

Le slide sono già su teams.

Prof. Mauro Pistello

Corso diviso in 3 blocchi: Batteriologia (generale e speciale), Virologia (generale e speciale) e Micologia (generale e speciale).

Virologia Generale:

Antibiotici: Alexander Fleming, 1928: Osservò che sulle piastre Petri contaminate da muffa i batteri non crescevano in un alone attorno alla muffa, dalla muffa isolò la penicillina.

L'uso massiccio di antibiotici sta rendendo l'antibiotico-resistenza un problema in continuo peggioramento.

Per quanto riguarda la virologia invece stiamo assistendo ad un periodo d'oro degli antivirali. Lo sviluppo degli antivirali è iniziato più tardi rispetto agli antibiotici perché i virus per replicarsi usano i meccanismi molecolari della cellula, quindi c'è il rischio che il farmaco risulti tossico.

Jenner, 1700: Vaccino del vaiolo.

Esistono vari tipi di vaccino:

- Vaccini vivi attenuati: Efficaci ma con controindicazioni, specialmente in pazienti immunodepressi (ovviamente), tuttora usati.
- ...

I virus sono diventati visibili solo dopo l'invenzione del microscopio elettronico, prima si era capita la loro esistenza ma non erano mai stati osservati direttamente.

Osservano l'anomalo tasso di sarcomi in alcuni pollai è stata osservata l'esistenza dei virus oncogeni.

I Virus

Il nome deriva da Venom = veleno. È un patogeno che veicola informazione genetica e usa i macchinari molecolari della cellula ospite per generare copie di se stesso. È costituito da una porzione di materiale genetico variamente strutturato (RNA, DNA, singolo o doppio filamento). Caratterizzati da alta velocità di mutazione. Non contengono molecole ad attività enzimatica quindi non sono capaci di sintesi proteica o di metabolismo energetico.

Morfologia e struttura:

Materiale genetico complessato con proteine (che costituiscono il **capside**) a sua volta ricoperto da un **envelope** (che deriva dalla membrana della cellula da cui si è originato) e sul quale vengono esposti i recettori virali, necessari all'entrata del virus nella cellula bersaglio. Le singole proteine che formano il virus sono dette **capsomeri**. La maggior parte dei virus (virus nudi) non hanno l'envelope. L'envelope caratterizza i virus detti **rivestiti**. Le proteine recettori (spike) non sono sempre esposte perché potrebbero essere riconosciute facilmente dal sistema immunitario quindi sarebbe un punto di vulnerabilità.

La struttura del capsido è molto variabile e caratteristica delle famiglie di virus, ad esempio Ebola appartiene ai filovirus (genoma compattato da proteine disposto a spirale con i capsomeri attaccati intorno a difenderlo), altri virus hanno struttura ad icosaedro o altre forme ancora.

Esistono virus con genomi molto più complessi, come ad esempio l'Herpes virus, altri virus ancora hanno la necessità di portare enzimi virali che non sono disponibili nella cellula. Per contenere questo materiale aggiuntivo si è sviluppata la struttura icosaedrica (approssimazione più facile da costruire rispetto alla sfera).

I processi di replicazione ed assemblaggio virale devono essere veloci per evitare che i meccanismi di difesa della cellula abbiano il tempo di attivarsi.

I virus nudi tendono ad essere più resistenti ai disinfettanti mentre quelli rivestiti sono favoriti all'interno dell'organismo ospite, inoltre i virus rivestiti possono uscire dalla cellula senza rompere la membrana (infezioni persistenti).

Nei virus rivestiti si trovano proteine tra l'envelope e il capsido dette **proteine della matrice**.

La presenza o meno di un envelope porta a differenze sostanziali nelle modalità di entrata e di uscita dalla cellula.

I virus nudi escono quasi sempre per lisi della cellula, quelli rivestiti per esocitosi (infezioni persistenti).

I virus rivestiti presentano una matrice proteica tra il capsido e l'envelope, queste proteine aumentano la rigidità della struttura del virus.

L'involucro esterno è perso nelle prime fasi di entrata nella cellula e va ad inattivare alcuni meccanismi di difesa.

All'esterno dell'organismo ospite i virus rivestiti sono molto più resistenti.

Il genoma dei virus è molto piccolo rispetto al genoma delle cellule, alcuni si sono ridotti a 3-4 kb.

Le proteine virali svolgono molte funzioni (moonlighting, aumenta la compattezza del codice).

Il genoma virale, tranne pochissime eccezioni, non presenta introni.

Alcuni genomi virali presentano geni sovrapposti, danno origine a prodotti proteici differenti se la traduzione inizia in punti diversi.

Nei virus a doppia elica alcuni geni sono codificati in una catena e altri nell'altra.

Nomenclatura dei virus:

Classicamente classificati in base alle malattie che causano, metodo inconsistente perché virus possono dare malattie differenti e virus diversi possono dare sintomi molto simili.

Esempio: virus dell'epatite, ne esistono molti tipi (A, B, C, D, E, F, G, forse altri) estremamente diversi tra loro come struttura, biochimica, modalità di trasmissione e quindi approccio terapeutico.

I virus erpetici invece danno malattie molto diverse pur essendo strutturalmente indistinguibili al microscopio elettronico.

I virus, a differenza degli organismi superiori, hanno un tasso di mutazione genetica molto alto, nel giro di ore o giorni si generano nuove varianti e ceppi.

Nella nomenclatura dei virus si parla di quasi-specie e non di specie appunto per questo.

Nella nomenclatura corrente si segue un approccio gerarchico organizzato in famiglie, sottofamiglie, generi e quasi-specie.

Ciclo replicativo dei Virus:

Fase precoce:

- i) Attacco (adsorbimento) alla cellula ospite. Fase più critica, se ha successo quasi sempre il virus arriverà a replicarsi (??? dopo il prof dice il contrario).
- ii) Penetrazione nel citoplasma.
- iii) Uncoating (scapsidizzazione), disassemblaggio della particella infettiva. Il punto in cui avviene dipende dal tipo di genoma, i virus a DNA lo fanno nel nucleo, i virus a RNA lo fanno nel citoplasma. È il momento in cui il virus è più vulnerabile, in cui la cellula può riconoscere il materiale genetico esogeno e i farmaci antivirali possono agire. Questa fase è anche detta eclissi perché il virione non è più viribile.
- iv) Replicazione del genoma virale. Il virus esprime i propri geni in un ordine ben preciso, ci sono geni precoci, geni intermedi e tradivi. Il genoma serve sia per produrre enzimi e altre proteine virali necessari alla replicazione ed all'assemblaggio ma deve anche replicarsi per generare nuovi virioni.

Fase tardiva:

- v) Assemblaggio dei virioni figli. Avviene nel punto dove si è replicato il genoma, i virus a DNA importano le proteine del capsido nel nucleo e si assemblano lì, i virus a RNA si assemblano nel citoplasma.
- vi) Rilascio dalla cellula ospite. Dipende dalla natura del virus, virus nudi generalmente escono per lisi, i virus rivestiti per gemmazione.
- vii) Maturazione.

I virus infettano preferenzialmente cellule in attiva replicazione (es. mucose) perché hanno il metabolismo più attivo, il virus può accelerare il metabolismo di cellule quiescenti ma risulta meno efficiente.

Virus che replicano più lentamente generano pochi virioni per cellula infettata (10^3) ma sono quasi tutti infettanti, virus più veloci generano molti più virioni figli ($10^6 - 10^8$) ma molti sono incompleti.

Fase I, attacco:

Legame tra una proteina virale (anti-recettore) ed un elemento della membrana della cellula ospite (recettore).

I recettori possono essere proteine, carboidrati, glicoproteine o glicolipidi.

Il recettore cellulare è specifico per un virus.

Alcuni virus hanno più anti-recettori diversi quindi hanno multiple vie di entrata nella cellula (anche 5 diverse).

In alcuni casi (es. dengue) il dominio Fc degli anticorpi facilita il legame del virione alla cellula (tramite i recettori per il dominio Fc). In questi casi la presenza di una risposta immune è uno svantaggio.

I recettori ovviamente non esistono per far entrare il virus ma servono alla funzione normale della cellula, molte sono integrine o molecole di adesione (molti virus infatti infettano gli epiteli, come detto prima). Oppure sono proteine transmembrana o canali.

Ad esempio il virus HIV lega la molecola CD4 sui linfociti.

Gli anticorpi neutralizzanti legano l'anti-recettore virale nel punto di legame con il recettore impedendo così l'entrata (problema risolto). Lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti è l'obiettivo del sistema immunitario e dello sviluppo dei vaccini.

Per difendersi i virus hanno sviluppato strategie, ad esempio alcuni presentano i recettori introflessi (canyon)

Fase II, entrata nel citoplasma:

Virus Rivestiti

Es. HIV presenta due glicoproteine, una responsabile dell'attacco ed una della fusione delle membrane. La glicoproteina di superficie CD4 è il recettore primario, CCR5, CXCR4 ed altre sono i co-recettori. Una volta realizzata l'interazione con il recettore principale e con i co-recettori si estende la glicoproteina necessaria alla fusione e si procede alla fusione delle membrane.

Il recettore in questo caso è una struttura dinamica che cambia nel tempo, la prima glicoproteina (gp120) varia molto spesso impedendo al sistema immunitario di sviluppare anticorpi neutralizzanti, pur mantenendo la stessa struttura per gli altri attori coinvolti.

L'entrata dei virus rivestiti avviene generalmente per fusione di membrana facendo entrare il capsido nel citoplasma cellulare.

Virus Nudi

Entrano principalmente per endocitosi.

Esistono molte situazioni intermedie in cui, ad esempio, virus rivestiti entrano per endocitosi.

Fase II, uncoating:

Virus con genoma a DNA raggiungono i pori nucleari e penetrano nel nucleo. In questa fase i virus modificano il citoscheletro per attraversare il citoplasma più velocemente.

I virus che entrano per endocitosi il capsido si disgrega parzialmente ad opera della vescicola endocitotica liberando il materiale genetico.

HIV è un virus ad RNA che però da origine ad un DNA a doppio filamento che viene trasportato nel nucleo ed integrato nel genoma ospite, la produzione del DNA avviene nel citoplasma ad opera dell'enzima retrotrascrittasi (virale).

Fase V: Assemblaggio

Abbiamo molte copie dell'acido nucleico e delle proteine che compongono il capsido. È una fase in cui la cellula è molto danneggiata, non ha capacità di sintetizzare proteine, perché il sistema ribosomiale è sfruttato per la sintesi di proteine virali e per impedire la sintesi di molecole necessarie ai meccanismi di difesa. I nucleotidi servono invece per sintetizzare genoma virale e per il metabolismo energetico. Deve essere veloce per terminare prima che la cellula muoia.

Si assemblano le proteine del capsido lasciando un orifizio dal quale viene "tirato dentro" l'acido nucleico. Le molecole di acido nucleico vengono prodotte tutte in serie attaccate e tramite il riconoscimento delle sequenze di inizio e di fine alcune nucleasi taglia le porzioni destinate a ciascun virione.

Fase VI: Rilascio

Virus nudi: lisi cellulare.

Virus con involucro: escono per gemmazione, si assemblano in prossimità della membrana.

I virus rivestiti che assemblano nel nucleo prendono il proprio rivestimento dalla membrana nucleare, altrimenti lo prendono dalla membrana citoplasmatica.

Durante l'inserzione delle proteine virali nella membrana il virus cerca il più possibile di eliminare le proteine naturalmente presenti nella membrana perché potrebbero presentare ostacolo alla diffusione essendo riconosciute come non-self da altri organismi ospiti.

Fase VII: Maturazione

Avviene quando il virus è gemmato, specifici tagli o cambiamenti conformazionali nelle proteine virali (sintetizzate come precursori) operate da proteasi virali ed enzimi cellulari. Con questo processo il virione neoformato spende meno tempo all'interno della cellula morente.

L'espressione genica virale, la replicazione del genoma virale e la sintesi proteica sono determinate dalla struttura del genoma virale.

Buona parte dei geni **precoci** virali servono a fare il dirottamento (hijack) dei meccanismi metabolici della cellula.

Le DNA/RNA polimerasi virali funzionano a velocità più che tripla rispetto a quelle eucariotiche, ciò si traduce in un tasso di mutazione molto più elevato, in congiunzione con la mancanza (tranne poche eccezioni) di un sistema di proof-reading ciò porta ad una molto rapida produzione di nuove varianti. I geni **intermedi** codificano per proteine che tengono sotto controllo il processo replicativo. I geni **tardivi** infine realizzano proteine necessarie all'assemblaggio.

DNA a doppia catena: Quando il materiale genetico virale è replicato nel nucleo esso è trascritto dalle RNA polimerasi cellulari (virus a DNA a doppia catena).

Virus con DNA a singola catena: deve diventare a doppia catena, per fare ciò si porta una DNA polimerasi virale che sintetizza l'altro filamento. Si procede poi come i virus a DNA ds.

Virus ad RNA: tranne alcune eccezioni si replicano nel citoplasma e quasi sempre usano RNA polimerasi virali.

RNA singolo filamento a polarità positiva: filamento di RNA sufficiente a produrre la progenie, viene tradotto dai ribosomi, il prodotto è tagliato nelle varie proteine virali tra cui la RNA polimerasi che duplica il genoma virale. Si produce così un filamento di RNA a polarità negativa che è usato come stampo per produrre i nuovi filamenti a polarità positiva.

RNA a singolo filamento a polarità negativa: portano nel capsido (up-front) la RNA polimerasi che produce i messaggeri che portano alla sintesi proteica e filamenti positivi che fungono da stampi per i nuovi filamenti a polarità negativa.

RNA a doppia catena: Anche questi hanno bisogno di una RNA polimerasi up-front.

Retrovirus: Hanno all'interno della particella virale due molecole di RNA a polarità positiva che sono retrotrascritte in DNA (da enzimi virali up-front) che è integrato nel DNA ospite e trascritto da polimerasi cellulare per ottenere i messaggeri per le proteine virali e RNA per i nuovi virioni.

Impatto sulla cellula

Si possono avere vari tipi di infezione:

- **Produttiva (citolitica):** la cellula produce virioni e poi muore, maggior parte dei casi.
- **Abortiva:** i meccanismi di difesa della cellula funzionano e bloccano uno stadio della replicazione virale.
- **Persistente attiva:** Il virus continua a replicare, danno al substrato o all'organo nel quale il virus si replica.
- **Persistente latente:** Produzione di virioni intermittente o assente.
- **Persistente trasformante:** Il virus perde la capacità di replicare, il virus modifica il genoma cellulare ma non può terminare la replicazione ed uccidere la cellula. La cellula può diventare tumorale.

Infezione Produttiva o Citolitica:

Una delle prime cose che fa il virus è il blocco della sintesi proteica cellulare per avere a disposizione l'intero macchinario ribosomiale e per bloccare le proteine dei sistemi di difesa cellulari. I meccanismi sono diversi ma il concetto di fondo è che rendono molto difficile la traduzione dei messaggeri cellulari. Alcuni bloccano componenti proteiche dei ribosomi, altri rimuovono i cap dagli RNA messaggeri, altri degradano la coda di poli-A, ecc... La sintesi virale può procedere perché RNA virali hanno cap diversi che sono riconosciuti ugualmente dal ribosoma ma con meccanismi diversi rispetto a come vengono riconosciuti i messaggeri cellulari. Quest'operazione è realizzata dalle proteine dei geni precoci o da proteine già presenti nel capsido o nella matrice del virus.

Un altro effetto precoce è il rallentamento/blocco della replicazione del DNA cellulare.

Avvengono molte altre alterazioni delle vie metaboliche della cellula, in ogni fase di replicazione il virus interagisce con 300-500 o più proteine cellulari. Le proteine con cui interagiscono i virus dipendono dalla tipologia del virus, alcune vie metaboliche (circa 150 proteine) però sono alterate da praticamente tutti i virus indipendentemente dalla loro natura.

Alterazioni osservabili dell'infezione virale (effetti citopatici)

- Corpi di inclusione
- Cambiamenti morfologici
- Distruzione del nucleo
- Vacuoli
- Sincizi
- Gemmazione di virioni sulla membrana

Corpi di inclusione: Si osservano nel punto dove avviene l'assemblaggio dei virioni (nucleo o citoplasma).

Sincizi: vengono dati principalmente da virus con involucro esterno che entrano per fusione della membrana. Le proteine virali che agganciano la membrana della cellula ospite durante la replicazione virale vengono inserite sulla membrana della cellula ospite, può succedere che interagisca con il recettore delle cellule vicine e che induca la fusione tra cellule vicine. Per il virus è un vantaggio perché aumentano le risorse disponibili per la replicazione virale e perché la diffusione cosiddetta cell-to-cell è molto più efficiente, non uscendo il virus nell'ambiente esterno non può essere bloccato dal sistema immunitario.

Come può la cellula cercare di bloccare il ciclo replicativo?

Uno dei sistemi più filogeneticamente conservati è la sintesi di small-RNA. Hanno la funzione di modulare l'espressione genica ma si possono associare e bloccare l'espressione di materiale genetico virale. Alcuni invece hanno effetto indiretto, vanno a distruggere messaggeri cellulari di proteine che aiutano la replicazione virale. HIV ad esempio nelle prime fasi aumenta l'espressione di alcune proteine cellulari perché queste proteine sono utili ad aumentare la trascrizione del genoma virale. Per ostacolare questo passaggio la cellula produce sRNA o miRNA che bloccano questi messaggeri. Anche i virus hanno i propri miRNA che ostacolano ad esempio la presentazione dell'antigene e l'apoptosi.

Le cellule contengono intrinsecamente proteine che ostacolano i virus, alcune cercano di bloccare l'ingresso, altri l'uncoating, l'uscita dalla cellula, ecc...

Esempio HIV e APOBEC3: Meccanismo che riduce la produzione di virioni di circa 1 milione di volte. Sono molecole presenti a livello dei linfociti T, modificano la sequenza genetica coinvolta nel riconoscimento dell'antigene. In ambito antivirale esse vengono incluse nelle particelle virali che si formano, quando questa particella infetta una nuova cellula le due molecole di RNA virali vengono normalmente usate per produrre un DNA a doppio filamento (retrotrascrizione). Se APOBEC è stata incorporata nella particella essa toglie un gruppo amminico alla maggior parte delle citosine del genoma virale convertendo la citosina in uracile, la trascrittasi inversa inserisce adenina (complementare dell'uracile) invece di guanina. (ipermutazione G-to-A). I trascritti prodotti dal materiale genetico ipermutato portano a prodotti proteici aberranti.

Altro meccanismo è rappresentato dalla produzione di interferoni in risposta alla captazione di molecole non-self che stimolano la produzione di proteine necessarie alla difesa ed essendo rilasciati in maniera paracrina stimolano lo stesso aumento di produzione nelle cellule vicine. Ovviamente i virus antagonizzano anche la produzione di interferoni.

Meccanismo di Trasformazione:

Si tratta di un processo multi-step con inizio, promozione e progressione.