

1

➤ A virus is a microscopic parasite that **infect cells** in biological organisms.

➤ The viruses were discovered by the Russian biologist Dmitri Ivanovsky in **1892**. The original word comes from the latin *virus* referring to **poison**.

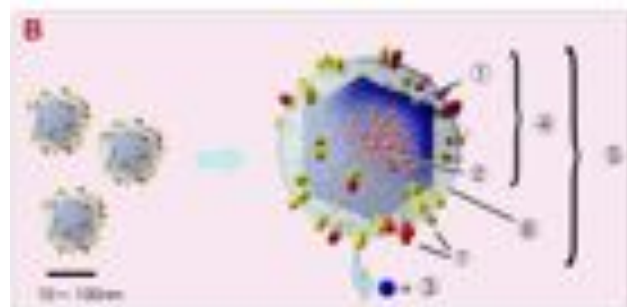
➤ Viruses are **obligate intracellular parasites**; they can reproduce only by invading and controlling other cells as they lack the cellular machinery for self reproduction.

➤ Virus particles carry a small amount of **nucleic acid genome** that may be either **DNA** or **RNA**, single- or double-stranded, and positive or negative sense.

➤ This is surrounded by some form of **protective coat** of proteins called a **capsid** (**spherical or helical**). Some viruses posse also a **membrane** that embrace the capsid.

➤ The complete virus particle is referred to as a **virion**. A virion is little more than a **gene transporter**, and components of the envelope and capsid provide the mechanism for injecting the viral genome into a host cell.

A) virus without membrane,



B) virus with membrane.

- 1 Capsid
- 2 Nucleic acid
- 3 Capsomer
- 4 Nucleocapsid
- 5 Virion
- 6 Protein coat
- 7 Glicoprotein coat

2

Virus infection

- 1. Attachment:** The virus attaches to receptors on the host cell wall.
- 2. Injection:** The virus moves through the plasma membrane and into the cytoplasm of the host cell.
- 3. Replication:** The viral genome contains all the information necessary to produce new viruses. Once inside the host cell, the virus induces the host cell to synthesize the necessary components for its replication.
- 4. Assembly:** The newly synthesized viral components are assembled into new viruses.
- 5. Release:** Assembled viruses are released from the cell and can now infect other cells, and the process begins again.

3

Human viral diseases

Examples of disease caused by viruses :

Acute hemorrhagic conjunctivitis - Coxsackie A-24 virus (Picornavirus) ss(+) RNA

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) - a human coronavirus (Coronavirus) ss(+) RNA

Gastroenteritis - Norwalk virus (Calicivirus) ss(+) RNA, rotavirus (Reovirus) ds RNA

Bronchiolitis - Respiratory syncytial virus (Paramyxovirus) ss(-) RNA

Hepatitis C - hepatitis C virus (Hepacivirus) ss(+) RNA

Smallpox - variola virus (Poxvirus) ds DNA

Lassa hemorrhagic fever - Lassavirus (Arenavirus) ss(-) RNA

Influenza - Influenza viruses A, B, and C (Orthomyxovirus) ss(-) RNA

Cervical cancer - human papilloma virus (Papovavirus) ds DNA

Dengue - dengue virus (Flavivirus) ss(+) RNA

AIDS / Acquired Immune Deficiency Syndrome (Retrovirus) ss RNA RT

Ebola hemorrhagic fever - Ebola virus (Filovirus) ss(-) RNA

Prevention and treatment of viral diseases

The most effective **medical approaches** to viral diseases, thus far, are **vaccination** to provide resistance to infection, and **drugs** that treat the symptoms of viral infections.

4

Virus

Dimensione virus = 10-100 nm (filovirus 14000 nm, circovirus 12 nm)

Dimensione batteri = 10^3 nm

Dimensione eucarioti = 10^4 - 10^6 nm

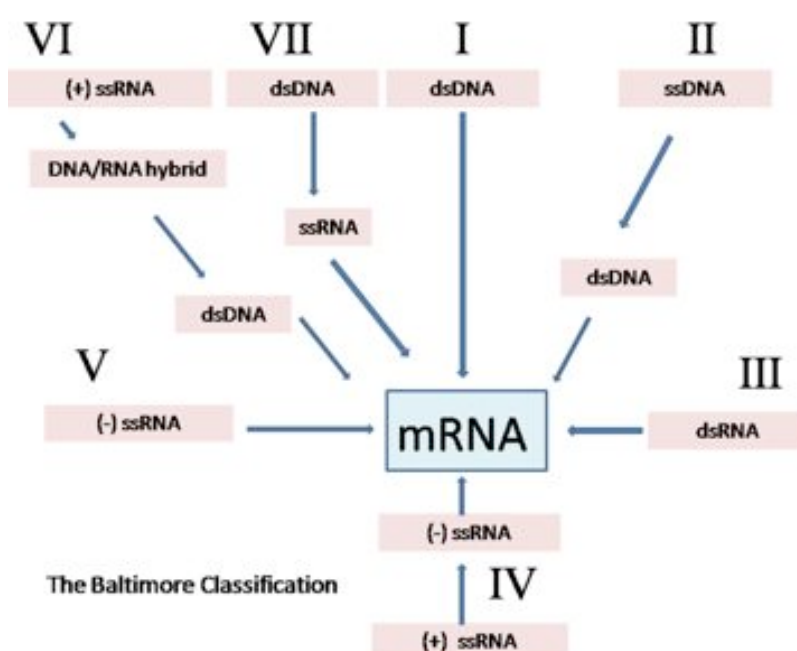
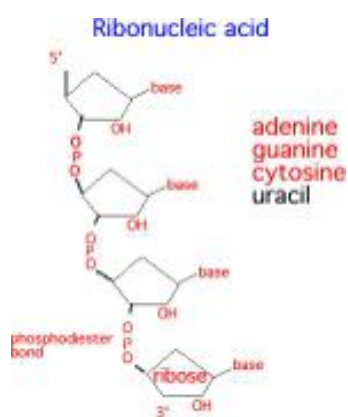
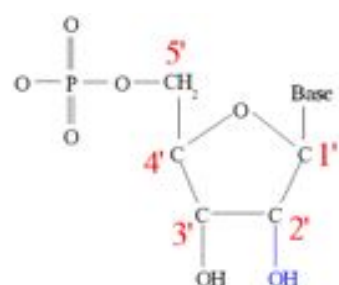
I virus sono **parassiti obbligati**: hanno bisogno di un organismo ospite per riprodursi

La **classificazione** dei virus segue lo schema seguente:

1. Tipo di genoma (DNA o RNA)
2. Simmetria del capside (icosaedrica, elicoidale)
3. Presenza/assenza di un envelop (membrana)
4. Architettura del genoma (ds (doppio filamento) ss (singolo filamento; +, -; lineare, circolare)
5. Dimensione del genoma: da 1.8 kb a 350 kb

5

Classificazione dei virus in 7 classi in base al genoma



(+) da 5' a 3'

(-) da 3' a 5'

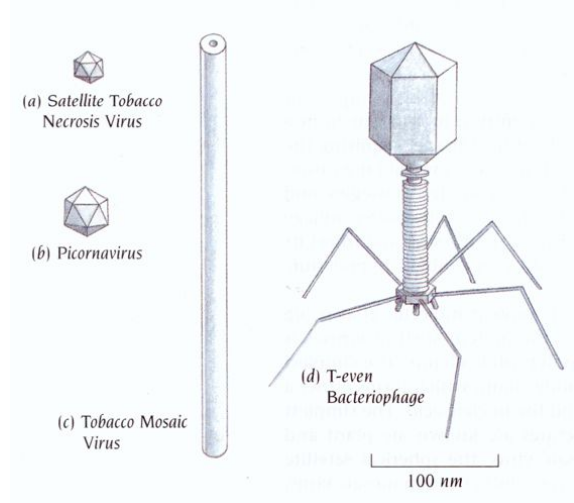
6

Struttura dei virus

I virus sono parassiti costituiti da **molecole di acido nucleico** circondate da un rivestimento protettivo costituito da proteine, chiamato **capside**. Alcuni virus hanno anche una membrana a doppio strato lipidico, chiamato **envelop**, che riveste il capsid.

Un acido nucleico non potrebbe mai codificare una singola molecola proteica tanto grande da racchiuderlo. Il capsid dei virus, quindi, è costituito da **piu' copie** di una o piu' catene polipeptidiche.

I virus hanno forme e dimensioni diverse: in particolare, il capsid può essere **sferico** o a **bastoncello**.



7

Struttura dei virus

Le proteine che costituiscono il capsid dei virus si dispongono in modo simmetrico o quasi-simmetrico. Ci sono due possibili disposizioni:

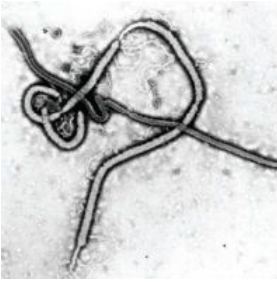
- virus con **capsid elicoidale**, in cui le subunità proteiche si associano a formare un bastoncino elicoidale;
- virus con **capsid sferico**, in cui le subunità proteiche si aggregano a formare un poliedro.

Considerato l'elevato numero di subunità proteiche (fino ad alcune centinaia) coinvolte nella formazione del capsid dei virus, **essi rappresentano l'esempio più complesso di organizzazione delle proteine in struttura quaternaria**.

8

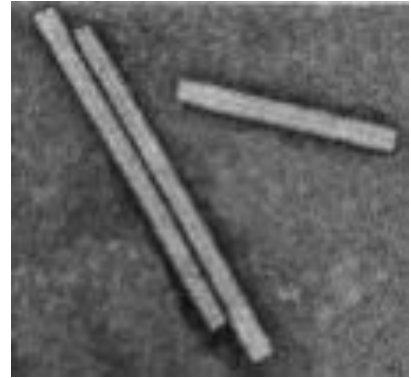
Virus con capsidie elicoidale

Ebola virus



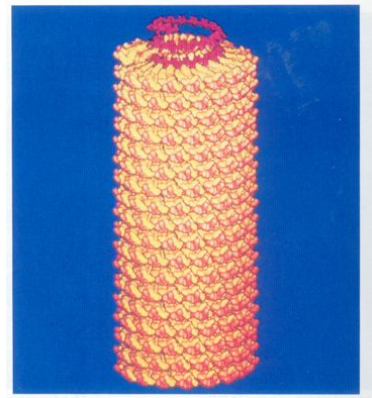
Un esempio di virus con capsidie elicoidale è dato dal **virus del mosaico del tabacco (TMV)**.

TMV ha una forma a bastoncino, è lungo circa 3000 Å, ha un diametro di 180 Å e ha una massa di 40 milioni di dalton.



Il suo capsidie è costituito da circa 2130 copie identiche di una proteina (158 aminoacidi), disposte a formare un'elica destrorsa cava (diametro cavità circa 40 Å), caratterizzata da $n = 16.3$ subunità per giro, $p = 23$ Å.

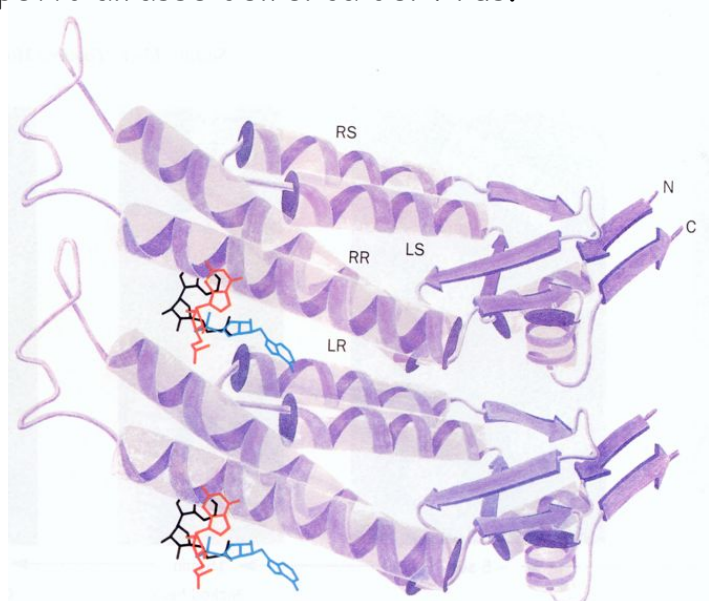
TMV contiene una molecola di RNA a singolo filamento che si avvolge nella cavità interna seguendo i giri dell'elica di proteine, in modo tale che 3 basi interagiscano con una subunità proteica.



Virus con capsidie elicoidale

L'analisi cristallografica a raggi X ha mostrato che ciascuna subunità del capsidie del virus TMV è costituita da un **bundle di 4 eliche**, disposto in modo radiale rispetto all'asse dell'elica del virus.

Asse dell'elica
del virus



Virus con capside 'sferico'

Come disporre in modo simmetrico oggetti identici in modo tale da costruire una sfera?

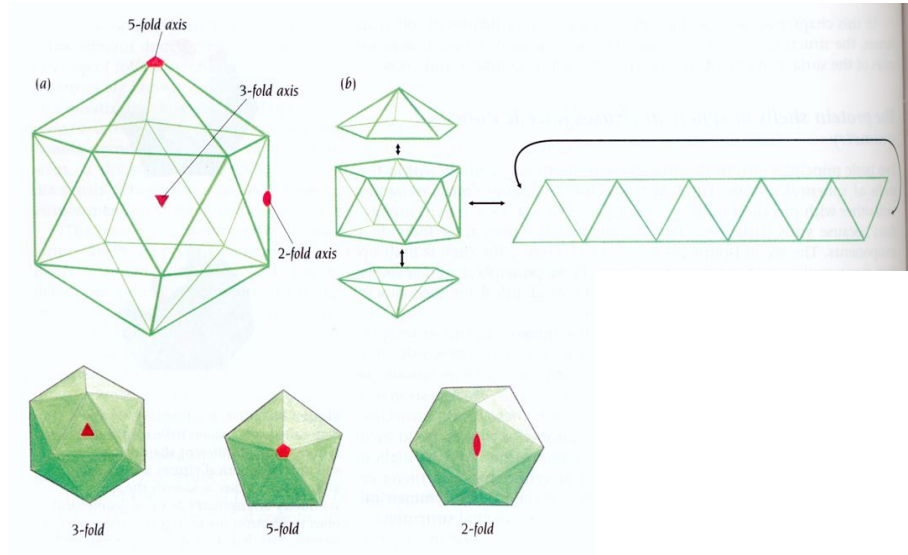
Esiste solo un numero limitato di modi per farlo e fra questi la **simmetria icosaedrica** è la più alta possibile, permettendo al maggior numero di oggetti identici di formare una quasi sfera.

L'**icosaedro** è un oggetto approssimativamente sferico costituito da **20 triangoli equilateri identici**.

12 vertici
(asse di rotazione di ordine 5)

20 facce
(asse di rotazione di ordine 3)

30 spigoli
(asse di rotazione di ordine 2)

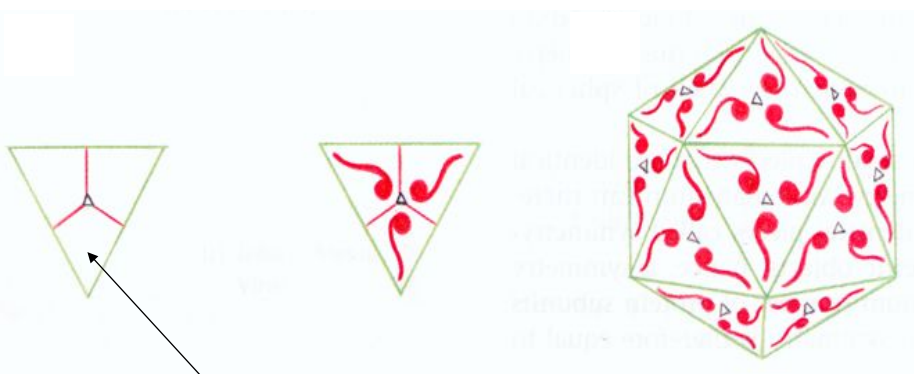


Virus con capside sferico

L'icosaedro presenta $12(\text{vertici}) \times 5(\text{simmetria}) = 60$ (o $20(\text{facce}) \times 3(\text{simmetria})$, o $30(\text{spigoli}) \times 2(\text{simmetria})$) posizioni equivalenti.

Ogni oggetto che presenta simmetria è costituito da parti identiche messe in relazione una con l'altra da operazioni di simmetria; tali parti vengono chiamate "**unità asimmetriche**" (perché come singole unità non sono simmetriche).

Le subunità proteiche che costituiscono il capside dei virus sferici sono **unità asimmetriche**: il **numero minimo** di subunità proteiche necessarie a formare il capside con simmetria icosaedrica è quindi uguale alle posizioni equivalenti dell'icosaedro = **60**.



Ciascuna **unità asimmetrica** può contenere una o più catene polipeptidiche.

Flavivirus polyprotein

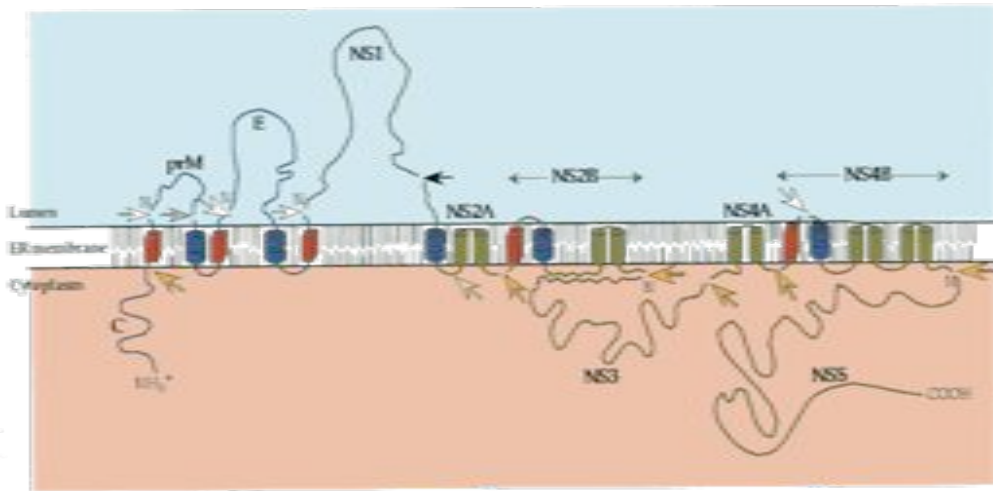
5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'

NS3

N - Protease - Helicase - C

NS5

N - Methyltransferase - RNA polymerase - C

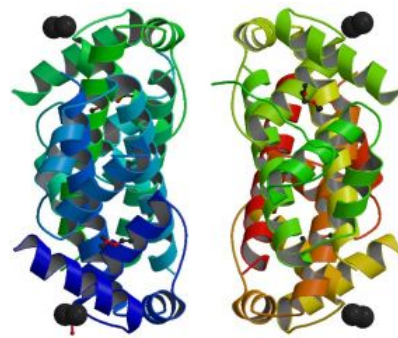


15

Proteine strutturali

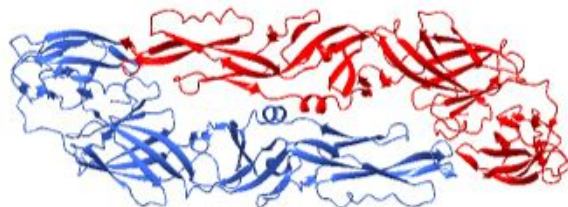
West nile virus

C = proteina del capsid, (Mw: 12-14 kDa, circa 105 aa.), carica positivamente (pdb: 1sfk, Dokland et al., 2004)



M = proteina della membrana, (Mw: 18-19 kDa), glicosilata, (non c'e' la struttura)

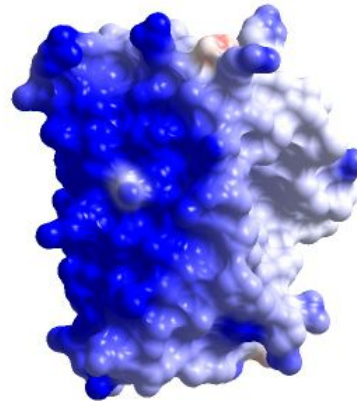
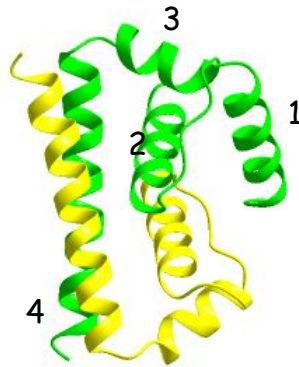
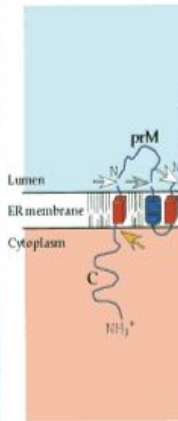
E = proteina dell' envelop, (Mw: 53-54 kDa, circa 500 aa.), proteina di membrana glicosilata (pdb: 1OAN, Modis et al., 2004)



16

C = proteina del capsid, 123 aa. \Rightarrow 105 aa. (taglio del C ter.)

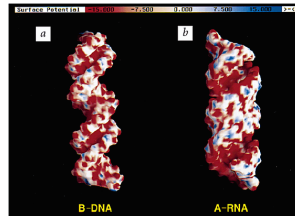
Blu = +39 kT/e, rosso = -39 kT/e



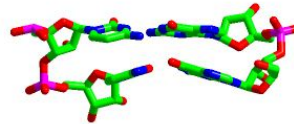
Mobilita' di $\alpha 1$:
-RNA binding
-capsid assembly

Dokland et al., 2004

~ Structural
~ Nonstruc



RNA

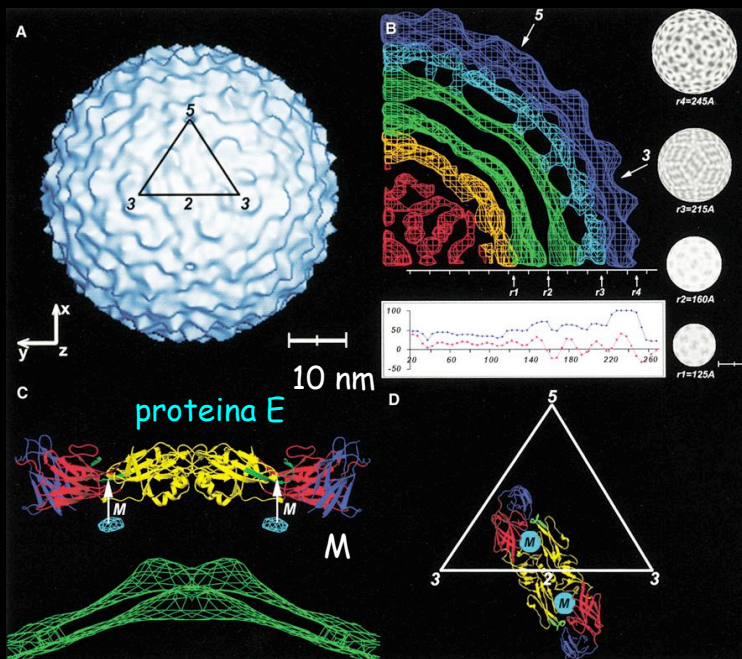


17

Struttura del virione di virus dengue

Da microscopia elettronica: particelle virali dalla superficie poco rugosa di circa 50 nm di diametro

Cryo electron microscopy a 24 Å di risoluzione: la proteina E forma una struttura icosaedrica formata da 90 dimeri (T=3, 3 mol. nell'a.u.).



Envelop, proteina E, 220-245 Å

M ecto dom., E stem, 185-220 Å

Membrana, 140-185 Å

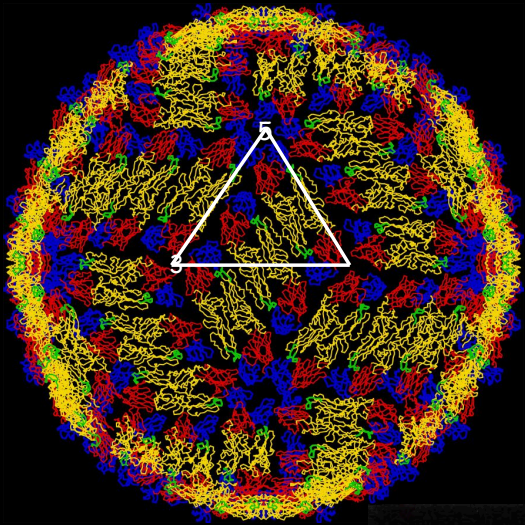
Capsid, 105-135 Å

mRNA

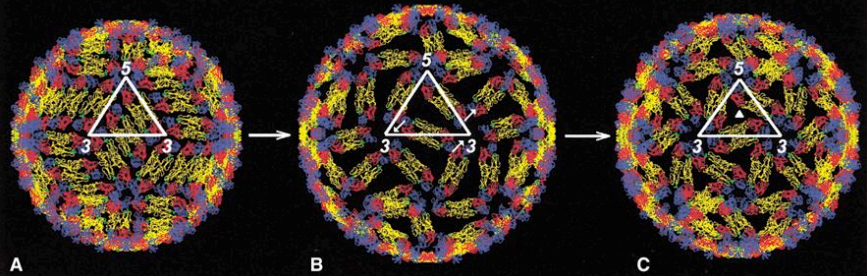
La struttura del capsid non e' ben definita:
-differente orientazione rispetto all'envelop
-disordine nella simmetria icosaedrica

Kuhn et al., 2002

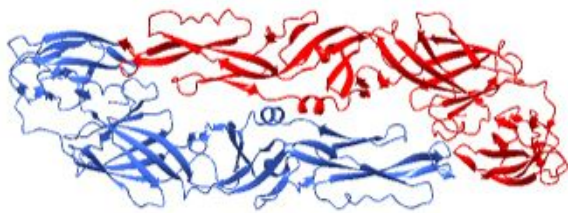
Struttura dell'envelop virale: 90 dimeri
(T=3, 3 mol. nell'a.u.).



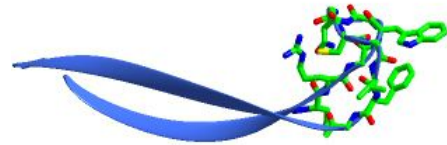
Kuhn et al., 2002



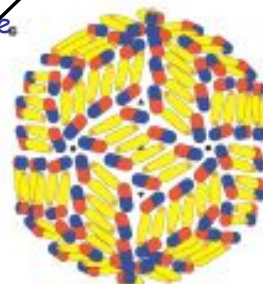
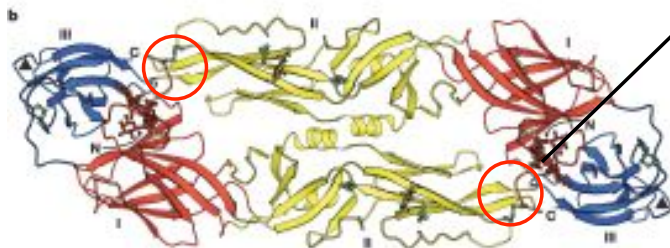
Envelop protein E



Seq. idrofobica cons.: res.
98-109:
si attacca alla membrana cell.



Proteina dimerica formata da 3 domini:
dominio I, dominio II e dominio III



20

Modis et al., Nature (2004)

Ingresso nella cellula: endocitosi

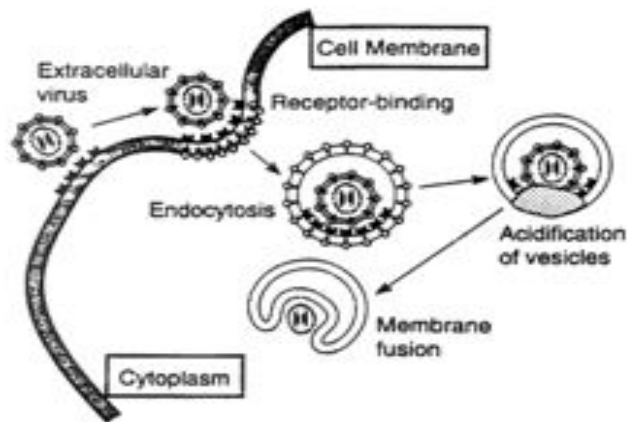
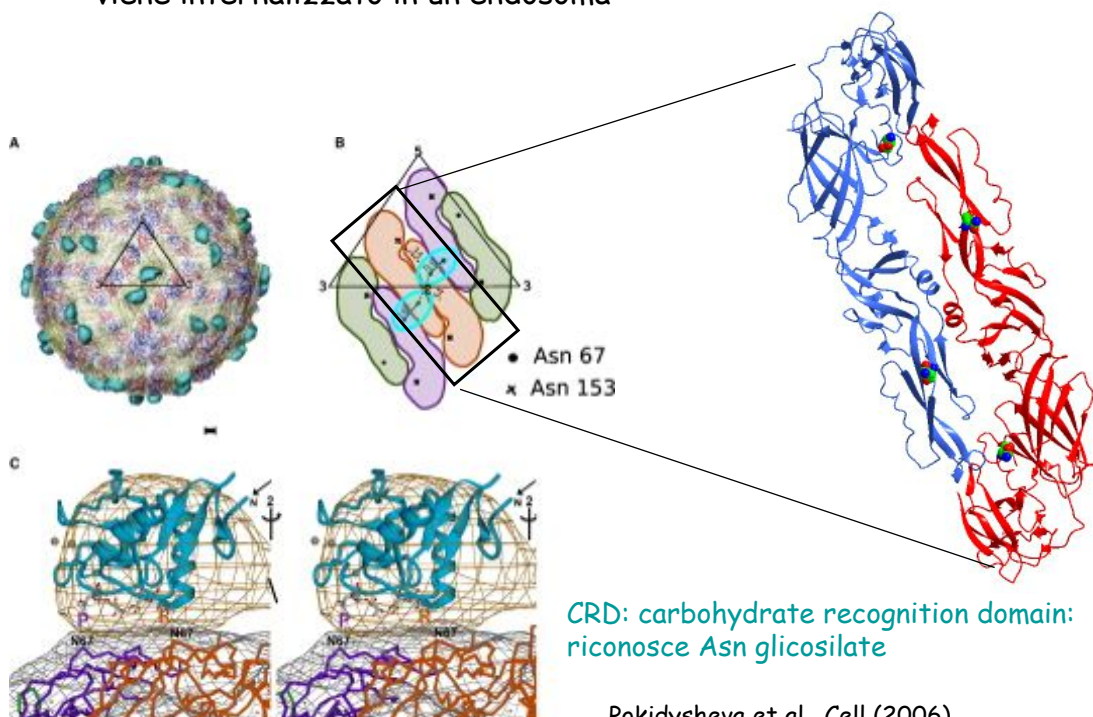


Figure 4.13 Virus-induced membrane fusion. This process is dependent on the presence of a specific fusion protein on the surface of the virus which, under particular circumstances (e.g. acidification of the virus-containing vesicle), becomes activated, inducing fusion of the vesicle membrane and the virus envelope.

21

Ingresso nella cellula: fusione delle membrane

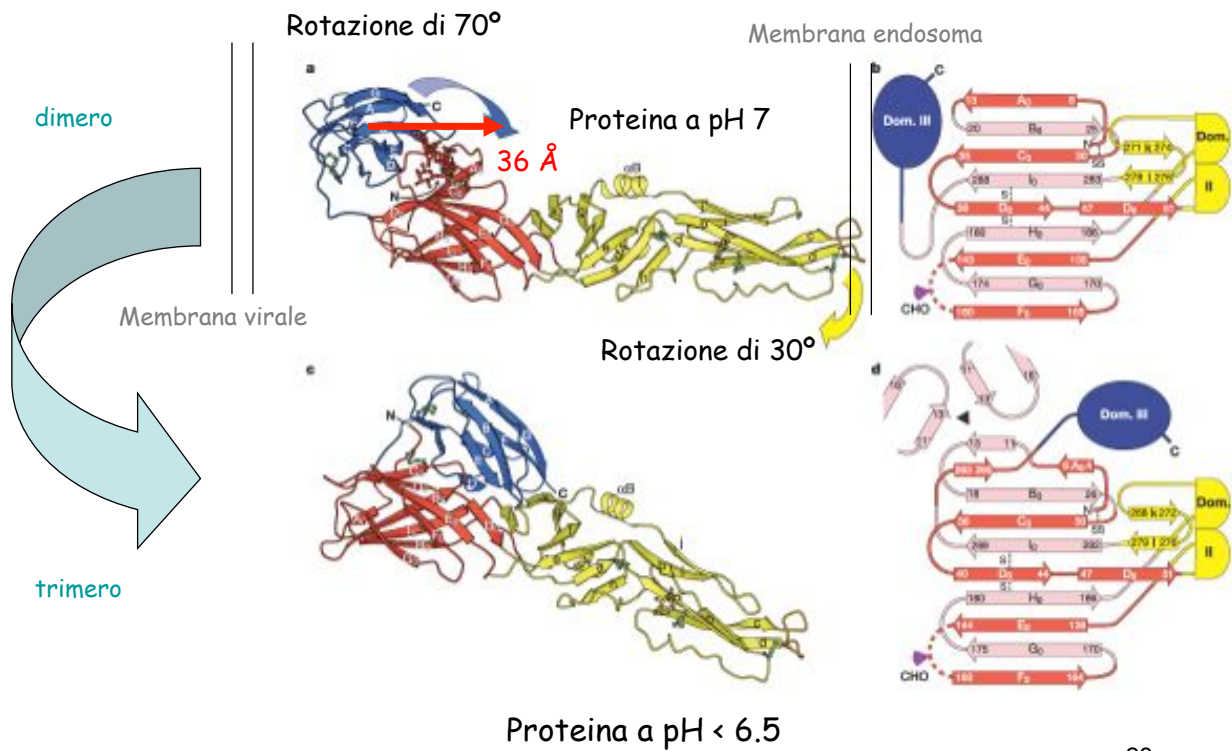
La proteina E si lega ad un ricettore sulla superficie cellulare e il virus viene internalizzato in un endosoma



Pokidysheva et al., Cell (2006)

22

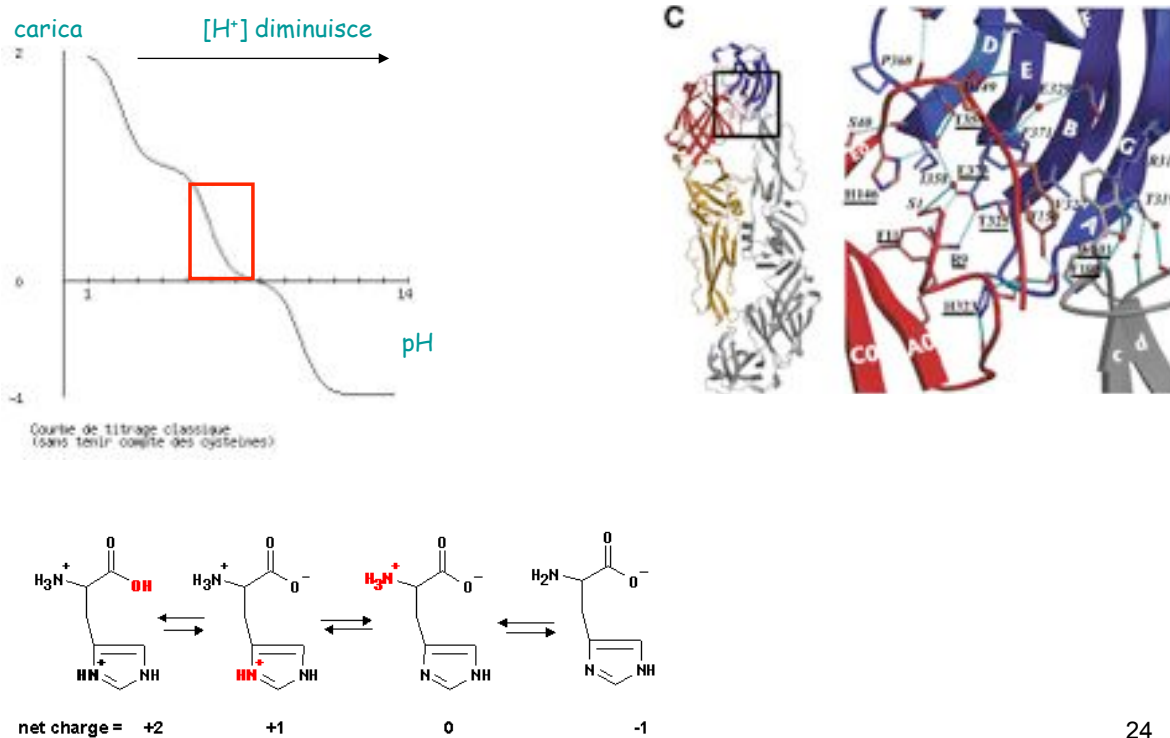
Modificazioni della proteina E indotte dal pH



Modis et al., Nature (2004)

23

Modificazioni della proteina E indotte dal pH

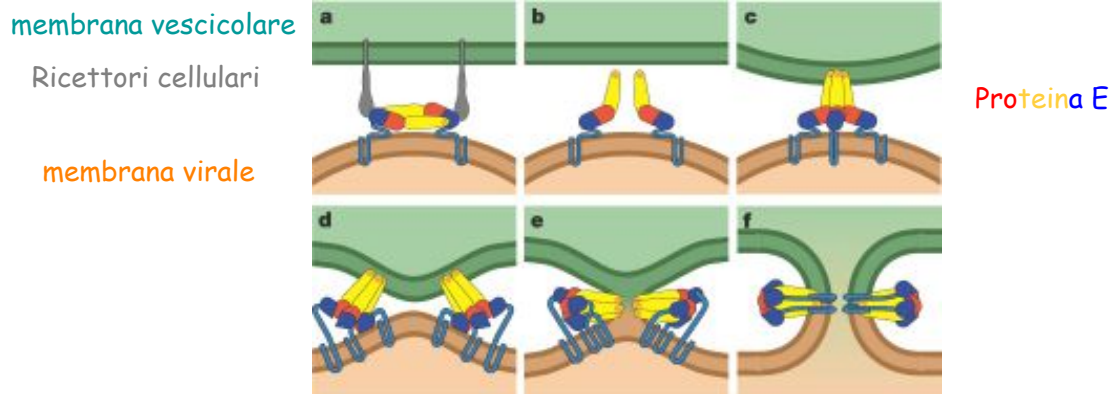


24

Bressanelli et al., EMBO J. (2004)

Fusione delle membrane

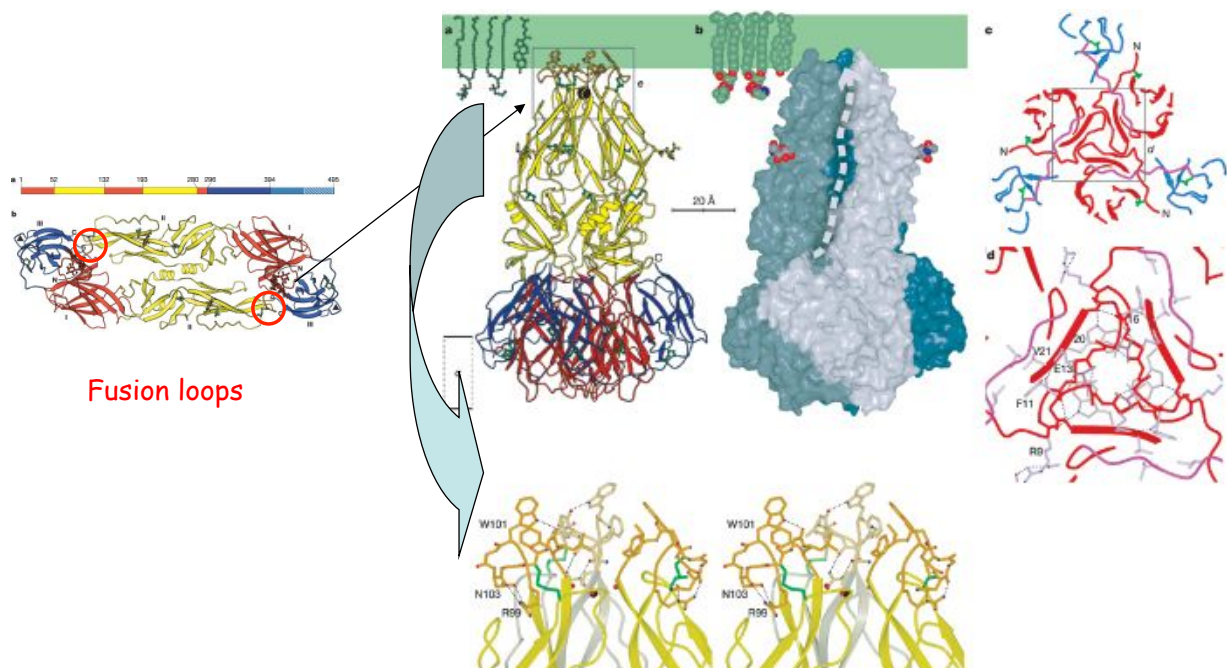
- Legame ai ricettori cellulari
- Endocitosi e abbassamento del pH: cambiamento conformazionale
- La proteina E nella nuova conformazione diviene trimerica e si lega alla membrana vescicolare
- e) f) fusione delle membrane e rilascio del capside nel citoplasma



Modis et al., Nature (2004)

25

Fusione delle membrane

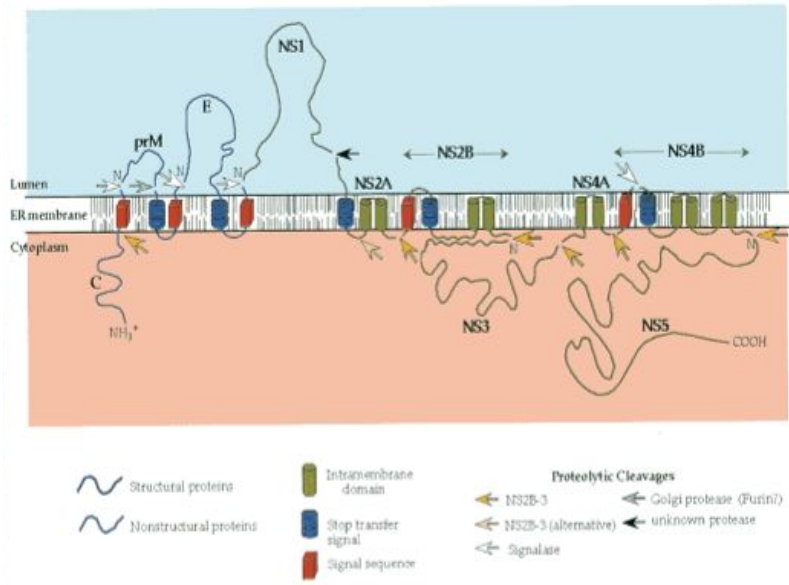


Modis et al., Nature (2004)

26

Proteine non strutturali (NS) e replicazione del virus

- NS1:** 40 kDa, ricca di cys, glicosilata, attivita' proteasica? Partecipa alla replicazione virale
- NS2A:** 25 kDa, proteina di membrana, ancoraggio del complesso di replicazione alla membr.
- NS2B:** si associa ad NS3 a formare la proteasi
- NS3:** 70 kDa, N-ter (1-180) Ser proteasi, C-ter elicasi e RNA trifosfatasi
- NS4A-B:** ancoraggio alla membrana del complesso di repl.
- NS5:** 104 kDa, N-ter Mtasi, C-ter RNA dep. RNA polimerasi



27

Proteine non strutturali (NS) e replicazione del virus

Traduzione:

Ribosomi umani, costruzione della poliproteina virale

Attivazione delle proteine virali:

Proteasi virale NS2B/NS3 + proteasi umane

Replicazione del genoma (trascrizione):

RNA dep. RNA polimerasi (NS5 C-ter.) + elicasi (NS3 C-ter.)

Capping dell'RNA:

NTPasi (NS3 C-ter.) + guanilil trasferasi (?) + Mtasi (NS5 N-ter.)

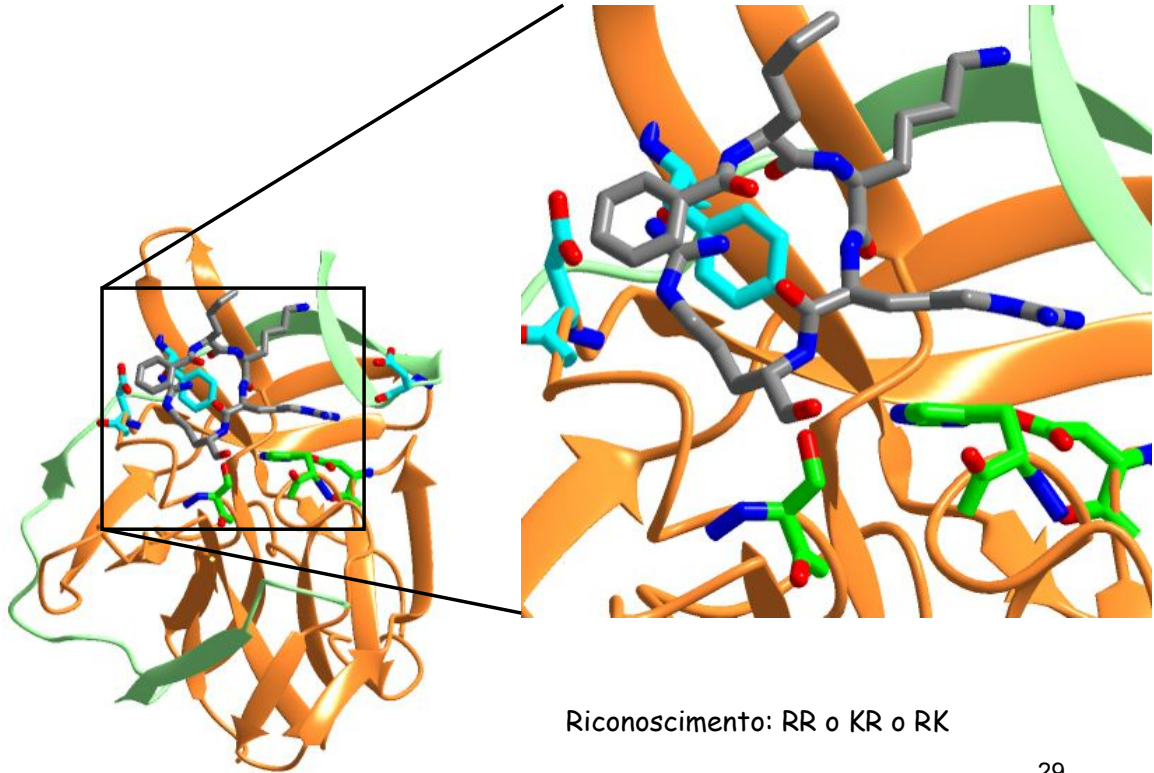
Costruzione e assemblaggio di nuove particelle virali:

(?)

Il complesso di replicazione e' associato alla membrana !

28

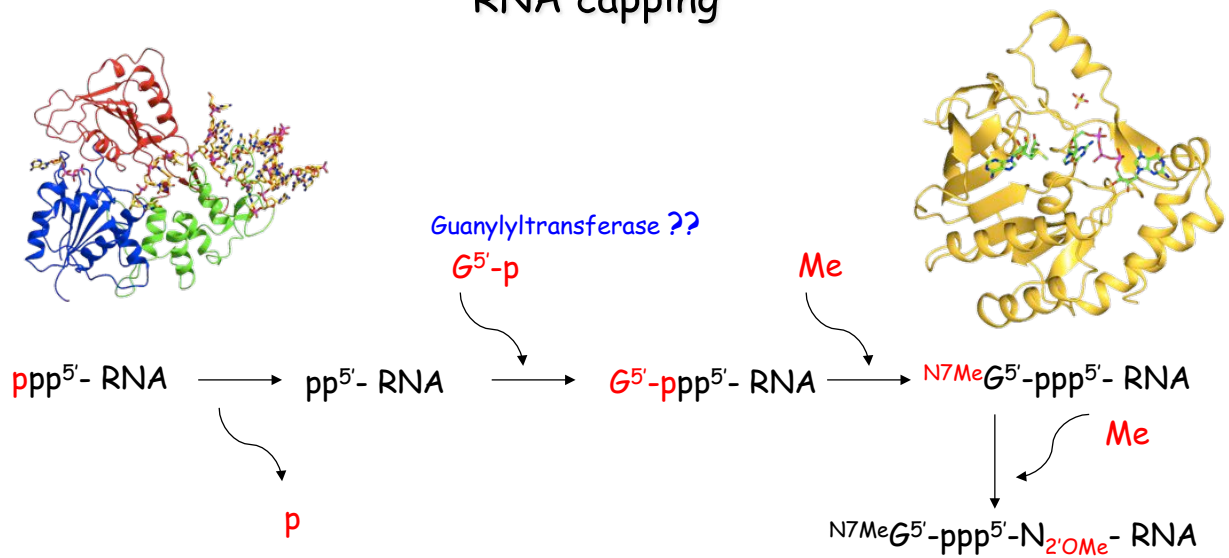
Proteasi NS2B/NS3



Erbel et al., Nat. Struc. Mol. Biol. (2006)

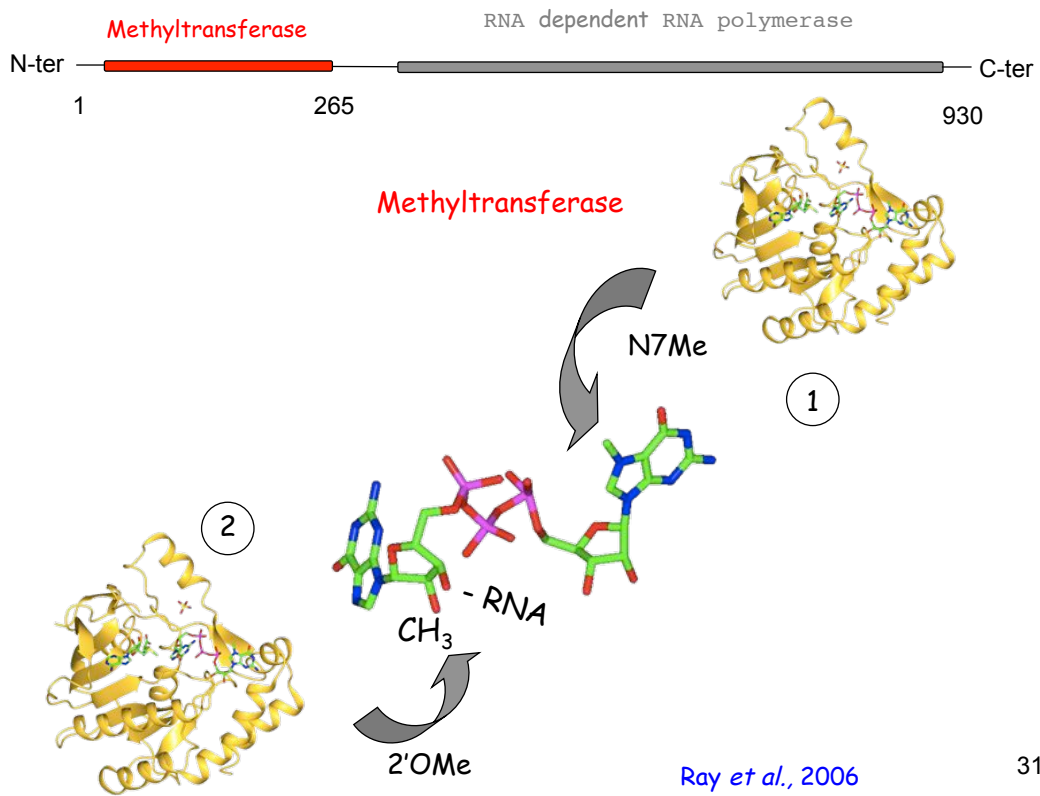
29

RNA capping



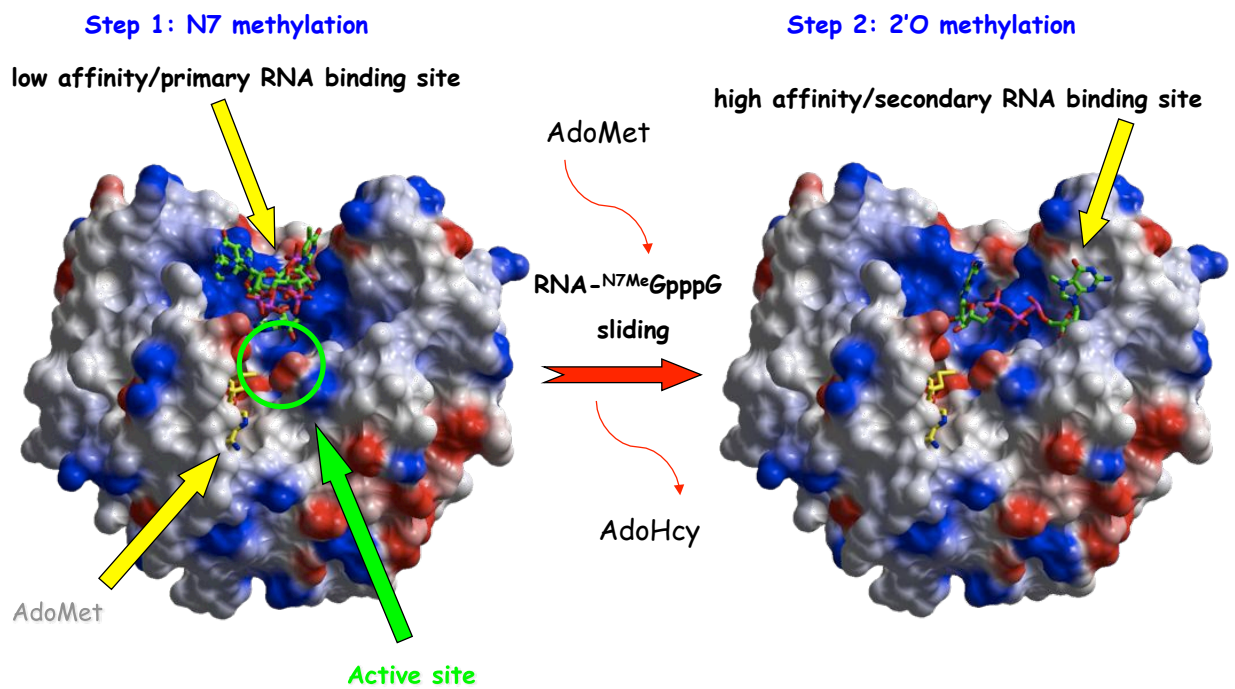
30

NS5



31

MTase function

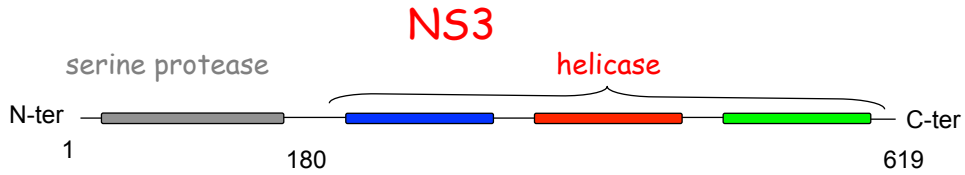


Crystal structure

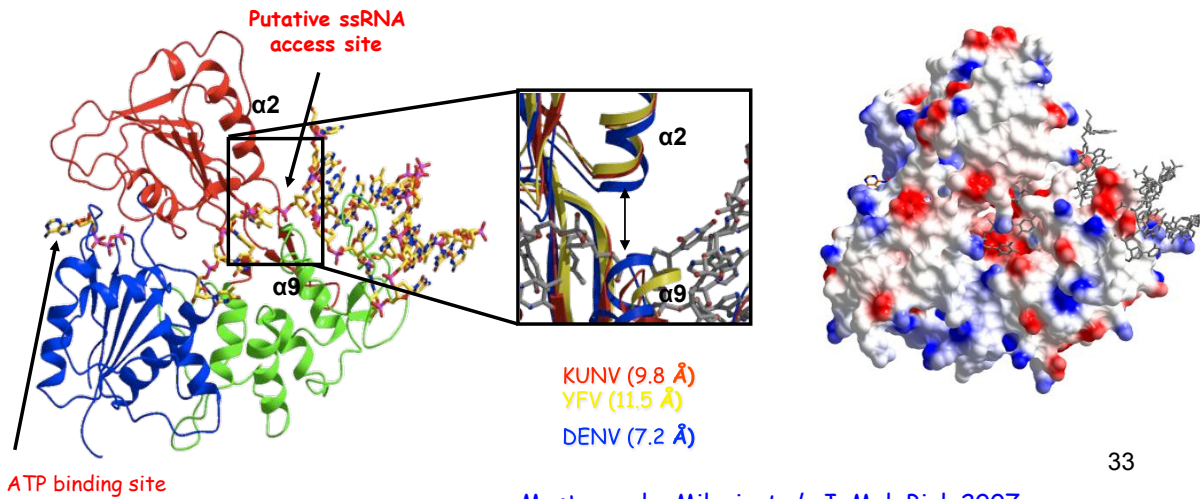
Model

Mastrangelo et al., Protein Sci. 2007
Bollati, Milani et al., J. Mol. Biol. 2009

32



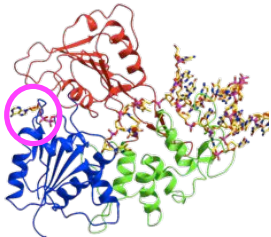
Kunjin virus helicase



Inhibition

Hel 'classical' inhibition:

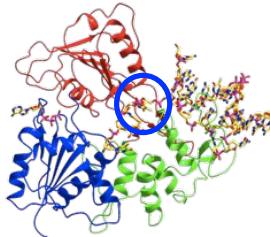
ATP binding site



Protein structure-function analysis

Hypothesis on activity

Putative ssRNA access

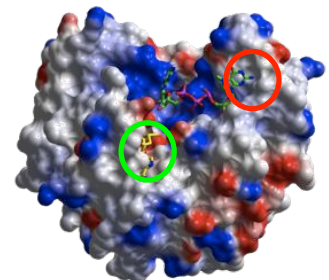


New inhibition sites

in silico docking search

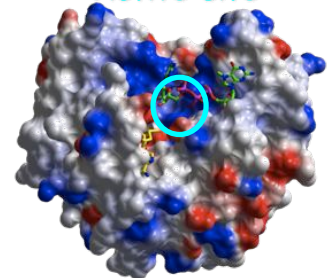
Mtase 'classical' inhibition:

AdoMet binding site



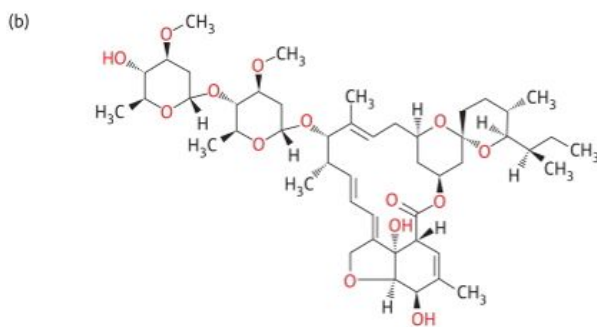
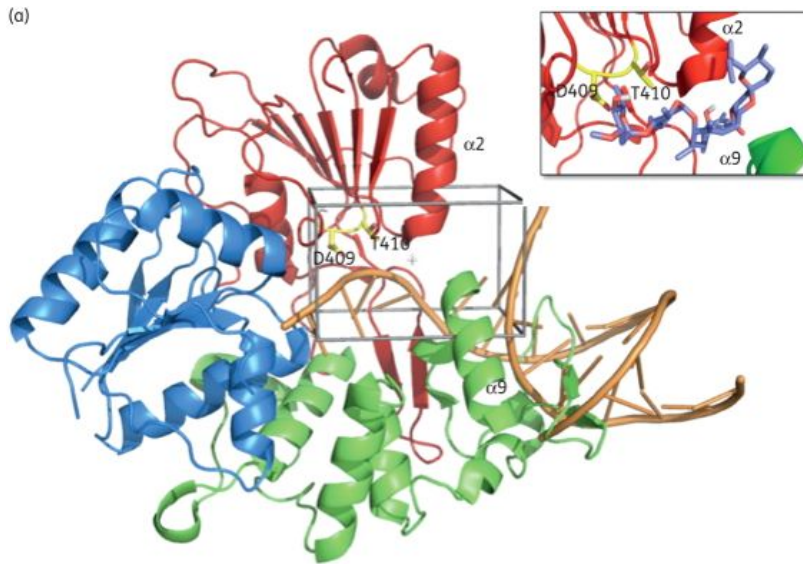
High affinity cap RNA

Active site



New inhibitors + validation of the proposed protein function mechanism

34



Mastrangelo et al., J. Antimicrob. Chemother. 2012

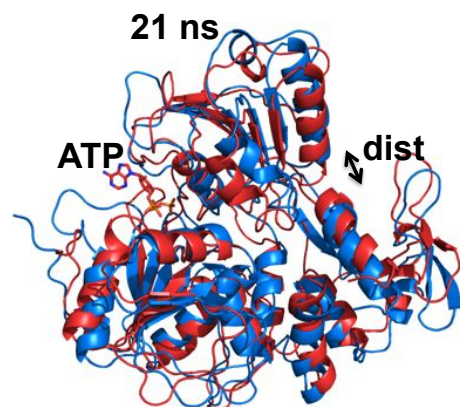
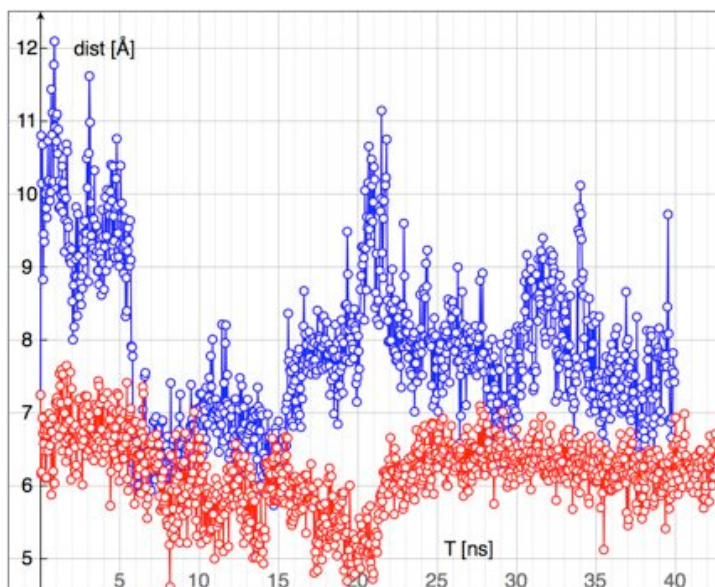
35

Dinamica Molecolare

α helices distance: ssRNA access site

apo Hel 40.9 ns: open (9.5 Å) 20%, intermediate (7.8 Å) 54%, closed (6.5 Å) 24%

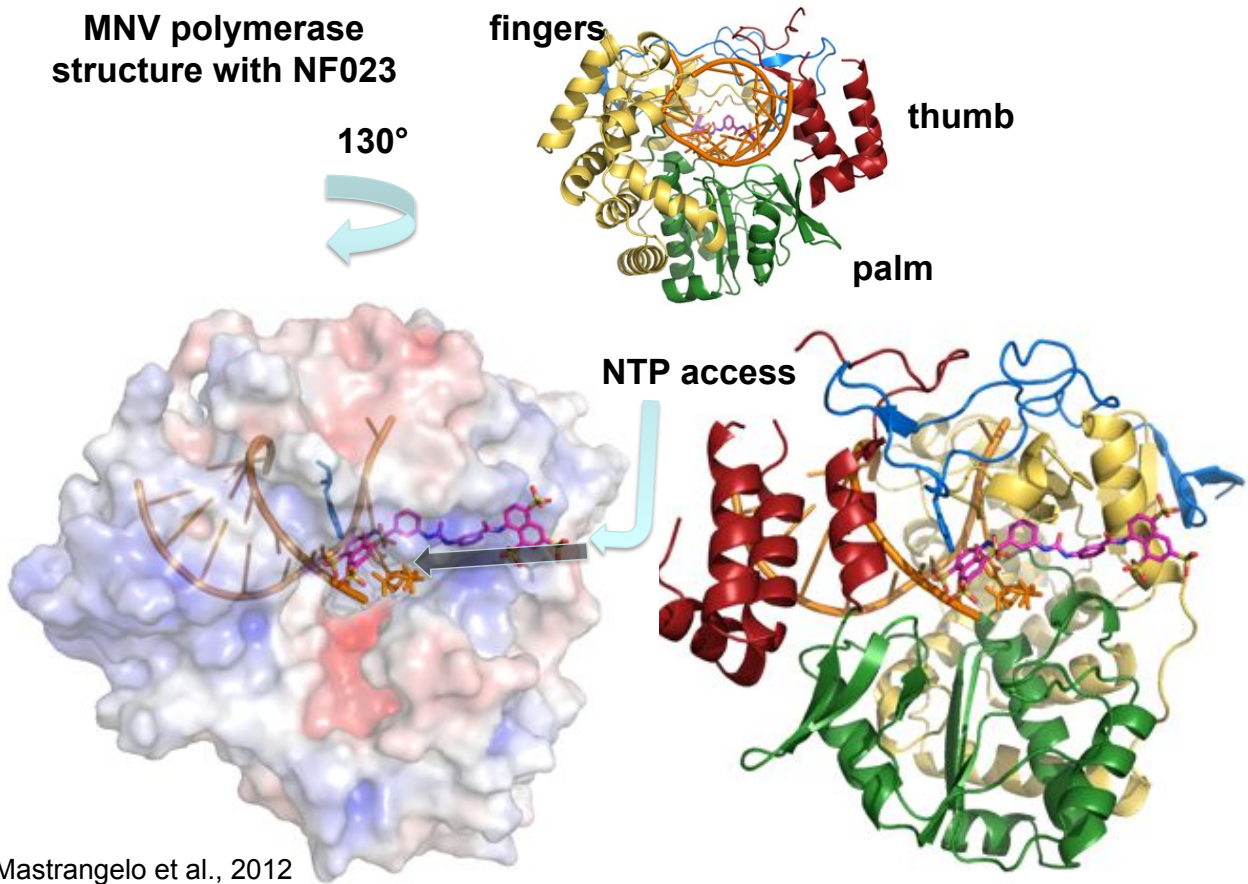
ATP Hel 43.5 ns: closed 100%



Mastrangelo et al., et al. BBRC 2012

36

MNV polymerase
structure with NF023



Mastrangelo et al., 2012

per approfondire ...

J.H. Strauss, E.G. Strauss

VIRUSES

Academic Press

S.J. Flint, L.W. Enquist, V.R. Racaniello, A. M. Skalka

PRINCIPLES OF VIROLOGY

ASM Press

<http://www.silver-europe.com/>