17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 335

CAPITOLO 17

Virus, viroidi e prioni

Introduzione
Struttura
Ecologia e classificazione
Replicazione virale
- Attacco e penetrazione
- Strategie di sintesi di acidi nucleici virali
- Sintesi delle proteine virali
- Assemblaggio dei virioni e liberazione della progenie virale dalla cellula ospite
- Crescita e titolazione dei virus

Lisogenia e integrazione nel genoma ospite
- Introduzione
- Come il genoma di un fago temperato si integra in quello di una cellula ospite
- Come il genoma virale integrato rimane silente
- Che cosa causa l'induzione virale?
- Decidere fra lisogenia e lisi
- Quali possono essere le conseguenze genetiche della lisogenia?
- Quale può essere l'effetto della lisogenia nell'evoluzione?

Viroidi e prioni
- Viroidi
- Prioni

Conclusioni
Domande di ripasso

Introduzione

Di fronte a queste piccolissime organizzazioni biologiche infettanti di livello subcellulare, formate essenzialmente da una o poche molecole informazionali di acido nucleico, dette virus, sorgono spontanee alcune domande circa la loro origine e il tipo di evoluzione a cui questi parassiti endocellulari obbligati sono andati incontro. I virus ci appaiono come particelle inerti in grado tuttavia di asservire le cellule a proprio vantaggio e di causare profondi cambiamenti nelle attività metaboliche e genetiche delle cellule infettate. Le caratteristiche dei virus sono molto singolari nell'ambito biologico e, prima della loro scoperta, nessuno poteva immaginare la presenza in natura di piccole particelle infettanti in grado di moltiplicarsi mediante la perdita della loro integrità strutturale e con un processo di disgregazione all'interno di una cellula ospite, in grado di influenzare tutte le forme di vita, di essere straordinariamente variabili sia nella forma che nelle dimensioni e di essere presenti nell'ambiente in concentrazione molto elevata. Nella realtà i virus giocano un ruolo centrale in biologia: hanno condizionato l'evoluzione, sono costantemente coinvolti nelle interazioni ecologiche fra organismi viventi e, infine, inducono malattie spesso anche gravi (basti pensare all'AIDS e alle epatiti virali). Eppure tali particelle virali, pur così importanti, non appaiono finora

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 336

© 978-88-08-06761-6

www.microbebook.org

17.1 A historical discussion of virology

Una rassegna storica di virologia

nella classificazione filogenetica degli esseri viventi articolata in "tre domini": *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* (vedere la Figura 1.2). La ragione di tale assenza si deve al fatto che i virus, pur presentando alcune delle caratteristiche tipiche degli esseri viventi, come la capacità di replicare, mutare e ricombinare, non sono considerati dei veri e propri organismi viventi. [N.d.T.: di loro si parla in termini di particelle infettanti di livello subcellulare, vale a dire organizzazioni biologiche in grado di essere, nelle cellule ospiti, parassiti endocellulari obbligati e completamente inerti dal punto di vista metabolico in ambiente extracellulare.]

Struttura

I virus hanno la capacità di infettare un'ampia varietà di ospiti e risultano molto più piccoli delle cellule (Figura 17.1). Il virus più grande finora conosciuto è sostanzialmente grande quanto il batterio più piccolo e ha un volume che risulta molte migliaia di volte maggiore di quello del più piccolo dei virus. Le particelle virali differiscono fra loro per composizione chimica, forma e dimensioni. [N.d.T.: variando da 0,002 a 0,3 μm; l'unità di misura più comunemente impiegata per i virus è il nanometro (nm 10^{-9} metri). Come esempio di dimensioni virali, si consideri che è di 200 nm il diametro di uno dei virus più grandi (virus del vaiolo, *smallpox*) e di solo 28 nm quello di uno dei virus più piccoli (virus della poliomielite o poliovirus).] Alcuni virus rassomigliano a bastoncini, altri a cupole geodetiche e altri ancora sono simili a veicoli per l'atterraggio lunare (per esempio il batteriofago T4), e comunque tutte queste forme ampiamente diversificate di virus presentano una struttura base comune: la disposizione dei componenti dell'involucro proteico che tutti essi posseggono.

Una particella virale è costituita dal materiale genetico o genoma virale, cioè da acido nucleico DNA (*deossiribovirus*) o RNA (*ribovirus*), mai entrambi, racchiuso da un contenitore proteico. La singola particella virale completa viene indicata con il termine di **virione**. Il contenitore proteico protettivo del virione è detto **capsìde** e il complesso capside-acido nucleico è detto **nucleocapsìde**. Le subunità strutturali del capside prendono il nome di **capsomeri**, i quali sono costituiti da una singola proteina oppure da diversi tipi di proteine. Nei virus più semplici e più piccoli conosciuti, i capsomeri sono disposti in modo simmetrico a formare uno o due tipi di strutture: quella con capside isometrico (quasi sferico), la cui forma più diffusa è quella con la struttura e la simmetria di un **icosaedro**, ovvero con 20 facce a forma di triangolo equilatero, e quella a forma bastoncellare con capside a simmetria **elicoidale** provvisto di capsomeri organizzati in una struttura a forma di spirale intorno a un asse ideale, con la parte centrale (***core***) cava in cui è contenuto l'acido nucleico virale (Figura 17.2). Entrambe le forme sono determinate dalle proprietà intrinseche dei capsomeri: indagini sperimentali hanno evidenziato come capsomeri isolati siano in grado di autoassemblarsi (secondo precise regole cristallografiche) spontaneamente in forma di virione anche in assenza degli acidi nucleici. Le dimensioni dei virus con struttura icosaedrica sono determinate soltanto dalla proprietà di autoassemblarsi, mentre la lunghezza dei virus filamentosi dipende dalla lunghezza dell'acido nucleico che essi contengono al loro interno. Se i virus filamentosi acquisiscono acido nucleico estraneo, i virioni diventano semplicemente più lunghi (una proprietà sicuramente vantaggiosa se si vogliono ottenere proteine mediante ingegneria genetica).

Un virione icosaedrico semplice è costituito di 60 capsomeri, 3 in ciascuna delle sue 20 facce triangolari, mentre i virus icosaedrici più grandi sono costituiti da moltissimi capsomeri (fino 1500). Ma poiché i capsomeri sono asimmetrici, il numero di essi che può essere assemblato per formare una faccia triangolare simmetrica equilatera segue rigide regole. Quindi i virioni icosaedrici non contengono un numero qualsiasi di capsomeri. La struttura icosaedrica successiva a 60 è quella con 180 subunità (tipica di molti virus), mentre le ulteriori e più grandi organizzazioni compatte presentano 240, 540, 960 e 1500 subunità.

www.microbebook.org

17.2 More details of viral structure

Più dettagli sulla struttura virale

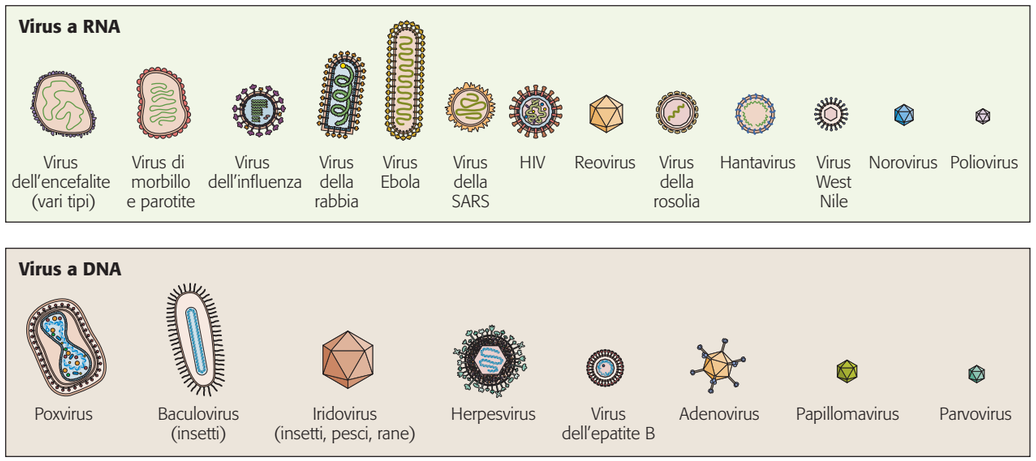

Figura 17.1
Esempi di forme e dimensioni di virus. Notare lampia escursione esistente sia nelle forme che nelle dimensioni.

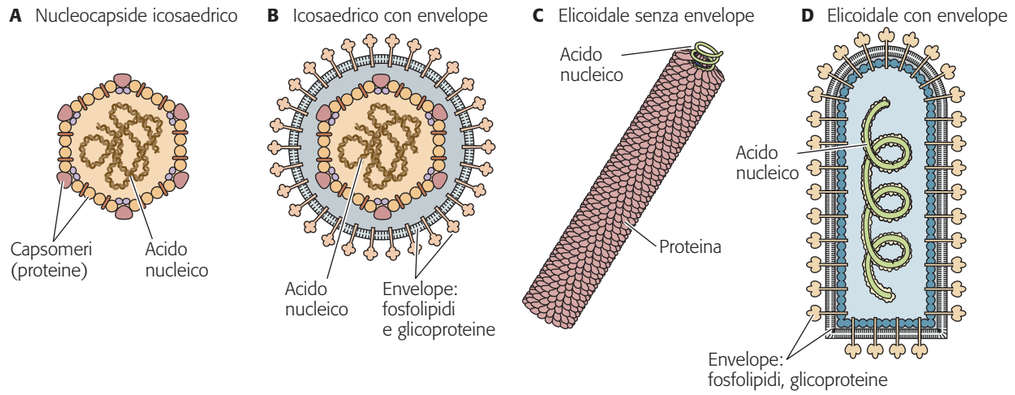

Figura 17.2
Tipiche forme virali. **(A)** Icosaedrica, senza envelope; **(B)** icosaedrica, provvista di envelope; **(C)** elicoidale, senza envelope; **(D)** elicoidale, provvista di envelope.

© 978-88-08-06761-6

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 338

© 978-88-08-06761-6

Alcuni virus presentano una **morfologia mista**; un esempio di questo tipo di struttura è rappresentato dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV), che è costituito da un capside icosaedrico e un core filamentoso di acido nucleico.

Alcuni virus sono provvisti di un *involucro lipoproteico* e carboidratico denominato **pericapsìde** (o peplos; ingl. ***envelope***, inviluppo), così denominato in quanto circonda il capside del virus. [N.d.T.: l'envelope è una struttura membranaria complessa costituita da un doppio strato lipidico in cui sono inserite proteine (in genere glicoproteine). I virus animali con capside a simmetria elicoidale sono sempre provvisti di envelope lipoproteico, mentre nei virus con capside isoedrico solo alcuni lo possiedono. Va sottolineato che l'envelope costituisce la componente del virione che interagisce per prima con la cellula ospite.] Le proteine di questa struttura sono codificate dal genoma virale, mentre le componenti lipidiche e carboidratiche derivano da una delle membrane della cellula ospite (per esempio la membrana citoplasmatica, la membrana nucleare, oppure la membrana del Golgi o del reticolo endoplasmatico). Queste componenti cellulari vengono acquisite al momento che il virus estrude (gemma) attraverso la membrana della cellula ospite, nella fase di maturazione del ciclo di moltiplicazione virale (Figura 17.3). In aggiunta, vari virus con envelope presentano strutture microfilamentose specializzate dette **peplomeri** (ingl. *spokes,* raggi, o *spikes*, spicule) che si proiettano all'esterno dell'involucro lipoproteico e sono coinvolte nella fase di attacco (adsorbimento) alla cellula ospite, come quelle che è possibile riscontrare nei virus influenzali o in alcuni batteriofagi dal caratteristico aspetto da modulo lunare. [N.d.T.: esistono poi anche **virus complessi** nei quali i virioni sono composti di parecchie parti distinte, ciascuna con la sua configurazione e simmetria. Per ciò che attiene la struttura, i virioni più complessi risultano essere alcuni virus dei batteri, detti **batteriofagi** o **fagi**, composti da teste icosaedriche e code elicoidali a volte con struttura complessa.]

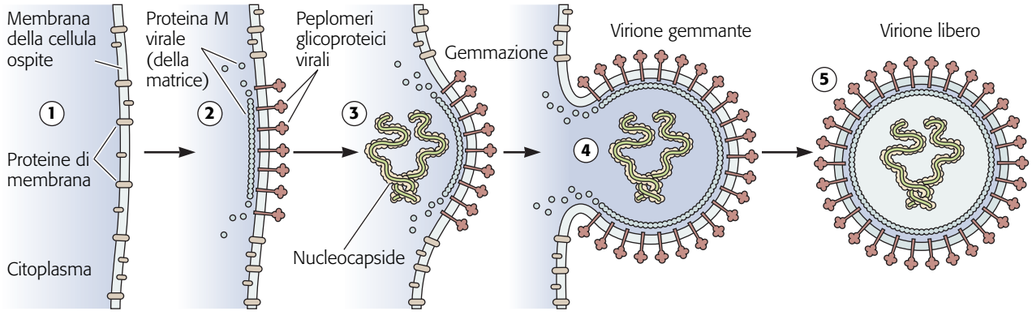

Figura 17.3
Gemmazione virale attraverso la membrana plasmatica. **(1)** La membrana della cellula ospite nella fase precedente o iniziale dell'infezione virale. **(2)** Molecole proteiche della matrice, codificate nel genoma virale, vengono associate alla membrana plasmatica. I peplomeri glicoproteici virali vengono incorporati nella membrana. **(3)** L'acido nucleico virale e le proteine (nucleocapside) sono assemblate vicino alla membrana e incomincia la gemmazione. **(4)** La gemmazione continua mentre molti peplomeri virali vengono inseriti nella membrana plasmatica. **(5)** La gemmazione risulta completata e il virione maturo viene rilasciato.

© 978-88-08-06761-6

Come già detto, i virioni nell'ambiente esterno risultano metabolicamente inerti, ovvero non effettuano processi metabolici al di fuori della cellula ospite; tuttavia essi non sono biochimicamente inattivi. Alcuni virioni possiedono, infatti, **enzimi virali codificati** nel proprio genoma i quali svolgono un ruolo primario nel processo infettivo: vengono utilizzati nella fase di attacco alle cellule ospiti, o nella fase di replicazione e persino modificazione dei loro acidi nucleici (questo aspetto verrà trattato in dettaglio più avanti nel capitolo). Alcuni dei virus di maggiori dimensioni, come quello che causa il vaiolo umano (o come un enorme virus trovato in alcune amebe, detto mimivirus), sono molto complessi e sollecitano la seguente domanda: che cosa gli manca perché essi possano diventare entità cellulari capaci di replicarsi in modo indipendente?

www.microbebook.org
17.3 Details of the mimivirus
Dettagli sui mimivirus

Ecologia e classificazione

Pochissime specie animali, vegetali e microbiche sono in grado di eludere un'infezione virale e da questa constatazione è possibile dedurre che esiste un'ampia varietà di gruppi diversi di virus. Si conoscono centinaia di virus in grado di causare malattie infettive nell'uomo (Tabella 17.1) e anche organismi "semplici" come *Escherichia coli*

Tabella 17.1
Un ospite, molti virus: le principali malattie infettive dell'uomo causate da virus[a]

Virus a RNA
Influenza
Raffreddore comune (causato da oltre 100 tipi diversi di virus)
SARS[b]
Encefalite West Nile
Sindrome polmonare da Hantavirus
Rabbia
Parotite
Morbillo
Rosolia
Poliomielite
Disordini gastrointestinali (molti differenti tipi di virus, per esempio agente Norwalk, rotavirus)
Febbre emorragica da Ebola
Infezione da HIV, AIDS
Virus a DNA
Herpes labiale (herpes simplex)
Herpes genitale
Epatite B
Vaiolo
Varicella, fuoco di S. Antonio (herpes zoster)
Mononucleosi infettiva (virus Epstein-Barr)
Infezione citomegalica
Infezione da adenovirus
Papillomatosi (verruche)

[a] Molte centinaia di virus sono riconosciuti agenti eziologici di malattie infettive dell'uomo. Alcune delle malattie sono specifiche dell'uomo (come il vaiolo), altre (come l'influenza) non lo sono. Alcuni virus sono in grado di superare non solo le barriere di specie ma anche quelle di regno e riescono a infettare sia animali che vegetali.
[b] SARS, sindrome respiratoria acuta grave (*severe acute respiratory syndrome*).

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 340

© 978-88-08-06761-6

possono essere infettati da dozzine di virus differenti. Ciascun gruppo virale è costituito da vari **ceppi** (*strain*) che differiscono fra loro per la virulenza e le proprietà antigeniche (sierotipi). I virus tendono a essere strettamente ospite-specifici anche se esistono in tal senso varie eccezioni, come per esempio il virus dell'influenza dei suini che può infettare sia esseri umani che maiali. I virus conosciuti fino a oggi sono migliaia e tuttavia sappiamo che questa valutazione sottostima notevolmente la realtà del mondo virale che è intorno a noi.

Esistono forme cellulari di vita che non sono infettate dai virus? Probabilmente no. Siamo inoltre consapevoli dell'esistenza di molti virus senza tuttavia conoscere quali ospiti possano infettare; gli oceani, per esempio, contengono un numero enorme di virus, più di quanto si possa immaginare: attraverso il conteggio al microscopio elettronico si è accertato che ogni millilitro di acqua di mare contiene oltre 10 milioni di particelle virali, presumibilmente **batteriofagi** (virus che infettano i batteri). Poiché la maggior parte dei batteri dell'acqua di mare non possono ancora essere coltivati in laboratorio, possiamo solo indovinare quali siano gli ospiti di questi virus. Questa mancanza di conoscenze non permette di chiarire la grande importanza delle relazioni ecologiche ed evolutive. I virus possono essere classificati in molti modi: in base al tipo di ospite (batteri, piante, animali, ecc.), alla loro forma e configurazione, alla presenza o assenza dell'envelope, al tipo di acido nucleico (RNA o DNA, a singolo o a doppio filamento, lineare o circolare) racchiuso nel capside (Tabella 17.2 e Figura 17.4).

Tabella 17.2
Alcuni virus animali

Gruppo	Polarità[a] dell'acido nucleico	Esempio di malattia[b]
Virus a RNA		
Monocatenario		
Poliovirus	Positiva	Poliomielite
Coronavirus	Positiva	Raffreddore, SARS
Virus dell'epatite A	Positiva	Epatite A
HIV	Positiva	AIDS
Virus della rabbia	Negativa	Rabbia
Virus del morbillo	Negativa	Morbillo
Virus dell'influenza	Negativa	Influenza
Bicatenario		
Rotavirus		Gastroenterite
Virus a DNA		
Monocatenario		
Parvovirus		Rash (uomo), malattia GI (cani)
Bicatenario		
Adenovirus		Raffreddore, infezioni oculari
Herpesvirus		Herpes, encefalite, mononucleosi infettiva, varicella
Poxvirus		Vaiolo, vaiolo vaccino
Virus dell'epatite B[c]		Epatite B

[a] Positiva indica che l'RNA dei virioni può servire direttamente come mRNA. Negativa indica che l'RNA dei virioni deve prima essere copiato in un filamento complementare, che poi serve da mRNA.
[b] SARS, sindrome respiratoria acuta grave; GI, gastrointestinale.
[c] Il virus dell'epatite B ha un genoma formato da una molecola di DNA circolare parzialmente bicatenaria nel virione maturo (extracellulare).

© 978-88-08-06761-6

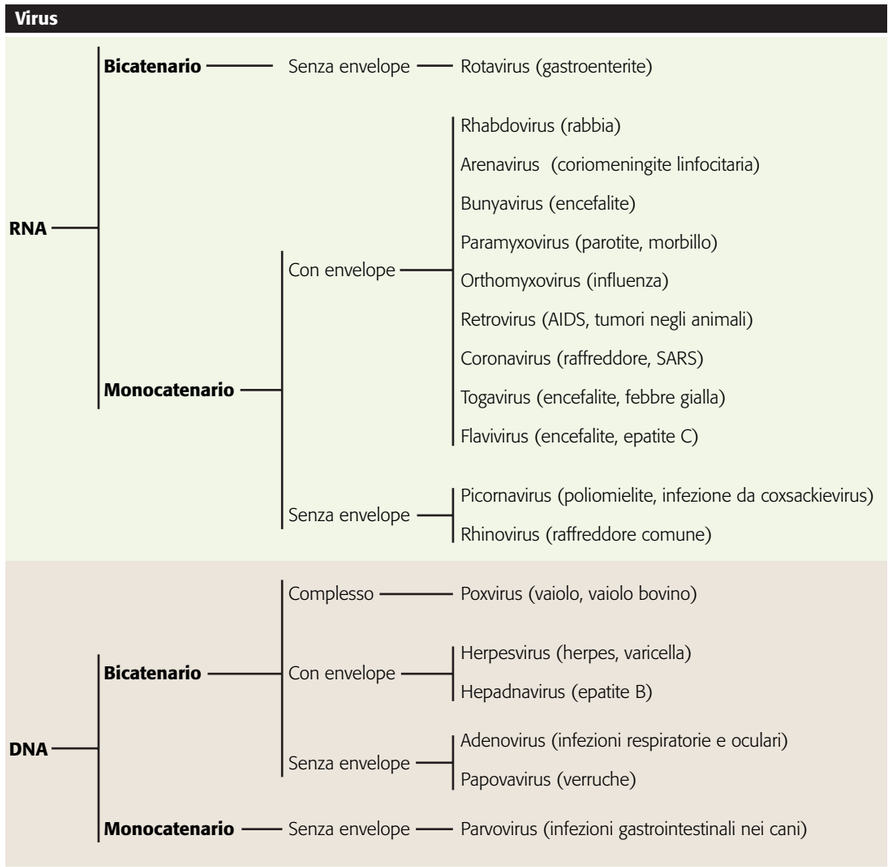

Figura 17.4
I più importanti gruppi di virus parassiti dell'uomo. Lo schema classificatorio rappresentato non tiene in alcun conto la filogenesi dei virus e ha il solo fine pratico di consentire una raffigurazione d'insieme dei vari gruppi virali.

Replicazione virale

Un virus può riprodurre se stesso soltanto se *penetra in una cellula ospite suscettibile all'infezione virale*. [N.d.T.: inoltre, a differenza di tutte le organizzazioni cellulari, non si riproduce per divisione del virione in due virioni progenie identici a quello parentale, ma si moltiplica utilizzando un meccanismo di replicazione separata delle varie componenti virali e l'assemblaggio di tali componenti a formare la numerosa progenie virale.] La prima fase di tale processo è l'attacco del virione alla cellula suscettibile, poi l'acido nucleico virale entra al suo interno da dove dirige la sintesi dei componenti virali e solo successivamente i vari componenti vengono assemblati per formare le particelle virali progenie, che sono liberate dalla cellula. Ciascuna di queste fasi è complessa e tipica in ogni tipo di virus.

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 342

© 978-88-08-06761-6

Attacco e penetrazione

I virus si imbattono casualmente nelle loro cellule ospiti e, ogni 10^3–10^4 impatti, vi si ancorano. Questa fase di attacco, denominata **adsorbimento** del virus alla superficie cellulare, è un processo che non richiede dispendio di energia, ma necessita di condizioni specifiche ioniche e di pH. [N.d.T.: ovvero un ambiente ricco di ioni, così da neutralizzare le cariche di superficie delle strutture complementari e ridurne la repulsione elettrostatica.] Poi i **ligandi** (o antirecettori virali), esposti sulla superficie dei virus adsorbiti, si legano specificamente e strettamente con i **recettori** esposti sulla cellula ospite suscettibile. I capsomeri dei virus più semplici possono assolvere alla doppia funzione, ovvero comportandosi sia come ligandi che come componenti strutturali, mentre i virus più complessi (quali il virus dell'influenza e altri virus provvisti di envelope) presentano strutture adibite al legame, come le glicoproteine organizzate nei peplomeri che sporgono dalla superficie del virus. I recettori della cellula ospite sono costituiti da glicolipidi o proteine (spesso glicoproteine), ma tale composizione risulta limitata solo alle poche strutture recettoriali antivirus fino a ora studiate e caratterizzate. Nel caso del virus dell'influenza, per esempio, vi è una corrispondenza singolare di complementarità fra la proteina antirecettore sul virus e il recettore della cellula ospite suscettibile.

Dopo l'attacco al recettore si verifica la penetrazione della particella virale nella cellula ospite permissiva, fase che comporta in alcuni virus l'ingresso quasi istantaneo del virione intero (o praticamente intatto). Successivamente si verifica la liberazione nel citoplasma dell'acido nucleico virale attraverso il processo di **esposizione** (*decoating*, spoliazione). Certi virus provvisti di envelope, quali gli herpesvirus e il retrovirus HIV, si internalizzano per fusione dell'involucro lipoproteico direttamente con la membrana cellulare esterna. Altri virus con envelope, come il virus dell'influenza, entrano per endocitosi, processo nel quale il virione è intrappolato in una vescicola endocitica (endosoma); l'esposizione si verifica allorché la vescicola va incontro ad acidificazione, fatto questo che induce cambiamenti conformazionali nelle proteine di superficie del virione. Quando il pH si abbassa a 5, la porzione amino-terminale (denominata **peptide fusogeno**) di una di queste proteine (emoagglutinina HA2 nel virus dell'influenza), che di norma è incastonata nel capside, protrude verso l'esterno così da esporsi all'ambiente acquoso della vescicola. Poiché il peptide fusogeno è altamente idrofobo, fonde l'envelope virale con la membrana della vescicola. Il genoma virale liberato entra allora nel citoplasma cellulare, dove va incontro a replicazione. [N.d.T.: gran parte dei virus senza envelope, subito dopo il legame con il recettore, vengono internalizzati per traslocazione attraverso la membrana cellulare oppure trasferiti nel citoplasma mediante endosoma.]

Ci sono molte variazioni nella modalità di penetrazione del virus nella cellula ospite e in particolare in alcuni virus privi di envelope. I virus batterici (batteriofagi o fagi) presentano per esempio un meccanismo di internalizzazione molto particolare, che li mette in grado di penetrare i rivestimenti resistenti che circondano la maggior parte dei batteri; un modo per fare questo è quello che utilizza un apparato sostanzialmente simile a una siringa in grado di penetrare sia la parete che la membrana delle cellule (Figura 17.5). Questa struttura ha una coda con una base di appoggio da cui sporgono fibre. Dopo la

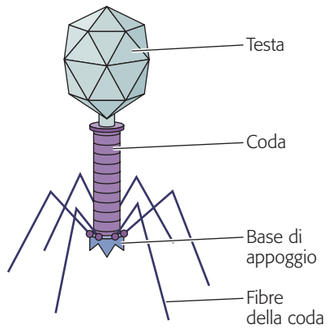

Figura 17.5
Struttura di un fago (il fago T4 di *Escherichia coli*). Il virione attacca la cellula ospite attraverso l'interazione delle fibre della coda e del piano base con i recettori esposti sulla superficie batterica. Quindi, il DNA racchiuso nella testa del fago viene eiettato e introdotto nella cellula ospite.

© 978-88-08-06761-6

collisione del virus con il batterio, le fibre della coda si legano saldamente al recettore batterico e la base di appoggio si attacca saldamente alla superficie batterica. La coda è costituita da un tubo vuoto tramite cui l'acido nucleico viene fatto passare per infettare la cellula ospite. La penetrazione è causata dalla contrazione delle proteine della coda (ancora per cambiamento conformazionale), che infine conduce all'eiezione dell'acido nucleico e alla sua penetrazione nel citoplasma della cellula ospite. Il processo reale dell'eiezione è ancora poco conosciuto; la "testa" del virus non si deforma nel processo e così non funziona come un bulbo che deve essere compresso per liberare il suo contenuto.

I modi di penetrazione possono essere abbastanza vari, ma tutti condividono un aspetto centrale: conducono inevitabilmente alla *dissociazione dell'acido nucleico virale dal rispettivo capside che lo avvolge*. È proprio questo processo di *smontaggio finalizzato alla replicazione* che distingue molto chiaramente i virus dalle forme di vita cellulari.

Strategie di sintesi di acidi nucleici virali

Per la sintesi delle macromolecole proteiche vige in biologia l'assioma "dal DNA all'RNA, dall'RNA alle proteine"; tuttavia tale dogma non risulta valido per molti virus. Esistono alcuni virus, per esempio i papillomavirus che causano le verruche, che seguono fedelmente il dogma e quindi la sequenza DNA-RNA-proteine; il loro genoma, che consiste di **DNA bicatenario**, può essere perciò replicato, trascritto e tradotto. Altri virus adottano, invece, vie più singolari per replicarsi; per esempio, alcuni virus contengono **DNA monocatenario** e la DNA-polimerasi della cellula ospite può replicare i loro genomi seguendo le seguenti fasi:

DNA monocatenario (virus infettante) ⟶ DNA bicatenario (per la replicazione)
⟶ DNA monocatenario (progenie virale)

La trascrizione in RNA messaggero (mRNA) avviene mentre il DNA virale è nella forma a doppio filamento e usa una RNA polimerasi dell'ospite (una RNA polimerasi DNA-dipendente), e questo meccanismo può sembrare come una piccola variazione dal metodo usuale. Occorre tuttavia considerare che esistono anche **virus a RNA monocatenario** e tali virus devono quindi sintetizzare RNA da un altro RNA stampo, processo questo che costituisce una nuovo tipo di reazione biochimica e ciò in considerazione del fatto che le cellule ospiti non sono provviste di enzimi in grado di consentire loro di sintetizzare RNA da altro RNA. In tale particolare caso quale potrebbe essere la soluzione? La risposta è che i virus a RNA codificano per uno specifico enzima, una **RNA-replicasi** (una RNA polimerasi RNA-dipendente), che permette la sintesi di RNA da un altro RNA. Come viene sintetizzato questo enzima? Nella forma monocatenaria, l'RNA virale può fungere addirittura da molecola di mRNA che può quindi essere usata direttamente per sintetizzare una proteina.

La questione replicativa non risulta tuttavia così semplice per quei virus a RNA monocatenario il cui RNA non costituisce un mRNA ma il suo *filamento complementare*. Apparentemente, un tal tipo di virus non può replicare anche se il relativo genoma codifica una RNA-replicasi (in quale modo infatti inizierebbe la sintesi del suo mRNA?). La soluzione a tale problema è in realtà abbastanza elegante: la particella virale trasporta la RNA-replicasi già completamente formata al-

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 344

© 978-88-08-06761-6

l'interno del virione. Appena introdotta nella cellula, la replicasi copia, infatti, l'RNA virale in un mRNA complementare. Tali particelle virali sono per questo denominate **virus a RNA con polarità negativa** (o virus a catena-negativa); questo gruppo include i virus che causano l'influenza, la parotite epidemica e molte malattie delle piante. Diversamente, i virus il cui RNA può servire direttamente da mRNA vengono denominati **virus a RNA con polarità positiva** (o virusa a catena-positiva); in tale gruppo sono compresi gli agenti della poliomielite, dell'epatite C e del raffreddore comune. Esiste tuttavia un'ulteriore complicazione: l'RNA dei virus a RNA con polarità negativa deve essere completamente accessibile all'enzima in grado di copiarlo, e così esso deve risultare privo di impedimenti strutturali, come le regioni a doppio filamento. Per garantire un pronto accesso, la struttura base zucchero-fosfato dell'RNA è qualche volta attaccata a una proteina impalcatura, in modo tale da esporre le basi nucleotidiche alla replicasi.

Un ulteriore meccanismo replicativo è riscontrabile nei **retrovirus**, come nel caso dell'HIV, il virus che causa la **sindrome da immunodeficienza acquisita** (**AIDS**). Il genoma di questo retrovirus è costituito da un RNA monocatenario con polarità positiva, il quale è in grado di replicare utilizzando un DNA-intermedio seguendo le fasi qui riportate:

RNA monocatenario (virus infettante) → DNA monocatenario
→ DNA bicatenario (integrato nel genoma della cellula ospite)
→ RNA monocatenario (progenie virale)

Il virus HIV è provvisto di un enzima denominato **trascrittasi inversa** in grado di convertire all'interno della cellula infettata l'RNA virale in DNA. (Questo enzima è unico nel panorama biologico e risulta un ottimo bersaglio per i farmaci anti-HIV; altro bersaglio farmacologico è una proteasi presente nel virione che risulta necessaria per la maturazione delle proteine virali (vedere "Infezione da HIV e AIDS" nel Capitolo 21.) Nella sua forma a doppio filamento, il DNA viene integrato nel genoma della cellula ospite per azione dell'integrasi, un altro enzima presente nel virione. Si deve poi alla RNA polimerasi della cellula ospite la trascrizione di questo DNA in RNA virale. A questo punto è possibile porsi il problema se l'HIV sia un virus a RNA o a DNA e probabilmente tale retrovirus è entrambe le cose, anche se non nello stesso stadio del suo ciclo vitale. Tale complesso ciclo di replicazione presenta un indubbio vantaggio selettivo che è legato alla formazione del DNA-intermedio, in grado di integrarsi nel genoma dell'ospite e quindi di essere trasportato indefinitamente con esso.

Per avere un quadro più completo di tutte le possibili strategie replicative virali, dobbiamo aggiungere ai virus con i meccanismi sopra riportati anche i virus con RNA bicatenario e pochi altri virus con strategie miste (Figura 17.6). In sintesi si può evidenziare come vi sia nei virus un'ampia libertà d'azione nella modalità con cui l'informazione genetica viene copiata e su come fluisce dal genoma verso la sintesi delle proteine, mentre mai essa risulta in grado di fluire in senso inverso, ovvero dalle proteine all'acido nucleico. Resta ancora da chiarire quali fattori siano entrati in gioco per creare una così ampia variazione sul tema centrale della replicazione virale.

© 978-88-08-06761-6

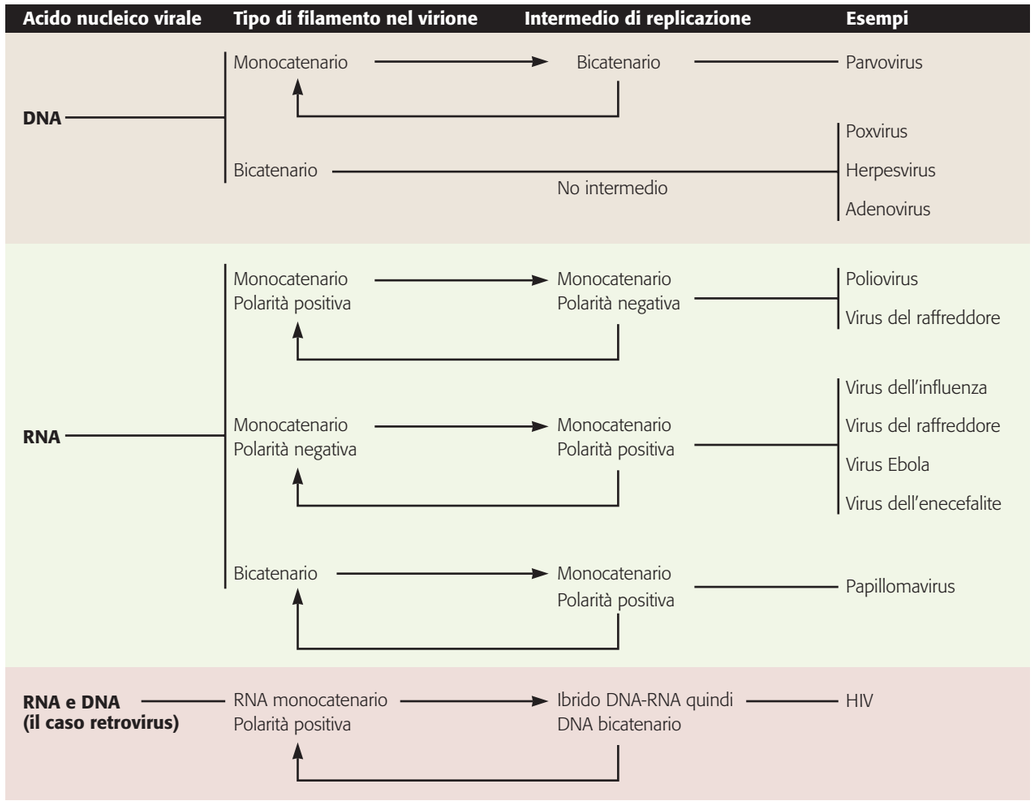

Figura 17.6
Le principali strategie di replicazione virale. Le frecce indicano il tipo di replicazione che porta alla formazione dell'acido nucleico del virione. La polarità positiva significa che una molecola di RNA può fungere direttamente da mRNA, mentre la polarità negativa indica che essa non può servire da mRNA ma deve prima essere copiata nel suo acido nucleico complementare.

Sintesi delle proteine virali

Il ciclo virale comincia con l'infezione della cellula ospite e termina con l'assemblaggio e il rilascio della progenie virale. Tra queste due fasi esistono molti eventi intermedi; subito dopo l'infezione non ci sono virioni intatti nella cellula perché, come già detto, in ordine alla replicazione, il virione deve prima essere "smontato". Il periodo che intercorre fra l'infezione del virus e il montaggio dei virioni interi è denominato **periodo di eclissi** (Figura 17.7). La denominazione non deve tuttavia trarre in inganno perché tale tempo risulta prezioso: molteplici processi avvengono in questo periodo all'interno della cellula infettata.

Sintetizzare gli acidi nucleici e le proteine virali non è un'attività che avviene in modo casuale, ma segue ritmi precisi simili a quelli di una partitura sinfonica, con eventi ben cronometrati e correlati. Tranne che nel caso di un virus a RNA con filamento positivo, in tutti gli altri virus la prima cosa che deve essere sintetizzata per poter costruire

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 346

© 978-88-08-06761-6

le proteine virali è il loro mRNA. Una volta che questo è disponibile, le proteine virali possono essere sintetizzate utilizzando il macchinario della cellula ospite. A prima vista può sembrare che le uniche proteine che necessitano di essere sintetizzate siano quelle che formano i costituenti dei virioni progenie; tuttavia numerosi virus fanno molto di più: essi sovvertono il metabolismo della cellula ospite e lo inducono a sintetizzare una gran quantità di nuovi virioni. Alcuni batteriofagi virulenti riescono a interrompere molte funzioni della cellula ospite, mettendo il suo macchinario a propria disposizione per la sintesi delle componenti virali. In particolari tipi di batteriofagi tale sovvertimento raggiunge punte di elevata precisione; subito dopo l'infezione fagica il DNA batterico viene frazionato, cannibalizzato per consentire la sintesi virale. Qualsiasi piccola quantità del DNA della cellula ospite che sopravviva non può essere trascritta perché un **fattore sigma** codificato dal virus assume il controllo, restringendo l'azione della RNA polimerasi dell'ospite alla trascrizione del solo DNA virale. Inoltre, determinate proteine codificate dal virus impediscono la traduzione dell'mRNA batterico in proteine. Quindi, attraverso l'azione di attacco e asservimento di quasi ogni funzione del macchinario della cellula ospite, questi virus si trasformano in parassiti biosintetici con una elevata efficienza. Non sorprende quindi che tali batteriofagi si riproducano molto rapidamente, in molti casi sono in grado di sintetizzare centinaia di virioni progenie in 20 minuti e anche in minor tempo. Si noti che per poter effettuare tale schema replicativo occorre reimpostare le funzioni della cellula ospite molto rapidamente e ciò passa attraverso la mediazione di **proteine precoci**. [N.d.T.: così dette in quanto sintetizzate subito dopo l'esposizione dell'acido nucleico virale infettante.] Le proteine strutturali dei virioni sono prodotte solo successivamente e denominate **proteine tardive** in quanto sintetizzate dopo la replicazione dell'acido nucleico virale. Perciò la fase di replicazione virale costituisce un processo complesso pianificato ed eseguito con grande cura (Figura 17.7).

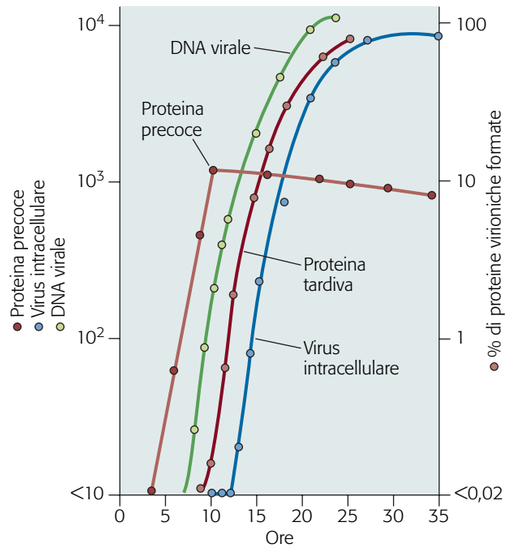

Figura 17.7
Una tipica "curva di crescita ad una fase" di un virus animale. È rappresentata la replicazione di un adenovirus in una coltura cellulare. Le varie fasi della replicazione virale procedono in accordo ad uno schema preordinato. Nella prima fase vengono sintetizzate le proteine precoci virali, che dirigono la cellula ospite nella sintesi del DNA virale e delle proteine tardive (che includono le proteine strutturali dei virioni). Dopo un determinato periodo di tempo, vengono formati all'interno della cellula ospite i virioni completi infettanti.

© 978-88-08-06761-6

Alcuni virus impiegano strategie supplementari per indurre le cellule ospiti a sintetizzare più virus. I cytomegalovirus, che fanno parte della famiglia Herpesviridae comprendente i comuni herpesvirus labiale e genitale, ingannano la cellula ospite a replicare solo il DNA virale. Alcuni virus che persistono per lunghi periodi all'interno delle loro cellule ospiti seguono un'altra strategia virale di sovvertimento; quando tali virus entrano nelle cellule epiteliali che normalmente hanno un breve arco vitale, l'infezione comporta una inibizione dell'**apoptosi** (morte cellulare programmata). Ne consegue perciò che le cellule infettate divengono immortali e producono il virus per periodi molto più lunghi. I virus che usano questa strategia includono l'agente della mononucleosi infettiva (virus di Epstein-Barr; vedere "Mononucleosi infettiva: la 'malattia del bacio'" nel Capitolo 21). Le cellule immortalizzate possono a volte indurre cancro.

www.microbebook.org
17.4 Herpesvirus replication
Replicazione degli Herpesvirus

Assemblaggio dei virioni e liberazione della progenie virale dalla cellula ospite

Una volta che un adeguato numero di copie di acido nucleico e proteine virali è stato sintetizzato, i virioni possono essere montati. [N.d.T.: non è stato ancora completamente chiarito quale sia il meccanismo con cui le varie componenti virali vengono riunite nei nuovi nucleocapsidi.] In gran parte dei virus è possibile dire che il capside è la parte del virione che è montata per prima, tramite l'autoassemblaggio (cristallizzazione) dei capsomeri virali, dando così la forma generale al virione. I capsidi sono successivamente riempiti di acido nucleico virale, che nei virus sprovvisti di envelope completa il processo di produzione dei virioni in costruzione. I virioni sono poi liberati a seguito della lisi della cellula ospite, un processo questo indotto dalle proteine virali che alterano la membrana o il citoscheletro. I **virioni dei virus con envelope** presentano un meccanismo di liberazione alquanto più complesso: sono liberati dalla cellula ospite mediante **gemmazione**, processo nel quale il virione viene circondato da una parte della membrana della cellula ospite e che non danneggia necessariamente la cellula infettata. Si noti che questa strategia di fatto avvantaggia il virus: prolungare la vita del suo ospite vuol dire fargli produrre progenie virale per un periodo più lungo. Prima di iniziare a gemmare, le glicoproteine di superficie, codificate nel genoma virale, si inseriscono nella membrana della cellula ospite; poi il capside virale interagisce con le porzioni terminali intracitoplasmatiche di queste glicoproteine (vedere Figura 17.3). [N.d.T.: successivamente la membrana cellulare si estroflette consentendo la gemmazione del virus (estrusione), che a questo punto risulta rivestito di involucro lipoproteico e può essere liberato nell'ambiente esterno con la fusione del residuo peduncolo che lega la membrana estroflessa alla cellula.]

www.microbebook.org
17.5 A short film on how bacteria lyse during phage infection
Un breve film su come i batteri lisano durante l'infezione fagica

Crescita e titolazione dei virus

Il saggio delle placche [N.d.T.: che costituisce la titolazione con metodo diretto più usata per stabilire la quantità di virus in un dato materiale (ovvero concentrazione o *titolo* virale) e si basa sulla determinazione del titolo infettante del materiale in esame, che è proporzionale al numero dei virioni completi presenti.] consiste nel mescolare in una coltura un piccolo numero di virioni batterici o animali con molti batteri o cellule animali sensibili all'infezione e di disporre il tutto su una piastra di agar (piastramento). Dopo un periodo opportu-

www.microbebook.org
17.6 An animation of viral infection
Una animazione di una infezione virale

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 348

© 978-88-08-06761-6

no di incubazione (alcune ore per i virus batterici; un giorno o più per i virus animali), la piastra risulterà ricoperta di cellule ospiti non infette; tuttavia, sarà possibile individuare qua e là zone circolari (placche) nel tappeto cellulare: tali zone sono denominate **placche di citolisi** e sono i risultati di una microepidemia. Ogni placca origina da una singola cellula ospite infettata dal virus che alla fine va incontro a lisi. Le particelle virali così liberate si fissano poi alle cellule ospiti non infette adiacenti; il processo si ripete, e ciò conduce ad una diffusione centrifuga dell'infezione. Il processo si arresta quando i batteri smettono di crescere ed entrano nella fase stazionaria della loro curva di crescita.

In tale metodo, che può essere paragonato alla conta dei batteri presenti in un materiale che si basa sul numero di colonie batteriche prodotte in piastre di agar-germi adeguatamente allestite, la conta dei virus si desume moltiplicando il numero delle placche presenti sulla piastra per il fattore di diluizione della preparazione. Ciò enumererà soltanto i virioni capaci di proliferare; se interessa determinare il numero totale di particelle virali, allora il campione deve essere esaminato al microscopio elettronico e deve essere contato il numero di particelle presenti in un dato volume. Un modo semplice per fare ciò è quello di mescolare la preparazione con una concentrazione nota di perline di lattice e determinare poi quale sia il rapporto fra particelle virali e perline.

Esistono variazioni su questo tema. Nel caso di virus delle piante, i conteggi delle placche di citolisi possono essere effettuati anche diffondendo virus sulla superficie abrasa di una foglia di un ospite vegetale suscettibile; il numero di lesioni che si sviluppano è proporzionale al numero di particelle virali presenti nella preparazione.

www.microbebook.org

17.7 More information about animal viruses: "All the Virology on the WWW" (many links)

Ulteriori informazioni sui virus animali: "Tutta la virologia sul WWW" (molti links)

Lisogenia e integrazione nel genoma ospite

Introduzione

Finora abbiamo delineato i virus come agenti distruttivi che danneggiano le loro cellule ospiti e causano malattia. Tale impostazione è chiaramente inadeguata perché non rende conto della reale funzione dei virus in natura e in ambito evolutivo. Sappiamo infatti che molti virus coesistono con le loro cellule ospiti per periodi lunghi e tali associazioni hanno spesso conseguenze di grande importanza, perché possono condurre a cambiamenti genetici all'interno della cellula ospite e allo scambio di materiale genetico fra cellule. Di conseguenza i virus svolgono un ruolo chiave nell'evoluzione. Ci sono, allora, due categorie di virus: i virus **virulenti**, ovvero che uccidono solitamente le loro cellule ospiti inducendone la lisi (ciclo litico), e virus **temperati** che qualche volta vivono in armonia con i loro ospiti (ciclo lisogeno). Sia i virus degli eucarioti che dei procarioti (fagi) possono essere virulenti o temperati.

Il genoma di un virus temperato può essere *integrato in quello della sua cellula ospite*. In realtà, i geni di tale virus divengono parte del patrimonio genetico dell'ospite. In questa condizione integrata, il genoma virale è quindi trasportato con quello dell'ospite ed è replicato a ogni divisione delle cellule. Ne consegue che soltanto i virus a DNA possono essere integrati nel genoma cellulare, anche se esistono eccezioni come i retrovirus (per esempio l'HIV) che, pur contenendo RNA nel proprio virione, sono in grado nella cellula ospite

© 978-88-08-06761-6

di sintetizzare DNA durante la fase del ciclo replicativo virale. Il concetto di virus temperato include un'altra funzione chiave e cioè che l'integrazione nel genoma dell'ospite sia reversibile, vale a dire che in alcune condizioni il *genoma di un virus temperato viene separato da quello dell'ospite e rilasciato*. Tale reversibilità consente a questi virus di divenire virulenti e di moltiplicarsi determinando in genere la morte dell'ospite.

Alcune definizioni, usate principalmente per i fagi, si rivelano utili: si dicono **fagi temperati** quelli che, oltre ad avere un normale ciclo litico con produzione di nuovi virioni, possono integrarsi nel DNA genomico ospite; la forma virale integrata è detta **profago**. Sono poi detti **lisogeni** i batteri che contengono fagi temperati e che in certe condizioni possono produrre spontaneamente virioni del virus temperato e tale condizione viene detta **lisogenia**. Una versione semplificata del **ciclo lisogeno** è mostrata in Figura 17.8.

Anche su questi temi esistono variazioni. In una modalità alternativa di lisogenia, il profago non è integrato nel genoma ospite ma piuttosto è nella forma di plasmide. Infatti, al pari di altri plasmidi si replica in sincronia con il cromosoma batterico ed è trasmesso alla progenie. Un esempio di fago che può divenire un plasmide è P1. L'integrazione non risulta quindi un aspetto essenziale della lisogenia,

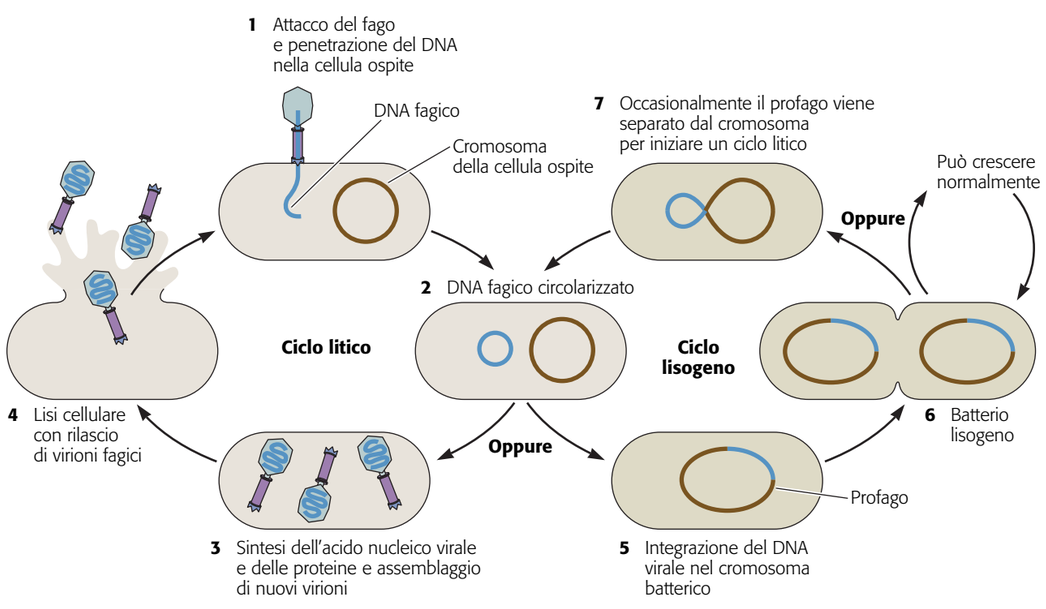

Figura 17.8
Le due diverse modalità di vita di un fago temperato: ciclo litico e ciclo lisogeno. L'attacco del fago ad un batterio ospite sensibile è seguito dalla penetrazione del DNA virale nell'ospite **(1)**. In modalità tipica il DNA virale circolarizza e si replica **(2)**, ciò porta alla sintesi della progenie dei fagi **(3)** e alla lisi cellulare **(4)**, oppure alla integrazione nel cromosoma ospite **(5)** per divenire un profago. In questo stato, la cellula ospite è divenuta un batterio lisogeno che può replicare per molte generazioni **(6)**. In rare occasioni il profago si separa spontaneamente dal cromosoma batterico **(7)**, un processo che può essere intensificato mediante un fattore di induzione (per esempio con trattamento di raggi UV o sostanze mutagene). Al momento della sua separazione dal cromosoma, il DNA fagico può iniziare un ciclo litico (3 e 4).

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 350

© 978-88-08-06761-6

mentre quello che è importante è il fatto che il fago non si replichi attivamente nella sua cellula ospite quando persegue la modalità di vita da temperato.

L'associazione fra un fago lisogeno e il suo ospite batterico può essere interrotta, in genere quando esistono condizioni che minacciano la vita dell'ospite. Per esempio, se una cellula di *Escherichia coli* lisogenizzata viene esposta ad agenti che danneggiano il DNA, come l'irradiazione con luce ultravioletta (UV), il suo profago si separa dal cromosoma batterico e si replica liberamente; tale fenomeno è denominato **induzione virale** e suggerisce la presenza di un meccanismo utilizzato dai virus temperati per "svignarsela" e sopravvivere anche se il loro ospite viene ucciso.

Quale dei due cicli aumenta maggiormente il grado di sopravvivenza del virus nel tempo: essere virulento e produrre quindi subito tantissima progenie virale, oppure essere temperato e preservare il proprio genoma all'interno dell'ospite? Da un lato la replicazione sfrenata dei virus virulenti porterebbe alla distruzione di gran parte delle cellule ospiti e infine alla morte del virus; d'altra parte essere continuamente in stato temperato significherebbe per il virus la "prigionia" perpetua. Una buona soluzione è costituita dall'alternanza fra virulenza e temperanza; in tal modo il virus costituisce particelle virali per l'occasione ma mantiene il proprio genoma in un sito sicuro che funge da "cassaforte", ed è proprio questo quello che fanno i fagi lisogeni. Come fanno i fagi lisogeni a bilanciare lo stile di vita virulento e temperato? Il fago temperato maggiormente studiato è un fago che infetta *Escherichia coli* detto **lambda**, divenuto ormai un modello per poter comprendere il fenomeno della lisogenia. (Il fago lambda è così tanto conosciuto e utilizzato per la ricerca che un corso universitario dedicato soltanto ad esso coprirebbe i principi fondamentali della biologia molecolare.)

www.microbebook.org

17.8 More details of lambda and lysogeny

Maggiori dettagli sul fago lambda e sulla lisogenia

Come il genoma di un fago temperato si integra in quello di una cellula ospite

Nel virione lambda il DNA è costituito da una molecola *lineare* bicatenaria e, subito dopo la penetrazione in una cellula di *Escherichia coli*, esso diventa circolare. La circolarizzazione è possibile perché le estremità coesive della molecola lineare (del DNA virale) presentano sequenze complementari a singolo filamento che protrudono; tali estremità coesive appaiano le loro basi così da formare un cerchio ed il sito creato nell'unione è detto *cos*. È tale forma circolare, che presenta due tagli (*nick*, uno in ciascuno dei due filamenti) chiusi dalla DNA ligasi per formare un **cerchio chiuso covalentemente**, che si integrerà nel cromosoma batterico ospite *mediante un singolo evento di crossing-over* (Figura 17.9). Questo processo di crossing-over ha caratteristiche uniche: se infatti il DNA dei fagi fosse lineare, un singolo crossing-over renderebbe il cromosoma ospite lineare; esso sarebbe degradato dalle nucleasi intracellulari e, comunque, non potrebbe essere replicato (*Escherichia coli* può replicare soltanto DNA circolare). Occorre quindi un doppio crossing-over per conservare la circolarità. La ricombinazione fra il DNA di lambda e il DNA del cromosoma batterico avviene soltanto in un *sito specifico di ciascuna molecola* (*attP* in lambda e *attB* nel cromosoma). Perché per gran parte dei batteri, anche se non per tutti, la circolarizzazione assume un grande rilievo? Le cellule batteriche hanno potenti esonucleasi che degradano il DNA lineare a meno che le estremità non risultino protette, e un cromosoma circolare costituisce semplicemente un modo facile per evitare tale processo degradativo.

© 978-88-08-06761-6

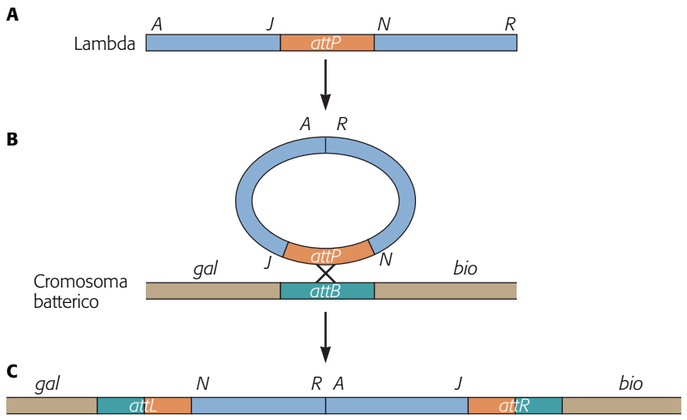

Figura 17.9
Meccanismo di integrazione del genoma di un fago temperato nel cromosoma della cellula ospite. Le estremità del genoma lineare del fago lamba **(A)** si uniscono fra loro a formare un circolo **(B)**. Il sito di attacco del fago (*attP*) si ricombina con un sito (*attB*) sul genoma batterico. Dal crossing-over di questi due siti, consegue che il genoma fagico si integra in quello della cellula batterica ospite **(C)**. In tale processo i siti di attacco risultano cambiati in *attL* e *attR*.

I virus che si integrano nel genoma del loro ospite rischiano di inattivare geni essenziali per la sopravvivenza della cellula ospite. Per evitare questo pericolo, la maggior parte di tali virus si integra soltanto in specifiche posizioni. Un tale evento di ricombinazione richiede l'attività di una proteina speciale denominata **integrasi**, che riconosce *due siti specifici ma dissimili fra loro*, uno sul cromosoma batterico e uno sul DNA virale fiancheggianti una corta regione di **omologia**. Questa regione è tuttavia troppo corta per permettere che un crossing-over avvenga senza l'intervento dell'integrasi che riconosce il DNA adiacente. Molte altre integrasi aiutano l'integrazione di altri virus, ma l'integrasi di lambda rimane quella maggiormente studiata.

Come il genoma virale integrato rimane silente

Un profago, nella sua integrazione cromosomica rimane un profago e non dirige la formazione di particelle virali, ciò perché la *maggior parte dei suoi geni è inattiva*. L'inattivazione genica si deve a una speciale proteina, il **repressore di lambda**, che evita l'espressione di tutti i geni virali, *tranne quello che codifica per il repressore stesso*. Il repressore lambda agisce come un tipico repressore e si lega all'operatore nella regione promotore (vedere il Capitolo 12). Finché il repressore è attivo, i geni del profago che codificano per la separazione dal cromosoma e per la replicazione rimangono silenti, quando invece il repressore non risulta più attivo il fago viene separato e nuove particelle fagiche verranno sintetizzate. Il risultato finale è la lisi della cellula ospite con rilascio di molti fagi progenie. Si può concordare con il fatto che dovrebbe essere possibile convertire il virus lambda, *mediante mutazione*, dalla forma temperata a quella virulenta. E infatti, due tipi di mutanti lo fanno: in un tipo, la mutazione

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 352

© 978-88-08-06761-6

inattiva la proteina repressore, mentre nell'altro rende un operatore insensibile all'azione del repressore; questi mutanti sono analoghi ai mutanti costitutivi con mutazioni nell'operone *lac* (vedere Capitolo 12). I due sistemi sono stati scoperti quasi nello stesso periodo di tempo (gli anni Cinquanta) da due gruppi di scienziati che cooperavano fra loro e lavoravano all'istituto Pasteur di Parigi.

Il nodo cruciale di come un profago sia attivato così da replicare è nella modalità con cui il repressore viene sintetizzato e inattivato. Risulta certamente vantaggioso per il virus avere un *livello ottimale del repressore*: se troppo poco, l'eccessiva replicazione dei fagi ucciderebbe la cellula; se troppo, risulterebbe difficile ottenere la sintesi dei virus; la giusta concentrazione del repressore può essere mantenuta affinché la proteina repressore sia capace di regolare l'espressione del suo stesso gene. Tale **autoregolazione** costituisce una risposta a feedback, cioè come un dispositivo tipo termostato (vedere Capitolo 12): troppo calore = circuito disinserito, troppo poco = inserito.

L'importanza del repressore lambda nell'inattivazione genica è ben evidenziata da due esperimenti. (1) Se una coltura di *Escherichia coli* viene infettata con un piccolo numero di particelle virali, solo alcuni virus entreranno in ogni cellula, perciò viene sintetizzato poco repressore, i fagi si moltiplicano e la maggior parte delle cellule viene lisata. (2) Se le colture sono infettate con tantissime particelle virali, molte di esse entreranno in ciascuna cellula, verrà perciò sintetizzato repressore in alta concentrazione e la maggior parte delle cellule diventeranno lisogenizzate. Più avanti sarà trattato il meccanismo che è alla base della decisione fra lisi e lisogenia.

Che cosa causa l'induzione virale?

Le condizioni ambientali dannose per i batteri possono inattivare il repressore, ciò comporta induzione del profago e inizio di un ciclo litico. Un tipico esempio di agente d'induzione è la luce UV che, danneggiando il DNA della cellula ospite, provoca una cascata di eventi molecolari. Nel corso della riparazione del DNA danneggiato, le cellule batteriche accumulano brevi tratti di DNA a singolo filamento. Questi segmenti mettono in azione la **risposta SOS** (vedere Capitolo 13), che porta all'attivazione di una coproteasi normalmente quiescente denominata RecA. La proteina RecA attivata scinde il repressore di lambda, permettendo ai geni fagici di esprimersi. Uno di questi geni codifica per un enzima, denominato **escissionasi**, il quale aiuta l'enzima integrasi ad attuare il crossing-over che asporta il profago dal cromosoma batterico. L'enzima integrasi ha bisogno di aiuto per poter asportare, perché l'escissione/separazione non è semplicemente l'inverso di integrazione: i due crossing-over avvengono in corrispondenza di sequenze alquanto differenti.

Se nessuna induzione virale si verifica, come sarebbe possibile sapere comunque che un profago è latente, "in agguato", in un genoma batterico? Di norma non è sufficiente osservare semplicemente una coltura o una colonia per poter dire se i batteri coltivati sono lisogeni; tuttavia esiste una prova semplice che è in grado di rivelarlo. Se dopo infezione con lo stesso fago si verifica lisi, la coltura non è lisogena, se invece non si verifica lisi, la coltura è lisogena; ciò si deve al fatto che il batterio lisogeno non consente al fago di svilupparsi, perché il repressore presente in loro lo impedisce. Tuttavia, il lettore attento noterà una contraddizione in questo esperimento: come può lambda agire da **fago litico** senza essere indotto? Nella trattazione che segue si capirà.

© 978-88-08-06761-6

Decidere fra lisogenia e lisi

Tornando all'inizio, ossia all'infezione di una coltura vergine non lisogena, abbiamo visto come il genoma virale viene integrato nel cromosoma batterico e le cellule diventano lisogene. Tuttavia, ciò è abbastanza lontano da quello che si verifica comunemente, e infatti la maggior parte delle volte accade l'opposto: lambda si replica, molte particelle virali progenie sono sintetizzate e la cellula subisce la lisi. Il risultato, lisi o lisogenia, dipende da molte variabili come l'ambiente, il numero di particelle infettanti per cellula e lo stato fisiologico dell'ospite. Per esempio, quando le cellule di *Escherichia coli* crescono in un ambiente nutrizionalmente ricco (per esempio, in presenza di alte concentrazioni di glucosio) tendono alla lisi a seguito di infezione di lambda. In terreno povero, con concentrazioni basse di glucosio, esse tendono ad essere lisogenizzate. Come viene presa la decisione della via litica anziché lisogena? Sono le proprietà del repressore di lambda in definitiva a governare il risultato. La proteina repressore risulta instabile perché può essere scissa dalle proteasi della cellula batterica. Come si è già visto, una di queste proteine, la proteina RecA, entra in gioco quando il DNA della cellula risulta danneggiato. Tuttavia, un'altra proteasi che influenza il repressore, denominata Hfl, è regolata dalle condizioni ambientali, come per esempio il tasso di accrescimento della coltura. L'attività di questa proteina è influenzata dal livello cellulare dell'AMP ciclico (AMPc); infatti, com'è possibile ricordare dal Capitolo 12, il livello di AMP ciclico in *Escherichia coli* varia in funzione della presenza di glucosio nel terreno nutritivo. Perciò se il terreno di coltura contiene molte molecole di glucosio, i livelli di AMP ciclico saranno bassi e l'inverso in presenza di terreni carenti di glucosio. Ne risulta che il livello della proteasi Hfl sarà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'AMPc. Così, saranno sintetizzate più proteasi in un terreno contenente glucosio che in un terreno carente di glucosio, il repressore di lambda sarà scisso in misura maggiore in un terreno ricco di glucosio e inizierà a svolgersi il ciclo litico. La proteolisi del repressore non è l'unico fattore che entra in gioco nella decisione (lisi o lisogenia): risultano importanti sia il tasso di sintesi del repressore che la sua attività relativa, come anche altre proteine coinvolte. Alcune di queste proteggono la proteina repressore dalla proteolisi; altre competono con essa per i siti dell'operatore e così influenzano l'attività del repressore. Tutto ciò costituisce una coreografia complessa.

È bene, a questo punto della trattazione, ritornare alla prova per determinare se una coltura di *Escherichia coli* è lisogena. L'esperimento è fatto solitamente in un terreno ad alto contenuto di glucosio. Da quanto detto finora, si deduce che in esso il livello di AMP ciclico nelle cellule risulterà basso e, dunque, il livello della proteasi Hfl sarà alto mentre quello del repressore di lambda basso; di conseguenza il ciclo litico sarà favorito rispetto a quello lisogeno. Se, d'altra parte, le cellule ricettive fossero lisogene, sarebbe presente abbastanza repressore da inibire il ciclo litico.

Il cambiamento fra un ciclo litico e uno lisogeno non è solo un fenomeno da laboratorio e probabilmente esercita un'azione di selezione nei confronti del virus e dell'ospite. *Escherichia coli* nel suo arco vitale può alternare, dal punto di vista nutrizionale, un ambiente

www.microbebook.org

17.9 A historical account of lysogeny

Una descrizione storica della lisogenia

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 354

© 978-88-08-06761-6

ricco (l'intestino degli animali) ad uno povero (acque, terreni e sedimenti); ebbene, parecchi isolati naturali di *Escherichia coli* risultano lisogeni per il fago lambda o fagi strettamente correlati. Da quanto detto sembra possibile che la commutazione fra due stili di vita possa aiutare a sopravvivere sia il fago che l'ospite, anche se ciò non è stato dimostrato sperimentalmente.

Quali possono essere le conseguenze genetiche della lisogenia?

Essere lisogeno significa veicolare geni supplementari. Il profago può contenere non solo i tipici geni dei fagi, ma anche alcuni geni che sono chiaramente batterici. Da dove vengono questi geni? Si è ipotizzato che essi si siano originati nel corso di infezioni con i primi ospiti batterici. Attualmente è possibile solo attestare come i geni batterici veicolati dal profago vengano acquisiti. Quando un profago è separato dal genoma ospite, la ricombinazione non sempre avviene *con precisione* alle estremità del profago; a volte l'escissione può avvenire un poco più a destra o a sinistra ed è proprio in questo caso che il genoma fagico che ne risulterà includerà i geni *batterici* vicini. Un'infezione temperata successiva introdurrà questi geni in un'altra cellula; il fenomeno che ne risulta viene detto **trasduzione specializzata** ed è discusso nel Capitolo 10.

L'acquisizione di geni mediante lisogenia ha conseguenze profonde per la fisiologia del batterio ospite e per la sua capacità di sopravvivenza e di indurre malattie. Un sorprendente numero di fagi temperati trasporta geni coinvolti nella virulenza batterica; sono proprio questi geni che rendono patogeni batteri altrimenti innocui. Molti sono i batteri che si sono convertiti da una condizione di avirulenza a quella di virulenza mediante lisogenizzazione, fra essi possiamo includere gli agenti della difterite, del colera, della scarlattina e dell'intossicazione alimentare stafilococcica. In molti di questi casi, i geni del profago codificano per potenti tossine, mentre in altri essi codificano per nuovi tipi di antigeni. In aggiunta, poiché questi geni vengono trasportati da un elemento mobile, possono essere trasferiti da un batterio all'altro.

I batteri lisogeni possono anche risultare geneticamente alterati *persino se il profago non veicola geni batterici*; un batterio lisogeno non permetterà infatti una seconda infezione da parte dello stesso fago, una conseguenza apparentemente secondaria per il batterio ma potenzialmente in grado di salvargli la vita. I batteri lisogenizzati risultano **immuni** alle infezioni che potrebbero ucciderli e tuttavia la lisogenia può avere altre conseguenze. Il fago lambda e molti altri fagi temperati si integrano in siti precisi del cromosoma ospite, mentre altri fagi risultano meno meticolosi nella loro integrazione; alcuni fagi (per esempio Mu) possono integrarsi in siti casuali del cromosoma e tale integrazione rende inattivo il gene a livello di tale sito, producendo così una **mutazione da inserzione**. Si noti che questo fenomeno è equivalente all'inserzione di un trasposone (vedere Capitolo 10); proprio per questo Mu è stato anche denominato "un trasposone travestito da fago".

Negli animali, un fenomeno analogo alla lisogenia causa certe forme di cancro e questo processo è denominato **trasformazione cellulare**. Tale termine, tuttavia, assume un diverso significato nei batteri dove è utilizzato per descrivere i cambiamenti genetici che conseguono all'assorbimento di DNA nudo (vedere Capitolo 10). La trasformazione cellulare negli animali è causata dai geni denominati **oncogèni**, i quali sovvertono i meccanismi alla base del controllo della moltiplicazione cellulare. Gli oncogèni sono forme alterate di normali geni regolatori che sono alla base dell'interruzione delle normali vie di trasduzione del segnale responsabile dell'alterazione dell'espressione genica della cellula. Gli oncogèni possono essere trasportati da virus o essere geni dell'ospite la cui struttura o espressione è alterata dall'inserzione del genoma virale, o dai sottoprodotti dei geni virali. La trasformazione cellulare indotta da virus richiede solitamente la persistenza di tutto o di una parte del genoma virale e l'espressione continua degli oncogèni; tuttavia, alcuni virus sono capaci di attuare un tipo di oncogenesi meglio conosciuta come "colpisci e fuggi". Fra i virus capaci di indurre trasformazione cellulare vi sono: retrovirus (virus oncogeni a RNA), come il virus del sarcoma di Rous e il virus tipo-1 della leucemia a cellule T dell'uomo; papillomavirus ed herpesvirus (virus oncogeni a DNA).

© 978-88-08-06761-6

Quale può essere l'effetto della lisogenia nell'evoluzione?

Risulta ampiamente accettato che i fagi hanno influenzato fortemente l'evoluzione batterica. Agendo da predatori, i **fagi virulenti** selezionano i batteri superstiti fago-resistenti, e ciò favorisce l'emergere di nuovi tipi batterici. Tuttavia, è probabile che i fagi temperati svolgano un ruolo ancor più importante nel plasmare l'evoluzione dei loro ospiti. Mediante trasferimenti genici, essi possono infatti portare a combinazioni genetiche più penetranti delle singole mutazioni geniche (vedere Capitolo 10). La lisogenia è stato un fenomeno certamente comune nel passato e sta avvenendo frequentemente anche oggi. Da queste brevi considerazioni si può dedurre che molti genomi batterici contengono le sequenze caratteristiche dei fagi, e ciò suggerisce che un fago lisogeno sia stato integrato nel passato. Questi residui di profago persistono all'interno dei batteri perché non contengono tutti i geni necessari per l'escissione e la replicazione fagica. In aggiunta a tutto ciò, come abbiamo già detto, la lisogenia sembra costituire una strategia favorevole per la sopravvivenza del virus; più dell'80% dei fagi conosciuti sono infatti temperati.

Viroidi e prioni

La trattazione fatta fino a ora ha ben delineato come il mondo dei virus sia tutt'altro che monotono. I virus variano notevolmente nella morfologia, nella struttura e nel modo di replicarsi. In questo mondo virale esiste ogni versione di acido nucleico: RNA o DNA a singolo o doppio filamento, lineare o circolare. Ebbene, pur con tanta varietà, c'è dell'altro. Vi sono in natura altri agenti, detti **viroidi** e **prioni**, che non sono conformi alla definizione di virus, anche se sono altrettanto piccoli e contagiosi. Esiste una stretta affinità fra virus e viroidi: i viroidi sono infatti **molecole di acido nucleico nude** composte interamente di RNA circolare. I prioni, d'altro canto, sono entità infettanti a parte: sono costituite soltanto di **singole molecole proteiche**. La descrizione che qui sarà fatta dei prioni è stata inserita in questa sezione del libro perché non è stato possibile individuare un'altro settore affine in cui poter inserire questo interessante tema scientifico.

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 356

© 978-88-08-06761-6

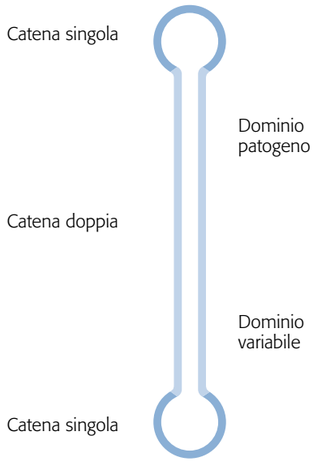

Figura 17.10
Struttura di un tipico viroide.

Viroidi

I viroidi sono i più piccoli agenti patogeni conosciuti e agenti causali di malattie delle piante. La forma extracellulare del viroide consiste semplicemente di molecole di RNA nude, ovvero non racchiuse da un rivestimento proteico protettivo; tali agenti infettanti non codificano infatti neppure per una singola proteina. Un viroide è quindi solo una piccola molecola di RNA circolare arrotolata su se stessa a creare un esteso segmento a doppio filamento (Figura 17.10). I viroidi causano malattie nelle coltivazioni agricole, come le maculature solari nell'avocado, il mosaico latente nella pesca e la maculatura fogliare gialla (*cadangcadang*) nella noce di cocco, e costituiscono in agricoltura un problema economico serio. Infatti, sia la coltivazione della noce di cocco nelle Filippine che il crisantemo che cresce negli Stati Uniti sono stati minacciati seriamente dalle malattie indotte da viroidi. Come fanno i viroidi a causare malattia? Moltiplicandosi essi deviano le risorse delle cellule, anche se tale alterazione nei nutrienti non riesce a condizionare molto l'ospite vegetale. Si pensa che per causare effetti patogeni di rilievo si debba verificare un'interazione diretta fra l'RNA del viroide e uno o più obiettivi cellulari; tuttavia il meccanismo non è ancora conosciuto nei suoi dettagli. Una delle caratteristiche maggiori dei viroidi è la loro piccola dimensione; per esempio, il viroide che infetta la patata e che causa l'affusolamento del tubero di patata contiene soltanto 359 nucleotidi!

I viroidi non sono protetti da un capside e non sembra che ne abbiano bisogno. Essi posseggono vaste regioni a doppio filamento che sono resistenti alla distruzione da parte delle ribonucleasi. Come si riproducono i viroidi? Innanzitutto, poiché non debbono affrontare il problema di sintetizzare le proteine del capside, nel loro genoma non sono codificati i relativi geni. Tuttavia essi devono affrontare, al pari dei virus a RNA, il problema di sintetizzare l'RNA da RNA stampo, e inoltre di come renderlo circolare. Le modalità con cui i viroidi compiono tale sintesi è un evento abbastanza complesso. L'RNA dei viroidi infettanti viene replicato da una **RNA polimerasi dell'ospite** che può sintetizzare l'RNA usando un RNA stampo. Tali enzimi sono comuni nelle piante ma non lo sono negli animali e nei batteri non infetti. Il processo di replicazione viene attuato usando l'RNA circolare come stampo e formando una copia, complementare ad esso, spostandosi tutto intorno al cerchio; questo meccanismo di **replicazione a cerchio rotante** viene usato anche da alcuni virus a DNA e dai plasmidi. Il risultato di tale operazione non consiste in una singola copia dello stampo, ma in una lunga serie di copie ripetute in tandem, come un rotolo di carta igienica non svolto. Per produrre viroidi, questa lunga molecola deve essere scissa in segmenti di dimensioni adeguate; questo può essere fatto in uno dei due seguenti modi. In alcuni viroidi, lo stesso RNA presenta un'attività enzimatica, ossia è un **ribozima**, ed è quindi capace di tagliare la lunga catena in singole copie; in altri viroidi il taglio viene eseguito da una endonucleasi dell'ospite. In entrambi i casi le copie risultanti devono legarsi in cerchi, che poi assumono la struttura molecolare del viroide.

Il solo agente infettante umano simile al viroide è detto erroneamente **virus dell'epatite D (HDV)**; in realtà tale particella è qualcosa di intermedio fra un virus e un viroide e quindi un'altra possibile denominazione potrebbe essere quella di "**virusoide**". Inoltre, HDV consiste di RNA nudo che differisce dai viroidi delle piante in quanto codifica per proteine. Tuttavia, a differenza dei veri e propri virus, l'agente dell'epatite D non codifica per il proprio capside, mentre le proteine che esso codifica sembrano svolgere un ruolo importante nell'impacchettamento delle particelle. L'agente dell'epatite D utilizza il capside di un virus autentico, ossia il virus dell'epatite B (HBV), per essere impacchettato. Da tutto ciò si evince che la malattia epatite D si verifica solo se l'ospite viene contemporaneamente coinfettato sia dal virus dell'epatite B che dall'agente dell'epatite D. Questo particolare tipo di infezione doppia comporta l'insorgenza di una malattia ben più grave di quella indotta dalla sola infezione da virus dell'epatite B. L'agente dell'epatite D può causare la malattia inattivando un componente essenziale delle cellule: il suo RNA presenta, infatti, un'ampia omologia di sequenza con una particella di RNA 7S citoplasmatica coinvolta nel riconoscimento del segnale e nella traslocazione di proteine secretorie e di quelle associate alla membrana; è probabile che l'RNA del virusoide sequestri o scinda la particella 7S, determinando la morte cellulare.

© 978-88-08-06761-6

Prioni

La degenerazione del sistema nervoso centrale costituisce una grave patologia, spesso con conseguenze mortali per gli esseri umani e gli animali. Recentemente, la più nota patologia degenerativa cerebrale è stata la cosiddetta "malattia della mucca pazza", ma ci sono anche altre manifestazioni cliniche simili, come la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) negli esseri umani e lo *scrapie* nelle pecore. Queste malattie sono denominate nel loro insieme **encefalopatie spongiformi** perché formano fori nel cervello, che fanno assumere al tessuto cerebrale un aspetto a spugna. La **natura infettiva** di una di queste malattie umane, il kuru, fu ipotizzata quando venne osservata l'associazione fra persone colpite e il loro consumo di carne di cervello umano a seguito di rituali tribali. È stato poi provato che alcune di queste malattie possono essere trasmesse anche in animali da laboratorio. In tutti questi esempi patologici, i ricercatori hanno sospettato che l'agente eziologico potesse essere un virus e tuttavia non riuscivano a isolare alcun agente infettivo conosciuto (virus, batteri o altri). In seguito, fu chiarito che l'agente infettivo, poi chiamato "prione", è altamente insolito in quanto *non contiene acidi nucleici, ma è composto interamente da una proteina*. Ciò risulta sorprendente perché tutti gli altri agenti infettivi, ovvero tutte le entità in grado di replicarsi, possiedono genomi a base di acido nucleico.

Tale mistero è stato parzialmente risolto con la scoperta che le proteine prioniche hanno proprietà insolite. Al pari delle altre proteine possono piegarsi in un certo numero di strutture tridimensionali differenti: in una configurazione, sono *costituenti normali delle cellule del sistema nervoso centrale* e non causano danno; in un'altra configurazione, invece, si trasformano in prioni e assumono la capacità insolita di fungere da stampo per convertire le molecole di proteine normali in prioni. I prioni e i loro precursori normali hanno la *stessa sequenza aminoacidica* e sono codificati dagli stessi geni: differiscono solamente nella conformazione molecolare, ovvero nel modo in cui tali componenti proteici sono ripiegati. Le proteine precursore normali dei prioni (proteina prionica cellulare o PrP^{c}) sono infatti ricche di siti molecolari nella conformazione α-elica, mentre tutte le proteine patologiche prioniche (PrP^{Sc}) mostrano una pre-

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 358

© 978-88-08-06761-6

valenza di siti molecolari che si presentano "srotolati" (*unfolded*) nella conformazione a foglietti-β. Contrariamente alle loro controparti normali, i prioni sono altamente resistenti alle proteasi, agli agenti chimici aggressivi e alle temperature elevate. La disinfezione di materiali contaminati da prioni richiede misure di disinfezione specifiche: per esempio, gli oggetti contaminati devono essere impregnati di idrossido di sodio 1N (normale) per almeno un'ora per poter distruggere le proteine prioniche.

Come fanno i prioni a imporre il loro tipo di ripiegamento alle molecole normali? Si pensa che i prioni *inducano* le proteine normali a ripiegarsi nella forma di prione. Non è noto, tuttavia, se i prioni agiscano su proteine che sono ancora nel processo di piegamento o su quelle che già si sono piegate nella loro configurazione naturale. Tale processo non è stato ancora riprodotto *in vitro*; si ritiene che esso sia irreversibile: ossia i prioni non ritornano a essere proteine normali.

Qualunque sia il meccanismo, l'accumulo di quantità sufficienti di prioni e la loro diffusione alle cellule adiacenti comporta l'alterazione delle normali funzioni cerebrali. Nelle pecore la malattia è denominata ***scrapie*** perché gli animali ammalati si strofinano intensamente su qualsiasi superficie, scorticando la propria lana e la pelle (*scrape*, scorticare). Con la morte di ampi aggregati cellulari nervosi, il cervello assume sempre più la forma di un formaggio svizzero con i buchi (Figura 17.11). Le proteine prioniche si aggregano in fibrille traslucide cerose dette **amiloidi**, che inducono la morte programmata delle cellule. Il termine "encefalopatia spongiforme" si riferisce all'aspetto spugnoso del tessuto cerebrale che consegue alla estesa necrosi cellulare. Le malattie da prioni mostrano sempre uno sviluppo lento nel tempo; è opportuno sottolineare che la funzione della forma normale dei prioni è ancora sconosciuta. I topi mutanti privi di questa proteina non mostrano sintomi. È possibile ipotizzare che se i prioni interessassero una proteina essenziale, le manifestazioni della malattia sarebbero più immediate.

www.microbebook.org

17.10 A website on prions

Un sito web dedicato ai prioni

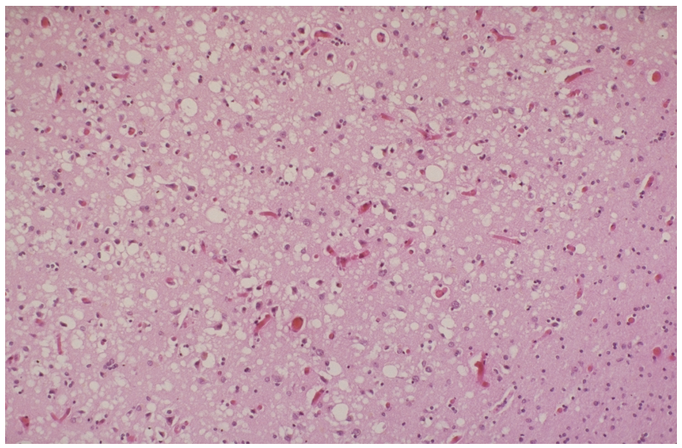

Figura 17.11
Danno patologico nella malattia da prioni. È mostrata una sezione di cervello affetto da encefalopatia spongiforme che rivela numerose cavità nel tessuto (aree chiare).

© 978-88-08-06761-6

In termini generali, l'attività dei prioni rientra nel campo di interesse dell'**epigenetica**, ovvero dei cambiamenti ereditari che non derivano da sequenze alterate del genoma. In tal senso gli esempi che riguardano organismi complessi sono alquanto numerosi – si pensi alla capacità delle cellule del fegato di riprodurre sempre se stesse pur avendo lo stesso genoma, per dire, delle cellule di muscolo. In alcuni casi, il cambiamento nel modello dell'espressione genica che caratterizza un dato tipo di cellule è stato attribuito a modificazioni del DNA, dovute a metilazione. Negli organismi unicellulari il fenomeno sembra essere più limitato; comunque i lieviti hanno proteine che si comportano come prioni, ossia inducono modificazioni ereditabili se introdotte per accoppiamento in altre cellule. Come i prioni animali, i prioni dei lieviti si aggregano in fibrille e inattivano le loro forme naturali. Rimane da vedere quanto sia diffuso il meccanismo dei prioni negli altri organismi. I prioni potrebbero essere coinvolti in altri fenomeni epigenetici, come la memoria a lungo termine o persino la differenziazione delle cellule somatiche.

Conclusioni

I virus, i viroidi e i prioni rivelano la grande plasticità del mondo biologico, ampliando i nostri concetti base sulla cellula come base della vita ai messaggeri chimici delle informazioni genetiche. Da queste entità infettanti apprendiamo che determinati fenomeni da cui dipendono i nostri concetti su che cosa è un vivente, come si replica e muta, non sono di pertinenza delle sole cellule. Questi processi possono essere indipendenti rispetto alle caratteristiche principali delle cellule, che sono quelle di dividersi e formare cellule figlie. Tali entità intracellulari non operano nel vuoto: hanno bisogno di cellule in grado di fornire l'energia e i meccanari di sintesi delle proteine. Se i virus che sono già capaci di sintetizzare il proprio acido nucleico, fossero dotati di un meccanismo necessario per ottenere l'energia e sintetizzare proteine, sarebbero capaci di replicazione autonoma? In altre parole sarebbero delle vere cellule? Tutto ciò sembra assumere una particolare importanza per alcuni dei grossi virus dotati di envelope, come quelli che causano il vaiolo, che sono forniti di un significativo complesso enzimatico per la sintesi dell'acido nucleico (vedere Capitolo 22).

Questo contesto così stimolante invita a ulteriori congetture. Da dove si originano i virus? Sono essi delle "cellule in forma ridotta", ovvero il risultato della perdita delle proprietà necessarie per poter condurre un'esistenza indipendente, oppure si sono evoluti come entità nuove? O ancora, seguono altre vie evolutive? Che significato può assumere la grande varietà dei virus, anche in un singolo ospite? Si pensi a tutti i virus conosciuti che causano patologie solo nell'uomo. A differenza dei batteri, che si sono evoluti in modo indipendente, i virus si sono evoluti solo in associazione con i loro ospiti. Inoltre, i prioni sono più diffusi di quanto oggi possiamo sapere, e assolvono funzioni nei fenomeni biologici essenziali, come la differenziazione? Queste e molte altre domande costituiscono argomenti di grande interesse scientifico e aree fertili per ulteriori studi.

17_Schaechter_def 17-10-2007 16:35 Pagina 360

© 978-88-08-06761-6

Domande di ripasso

1. In che cosa i virus differiscono dalle forme di vita cellulari?
2. Quali componenti sono comuni a tutti i virus?
3. Oltre alla conformazione, quale altra differenza importante esiste fra i virus icosaedrici e quelli filamentosi?
4. Quale può essere stata l'origine dell'envelope nei virus provvisti di rivestimento?
5. Alcuni virus trasportano enzimi nei loro virioni. Che genere di enzimi sono questi?
6. Come si replica l'acido nucleico dei retrovirus?
7. Discutere su come le proteine virali sono sintetizzate durante il ciclo di replicazione virale.
8. Distinguere fra i virus virulenti e quelli temperati.
9. Come rimangono quiescenti i virus temperati?
10. In un batterio lisogeno, come viene presa la decisione fra un ciclo litico e uno lisogeno?
11. Quali sono le caratteristiche distintive fra viroidi e prioni?