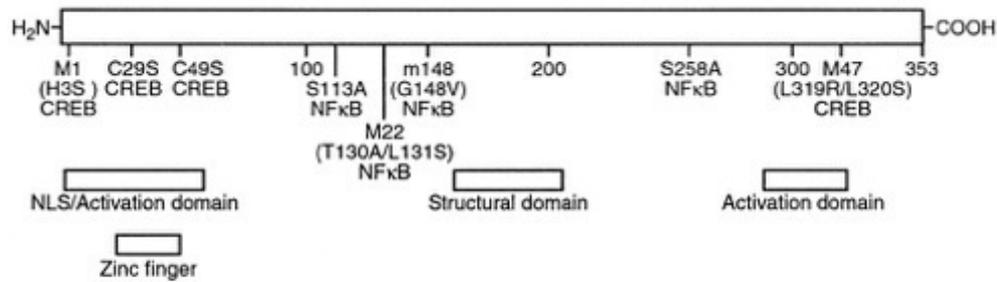
Le infezioni persistono per tutta la vita

Genoma

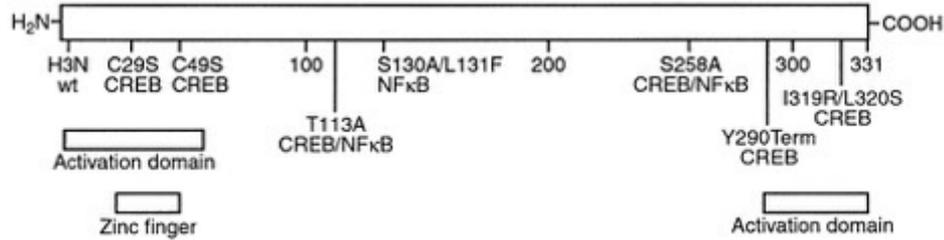
Extra-geni: proteine regolatorie che non hanno omologi cellulari



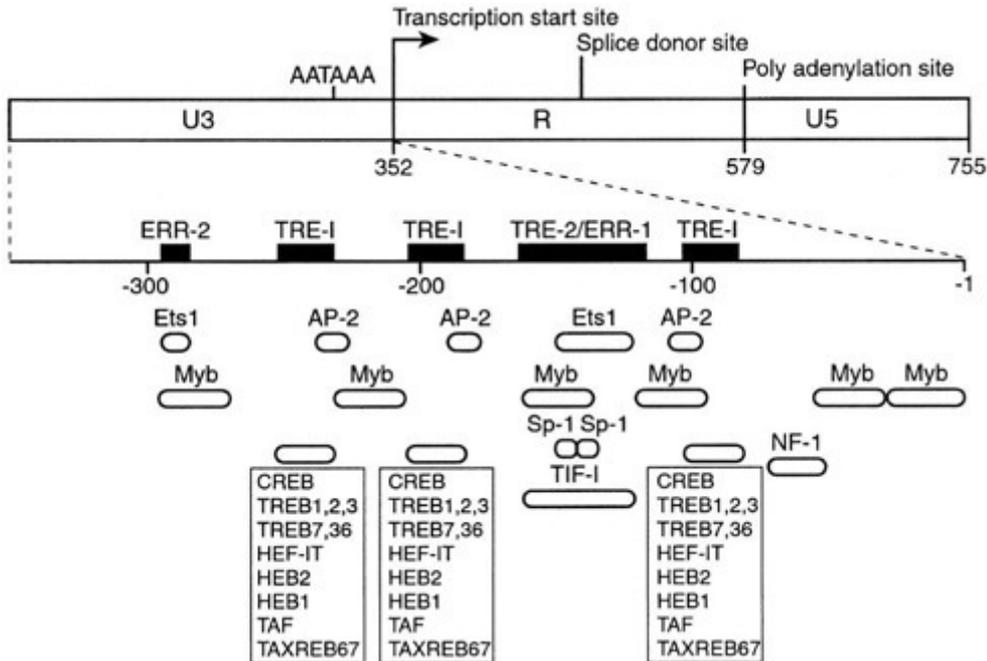
HTLV-1 Tax



HTLV-2 Tax



Tax



LTR

Tax e Rex (nucleari) necessarie per l'espressione genica e per la trasformazione

Tax (p40) transattiva LTR, interagisce con fattori trascrizionali (**CREB/ATF/p300**)

Rex (p27) è una fosfoproteina a localizzazione nucleolare necessaria per l'espressione degli mRNA un-spliced (gag,pol) o single-spliced (env), stimola il trasporto nucleo citoplasmatico, aumenta la stabilità, inibisce lo splicing e/o facilita la traduzione degli mRNA contenenti Rex-RXRE. Rex stabilizza l'mRNA della catena α dell'IL2-R (ruolo trasformazione)

Dalla stessa ORF è prodotta una p21 a funzione NON nota

ORF I e II Importanti per infettività e replicazione *in vivo*

ORF I p12 altamente conservata, altera il rilascio di calcio dalle cellule infettate, arriva la trascrizione di fattori nucleari e IL2-R. Si localizza a livello di RE e GA. Attiva la proliferazione cellulare e condiziona l'infettività.

ORF II p30 e p13

p30 si localizza nel nucleo e nucleolo, ha omologia con fattori trascrizionali (**Oct-1, -2, Pit-1, POU-M1**), riduce il livello di tax e rex. Si lega a fattori trascrizionali costituiti da p300 e una o più proteine correlate o CPB.

Env gp46 (SU), p21 (TM)

L'infezione richiede una cellula T attivata (**env attività mitogena**)

Gag p15 (nucleocapside), p24 (capside), p19 (matrice)

Pol: Trascrittasi inversa, RNAsi e integrasi

Meccanismi d'azione di Tax

Tax è una FOSFOPROTEINA ad azione pleiotropica

- **Aumenta la trascrizione virale promuovendo l'interazione di fattori cellulari con alcune sequenze enhancer localizzate nelle LTR**
- **Aumenta la trascrizione di geni cellulari (linfocine, recettori per le linfocine, molecole di superficie e proto-oncogeni), legandosi a due co-attivatori (CBP/300 e P300/CBP)**
- **Si lega a numerosi membri della famiglia NF- κ B stimolando la crescita delle cellule T**
- **Attiva l'oncogene cellulare c-Fos e l'antigene 1-Fos correlato**
- **Facilita la trascrizione interagendo con la TATA boxbinding protein**
- **Stimola l'attività trascrizionale di AP1-1 (attivazione di IL-2)**
- **Reprime il TGF- β , inibitore della proliferazione cellulare**

HTLV-I e II

Il DNA provirale si integra CASUALMENTE nel DNA cellulare

Non codificano oncogeni

Immortalizzano (co-coltivazione) in vitro cellule T mature (CD4+, CD8+) primarie umane e immature (CD4- e CD8-)

Immortalizzano i linfociti T di scimmie, coniglio, gatto e ratto

Può infettare altri tipi cellulari ma trasforma solo i linfociti T

Le cellule trasformate in vitro trascrivono RNA e producono virioni a differenza delle cellule ATL (primo step della trasformazione ?)

Topi transgenici per Tax sviluppano tumori (leucemie, e tumori mesenchimali)

Tax immortalizza le cellule umane (ed è espressa nelle linee trasformate in vitro)

LENTIVIRUS

Caratteristiche biologiche dei Lentivirus:

Oltre a gag, pol e env, i Lentivirus codificano proteine transattivatrici (simil-TAT) e che controllano il trasporto dell'RNA (simil-REV)

Persistono per tutta la vita dell'ospite: si integrano nei cromosomi, evadono la risposta immune

Hanno elevata frequenza di mutazione

Replicano in macrofagi

Tutti quelli finora caratterizzati utilizzano come recettori (o co-r.) quelli per le chemiochine

L'infezione si sviluppa in 3 stadi:

- 1) l'infezione iniziale è associata a rapida replicazione virale e disseminazione, spesso associata a malattia passeggera**
- 2) Segue un periodo di latenza clinica, in cui il virus è controllato dal sistema immunitario e non c'è malattia**
- 3) dopo un periodo di alcuni anni, i livelli replicativi aumentano, e si verifica la malattia**

L'insorgenza della malattia è influenzata da diversi cofattori, fra cui:

background genetico dell'ospite (a seconda del ceppo, resistenti o più o meno sensibili)

età (individui giovani più suscettibili a malattie rapide)

stress (animali che super-lavorano hanno malattie più gravi)

fattori virali (ceppi virali con diversa virulenza)

HIV

Agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS)

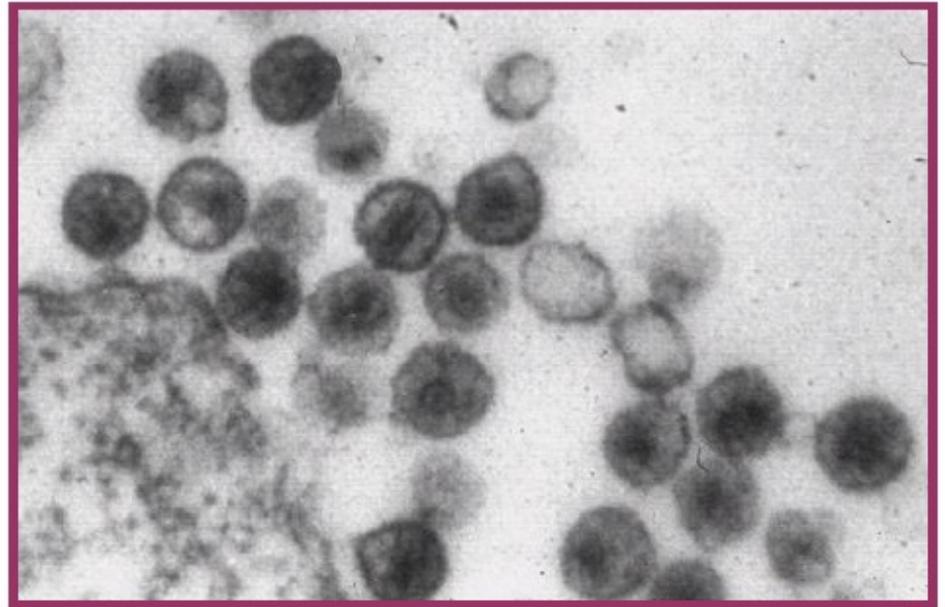
1981- Descrizione della sindrome in uomini omosessuali caratterizzata da

- infezioni opportunistiche
- Sarcoma di Kaposi
- Linfomi e altri tumori

1983- Isolamento dell'HIV-1

1985- Sequenziamento del genoma

1987- Isolamento dell' HIV-2



HIV è la causa dell'AIDS

(Rispetta i postulati di Koch)

Associazione Epidemiologica:

- HIV è presente in tutti i pazienti con AIDS
- I livelli virali predicono sviluppo ed andamento della malattia
- Farmaci che inibiscono HIV migliorano la malattia

Isolamento del Virus:

- Il virus può essere isolato da tutti i pazienti
- In vitro infetta e lisa le cellule bersaglio

Trasmissione e patogenesi:

- Personale di laboratorio e medico che si è infettato accidentalmente con HIV ha sviluppato AIDS
- HIV e SIV possono causare AIDS nelle scimmie

Nonostante le fortissime evidenze disponibili, ci sono gruppi di pazienti e anche qualche scienziato che affermano che la causa dell'AIDS deve ancora essere identificata

HIV-1

retrovirus caratterizzato da un genoma alquanto complesso se paragonato a quello degli altri retrovirus: **9 geni diversi**.

- ciclo replicativo e' relativamente complesso.
- Ha effetto citopatico, ossia uccide, di norma, le cellule che infetta. L'effetto citopatico, tuttavia, richiede alcuni giorni prima di manifestarsi (alcuni virus, es. a RNA, richiedono solo poche ore).
- Il suo ciclo replicativo nei linfociti CD4 infettati e' tanto piu' rapido quanto piu' i linfociti sono attivati.

HIV-2

Isolato da un paziente del Senegal affetto da AIDS.

Retrovirus simile a HIV, ma sufficientemente diverso da essere considerato un sierotipo diverso.

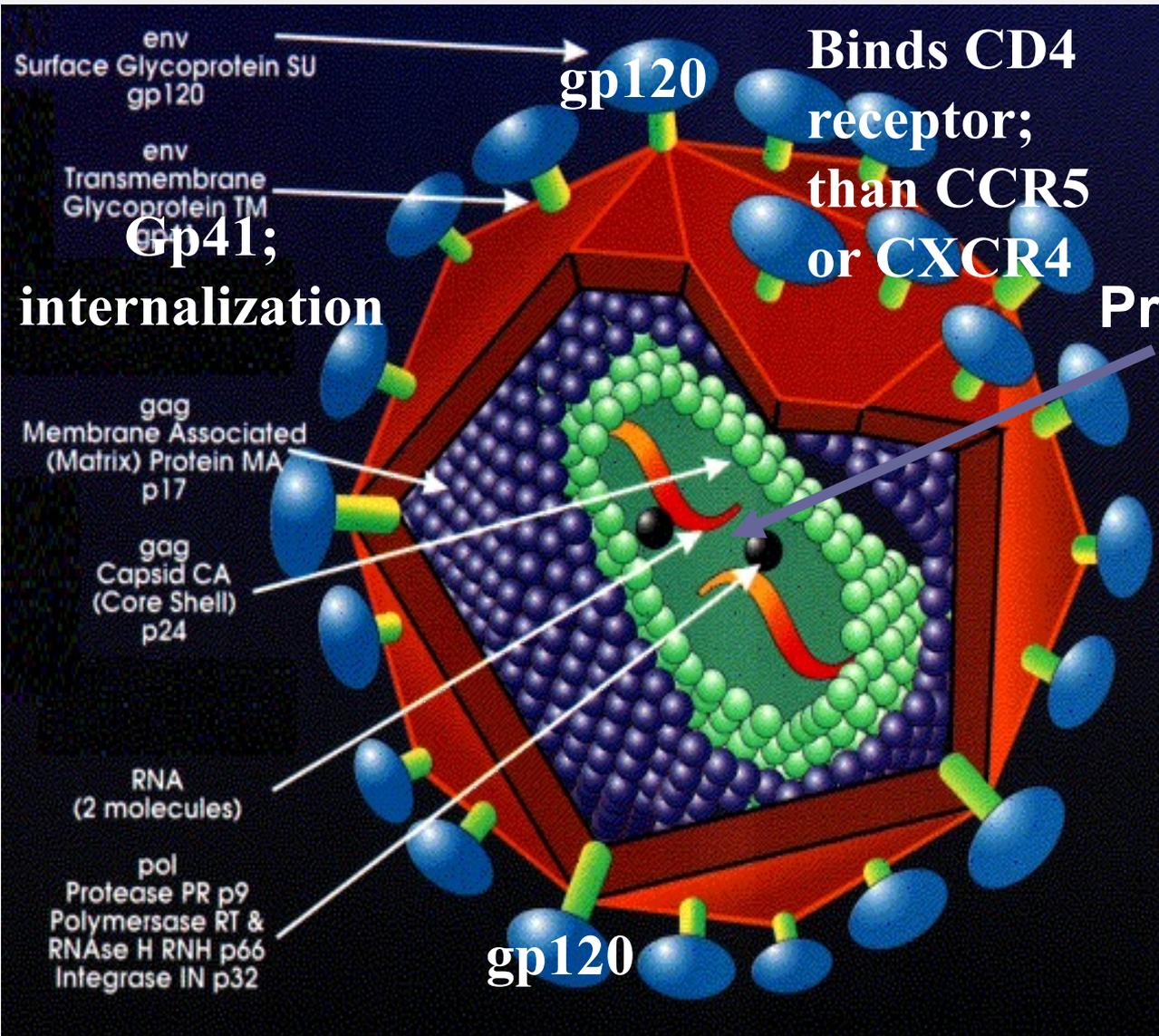
HIV-2 è in realtà più simile a SIV_{sm} e a SIV_{mac} (Simian Immunodeficiency Virus), dal quale probabilmente deriva.

SIV_{sm} infetta il cercocebo senza causare malattia, anche se in circolo ci sono elevati livelli di virus □ è più importante il controllo dell'infezione che le proprietà del virus

Sia HIV-1 che HIV-2 provocano l'AIDS, ma mentre HIV-1 è diffuso in tutto il mondo, HIV-2 è localizzato soprattutto in Africa.

La malattia da HIV-1 è più veloce; le forme sostenute da HIV-2 hanno un decorso più lungo, anche se l'esito è lo stesso.

Structure of HIV-1 virus

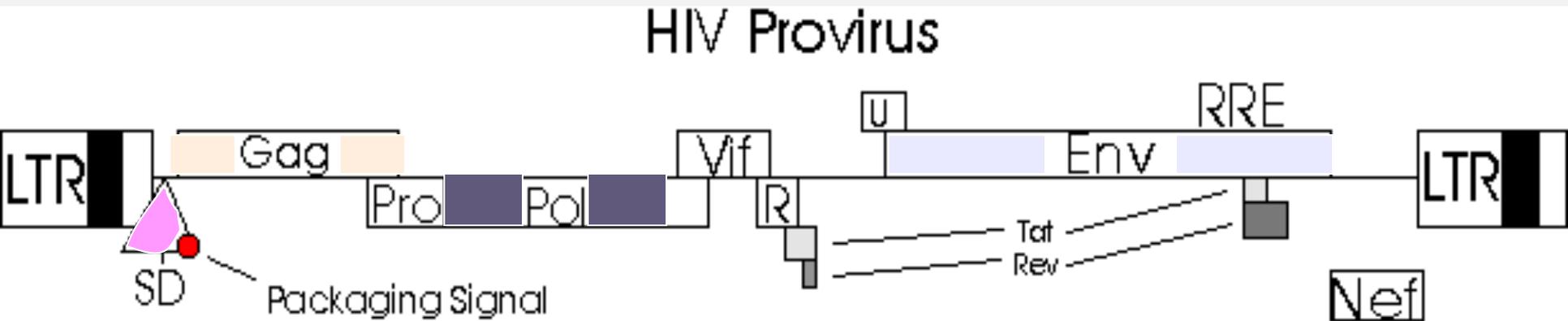


Preintegration complex

Contains

- 1) Integrase;
- 2) Product of vpr gene;
- 3) Matrix protein (part of the gag) recognizable by nuclear pore import machinery

Genes encoded by HIV-1 virus



Three stages of HIV infection:

1. Latent stage (virus integrated but not replicate itself)
2. Virus gradually infects helper T cells
3. Production of infective viral particles that are released into the blood by the host cell lysis to infect other cells

CELLULE BERSAGLIO DI HIV

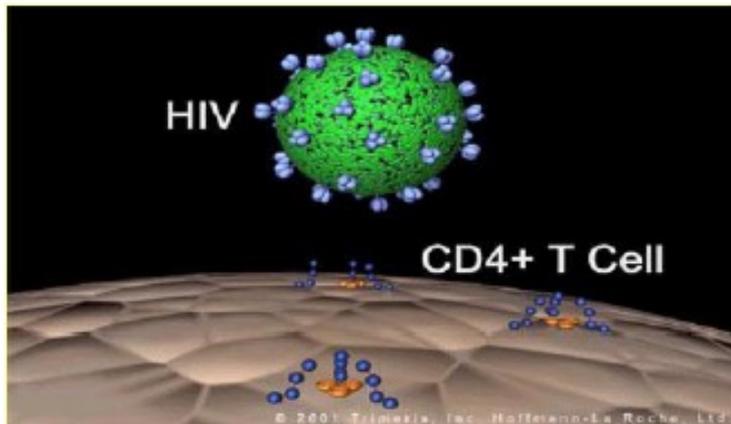
HIV infetta soprattutto cellule del sistema immunitario (cellule dendritiche, macrofagi, linfociti T) e cellule endoteliali.

Causa effetti citopatici nelle cellule permissive: come sincizi, morte cellulare e per apoptosi o necrosi.

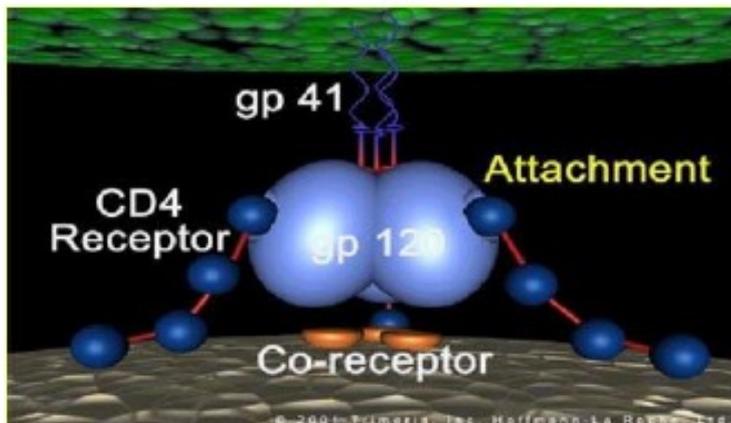
- **Macrofagi** (incluse le cellule microgliali del sistema nervoso centrale) e **linfociti CD4** sono il principale bersaglio di HIV in vivo. La loro infezione è in grado di spiegare praticamente tutte le alterazioni causate dal virus nei pazienti.
- Altre cellule potenzialmente infettabili da HIV :
 - Tutte le cellule umane aventi il recettore virale (CD4) sulla membrana. Ma anche cellule CD4⁻ come cellule del SNC (astrociti, oligodendrociti)

HIV entry

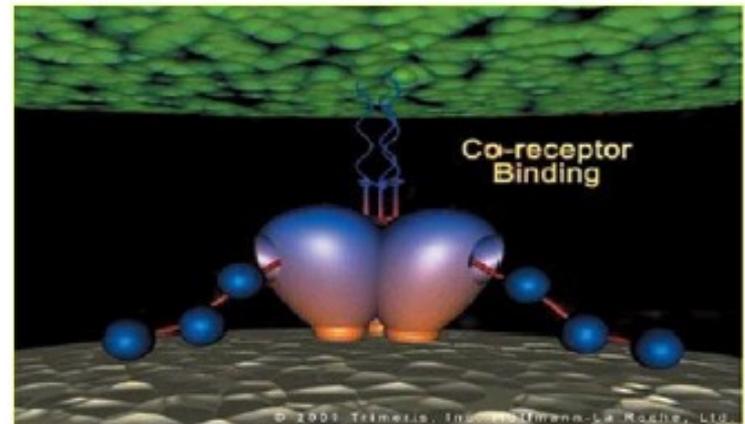
1) HIV near to target cell



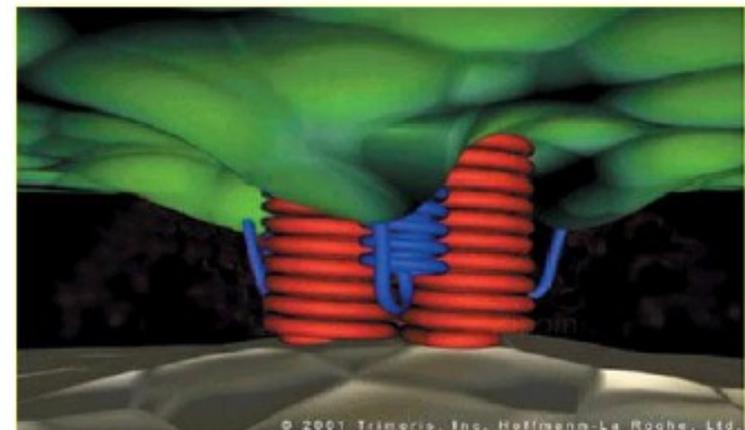
2) Binding between CD4 receptor and viral gp120



3) Conformational change
gp120-co-receptor binding



4) membrane fusion

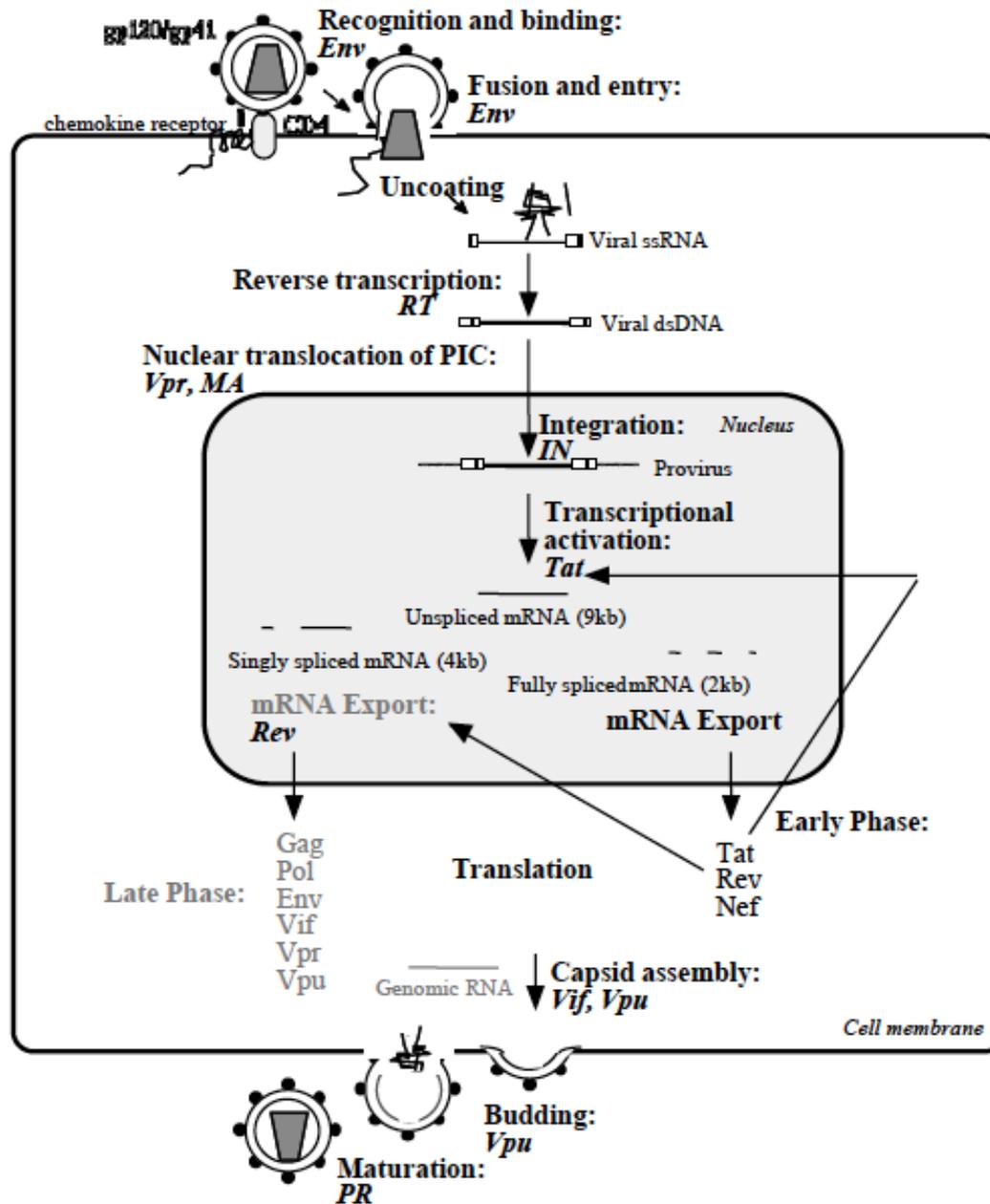


video

<https://vimeo.com/260291607>

http://scienceofhiv.org/wp/?page_id=20

Main steps of virus replication



The Genome of HIV

Small non-structural proteins

mRNAs made by multiple splicing of genomic RNA
(c.f. mRNA for structural proteins)

EARLY

TAT: TransActivator of Transcription

REV: Regulator of Virion Protein Expression

NEF: Negative Regulatory Factor

TAT and REV
are essential for
HIV replication

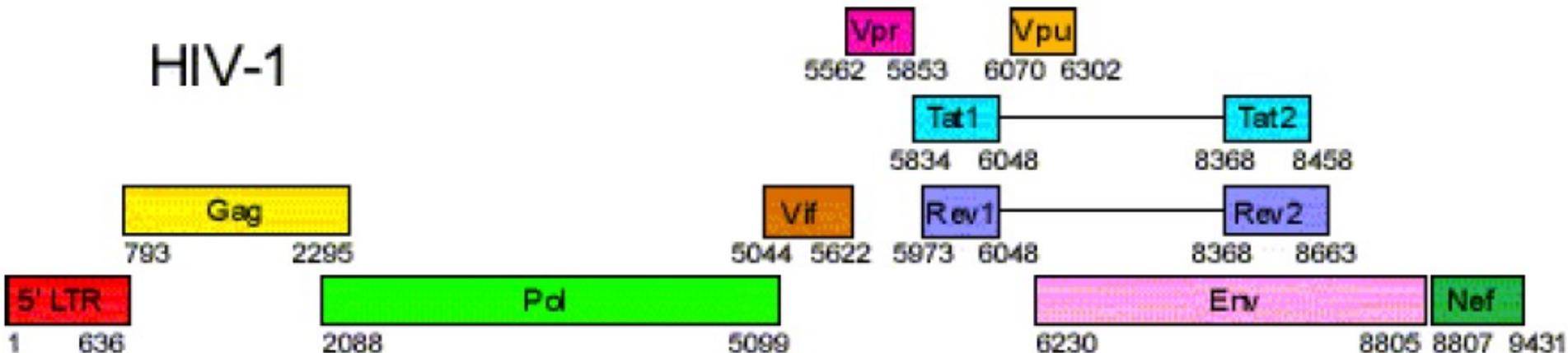
LATE

VIF: Virion Infectivity Factor

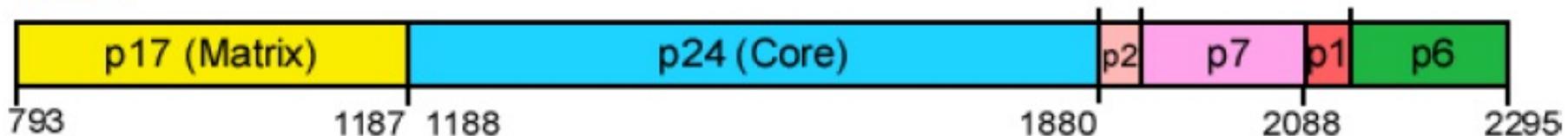
VPU: Viral Protein U

VPR: Viral Protein R

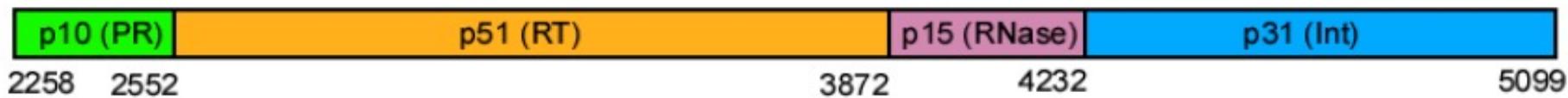
HIV-1



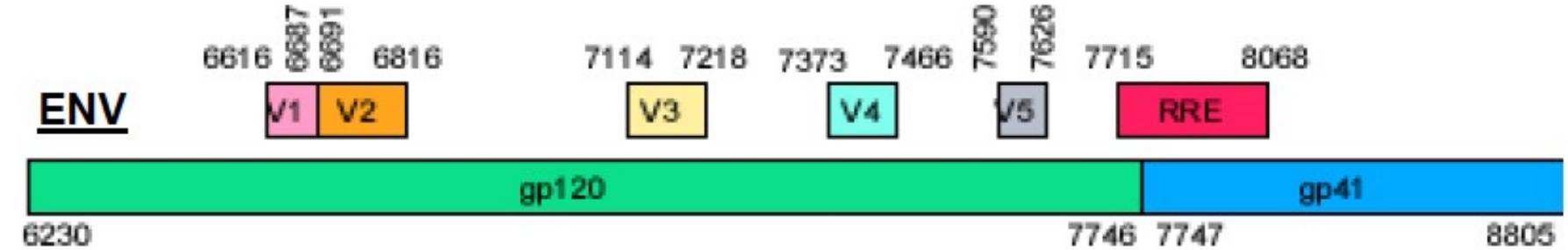
GAG



POL



ENV



LTR (long terminal repeat): Sequenze laterali del genoma di HIV che controllano e attivano la replicazione virale, attraverso una fine regolazione dell'espressione dei geni dell'HIV, e una interazione con i geni e le proteine della cellula ospite.

Geni codificanti per proteine strutturali

GAG = Gene codificante per le **proteine di struttura: p17** matrice, **p24** capside, **p7** nucleocapside

POL= Gene codificante per gli **enzimi**:

- **Transcrittasi inversa**: DNA polimerasi RNA dipendente, sintetizza DNA da RNA e DNA (genera errori:priva di attività di correzione di bozze)-**Ribonucleasi H**: degrada RNA di ibridi RNA/DNA
- **Integrasi** : integra il DNA virale nel genoma della cellula ospite (provirus)
- **Proteasi**: scinde in modo specifico le poliproteine virali Gag/Gag-Pol in proteine mature e funzionali del virus

ENV = Gene codificante per le **proteine dell'envelope**:

- **gp 120** : Glicoproteina che lega il recettore CD4 sulla superficie cellulare, e permette l'inizio del ciclo replicativo. Tramite il legame gp120-CD4 si formano sincizi cellula-cellula
- **gp 41** : Glicoproteina che regola l'ancoraggio e la fusione del virus con la membrana cellulare

Geni codificanti per proteine regolatrici

TAT : Proteina essenziale RNA-binding che incrementa la trascrizione e la produzione di mRNA virale e quindi la sintesi delle proteine virali.

REV : Proteina essenziale RNA-binding che incrementa la stabilità e la fuoriuscita nucleare dell'RNA virale contenente introni, favorendo la produzione delle proteine virali tardive.

Geni codificanti per proteine accessorie

NEF : Proteina che regola l'infettività virale. Ceppi virali privi di nef non sono infettanti. Aumenta la replicazione virale; coinvolta nella diminuzione di espressione di CD4 e MHC I sulla superficie delle cellule infette. Ruolo nella patogenesi.

VIF : Proteina che incrementa l'infettività virale (APOBEC).

VPR : Proteina che incrementa l'infezione virale e/o la replicazione (entrata nucleare del PIC, attivazione della trascrizione virale, blocco ciclo cellulare G2, induzione di apoptosi) ruolo nell'infezione dei macrofagi.

VPU : Proteina che incrementa la produzione di particelle virali e degradazione del CD4.

Sottotipi di HIV

Analisi filogenetica indica 3 principali gruppi genetici (M, N, O) correlati a SIV

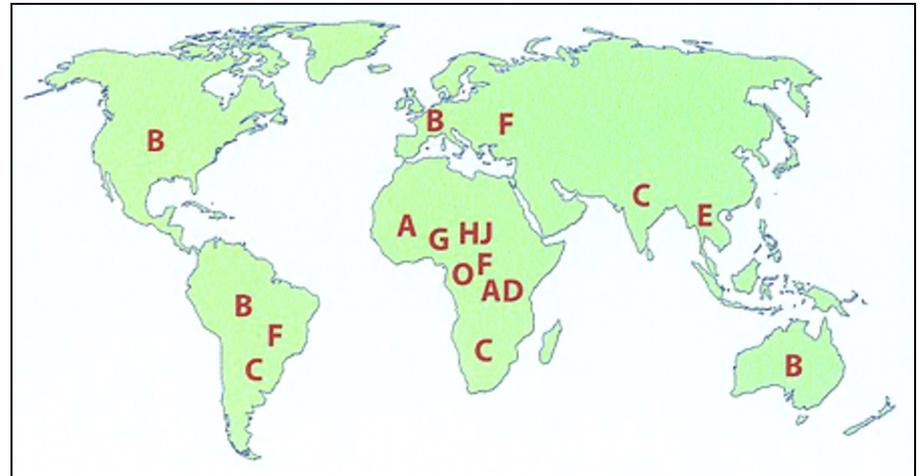
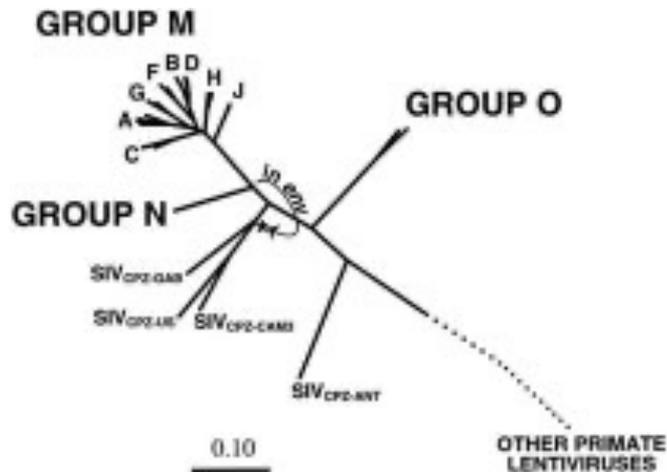
O West Africa (Cameroon, Gabon, Guinea Equatoriale)

N Cameroon

M distribuzione mondiale (diversità genetica delle popolazioni, diverse proprietà virali):

- divisi in sottotipi (A-J) a seconda del grado di similarità

- differiscono nella sequenza nucleotidica principalmente in gag (14%) e in env (30%)



TRASMISSIONE

La trasmissione avviene principalmente con:

- **Rapporti sessuali**
- **Esposizione parenterale al sangue e suoi derivati contaminati**
- **Materno-fetale (in utero, alla nascita, allattamento)**

A differenza di altri retrovirus, HIV può rimanere latente per molti anni, specialmente a livello delle cellule CD4 + di memoria. Quando queste cellule vengono riattivate, anche il virus riprende a replicarsi portando alla morte cellulare

Inoltre bisogna notare che, anche se il virus scompare dal circolo sanguigno, esistono distretti specifici (reservoir) nei quali la replicazione continua costantemente anche se a bassi livelli

Velocità di progressione della malattia

La velocità di progressione della malattia è estremamente variabile tra individui infettati da HIV e dipende da una miriade di fattori virali e dell'ospite.

Una piccola percentuale di individui HIV+ non manifesta sintomi della malattia (long-term-non-progressors), raramente in seguito ad infezione con virus attenuati, ma principalmente per fattori dell'ospite:

✓ Capacità di certi HLA di presentare epitopi virali immunodominanti (risposte CTL efficaci)

✓ Polimorfismo genetico nei corecettori di HIV e nei loro ligandi:

individui omozigoti per il gene *CCR5-Δ32* sono resistenti all'infezione da HIV, mentre gli eterozigoti sono parzialmente protetti

Mutazioni nel dominio di transmembrana di CCR2 (che previene formazione eterodimero con CXCR4 e CCR5)

✓ Polimorfismo del promotore: es. di CCR5 (accelera o riduce progressione).

✓ Risposte immuni (qualità e quantità): studi in LTNP indicano un ruolo importante per CTL, CD8+ T-cell suppressor factors, CD4+ T-helper, ADCC, anticorpi neutralizzanti, risposta umorale mucosali nella protezione dall'infezione e progressione della malattia.

✓ Nei LTNP l'architettura del tessuto linfoide è generalmente preservata, indicando bassi livelli di replicazione virale in questi individui

PATOGENESI DELL' AIDS

È un processo complesso e multifattoriale che coinvolge fattori virali e dell' ospite

Paradossalmente HIV sovverte il sistema immune inducendo attivazione immunitaria e usando questo ambiente per un proprio vantaggio replicativo

Alcuni degli effetti di HIV sul sistema immunitario sono:

Alterata espressione di citochine

Diminuzione delle funzioni CTL e NK

Minore risposta umorale e proliferativa agli antigeni e ai mitogeni

Diminuita espressione delle molecole di MHCII

Minore capacità chemotattica dei monociti

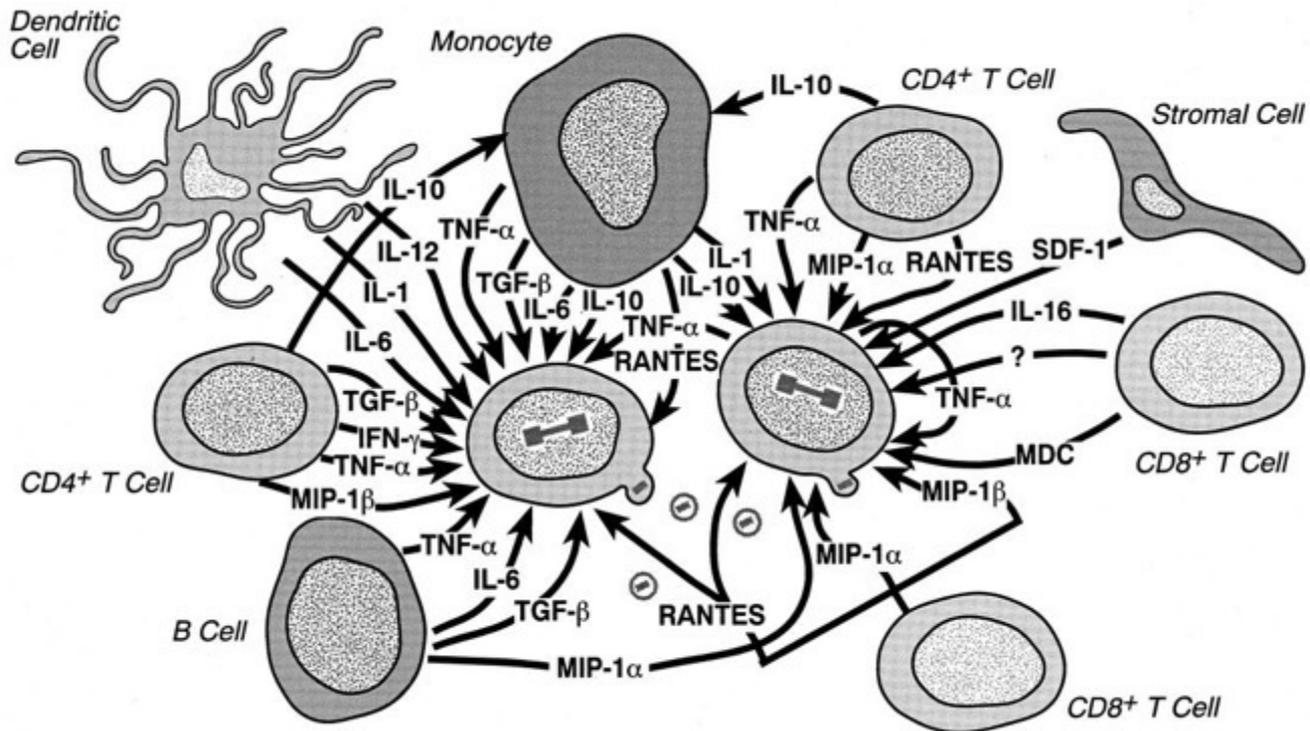
Deplezione del numero di cellule CD4+

Compromissione delle reazioni di ipersensibilità ritardata

Linfopenia

Attivazione policlonale delle cellule B

La replicazione di HIV è controllata da un complesso network di citochine



Tessuto linfoide

Manifestazioni cliniche

L' AIDS è caratterizzata da elevata disregolazione del sistema immune che causa:

- **immunosoppressione**
- **sviluppo di neoplasie insolite (es. sarcoma di Kaposi, linfoma non-Hodgkin, anogenitali)**
- **infezioni opportunistiche rare in pazienti immuno-competenti**
- **malattia neurologica**
- **AIDS pediatrica**

I sintomi più gravi nell' adulto sono spesso preceduti da manifestazioni che possono comprendere affaticamento, perdita di peso, febbre, dispnea, diarrea cronica, linfoadenopatia, candidiasi orale.

Misure di controllo

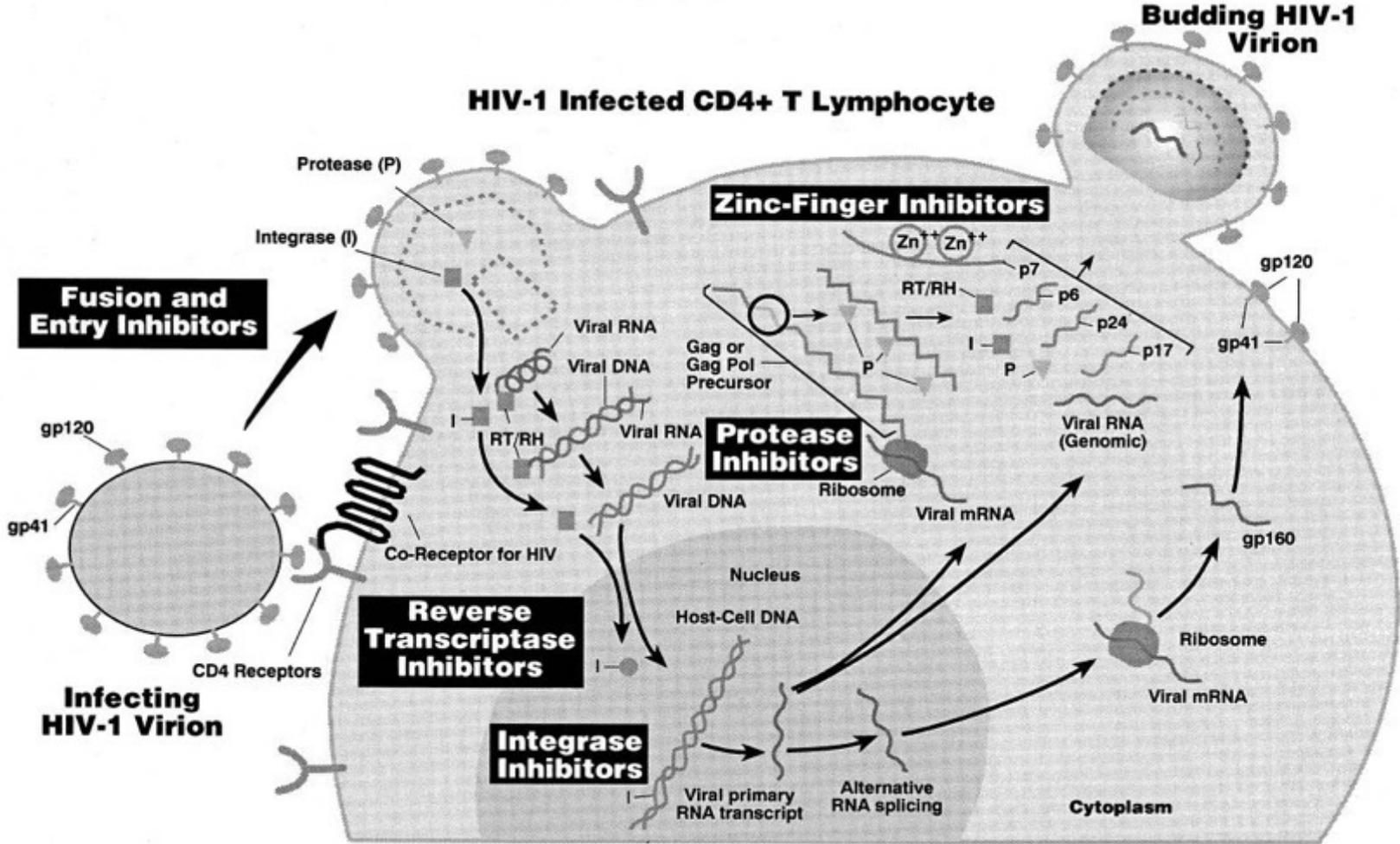
1. Educazione sanitaria fondamentale per la prevenzione:

- ✓ **Rapporti sessuali protetti**
- ✓ **Non usare aghi o siringhe infetti**
- ✓ **Evitare allattamento in caso di madre infetta**
- ✓ **Evitare gravidanze nei gruppi a rischio**
- ✓ **Sterilizzazione al calore dei ferri chirurgici**
- ✓ **Decontaminare superfici contaminate da sangue con candeggina (1:10)**

2. Terapia farmacologica (inibitori RT, e proteasi)

3. Vaccino profilattico e/o terapeutico (non ancora disponibile)

Terapia antiretrovirale



Highly active anti-retroviral therapies (HAART)

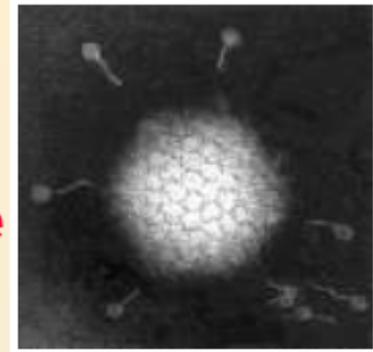
Terapia che combina l'uso di almeno tre farmaci: due inibitori della retrotrascrittasi (un nucleosidico e un non-nucleosidico) e un inibitore della proteasi

Il trattamento riduce significativamente il viral load, fino a livelli non misurabili

Tuttavia il virus permane a livello dei reservoir

Virus a DNA

ADENOVIRUS



Isolati per la prima volta nel 1953, da adenoidi e tonsille

- 1953 identificazione di un virus come causa del processo degenerativo di colture cellulari derivate da adenoidi umane
- 1954 dimostrazione di effetto citopatico in colture di tessuto infettate con secrezioni dell'apparato respiratorio
- 1956 studi epidemiologici confermano l'origine virale dell'agente eziologico delle malattie acute dell'apparato respiratorio.

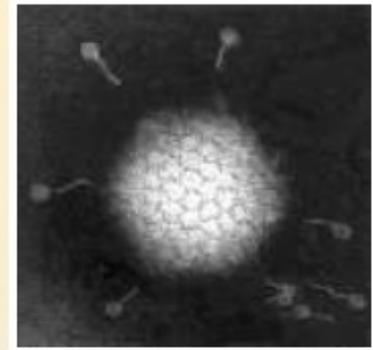
Storicamente importanti perché il loro studio ha permesso di scoprire per la prima volta importanti fenomeni:

1962: adenovirus tipo 12 tumorigeno in criceti

1977: scoperta dei meccanismi di splice

1988: proteine di Adenovirus interagiscono con proteine oncosoppressori.

ADENOVIRUS



Possono infettare il tratto respiratorio, l'occhio, il tratto gastrointestinale e la vescica. Spesso si tratta di infezioni subcliniche.

Strettamente specie-specifici.

Dati USA:

5% di **malattie respiratorie** acute pediatriche (sotto i 5 anni) e 10% delle polmoniti sono causate da Adenovirus.

Difficile distinguere clinicamente l'infezione da influenza, parainfluenza, virus respiratorio sinciziale.

ADENOVIRUS: STRUTTURA

Capside **icosaedrico nudo** (\varnothing 70-90 nm).

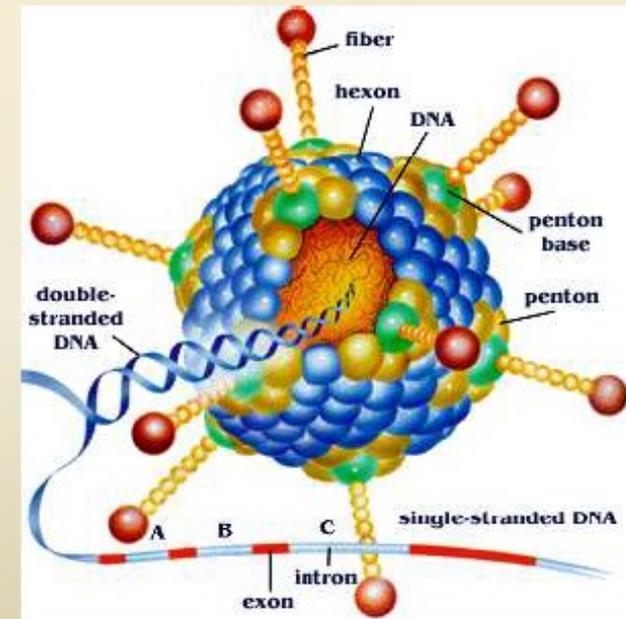
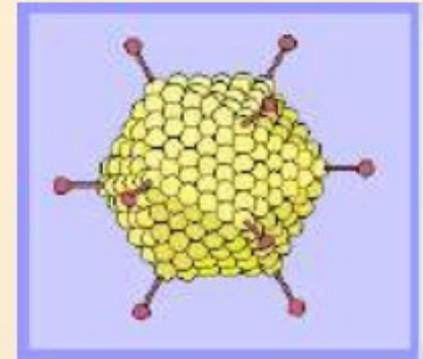
Formato da:

ESONI: Ag comuni a tutti gli Adenovirus

PENTONI: con attività tossica (arrotondamento e distacco delle cellule infettate)

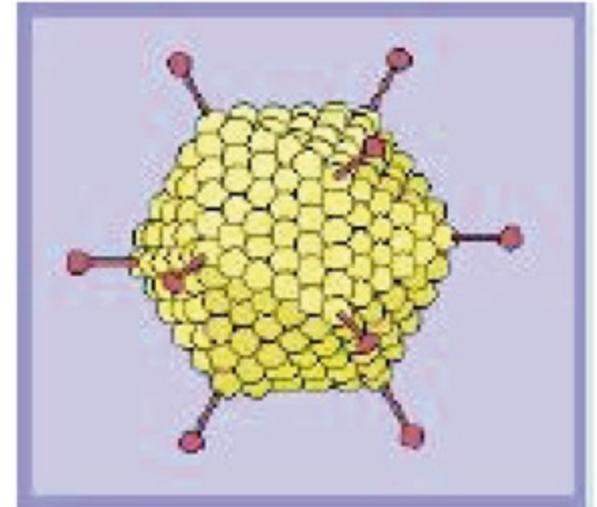
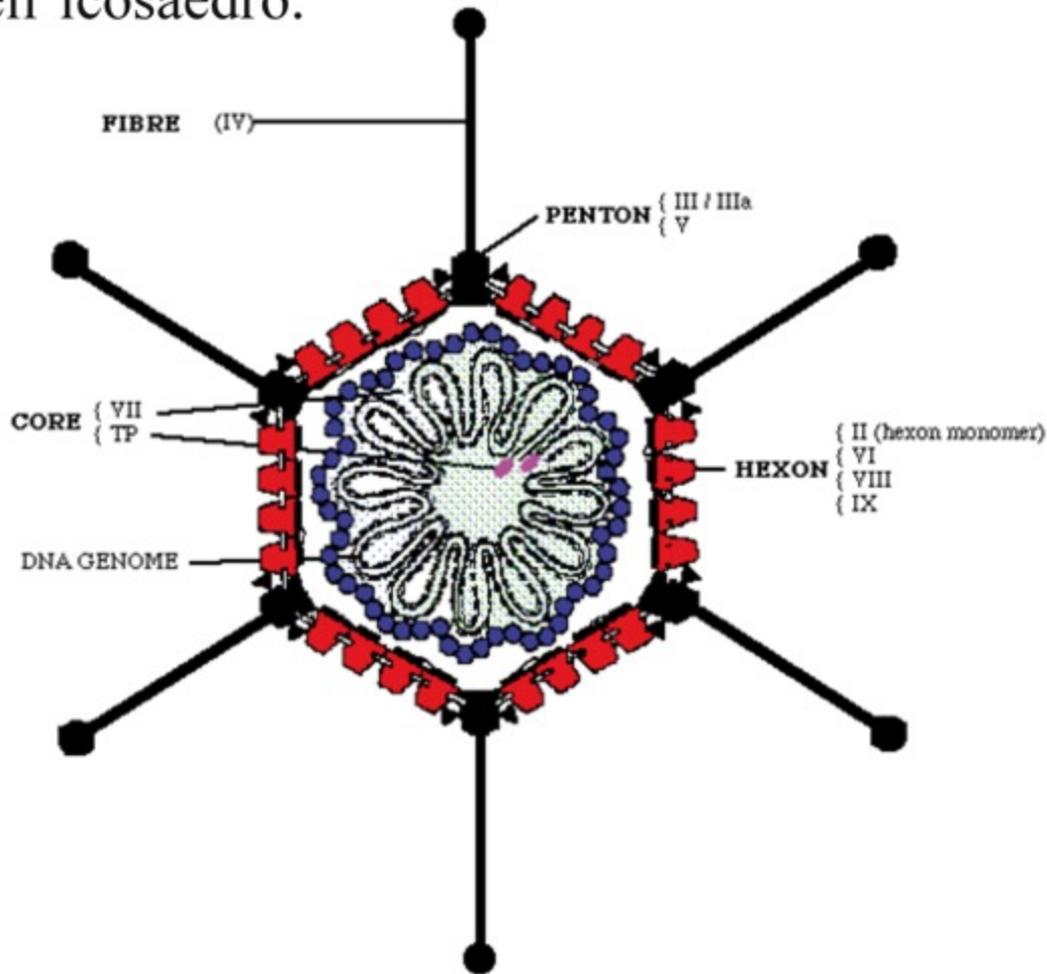
FIBRE: originano ai vertici dei pentoni; sono le VAP che si legano al R cellulare (tipi diversi usano R diversi); Ag tipo-specifico. Sono citotossiche, arrestano la divisione cellulare, sono emoagglutinine.

Distinti in **sottogruppi** (A-G) e >100 **sierotipi** per omologia di sequenza e tropismo cellulare. Il sierotipo è dovuto a differenze pentoni e fibra (che determinano anche tropismo e natura della malattia).

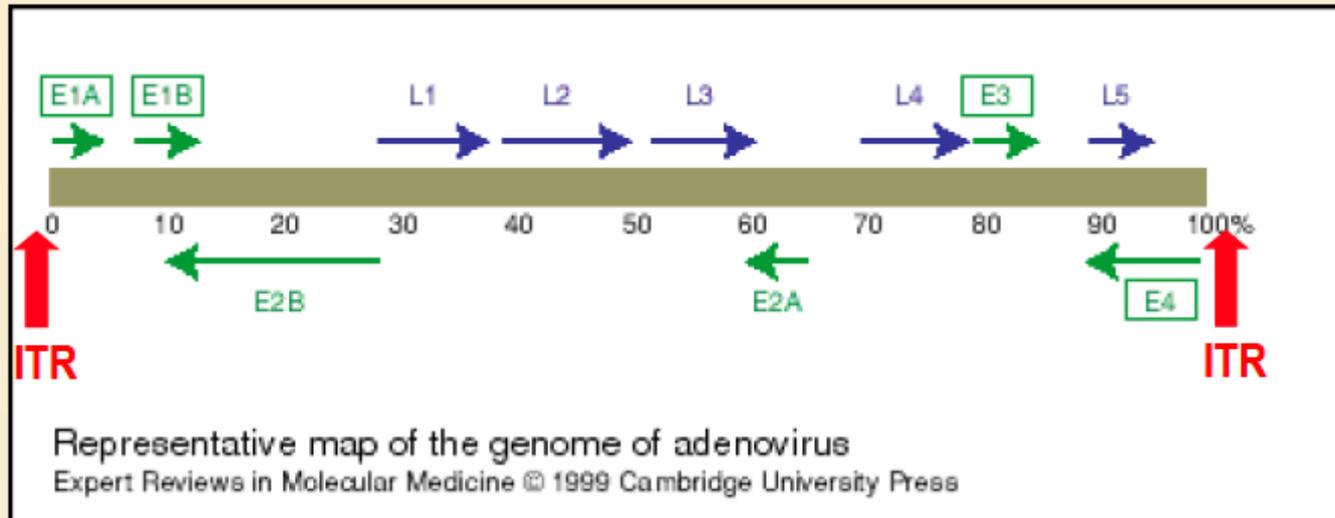


Adenovirus

Virus **nudi** a **DNA** con simmetria icosaedrica (75nm), con 252 capsomeri (20 facce e 12 vertici) caratterizzati da fibre che si diramano dai 12 vertici dell'icosaedro.



ADENOVIRUS: GENOMA



ds DNA: **30-36 Kb**
Sequenze ITR (circa 100 bp)

geni precoci
geni tardivi } **50 proteine**

PRECOCI: trans-attivatori trascrizionali di geni virali e cellulari, incluse la propria DNAPol (alterano la proliferazione cellulare, apoptosi, bloccano sintesi proteine cellulari e favoriscono quelle virali, inibiscono JNK-STAT, ecc)

TARDIVI: proteine strutturali, proteine scaffold, proteasi

ADENOVIRUS: REPLICAZIONE

Legame VAP (fibre) a R cellulare (**CAR+integrine**)

→ penetrazione per endocitosi → acidificazione

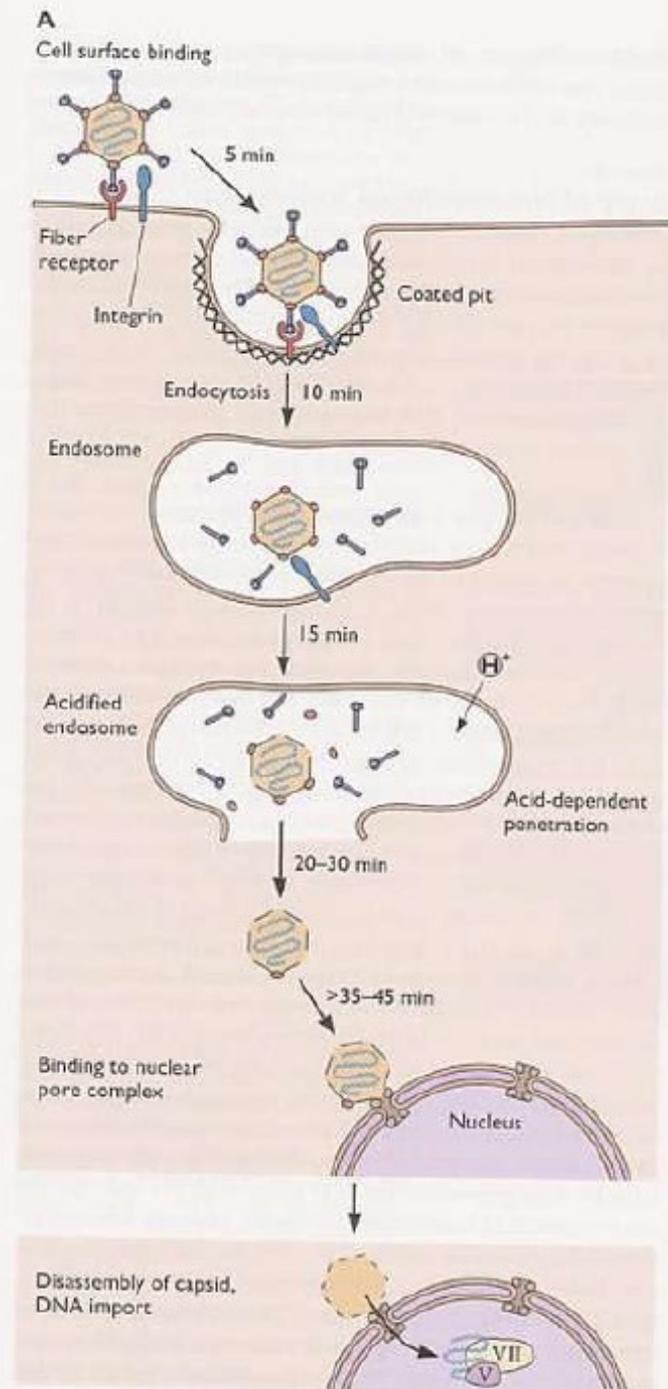
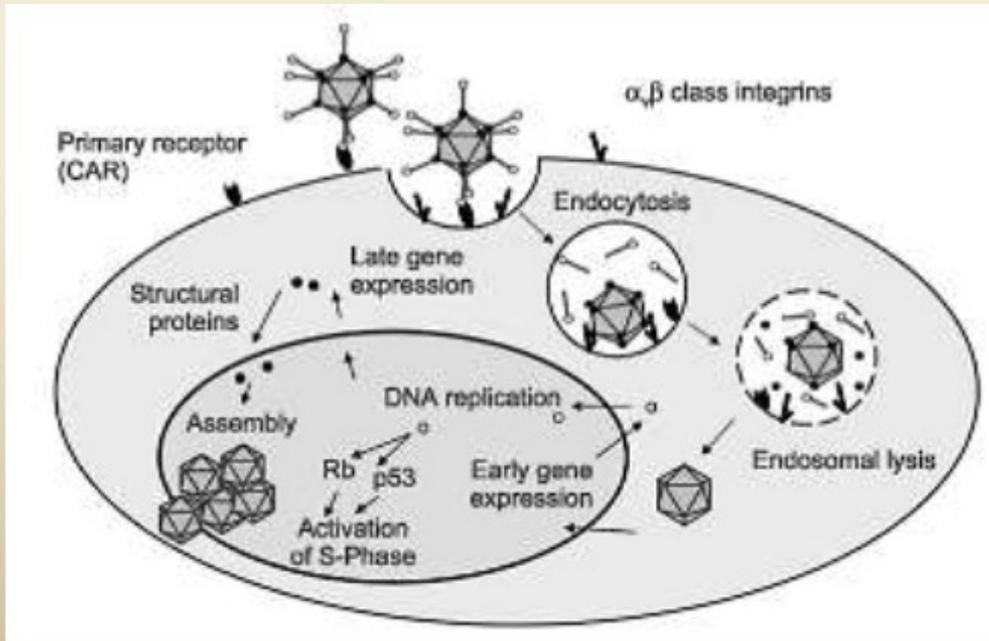
endosoma porta al rilascio del capside

parzialmente degradato → trasporto ai pori

nucleari → uncoating e rilascio del DNA nel

nucleo. Replicazione tipica Classe I (nucleo).

CAR=Coxsackievirus and adenovirus receptor (type I membrane protein, molecola di adesione che interagisce con gp della mtrice extracellulare: fibronectina, laminin-1, ecc



ADENOVIRUS: PATOGENESI

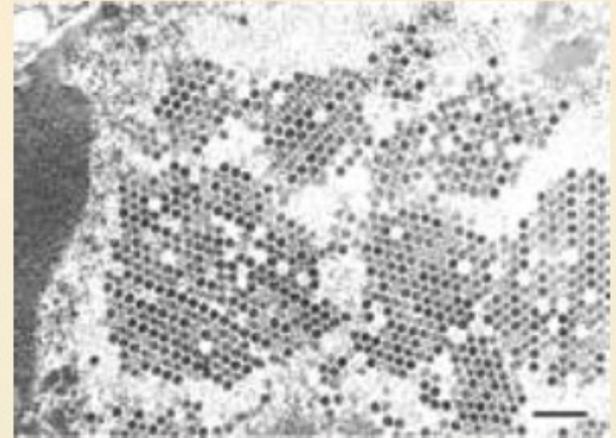
Il virus causa infezioni **litiche**, **persistenti** e **latenti** nell'uomo, e alcuni ceppi immortalizzano certe cellule animali.

Infetta **cellule epiteliali** delle mucose respiratorie, di congiuntiva e cornea, del tratto gastrointestinale.

La progenie virale si accumula nel nucleo formando **inclusioni** paracristalline che, insieme al rilascio dei virioni, porta a lisi la cellula infetta.

Persiste in tessuto linfoide (tonsille, adenoidi, placche del Peyer): si riattiva in corso di immunosoppressione.

Alcuni Adenovirus sono **oncogeni in animali** e trasformano colture cellulari. Coinvolti geni precoci: **E1A** immortalizza cellule primarie, **E1B** coopera nella trasformazione, E1A+E1B necessari per trasformazione completa ed oncogenicità.



Non sono associati a tumori umani.

ADENOVIRUS: MALATTIE

Il capsid virale è **RESISTENTE** a inattivazione nel tratto gastro-intestinale e alla mancanza di umidità.

TRASMISSIONE: per **aerosol**, stretto **contatto** o via **oro-fecale**. Arriva agli occhi tramite le dita. Anche contatto con oggetti contaminati (es. asciugamani, strumenti medici contaminati), o per clorurazione insufficiente delle acque delle piscine. A rischio bambini <14 anni, militari, nuotatori.

MALATTIE. Il virus infetta le cellule mucoepiteliali del tratto respiratorio, gastrointestinale e della congiuntiva o cornea, causando un **danno diretto**.

La malattia dipende dal tropismo tissutale di uno specifico gruppo o sierotipo virale.

La maggior parte delle infezioni sono **asintomatiche**.

Il virus **persiste** nei tessuti linfoidei (ad esempio tonsille, adenoidi, placche del Peyer).

La risposta **anticorpale** è importante per la risoluzione.

ADENOVIRUS: MALATTIE

Malattie associate:

- Infez. respiratorie: febbre, tosse, faringite, adenite cervicale, tonsilliti, a volte rash cutaneo; più rare in adulti, tranne la malattia respiratoria acuta delle reclute (→ polmonite, a volte fatale, associata al sottogenere E).
- Faringite febbrile acuta: in bambini.
- Cheratocongiuntivite epidemica, anche attraverso acqua di piscina contaminata.
- Gastroenterite infantile con diarrea (15% dei casi ospedalizzati).
- Cistite emorragica acuta: in bambini, autolimitante.
- Infez. sistemiche in immunocompromessi.

IMMUNITÀ duratura, ma per l'alto n° di tipi virali, possibili reinfezioni con altri sottotipi.

VACCINO solo per militari USA.

ADENOVIRUS UMANI

SPECIFICITA' d'ospite

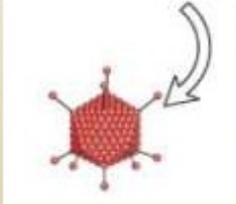
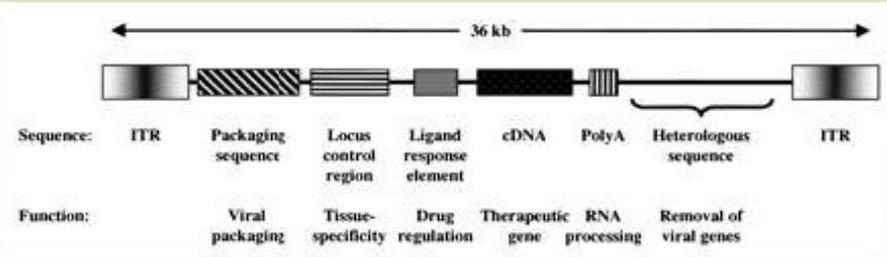
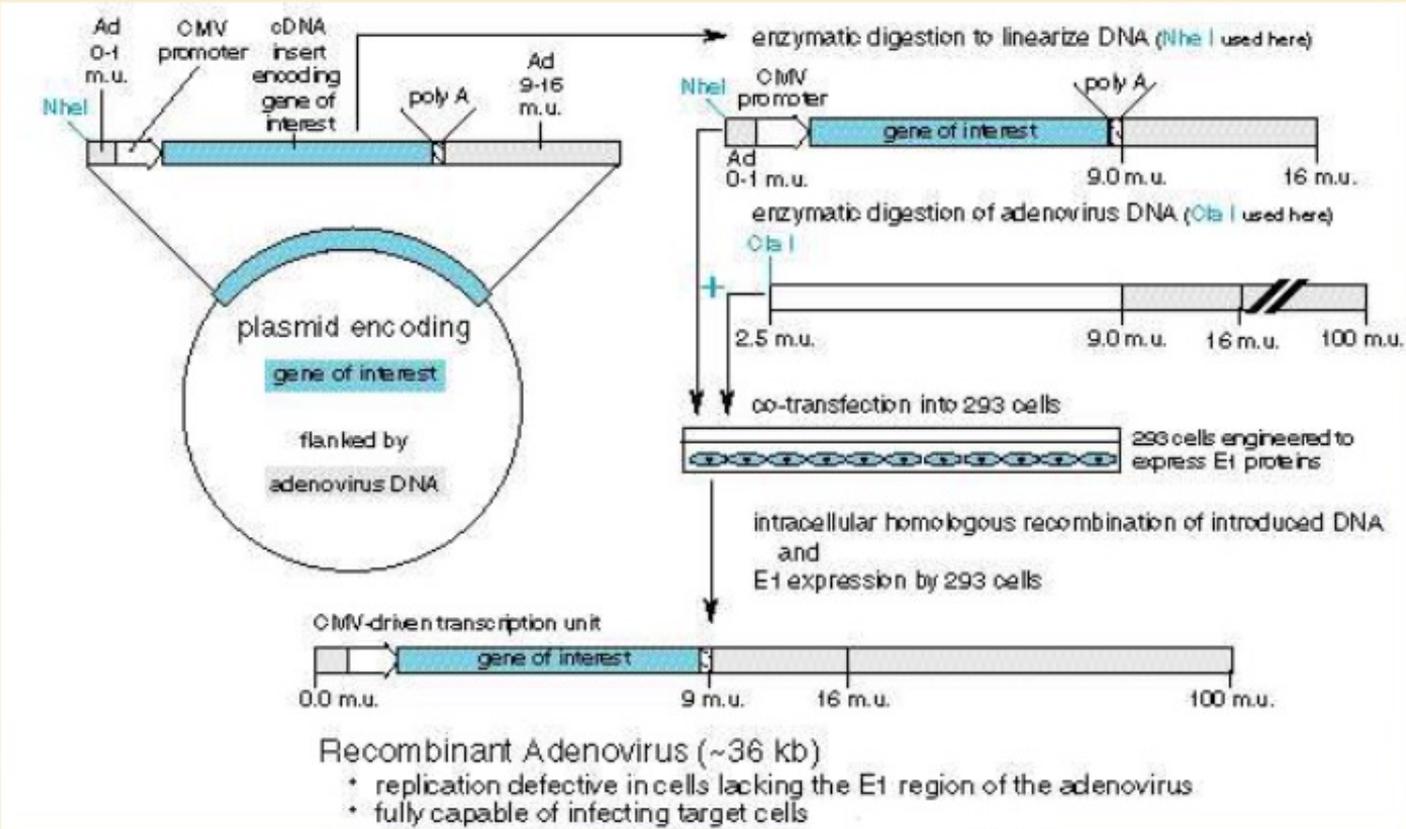
Adenovirus umani infettano solo l'uomo e crescono "in vitro" solo in cellule umane.

Interagiscono con altri virus: i virus Adeno-associati (parvovirus) sono incapaci di moltiplicarsi senza Adenovirus.

Tab. 32-3. Malattie associate ad adenovirus umani.

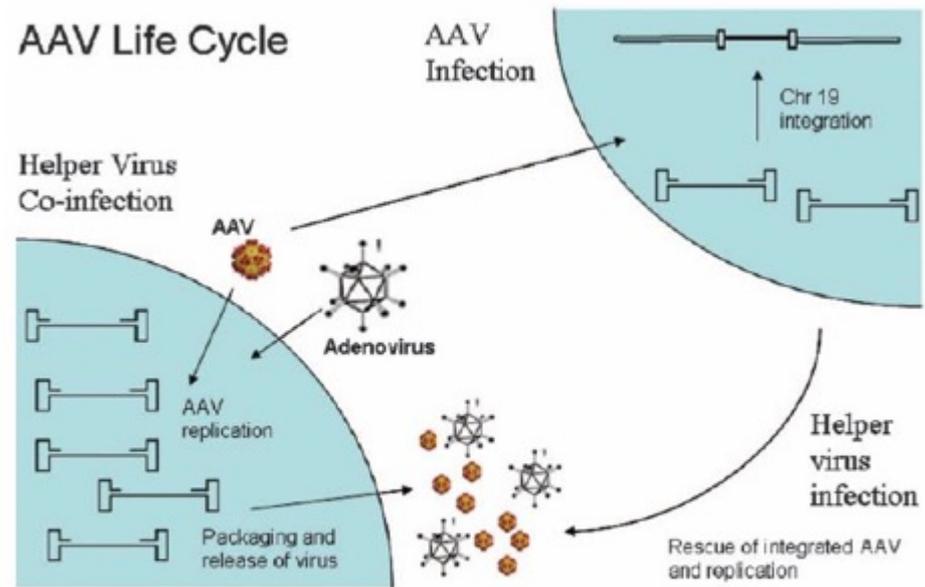
Gruppo	Tipi principali	Malattia
B	3, 7, 14	Febbre faringo-congiuntivale
	3, 7, 14, 21	Malattia respiratoria acuta
	3, 7	Polmonite, faringite acuta febbrile nei bambini più piccoli
	11, 21 34, 35	Cistite emorragica acuta Polmonite con disseminazione; persistenza nelle vie urinarie
C	1, 2, 5, 6	Faringite acuta febbrile nei bambini più piccoli; infezione latente nel tessuto linfatico
	1, 2, 5	Epatite nei bambini con trapianto di fegato
D	8, 19, 37	Cheratocongiuntivite epidemica
E	4	Malattia respiratoria acuta con febbre; polmonite
F	40, 41	Gastroenterite

Molti studi sulla possibilità di usare Adenovirus defettivi come vettori in **TERAPIA GENICA**.



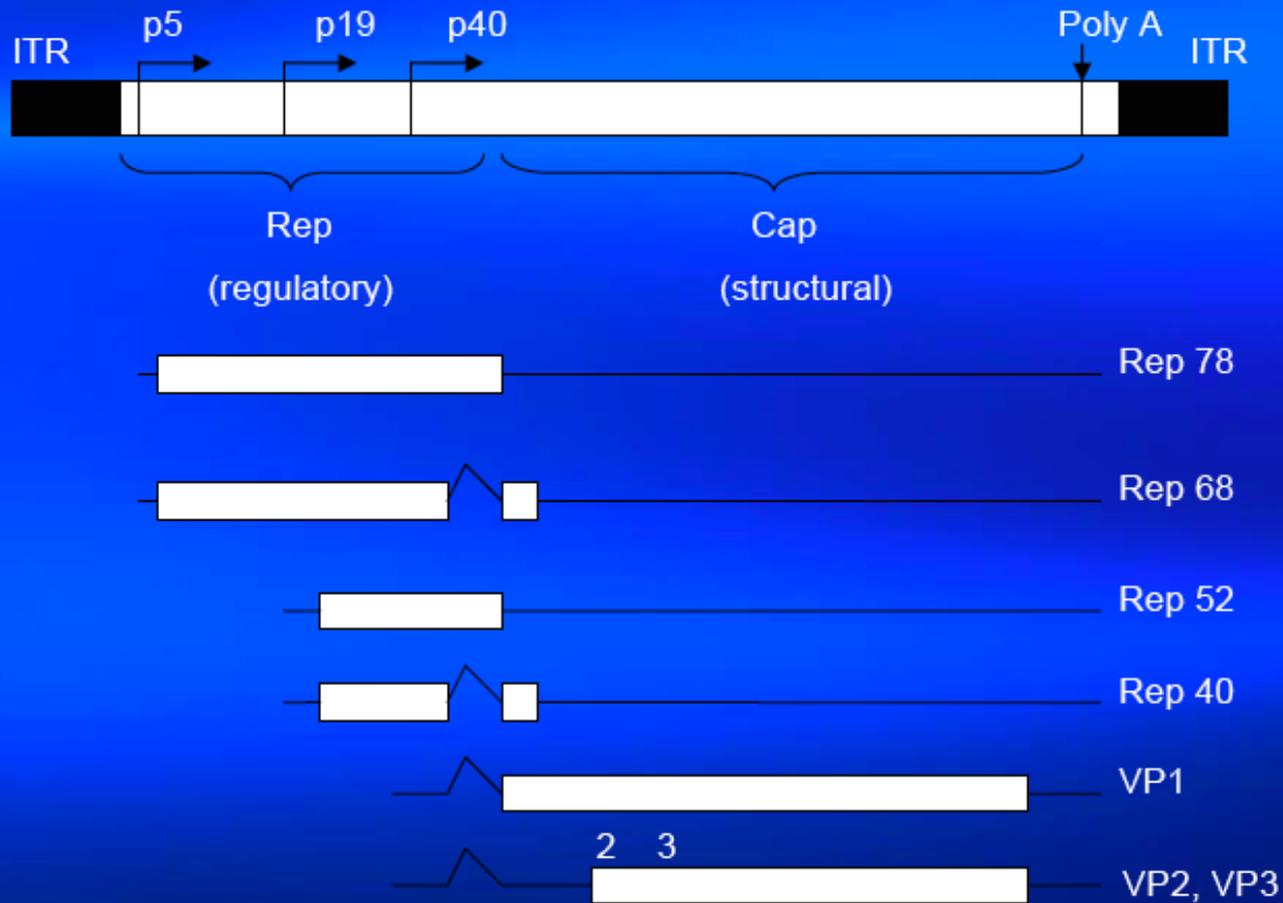
Virus Adeno-Associati (AAV)

1. Sono virus a DNA lineare a singolo filamento, ne sono stati descritti 11 sierotipi, in grado di infettare cellule di diversi tessuti, anche non attivamente proliferanti (fegato e neuroni). L'80-90% della popolazione risulta essere **positiva** per i sierotipi 2 e 3.
2. **L'AAV si integra nel DNA cromosomico in una regione ben precisa sul cromosoma 19** ed esprime i suoi geni a livelli molto bassi, infettando la cellula in modo latente.
3. Solo la successiva **co-infezione con un altro virus (adenovirus o herpesvirus)** attiva il loro ciclo litico e produce una gran quantità di virioni, ciò li rende più controllabili e sicuri in terapia genica, evitando fenomeni di «mutagenesi inserzionale».



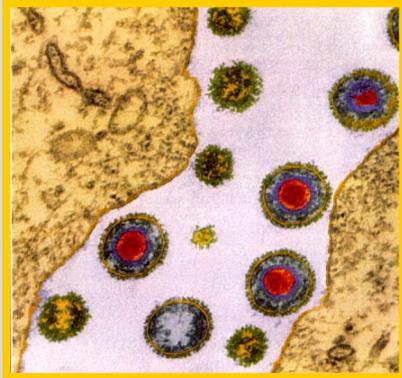
<http://cmr.asm.org/content/21/4/583.full.pdf>

AAV Genome



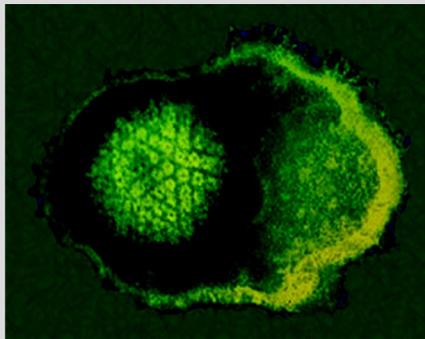
*AAV is a replication defective virus: Dependent on Adenovirus for replication

HERPESVIRIDAE



150 nm

Capside icosaedrico
rivestito da involucro



Sottofamiglia	Genere	Tipo
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpes simplex virus tipo 1 Herpes simplex virus tipo 2
	<i>Varicellovirus</i>	Virus Varicella Zoster
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovirus
	<i>Roseolovirus</i>	Herpesvirus umano 6 Herpesvirus umano 7
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Epstein-Barr virus
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvirus 8 associato al sarcoma di Kaposi

CICLO DI REPLICAZIONE

Geni α - IE (ICP0, ICP4, ICP27)



Geni β - E



Sintesi del DNA



Geni γ_1 e γ_2

cascata di espressione genica

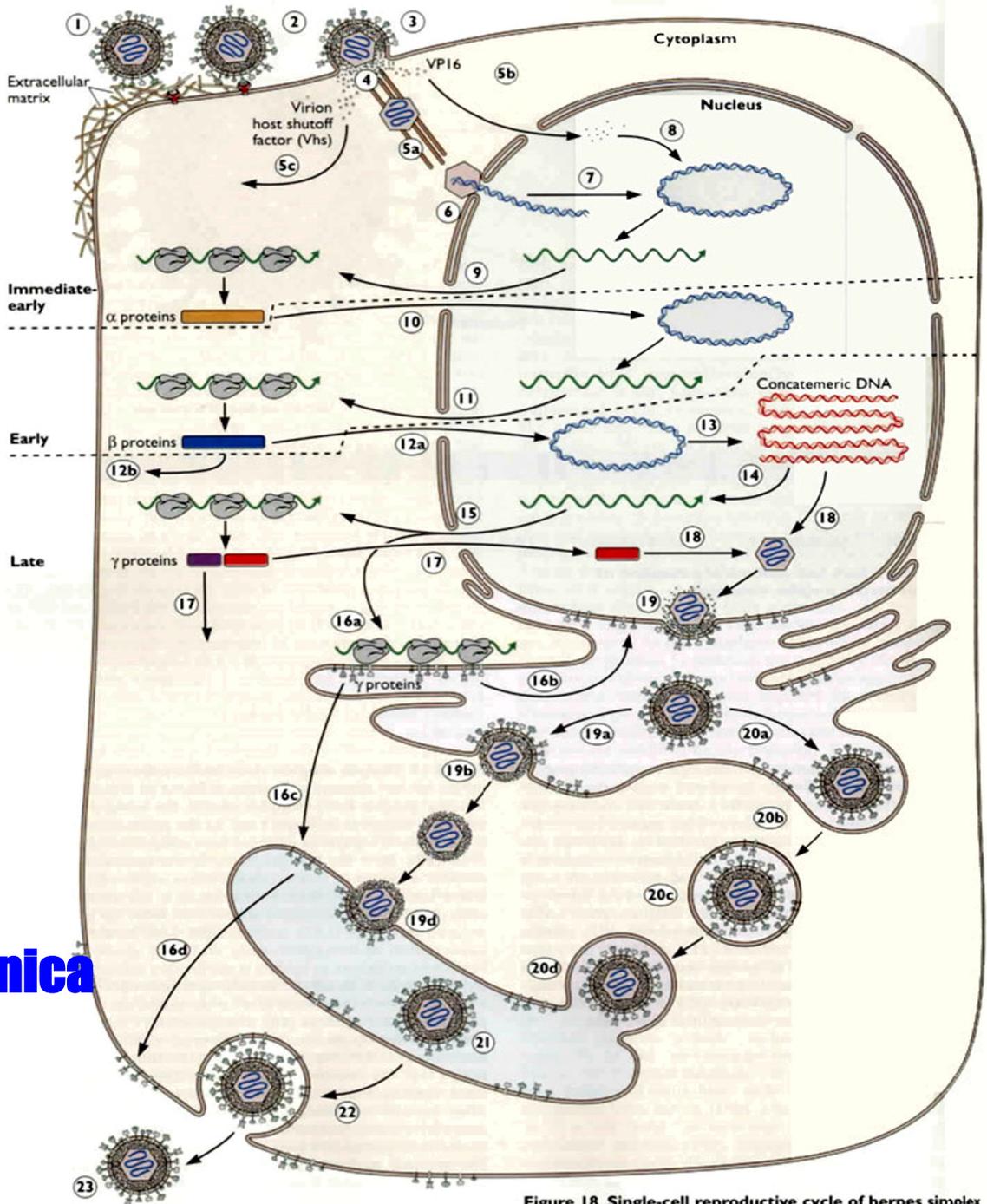
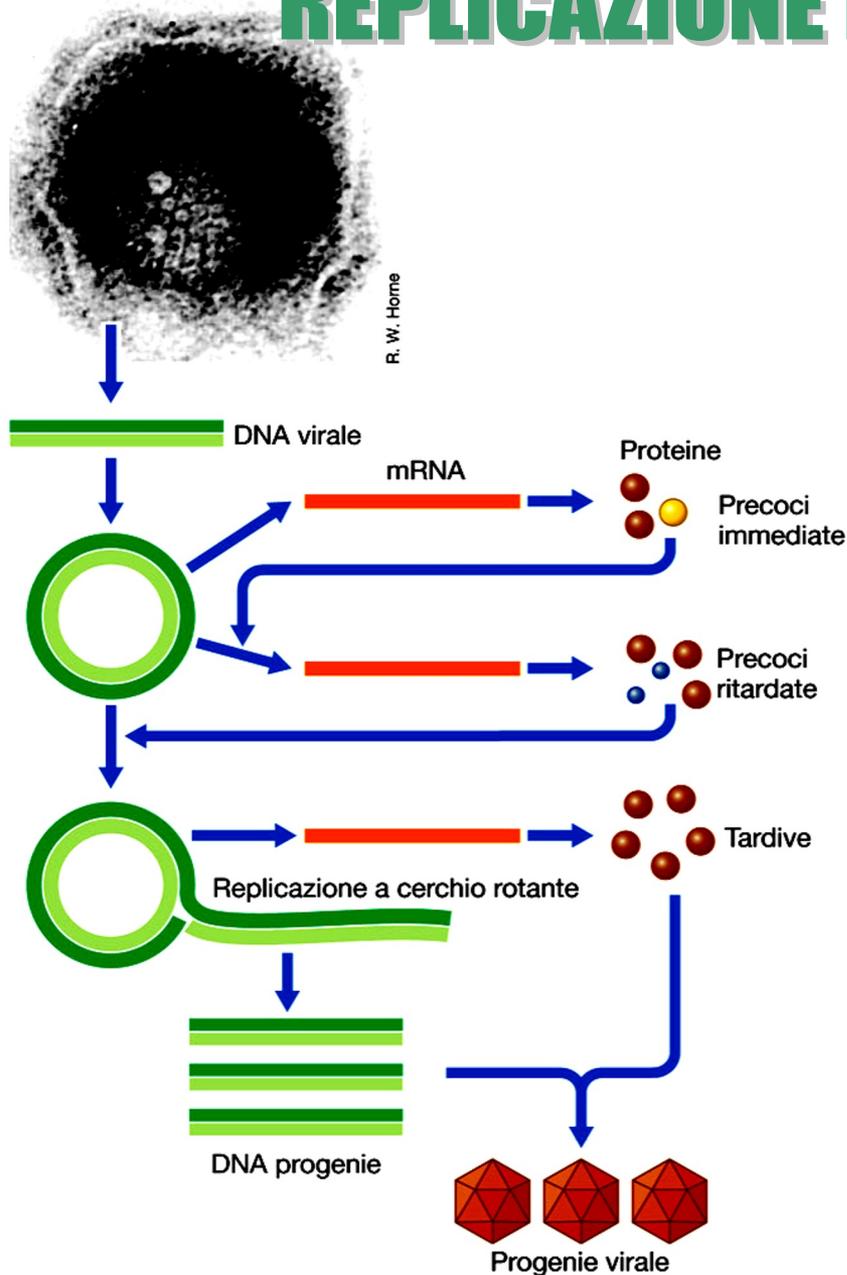


Figure 18 Single-cell reproductive cycle of herpes simplex virus type 1.

REPLICAZIONE DEL GENOMA DI HSV-1



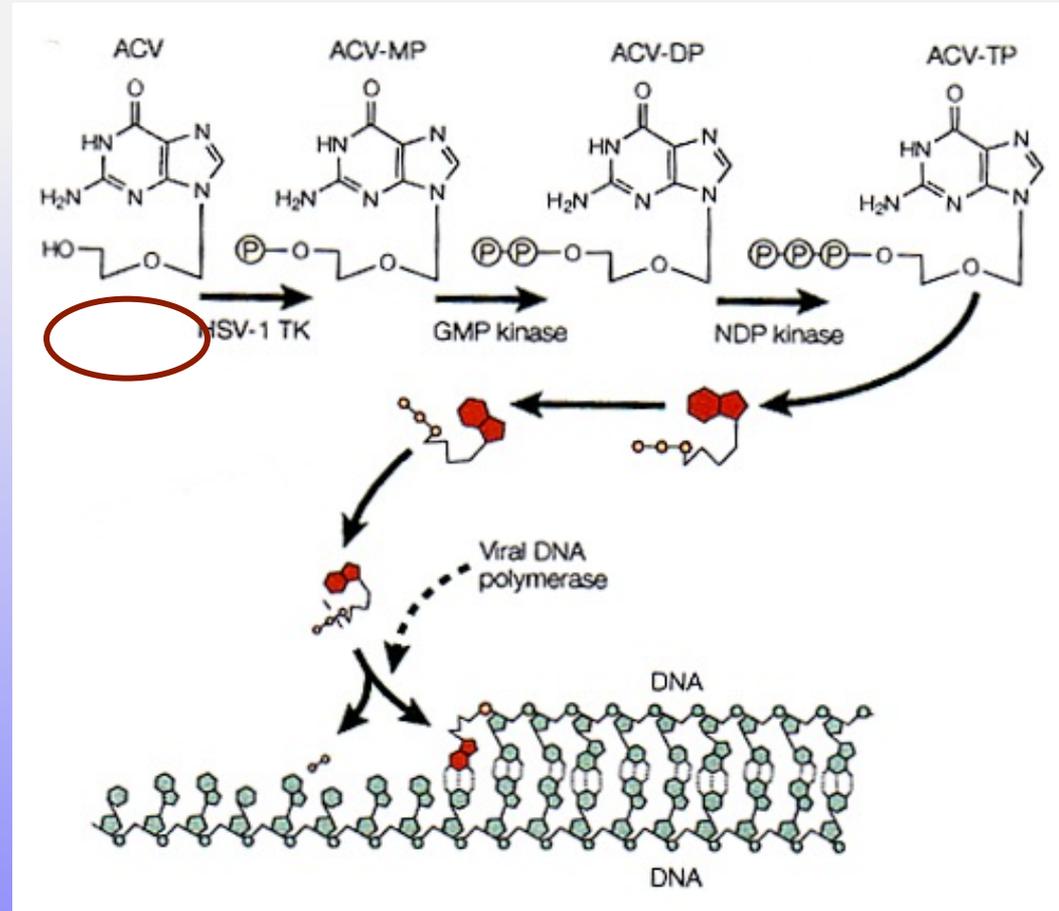
La replicazione del DNA virale avviene nel nucleo per circolarizzazione e sintesi tramite cerchio rotante

proteine beta

L'assemblaggio della particella virale avviene nel nucleo e l'acquisizione del tegumento esterno avviene per gemmazione sulla membrana nucleare

Acyclovir

- farmaci inattivi (*prodrug*)
- **Base della selettività:**
convertiti nella forma attiva dalla **Timidina chinasi virale**, e successivamente da chinasi cellulari
- L'incorporazione della forma trifosfato porta alla **terminazione** dell'allungamento di catena da parte della DNA polimerasi



From DeClercq Nature Reviews Drug Discovery 1, 13 (2002)

Blocco della replicazione del DNA virale 169

POXVIRIDAE

Genere:

ORTHOPOXVIRUS

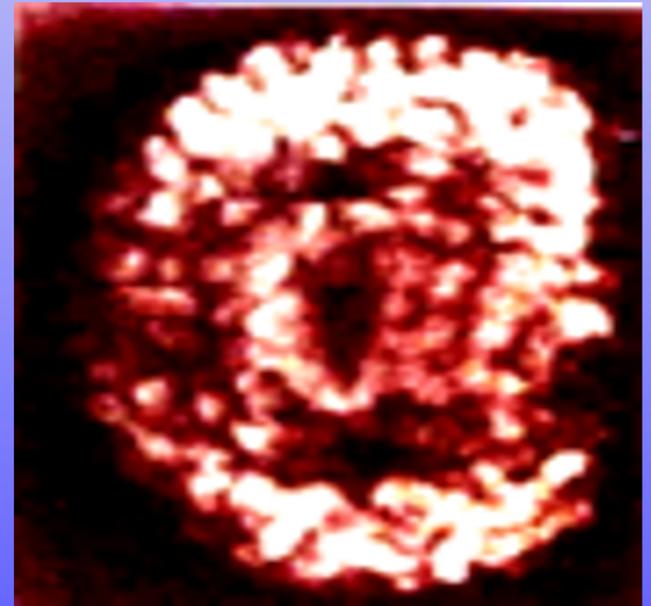
- Virus del vaiolo umano
- Virus vaccino*

AVIPOXVIRUS

ENTOMOPOXVIRUS

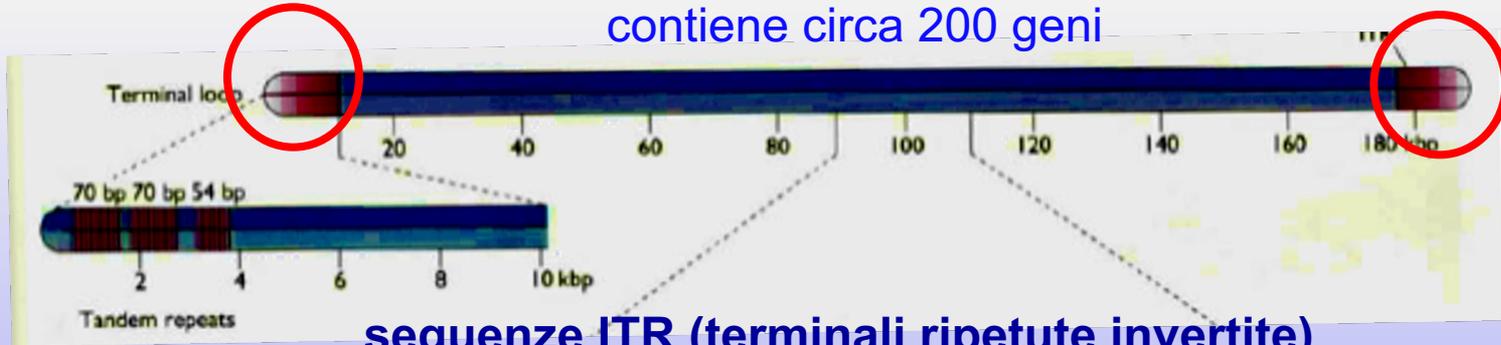
LEPORIPOXVIRUS

*modello di studio



NUCLEOIDE

1 molecola lineare DNAds
(180-200 kpb)
contiene circa 200 geni



sequenze ITR (terminali ripetute invertite)
legami fosfodiesteri 3'-5'

scissi da endonucleasi virali durante la replicazione del genoma

Proteine del NUCLEOIDE (

Strutturali (simil-istone) associate
al DNA

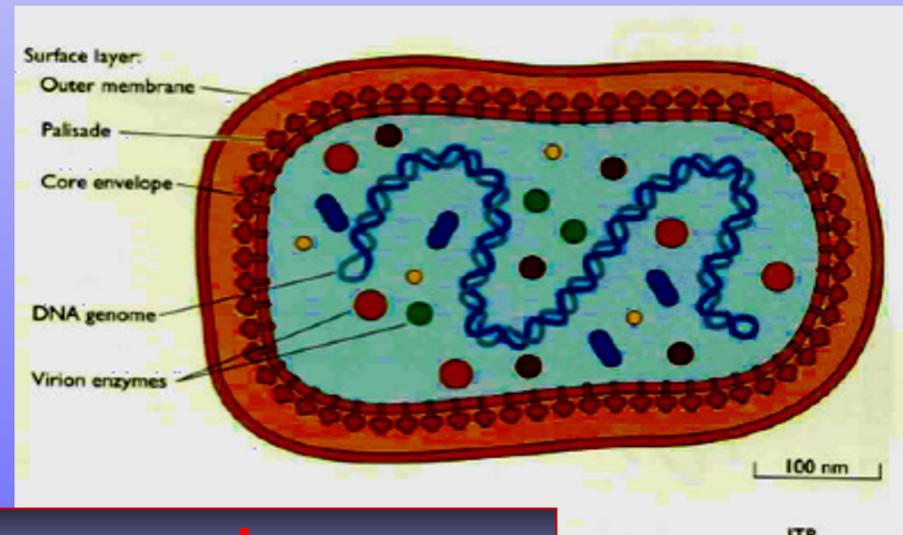
Enzimi:

RNA polimerasi

Poliadenilato sintetasi

Metil-transferasi

Guanilil-transferasi



**Trascrizione precoce nel core
mRNA senza introni- assenza di splicing**

POXVIRUS

- Eparan solfato
- EGF (Epidermal Growth Factor)

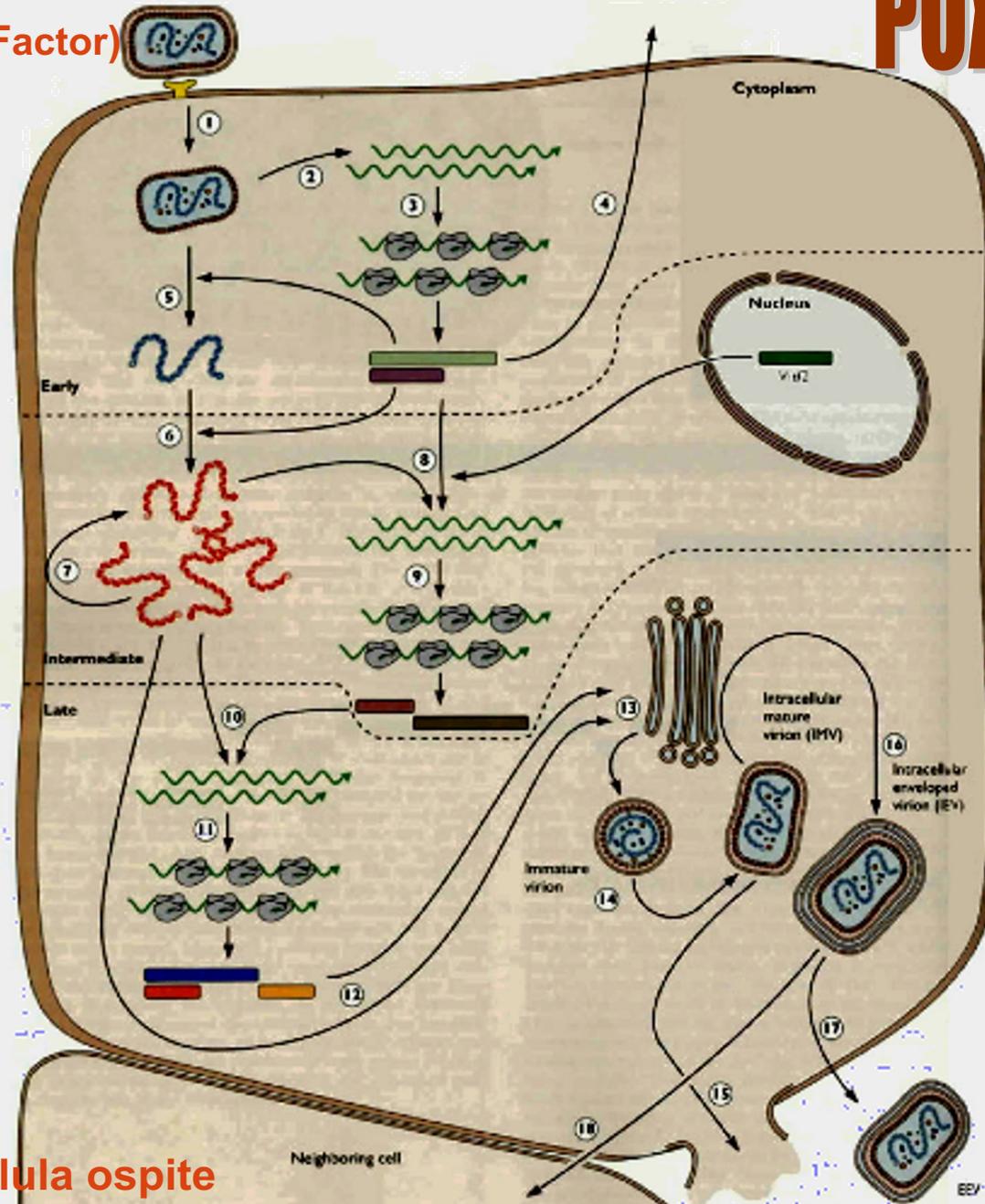
- Endocitosi

Trascrizione precoce nel core di:

- proteasi che rimuovono il core (uncoating)
- DNA polimerasi virale

Trascrizione tardiva:
-proteine strutturali

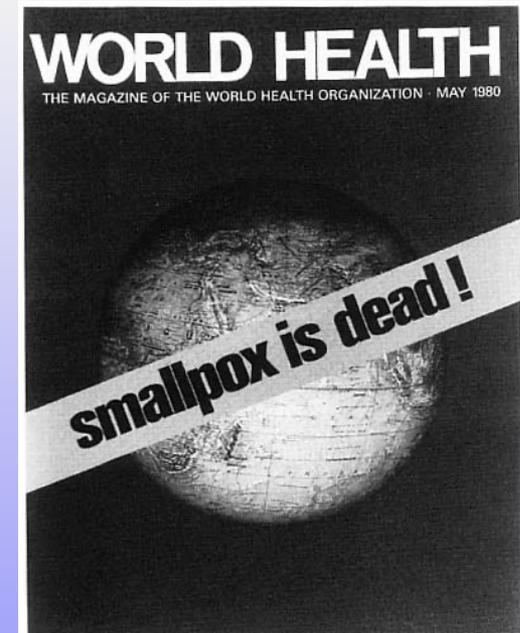
- Uscita per lisi della cellula ospite



il vaiolo è debellato al livello mondiale

Dal 1979 il
virus è
completamente
eradicato

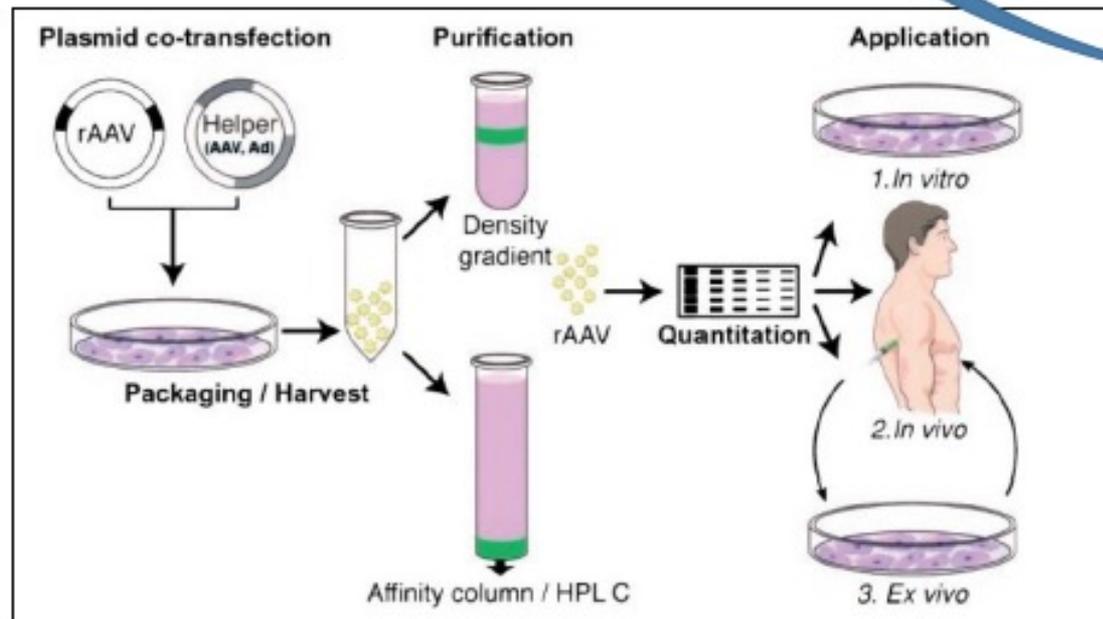
In Italia la vaccinazione è stata
sospesa nel 1977 e definitivamente
abrogata dal 1981



Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA)

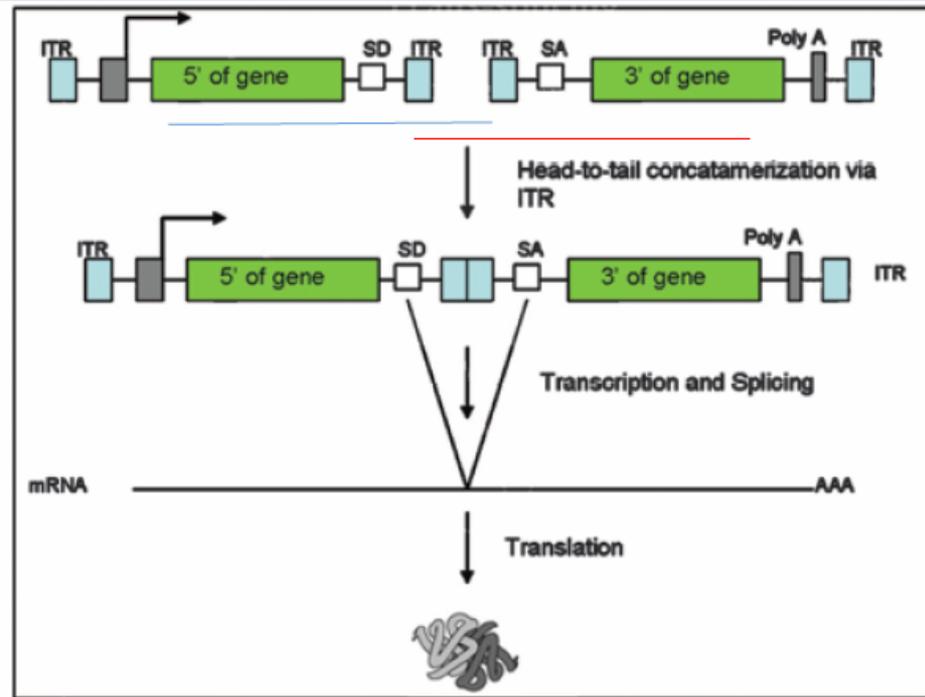
Laboratorio di Ricerche Virologiche e Biotecnologiche (Novosibirsk, Russia)

4. Lo sviluppo di nuovi *helper* li ha resi **idonei alla produzione di vaccini**
5. **Sviluppati vettori senza entrambi i geni *cap* e *rep*.** Genoma di piccole dimensioni (5 Kb). Nei primi vettori il DNA esogeno veniva inserito al posto del gene *cap*, mentre la proteina *rep* **interferisce coi promotori eucarioti ed è responsabile di molti degli effetti tossici.** **La delezione di *rep*, nei vettori rAAV, causa perdita della specificità di integrazione e aumenta il rischio di inattivazione inserzionale.**



6. **Scarsa capienza:** le ridotte dimensioni del virione non permettono l'inserimento di DNA esogeno di lunghezza superiore alla 4 Kb e questo comporta notevoli limitazioni al loro utilizzo.
7. **Sviluppo di vettori *trans*-splicing AAV:** co-trasfettando nella stessa cellula il cDNA clonato in due vettori separati, contenenti uno la regione 5' del cDNA e l'altro la regione 3'. Questo sistema sfrutta la capacità di formare dei concatenameri AAV testa-coda tramite ricombinazione nei ITR (**inverted terminal repeats**). In questo approccio, il transgene è diviso tra due vettori rAAV contenente adeguatamente collocato tra i siti di giunzione donatore (SD) e accettore (SA). La Trascrizione di molecole AAV ricombinate, seguita al corretto splicing del trascritto mRNA, produce un prodotto genico funzionale. Questa applicazione è utile per inserire fino a 9 kb.

Il **trans-splicing** è stato utilizzato con successo per l'espressione genica nelle cellule della retina, polmone, e, più recentemente, muscolo.



Gli AAV sono uno strumento promettente per la terapia genica:

- **Non scatenano una risposta immunitaria** (forse per la semplicità della struttura del loro capside)
- Per la **trasduzione di cellule quiescenti** del sistema nervoso, retina, muscolo e fegato ed in studi clinici preliminari
- Trattamento di malattie ereditarie: **fibrosi cistica, emofilia e distrofia muscolare**

TABLE 2. Clinical trials involving AAV vectors

Condition	Gene product(s)	Phase
CF	CFTR	I/II
Canavan's disease	Aspartoacylase	I
Parkinson's disease	GAD65, GAD65, AADC, neurturin	I
Alzheimer's disease	Beta nerve growth factor	I
Alpha-1-antitrypsin deficiency	AAT	I
Arthritis	TNFR:Fc	I
Leber congenital amaurosis	RPE65	I
Hemophilia B	Factor IX	I
Late infantile neuronal lipofuscinosis	CLN2	I
Muscular dystrophy	Minidystrophin, sarcoglycan	I
Heart failure	SERCA-2a	I
Prostate cancer	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factory	I/II/III
Epilepsy	Neuropeptide Y	I

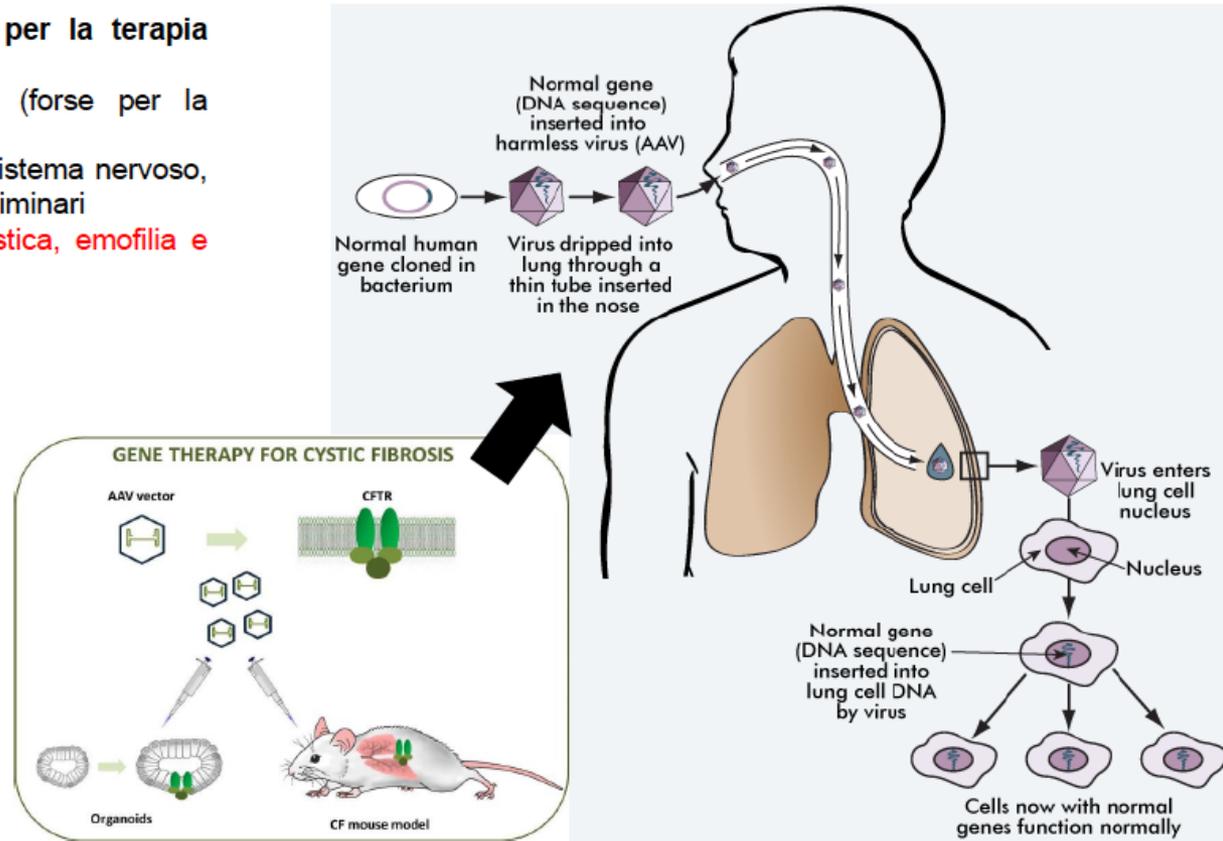


TABLE 2. *Properties of HTLV-transformed cells*

Continuous proliferation
Surface marker expression
Usually CD4+
Occasionally CD4–CD8+
Invariably IL-2R+
Express transferrin receptor (101)
May show altered HLA expression (208)
Increased expression of adhesion molecules (75)
Jak/STAT constitutively activated, HTLV-1 only (215)
Expression of cytokines
IL-1 (358)
IL-2 variable
IL-3 (249)
IL-5 (7)
IL-6 (353)
IL-9 (159)
γ -IFN (34)
CSF-1 (M-CSF) (158)
GM-CSF (158)
TNF- α and - β (164)
TGF- β (161)
NGF (93)
EGR-1 (289)
GGPF (17)

HTLV, human T-cell leukemia virus; IL, interleukin; HLA, human lymphocyte antigen; IFN, interferon; CSF, colony-stimulating factor; M, macrophage; G, granulocyte; TNF, tumor necrosis factor; TGF, transforming growth factor; NGF, nerve growth factor; EGR, epidermal growth factor receptor; GGPF, glial growth promoting factor.

TABLE 3. Promoters whose expression is influenced by the Tax protein

Promoter	Activated transcription factor	Reference
Genes induced by Tax		
Viruses		
HTLV-1/-2	CREB/ATF	71, 382
HIV	NF κ B	29
CMV	NF κ B	227
Cytokines and receptors		
IL-1	NF κ B	231
IL-2	NF κ B, NFAT	10, 89
IL-2R α	NF κ B	51
GM-CSF	NF κ B	118
G-CSF	NF κ B	118
IL-6	NF κ B	236
IL-8	NF κ B	229
IL-15	NF κ B	6
TNF- α	NF κ B	50
TNF- β	NF κ B	195
Lymphotoxin	NF κ B	266
NGF	CREB	93
INF- γ	?	34
IL-3	?	249
TGF- β 1	?	161
PTHrP	?	62
Act-2	?	244
Proenkephalin	?	149
Transcription factors and proto-oncogenes		
<i>c-fos</i>	CREB, SRF	73, 256
<i>c-sis</i>	EGR-1	339
<i>c-rel</i>	NF κ B	193
<i>c-myc</i>	NF κ B	60
<i>erg-1</i>	CREB, SRF	73
<i>erg-2</i>	CREB, SRF	73
<i>fra-1</i>	SRF	340
Cell adhesion molecules		
Vimentin	NF κ B	194
ICAM-1, CD54	NF κ B	335
Gp34	NF κ B	256
OX-40	?	117
Inhibitor of nucleotide excision repair		
PCNA	?	153
Inhibitor of apoptosis		
A-20	NF κ B	178
Genes repressed by Tax		
DNA repair enzyme		
β -polymerase	bHLH	348
Pro-apoptotic factors		
bax	bHLH	32
p53	bHLH	349
Protein tyrosine kinases		
lck	bHLH	363
Zap-70	?	190

Trasmissione

Il virus replica per espansione clonale delle cellule infettate più che attraverso cicli di replicazione che implicano la trascrizione inversa

Diffusione da cellula a cellula

La trasmissione richiede la presenza di cellule infettate:

- Transplacentare (rara)

- Allattamento (frequente)

- Sangue (trasfusioni, scambio siringhe ...)

- Sessuale (nello sperma)

HTLV-I e II

MANIFESTAZIONI CLINICHE

ATL (Adult T cell leukemia)

- Linfadenopatia generalizzata
- Interessamento viscerale
- Ipercalcemia
- Interessamento cutaneo
- Lesioni ossee litiche
- Infezioni opportunistiche

HAM/TSP (mielopatia associata a HTLV/paraparesi tropicale spastica)

- Demielinizzazione neuroni motori midollo spinale
- Sporadica
- Donne
- Talvolta familiare
- Disturbi andatura
- Spasticità
- Disturbi sensoriali
- Incidenza circa metà dell' ATL

POLIMIOSITE

POLIARTROPATIA

UVEITE

ATL (Adult T cell leukemia)

- Espansione di un clone CD4+ (raramente CD8+) spesso IL-2 indipendente
- Si sviluppa 20-30 anni dopo l' infezione
- Individui infettati hanno 1% di probabilità di sviluppare tumore durante la loro vita e il 5-10% di sviluppare una patologia legata ad HTLV
- Costante presenza di DNA provirale di HTLV-1 (no RNA)
- Integrazione del DNA provirale casuale nel DNA cellulare
- Integrazione policlonale (pre-ATL), oligoclonale o monoclonale (fasi avanzate)

TABLE 4. *Clinical Phases of HTLV-1 infection*

Stage	Monoclonal provirus	Skin lesions	Visceropathy	White blood count
Carrier Clinical status: no clinical signs.	+	-	-	Normal ($<4 \times 10^9/L$)
Pre-ATL Clinical status: variable-uncertain category.	+	-	-	Slightly elevated? ($\sim 4 \times 10^9/L$)
Smoldering ATL Clinical status: 5% abnormal lymphocytes, no hypercalcemia, variable course, may progress to ATL.	+	+	-	Normal ($<4 \times 10^9/L$)
Chronic ATL Clinical status: 5% abnormal lymphocytes, no hypercalcemia, variable course, may progress to ATL.	+	+	-	$>4 \times 10^9/L$
Lymphoma type Clinical status: $<1\%$ abnormal lymphocytes, lymphadenopathy, median survival ~ 10 months.	+	+/-	+	Normal ($<4 \times 10^9/L$)
Acute ATL Clinical status: $>5\%$ abnormal lymphocytes, hypercalcemia, median survival ~ 6 months.	+	+	+	$>4 \times 10^9/L$

These clinical phases may be but are not necessarily temporally related (314).

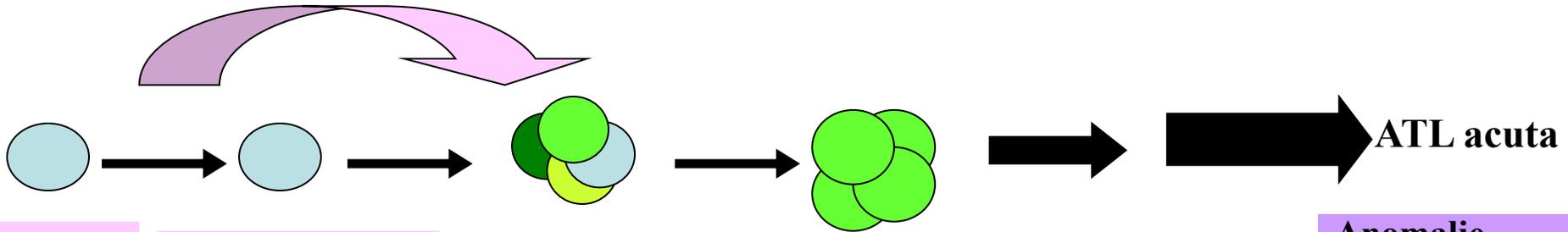
Risposta del sistema immunitario

- **Tutti** i pazienti con ATL e HAM/TSP **hanno anticorpi anti-Gag** (p19,p24, p15) e **anti-Env** (gp46, p21)
- Molti individui presentano anche **anticorpi Anti- Tax**
 - Compaiono **prima** quelli contro Gag p24, p19, contro Env p21, gp46, e dopo molti mesi contro Tax
- Anticorpi possono **modificare** corso dell' infezione ma **non l' eliminano**
- Risposta varia da individuo a individuo
- **CTL si sviluppano contro env, ma la maggior parte è contro tax**
- Descritta anche la citotossicità dipendente da anticorpi e NK
- La risposta immunitaria indotta da HTLV non è in grado di “eliminare” l' infezione virale che si trasforma in un' infezione persistente

HTLV-I e la patogenesi dell' ATL

**IL-2/IL-2R
loop autocrino**

Perdita dipendenza IL-2



infezione

**Trasformazione
(Tax e Rex)**

**Popolazione
policlonale**

**Selezione clonale
Tax-dipendente**

**Anomalie
cromosomiche**

**Risposta immune
non controlla infezione
completamente.
Infezione persistente**

**Sistema immune controlla
comparsa cloni maligni
durante la fase asintomatica**

immunodepressione

Fase asintomatica

Pre-ATL

**Fase sintomatica
Smouldering ATL, ATL cronica,
ATL acuta**

HTLV: Diagnosi

Indicazioni WHO*

Le indicazioni WHO per prevenire la trasmissione di HTLV-1/2 attraverso le **trasfusioni** prevedono:

1. Nei paesi in cui HTLV è endemico, l'introduzione dello **screening** per HTLV-1/2 deve tener presente l'impatto sulla disponibilità di sangue.
2. Lo screening per Ab anti-HTLV-1/2 deve essere effettuato usando un **saggio immunoenzimatico** altamente sensibile e specifico.
3. Nei paesi in cui HTLV non è endemico lo screening per HTLV-1/2 dovrebbe essere introdotto sempre prima dell'uso di sangue o emoderivati nella pratica clinica.



Per confermare e differenziare la diagnosi dopo lo screening Ab, si possono usare Western blot e/o PCR.