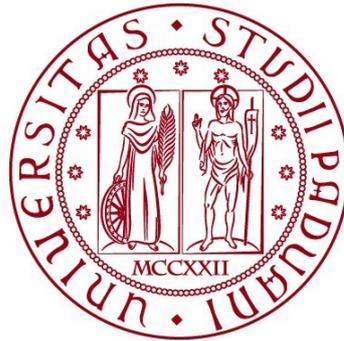


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

Virus e adattamento: studio sull'evoluzione virale

Tutor: Prof.ssa Roberta Provvedi

Dipartimento di Biologia

Laureando: Francesco Gazzola

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

ABSTRACT	1
CAPITOLO 1. I VIRUS.....	2
1.1 STORIA DELLA VIROLOGIA.....	2
1.2 CLASSIFICAZIONE DEI VIRUS	3
1.3 CENNI SULLA STRUTTURA E LA REPLICAZIONE DEI VIRUS.....	6
CAPITOLO 2. BASI DELL'EVOLUZIONE	9
2.1 PRINCIPI FONDAMENTALI DELL'EVOLUZIONE BIOLOGICA	9
2.2 L'EVOLUZIONE DEI VIRUS	11
2.3 MUTAZIONI, SELEZIONE E ADATTAMENTO.....	13
CAPITOLO 3. MECCANISMI DI EVOLUZIONE DEI VIRUS	15
3.1 MUTAZIONI E QUASI-SPECIE	15
3.2 RICOMBINAZIONE	17
3.3 RIASSORTIMENTO	18
3.4 FITNESS, AMBIENTE E RAPPORTO CON L'OSPITE	21
CAPITOLO 4. ADATTAMENTO E COEVOLUZIONE	24
4.1 LIVELLO MINIMO DI POPOLAZIONE	24
4.2 VIRUS DEL MIXOMA.....	25
4.3 ESEMPI DI COEVOLUZIONE TRA VIRUS E OSPITI.....	27
CAPITOLO 5. SARS-COV-2	29
5.1 STRUTTURA, INFEZIONE ED EVOLUZIONE	29
CONCLUSIONI	34
BIBLIOGRAFIA	35

ABSTRACT

La presente tesi bibliografica esplora il mondo dei virus, le loro caratteristiche fondamentali, le modalità di classificazione, in particolare si concentra sugli aspetti chiave della loro evoluzione. Attraverso un'indagine dettagliata si va ad analizzare le strutture dei virus, con particolare attenzione ai capsidi e alle diverse architetture che posso assumere. Si discute inoltre la simmetria di quest'ultimi, evidenziando le differenze tra i capsidi elicoidali ed icosaedrici, considerando le implicazioni di tali strutture sulla capacità dei virus di incapsulare il proprio genoma.

Il cuore centrale di questa tesi è proprio sull'evoluzione e l'adattamento virale, con particolare enfasi sui meccanismi di mutazione, ricombinazione e riassortimento che guidano la diversificazione genica dei virus.

Si va ad esplorare il concetto di fitness virale ed il rapporto virus/ospite, andando ad evidenziare come questo tipo di interazioni possano influenzare l'adattamento e la coevoluzione di entrambe le parti. In particolare si studiano il virus del mixoma e dell'herpesvirus come esempi per analizzare al meglio il concetto di coevoluzione, evidenziando le dinamiche complesse che regolano tali interazioni.

Si esamina, inoltre, il ruolo giocato dalle dimensioni delle popolazioni nella diffusione e persistenza del virus.

Nell'ultimo capitolo si mette una lente di ingrandimento sul virus del SARS-CoV2 analizzando la sua struttura, la sua evoluzione ed i suoi meccanismi di interazione ed infezione dell'ospite.

Il presente studio fornisce una panoramica sulla complessità dell'evoluzione virale, andando ad analizzare le diverse interazioni che il virus può avere con l'ospite e con l'ambiente, cercando di fare ordine e chiarezza su una scienza in continuo studio e cambiamento.

CAPITOLO 1. I VIRUS

1.1 Storia della virologia

Virus in latino significa letteralmente “Veleno”, l'identificazione di malattie oggi attribuite a virus ha una lunga storia, risalente all'antichità. Si trovano tracce antiche delle conseguenze della poliomielite su una stele egizia, mentre testi greci e latini descrivono la rabbia e antichi scritti indiani e cinesi fanno menzione del vaiolo. Originariamente, il termine latino "virus" aveva un significato più generale, indicando secrezioni, veleni o infezioni. Nel corso del XIX secolo, il concetto si è evoluto gradualmente per includere qualsiasi agente infettivo o fonte di contagio. Questa trasformazione concettuale è stata influenzata dall'ipotesi formulata nel 1840 dall'anatomista e fisiologo tedesco Jacob Henle, il quale sospettava che alcune malattie trasmissibili potessero essere causate da microrganismi (Agut 2022). Bisogna, però, fare un salto nella Russia di fine '900 dove il botanico Dmitri Ivanovski osservando la devastazione delle piantagioni di tabacco in un'area che includeva l'Ucraina, la Moldavia e la Crimea, riuscì a individuare un agente eziologico infinitamente piccolo che passava attraverso il filtro Chamberland, ma non aveva i mezzi per comprendere appieno la sua natura. Martinus Beijerinck, pochi anni dopo, ripeté l'esperimento di Ivanovski ottenendo gli stessi risultati e fu in quel contesto che si coniò il termine "virus". Wendell Stanley brillante assistente presso il Rockefeller Institute for Medical Research di New York, su invito del direttore dell'istituto, Simon Flexner, e del patologo vegetale Louis O. Kunkel, si trasferì al Dipartimento di Patologia vegetale e animale per lavorare sul TMV (Tobacco mosaic virus) nel 1932, segnando la sua introduzione nel campo della virologia. Mentre lavorava con John Howard Northrop e James Batcheller Sumner, mirava a ottenere una forma tridimensionale del virus per comprenderne la vera natura. Dopo aver colto la struttura del virus del mosaico del tabacco, Stanley scoprì che il virus, diluito ed introdotto nelle piante di tabacco, causava la malattia. Questa scoperta fu rivoluzionaria, sfidando il paradigma consolidato che solo gli organismi viventi potevano trasmettere malattie. Dal punto di vista strutturale, Stanley inizialmente definì il virus come una nucleoproteina, ma successivamente scienziati inglesi come Frederick Bawden e Norman Pirie dimostrarono che questo complesso proteico conteneva anche acido ribonucleico (RNA). Questi studi furono

fondamentali per lo sviluppo della moderna virologia. Wendell Stanley fu insignito del premio Nobel per la chimica nel 1946 insieme ai colleghi Northrop e Sumner, marcando il primo Nobel nel campo della virologia. (Stanley, 1938)

1.2 classificazione dei virus

Nei decenni che seguirono, queste scoperte furono di cruciale importanza nel mondo scientifico e la scoperta di diverse tipologie di virus portò alla necessità di avere un sistema di classificazione. Nel settembre 1971, David Baltimore pubblicò su *Bacteriology Reviews* (ora *Microbiology and Molecular Biology Reviews*) un breve documento intitolato "Expression of animal virus genomes" (Baltimore, 1971), anche definito "B71", che delineava la classificazione dei virus in base alle vie di espressione del genoma. Le sei "classi Baltimore" di virus, con l'aggiunta di una settima classe, sono diventate il quadro concettuale per lo sviluppo della virologia nei cinque decenni successivi. Durante questo periodo, è diventato chiaro che le classi di Baltimore, con aggiunte relativamente minori, coprono effettivamente la diversità degli schemi di espressione del genoma dei virus che definiscono anche i cicli di replicazione. Il sistema descritto in B71 consiste in sei classi di virus (di seguito classi di Baltimora, BC) che si distinguono per le diverse vie di trasferimento dell'informazione dall'acido nucleico incorporato nei virioni (genoma del virus) (Koonin et al., 2021). Queste vie, evidentemente, riflettono la natura chimica e la polarità del genoma (Fig. 1).

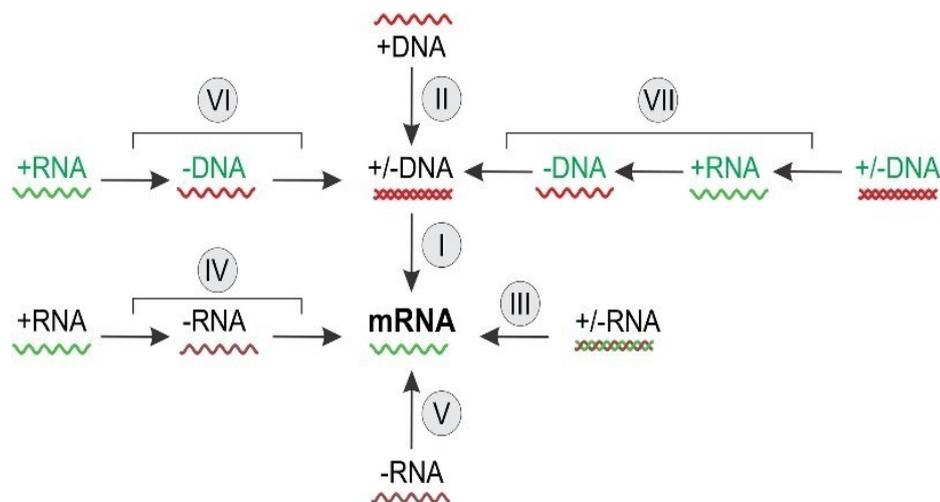


Figura 1: Nell'immagine viene rappresentato lo schema modificato delle sette classi di virus di Baltimore (Koonin et al., 2021).

È qui mostrato il trasferimento di informazioni genetiche tra gli acidi nucleici incapsulati nei virioni (genomi, in breve) e l'mRNA. Questo trasferimento è reso possibile da reazioni enzimatiche; nel caso dei virus a RNA, con l'eccezione dell'epatite delta e dei virus correlati, queste reazioni sono catalizzate dalle RNA polimerasi RNA-dipendenti codificate dal virus, che sono incapsulate nei virioni dei virus BCIII e BCV, ma non BCIV; la trascrizione inversa dell'RNA in DNA è catalizzata dalle trascrittasi inverse codificate dal virus, che possono essere o meno incapsulate nei virioni; la replicazione dei genomi di DNA è catalizzata dalle DNA polimerasi codificate dal virus o dall'ospite, che non sono racchiuse o contenute all'interno di strutture particolari come i capsidi o altri involucri virali (Baltimore, 1971). Vediamo ora più nello specifico ogni BC, indicati rispettivamente con un numero romano:

- i. BCI: virus a DNA a doppio filamento (ds). Sono i virus che incapsulano il dsDNA e utilizzano la via classica di trasmissione dell'informazione, la stessa di tutte le cellule.
- ii. BCII: virus a DNA a singolo filamento (ss) che incapsulano ssDNA, che viene poi replicato ed espresso attraverso un intermedio di dsDNA; Baltimore ha notato che tutti i virus a ssDNA conosciuti all'epoca incorporavano nei virioni o un ssDNA della stessa polarità dell'mRNA ([+]DNA) o molecole di ssDNA di entrambe le polarità (in particelle separate), ma non esclusivamente (-)DNA.
- iii. BCIII: virus a dsRNA che contengono un genoma a dsRNA che deve essere trascritto (la trascrizione è qui definita come sintesi di mRNA, indipendentemente dalla natura del modello) per produrre l'mRNA.
- iv. BCIV: virus a RNA (+) positivo che impacchettano nei virioni un ssRNA della stessa polarità dell'mRNA per la sintesi delle proteine del virus, in modo che l'RNA del genoma possa essere tradotto direttamente.
- v. BCV: virus a RNA negativo (-) che impacchettano un RNA complementare all'mRNA che viene trascritto per produrre quest'ultimo.
- vi. BCVI: virus a RNA a trascrizione inversa che confezionano un RNA a senso positivo che viene replicato attraverso un DNA intermedio.

Poco dopo la pubblicazione del B71, è stato caratterizzato un gruppo di virus, i virus dell'epatite B (HBV) successivamente denominati hepadnavirus (Galibert et al., 1979;

Kay & Zoulim, 2007), che si sono qualificati come BCVII, virus che confezionano un genoma a dsDNA (sebbene uno dei filamenti sia tipicamente incompleto) e utilizzano la RT (trascrittasi inversa) per replicarsi attraverso un intermedio a RNA. Un'altra importante classificazione che bisogna tenere in considerazione è la classificazione tassonomica dei virus e la denominazione dei taxa virali, che sono di competenza "dell'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)" (Adams et al., 2017). L'ICTV è incaricato di sviluppare, perfezionare e mantenere una tassonomia universale dei virus dalla Divisione di Virologia dell'Unione Internazionale delle Società Microbiologiche (Schleifer, 2008). L'ICTV è stato fondato nel 1966 con il nome di International Committee on Nomenclature of Viruses (Comitato Internazionale per la Nomenclatura dei Virus) e rinominato International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus) nel 1977 (Adams et al., 2015, 2017; Wildy, 1971). L'ICTV è composto da una serie di funzionari, presidenti di sottocomitati e membri eletti che supervisionano la classificazione tassonomica e la denominazione. Esistono sei sottocomitati, ognuno dei quali si occupa di un diverso gruppo di virus, differenziati in base al tipo di ospite che il virus infetta (animale, vegetale, fungino e protista, o batterico e arcaico) e alla composizione molecolare del genoma del virus (DNA, RNA, a doppio o singolo filamento e polarità traslazionale) (Lefkowitz et al., 2018). All'interno del sistema ICTV, le due principali divisioni tassonomiche sono: i virus con genoma a RNA e quelli con genoma a DNA. I livelli tassonomici successivi si basano sulle dimensioni e sulla struttura del capsido (icosaedrico, elicoidale o complesso), sulla presenza o meno dell'involucro e sulla natura del genoma (a singolo o doppio filamento, lineare o circolare, segmentato o non segmentato) (King, 2012a). Queste informazioni sono sufficienti per definire i principali gruppi di virus geneticamente distinti in famiglie, mentre alcune famiglie sono raggruppate in ordini. Le famiglie sono suddivise in generi, che sono collezioni di specie virali correlate ma distinte. Alcune grandi famiglie sono suddivise in sottofamiglie che sono poi suddivise in generi. Le sottofamiglie, i generi e le specie sono definiti da proprietà quali l'organizzazione genica, il meccanismo di replicazione, la suscettibilità a stress fisici e agenti chimici, il tropismo cellulare e le proprietà immunologiche e patogene. Secondo la definizione dell'ICTV, "una specie virale è una classe politetica di virus che costituisce un lignaggio replicativo e occupa una

particolare nicchia ecologica". Le caratteristiche epidemiologiche o biologiche distinte dei membri di una specie virale definiscono la sua "particolare nicchia ecologica". Nel sistema di nomenclatura dell'ICTV, gli ordini sono indicati con il suffisso "-virales", le famiglie con "-viridae", le sottofamiglie con "-virinae" e i generi con "-virus". I nomi delle specie di virus sono in corsivo. In alcuni casi, i nomi comuni ampiamente utilizzati differiscono dalla loro designazione formale, ad esempio, i poliovirus sono formalmente assegnati alla specie *Human enterovirus C*. Un esempio possiamo farlo con il virus dell'Herpes simplex: Ordine Herpesvirales, famiglia Herpesviridae, sottofamiglia Alphaherpesvirinae, genere Simplexvirus, specie *Human herpesvirus 1* (Pellett et al., 2014b)

Andiamo ora a vedere cosa sono effettivamente i virus, la loro struttura e i principali meccanismi che li contraddistinguono.

1.3 Cenni sulla struttura e la replicazione dei virus

I virus sono unità infettive, con diametri che variano da circa 16 nm (circovirus) a oltre 300 nm. La loro dimensione ridotta consente loro di sfuggire alla trattenuta attraverso filtri antibatterici, rendendoli ultra-filtrabili. Nel corso di un lungo processo evolutivo, i virus si sono adattati a organismi specifici e alle loro cellule. Le unità virali infettive, chiamate virioni, sono costituite da proteine e, in alcune categorie di virus, sono avvolte da una membrana lipidica chiamata involucro. Queste particelle contengono esclusivamente un tipo di acido nucleico, che può essere DNA o RNA.

A differenza di batteri, lieviti o altre cellule che si replicano attraverso la divisione, i virus non hanno un processo di riproduzione autonomo. Invece, si replicano all'interno delle cellule viventi che infettano, sfruttando la macchina genomica e producendo i componenti necessari. I virus non codificano i propri ribosomi per la sintesi proteica né le vie metaboliche per la produzione di energia, rendendoli parassiti intracellulari. Hanno la capacità di influenzare e alterare i processi cellulari al fine di ottimizzare la propria replicazione.

Oltre alle informazioni genetiche per la codifica dei componenti strutturali, i virus possiedono geni che dirigono diverse proteine regolatrici attive, come i transattivatori, ed enzimi quali proteasi e polimerasi (Modrow et al., 2013).

Da un punto di vista strutturale, i virioni possono essere generalmente considerati come assemblaggi di nucleoproteine. Tutti comprendono un genoma di acido nucleico e molte copie di una o più proteine. Tuttavia, i virioni presentano notevoli differenze in termini di dimensioni, forma, composizione molecolare, organizzazione strutturale e complessità. Considerando solo la composizione molecolare, i virus sono generalmente classificati in due grandi gruppi, i virus con involucro o “enveloped virus” e i virus nudi o “non-enveloped virus”, a seconda dell'assenza o della presenza di uno strato lipidico esterno.

Negli enveloped virus, il capsid e/o altre strutture interne sono tipicamente circondate da un doppio strato lipidico chiamato anche pericapsid, in cui sono incorporate alcune glicoproteine; alcuni virioni con pericapsid hanno una complessa struttura multistrato costituita da strati organizzati di lipidi, proteine e/o nucleoproteine (Almendral, 2013; Castón & Carrascosa, 2013; Garcia-Doval & van Raaij, 2013; San Martín, 2013)

Nei virus nudi, invece, i virioni sono composti solo da un involucro proteico, o capsid, costituito da copie multiple di una o più proteine, che contiene l'acido nucleico virale. Nei virioni più complessi, il capsid può contenere non solo il genoma virale, ma anche altre proteine e/o altre macromolecole, che possono essere organizzate in sottoinsiemi. Queste biomolecole o sottoinsiemi aggiuntivi possono essere racchiusi nel guscio del capsid o attaccati esternamente alla sua superficie. Il capsid svolge un ruolo fondamentale sia nell'architettura che nella funzione biologica di un virus. Si può generalmente descrivere come un oligomero o multimerico proteico simmetrico cavo, composto da diverse decine a centinaia di copie di uno o pochi tipi di polipeptidi piegati, noti come subunità proteiche del capsid (CP). La maggior parte dei CP (o dei loro domini strutturali individuali se formati da più di un dominio) può essere associata a un numero molto limitato di architetture o piegature proteiche che possono assemblarsi in un numero ristretto di strutture quaternarie (Castón & Carrascosa, 2013). I capsidi elicoidali sono estremamente semplici, multimeri teoricamente infiniti e (in principio) potrebbero essere realizzati in qualsiasi lunghezza necessaria per incapsulare un genoma di acido nucleico, indipendentemente dalla sua lunghezza. Tuttavia, restrizioni fisiche e biologiche limitano la lunghezza dei capsidi elicoidali, che sono molto meno frequenti dei capsidi icosaedrici; i capsidi elicoidali regolari si trovano in circa il

10% delle famiglie di virus. A differenza dei capsidi elicoidali, i capsidi icosaedrici devono essere composti esattamente da 60 componenti strutturalmente identici (monomeri o oligomeri CP) per soddisfare vincoli geometrici intrinseci. Questo potrebbe limitare notevolmente le dimensioni del genoma di acido nucleico e, di conseguenza, la quantità di informazioni genetiche che potrebbero essere racchiuse (Castón & Carrascosa, 2013). Tuttavia, l'evoluzione ha portato a diverse soluzioni strutturali per realizzare capsidi virali molto grandi con simmetria icosaedrica, composti da centinaia di subunità CP chimicamente identiche, in grado di racchiudere genomi molto ampi. I capsidi icosaedrici sono estremamente comuni perché possiedono una simmetria che offre una stabilità energetica ottimale. Questa forma geometrica minimizza l'energia superficiale complessiva della struttura virale, consentendo ai virus di mantenere una conformazione stabile e compatta. La stabilità energetica è cruciale per la sopravvivenza e la replicazione dei virus, poiché consente loro di resistere a stress esterni e di mantenere l'integrità della capsula proteica durante la diffusione e l'infezione. La simmetria icosaedrica è quindi la scelta più comune tra i virus, riscontrata in circa la metà delle famiglie virali, poiché rappresenta un compromesso ideale tra stabilità strutturale ed efficienza nella replicazione virale (Mateu, 2013).

Il ciclo di replicazione del virus inizia con l'ingresso del virus nella cellula ospite. Le proteine di attacco sulla superficie del virione riconoscono e si legano a specifici recettori sulla superficie cellulare. Nel caso dei non-enveloped virus, l'attacco è solitamente mediato da una specifica glicoproteina dell'involucro del virus, ad esempio la glicoproteina emoagglutinina del virus dell'influenza (Cosset & Lavillette, 2011). Per gli enveloped virus, l'attacco può essere mediato da una singola proteina, come la proteina fibra dell'adenovirus, o da una struttura multiproteica come nel caso del poliovirus (Moyer & Nemerow, 2011; Suomalainen & Greber, 2013). La penetrazione è il processo attraverso il quale il virus accede al citoplasma. Gli involucri di alcuni virus, ad esempio l'HIV-1, si fondono direttamente con la membrana plasmatica cellulare. Altri virus avvolti, ad esempio i virus influenzali, vengono endocitati e alla fine fondono il loro involucro con la membrana della vescicola endocitica. In entrambi i meccanismi, un cambiamento conformazionale in una proteina della membrana virale espone un peptide di fusione idrofobico che innesca la fusione della membrana, rilasciando il nucleocapside del virus nel

citoplasma (Plempner, 2011). I meccanismi di penetrazione dei virus nudi sono meno conosciuti rispetto a quelli dei virus con pericapside. L'interazione dei nonenveloped virus con la superficie cellulare o le vescicole endocitiche porta a cambiamenti conformazionali che espongono un dominio idrofobico o un'altra struttura stabilizzante della membrana, come specifiche regioni proteiche o sequenze di amminoacidi lipofile, che favoriscono l'ancoraggio e l'ingresso del virus nella cellula ospite. In alcuni casi, l'attivazione dei cambiamenti conformazionali coinvolti nella penetrazione richiede un co-recettore cellulare o un cambiamento nell'ambiente del virione, come l'acidificazione di un compartimento endocitico. Il virione deve subire ulteriori modifiche per consentire al genoma del virus di accedere ai componenti cellulari necessari per la replicazione virale. I dettagli di questo processo di disassemblaggio dipendono dal tipo di virus, dalla strategia di replicazione e dal compartimento all'interno della cellula in cui avviene la replicazione del genoma virale. Per la maggior parte dei virus a DNA (classi Baltimore I e II, eccetto i poxvirus;), il complesso del capsido o della nucleoproteina contenente il genoma viene trasportato in prossimità di un poro nucleare, seguito dalla consegna del genoma attraverso il poro per consentire l'inizio dell'espressione genica e della replicazione. Per i virus a RNA a filamento positivo (classe IV di Baltimore), la dissociazione dell'RNA genomico dal capsido consente l'associazione con i ribosomi, dando inizio all'espressione genica virale. Per i virus a RNA a doppio filamento e a filamento negativo (classi Baltimore III e V), il rivestimento rimuove tipicamente i componenti esterni del virione, ma lascia il genoma associato all'RdRp codificato dal virus (Pellett et al., 2014a).

CAPITOLO 2. Basi dell'evoluzione

2.1 Principi fondamentali dell'evoluzione biologica

“L'evoluzione altro non è che il cambiamento nel tempo del pool genetico di una popolazione. In termini più generali l'evoluzione è l'originarsi di nuovi organismi attraverso l'assommarsi di cambiamenti nel tempo lungo le generazioni”

(Arms Karen, 1998)

Nel 1858, Charles Darwin e Alfred Russell Wallace presentarono alla Linnean Society di Londra la “teoria dell'evoluzione”, destinata a trasformare radicalmente il panorama scientifico ed evolucionistico. Darwin elaborò le fondamenta concettuali della sua teoria attraverso anni di studio teorico ed esperienze. La diffusione dei suoi scritti, tra cui "Viaggio di un naturalista intorno al Mondo" (1839), "L'origine delle specie per selezione naturale" (1859) e "L'origine dell'uomo" (1871), insieme a numerosi saggi e corrispondenze, rivoluzionò completamente la concezione dell'evoluzione fino ad allora. Riprendendo l'opera principale di Darwin, "L'origine delle specie," pubblicata nel 1859, e considerando gli studi successivi del biologo e genetista Ernst Mayr, è possibile identificare i cinque punti focali della teoria darwiniana:

- i. L'evoluzione in sé: detta anche “teoria della non costanza”, non è altro che l'affermazione che il mondo è in continuo cambiamento e che le specie non sono immutabili, ma piuttosto soggette a cambiamenti nel corso del tempo attraverso un processo di evoluzione. Le specie, quindi, non sono fissate o costanti, ma possono cambiare nel corso delle generazioni.
- ii. La discendenza comune: L'idea centrale è che tutta la vita sulla Terra condivide un antenato comune, che ha dato origine alla diversità che vediamo nei fossili e intorno a noi. Questo implica che tutti gli organismi viventi sono imparentati, e la relazione può essere più o meno stretta. Darwin si discosta da Lamarck che sosteneva che le linee genealogiche diverse derivavano da progenitori distinti (Ferraguti et al., 2011).
- iii. La proliferazione della specie: Attraverso la costante successione di piccole variazioni da una generazione all'altra, è possibile generare differenze significative tra sottopopolazioni isolate, creando le condizioni per l'emergere di nuove specie distinte rispetto a quella di origine. Il processo di speciazione si attua attraverso la formazione di una barriera riproduttiva tra due popolazioni appartenenti alla stessa specie (Lupia Palmieri, 2014), spesso (ma non necessariamente) in seguito all'isolamento geografico. Con Darwin assistiamo a un cambio di prospettiva: l'evoluzione non è più un processo lineare e l'insieme degli esseri viventi non è più metaforicamente disposto in una scala gerarchica.

- iv. La selezione naturale: Darwin descrisse la selezione naturale come il principio secondo il quale ogni minima variazione, se benefica per la sopravvivenza dell'individuo nelle specifiche condizioni ambientali a cui è esposto, viene preservata e tende a essere trasmessa ai discendenti. Nella prospettiva darwiniana, la selezione naturale emerge quindi come il processo naturale che guida il cambiamento evolutivo adattivo; si configura come un meccanismo che conserva e registra i tratti ereditabili che risultano vantaggiosi per la generazione precedente. Agendo sulla variazione ereditabile disponibile, la selezione naturale contribuisce al miglioramento dell'adattamento degli organismi al loro ambiente (Gould, 2007).
- v. La gradualità dell'evoluzione: l'evoluzione di una specie è generata da un accumulo di cambiamenti che si verificano pian piano nel corso delle generazioni precedenti (Berti, 2014). Utilizzando le parole di Darwin stesso: “La selezione naturale opera esclusivamente accumulando leggere variazioni favorevoli (...) per cui non può provocare all'improvviso grandi modificazioni, mentre può operare esclusivamente a passi molto brevi e lenti” (Darwin, 1859 ed. 2016).

2.2 L'evoluzione dei virus

I virus sono entità mutabili soggette a pressione evolutiva come tutti gli altri organismi e ciò ha portato alla grande diversità dei virus esistenti oggi. Purtroppo, però, è molto difficile riuscire a confrontare i virus nei diversi anni, perché non lasciano tracce archeologiche. Insieme alla mancanza di tracce fossili, vi è anche il fatto che la replicazione dei virus è molto rapida, ciò gli permette di generare una un'ampia gamma di mutanti dai quali può avvenire una selezione in tempi molto brevi. (Dimmock Nigel J. et al., 2017)

Un concetto molto importante nell'evoluzione dei virus è il fatto che, essendo parassiti obbligati, sono bloccati con gli ospiti cellulari in una perenne corsa agli armamenti (Koonin et al., 2020). Durante questa gara, gli ospiti evolvono e diversificano i meccanismi di difesa antivirale, mentre i virus rispondono con sistemi di controdifesa in evoluzione che sopprimono le difese dell'ospite. Complementare alla corsa agli armamenti e ad essa intrecciata è l'ampio flusso genico tra i virus e i

loro ospiti. I virus spesso acquisiscono i geni dell'ospite e li impiegano per svolgere ruoli nella riproduzione del virus e nell'interazione virusospite e, viceversa, gli ospiti catturano i geni del virus e li riutilizzano per la difesa e altre funzioni cellulari (Koonin et al., 2020)

Un esempio che può rappresentare al meglio questa mutuale evoluzione, è rappresentato dal batterio *Pseudomonas aeruginosa*, noto per causare infezioni nosocomiali, anche molto gravi, in soggetti immunocompromessi (Wilson & Pandey, 2024). Nel momento in cui questo tipo di batterio viene infettato dai fagi, utilizza più di un sistema come metodo di difesa. Fra quelli di maggiore importanza c'è la produzione di esopolisaccaridi extracellulari (EPS) e la formazione di biofilm che possono facilitare il mascheramento dei recettori, impedendo la penetrazione del fago e il legame con il recettore (Vaitekenas et al., 2021). Tuttavia, alcuni fagi sono maggiormente in grado di penetrare i biofilm grazie alla produzione di enzimi degradativi della matrice. Il sistema di difesa che ci interessa maggiormente è quello costituito dal CRISPR-Cas, fondamentale nel momento in cui i fagi riescono a penetrare all'interno del batterio. Il componente CRISPR RNA (crRNA) del CRISPR-cas lega sequenze di DNA complementari specifiche del fago, consentendo alle nucleasi cas di tagliare il DNA dell'invasore riconosciuto. Il CRISPR-cas è anche in grado di adattarsi, in modo che un batterio che sopravvive a un'infezione possa incorporare il DNA di un fago nella sua sequenza CRISPRcas. L'adattamento consente a un batterio di riconoscere e prevenire successive infezioni con lo stesso fago.

Anche i fagi stessi possono subire mutazioni, che permettono loro di combattere i sistemi di difesa del batterio ospite, dando inizio a un nuovo ciclo nella corsa agli armamenti tra batteri e fagi (Cady et al., 2012; Vaitekenas et al., 2021).

Questo processo dimostra come la continua interazione tra virus e batteri conduca ad un costante adattamento ed evoluzione da ambe le parti.

Nell'evoluzione dei virus, è cruciale considerare sia la pressione selettiva che modifica le caratteristiche dell'ospite, sia quella esercitata sul virus da ciascun ospite. È essenziale comprendere che l'evoluzione di ogni parassita di successo deve garantire la sopravvivenza dell'ospite stesso: le molteplici interazioni tra virus e ospite possono essere interpretate come diverse strategie adottate dai virus per affrontare questa sfida. (Dimmock Nigel J. et al., 2017).

2.3 Mutazioni, selezione e adattamento

L'evoluzione attraverso la selezione naturale richiede la generazione di una certa diversità genetica sulla quale può agire. Questa diversità è alla fine responsabile dell'esistenza di differenze nel successo riproduttivo degli individui, nella loro fitness. La maggior parte della variabilità genetica è una conseguenza diretta del verificarsi di errori durante la copia dei genomi virali. La replicazione dell'acido nucleico è un processo complesso in cui viene creata una sequenza complementare attraverso l'aggiunta sequenziale di nucleotidi. La replicazione non è completamente fedele e, occasionalmente, un nucleotide errato viene aggiunto alla catena di sintesi. Se l'errore non viene corretto, può essere propagato alle generazioni successive e dare origine a una mutazione. A quanto pare, potrebbe esserci una contraddizione tra l'effetto deleterio della maggior parte delle mutazioni e la necessità di diversità per consentire l'adattamento a condizioni mutevoli. Il confronto dei tassi di mutazione spontanea della replicazione in diversi organismi suggerisce che l'evoluzione ha selezionato valori ottimali di tasso di mutazione in funzione della variabilità ambientale (Drake et al., 1998; Earl & Deem, 2004).

I genomi di DNA sono replicati dalle DNA polimerasi, enzimi dotati di diverse attività correttive che assicurano un'elevata precisione di copiatura. L'accuratezza delle DNA polimerasi può tuttavia essere modificata se l'ambiente lo richiede. Ad esempio, condizioni di stress possono favorire la selezione di ceppi batterici con una minore attività correttiva della DNA polimerasi (Tanaka et al., 2003). Queste varianti si comportano come ceppi ipermutatori, generando così una più ampia diversità genetica che può essere vantaggiosa per la sopravvivenza dell'organismo, consentendo l'emergere di individui in grado di adattarsi meglio alle condizioni di stress. Un esempio di replicazione del DNA con un tasso di errore superiore è rappresentato dai geni delle immunoglobuline nei vertebrati. Questi geni, essenziali per la produzione di anticorpi, sperimentano un tasso di mutazione più elevato rispetto ad altri geni del genoma. Tale variabilità è cruciale per la diversificazione degli anticorpi, consentendo al sistema immunitario di riconoscere e neutralizzare una vasta gamma di antigeni. La variabilità nella precisione della replicazione del DNA può avere conseguenze significative sull'adattamento degli organismi alle loro condizioni ambientali e sulle risposte immunitarie contro le infezioni.

I virus sono replicatori che utilizzano i meccanismi generali di mutazione e selezione per riprodursi in modo efficiente in ambienti che cambiano frequentemente. Esistono importanti differenze nella capacità evolutiva dei virus a DNA e a RNA. I virus del DNA possono replicare i loro genomi utilizzando polimerasi del DNA ad alta fedeltà. Al contrario, poiché nel mondo cellulare la replicazione dell'RNA non ha luogo (l'RNA viene sempre sintetizzato in seguito alla trascrizione del DNA), i virus a RNA necessitano di attività enzimatiche che di solito non sono presenti nella cellula. Questi enzimi sono le replicasi dell'RNA e le trascrittasi inverse, codificate dai genomi virali. Entrambi gli enzimi sono privi di attività correttive, il che comporta un tasso di errore nella replicazione di diversi ordini di grandezza superiore a quello della replicazione del DNA, consentendo infine la generazione di un'enorme varietà di genomi mutanti Fig.2 (Domingo & Holland, 1997; Drake & Holland, 1999).

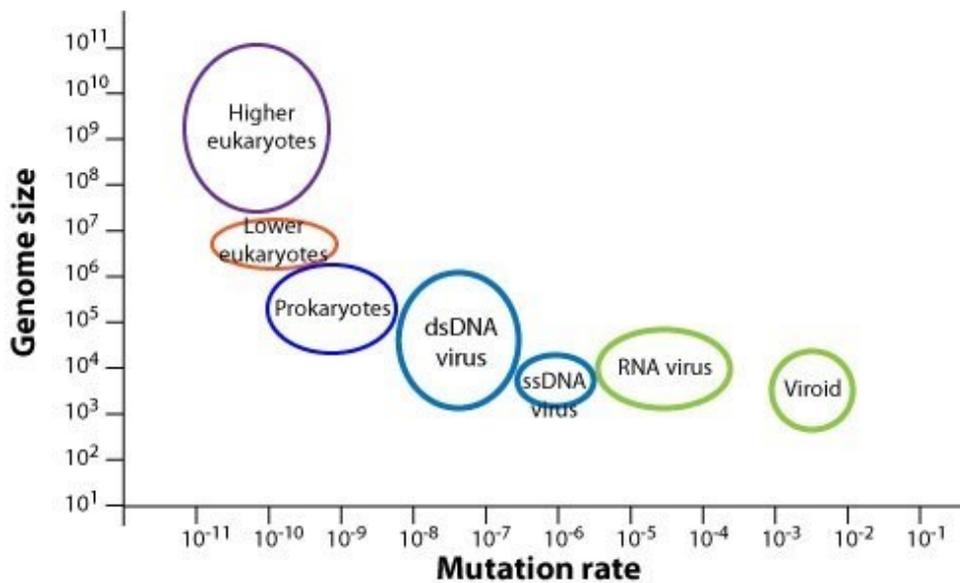


Figura 2: In questa immagine viene messo in evidenza il rapporto fra la frequenza delle mutazioni e la grandezza del genoma, dimostrando quanto i virus siano di gran lunga quelli con la frequenza di mutazione più alta.

CAPITOLO 3. Meccanismi di evoluzione dei virus

3.1 Mutazioni e quasi-specie

Come per tutti gli organismi, anche per i virus l'evoluzione dipende dall'acquisizione di mutazioni che conferiscono un vantaggio selettivo. I mutanti con diversi livelli di infettività generati da un gene mutato si verificano regolarmente in una popolazione di virus a causa degli elevati tassi di mutazione (Holland et al., 1982).

La mutazione, che rappresenta un fenomeno osservabile in una popolazione (insieme di organismi o di geni o tratti di essi), può essere descritta quantitativamente attraverso due parametri principali: il tasso di mutazione e la frequenza di mutazione. Il tasso di mutazione indica il numero di mutazioni che si verificano per ogni singolo nucleotide copiato, senza tener conto della destinazione finale dell'errore generato; di conseguenza, si tratta di una misurazione di un processo biochimico specifico. Diversamente, la frequenza di mutazione descrive la proporzione di individui mutanti all'interno di una popolazione, e dipende sia dal tasso con cui si generano le mutazioni sia dalla capacità di replicazione del mutante rispetto agli altri genomi presenti nella popolazione (Fields et al., 2007). Mentre i tassi di mutazione per i genomi del DNA sono stati stimati tra 10^{-7} e 10^{-11} per coppia di basi per replicazione, l'RNA polimerasi dipendente dall'RNA (RdRp) ha mostrato una fedeltà tipicamente bassa, con un tasso di mutazione di circa 10^{-4} mutazioni per nucleotide copiato, superiore a quello di quasi tutti i virus a DNA (Mandary et al., 2019). Un virus a RNA può dunque raggiungere, in una singola generazione, un grado di variabilità genetica che un genoma equivalente a DNA raggiungerebbe in un numero di generazioni compreso tra 300 000 e 3 milioni (Dimmock Nigel J. et al., 2017)

Tutti i meccanismi che generano diversità genetica in grandi popolazioni di individui a rapida replicazione, come i virus a RNA, portano a una struttura di popolazione altamente eterogenea. Quando l'ambiente subisce un cambiamento, le varianti di maggior successo nelle nuove condizioni aumentano la loro rappresentanza nella popolazione, modificandone la composizione. Una volta che i processi di mutazione, competizione e selezione hanno agito per un tempo

sufficientemente lungo in un ambiente costante, si raggiunge uno stato stazionario in cui ogni mutante è rappresentato in quantità fissa. Questo stato stazionario definisce una quasispecie (Manrubia & Lázaro, 2006). La vitalità di tutta la progenie mutante non è garantita, ma molti mutanti lo saranno. La selezione naturale, specialmente attraverso i meccanismi di difesa dell'ospite e le condizioni ambientali che favoriscono la sopravvivenza al di fuori dell'ospite, sarà fondamentale nel determinare quali discendenti avranno la capacità di infettare un nuovo ospite e trasmettere i geni mutanti.

La popolazione di quasispecie è costituita da una “nuvola” di mutanti in equilibrio che si sviluppano intorno a una sequenza master o consenso. Questa popolazione presenta variazioni genomiche che permettono di distinguere i diversi mutanti dalla sequenza leader, anche se non a un punto tale da considerarli specie diverse (Fields et al., 2007). La sequenza consenso rappresenta la sequenza più comune o predominante tra tutte quelle dei mutanti presenti nella popolazione. A causa dell'equilibrio dinamico che caratterizza questa distribuzione, la sequenza consenso può variare nel tempo a seguito del processo continuo di mutazione e selezione.

Pertanto, anche la sequenza consenso non è stabile nel tempo (Flint & Microbiology, 2009).

Un altro concetto importante quando si parla di quasispecie è quello della soglia di errore, si riferisce alla massima frequenza di mutazioni che un processo replicativo può sopportare senza compromettere la formazione di una popolazione di quasispecie vitale. In altre parole, indica il punto in cui la frequenza complessiva delle mutazioni supera un certo limite, oltre il quale la frequenza di mutazioni non vitali diventa troppo elevata per permettere la formazione di una popolazione stabile. (Dimmock Nigel J. et al., 2017)

La struttura di quasispecie non è esclusiva dei virus che causano infezioni persistenti, e non tutti i virus che causano infezioni persistenti seguono una dinamica di quasispecie. È importante sottolineare che la presenza di una quasispecie non implica necessariamente la persistenza virale e viceversa (Domingo et al., 1998).

La dinamica di quasispecie, che porta alla formazione di una popolazione di mutanti, offre al virus un'elevata capacità di adattamento e la possibilità di regolare l'espressione fenotipica. Ciò significa che la manifestazione clinica dell'infezione

può essere influenzata dalla popolazione di varianti presenti, anziché essere determinata da un singolo tipo virale. I mutanti che compongono la quasispecie rappresentano una vasta riserva di varianti con proprietà biologiche potenzialmente diverse. Questa diversità può giocare un ruolo cruciale nel processo evolutivo del virus, poiché fornisce una ricca fonte di adattamento e selezione. Alla fine, questo processo può portare alla selezione del mutante più adatto a sopravvivere e prosperare nell'ambiente in cui si trova il virus (Domingo & Holland, 1997)

3.2 Ricombinazione

La ricombinazione consiste nella creazione di nuove associazioni di materiale genetico (unite covalentemente) che proviene da due genomi parentali distinti, o tra vari punti dello stesso genoma. Questo processo di ricombinazione è un metodo comune di variazione genetica che si verifica sia nei virus RNA che DNA (Fields et al., 2007) Affinché si verifichi la ricombinazione, è necessario che la stessa cellula ospite venga infettata da almeno due genomi virali distinti. La persistenza di un singolo genoma virale all'interno della cellula, causando un'infezione prolungata, favorisce l'insorgere di una coinfezione mediante l'invasione successiva di un altro virus, aumentando così le probabilità di ricombinazione (Fields et al., 2007). Lo scambio genetico può avvenire sia durante la replicazione del genoma che in modo indipendente. Durante la replicazione del genoma, la ricombinazione si verifica quando i due genomi presentano una notevole somiglianza, con regioni omologhe che consentono agli enzimi coinvolti di spostarsi da un modello di genoma all'altro, trasportando con sé la molecola appena sintetizzata, che viene estesa utilizzando il secondo genoma come modello. In questo modo, in un singolo evento, la molecola figlia risultante acquisisce alcune caratteristiche di entrambe le molecole parentali; tuttavia, affinché la progenie sia biologicamente efficiente, le parti dei genomi risultanti devono essere sufficientemente compatibili. La ricombinazione non replicativa può avvenire mediante lo scambio di materiale genetico tra due genomi, coinvolgendo processi di rottura e riunione di due o più frammenti. Sia i genomi a DNA che quelli a RNA possono subire ricombinazione, anche se questa è più comune nei virus a RNA durante la replicazione. In linea di principio, sebbene gli eventi multipli siano significativamente meno probabili, la ricombinazione può verificarsi più volte all'interno di un genoma, generando così virus ricombinanti a

mosaico. Durante la ricombinazione, esiste la possibilità di generare genomi ricombinanti contenenti sequenze duplicate o mancanti a causa di eventi di ricombinazione che hanno fuso i genomi in regioni non omologhe. La formazione di regioni duplicate consente a una copia di un gene duplicato di mutare senza causare danni al virus. Questo può rappresentare un meccanismo attraverso il quale i virus acquisiscono nuovi geni e funzioni (Dimmock Nigel J. et al., 2017). Le mutazioni e la ricombinazione sono le due principali fonti di diversità genetica. Le mutazioni introducono cambiamenti negli stati nucleotidici e quindi nuove varianti. La ricombinazione consente il movimento di varianti tra i genomi per produrre nuovi aplotipi. Pertanto, la ricombinazione non crea nuove mutazioni (a livello nucleotidico), ma introduce nuove composizioni di quelle esistenti. Di conseguenza, diverse mutazioni precedentemente incorporate in una regione genomica possono essere trasferite simultaneamente a un'altra regione da un singolo evento di ricombinazione (Pérez-Losada et al., 2015). Esistono numerosi studi su virus che mostrano tassi di ricombinazione elevati che aumentano la diversità genetica e creano nuovi ceppi (Combela et al., 2011; González-Candelas et al., 2011; He et al., 2010) o aumentano la variazione fenotipica (Combela et al., 2011). La ricombinazione ha infatti favorito l'emergere di nuovi virus patogeni ricombinanti in circolazione (Combela et al., 2011; González-Candelas et al., 2011).

3.3 Riassortimento

Anche i virus con genomi segmentati (RNA o DNA) possono partecipare al processo di ricombinazione, noto come riassortimento, mediante il quale acquisiscono interi segmenti genomici da altri virus. Questa forma di ricombinazione, chiamata riassortimento, produce virus riassortanti.

Contrariamente agli eventi di ricombinazione replicativa o non replicativa descritti in precedenza, il riassortimento avviene con una frequenza maggiore. È un fenomeno evolutivo che permette grossi cambiamenti e che viene molto sfruttato da questi virus,; ad esempio, un virus influenzale può acquisire una nuova proteina di rivestimento in un'unica fase, fenomeno noto come "Antigenetic shift", responsabile delle pandemie influenzali umane (Flint & Microbiology, 2009).

Esiste inoltre un altro fenomeno strettamente correlato all'antigenetic shift chiamato "Antigenetic drift". Bisogna però fare una chiara e netta distinzione fra i due :

- i. L'antigenic drift (Deriva antigenetica) rappresenta un processo continuo di accumulo graduale di mutazioni minori nel genoma virale, come le sostituzioni nucleotidiche. Queste mutazioni determinano un potenziale codificante lievemente alterato e, di conseguenza, un'antigenicità modificata, che può ridurre il riconoscimento da parte del sistema immunitario. Sebbene avvenga in tutti i virus, la frequenza della deriva antigenica varia notevolmente, essendo più comune nei virus a RNA rispetto a quelli a DNA. Il sistema immunitario si adatta costantemente per riconoscere e rispondere alle nuove strutture antigeniche, ma spesso rimane un passo indietro. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, il sistema immunitario riesce infine a sconfiggere il virus, eliminandolo.
- ii. L'antigenic shift (sostituzione antigenica) è un processo in cui il riassortimento del genoma virale segmentato con un altro genoma di tipo antigenico diverso provoca un repentino e drammatico cambiamento nell'antigenicità del virus. Questo porta inizialmente a una incapacità del sistema immunitario di riconoscere il nuovo tipo antigenico, dando al virus un vantaggio (Cann, 2006).

Concentrandoci sul virus dell'influenza, affinché avvenga il riassortimento, è necessaria una compatibilità tra tutti gli otto segmenti genomici del virus influenzale A, il che limita la generazione di nuovi virus. Sebbene i virus influenzali A abbiano la capacità di infettare diverse specie animali, il serbatoio naturale dei ceppi influenzali che infettano l'uomo è rappresentato dagli uccelli acquatici. Le glicoproteine dell'involucro virale, l'emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA), stimolano una risposta immunitaria protettiva nell'ospite, mediata da anticorpi specifici per tali proteine.

I virus influenzali A sono classificati in tipi, sottotipi e ceppi. Sono stati isolati in natura 16 sottotipi di HA (H1,H2,H3,...,H16) e 9 sottotipi di NA (N1,N2,N2,...,N9), suggerendo la possibilità di 144 combinazioni diverse di queste proteine. Tuttavia, attualmente, solo due sottotipi influenzali (H1N1 e

H3N2) circolano nell'uomo, sebbene siano stati osservati periodicamente altri sottotipi che non si sono stabiliti nella popolazione umana.

Nonostante l'attivazione di una risposta immunitaria dopo l'infezione, le infezioni ripetute da virus influenzali sono comuni a causa della deriva antigenica, in cui le proteine HA e NA mutano continuamente, rendendo inefficace l'immunità progressiva. La cronologia della comparsa di virus influenzali risultati da antigenic shift nell'uomo la vediamo in Fig.2

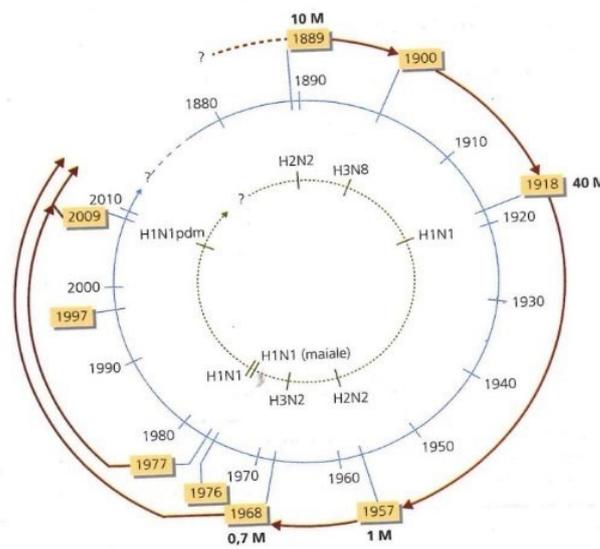


Figura 2: Il cerchio esterno riporta l'anno di comparsa di un nuovo sottotipo che è mostrato nel cerchio interno, la durata della presenza di quel sottotipo e il momento in cui è avvenuta la sostituzione da parte di un sottotipo diverso. La scala temporale è mostrata nel cerchio inter-medio. Le cifre relative alla mortalità in tutto il mondo sono indicate in milioni (M). (Dimmock Nigel J. et al., 2017)

Dal 1977, con l'emergere di un nuovo ceppo pandemico H1N1 nel 2009, i discendenti dei virus H3N2 del 1968 e H1N1 del 1977 hanno circolato contemporaneamente e subito deriva antigenica. Tuttavia, i processi che determinano la sostituzione di un ceppo influenzale con un altro non sono ancora

del tutto chiari, ma si pensa che riflettano le complesse interazioni tra il virus e il sistema immunitario della popolazione ospite.

Il riassortimento genico è un meccanismo molto efficiente nei virus influenzali A, poiché il loro genoma è segmentato in otto RNA a singolo filamento a polarità negativa, con HA e NA codificati da segmenti genomici diversi. Durante l'infezione simultanea di una cellula con più ceppi virali, i segmenti genomici si riassortiscono casualmente nella progenie. Sebbene non tutte le permutazioni genetiche possibili siano stabili, molte lo sono. Il riassortimento genico avviene facilmente nelle cellule in coltura, negli animali da esperimento e nelle infezioni naturali umane da virus influenzali di tipo A, ma non tra ceppi di tipo A e B, questo perché i virus influenzali di tipo B hanno un genoma segmentato, ma con una struttura ed una composizione diverse rispetto al tipo A, e non sono in grado, di conseguenza, di scambiare segmenti genomici fra di loro. (Flint & Microbiology, 2009)

Anche dopo il riassortimento, sono necessarie mutazioni adattative prima che un virus possa causare una pandemia. Pertanto, un virus riassortante può essere presente nella popolazione per anni prima di adattarsi e diventare pandemico (Dimmock Nigel J. et al., 2017).

3.4 Fitness, ambiente e rapporto con l'ospite

La fitness virale è definita come la capacità relativa di una popolazione di virus di produrre progenie infettiva in un insieme di condizioni ambientali definite (Domingo & Holland, 1997). Il concetto di fitness nei virus a RNA è stato spesso semplificato in eccesso, probabilmente a causa della traduzione diretta di tale concetto dalle teorie dell'evoluzione molecolare, dove la capacità replicativa è l'unica proprietà che definisce il fenotipo. I virus sono molto più complessi di semplici replicatori, il loro successo riproduttivo non dipende solo dalla capacità di replicare il proprio genoma, ci sono molti altri processi che devono essere completati per generare una nuova progenie virale infettiva. Grazie ad una vastissima variabilità genetica è comune trovare parassiti (genomi che utilizzano per la loro replicazione risorse fornite da altri virus) o comportamenti altruistici (genomi che producono proteine utilizzate da altri virus). Si può pensare a una popolazione virale come a una sorta di ecosistema intrecciato composto da

molecole con capacità diverse, in continua interazione e con un'origine comune. Il comportamento emergente di tali insiemi non è facile da prevedere (de la Torre & Holland, 1990). Ad esempio, il genoma con la più alta capacità replicativa non è necessariamente il più rappresentato nella popolazione. Supponiamo che un genoma si replichi velocemente, ma che manchi dei segnali necessari per essere impacchettato correttamente nel capsido. Questo genoma sarà scarsamente rappresentato nella popolazione finale e potrebbe addirittura scomparire a lungo termine. Questo rivela che la fitness è una caratteristica complessa che include non solo la capacità replicativa del genoma, ma anche diversi altri processi che devono essere completati con successo se si vuole produrre una progenie infettiva vitale. L'ottimizzazione della fitness richiede un compromesso tra le diverse caratteristiche coinvolte. Per esempio, un replicatore veloce potrebbe essere avvantaggiato quando compete all'interno della cellula con altri genomi, ma sopprimere la capacità di codificare correttamente i segnali di impacchettamento comporta un chiaro svantaggio per la propagazione. Questo stabilisce dei compromessi tra le diverse caratteristiche e il problema dell'ottimizzazione della fitness nei virus risulta avere una serie di vincoli, fra cui di grande importanza l'ambiente attuale. La fitness virale, quindi, non è un valore assoluto costante: dipende dall'ambiente specifico e le perturbazioni esterne possono modificarne completamente il valore quantitativo sia nel caso di un individuo che di una popolazione (Manrubia & Lázaro, 2006)

I meccanismi molecolari con cui un virus può dare origine a una progenie infettiva all'interno di un particolare tipo di cellula o di ospite costituiscono un sorprendente esempio di adattamento, in cui il virus utilizza il metabolismo cellulare a proprio vantaggio. Ma questo uso delle risorse cellulari implica spesso una lesione della cellula, spesso provoca malattie e talvolta la morte dell'organismo infettato. Ciò ha favorito la coevoluzione di virus e cellule, e queste ultime hanno sviluppato meccanismi di difesa che trovano la loro espressione più raffinata nel sistema immunitario dei vertebrati. In questa corsa agli armamenti con i loro ospiti, i virus hanno adottato diverse strategie che permettono la loro sopravvivenza nel lungo periodo. Alcuni virus, come il morbillo o il vaiolo, si sono specializzati per moltiplicarsi all'interno di un singolo ospite, mentre altri, come l'influenza, possono infettare un ampio repertorio di

organismi. Un'altra importante distinzione separa i virus che si mantengono in un unico ospite da altri che infettano alternativamente specie diverse, stabilendo così cicli complessi in cui uno degli ospiti funge da vettore (di solito un insetto) dove il virus si moltiplica. Il vettore trasmette il virus a un altro ospite che può rappresentare un vicolo cieco per il virus. Esempi di virus con un ciclo che coinvolge due o più ospiti sono gli arbovirus, virus trasmessi da artropodi che di solito prosperano passando continuamente da un ospite insetto a un ospite vertebrato.

Per perpetuarsi nella popolazione ospite, alcuni virus si sono specializzati nella produzione di infezioni acute di breve durata. A volte il virus può causare gravi danni o addirittura la morte dell'ospite, ma la sopravvivenza del virus è garantita se la popolazione di ospiti suscettibili si rinnova con sufficiente frequenza. Le scale temporali coinvolte, e quindi il successo di questa strategia, dipendono dalla durata della risposta immunitaria contro il virus. Un esempio di questa categoria di virus è il virus influenzale, che attraverso un continuo cambiamento delle sue proprietà antigeniche (Antigenetic drift) elude il sistema immunitario dell'ospite (Earn et al., 2002). La strategia opposta è quella dei virus che hanno attenuato la propria virulenza fino a un limite compatibile con la persistenza nell'ospite, senza provocare gravi sintomi di malattia. Molti di questi virus possono rimanere inosservati, venendo scoperti solo quando infettano un nuovo ospite privo di meccanismi di difesa efficaci per sconfiggere il nuovo agente infettivo. Le infezioni acute e le infezioni asintomatiche sono due estremi di un ampio spettro di relazioni tra i virus e i loro ospiti (Baranowski et al., 2001).

In generale, quando un virus attraversa i confini di specie e infetta un nuovo ospite, non è in grado di moltiplicarsi in modo efficiente nel nuovo tipo di cellula. In questo caso l'infezione rappresenta un vicolo cieco e la trasmissione del virus nella nuova specie si arresta. Tuttavia, grazie alla sua enorme capacità di adattamento, il virus acquisisce sporadicamente la capacità di trasmettersi tra organismi, con il risultato di far emergere una nuova malattia. Il trasferimento dei virus è solitamente favorito da perturbazioni ecologiche che aumentano il contatto tra specie portatrici di diversi tipi di virus. A volte, il trasferimento è facilitato anche da cambiamenti nelle proprietà del virus che permettono la penetrazione e la replicazione in un nuovo tipo di cellula (Manrubia & Lázaro, 2006).

Capitolo 4. Adattamento e coevoluzione

4.1 Livello minimo di popolazione

Un aspetto chiave nell'evoluzione dei virus è la "Population size". In virologia, questo termine si riferisce al numero di individui virali che costituiranno una nuova popolazione. Quando questo numero è basso, le mutazioni presenti nei virus vengono trasmesse alla maggior parte della prole, portando ad una presenza maggiore di mutazioni nella sequenza genetica predominante. La riduzione delle dimensioni della popolazione significa che la competizione e la selezione dei fenotipi migliori avvengono tra un numero limitato di genomi. Poiché le mutazioni sono per la maggior parte dei casi deleterie, ridurre le dimensioni della popolazione porta a una diminuzione della capacità di sopravvivenza complessiva della popolazione. Al contrario, quando una popolazione virale ha un grande numero di individui, la competizione coinvolge un maggior numero di genomi, aumentando le probabilità che le mutazioni vantaggiose si diffondano e migliorino la capacità di sopravvivenza complessiva della popolazione. (Manrubia & Lázaro, 2006)

Diverso invece è quando si parla di dimensioni di popolazione dell'ospite, la disponibilità di un ospite suscettibile e la pressione selettiva esercitata dall'ospite per resistere giocano un ruolo fondamentale nell'evoluzione del virus. Studi condotti da F.L. Black (Black, 1966) sui casi di morbillo in diverse isole (Fig.3) hanno dimostrato una correlazione tra la dimensione della popolazione e il numero di casi di morbillo registrati. In particolare, con un aumento della popolazione, i casi di morbillo si sono verificati per periodi più lunghi. Black ha ipotizzato che, per mantenere la presenza del virus nel corso del tempo, fosse necessaria una popolazione di almeno 500.000 individui, al di sotto della quale il virus scompare, generalmente in meno di un anno, fino a quando non viene reintrodotta da una fonte esterna.

Gruppi di isole	Popolazione (migliaia)	Nuove nascite per anno (migliaia)	Percentuale dell'anno in cui si verificavano casi di morbillo
Hawaii	550	16,7	100
Fiji	346	13,4	64
Solomon	110	4,1	32
Tonga	57	2,0	12
Cook	16	0,7	6
Nauru	3,5	0,17	5
Falkland	2,5	0,04	0

Figura 3: correlazione tra i casi di morbillo verificatisi nelle isole e il numero di abitanti (Dimmock Nigel J. et al., 2017).

Considerando la scala temporale geologica, l'uomo è comparso sulla Terra relativamente di recente e ha vissuto in comunità di dimensioni superiori a 500.000 individui sin dai tempi delle antiche civiltà sviluppatesi nei pressi dei fiumi Tigri ed Eufrate, circa 6000 anni fa. In tempi in cui l'uomo viveva in piccoli gruppi, il virus del morbillo non poteva esistere nella sua forma attuale, poiché non sono state trovate evidenze di infezioni persistenti a lungo termine. Si ipotizza quindi che il virus attuale sia emerso negli ultimi millenni, probabilmente a seguito dei cambiamenti nel comportamento sociale umano che hanno portato a popolazioni sufficientemente grandi da mantenere l'infezione.

F.L. Black (Black, 1966) ha anche considerato la similitudine antigenica tra il virus del morbillo e quelli del cimurro e della peste bovina, ipotizzando che questi tre virus potessero avere un antenato comune che infettava cani o bovini preistorici. È possibile che il virus antenato si sia evoluto nella sua forma attuale in risposta ai cambiamenti nelle popolazioni ospiti e alle pressioni evolutive incontrate nel corso del tempo (Dimmock Nigel J. et al., 2017).

4.2 Virus del mixoma

La comparsa di nuove malattie infettive può provocare intense pressioni selettive sulle popolazioni e causare rapidi cambiamenti evolutivi sia nell'ospite che nel parassita. Mentre gli agenti patogeni devono adattarsi a una nuova ecologia e a un nuovo ambiente cellulare, gli ospiti possono evolvere rapidamente la resistenza in una continua corsa agli armamenti. Uno degli esempi più emblematici di questo processo coevolutivo si è verificato quando le popolazioni di coniglio selvatico

europeo (*Oryctolagus cuniculus*) in Australia e in Europa sono state esposte per la prima volta al virus del mixoma (MYXV) del genere Leporipoxvirus, famiglia Poxviridae. Il Mixoma circola naturalmente nei conigli americani dalla coda di cotone (*Sylvilagus spp*), dove causa tumori cutanei benigni, ma nei conigli europei provoca la malattia sistemica altamente letale della mixomatosi (F. Fenner & F.N. Ratcliffe, 1965).

I conigli sono stati inizialmente introdotti in Australia dai coloni europei, causando ingenti danni ecologici ed economici (F. Fenner & B. Fantini, 1999). Nel 1950, nel tentativo di controllare le popolazioni di conigli, è stato rilasciato in Australia il Mixoma virus, che si è poi diffuso rapidamente in tutto il Paese, causando una massiccia riduzione della popolazione (F. Fenner & F.N. Ratcliffe, 1965).

Durante i primi tentativi di diffondere la malattia in Australia, furono rilasciati nel territorio conigli infetti dal virus della mixomatosi. Nonostante la virulenza del virus e la presenza di ospiti suscettibili, esso non riuscì a stabilirsi nelle popolazioni di conigli. Questo insuccesso fu attribuito alla limitata presenza della zanzara vettore, che era presente solo in alcune stagioni dell'anno.

Tuttavia, quando gli animali infetti vennero rilasciati durante la stagione di massima presenza delle zanzare, l'epidemia di mixomatosi si diffuse rapidamente. Nei due anni successivi, il virus si propagò per migliaia di chilometri attraverso l'Australia e raggiunse persino la Tasmania. Durante questo periodo, divenne evidente che solo pochi conigli morivano a causa della malattia rispetto all'inizio dell'epidemia.

Il confronto tra la virulenza del virus originario e quella del virus isolato dai conigli selvatici, valutata mediante l'inoculazione del virus in conigli da laboratorio, rivelò due fatti significativi: in primo luogo, i conigli infettati con gli isolati del nuovo virus sopravvivevano più a lungo; in secondo luogo, un numero maggiore di conigli guariva dall'infezione. Ciò suggeriva che il virus si era evoluto verso una forma meno virulenta (Fig.4) (Kerr, 2012).

Tempi di sopravvivenza medi (giorni)	Mortalità (%)	Anno di isolamento			
		1950-1951	1952-1953	1955-1956	1963-1964
< 13	> 99	100	4	0	0
14-16	95-99	–	13	3	0
17-28	70-95	–	74	55	59
29-50	50-70	–	9	25	31
> 50	< 50	–	0	17	9

Figura 4: Si evidenzia l'evoluzione verso l'avirulenza del virus mixoma del coniglio europeo dopo l'introduzione del virus virulento nel 1950 in Australia (Dimmock Nigel J. et al., 2017).

La spiegazione di tale fenomeno era semplice: alcune mutazioni avevano prodotto varianti virali che non uccidevano rapidamente i conigli, consentendo loro di rimanere infetti per un periodo più lungo e di essere quindi trasmessi a un numero maggiore di individui.

Questa ricerca dimostra come un virus avirulento e ben adattato a un certo ospite possa diventare letale in un nuovo ospite, e come le nuove pressioni evolutive possano creare rapidamente un equilibrio tra il virus e il suo nuovo ospite per garantire la sopravvivenza di entrambi.

Questo fenomeno è stato riscontrato in molti virus dopo il passaggio a nuovi ospiti ed è ancora un ostacolo per il controllo biologico di patogeni che colpiscono sia gli animali che le piante. (Alves et al., 2019; Dimmock Nigel J. et al., 2017).

4.3 Esempi di coevoluzione tra virus e ospiti

Quando un virus acquisisce le proprietà necessarie per infettare efficacemente e diffondersi tra gli individui di una nuova specie ospite, il suo percorso evolutivo non si arresta. Come visto dall'esempio del virus del mixoma, l'introduzione in una specie ospite non familiare può inizialmente provocare una malattia grave, che tende poi a diventare meno letale a seguito di mutazioni virali e possibili adattamenti dell'ospite. Mentre i cambiamenti in alcuni virus, come quello del mixoma, possono essere osservati in tempi relativamente brevi, l'assenza di reperti fossili rende difficile tracciare l'evoluzione virale su scale temporali estese.

Tuttavia, l'analisi dei genomi degli Herpesviridae offre una nuova prospettiva per studiare tali processi evolutivi. Una peculiarità degli herpesvirus che colpiscono

mammiferi e uccelli è la loro capacità di stabilire un'infezione latente che persiste per l'intera vita dell'ospite. Durante la latenza, il virus si mantiene in uno stato dormiente, ma può occasionalmente riattivarsi, generando nuovi virus capaci di infettare altri ospiti sensibili (Dimmock Nigel J. et al., 2017).

Gli herpesvirus (HV) sono virus icosaedrici di grandi dimensioni (150-200 nm), dotati di un cosiddetto strato di tegumento tra il capsido e l'involucro. Gli HV possiedono un genoma a DNA lineare, non segmentato, a doppio filamento (135-295 kbp) (King, 2012b).

Questi virus hanno dimostrato una notevole capacità di adattamento attraverso milioni di anni, evidenziando un'evoluzione sincrona con le linee evolutive dei loro ospiti.

La famiglia Herpesviridae è stata suddivisa in tre sottofamiglie, riflettendo la diversità degli ospiti che questi virus infettano: gli Herpesviridae, che comprendono i virus degli amnioti (vertebrati più evoluti come mammiferi e uccelli); gli Alloherpesviridae, che includono i virus di anfibi e pesci; e i Malacoherpesviridae, associati ai molluschi (Davison et al., 2009). Questa classificazione sottolinea l'adattabilità dei virus herpes a un ampio spettro di ospiti, evidenziando la coevoluzione virus-ospite come un processo dinamico e complesso.

La relazione evolutiva tra gli Herpesviridae e i loro ospiti suggerisce che i maggiori sottogruppi all'interno delle sottofamiglie degli herpesvirus si sono probabilmente differenziati prima della radiazione dei mammiferi, circa 60-80 milioni di anni fa, con il punto di diversificazione delle tre sottofamiglie risalente a circa 200 milioni di anni fa (McGeoch et al., 1995, 2000). Questo modello di coevoluzione si riflette nel fatto che i virus e i loro ospiti mostrano schemi filogenetici di ramificazione simili, suggerendo una lunga storia di coevoluzione. Studi su virus specifici come il Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) evidenziano la complessità delle interazioni virus-ospite, con il virus che è coevoluto con il bufalo africano per circa 1,5 milioni di anni prima di essere trasmesso al bestiame (Dewals et al., 2006). Questo esempio illustra come gli eventi di trasmissione tra specie possano giocare un ruolo chiave nell'evoluzione virale e nella diversificazione degli ospiti.

Inoltre, la scoperta di genomi virali integrati nei cromosomi degli ospiti offre nuove prospettive sulla coevoluzione virus-ospite, fornendo dati interessanti sull'organizzazione e sul contenuto del genoma di specie virali antiche. Ad esempio, il genoma di *Branchiostoma floridae* (lanceolato della Florida) contiene geni omologhi ai geni degli herpesvirus, suggerendo l'esistenza di un virus herpes associato a questo cordato invertebrato, e gettando luce sull'antico legame tra virus e ospiti prima della separazione tra vertebrati e invertebrati (Savin et al., 2010). La coevoluzione tra herpesvirus e i loro ospiti negli anni illustra un fenomeno che si ritiene comune a tutti i virus con l'introduzione in nuove specie ospiti. La coevoluzione virus-ospite evidenzia un intenso legame di reciprocità, dove entrambi si adattano continuamente in un ciclo di attacchi e difese, portando alla nascita dei virus attuali. In questo processo, l'evoluzione gioca un ruolo chiave nel determinare il successo dell'organismo più adattabile, assicurandone la sopravvivenza nel lungo termine (Kaján et al., 2020).

Capitolo 5. SARS-CoV-2

5.1 Struttura, infezione ed evoluzione

I coronavirus sono enveloped virus a RNA con filamento positivo. Si trovano in molte specie animali e possono o meno causare sintomi di malattia nei loro ospiti (Singh & Yi, 2021). Sulla base della caratterizzazione genetica e sierologica, i coronavirus sono suddivisi in quattro generi distinti: *Alphacoronavirus* (*alfa-CoV*), *Betacoronavirus* (*beta-CoV*), *Gammacoronavirus* (*gamma-CoV*) e *Deltacoronavirus* (*delta-CoV*) (Kaján et al., 2020; Wertheim et al., 2013; Woo et al., 2012). Si ritiene che questi gruppi di coronavirus si siano differenziati tra loro tra il 3000 ed il 2400 a.c. e tendono a infettare gruppi diversi di animali (Fig. 5a). Gli Alphacoronavirus e i Betacoronavirus si trovano soprattutto nei mammiferi, mentre i Gammacoronavirus e i Deltacoronavirus si trovano principalmente negli uccelli, sebbene i Gammacoronavirus infettino anche alcuni cetacei, tra cui le balene beluga e i tursiopi (Forni et al., 2017; Ge et al., 2013; Jonassen et al., 2005).

I coronavirus che hanno causato i recenti focolai epidemici e pandemici di malattie, tra cui SARS, MERS e COVID-19, nelle popolazioni umane appartengono a un sottogruppo di *Betacoronavirus* noto come sarbecovirus (Lefkowitz et al., 2018b). I membri di questo gruppo di coronavirus sono abbondanti nei pipistrelli e in altri mammiferi (Fig. 5a). Tra gli altri quattro ceppi di coronavirus identificati in precedenza e associati a sintomi lievi del raffreddore comune nell'uomo, HCoV-229E e HCoV-NL63 appartengono ad *Alphacoronavirus*, mentre HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 sono classificati come un diverso sottogruppo di *Betacoronavirus* chiamato embecovirus (Fig. 5a).

Anche i coronavirus subiscono frequenti ricombinazioni (Lai & Cavanagh, 1997). Se animali che ospitano diversi coronavirus entrano in stretto contatto e si scambiano i virus, può verificarsi una ricombinazione tra i diversi ceppi, con conseguente diversificazione. Purtroppo, sembra che tali eventi durante la storia evolutiva del SARS-CoV-2 abbiano portato all'evoluzione di un ceppo potente in grado di infettare facilmente le cellule umane.

Come altri coronavirus, il SARS-CoV-2 ha un genoma di circa 30 kb (Kim et al., 2020; Zhou et al., 2020a), che codifica quattro proteine strutturali, tra cui la proteina spike (S), la proteina dell'involucro (E), la proteina della membrana (M) e la proteina del nucleocapside (N) (Fig. 5b). Inoltre, nel genoma del SARS-CoV-2 sono codificati anche diversi "open reading frame" (ORF) non strutturali (Kim et al., 2020). In campioni umani infatti, uno studio ha rilevato che >60% di tutti i trascrittomi erano di origine virale (Kim et al., 2020), dimostrando la schiacciante e fondamentale alterazione della biologia cellulare in seguito all'infezione di cellule umane. In particolare, questi trascrittomi includevano trascritti parziali e trascritti di fusione non canonici (Kim et al., 2020), come osservato in studi precedenti su altri coronavirus (Stewart et al., 2018; Viehweger et al., 2019). Sebbene il significato funzionale di questi trascritti rimanga sconosciuto, la loro presenza fornisce un'ulteriore prova che questo virus è soggetto a frequenti eventi di ricombinazione all'interno degli ospiti.

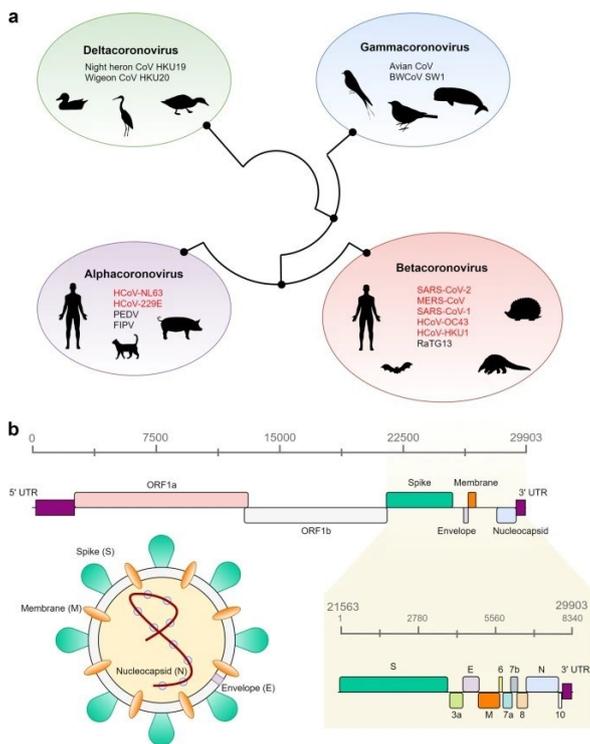


Figura 5: a Rappresentazione schematica dei quattro generi di coronavirus, della loro relazione evolutiva e dei loro ospiti animali (Woo et al., 2012). *b* Distribuzione genomica di tutti gli open reading frames (ORFs) nel genoma del SARS-CoV-2 di 29.903 pb. Le proteine del nucleocapside (N), dello spike (S), della membrana (M) e dell'involucro (E) sono codificate a colori in base all'immagine del virus. Tutte le

altre ORF corrispondono a proteine non strutturali. Il pannello giallo mostra una vista migliorata di una regione di 8.340 bp che comprende 9 ORF e la regione non tradotta di tre apici (3'-UTR).

La proteina S, con un peso molecolare di circa 600 kDa, rappresenta una delle più imponenti proteine di fusione di classe I conosciute, essendo notevolmente glicosilata con 66 glicani. Ogni protomero S è composto dalle subunità S1 e S2 e da un singolo ancoraggio transmembrana (TM). La proteina S si lega al recettore cellulare ACE2 attraverso il dominio di legame del recettore (RBD). L'attivazione di S richiede la scissione di S1/S2, mediata dalla serin-proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2), una proteasi della cellula ospite, e comporta un cambiamento conformazionale.

Dopo l'attivazione, la proteina S subisce riarrangiamenti strutturali, inclusa la rimozione della subunità S1 e l'inserimento del peptide di fusione (FP) nella membrana della cellula bersaglio, assumendo una forma ad ago, con tre eliche intrecciate tra loro coassialmente.

Per infettare la cellula ospite, il virus SARS-CoV-2 interagisce con il suo recettore, l'ACE2, una proteina altamente conservata apparsa circa 550 milioni di

anni fa. La maggior parte dei virus umani in grado di infettare un'ampia gamma di ospiti utilizzano recettori cellulari altamente conservati, con una sequenza di amminoacidi simile al 90% (Lumbers et al., 2022). ACE2 è una carbossipeptidasi di superficie localizzata sulla membrana delle cellule ed è abbondantemente espresso in vari tessuti, come il cuore, i vasi sanguigni, i polmoni, i reni e l'intestino, svolgendo un ruolo cruciale in diverse vie cardiovascolari e nella risposta infiammatoria-immunitaria (Theodorakopoulou et al., 2022).

ACE2 è un componente chiave del sistema renina-angiotensina (RAS), coinvolto nella regolazione di numerosi processi fisiologici, incluso il controllo della pressione sanguigna e dell'equilibrio idro-elettrolitico (Theodorakopoulou et al., 2022). I principali componenti del RAS includono l'angiotensina II (Ang II), che ha un'azione vasocostrittrice, e l'angiotensina 1-7 (Ang 1-7), che ha un'azione vasodilatatoria. Entrambe derivano dall'angiotensinogeno, convertito in Ang I dalla renina e successivamente trasformato in Ang II dall'enzima ACE, mentre Ang II viene convertita in Ang 1-7 dall'enzima ACE2. Ang II, attraverso il recettore dell'angiotensina II di tipo 1 (AT1-R), esercita effetti vasocostrittori e proinfiammatori, contribuendo al rimodellamento cardiorenale. D'altra parte, la cascata Ang 1-7/ACE2 ha un'azione vasodilatatoria e anti-infiammatoria, esercitando un'azione controregolatoria rispetto all'asse Ang II/ACE. Il bilancio tra questi due assi determina la risposta dell'organismo agli stimoli esterni (Fig.6) (Theodorakopoulou et al., 2022).

Durante l'infezione da COVID-19, il virus SARS-CoV-2 interagisce con ACE2, portando a una risposta infiammatoria disregolata. La distruzione di ACE2 provoca un'accumulo incontrollato di Ang II, contribuendo alla gravità della risposta infiammatoria. La gravità della risposta infiammatoria è correlata alla produzione di Ang II, che può essere aumentata in condizioni come obesità, ipertensione e diabete mellito, dove la densità di ACE2 è aumentata (Lumbers et al., 2022).

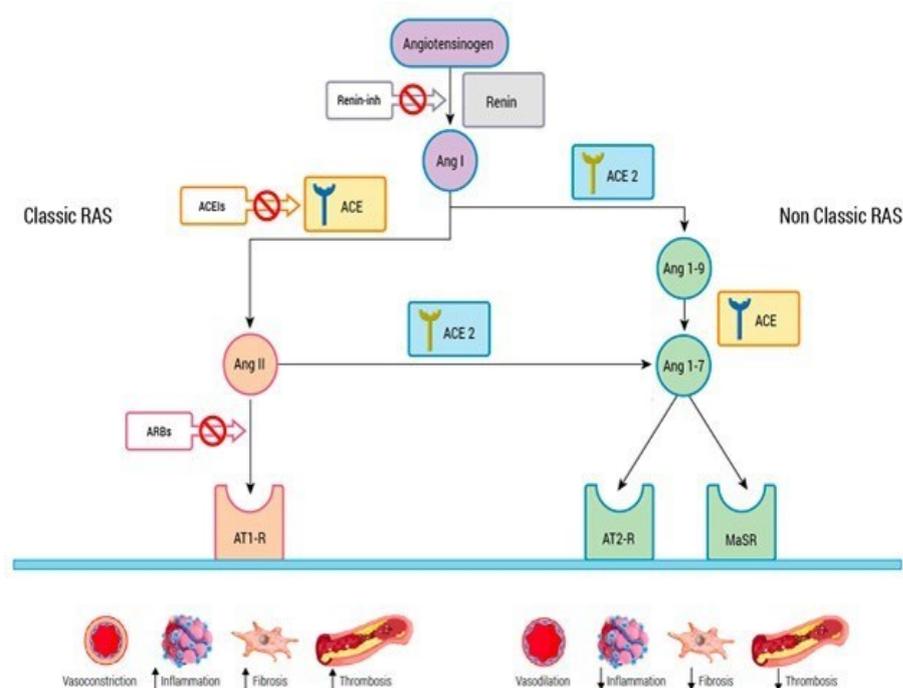


Fig.6 - Il ruolo di ACE e ACE2 nei percorsi RAS-classico e RAS-non classico (Theodorakopoulou et al., 2022)

Per quanto riguarda l'evoluzione e le origini di questo virus si fa riferimento ai pipistrelli i quali sono serbatoi primari di molti virus potenzialmente zoonotici. Come era già successo con SARS e MERS, anche il nuovo coronavirus SARSCoV-2 ha avuto molto probabilmente origine da essi (condivide infatti il 96% del genoma con un coronavirus, RaTG13, riscontrato in *Rhinolophus affinis*) (Zhou et al., 2020b). I pipistrelli presentano meccanismi che limitano le risposte infiammatorie e immunitarie, permettendo loro di far fronte allo stress metabolico e al rischio di infiammazioni causati dal volo. Tali adattamenti li hanno portati a sviluppare una straordinaria tolleranza ai virus (Kacprzyk et al., 2017; G. Zhang et al., 2013). La notevole tendenza sociale dei pipistrelli, che li porta a formare raggruppamenti numerosi di individui anche appartenenti a diverse specie, potrebbe poi aver favorito la diffusione e la diversità dei virus di cui sono ospiti (Luis et al., 2013).

Come visto in precedenza la proteina Spike dei coronavirus, agganciando un recettore di membrana (ACE2, nel caso di SARS-CoV-2) delle cellule umane ospiti, permette l'infezione. La Spike del virus RaTG13 del pipistrello è però molto diversa da quella del SARS-CoV-2 e apparentemente non in grado di

agganciare ACE2 (Andersen et al., 2020). Nei pangolini, tuttavia, sono stati trovati dei virus con proteine Spike che presentano forte similarità nella regione del dominio RBD con quella di SARS-CoV-2 (Andersen et al., 2020; Li et al., 2020; Y.-Z. Zhang & Holmes, 2020).

Una delle ipotesi più accreditate è che in seguito a ricombinazione tra un virus di pipistrello e un virus di pangolino si sia originato il diretto progenitore di SARSCoV-2 in uno o più ospiti intermedi (non ancora noto/i) (Andersen et al., 2020; Y.-Z.

Zhang & Holmes, 2020). Non si può però escludere che le mutazioni della proteina Spike di SARS-CoV-2 siano frutto di una convergenza evolutiva. Da questo ospite intermedio, il virus sarebbe poi arrivato all'uomo tramite un unico passaggio, avvenuto al più tardi ad inizio Dicembre 2019. La forte affinità della proteina Spike per il recettore umano ACE2 e probabilmente, in seguito, l'effetto della selezione naturale hanno portato alla elevata infettività di SARSCoV-2 e alla sua rapida diffusione tra la popolazione umana (Andersen et al., 2020; Li et al., 2020).

Conclusioni

Nella presente tesi compilativa sono andato ad analizzare la complessità dell'evoluzione e adattamento virale. Attraverso una prima analisi riguardante le strutture ed i processi di replicazione virale, emerge come i meccanismi di mutazione, quali, mutazioni, ricombinazione e riassortimento siano i principali vettori di diversità genetica all'interno delle popolazioni virali.

Gli studi finora svolti su questi argomenti, sono risultati fondamentali durante la pandemia da Covid-19, che ha messo in evidenza le vulnerabilità e le capacità della comunità scientifica di rispondere rapidamente a nuove sfide.

Facendo un'analisi del Mixoma virus e dell'Herpesvirus, si evidenzia come l'adattamento e la coevoluzione con l'ospite, siano processi chiave per comprendere le dinamiche all'interno delle infezioni virali. Questi studi, non solo migliorano la nostra conoscenza teorica, ma hanno moltissime implicazioni pratiche nella prevenzione ed il controllo di future pandemie.

E' evidente come questi studi siano in continua evoluzione. Questa tesi vuole sottolineare l'importanza di uno studio complesso ed approfondito sull'adattamento e l'evoluzione virale, non solo per comprendere i virus stessi, ma anche per prepararsi al meglio alle possibili sfide future che potrebbero emergere.

Penso che la collaborazione internazionale e l'investimento nella ricerca scientifica siano fondamentali per fornire degli studi utili ed accurati, che ci permettano di approfondire al meglio questa scienza in continua evoluzione.

BIBLIOGRAFIA

Adams, M. J., Hendrickson, R. C., Dempsey, D. M., & Lefkowitz, E. J. (2015). Tracking the changes in virus taxonomy. *Archives of Virology*, *160*(5), 1375–1383.
<https://doi.org/10.1007/s00705-015-2376-4>

- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Mushegian, A. R., Nibert, M. L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Orton, R. J., Smith, D. B., ... Davison, A. J. (2017). 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. *Archives of Virology*, 162(5), 1441–1446. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3215-y>
- Aldosari, B. N., Alfagih, I. M., & Almurshedi, A. S. (2021). Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*, 13(2), 206. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020206>
- Almendral, J. M. (2013). Assembly of Simple Icosahedral Viruses. In M. G. Mateu (Ed.), *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook* (pp. 307–328). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_10
- Alves, J. M., Carneiro, M., Cheng, J. Y., Lemos de Matos, A., Rahman, M. M., Loog, L., Campos, P. F., Wales, N., Eriksson, A., Manica, A., Strive, T., Graham, S. C., Afonso, S., Bell, D. J., Belmont, L., Day, J. P., Fuller, S. J., Marchandeu, S., Palmer, W. J., ... Jiggins, F. M. (2019). Parallel adaptation of rabbit populations to myxoma virus. *Science*, 363(6433), 1319–1326. <https://doi.org/10.1126/science.aau7285>
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Anderson, B. R., Muramatsu, H., Nallagatla, S. R., Bevilacqua, P. C., Sansing, L. H., Weissman, D., & Karikó, K. (2010). Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5884–5892. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq347>
- Arms Karen, C. P. S. (1998). *Biologia* (piccin, Ed.; 1.ed. italiana).
- Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S. A., Rouphael, N., Creech, C. B., McGettigan, J., Khetan, S., Segall, N., Solis, J., Brosz, A., Fierro, C., Schwartz, H., Neuzil, K., Corey, L., ... Zaks, T. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 384(5), 403–416. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3), 235–241. <https://doi.org/10.1128/br.35.3.235-241.1971>
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., & Domingo, E. (2001). Evolution of cell recognition by viruses. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), 1102–1105. <https://doi.org/10.1126/science.1058613>
- Berti, A. (2014). Berti, A.E. & Toneatti, L. (2014). L'evoluzione delle specie nei libri di testo per la terza elementare Mundus, 4-7. 28-41 (Species' evolution in textbooks for third grade). *Mundus*, 4–7, 28–41.
- Black, F. L. (1966). Measles endemicity in insular populations: Critical community size and its evolutionary implication. *Journal of Theoretical Biology*, 11(2), 207–211. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90161-5](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90161-5)

- Buschmann, M. D., Carrasco, M. J., Alishetty, S., Paige, M., Alameh, M. G., & Weissman, D. (2021). Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines*, *9*(1), 65. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>
- Cady, K. C., Bondy-Denomy, J., Heussler, G. E., Davidson, A. R., & O'Toole, G. A. (2012). The CRISPR/Cas Adaptive Immune System of *Pseudomonas aeruginosa* Mediates Resistance to Naturally Occurring and Engineered Phages. *Journal of Bacteriology*, *194*(21), 5728–5738. <https://doi.org/10.1128/JB.01184-12>
- Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Rawson, S., Rits-Volloch, S., & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, *369*(6511), 1586–1592. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>
- Cann, A. J. (2006). *Elementi di virologia molecolare*.
- Castón, J. R., & Carrascosa, J. L. (2013). The Basic Architecture of Viruses. In M. G. Mateu (Ed.), *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook* (pp. 53–75). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_2
- Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). Author Correction: mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(11), 880–880. <https://doi.org/10.1038/s41573-02100321-2>
- Combelas, N., Holmblat, B., Joffret, M.-L., Colbère-Garapin, F., & Delpeyroux, F. (2011). Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses*, *3*(8), 1460–1484. <https://doi.org/10.3390/v3081460>
- Cosset, F.-L., & Lavillette, D. (2011). 4 - Cell Entry of Enveloped Viruses. In T. Friedmann, J. C. Dunlap, & S. F. Goodwin (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 73, pp. 121–183). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123808608000045>
- Cullis, P. R., & Hope, M. J. (2017). Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Molecular Therapy*, *25*(7), 1467–1475. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.013>
- Darwin, C. R. (2016). *L'origine della specie per selezione naturale, o, La preservazione delle razze privilegiate nella lotta per la vita* (Ed. integrale, 2. ed). Newton Compton.
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J., & Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, *154*(1), 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
- de la Torre, J. C., & Holland, J. J. (1990). RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *Journal of Virology*, *64*(12), 6278–6281. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.12.6278-6281.1990>
- Dewals, B., Thirion, M., Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., de Fays, K., Minner, F., Daix, V., Sharp, P. M., & Vanderplasschen, A. (2006). Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. *Journal of General Virology*, *87*(6), 1509–1519. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81757-0>

- Dimmock Nigel J., Easton Andrew J., & Leppard Keith N. (2017). *Introduzione alla virologia moderna* (CEA, Ed.; 1. ed. italiana).
- Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Martín-Hernández, A. M., Sáiz, J. C., & Escarmís, C. (1998). Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases*, *4*(4), 521–527. <https://doi.org/10.3201/eid0404.980402>
- Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*, *51*, 151–178. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151>
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, *148*(4), 1667–1686. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1667>
- Drake, J. W., & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(24), 13910–13913. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13910>
- Earl, D. J., & Deem, M. W. (2004). Evolvability is a selectable trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(32), 11531–11536. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404656101>
- Earn, D. J. D., Dushoff, J., & Levin, S. A. (2002). Ecology and evolution of the flu. *Trends in Ecology & Evolution*, *17*(7), 334–340. [https://doi.org/10.1016/S01695347\(02\)02502-8](https://doi.org/10.1016/S01695347(02)02502-8)
- European medicines agency. (2024a, March 11). *Comirnaty*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/epar/comirnaty>.
- European medicines agency. (2024b, April 26). *Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna)*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/epar/spikevaxpreviously-covid-19-vaccine-moderna>.
- F. Fenner, & B. Fantini. (1999). *Biological control of vertebrate pests; The history of mixomatosis; an experiment in evolution* (CABI publ, Ed.).
- F. Fenner, & F.N. Ratcliffe. (1965). *Myxomatosis* (Cambridge Univ. Press., Ed.).
- Fang, E., Liu, X., Li, M., Zhang, Z., Song, L., Zhu, B., Wu, X., Liu, J., Zhao, D., & Li, Y. (2022). Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00950-y>
- Ferraguti, M., Castellacci, C., & Allegrucci, G. (2011). *Evoluzione: modelli e processi*. Pearson.
- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology* (5th ed). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Flint, S. J., & Microbiology, A. S. for. (2009). *Principles of virology* (3rd ed). ASM Press.
- Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in Microbiology*, *25*(1), 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>

- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., & Charnay, P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*, *281*(5733), 646–650. <https://doi.org/10.1038/281646a0>
- Garcia-Doval, C., & van Raaij, M. J. (2013). Bacteriophage Receptor Recognition and Nucleic Acid Transfer. In M. G. Mateu (Ed.), *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook* (pp. 489–518). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_17
- Ge, X.-Y., Li, J.-L., Yang, X.-L., Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., Mazet, J. K., Hu, B., Zhang, W., Peng, C., Zhang, Y.-J., Luo, C.-M., Tan, B., Wang, N., Zhu, Y., Crameri, G., Zhang, S.-Y., Wang, L.-F., Daszak, P., & Shi, Z.-L. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, *503*(7477), 535–538. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
- González-Candelas, F., López-Labrador, F. X., & Bracho, M. A. (2011). Recombination in hepatitis C virus. *Viruses*, *3*(10), 2006–2024. <https://doi.org/10.3390/v3102006>
- Gould, S. J. (2007). *Ever since Darwin: reflections in natural history* (Reissued). Norton.
- Granot, Y., & Peer, D. (2017). Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics—An innate immune system standpoint. *Seminars in Immunology*, *34*, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.015>
- He, C.-Q., Ding, N.-Z., He, M., Li, S.-N., Wang, X.-M., He, H.-B., Liu, X.-F., & Guo, H.-S. (2010). Intragenic recombination as a mechanism of genetic diversity in bluetongue virus. *Journal of Virology*, *84*(21), 11487–11495. <https://doi.org/10.1128/JVI.00889-10>
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., & VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science (New York, N.Y.)*, *215*(4540), 1577–1585. <https://doi.org/10.1126/science.7041255>
- Houseley, J., & Tollervey, D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, *136*(4), 763–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019>
- Jonassen, C. M., Kofstad, T., Larsen, I.-L., Løvland, A., Handeland, K., Follestad, A., & Lillehaug, A. (2005). Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of General Virology*, *86*(6), 1597–1607. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80927-0>
- Kacprzyk, J., Hughes, G. M., Palsson-McDermott, E. M., Quinn, S. R., Puechmaille, S. J., O'Neill, L. A. J., & Teeling, E. C. (2017). A Potent Anti-Inflammatory Response in Bat Macrophages May Be Linked to Extended Longevity and Viral Tolerance. *Acta Chiropterologica*, *19*(2), 219–228. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2017.19.2.001>
- Kaján, G. L., Doszpoly, A., Tarján, Z. L., Vidovszky, M. Z., & Papp, T. (2020). Virus–Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *Journal of Molecular Evolution*, *88*(1), 41–56. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09913-4>

- Karam, M., & Daoud, G. (2022). mRNA vaccines: Past, present, future. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 491–522. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.05.003>
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., & Weissman, D. (2004). mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12542–12550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310175200>
- Kay, A., & Zoulim, F. (2007). Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research*, 127(2), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.021>
- Kerr, P. J. (2012). Myxomatosis in Australia and Europe: A model for emerging infectious diseases. *Antiviral Research*, 93(3), 387–415. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.01.009>
- Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914–921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- King, A. M. Q. (2012a). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press.
- King, A. M. Q. (2012b). *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses* (Academic press, Ed.).
- Koonin, E. V., Krupovic, M., & Agol, V. I. (2021). The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(3), 5321. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00053-21>
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Krupovic, M. (2020). Evolutionary entanglement of mobile genetic elements and host defence systems: guns for hire. *Nature Reviews. Genetics*, 21(2), 119–131. <https://doi.org/10.1038/s41576-0190172-9>
- Lai, M. M. C., & Cavanagh, D. (1997). *The Molecular Biology of Coronaviruses* (pp. 1–100). [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9)
- Ledford, H. (2021). How ‘killer’ T cells could boost COVID immunity in face of new variants. *Nature*, 590(7846), 374–375. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-003677>
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018a). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708–D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018b). Virus taxonomy: the database of the International Committee on

- Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708–D717.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Li, X., Zai, J., Zhao, Q., Nie, Q., Li, Y., Foley, B. T., & Chaillon, A. (2020). Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARSCoV-2. *Journal of Medical Virology*, 92(6), 602–611. <https://doi.org/10.1002/jmv.25731>
- Liang, Y., Huang, L., & Liu, T. (2021). Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.718753>
- Luis, A. D., Hayman, D. T. S., O’Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C., Mills, J. N., Timonin, M. E., Willis, C. K. R., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Rupprecht, C. E., Wood, J. L. N., & Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756), 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
- Lumbers, E. R., Head, R., Smith, G. R., Delforce, S. J., Jarrott, B., H. Martin, J., & Pringle, K. G. (2022). The interacting physiology of COVID-19 and the renin-angiotensinaldosterone system: Key agents for treatment. *Pharmacology Research & Perspectives*, 10(1). <https://doi.org/10.1002/prp2.917>
- Lupia Palmieri, E. (2014). *Terra con chimica: il nostro pianeta, la geodinamica esogena* (Ed. azzurra). Zanichelli.
- Mandary, M. B., Masomian, M., & Poh, C. L. (2019). Impact of RNA Virus Evolution on Quasispecies Formation and Virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4657. <https://doi.org/10.3390/ijms20184657>
- Manrubia, S. C., & Lázaro, E. (2006). Viral evolution. *Physics of Life Reviews*, 3(2), 65–92. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2005.11.002>
- MARSHALL, I. D., & FENNER, F. (1958). Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. V. Changes in the innate resistance of Australian wild rabbits exposed to myxomatosis. *The Journal of Hygiene*, 56(2), 288–302. <https://doi.org/10.1017/s0022172400037773>
- Mateu, M. G. (2013). Introduction: The Structural Basis of Virus Function. In M. G. Mateu (Ed.), *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook* (pp. 3–51). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_1
- McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E., & Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of Molecular Biology*, 247(3), 443–458. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0152>
- McGeoch, D. J., Dolan, A., & Ralph, A. C. (2000). Toward a Comprehensive Phylogeny for Mammalian and Avian Herpesviruses. *Journal of Virology*, 74(22), 10401–10406. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10401-10406.2000>
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2013). Viruses: Definition, Structure, Classification. In *Molecular Virology* (pp. 17–30). Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-20718-1_2

- Moyer, C. L., & Nemerow, G. R. (2011). Viral weapons of membrane destruction: variable modes of membrane penetration by non-enveloped viruses. *Virus Entry/Environmental Virology*, *1*(1), 44–49.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.002>
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(4), 261–279.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Pellett, P. E., Mitra, S., & Holland, T. C. (2014a). Basics of virology. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 123, pp. 45–66). Elsevier.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044453488000002X>
- Pellett, P. E., Mitra, S., & Holland, T. C. (2014b). Chapter 2 - Basics of virology. In A. C. Tselis & J. Booss (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 123, pp. 45–66). Elsevier.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044453488000002X>
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J. C., Palero, F., & González-Candelas, F. (2015). Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *30*, 296–307.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.022>
- Plempner, R. K. (2011). Cell entry of enveloped viruses. *Virus Structure and Function*, *1*(2), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.002>
- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., Hammitt, L. L., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, *383*(27), 2603–2615.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
- Rosa, S. S., Prazeres, D. M. F., Azevedo, A. M., & Marques, M. P. C. (2021). mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine*, *39*(16), 2190–2200.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.038>
- Ross, J., & Sanders, M. F. (1984). The development of genetic resistance to myxomatosis in wild rabbits in Britain. *The Journal of Hygiene*, *92*(3), 255–261.
<https://doi.org/10.1017/s0022172400064494>
- San Martín, C. (2013). Structure and Assembly of Complex Viruses. In M. G. Mateu (Ed.), *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook* (pp. 329–360). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_11
- Savin, K. W., Cocks, B. G., Wong, F., Sawbridge, T., Cogan, N., Savage, D., & Warner, S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virology Journal*, *7*(1), 308. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-308>
- Schleifer, K.-H. (2008). The International Union of Microbiological Societies, IUMS. *Research in Microbiology*, *159*(1), 45–48.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.11.003>

- Singh, D., & Yi, S. V. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(4), 537–547. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>
- Stanley, W. M. (1938). Virus proteins - A new group of macromolecules. *Journal of Physical Chemistry*, 42(1), 55–70. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-1542707388&partnerID=40&md5=03db2c9fb831d9beed20cbda4b6ee43f>
- Stewart, H., Brown, K., Dinan, A. M., Irigoyen, N., Snijder, E. J., & Firth, A. E. (2018). Transcriptional and Translational Landscape of Equine Torovirus. *Journal of Virology*, 92(17). <https://doi.org/10.1128/JVI.00589-18>
- Suomalainen, M., & Greber, U. F. (2013). Uncoating of non-enveloped viruses. *Virus Entry / Environmental Virology*, 3(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.12.004>
- Tanaka, M. M., Bergstrom, C. T., & Levin, B. R. (2003). The evolution of mutator genes in bacterial populations: the roles of environmental change and timing. *Genetics*, 164(3), 843–854. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.3.843>
- Tarke, A., Sidney, J., Kidd, C. K., Dan, J. M., Ramirez, S. I., Yu, E. D., Mateus, J., da Silva Antunes, R., Moore, E., Rubiro, P., Methot, N., Phillips, E., Mallal, S., Frazier, A., Rawlings, S. A., Greenbaum, J. A., Peters, B., Smith, D. M., Crotty, S., ... Sette, A. (2021). Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Reports Medicine*, 2(2), 100204. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100204>
- Theodorakopoulou, M. P., Alexandrou, M.-E., Boutou, A. K., Ferro, C. J., Ortiz, A., & Sarafidis, P. (2022). Renin-angiotensin system blockers during the COVID-19 pandemic: an update for patients with hypertension and chronic kidney disease. *Clinical Kidney Journal*, 15(3), 397–406. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfab272>
- Vaitekenas, A., Tai, A. S., Ramsay, J. P., Stick, S. M., & Kicic, A. (2021). Pseudomonas aeruginosa Resistance to Bacteriophages and Its Prevention by Strategic Therapeutic Cocktail Formulation. *Antibiotics*, 10(2), 145. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020145>
- Viehweger, A., Krautwurst, S., Lamkiewicz, K., Madhugiri, R., Ziebuhr, J., Hölzer, M., & Marz, M. (2019). Direct RNA nanopore sequencing of full-length coronavirus genomes provides novel insights into structural variants and enables modification analysis. *Genome Research*, 29(9), 1545–1554. <https://doi.org/10.1101/gr.247064.118>
- Wadhwa, A., Aljabbari, A., Lokras, A., Foged, C., & Thakur, A. (2020). Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*, 12(2), 102. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020102>
- Weng, Y., Li, C., Yang, T., Hu, B., Zhang, M., Guo, S., Xiao, H., Liang, X.-J., & Huang, Y. (2020). The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnology Advances*, 40, 107534. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107534>
- Wertheim, J. O., Chu, D. K. W., Peiris, J. S. M., Kosakovsky Pond, S. L., & Poon, L. L. M. (2013). A Case for the Ancient Origin of Coronaviruses. *Journal of Virology*, 87(12), 7039–7045. <https://doi.org/10.1128/JVI.03273-12>

- Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(2), 129–138. <https://doi.org/10.1038/nrd2742>
- Wildy, P. (1971). *Classification and Nomenclature of Viruses: 1st Report of the International Committee on Nomenclature of Viruses*. S. Karger.
- Wilson, M. G., & Pandey, S. (2024). *Pseudomonas aeruginosa*.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Yadav, T., Srivastava, N., Mishra, G., Dhama, K., Kumar, S., Puri, B., & Saxena, S. K. (2020). Recombinant vaccines for COVID-19. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(12), 2905–2912. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1820808>
- Zhang, G., Cowled, C., Shi, Z., Huang, Z., Bishop-Lilly, K. A., Fang, X., Wynne, J. W., Xiong, Z., Baker, M. L., Zhao, W., Tachedjian, M., Zhu, Y., Zhou, P., Jiang, X., Ng, J., Yang, L., Wu, L., Xiao, J., Feng, Y., ... Wang, J. (2013). Comparative Analysis of Bat Genomes Provides Insight into the Evolution of Flight and Immunity. *Science*, 339(6118), 456–460. <https://doi.org/10.1126/science.1230835>
- Zhang, Y.-Z., & Holmes, E. C. (2020). A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, 181(2), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020a). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020b). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>