

História de Virologia – BMM 0586

Fields Virology 5ª edição - 2007

**por Arnold J. Levine Lynn W. Enquist
tradução, reedição e adaptação por Paolo M. de A. Zanotto**

Virologia, como ciência, tem uma história notável. Os vírus, por causa de sua natureza intrinsecamente interativa e sistêmica, moldaram a história e evolução de seus hospedeiros. Praticamente todos os organismos vivos, quando estudados em detalhe, revelam estar associados com vírus, numa proporção logarítmica de vírus distintos para cada organismo celular. Estas menores das entidades vivas exercem interferências homeostáticas significativas em todas as formas de vida, incluindo si mesmas. Em particular, as consequências da morbidez e mortalidade de infecções virais humanas alteraram a nossa história e resultaram em esforços extraordinários por parte de várias áreas da ciência em estudar, compreender, controlar, utilizar em contextos tecnológicos e terapêuticos e, eventualmente erradicar alguns desses agentes. Virologistas elucidaram novos princípios dos processos da vida e deram novas direções importantes para a Ciência Biomédica em geral. Quase todos os conceitos fundamentais e ferramentas da Biologia Molecular foram derivados do estudo dos vírus e suas células hospedeiras. Neste texto, analisaremos partes selecionadas desta história no que se refere ao desenvolvimento de novos conceitos de Virologia e Genética Molecular em particular e da Biologia Molecular em geral (53,54).

Os vírus e o homem durante a história

A interação do homem com agentes virais foi possivelmente, um fator-chave que moldou a evolução humana, cultura e civilização desde o seu início. As evidências do efeito de doenças, desde as fases iniciais da especiação humana, através de tempos pré-históricos até o presente indicam que os tipos de vírus associados com o homem tem mudado com o tempo.

O progresso tecnológico permitiu `as populações humanas crescerem em número e densidade. Como consequência, diferentes vírus encontraram condições adequadas para prosperar e estabelecer duradouras associações com o homem. Embora nem todos os agentes virais causam doenças e outros podem de fato ser considerados benéficos, como por exemplo os vírus de algas que controlam a composição atmosférica da terra, vírus que são usados como agentes de controle biológico, vírus usados em processos biotecnológicos, &c. No entanto, a situação atual de pobreza, superpopulação e desequilíbrio ecológico pode ter efeitos devastadores para o progresso humano. Isto porque, doenças recentemente surgidas causando pandemias gigantescas (por exemplo, HIV-1, HCV, dengue, &c.) estão se tornando desafios formidáveis, que podem ter um impacto direto sobre o destino de nossa espécie (174).

A origem da Virologia

As primeiras evidências históricas de infecções virais remontam para depois da revolução agrícola. Para esta seção usamos o material disponibilizado em: (<http://www.microbiologybytes.com/introduction/introduction.html>)

Certos aspectos da interação com doenças infecciosas pode ser percebida até hoje em hábitos e costumes arraigados nas culturas de sociedades de coletores caçadores na África expostas a agentes infecciosos como os filovírus (*e.g.*, Ebola), que colocam sinais em trilhas chegando em seus assentamentos quando há um surto epidêmico, ou mesmo no isolamento estrito de doentes.

Os antigos Persas em 1000 AC tinham leis descrevendo as responsabilidades de proprietários de cães rábidos e Homero nas *Iliadas* descreve Heitor como 'rábido'.



Baixo relevo de Memphis, capital do antigo Egito, de aproximadamente 3700 AC mostrando um sacerdote denominado Ruma com sinais aparentes de poliomielite paralítica.



O faraó Sipta governou o Egito de 1200 a 1193 AC, e morreu súbitamente com uma idade aproximada de 20. Seu corpo mumificado ficou intocado em sua tumba no Vale dos Reis até 1905, quando o túmulo foi escavado. A múmia mostra que sua perna esquerda era atrofiada e que seu pé estava rigidamente estendido em “pata de cavalo”, que é uma seqüela clássica de poliomielite paralítica.



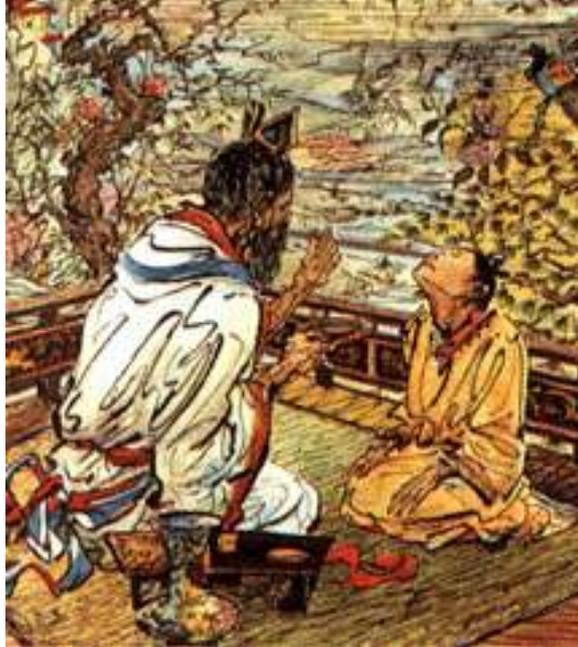
O faraó Ramsés V quarto faraó da XX dinastia egípcia, filho da rainha Duatentopet e do faraó Ramsés IV, de quem herdou o trono governou o Egito de 1146 AC até morrer em 1152 AC, supostamente de varíola. Compare as marcas de no maxilar com as pústulas em pacientes recentes, `a direita.

No milênio passado as epidemias de varíola foram especialmente úteis para a submissão dos povos nativos e a repovoamento das Américas. A varíola ajudou Cortez e Pizarro, por exemplo, na conquista dos Astecas e os Incas. Além de



MORTAL SICKNESS AMONG THE INDIANS.





Assim como no Egito, a varíola era endêmica na China por volta de 1000 AC. Médicos Chineses observaram que os sobreviventes de um surto se tornavam protegidos em surtos subsequentes e desenvolveram a técnica de *variolação* que envolvia inicialmente a inalação de pó de crostas secas de lesões de pacientes convalescentes. Depois a técnica foi modificada e passou-se a fazer uso de pús de lesões na pele (pústulas) que eram arranhadas no antebraço de crianças.



Em 14 de Maio de 1796. Edward Jenner, usou material obtido de pústulas das mãos de uma tratadora de vacas leiteiras de sua vila natal de Berkley em Gloucestershire, para “vacinar”, de forma análoga aos chineses, um menino de 8anos James Phipps. Em 1 de Julho ele expôs Phipps deliberadamente como material de um caso real de varíola e o menino não apresentou sintomas de doença. A idéia de Jenner veio de sua observação que lesões em vacas eram muito similares às de humanos mas que os tratadores de gado leiteiro, apesar de apresentar manifestações leves na pela das mãos não tinham problema com varíola.



EDWARD JENNER

Ele raciocinou que os agentes patogênicos eram similares em suas manifestações mas distintos em sua especificidade para com bovinos e humanos. O conceito fundamental de Jenner foi usar uma forma menos patogênica da doença para estimular uma resposta que impedia a forma mais patogênica.



Caricatura da vacinação por James Gillray de 1802

Apesar da enorme controvérsia no início do Sec. XIX, programas de vacinação em massa foram rapidamente instituídos e em 1830 a varíola foi erradicada de Londres e em 1977 no último reduto na África.

O desenvolvimento do conceito de vírus

O período inicial: O século 19

Na última metade do século 19, a existência de um mundo microbiano diversificado de bactérias, fungos, protozoários e estava bem estabelecido. Já em 1840, o famoso anatomista alemão Jacob Henle de Göttingen (o descobridor da alça de Henle e avô do virologista do século 20 Werner Henle) levantou a hipótese da existência de agentes infecciosos que eram muito pequenos para serem observados com o microscópio de luz e que eram capazes de causar doenças específicas. Na ausência de qualquer evidência direta para tais entidades, no entanto, suas idéias não foram aceitas. Naquele período, três grandes avanços em microbiologia convergiram para definir o cenário para o desenvolvimento do conceito de um agente submicroscópicas que viria a ser chamado de um vírus.

A primeira destas ideias foi a demonstração de que a geração espontânea de organismos não ocorria. Esta noção tinha uma longa história, com experimentos tanto apoiando-a como refutando-a. O crédito, no entanto, para finalmente refutar esta hipótese é comumente dado a Louis Pasteur (1822 - 1895), que empregou seus frascos de pescoço de cisne para dar um golpe mortal no conceito de geração espontânea em 1859. Pasteur passou a estudar a fermentação por agentes microbianos diferentes. Durante estes estudos, ele deixou claro que “tipos de micróbios diferentes estão associados com diferentes tipos de fermentação” e estendeu esse conceito para processos em doença.



Louis Pasteur (1822-1895)

Partindo desta base, Robert Koch (1843 - 1910), um estudante de Jacob Henle e um médico de uma pequena aldeia alemã, demonstrou que o bacilo do antraz era causador da doença (1876) e que o bacilo da tuberculose era a causa de tuberculose em humanos (1882). Pouco disto teria sido possível sem a terceira maior contribuição por Joseph Lister (1827 - 1912). Uma vez que era evidente que os organismos reproduzem novos organismos, a importância de um campo estéril, seja na cirurgia ou para o isolamento de novos organismos, tornou-se clara. Lister desenvolveu a técnica da diluição limitante, para obter culturas puras de organismos, e Koch desenvolveu meios sólidos de cultura, o isolamento de colónias individuais de bactérias para obter culturas puras, bem como a utilização de corantes para visualização estes microrganismos. Embora muitos cientistas da época contribuíram para estas ferramentas e conceitos, foi principalmente Pasteur, Lister e Koch que criaram uma nova abordagem experimental para a ciência médica.



Robert Koch (1843-1910)

Estes estudos formalizaram algumas das ideias originais de Jacob Henle, que são agora incorporadas nos postulados de Koch para definir se um organismo é o agente causador de uma doença. Estes postulados afirmam que (a) o organismo deve ser regularmente presente nas lesões da doença, (b) o organismo tem de ser isolado em cultura pura, (c) a inoculação de uma cultura pura de organismos em um hospedeiro deve iniciar a doença, e (d) o organismo tem de ser recuperado novamente a partir das lesões do hospedeiro. Ao final do século 19, esses conceitos tornaram-se o paradigma dominante da microbiologia médica, que apresentaram um método experimental para ser utilizado em todas as situações. Foi apenas quando estas regras foram violadas e

não conduziram ao isolamento de um agente causador que o conceito de um vírus nasceu.

O período de descoberta: 1886 - 1903

Adolf Mayer (1843 - 1942), um cientista alemão treinado no campo da tecnologia química (que estudou a fermentação e nutrição de plantas), tornou-se o diretor da Estação Experimental Agrícola de Wageningen, na Holanda, em 1876. Alguns anos mais tarde (1879), ele começou sua pesquisa sobre doenças do tabaco e, embora ele não tenha sido o primeiro a descrever tais doenças, ele nomeou a doença de “doença do mosaico do tabaco” devido às manchas claras e escuras nas folhas infectadas.

Numa de suas experiências, Mayer inoculou plantas saudáveis com o suco extraído de plantas doentes, após moer as folhas infectadas em água. Esta foi a primeira transmissão experimental de uma doença viral de plantas, e Mayer informou que, “em nove de cada dez casos de plantas inoculadas haverá doença” (118). Embora estes estudos estabelecessem a natureza infecciosa da doença, nem um agente bacteriano ou fúngico puderam ser cultivados ou consistentemente detectados em extratos, assim os postulados de Koch não foram satisfeitos.



Adolf Mayer (1843-1942)

Em uma comunicação preliminar em 1882 (117), ele especulou que a causa poderia ser uma forma “solúvel de contágio, possivelmente como enzimas, apesar de qualquer analogia para tal suposição não ter suporte científico”. No entanto, quatro anos mais tarde, em seu trabalho definitivo sobre o assunto, Mayer concluiu que a doença do mosaico “é bacteriana, mas que as formas infecciosas ainda não foram isoladas, nem são as suas formas e modos de vida conhecidos” (118).

O passo seguinte foi dado por Dimitri Ivanofsky (1864 - 1920), um cientista russo trabalhando em São Petersburgo. Em 1887 e novamente em 1890, Ivanofsky foi encarregado pelo Ministério da Agricultura da Rússia para investigar a causa de uma doença do tabaco em plantações Bessarabia, Ucrânia e da Criméia.



Dimitri Iwanowski (1864-1920)

Ivanofsky rapidamente repetiu as observações de Mayer, demonstrando que a seiva das plantas infectadas continha um agente capaz de transmitir a doença para as plantas saudáveis, e acrescentou uma etapa adicional. Ele passou a seiva infectada através de um filtro que bloqueava a passagem de bactéria - o filtro Chamberland, feito de porcelana não vidrada -. O filtro Chamberland, desenvolvido para purificar a água por Charles Chamberland, um dos colaboradores de Pasteur, continha poros suficientemente pequenos para reter a maioria das bactérias. Em 12 de fevereiro de 1892, Ivanofsky informou a Academia de Ciências de São Petersburgo que “a seiva de folhas infectadas com a doença do mosaico do tabaco mantém suas propriedades infecciosas, mesmo após filtração através do filtro de vela de Chamberland” (84). A importância desta experiência é que ela forneceu uma definição operacional de vírus, via uma técnica experimental, através da qual um agente pode ser qualificado como um vírus.

Ivanofsky, como Mayer antes dele, não conseguiu cultivar um organismo a partir de filtrados da seiva ou macerados e não conseguiu satisfazer os postulados de Koch. Ele, também, estava atrelado pelo paradigma dos tempos, que sugeriam que o filtro poderia estar com defeito ou algo poderia haver algum erro em seus métodos. Ele ainda sugeriu a possibilidade de que uma toxina (não um organismo como reprodução) pudesse passar através do filtro e causar a doença. Em 1903, quando Ivanofsky publicou sua tese (85), ele não poderia afastar a possibilidade de que bactérias causavam o mosaico do tabaco e que ele e os outros tinham de alguma forma falhado no seu cultivo. O dogma daquele tempo devido ao sucesso evidente dos postulados de Koch impediu a maioria dos cientistas de interpretar os dados de uma forma diferente. É igualmente curioso que naquele momento (1885), Pasteur estava trabalhando com vírus, no desenvolvimento da vacina anti-rábica (126), mas nunca investigou a natureza única daquele agente infeccioso.

O terceiro cientista que desempenhou um papel chave no desenvolvimento do conceito de vírus foi Martinus Beijerinck (1851 - 1931), microbiologista de solo holandês, que colaborou com Adolf Mayer em Wageningen. Beijerinck também mostrou que a seiva das plantas de tabaco infectadas poderiam manter infectividade após filtração através de um filtro de vela de Chamberland. (Ele não tinha conhecimento do trabalho de Ivanofsky na época [1898]).



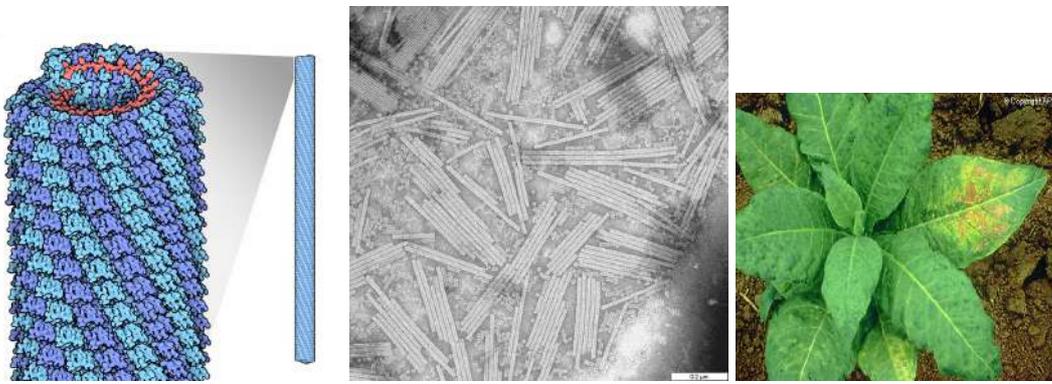
Martinus Beijerinck (1851-1931)

Ele então estendeu estes estudos mostrando que filtrados de seiva podem ser diluídos e em seguida, recuperar sua força após a replicação em tecidos vivos em crescimento da planta. O agente podia então reproduzir-se (o que significa que não era uma toxina), mas apenas em tecidos vivos, e não na seiva livres de células da planta. Isto explicava a incapacidade de cultivar o patógeno fora do seu hospedeiro, e preparou o cenário para a descoberta de organismos menores que as bactérias (um agente filtrável), não é observável no microscópio de luz, e é capaz de reproduzir-se apenas em células vivas ou tecidos. Beijerinck chamou este um agente de “*contagium vivum fluidum*”, ou um líquido vivo contagioso. Esse conceito deflagrou um debate de 25 anos sobre a natureza do vírus, eram líquidos ou partículas? Este conflito acabou quando d’Herelle desenvolveu o teste de placas em 1917 (34) e quando as primeiras fotografias com microscópio eletrônico foram tiradas do vírus do mosaico do tabaco (TMV) em 1939 (94). Assim, Mayer, Ivanofsky e Beijerinck, cada qual contribuiu para o desenvolvimento de um novo conceito: ***um agente filtrável demasiado pequeno para ser observado no microscópio de luz, mas capaz de causar a doença através da multiplicação em células vivas***. Loeffler e Frosch (109) rapidamente descreveram e isolaram o primeiro agente filtrável de animais, o vírus da febre aftosa, e Walter Reed e sua equipe, em Cuba (1901) identificaram o primeiro agente filtrável humano, o vírus da febre amarela (132). O termo vírus (do latim para o líquido viscoso ou veneno [81]) era naquele tempo usado indistintamente para qualquer agente infeccioso e por isso foi aplicado ao TMV. A literatura das primeiras décadas do século 20 mais frequentemente se refere a essas entidades infecciosas como agentes filtráveis, e este foi de fato a definição operacional de vírus. Algum tempo depois, o termo vírus tornou-se restrito ao uso para aqueles agentes que cumpriram os critérios desenvolvidos por Mayer, Ivanofsky e Beijerinck e que foram os primeiros agentes causadores de doença que não podiam ser provados utilizando os postulados de Koch.

Os Vírus de Plantas e do período da química: 1929-1956

O vírus do mosaico do tabaco continuou a ter um papel central na exploração da natureza e das propriedades dos vírus. As primeiras décadas do século 20 viu o desenvolvimento de técnicas para purificar enzimas (proteínas). A noção de que os vírus eram proteínas e assim poderiam ser purificados da mesma maneira foi

Os padrões de difração de raios X (14) sugeriram que a partícula em forma de haste do TMV foi construída a partir de subunidades repetidas. Estes dados e outras considerações levaram Crick e Watson (30) a compreender que os vírus mais simples tinham que consistir de uma ou algumas espécies de subunidades idênticas de proteína. Por volta de 1954 a 1955, várias técnicas foram desenvolvidas para dissociar as subunidades de proteína TMV e TMV podem ser reconstituídas a partir de RNA e as suas subunidades de proteína (61) para a produção de vírus infecciosos. O princípio de auto-montagem dos vírions (21) foi elaborado usando TMV e, em 1962, Caspar e Klug (24) elegantemente descreveram os princípios geométricos da estrutura do vírus icosaédrico para muitos dos vírus isométricos. Assim, de 1929 a 1962, ambas as estruturas e as composições químicas dos vírus foram elucidados.

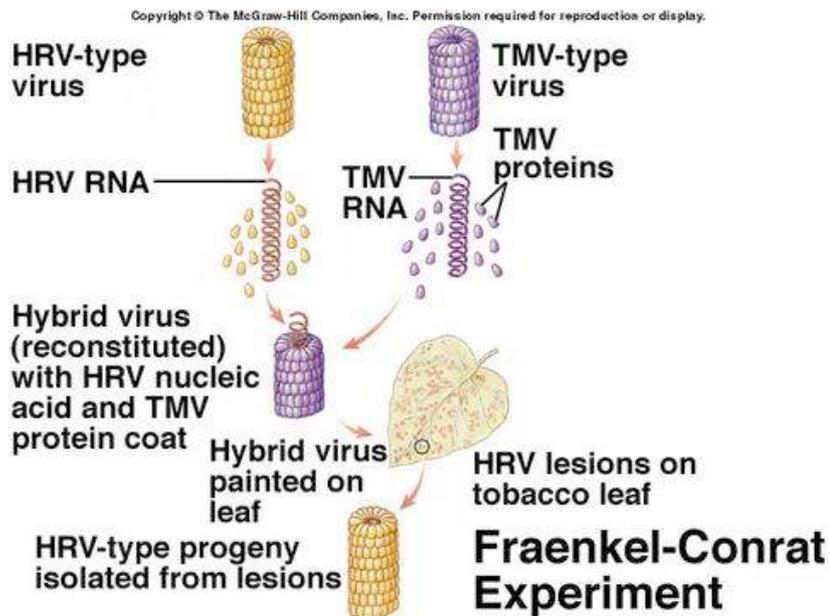


O vírus do mosaico do tabaco

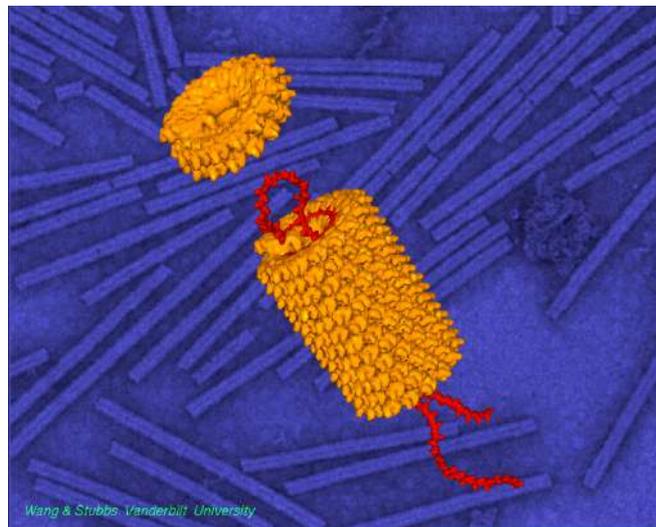
Já em 1926, HH McKinney (119) reportou o isolamento de “variantes” de TMV com uma morfologia da placa diferente que podia ser cultivado e podia ser isolado de várias localizações geográficas (120). Em 1933, Jensen (91) confirmou as observações de McKinney e demonstrou mutações de reversão para este fenótipo. Assim, estabeleceu-se que os vírus, tal como com todos os seres vivos replicantes que podem sofrer mutações, tem informação genética hereditária. Que a informação genética reside no RNA do TMV foi mostrado 30 anos mais tarde por um ensaio de RNA infeccioso (60,69). Esta foi a primeira demonstração de que o RNA pode ser um material genético. Este achado aconteceu após os experimentos de Avery de transformação de DNA com pneumococos (4) e da experiência de Hershey-Chase com bacteriófagos (77), ambos demonstrando que o DNA era o material genético mais comum.

Nas décadas subsequentes a sequência de nucleotídeos do RNA do TMV ajudou a confirmar as atribuições de codons para o código genético, acrescentando evidência clara da universalidade do código genético, e ajudou a elucidar os mecanismos de mutação por vários agentes mutagênicos diversos (59). Crucialmente, o bioquímico Heinz Ludwig Fraenkel-Conrat alemão-americano descobriu os papéis complementares das estruturas componentes dos vírus. Em 1960 anunciou o sequenciamento completo de 158 aminoácidos da capsídeo do vírus. As suas

pesquisas mais notáveis foram com o vírus do mosaico do tabaco (TMV) e o vírus da tanchagem de Holmes (VFC). Ele descobriu que o elemento infeccioso do vírus reside no ácido nucleico e que portanto controle genético da reprodução viral reside no RNA que é transportado no vírion. Em 1955, ele e biofísico Robley Williams mostraram que um vírus funcional poderia ser criado a partir de RNA purificado e os componentes de sua capa de proteína. O TMV e seus vírus de plantas relacionados contribuíram de forma significativa para as origens e o desenvolvimento da virologia.



Reconstrução de vírions por auto-montagem



Vírus do mosaico do tabaco (TMV), cartoon sobre foto de microscopia eletrônica de transmissão (EMT)

Os Bacteriófagos

O período inicial: 1915 - 1940

Em 1915, Frederick W. Twort era o superintendente da Instituição Brown em Londres. Na sua pesquisa, Twort procurava variantes do vírus da vacínia, usados na vacina contra a varíola, que replicassem em meio definido simples, fora de células vivas. Em uma das suas experiências, ele inoculou numa placa de cultura em nutriente de agar com uma alíquota da vacina contra a varíola e, embora o vírus não replique nestas condições, contaminantes bacterianos cresceram rapidamente em placas de agar formando um tapete sobre o agar.



Frederick Twort (1877-1950)

Quando Twort continuou a incubar suas culturas, ele percebeu que algumas colônias bacterianas sofriam uma mudança visível, tornando-se “como aparência aquosa” (ou seja, mais transparente). Essas colônias já não eram capazes de se replicar quando subculturadas por re-plaquamento (ou seja, as bactérias haviam sido mortas). Twort chamou isto de transformação por “fenômeno vítreo”, e mostrou que colônias normais de bactérias infectadas com o ‘princípio vítreo’ morriam. A ‘entidade vítrea’ passada através de um filtro de porcelana, podia ser diluída em um milhão de vezes, e quando aplicada sobre um tapete de bactérias frescas iria recuperar a sua força, ou titulação (153, 154, 155). Twort (153) publicou uma nota curta descrevendo estes resultados e sugeriu que uma explicação de sua observação era um vírus de bactérias. A pesquisa de Twort foi interrompida pela Primeira Guerra Mundial, em que serviu nas forças armadas. Quando ele voltou para Londres, ele não continuou nesta linha de pesquisa e não fez mais contribuições nesta área.

Ao mesmo tempo, Félix d’Herelle, um médico bacteriologista canadense, estava trabalhando no Instituto Pasteur, em Paris. Em agosto de 1915, um esquadrão de cavalaria de soldados franceses foi aquartelado em Maisons-Lafitte, nos arredores de Paris, quando um surto desenfreado de *Shigella* disentérica incidiu sobre a tropa. d’Herelle prontamente isolou o bacilo da disenteria de emulsões filtradas de fezes de homens doentes e cultivou-os. Quando as bactérias cresciam e cobriam a superfície da

placa de Petri, d'Herelle observou ocasionalmente manchas claras circulares onde bactérias não cresciam, chamando-as de “vierges colchetes”, ou placas. d'Herelle (34,35) acompanhou o curso de infecção num único paciente, observando quando as bactérias eram mais abundantes e quando as placas apareciam. Ele demonstrou que as placas apareciam no quarto dia após a infecção e matavam as bactérias na placa de cultura. Curiosamente, o paciente começou a melhorar no quarto dia após a infecção.



Felix d'Herelle (1873-1949)

d'Herelle chamou esses vírus de bacteriófagos, e passou a desenvolver técnicas usadas até hoje em virologia. Ele desenvolveu a utilização de diluições limitantes com o ensaio de placa para titular preparações de vírus. Ele raciocinou que o aparecimento de placas mostrava que o vírus deveriam ser “partículas”, ou “corpúsculos” d'Herelle também demonstrou que o primeiro passo de uma infecção por vírus envolvia o agente prender-se (adsorver) na célula hospedeira, demonstrado pela co-sedimentação do vírus e hospedeiro após a mistura dos dois. (Ele também mostrou que o vírus podia diluir-se no fluido sobrenadante). A ligação do vírus ocorria apenas quando as bactérias sensíveis ao vírus eram misturados com ele, demonstrando a especificidade de gama de hospedeiros do vírus na fase de adsorção. Ele descreveu a lise celular e a liberação de vírus infecciosos em termos claros e modernos. d'Herelle (35,36) foi de muitas maneiras um dos fundadores da moderna virologia.

Em 1921, um número crescente de estirpes de bactérias lisogênicas foram isoladas, e tornou-se impossível separar os vírus de seu hospedeiro, em algumas experiências. Isso levou Jules Bordet (19), do Instituto Pasteur, em Bruxelas a sugerir que o agente transmissível descrito por d'Herelle não era nada mais do que uma enzima bacteriana que estimulava a sua própria produção. Apesar de ser uma conclusão incorreta, é notavelmente próxima das idéias atuais de estrutura e replicação dos príons.

Ao longo das décadas de 1920 e 1930, d'Herelle concentrou seus esforços nas aplicações potencialmente médicas de sua pesquisa. Tendo inclusive ido trabalhar na Índia no controle do vibrio colérico usando bacteriófagos. No entanto ele teve sucesso errático, principalmente porque o princípio de lise e lisogenia não era entendido na época e portanto os resultados eram imprevisíveis. Em 1921 publicou o texto seminal “*Le bactériophage; son rôle dans l'immunité*” onde de forma pioneira lança o conceito da **fagoterapia** em particular e reforça o conceito de uso de vírus como ferramenta para a medicina em geral. A pesquisa básica sendo realizada nesta época foi muito influenciada e interpretada segundo as fortes personalidades dos

cientistas no campo. Principalmente, o enfoque pioneiro de d'Herelle foi deixado de lado com o advento dos antibióticos na década de 1940. Embora estivesse claro que havia muitos bacteriófagos diferentes e que alguns eram líticos e alguns eram lisogênicos, as inter-relações permaneceram mal entendidas. Um dos destaques deste período foi a demonstração por Max Schlesinger (139, 141) que os fagos purificados tinham uma dimensão máxima linear de 0,1 micrometro e uma massa de cerca de 4×10^{-16} g e que eram compostos por proteínas e DNA em proporções aproximadamente iguais (142). Em 1936, não se sabia bem o que fazer com essa observação, que começaria a fazer sentido ao longo dos próximos 20 anos.

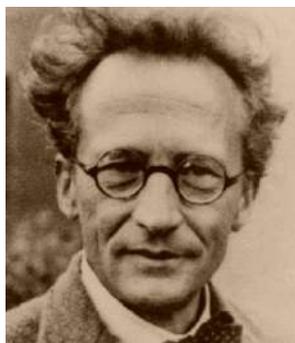


Bacteriófago T4 infectando uma célula

O Período Moderno: 1938 – 1975

Um dos aspectos fundamentais deste período foi resolver a questão da base molecular da hereditariedade e evolução. Isto atraiu os melhores pensadores da época para a Biologia e rapidamente os vírus foram entendidos como modelos “simples” e ideais.

Em 1944 foi publicada a primeira dedução baseada na física quântica do que devia armazenar e transmitir a informação genética, o seminal: “*What is Life? The Living Aspect of the Living Cell.*” de Erwin Schrödinger (a partir de uma série de aulas dadas no Trinity College, Dublin). Onde é postulada seu fino entendimento de mecânica quântica da hereditariedade desenvolvido desde 1927.



Erwin Schrödinger (1887-1961)

Um pesquisador importante seguindo o mesmo caminho de Schrödinger foi Max Delbrück. Ele foi treinado em física na Universidade de Göttingen, e sua primeira posição foi no Instituto Kaiser Wilhelm de Química, em Berlim. Lá, ele se juntou a um grupo diversificado de indivíduos ativamente discutindo como a física quântica se relacionava com a compreensão da hereditariedade. O interesse de Delbrück nesta área levou-o a desenvolver um modelo de mecânica quântica do gene e, em 1937, ele solicitou e obteve uma bolsa para estudar no Instituto de Tecnologia da Califórnia. Uma vez lá, ele se juntou com outro pesquisador, Emory Ellis (47), que estava trabalhando com um grupo de bacteriófagos, T2, T6, T4 (os fagos T-pares). Delbrück rapidamente entendeu que estes vírus eram ideais para o estudo da replicação viral. Estes fagos representavam um caminho para sondar como a informação genética pode determinar a estrutura e função de um organismo.



Max Delbrück (1906-1981)

Desde início, esses vírus foram vistos como sistemas modelo para a compreensão de vírus de câncer ou até mesmo para entender como um espermatozóide fertiliza um óvulo e um novo organismo se desenvolve. Ellis e Delbrück em 1939 (48) desenharam o experimento da “curva de crescimento em uma etapa”:

<http://www.microbiologybytes.com/LabWork/grow/grow2.htm>

Nele uma bactéria infectada liberta centenas de fagos de uma forma síncrona depois de uma latência definida de $\frac{1}{2}$ hora (período eclipse). Este experimento definiu o período de latência, quando não há infecciosidade viral. Isto tornou-se o paradigma experimental do grupo de fagos.

Com a eclosão da Segunda Guerra Mundial, Delbrück permaneceu nos Estados Unidos na Universidade de Vanderbilt e colaborou com um refugiado italiano, Salvador E. Luria, que havia fugido para a América e foi trabalhar na Universidade de Columbia, em Nova York (com fagos T1 e T2). Eles se conheceram em um encontro na Filadélfia em 28 de dezembro de 1940, e passaram os próximos dois dias planejando experimentos em Columbia. Estes dois cientistas nuclearam e lideraram um grupo crescente de pesquisadores que se concentrou em utilizar vírus bacterianos como modelo para a compreensão de processos essenciais de vida. Central para o sucesso deles foi um convite para passar o verão de 1941 no laboratório de Cold Spring Harbor fazendo experimentos. O resultado foi que um físico alemão e um geneticista italiano uniram forças ao longo dos anos da II Guerra Mundial para viajar

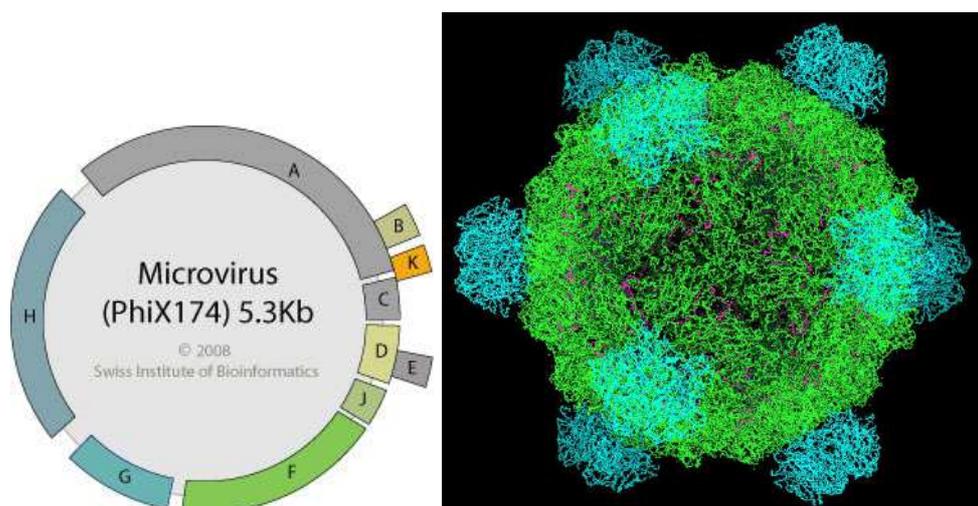
por todo os Estados Unidos e recrutar uma nova geração de biólogos que veio a ser conhecido como o “*Grupo dos Fagos*”.



Salvador Edward Luria (1912-199)

Pouco tempo depois, Tom Anderson, um microscopista eletrônico nos Laboratórios RCA em Princeton, Nova Jersey, encontrou Delbrück, e em março de 1942 as primeiras fotos com boa definição de bacteriófagos foram obtidas (113). Aproximadamente ao mesmo tempo, os primeiros mutantes destes fagos foram isolados e caracterizados (111). Por volta de 1946, o primeiro curso de fagos estava sendo ensinado em Cold Spring Harbor, e em Março de 1947, a reunião de fagos atraiu oito pessoas. A partir destas origens humildes cresceu o campo da Biologia Molecular, que focalizou o hospedeiro bacteriano e seus vírus.

Os próximos 25 anos (1950 - 1975) foi um período de intensa produção de pesquisa de vírus com bacteriófagos. Centenas de virologistas produziram milhares de publicações em três áreas principais: (a) infecção lítica de *Escherichia coli* com os fagos T-pares, (b) a natureza da lisogenia, utilizando o fago lambda, e (c) a replicação e as propriedades de vários fagos únicos, tais como o PhiX174 (com DNA circular fita simples), os fagos de RNA, T7, e assim por diante.



Mapa físico dos genoma do fago PhiX174 (esquerda) e modelo estrutural do vírion (direita)

Simplesmente não é possível aqui rever toda esta literatura, que lançou as bases da moderna biologia molecular e virologia, portanto, apenas destaques selecionados desta época serão mencionados.

A partir de 1947 ou 1948, a idéia de examinar, no nível bioquímico, os eventos que ocorrem em células infectadas por fagos durante o período de latência tinha se estabelecido. Seymour Cohen (que havia sido treinado primeiro com Erwin Chargaff na Universidade de Columbia, estudando os lipídios e ácidos nucleicos, e depois com Wendell Stanley trabalhando com RNA de TMV, e que tinha participado do curso sobre fagos dado por Delbrück em 1946 em Cold Spring Harbor, examinou os efeitos da infecção do fago nos níveis de DNA e RNA em células infectadas, utilizando uma análise colorimétrica (27,28). Estes estudos mostraram uma alteração dramática da síntese macromolecular em células infectadas pelo fago: (a) O acúmulo líquido de RNA parou nestas células. Mais tarde esta observação seria a base para a detecção de uma espécie de RNA de rápida reciclagem e a primeira demonstração da existência do RNA mensageiro [3]). (b) a síntese de DNA cessou durante 7 minutos, seguida por uma retomada da síntese em uma taxa 5 - a 10 vezes maior. (c) Ao mesmo tempo, Monod e Wollman (121) mostraram que a síntese de uma enzima celular, a β -galactosidase indutível, era inibida após a infecção por fagos. Estas experiências dividiram o período de eclipse viral em fases precoce (antes da síntese de DNA) e tardia. Mais importante ainda, estes resultados deixaram claro que um vírus pode reorientar os processos celulares de síntese macromolecular em células infectadas (29).

Ao final de 1952, duas experiências tiveram um efeito crítico sobre este campo. Em primeiro lugar, Hershey e Chase (77) usaram proteínas virais diferencialmente marcadas por (^{35}S) e ácidos nucleicos também marcados com (^{32}P) para seguir a adesão do fago à bactéria. Eles foram capazes de cisalhar as capas de proteínas virais das bactérias, utilizando um liquidificador de Waring e, assim, deixar apenas o DNA associado com as células infectadas. ***Isto permitiu-lhes provar que o DNA tinha todas as informações necessárias para reproduzir 100 novos vírus!*** A experiência de Hershey-Chase veio no momento certo para ser apreciada à luz da nova estrutura do DNA elucidada por Watson e Crick um ano depois e publicada em 25 de Abril de 1953 na Nature (160). Juntas, essas experiências formaram uma pedra angular da revolução da biologia molecular (22).



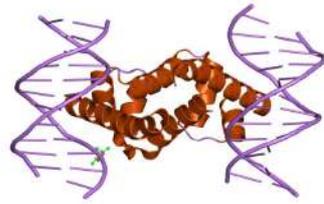
James D. Watson (1928) e Francis Crick (1916-2004)

O segundo experimento em virologia realizado em 1953, que teria uma influência importante, foi feito por Wyatt e Cohen (170). Eles identificaram uma nova base, hydroxymethylcytosine, em fagos de DNA T-pares; esta nova base tomou o lugar de citosina, que estava presente no DNA bacteriano (*i.e.*, a descoberta da metilação do DNA). Isto iniciou um estudo de 10 anos de como desoxi-ribonucleótidos eram sintetizados em bactérias e células infectadas por fagos, e que conduziu à observação fundamental que o vírus introduzem informação genética para a uma nova enzima na célula infectada (56).

Por volta de 1964, Cohen et al (29) provou que a hidroximethylase não existe nas células não infectadas e deve ser codificada pelo vírus. Estas experiências introduziram o conceito de funções virais precoces (*early genes*), utilizadas na biossíntese de deoxi-pirimidina e replicação do DNA (96), e apresentou provas bioquímicas claras que o genoma do vírus contém informação genética que é expressa como proteínas em células infectadas. A subsequente análise detalhada da genética destes fagos identificou e mapeou os genes que codificam para as proteínas de fagos, expandindo o conceito molecular da relação entre genótipo e fenótipo. De fato, a análise genética do rII cistrons A e B de fagos-T mesmo tornou-se um dos exemplos mais bem estudados de uma “estrutura genética fina” (10,11). A replicação do DNA viral utilizando mutantes de fagos e extratos para complementar e purificar atividades enzimáticas *in vitro* contribuiu muito para o nosso entendimento moderno de como o DNA é duplicado (1). Em suma, uma análise detalhada genética da morfogênese de fagos, utilizando a complementação de fagos mutantes na montagem *in vitro*, é um exemplo crucial e lúcido de como estruturas complexas são construídas por organismos vivos utilizando os princípios de auto-montagem (43). A análise genética e bioquímica da lisozima de fagos ajudou a elucidar a natureza molecular das mutações (147), e as mutações âmbar de fagos forneceu de forma clara para o estudo de mutações supressoras ao nível molecular (12). O mapa genético circular dos fagos T-pares (146) foi entendido como tendo uma conformação circularmente permutada, com DNA com terminais redundantes (dando origem a fagos heterozigotos).

A notável reprogramação da síntese de proteínas virais e celulares em células infectadas por fagos foi revelada de forma dramática por um dos primeiros usos de géis de poliacrilamida com dodecil sulafato de sódio (SDS) (100), mostrando que as proteínas virais são traduzidas numa sequência específica de eventos, em classes temporais distintas, subdividindo as proteínas precoces das tardias, mostrando que como em qualquer outro organismo vivo, a ontologia viral segue um programa de desenvolvimento definido e recorrente.

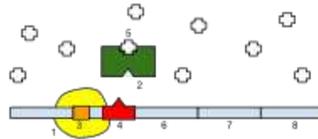
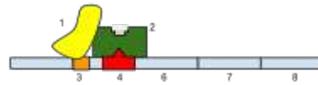
O mecanismo subjacente a esta regulação temporal levou à descoberta dos fatores Sigma que modificam a atividade da RNA-polimerase conferindo especificidade para genes distintos (71). O estudo da regulação genética em quase todos os níveis (transcrição, estabilidade de RNA, síntese de proteínas, processamento de proteína, &c.), foi possibilitado a partir de um conjunto de contribuições originais derivadas da uma análise das infecções por fagos.



Fator Sigma E (http://en.wikipedia.org/wiki/Sigma_factor)

Embora este progresso notável começou com os fagos, ninguém sabia muito bem o que fazer com os fagos lisogênicos. Isso mudou em 1949, quando André Lwoff no Instituto Pasteur começou seus estudos com o *Bacillus megaterium* e seus fagos lisogênicos. Através da utilização de um micromanipulador, ele mostrou que bactérias individuais dividem-se 19 vezes, sem nunca liberar um vírus. Quando as bactérias lisogênicas foram lizadas de fora, nenhum vírus foi detectado. Mas, de vez em quando, uma bactéria espontaneamente entrava em fase lisogênica produzindo muitos fagos (115). A influência da luz ultravioleta, induzindo a liberação desses vírus, foi uma observação fundamental que possibilitou delinear esta curiosa relação entre um vírus e seu hospedeiro (116).

Por volta de 1954, Jacob e Wollman (87, 88), no Instituto Pasteur, tinham feito a observação importante que um cruzamento genético entre uma estirpe lisogênica bacteriana (Hfr, lambda) e uma recipiente não-lisogênica resultava na indução do vírus após a conjugação, num processo de eles denominaram de indução zigótica. De fato, a posição do fago lisogênico ou profago no cromossoma da *E. coli* hospedeira era possível de ser mapeada por experimentos de ‘acasalamento interrompido padrão’ durante o cruzamento genético (88). Este foi um dos experimentos mais críticos para a compreensão conceitual da lisogenia viral por várias razões: (a) mostrou que um vírus se comportava como um gene num cromossoma bacteriano numa bactéria, (b), foi um dos primeiros resultados experimentais que sugeriu que o material genético viral era mantido silencioso (*i.e.*, não transcrito) em bactérias por regulação negativa, que era ativada quando o cromossoma de doadoras lisogênicas passava para hospedeira receptora não lisogênica, e (c) estes resultados auxiliaram Jacob e Monod perceber em 1954, que a indução de síntese de enzimas e o desenvolvimento de fagos são conseqüências de um mesmo fenômeno (115). Estes experimentos lançaram as bases para o modelo do **Operon** e a natureza da coordenação da regulação de genes.



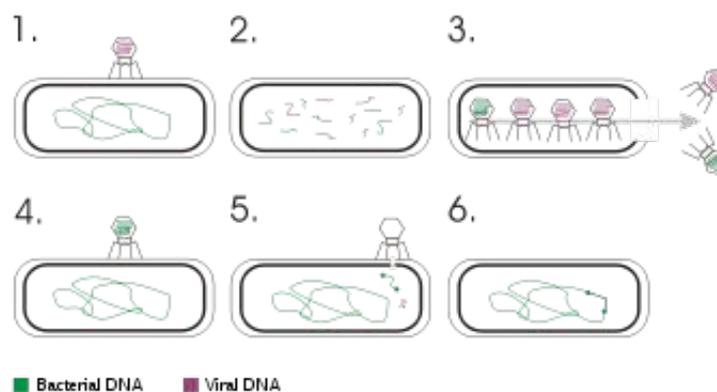
Lac Operon (<http://en.wikipedia.org/wiki/Operon>)



François Jacob (1920) e **Jaques Monod** (1910-1976)

Embora a estrutura do DNA foi elucidada em 1953 (160) e a indução zigótica foi descrita em 1954, a relação entre o cromossoma bacteriano e o cromossoma viral em lisogenia ainda era mencionada como o “local de ligação” e literalmente pensada nesses termos. A relação estreita entre um vírus e o hospedeiro não foi entendida até que Campbell em 1968 (23) propôs a integração do genoma de DNA (inserção e ligação covalente) do fago lambda no cromossoma bacteriano, com base no fato de que sequências de marcadores de fagos eram diferentes no estado integrado das do estado vegetativo ou replicativo. Isto levou ao isolamento do regulador negativo ou repressor de lambda, uma compreensão clara da imunidade em lisógenos, e um dos primeiros exemplos de como os genes são regulados de forma coordenada (130). A análise genética do ciclo de vida do bacteriófago lambda é uma das grandes aventuras intelectuais da genética microbiana em particular e da biologia em geral (76), que culminou com a elucidação do código genético por Crick em 1953. Esta fase magnífica da aquisição do entendimento da interação de genes, genomas e organismos embasa a Biologia moderna e de sistemas e merece ser conhecida e revista em detalhes por todos os estudantes de Virologia e Biologia Molecular.

Os fagos lisogênicos (e.g., o fago P22 de *Salmonella typhimurium*) proporcionaram o primeiro exemplo de transdução generalizada (172), ao passo que lambda proveu o primeiro exemplo de transdução especializada (123). O fato de que vírus podem carregar consigo genes celulares e transferir tais genes de uma célula para outra, proveu um método para o mapeamento genético fino e um novo conceito em virologia.



Transdução (http://en.wikipedia.org/wiki/Transduction_%28genetics%29)

À medida que os elementos genéticos de bactérias foram estudados em maior detalhe, verificou-se que existia uma continuidade notável de fagos lisogênicos, epissemos, transposons, e retrotransposons, elementos de inserção, retrovírus, hepadnavirus, viróides, virosídes (nas plantas), e de algum modo remoto até com príons (i.e., a transferência de configuração patogênica de formas patogênicas para não patogênicas por contato molecular em tecidos nervosos, após ingestão da forma patogênica). A informação genética move-se entre vírus e seus hospedeiros a ponto onde definições e classificações começam a se confundir e perder o sentido.

Os conceitos genéticos e bioquímicos que derivam do estudo de bacteriófagos tornou a próxima fase da virologia possível. As lições dos fagos líticos e lisogênicos foram muitas vezes reaprendidas e modificadas à medida que vírus de animais foram sendo estudados.

Os vírus de animais

O período inicial (1898 - 1965): Descoberta e Cultura de Células

Alguns dos destaques do início do período de Virologia animal estão resumidos na Tabela 1 abaixo. Uma vez que o conceito de um vírus filtrável foi estabelecido, este procedimento experimental foi aplicado a muitos tecidos animais doentes. Foram encontrados agentes filtráveis invisíveis ao microscópio de luz, que replicavam apenas em tecidos animais vivos. Houve algumas surpresas, como a identificação do vírus da febre amarela que é transmitido por um mosquito vector (132), o achado de corpos de inclusão específicos visíveis em células infectadas (vírions e efeito

citopático) em tecidos infectados (85, 125), e mesmo agentes virais que podem causar câncer (46, 134). Ao longo deste período inicial (1900 - 1930), uma grande variedade de vírus foram encontrados (Tabela 1) e caracterizados de acordo com o seu tamanho (utilizando os diferentes tamanhos de poros de filtros), a resistência a agentes químicos ou físicos (por exemplo, álcool, éter), e efeitos patogênicos.

Apenas com base nessas propriedades, tornou-se claro que os vírus eram um grupo muito diversificado de agentes. Alguns foram até observados ao microscópio de luz (por exemplo, vaccinia em microscopia de campo escuro ótica e poliedros e grânulos de baculovírus em microscopia com contraste de fase), quando as estruturas eram maiores que 450 nm. Alguns agentes eram inativados por éter, enquanto que outros não. O que depois foi associado à presença ou ausência de envelope lipídico de origem celular envolvendo o virion. Foi observado que uma vasta gama de doenças virais afetavam todos os tipos de tecido e, que vírus davam origem a doenças crônicas ou agudas, que eles eram agentes persistentes ou de recorrência periódica (surto epidêmicos). Entende-se que os vírus podem causar a destruição celular ou induzir a proliferação celular.

Para os virologistas incapazes de ver seus agentes em um microscópio de luz e muitas vezes confundidos por esta grande diversidade, certamente foi necessário um elemento de fé conceitual nesta fase inicial da Virologia. Em 1912, Wolbach, um patologista americano, observou que “é bem possível que quando o nosso conhecimento do vírus filtráveis for mais completo, a nossa concepção da matéria viva mude consideravelmente, e que vamos parar de tentar classificar os vírus filtráveis como animal ou planta” (166). A resolução deste estado de indefinição conceitual inicial foi liderada pelos virologistas de plantas e pelo desenvolvimento de técnicas para purificar vírus e para caracterizar propriedades químicas físicas desses agentes (ver seção anterior, os vírus de plantas e do Período de química: 1929 - 1956). O segundo caminho veio dos estudos com bacteriófagos, onde células individuais infectados com vírus em cultura que eram muito mais passíveis de manipulação experimental deram respostas claras do que em infecções experimentais em animais inteiros.

Enquanto os virologistas de plantas de então estavam atrelados às estufas e os virologistas animais aos biotérios, os vírus de bactérias foram estudados de forma eficiente, expediente e cômoda em placas de Petri e tubos de ensaio. O progresso na simplificação dos sistemas experimentais em estudo foi obtido um passo de cada vez, a partir de estudos em animais selvagens, depois em animais de laboratório, tais como o rato (63) ou os ovos de galinha embrionados (167), depois em culturas de explantes de tecidos *in vitro*, e, em seguida, para células isoladas em culturas de tecido primárias e depois estabelecidas.

Entre 1948 e 1955, a transição crítica na conversão da Virologia animal em uma ciência de laboratório ocorreu em quatro etapas importantes: (a) Sanford *et al.* (137) do Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos USA estabeleceu a cultura de células individuais, (b) Gey *et al.* (68) cultivaram células humanas para a primeira vez e desenvolveram uma linha de células (HeLa) a partir de um carcinoma cervical, (c) Eagle (42) no NIH desenvolveu um meio ideal para a cultura de células individuais, e (d) Enders *et al.* (49), em uma demonstração da utilidade de tudo isto, mostrou que o poliovírus poderia replicar num explante não neuronal de tecidos embrionários

humanos. Essas idéias, realizações técnicas e materiais experimentais tiveram dois efeitos imediatos na Virologia. Em primeiro lugar, levaram ao desenvolvimento da vacina contra a poliomielite, a primeira vacina produzida em cultura de células. De 1798 a 1949, todas as vacinas em uso (varíola, raiva, febre amarela, gripe) eram cultivadas em animais ou ovos embrionados de galinha. Poliovírus foi cultivado em células de rim de macaco (78, 106) incubadas em frascos. Segundo, o uso de cultura de células para o estudo de vírus iniciou a era moderna de Virologia Molecular.

O primeiro ensaio de placa (“plaque assay”) de um vírus animal na cultura foi feito com o poliovírus (38), e isto conduziu a uma análise tão detalhada e importante como o trabalho sendo desenvolvido com bacteriófagos da época. A maneira mais simples para embasar esta afirmação vem da comparação da primeira edição do “General Virology” do Luria em 1953 (112) com a segunda edição por Luria e Darnell em 1967 (114) e examinar as descrições experimentais de infecção do poliovírus de células. A era atual de virologia havia chegado, mas continuaria a ser cheia de surpresas.

Tabela 1. Duzentos e vinte anos de descobertas (1796 a 2005, Preencha até 2012!)

Data	Descoberta
1796	Vírus da varíola bovina usado para vacinar contra a varíola (Jenner)
1885	Vacina contra a raiva é desenvolvida (Pasteur)
1892	Descrição do agente infeccioso filtrável (TMV) (Ivanovsky)
1898	Conceito de vírus como uma forma viva contagiosa (TMV) (Beijerinck)
1898	Primeira descrição de um vírus animal (FMDV) (Loeffler, Frosch)
1901	Primeira identificação da gripe aviária; vírus da peste de aves (Lode, Gruber)
1901	Primeira descrição de um vírus humano (vírus da febre amarela) (Reed et al.)
1903	O vírus da raiva é identificado (Remlinger, Riffat-Bay); corpos de inclusão de raiva descrito (Negri)
1908	vírus causador de Leucemia identificado (Ellerman, Bang)
1909	Poliovírus identificado (Landsteiner, Popper)
1911	Descoberta de vírus de tumor sólido (RSV) (Rous)
1912	A cultura de tecidos de um explante embrião de galinha (Carrel)
1913	Um dos primeiros exemplos da propagação de vírus em cultura de tecido (Steinhardt)
1915	Primeira descrição de vírus bacterianos (bacteriófagos) (Twort, d'Herelle)
1931	Propagação de vírus em ovos de galinha embrionados (Woodruff, Goodpasture)
1931	A utilização de ratos, como hospedeiros de vírus (Furth)
1931	Identificação de vírus da gripe suína (Shope)
1933	Identificação do vírus da gripe humana (Smith et al.)
1933	Identificação do papilomavírus do coelho (Shope)
1933	Tumores de ratos mamárias identificados (Equipe do Memorial Jackson Laboratory)
1935	Vírus do mosaico do tabaco cristalizado (Stanley)
1936	Indução de carcinomas em outras espécies pelo papilomavírus coelho (Rous; Beard)
1938	Vacina contra a febre amarela (Thieler)
1939	Um ciclo de crescimento em uma etapa para fagos (Ellis, Delbrück)
1941	Reconhecimento de hemaglutinação do vírus da gripe (HA); HA inibição pelo anticorpo.
1941	Descoberta do primeiro vírus associado (enzima receptor destruindo, neuraminidase) enzima (Hirst)
1946	Infecção com misturas de bacteriófago distintos leva a recombinação genética (Delbrück)

- 1947 Mutação e de reparo do DNA em bacteriófagos (reativação por multiplicidade) (Luria)
- 1948 Replicação de poliovírus em cultura de células não neuronais (Enders, Weller, Robbins)
- 1948 Cultura de células de animais individuais (Sanford)
- 1952 Ensaio de placa para poliovírus (Dulbecco)
- 1952 Genoma de bacteriófago é de ácido nucleico (Hershey, Chase)
- 1952 Transdução de informação genética (Zinder, Lederberg)
- 1952 Restrição e de modificação de ADN (Luria)
- 1954 Vacina contra a poliomielite é desenvolvida (Salk)
- 1955 Cultura estabelecida de células humanas (HeLa) (Gey et al.)
- 1955 Otimização de meio de crescimento celular (Eagle)
- 1955 Definição de um gene como um cistron (teste "cis-trans" de Lewis, 1951) (Benzer)
- 1957 In vitro montagem de vírus (TMV) (Fraenkel-Conrat, Williams)
- 1957 Descoberta de interferon (Isaacs, Lindemann)
- 1958 Bacteriófago lambda como paradigma de regulação gênica (Pardee, Jacob, Monod)
- 1958 Definição do episomo (Jacob, Wollman)
- 1961 Descoberta do RNA mensageiro (mRNA), utilizando bacteriófagos (Brenner, Jacob, Meselson)
- 1961 Elucidação do código de tripletes através de análise genética de bacteriófagos (Crick et al.)
- 1961 Definição genética de codões sem sentido como sinais de paragem da tradução em bacteriófagos (Campbell)
- 1963 Descoberta do vírus da hepatite B (Blumberg)
- 1964 Colinearidade de um gene bacteriófago com a cadeia polipeptídica (Sarabhai, Stretton, Brenner)
- 1964 Descoberta do vírus do tumor primeiro humano, EBV (vírus Epstein-Barr)
- 1966 Caminhos da montagem macromolecular de bacteriófagos (Edgar, Madeira)
- 1967 Phage λ »repressor isolado (Ptashne)
- 1967 Descrição dos viróides (Diener)
- 1970 Descoberta da transcriptase reversa retroviral (Temin, Baltimore)
- 1972 Fago recombinante A tecnologia do DNA I »e SV40 (Berg)
- 1973 Descoberta que o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) apresenta antígenos virais de linfócitos
- 1973 Mapa de enzimas de restrição de um primeiro genoma viral, SV40 (Nathans)
- 1974 Vetores de fagos lambda virais para a tecnologia de DNA recombinante (Murray, Davis, Blattner, Enquist)
- 1976 Oncogenes retrovirais são derivados de células (Bishop, Varmus)
- 1977 Splicing de RNA descoberto em adenovírus (Roberts, Sharp, Chow, Broker)
- 1978 Primeiro viral genoma sequenciado (phiX174, Sanger)
- 1978 Estrutura de cristal do vírus (TBSV) (Harrison)
- 1979 A descoberta da proteína supressora de tumor p53 ligado ao vírus símio vacuolar 40 (SV40), antígeno T (T)
- 1979 Organização Mundial de Saúde declara a varíola erradicada
- 1981 Desenvolvimento de clone recombinante infeccioso para um vírus de RNA, poliovírus (Racaniello, Baltimore)
- 1981 Estrutura da proteína do envelope viral primeiro (Wiley, Skehel, Wilson)
- 1983 Descrição do HIV-1 como agente causador do síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Montagnier)
- 1989 O vírus da hepatite C clonado (Houghton et al.)
- 1990 Terapia de gene humano com um vector de retrovírus
- 1994 Herpesvirus sarcoma de Kaposi descoberto (HHV-8) (Chang, Moore)
- 1997 Tratamento HAART para a AIDS
- 2003 Síndrome respiratória aguda grave surto (SARS) e contenção; identificação rápida de coronavírus humano
- 2005 Vírus da hepatite C propagado em cultura de tecidos (Chisari; Rice; Wakita)
- 2005 1918 genoma do vírus influenza reconstruído e sequenciado (Palese, Tumpey, Taubenberger)

O período moderno: 1960 até o presente

No texto acima, vimos que a informação foi apresentada em ordem cronológica ou em grupos separados de vírus (vírus de plantas, bacteriófagos e vírus de animais), o que reflete a separação histórica desses campos. Na próxima parte deste texto, o formato vai ser alterado porque a motivação para o estudo de vírus começou a mudar durante este período.

Virologistas começaram a usar vírus para sondar questões centrais para a compreensão de todos os processos da vida. Isto porque eles devem usar as regras, sinais, e vias reguladoras do hospedeiro, uma vez que os vírus se replicam e dependentes de suas células hospedeiras.

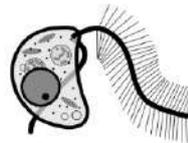
Virologistas começaram a dar contribuições em todas as facetas da biologia. A revolução de ideias que começaram com o grupo de fagos foi abraçada e estendida pelos virologistas animais. Ademais, durante o período de 1970 até o presente, a revolução do DNA recombinante começou, e ambos os bacteriófagos e vírus de animais desempenharam um papel crítico e central na revolução. Os vírus foram utilizados para sondar muitas questões diversas em biologia. Por estas razões, a organização desta seção concentra-se nas realizações da biologia celular e molecular, onde os vírus foram usados. Alguns dos marcos da Virologia desde 1970 estão listados na Tabela acima.

Livro 1, Capítulo 1

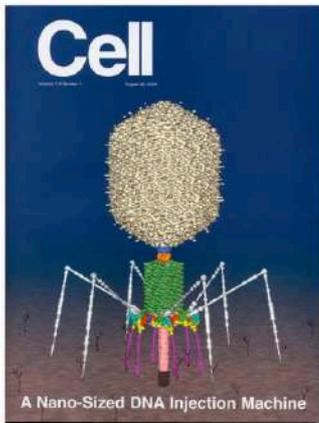
Fonte: Flint et al., Principles of Virology (3rd & 4th Edition).
Edições por Daffiny Suman & Paolo Zanotto

We live and prosper in a cloud of viruses

- Viruses infect all living things
- We regularly eat and breathe billions of virus particles
- We carry viral genomes as part of our own genetic material



The number of viruses on Earth is staggering



More than 10^{30} bacteriophage particles in the world's waters!



- A bacteriophage particle weighs about a femtogram (10^{-15} grams)

$10^{30} \times 10^{-15}$ = the biomass on the planet of BACTERIAL VIRUSES ALONE exceeds the biomass of elephants by more than 1000-fold!

- The length of a head to tail line of 10^{30} phages is 100 million light years!

<http://www.phagehunter.org/2008/09/how-far-do-those-phages-stretch.html>

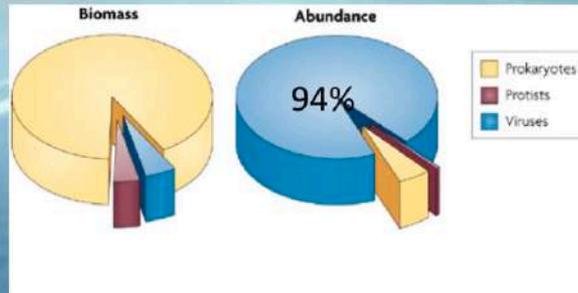
Virology Lectures 2018 • Prof. Vincent Racaniello • Columbia University



Excretam $10E13$ vírions de calicivírus por grama de feses por dia.

Viruses are not just purveyors of bad news

*More viruses in a liter of coastal seawater
than people on Earth*



Virology Lectures 2018 • Prof. Vincent Racaniello • Columbia University

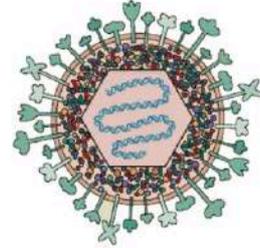
**There are $\sim 10^{16}$ HIV genomes
on the planet today**



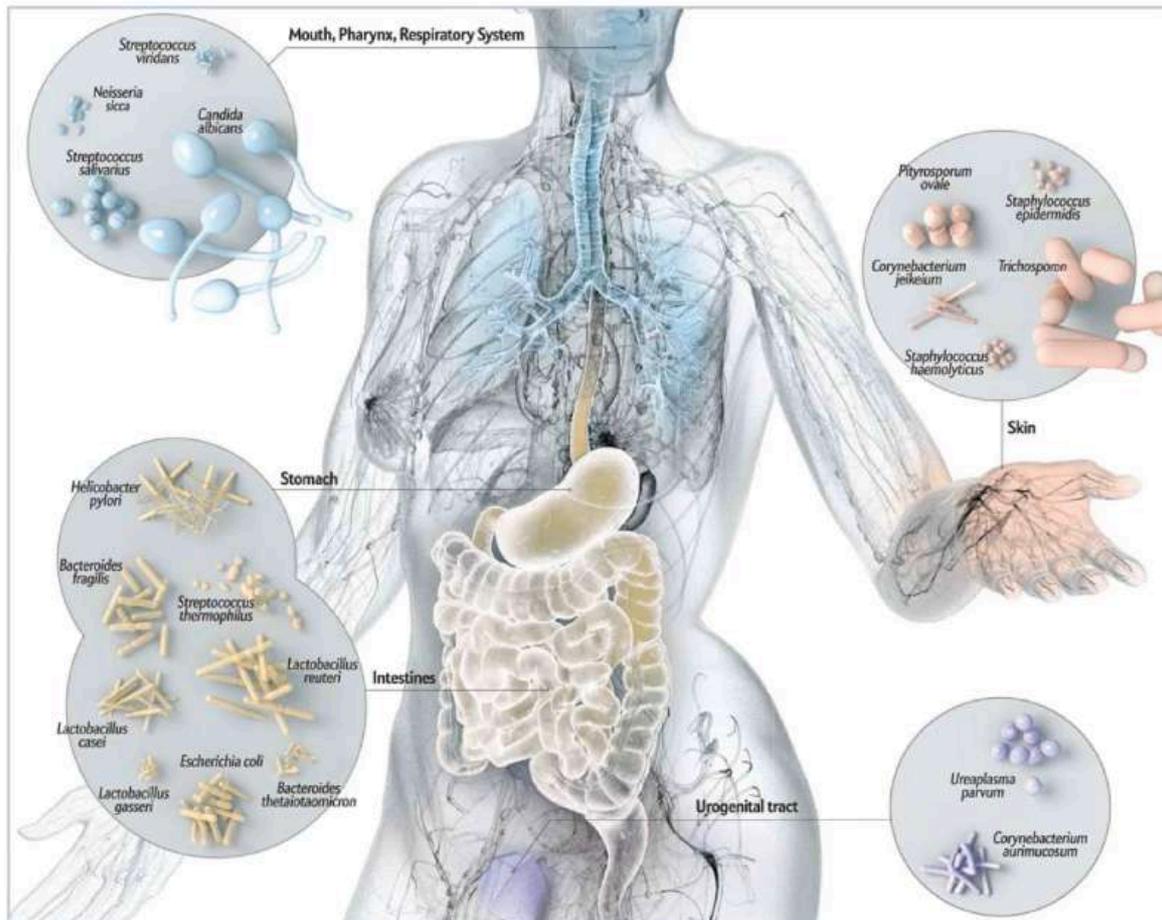
Virology Lectures 2018 • Prof. Vincent Racaniello • Columbia University

How 'infected' are we?

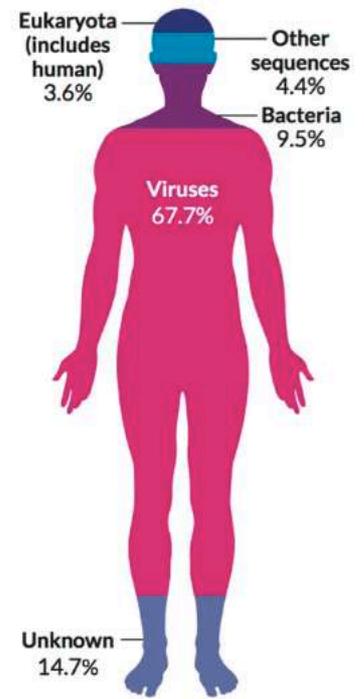
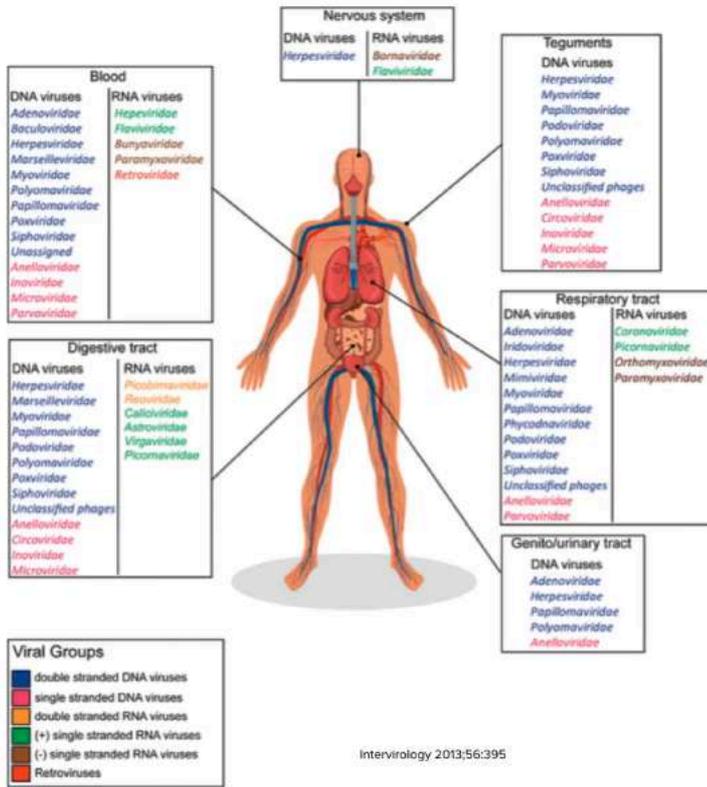
- HSV-1, HSV-2, VZV, HCMV
EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8
- Once infected, it is for life



Microbiome

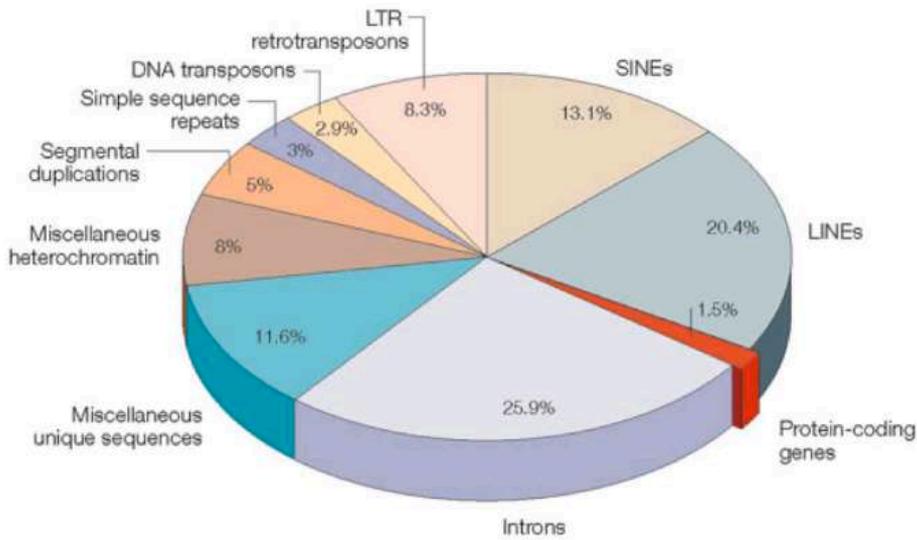


Virome



Na esquerda você vê os vírus comumente associados aos diferentes tecidos.
Na direita NGs mostra que 67.7% do DNA no seu sangue é viral!

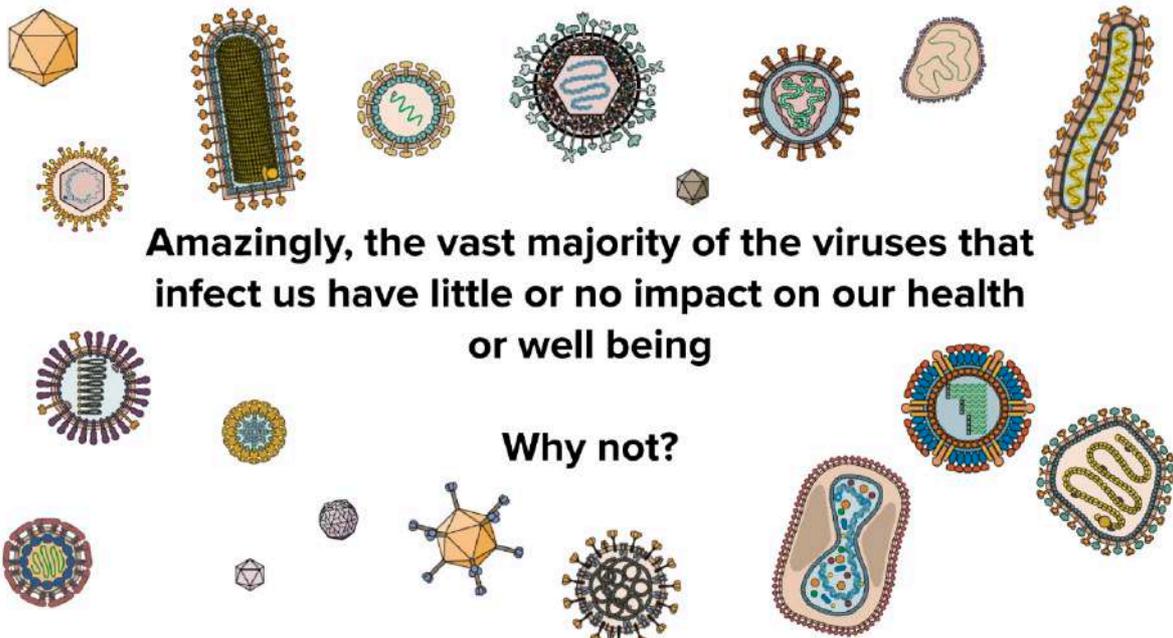
The Human Genome



3.2 billion bases

LINES & SINES, LTR de retrotransposons

Porcos tem muitos virus endógenos. Em Harvard tiraram os ERV dos procos para órgãos.



Most viruses just pass through us

We ingest many non-animal viruses regularly with foods



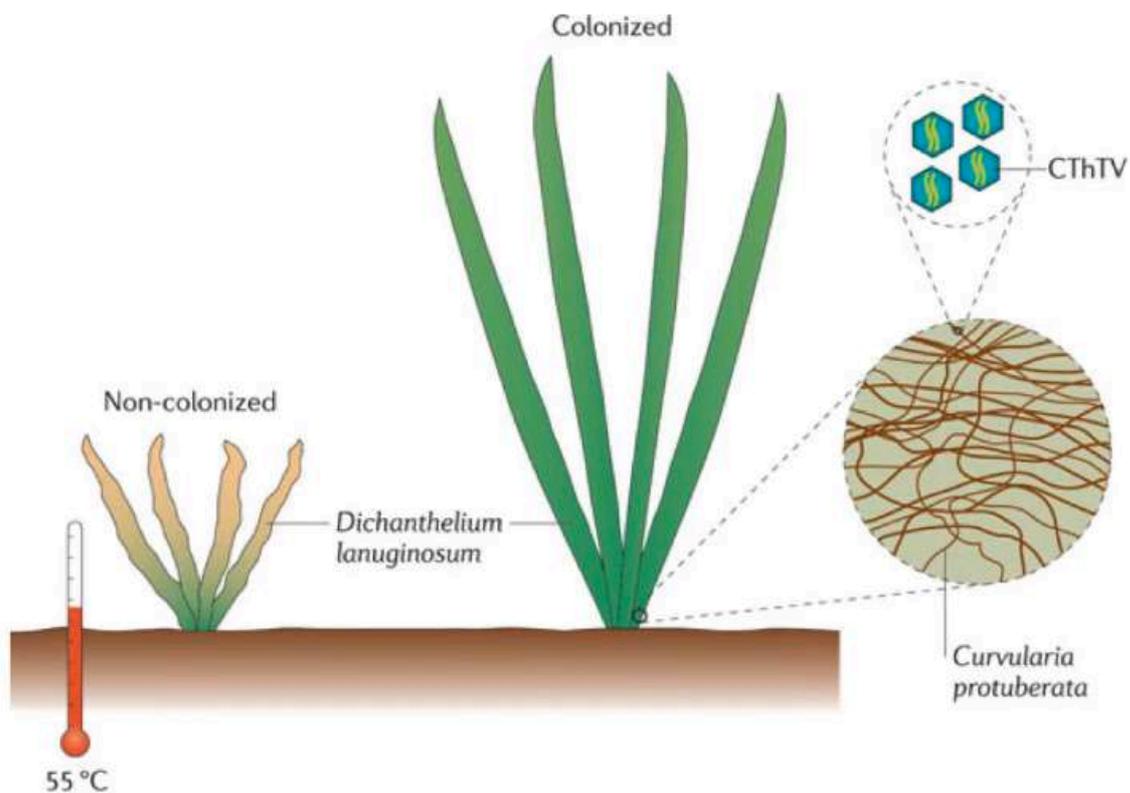
...in one study it was found that cabbage purchased from 5 different supermarkets in the Washington D.C. area were all contaminated with baculoviruses to such an extent that each serving (about 100 cm² of leaf material) would contain up to 10⁸ particles of a virus pathogenic for the cabbage looper



- Metagenomic analysis of RNA viruses in human feces reveal that most viral sequences are similar to plant viruses
- Of 36,769 sequences obtained, 25,040 (91%) resembled plant viruses
- Most abundant human fecal virus: pepper mild mottle virus, 10⁹ virions per gram of dry fecal matter.

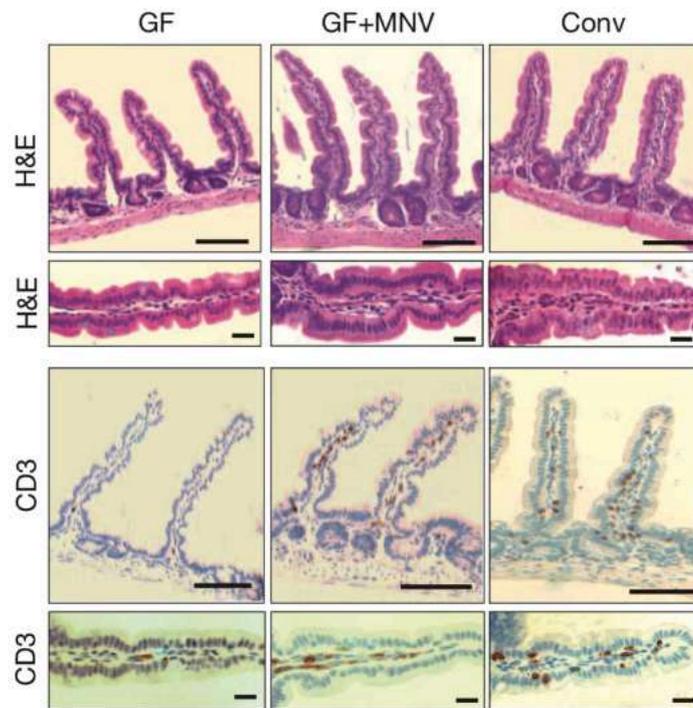
Vírus passam por você e não te afetam.

The good viruses

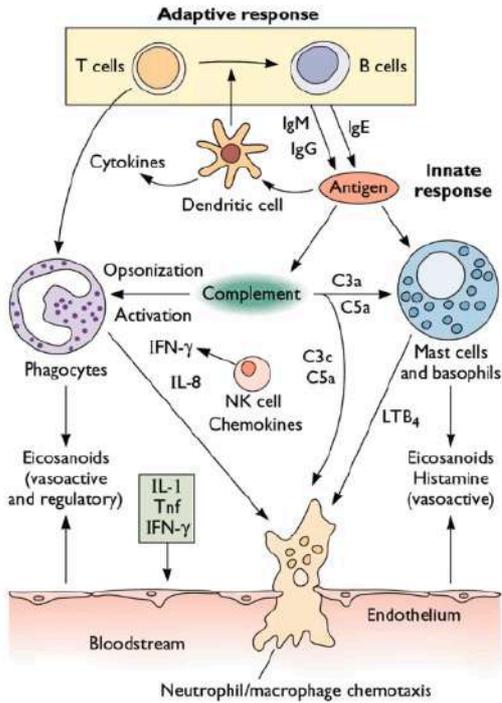


Gramas que crescem em ambientes quentes devido `a presença de um fungo que tem termo tolerância devido a um virus CThTV. Mutialismo fungo-virus-planta.

An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria



Norovirus restoram o desenvolvimento normal do intestino de roedores. GF: ratos Germ Free (Esquerda), Conv, ratos convencionais. No painel abaixo vê-se que os GF tem poucos linfócitos T (marrom) e o MMV (norovirus) restora células T nos ratos GF (GF + MNV)

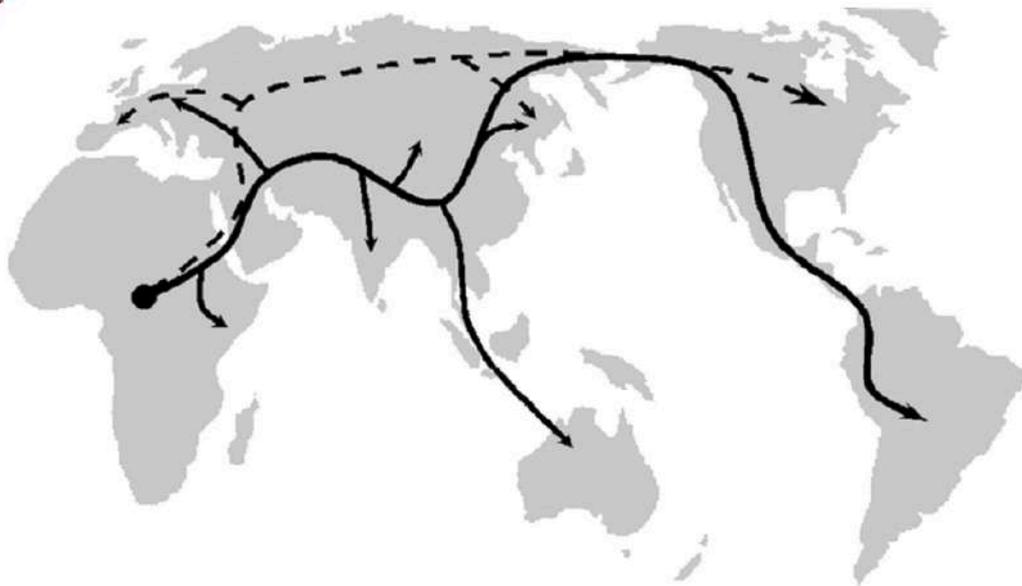


We have an amazing immune system

O sistema immune controla a invasão viral.

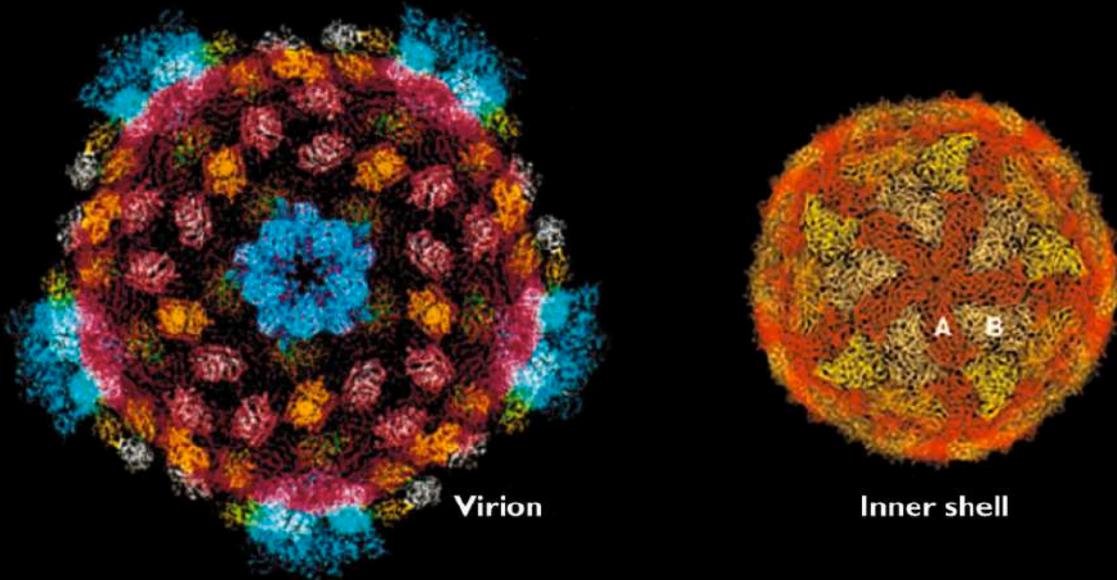


Not all human viruses make you sick...



Poliomavírus humano, só é patogênico em imunodeprimidos. Acompanha a migração humana (- - -) melhor que o DNA (-----) humano.

Viruses are amazing



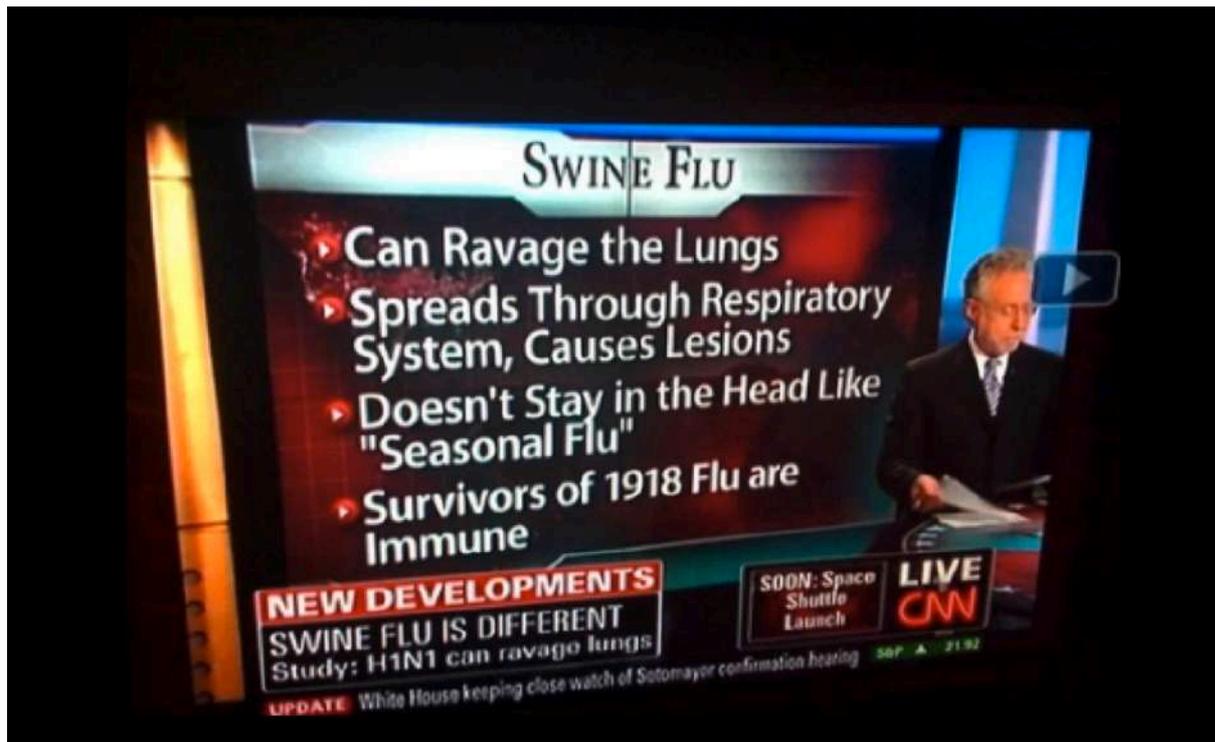
Virology is an integrative science

Virologia integra ecologia, biologia molecular, epidemiologia, etc.

Course goals

- This course is designed to help you see the 'big picture' of virology
- I'll show you how to think about virology as an integrative discipline, not an isolated collection of viruses, diseases, or genes
- You will learn the fundamentals about these molecular wizards that amaze the informed and *frighten the uninformed*

Curso baseado em princípios não em vírus!



Imprensa distribui medo e apreensão em 2009 H1N1 estudo em ferrets mas eles dizem que isto é que acontece em humanos mas em ferrets a doença é muito mais séria e agressiva.

Which statement is true?

1. All viruses make us sick and can be lethal
2. Our immune system can manage most viral infections
3. Humans are usually infected with one virus at a time
4. The press is usually correct in their virology reporting
5. Our immune system cannot handle most viral infections

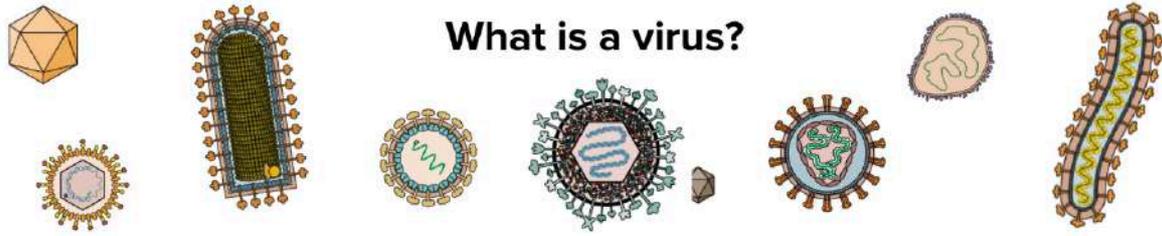
2 Which statement is true?

HOW'D WE DO? 83/110 students answered

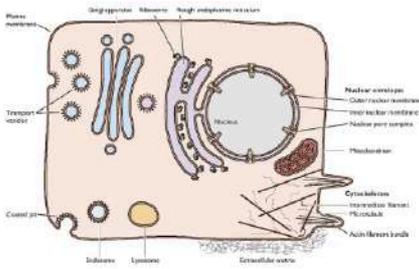
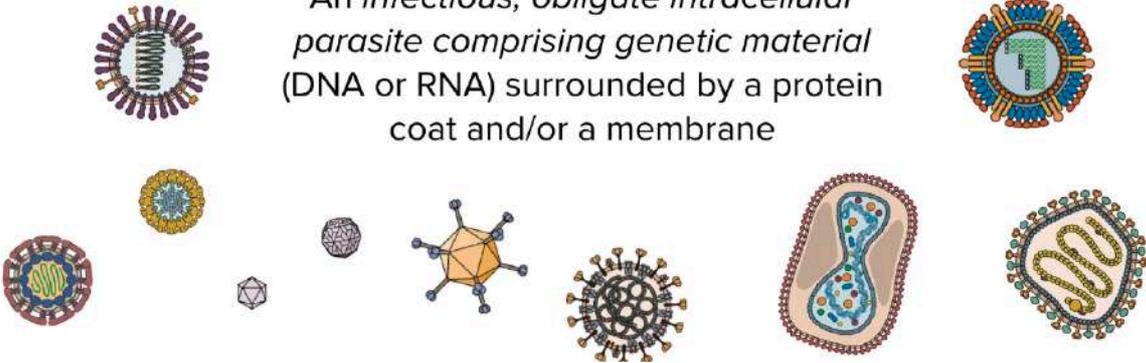
A	All viruses make us sick and can be lethal	0%
B	Our immune system can manage most viral infections	99%
C	Humans are usually infected with one virus at a time	0%
D	The press is usually correct in their virology reporting	1%
E	Our immune system cannot handle most viral infections	0%

▼ SHOW EXPLANATION

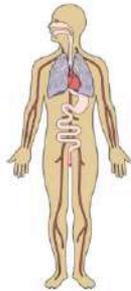
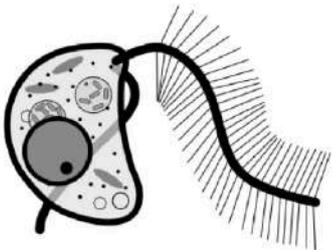
What is a virus?



An infectious, obligate intracellular parasite comprising genetic material (DNA or RNA) surrounded by a protein coat and/or a membrane



As viruses are obligate molecular parasites, every solution must reveal something about the host as well as the virus



Are viruses alive?

Yes - (1917 votes)



No - (2102 votes)



They are something in between - (

1959 votes)



I don't know - (295 votes)



Total Answers 6368

Total Votes 6367

<http://www.virology.ws/are-viruses-alive/>

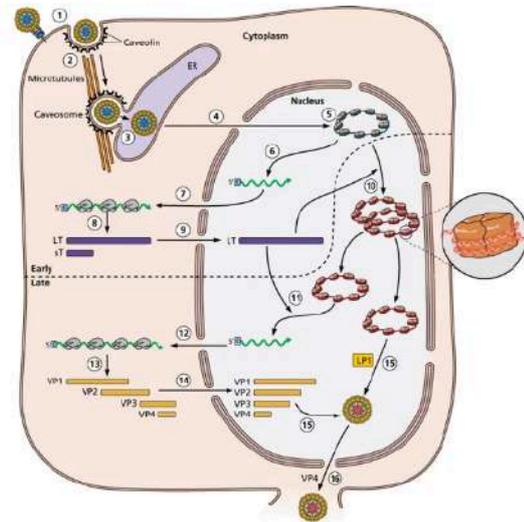
The virus and the virion

A virus is an organism with two phases



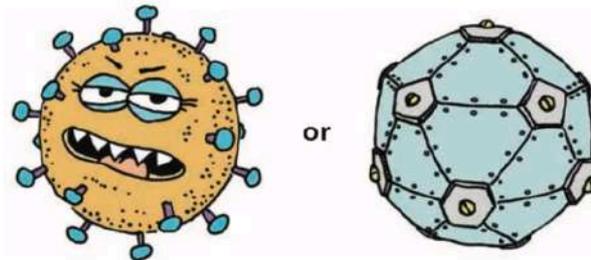
virion (infectious particle)

Prof. Vincent Baranillo - Columbia University



infected cell

Be careful: Avoid anthropomorphic analyses



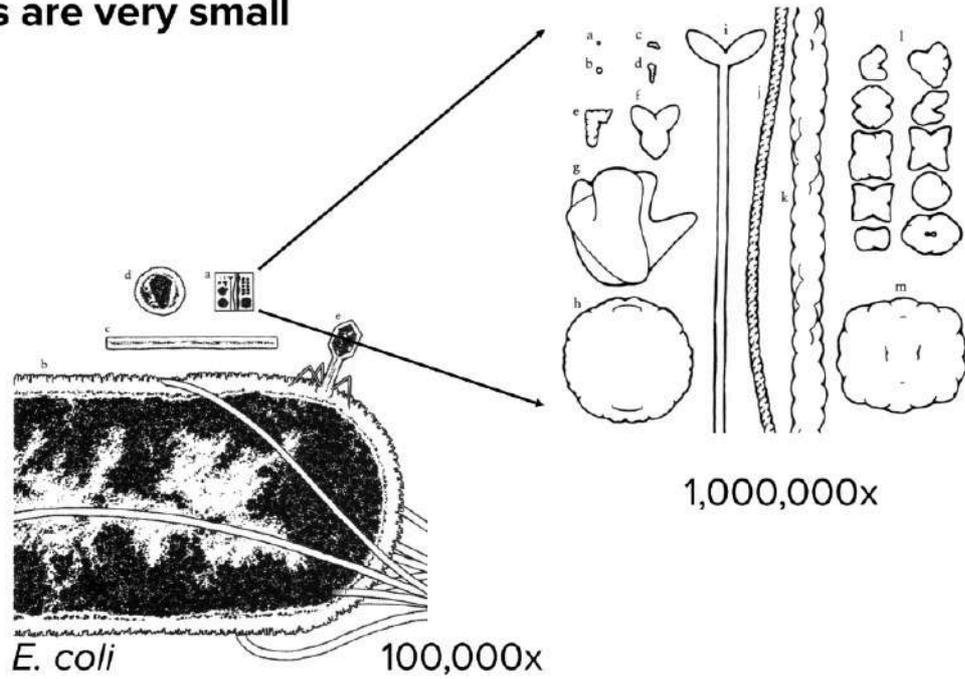
Viruses do NOT think!

(or employ, ensure, exhibit, display, etc...)

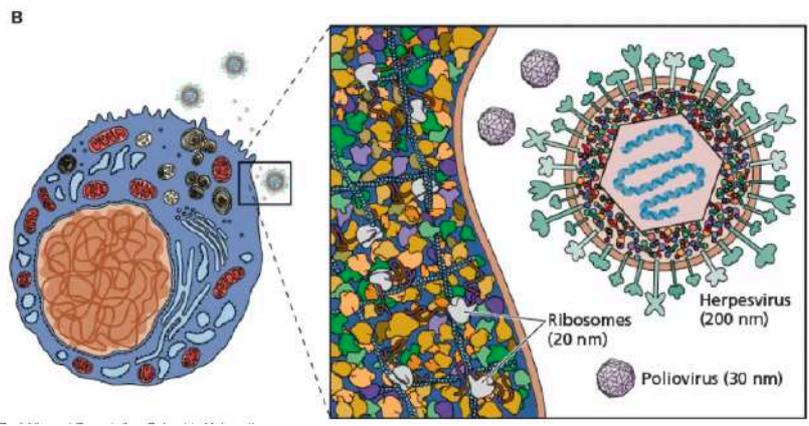
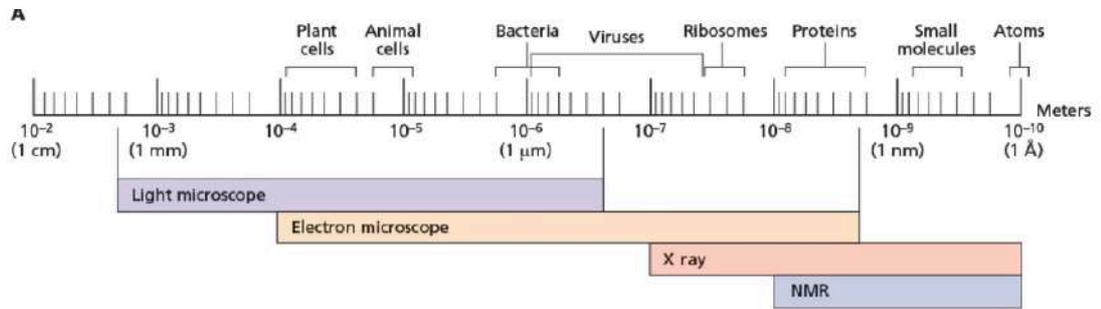
They do not achieve their goals in a human-centered manner

Viruses are passive agents!

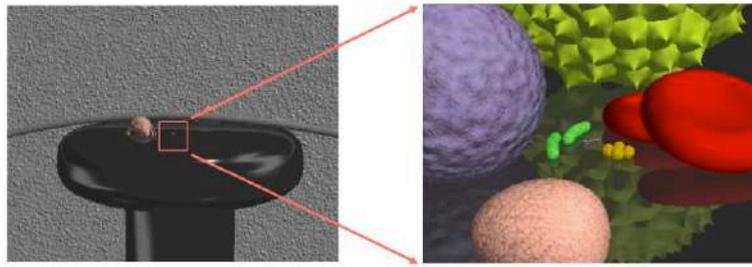
Viruses are very small



a) estruturas macromoleculares celulares: g) ribossomos, b) *E. coli*, c) vírus do mosaico do tabaco (TMV), d) HIV-1. H) poliovírus,



How many viruses can fit on the head of a pin?

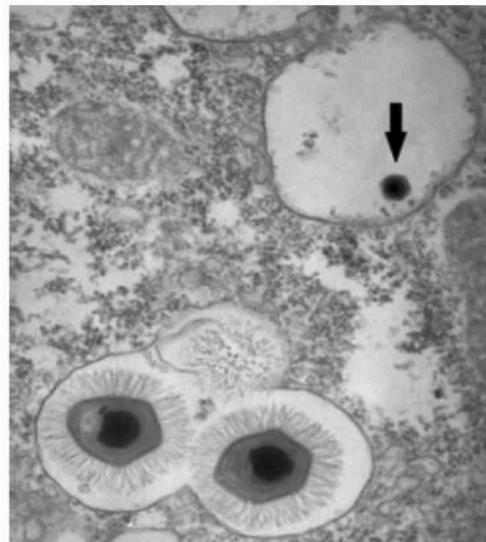
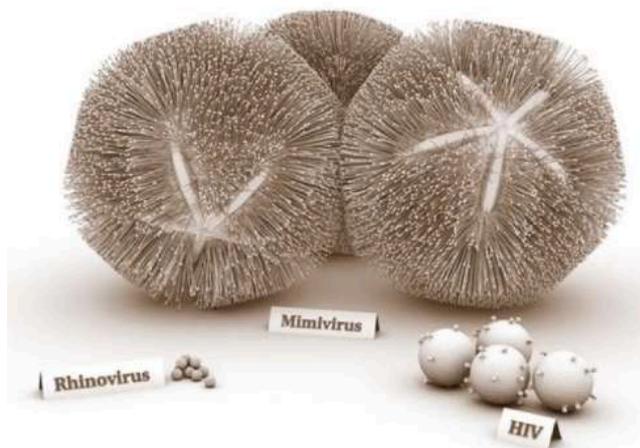


2 mm = 2000 microns

- 500 million rhinoviruses
- When you sneeze, you fire an aerosol that contains enough viruses to infect thousands

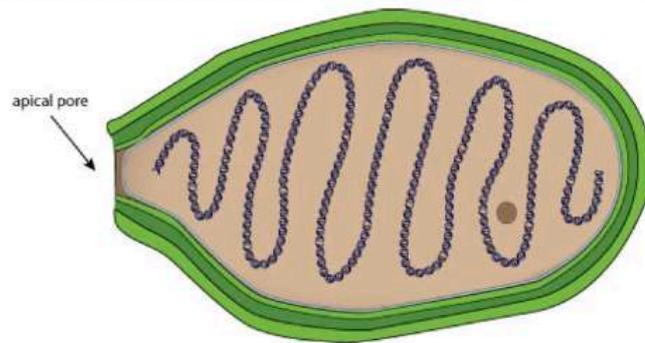
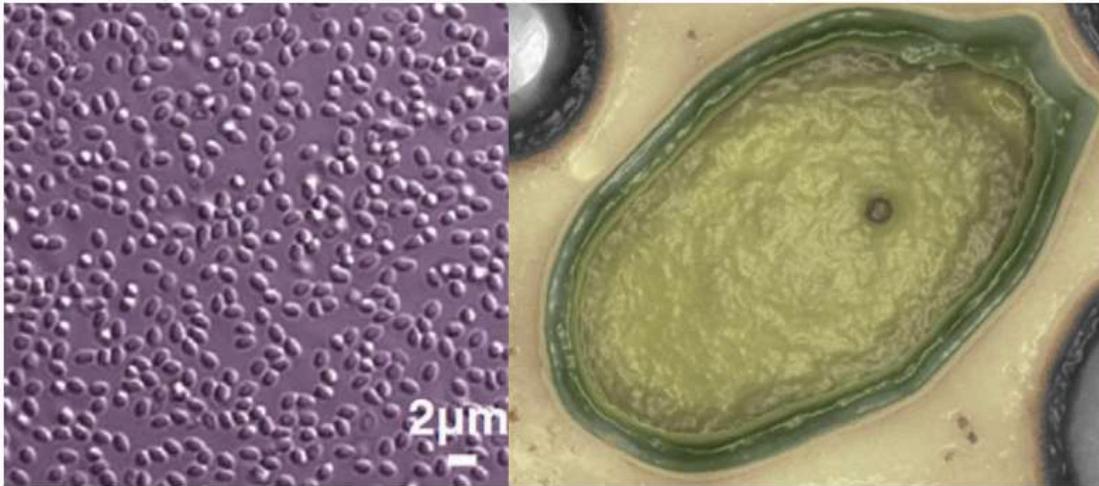
Not as small as we once thought!

AMERICAN
Scientist
July–August 2011
www.americanscientist.org



SIGMA XI
THE SCIENTIFIC RESEARCH SOCIETY

Pandoravirus

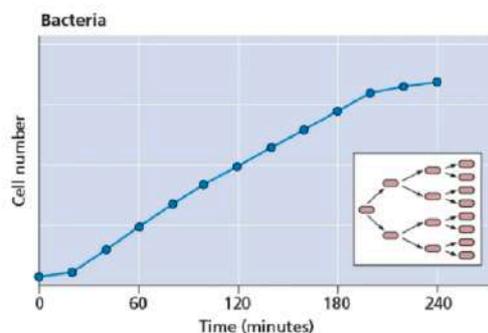
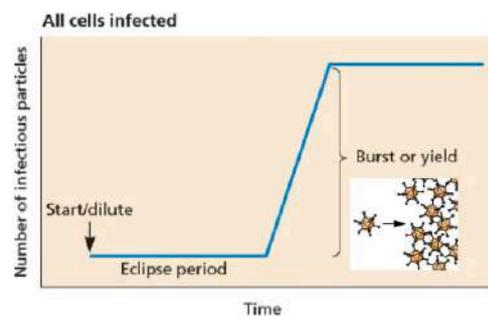


Descobertos em 2014.

Viruses replicate by assembly of pre-formed components into many particles

Make the parts, assemble the final product

Not binary fission like cells

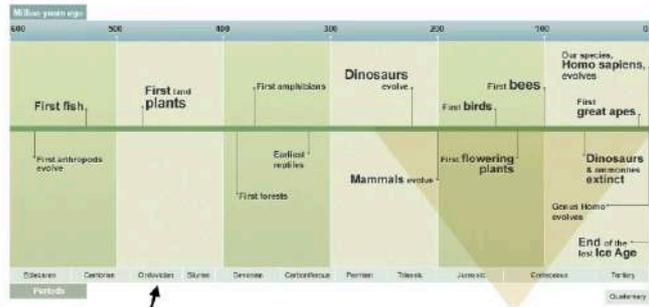


Vírus não dividem por fissão binária mas por produção explosiva de componentes!

How old are viruses?

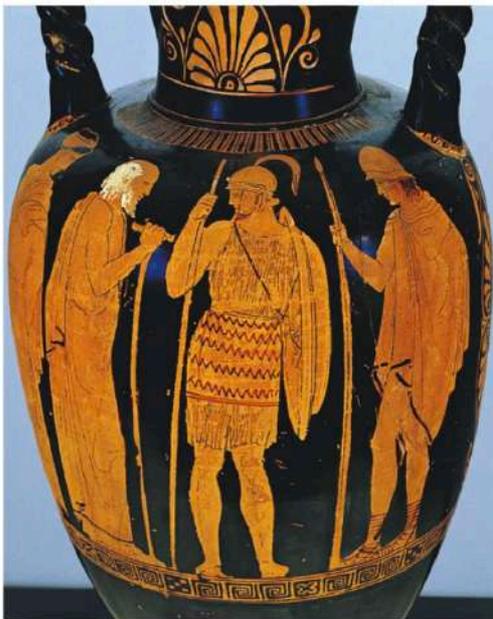


Nobu Tamura (<http://spinops.blogspot.com>)



- Estimates of molecular evolution suggest marine origin of some retroviruses >450 Ma, Ordovician period
- Likely originated billions of years ago - before cells?

Ancient references to viral diseases



Here this firebrand, rabid Hector, leads the charge.
Homer, *The Iliad*,
translated by Robert Fagels
(Viking Penguin)

700 B.C.



1580-1350 B.C.

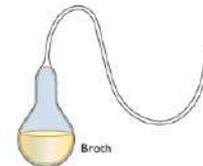
Immunization

- Variolation - China (11th century), Lady Montagu (1700s)
- No knowledge of agent
- Survivors of smallpox protected against disease
- 1790s - experiments by Edward Jenner in England establish vaccination



Concept of microorganisms

- Leeuwenhoek (1632 - 1723)
- Pasteur (1822 - 1895)
- Koch (1843-1910)



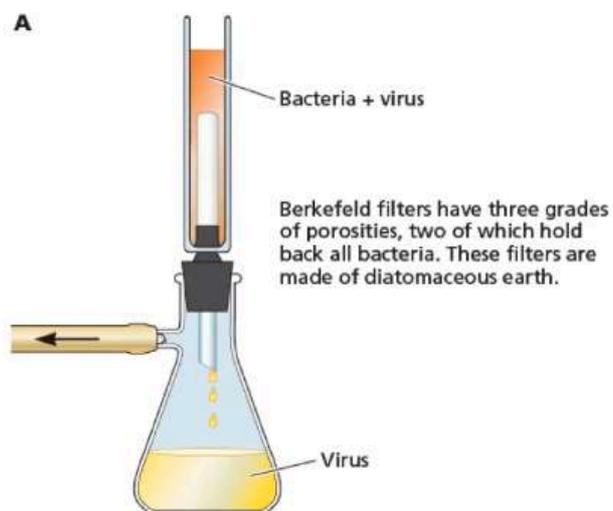
Leeuwenhoek viu pequenos organismos com seu primeiro microscópio.



Primeiro vírus conhecido!

Virus discovery - filterable agents

- 1892 - Ivanovsky
- 1898 - Beijerinck: *contagium vivum fluidum*
- Virus: slimy liquid, poison



O filtrado era infeccioso! “líquido venenoso”

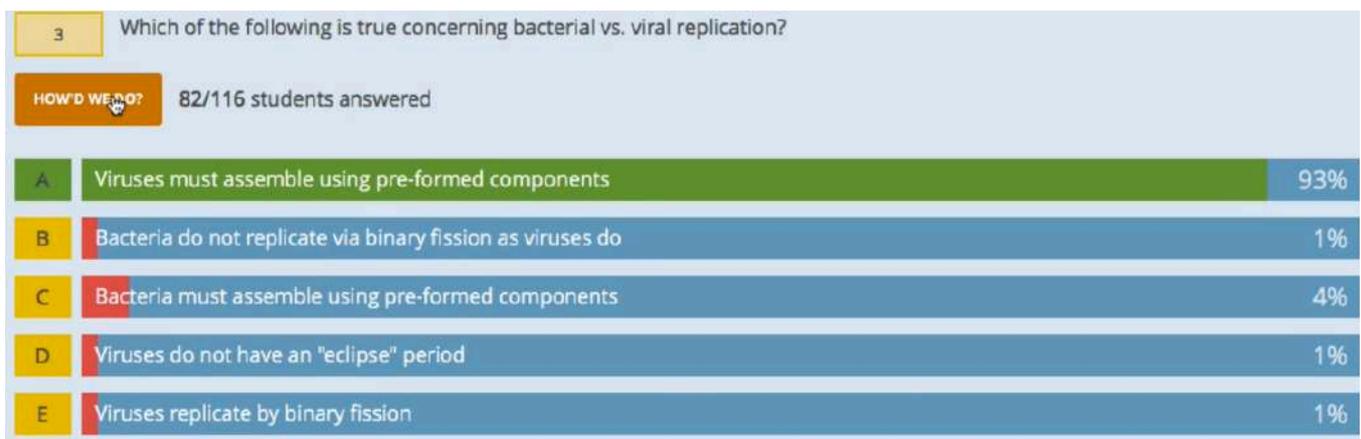
Virus discovery

- 1898 - Loeffler & Frosch - agent of foot & mouth disease is filterable
- Key concept: agents not only small, but replicate only in the host, not in broth
- 0.2 micron filters (μm , one millionth of a meter)



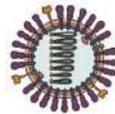
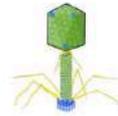
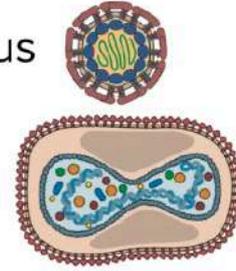
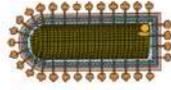
Which of the following is true concerning bacterial vs. viral replication?

1. Viruses must assemble using pre-formed components
2. Bacteria do not replicate via binary fission as viruses do
3. Bacteria must assemble using pre-formed components
4. Viruses do not have an "eclipse" period
5. Viruses replicate by binary fission



Virus discovery

- 1901 - first human virus, yellow fever virus
- 1903 - rabies virus
- 1906 - variola virus
- 1908 - chicken leukemia virus, poliovirus
- 1911 - Rous sarcoma virus
- 1915 - bacteriophages
- 1933 - influenza virus



Historia da Virologia, recapitulando em um breve sumário!

O caráter infeccioso dos vírus contribui para a seleção natural humana.

Os vírus que puderam se manter em contato mais intenso com o hospedeiro, de menor virulência, foram os primeiros a se adaptar no início da civilização. Ex: papilomavírus, herpesvirus e os retrovirus.

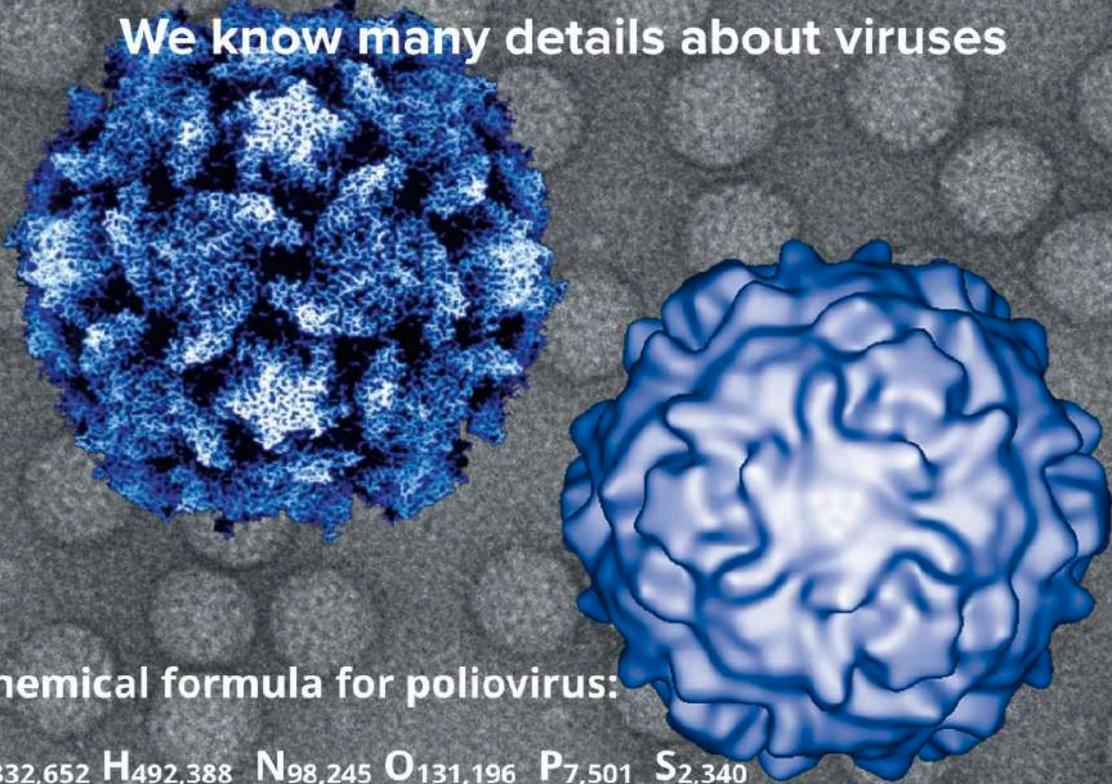
O primeiro experimento inoculou o sumo de plantas doentes em plantas saudáveis e isso levou o desenvolvimento da doença nas saudáveis - Adolf Meyer.

“Fluido vivo contagioso” - patógeno menor que bactéria e incapaz de ser visualizado no microscópio - Beijerinck (agentes filtráveis passavam por filtros nos quais as bactérias ficavam retidas).

A lise de bactérias poderia ser causada por ‘partículas’ - bacteriófagos - d’Herelle - “Vírus são sólidos geométricos e precipitáveis” que causavam placas transparentes em colônias confluentes de bactérias crescidas em placas de agar.

Proteínas obtidas partir do extrato de macerado de folha de tabaco com a doença do mosaico, após precipitação previa, eram sujeitas a eletroforese em gel. As amostras que formavam duas bandas (banda de proteínas de TMV & banda de anticorpo de coelho) que indicavam que a planta estava saudável. No entanto, quando uma banda só era formada na presença de anticorpo, isto indicava que a planta estava infectada pois o anticorpo de coelho se ligava á proteínas de capsídeo do TMV.

We know many details about viruses

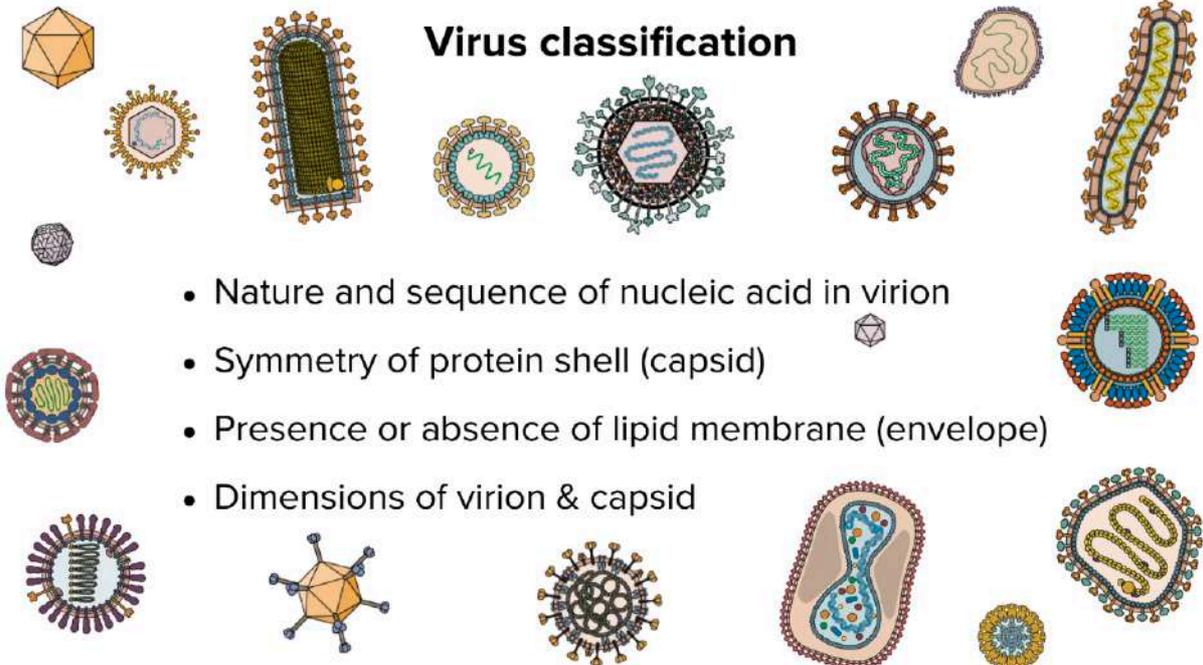


Chemical formula for poliovirus:

$C_{332,652} H_{492,388} N_{98,245} O_{131,196} P_{7,501} S_{2,340}$

Virology Lectures 2018 • Prof. Vincent Racaniello • Columbia University

Virus classification



- Nature and sequence of nucleic acid in virion
- Symmetry of protein shell (capsid)
- Presence or absence of lipid membrane (envelope)
- Dimensions of virion & capsid

Virus classification

<http://ictvonline.org/>

Classical hierarchical system:

Kingdom

Phylum

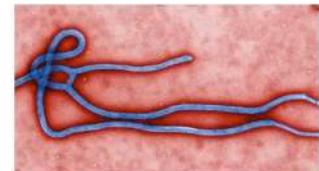
Class

Order (-virales)

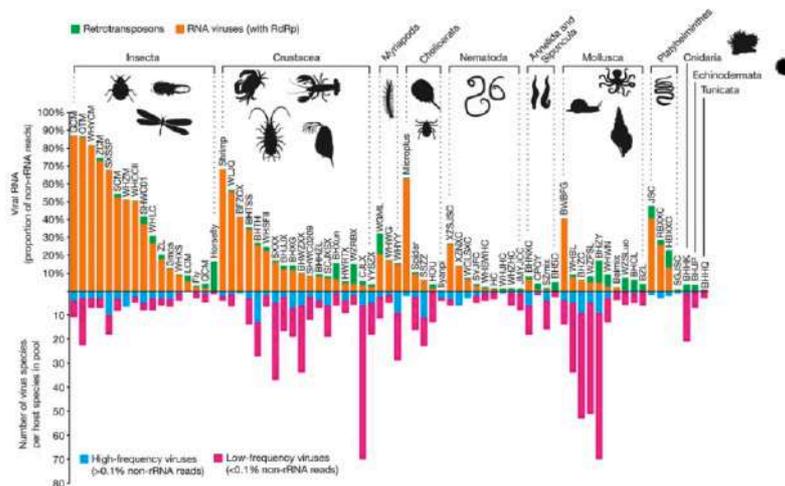
Family (-viridae) *Filoviridae* (filovirus family)

Genus (-virus) *Ebolavirus*

Species *Zaire ebolavirus*



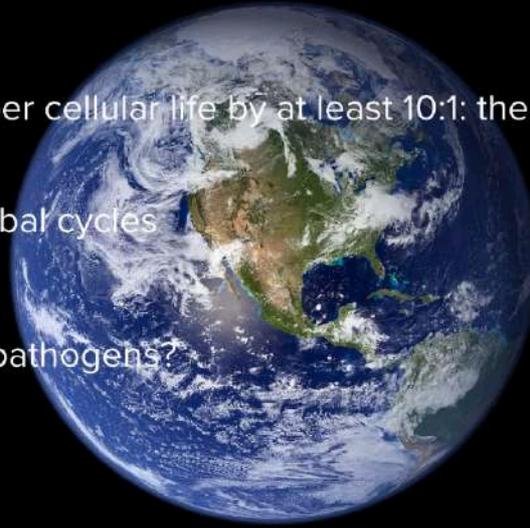
Virus discovery - Once driven only by disease



Analyzed RNA from 220 invertebrate species, found 1,445 new viruses

Why do we care?

- Viruses outnumber cellular life by at least 10:1: the greatest biodiversity on Earth
- Viruses drive global cycles
- Beneficial
- Sources of new pathogens?



1) Horizontal gene transfer.

2) Ciclo de gases e nutrientes nos oceanos.

There is an underlying simplicity and order to viruses because of two simple facts

- All viral genomes are obligate molecular parasites that can only function after they replicate in a cell
- All viruses must make mRNA that can be translated by host ribosomes: they are all parasites of the host protein synthesis machinery



Referências (para a História da Virologia)

1. Alberts BM, Bedinger BP, Formosa T, et al. Studies on DNA replication in the bacteriophage T4 in vitro systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1982;47:655-668.
2. Altman LK. Smallpox virus, frozen in 2 labs, escapes a scalding end for now. *New York Times*, December 25, 1993:1, 8.
3. Astrachan L, Volkin E. Properties of ribonucleic acid turnover in T2-infected *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Acta* 1958;29:536-539.
4. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 1944; 79:137-158.
5. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970; 226:1209-1222.
6. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 110:868-871.
7. Bawden FC, Pirie NW. The isolation and some properties of liquid crystalline substances from solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. *Proc R Soc Med* 1937;123:274-320.
8. Bawden FC, Pirie NW, Bernal JD, et al. Liquid crystalline substances from virus infected plants. *Nature* 1936; 138:1051-1052.
9. Beijerinck MW. Concerning a contagium vivum fluidum as a cause of the spot-disease of tobacco leaves. *Verh Akad Wetensch, Amsterdam, II* 1898;6:3-21.
10. Benzer S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955;41:344-354.
11. Benzer S. Genetic fine structure. In: *Harvey Lectures*, vol 56. New York: Academic Press, 1961:1.
12. Benzer S, Champe SP. Ambivalent rII mutants of phage T4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;47:1025-1038.
13. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 58 terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3171-3175.
14. Bernal JD, Fankuchen I. X-ray and crystallographic studies of plant virus preparations. *J Gen Physiol* 1941;25:111-165.
15. Bieniasz PD. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 2004;5:1109-1115.
16. Biggs PM, Payne LN, Milne BS, et al. Field trials with an attenuated cell-associated vaccine for Marek's disease. *Vet Rec* 1970;87:704-709.
17. Blumberg BS, Gerstley BJS, Hungerford DA, et al. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967;66:924-931.
18. Bohmann D, Bos TJ, Admon A, et al. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 1987;238:1386-1392.
19. Bordet J. Concerning the theories of the so-called "bacteriophage" *BMJ* 1922;2:296.
20. Burkitt D. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* 1962;194:232-234.
21. Butler PJG, Klug A. Assembly of the particle of TMV from RNA and disk of protein. *Nature New Biology* 1971;229:47.

22. Cairns J. The autoradiography. In: Cairns J, Stent GS, Watson JD, eds. Phage and the Origins of Molecular Biology. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press;1966:252-257.
23. Campbell AM. Episomes. *Adv Genet* 1962;11:101-145.
24. Caspar DLD, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1962;27:1-32.
25. Chov Q-L, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;88:359-362.
26. Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, et al. An amazing sequence arrangement at the 58 ends of adenovirus 2 messenger RNAs. *Cell* 1977;12:1-8.
27. Cohen SS. The synthesis of bacterial viruses in infected cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1947;12:35-49.
28. Cohen SS. Synthesis of bacterial viruses; synthesis of nucleic acid and proteins in *Escherichia coli* infected with T2r+ bacteriophage. *J Biol Chem* 1948;174:281-295.
29. Cohen SS. *Virus-induced Enzymes*. New York: Columbia University Press; 1968.
30. Crick FHC, Watson JD. The structure of small viruses. *Nature* 1956;177:473-475.
31. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of SV40 DNA by restriction endonuclease of *H. influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:2913-2918.
32. Danna KJ, Sack GH Jr, Nathans D. Studies of simian virus 40 DNA. VII. A cleavage map of the SV40 genome. *J Mol Biol* 1973;78:363-376.
33. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988;54:275-283.
34. d'Herelle FH. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Hebd Seances Acad Sci Paris* 1917;165:373-390.
35. d'Herelle F. Le microbe bactériophage, agent d'immunité dans la peste et le barbone. *C R Hebd Seances Acad Sci Paris* 1921;172:99.
36. d'Herelle F. *The Bacteriophage and Its Behavior*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1926.
37. DiMascio M, Ribeiro RM, Markowitz M, et al. Modeling the long-term control of viremia in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy. *Math Biosci* 2004;188:47-62.
38. Dulbecco R, Vogt M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1953;18:273-279.
39. Dulbecco R, Vogt M. Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963;50:236-243.
40. Dynan WS, Tjian R. The promoter specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 1983;35:79-87.
41. Dyson N, Howley PM, Munger K, et al. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-937.
42. Eagle H. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell strain HeLa in tissue culture. *J Exp Med* 1955;102:37-48.
43. Edgar RS, Wood WB. Morphogenesis of bacteriophage T4 in extracts of mutant-infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;55:498-505.
44. Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology* 2005;3:504-510.
45. Eidson CS, Kleven SH, Anderson DP. Vaccination against Marek's disease. In: *Oncogenesis and Herpesvirus*. Lyon: International Oncogene Research on Cancer, 1972:147.

46. Ellermann V, Bang O. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Zentralbl Bakteriol Alet I 1908;46:595-597.
47. Ellis EL. Bacteriophage: One-step growth. In: Cairns J, Stent GS, Watson JD, eds. Phage and the Origins of Molecular Biology. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1966:53-62.
48. Ellis EL, Delbrück M. The growth of bacteriophage. J Gen Physiol 1939; 22:365-384.
49. Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. Science 1949; 109:85-87.
50. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1964; 1:702-703.
51. Fenner F, Nakano JH. Poxviridae: the poxviruses. In: Lennette EH, Halonen P, Murphy FA, eds. The Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice, vol. 2: Viral, Rickettsial and Chlamydial Diseases. New York: Springer-Verlag; 1988:177-210.
52. Fenner F, Woodroffe GM. Changes in the virulence and antigenic structure of strains of myxomavirus recovered from Australian wild rabbits between 1950 and 1964. Aust J Exp Biol Med Sci 1965; 43:359-374.
53. Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, et al., eds. Fields Virology, 1st ed. New York: Raven Press; 1985.
54. Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, et al., eds. Fields Virology, 2nd ed. New York: Raven Press; 1990.
55. Fitzgerald M, Shenk T. The sequence 58-AAUAAA-38 forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. Cell 1981; 24:251-260.
56. Flaks JG, Cohen SS. Virus-induced acquisition of metabolic function. I. Enzymatic formation of 58-hydroxymethyldeoxycytidylate. J Biol Chem 1959;234:1501-1506.
57. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, et al. 2004. Principle of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2004.
58. Fowlkes DM, Shenk T. 1980. Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RAN gene. Cell; 22:405-413.
59. Fraenkel-Conrat H, Singer B. 1972, The chemical basis for the mutagenicity of hydroxylamine and methoxyamine. Biochim Biophys Acta 1972;262:264.
60. Fraenkel-Conrat H, Singer B, Williams RC. Infectivity of viral nucleic acid. Biochim Biophys Acta 1957;25:87-96.
61. Fraenkel-Conrat H, Williams RC. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. Proc Natl Acad Sci USA 1955; 41:690-698.
62. Freeman VJ. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. J Bacteriol 1951; 61:675-688.
63. Furth J, Strumia M. Studies on transmissible lymphoid leukemia of mice. J Exp Med 1931;53:715-726.
64. Furuichi Y, Morgan M, Muthukrishnan S, et al. Reovirus mRNA contains a methylated, blocked 58-terminal structure: m5G pppGmpCp. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72:362-366.
65. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 1984; 224:497-500.
66. Gaynor RB, Hillman D, Berk AJ. Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a nonviral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:1193-1197.

67. Germond JE, Hirt B, Oudet P, et al. Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:1843-1847.
68. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 1952; 12:264-265.
69. Gierer A, Schramm G. Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature* 1956; 177:702-703.
70. Goff SP, Berg P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 1976; 9:695-705.
71. Gribskov M, Burgess RR. Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01 and phage T4 are homologous proteins. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:6745-6763.
72. Gruss P, Dhar R, Khoury G. Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:943-947.
73. Hayward WS, Neel BG, Astrin SM. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 1981; 290:475-480.
74. Hearing P, Shenk T. Sequence-independent autoregulation of the adenovirus type 5 E1A transcription unit. *Mol Cell Biol* 1985; 5:3214-3221.
75. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 59:94-101.
76. Hershey AD, ed. *The Bacteriophage Lambda*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1971.
77. Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 1952; 36:39-56.
78. Hilleman MR. Historical and contemporary perspectives in vaccine developments: From the vantage of cancer. In: Melnick JL, ed. *Progress in Medical Virology*, vol 39. Switzerland: S Karger; 1992:1-18.
79. Hoh J, Jin S, Parrado T, et al. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; 99:8467-8472.
80. Holmes FA. Local lesions in tobacco mosaic. *Botanical Gazette* 1929; 87:39-55.
81. Hughes SS. *The Virus: A History of the Concept*. London: Heinemann Education Books; 1977.
82. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference I. *Proc R Soc Lond* 1957; 147B:258-267.
83. Isaacs A, Lindenmann J. The interferon II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond* 1957; 147B:268-273.
84. Ivanofsky D. Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. *St. Petersburg Acad Imp Sci Bull* 1892; 35:67-70.
85. Ivanofsky D. On the mosaic disease of tobacco. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheit* 1903; 13:1-41.
86. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:2904-2909.
87. Jacob F, Wollman EL. Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*Escherichia coli*. I. Le système génétique du bactériophage I. *Ann Inst Pasteur* 1954; 87:653-673.
88. Jacob F, Wollman EL. *Sexuality and the Genetics of Bacteria*. New York: Academic Press; 1961.
89. Jan SK, Davies MV, Kaufman RJ, et al. Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J Virol* 1989; 63:1651-1660.
90. Jenner RG, Young RA. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 3:281-294.

91. Jensen JH. Isolation of yellow-mosaic virus from plants infected with tobacco mosaic. *Phytopathology* 1933; 23:964-974.
92. Kates J, Beeson J. Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. II. Synthesis of polyriboadenylic acid. *J Mol Biol* 1970; 50:19-23.
93. Kates JR, McAuslan BR. Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58:134-141.
94. Kausche GA, Ankuch PF, Ruska H. Die Sichtbarmachung von PF lanzlichem Virus in Ubermikroskop. *Naturwissenschaften* 1939; 27:292-299.
95. Kitajewski J, Schneider RJ, Safer B, et al. An adenovirus mutant unable to express VAI RNA displays different growth responses and sensitivity to interferon in various host cell lines. *Mol Cell Biol* 1986;6:4493-4498.
96. Kornberg A. Biological synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 1960; 131:1503-1508.
97. Kotin RM, Siniscalco RJ, Samulski RJ, et al. Site-specific integration by adenovirus-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2211-2215.
98. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967;200:365-373.
99. Kuiken T, Leighton FA, Fouchier RAM, et al. Pathogen surveillance in animals. *Science* 2005; 309:1680-1681.
100. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
101. Laemmli UK, Cheng SM, Adolph KW, et al. Metaphase chromosome structure: the role of nonhistone proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1978; 42:351-360.
102. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
103. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278:261-263.
104. Lee W, Haslinger A, Karin M, et al. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 1987; 325:368-372.
105. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Ann Rev Biochem* 1993; 62:623-651.
106. Levine AJ. The origins of the small DNA tumor viruses. *Adv Cancer Res* 1994; 65:141-168.
107. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456.
108. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen in SV40 transformed cells. *Cell* 1979; 17:43-52.
109. Loeffler F, Frosch P. *Zentralbl Bakteriol 1 Orig* 1898;28:371.
110. Lorenz P, Eck J. Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3:510-516.
111. Luria SE. Mutations of bacterial viruses affecting their host range. *Genetics* 1945; 30:84-99.
112. Luria SE, ed. *General Virology*, 1st ed. New York: Wiley; 1953.
113. Luria SE, Anderson TF. Identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1942; 28:127-130.
114. Luria SE, Darnell JE, eds. *General Virology*, 2nd ed. New York: Wiley; 1967.
115. Lwoff A. The prophage and I. In: Cairns J, Stent GS, Watson JD, eds. *Phage and the Origins of Molecular Biology*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1961:88-99.

116. Lwoff A, Siminovitch L, Kjeldgaard N. Induction de la lyse bactériophagique de la totalité d'une population microbienne lysogène. *C R Acad Sci Paris* 1950; 231:190-191.
117. Mayer A. On the mosaic disease of tobacco: preliminary communication. *Tijdschr Landbouwk* 1882; 2:359-364.
118. Mayer A. On the mosaic disease of tobacco. *Landwn VerSSStnen* 1886; 32:451-467.
119. McKinney HH. Factors affecting the properties of a virus. *Phytopathology* 1926; 16:753-758.
120. McKinney HH. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *J Agric Res* 1929; 39:557-578.
121. Monod J, Wollman EL. L'inhibition de la croissance et de l'adaption enzymatique chez les bactéries infectées par le bactériophage. *Ann Inst Pasteur* 1947; 73:937-957.
122. Morrow JF, Berg P. Cleavage of simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:3365-3369.
123. Morse ML, Lederberg EM, Lederberg J. Transduction in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 1956; 41:142-156.
124. Mulder C, Delius H. Specificity of the break produced by restricting endonuclease R1 in SV40 DNA as revealed by partial denaturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:3215.
125. Negri A. Beitrag zum Stadium der Aetiologie der Tollwuth. *Z Hyg Infektkrankh* 1903; 43:507-528.
126. Pasteur L. Méthode pour prévenir la rage après morsure. *C R Acad Sci* 1885; 101:765-772.
127. Pilder S, Moore M, Logan J, Shenk T. The adenovirus E1B- 55Kd transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNA. *Mol Cell Biol* 1986; 6:470-476.
128. Plotkin JB, Dushoff J, Levin S. Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:6263-6268.
129. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:7415-7419.
130. Ptashne M. *A Genetic Switch, Gene Control and Phage Lambda*. Palo Alto, CA: Blackwell Science; 1987.
131. Purdy-Beale HA. Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. *J Exp Med* 1929; 49:919-935.
132. Reed W, Carroll J, Agramonte A, et al. *Senate Documents* 1901; 66(822):156.
133. Robins H, Krasnitz M, Barak H, et al. A relative entropy algorithm for genomic fingerprinting captures host-phage similarities. *J Bacteriol* 2005; 187:24.
134. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 1911; 13:397-399.
135. Roux E. Sur les microbes dits invisible. *Bull Inst Pasteur Paris* 1903; 1:7-12, 49-56.
136. Samulski RJ, Chang L-S, Shenk T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989; 63:3822-3828.
137. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst* 1948; 23:1035-1069.
- 137a. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977; 265:687-695.
138. Sarnow P, Ho YS, Williams J, et al. Adenovirus E1B-58Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54Kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28:387-394.

139. Schlesinger M. Die Bestimmung von Teilchengröße und Spezifischem gewicht des Bakteriophagen durch Zentrifugierversuche. *Z Hyg Infektionskrankh* 1932; 114:161.
140. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus 16 or 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63: 1129-1136.
141. Schlesinger M. Zur Frage der chemischen Zusammensetzung des Bakteriophagen. *Biochem Z* 1934; 273:306-311.
142. Schlesinger M. The fuelsing reaction of the bacteriophage substance. *Nature* 1936; 138:508-509.
143. Sinsheimer RL. A single-stranded DNA from bacteriophage PhiX174. *Brookhaven Symp Biol* 1959; 12:27-34.
144. Stanley W. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science* 1935; 81:644-645.
145. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, et al. DNA related to transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976; 260:170-173.
146. Streisinger G, Edgar RS, Denhardt GH. Chromosome structure in phage T4. I. Circularity of the linkage map. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 51:775-779.
147. Streisinger G, Mukai F, Dreyer WJ, et al. Mutations affecting the lysozyme of phage T4. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1961; 26:25-30.
148. Suttle CA. Viruses in the sea. *Nature* 2005; 437:356-361.
149. Takahashi WN, Rawlins RE. Method for determining shape of colloidal particles: application in study of tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1932; 30:155-157.
150. Takatsuki K, Uchuyama T, Ueshima Y, et al. Adult T-cell leukemia: proposal as a new disease and cytogenetic, phenotypic and function studies of leukemic cells. *Gann Monogr* 1982; 28:13-21.
151. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226:1211-1213.
152. Thomas CA Jr. The arrangement of information in DNA molecules. *J Gen Physiol* 1966; 49:143-169.
153. Twort FW. An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses. *Lancet* 1915; 189:1241-1243.
154. Twort FW. The bacteriophage: the breaking down of bacteria by associated filter-passing lysins. *BMJ* 1922; 2:293.
155. Twort FW. The discovery of the bacteriophage. *Sci News* 1949; 14:33.
156. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 1977;5 0:481-492.
157. Venter JC, Adams MD, Meyers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-1351.
158. Vinson CG, Petre AW. Mosaic disease of tobacco. *Botan Gaz* 1929; 87:14-38.
159. Wang D, Urisman A, Liu Y, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol* 2003; 1:257-260.
160. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953; 171:737-738.
161. Weil PA, Luse DS, Segall J, et al. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 1979; 18:469-484.
162. Weil R, Vinograd J. The cyclic helix and cyclic coil forms of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963;50:730-736.
163. Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J, eds. *RNA Tumor Viruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982.

164. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76-79.
165. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, et al. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1a proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334:124-129.
166. Wolbach SB. The filterable viruses: a summary. *J Med Res* 1912;27:1-25.
167. Woodruff AM, Goodpasture EW. The susceptibility of the chorio-allantoic membrane of chick embryos to infection with the fowl-pox virus. *Am J Pathol* 1931; 7:209-222.
168. Worcel A, Burgi E. On the structure of the folded chromosome of *E. coli*. *J Mol Biol* 1972; 71:127-139.
169. World Health Organization. The global eradication of smallpox. Final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication (History of International Public Health, no 4). Geneva: World Health Organization; 1980.
170. Wyatt GR, Cohen SS. The basis of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem J* 1952; 55:774-782.
171. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T- cell leukemia and its implications in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:2031-2035.
172. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol* 1952; 64:679-699.
173. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254:1167-1172.
174. Leal E.S. and Zanotto, P.M.A. Viral diseases and Human Evolution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2000; 95; 193-2

Livro 1, Capítulo 4

- Estrutura dos Vírus -

Fonte: Flint et al., Principles of Virology (3rd & 4th Edition).
Edições por Daffiny Suman & Paolo Zanotto



polio 7.4 kb genome

Sumário das propriedades gerais dos Vírus

Alguns conceitos fundamentais sobre Morfologia e Estrutura viral:

Vírions são entidade viral completa e infecciosa (particularmente vírus maduros).

Unidade proteica equivale a uma cadeia polipeptídica. Uma subunidade estrutural ou **protômero** equivale a uma ou mais unidades proteicas, não idênticas, que se associam para formar estruturas maiores denominadas **capsômero**;

Unidade de montagem equivale a um grupo de subunidades ou protômeros que é formada durante a montagem do vírion no processo de síntese viral;

Capsômeros podem parecer protuberâncias vistas nas superfícies dos vírions não envelopados por microscopia eletrônica. Os capsômeros interagem entre si de forma ordenada geralmente seguindo um eixo de simetria. Essas unidades morfológicas formam o **capsídeo**, que geralmente é formado por hexâmeros nas áreas planas das faces dos vírions e **pentâmeros** nos vértices virais.

Capsídeo é a capa de proteína que envolve diretamente o ácido nucleico;

Core ou cerne é formado pelo ácido nucleico viral mais as proteínas associadas à estabilização do genoma e sua posterior replicação;

Matriz proteica é a estrutura de proteínas não glicosiladas presentes em alguns vírions, localizada entre o envelope e o capsídeo, que tem como principais funções dar sustentação ao envelope e servir de ancoragem para as proteínas de superfície;

Envelope é a camada bilipídica proveniente da célula hospedeira que envolve certas partículas virais. Nelas, encontram-se inseridas as glicoproteínas conhecidas pelo nome de peplômeros ou espículas virais;

Tipos de Estruturas Virais e suas Características

O **capsídeo** interage de forma energeticamente favorável e estável ao redor do genoma funcionando como histonas e o nucleossomo estabilizando e protegendo o material genético.

Geralmente o **capsídeo** é composto por muitas cópias da mesma proteína ou mesmo de poucas proteínas diferentes.

Existem formas geométricas que são mais favoráveis para vírions. Que são definidas em termos de simetrias. Elas são: **(i) simetria helicoidal**, **(ii) icosaédrica** ou, **(iii) complexa** (pseudo-simétrica).

1 – Icosaédrica. mínimo de energia para a montagem; forma mais eficiente conhecida (proteínas conseguem ocupar uma área externa menor com uma área interna maior); cada face é constituída por protômeros, hexâmeros e pentâmeros.

2 – Helicoidal. Na forma de cilindro ou tubo; proteínas interagem covalentemente umas com as outras e com a molécula de ácido nucleico; capsídeo é rígido em plantas e longo e flexível em animais.

3 – Complexa. mistura das anteriores com variedades de espículas e fibras na porção helicoidal.

O **Envelope** é derivado de membrana celular. Ele é gerado pelo brotamento (requer o direcionamento de proteínas virais, espículas virais, para a membranas internas dos compartimentos celulares, como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas intra-citoplasmáticas, onde acontece a posterior interação de proteínas virais intra-citoplasmáticas com essas proteínas virais inseridas em membranas. Vírions podem adquirir envelope intra-citoplasmático ou na saída da célula na membrana plasmática.

Ácido Nucleico Viral. RNA genômico ou DNA genômica são os ácidos nucleico de vírus. Os vírus tem genomas lineares, circulares, fita dupla ou fita simples, haploide ou diploide. Apresentam genoma único (um só segmento) ou segmentado (Informação genética e dividida em diferentes segmentos do ácido nucleico). Podem ter genomas de RNA polaridade positiva (o RNA mensageiro e imediatamente traduzido), RNA polaridade negativa (complementar ao RNA mensageiro) e RNA com intermediário de DNA durante os processos de replicação (retrovírus). Além de RNA há vírus de genoma de DNA com fita simples, dupla ou genomas com genomas híbridos de DNA e RNA (vírus da Hepatite B).

Proteínas Não Estruturais são proteínas codificadas pelo genoma e traduzidas somente durante a replicação viral com função enzimática e de modulação das atividades celulares.

Proteínas Estruturais são aquelas que compõem a estrutura da partícula (empacotamento do genoma nos novos capsídeos, etc.).

Nucleocapsídeo é o capsídeo mais ácido nucleico quando envelopados.

Functions of structural proteins



Protection of the genome

- Assembly of a stable, protective protein shell
- Specific recognition and packaging of the nucleic acid genome
- Interaction with host cell membranes to form the envelope

Functions of structural proteins

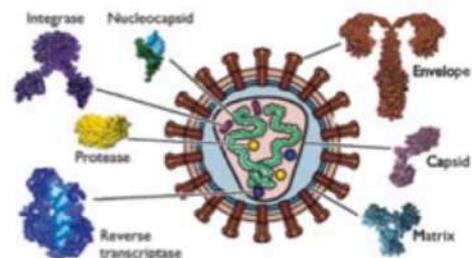
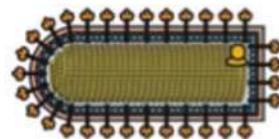
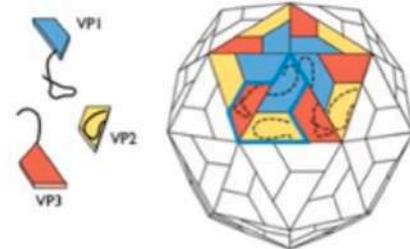


Delivery of the genome

- Bind host cell receptors
- Uncoating of the genome
- Fusion with cell membranes
- Transport of genome to the appropriate site

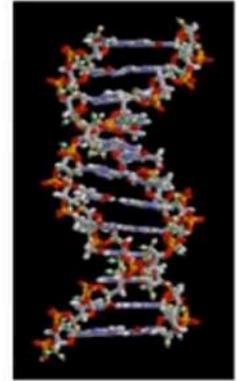
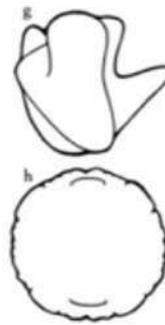
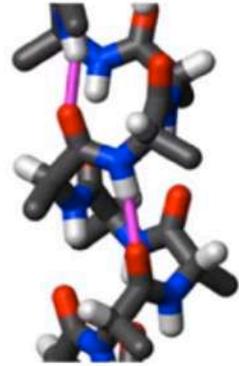
Definitions

- **Subunit**
 - Single folded polypeptide chain
- **Structural unit (protomer, asymmetric unit)**
 - Unit from which capsids or nucleocapsids are built; one or more subunits
- **Capsid (capsa = Latin, box)**
 - Protein shell surrounding genome
- **Nucleocapsid (core)**
 - Nucleic acid - protein assembly within virion
- **Envelope (viral membrane)**
 - Host cell-derived lipid bilayer
- **Virion**
 - Infectious virus particle



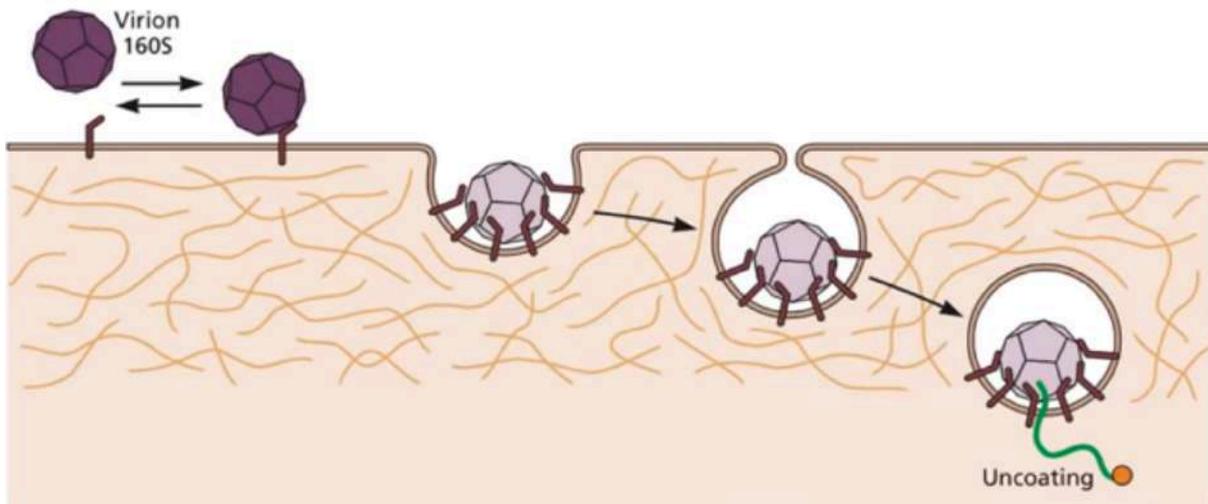
Putting virus particles into perspective

- Nanometer: 10^{-9} meters
- Alpha helix in protein: 1 nm diameter
- DNA: 2 nm diameter
- Ribosome: 20 nm diameter
- Poliovirus: 30 nm
- Pandoravirus: 1000 nm



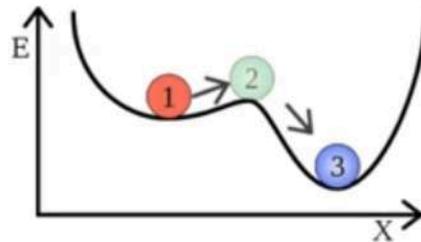
Virus particles are metastable

- Must protect the genome (stable)
- Must come apart on infection (unstable)



Virions are metastable

- Virus particles have not attained minimum free energy conformation
- Unfavorable energy barrier must be surmounted



- Energy put into virus particle during assembly (*spring loaded*)
- Potential energy used for disassembly if cell provides proper signal

How is metastability achieved?



- *Stable structure*
 - Created by symmetrical arrangement of many identical proteins to provide maximal contact
- *Unstable structure*
 - Structure is not usually permanently bonded together
 - Can be taken apart or loosened on infection to release or expose genome

Viral capsids are metastable because:

1. They must protect the viral genome outside of the cell
2. They must come apart and release the genome into a cell
3. They have not obtained a minimum free energy conformation
4. They are spring-loaded
5. All of the above

resp. 5

The tools of viral structural biology

- Electron microscopy
- X-ray crystallography
- Electron cryomicroscopy (cryoEM) & tomography
- Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

Flint volume I, chapter 3, pp 85-88

Beginning of the era of modern structural virology

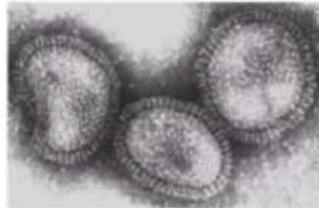
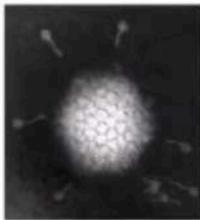
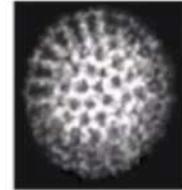
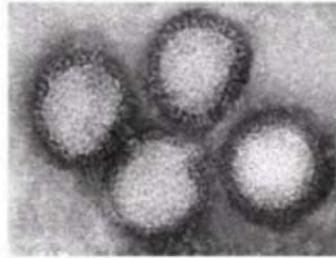
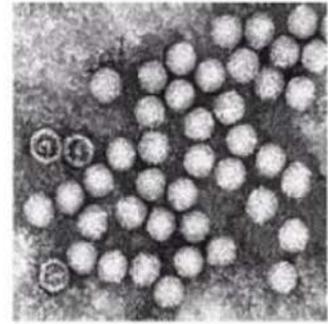
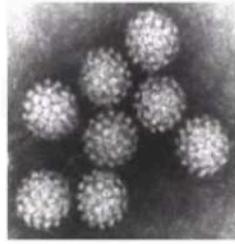
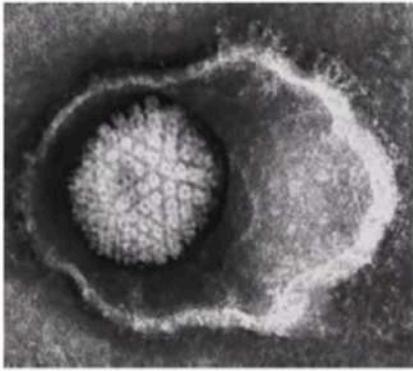
1940: Helmuth Ruska used an electron microscope to take the first pictures of virus particles

Ruska, H. 1940. Die Sichtbarmachung der Bakteriophagenlyse im Übermikroskop. Naturwissenschaften. 28:45-46).

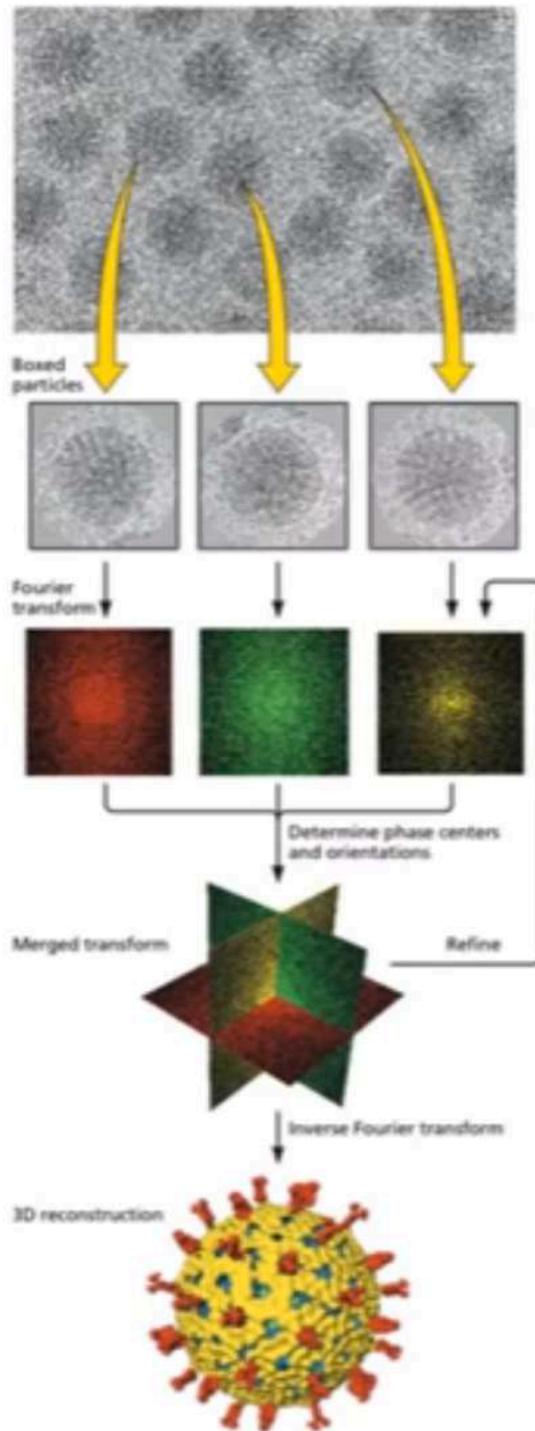


Electron microscopy

- Biological materials have little inherent contrast: need to be stained
- Negative staining with electron-dense material (uranyl acetate, phosphotungstate), scatter electrons (1959)
- Resolution 50-75 Å (alpha helix 10 Å dia; 1 Å = 0.1 nm)
- Detailed structural interpretation impossible

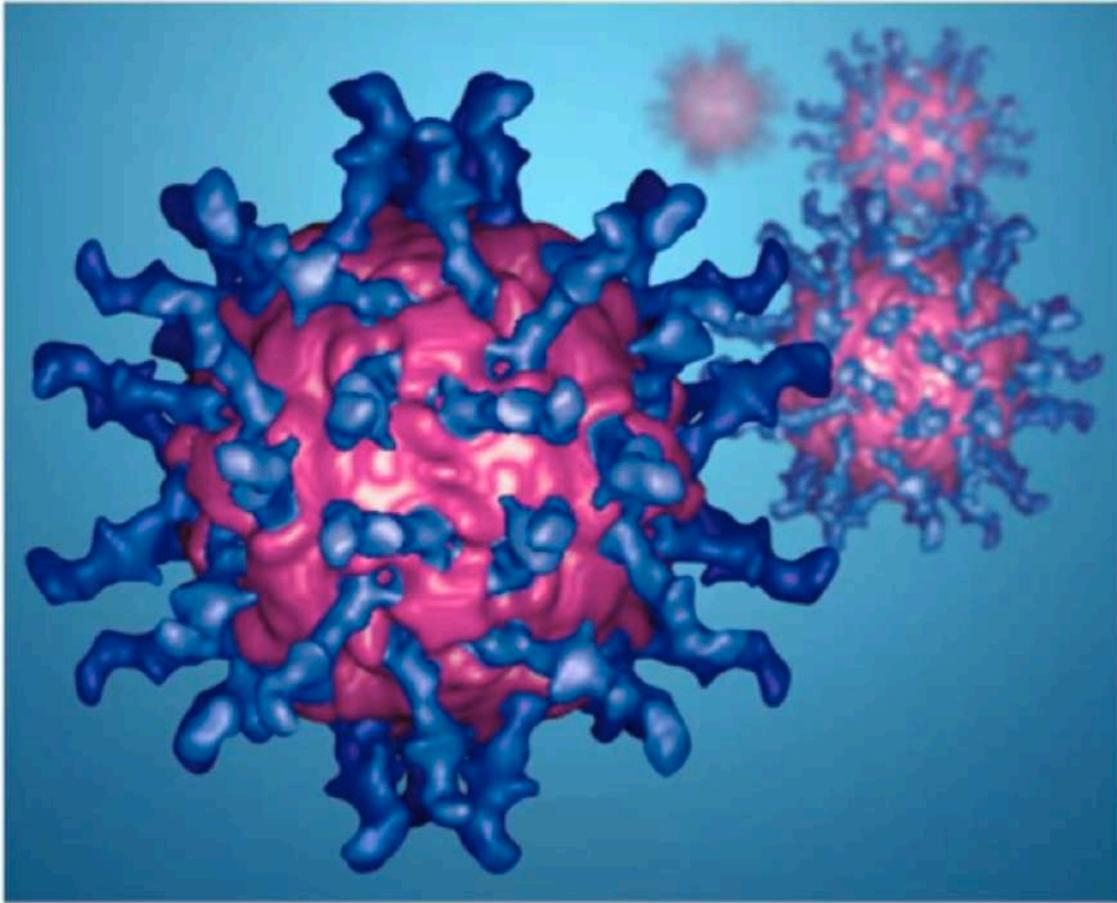


Linda Stannard, University of Cape Town
<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/linda.html>



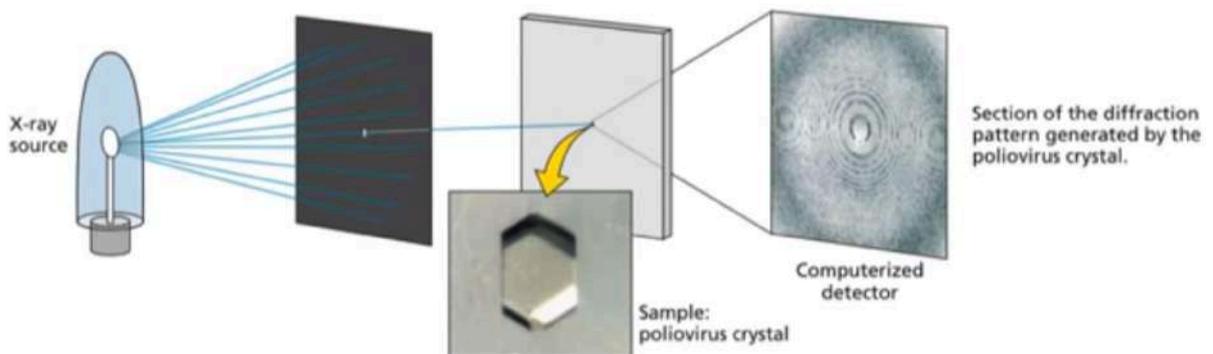
CryoEM – cryo-electron microscopy 10A resolution, fast computation is key!!

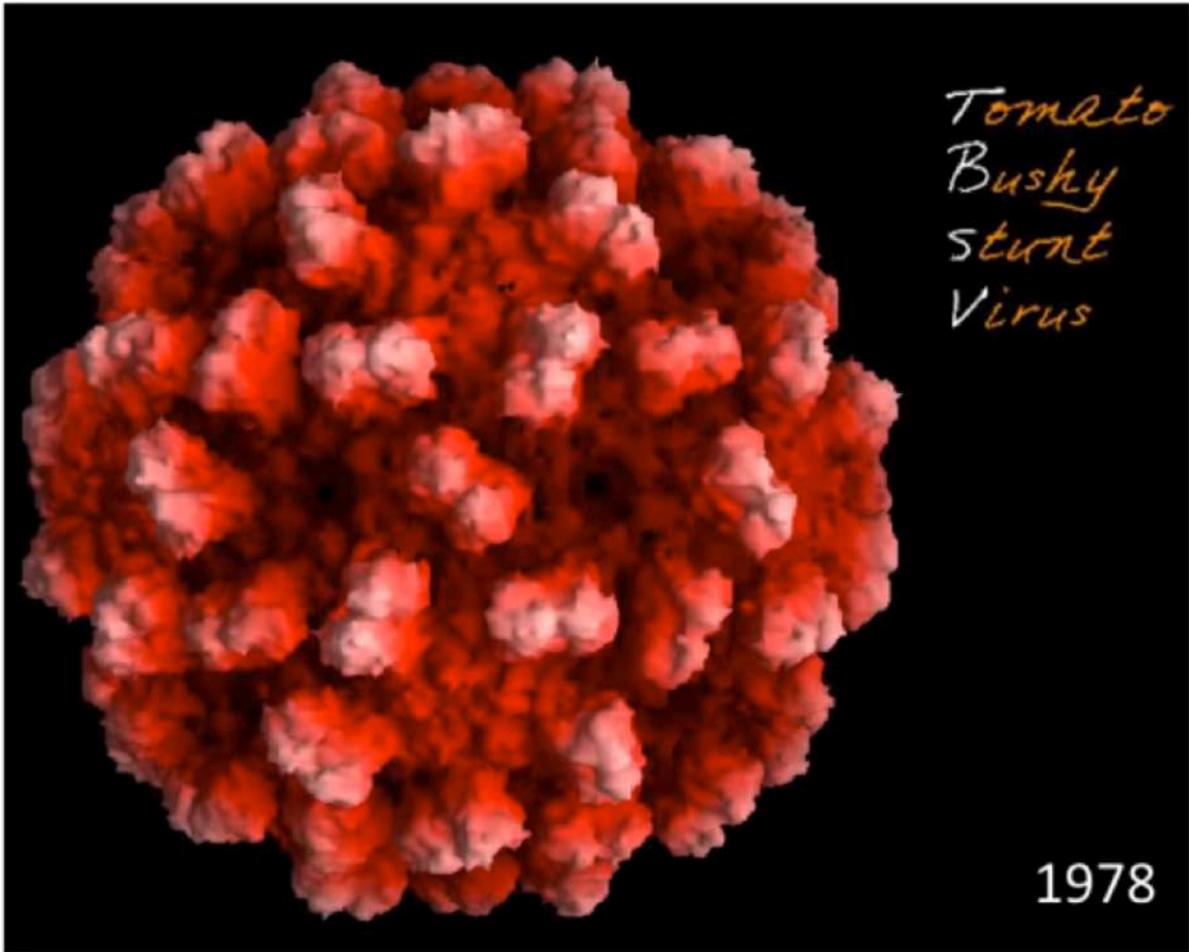
Poliovirus + CD155



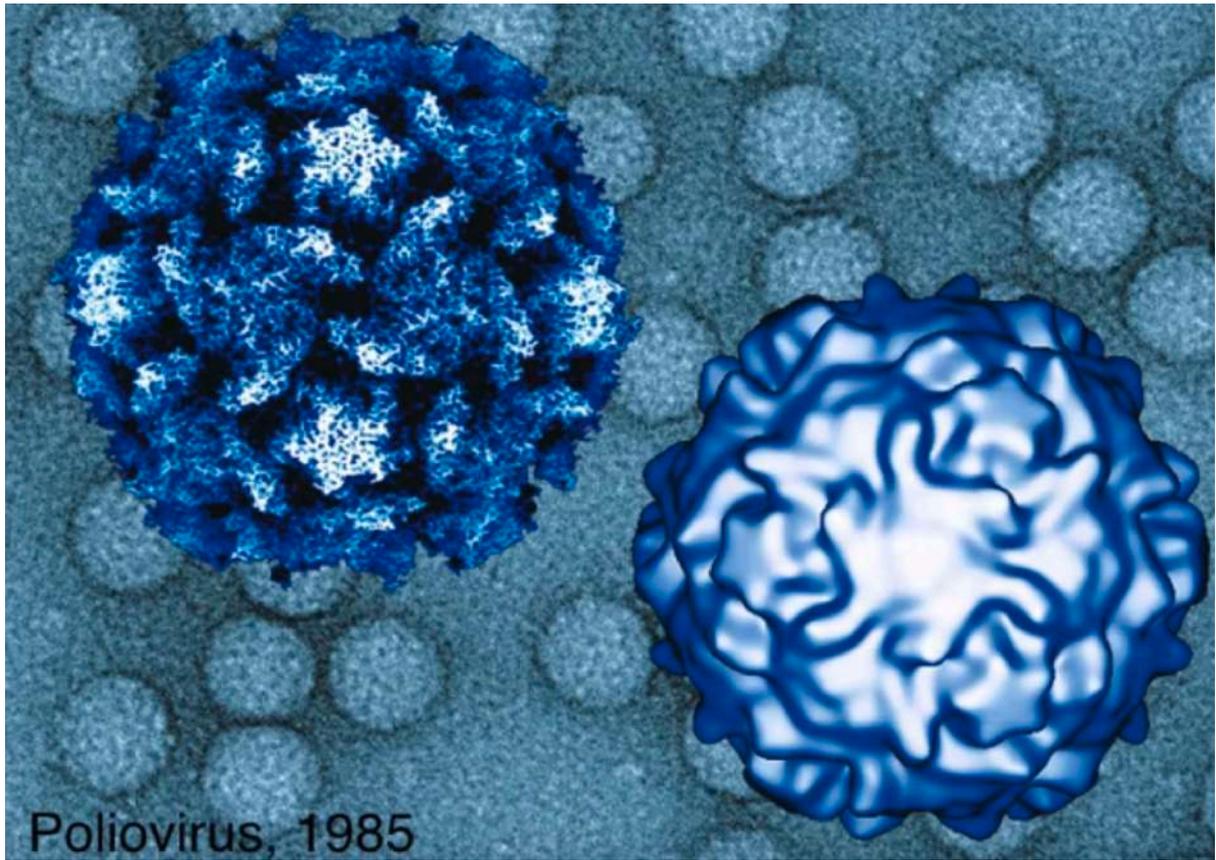
CryoEM cryo electron microscopy reconstruction of poliovirus bound to cell receptors (in blue)

X-ray crystallography (2-3 Å for viruses)





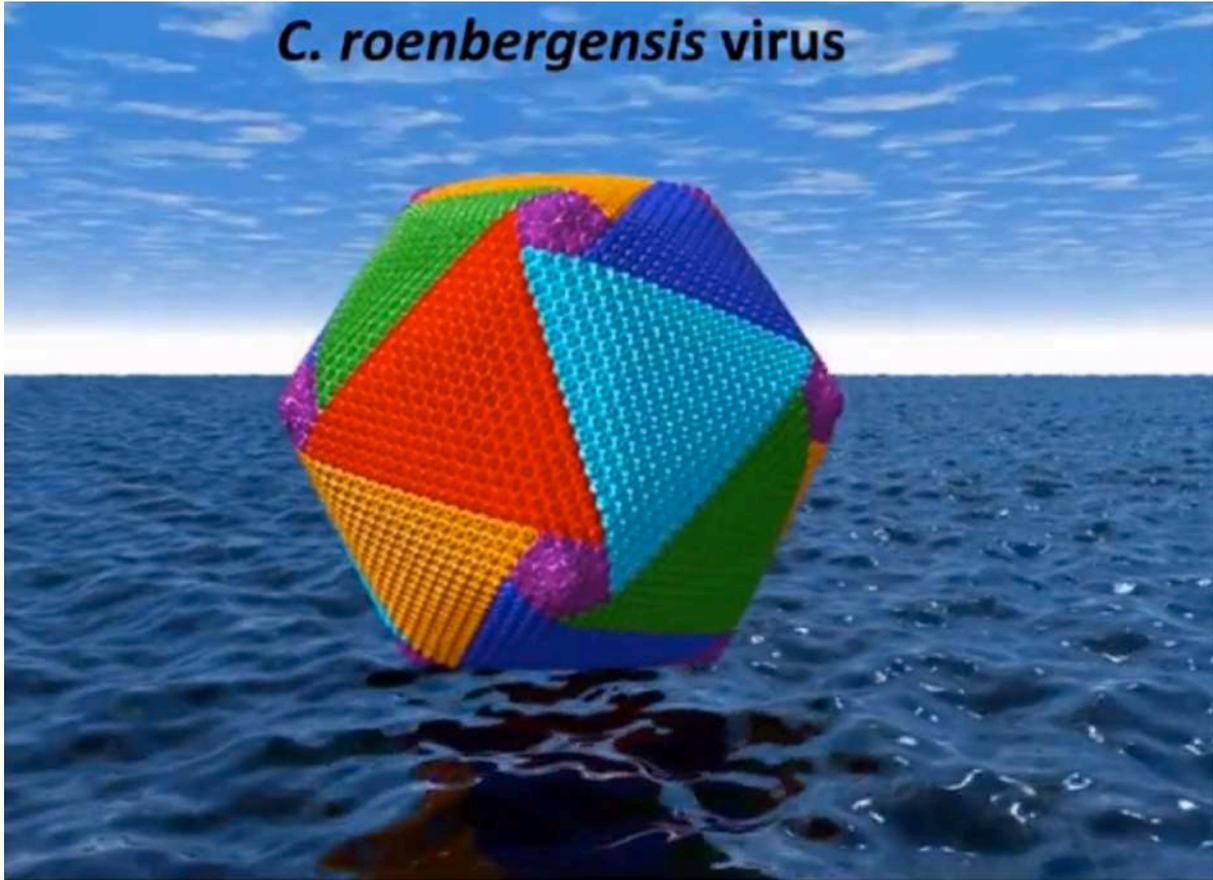
1st X-ray crystal structure of a virus



Poliovirus, 1985

X-Ray crystallography upper left (2A), CryoEM right (8A)

C. roenbergensis virus



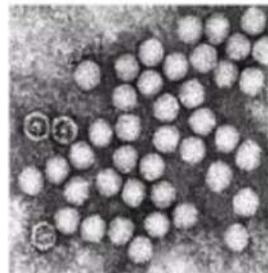
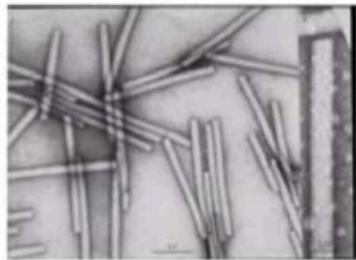
300 nm, >15,000 capsid proteins

Chuan Xiao <http://utminers.utep.edu/cxiao/#4>

Caffeteria virus, huge!

Building virus particles: Symmetry is key

- Watson and Crick did more than discover DNA structure



- Their seminal contribution to virology:
 - Identical protein subunits are distributed with *helical symmetry* for rod-shaped viruses
 - *Platonic polyhedra symmetry* for round viruses

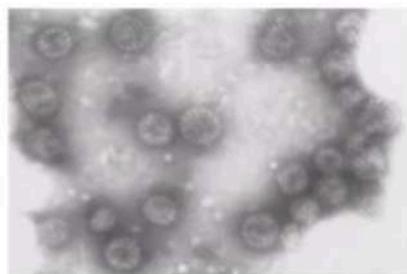
The symmetry rules are elegant in their simplicity

They provide rules for “self-assembly”

- **Rule 1:** Each subunit has ‘identical’ bonding contacts with its neighbors
 - Repeated interaction of chemically complementary surfaces at the subunit interfaces naturally leads to a symmetric arrangement
- **Rule 2:** These bonding contacts are usually non-covalent
 - Reversible; error-free assembly

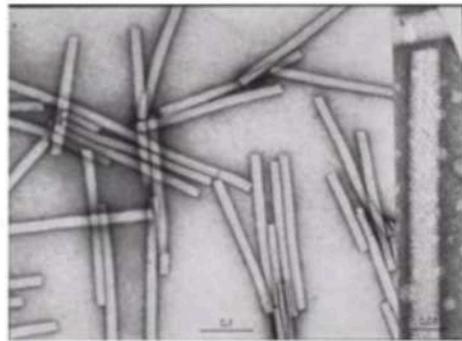
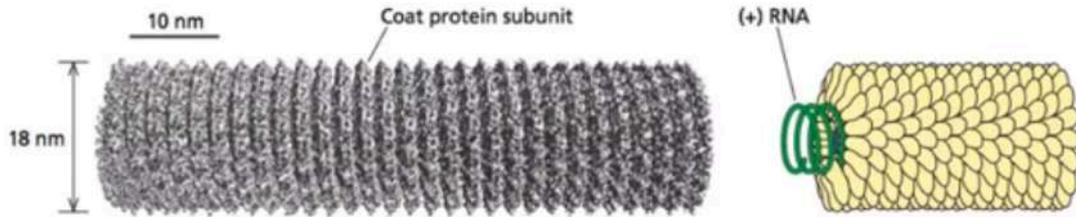
Symmetry and self-assembly

- Many capsid proteins can self assemble into ‘virus-like particles’ (VLPs)
- The HBV and HPV vaccines are VLPs made in yeast

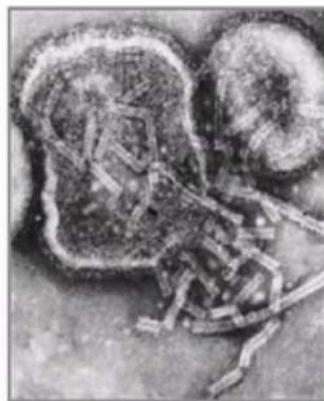
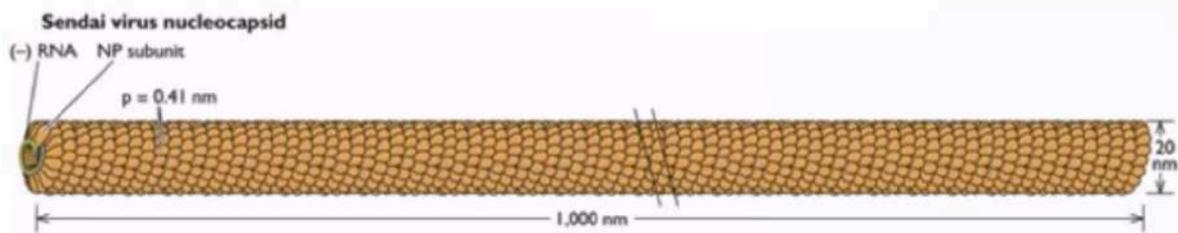


Helical symmetry

Coat protein molecules engage in identical, equivalent interactions with one another and with the viral genome to allow construction of a large, stable structure from a single protein subunit

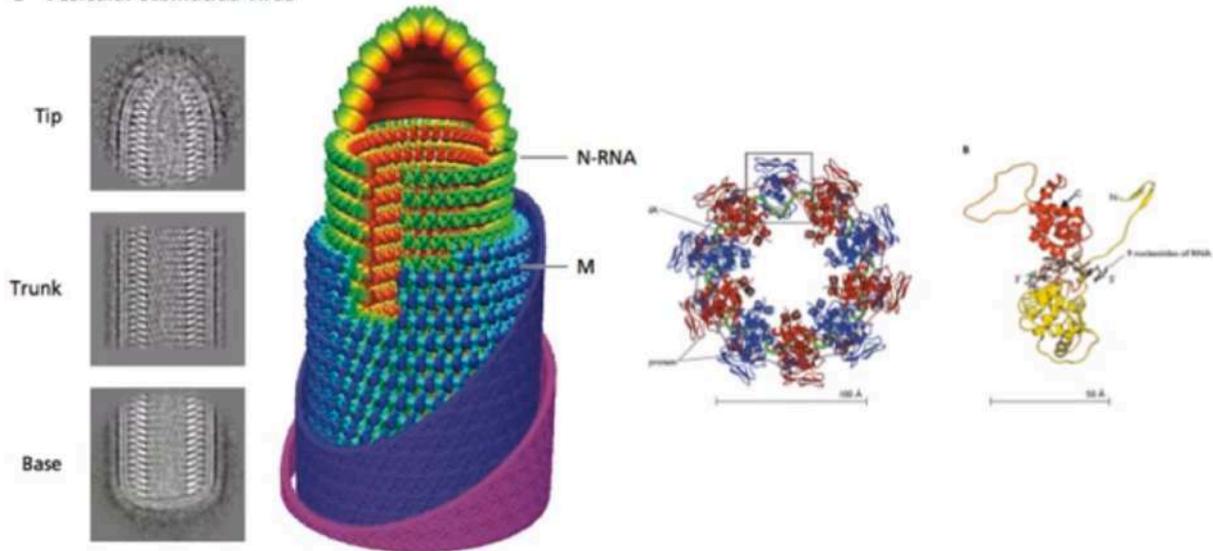


Helical symmetry



Enveloped helical Sendai virus with a nucleocapsids because are enveloped.

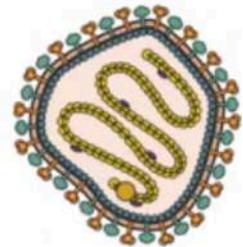
C Vesicular stomatitis virus



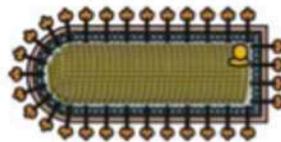
bullet shaped CryoEM image

Enveloped RNA viruses with (-) ssRNA and helical capsids

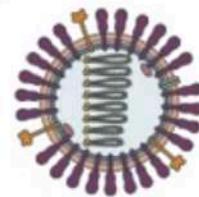
- *Paramyxoviridae* (measles virus, mumps virus)



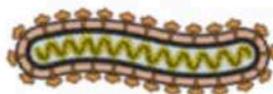
- *Rhabdoviridae* (rabies virus)



- *Orthomyxoviridae* (influenza virus)



- *Filoviridae* (Ebola virus)



- The *nucleocapsid* is the nucleic acid-protein assembly that is packaged within the virion

Helical symmetry & nucleocapsid examples

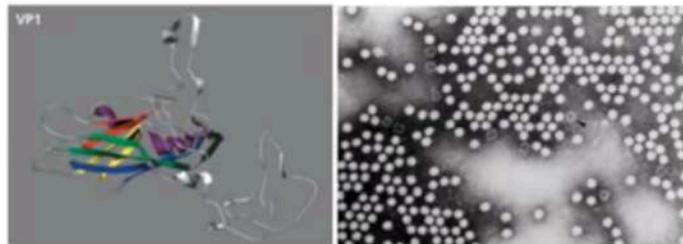
Which of the following describe virus symmetry and self assembly?

1. The bonding contacts are usually covalent
 2. Each subunit always has identical bonding contacts with its neighbors
 3. The bonding contacts of subunits are usually non-covalent
 4. Each subunit has different bonding contacts with its neighbors
 5. None of the above
-

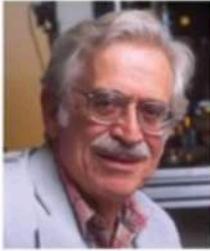
Resp. C

Always is part of a false statement.

How can you make a round capsid from proteins with irregular shapes?



- Clue 1: All round capsids have precise numbers of proteins; multiples of 60 are common (60, 180, 240, 960)
- Clue 2: Spherical viruses come in many sizes, but capsid proteins are 20-60 kDa average



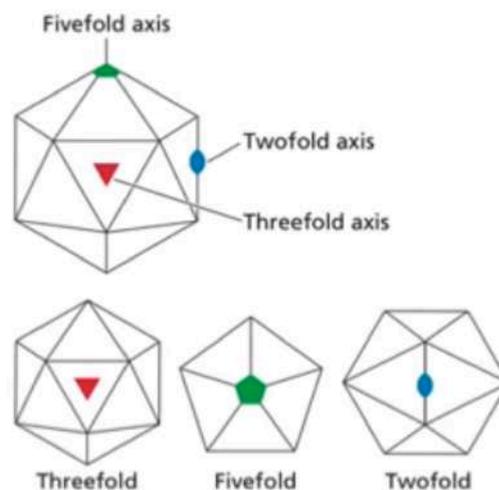
Caspar & Klug's 1962 solution

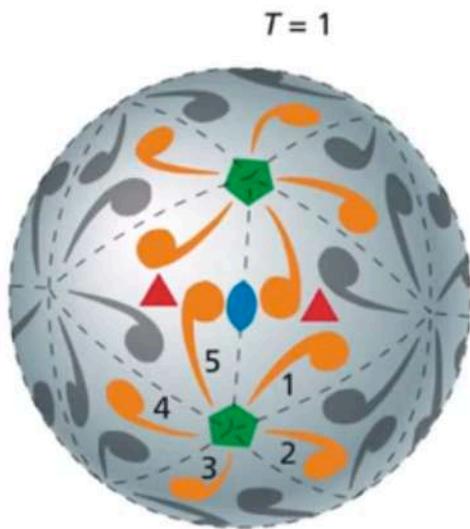


- They knew from Watson & Crick's work that round capsids are icosahedrons - no other Platonic solids were used
- Capsid subunits tended to be arranged as hexamers and pentamers

Icosahedral symmetry

- Icosahedron: solid with 20 faces, each an equilateral triangle
- Allows formation of a closed shell with smallest number (60) of identical subunits





- Made of 60 identical protein subunits
- The protein subunit is the structural unit
- Interactions of all molecules with their neighbors are identical (head-to-head, tail-to-tail)

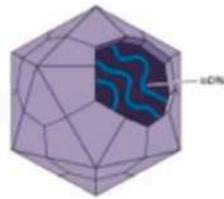
each comma are a single protein

Adeno-associated virus 2 (parvovirus)

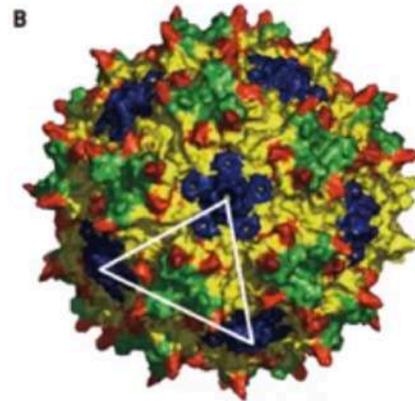
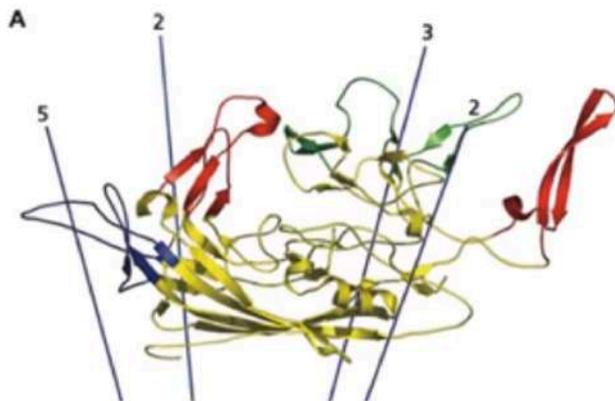
25 nm

$T=1$

60 copies of a single capsid protein



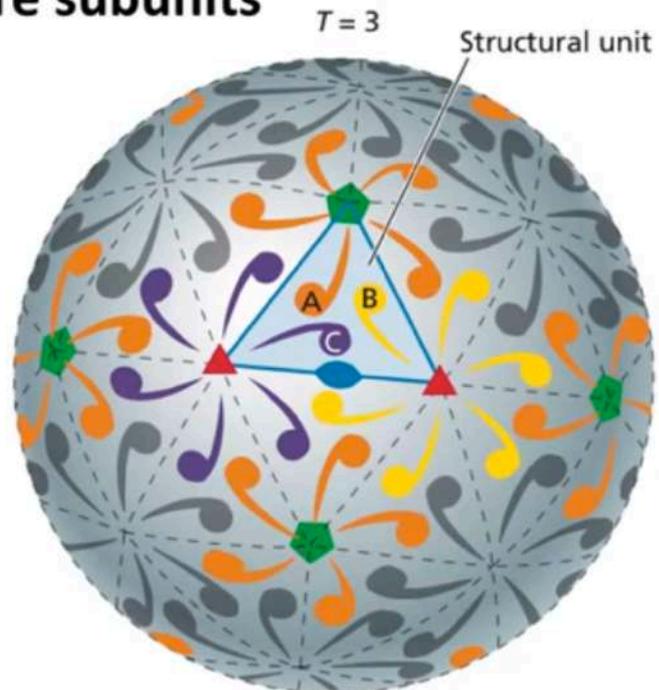
Parvoviridae (4–6 kb)



T = triangulation number.

How are larger virus particles built? By adding more subunits

- Three modes of subunit packing (orange, yellow, purple)
- Pentamers & hexamers
- Bonding interactions are quasiequivalent: all engage tail-to-tail and head-to-head



180 identical protein subunits

©Principles of Virology, ASM Press

pentamers & hexamers quasi-equivalent (bonding similar but not identical) when capsids have more than 60 subunits

Quasiequivalence

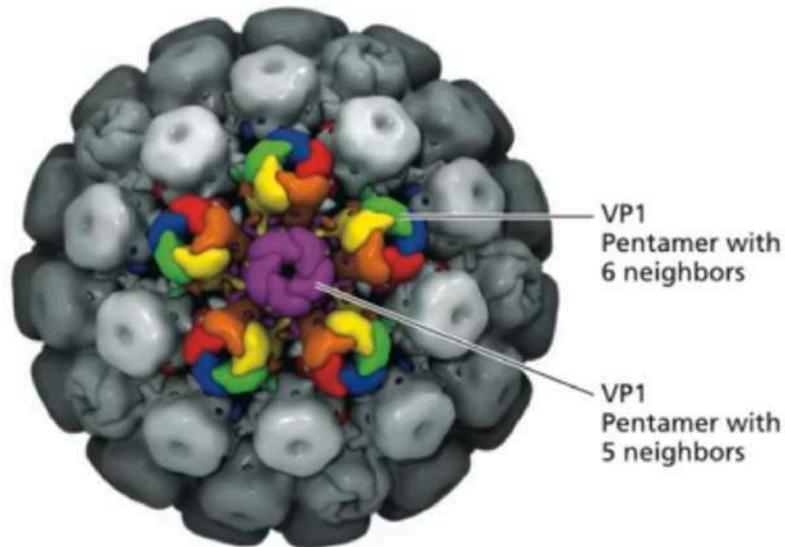
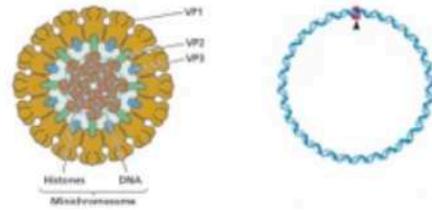
- When a capsid contains more than 60 subunits, each occupies a *quasiequivalent* position
- The noncovalent binding properties of subunits in different structural environments are similar, but not identical

SV40 (polyomavirus)

50 nm

$T=6$

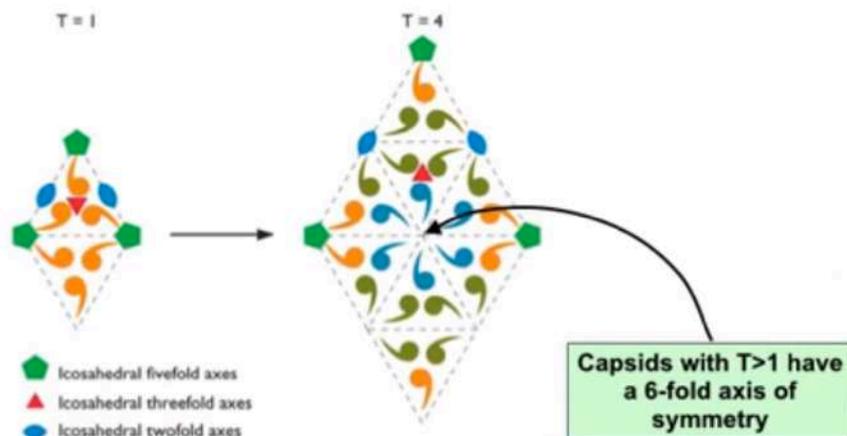
72 pentamers of VP1 = 360 subunits



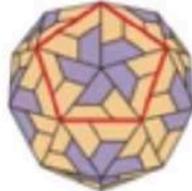
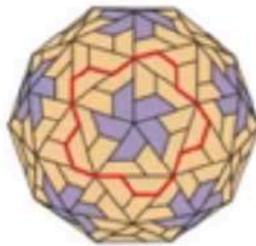
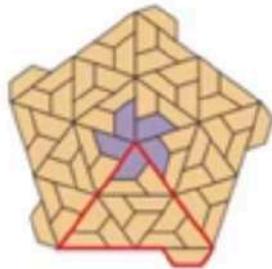
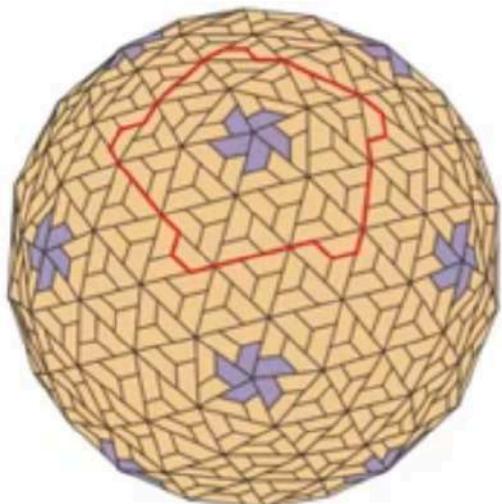
quasi-equivalent structure

Triangulation number, T

- The number of facets per triangular face of an icosahedron
- Combining several triangular facets allows assembly of larger face from same structural unit



Triangulation number (T) is number is the number of triangular structures (facets) you pack at each face (see red triangle at the center of a face). T allows for bigger capsids.

Structural unit	Organization at 5-fold axes	Capsid	Total number of subunits (60T)
		 T = 1	60
 x60	 x12	 T = 3	180
 x60	 x12	 T = 4	240
 x60	 x12	 T = 13	780

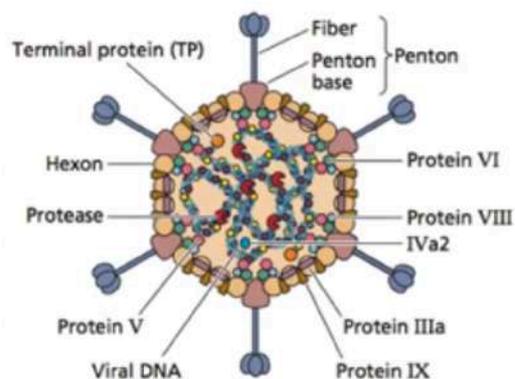
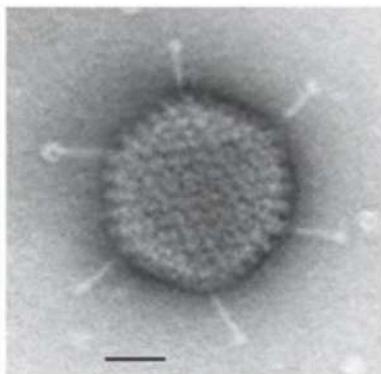
Which of the following are characteristics of icosahedral symmetry in viral capsids?

1. Produces a solid with 20 faces, each an equilateral triangle
2. Allows formation of a closed shell with 60 identical subunits
3. Fivefold, threefold, and twofold axes of symmetry
4. The T number describes the number of facets per icosahedral face
5. All of the above

Resp. Todas as acima

Large complex capsids

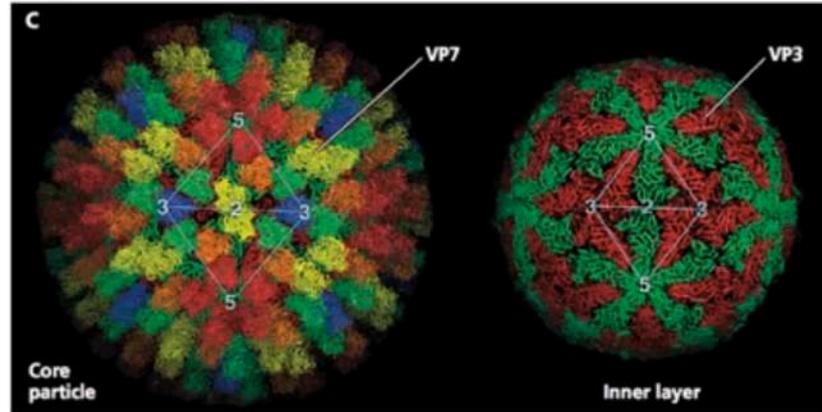
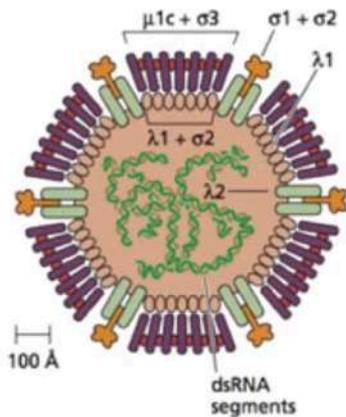
- Distinct components with different symmetries
- Presence of proteins devoted to specialized roles



Adenovirus

- 150 nm
- T=25 capsid, 720 copies viral protein II + 60 copies of protein III
- Fibers at 12 vertices

Complex capsids with two icosahedral protein layers



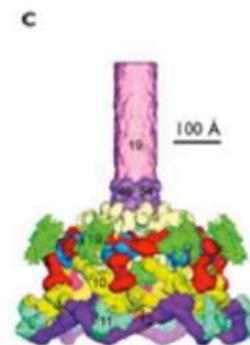
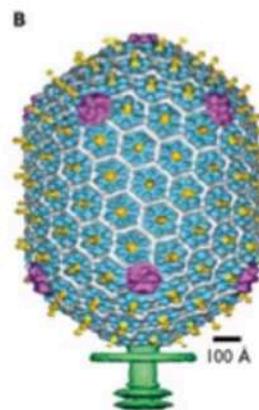
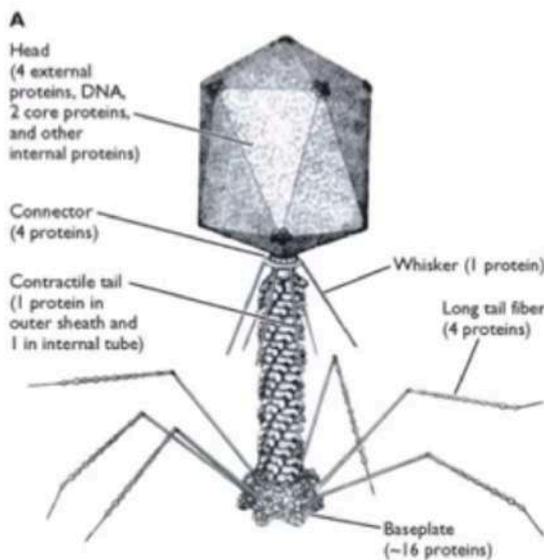
VP7 trimers, T=13

VP3 monomers, T=2

Reoviruses

- T=13
- 70 - 90 nm
- two concentric shells

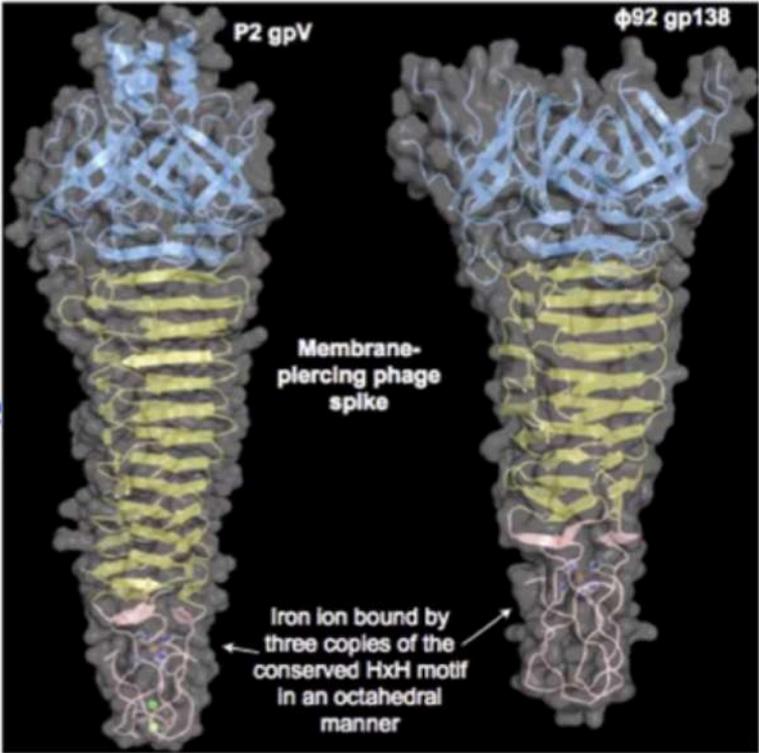
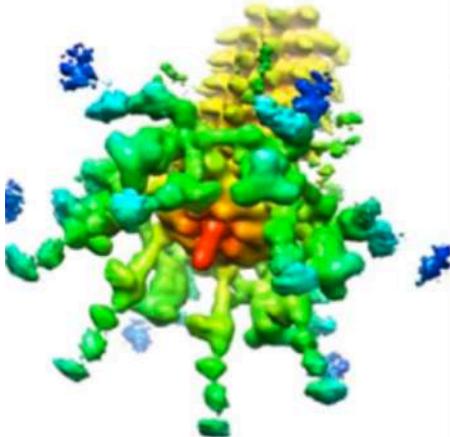
Tailed bacteriophages



The tail is attached at one of the 12 vertices of the capsid (capsid has icosahedral symmetry).

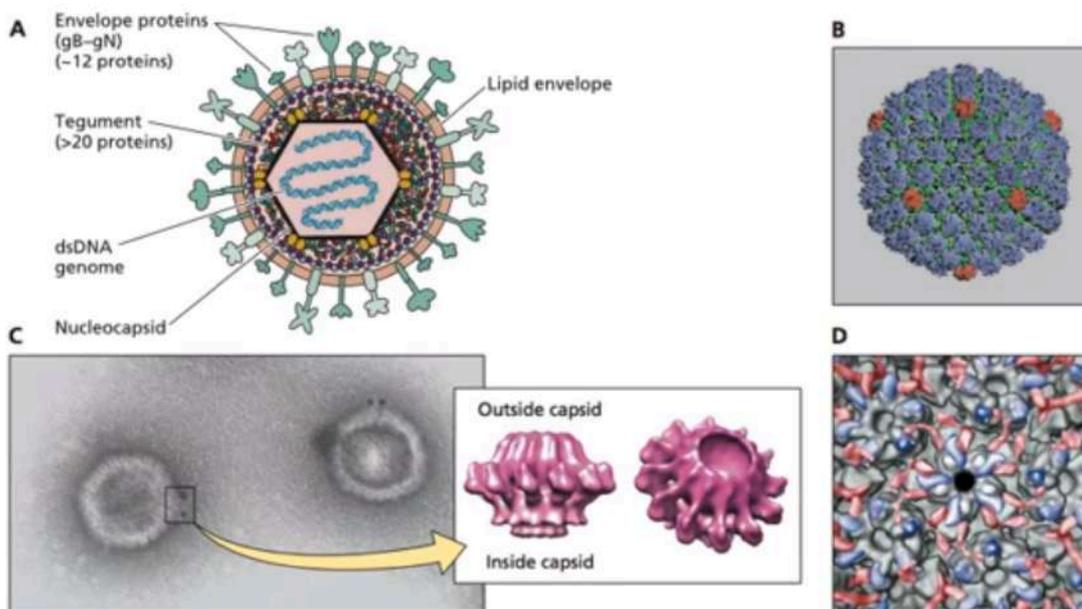
The tail is a complex rod
 - uses helical symmetry in many places
 - some tails are contractile

An iron loaded spike



Herpes simplex virus capsid

Holes for entry and exit of DNA

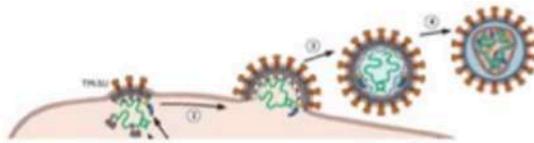


The portal or opening for viral DNA is built at ONE of the 12, 5-fold vertices of the T=16 200 nm herpesvirus capsid

4-fold axis is a pore (D) in & out of DNA

Capsids can be covered by host membranes: enveloped virions

- Envelope is a lipid bilayer derived from host cell
 - Viral genome does not encode lipid synthetic machinery
- Envelope acquired by budding of nucleocapsid through a cellular membrane
 - Can be any cell membrane, but is virus-specific



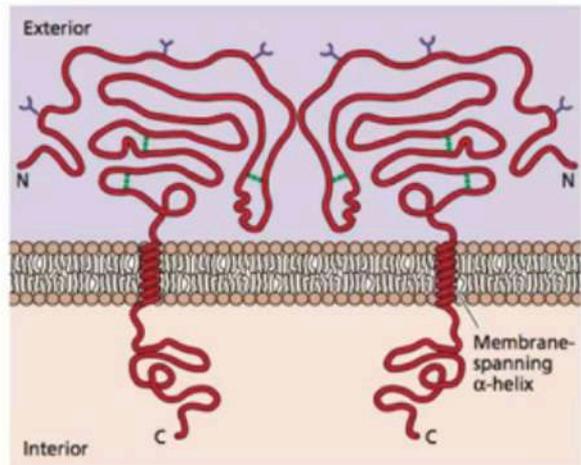
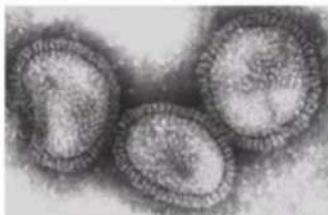
- Nucleocapsids inside the envelope may have helical or icosahedral symmetry

©Principles of Virology, ASM Press

Budding! ER Golgi plasma or nuclear membrane

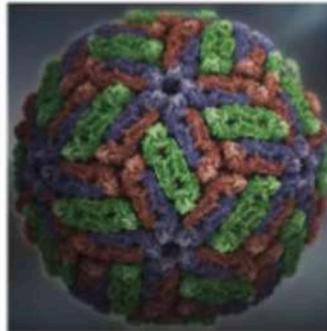
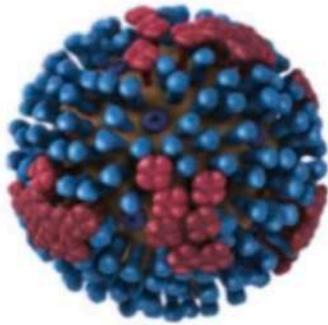
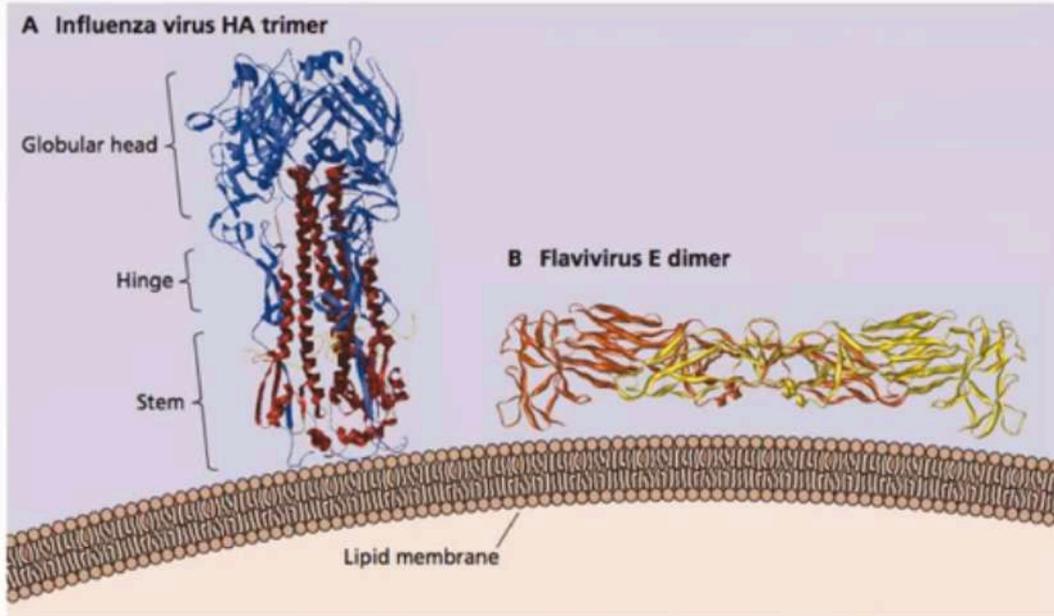
Viral envelope glycoproteins

- Integral membrane glycoproteins
- Ectodomain: attachment, antigenic sites, fusion
- Internal domain: assembly
- Oligomeric: spikes

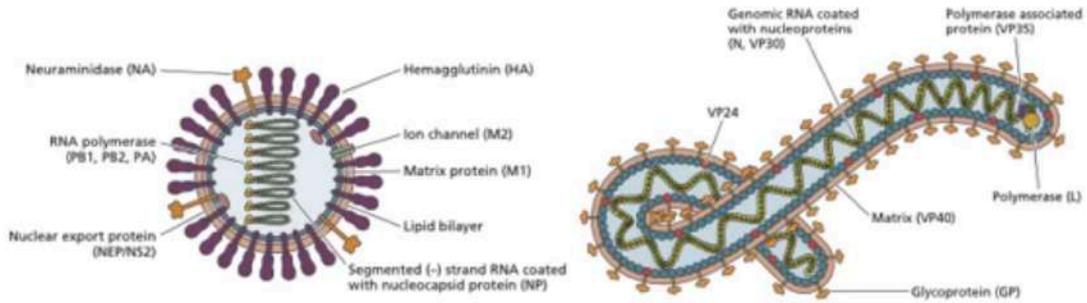


©Principles of Virology, ASM Press

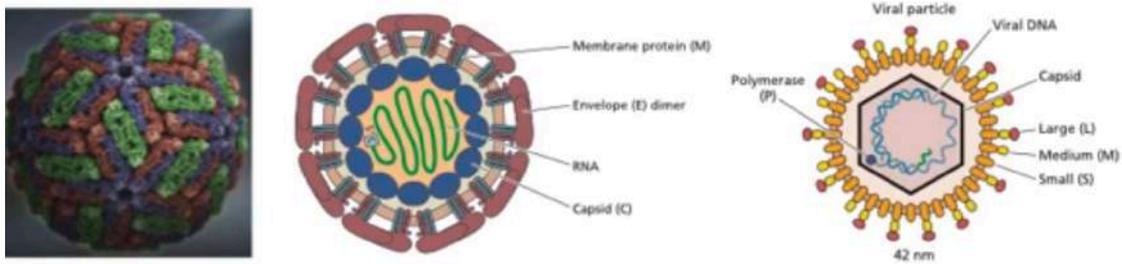
Hemmagglutinin



Helical nucleocapsids - unstructured envelopes

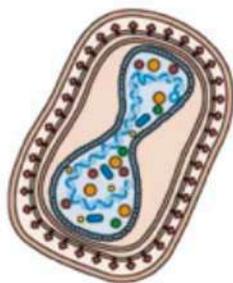


Icosahedral nucleocapsids - structured envelopes

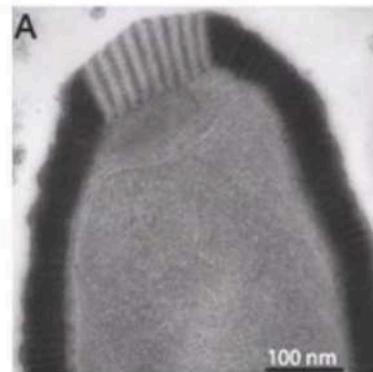


©Principles of Virology, ASM Press

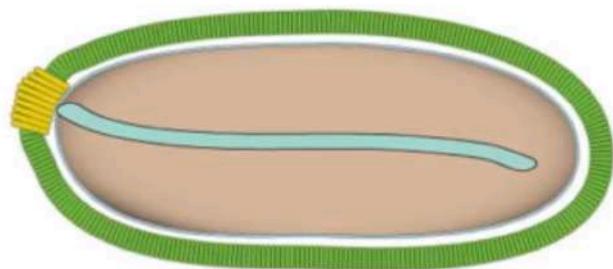
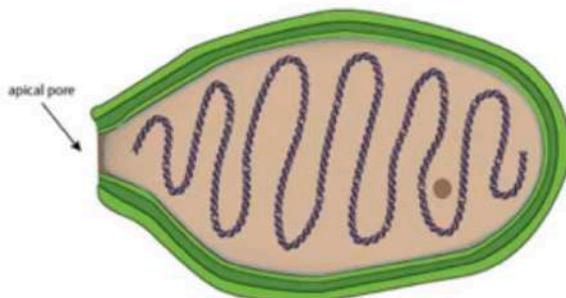
Poxvirus



Pithovirus



Pandoravirus



© ViralZone 2014
 100 Swiss Institute of Bioinformatics

© ViralZone 2014
 100 Swiss Institute of Bioinformatics

Not helical no icosahedral – no symmetry

Other virion components

- Enzymes
 - polymerases, integrases, associated proteins
 - proteases
 - poly(A) polymerase
 - capping enzymes
 - topoisomerase
- Activators, mRNA degradation, required for efficient infection, mRNAs
- Cellular components - histones, tRNAs, myristate, lipid, cyclophilin A, and many more

