



Universidad Autónoma de Madrid



**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Departamento de Biología Molecular**  
**Facultad de Ciencias**

**Análisis estructural y funcional del  
complejo transcripcional del virus  
de la bursitis infecciosa (IBDV)**

**- TESIS DOCTORAL -**

**Aitor Navarro Nieto**  
**Madrid, 2009**







Universidad Autónoma de Madrid



**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Departamento de Biología Molecular**  
**Facultad de Ciencias**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas por

**Aitor Navarro Nieto**

Universidad Autónoma de Madrid  
Abril de 2009

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre**  
C.N.B.-C.S.I.C.



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA





El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (C.N.B-C.S.I.C.) bajo la dirección del Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre. Su financiación corrió a cargo de una beca de un proyecto europeo y de un contrato de técnico superior de Investigación y Laboratorio.



*A mi padre y a mi madre*





## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis ha costado lo suyo, pero por fin es una realidad. En ella ha colaborado mucha gente, tanto a nivel científico como personal y “de buen nacido es ser agradecido” (no podía faltar un refrán):

A Paco, mi director de Tesis, por darme la oportunidad de entrar en éste mundo y por su confianza ciega en mis posibilidades. Por enseñarme a disfrutar de la ciencia, vamos, a sentirme un científico. “Sólo” puedo decir que es mi amigo. Gracias por todos los momentos que hemos pasado, tanto buenos como malos.

A Amelia, mi tía. Gracias a ella llegué aquí. Ella ha sido un apoyo fundamental para mí todos estos años, en lo personal y en lo científico. Impagable su papel como “pepito grillo”, siempre encima, dándome la vara (en el buen sentido) haciéndome ver lo que yo no podía. Gracias por todo.

A la gente de mi laboratorio, el 117, tanto del pasado como del presente. Gracias por hacer del labo un lugar en el que es una gozada trabajar, tanto por el nivel científico, como humano que se viven en él. A Fernando, antiguo compañero de laboratorio y actual casero (no me libro de él ni queriendo), él me enseñó a usar las manos (en conexión con el cerebro), me puso los zapatos y me enseñó a andar en un laboratorio. A Dani, qué decir de este tipo, mi amigo *kunta*, con su enorme capacidad de trabajo, su inteligencia (qué cerebro gasta el tío). Con él he compartido enormes momentos tanto en el laboratorio como fuera de él. Espero que esta relación amistoso-laboral dure muchos años. A los componentes actuales, Ana Oña, Laura, Nerea, Loly, Sonia, Idoia y Antonio Varas y a los antiguos, Irene, Antonio Maraver y Roberto. A J.R., por estar ahí siempre que lo he necesitado y a Elena, del S5. A la gente del 116 y del actual 118 (*formerly named* 117A), en especial a Urtzi, mi compi de piso, Estela, Pablo y Ariel. A la “otra familia”, el 113 con Lolo a la cabeza.

A la gente de Barcelona, vais a parte porque lo vuestro no se cómo denominarlo. Para empezar, la mitad de ésta tesis es vuestra. Gracias por intentar hacerme entender que es eso de la cristalografía, aunque no sé si lo habréis logrado. Gracias a todos, en especial a la jefa, Nuria y a mis dos medias mitades, Damiá y Arnau. Por mucho que digáis, no se dice bepe uno y bepe tres sino uvepe uno y uvepe tres. Estoy seguro que habrá un Gallocanta 2009 o 2010 o...

A la gente de la empresa, Romy, Yolanda, Merche, Tonan, Esther, Javi, Nacho, cuánto hemos aprendido juntos.

Quiero también expresar mi agradecimiento a todo el personal del CNB, de los distintos servicios, sin ayuda de los cuales, esto no habría salido adelante.

A mis amigos de Donosti, por permitirme desconectar de la ciencia entre chuletones y kubatas. Lleváis tiempo conmigo y espero que dure muchos años más.

A toda mi familia (no os asustéis, no es muy grande), en primer lugar a mis padres, a mi madre, por estar siempre conmigo, apoyándome en todo y a mi padre que aunque ya no está, sigue aquí. Gracias a vosotros soy lo que soy. A mis hermanos, Unai y Naiara. A mi familia madrileña, empezando por mis abuelos, que me acogieron en su casa cuando llegué y me han dado todo su cariño. A mis tíos (naturales y políticos). Con todo mi cariño, ésta Tesis también es vuestra.

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-XX:</b>	anticuerpo anti-XX	<b>HT:</b>	cola de histidinas ( <i>Histidine Tag</i> )
<b>aa:</b>	aminoácido	<b>HtH:</b>	hélice-giro-hélice ( <i>Helix-turn-Helix</i> )
<b>AcPHV:</b>	virus de la poliedrosis de <i>Autographa californica</i> ( <i>Autographa californica Poliedrosis Virus</i> )	<b>IBDV:</b>	virus de la bursitis infecciosa ( <i>Infectious Bursal Disease Virus</i> )
<b>ATCC:</b>	colección americana de tipos celulares ( <i>American Type Cell Collection</i> )	<b>IMAC:</b>	cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados ( <i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i> )
<b>ATP:</b>	adenosina-5'-trifosfato ( <i>Adenosine-5'-TriPhosphate</i> )	<b>IPNV:</b>	virus de la necrosis pancreática infecciosa ( <i>Infectious Pancreatic Necrosis Virus</i> )
<b>BSA:</b>	seroalbúmina bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )	<b>IPTG:</b>	isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido
<b>BrEt:</b>	bromuro de etidio	<b>kb:</b>	kilobase
<b>BSNV:</b>	virus del cabeza de serpiente moteado ( <i>Blotched Snakehead Virus</i> )	<b>kDa:</b>	kiloDalton
<b>CEF:</b>	fibroblastos embrionarios de pollo ( <i>Chicken Embryo Fibroblasts</i> )	<b>MAD:</b>	dispersión anómala de longitud de onda múltiple ( <i>Multiwavelength Anomalous Dispersion</i> )
<b>C-terminal:</b>	carboxilo terminal	<b>MALDI-</b>	
<b>DEPC:</b>	di-etil pirocarbonato	<b>TOF:</b>	desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> )
<b>DMEM:</b>	medio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i> )	<b>MOI:</b>	multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of Infection</i> )
<b>DNA:</b>	ácido desoxirribonucleico ( <i>DesoxiriboNucleic Acid</i> )	<b>mRNA:</b>	RNA mensajero ( <i>messenger RNA</i> )
<b>DNasa:</b>	desoxirribonucleasa	<b>NMP:</b>	nucleótido monofosfato ( <i>Nucleotide MonoPhosphate</i> )
<b>dNTP:</b>	desoxirribonucleótido trifosfato ( <i>desoxiriboNucleotide TriPhosphate</i> )	<b>N-terminal:</b>	amino terminal
<b>DpDd:</b>	DNA polimerasa dependiente de DNA	<b>NTP:</b>	nucleotide trifosfato ( <i>Nucleotide TriPhosphate</i> )
<b>DpRd:</b>	DNA polimerasa dependiente de RNA	<b>ORF:</b>	fase abierta de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>DTT:</b>	ditiotreitól	<b>pb:</b>	par de bases
<b>dsRNA:</b>	ácido ribonucleico de cadena doble ( <i>double stranded RNA</i> )	<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>DXV:</b>	virus X de <i>Drosophila</i> ( <i>Drosophila X Virus</i> )	<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>EeV:</b>	virus de <i>Euprosterna elaeasa</i> ( <i>Euprosterna elaeasa Virus</i> )	<b>PDB:</b>	base de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
<b>EDTA:</b>	ácido etilendiaminetetraacético ( <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> )	<b>PEG:</b>	polietilenglicol
<b>EGTA:</b>	ácido etilenglicol tetraacético ( <i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i> )	<b>PIPES:</b>	piperazina-N,N-bis(ácido 2-etanosulfónico)
<b>FCS:</b>	suero fetal de ternero ( <i>Fetal Calf Serum</i> )	<b>PPi:</b>	pirofosfato inorgánico ( <i>PiroPhosphate inorganic</i> )
<b>FID:</b>	difusión libre de interfase ( <i>Free Interface Difusión</i> )	<b>rBV:</b>	baculovirus recombinante ( <i>recombinant Baculovirus</i> )
<b>FMDV:</b>	virus de la fiebre aftosa ( <i>Foot and Mouth Disease Virus</i> )	<b>RHDV:</b>	virus de la enfermedad hemorrágica del conejo ( <i>Rabbit Hemorrhagic Disease Virus</i> )
<b>GTP:</b>	guanosina-5'-trifosfato ( <i>Guanosine-5'-TriPhosphate</i> )	<b>RNA:</b>	ácido ribonucleico ( <i>RiboNucleic Acid</i> )
<b>HCV:</b>	virus de la hepatitis C ( <i>Hepatitis C Virus</i> )	<b>RNasa:</b>	ribonucleasa
<b>HIV:</b>	virus de la inmunodeficiencia humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )	<b>RNP:</b>	ribonucleoproteína ( <i>RiboNucleoProtein</i> )
<b>hp.i.:</b>	horas postinfección	<b>rNTP:</b>	ribonucleótido trifosfato ( <i>riboNucleotide TriPhosphate</i> )
		<b>RT:</b>	temperatura ambiente ( <i>Room Temperature</i> )

<b>rVV:</b>	virus vaccinia recombinante ( <i>recombinant Vaccinia Virus</i> )	<b>T:</b>	número de triangulación
<b>SDS:</b>	dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecil Sulfate</i> )	<b>TaV:</b>	virus de <i>Thosea asigna</i> ( <i>Thosea asigna Virus</i> )
<b>SDS-</b>		<b>TBE:</b>	tampón Tris-Borato-EDTA
<b>PAGE:</b>	electroforésis en geles desnaturizantes de poliacrilamida ( <i>SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> )	<b>Tris:</b>	tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>siRNA:</b>	RNA pequeño interferente ( <i>small interference RNA</i> )	<b>tRNA:</b>	RNA de transferencia ( <i>transfer RNA</i> )
<b>ssRNA:</b>	RNA de cadena simple ( <i>single stranded RNA</i> )	<b>ufp:</b>	unidad formadora de placa
		<b>UTP:</b>	uridina-5'-trifosfato ( <i>Uridine-5'-TriPhosphate</i> )
		<b>UTR:</b>	región no traducida ( <i>UnTranslated Region</i> )
		<b>WB:</b>	inmunodetección de proteínas en membrana ( <i>Western Blot</i> )

## CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

<b>Alanina</b>	Ala, A	<b>Leucina</b>	Leu, L
<b>Arginina</b>	Arg, R	<b>Lisina</b>	Lys, K
<b>Ácido aspártico</b>	Asp, D	<b>Metionina</b>	Met, M
<b>Asparagina</b>	Asn, N	<b>Fenilalanina</b>	Phe, F
<b>Cisteína</b>	Cys, C	<b>Prolina</b>	Pro, P
<b>Ácido Glutámico</b>	Glu, E	<b>Serina</b>	Ser, S
<b>Glicina</b>	Gly, G	<b>Tirosina</b>	Tyr, Y
<b>Glutamina</b>	Gln, Q	<b>Treonina</b>	Thr, T
<b>Histidina</b>	His, H	<b>Triptófano</b>	Trp, W
<b>Isoleucina</b>	Ile, I	<b>Valina</b>	Val, V



# ÍNDICE

<b>ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS</b>	1
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>1.1 El virus de la bursitis infecciosa (IBDV)</b>	7
<b>1.2 Organización genómica de IBDV</b>	7
<b>1.3 Estructura del virión de IBDV</b>	9
1.3.1 Componentes estructurales del virión de IBDV	9
<b>1.4 RNA polimerasas RNA dependientes virales</b>	12
1.4.1 La polimerasa de IBDV	14
<b>1.5 La proteína VP3</b>	16
<b>1.6 De la purificación a la resolución</b>	18
1.6.1 Purificación de proteínas recombinantes	19
1.6.2 Cristalización de proteínas	19
<b>2 OBJETIVOS</b>	23
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
<b>3.1 Material Biológico</b>	29
3.1.1 Células procariotas	29
3.1.2 Células eucariotas	29
3.1.3 Plásmidos	29
3.1.4 Virus	30
3.1.5 Anticuerpos	31

<b>3.2 Manipulación y obtención de material biológico</b>	32
3.2.1 PCR	32
3.2.2 Reacciones de ligación de fragmentos de DNA	32
3.2.3 Reacciones de restricción enzimática	32
3.2.4 Generación de plásmidos recombinantes	32
3.2.5 Obtención de rVV VT7/his-VP3	36
3.2.6 Obtención de Baculovirus recombinantes (rBV)	36
3.2.7 Reacciones de transcripción <i>in vitro</i>	36
3.2.8 Obtención de antisuero específico frente a la proteína VP1 (nº 806)	37
<b>3.3 Infecciones y expresión de proteínas</b>	37
3.3.1 Infección con rBV	37
3.3.2 Infección con rVV VT7	37
3.3.3 Infección con IBDV	37
3.3.4 Marcaje metabólico con [ <sup>35</sup> S]-Met	37
3.3.5 Anillamiento y marcaje con [ <sup>32</sup> P]-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> de oligos de ssRNA	38
<b>3.4 Purificación de proteínas y ensamblados virales</b>	38
3.4.1 Purificación de las proteínas VP1 y VP3	38
3.4.2 Purificación de viriones de IBDV	39
3.4.3 Purificación de dsRNA de IBDV	39
<b>3.5 Análisis Bioquímico</b>	40
3.5.1 Análisis electroforético en geles desnaturizantes de poliacrilamida	40
3.5.2 Análisis electroforético en geles nativos de agarosa	40
3.5.3 Análisis electroforético en geles nativos de poliacrilamida	40
3.5.4 Electrotransferencia e inmunodetección ( <i>Western Blot</i> )	41
3.5.5 Análisis por cromatografía de exclusión (filtración en gel)	41
3.5.6 Análisis por espectrometría de masas	41
<b>3.6 Determinación de la estructura atómica de las proteínas</b>	42
3.6.1 Cristalización y recolección de datos	42
3.6.2 Determinación de estructura y refinamiento	43
3.6.3 Números de acceso de las estructuras de Rayos X	43



<b>3.7 Ensayos de interacción proteína-RNA y ensayos de actividad</b>	44
<b>3.7.1</b> Ensayos de interacción proteína-RNA	44
<b>3.7.2</b> Ensayo de actividad polimerasa	44
<b>4 RESULTADOS</b>	47
<b>4.1 Proteína VP1 del virus IBDV</b>	49
<b>4.1.1</b> Expresión de la proteína recombinante his-VP1	49
<b>4.1.2</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP1	50
<b>4.1.3</b> Expresión de la proteína recombinante his-VP1 $\Delta$ 846-879	52
<b>4.1.4</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP1 $\Delta$ 846-879	53
<b>4.1.5</b> Determinación de la estructura atómica de la proteína VP1	54
<b>4.2 Proteína VP3 del virus IBDV</b>	61
<b>4.2.1</b> Expresión y purificación de la proteína recombinante his-VP3	61
<b>4.2.2</b> Expresión de la proteína recombinante his-VP3 $\Delta$ 222-258	63
<b>4.2.3</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP3 $\Delta$ 222-258	64
<b>4.2.4</b> Determinación de la estructura atómica de la proteína VP3	65
<b>4.2.5</b> Expresión mediante el virus rVV VT/7LacOI de la proteína recombinante his-VP3 (rVV VT7/his-VP3)	69
<b>4.2.6</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP3 procedente de células de mamífero	72
<b>4.3 Ensayos de interacción de las proteínas VP3 y VP1 con dsRNA y ssRNA viral</b>	73
<b>4.3.1</b> Interacción de las proteínas his-VP3 e his-VP3 $\Delta$ 222-258 con dsRNA viral	73
<b>4.3.2</b> Interacción de las proteínas his-VP1 e his-VP1 $\Delta$ 846-879 con dsRNA viral	75
<b>4.3.3</b> Ensayo de interacción de los complejos VP1-VP3 con dsRNA viral	76
<b>4.3.4</b> Interacción de las proteínas his-VP3 e his-VP3 $\Delta$ 222-258 con ssRNA viral	78
<b>4.3.5</b> Determinación del tamaño mínimo de dsRNA con el cual interacciona la proteína his-VP3	80

<b>4.4 Ensayos de actividad</b>	82
<b>4.4.1</b> Ensayo de actividad de VP1, VP1-péptido C-terminal de VP3 y VP3-VP1	82
<b>4.4.2</b> Ensayo de actividad con distintos cationes divalentes	84
<b>4.5 Estructura del complejo VP1-péptido C-terminal de VP3</b>	85
<b>5 DISCUSIÓN</b>	89
<b>5.1 La proteína VP1</b>	91
<b>5.1.1</b> Conectividad no canónica de la palma de VP1	91
<b>5.1.2</b> El sitio activo	92
<b>5.1.3</b> Complejo VP1-Mg <sup>2+</sup>	94
<b>5.2 La proteína VP3</b>	94
<b>5.2.1</b> Interacción de la proteína VP3 con el RNA viral (dsRNA y ssRNA)	95
<b>5.2.2</b> Intercambio de dominios ( <i>Domain-Swapping</i> )	96
<b>5.2.3</b> Factores reguladores de la transcripción	97
<b>5.3 Complejo VP1-VP3</b>	99
<b>5.3.1</b> Modelo hipotético de interacción VP1-VP3	99
<b>5.3.2</b> Actividad catalítica de la proteína VP1	101
<b>5.3.3</b> Modelo hipotético de unión de RNA y polimerización	102
<b>5.4 Relaciones evolutivas</b>	104
<b>6 CONCLUSIONES</b>	107
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	111
<b>8 PUBLICACIONES</b>	127

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras proteicas resueltas de Birnavirus	6
<b>Figura 2.</b> Organización genómica de IBDV	9
<b>Figura 3.</b> Estructura de la cápsida	11
<b>Figura 4.</b> Estructura de RpRd	13
<b>Figura 5.</b> Organización estructural del dominio <i>palma</i> canónico o permutado	14
<b>Figura 6.</b> Expresión de las proteínas VP1 y VP3 en el contexto de la infección con IBDV. Análisis por microscopía electrónica de las RNPs de IBDV	17
<b>Figura 7.</b> Esquema del proceso desde el gen hasta la estructura	18
<b>Figura 8.</b> Esquema de un diagrama de fase de la cristalización de proteínas	21
<b>Figura 9.</b> Expresión de la proteína recombinante his-VP1	49
<b>Figura 10.</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP1	50
<b>Figura 11.</b> Análisis por espectrometría de masas de la proteína his-VP1	51
<b>Figura 12.</b> Expresión de la proteína recombinante his-VP1 $\Delta$ 846-879	52
<b>Figura 13.</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP1 $\Delta$ 846-879	53
<b>Figura 14.</b> Estructura de la polimerasa VP1 de IBDV	55
<b>Figura 15.</b> Motivos estructurales conservados de la polimerasa	57
<b>Figura 16.</b> Secuencia del polipéptido VP1 $\Delta$ 846-879	58
<b>Figura 17.</b> Mapa de densidad electrónica alrededor del sitio activo de VP1 en la estructura del complejo VP1-Mg <sup>2+</sup>	59
<b>Figura 18.</b> Esquema del plegamiento del dominio <i>palma</i>	60
<b>Figura 19.</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP3	61
<b>Figura 20.</b> Análisis por espectrometría de masas de la proteína his-VP3	62
<b>Figura 21.</b> Expresión de la proteína recombinante his-VP3 $\Delta$ 222-258	64
<b>Figura 22.</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP3 $\Delta$ 222-258	65
<b>Figura 23A.</b> Estructura de la proteína VP3 de IBDV	66
<b>Figura 23B.</b> Secuencia del polipéptido VP3 $\Delta$ 222-258	67
<b>Figura 24.</b> Estructura del dímero de VP3	68
<b>Figura 25A.</b> Caracterización de la expresión de rVV VT7/his-VP3	70
<b>Figura 25B.</b> Caracterización de la expresión de rVV VT7/his-VP3	71
<b>Figura 26.</b> Purificación de la proteína recombinante his-VP3 de origen rVV VT7/his-VP3	72

<b>Figura 27.</b> Interacción de las proteínas recombinantes his-VP3 e his-VP3 $\Delta$ 222-258 con dsRNA viral	74
<b>Figura 28.</b> Interacción de las proteínas recombinantes his-VP1 e his-VP1 $\Delta$ 846-879 con dsRNA viral	75
<b>Figura 29.</b> Análisis de interacción del complejo VP1-VP3 (I)	76
<b>Figura 30.</b> Análisis de interacción del complejo VP1-VP3 (II)	77
<b>Figura 31.</b> Interacción de las proteínas his-VP3 e his-VP3 $\Delta$ 222-258 con ssRNA viral	79
<b>Figura 32.</b> Interacción de la proteína his-VP3 con oligonucleótidos de RNA hibridados y marcados	81
<b>Figura 33.</b> Ensayo de actividad VP1, VP-péptido C-terminal de VP3 y VP1-VP3	83
<b>Figura 34.</b> Actividad polimerasa en presencia de distintos cationes	84
<b>Figura 35.</b> Estructura de la proteína VP1 acomplejada o no con el péptido C-terminal de VP3	86
<b>Figura 36.</b> Mapa de densidad del complejo VP1-péptido C-terminal de VP3	88
<b>Figura 37.</b> Coordinación de iones metálicos	93
<b>Figura 38.</b> Esquema resumen de la proteína VP3	98
<b>Figura 39.</b> Modelo hipotético de interacción VP1-VP3	100
<b>Figura 40.</b> Modelo de activación de la polimerasa VP1 y síntesis de RNA	103

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos empleados en la generación de las diferentes construcciones	35
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos empleados en la generación de dsRNA de pequeño tamaño	35

## **ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS**

*Infectious bursal disease virus* (IBDV), a member of the *Birnaviridae* family, is the causative agent of one of the most harmful poultry diseases. The IBDV genome encodes five mature proteins. The work described here has been focused on the characterization of the structure/function relationship of the IBDV transcriptional complex formed by the VP1 and VP3 proteins and the viral RNA.

Here, we report the x-ray structure of the VP1 polypeptide, a non-canonical birnaviral RNA dependent RNA polymerase (RdRp) in its free form, as well as bound to a peptide encompassing the polymerase-binding motif of the regulatory viral protein VP3. The structure of VP1 reveals that the non-canonical connectivity of the palm subdomain maintains the geometry of the catalytic residues found in canonical polymerases but results in a partial blocking of the active site cavity. The VP1–VP3 peptide complex shows a mode of polymerase activation in which VP3 binding promotes a conformational change that removes the steric blockade of the VP1 active site, thus facilitating the accommodation of the template and incoming nucleotides for catalysis. The striking structural similarities between birnavirus (dsRNA) and the positive-stranded RNA picornavirus RdRp provide evidence supporting the existence of functional and evolutionary relationships between these two virus groups.

The multifunctional protein VP3 plays an essential role in virus morphogenesis. This protein, which interacts with the structural protein VP2, with the double stranded RNA genome, and with the virus-encoded RdRp, VP1, is involved not only in the formation of the viral capsid, but also in the recruitment of VP1 into the capsid and in the encapsidation of the viral genome. Here, we report the X-ray structure of the central region of VP3, residues 92–220, consisting of two  $\alpha$ -helical domains connected by a long and flexible hinge that are organized as a dimer. Unexpectedly, the overall fold of the second VP3 domain shows significant structural similarities with different transcription regulation factors.



# *1 Introducción*





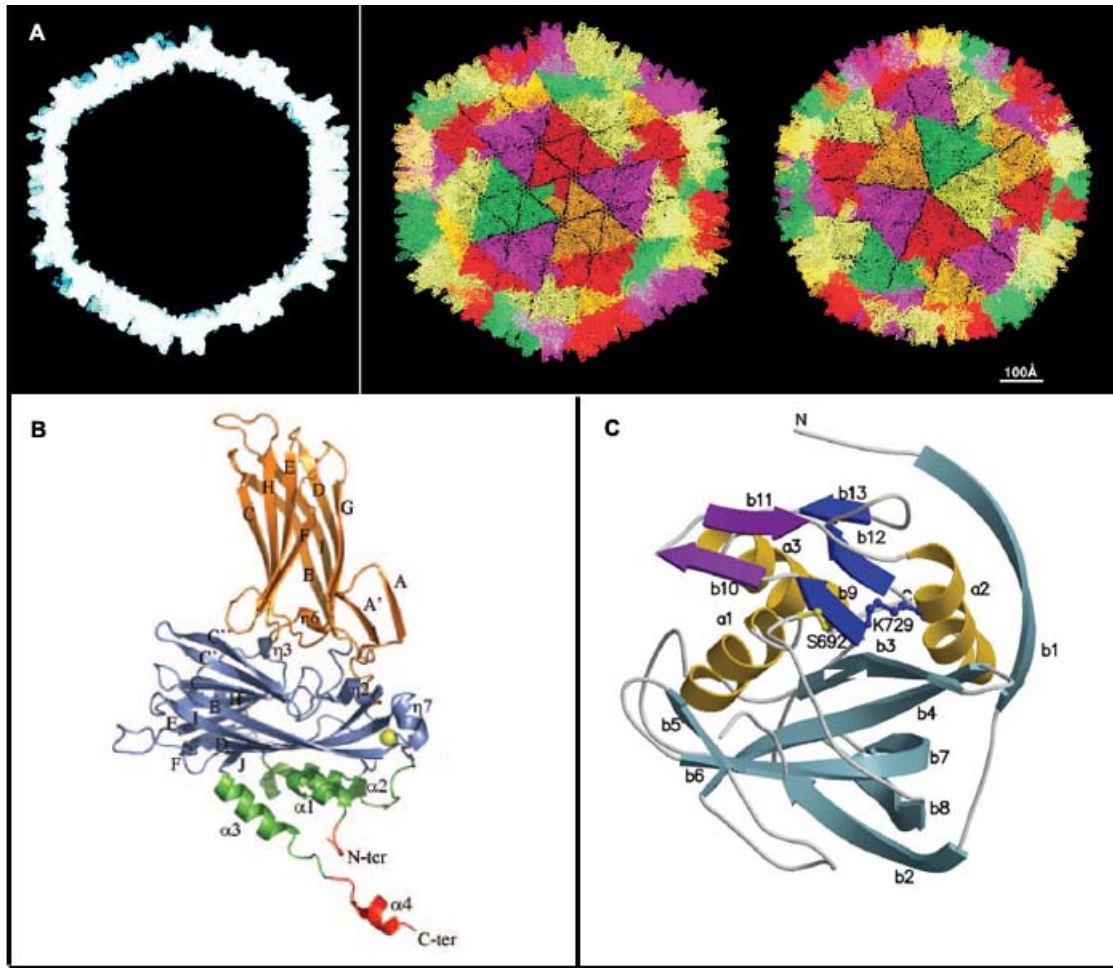


## **Análisis estructural y funcional del complejo transcripcional del virus de la bursitis infecciosa (IBDV)**

Los virus son únicos en la naturaleza. Son los organismos autoreplicativos más pequeños que existen. En su forma más básica consisten únicamente en un pequeño segmento de ácido nucleico encerrado en un caparazón proteico simple. Los virus no tienen metabolismo por sí mismos y, por lo tanto, están obligados a invadir células y parasitar su maquinaria biosintética, desviándola de su propósito inicial. Muchos han argumentado incluso que los virus no están vivos (Villareal 2004) aunque para un investigador experimentado, exhiben una vida tan robusta como cualquier otra criatura. La virología, como material de estudio, ha tenido una historia notable. Los virus, debido a su naturaleza predadora, han conformado la historia y la evolución de sus huéspedes. Las consecuencias médicas de las infecciones virales en humanos han alterado nuestra historia y han dado lugar a extraordinarios esfuerzos por parte de los virólogos para entender y erradicar estos agentes. Muchos de los conceptos y herramientas de la biología molecular se derivan del estudio de los virus y de sus huéspedes.

La aparente simplicidad de los virus es engañosa. Lo cierto es que, como grupo, los virus infectan casi cualquier organismo en la naturaleza, presentan una enorme diversidad y complejidad de estructura y función. El estudio de los virus debe tener en cuenta tanto su singularidad como su complejidad. La singular naturaleza de los virus ha dado lugar a nuevos métodos de clasificación y experimentación exclusivos de la virología. La complejidad de los virus está constantemente poniendo a prueba a los científicos y a su investigación para poder comprender algunos nuevos cambios en el dogma central de la biología que han sido revelados en una simple infección viral.

En el caso concreto de nuestro laboratorio, el objetivo de estudio es el virus de la bursitis infecciosa (IBDV) que se describirá en profundidad más adelante en esta memoria. El trabajo de nuestro grupo y otros como el nuestro, se ha focalizado en la obtención de un conocimiento del virus, tanto a nivel estructural como a nivel funcional, que mediante un estudio minucioso de cada uno de los componentes, nos permiten obtener una imagen global del mismo. El conocimiento sobre la biología estructural y molecular de IBDV ha experimentado un gran progreso en los últimos años, así, la estructura cristalina de varios de los componentes del virus ha sido resuelta, en concreto, la estructura de la proteína VP2 y con ello la estructura de la partícula viral (Colulibaly y col. 2005; Garriga y col. 2006, Lee y col 2006) y la estructura de la proteasa viral, la proteína VP4 (Feldman y col. 2006; Lee y col. 2007) (Figura 1).



**Figura 1. Estructuras proteicas resueltas de Birnavirus.** (A) Estructura de la cápsida de IBDV (Coulibaly y col. 2005); (B) Estructura de la proteína VP2 de IBDV (Garriga y col. 2006); (C) Estructura de la proteína VP4 de BSNV (Feldman y col. 2006).

A su vez, se ha caracterizado extensamente el ensamblaje viral (Oña y col. 2004; Saugar y col. 2005; Chevalier y col. 2005; Luque y col. 2007) y se han estudiado las características funcionales de las proteínas VP1 (Dobos 1993; Lombardo y col. 1999; von Einem y col. 2004; Tacken y col. 2004; Xu y col. 2004) y VP3 (Tacken y col. 2002; Kochan y col. 2003; Maraver y col. 2003a; Maraver y col. 2003b). Sin embargo, excepto predicciones informáticas (Gorbalenya y col. 2002; Maraver y col. 2003b), se carecía de información experimental acerca de la estructura tridimensional de las proteínas VP1 y VP3. En el trabajo descrito en la presente memoria se ha utilizado la experiencia del grupo de investigación en la bioquímica del virus para resolver la estructura tridimensional de las proteínas VP1 y VP3 como paso previo para la comprensión en profundidad de las características funcionales anteriormente estudiadas.

## 1.1 El virus de la bursitis infecciosa (IBDV)

La familia *Birnaviridae* engloba los géneros *Aquabirnavirus*, *Entombirnavirus* y *Avibirnavirus*, siendo sus miembros representativos el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus X de *Drosophila* (DXV) y el virus de la bursitis infecciosa (IBDV), respectivamente (Fauquet y col. 2005).

IBDV es el agente causal de la enfermedad de la bursitis infecciosa. Esta enfermedad, altamente contagiosa, afecta a pollos jóvenes y se caracteriza por la destrucción de la bolsa de Fabricio (Kaufer y Weiss 1980). Este hecho provoca una inmunosupresión severa y, por tanto, una elevada susceptibilidad frente a patógenos oportunistas que produce grandes pérdidas en la industria avícola a nivel mundial (van den Berg y col. 2000).

IBDV se caracteriza por ser muy resistente a tratamientos tradicionalmente empleados para la desinfección tales como la inactivación química o por calor. Hasta ahora, el único método eficaz disponible para el control de la bursitis infecciosa consiste en la implementación de programas vacunales intensivos (Negash y col. 2004). Sin embargo, el uso indiscriminado de vacunas atenuadas ha coadyuvado a la rápida diseminación global del virus (Yamaguchi y col. 2000). La detección de anticuerpos neutralizantes específicos frente a IBDV en pingüinos emperador (*Spheniscidae aptenodytes*) procedentes de colonias antárticas (Gardner y col. 1997), ejemplifica el grado de diseminación actual del virus. La búsqueda de nuevas estrategias para controlar y, eventualmente, erradicar la enfermedad es por tanto prioritaria. Esta necesidad es especialmente acuciante para los países del tercer mundo, donde el pollo constituye la base proteica de la dieta y en los que el mantenimiento de programas de vacunación tan complejos y costosos como los actuales, resulta económica y técnicamente inviable.

## 1.2 Organización genómica de IBDV

El genoma de IBDV está formado por dos segmentos de RNA de cadena doble (dsRNA) de 3,2 kb (segmento A) y 2.8 kb (segmento B) (Muller y col. 1979; Muller y Nitschke 1987) con regiones no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3' (Figura 2).

El segmento A contiene dos fases abiertas de lectura (ORFs) parcialmente solapantes. La primera de ellas codifica la proteína no estructural VP5 (145 aa, 17 kDa), una proteína citolítica de membrana (Lombardo y col. 2000) que, aunque dispensable para la replicación del virus en cultivos celulares (Mundt y col. 1997), es importante en la patogénesis *in vivo*, ya que está implicada en la liberación y dispersión de la progenie viral (Yao y col. 1998; Lombardo y col.

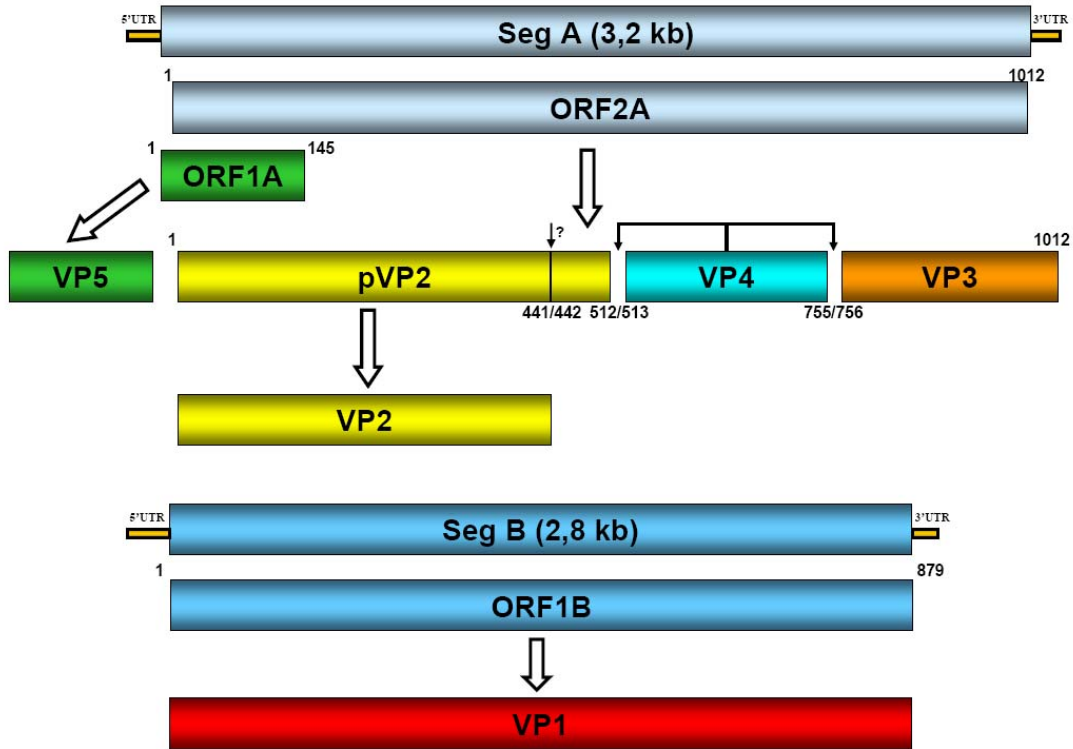
2000). Se ha descrito que esta proteína inhibe la apoptosis en los estadios iniciales de la infección (Liu y col. 2006). La segunda ORF codifica una poliproteína de 107 kDa (1012 aa) que se autoprocasa proteolíticamente dando lugar a las proteínas pVP2 (512 aa, 54 kDa), VP4 (244 aa, 25 kDa) y VP3 (256 aa, 28 kDa) en un proceso cotraduccional mediado por la propia VP4 (Kibenge y col. 1988a; 1988b). Inicialmente, se propuso que VP4, la proteasa de los birnavirus, utilizaría un mecanismo catalítico mediado por residuos Ser y Lys conservados en su centro activo, lo que la diferenciaría de otras proteasas virales (Birghan y col. 2000; Lejal y col. 2000; Petit y col. 2000). La reciente resolución de la estructura cristalina de la proteína VP4 de varios miembros de la familia (Feldman y col. 2006; Lee y col. 2007), ha confirmado la validez de dicha hipótesis, así como la homología estructural con otras proteasas con una díada catalítica Ser/Lys como la proteasa bacteriana Lon (Botos y col. 2004; Botos y col. 2005), las proteínas de respuesta a daño en el DNA LexA (Luo y col. 2001) y UmuD' (Peat y col. 1996), o el represor c1 del bacteriófago  $\lambda$  (Bell y col. 2000).

pVP2 es la forma precursora de la proteína estructural de la cápsida, VP2. Los 71 residuos carboxilo terminales de pVP2 son procesados para dar lugar a la forma madura, VP2 (441 aa, 48 kDa). La maduración postraduccional de pVP2 está mediada por dos eventos proteolíticos: el procesamiento por VP4 en dianas secundarias Ala-Ala en las posiciones 487, 494 y 501 (generando hasta cuatro variantes de pVP2), y el procesamiento posterior, más lento, entre los residuos 441 y 442. El mecanismo de éste segundo evento proteolítico viene determinado por la actividad endopeptidasa del residuo D431 de la proteína VP2 que procesa la diana A441-F442 para dar lugar a la proteína VP2 madura (Irigoyen y col. 2009). En cualquier caso, el proceso de maduración requiere el ensamblaje de la cápsida viral (Chevalier y col. 2002) y los pequeños polipéptidos generados quedan retenidos en las partículas virales (Da Costa y col. 2002). Dichos péptidos poseen la capacidad de desestabilizar membranas (Chevalier y col. 2005; Galloux y col. 2007). Al igual que ocurre en los procesos morfogenéticos de otros sistemas virales (Gallagher y Rueckert 1988; Zlotnick y col. 1994; Schneemann y col. 1998), este proceso de maduración proteolítica podría conferir irreversibilidad al ensamblaje de la cápsida.

VP3 es una proteína multifuncional ya que además de su interacción con VP2 durante el proceso de morfogénesis de la cápsida, está implicada en múltiples interacciones con otros componentes estructurales del virión. VP3, interacciona con la RNA polimerasa RNA dependiente (VP1) y con el dsRNA viral (Lombardo y col.1999; Tacken y col. 2002; Maraver y col. 2003a; Maraver y col. 2003b).

El segmento B contiene una única ORF que codifica la RNA-polimerasa RNA-dependiente (RpRd), una proteína de 97 kDa (879 aa) (Muller y Nitschke 1987b; Morgan y col. 1988; von

Einem y col. 2004) (Figura 2). Al igual que las polimerasas de otros virus dsRNA, VP1 cataliza tanto la transcripción como la replicación del genoma viral (Spies y col. 1987; Xu y col. 2004; Pan y col. 2007).



**Figura 2. Organización genómica de IBDV.** El segmento A contiene dos ORFs que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral, respectivamente. La poliproteína es procesada cotraduccionalmente dando lugar a las proteínas pVP2, VP3 y VP4. pVP2 se autoprocresa postraduccionalmente en su extremo carboxilo terminal para dar lugar a la forma madura VP2. El segmento B contiene una única ORF que codifica la RpRd, VP1.

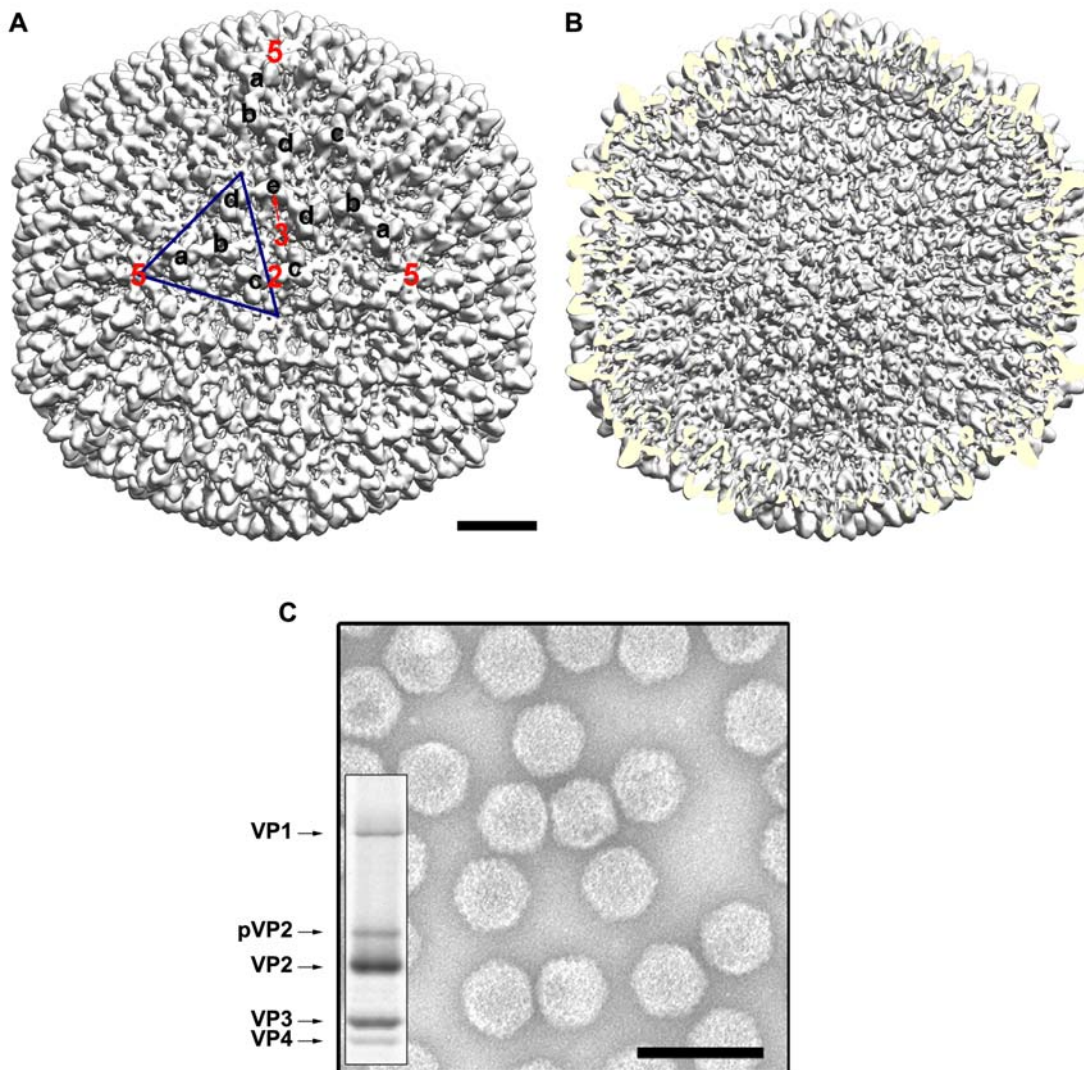
## 1.3 Estructura del virión de IBDV

### 1.3.1 Componentes estructurales del virión de IBDV

IBDV es un virus icosaédrico carente de envuelta lipídica. La estructura tridimensional de la partícula viral, resuelta mediante rayos X (Figura 1A) (Coulibaly y col. 2005) y reconstrucción de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica, ha mostrado que el virus presenta una única envuelta proteica (Böttcher y col. 1997; Castón y col. 2001). La cápsida del virión muestra una topografía molecular basada en un número de triangulación T=13, presentándose las subunidades fundamentales en forma de trímeros (Figura 3). La partícula, de un grosor

medio de 9 nm, no presenta un carácter esférico, ya que entre los ejes de orden 5 tiene un diámetro de 72 nm, mientras que entre los ejes de orden 3 el diámetro aproximado es de 66 nm. Para partículas altamente simétricas como son los virus, el mapa tridimensional no solamente revela la forma del virus sino también la organización y forma de sus componentes, su estequiometría y los cambios sistemáticos en la conformación de sus unidades estructurales que permiten la formación de la cápsida. Así, la cara externa del virión está formada por un total de 260 protusiones triméricas que se disponen en cinco entornos locales (a-e, mostrado en Figura 3A), permitiendo interacciones muy estrechas entre algunos trímeros vecinos, mientras que otros se encuentran más separados (Figura 3A). La cara interna de la cápsida presenta 200 unidades morfológicas en forma de Y localizadas en las posiciones hexaméricas locales, mientras que en las posiciones pentaméricas aparecen unas densidades anulares como consecuencia del estrecho empaquetamiento de los trímeros en las mismas (Figura 3B).

VP2 (junto con una pequeña proporción de pVP2) y VP3 son las proteínas mayoritarias del virión maduro. Además de estos componentes, la partícula viral también contiene los segmentos de dsRNA que constituyen el genoma viral, así como una menor proporción de la RpRd y de la proteasa VP4 (Figura 3C, recuadro interior) (Dobos y col. 1979). La posible incorporación de VP4 a la partícula viral está en entredicho debido a su tendencia a formar estructuras tubulares, denominadas túbulos de tipo II, que podrían copurificar con los viriones (Granzow y col. 1997). Aunque los primeros análisis indicaban que la cápsida del virión maduro estaba constituida por VP2 y VP3 (Böttcher y col. 1997), estudios posteriores, han demostrado que está formada únicamente por trímeros cuasi-equivalentes de VP2 (Coulibaly y col. 2005; Saugar y col. 2005; Luque y col. 2007). Este hecho es coherente con que VP2 reúna los principales marcadores de virulencia y patogenicidad (Brandt y col. 2001; van Loon y col. 2002); así como epítomos reconocidos por anticuerpos neutralizantes (Schnitzler y col. 1993).



**Figura 3. Estructura de la cápsida.** (A-B) Estructura tridimensional de la partícula de IBDV mostrando sus caras externa (A) e interna (B) a una resolución de 10 Å (Luque y col. 2007). En una cara fundamental del icosaedro se indican las diferentes clases de capsómeros triméricos (a-e) y los ejes de simetría de orden 5, 3 y 2. El enantiómero arbitrariamente mostrado es levógiro. La barra de escala corresponde a 10 nm. (C) Viriones de IBDV purificados teñidos negativamente con acetato de uranilo. La barra corresponde a 100 nm. El recuadro interior muestra el análisis electroforético y tinción con Coomassie de los viriones maduros de IBDV purificados (Lombardo y col. 1999). Se indica con flechas cada una de las proteínas estructurales del virus: VP1 (97kDa), pVP2 (~54 kDa), VP2 (48kDa), VP3 (28 kDa) y VP4 (25 kDa).

## 1.4 RNA polimerasas RNA dependientes virales

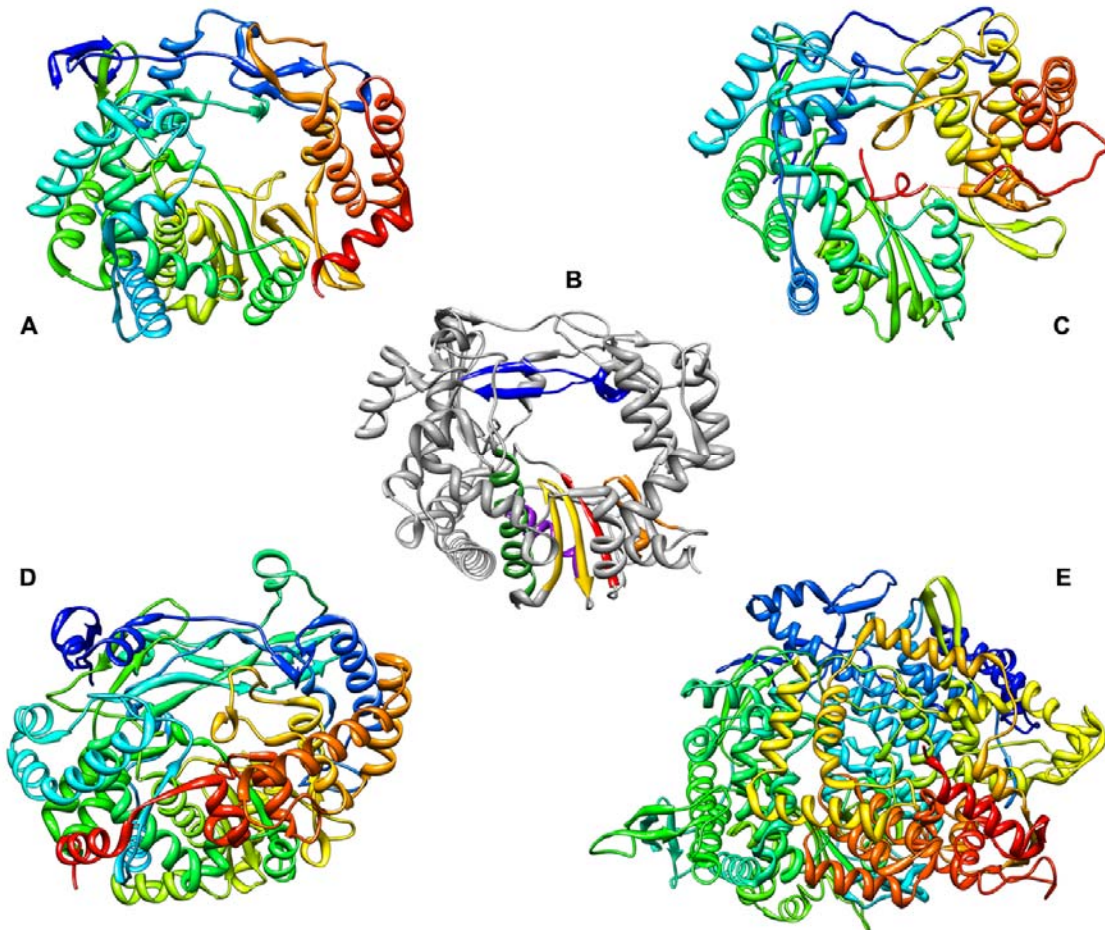
Las RpRd son los componentes catalíticos de la replicación del RNA y, por tanto, actores fundamentales en el ciclo vital. Hasta el día de hoy, se ha resuelto la estructura de las RpRd de varias familias de virus, tanto en su apofoma como unidas a ácidos nucleicos y sustratos, como por ejemplo la polimerasa NS5B del virus de la hepatitis C (HCV) perteneciente a la familia *Flaviviridae* (Ago y col 1999; Lesburg y col. 1999), la polimerasa del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) perteneciente a la familia *Caliciviridae* (Ng y col. 2002), la polimerasa 3D del virus de la fiebre aftosa (FMDV) perteneciente a la familia *Picornaviridae* (Ferrer-Orta y col. 2004), la polimerasa  $\lambda 3$  de reovirus, perteneciente a la familia *Reoviridae* (Tao y col. 2002) y la polimerasa del fago  $\phi 6$ , perteneciente a la familia *Cystoviridae* (Butcher y col. 2001; Salgado y col. 2004). Las tres primeras pertenecen a virus RNA de cadena simple y polaridad positiva y las otras dos a virus de RNA de doble cadena.

Los datos estructurales confirman lo propuesto anteriormente por Steitz (Steitz 1998) respecto a que todas las RpRd comparten una estructura y mecanismos de catálisis similares. Estas estructuras contienen una región central de la polimerasa que recuerda a la forma de una *mano derecha* con los dominios *dedos*, *palma* y *pulgar* en conformación cerrada la cual se consigue mediante la interconexión de los dominios *dedos* y *pulgar* a través de la porción N-terminal de la proteína y a través de varios lazos que sobresalen de los *dedos*, llamados *yemas de dedos*, los cuales circularizan completamente el sitio activo del enzima, en contraposición a la conformación abierta o forma de *U* observada en las DNA polimerasas (Steitz 1999). Esta forma de *mano derecha* permite el correcto ordenamiento geométrico de los sustratos y los iones metálicos en el sitio activo de catálisis (Brautigam y col. 1998). De todas maneras, además de las similitudes obvias, las RpRd virales tienen características específicas que las distinguen unas de otras.

El sitio catalítico de todas las RpRd se encuentra en el dominio *palma*. La arquitectura de esta región está compuesta por tres hojas  $\beta$ , organizadas de forma antiparalela flanqueadas por tres  $\alpha$ -hélices, esta región es la característica más conservada de todas las polimerasas conocidas. Se han identificado seis motivos estructurales y de secuencia (Kamer y col. 1984; O'Reilly y col. 1998; Bruenn 2003), la mayoría de los cuales son compartidos con las RNA polimerasas DNA dependientes (RpDd), DNA polimerasas DNA dependientes (DpDd) y DNA polimerasas RNA dependientes (DpRd) que son fundamentales para el funcionamiento enzimático de las polimerasas. Estos motivos, designados de la A a la F, juegan un papel fundamental en los distintos procesos de la catálisis de las polimerasas tales como el reconocimiento y unión de los



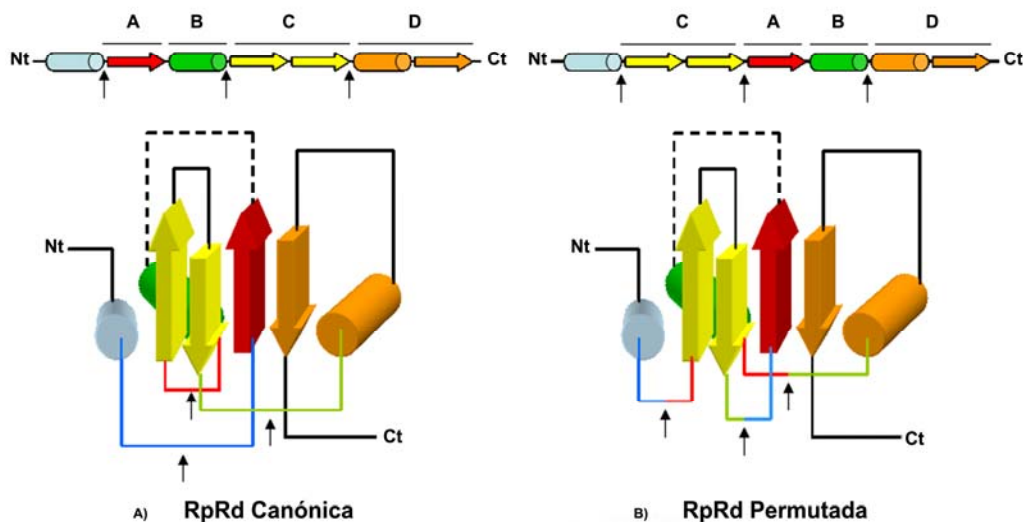
nucleótidos (motivos A y B), transferencia de grupos fosfato (motivos A y C), integridad estructural del dominio *palma* (motivo D), primado de la unión de nucleótidos (motivo E) y unión del molde (motivo F) (Figura 4).



**Figura 4. Estructura de RpRd.** Se representan mediante diagramas de cintas, y en su conformación convencional de *mano derecha*, las estructuras de las RpRd; **A.** RHDV, **B.** 3Dpol (FMDV), **C.** NS5B (HCV), **D.** bacteriófago  $\phi 6$  y **E.**  $\lambda 3$  (Reovirus). La polimerasa 3D de FMDV (**B**) se muestra en gris con los seis motivos estructurales de los dominios *palma* y *dedos* coloreados como sigue: A, rojo; B, verde; C, amarillo; D, violeta; E, naranja; y F, azul. Las demás RpRd se colorean en tipo arcoiris desde el N-terminal en azul, hasta el C-terminal en rojo.

### 1.4.1 La polimerasa de IBDV

Si dirigimos nuestra atención al dominio *palma*, el cual se considera un vestigio de una polimerasa ancestral (Koonin y col. 2006) y por lo tanto podemos deducir que es la región que se encuentra más conservada entre las distintas polimerasas, podemos comprobar que, en contraste con las características convencionales, la polimerasa de birnavirus tiene, entre otras, una característica inusual y es que la secuencia clásica G-D-D que habitualmente se encuentra en el Motivo C del dominio *palma* (Poch y col. 1989; Koonin 1991) y en la que los dos residuos D, junto con un tercer residuo D conservado en el Motivo A, representan el sitio catalítico de la polimerasa y funcionan coordinando el posicionamiento de dos iones metálicos, agua, el extremo 3'-OH libre de la hebra naciente y el NTP entrante (Steitz y col. 1993), está ausente en la polimerasa de birnavirus (Duncan y col. 1991; Shwed y col. 2002). Sin embargo, una secuencia con las propiedades esperadas aparece en una región por encima (*upstream*) del motivo A e incluye un motivo estructuralmente similar, residuos A-D-N, y podría ser el Motivo C auténtico, ocupando una posición no canónica, esto originaría un cambio en el ordenamiento del dominio de la *palma* dando lugar a un cambio de orden en los motivos conservados, pasando de un orden canónico (A – B – C – D), a un orden permutado (C – A – B – D) (Figura 5).



**Figura 5. Organización estructural del dominio *palma* canónico o permutado.** Organización lineal y terciaria de los motivos de secuencia y la predicción de estructura secundaria de los principales elementos del dominio palma canónico (A) o permutado (B). Las flechas indican el lugar donde se rompe la conectividad en la RpRd canónica y dónde se reconecta para dar lugar a la RpRd permutada. Nt y Ct son el N-terminal y el C-terminal respectivamente.

Esta característica se encuentra presente únicamente en los virus dsRNA de la familia *Birnaviridae* y en dos miembros de la familia *Tetraviridae* (*Thosea asigna virus-TaV* y *Euprosterona elaeasa virus-EeV*) lo que ha llevado a identificar a estos virus como un linaje diferente con respecto al común de todas las polimerasas que pudo divergir en un estadio muy temprano de la evolución de estas enzimas, tal y como indican los análisis filogenéticos (Gorbalenya y col. 2002).

En la gran mayoría de los virus dsRNA, el RNA genómico es liberado al medio celular dentro de una partícula icosaédrica transcripcionalmente activa que puede generar las copias de RNA de cadena simple y polaridad positiva. Estos pueden servir tanto como moldes para la síntesis de proteínas mediante el mRNA o ser encapsidadas dentro de una nueva partícula subviral donde será generado de nuevo el RNA de cadena doble. Otra característica importante del ciclo vital de los virus dsRNA es el metabolismo del RNA, catalizado por la RpRd. Debido a que los virus codifican únicamente una proteína con los motivos característicos de una RpRd, ésta deberá catalizar tanto la transcripción del RNA genómico partiendo de dsRNA para dar lugar a ssRNA de polaridad positiva, como la replicación del ssRNA para dar lugar al dsRNA.

La correcta iniciación de la síntesis de RNA es esencial para la integridad del RNA viral. Se conocen dos mecanismos mediante los cuales se puede iniciar la replicación:

- Iniciación independiente de cebador, denominada síntesis *de novo*. La ventaja de este sistema es que no hay pérdida de información genética y no se necesitan enzimas adicionales para generar el cebador. (Kao y col. 2001).

- Iniciación dependiente de cebador. En este sistema los virus inician la síntesis de RNA usando un oligonucleótido como cebador, (dos ejemplos de esto son el secuestro del *cap* [Hagen y col 1995], mediante el auto-cebado del propio molde [Behrens y col 1996]) o utilizando como cebador una proteína, en este sistema un aminoácido provee del grupo hidroxilo para la formación del enlace fosfodiéster con el primer nucleótido (Paul y col. 1998).

Este es el sistema que utilizan los virus de la familia *Birnaviridae*. La RpRd de Birnavirus inicia la síntesis de RNA mediante el cebado proteico del RNA molde (Muller y Nitschke 1987b; Spies y Muller 1990). El cebado proteico es un mecanismo que utilizan muchos virus (ej., adenovirus, picornavirus, bacteriófago  $\phi 29$ ) para iniciar la replicación de su genoma, a fin de prevenir la pérdida de información de las secuencias terminales (Salas 1991). Aunque el cebado proteico y la actividad polimerasa habitualmente lo llevan a cabo distintas moléculas, la función de cebado, en Birnavirus, la lleva a cabo la propia RpRd. Se ha demostrado que tanto la VP1

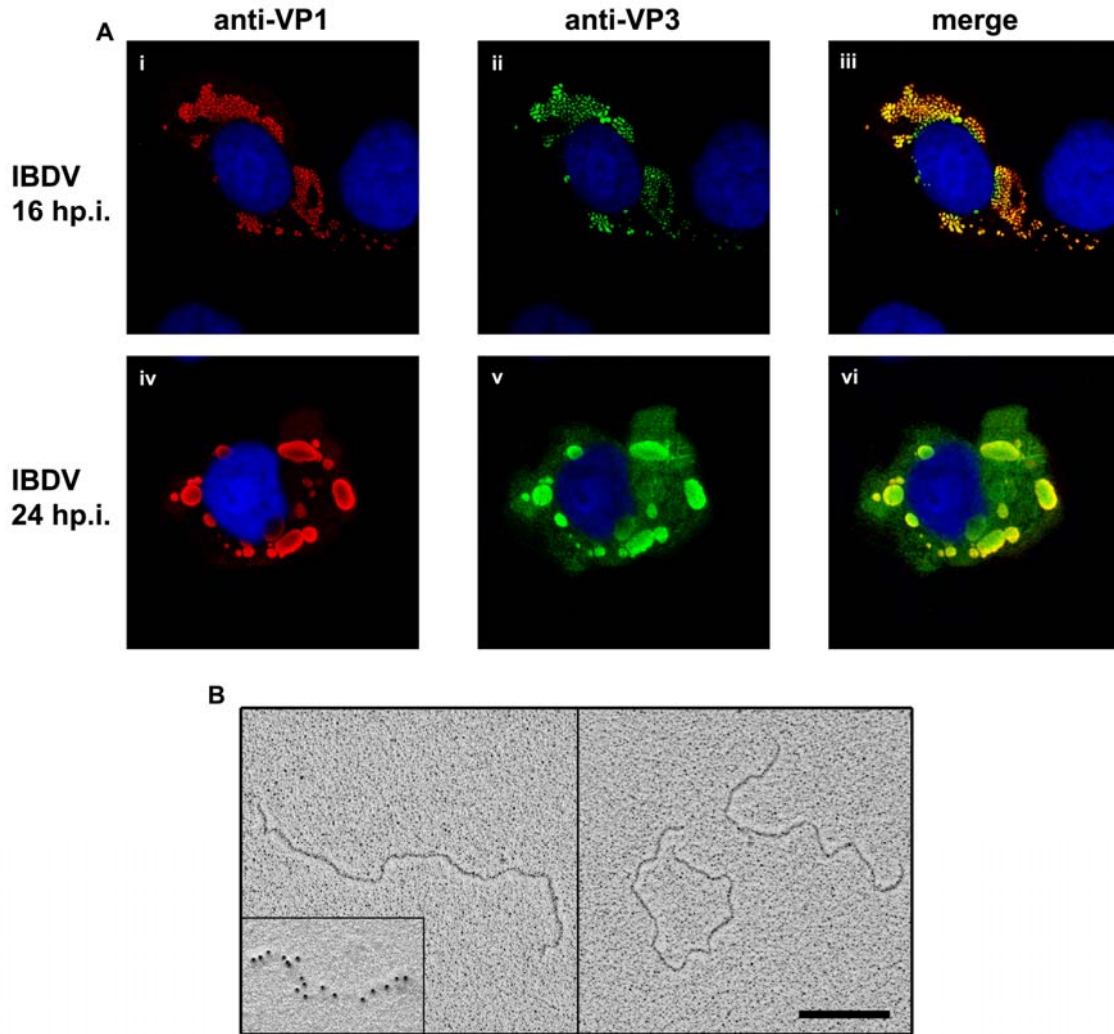
asociada a viriones como la producida *in vitro*, tienen actividad de autoguanilación, la cual no requiere molde de RNA y produce dos productos VP1-pG y VP1-pGpG (Spies y col 1990; Dobos 1993; Shwed y col. 2002; Xu y col. 2004). Se ha propuesto que el motivo pGpG se une a la secuencia pCpC conservada en el extremo terminal del RNA molde de origen viral durante la iniciación de la polimerización de nucleótidos (Magyar y col. 1998; Xu y col. 2004). Consecuentemente con esto, los extremos 5' de los RNAs mensajero y genómico de Birnavirus se encuentran covalentemente unidos a la RpRd.

## 1.5 La proteína VP3

Los birnavirus tienen una serie de características estructurales, genéticas y biológicas que los diferencian claramente de los demás virus dsRNA (Revisado por Ahlquist 2005). A diferencia de la mayoría de los virus dsRNA cuyo ciclo celular incluye una fase extracelular, los birnavirus no poseen un núcleo transcripcional interno (Bottcher y col. 1997; Coulibaly y col. 2005). La ausencia de esta estructura debe provocar cambios en las estrategias del virus y estos cambios deben ser asumidos únicamente por las cinco proteínas del virus (VP1-VP5). En este contexto una proteína sobresale de entre todas las demás debido a su multifuncionalidad, y es la proteína VP3 que además de interactuar con la proteína VP2 en el proceso de morfogénesis de la cápsida, interacciona con la proteína VP1. De hecho, VP1 se incorpora a la cápsida T=13 mediante la formación de complejos con VP3 (Lombardo y col. 1999; Maraver y col. 2003b) (Figura.6A). La región implicada en esta interacción corresponde a una secuencia de 16 aa altamente cargada en la región carboxilo terminal de VP3 (residuos 243 a 258). Esta secuencia es suficiente para el establecimiento de la interacción entre ambas proteínas, así como para interferir con la producción de virus *in vivo* (Maraver y col. 2003a).

Por otra parte, la interacción entre VP3 y el RNA es independiente de secuencias específicas, lo que es consistente con su posible función como estabilizador del dsRNA en la partícula viral (Kochan y col. 2003). De hecho, se ha observado que, al igual que en el birnavirus IPNV (Hjalmarsson y col. 1999), en IBDV, VP3 está asociada con el dsRNA viral y con la proteína VP1 formando filamentos ribonucleoproteicos (RNP) (Luque y col 2009a) (Figura 6B). Se ha propuesto que el complejo de RNP podría jugar un papel parecido al de los núcleos transcripcionales encontrados en otros virus dsRNA (Ahlquist 2005). Sin olvidar que el dsRNA es una potente señal para la activación de los mecanismos celulares de defensa (Hutvagner y col. 2008; Lemaire y col. 2008) y la proteína podría jugar un papel fundamental si funciona de forma análoga a un núcleo transcripcional.

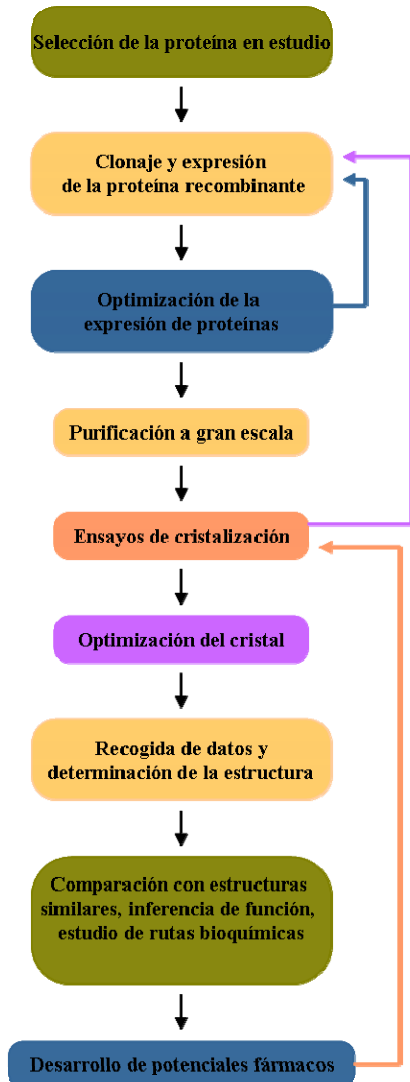
Por otra parte, la proteína VP3 es capaz de interactuar consigo misma, propiedad ampliamente extendida entre las proteínas de andamiaje virales (Tacken y col. 2000). Mediante el uso de mutantes de delección se ha delimitado el dominio de oligomerización en una región de 24 aa localizada entre los residuos 226 y 249 del extremo carboxilo terminal de la proteína. Esta región se solapa parcialmente con la implicada en la interacción con VP1.



**Figura 6. (A) Expresión de las proteínas VP1 y VP3 en el contexto de la infección con IBDV.** (i-iii) Distribución subcelular de las proteínas VP1 y VP3 tras 16 hp.i. con IBDV en células BSC-40. (iv-vi) Distribución subcelular de las proteínas VP1 y VP3 tras 24 hp.i. con IBDV en células BSC-40. El marcaje en rojo corresponde a VP1, el marcaje en verde a VP3 y en azul la tinción nuclear, en los paneles C y F se muestra la superposición (merge) de las tres señales fluorescentes. **(B) Análisis por microscopía electrónica de las RNPs de IBDV.** Imágenes de microscopía electrónica y sombreado metálico. La barra de escala corresponde a 0.2  $\mu\text{m}$ . El recuadro interior muestra una RNP purificada, inmunomarcada con un suero policlonal  $\alpha$ -VP3 y partículas de oro de 5 nm y contrastada mediante sombreado metálico con Pt-C.

## 1.6 De la purificación a la resolución

Actualmente vivimos en una época en la que, por primera vez, los sistemas biológicos se están empezando a conocer a nivel molecular. Debido a que las funciones de las proteínas vienen determinadas por sus estructuras tridimensionales, la cristalografía de proteínas ha adquirido un importante papel en el proceso de dar forma a todo este conocimiento puesto que de todas las estructuras proteicas resueltas hasta el día de hoy, el 85.6% de ellas ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Protein Data Bank [PDB] Enero 2009) → <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>). Pero para llegar al final del camino, la cristalografía no es el único paso sino que forma parte de un complejo proceso que se muestra reflejado en la siguiente figura (Figura 7).



**Figura 7. Esquema del proceso desde el gen hasta la estructura.** Se ilustra en este esquema los pasos necesarios desde la selección de la proteína en estudio hasta la determinación de su estructura y los posteriores análisis que se pueden llevar a cabo, desde la determinación de su función hasta el desarrollo de nuevos fármacos.

### 1.6.1 Purificación de proteínas recombinantes

Habitualmente, el primer paso limitante con el que se encuentran todos los procesos de resolución de una estructura se encuentra en la etapa de purificación. El problema es cómo obtener una proteína soluble lo suficientemente concentrada y pura (Chayen y col. 2008). Inicialmente, únicamente las proteínas más abundantes y más estables, tales como las que se pueden encontrar en los fluidos corporales o en músculo, fueron consideradas como posibles objetivos (Derewenda 2004). Esta percepción cambió cuando se comenzaron a desarrollar métodos eficaces de expresión de proteínas recombinantes. Tras los primeros éxitos en la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* con ejemplos como la insulina (Goeddel y col. 1979) y la somatostatina (Itakura y col. 1977), el uso de técnicas de DNA recombinante se extendió y entre las primeras proteínas cristalizadas que se obtuvieron por estos métodos se encuentran la insulina (Chance y col. 1981), el interferón A de leucocitos humanos (Miller y col. 1981a; Miller y col. 1982b) y el interferón- $\beta$  murino (Matsuda y col. 1986). Las ventajas de utilizar proteínas recombinantes para los ensayos de cristalización incluyen, entre otras, un considerable aumento en la cantidad de proteína que se obtiene, facilidad de purificación utilizando secuencias de afinidad fusionadas a la proteína en estudio, tales como la cola de 6xHis (Smith y col. 1988a), GST (Smith y col. 1988b), MBP (di Guan y col. 1988) y otros menos utilizados como la tioredoxina (La Vallie y col. 1993) o el dominio Z de la proteína A (Nilsson y col. 1987), posibilidad de modificar la proteína realizando mutaciones en su secuencia para aumentar su propensión a cristalizar (Lorber y col. 2002), o la delección de zonas N-terminal y/o C-terminal desestructuradas o lazos flexibles (Porter 1973; Noel y col. 1993) que impiden la cristalización debido a su inestabilidad estructural. Como se verá más adelante en este trabajo, nosotros nos decidimos por ésta última estrategia para la producción de proteínas con posibilidades de cristalización.

### 1.6.2 Cristalización de proteínas

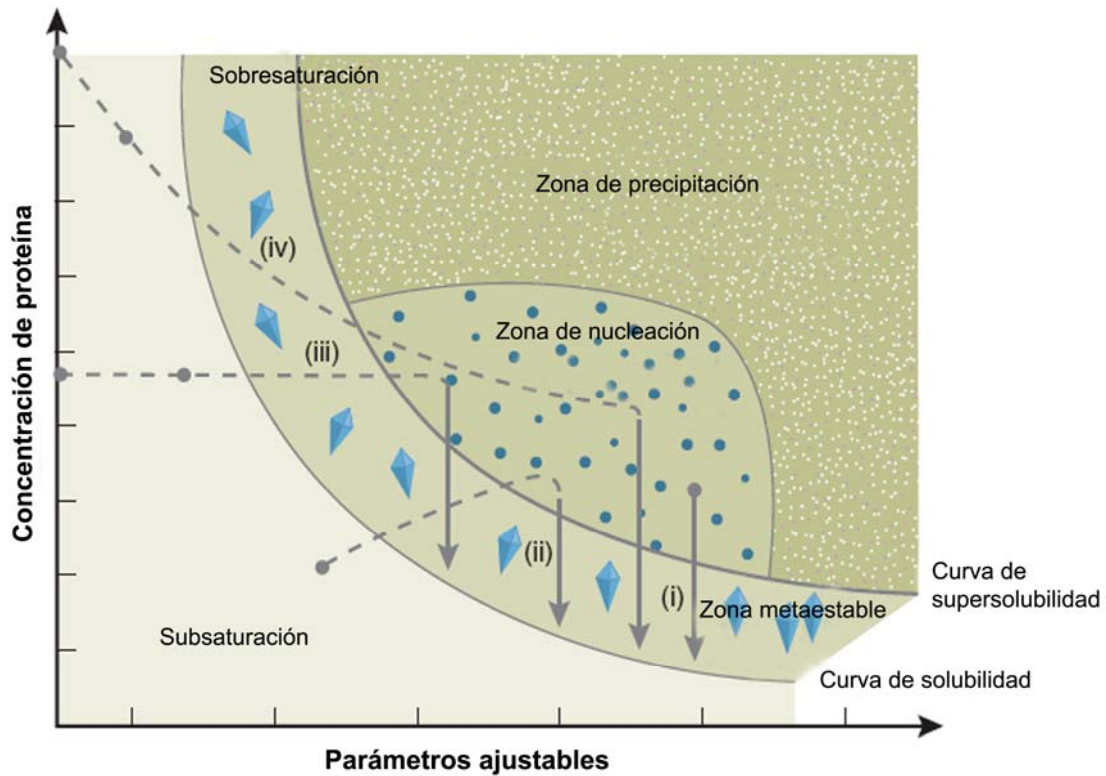
El siguiente paso limitante al que se enfrenta el sistema es la cristalización de la proteína bajo estudio puesto que sólo una pequeña fracción de las proteínas recombinantes purificadas consigue ser cristalizada. Normalmente las razones principales son, a nivel de purificación, su heterogenicidad, aún incluso cuando en un gel SDS-PAGE aparezca una única banda, debido a la inherente flexibilidad y el diferente estado de estabilidad de la proteína, y su propensión a agregar. Además, las proteínas, una vez purificadas, se suelen encontrar en soluciones heterogéneas que contienen además, impurezas como partículas de polvo o fragmentos

minerales que dificultan los pasos esenciales en la cristalización como son la nucleación y el crecimiento del cristal (McPherson 1999; Thomas y col 1998). Al iniciar el proceso de cristalización de una determinada proteína el investigador se enfrenta al dilema de por dónde comenzar los ensayos de prueba y error necesarios para conseguir la cristalización de la molécula. Hasta hace muy poco, este proceso de búsqueda se basaba inicialmente en las propiedades bioquímicas aprendidas durante la purificación y caracterización bioquímica de la macromolécula en estudio (McPherson 1982).

Actualmente se encuentran en el mercado kits comerciales optimizados para diferentes grupos o tipos de macromoléculas que facilitan los estudios iniciales de cristalización. Es importante elegir el método de cristalización a utilizar entre los disponibles, entre los cuales se encuentran los experimentos de purificación en microescala (*batch*) (Chayen 1998), los experimentos de diálisis, los experimentos de FID (*Free Interface Difusión*) (McPherson 1999) (García-Ruiz y col. 2007), los experimentos de microfluidos (Hansen y col. 2003) y finalmente el método más utilizado (y el que hemos utilizado nosotros en este trabajo) que es el de difusión de vapor, en el cual la gota con la solución que contiene la proteína se encuentra suspendida en un portaobjeto y equilibrada frente a un reservorio que contiene la solución con los agentes de cristalización que se encuentran en mayor o menor concentración que en la gota que contiene la solución de proteína.

La cristalización es un fenómeno de transición de fase. Los cristales crecen a partir de una solución acuosa que contiene la proteína en estudio cuando dicha solución es llevada hasta su sobresaturación (McPherson 1999; Ducruix y col. 1999). La sobresaturación se consigue variando los componentes del sistema, tales como la concentración de proteína y aditivos, el pH o la temperatura. El proceso de cristalización se puede ilustrar con un diagrama de fase, el cual indica que estado (líquido, cristalino o sólido amorfo [precipitado]) es estable bajo gran variedad de parámetros de cristalización. Proporciona un medio para cuantificar la influencia de los distintos parámetros en la producción del cristal. (Figura 8).





**Figura 8. Esquema de un diagrama de fase de la cristalización de proteínas.** Los parámetros ajustables pueden ser el precipitante, la concentración de aditivos, el pH, la temperatura, etc. Se representan los cuatro métodos principales de cristalización, mostrando sus diferentes rutas hacia la nucleación y el crecimiento del cristal (zona metaestable), asumiendo que el parámetro ajustable es la concentración de precipitante. (i) batch. (ii) difusión de vapor. (iii) diálisis. (iv) FID. Se representan dos puntos de inicio para los métodos (iii) y (iv) debido a que la solución de proteína subsaturada puede contener únicamente la proteína o la proteína mezclada con una baja concentración de agentes precipitantes. La solubilidad se define como la concentración de proteína en el soluto que está en equilibrio con los cristales.

La Figura 8 ilustra un diagrama de fase de cristalización típico, que consiste en cuatro zonas que representan los diferentes grados de sobresaturación: una zona de alta sobresaturación, donde la proteína precipitará; una zona de sobresaturación moderada, donde tendrá lugar la nucleación espontánea; la zona metaestable (justo bajo la zona de nucleación) que es una zona de baja sobresaturación, donde los cristales son estables y pueden crecer pero no tendrá lugar una posterior nucleación (las condiciones en esta región son las mejores para el crecimiento de los cristales ordenados); y una zona de subsaturación, donde la proteína se encuentra totalmente disuelta y nunca cristalizará.

Examinando el diagrama de fase de cristalización y las propiedades de solubilidad de la proteína, el propósito es concebir un método que permita al investigador manipular y controlar los parámetros que le lleven a obtener el resultado deseado (Chayen 2004).

Partiendo del concepto inicial de que el ejercicio de cristalización comienza a nivel del proceso de purificación (Pusey y col. 2005) la comercialización de kits de análisis de cristalización y los estudios de cristalización factorial han contribuido enormemente a aumentar el número de estructuras resueltas en la pasada década. Sin embargo, es erróneo pensar que cuando una proteína no cristaliza con esos kits, está condenada a no ser cristalizada, es en ese momento cuando a los ensayos de cristalización debe aplicársele una estrategia basada en la modificación de los diferentes parámetros (pH, temperatura, etc.) y para eso son una gran herramienta los diagramas de fase. A su vez, cada vez son más utilizados sistemas de *high-throughput* que incluyen el uso de plataformas robotizadas como la basada en el brazo robótico *Zymate II* (Ward y col. 1988) que permiten utilizar volúmenes a escala de nanolitros eliminando de esa manera la necesidad de purificar grandes cantidades de proteína, pero esto a su vez puede generar una serie de problemas, en primer lugar, es posible que las condiciones de cristalización de determinada proteína no la permitan cristalizar en volúmenes tan pequeños, en segundo lugar en volúmenes tan pequeños, a veces puede ser difícil distinguir si el cristal que vemos es de proteína o de las sales en solución porque aunque hoy en día se utilizan sistemas de imagen para analizar un elevado número de condiciones, éstos no están del todo perfeccionados y entre tanta cantidad de muestras se puede perder información al tener que acotar la búsqueda en determinados parámetros y en tercer lugar, es posible que aunque los cristales obtenidos sean del tamaño adecuado para los primeros ensayos de cristalización, su manipulación puede ser complicada a la hora de hacer ensayos más intensivos al carecer de un sistema de manipulación automatizado completamente efectivo sin la intervención humana.

Finalmente, otro paso importante en el proceso de cristalización es que el éxito o fracaso vendrán determinados por la calidad de los datos obtenidos de difracción de rayos X obtenidos los cuales serán analizados por paquetes de software diseñados específicamente para la resolución de estructuras como por ejemplo MOSFLM y SCALA (*Collaborative computational project N* 1994).

## *2 Objetivos*

---



Hasta el comienzo del presente trabajo, los estudios estructurales realizados, con el virus de la bursitis infecciosa (IBDV), se habían centrado en la resolución de la estructura de la cápsida viral, formada por la proteína VP2. Sin embargo la estructura de las proteínas VP1 y VP3 que forman el complejo transcripcional del virus era desconocida.

El objetivo general de esta tesis es el estudio de las relaciones estructura-función de los componentes del complejo transcripcional de IBDV, formado por las proteínas VP1 y VP3. En éste contexto nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Expresión y purificación de la proteína VP1 de IBDV y determinación de su estructura atómica mediante cristalografía de rayos X.
2. Expresión y purificación de la proteína VP3 de IBDV y determinación de su estructura atómica mediante cristalografía de rayos X.
3. Caracterización de la interacción de las proteínas VP1 y VP3 con el RNA viral.
4. Caracterización de la actividad RNA polimerasa de la proteína VP1, tanto de forma individual como formando parte del complejo VP1-VP3.



## *3 Materiales y Métodos*







## 3.1 Material Biológico

### 3.1.1 Células procariotas

La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Raleigh y col. 2002) se utilizó para la amplificación de plásmidos recombinantes. La cepa de *E. coli* DH10-Bac (Luckow y col. 1993) se utilizó para la generación de bácmidos infectivos de baculovirus.

### 3.1.2 Células eucariotas

Para la generación, amplificación y expresión de rBV se utilizó la línea celular *High Five*<sup>TM</sup> (BTI-TN-5B1-4) (*Invitrogen*) que es un clon de células aislado de *Trichoplusia ni* (oruga del repollo). Para la obtención, crecimiento y expresión de proteínas clonadas en rVVs, se utilizaron células BSC-40 (ATCC, CRL-2761) que son células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops* (mono verde), derivadas de la línea BSC-1 (ATCC, CCL-26). Para la amplificación de IBDV se utilizó la línea celular QM7 derivada de fibroblastos musculares de *Coturnix japonica* (codorniz japonesa) (Antin y Ordahl 1991, ATCC, CRL-1962).

Los cultivos celulares de *High Five*<sup>TM</sup> fueron crecidos y mantenidos en medio TC-100 (*GIBCO*) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 U/ml), gentamicina (50  $\mu$ g/ml) y fungizona (1  $\mu$ g/ml). Los cultivos celulares de BSC-40 y QM7 fueron crecidos y mantenidos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Dulbecco y Freeman 1959) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 U/ml), gentamicina (50  $\mu$ g/ml), fungizona (0.5  $\mu$ g/ml) y aminoácidos no esenciales.

### 3.1.3 Plásmidos

A lo largo del desarrollo de este trabajo, se emplearon los siguientes plásmidos:

**-pBSK.** Plásmido de alto número de copias, que permite la incorporación de segmentos de DNA externos con el fin de crecerlos de una forma convencional y rápida.

**-pFastBac1 y pFastBacHT.** Plásmidos de la casa comercial *Invitrogen*, fueron utilizados para la generación de rBV. En ambos plásmidos, los genes heterólogos se encuentran bajo el control del promotor de la poliedrina y poseen sitios específicos para la transposición del gen

recombinante en el báculo. El plásmido pFastBacHT, además, incorpora una cola de His y un brazo espaciador en el extremo amino terminal de la proteína recombinante.

**-pVOTE2.** Plásmido de expresión e inserción eucariota en el locus hemaglutinina de *vaccinia*, cedido por el Dr. Bernard Moss (NIH, Bethesda, EEUU). El gen de interés está bajo el control de del promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (Ward y col.1995).

**-pUC57.** Plásmido de clonaje.

**-pT7-X-Rz.** Plásmido de expresión eucariota. Este plásmido permite la expresión del gen de interés bajo el promotor de la RNA polimerasa del fago T7. En la posición 3' con respecto al final del polilinker se encuentra la ribozima del virus de la hepatitis delta. De esta forma se produce postranscripcionalmente un extremo 3'OH que coincide con el último nucleótido del gen de interés.

**-pT7-X.** Plásmido de expresión eucariota. Este plásmido permite la expresión del gen de interés bajo el promotor de la RNA polimerasa del fago T7. En este caso no hay ribozima en el extremo 3' sino que se clona con una diana única en el extremo 3' del fragmento introducido.

### 3.1.4 Virus

En el desarrollo del trabajo se utilizaron los siguientes virus:

**-Vaccinia.** Para la generación de virus recombinantes se utilizó como cepa parental el virus Vaccinia recombinante rVV VT7LacOI (Ward y col.1995) cedido por el Dr Bernard Moss (NIH, Bethesda, EEUU)

Se utilizaron los siguientes rVV generados anteriormente:

rVV VT7/Poly → Expresa la poliproteína del virus IBDV (Fernández-Arias y col.1998)

rVV VT7/VP3 → Expresa la proteína VP3 del virus IBDV (Fernández-Arias y col.1997)

Se generó el siguiente rVV para este trabajo:

rVV VT7/his-VP3 → Expresa la proteína VP3 de IBDV con una cola de histidinas fusionada a su extremo N-terminal.

**-Baculovirus.** Este virus fue generado mediante manipulación genética a partir de un aislado de campo del virus de la poliedrosis de *Autographa californica* (AcPHV). La generación de baculovirus recombinantes (rBV) se realizó a partir de la cepa BV FastBac (*Invitrogen*).

A lo largo del desarrollo del trabajo se utilizaron los siguientes baculovirus recombinantes (rBV) previamente generados:

rBV VP3 → Expresa la proteína VP3 del virus IBDV (Ana Oña Comunicación personal)

rBV his-VP3 → Expresa la proteína VP3 de IBDV con una cola de histidinas fusionada a su extremo N-terminal. (Kochan, y col.2003)

rBV VP1 → Expresa la proteína VP1 del virus IBDV (Maraver y col. 2003b)

Se generaron los siguientes baculovirus recombinantes (rBV) para el trabajo:

rBV his-VP1 → Expresa la proteína VP1 de IBDV con una cola de histidinas en el extremo N-terminal.

rBV his-VP1 $\Delta$ 846-879 → Expresa la proteína VP1 con una delección de los últimos 34 aminoácidos y una cola de histidinas en su extremo N-terminal.

rBV his-VP3 $\Delta$ 222-258 → Expresa la proteína VP3 con una delección de los últimos 36 aminoácidos y una cola de histidinas en su extremo N-terminal.

**-IBDV.** Para las infecciones con IBDV ha sido empleada la cepa *Soroa* (Lombardo y col. 1999). Esta cepa viral, perteneciente al serotipo I, fue aislada de un pollo infectado en la región de Soroa (Cuba) y adaptada a crecer en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF). Posteriormente, la cepa fue adaptada a crecer en diferentes células de mamífero.

### **3.1.5 Anticuerpos**

En el presente trabajo se utilizaron los anticuerpos frente a la proteína VP3 (nº 332), descrito anteriormente (Fernández-Arias y col. 1998) y frente a la proteína VP1, nº 434 descrito

anteriormente (Lombardo y col. 1999) y nº 806, cuya generación se detalla más adelante. También se utilizaron anticuerpos comerciales frente a la cola de histidinas,  $\alpha$ -his (*Sigma*).

## **3.2 Manipulación y obtención de material biológico**

### **3.2.1 PCR**

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l con 0.2 mM dNTPs, 200 ng de cada cebador, 2 ng de DNA molde, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 nM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH)<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100 y 2 U de DNA polimerasa *Vent* (*New England Biolabs*). Como protocolo de amplificación se utilizó el siguiente: 1 min a 94 °C; 30 ciclos de 40 seg a 92 °C, 40 seg a 60 °C y 1 min 30 seg a 75°C; 5 min a 75 °C.

### **3.2.2 Reacciones de ligación de fragmentos de DNA**

Se realizaron en un volumen final de 15  $\mu$ l en un tampón compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25  $\mu$ g/ml BSA; utilizando 200 ng/ml de cada fragmento de DNA y 200 U de T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*). Las reacciones se llevaron a cabo durante 16 h a 16 °C.

### **3.2.3 Reacciones de restricción enzimática**

Se realizaron con enzimas procedentes de las casas comerciales *New England Biolabs* y *Fermentas*, según las indicaciones del proveedor.

### **3.2.4 Generación de plásmidos recombinantes**

#### **Generación del plásmido pFBHtc-VP1**

Obtuvimos mediante restricción enzimática con XhoI la secuencia DNA correspondiente a la proteína VP1 a partir de un plásmido generado anteriormente en el laboratorio, pBSK/VP1 (Lombardo y col. 1999). Este fragmento fue cortado en romo, digerido con Not I y subclonado en el vector pFastBacHtc (*Invitrogen*) que previamente había sido digerido con EheI y Not generando de ésta manera el plásmido pFBHtc-VP1.

### **Generación del plásmido pFBHtc-VP1 $\Delta$ 846-879**

Esta versión truncada de la proteína his-VP1, denominada his-VP1  $\Delta$ 846-879, fue generada, a partir del plásmido pBSK/VP1 (Lombardo y col. 1999). Para ello, se obtuvo mediante PCR, con los oligos 5' VP1 $\Delta$ 846-879 y 3' VP1 $\Delta$ 846-879 un fragmento de DNA de 938 pb, que contenía la delección requerida así como un triplete de terminación falso. El producto de PCR, fue purificado, digerido con la enzima KpnI e insertado en el plásmido pFBHtc-VP1 que a su vez había sido digerido con el enzima KpnI, para dar lugar al plásmido.

### **Generación del plásmido pFBHtb-VP3 $\Delta$ 222-258**

Esta versión truncada de la proteína his-VP3, denominada his-VP3  $\Delta$ 222-258, fue generada a partir del plásmido pVOTE/Poly (Fernández Arias y col. 1998). Para ello, se obtuvo mediante PCR, con los oligos 5' VP3 $\Delta$ 222-258 y 3' VP3 $\Delta$ 222-258 un fragmento de DNA de 686 pb, que contenía la delección requerida así como un triplete de terminación falso. El producto de PCR se digirió con los enzimas EheI y BamHI y se introdujo en el plásmido pFastBacHTb (*Invitrogen*) que previamente había sido digerido con EheI y BamHI.

### **Generación del plásmido pVOTE2/his-VP3**

Utilizando como molde el plásmido pFastBacHTc-VP3 generado anteriormente en el laboratorio (Kochan y col. 2003) se obtuvo mediante PCR, con los oligos 5'vvhVP3 y 3'vvhVP3 un fragmento de DNA de 1007 pb que contenía la región codificante de la His-VP3 este fragmento se digirió con los enzimas NdeI y Sal I y se introdujo en el plásmido pVOTE2 descrito anteriormente (Ward y col. 1995) que había sido digerido previamente con digerido con esos mismos enzimas.

### **Generación de los plásmidos pT7-Cas1-Rz y pT7-Cas2-Rz**

#### **pT7-Cas1-Rz**

Se encargó a la casa comercial *GenScript Corporation* la síntesis *in vitro* de una secuencia que contenía el promotor del fago T7 la región 5' UTR del segmento A del virus IBDV, un fragmento de las ORFs de dicho segmento, concretamente los ATG iniciales tanto de la ORF 1A (VP5) como de la ORF 2A (Poly), una región intermedia, y el terminador de la ORF 2A (Poly) (a todo el conjunto lo denominamos Cas1), la región 3'UTR del segmento A del virus

IBDV, la secuencia de la ribozima del virus de la Hepatitis  $\delta$  y el terminador del fago T7. Todo flanqueado por las dianas Not I. Esta secuencia se insertó en el polilinker del plásmido pUC57

### **pT7-Cas2-Rz**

Se encargó a la casa comercial *GenScript Corporation* la síntesis *in vitro* de una secuencia que contenía el promotor del fago T7, la región 5' UTR del segmento B del virus IBDV, un fragmento de la ORF de dicho segmento, concretamente el ATG inicial de la ORF 1B (VP1) una región intermedia, y el terminador de la ORF 1B (VP1) (a todo el conjunto lo denominamos Cas2), la región 3'UTR del segmento B del virus IBDV, la secuencia de la ribozima del virus de la Hepatitis  $\delta$  y el terminador del fago T7. Todo flanqueado por las dianas Not I. Esta secuencia se insertó en el polilinker del plásmido pUC57.

### **Generación del plásmido pT7-SA-Rz**

Mediante restricción con las enzimas SphI y PshAI se extrajo un fragmento de 2653 pb de la poliproteína de IBDV del vector pFB-Poly, generado anteriormente (Martinez-Torrecuadrada y col. 2000) y se ligó en el vector pT7-Cas1-Rz previamente digerido con esas mismas enzimas.

### **Generación del plásmido pT7-SB-Rz**

Mediante restricción con la enzima Sal I se extrajo un fragmento de 2272 pb de la proteína VP1 de IBDV del vector pFB-VP1, generado anteriormente (Maraver y col. 2003b) y se ligó en el vector pT7-Cas2-Rz previamente digerido con la enzima SalI.

### **Generación del plásmido pT7-SA**

Utilizando como molde el plásmido pT7-SA-Rz, se obtuvo mediante PCR con los oligos 5' T7-SA y 3' T7-SA, un fragmento de DNA de 492 pb (que ya no contenía la secuencia de la ribozima de la hepatitis  $\delta$ ), este fragmento fue digerido con las enzimas SphI y Bpu1102I y se introdujo en el plásmido pT7-SA-Rz (descrito en este mismo apartado) que a su vez había sido digerido con los mismos enzimas. Una vez generado este plásmido, al digerirlo con la enzima BsrGI quedaba el extremo 3' del Segmento A libre.

### **Generación del plásmido pT7-SB**

Utilizando como molde el plásmido pT7-SB-Rz, se obtuvo mediante PCR con los oligos 5' T7-SB y 3' T7-SB, un fragmento de DNA de 371 pb (que ya no contenía la secuencia de la ribozima de la hepatitis  $\delta$ ), este fragmento fue digerido con las enzimas BsrGI y Bpu1102I y se introdujo en el plásmido pT7-SB-Rz (descrito en este mismo apartado) que a su vez había sido digerido con los mismos enzimas. Una vez generado este plásmido, al digerirlo con la enzima

PstI quedaba el extremo 3' del Segmento B libre con 4 nucleótidos adicionales en dicho extremo 3'.

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la generación de las diferentes construcciones**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
5' VP1Δ846-879	CAGGGGCAAGCTGAGACAGC
3' VP1Δ846-879	GCGCGGTACCTTAGAGAAGAGCGGCCTGGACACC
5' VP3Δ222-258	GCGCGGCGCCGCTGCATCAGAGTTCAAAGA
3' VP3Δ222-258	GCGCGGATCCTTAGCGATGCTTCATCTCCATCGCAGTC
5'vvhVP3	GCGCCATATGTCGTACTACCATCACCATCACC
3'vvhVP3	CCT CTA CAA ATG TGG TAT GGC TG
5' T7-SA	GGCCAGGTAAAGTACTGGCAGAAC
3' T7-SA	GCGCGCTAAGCTGTACAGGGGACCCGCGAACGGATCCAA TTTG
5' T7-SB	CAAGGTCGCCCCACTCAGCACTC
3' T7-SB	CGCGGCTCAGCTGCAGGGGGCCCCCGCAGGCGAAGGCCG G

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la generación de dsRNA de pequeño tamaño**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
AR1A	GUCCUCAGCUUAC
AR1B	AGGAGUCGAAUGC
AR2A	GUCCUCAGCUUACCCACAUCAUAUG
AR2B	AGGAGUCGAAUGGGUGUAGUAUACC

AR3A	GUCACCGUCCUCAGCUUACCCACAUCAUAUGAUCUUA
AR3B	AGUGGCAGGAGUCGAAUGGGUGUAGUAUACUAGAAUC

### 3.2.5 Obtención de rVV VT7/his-VP3

Una vez obtenido el plásmido pVOTE2/his-VP3, se generó el rVV VT7/his-VP3 según el protocolo anteriormente descrito (Ward y col.1995, Falkner y Moss 1988, 1990).

### 3.2.6 Obtención de Baculovirus recombinantes (rBV)

Los baculovirus recombinantes se generaron mediante el sistema denominado Bac-to-Bac (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método está basado en la transposición de los genes recombinantes en el genoma infectivo de baculovirus contenido en un vector (bácmido) propagado en la cepa de *E. coli* DH10-Bac (Luckow y col. 1993). En resumen, una vez clonado la secuencia de interés en el plásmido donador (pFastBac), éste es empleado para transformar bacterias DH10-Bac donde va a tener lugar la transposición del gen recombinante de expresión en el bácmido. Una vez seleccionados los bácmidos recombinantes, los rBV son generados mediante transfección de células H5 con dichos bácmidos. Finalmente, Los rBV son amplificados mediante la infección de células H5 con el sobrenadante de células transfectadas con los bácmidos.

### 3.2.7 Reacciones de transcripción *in vitro*

Los plásmidos pT7-Cas2-Rz, pT7-SA-Rz, pT7-SB-Rz fueron linearizados con la enzima NotI. El plásmido pT7-SA fue linearizado con la enzima BsrGI, y el plásmido pT7-SB fue linearizado con la enzima PstI. Se llevó a cabo la transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa del fago T7 (*New England Biolabs*). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl con 1,5 µgr de molde, 1mM NTPs, 1X *RNAPol Reaction Buffer* (*New England Biolabs*), T7 RNA polimerasa (*New England Biolabs*) e inhibidor de RNAsas (RNasin *Promega*). La transcripción se llevó a cabo a 37 °C durante 1 hora y media y posteriormente se trató con DNasa I libre de RNasa (*Roche*) se extrajo con fenol/cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en agua DEPC.



### **3.2.8 Obtención de antisuero específico frente a la proteína VP1 (n° 806)**

El inmunógeno utilizado se obtuvo mediante la expresión en células *High Five*<sup>TM</sup> de la proteína his-VP1 Δ846-879. La purificación de la proteína se realizó por cromatografía en una resina de afinidad de Níquel (*HisTrap HP*, *GE Healthcare*). El antisuero específico de conejo frente a VP1 se obtuvo mediante hiperinmunización de los animales con la proteína purificada.

## **3.3 Infecciones y expresión de proteínas**

### **3.3.1 Infección con rBV**

Cultivos confluentes de células *High Five*<sup>TM</sup> se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 1-5 unidades formadoras de placa por célula (ufp/cel.) del rBV correspondiente en un volumen mínimo. Tras 1h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio TC-100 suplementado con 2% FCS.

### **3.3.2 Infección con rVV VT7**

Cultivos confluentes de BSC-40 fueron lavados con DMEM e infectados con una MOI de 5 ufp/cel del rVV de interés. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y las células se mantuvieron en DMEM suplementado con 2% FCS. En el caso de los rVVs además se suplementó con 1 mM IPTG. Cuando se indica, las células se marcaron metabólicamente.

### **3.3.3 Infección con IBDV**

Para la purificación de viriones de IBDV, cultivos de células QM7 a una confluencia del 70-80% se infectaron a una MOI de 1-2 ufp/cel de IBDV en un volumen mínimo. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% FCS. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos a las 48-72 hp.i. según el efecto citopático observado.

### **3.3.4 Marcaje metabólico con [<sup>35</sup>S]-Met**

En una infección de células BSC-40 con virus rVV VT7 como la descrita en el punto 3.3.2 de este apartado, 16 hp.i. las células se lavaron y se incubaron con DMEM sin metionina durante 30 minutos. A continuación se añadió DMEM suplementado con 2% FCS y una relación 1:9 de

[<sup>35</sup>S]-Met:Met, con una cantidad de marca correspondiente a 100 µCi/ml. Tras 1 hora a 37 °C, se eliminó el medio, se lavaron las monocapas con PBS 1X y se recogieron en tampón de Laemmli (Laemmli 1970).

### 3.3.5 Anillamiento y marcaje con [<sup>33</sup>P]-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de oligos de ssRNA

En un volumen final de 200 µl se incubaron cantidades equimolares de las parejas de oligonucleótidos de ssRNA a anillar, en el tampón de anillamiento (100 mM NaCl en un tampón 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Esta mezcla se mantuvo a 90°C durante 3 minutos y posteriormente se dejó descender la temperatura hasta la temperatura ambiente (23°C) (*support protocol 1-Matthias, Current Protocols in Molecular Biology 2003*). Tras el anillamiento, fueron marcados con [<sup>33</sup>P]-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> mediante T4 polinucleótido quinasa siguiendo las indicaciones de la casa comercial (*New England Biolabs*) y tras el marcaje, se corrieron en un gel acrilamida 15% en TBE (90 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA), se cortaron las bandas y se llevaron a un volumen final de 800 µl en un tampón 1M AcNH<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, se incubaron a 4°C O/N en agitación. De esos 800 µl se cogieron 400 µl, se les añadió 2 µgr de tRNA, se incubaron 30 minutos a -80°C, se centrifugaron a 15.000 x g durante 15 minutos, el pellet se lavó con Etanol 70% y se resuspendió en 25 µl de agua DEPC.

## 3.4 Purificación de proteínas y ensamblados virales

### 3.4.1 Purificación de las proteínas VP1 y VP3

Células *HighFive*<sup>TM</sup> (*Invitrogen*) fueron infectadas con los rBVs, recogidas 72 hp.i., lavadas dos veces con PBS, resuspendidas en tampón de lisis 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl y 0,1% Igepal CA-360 (*Sigma*), suplementadas con inhibidores de proteasas (*Complete mini; Roche*) y mantenidas en hielo 20 minutos. Posteriormente los extractos fueron centrifugados a 13,000xg durante 10 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y fueron purificados mediante cromatografía de afinidad a metal (*IMAC*) en columnas de agarosa-níquel (*HisTrap HP; GE Healthcare*). Los polipéptidos unidos a la resina se eluyeron con un tampón de elución (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl y 250 mM imidazol). Se juntaron las fracciones que contenían la proteína, se dializaron frente a un tampón de lisis que no contenía Igepal CA-360 (*Sigma*) y fueron sometidas a una segunda ronda de purificación.

Una vez purificada la proteína recombinante, las muestras fueron tratadas con la proteasa recombinante rTEV (65 µg/ml de proteína. 20 horas a 20°C) para eliminar la cola de histidinas,

se dializaron frente a un tampón 50 mM Tris-HCl pH 8 y 300 mM NaCl, se utilizó una columna de agarosa-níquel (*HisTrap HP; GE Healthcare*) para purificar la proteína sin la cola de histidinas y se concentró la muestra hasta una concentración final de 10 mg/ml usando los filtros Centricon YM-10 (*Millipore*).

En el caso de la his-VP3 procedente de infecciones de células BSC-40 con rVV VT7/his-VP3 el proceso fue el mismo a excepción de la recogida de las infecciones que se realizó 48 hp.i.

### **3.4.2 Purificación de viriones de IBDV**

El sobrenadante de cultivos de células QM7 infectadas con IBDV fue mezclado en una relación 1:5 (v:v) con PEG 20% 3M NaCl y fue incubado con agitación toda la noche a 4 °C. Posteriormente, fue centrifugado a 3,000 r.p.m. (1,000xg) durante 30 min en un rotor un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*), el precipitado resultante fue resuspendido en PES (50 mM PIPES pH 6.2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, Roche*) y nuevamente centrifugado a 3,000 r.p.m. (1,000xg) durante 30 min. El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 r.p.m. (170,000xg) durante 2h 30 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El precipitado resultante fue resuspendido en PES y centrifugado en una microfuga 1 min a 13,000 r.p.m. (16,000xg). El sobrenadante fue mezclado con CsCl<sub>2</sub> en tampón PES a una densidad inicial de 1.33 g/cc y ultracentrifugado a 40,000 r.p.m. (130,000xg) durante 14 h en un rotor NVT65 (*Beckman-Coulter Inc.*). Las bandas fueron recuperadas por punción lateral con agujas hipodérmicas 23G y dializadas 48 h frente a tampón PES. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C.

### **3.4.3 Purificación de dsRNA de IBDV**

El material de partida para la purificación de dsRNA viral fueron los viriones purificados según lo descrito en el apartado 3.4.2. La muestra fue desnaturalizada en presencia de SDS al 1% durante 3 min a 100 °C y 1 min a 4°C. Posteriormente, fue digerida con proteinasa K a una concentración final de 2 mg/ml durante 1h a 37 °C. Finalmente, el dsRNA viral fue purificado sucesivamente mediante extracción con TriZol (*Invitrogen*) y adsorción en mini columnas gel de sílice (*Quiagen*), según las instrucciones de los fabricantes.

## 3.5 Análisis Bioquímico

### 3.5.1 Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de Laemli de electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras analizadas fueron mezcladas con tampón de desnaturalización 5X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.06% azul de bromofenol, 25% glicerol y 10 mM DTT), hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y cargadas en geles de poliacrilamida (37.5:1) al 10 y al 12%. Posteriormente, dichos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa, teñidos con una solución de azul de Coomassie al 2% en 10% metanol, 10% ácido acético o secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autoradiografiados.

### 3.5.2 Análisis electroforético en geles nativos de agarosa

Para la resolución electroforética de ácidos nucleicos, y complejos RNA-proteína en condiciones nativas, las muestras fueron mezcladas con tampón de carga azul/naranja 6X de la casa comercial *Promega* (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.4% naranja G, 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xilencianol FF, 15% Ficoll 400, 50mM EDTA pH 8.0) y cargadas en geles de agarosa al 0,7 % en tampón TBE (90 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA). Tras el proceso de electroforesis, los geles fueron teñidos durante 30 min en una solución de bromuro de etidio (BrEt) 0.5 µg/ml y lavados tres veces en agua durante 10 min.

### 3.5.3 Análisis electroforético en geles nativos de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de oligonucleótidos marcados y productos de reacción de los ensayos de actividad, las muestras fueron mezcladas con tampón de carga azul/naranja 6X de la casa comercial *Promega*, calentadas a 65°C durante 5 minutos y cargadas en geles de 5% y 7% acrilamida en TBE. Posteriormente dichos geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autoradiografiados entre 24 h y 96 h en una pantalla fosfoluminiscente (*Phosfor Screen, Molecular Dynamics*). A continuación, la pantalla fue digitalizada en un scanner Storm 869 (*Molecular Dynamics*). Alternativamente, para la resolución de los experimentos de interacción del complejo VP1-VP3-dsRNA, los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa.

### 3.5.4 Electrotransferencia e inmunodetección (*Western blot*)

Una vez llevada a cabo la separación electroforética mediante geles de poliacrilamida o agarosa, éstos fueron electrotransferidos en condiciones semisecas durante 45 min a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (*Protran, Schleicher & Schuell*) tras incubar durante 10 min tanto el gel como las membranas en tampón Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375 % (p/v), metanol 20 % (v/v). Las membranas fueron saturadas en solución de bloqueo [leche desnatada en polvo al 5% en tampón fosfato salino (PBS)] durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente incubadas con el correspondiente anticuerpo primario diluido ( $\alpha$ -VP1 1:500;  $\alpha$ -VP3 1:500;  $\alpha$ -His 1:1000) en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 10 min con PBS, se incubaron 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra  $\alpha$ -IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1:5000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces con PBS durante 10 min y se reveló mediante la utilización del sistema comercial quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*) o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0,025 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.5.5 Análisis por cromatografía de exclusión (Filtración en gel)

Una vez purificada la proteína en estudio, la fracción pico de la purificación se diluyó en un tampón Tris HCl (pH 8), 0.5 M NaCl y glicerol 8% y se sometió a análisis por filtración en gel en una columna Superdex 75 HR 10/65 (*Amersham*) calibrada previamente con marcadores de proteínas de masa molecular conocida y equilibrada en el mismo tampón que la proteína en estudio.

### 3.5.6 Análisis por espectrometría de masas

La muestra en estudio se resuspendió en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se pasó a través de puntas C-18 Zip Tip (*Millipore*) y la proteína eluida se mezcló en relación 1:1 con la solución matriz (ácido 3,5-dimetoxi-4hidroxicinámico en acetonitrilo acuoso al 33% y 0,1% ácido trifluoroacético). Una alícuota de 0,7  $\mu$ l de esta mezcla se colocó en la sonda inoxidable MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) y se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras se midieron en un espectrómetro de masas Bruker Reflex IV por el procedimiento MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) (Bruker – Franzen Analytic GmbH) equipado con una fuente SCOUT configurada en modo de reflexión de iones positivos con retardo de extracción.

## 3.6 Determinación de la estructura atómica de las proteínas

### 3.6.1 Cristalización y recolección de datos

Los cristales de la proteína recombinante VP1  $\Delta$ 846-879 se obtuvieron mediante el método de difusión de vapor en gotas, a 20°C, mezclando volúmenes iguales de la proteína VP1  $\Delta$ 846-879 y de un tampón de cristalización en los siguientes rangos, 10-12% de PEG3350, 0.3-0.5 M LiNO<sub>3</sub> y pH entre 6.5 y 8.0

El derivado de Samario se preparó introduciendo los cristales nativos de VP1  $\Delta$ 846-879, antes de ser congelados con nitrógeno líquido, en una solución que contenía el tampón de cristalización descrito y acetato de Samario 3M [(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Sm-3H<sub>2</sub>O].

El complejo VP1  $\Delta$ 846-879-GRLGRWIRTVSEDELE se obtuvo mezclando la proteína con el péptido de VP3 en un ratio molar 1:4 e incubándolo ocho horas a 4°C antes de los ensayos de cristalización. Los cristales se crecieron a 20°C en una solución que contenía 5% PEG3350, 0.4 M LiNO<sub>3</sub> y 0.1 M Tris-HCl pH 7.2.

Los cristales del complejo VP1  $\Delta$ 846-879-GTP-Mg<sup>2+</sup> se prepararon introduciendo los cristales nativos de VP1  $\Delta$ 846-879 en la solución de cristalización que además contenía 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM GTP.

Los cristales de la proteína recombinante VP3  $\Delta$ 222-258 se obtuvieron mediante el método de difusión de vapor en gotas, a 20°C, mezclando volúmenes iguales de la proteína VP3  $\Delta$ 222-258 y de un tampón de cristalización que contenía 2.6 M NaCl y 0.1 M acetato sódico (pH 5). Los cristales, antes de ser congelados con nitrógeno líquido, fueron transferidos a una solución como la descrita para la proteína VP3  $\Delta$ 222-258, suplementada con glicerol al 20% (v/v).

Los derivados de oro se prepararon introduciendo durante tres horas, antes de ser congelados, los cristales nativos de la proteína VP3  $\Delta$ 222-258 en una solución que contenía el tampón de cristalización descrito y 5mM AuCl<sub>3</sub>.

Los datos de difracción de rayos X de los cristales se recogieron utilizando radiación de sincrotrón en el *European Synchrotron Radiation Facility* (Grenoble, Francia) (haces BM16, ID23.1 e ID14.2 en el caso de VP1  $\Delta$ 846-879 y haz ID23 en el caso de VP3  $\Delta$ 222-258). Las

imágenes de difracción se procesaron con los programas MOSFLM y SCALA (*Collaborative computational project N* 1994) en el caso de la proteína VP1  $\Delta$ 846-879 y el paquete Denzo/Scale (Otwinowski y Minor, 1997) en el caso de la proteína VP3  $\Delta$ 222-258.

### 3.6.2 Determinación de estructura y refinamiento

En el caso de la proteína VP1  $\Delta$ 846-879, las fases para el cálculo del mapa de densidad electrónica se obtuvieron mediante el método de MAD (Dispersión Anómala Múltiple), a partir de un cristal derivatizado con Samario, usando los juegos de datos a 3.8 Å de resolución recogidos a diferentes longitudes de onda. Estas fases iniciales se aplicaron a un juego de datos isomórfico (comparable) de 2.8 Å de resolución, lo que permitió obtener unos mapas experimentales suficientemente buenos para trazar un modelo preliminar de VP1. Este modelo se usó para aplicar el método de Reemplazo Molecular a otro juego de datos de mayor resolución, 2.4 Å, a partir del que se trazó la estructura atómica de la proteína VP1.

Los mapas del complejo VP1  $\Delta$ 846-879-péptido de VP3 se obtuvieron comparando los nuevos datos con los datos de los coordinados de la proteína VP1  $\Delta$ 846-879 obtenidos anteriormente. Posteriormente estos datos se sometieron a varios ciclos de refinamiento hasta llegar al modelo final.

En el caso de la proteína VP3  $\Delta$ 222-258 la estructura se obtuvo mediante el método de MAD (Dispersión Anómala Múltiple) aplicado a un único cristal de un derivado de oro a una resolución de 2.4 Å. Los datos nativos se utilizaron para refinar la estructura hasta una resolución de 2.3 Å.

Los modelos se refinaron con los programas SHARP (Bricogne y col. 2003) y REFMAC5 (Mushudov y col. 1997)

### 3.6.3 Números de acceso de las estructuras de Rayos X

Los coordinados atómicos han sido depositados en la base de datos de proteínas ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) con números de acceso 2PUS para VP1  $\Delta$ 846-879, 2R72 para VP1  $\Delta$ 846-879 + Mg<sup>2+</sup>, 2R70 y 2QJ1 para VP1  $\Delta$ 846-879 + péptido C-terminal de VP3, 2R18 para VP3  $\Delta$ 222-258 y 2Z7J para el derivado de oro de VP3  $\Delta$ 222-258.

## **3.7 Ensayos de interacción proteína-RNA y ensayos de actividad**

### **3.7.1 Ensayos de interacción proteína-RNA**

Una vez purificadas las proteínas sujeto del estudio y los RNAs de distintos orígenes; dsRNA del virus IBDV, ssRNA viral procedente de transcripción *in vitro* (apartado 3.2.7) y oligonucleótidos anillados y marcados, se llevaron a cabo los ensayos de interacción de la siguiente manera:

#### **Interacción proteína-dsRNA y proteína-ssRNA:**

En un volumen final de 20  $\mu$ l se incubaron, en el tampón de interacción (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl), varios tubos con distintas concentraciones de la proteína problema (desde 80 ng a 10  $\mu$ gr), 500 ng de dsRNA de IBDV y 10  $\mu$ gr de BSA. La interacción se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora, tras ese tiempo se añadió a cada tubo tampón de carga azul/naranja 6X de la casa comercial *Promega* y se cargó en un gel de agarosa 0,7% en TBE. En el caso de los experimentos de interacción del complejo VP1-VP3-dsRNA las muestras se cargaron en geles 5% acrilamida en TBE.

#### **Interacción proteína-oligos de dsRNA:**

En un volumen final de 20  $\mu$ l se incubaron, en el tampón de interacción (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl), 10  $\mu$ gr de proteína, 5  $\mu$ gr de oligonucleótidos hibridados y 10  $\mu$ gr de BSA. La interacción se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora, tras ese tiempo se añadió a cada tubo tampón de carga azul/naranja 6X de la casa comercial *Promega* y se cargó en un gel 7% acrilamida en TBE.

### **3.7.2 Ensayo de actividad polimerasa**

Los ensayos de polimerización de la proteína VP1 se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente (von Einem y col. 2004) con algunas modificaciones. Las mezclas de reacción, que contenían 1  $\mu$ g de proteína hVP1 $\Delta$ 846-879 y la cantidad apropiada del péptido C-terminal de la VP3 o la hVP3 purificada, se prepararon en 20  $\mu$ l de un tampón 100 mM Tri-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 4 mM  $Cl_2Mg$ , 0.01 mM EGTA, 20 unidades de RNasin, 1 mM ATP, CTP y GTP, y 0.02. Las muestras se incubaron a 20°C durante 30 minutos, se añadieron 5  $\mu$ l de molde ssRNA+ (0.2 mg/ml) y 10  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]UTP y se incubaron durante 2 horas a 40°C, tras ese tiempo las muestras fueron digeridas con Proteinasa K, extraídas con fenol/cloroformo,



precipitadas con etanol y resuspendidas en 18  $\mu$ l de agua DEPC, posteriormente se le añadieron 3  $\mu$ l de tampón de carga azul/naranja 6X de la casa comercial *Promega*, se calentaron a 65°C durante 5 minutos y se cargaron en geles 5% acrilamida en TBE. Posteriormente dichos geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autoradiografiados entre 24 h y 96 h en una pantalla fosfoluminiscente (*Phosfor Screen, Molecular Dynamics*). A continuación, la pantalla fue digitalizada en un scanner Storm 869 (*Molecular Dynamics*). Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software *ImageQuant (Molecular Dynamics)*.



## *4 Resultados*



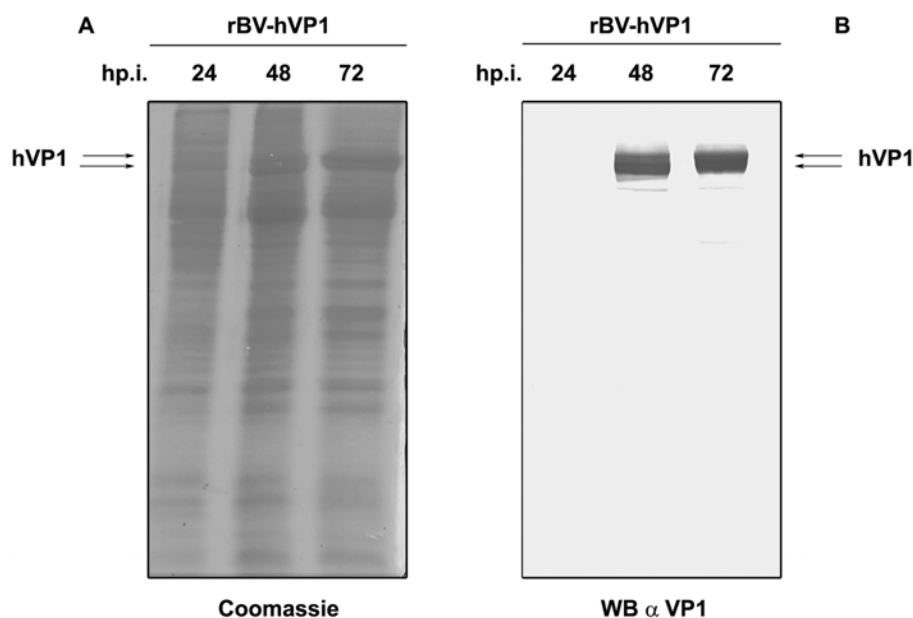


## 4.1 Proteína VP1 del virus IBDV

### 4.1.1 Expresión de la proteína recombinante his-VP1

El primer paso en el estudio de la proteína VP1 consistió en la generación de un plásmido que nos permitiera expresar la proteína fusionada a una cola de histidinas en su extremo N-terminal, para dar lugar a la síntesis de la proteína recombinante denominada his-VP1. Con este fin obtuvimos, mediante restricción enzimática (*Materiales y Métodos*, 3.2.3), la secuencia DNA correspondiente a la proteína VP1 a partir de un plásmido generado anteriormente en el laboratorio, pBSK/VP1 (Lombardo y col. 1999). Este fragmento de DNA fue subclonado en el vector pFastBacHtc (*Invitrogen*) generando de ésta manera el plásmido pFBHtc-VP1 (*M.M.* 3.2.4). Este plásmido se utilizó para obtener un baculovirus recombinante (rBV) siguiendo la metodología del sistema Bac-to-Bac (*Invitrogen*). Este rBV fue denominado rBV-his-VP1.

Una vez obtenido el rBV-his-VP1, se procedió a analizar la expresión de la proteína recombinante his-VP1 mediante la infección en células *HighFive*<sup>TM</sup>. Para ello, las células se infectaron a MOI de 5 ufp/cel. Tras la infección, se recogieron muestras a las 24, 48 y 72 hp.i. Los correspondientes extractos fueron sometidos a análisis mediante SDS-PAGE. Tras la electroforesis, los gels fueron teñidos con azul de Coomassie o analizados mediante *Western Blot* empleando un anticuerpo específico frente a VP1 (nº 434, *M.M.* 3.1.5) (Figura 9).



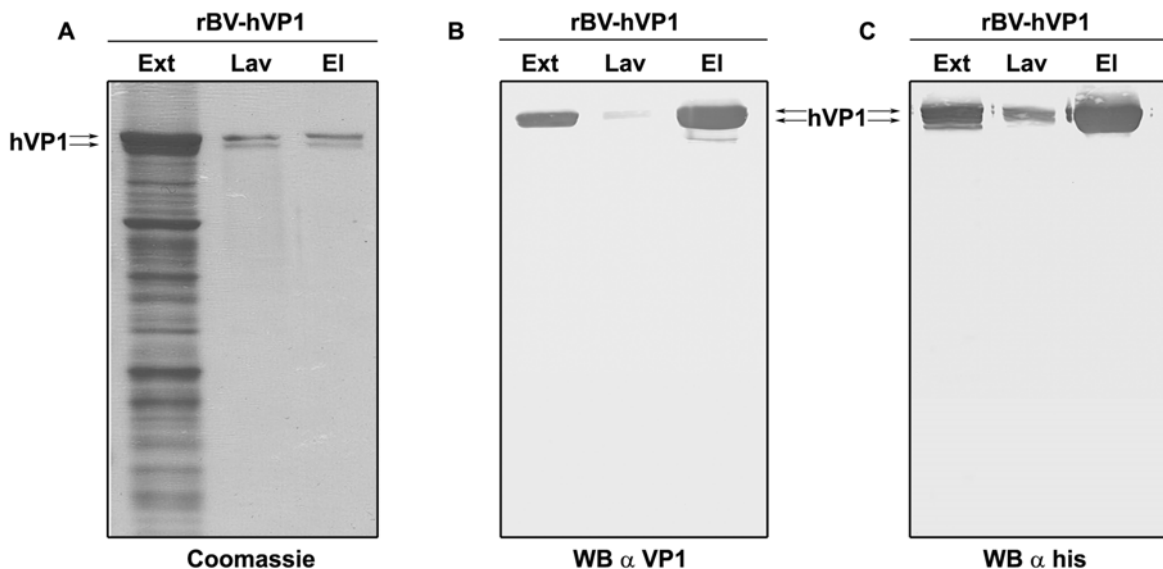
**Figura 9. Expresión de la proteína recombinante his-VP1.** Gel SDS-PAGE 10% donde se muestra la expresión de la proteína recombinante his-VP1 durante la cinética de infección en células *HighFive*<sup>TM</sup>. Las muestras analizadas fueron recogidas a las 24, 48 y 72 hp.i. (A) Tinción con azul de Coomassie.

(B) *Western Blot* frente a la proteína VP1. Las flechas marcan la posición correspondiente a la proteína his-VP1.

Como puede apreciarse en la Figura 9, la proteína his-VP1 se expresa correctamente, alcanzando un nivel de acumulación máximo a las 72 hp.i. Estos resultados nos permitían abordar la purificación de la proteína bajo estudio.

#### 4.1.2 Purificación de la proteína recombinante his-VP1

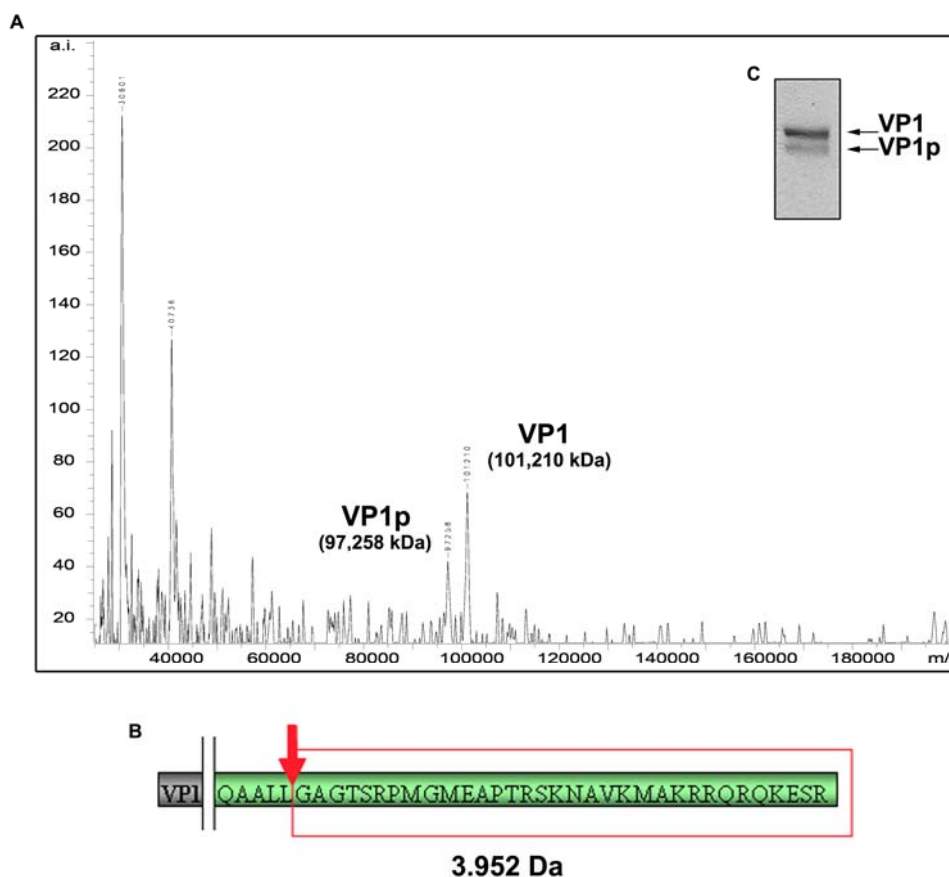
El primer paso de la purificación consistió en la producción de extractos celulares enriquecidos en la proteína his-VP1 mediante infección de células *HighFive*<sup>TM</sup> con el rBV-his-VP1. Las infecciones fueron realizadas empleando una MOI de 5 ufp/cel. Los cultivos fueron recogidos a las 72 hp.i. Tras dos lavados en PBS, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis y procesadas según se describe en el apartado de Materiales y Métodos (3.4.1). Los extractos resultantes fueron empleados para la purificación de la proteína his-VP1 mediante cromatografía de afinidad a metal (IMAC) en columnas de agarosa-níquel (*HisTrap HP*; *GE Healthcare*). Tras el proceso de purificación, las muestras recogidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Los geles fueron analizados mediante tinción azul de Coomassie y *Western Blot* empleando anticuerpos específicos frente a VP1 y frente a la cola de histidinas (Figura 10).



**Figura 10. Purificación de la proteína recombinante his-VP1.** Gel SDS-PAGE 10% donde se muestra la purificación, por columna de afinidad, de la proteína his-VP1 expresada por el rBV-his-VP1. Ext: extracto total pre-cromatografía; Lav: lavado de la columna; El: eluido final. (A) Tinción con azul de Coomassie. (B) *Western Blot* frente a la proteína VP1. (C) *Western Blot* frente a la cola de histidinas. Las flechas marcan la posición correspondiente a la proteína his-VP1.

En la purificación se obtienen rendimientos de proteína de aproximadamente  $0,0675 \text{ mg}/10^6$  células. Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos muestra la presencia de dos bandas proteicas de aproximadamente 101 y 97 kDa, respectivamente (Figura 10A). El análisis mediante *Western Blot* permite comprobar que ambas bandas corresponden a dos especies moleculares de la proteína recombinante his-VP1 (Figura 10B y 10C).

Para determinar el origen de las dos especies moleculares, la muestra fue analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados de este análisis permitieron determinar la presencia de dos proteínas con masas moleculares de 97.258 y 101.210 Da, respectivamente (Figura 11). La masa molecular de la proteína de menor movilidad electroforética corresponde de forma precisa al esperado para la proteína his-VP1 (101,456 kDa). Por otra parte, la masa de la segunda proteína corresponde exactamente a una forma truncada de la proteína his-VP1 carente de los 34 aminoácidos C-terminales. Este péptido C-terminal tiene una masa molecular estimada de 3,952 kDa. Estos resultados indican que la proteína his-VP1 sufre un procesamiento proteolítico que elimina los últimos 34 aminoácidos de su extremo C-terminal.



**Figura 11. Análisis por espectrometría de masas de la proteína his-VP1.** (A) Gráfica de análisis por espectrometría de masas de la proteína VP1 purificada (B) Esquema de la diferencia de masa entre las dos especies, VP1 y VP1p (procesada). La flecha roja indica el lugar de procesamiento. (C) *Western Blot* frente a la proteína VP1.

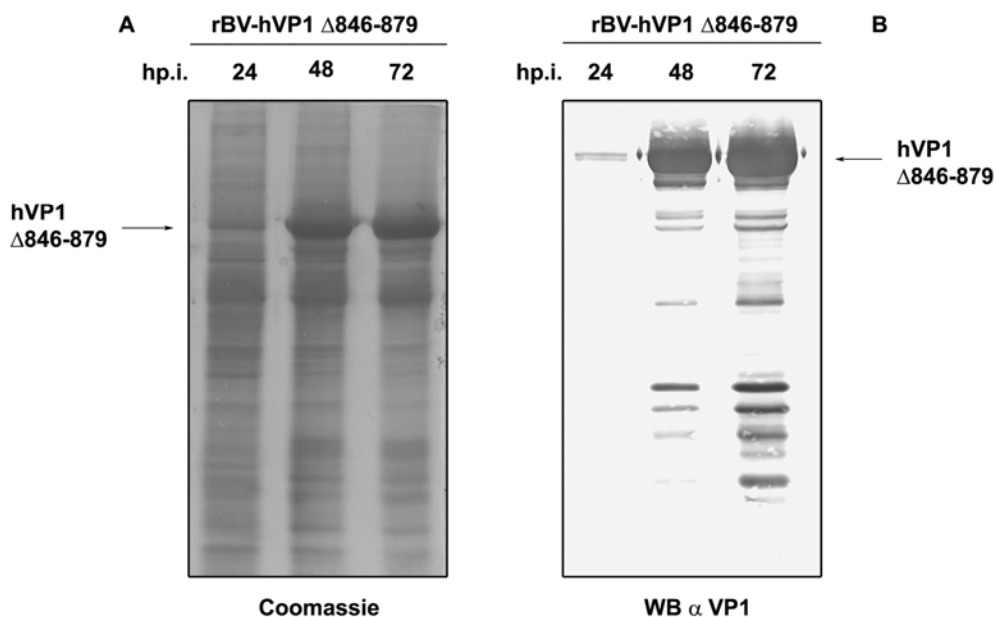
La segunda banda (97,258 kDa) puede generarse como consecuencia de un procesamiento en la región C-terminal de la proteína VP1. Esta degradación puede ser debida a que es una región con un alto grado de flexibilidad estructural y fuertemente cargada, dos características frecuentemente asociadas con una elevada susceptibilidad a la proteólisis (Realini et al, 1994; Reichsteiner y Rogers, 1996).

Este resultado confirma la hipótesis de la presencia de dos especies moleculares de la proteína, lo cual nos impide realizar los ensayos de cristalización y por lo tanto, la posterior resolución de la estructura atómica de la proteína.

#### 4.1.3 Expresión de la proteína recombinante his-VP1 $\Delta$ 846-879

Para solucionar la causa de las dos especies moleculares decidimos generar un plásmido que codificase una versión truncada de la proteína his-VP1. Esta versión consistía en la proteína recombinante his-VP1 carente de los 34 últimos aminoácidos C-terminales. La versión truncada, denominada his-VP1  $\Delta$ 846-879, fue generada, a partir del plásmido pBSK/VP1 (Lombardo y col. 1999). Para ello, se generó mediante PCR un fragmento de DNA, que contenía la delección requerida así como un triplete de terminación falso (M.M. 3.2.4). El plásmido resultante, pFBHtc-VP1  $\Delta$ 846-879, se utilizó para generar un rBV denominado rBV-his-VP1  $\Delta$ 846-879.

Una vez obtenido el rBV-his-VP1  $\Delta$ 846-879, comprobamos la correcta expresión de la proteína recombinante his-VP1  $\Delta$ 846-879 mediante el análisis de la cinética de acumulación de la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 en células *HighFive*<sup>TM</sup>. Para ello, las células se infectaron a MOI 5 ufp/cel y las infecciones se recogieron a las 24, 48 y 72 hp.i. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y analizadas mediante tinción azul de Coomassie y *Western Blot* empleando un anticuerpo específico frente a la proteína VP1 (Figura 12).



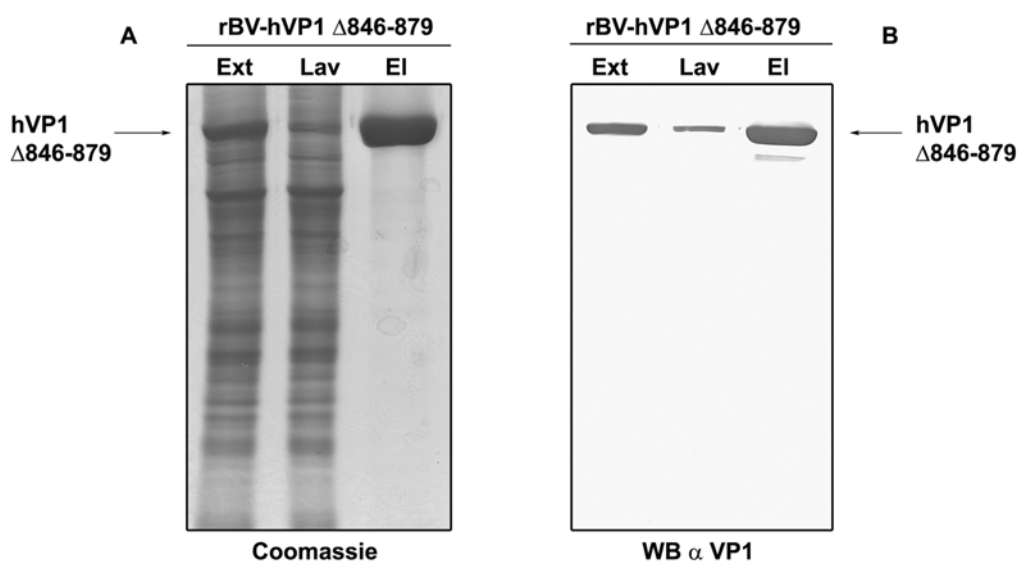


**Figura 12. Expresión de la proteína recombinante his-VP1  $\Delta$ 846-879.** Gel SDS-PAGE 10% donde se muestra la acumulación de la proteína recombinante his-VP1  $\Delta$ 846-879 durante la cinética de infección en células *HighFive*<sup>TM</sup>. Las muestras fueron recogidas a las 24, 48 y 72 hp.i. **(A)** Tinción con azul de Coomassie. **(B)** *Western Blot* frente a la proteína VP1. Las flechas marcan la posición correspondiente a la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879.

En la Figura 12 se puede observar la presencia de una banda reconocida por el anticuerpo frente a VP1 cuya máximo nivel de acumulación se produce a las 72 hp.i. A partir de 48 hp.i. se detecta la presencia de proteínas de menor masa molecular, probablemente debido al procesamiento de la proteína.

#### 4.1.4 Purificación de la proteína recombinante his-VP1 $\Delta$ 846-879

El primer paso de la purificación consistió en la producción de extractos celulares enriquecidos en la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 mediante infección de células *HighFive*<sup>TM</sup> con el rBV-his-VP1  $\Delta$ 846-879. Las infecciones fueron realizadas empleando una MOI de 5 ufp/cel. Los cultivos fueron recogidos a las 72 hp.i. Tras dos lavados en PBS, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis y procesadas según se describe en el apartado de Materiales y Métodos (3.4.1). Los extractos resultantes fueron empleados para la purificación de la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 mediante IMAC en columnas de agarosa-níquel. Tras el proceso de purificación, las muestras recogidas fueron sometidas a SDS-PAGE. Los geles fueron analizados mediante tinción azul de Coomassie y *Western Blot* empleando un anticuerpo específico frente a la proteína VP1 (Figura 13).



**Figura 13. Purificación de la proteína recombinante his-VP1  $\Delta$ 846-879.** Gel SDS-PAGE 10% donde se muestra la purificación por columna de afinidad, de la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 expresada por el

rBV-his-VP1  $\Delta$ 846-879. Ext: extracto total pre cromatografía; Lav: lavado de la columna; El: eluido final. **(A)** Tinción con azul de Coomassie. **(B)** *Western Blot* frente a la proteína VP1. Las flechas marcan la posición correspondiente a la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879.

En la purificación se obtienen rendimientos de proteína de aproximadamente 0,0675 mg/10<sup>6</sup> células. El análisis de los resultados obtenidos muestra la presencia de una única banda proteica de aproximadamente 97 kDa (Figura 13A). El análisis mediante *Western Blot* permite comprobar que esta banda corresponde a la proteína recombinante his-VP1  $\Delta$ 846-879 (Figura 13B). Este resultado nos permitió proceder con los ensayos de cristalización y posterior resolución de la estructura atómica de la proteína de la proteína.

#### 4.1.5 Determinación de la estructura atómica de la proteína VP1

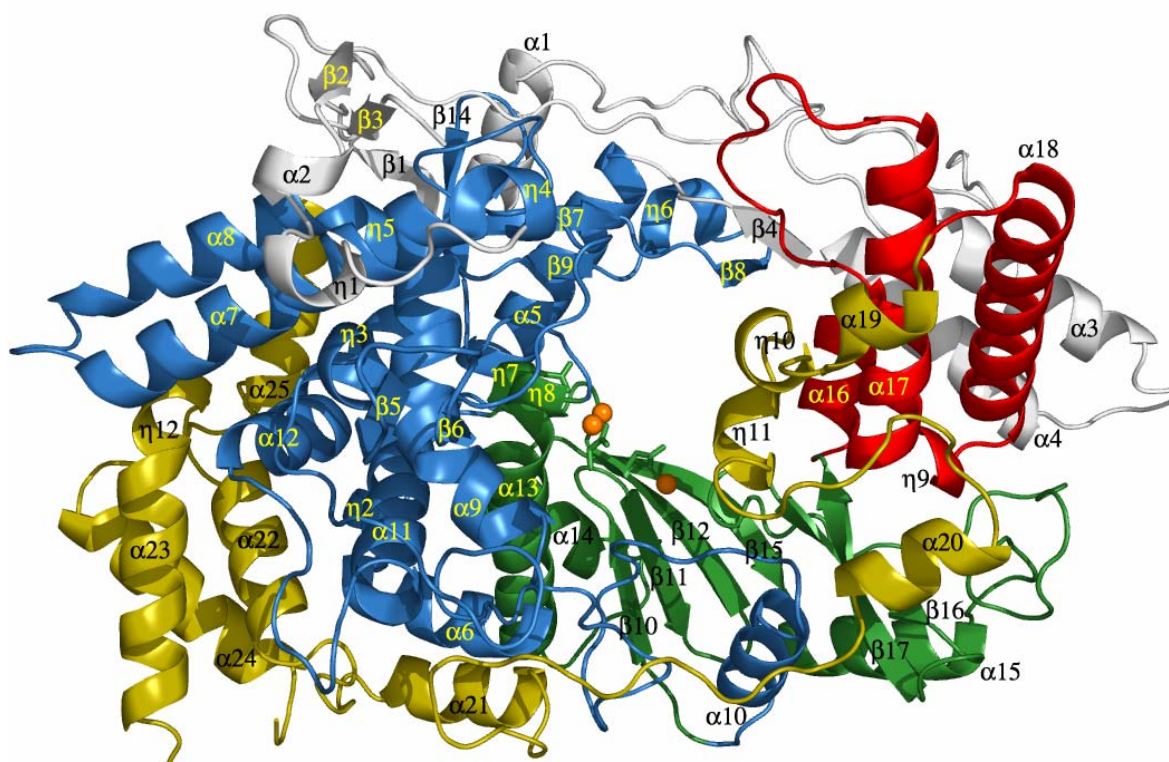
Una vez purificada la proteína recombinante his-VP1  $\Delta$ 846-879, las muestras fueron tratadas con la proteasa recombinante rTEV (M.M. 3.4.1) para eliminar la cola de histidinas. Se dializaron frente a un tampón 50 mM Tris-HCl pH8 y 300 mM NaCl, y se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna de agarosa-níquel para aislar la fracción de la muestra que no quedaba retenida en la columna, es decir, aquella que carece de cola de histidinas. Se concentró la muestra hasta una concentración final de 10 mg/ml usando los filtros Centricon YM-10 (*Millipore*).

Los cristales de la proteína recombinante VP1  $\Delta$ 846-879 se obtuvieron mediante el método de difusión de vapor en gotas, mezclando volúmenes iguales de la proteína VP1  $\Delta$ 846-879 y de un tampón de cristalización en los siguientes rangos, 10-12% de PEG3350, 0.3-0.5 M LiNO<sub>3</sub> y pH entre 6.5 y 8.0 (M.M. 3.6.1)

La estructura de la versión recombinante de la RpRd de IBDV se obtuvo de la siguiente manera: Las fases para el cálculo del mapa de densidad electrónica se obtuvieron mediante el método de Dispersión Anómala Múltiple (MAD), a partir de un cristal derivatizado con Samario, usando los juegos de datos a 3.8 Å de resolución recogidos a diferentes longitudes de onda. Estas fases iniciales se aplicaron a un juego de datos isomórfico (comparable) de 2.8 Å de resolución, lo que permitió obtener unos mapas experimentales suficientemente buenos para trazar un modelo preliminar de VP1. Este modelo se usó para aplicar el método de Reemplazo Molecular a otro juego de datos de mayor resolución, 2.4 Å, a partir del que se trazó la estructura atómica de la proteína VP1 (Figura 14).

La proteína VP1 forma una unidad compacta con forma aproximadamente oval (dimensiones: 95 x 55 x 54 Å). La cadena polipeptídica esta formada por 37 hélices (25  $\alpha$ -hélices y 12 hélices  $3_{10}$ ) y 17 hojas  $\beta$  y se puede dividir en tres dominios bien diferenciados si la comparamos con otras RpRds virales (Ferrer-Orta y col. 2006). Estos dominios son los que aquí se exponen:

- 1- El dominio central de la polimerasa (residuos 169-657) que contiene los subdominios clásicos *dedos*, *palma* y *pulgar* que se encuentran en todas las polimerasas (Steitz 1998).
- 2- Un dominio N-terminal (residuos 1-168), que rodea el dominio central de la polimerasa, el cual conecta los *dedos* y el *pulgar* a un lado de la hendidura catalítica.
- 3- Un dominio C-terminal en forma de herradura (residuos 658-845) que se extiende a través de la *palma* y los *dedos* al otro lado de la hendidura catalítica.



**Figura 14. Estructura de la polimerasa VP1 de IBDV.** Diagrama de cintas que muestra la estructura secundaria con los elementos marcados explícitamente: El dominio N-terminal (gris) está formado por 5 hélices ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$  y la hélice  $3_{10}$ ,  $\eta 1$ ) cuatro hojas  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ) y tres largos lazos. Los *dedos* de VP1 (azul) se organizan en dos regiones. La primera región son los *dedos* internos, formados por las hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$  y  $\alpha 12$  que se encuentran rodeando el subdominio *palma*. La segunda región son los *dedos* exteriores, los cuales incluyen lo siguiente: (i) una hoja  $\beta$  con cinco hebras ( $\beta 1$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 9$ ,  $\beta 13$ ,  $\beta 14$ ), siendo  $\beta 1$  cedida por el dominio N-terminal, rodeada por una superficie de hélices expuestas ( $\eta 4$ ,  $\eta 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\alpha 8$ ); (ii) una región adyacente formada por la hélice  $\eta 3$  y la horquilla  $\beta 5$ - $\beta 6$  señalando la cavidad central de la polimerasa; y (iii) un lazo formado por  $\beta 8$  y  $\eta 6$  (residuos 321-335), los cuales se extienden hacia el

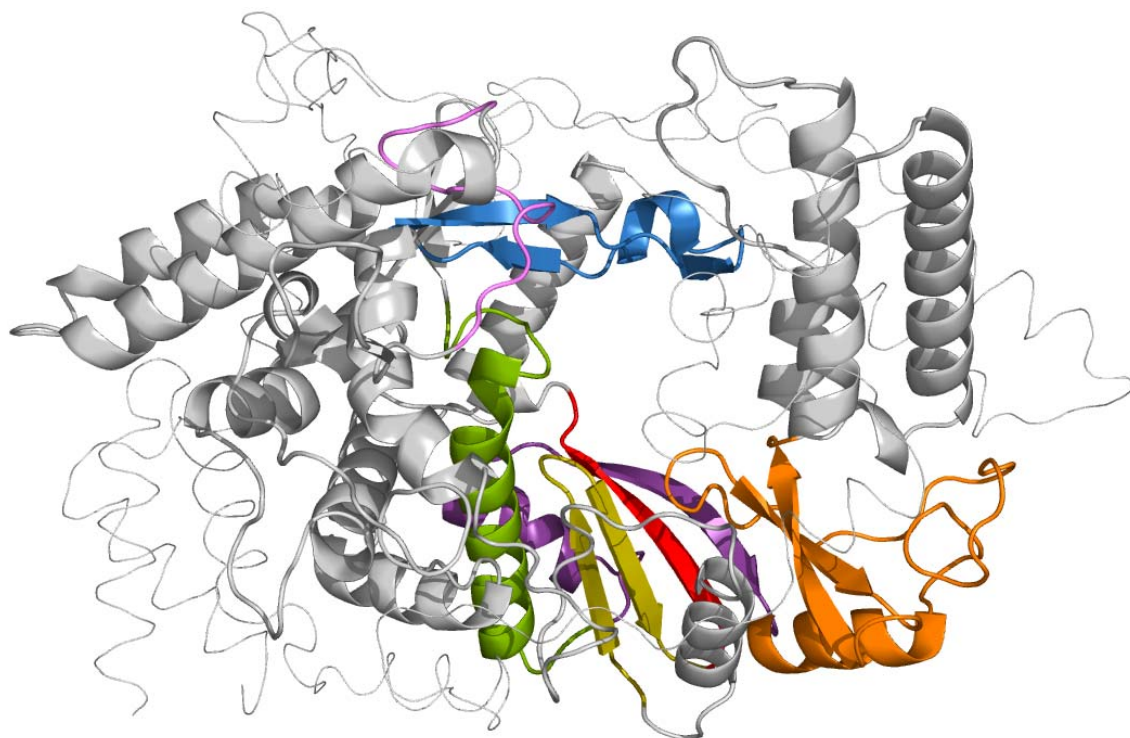
dominio *pulgar*. El dominio *palma* (verde) está formado por una hoja  $\beta$  de cuatro hebras ( $\beta_{10}$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{12}$  y  $\beta_{15}$ ) flanqueada por dos  $\alpha$ -hélices ( $\alpha_{13}$  y  $\alpha_{14}$ ) y seguida por una hélice adicional  $\alpha_{15}$  y un largo lazo que conecta la horquilla  $\beta_{16}$ - $\beta_{17}$ . El dominio *pulgar* (rojo) incluye tres hélices ( $\alpha_{16}$ ,  $\alpha_{17}$  y  $\alpha_{18}$ ) conectadas por largos lazos. Finalmente el dominio C-terminal (amarillo; residuos 671-804) incluye cuatro hélices ( $\alpha_{19}$ ,  $\eta_{10}$ ,  $\eta_{11}$  y  $\alpha_{20}$ ), al lado del *pulgar*, seguido por seis  $\alpha$ -hélices ( $\alpha_{21}$ - $\alpha_{25}$  y  $\eta_{12}$ ), cerca de los *dedos* y conectadas por un largo lazo flexible.

En la estructura resuelta (Figura 14) lo primero que tenemos que destacar es que los primeros 26 residuos de la proteína VP1 no son visibles, luego, deben estar desordenados. Los residuos 26-32 se encuentran fuera del núcleo de la polimerasa y participan en el empaquetamiento cristalino. El resto del dominio, residuos 33-168, se organizan en 4  $\alpha$ -hélices (de  $\alpha_1$  a  $\alpha_4$ ), una hélice  $3_{10}$  ( $\eta_1$ ), cuatro hojas  $\beta$  (de  $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) y tres lazos que cubren parte del sitio activo. Las interacciones entre las hélices N-terminales  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$  y las hélices  $\alpha_{17}$  y  $\alpha_{18}$  del subdominio *pulgar* son fundamentales para que la polimerasa mantenga esa estructura compacta.

En segundo lugar, en el dominio C-terminal se encuentran dos regiones formadas por  $\alpha$ -hélices que están separadas entre sí pero unidas por un largo lazo. La región formada por las hélices  $\alpha_{19}$ ,  $\eta_{10}$ ,  $\eta_{11}$  y  $\alpha_{20}$ , cercana al subdominio *pulgar*, y la región formada por las hélices  $\alpha_{21}$  a  $\alpha_{25}$  que se encuentran fuertemente empaquetadas con los *dedos*. La región formada por las hélices  $\alpha_{19}$ ,  $\eta_{10}$  y  $\eta_{11}$  forma una protrusión que bloquea parcialmente el sitio activo.

En tercer lugar observamos que el dominio central de la proteína VP1 muestra todos los motivos estructurales característicos de las RpRd (Kamer y col. 1984; O'Reilly y col. 1998; Bruenn 2003) que podemos ver más claramente en la Figura 15, implicados en las siguientes funciones:

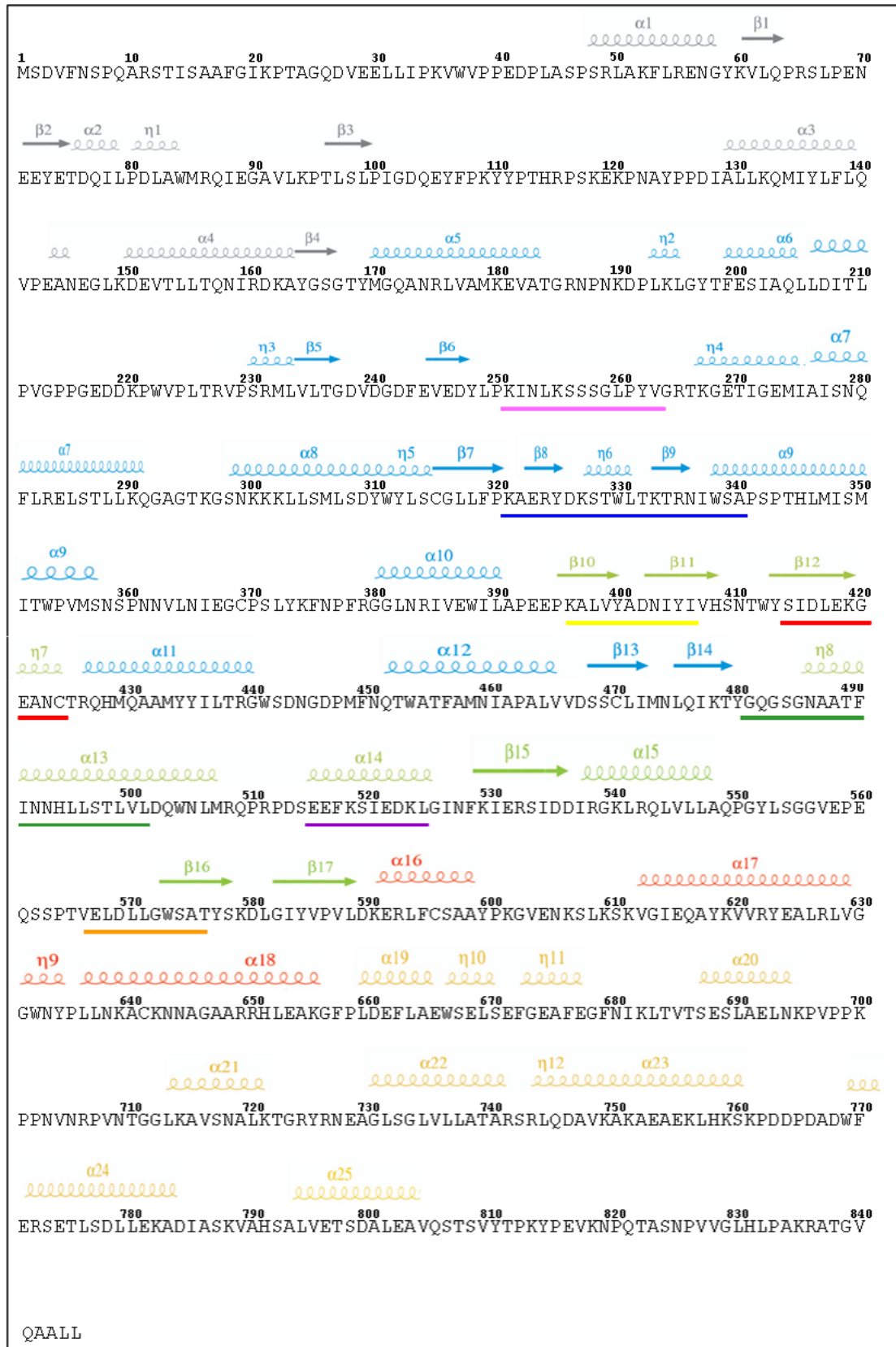
- Reconocimiento y unión de los nucleótidos → motivos A, B y F (rojo, verde y azul)
- Transferencia de grupo fosfato → motivos A y C (rojo y amarillo)
- Integridad estructural del dominio *palma* → motivo D (violeta)
- Primado de la unión de nucleótidos → motivo E (naranja)
- Unión del molde → motivos B, F y G (verde, azul y rosa)



**Figura 15. Motivos estructurales conservados de la polimerasa.** Los motivos estructurales conservados están coloreados como sigue: A, rojo; B, verde; C, amarillo; D, violeta; E, naranja; F, azul; G, rosa; Los dominios N-term y C-term se muestran como cintas finas. En gris, los subdominios *dedos* y *pulgar*. El patrón de colores es el mismo que en la Figura 4B

El análisis en conjunto de la estructura resuelta (Figura 15), con la secuencia de la proteína (Figura 16), revela lo siguiente:

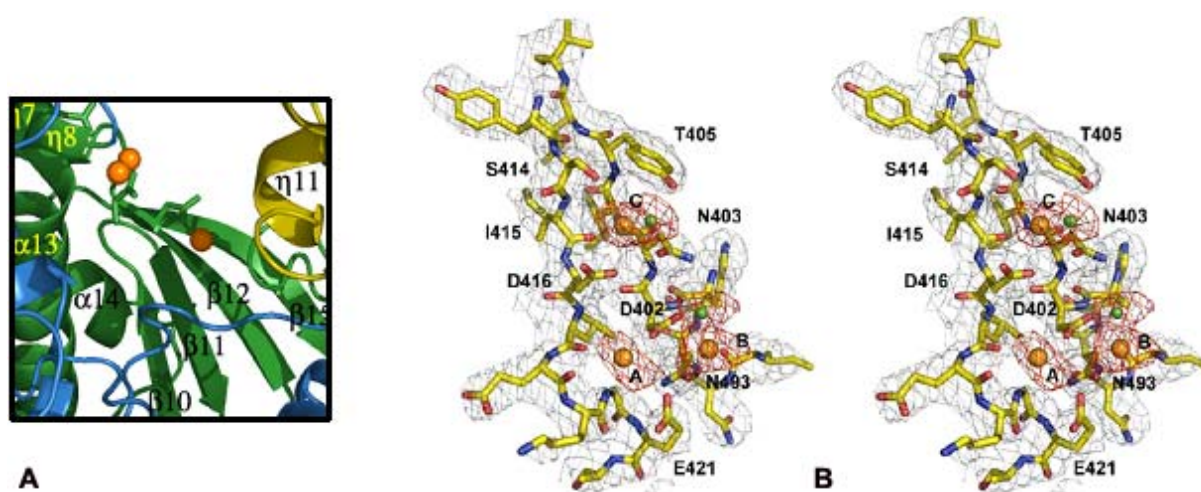
- Los residuos 251-265 de la región de los *dedos* forman el motivo G (rosa) que se encuentra en el lazo que conecta la lámina  $\beta 6$  y la hélice  $\eta 4$  y tiene una secuencia consenso T/SX<sub>1,2</sub>GP.
- La lámina  $\beta 9$  (residuos 322-338; azul) contiene el motivo F el cual se encuentra únicamente en las RpRd y se define como R-X<sub>n</sub>-I/L (n= 1, 2). Es el lazo de unión de rNTPs y tiene una serie de residuos básicos (333-339) que interaccionan con los grupos fosfato de los nucleótidos entrantes.
- Los residuos 396-406 de la *palma* contienen el motivo C (amarillo) que en el género *Birnaviridae* se encuentra inmediatamente antes del motivo A (residuos 414-424; rojo) (Gorbalenya y col. 2002). El motivo C incluye la secuencia ADN (residuos 401-403), estructuralmente similar a la secuencia GDD que se encuentra en las RpRds canónicas de estructura conocida (Poch y col. 1989).
- El motivo A incluye los residuos conservados D416 y E421. Estos residuos junto con el D402 parecen ser los residuos catalíticos de las RpRds de Birnavirus (Duncan y col. 1991; Shwed y col. 2002). El motivo B (residuos 480-500) incluye la mayoría de la hélice  $\alpha 13$  y se muestra en verde.



**Figura 16. Secuencia del polipéptido VP1Δ846-879.** Se muestra la secuencia de la proteína resuelta. Encima de la secuencia aminoacídica se indican los elementos de estructura secundaria, coloreados por subdominios, tal y como se muestran en la Figura 14. Los motivos conservados se marcan con barras bajo la secuencia y se colorean como se muestra en la Figura 15.

En casi todas las RpRd, el motivo B presenta la secuencia consenso – SGxxxT – la cual se ha propuesto que interactúa con el grupo 2'-OH del nucleótido entrante (Tao y col. 2002; Butcher y col. 2001). El motivo B funcionará guiando la entrada del molde al sitio activo. La hélice  $\alpha 14$  junto con la lámina  $\beta 15$ , forman el motivo D (residuos 515-524; violeta). Este motivo da soporte estructural a la hoja  $\beta$  que contiene los motivos A y C. El motivo E (residuos 567-576; naranja) se encuentra en el largo lazo que une la hélice  $\alpha 15$  y la lámina  $\beta 16$  en la región de unión entre los dominios *palma* y *pulgar*.

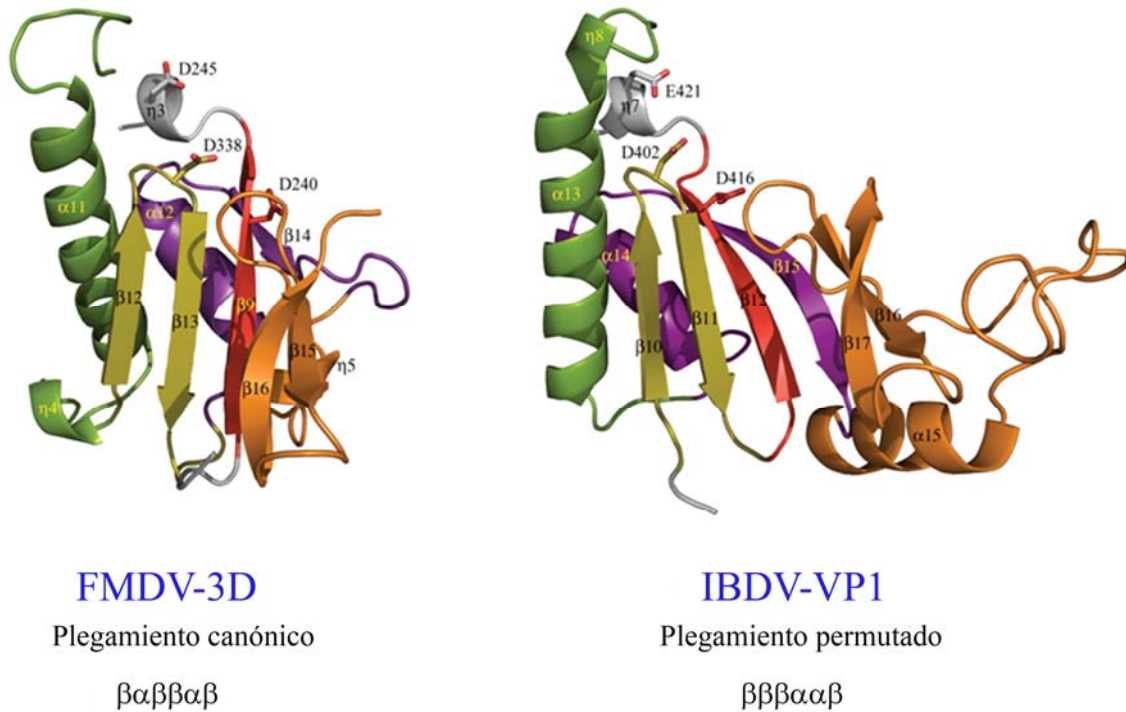
En el centro activo de la proteína (Figura 14) encontramos 3 átomos de Magnesio, dos de ellos, unidos a los residuos D402 (motivo C) y D416 y E421 (motivo A) en la posición en la que cabría esperar que se encontrasen los iones metálicos implicados en la catálisis (Steitz 1998) y el tercero a una distancia de 6 Å de las posiciones catalíticas, mostrando una coordinación octaédrica perfecta que podemos ver con más detalle en la Figura 17.



**Figura 17. Mapa de densidad electrónica alrededor del sitio activo de VP1 en la estructura del complejo VP1-Mg<sup>2+</sup>.** (A) Detalle del centro activo de VP1. (B) Visión estereoscópica del mapa de densidad electrónica del centro activo del complejo VP1-Mg<sup>2+</sup>. Se encuentran tres iones de Mg<sup>2+</sup> en la estructura, dos de ellos en el sitio activo de la polimerasa, unidos a los residuos D402 (motivo C) y D416 y E421 (motivo A) en la posición esperada para los metales catalíticos. El tercer ión metálico se encuentra a 6Å de distancia de la posición catalítica esperada. Los iones Mg<sup>2+</sup> se muestran como bolas naranjas.

El elemento fundamental que destaca en la estructura atómica resuelta de la proteína VP1 es que el dominio *palma* presenta una permutación poco usual (*palm permuted domain*) de los motivos de secuencia N-terminal-A-B-C-C-terminal, tradicional en las RpRd, éste se encuentra reordenado en la forma N-terminal-C-A-B-C-terminal. Este reordenamiento fue predicho por

análisis computacionales (Gorbalenya y col. 2002). Como podemos ver en la Figura 18, la permutación de la *palma* de la proteína VP1 transforma el ordenamiento canónico  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  en un nuevo ordenamiento,  $\beta\beta\beta\alpha\alpha\beta$ .



**Figura 18. Esquema del plegamiento del dominio *palma*.** Comparación del plegamiento del dominio *palma* de la RpRd canónica del virus FMDV-3D con el plegamiento no canónico del dominio *palma* de la RpRd VP1 del virus IBDV.

En la Figura 18 se muestra claramente la permutación del dominio *palma* de la RpRd de IBDV con respecto a dicho dominio en las polimerasas canónicas, en estas últimas y concretamente en la de FMDV-3D vemos claramente que la palma sigue exactamente la relación N-terminal-**A**(rojo)-**B**(verde)-**C**(amarillo)-C-terminal, sin embargo en el caso de la palma de la RpRd de IBDV, el ordenamiento es claramente N-terminal-**C**(amarillo)-**A**(rojo)-**B**(verde)-C-terminal. En esta estructura, la horquilla central  $\beta_{10}$ – $\beta_{11}$ , que contiene el motivo C (amarillo) y la hebra  $\beta_{12}$  que contiene el motivo A (rojo), están unidas directamente y desconectadas de la hélice  $\alpha_{13}$  que contiene el motivo B (verde). Esto genera cambios en la región inmediatamente anterior a la hélice  $\alpha_{13}$ , región a la que llamaremos lazo B a partir de ahora, que ahora se acerca a la hélice  $\eta_8$  y la horquilla  $\beta_{11}$ – $\beta_{12}$  y de esta manera se introduce en la región del sitio activo. Esto produciría un bloqueo parcial del sitio activo.

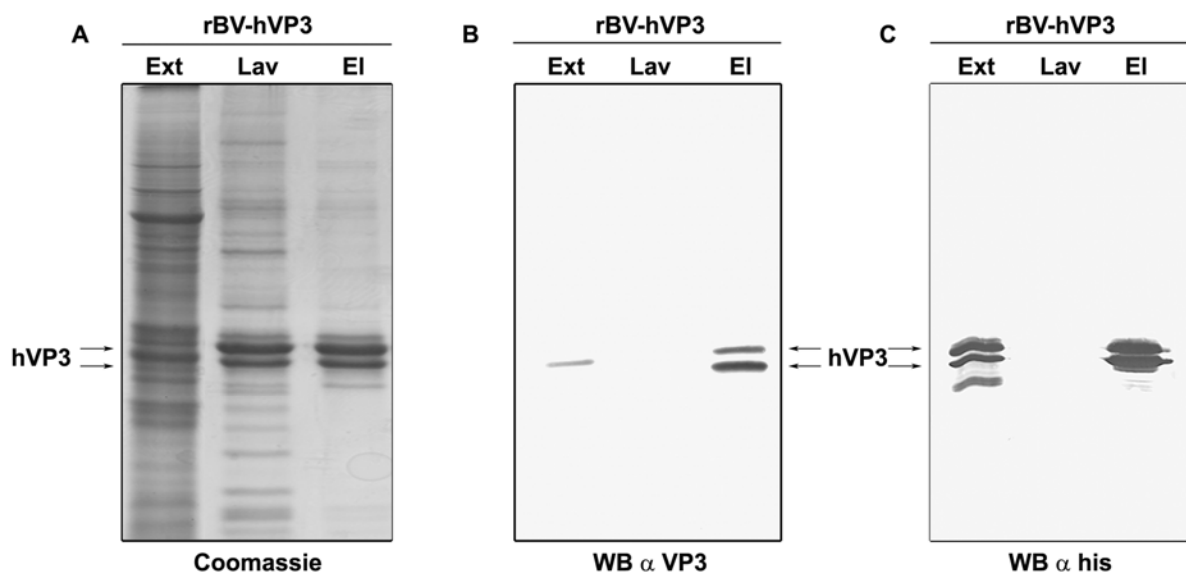


## 4.2 Proteína VP3 del virus IBDV

### 4.2.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante his-VP3

Al igual que en el caso de la proteína VP1 (apartado 4.1), nos propusimos expresar y purificar la proteína his-VP3. Con éste objetivo, partimos del recombinante rBV-his-VP3 que expresaba la proteína VP3 con una cola de histidinas fusionada en su extremo N-terminal generado previamente en el laboratorio (Kochan y col. 2003).

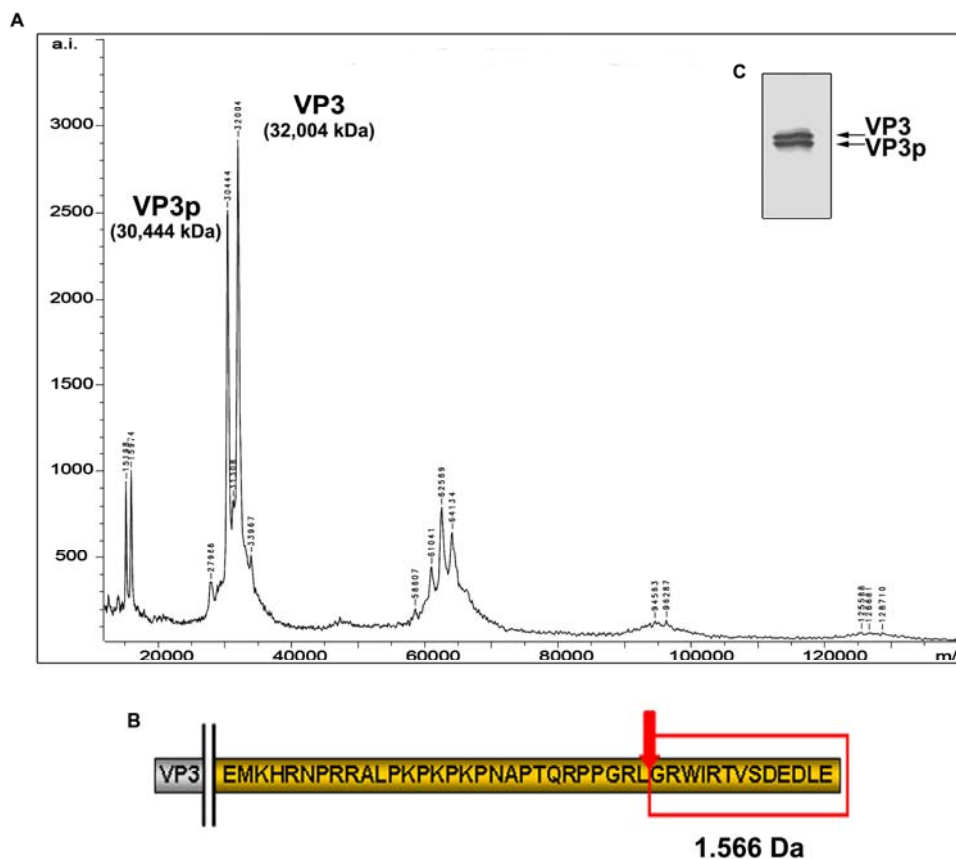
El primer paso de la purificación consistió en la producción de extractos celulares enriquecidos en la proteína his-VP3 mediante infección de células *HighFive*<sup>TM</sup> con el rBV-his-VP3. Las infecciones fueron realizadas empleando una MOI de 5 ufp/cel. Los cultivos fueron recogidos a las 72 hp.i. Tras dos lavados en PBS, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis y procesadas según se describe en el apartado de Materiales y Métodos (3.4.1). Los extractos resultantes fueron empleados para la purificación de la proteína his-VP3 mediante IMAC en columnas de agarosa-níquel. Tras el proceso de purificación, las muestras recogidas fueron sometidas a SDS-PAGE. Los gels fueron analizados mediante tinción azul de Coomassie y *Western Blot* empleando anticuerpos específicos frente a la proteína VP3 (nº 332, *M.M.* 3.1.5) y frente a la cola de histidinas (Figura 19).



**Figura 19. Purificación de la proteína recombinante his-VP3.** Gel SDS-PAGE 12% donde se muestra la purificación, por columna de afinidad, de la proteína his-VP3 expresada por el rBV-his-VP3. Ext: extracto total pre-cromatografía; Lav: lavado de la columna; El: eluido final. (A) Tinción con azul de Coomassie. (B) *Western Blot* frente a la proteína VP3. (C) *Western Blot* frente a la cola de histidinas. Las flechas marcan la posición correspondiente a la proteína his-VP3.

En la purificación se obtienen rendimientos de proteína de aproximadamente  $0,0135 \text{ mg}/10^6$  células. Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos muestra la presencia de dos bandas proteicas de aproximadamente 32 y 30 kDa, respectivamente (Figura 19A). El análisis mediante *Western Blot* permite comprobar que ambas bandas corresponden a dos especies moleculares de la proteína recombinante his-VP3 (Figuras 19B y 19C).

Para determinar el origen de las dos especies moleculares, la muestra fue analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados de este análisis permiten determinar la presencia de dos proteínas con masas moleculares de 30.444 Da y 32.004 Da, respectivamente (Figura 20). La masa molecular de la proteína de menor movilidad electroforética corresponde de forma precisa al esperado para la proteína his-VP3 (32,110 kDa). Por otra parte, la masa de la segunda proteína corresponde exactamente a una forma truncada de la proteína his-VP3 carente de los 13 aminoácidos C-terminales. Este péptido C-terminal tiene una masa molecular estimada de 1,566 kDa. Estos resultados indican que la proteína his-VP3 sufre un procesamiento proteolítico que elimina los últimos 13 aminoácidos de su extremo C-terminal.



**Figura 20. Análisis por espectrometría de masas de la proteína his-VP3.** (A) Gráfica de análisis por espectrometría de masas de la proteína VP3 purificada (B) Esquema de la diferencia de masa entre las dos especies, VP3 y VP3p (procesada). La flecha roja indica el lugar de procesamiento. (C) *Western Blot* frente a la proteína VP3.

La segunda banda (30,444 kDa) puede generarse como consecuencia de un procesamiento en la región C-terminal de la proteína VP3.

Esta degradación puede ser debida a que es una región con un alto grado de flexibilidad estructural y fuertemente cargada, dos características frecuentemente asociadas con una elevada susceptibilidad a la proteólisis (Realini et al, 1994; Reichsteiner y Rogers, 1996).

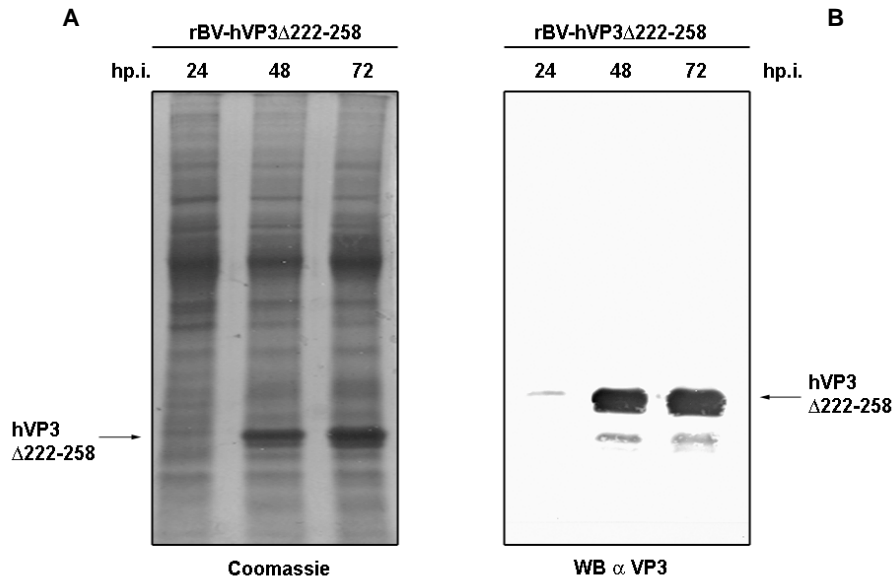
Este resultado confirma la hipótesis de la presencia de dos especies moleculares de la proteína, lo cual nos impide realizar los ensayos de cristalización y por lo tanto, la posterior resolución de la estructura atómica de la proteína.

#### 4.2.2 Expresión de la proteína recombinante his-VP3 $\Delta$ 222-258

Para solucionar el problema de las dos especies moleculares decidimos generar un plásmido que expresase una versión truncada de la proteína his-VP3. Esta versión consistía en la proteína recombinante his-VP3 carente de los 36 últimos aminoácidos del extremo C-terminal. Decidimos eliminar los 36 últimos aminoácidos en vez de los 13 últimos, porque según una predicción de estructura secundaria de la proteína VP3 (Maraver y col. 2003b), los 36 últimos aminoácidos del extremo C-terminal forman una zona desestructurada con grandes posibilidades de ser degradada (es además la zona descrita de oligomerización y de interacción con la proteína VP1).

Esta versión truncada, denominada his-VP3  $\Delta$ 222-258, fue generada a partir del plásmido pVOTE/Poly (Fernández Arias y col. 1998). Para ello, se generó mediante PCR un fragmento de DNA, que contenía la delección requerida así como un triplete de terminación falso (*M.M.* 3.2.4). El plásmido resultante, pFBHtb-VP3  $\Delta$ 222-258, se utilizó para generar un rBV denominado rBV-his-VP3  $\Delta$ 222-258.

Una vez obtenido el rBV-his-VP3  $\Delta$ 222-258, comprobamos la correcta expresión de la proteína recombinante his-VP3  $\Delta$ 222-258 mediante el análisis de la cinética de acumulación de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 en células *HighFive*<sup>TM</sup>. Para ello, las células se infectaron a MOI 5 ufp/cel y las infecciones se recogieron a las 24, 48 y 72 hp.i. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y analizadas mediante tinción azul de Coomassie y *Western Blot* empleando un anticuerpo específico frente a la proteína VP3 (Figura 21).

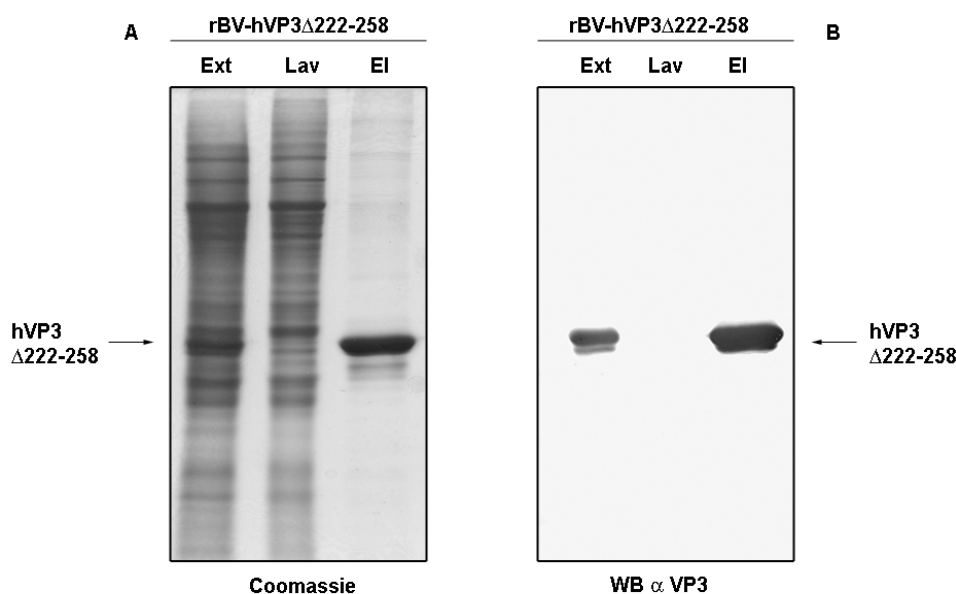


**Figura 21. Expresión de la proteína recombinante his-VP3  $\Delta$ 222-258.** Gel SDS-PAGE 12% donde se muestra la expresión de la proteína recombinante his-VP3  $\Delta$ 222-258 durante la cinética de infección en células *HighFive*<sup>TM</sup>. Los puntos se recogen 24, 48 y 72 hp.i. **(A)** Tinción con azul de Coomassie. **(B)** *Western Blot* frente a la proteína VP3. Las flechas marcan la posición correspondiente a la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258.

En la Figura 21 se puede observar la presencia de una banda reconocida por el anticuerpo frente a VP3 cuya máximo nivel de acumulación se produce a las 72 hp.i. A partir de 48 hp.i. se observa degradación proteica.

#### 4.2.3 Purificación de la proteína recombinante his-VP3 $\Delta$ 222-258

El primer paso de la purificación consistió en la producción de extractos celulares enriquecidos en la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 mediante infección de células *HighFive*<sup>TM</sup> con el rBV-his-VP3  $\Delta$ 222-258. Las infecciones fueron realizadas empleando una MOI de 5 ufp/cel. Los cultivos fueron recogidos a las 72 hp.i. Tras dos lavados en PBS, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis y procesadas según se describe en el apartado de Materiales y Métodos (3.4.1). Los extractos resultantes fueron empleados para la purificación de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 mediante IMAC en columnas de agarosa-níquel. Tras el proceso de purificación, las muestras recogidas fueron sometidas a SDS-PAGE. Los geles fueron analizados mediante tinción azul de Coomassie y *Western Blot* empleando un anticuerpo específico frente a la proteína VP3 (Figura 22).



**Figura 22. Purificación de la proteína recombinante his-VP3  $\Delta$ 222-258.** Gel SDS-PAGE 12% donde se muestra la purificación, por columna de afinidad, de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 expresada por el rBV-his-VP3  $\Delta$ 222-258. Ext: extracto total pre-cromatografía; Lav: lavado de la columna; El: eluido final. **(A)** Tinción con azul de Coomassie. **(B)** *Western Blot* frente a la proteína VP3. Las flechas marcan la posición correspondiente a la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258.

En la purificación se obtienen rendimientos de proteína de aproximadamente  $0,0135 \text{ mg}/10^6$  células. El análisis de los resultados obtenidos muestra la presencia de una única banda proteica de aproximadamente 28 kDa (Figura 22A). El análisis mediante *Western Blot* permite comprobar que esta banda corresponde a la proteína recombinante his-VP3  $\Delta$ 222-258 (Figura 22B). Este resultado nos permite proceder con los ensayos de cristalización y posterior resolución de la estructura atómica de la proteína de la proteína.

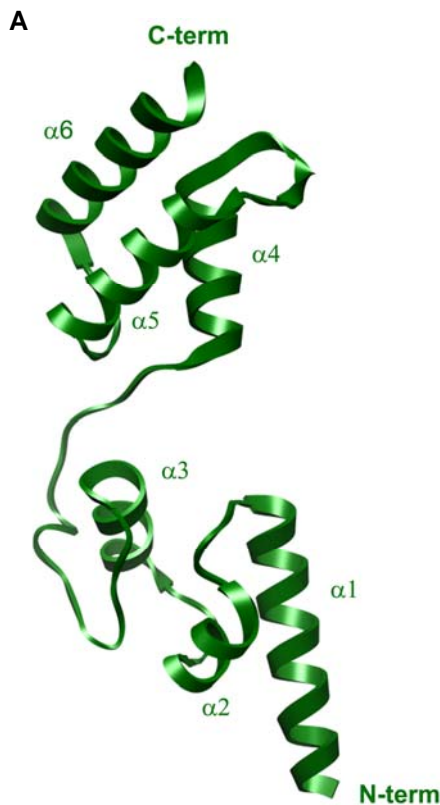
#### 4.2.4 Determinación de la estructura atómica de la proteína VP3

Una vez purificada la proteína recombinante his-VP3  $\Delta$ 222-258, las muestras fueron tratadas con la proteasa recombinante rTEV (M.M) para eliminar la cola de histidinas. Se dializaron frente a un tampón 50 mM Tris-HCl pH8 y 300 mM NaCl, y se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna de agarosa-níquel para aislar la fracción de la muestra que no quedaba retenida en la columna, es decir, aquella que carece de cola de histidinas. Se concentró la muestra hasta una concentración final de 3 mg/ml usando los filtros Centricon YM-10 (*Millipore*).

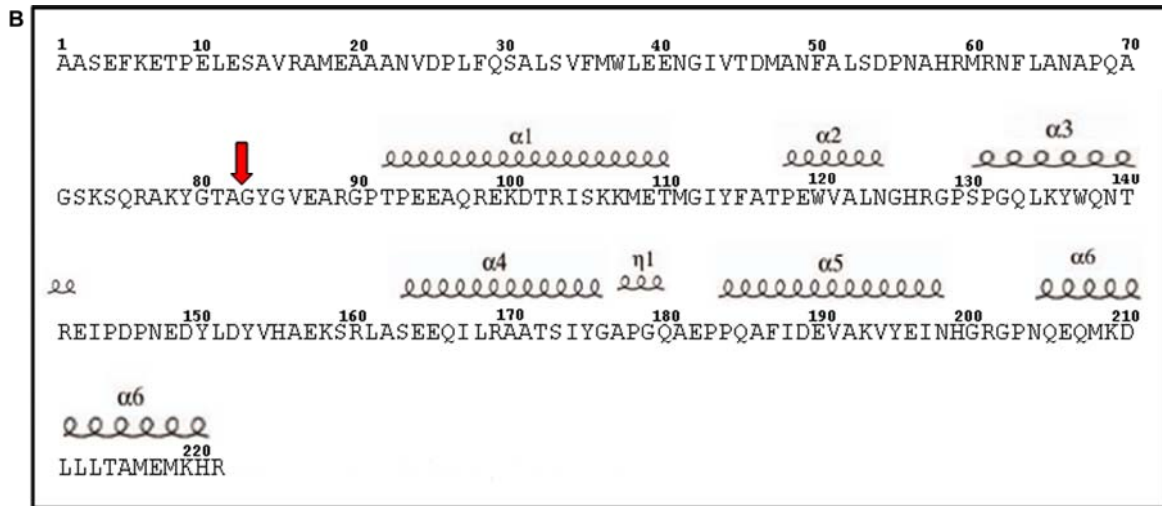
Al igual que con la proteína VP1, los cristales de la proteína recombinante VP3  $\Delta$ 222-258 se obtuvieron mediante el método de difusión de vapor en gotas, mezclando volúmenes iguales de la proteína VP3  $\Delta$ 222-258 y de un tampón de cristalización que contenía 2.6 M NaCl y 0.1 M acetato sódico (pH 5) y suplementado con glicerol al 20% (v/v). (M.M. 3.6.1)

La estructura de la versión recombinante de la proteína VP3 de IBDV se obtuvo mediante el método de Dispersión Anómala Múltiple (MAD) aplicado a un único cristal de un derivado de oro a una resolución de 2.4 Å. Los datos nativos se utilizaron para refinar la estructura hasta una resolución de 2.3 Å (Figura 23A).

La estructura resuelta nos permitió determinar exactamente el mapa de los residuos T92 a A220, los 91 aminoácidos precedentes (del N-terminal) (sin contabilizar la cola de histidinas que son 25 aa) se perdieron en el proceso de cristalización. Análisis SDS-PAGE de cristales de VP3 muestra una banda de 15 kDa. Adicionalmente las muestras fueron analizadas mediante espectrometría de masas, obteniendo una masa de 15.770 Da. Estos datos se corresponden con la masa de la proteína purificada his-VP3  $\Delta$ 222-258 (27.983 Da), menos los 107 aminoácidos del N-terminal (82 aa de la VP3 y 25 aa del tag de histidinas, 11.987 Da). Por lo tanto, los 10 aa restantes hasta el T92, deben estar presentes en el péptido, aunque no se resuelven en la estructura



**Figura 23A. Estructura de la proteína VP3 de IBDV.** Diagrama de cintas de la estructura atómica de la proteína VP3. Se indican los elementos de estructura secundaria así como los extremos amino y carboxilo de la cadena polipeptídica



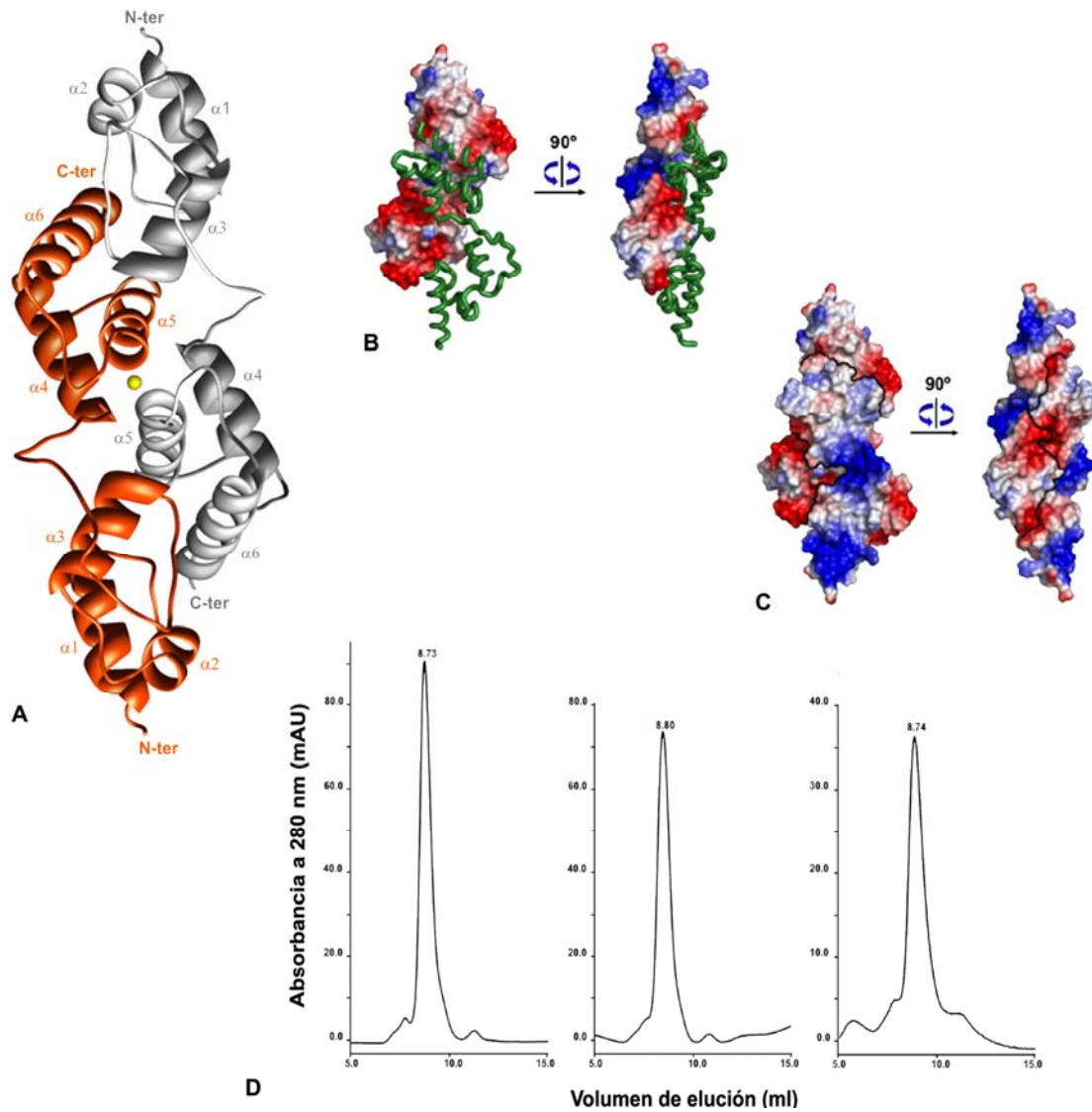
**Figura 23B. Secuencia del polipéptido VP3 Δ222-258.** Se muestra la secuencia de la proteína resuelta. Encima de la secuencia aminoacídica se indican los elementos de estructura secundaria mostrados en la Figura 23A. La flecha roja marca el inicio de la región cristalizada.

Como se puede ver en las Figuras 23A y 23B la estructura de la región resuelta de la proteína VP3 consiste enteramente en  $\alpha$ -hélices conectadas por lazos de distintos tamaños.

Esta estructura puede subdividirse en dos dominios unidos por una bisagra flexible. El primer dominio está formado por tres  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), la primera de las cuales,  $\alpha 1$ , consta de los residuos T92-T110, seguida de un lazo (M111-T117) que conecta a la hélice  $\alpha 1$  con la hélice  $\alpha 2$ , formada esta última por los residuos P118-N124 y rotada  $37^\circ$  en el sentido de las agujas del reloj con respecto a la hélice  $\alpha 1$ . La hélice  $\alpha 3$  empieza en el residuo S130 y se extiende hasta el residuo R141, estando rotada a su vez  $38^\circ$  en sentido contrario a las agujas del reloj respecto a la hélice  $\alpha 2$ . La estructura de este primer dominio se encuentra estabilizada a través de una serie de interacciones hidrofóbicas entre distintos residuos de las tres  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ). Estos residuos se encuentran conservados en todos los birnavirus.

Una región larga y flexible (residuos N147-S159) con estructura secundaria débil, forma la bisagra entre los dos dominios de la proteína VP3.

La estructura del segundo dominio se organiza en tres  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ ), la primera de las cuales,  $\alpha 4$ , está formada por los residuos S163-G176, seguida de una pequeña hélice  $3_{10}$  (A177-Q180) que une la hélice  $\alpha 4$  con la hélice  $\alpha 5$  (Q185-N198). Finalmente la hélice  $\alpha 6$  va del residuo Q205 hasta el H220 (C-terminal). Al igual que ocurre en el primer dominio, en este segundo dominio se dan una serie de interacciones hidrofóbicas entre distintos residuos que estabilizan la estructura secundaria del mismo. Estos residuos también están conservados en los distintos birnavirus.



**Figura 24. Estructura del dímero de VP3.** (A) Diagrama de cintas del dímero de la proteína VP3, un protómero se muestra en color naranja y el otro en color gris. Se indican los elementos de estructura secundaria y los terminales amino y carboxi están marcados. Centro de la figura: molécula de oro unida a la estructura ocupando el de simetría de orden 2. (B) Estructura de la proteína VP3; se muestra un protómero en superficie de Connolly según su potencial electrostático y el segundo protómero como esqueleto en verde. En dos vistas diferentes. (C) lo mismo que en (B) pero mostrando todo el dímero. (D) Ensayo de filtración en gel, las tres gráficas corresponden a tres concentraciones diferentes de muestra cargada (izda: 0.5 mg/ml; centro: 0.25 mg/ml; dcha: 0.125 mg/ml)

En la estructura expuesta en la Figura 24 podemos ver como dos subunidades de VP3 se asocian de forma simétrica y antiparalela siguiendo el eje de simetría dos, cada una de las subunidades contribuye con el 30% de su superficie en los contactos interdiméricos.

Se observan 81 contactos interprotoméricos, incluyendo enlaces polares y contactos de van der Waals, la interacción se produce sobre todo entre los segundos dominios, en los cuales están



envueltos los siguientes aminoácidos de las tres hélices ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ ):  $\alpha 4$  (E164, E165),  $\alpha 5$  (Q185, D189, E190, E196, I197 y H199) y  $\alpha 6$  (E206, Q207, D210, L213, T214, E217 y M218). Los residuos T140, R141, E142, A162 y S163 en la unión interdominios (bisagra) y en el lazo  $\alpha 1 - \alpha 2$  del primer dominio, los residuos E109 e Y114, también están envueltos en dichos contactos. Todos los residuos implicados en las interacciones están conservados entre los distintos birnavirus. La colocación de ambos protómeros, así como el ordenamiento que dejan los extremos N y C terminales es compatible con la presencia de las regiones no resueltas.

La resolución de la estructura de ésta región de la proteína VP3 determinó que esta proteína forma un dímero (Figura 24A-C).

Estudios bioinformáticos realizados con el programa NOXclass (Zhu y col. 2006) predijeron que se trataba de un dímero biológico (no debido al empaquetamiento cristalino) con una confianza del 99.86%. Se había descrito anteriormente que la proteína VP3 forma oligómeros, lo cual es un paso fundamental para el ensamblaje de la cápsida de IBDV (Maraver y col 2003a). Para confirmar este resultado, realizamos una serie de experimentos de cromatografía de exclusión (Figura 24D) con las formas de la proteína VP3 (1-220) y VP3 (82-220) y aún habiendo eliminado el dominio de oligomerización anteriormente descrito (los últimos 24 aa del extremo C-terminal de la proteína VP3, [Maraver y col. 2003b] incluidos en los 36 aa eliminados en la construcción), la VP3 forma dímeros en solución bajo las condiciones experimentales utilizadas (*M.M.* 3.5.5).

Este resultado confirma que la proteína VP3 posee un dominio de dimerización diferente al dominio de oligomerización. En la Figura 24 (A y B) se muestra el dímero de VP3

#### **4.2.5 Expresión mediante el virus rVV VT7/LacOI de la proteína recombinante his-VP3 (rVV VT7/his-VP3)**

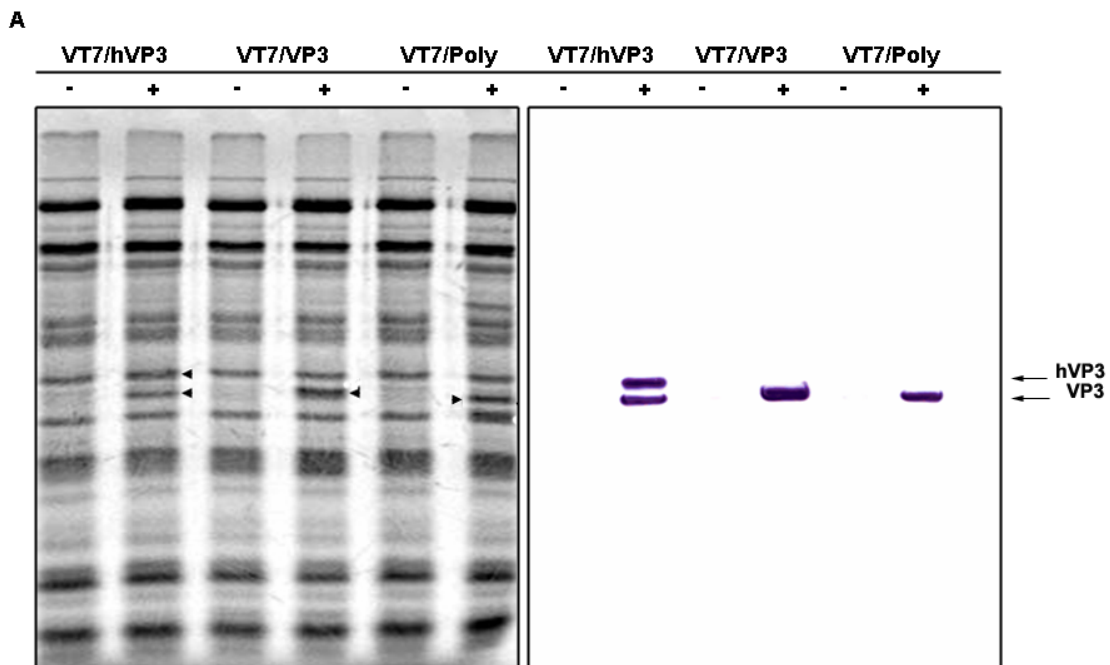
Tras resolver la estructura atómica de las proteínas VP1  $\Delta 846-879$  y VP3  $\Delta 222-258$ , queríamos comprobar la actividad replicativa y/o transcripcional de la proteína his-VP1  $\Delta 846-879$  tanto de forma individual como formando parte del complejo VP1-VP3, para esto último necesitábamos la proteína VP3 completa, no la forma truncada his-VP3  $\Delta 222-258$  debido a que la región de interacción con la proteína VP1 se encuentra en los 16 últimos aminoácidos del extremo C-terminal (Maraver y col. 2003a) y tampoco podíamos utilizar la proteína his-VP3 purificada en células de insecto (*HighFive<sup>TM</sup>*) porque una parte importante de la proteína purificada está degradada (Figura 12) y pierde la zona de interacción con la proteína VP1.

Para abordar esta cuestión, se generó el virus rVV VT7/his-VP3 que contiene la región codificante del gen de la proteína his-VP3 bajo el control transcripcional de un promotor

inducible por IPTG (M.M. 3.2.5). Nos decantamos por este sistema porque experimentos anteriores del grupo habían demostrado que no se producía degradación en el extremo C-terminal de la proteína (Fernández-Arias y col. 1998).

Para obtener el rVV VT7/his-VP3, en primer lugar se generó el plásmido pVOTE/his-VP3 de la siguiente manera, se extrajo mediante PCR la región codificante de la his-VP3, utilizando como molde el plásmido pFastBacHTc-VP3 generado anteriormente en el laboratorio (Kochan y col. 2003) y este fragmento se introdujo en el plásmido pVOTE2 descrito anteriormente (Ward y col. 1995) dando lugar al plásmido pVOTE2/his-VP3 (M.M. 3.2.4). Este plásmido a su vez se utilizó para generar un virus vaccinia recombinante, denominado rVV VT7/his-VP3 tal y como se describe en la referencia Earl y col. 2001.

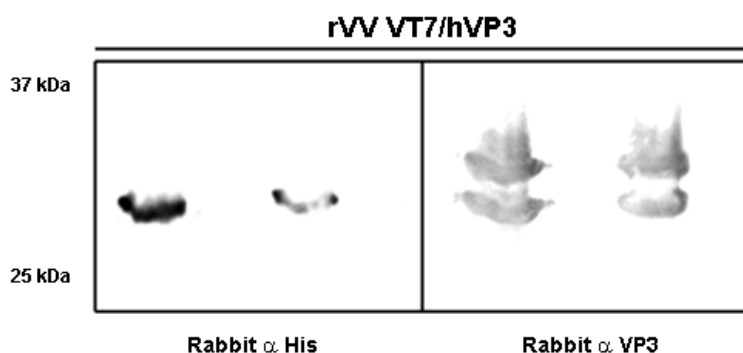
Una vez generado el virus recombinante, se procedió a analizar su expresión en células infectadas. Para ello, cultivos de células BSC-40 fueron infectados con una MOI de 5 ufp/cel con el rVV VT7/his-VP3 en presencia y ausencia del inductor IPTG. A modo de controles positivos se infectaron cultivos de BSC-40 con los virus rVV VT7/VP3 (Fernández-Arias y col. 1997) y rVV VT7/Poly (Fernández-Arias y col. 1998). Transcurrida una hora de infección, las células fueron marcadas metabólicamente con 100  $\mu$ Ci/ml de [ $^{35}$ S]-metionina durante una hora y 16 hp.marcaje se recogieron en tampón de Laemmli. Las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE, analizándose mediante autorradiografía y *Western blot* empleando un anticuerpo específico frente a la proteína VP3 (Figura 25A).



**Figura 25A. Caracterización de la expresión de rVV VT7/his-VP3.** Cultivos de células BSC-40 infectadas con los virus rVV VT7/his-VP3, rVV VT7/VP3 y rVV VT7/Poly que fueron marcados metabólicamente y recogidos a las 18 hp.i. Los extractos proteicos correspondientes se analizaron por SDS-PAGE, autorradiografía y *Western blot*. Se muestra el patrón electroforético de proteínas

procedentes de extractos de células infectadas con los virus indicados en la parte superior de la figura y suplementadas (+) o no (-) con el inductor IPTG. Las flechas marcan la presencia de las distintas especies moleculares de VP3

En la Figura 25A se observa como el virus rVV VT7/his-VP3 en presencia de IPTG expresa dos nuevas proteínas. Una de unos 32 kDa, tamaño que coincide con el esperado para la proteína his-VP3 y otra de un tamaño aproximado de 28 kDa que, viendo el tamaño de la proteína expresada tanto por el rVV VT7/VP3 como por el rVV VT7/Poly (28 kDa), podemos inferir que también es VP3, lo que teníamos que comprobar ahora era si esta segunda banda era debida a degradación de la proteína (como en los casos anteriores) o si esto ocurría por otro motivo. Para ello, la muestra del experimento de la Figura 25A perteneciente a la infección con el rVV VT7/his-VP3 se resolvió en otro gel de poliacrilamida del 12% y se analizó mediante *Western blot* empleando los anticuerpos específicos frente a la cola de histidinas (*Invitrogen*) y frente a la proteína VP3 y el resultado lo podemos ver en la Figura 25B.



**Figura 25B. Caracterización de la expresión de VT7/his-VP3.** Cultivos de células BSC-40 infectados con el virus rVV VT7/his-VP3 recogidos a las 18 hp.i. Los extractos proteicos correspondientes se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot* frente a la proteína VP3 y la cola de histidinas.

En la Figura 25B podemos ver claramente que cuando revelamos el gel con el anticuerpo frente a la cola de histidinas, únicamente se detecta la banda superior, de unos 32 kDa, tamaño de la proteína his-VP3 y cuando lo revelamos con el anticuerpo frente a la proteína VP3, detectamos ambas bandas, la de 32 kDa y una de 28 kDa, que es el tamaño de la proteína VP3.

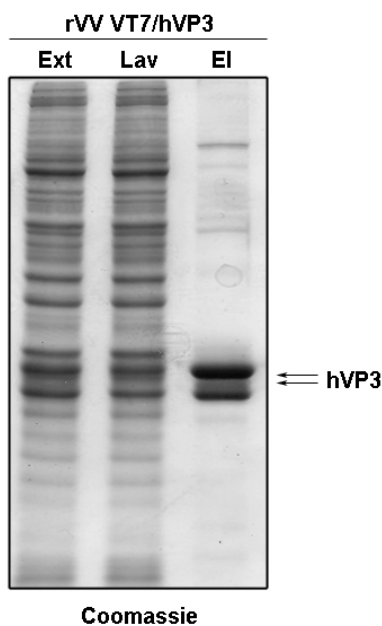
Hemos demostrado que las dos especies de la proteína que se ven son la proteína VP3. La especie que tiene un tamaño aproximado de 32 kDa sería la proteína his-VP3 entera y la que tiene un tamaño aproximado de 28 kDa sería la proteína VP3 sin cola de histidinas. Este hecho puede ser debido a que la estrategia de clonaje de la proteína VP3 en el plásmido con cola de histidinas pFBHTc-VP3 (Kochan y col. 2003), inserta una metionina falsa además de la metionina inicial de la cola de histidinas. Es decir, que haya iniciación tanto en la metionina que

precede a la cola de histidinas, lo cual dará como resultado la proteína de 32 kDa y también hay iniciación en la metionina “*downstream*” la cola de histidinas, que dará lugar a la proteína de 28 kDa.

Lo importante para nosotros es que el extremo C-terminal parece estar completo y esto nos permite utilizar esta proteína purificada procedente de infecciones de células BSC-40 con el virus rVV VT7/his-VP3 para los ensayos de actividad puesto que sabemos que en la región C-terminal de la proteína VP3 se encuentra, entre otras regiones, la región de interacción con la proteína VP1.

#### 4.2.6 Purificación de la proteína recombinante his-VP3 procedente de células de mamífero

El primer paso de la purificación consistió en la producción de extractos celulares enriquecidos en la proteína his-VP3 mediante infección de células BSC-40 con el rVV VT7/his-VP3. Las infecciones fueron realizadas empleando una MOI de 1 ufp/cel. Los cultivos fueron recogidos a las 48 hp.i. Tras dos lavados en PBS, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis y procesadas según se describe en el apartado de Materiales y Métodos (3.4.1). Los extractos resultantes fueron empleados para la purificación de la proteína his-VP3 mediante IMAC en columnas de agarosa-níquel. Tras el proceso de purificación, las muestras recogidas fueron sometidas a análisis mediante SDS-PAGE. Los geles fueron analizados mediante tinción azul de Coomassie (Figura 26).



**Figura 26. Purificación de la proteína recombinante his-VP3 de origen rVV VT7/his-VP3.** Gel SDS-PAGE 12% donde se muestra la purificación por columna de afinidad, de la proteína his-VP3 expresada por el rVV VT7/his-VP3.

Ext: extracto total pre cromatografía; Lav: lavado de la columna; El: eluido final. Tinción con azul de Coomassie. Las flechas marcan la aparición de dos especies moleculares de la proteína his-VP3.

En la purificación se obtiene rendimientos de proteína de aproximadamente 0,0135 mg/10<sup>6</sup> células. El análisis de los resultados obtenidos demuestra la presencia de dos especies moleculares, con tamaños de 32 y 28 kDa respectivamente (Figura 26). El análisis mediante *Western Blot* permite comprobar que ambas bandas corresponden a la proteína VP3 con y sin cola de histidinas. (Figura 25B). Este resultado nos permite utilizar esta proteína purificada para los ensayos de actividad del complejo VP1-VP3.

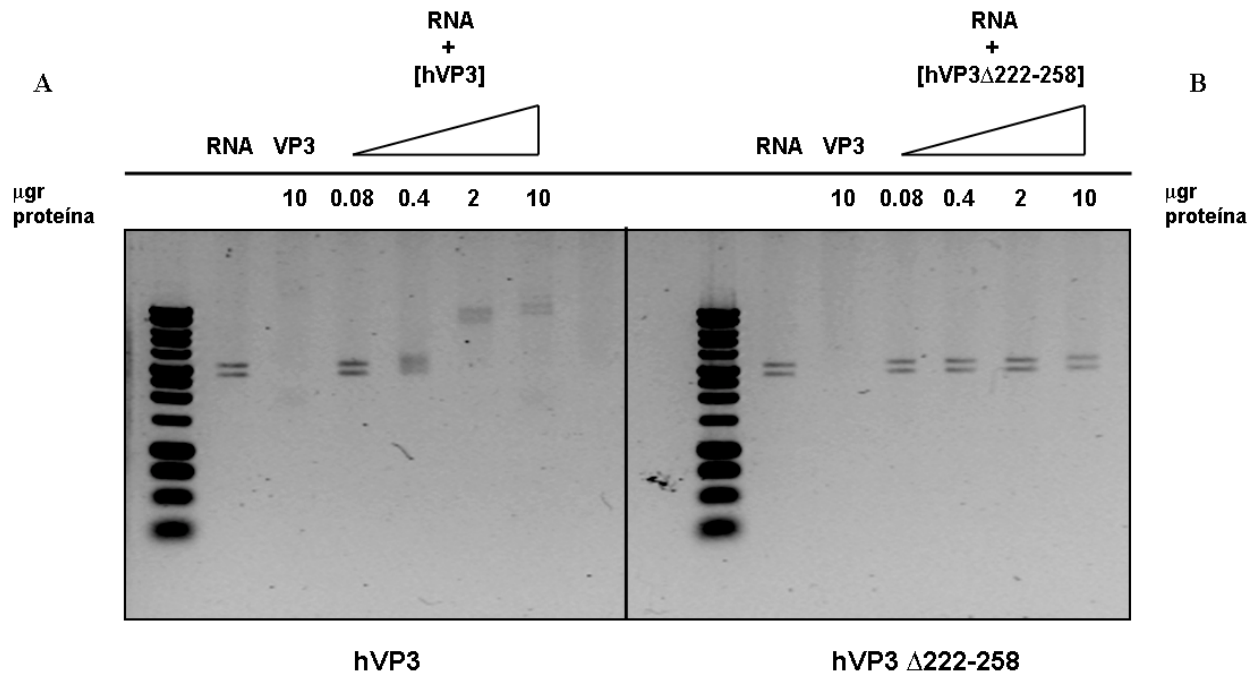
Una vez obtenidas las proteínas his-VP1, his-VP1  $\Delta$ 846-879, his-VP3, his-VP3  $\Delta$ 222-258 e his-VP3 (origen vaccinia), decidimos comprobar la interacción de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 con el RNA viral (tanto ssRNA como dsRNA) puesto que existían antecedentes en el laboratorio (Kochan y col. 2003) que demuestran que la proteína VP3 interacciona con ssRNA de origen viral en la región S53-G124.

### **4.3 Ensayos de interacción de las proteínas VP3 y VP1 con dsRNA y ssRNA viral**

Para la realización de los ensayos de interacción, obtuvimos las proteínas his-VP3, his-VP3  $\Delta$ 222-258, his-VP1 e his-VP1  $\Delta$ 846-879 de la forma descrita anteriormente en esta memoria. Obtuvimos también dsRNA de origen viral (de origen IBDV) cuya fuente fue IBDV purificado (*M.M.* 3.4.3), y ssRNA viral, procedente de la transcripción *in vitro* de los plásmidos pT7-SA-Rz y pT7-SB-Rz, que contienen el cDNA del Segmento A o del Segmento B del virus (transcripción realizada con T7 RNA polimerasa) (*M.M.* 3.2.7).

#### **4.3.1 Interacción de las proteínas his-VP3 e his-VP3 $\Delta$ 222-258 con dsRNA viral**

Realizamos un ensayo de interacción de las proteínas recombinantes his-VP3 e his-VP3  $\Delta$ 222-258 con dsRNA de origen viral (IBDV), utilizando concentraciones crecientes de las proteínas (desde 80 ng hasta 10  $\mu$ gr) mientras se mantenía constante la cantidad de dsRNA (añadimos una cantidad constante de BSA a la reacción para eliminar interacciones inespecíficas). La interacción se llevó a cabo durante 1 h a RT en el tampón de interacción (*M.M.* 3.7.1) y tras ese tiempo las muestras se analizaron en geles de agarosa del 0,7% (Figura 27)



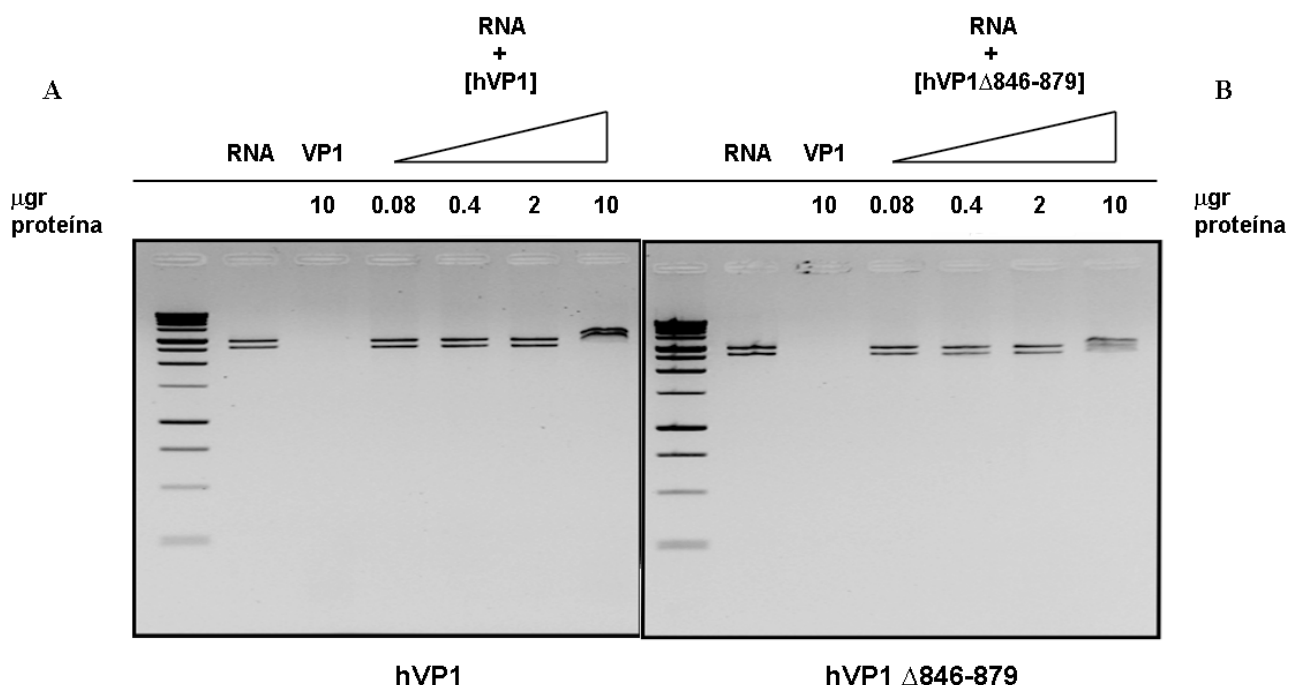
**Figura 27. Interacción de las proteínas recombinantes his-VP3 e his-VP3  $\Delta$ 222-258 con dsRNA viral.** (A) Gel de agarosa del 0,7% en el que se muestra la interacción entre concentraciones crecientes de la proteína his-VP3 con una concentración constante de dsRNA. Como controles se utilizaron tanto el dsRNA como la proteína his-VP3 de forma individual (B) Gel de agarosa del 0,7% en el que se muestra la interacción entre concentraciones crecientes de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 con una concentración constante de dsRNA. Como controles se utilizaron tanto el dsRNA como la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 de forma individual.

En la Figura 27 se observa lo siguiente: En el ensayo de interacción (A), al aumentar la concentración de la proteína his-VP3 manteniendo constante la concentración de dsRNA (10  $\mu\text{l}$  a 50 ng/ $\mu\text{l}$ ), se produce un retardo en la movilidad del dsRNA que va aumentando según aumenta la concentración de proteína his-VP3. Comprobamos que en ausencia de la proteína his-VP3 (en todos los casos añadíamos una concentración constante de la proteína BSA [concretamente 10  $\mu\text{gr}$ ] para descartar interacciones inespecíficas) el dsRNA se desplaza a un tamaño determinado, alrededor de las 3 kilobases y cuando comenzamos a añadir concentraciones crecientes de la proteína his-VP3, desde 0,08  $\mu\text{gr}$  (aumentando la concentración 5 veces) hasta 10  $\mu\text{gr}$  vemos que se produce un retardo en la movilidad del dsRNA debido a su interacción con la proteína his-VP3. Sin embargo, en el caso de la proteína his-VP3 $\Delta$ 222-258 (B), con las mismas concentraciones de los diversos elementos, comprobamos que el dsRNA viral no sufre ningún retardo, con lo cual podemos concluir que no se produce interacción entre el dsRNA viral y la proteína his-VP3 $\Delta$ 222-258 por lo tanto podemos inferir, primero, que la proteína his-VP3 completa, interacciona con el dsRNA viral y segundo, que la región necesaria para que se lleve a cabo esta interacción se encuentra en la región que en la proteína his-

VP3 $\Delta$ 222-258 se encuentra deletada, es decir, los 36 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína VP3.

#### 4.3.2 Interacción de las proteínas his-VP1 e his-VP1 $\Delta$ 846-879 con dsRNA viral

Realizamos un ensayo de interacción de las proteínas recombinantes his-VP1 e his-VP1  $\Delta$ 846-879 con dsRNA de origen viral (IBDV), utilizando concentraciones crecientes de las proteínas (desde 80 ng hasta 10  $\mu$ gr) mientras se mantenía constante la cantidad de dsRNA (añadimos una cantidad constante de BSA a la reacción para eliminar interacciones inespecíficas). La interacción se llevó a cabo durante 1 h a RT en el tampón de interacción (*M.M.3.7.1*) y tras ese tiempo las muestras se analizaron en geles de agarosa del 0,7% (Figura 28).



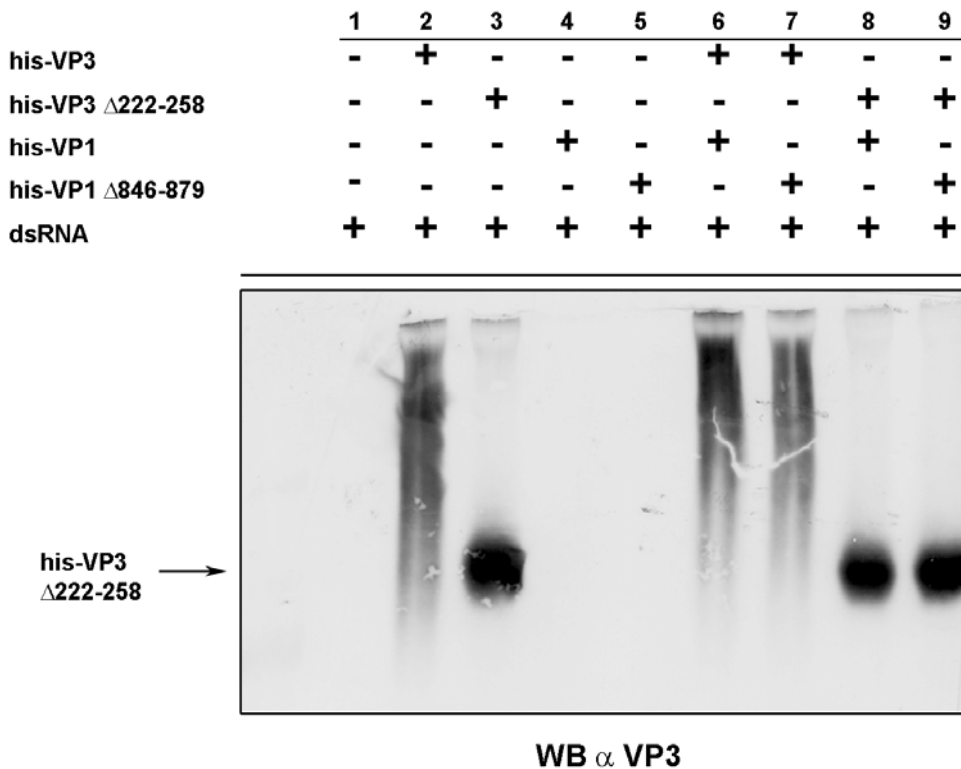
**Figura 28. Interacción de las proteínas recombinantes his-VP1 e his-VP1  $\Delta$ 846-879 con dsRNA viral.** (A) Gel de agarosa del 0,7% en el que se muestra la interacción entre concentraciones crecientes de la proteína his-VP1 con una concentración constante de dsRNA. Como controles se utilizaron tanto el dsRNA como la proteína his-VP1 de forma individual (B) Gel de agarosa del 0,7% en el que se muestra la interacción entre concentraciones crecientes de la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 con una concentración constante de dsRNA. Como controles se utilizaron tanto el dsRNA como la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 de forma individual.

En la Figura 28 se observa lo siguiente: En el ensayo de interacción (A), al aumentar la concentración de la proteína his-VP1 manteniendo constante la concentración de dsRNA (10  $\mu$ l a 50 ng/ $\mu$ l) observamos que el retardo en la movilidad del dsRNA en el gel es mínimo y

únicamente en el caso de mayor concentración de proteína (10  $\mu$ gr) podemos observar un pequeño retardo en dicha movilidad. En el caso del ensayo de interacción de la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 con el dsRNA (B) ocurre exactamente lo mismo que con la proteína his-VP1. Este resultado demuestra que tanto la proteína his-VP1 como la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 interaccionan con el dsRNA viral y por lo tanto, la región delecionada de la his-VP1  $\Delta$ 846-879 no interviene en la interacción con el dsRNA viral.

### 4.3.3 Ensayo de interacción de los complejos VP1-VP3 con dsRNA viral.

Para confirmar los datos anteriores llevamos a cabo una serie de ensayos de interacción de his-VP3, his-VP3  $\Delta$ 222-258, his-VP1, e his-VP1  $\Delta$ 846-879 y sus combinaciones, his-VP3 + his-VP1, his-VP3 + his-VP1  $\Delta$ 846-879, his-VP3  $\Delta$ 222-258 + his-VP1 e his-VP3  $\Delta$ 222-258 + his-VP1  $\Delta$ 846-879 con el dsRNA viral. El ensayo se llevó a cabo de forma similar a los anteriores, en este caso utilizamos como única concentración de proteínas, la concentración de 10  $\mu$ gr, tanto en el caso de proteínas individuales como en la interacción de los complejos y mantuvimos una concentración constante de dsRNA (10  $\mu$ l a 50 ng/ $\mu$ l). La interacción se llevó a cabo durante 1 h a RT y tras el ensayo las muestras se analizaron en un gel de acrilamida al 5% en TBE el cual transferimos y revelamos con un anticuerpo frente a la proteína VP3 (Figura 29).



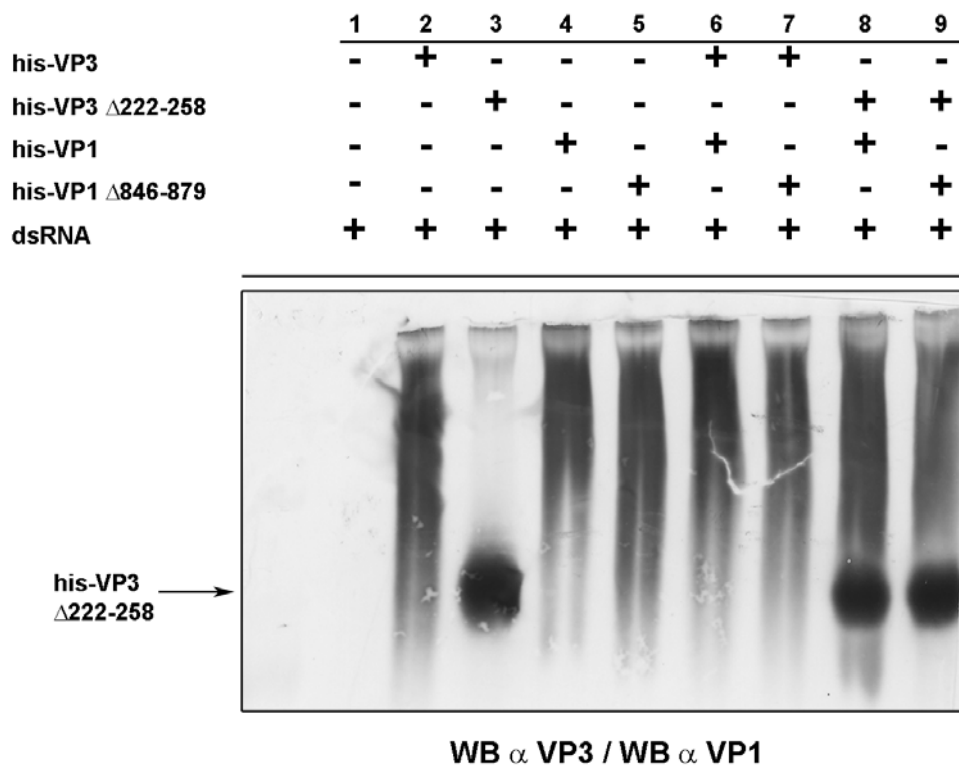
**Figura 29. Análisis de interacción del complejo VP1-VP3 (I).** Gel de acrilamida 5% en TBE y análisis por *Western Blot* revelado con un anticuerpo frente a la proteína VP3 de los ensayos de interacción entre



el dsRNA viral (1) y las siguientes combinaciones de proteínas: hVP3 (2), hVP3 $\Delta$ 222-258 (3), hVP1 (4), hVP1 $\Delta$ 846-879 (5), hVP3 + hVP1 (6), hVP3 + hVP1 $\Delta$ 846-879 (7), hVP3  $\Delta$ 222-258 + hVP1 (8), hVP3  $\Delta$ 222-258 + hVP1 $\Delta$ 846-879 (9). La flecha muestra la posición de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258.

En la Figura 29 observamos que cuando el ensayo se realiza con la proteína his-VP3 y el dsRNA viral (en presencia o ausencia de la proteína VP1) (columnas 2, 6 y 7), se produce un retardo en la movilidad electroforética de la proteína, lo cual confirma la interacción que habíamos observado en el ensayo mostrado en la Figura 27. Sin embargo, cuando utilizamos la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 y el dsRNA viral (en presencia o ausencia de la proteína VP1) podemos comprobar que no se produce dicho retardo (columnas 3, 8 y 9) confirmando a su vez que no se produce la interacción (tal y como vimos en el ensayo mostrado en la Figura 27).

Para comprobar el efecto de las proteínas his-VP1 e his-VP1  $\Delta$ 846-879 en este ensayo, revelamos el mismo gel de la Figura 29 con un anticuerpo frente a la proteína VP1 (n°806 *M.M.* 3.2.8) (Figura 30)



**Figura 30. Análisis de interacción del complejo VP1-VP3 (II).** Gel de acrilamida 5% en TBE y análisis por *Western Blot* revelado con un anticuerpo frente a la proteína VP1 de los ensayos de interacción entre el dsRNA viral (1) y las siguientes combinaciones de proteínas: hVP3 (2), hVP3 $\Delta$ 222-258 (3), hVP1 (4), hVP1 $\Delta$ 846-879 (5), hVP3 + hVP1 (6), hVP3 + hVP1 $\Delta$ 846-879 (7), hVP3  $\Delta$ 222-258+ hVP1 (8), hVP3  $\Delta$ 222-258 + hVP1 $\Delta$ 846-879 (9). La flecha muestra la posición de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258.

Los resultados mostrados en la Figura 30 permiten comprobar que cuando se utiliza para el ensayo de interacción con el dsRNA viral, las proteínas his-VP1 (columna 4) o his-VP1  $\Delta$ 846-879 (columna 5), se produce un retardo en la movilidad electroforética de dichas proteínas, confirmando la interacción entre la proteína VP1 y el dsRNA viral que vimos en el ensayo de la Figura 28. Cuando el ensayo se lleva a cabo con la proteína his-VP3 e his-VP1 o his-VP1  $\Delta$ 846-879 (columnas 6 y 7), el patrón resultante es el mismo que en el ensayo de la Figura 29 puesto que tanto his-VP3 como his-VP1 e his-VP1  $\Delta$ 846-879 interaccionan con el dsRNA viral. Sin embargo en el ensayo de his-VP3  $\Delta$ 222-258 con his-VP1 o his-VP1  $\Delta$ 846-879 (columnas 8 y 9) el retardo en el gel es debido únicamente a las proteínas his-VP1 o his-VP1  $\Delta$ 846-879 debido a que, como vimos en el ensayo mostrado en la Figura 29, la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 no interacciona con el dsRNA viral.

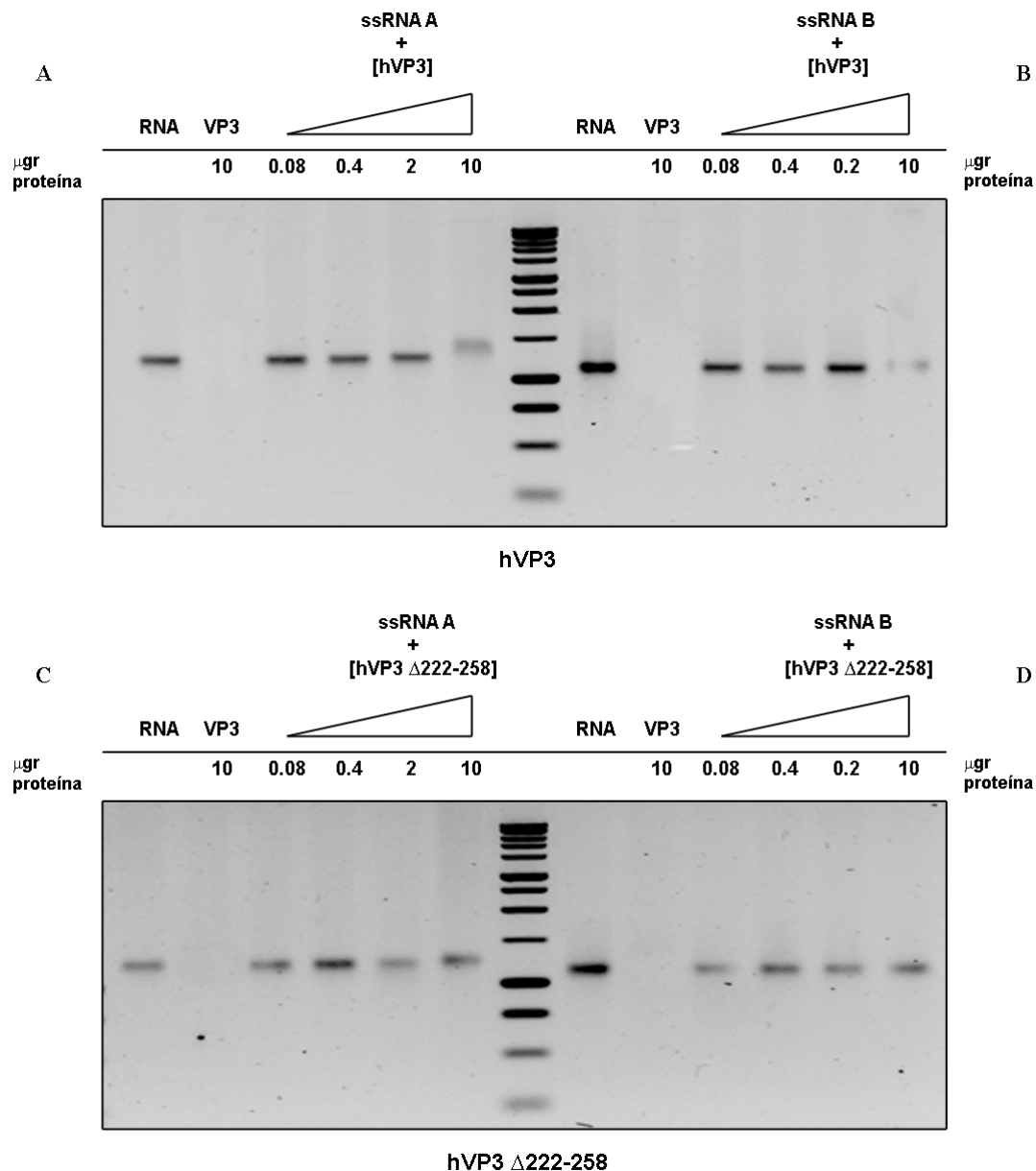
#### **4.3.4 Interacción de las proteínas his-VP3 e his-VP3 $\Delta$ 222-258 con ssRNA viral**

Una vez comprobado que la proteína his-VP3 interaccionaba con el dsRNA viral y que la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 no lo hacía, quisimos comprobar con este mismo tipo de ensayos, si ambas proteínas eran capaces de interaccionar con el ssRNA de origen viral.

Según datos obtenidos anteriormente en el grupo de investigación, ambas proteínas deben interaccionar con el ssRNA de origen viral puesto que ninguna de las dos tiene deletada la región descrita como zona de interacción de la proteína VP3 con el ssRNA de origen viral (región S53 – G124) (Kochan y col. 2003).

Para comprobarlo, llevamos a cabo un ensayo de interacción de las proteínas his-VP3 e his-VP3  $\Delta$ 222-258, con ssRNA viral generado mediante transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos pT7-SA-Rz y pT7-SB-Rz que contienen el cDNA tanto del segmento A, como del segmento B, respectivamente, del virus IBDV (*M.M.3.2.7*).

El ensayo se realizó utilizando concentraciones crecientes de las proteínas (desde 80 ng hasta 10  $\mu$ gr) mientras se mantenía constante la cantidad de ssRNA (procedente del Segmento A o del Segmento B del virus (añadimos una cantidad constante de BSA a la reacción para eliminar interacciones inespecíficas). La interacción se llevó a cabo durante 1 h a RT en el tampón de interacción (*M.M. 3.7.1*) y tras ese tiempo las muestras se analizaron en un gel de agarosa del 0,7% (Figura 31).



**Figura 31. Interacción de las proteínas his-VP3 e his-VP3  $\Delta$ 222-258 con ssRNA viral.** (A y B) Gel de agarosa 0,7% del ensayo de interacción la proteína his-VP3 con ssRNA de origen viral (procedente de transcripción *in vitro* de plásmidos que contienen cDNA tanto del Segmento A como del Segmento B de IBDV). Se mantiene una concentración constante de ssRNA y se va aumentando la concentración de proteína. Como controles se utilizaron tanto el dsRNA como la proteína his-VP3 (C y D) Gel de agarosa 0,7% del ensayo de interacción de la proteína his-VP3 $\Delta$ 222-258 con ssRNA de origen viral (procedente de transcripción *in vitro* de plásmidos que contienen cDNA tanto del Segmento A como del Segmento B de IBDV). Se mantiene una concentración constante de ssRNA y se va aumentando la concentración de proteína. Como controles se utilizaron tanto el dsRNA como la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258.

En este ensayo comprobamos que la proteína his-VP3 interacciona con el ssRNA de origen viral (Figura 31A y 31B) aunque la cantidad de proteína necesaria para que se produzca esta interacción es mayor que en el caso del dsRNA viral. En la Figura 31A vemos que empieza a

aparecer un retardo en la movilidad del ssRNA a partir de 2  $\mu$ gr de proteína y en la Figura 31B este retardo únicamente aparece a partir de cantidades de proteína de 10  $\mu$ gr. Esto puede indicar que la proteína VP3 tiene más afinidad por el ssRNA procedente del Segmento A del virus que por el del Segmento B o, simplemente que, como el ssRNA del Segmento A es de mayor tamaño, interaccionan con él más moléculas de proteína y por ello el retardo en el gel es más evidente.

Cuando utilizamos para la interacción, la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258 (Figura 31C y 31D), comprobamos que el retardo en el gel es poco apreciable en el caso del ssRNA procedente del Segmento A e inapreciable en el caso del ssRNA procedente del Segmento B. Esta disminución en la interacción puede ser debida a que, la zona deletada de la proteína his-VP3  $\Delta$ 222-258, está implicada también en la interacción con el ssRNA además de con el dsRNA.

#### **4.3.5 Determinación del tamaño mínimo de dsRNA con el cual interacciona la proteína his-VP3**

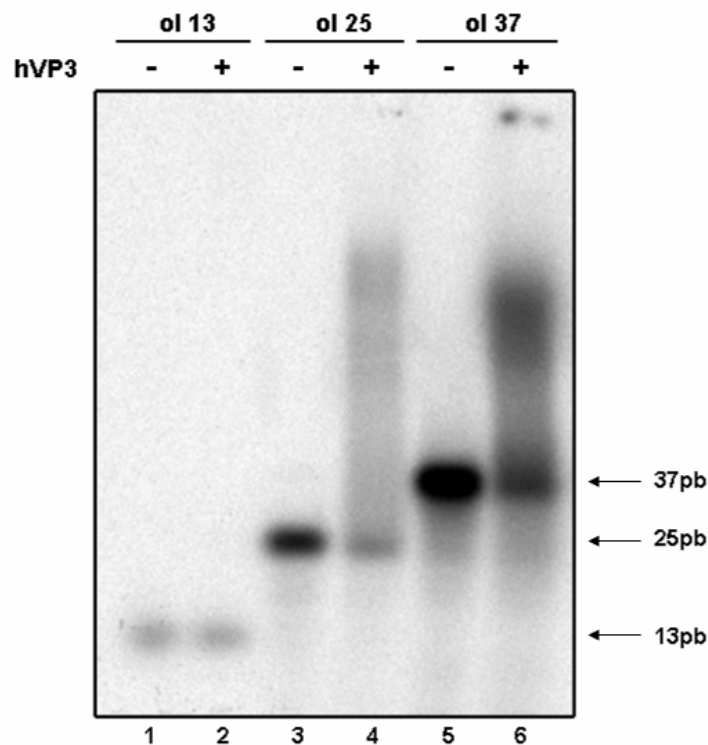
Una vez comprobado que la proteína his-VP3 interaccionaba con dsRNA de origen viral, decidimos averiguar cuál era el tamaño mínimo de dsRNA necesario para que se produjese ésta interacción. El objetivo principal de este experimento consistía en averiguar el tamaño mínimo, de un oligonucleótido de dsRNA, necesario para que la proteína his-VP3 purificada interaccionase con él, con el objetivo de realizar ensayos de cristalización en los que determinar de manera exacta la zona de interacción de la proteína his-VP3 con el dsRNA.

Para esta determinación diseñamos tres parejas de oligonucleótidos, AR1A-AR1B, AR2A-AR2B y AR3A-AR3B (*M.M. Tabla 2*), que tras ser hibridados, generan tres fragmentos de dsRNA de tres tamaños distintos (13, 25 y 37 pb). Para su diseño elegimos una región del Segmento A de IBDV correspondiente a la región que codifica la proteína VP2.

Elegimos ésta región porque es una zona que no presenta excesiva estructura secundaria y es prácticamente una región central de la secuencia del Segmento A.

Para realizar el ensayo de interacción, primeramente hibramos los oligonucleótidos de RNA (AR1A, AR2A y AR3A) con sus complementarios (AR1B, AR2B y AR3B), y para ello utilizamos el protocolo de anillamiento equimolecular de siRNA (*M.M. 3.3.5*), posteriormente fosforilaron con  $^{33}\text{P}$  y tras fosforilarlos se cargaron en un gel de acrilamida 15% en TBE y se purificaron según el protocolo correspondiente (*M.M. 3.3.5*).

Una vez hibridados, marcados con  $^{33}\text{P}$  y purificados, se utilizaron para realizar un ensayo de interacción con la proteína his-VP3. La interacción se realizó en el tampón anteriormente descrito (*M.M. 3.7.1*), la concentración de proteína utilizada fue de 10  $\mu\text{gr}$  por ensayo y utilizamos 5  $\mu\text{gr}$  de oligonucleótidos por reacción (añadimos una cantidad constante de BSA a la reacción para eliminar interacciones inespecíficas). Las muestras se sometieron a análisis en geles de acrilamida 7% en TBE. Posteriormente dichos geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autorradiografiados (*M.M. 3.5.3*). El resultado se muestra en la Figura 32.



**Figura 32. Interacción de la proteína his-VP3 con oligonucleótidos de RNA hibridados y marcados.** Gel acrilamida 7% en TBE de la interacción de la proteína his-VP3 con los oligonucleótidos hibridados por parejas (AR1A-AR1B  $\rightarrow$  ol 13, AR2A-AR2B  $\rightarrow$  ol 25 y AR3A-AR3B  $\rightarrow$  ol 37). Los carriles 1, 3 y 5 muestran el ensayo de interacción en ausencia de la proteína his-VP3. Los carriles 2, 4 y 6 muestran el ensayo de interacción en presencia de la proteína his-VP3. Las flechas marcan el tamaño de los oligonucleótidos hibridados.

En la Figura 32 podemos comprobar que cuando el ensayo de interacción se lleva a cabo con el oligonucleótido de 13 pb (carriles 1 y 2), no se observa ningún retardo en la movilidad electroforética del mismo. En cambio, cuando este ensayo se lleva a cabo con los oligonucleótidos de 25 pb (carriles 3 y 4) ó 37 pb (carriles 5 y 6), sí se observa un retardo en la movilidad electroforética de los oligonucleótidos.

Estos resultados indican que el tamaño mínimo que deberá tener un dsRNA para que la proteína his-VP3 interaccione con él, será de entre 14 y 25 pb.

Estos datos nos van a permitir, en un futuro, diseñar un oligonucleótido de dsRNA con el que interaccione la proteína his-VP3 para realizar ensayos de cristalización que nos permitan determinar de manera exacta la zona de interacción de la proteína his-VP3 con el dsRNA.

## 4.4 Ensayos de actividad

Por estudios publicados anteriormente, sabemos que la proteína VP1 es la polimerasa viral (von Einem y col. 2004, Pan y col. 2007). A su vez también sabemos que la proteína VP3 interacciona con la polimerasa viral VP1 (Lombardo y col. 1999; Tacken y col. 2000; Tacken y col. 2002), que ésta interacción es fundamental para que la polimerasa sea encapsidada (Lombardo y col. 1999) y que el dominio de interacción de la proteína VP3 con la proteína VP1 se adscribe a los últimos 16 aa del extremo C-terminal de la proteína VP3 (Maraver y col. 2003a).

### 4.4.1 Ensayo de actividad de VP1, VP1-péptido C-terminal de VP3 y VP1-VP3

En estos ensayos comprobamos la actividad catalítica de la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 purificada y comprobamos a su vez cual era el efecto que tenían en la actividad de la polimerasa tanto el péptido que representa los últimos 16 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína VP3, como la proteína VP3 completa puesto que como vimos en la estructura resuelta de la proteína VP1  $\Delta$ 846-879, cuando ésta proteína se encuentra en su apoforma (o interaccionando con átomos de magnesio) su centro activo se encuentra parcialmente bloqueado (las regiones que lo bloquean son el lazo B, región inmediatamente precedente a la  $\alpha$ -hélice 13 [residuos 483-490] y la región de las  $\alpha$ -hélices 19,  $\eta$ 10 y  $\eta$ 11) y este bloqueo probablemente dificulte la colocación del molde y la entrada al centro activo de los nucleótidos necesarios para la generación de la nueva hebra.

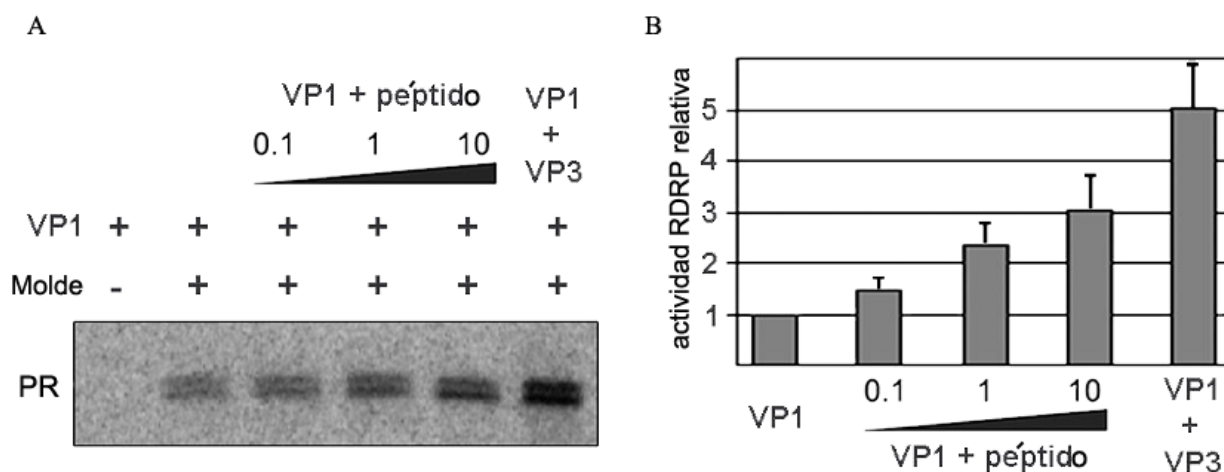
Para la realización de estos ensayos utilizamos la proteína his-VP3 purificada a partir de células de mamífero con el virus rVV VT7/his-VP3, que contiene el extremo C-terminal, necesario para su interacción con la proteína VP1.

Como molde de los ensayos de actividad utilizamos un ssRNA de polaridad positiva obtenido mediante transcripción *in vitro* (M.M. 3.2.7) a partir de un plásmido que contiene un cassette transcripcional formado por un fragmento de 554 pb que contiene las regiones no traducidas 5'y

3' del segmento B de IBDV denominado pT7-Cas2-Rz, cuyo extremo 3' quedará libre por la acción de la ribozima de la hepatitis  $\delta$ .

Para la realización de estos ensayos, la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 se incubó con diferentes concentraciones del péptido C-terminal de la proteína VP3 ( $_{243}$ GRLGRWIRTVSDLE $_{258}$ ) y también se incubó con la proteína purificada his-VP3. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 minutos y posteriormente se realizaron los ensayos de actividad según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.(3.7.2).

El resultado obtenido es el que se puede observar en la Figura 33.



**Figura 33. Ensayo de actividad VP1, VP1-péptido C-terminal de VP3 y VP1-VP3.** (A) La proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 purificada se preincubó tanto con el péptido ( $_{243}$ GRLGRWIRTVSDLE $_{258}$ ) C-terminal de VP3 como con la proteína his-VP3 purificada (origen rVV VT7/his-VP3). Las relaciones molares Péptido/his-VP1 fueron 0.1:1 (0.1), 1:1 (1) y 10:1 (10), respectivamente. La relación molar his-VP3/his-VP1 fue 2:1. Las reacciones fueron suplementadas (+) o no (-) con el molde ssRNA+ de 554 nt (Molde). El marcaje se realizó con [ $^{32}$ P] UTP y los productos de la reacción (PR) se separaron en geles de acrilamida 5% en TBE. (B) Actividad de la proteína VP1 después de la preincubación con el péptido C-terminal de VP3 y el polipéptido VP3 en relación a la proteína VP1 sola, definido con el valor de 1. El valor medio para cada condición se obtuvo de tres experimentos independientes.

El resultado que podemos observar en la Figura 33 es el siguiente, en primer lugar observamos que la proteína his-VP1  $\Delta$ 846-879 es activa por sí sola y en segundo lugar, la preincubación de la proteína VP1 con el péptido C-terminal de la proteína VP3 tiene un efecto dependiente de la concentración, dando lugar a un aumento de 3 veces la actividad catalítica de la proteína VP1

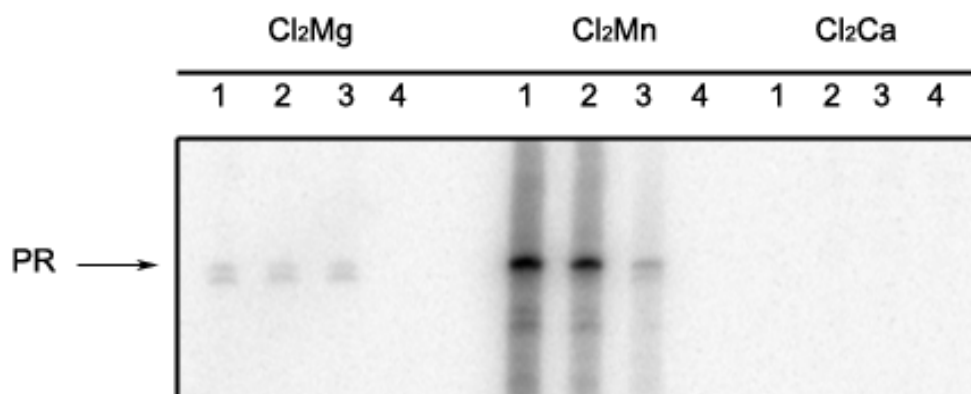
cuando la relación molar que se usa es 10:1. Concentraciones mayores causan una drástica disminución de la actividad catalítica de la proteína VP1.

Tal y como esperábamos, la preincubación con la proteína purificada his-VP3 (rVV VT7/his-VP3) tiene aún un mayor efecto (aumenta hasta 5 veces la actividad catalítica de la proteína VP1) que el péptido del C-terminal de VP3. Esto viene a demostrar que aunque la proteína VP3 (o en su defecto el del C-terminal) no es esencial para la síntesis de RNA, da lugar a un aumento de la actividad catalítica de la proteína VP1 *in vitro*.

#### 4.4.2 Ensayo de actividad con distintos cationes divalentes

Sabemos por estudios anteriores (Cohen 1975; Xu y col. 2004) que la RpRd de birnavirus, tanto en su forma asociada al virión como recombinante, puede usar  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  como cofactor para la catálisis.

Para comprobar cual era el efecto de diferentes cationes en la proteína his-VP1  $\Delta 846-879$  purificada por nosotros, realizamos ensayos de actividad utilizando el complejo VP1-VP3, el complejo VP1-péptido y la proteína VP1 sola, cambiando únicamente el catión utilizado en el tampón de replicación. Utilizamos los siguientes cationes,  $Cl_2Mg$ ,  $Cl_2Mn$  y  $Cl_2Ca$  y el resultado obtenido se puede observar en la siguiente figura (Figura 34).



**Figura 34. Actividad polimerasa en presencia de distintos cationes.** Gel de Acrilamida –TBE 5% en el que se muestran las diferencias de actividad de la RpRd de IBDV en presencia de distintos cationes. (1) VP1-VP3; (2) VP1-péptido de VP3; (3) VP1 (4) control negativo. (PR) Producto de reacción.



En la Figura 34 podemos ver que cuando utilizamos el catión  $Mg^{2+}$ , el resultado que obtenemos es el mismo que en ensayos anteriores, sin embargo, cuando el catión utilizado es  $Mn^{2+}$  podemos comprobar que se produce una mayor actividad de la RpRd, que al igual que en ensayos anteriores, es menor en ausencia tanto de la proteína VP3 como del péptido de VP3. Cuando utilizamos  $Ca^{2+}$  comprobamos que se produce una inhibición de la actividad de la RpRd lo que implica probablemente que el calcio no es coordinado en el centro activo y por ello no tienen lugar la actividad catalítica.

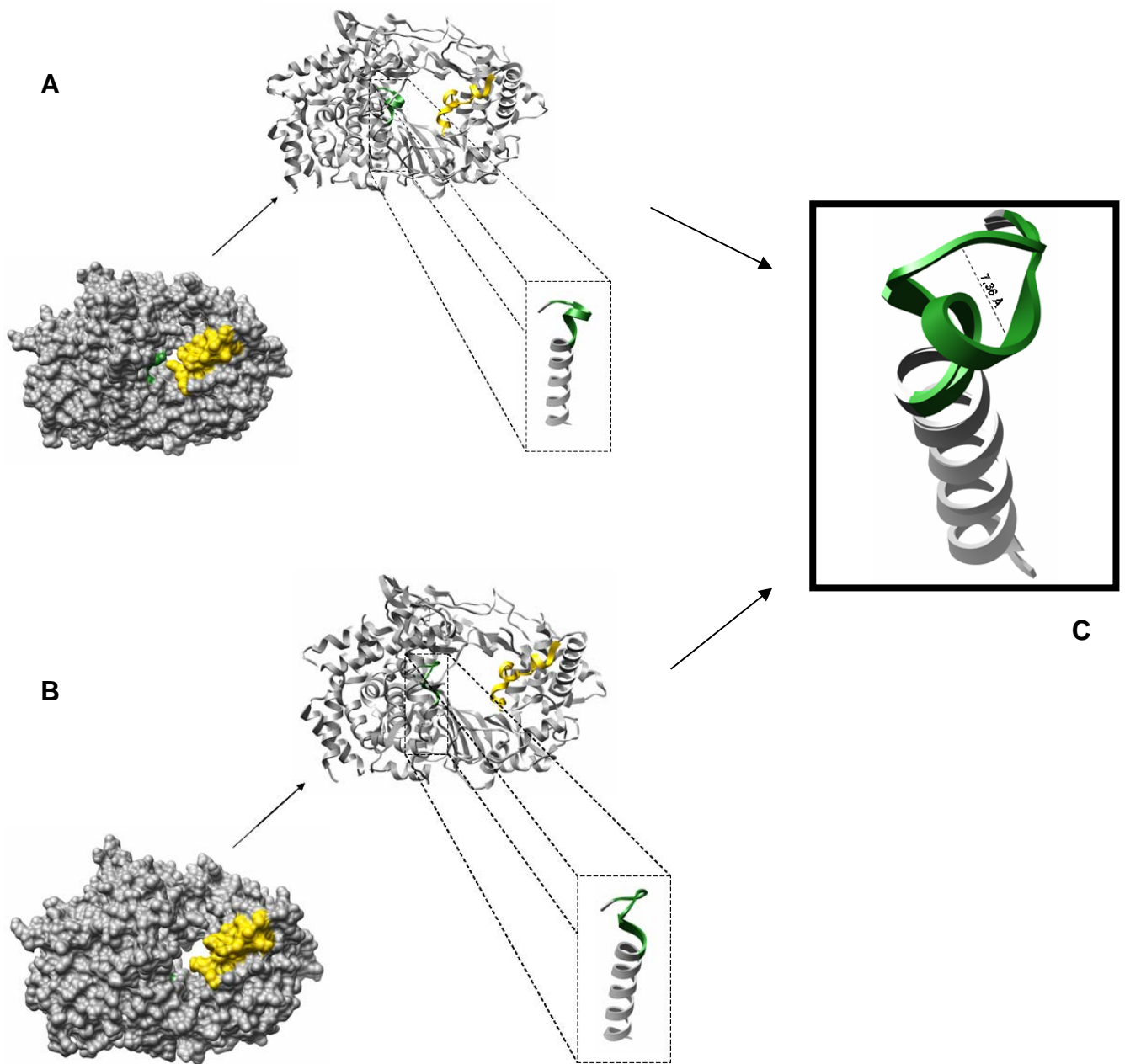
#### 4.5 Estructura del complejo VP1-péptido C-terminal de VP3

Tras realizar los ensayos de actividad y comprobar que la preincubación con el péptido del C-terminal de la proteína VP3 daba lugar a un aumento de hasta 3 veces en la actividad catalítica, teniendo resuelta ya la estructura atómica de la proteína VP1 y tras los antecedentes que existían en cuanto a la interacción de VP1 con VP3 (Hjalmarsson y col. 1999, Lombardo y col. 1999, Tacken y col. 2000, Maraver y col. 2003a), nos propusimos resolver la estructura atómica del complejo VP1-péptido de VP3, para lo cual obtuvimos cocristales de VP1 acomplejados con el péptido que representa el dominio de VP3 responsable de su interacción con la proteína VP1.

Para obtener la estructura del complejo VP1  $\Delta 846-879$ -péptido de VP3, se purificó la proteína recombinante his-VP1  $\Delta 846-879$ , se trató tal y como se describe en el apartado de *Resultados* 4.1.5., y los cristales del complejo VP1  $\Delta 846-879$ -péptido se obtuvieron mediante el método de difusión de vapor en gotas, mezclando la proteína con el péptido de VP3 en una relación molar 1:4 e incubándolo ocho horas a 4°C antes de los ensayos de cristalización. Los cristales se crecieron a 20°C en una solución que contenía 5% PEG3350, 0.4 M  $LiNO_3$  y 0.1 M Tris-HCl pH 7.2.

Los mapas del complejo VP1  $\Delta 846-879$ -péptido de VP3 se obtuvieron comparando los nuevos datos con los datos de los coordinados de la VP1  $\Delta 846-879$  obtenidos anteriormente (*M.M.* 3.6).

La estructura resuelta se muestra en la Figura 35.



**Figura 35. Estructura de la proteína VP1 acomplejada o no con el péptido C-terminal de VP3.**

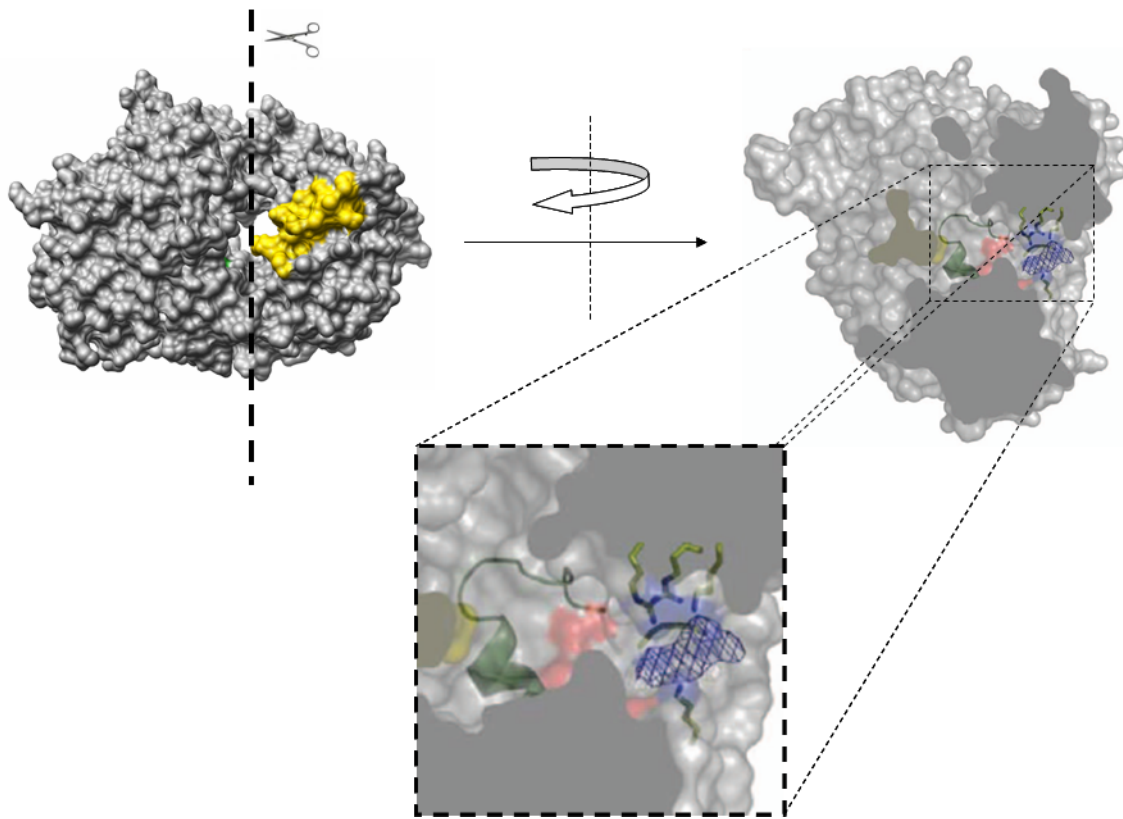
(A) Estructura de la proteína VP1 en esferas de van der Waals y en diagrama de cintas y, destacada, la región Q482-R508. (B) Estructura de la proteína VP1 acomplejada con el péptido C-terminal de VP3 (GRLGRWIRTVSDLE) en esferas de van der Waals y en diagrama de cintas y, destacada, la región Q482-R508. Marcado en verde el lazo B (G483-F490) y en amarillo la región de las hélices  $\alpha 19$ ,  $\eta 10$  y  $\eta 11$ . (C) Superposición de la región Q482-R508 de ambas estructuras mostrando el cambio conformacional de la región del lazo B (verde).

En la figura 35 podemos ver lo siguiente. Primero vemos la estructura de la proteína VP1 en su apoforma (Figura 35A), tanto en esferas de van der Waals como en diagrama de cintas (es la estructura que ya se describió anteriormente → Figura 14) donde podemos comprobar cómo la región del lazo B forma una protrusión que se introduce en el sitio activo de la RpRd, impidiendo el acceso al mismo. En el detalle podemos ver que forma adquiere la región Q482-R508 y más concretamente el lazo B (G483-F490).

En la Figura 35B vemos la estructura de la proteína VP1, en este caso acomplejada con el péptido del extremo C-terminal de la proteína VP3 y lo que podemos ver aquí es que la unión del péptido de VP3 induce cambios conformacionales en la región del lazo B que van a permitir, ahora sí, que se acomoden en la cavidad catalítica de la polimerasa, tanto el molde como los nucleótidos.

En el detalle podemos ver que forma adquiere la región Q482-R508 y más concretamente el lazo B (G483-F490). Vemos que en presencia del péptido de VP3, la hélice  $\eta 8$  se encuentra desestructurada y el lazo B se aleja unos 8 Å (concretamente 7.36 Å) de su posición inicial, permitiendo así la apertura del sitio catalítico para la entrada de sustratos.

En la resolución de la estructura de la proteína VP1 acomplejada con el péptido C-terminal de la proteína VP3, podemos ver que, en el túnel de entrada de los nucleótidos nos encontramos con una densidad electrónica extra que corresponde a la estructura pobremente ordenada del péptido del C-terminal de VP3, concretamente a los 5 últimos aminoácidos. El carácter electropositivo de este túnel, que viene determinado por las cadenas laterales de los aminoácidos R175 (hélice  $\alpha 5$ ), K333 y R335 (motivo F), K419 (motivo A) y K529 (motivo D) sugiere que la densidad observada correspondería a los últimos 5 aa (concretamente DEDLE) del péptido del extremo C-terminal de VP3 cuya carga es claramente negativa y por lo tanto se daría la interacción (cargas positivas-cargas negativas) (Figura 36).



**Figura 36. Mapa de densidad del complejo VP1-péptido C-terminal de VP3.** Representación de la polimerasa VP1 acomplejada con el péptido C-terminal de VP3, en esferas de van der Waals, que ha sido cortada para exponer el canal de entrada del molde y los nucleótidos, donde se encuentra la densidad electrónica extra anteriormente descrita (azul). El sitio activo de la polimerasa se representa en rojo, en verde el lazo B y en amarillo las hélices  $\alpha 19$ ,  $\eta 10$   $\eta 11$ .

## *5 Discusión*





La familia *Birnaviridae* comparte una característica que la distingue del resto de virus dsRNA y es que son los únicos en los que el material genético forma parte de RNPs (Hjalmarsson y col. 1999; Luque y col. 2009a). Estas RNPs están formadas por el dsRNA viral, la polimerasa del virus (VP1), unida al extremo 5' del RNA, y la proteína VP3 que recubre homogéneamente y sin compresión longitudinal el dsRNA. Las RNPs son funcionalmente competentes para la síntesis de RNA en ausencia de la proteína VP2 y de una cápsida estructuralmente íntegra (Luque y col. 2009a).

Debido a que todos los miembros de la familia *Birnaviridae* carecen de un núcleo interno transcripcional (T=2), es probable que una de las funciones de las RNPs sea la de ocultar el dsRNA viral a los sensores de dsRNA celulares. Esta característica refuerza la hipótesis acerca de la existencia de una conexión evolutiva entre los birnavirus y los virus ssRNA de cadena negativa (Gorbalenya y col. 2002; Coulibaly y col. 2005).

## 5.1 La proteína VP1

La RpRd de IBDV exhibe una serie de características que la hacen comparable a otras RpRd (Steitz 1998). Las comparaciones estructurales indican que los motivos de la polimerasa adoptan una estructura secundaria similar a la observada en otras RNA polimerasas, excepto en el ordenamiento de los motivos A-B-C, que se encuentran permutados obteniéndose una conectividad no canónica del dominio *palma* (R. 4.1.5).

### 5.1.1 Conectividad no canónica de la palma de VP1

Estudios bioinformáticos previos (Gorbalenya y col. 2002) propusieron que el dominio *palma* de la proteína VP1 muestra una permutación de los motivos de secuencia A, B y C de las RpRd (Kamer y col. 1984; O'Reilly y col. 1998; Bruenn 2003) en el cual, el ordenamiento clásico N-terminal-A-B-C-C-terminal pasa a ser N-terminal-C-A-B-C-terminal. Los resultados descritos en este trabajo (R 4.1.5) demuestran que este reordenamiento tiene lugar y es compatible con la organización espacial de los elementos estructurales del dominio *palma* de las polimerasas canónicas, manteniendo los residuos ácidos del sitio activo de la polimerasa en la posición adecuada para la catálisis. Esta permutación en el orden del dominio *palma* provoca un reordenamiento de las regiones adyacentes, concretamente en la región que precede a la hélice  $\alpha 13$  (residuos 483-490), denominada lazo B, con respecto a los dominios *palma* canónicos (Kamer y col. 1984; O'Reilly y col. 1998; Bruenn 2003), como consecuencia, el lazo B se introduce en el sitio activo bloqueándolo parcialmente.

Es importante resaltar, que la secuencia esencial de las RpRd – X(G)DD – , que habitualmente se encuentra en el motivo C (Poch y col. 1989; Koonin 1991), no está presente en la secuencia de la proteína VP1. Esto nos lleva a preguntarnos si VP1 emplea el mecanismo convencional de coordinación con iones metálicos habitual de las polimerasas o si emplea un mecanismo diferente para la transferencia de nucleótidos. Además, el motivo C en birnavirus contiene la secuencia ADN, lo que implica que sólo hay un residuo D en dicho motivo (la secuencia GDD, estrictamente conservada en muchas otras RpRd, aquí es sustituida por la secuencia ADN).

### 5.1.2 El sitio activo

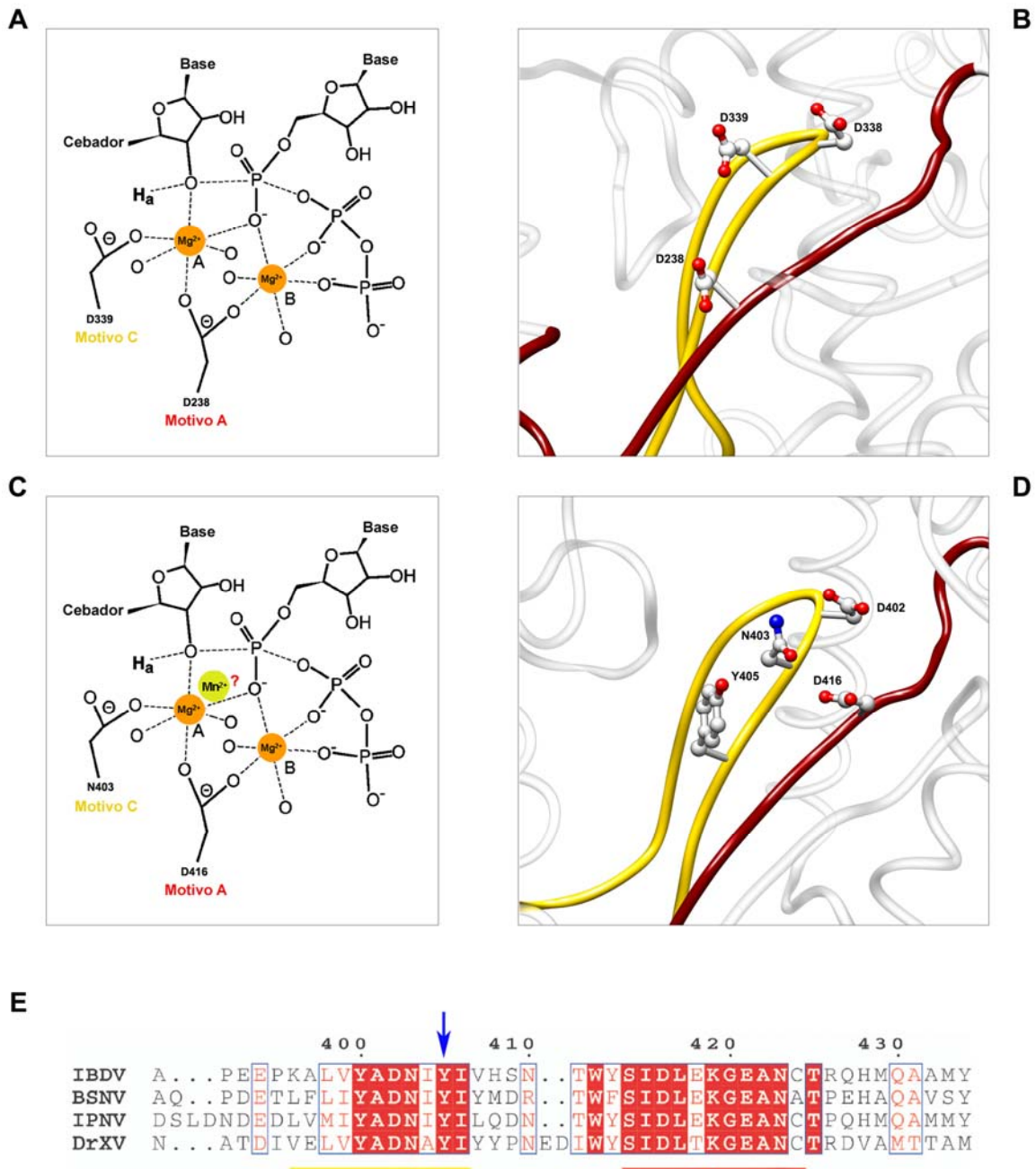
La característica más importante del sitio activo de la proteína VP1 es la sustitución del residuo D altamente conservado en otras RpRd, por un residuo N en la posición 403 (Figuras 37C y 37D). De esta manera VP1 posee únicamente dos residuos D en el sitio activo (D402 y D416) mientras que la mayoría de las polimerasas de virus dsRNA y ssRNA poseen tres (Steitz 1993) (Figuras 37A y 37B). Aunque, los tres aminoácidos, D402, N403 y D416, se encuentran en una posición y conformación análoga a las de los tres residuos D de otras polimerasas canónicas (Steitz 1999; Tao y col. 2002).

Estudios previos han demostrado que la función principal de los tres residuos D altamente conservados es la de coordinar el par de iones metálicos (Joyce y col. 1994).

Dos de los residuos D, incluyendo el del motivo A (equivalente a D416 en VP1) y el primer residuo D del motivo C (equivalente a D402 en VP1) son absolutamente esenciales para la función de la polimerasa (Jablonski y col. 1995; Lohmann y col. 1997; Vázquez y col. 2000). El segundo residuo D del motivo C (equivalente a N403 en VP1) se requiere para el correcto funcionamiento de las RpRds. Por ejemplo, la sustitución del residuo D por un residuo N en la RNA polimerasa de calicivirus resulta en la completa pérdida de actividad (Vázquez y col. 2000) y este mismo cambio en la RNA polimerasa de poliovirus inactiva la polimerasa, aunque se puede rescatar su actividad utilizando  $Mn^{2+}$  como cofactor (Jablonski y col. 1995).

Hemos comprobado que la proteína VP1 de birnavirus, con sólo 2 residuos D en el sitio activo, se une eficientemente al  $Mg^{2+}$  bajo condiciones fisiológicas. Se ha mostrado anteriormente que los residuos N, en diferentes moléculas proteicas, pueden sufrir una deamidación para generar un residuo D (Wright 1991). Sin embargo, la deamidación requiere un tiempo medio de 24h. Teniendo en cuenta que el ciclo replicativo de IBDV tiene lugar en un período inferior, no habría tiempo para que este proceso tuviese lugar. Un estudio en profundidad de la estructura de la proteína VP1 revela que la cadena lateral del residuo N403 se encuentra colocada frente a la cadena lateral de un residuo Y (Y405), conservada en todos los birnavirus (Figura 37E).





**Figura 37. Coordinación de iones metálicos.** (A y C) Representación esquemática de los aminoácidos implicados en la coordinación de iones metálicos en el sitio activo de las RpRd. (A) RpRd canónica (3Dpol de FMDV). (B) RpRd de IBDV, en la cual, el residuo D del motivo C de las polimerasas canónicas se sustituye por un residuo N. (C) Estructura atómica del centro activo de 3Dpol de FMDV. (D) Estructura atómica del centro activo de la polimerasa de IBDV. Las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la coordinación se encuentran explícitamente marcadas. (E) Alineamiento múltiple de la secuencia de la RpRd de los birnavirus IBDV (número de acceso Q8B540), BSNV (Q8AZL8), IPNV (P22173) y DXV (Q91CD5). Se muestra únicamente la secuencia que incluye los motivos A y C. Los residuos estrictamente conservados se muestran en cuadrados rojos y los residuos similares en recuadros azules. Los motivos de secuencia conservados se marcan con barras bajo la

secuencia, coloreados de la misma forma que en la Figura 16. La flecha azul marca el residuo Y, conservado en todos los birnavirus.

Atendiendo a esta conformación, el anillo aromático del residuo Y405, rico en electrones, podría transferir electrones a la cadena lateral del residuo N403 permitiendo la unión tanto de  $Mn^{2+}$  como de  $Mg^{2+}$  (Figura 37D), en un mecanismo similar al de la retrotranscriptasa de HIV (Huang y col. 1998). Aunque es probable que la coordinación del ión  $Mg^{2+}$  sea peor que la del ión  $Mn^{2+}$  lo que provocaría una reducción en su actividad, como hemos observado a lo largo del presente trabajo (R.4.4.3).

La proteína VP1 de birnavirus, tanto en su forma asociada al virión como recombinante, puede emplear  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  como cofactor para la catálisis (Cohen 1975; Xu y col. 2004).

### 5.1.3 Complejo VP1- $Mg^{2+}$

Tras incubar los cristales de la proteína VP1 con GTP y  $Mg^{2+}$ , se incorporan tres iones de  $Mg^{2+}$ , dos de ellos en el sitio activo (D402, motivo C y D416 y E421, motivo A). Esto es similar a lo descrito para las estructuras de las polimerasas del bacteriofago  $\phi 6$  (Butcher y col. 2001) y FMDV (Ferrer-Orta y col. 2006). La organización de cadenas laterales resultante alrededor de los iones metálicos es muy parecida a la que se encuentra en los complejos de replicación descritos previamente en distintas polimerasas canónicas (Ago y col. 1999; Butcher y col. 2001; Tao y col. 2002). El tercer ión metálico se encuentra a una distancia de 6 Å con respecto a su posición catalítica esperada, mostrando una coordinación octaédrica perfecta (Figura 17). Se ha observado una ordenación muy parecida en las estructuras del fago  $\phi 6$  (Butcher y col. 2001) y del virus de fiebre aftosa (FMDV) (Ferrer-Orta y col. 2004). Por otra parte, no se observan diferencias conformacionales entre la proteína VP1 unida a  $Mg^{2+}$  y la apoforma.

## 5.2 La proteína VP3

La estructura de la proteína VP3 presenta dos dominios helicoidales  $\alpha$  conectados por una bisagra larga y flexible. De forma inesperada, el plegamiento general del segundo dominio de VP3 presenta similitud estructural significativa con diferentes factores que regulan la transcripción.

El análisis cromatográfico en columna de exclusión (R.4.2.4) indica que la proteína VP3 forma dímeros en solución incluso en construcciones carentes del dominio de oligomerización, fundamental para el ensamblaje de la cápsida de IBDV (Maraver y col. 2003b). Sabemos que a

concentraciones de 1.5 mg/ml la proteína se encuentra en forma dimérica. En el dímero, dos subunidades de VP3 se asocian de forma simétrica y antiparalela siguiendo el eje de simetría dos, cada una de las subunidades contribuye con el 30% de su superficie en los contactos interdímicos. La interacción se produce mayoritariamente mediante el segundo dominio de VP3.

Estos resultados muestran que VP3 presenta un dominio de dimerización independiente del dominio de oligomerización. Es factible pensar que los oligómeros de VP3 se formen mediante la multimerización de dímeros preformados. Los extremos N-terminales de ambas subunidades se encuentran a una distancia de 86 Å y los extremos C-terminales distan entre sí 49 Å. Estos extremos se encuentran completamente accesibles lo que permitiría acomodar las regiones tanto N-terminal como C-terminal no resueltas, sin causar distorsión en la organización dimérica. De hecho, la estructura del dímero indica que los extremos C-terminales de la proteína podrían quedar libres, permitiendo así el establecimiento de otras interacciones a través del dominio de oligomerización y/o del dominio de interacción con VP1, parcialmente solapados.

La región C-terminal de la proteína VP3 es altamente hidrofílica, rica en aminoácidos cargados, entre ellos ocho residuos de P (Hudson y col. 1986; Maraver y col. 2003a). Debido a esta naturaleza electrostática e hidrofílica, se predice que esta región podría estar desordenada y expuesta (Figura 38D). Como se describe en la presente memoria (R. 4.5), la interacción del extremo C-terminal de VP3 con la proteína VP1, desbloquea el centro activo de la polimerasa, permitiendo que accedan a éste, el molde y los nucleótidos necesarios para que tenga lugar la síntesis de la nueva hebra, por lo tanto, podemos afirmar que la proteína VP3 actúa como un activador de la RpRd.

### **5.2.1 Interacción de la proteína VP3 con el RNA viral (dsRNA y ssRNA)**

En trabajos anteriores se demostró que la proteína VP3 interacciona con la proteína VP2 durante el proceso morfogenético de la cápsida (Oña y col. 2004), forma complejos con la proteína VP1, facilitando su encapsidación (Lombardo y col. 1999; Maraver y col. 2003b), e interacciona con el RNA viral, tanto ssRNA como dsRNA (Kochan y col. 2003), formando las RNPs (Hjalmarsson y col. 1999; Luque y col. 2008).

Nosotros hemos demostrado (R.4.3.1) que la región C-terminal de la proteína VP3 está implicada en la interacción de VP3 con el dsRNA viral. Tras eliminar la región C-terminal, comprendida entre los residuos N222-E258, la proteína VP3 no interacciona con el dsRNA viral. Por lo tanto, ésta región de la proteína VP3, aún no siendo la única que interacciona con

RNA (la región comprendida entre los residuos S53-G124 interacciona con ssRNA [Kochan y col. 2003]) es importante para la interacción con dsRNA.

Las moléculas de VP3 interaccionan con el dsRNA formando las RNPs, característica ésta que es única entre los virus dsRNA (Luque y col. 2009a), sin introducir compresión longitudinal, a diferencia de lo descrito para la heterocromatina celular (Figuras 38A y 38B). No obstante, esta interpretación no excluye la posibilidad de que en el interior de la cápsida viral existan interacciones entre las moléculas de VP3 comprimiendo el genoma viral.

Hemos comprobado que el tamaño mínimo necesario para que la proteína VP3 interaccione con el dsRNA está comprendido entre 14 y 25 pb. La determinación de la estequiometría proteica de las diferentes subpoblaciones de IBDV muestra que todas las partículas virales contienen ~450 copias de VP3, si consideramos que IBDV es capaz de encapsidar 4 segmentos de dsRNA, cada segmento estaría acompañado con ~110 moléculas de VP3, lo que supone ~26 pb/molécula VP3 (Luque y col. 2009b).

VP3 interacciona con el dsRNA viral y de esta manera, probablemente, protegerá al virus frente a los mecanismos de defensa intracelular como por ejemplo la ruta de la proteína 2-5 Oligo (A) sintetasa o la ruta de la proteína PKR, (Sadler y col. 2008). La proteína NS1 del virus de la gripe, que inhibe la ruta de la proteína 2-5 Oligo (A) sintetasa (Min y col. 2006), o las proteína E3L del virus vaccinia (Chang y col. 1992) y  $\sigma 3$  de reovirus (Jacobs y col. 1998), que previenen la activación de PKR, son ejemplos de proteínas virales que interaccionan con el dsRNA viral.

En relación al ssRNA viral, como hemos descrito en el apartado (R.4.3.4), tanto la proteína completa (his-VP3) como la delecionada (his-VP3  $\Delta 222-258$ ) interaccionan con él, siendo más evidente en el caso de la proteína his-VP3, lo cual indica que la zona delecionada de la proteína (aún siendo responsable de la interacción de la proteína con el dsRNA) no es la única que interacciona con el ssRNA, como se demostró anteriormente (Kochan y col. 2003) aunque su deleción disminuye la interacción con el ssRNA. Esta disminución en la interacción probablemente influirá en el posible papel de la proteína VP3 como activador de la transcripción (D. 5.2.3).

### **5.2.2 Intercambio de dominios (*Domain-Swapping*)**

La arquitectura general del dímero de VP3 comparte muchas características con las proteínas que presentan el llamado intercambio de dominios (*domain-swapping*). Este proceso, en el cual dos o más moléculas proteicas intercambian parte de su estructura para formar oligómeros

entrecruzados (Bennett y col. 1994), fue propuesto originalmente como un mecanismo para la aparición de las proteínas oligoméricas (Rousseau y col. 2003).

En VP3 el dímero está formado intercambiando la región de la bisagra y del segundo dominio entre los dos protómeros (Figura 38E). Este mismo mecanismo explica la estructura del dímero del extremo C-terminal de la proteína de la cápsida de HIV y del dominio de oligomerización SCAN de los factores de transcripción de mamíferos (Ivanov y col. 2005 y 2007).

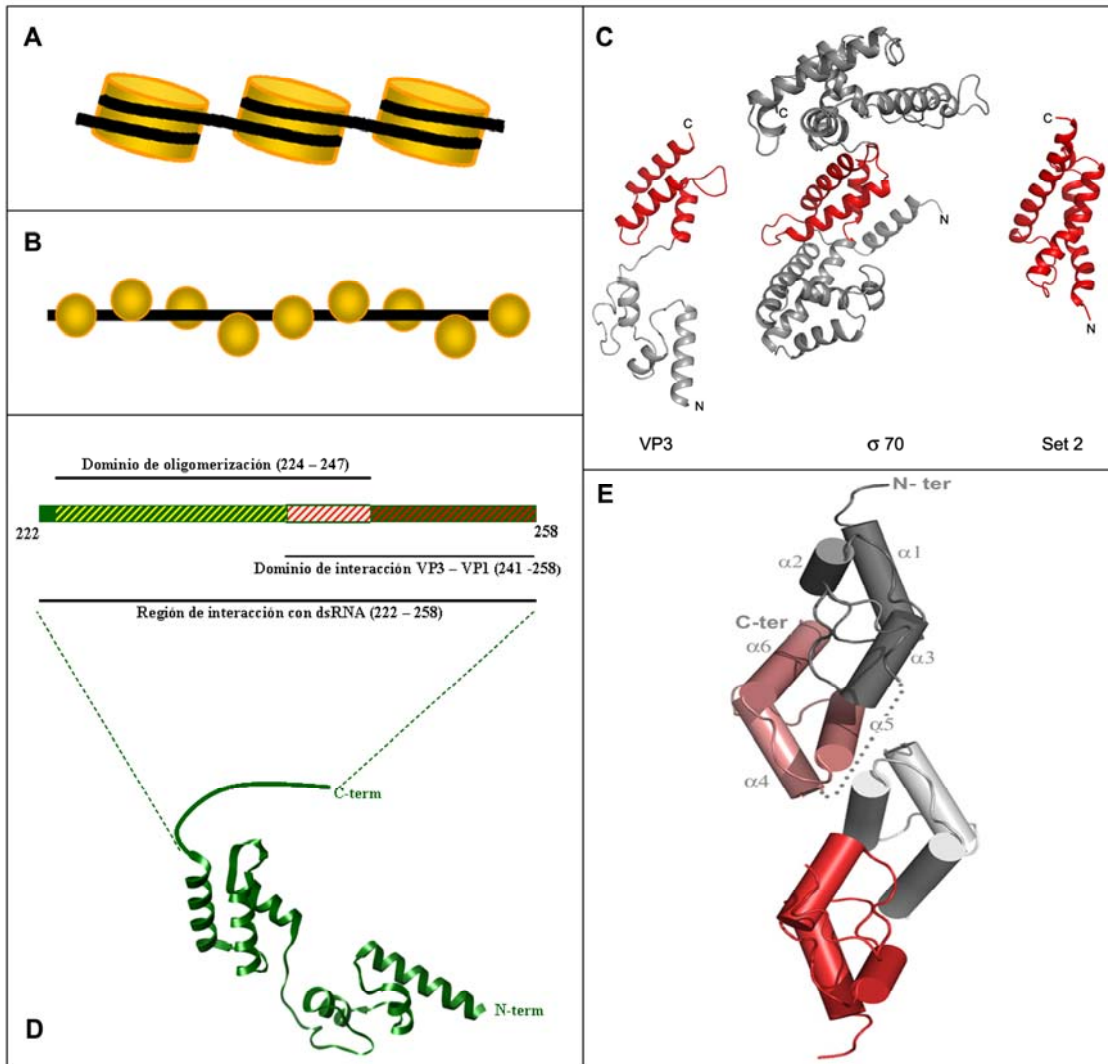
### 5.2.3 Factores reguladores de la transcripción

La comparación de la estructura de la proteína VP3 con un plegamiento conocido en la base de datos Dali (Holm y Sander 1995) reveló que la topología general del primer dominio de VP3 no estaba relacionada con ninguna estructura conocida (proteína o dominio de proteína). Además no se encontraron homólogos estructurales en bases de datos actualizadas, lo cual sugiere que la proteína VP3 debería ser considerada un polipéptido huérfano (ORFan-encoded polypeptide), según la clasificación de genes virales propuesta por Koonin (Koonin y col. 2006), debido a que carece de homólogos detectables en otras familias virales. La falta de homólogos identificables para la proteína VP3 de birnavirus fue descrita por primera vez por Hudson (Hudson y col. 1986).

En cambio, la misma búsqueda reveló una significativa similitud estructural entre el segundo dominio de la proteína VP3 y distintos factores de regulación de la transcripción. Estos factores interactúan con la RNA polimerasa celular y llevan a cabo funciones clave en el proceso de transcripción (Borukhov y col. 2003).

Los dos factores que obtuvieron un valor más alto en la comparación realizada con la base de datos Dali fueron, el factor  $\sigma 70$  (PDB: 1IW7) de la bacteria *Thermus thermophilus* (Vassilyev y col. 2002) y el dominio SRI Set2 de la histona H3 metil transferasa (PDB: 2C5Z) (Vojnic y col. 2006), cuyas puntuaciones fueron de 3.6 y 3.5 para la superimposición de 53 y 57 carbonos alfa respectivamente. La región de  $\sigma 70$  que está estructuralmente relacionada con VP3 corresponde al dominio  $\sigma 2$  (Figura 38C).  $\sigma 2$  interactúa con la cadena  $\beta'$  del núcleo de la RNA polimerasa de la bacteria (Vassilyev y col. 2002). Los factores  $\sigma$  se unen a las RNA polimerasas de bacterias dirigiendo aspectos importantes del proceso de transcripción, incluido el reconocimiento del promotor de DNA y la fusión del DNA para exponer el sitio de inicio de la transcripción (Mooney y col. 2005).

Muchos aspectos de la regulación de la RpRd de birnavirus son aún desconocidos. El paralelismo observado entre VP3 y los factores de transcripción podría servir como punto de partida para el estudio de la regulación transcripcional en birnavirus.



**Figura 38. Esquema resumen de VP3.** (A) Modelo de interacción de ácido nucleico rodeando a la proteína que implica compresión longitudinal. (B) Modelo de interacción de la proteína a lo largo del ácido nucleico, que no implica necesariamente compresión longitudinal. (C) Estructura atómica de VP3  $\sigma 70$  y Set 2 en las que se resalta en rojo el dominio con homología estructural. (D) Esquema del extremo C-terminal de VP3 que apoya su clasificación como *moonlight protein* debido a la pluralidad de funciones de dicho C-terminal. (E) Diagrama que ilustra la dimerización de VP3 mediante el proceso de *domain swapping*. Se obtendría un protómero más compacto intercambiando la región de la bisagra y el segundo dominio entre protómeros, por ejemplo, conectando la cadena polipeptídica procedente de la hélice gris  $\alpha 3$ , con la hélice rosa  $\alpha 4$  (línea gris de puntos)

Teniendo en cuenta que la región C-terminal de VP3 es una región en la que se solapan diferentes funciones en una misma secuencia proteica y debido a su carácter desestructurado y teniendo en cuenta que otras regiones de la proteína tienen a su vez otra serie de funciones,

proponemos que VP3 pueda ser clasificada como una *moonlight protein*, es decir una proteína con la habilidad de cumplir con distintas funciones, aparentemente no relacionadas unas con otras con una misma región de la proteína (Jeffery 1999; Tompa y col. 2005) aumentando de esta manera la complejidad del sistema viral donde se encuentra esta proteína, sin aumentar por ello, el número de proteínas necesarias para llevar a cabo estos procesos.

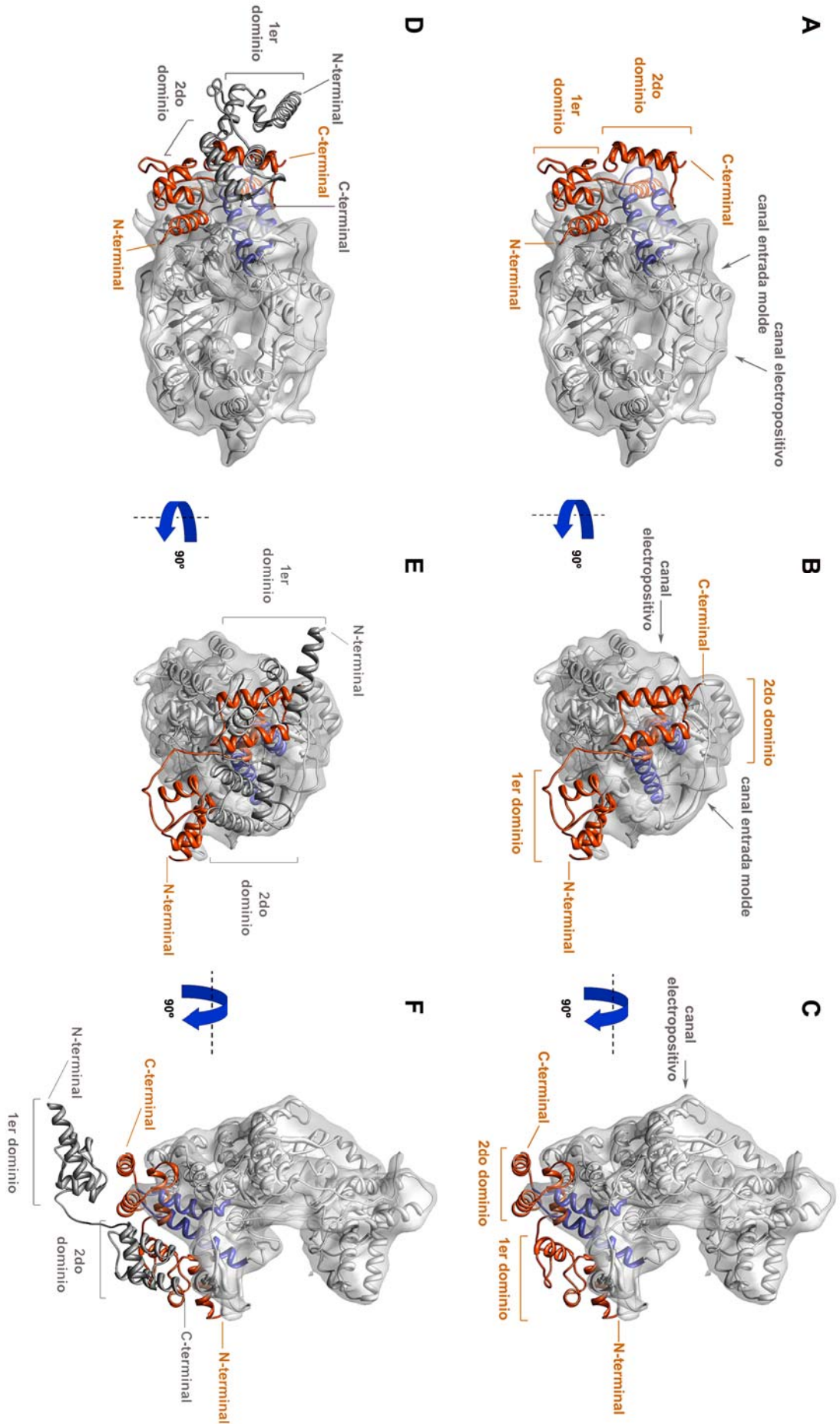
### 5.3 Complejo VP1-VP3

Se ha descrito anteriormente que la encapsidación de la proteína VP1 requiere la interacción con la proteína VP3 (Lombardo y col. 1999). Por otra parte, la proteína VP3 interacciona con el genoma viral (Kochan y col. 2003) y forma RNPs (Hjalmarsson y col. 1999; Luque y col. 2009a). Se ha determinado la posición del dominio de unión a VP1 de VP3 (Maraver y col. 2003a). Nos interesaba determinar estructuralmente la interacción de la proteína VP3 con la proteína VP1. Como se observa en la Figura 35, comprobamos que la presencia del péptido C-terminal de VP3 induce un cambio conformacional que elimina el bloqueo estérico del sitio activo de la RpRd, observado en la estructura de la apoforma. Este cambio conformacional permite acomodar el molde y los nucleótidos necesarios para la catálisis. Hay que destacar que la conformación del lazo B tras la activación mediada por el péptido de VP3 se encuentra estrechamente relacionada con un lazo equivalente presente en las polimerasas de  $\phi 6$  y FMDV.

#### 5.3.1 Modelo hipotético de interacción VP1-VP3

Como se ha discutido anteriormente, el segundo dominio de la proteína VP3 es estructuralmente homólogo al dominio  $\sigma 2$  del factor  $\sigma 70$  de *Thermus thermophilus* (Vassylyev y col. 2002), este factor de transcripción forma, junto con el núcleo de la RNA polimerasa bacteriana, un holoenzima (concretamente, el dominio  $\sigma 2$  interacciona con la cadena  $\beta'$  del núcleo de la RNA polimerasa) que permite que tenga lugar el reconocimiento del promotor por parte del holoenzima, esto permite que se desenrolle el dsDNA y se inicie la transcripción. Aunque el núcleo de la RNA polimerasa es catalíticamente activo, es incapaz de iniciar la transcripción de forma eficiente y específica en ausencia del dominio  $\sigma 2$ .

Estos datos, junto con la comparación estructural de las proteínas de IBDV, VP1 (PDB: 2PUS) y VP3 (PDB: 2R18), con el holoenzima de la RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* (PDB: 1IW7) mediante el programa UCSF Chimera (*University of California*) y la base de datos Dali, aportan información para proponer el modelo hipotético de interacción entre las proteínas VP1 y VP3 de IBDV que se muestra en la Figura 39.





**Figura 39. Modelo hipotético de interacción VP1-VP3.** Representación en superficie y diagrama de cintas de la interacción entre la proteína VP1 (gris claro) y la estructura resuelta de la proteína VP3 (naranja). **(A-C)** Se representa la probable interacción entre el dominio HtH (I271-S234, azul) de la proteína VP1 y el segundo dominio de uno de los monómeros de VP3. Las flechas señalan el canal de entrada del RNA molde y el canal de carácter electropositivo de VP1, con el que puede interaccionar el extremo C-terminal desestructurado (no resuelto) del monómero de VP3. Se muestra a su vez, el extremo N-terminal del primer dominio. **(D-F)** Misma representación que en las figuras A-C con la diferencia que aquí se muestra el dímero de VP3 (naranja y gris oscuro). Esto permite comprobar que el extremo C-terminal del segundo dominio del monómero de VP3, representado en gris oscuro, quedaría libre para interaccionar con el dsRNA viral. Las figuras B, C, F y E se encuentran giradas 90° respecto a la figura que las precede.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, tanto en trabajos anteriores (Maraver y col. 2003a, 2003b; Kochan y col. 2003) como los descritos en la presente memoria, proponemos que la interacción entre la proteína VP1 y el dímero de VP3 puede tener lugar mediante una serie de contactos íter-proteicos entre el segundo dominio de VP3, con homología estructural con el dominio  $\sigma 2$  del factor de transcripción  $\sigma 70$ , y la región N-terminal de VP1 en forma de herradura (región HtH, Hélice-giro-Hélice, en azul en la Figura 39) formada por la secuencia I271-S314. De esta manera el complejo quedaría formado de tal manera que uno de los extremos C-terminales libres del dímero de VP3 tendría total libertad para acceder a la región que hemos determinado como un canal electropositivo (Figura 39A-C). Este canal está formado por las cadenas laterales de los aminoácidos R175, K333, R335, K419 y K529, donde la región C-terminal de VP3 podría interaccionar debido a su carácter altamente electronegativo, produciendo las modificaciones estructurales descritas anteriormente (R. 4.5) que permitirían que el lazo B (G483-F490) de la proteína VP1, se moviese de su posición, permitiendo de ésta manera el acceso del RNA molde al centro activo de VP1 a través del canal descrito como responsable de ésta entrada (Figura 39A-B) (motivo G, K256-G263). Este cambio sería responsable del incremento en la procesividad y especificidad de la polimerasa, observados experimentalmente.

A su vez, el otro extremo C-terminal del dímero, quedaría libre para interaccionar con otras moléculas (Figura 39F).

### 5.3.2 Actividad catalítica de la proteína VP1

La resolución de la estructura de la proteína VP1 tanto en su apoforma como interaccionando con el péptido del extremo C-terminal de la proteína VP3 nos permitió determinar que cuando la proteína VP1 se encuentra en su apoforma, la presencia del lazo B bloquea el acceso al centro activo y, probablemente, impide que el molde de RNA acceda al mismo. Sin embargo, cuando

se produce la interacción entre dicho péptido y la proteína VP1, este bloqueo estructural desaparece permitiendo el acceso al centro activo (Figura 35). A su vez, comprobamos qué efecto tenía este péptido en la actividad catalítica de la polimerasa. Se determinó que la presencia del péptido del extremo C-terminal de la proteína VP3 provoca un incremento en la actividad catalítica de la proteína VP1. Este incremento sigue un patrón dependiente de concentración (Figura 33).

La actividad detectada en ausencia del péptido de VP3 podría explicarse porque en los ensayos nos encontramos lejos de las condiciones fisiológicas y por tanto es muy probable que haya una heterogeneidad molecular y existan moléculas de VP1 cuyo centro activo se haya desbloqueado, debido a que es una zona flexible (y, en principio, no está controlada por un inhibidor específico), la molécula es dinámica y por lo tanto desde que se purifica hasta que se realizan los ensayos, se pueden producir cambios conformacionales que desbloqueen el centro activo.

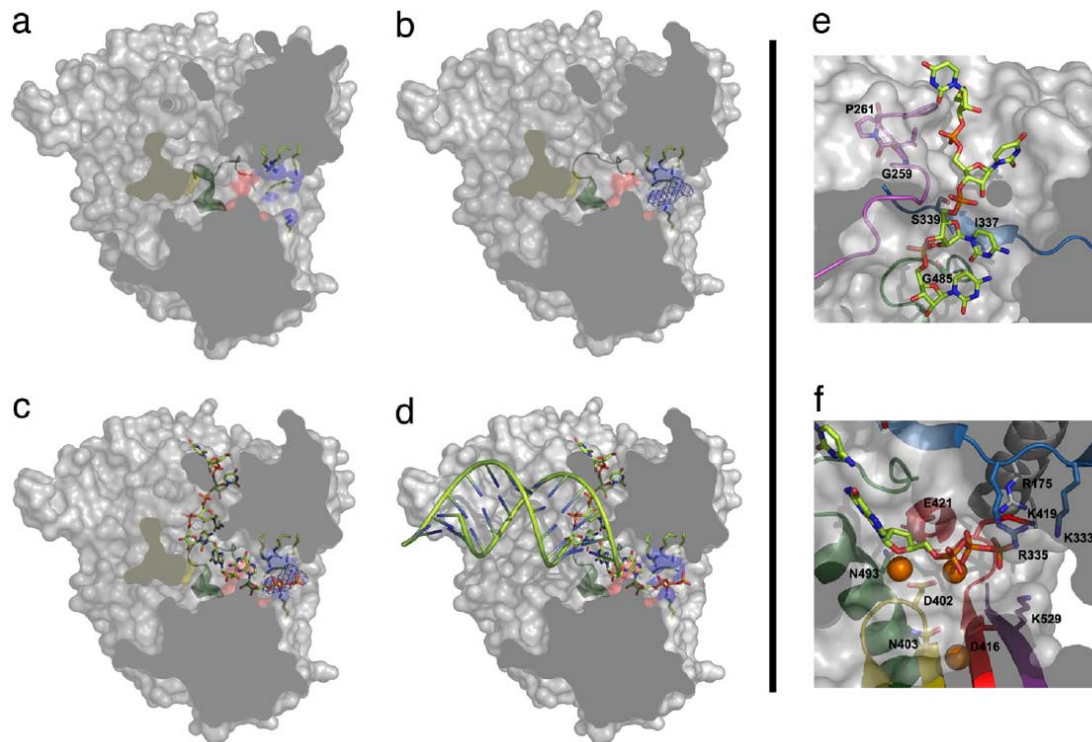
### 5.3.3 Modelo hipotético de unión de RNA y polimerización

La estructura de la proteína VP1 se determinó en ausencia de RNA. Sin embargo el elevado grado de homología estructural observado entre la proteína VP1 y las polimerasas de  $\phi 6$  y FMDV, las cuales se han cristalizado en presencia de diferentes sustratos (Butcher y col. 2001; Ferrer-Orta y col. 2004), facilitan la superposición del molde y los nucleótidos entrantes en el sitio activo de la polimerasa VP1, es más, debido a que la protrusión C-terminal de VP1 también se encuentra en la RpRd de  $\phi 6$ , hemos utilizado el complejo de iniciación  $\phi 6$  – RNA como modelo comparativo (Figura 40). El acoplamiento de este modelo permite la identificación de los residuos de VP1 que se encuentran próximos a los ligandos, revelando que muchos de los residuos conservados en las polimerasas de birnavirus se encuentran en posición para interactuar con los sustratos de RNA. Muchos de estos posibles residuos se encuentran también conservados en FMDV y  $\phi 6$ . El motivo estructural G (residuos 252-261, con el lazo conectando la hoja  $\beta 6$  y la hélice  $\eta 4$ ), altamente conservado en la familia *Birnaviridae*, forma el canal de entrada de molde. Esta región equivalente en picornavirus contiene un residuo cis-prolina absolutamente conservado (cis-P261 en IBDV) cubriendo este surco que está precedido por una glicina absolutamente conservada (G259 en IBDV).

Experimentos realizados con mutantes puntuales de la RpRd de FMDV y poliovirus revelaron el papel crítico de estos residuos en la unión del molde y el transporte de ácidos nucleicos durante la síntesis (Thompson y col. 2004; Arias y col. 2005). La RpRd de  $\phi 6$  posee también una cis-prolina en una posición equivalente pero carece de la glicina adyacente. Las similitudes estructurales de la región que contiene el motivo G, tanto en picornavirus, birnavirus como en el

bacteriofago  $\phi 6$  sugieren un modo de unión de molde y traslocación de RNA parecido en las tres familias de virus.

El modelo de acoplamiento muestra como los dos iones  $Mg^{2+}$  que se unen al sitio activo de la polimerasa en el complejo VP1- $Mg^{2+}$  están en buena posición para unir el rNTP entrante. Los residuos básicos de la hélice  $\alpha 5$  y el motivo F se encuentran en una posición ideal para interactuar con los fosfatos negativamente cargados del nucleótido entrante. En nuestro modelo, las cadenas laterales de E421 (motivo A) y N493 (motivo B) se encuentran muy cercanas a los grupos OH2' y OH3' del rNTP. En picornavirus se ha observado que los residuos equivalentes Ay N juegan un papel crítico para la selección y unión de rNTPs (Gohara y col. 2000).



**Figura 40. Modelo de activación de la polimerasa VP1 y síntesis de RNA.** La representación del enzima (gris) se ha cortado para exponer los tres canales a través de los cuales los diferentes sustratos acceden al centro activo (superficie roja). (a) En ausencia de VP3, el lazo B (cinta verde) tapa parcialmente el sitio de unión del molde. (b) VP3 (malla azul) accede al centro activo a través del túnel de acceso de los NTPs y se producen los cambios conformacionales en el lazo B. (c) Al entrar el molde debe salir la proteína VP3 para dejar entrar a los NTPs. (d) Tras la catálisis del primer enlace fosfodiéster, el dúplex RNA de nueva síntesis sale por el túnel desplazando el C-terminal de la proteína VP1 (superficie amarilla). (e) Modelo de interacción VP1-RNA. El motivo G (rosa) forma la entrada del canal del molde. Los residuos I337 y S339 del motivo F (azul) en el dominio *dedos* y G485 del motivo B (verde) en la

*palma* estabilizan la primera base del molde. (f) Los motivos mostrados en esta figura estabilizan el nucleótido entrante. Las bolas naranjas son los iones  $Mg^{2+}$  coordinados por los residuos D402 (amarillo), D416 y E421 (rojo).

El modelo muestra además cómo la región C-terminal de VP1 ( $\alpha 19$ – $\eta 10$ – $\eta 11$ ) impide la salida del dsRNA naciente. Cuando se forme el primer enlace fosfodiéster, debe de producirse un reordenamiento conformacional para permitir el proceso de elongación del RNA.

## 5.4 Relaciones evolutivas

Las sorprendentes similitudes estructurales entre la polimerasa 3D de FMDV y la polimerasa VP1 de IBDV sugieren un vínculo evolutivo directo entre las polimerasas de picornavirus y birnavirus. Esta similitud no termina aquí sino que ambas polimerasas ceban la síntesis de RNA con una proteína (VPg) que fue descubierta originalmente en picornavirus y todos los virus similares a picornavirus pueden usar este mecanismo.

En birnavirus, una fracción de la cantidad total de moléculas de replicasa que hay en el virión (Luque y col. 2009b) se encuentran unidas al extremo 5' del genoma dsRNA y se usan como cebador (Xu y col. 2004).

Los análisis computacionales indican que los dominios *palma*, (canónicos y permutados), se originaron vía permutación circular de un ancestro común (Gorbalenya y col. 2002). La aplastante sobrerrepresentación de la palma canónica (dominio de la *palma*) en las RpRd actuales sugiere que quizá originariamente las polimerasas tenían una organización no canónica y un único evento de permutación circular (Pan y col 1993) habría dado lugar al ensamblaje del dominio *palma* canónico, probablemente mucho más eficiente, que se habría fijado y diseminado a través del mundo de los virus. De acuerdo con esta hipótesis, la RpRd no canónica de birnavirus y tetravirus podría ser considerada un fósil molecular.

La característica biológica más destacable de los birnavirus es la ausencia de un núcleo transcripcional interno, elemento esencial de las partículas de virus dsRNA con fase extracelular en su ciclo vital (Bottcher y col. 1997). Recientemente se ha propuesto que los virus dsRNA actuales podrían haber evolucionado a partir de un hipotético precursor de birnavirus (que aportaría la cápsida T=13) y un ancestro de totivirus (que aportaría el núcleo transcripcional interno T=2) (Coulibaly y col. 2005). Datos previos sustentan el hecho de que la proteína VP3, aunque incapaz de ensamblarse en estructuras icosaédricas, podría adoptar el papel de los núcleos transcripcionales T=2, proveyendo de un andamiaje para el ensamblaje de la partícula

T=13 (Saugar y col. 2005) y evitando la detección del dsRNA viral por parte de los sensores celulares. Los datos descritos en la presente memoria sugieren que además de su papel estructural, la proteína VP3 juega un importante papel interaccionando con la proteína VP1 y regulando su actividad polimerasa.



## *6 Conclusiones*







1. Las proteínas de fusión his-VP1 e his-VP3 expresadas en células de insecto, sufren procesamiento proteolítico, dando como resultado la aparición de dos especies moleculares de cada proteína. Este hecho imposibilita la realización de estudios de cristalización. La generación de versiones truncadas de ambas proteínas, denominadas his-VP1  $\Delta$ 846-879 e his-VP3  $\Delta$ 222-258, carentes de las regiones de baja complejidad de los extremos C-terminales, permite purificar una única especie molecular de ambas proteínas, facilitando la realización de estudios de cristalización.
2. La resolución de la estructura atómica de la proteína VP1 nos ha permitido demostrar la permutación de los dominios de secuencia del dominio *palma* con respecto a las polimerasas canónicas. Esta reorganización mantiene los residuos del centro activo de la polimerasa, que en este caso incluyen la secuencia ADN en vez de la secuencia GDD de las RpRd canónicas, en la posición correcta para la catálisis. Las alteraciones estructurales observadas dan como resultado una diferente disposición de la región que precede a la hélice  $\alpha$ 13, denominada lazo B. Este lazo B se introduce en el centro activo de la polimerasa bloqueando el acceso al mismo del molde y los nucleótidos.
3. La resolución de su estructura atómica demuestra que la proteína VP3 forma un dímero, cada uno de cuyos monómeros está compuesto por dos dominios de tres alfa-hélices unidas por una bisagra flexible. El primer dominio de VP3 no tiene homólogos estructurales por lo que debe ser considerado un nuevo polipéptido huérfano. El segundo dominio de VP3 tiene una similitud estructural significativa con los factores de regulación de la transcripción  $\sigma$ 70 de *Thermus thermophilus* y Set2 de la histona H3 metil transferasa. La arquitectura general del dímero de VP3 comparte muchas características con las proteínas que presentan el llamado intercambio de dominios.
4. La región C-terminal de la proteína VP3 está implicada en la interacción de VP3 con el dsRNA y ssRNA virales. El tamaño mínimo de dsRNA, necesario para que la proteína VP3 interactúe con él, está comprendido entre 14 y 25 pb.
5. Los ensayos llevados a cabo *in vitro* demuestran que la interacción de la proteína VP1 con el péptido del extremo C-terminal de la proteína VP3, provoca un cambio conformacional que desbloquea el acceso al centro activo de la polimerasa, aumentando la actividad de la misma hasta tres veces. La interacción con la proteína VP3 completa aumenta hasta 5 veces la actividad catalítica de la proteína VP1.



## *7 Bibliografía*





- (1994). Collaborative computational project N. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-763.
- Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K. y Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* **7**(11), 1417-1426.
- Ahlquist, P. (2005). Virus evolution: fitting lifestyles to a T. *Curr Biol* **15**(12), R465-467.
- Antin, P. B. y Ordahl, C. P. (1991). Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol* **143**(1), 111-121.
- Arias, A., Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Perez-Luque, R., Airaksinen, A., Brocchi, E., Domingo, E., Verdaguer, N. y Escarmis, C. (2005). Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J Mol Biol* **353**(5), 1021-1032.
- Behrens, S. E., Tomei, L. y De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J* **15**(1), 12-22.
- Bell, C. E., Frescura, P., Hochschild, A. y Lewis, M. (2000). Crystal structure of the lambda repressor C-terminal domain provides a model for cooperative operator binding. *Cell* **101**(7), 801-811.
- Bennett, M. J., Choe, S. y Eisenberg, D. (1994). Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8), 3127-3131.
- Birghan, C., Mundt, E. y Gorbalenya, A. E. (2000). A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J* **19**(1), 114-123.
- Borukhov, S. y Nudler, E. (2003). RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Curr Opin Microbiol* **6**(2), 93-100.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Kozlov, S., Makhovskaya, O. V., Tropea, J. E., Gustchina, A., Rotanova, T. V. y Wlodawer, A. (2005). Atomic-resolution crystal structure of the proteolytic domain of *Archaeoglobus fulgidus* lon reveals the conformational variability in the active sites of lon proteases. *J Mol Biol* **351**(1), 144-157.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Tropea, J. E., Khalatova, A. G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Wlodawer, A. y Gustchina, A. (2004). The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J Biol Chem* **279**(9), 8140-8148.
- Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. y Crowther, R. A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* **71**(1), 325-330.

Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R. A. y Vakharia, V. N. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol* **75**(24), 11974-11982.

Brautigam, C. A. y Steitz, T. A. (1998). Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* **8**(1), 54-63.

Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M. y Paciorek, W. (2003). Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 11), 2023-2030.

Bruenn, J. A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **31**(7), 1821-1829.

Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H. y Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* **410**(6825), 235-240.

Casanas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., Gonzalez, D., Rodriguez, J. F. y Verdaguer, N. (2008). Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure* **16**(1), 29-37.

Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. y Carrascosa, J. L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol* **75**(22), 10815-10828.

Cohen, J. (1975). Ribonucleic acid polymerase activity in purified infectious pancreatic necrosis virus of trout. *Biochem Biophys Res Commun* **62**(3), 689-695.

Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. y Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* **120**(6), 761-772.

Chance, R. E., Kroeff, E. P., Hoffmann, J. A. y Frank, B. H. (1981). Chemical, physical, and biologic properties of biosynthetic human insulin. *Diabetes Care* **4**(2), 147-154.

Chang, H. W., Watson, J. C. y Jacobs, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11), 4825-4829.

Chao, J. A., Lee, J. H., Chapados, B. R., Debler, E. W., Schneemann, A. y Williamson, J. R. (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nat Struct Mol Biol* **12**(11), 952-957.

Chayen, N. E. (1998). Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**(Pt 1), 8-15.

- Chayen, N. E. (2004). Turning protein crystallisation from an art into a science. *Curr Opin Struct Biol* **14**(5), 577-583.
- Chayen, N. E. y Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods* **5**(2), 147-153.
- Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J. y Delmas, B. (2005). Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol* **79**(19), 12253-12263.
- Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. y Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* **76**(5), 2384-2392.
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. y Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* **76**(5), 2393-2402.
- Derewenda, Z. S. (2004). The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods* **34**(3), 354-363.
- di Guan, C., Li, P., Riggs, P. D. y Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**(1), 21-30.
- Dobos, P. (1993). In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology* **193**(1), 403-413.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. y Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* **32**(2), 593-605.
- Doublet, S. y Ellenberger, T. (1998). The mechanism of action of T7 DNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol* **8**(6), 704-712.
- Ducruix, A. y Giegé, R. (1999). Crystallization of nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. *Oxford University Press. Oxford* **2nd edition**.
- Dulbecco, R. y Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**(3), 396-397.
- Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. A. y Dobos, P. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* **181**(2), 541-552.
- Earl, P. L., Moss, B., Wyatt, L. S. y Carroll, M. W. (2001). Generation of recombinant vaccinia viruses. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 16**, Unit 16 17.
- Falkner, F. G. y Moss, B. (1988). Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* **62**(6), 1849-1854.

Falkner, F. G. y Moss, B. (1990). Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J Virol* **64**(6), 3108-3111.

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L. A., Eds. (2005). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, California, Academic Press.

Feldman, A. R., Lee, J., Delmas, B. y Paetzel, M. (2006). Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J Mol Biol* **358**(5), 1378-1389.

Fernández-Arias, A., Martínez, S. y Rodríguez, J. F. (1997). The Major Antigenic Protein of Infectious Bursal Disease Virus, VP2, Is an Apoptotic Inducer. *J. Virol.* **71**(10), 8014-8018.

Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. y Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol* **79** ( Pt 5), 1047-1054.

Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmis, C. y Verdaguer, N. (2006). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 27-34.

Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. y Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem* **279**(45), 47212-47221.

Gallagher, T. M. y Rueckert, R. R. (1988). Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J. Virol.* **62**(9), 3399-3406.

Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J. y Delmas, B. (2007). Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem.***282**(28),20774-20784.

García-Ruiz, J. M. y Ng, J. D. (2007). Counterdiffusion capillary crystallization for high-throughput applications. *Protein Crystallization Strategies for Structural Genomics (International University Line, La Jolla, California)*, 111-126.

Gardner, H., Kerry, K., Riddle, M., Brouwer, S. y Gleeson, L. (1997). Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature* **387**(6630), 245.

Garriga, D., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Castón, J. R. y Rodríguez, J. F. (2006). The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J. Virol.* **80**(14), 6895-6905.



- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. y Riggs, A. D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(1), 106-110.
- Gohara, D. W., Crotty, S., Arnold, J. J., Yoder, J. D., Andino, R. y Cameron, C. E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs A and B. *J Biol Chem* **275**(33), 25523-25532.
- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddiam, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. y Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol* **324**(1), 47-62.
- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Kollner, B. y Mundt, E. (1997). A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol* **71**(11), 8879-8885.
- Hagen, M., Tiley, L., Chung, T. D. y Krystal, M. (1995). The role of template-primer interactions in cleavage and initiation by the influenza virus polymerase. *J Gen Virol* **76** ( Pt 3), 603-611.
- Hansen, C. y Quake, S. R. (2003). Microfluidics in structural biology: smaller, faster em leader better. *Curr Opin Struct Biol* **13**(5), 538-544.
- Hjalmarsson, A., Carlemalm, E. y Everitt, E. (1999). Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol* **73**(4), 3484-3490.
- Holm, L. y Sander, C. (1995). Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci* **20**(11), 478-480.
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. y Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**(5394), 1669-1675.
- Hudson, P. J., McKern, N. M., Power, B. E. y Azad, A. A. (1986). Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res* **14**(12), 5001-5012.
- Hutvagner, G. y Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1), 22-32.
- Irigoyen, N., Garriga, D., Navarro, A., Verdaguer, N., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2009). Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J Biol Chem*.

Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. y Boyer, H. W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**(4321), 1056-1063.

Ivanov, D., Stone, J. R., Maki, J. L., Collins, T. y Wagner, G. (2005). Mammalian SCAN domain dimer is a domain-swapped homolog of the HIV capsid C-terminal domain. *Mol Cell* **17**(1), 137-143.

Ivanov, D., Tsodikov, O. V., Kasanov, J., Ellenberger, T., Wagner, G. y Collins, T. (2007). Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11), 4353-4358.

Jablonski, S. A. y Morrow, C. D. (1995). Mutation of the aspartic acid residues of the GDD sequence motif of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase results in enzymes with altered metal ion requirements for activity. *J Virol* **69**(3), 1532-1539.

Jacobs, B. L. y Langland, J. O. (1998). Reovirus sigma 3 protein: dsRNA binding and inhibition of RNA-activated protein kinase. *Curr Top Microbiol Immunol* **233**(Pt 1), 185-196.

Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**(1), 8-11.

Joyce, C. M. y Steitz, T. A. (1994). Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **63**, 777-822.

Kamer, G. y Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res* **12**(18), 7269-7282.

Kao, C. C., Singh, P. y Ecker, D. J. (2001). De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology* **287**(2), 251-260.

Kaufer, I. y Weiss, E. (1980). Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun* **27**(2), 364-367.

Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. y Russell, R. G. (1988). Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* **69**, 1757-1775.

Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. y Russell, R. G. (1988). Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells. *Avian Dis* **32**(2), 298-303.

Kochan, G., González, D. y Rodríguez, J. F. (2003). Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol* **148**(4), 723-744.

Koonin, E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **72** ( Pt 9), 2197-2206.

Koonin, E. V., Senkevich, T. G. y Dolja, V. V. (2006). The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct* **1**, 29.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-685.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. y McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* **11**(2), 187-193.
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y. y Wang, A. H. (2006). Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: Implications in virion assembly and immunogenicity. *J. Struct. Biol.* **155**(1), 74-86.
- Lee, J., Feldman, A. R., Delmas, B. y Paetzel, M. (2007). Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction. *J Biol Chem.* **282**(34), 24928-24937.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C. y Delmas, B. (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol* **81**(Pt 4), 983-992.
- Lemaire, P. A., Anderson, E., Lary, J. y Cole, J. L. (2008). Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *J Mol Biol* **381**(2), 351-360.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F. y Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* **6**(10), 937-943.
- Liu, J. y Tsai, M. D. (2001). DNA polymerase beta: pre-steady-state kinetic analyses of dATP alpha S stereoselectivity and alteration of the stereoselectivity by various metal ions and by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **40**(30), 9014-9022.
- Liu, M. y Vakharia, V. N. (2006). Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol* **80**(7), 3369-3377.
- Lohmann, V., Korner, F., Herian, U. y Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* **71**(11), 8416-8428.
- Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. y Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol* **73**(8), 6973-6983.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernández-Arias, A. y Rodríguez, J. F. (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* **277**(2), 345-357.

- Lorber, B., Theobald-Dietrich, A., Charron, C., Sauter, C., Ng, J. D., Zhu, D. W. y Giege, R. (2002). From conventional crystallization to better crystals from space: a review on pilot crystallogenesis studies with aspartyl-tRNA synthetases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 10 Pt 1), 1674-1680.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. y Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* **67**(8), 4566-4579.
- Luo, Y., Pfuetzner, R. A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E. A., Cherney, M., Kim, B., Little, J. W. y Strynadka, N. C. (2001). Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* **106**(5), 585-594.
- Luque, D., Saugar, I., Rejas, M. T., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2009a). Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol* **386**(3), 891-901.
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2009b). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7), 2148-2152.
- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J. F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martin, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. y Caston, J. R. (2007). Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol* **81**(13), 6869-6878.
- Magyar, G., Chung, H. K. y Dobos, P. (1998). Conversion of VP1 to VPg in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **245**(1), 142-150.
- Maraver, A., Clemente, R., Rodríguez, J. F. y Lombardo, E. (2003a). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.* **77**(4), 2459-2468.
- Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J. A., Castón, J. R., Pazos, F. y Rodríguez, J. F. (2003b). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* **77**(11), 6438-6449.
- Martínez-TorreCuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* **278**(2), 322-331.
- Matsuda, S., Kawano, G., Itoh, S., Mitsui, Y. y Iitaka, Y. (1986). Crystallization and preliminary X-ray studies of recombinant murine interferon-beta. *J Biol Chem* **261**(34), 16207-16209.
- McPherson, A. (1982). Preparation and Analysis of Protein Crystals. **Wiley Interscience, New York, N.Y.**

- McPherson, A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY*.
- Miller, D. L., Kung, H., Staehelin, T. y Pestka, S. (1981a). The crystallization of recombinant human leukocyte interferon A. *Methods Enzymol* **79**(Pt B), 3-7.
- Miller, D. L., Kung, H. F. y Pestka, S. (1982b). Crystallization of recombinant human leukocyte interferon A. *Science* **215**(4533), 689-690.
- Min, J. Y. y Krug, R. M. (2006). The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18), 7100-7105.
- Mindich, L. (2004). Packaging, replication and recombination of the segmented genome of bacteriophage Phi6 and its relatives. *Virus Res* **101**(1), 83-92.
- Mooney, R. A., Darst, S. A. y Landick, R. (2005). Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol Cell* **20**(3), 335-345.
- Morgan, M. M., Macreadie, I. G., Harley, V. R., Hudson, P. J. y Azad, A. A. (1988). Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology* **163**(1), 240-242.
- Muller, H. y Nitschke, R. (1987). Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **176**(2), 113-121.
- Muller, H., Scholtissek, C. y Becht, H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol* **31**(3), 584-589.
- Mundt, E., Kollner, B. y Kretzschmar, D. (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* **71**(7), 5647-5651.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. y Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**(Pt 3), 240-255.
- Negash, T., al-Garib, S. O. y Gruys, E. (2004). Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet Q* **26**(2), 76-87.
- Ng, K. K., Cherney, M. M., Vazquez, A. L., Machin, A., Alonso, J. M., Parra, F. y James, M. N. (2002). Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**(2), 1381-1387.
- Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsen, L., Elmblad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T. A. y Uhlen, M. (1987). A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng* **1**(2), 107-113.

Noel, J. P., Hamm, H. E. y Sigler, P. B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP  $\gamma$  S. *Nature* **366**(6456), 654-663.

O'Reilly, E. K. y Kao, C. C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* **252**(2), 287-303.

Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Caston, J. R. y Rodriguez, J. F. (2004). The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* **322**(1), 135-142.

Otwinowski, Z. y Minor, W. (1997). Processing X-ray diffraction data collected in oscillation model. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.

Pan, J., Vakharia, V. N. y Tao, Y. J. (2007). The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18), 7385-7390.

Pan, T. y Uhlenbeck, O. C. (1993). Circularly permuted DNA, RNA and proteins--a review. *Gene* **125**(2), 111-114.

Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. y Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**(6682), 280-284.

Peat, T. S., Frank, E. G., McDonald, J. P., Levine, A. S., Woodgate, R. y Hendrickson, W. A. (1996). Structure of the UmuD' protein and its regulation in response to DNA damage. *Nature* **380**(6576), 727-730.

Petit, S., Lejal, N., Huet, J. C. y Delmas, B. (2000). Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* **74**(5), 2057-2066.

Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. y Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal* **8**(12), 3867-3874.

Porter, R. R. (1973). Structural studies of immunoglobulins. *Science* **180**(87), 713-716.  
Pusey, M. L., Liu, Z. J., Tempel, W., Praissman, J., Lin, D., Wang, B. C., Gavira, J. A. y Ng, J. D. (2005). Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. *Prog Biophys Mol Biol* **88**(3), 359-386.

Raleigh, E. A., Elbing, K., Brent, R. y (2002). Current Protocols in molecular biology: Selected Topics from Classical Bacterial Genetics, Interscience.

Realini, C., Rogers, S. W. y Rechsteiner, M. (1994). KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett* **348**(2), 109-113.

Rechsteiner, M. y Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**(7), 267-271.

- Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. y Itzhaki, L. S. (2003). The unfolding story of three-dimensional domain swapping. *Structure* **11**(3), 243-251.
- Sadler, A. J. y Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* **8**(7), 559-568.
- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**, 39-71.
- Salgado, P. S., Makeyev, E. V., Butcher, S. J., Bamford, D. H., Stuart, D. I. y Grimes, J. M. (2004). The structural basis for RNA specificity and Ca<sup>2+</sup> inhibition of an RNA-dependent RNA polymerase. *Structure* **12**(2), 307-316.
- Saugar, I., Luque, D., Oña, A., Rodríguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. y Castón, J. R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure* **13**(7), 1007-1017.
- Schneemann, A., Reddy, V. y Johnson, J. E. (1998). The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology. *Adv. Virus Res.* **50**, 381-446.
- Schnitzler, D., Bernstein, F., Muller, H. y Becht, H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* **74** ( Pt 8), 1563-1571.
- Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. y Duncan, R. (2002). Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology* **296**(2), 241-250.
- Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988b). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**(1), 31-40.
- Smith, M. C., Furman, T. C., Ingolia, T. D. y Pidgeon, C. (1988a). Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *J Biol Chem* **263**(15), 7211-7215.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. y Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**(5689), 1434-1437.
- Spies, U. y Muller, H. (1990). Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol* **71** ( Pt 4), 977-981.
- Spies, U., Muller, H. y Becht, H. (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* **8**(2), 127-140.
- Steitz, T. A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**, 231-232.

Steitz, T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* **274**(25), 17395-17398.

Steitz, T. A. y Steitz, J. A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14), 6498-6502.

Tacken, M. G., Peeters, B. P., Thomas, A. A., Rottier, P. J. y Boot, H. J. (2002). Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol* **76**(22), 11301-11311.

Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L. y Peeters, B. P. (2000). Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol* **81**(Pt 1), 209-218.

Tacken, M. G., Thomas, A. A., Peeters, B. P., Rottier, P. J. y Boot, H. J. (2004). VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Arch Virol* **149**(11), 2245-2260.

Tao, Y., Farsetta, D. L., Nibert, M. L. y Harrison, S. C. (2002). RNA synthesis in a cage--structural studies of reovirus polymerase lambda3. *Cell* **111**(5), 733-745.

Thomas, B. R., Vekilov, P. G. y Rosenberger, F. (1998). Effects of microheterogeneity in hen egg-white lysozyme crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**(Pt 2), 226-236.

Thompson, A. A. y Peersen, O. B. (2004). Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Embo J* **23**(17), 3462-3471.

Tompa, P., Szasz, C. y Buday, L. (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* **30**(9), 484-489.

van den Berg, T. P., Etteradossi, N., Toquin, D. y Meulemans, G. (2000). Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech* **19**(2), 509-543.

van Loon, A. A., de Haas, N., Zeyda, I. y Mundt, E. (2002). Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J Gen Virol* **83**(Pt 1), 121-129.

Vassilyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S. y Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **417**(6890), 712-719.

Vazquez, A. L., Alonso, J. M. y Parra, F. (2000). Mutation analysis of the GDD sequence motif of a calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **74**(8), 3888-3891.



- Villareal, L. P. (2004). Are viruses alive? *Sci Am* **291**, 100-105.
- Vojnic, E., Simon, B., Strahl, B. D., Sattler, M. y Cramer, P. (2006). Structure and carboxyl-terminal domain (CTD) binding of the Set2 SRI domain that couples histone H3 Lys36 methylation to transcription. *J Biol Chem* **281**(1), 13-15.
- von Einem, U. I., Gorbalenya, A. E., Schirrmeier, H., Behrens, S. E., Letzel, T. y Mundt, E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* **85**(Pt 8), 2221-2229.
- Ward, G. A., Stover, C. K., Moss, B. y Fuerst, T. R. (1995). Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6773-6777.
- Ward, K. B., Perozzo, M. A. y Zuk, W. M. (1988). Automated preparation of protein crystals using laboratory robotics and automated visual inspection. *J. Cryst. Growth* **90**, 325-339.
- Wright, H. T. (1991). Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins. *Protein Eng* **4**(3), 283-294.
- Xu, H. T., Si, W. D. y Dobos, P. (2004). Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* **322**(1), 199-210.
- Yamaguchi, T., Setiyono, A., Kobayashi, M., Takigami, S., Fukushi, H. y Hirai, K. (2000). Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian Dis* **44**(2), 284-290.
- Yao, K., Goodwin, M. A. y Vakharia, V. N. (1998). Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J Virol* **72**(4), 2647-2654.
- Zhu, H., Domingues, F. S., Sommer, I. y Lengauer, T. (2006). NOXclass: prediction of protein-protein interaction types. *BMC Bioinformatics* **7**(27).
- Zlotnick, A., Reddy, V. S., Dasgupta, R., Schneemann, A., Ray, W. J., Jr., Rueckert, R. R. y Johnson, J. E. (1994). Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue. *J. Biol. Chem.* **269**(18), 13680-13684.



*8 Publicaciones*





# Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase

Damià Garriga\*, Aitor Navarro<sup>†‡</sup>, Jordi Querol-Audí\*, Fernando Abaitua<sup>†§</sup>, José F. Rodríguez<sup>†</sup>, and Núria Verdaguer\*<sup>¶</sup>

\*Institut de Biologia Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parc Científic de Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Spain; and <sup>†</sup>Department of Molecular and Cell Biology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Darwin Number 3, 28049 Madrid, Spain

Edited by Charles M. Rice III, The Rockefeller University, New York, NY, and approved October 22, 2007 (received for review May 11, 2007)

**Two lineages of viral RNA-dependent RNA polymerases (RDRPs) differing in the organization (canonical vs. noncanonical) of the palm subdomain have been identified. Phylogenetic analyses indicate that both lineages diverged at a very early stage of the evolution of the enzyme [Gorbalenya AE, Pringle FM, Zeddam JL, Luke BT, Cameron CE, Kalmakoff J, Hanzlik TN, Gordon KH, Ward VK (2002) *J Mol Biol* 324:47–62]. Here, we report the x-ray structure of a noncanonical birnaviral RDRP, named VP1, in its free form, bound to Mg<sup>2+</sup> ions, and bound to a peptide representing the polymerase-binding motif of the regulatory viral protein VP3. The structure of VP1 reveals that the noncanonical connectivity of the palm subdomain maintains the geometry of the catalytic residues found in canonical polymerases but results in a partial blocking of the active site cavity. The VP1–VP3 peptide complex shows a mode of polymerase activation in which VP3 binding promotes a conformational change that removes the steric blockade of the VP1 active site, facilitating the accommodation of the template and incoming nucleotides for catalysis. The striking structural similarities between birnavirus (dsRNA) and the positive-stranded RNA picornavirus and calicivirus RDRPs provide evidence supporting the existence of functional and evolutionary relationships between these two virus groups.**

birnavirus replication | infectious bursal disease virus | noncanonical palm | virus evolution | double-stranded RNA viruses

**P**alm-based nucleotide polymerases comprise the largest family of template-dependent polynucleotide polymerases. The palm subdomain, considered a vestige of the ancestral protein polymerase (1), is found in polymerases from all extant RNA and relict (DNA and RNA) viruses. Within viral RNA-dependent RNA polymerases (RDRPs), two different lineages have been identified differing in a sequence permutation of the palm subdomain. Both lineages diverged at a very early stage of evolution of the enzyme as indicated by phylogenetic analyses (2). Permuted RDRPs belong to an ancient lineage, exclusively found in the dsRNA birnaviruses and in two members of the Tetraviridae family having a positive-stranded RNA genome.

Infectious bursal disease virus (IBDV), an immunosuppressive avian pathogen (3), is the best characterized member of the Birnaviridae family. This family groups single-shelled icosahedral (triangulation number  $T = 13$ ) viruses with dsRNA bipartite genomes (4). Birnaviruses exhibit a series of structural and biological features, the most conspicuous one being the lack of an internal transcriptional core (5), that clearly differentiate them from the rest of the dsRNA viruses.

The IBDV RDRP (97.5 kDa) is encoded by the smaller genomic segment (segment B) (6). The RDRP forms part of a ribonucleoprotein complex that also includes the scaffolding polypeptide (VP3) and the virus genome (7). Although a fraction of the RDRP molecules are covalently linked to the 5' end of the dsRNA virus genome segments (8), its encapsidation requires the formation of a complex with VP3 (9).

The structure of the IBDV RDRP, unbound form, has been recently determined (10). Here, we report the crystal structures

of the IBDV polymerase in its apo form and bound to Mg<sup>2+</sup> ions and to a peptide, containing the polymerase binding motif of protein VP3 (11), at resolutions of 2.4 and 3.1 and 2.7 Å, respectively. The comparison of the different structures determined reveals that the permuted topology of the VP1 palm results in unique structural properties that have consequences in the regulation of the enzyme activity.

## Results and Discussion

**Overall Structure of IBDV VP1 and Comparison with Other RDRPs.** The structure of a recombinant version of the infectious bursal disease virus RDRP, VP1 (residues 1–845), was determined by combining phases from multiwavelength anomalous dispersion of a Samarium derivative at 3.8-Å resolution and molecular replacement, using native data to 2.4 Å [see *Methods* and *supporting information* (SI) Table 1].

VP1 folds into a compact unit with a roughly oval shape (dimensions 95 × 55 × 54 Å<sup>3</sup>). The polypeptide chain is organized in 37 helices (25  $\alpha$ -helices and 12 helices 3<sub>10</sub>) and 17  $\beta$ -strands, and can be divided into three domains by comparison with other viral RDRPs (12): (i) the central polymerase domain (residues 169–657) containing the classical “fingers,” “palm” and “thumb” subdomains found in all other polynucleotide polymerases (13), (ii) an N-terminal domain (residues 1–168), surrounding the central polymerase domain, which bridges fingers and thumb on one side of the catalytic cleft, and (iii) a horseshoe shaped C-terminal domain (residues 658–845) extending through palm and fingers on the other side (Fig. 1).

The first 26 residues of VP1 are disordered and not visible in the structure. Residues 26–32 point out of the polymerase core and participate in crystal packing interactions. The remainder of the domain, residues 33–168, is organized in four  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ 1 to  $\alpha$ 4), one 3<sub>10</sub> helix ( $\eta$ 1), four  $\beta$ -strands ( $\beta$ 1 to  $\beta$ 4), and three long loops, covering one side of the active site cleft. Extensive interactions between the N-terminal helices  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4 and helices  $\alpha$ 17 and  $\alpha$ 18 of the thumb subdomain are critical for the close conformation of the VP1 polymerase (Fig. 1*a*).

The central polymerase domain of VP1 shows all structural motifs characteristic of RNA-dependent RNA polymerases,

Author contributions: D.G. and A.N. contributed equally to this work; J.F.R. and N.V. designed research; D.G., A.N., and J.Q.-A. performed research; A.N. and F.A. contributed new reagents/analytic tools; D.G., J.Q.-A., J.F.R., and N.V. analyzed data; and J.F.R. and N.V. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The atomic coordinates have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID codes 2PUS, 2QJ1, 2R70, and 2R72).

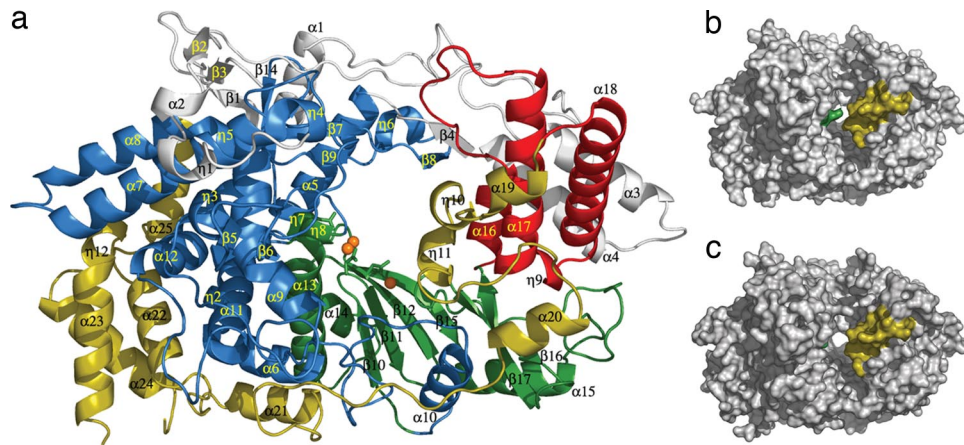
<sup>†</sup>Present address: Kapsid Link S.L., Alcalá 420, 28017 Madrid, Spain.

<sup>§</sup>Present address: Marie Curie Research Institute, The Chart, Oxted, Surrey RH8 OTL, United Kingdom.

<sup>¶</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: nvmcri@ibmb.csic.es.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0704447104/DC1](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0704447104/DC1).

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA



**Fig. 1.** Structure of VP1 polymerase of IBDV. (a) View of a ribbon diagram showing the secondary structural elements explicitly labeled as follows: the N-terminal domain (gray) is folded in five helices ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$  and the  $3_{10}$  helix  $\eta 1$ ), four  $\beta$ -strands ( $\beta 1$ – $\beta 4$ ), and three long loops. The VP1 fingers (blue) are organized in two regions. The first region is the inner fingers, consisting primarily of helices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ , and  $\alpha 12$  surrounding and packed against the palm subdomain. The second region is the outer fingers, which include the following: (i) a five-stranded  $\beta$ -sheet ( $\beta 1$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 9$ ,  $\beta 13$ ,  $\beta 14$ ), with  $\beta 1$  contributed by the N-terminal domain, surrounded by a surface of exposed helices ( $\eta 4$ ,  $\eta 5$ ,  $\alpha 7$ , and  $\alpha 8$ ); (ii) an adjacent region formed by helix  $\eta 3$  and the  $\beta$ -hairpin  $\beta 5$ – $\beta 6$  pointing out of the central cavity of the polymerase; and (iii) a loop formed by  $\beta 8$  and  $\eta 6$  (residues 321–335), which effectively extends toward the thumb domain. The palm subdomain (green) consists of a four-stranded  $\beta$ -sheet ( $\beta 10$ ,  $\beta 11$ ,  $\beta 12$ , and  $\beta 15$ ) flanked by two  $\alpha$ -helices ( $\alpha 13$  and  $\alpha 14$ ) and followed by an additional helix  $\alpha 15$  and a long loop connecting the  $\beta 16$ – $\beta 17$  hairpin. The thumb subdomain (red) includes three  $\alpha$ -helices ( $\alpha 16$ ,  $\alpha 17$ , and  $\alpha 18$ ) connected by long loops. Finally, the C-terminal domain (yellow; residues 671–804) includes four helices ( $\alpha 19$ ,  $\eta 10$ ,  $\eta 11$ , and  $\alpha 20$ ), next to the thumb, followed by six  $\alpha$ -helices ( $\alpha 21$ – $\alpha 25$  and  $\eta 12$ ), close to fingers that are connected by a long and flexible loop. (b) Surface representation of the IBDV VP1 in its apo form, showing the central cleft, which is partially covered by two protrusions that project from the B loop (green) and the  $\alpha 19$ – $\eta 10$ – $\eta 11$  region (yellow) at the C-terminal domain. (c) Surface representation of the IBDV VP1 when complexed with the VP3 derived peptide.

involved in the following: nucleotide recognition and binding (A, B, and F), phosphoryl transfer (A and C), structural integrity of the palm (D), priming nucleotide binding (E), and template binding (B, F, and G) (Fig. 2 and SI Fig. 5). The overall architecture of this domain is strikingly similar to those of positive-strand RNA picorna- and caliciviruses (12, 14, 15) (SI Table 2 and Fig. 2).

The C-terminal domain of IBDV VP1 includes helices  $\alpha 19$ ,  $\eta 10$ ,  $\eta 11$ , and  $\alpha 20$ , close to the thumb subdomain, followed by five  $\alpha$ -helices ( $\alpha 21$  to  $\alpha 25$ ) tightly packed against the fingers. All of these helices are connected by long loops (Fig. 1a). The  $\alpha 19$ ,  $\eta 10$ ,  $\eta 11$  region, forms a protrusion that partially blocks the active site cleft (Fig. 1b). Although structurally very different, the location of the C-terminal protrusion in IBDV seems to be reminiscent of the C-terminal initiation platforms of bacteriophage  $\phi 6$  and hepatitis C virus RDRPs (16, 17).

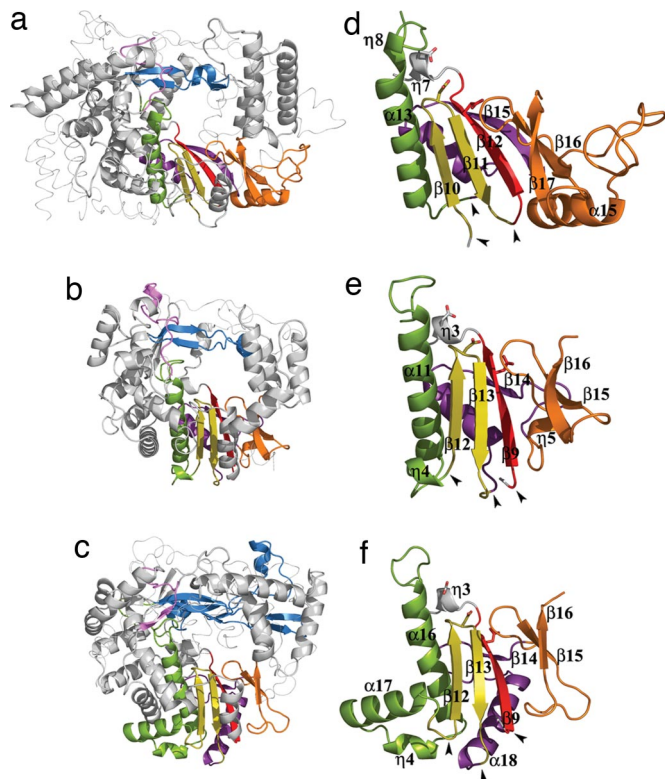
**The Noncanonical Connectivity of the VP1 Palm.** In contrast to the similarities described above, the VP1 palm exhibits an unusual permutation of the sequence motifs A, B, and C from their usual amino- to carboxyl-terminal order A–B–C to the order C–A–B. The structures determined reveal that this rearrangement, previously predicted by computational analyses (2), is compatible with the canonical spatial organization of the major secondary structural elements of the palm fold, maintaining the acidic residues of the polymerase active site in the expected position for catalysis (Figs. 1a and 2d–f). The permutation of the VP1 palm transforms the  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  fold into a new  $\beta\beta\beta\alpha\alpha\beta$  structure (Fig. 2d–f). In this structure, the central  $\beta 10$ – $\beta 11$  hairpin, containing motif C, and the strand  $\beta 12$ , containing motif A, are directly linked and disconnected from helix  $\alpha 13$  that contains motif B. These structural alterations result in a different disposition of the region immediately preceding helix  $\alpha 13$  (residues 483–490; named B loop from here on) when compared with canonical palms (Fig. 2d–f). In two of the three structures determined (VP1 apo-form and VP1– $Mg^{2+}$  complex), the B loop approaches to helix  $\eta 8$  and  $\beta 11$ – $\beta 12$  hairpin, protruding into the active site cleft, and blocking the access of the template and incoming

nucleotides. A conformational rearrangement of this region should be required to accommodate these substrates in the catalytic cavity (Fig. 1).

**The VP1– $Mg^{2+}$  Complex.** The incubation of VP1 crystals with GTP and  $MgCl_2$  resulted in the incorporation of three  $Mg^{2+}$  ions in the structure. Two of them were found in the active site, bound to the acidic residues Asp-402 (motif C), and Asp-416 and Glu-421 (motif A) in a position close to the expected for the catalytic metal ions (SI Fig. 6). The resulting side-chain organization around the metal ions is very similar to the replication complexes previously reported in canonical polymerases (16, 18, 19). The third metal ion was bound at a site  $\approx 6$  Å from the expected catalytic positions, showing a perfect octahedral coordination (SI Fig. 6). A similar finding was reported in the structure of the bacteriophage  $\phi 6$  (16) and foot-and-mouth disease virus (FMDV) (14) RDRPs. Comparison of IBDV VP1 structures obtained with and without  $Mg^{2+}$  ions did not show any global conformational change in the enzyme on metal binding. No ordered density was observed to position the GTP substrate.

**The VP1–VP3 Peptide Complex.** VP1 is enclosed within the capsid, and protein VP3 is the responsible for its encapsidation (9). VP3 also interacts with the viral genome, forming ribonucleoprotein filaments (7). The VP1-binding domain of VP3 has been mapped as the 16 C-terminal-most residues, a region rich in charged amino acids (20).

To elucidate the role of VP3 on VP1 binding, we obtained cocrystals of VP1 in complex with the peptide GRLGRWIRTVSDEDLE, representing the VP3 VP1-binding domain. Remarkably, the VP3 peptide binding induced the conformational changes in the B loop required to accommodate the template and incoming nucleotide into the catalytic cavity (Figs. 1b and c, 3, and 4). In presence of the VP3 peptide, the short helix  $\eta 8$  appears unfolded and the B loop moves  $\approx 8$  Å away from its initial position (SI Fig. 7), thus allowing the opening of the active site cavity for substrates entry. The resulting conformation of the B loop after VP3 activation is closely related to that of the

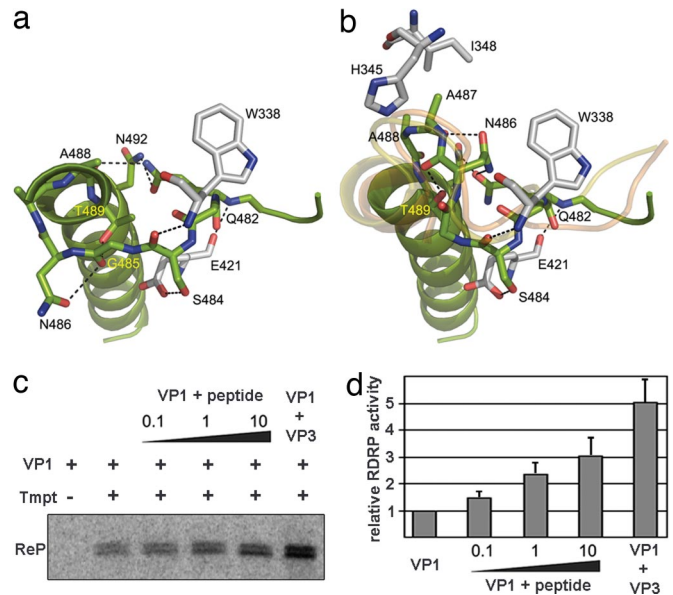


**Fig. 2.** The conserved structural polymerase motifs. (a–c) The polymerase core of IBDV VP1 (a) compared with the equivalent cores in FMDV (b) and bacteriophage  $\phi 6$  (c) RDRPs. The secondary structural elements containing the conserved motifs are colored as follows: A, red; B, green; C, yellow; D, purple; E, orange; F, blue; G, pink. The N- and C-terminal domains are shown as thin ribbons. (d–e) Structural organization of the permuted palm subdomain of IBDV VP1 (d) compared with the canonical palm subdomains of FMDV (e) and  $\phi 6$  (f) RDRPs. Side chains of the acidic residues in the polymerase catalytic sites are shown as sticks. The black arrowheads indicate positions where the backbone connectivity is broken in the canonical polymerases and reconnected in the permuted IBDV RDRP.

equivalent loop in the functional polymerases of FMDV and  $\phi 6$  (Fig. 3*b*).

The VP3 peptide appears poorly ordered in the structure of the complex. Only a weak elongated extra density was detected at the nucleotide entry tunnel (Fig. 4*b*). This density could be interpreted as due to the presence of  $\approx 5$  aa in an extended conformation. The electropositive character of this tunnel, contributed by the basic side chains of Arg-175 (helix  $\alpha 5$ ), Lys-333 and Arg-335 (motif F), Lys-419 (motif A), and Lys-529 (motif D), suggests that the visible density might correspond to the negatively charged C-terminal-most end of VP3 (amino acids DEDLE). Because this tunnel serves also for the entry of incoming ribonucleoside triphosphates (rNTPs) (Fig. 4*c*) and the exit of the pyrophosphate products, this nucleotide diffusion would probably promote the release of VP3 when the template acceptor base occupies its correct position in the catalytic cavity (Fig. 4*d*).

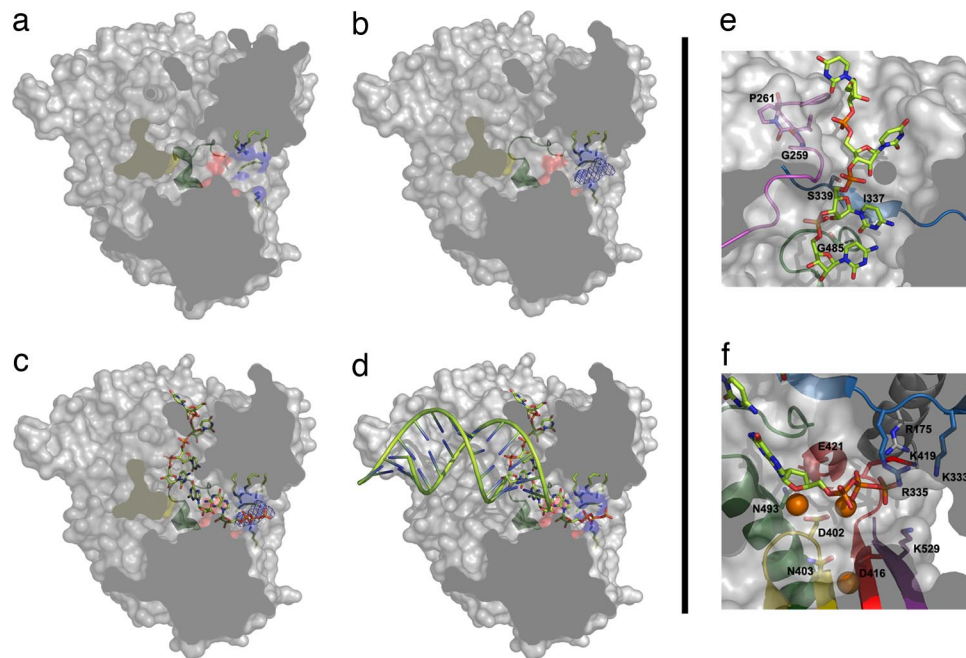
The structural observations prompted us to determine the effect of the VP3 C-terminal peptide on the catalytic activity of VP1. For this, VP1 was incubated with different peptide concentrations, and then allowed to replicate an IBDV-derived ssRNA+ template. As shown in Fig. 3*c* and *d*, preincubation of VP1 with the peptide has a significant concentration-dependent effect, reaching a 3-fold increase on VP1 catalytic activity when using 10:1 peptide/VP1 molar ratios. Higher peptide concentrations cause a drastic drop on VP1 activity (data not shown). As



**Fig. 3.** Structural rearrangements of the B loop and effects of the VP3 C-terminal peptide and the VP3 polypeptide on VP1 RDRP activity. (a and b) The closed conformation found in the structure of the isolated VP1 (a) and the open conformation found in the VP1–VP3 complex (b). The amino acids involved in intramolecular contacts that stabilize the two alternative conformations of the B loop are shown in sticks and explicitly labeled. The main chain tracing of the equivalent loop in FMDV and  $\phi 6$  RDRPs correlates well with the open conformation found in the structure of the VP1–VP3 complex (yellow and orange ribbons in *b*, respectively). (c) Purified hVP1 was preincubated with either the VP3 C-terminal peptide (peptide) or purified hVP3 (VP3). Peptide/hVP1 molar ratios were 0.1:1 (0.1), 1:1 (1), and 10:1 (10), respectively. hVP3 was used at a 2:1 hVP3/hVP1 molar ratio. Samples were supplemented (+) or not (–) with a 544-nt ssRNA+ template (Tmpt). Labeling was performed by using [ $^{32}$ P]UTP, and reaction products (ReP) were separated on 5% acrylamide TBE gels. (d) RDRP activity after preincubation with the VP3 C-terminal peptide and the VP3 polypeptide relative to VP1 alone, which was defined as 1. The mean value for each condition was obtained from three independent experiments.

expected, preincubation with purified VP3 has even higher boosting effect (up to 5-fold increase) on VP1 polymerase activity (Fig. 3*c* and *d*). These results show that, although VP3 (or the VP3 peptide) is not essential for the initiation of RNA synthesis, it promotes a major enhancement on VP1 catalytic activity *in vitro*.

**Hypothetical Model of RNA Binding and Polymerization.** The structure of VP1 was obtained in absence of RNA. However, the high degree of structural homology observed between VP1, and FMDV and  $\phi 6$  RDRPs crystallized in presence of different substrates (14, 16) facilitates the superposition of the template-primers and incoming nucleotides on the activated IBDV enzyme. Furthermore, because of the presence of C-terminal protrusions in both VP1 and  $\phi 6$  RDRPs, we have used the  $\phi 6$ –RNA initiation complex (16) as the best fitting model (Fig. 4*c*). This model docking allows the identification of the VP1 residues that come into proximity of the ligands, revealing that many strictly conserved amino acids in birnavirus polymerases are in position to interact with the RNA substrates. Most of these putative interacting residues are also conserved in FMDV and  $\phi 6$  RDRPs (SI Fig. 8). The structural motif G (residues 252–261; within the loop connecting strand  $\beta 6$  and helix  $\eta 4$ ), highly conserved in the Birnaviridae family (SI Fig. 5), forms the expected template channel entry (Fig. 4*e*). The equivalent region in picornaviruses contains a 100% conserved *cis*-Pro (equivalent to Pro-261 in IBDV, also in *cis* configuration) lining this groove



**Fig. 4.** A model for activation of the VP1 polymerase and RNA synthesis. A space-filling representation of the enzyme (gray) has been cut to expose the three channels by which the different substrates accede to the active site (red surface). (a) In the absence of VP3, the B loop (green ribbon) partially occludes the binding site of the template base. (b) VP3 accedes to the VP1 active site, through the nucleotide entry tunnel, promoting the conformational change of the B loop that opens the catalytic cavity for template entry. Side chains of basic residues forming the tunnel are shown as sticks and blue surfaces. The electron density corresponding to the visible part of the VP3 peptide is shown as a blue chicken wire. (c) Once the template acceptor base reaches the active site, a second rearrangement should occur, facilitating the exit of VP3 and the entry of rNTP substrates to the active site. (d) After the catalysis of the first phosphodiester bond and pyrophosphate release, the newly synthesized RNA can ratchet down, displacing the C-terminal region (yellow surface). This movement would allow the exit of the nascent duplex out of the polymerase active site. (e) Model of VP1-RNA interactions. The motif G (pink) forms the entry of the template channel. The position of the template acceptor base in the VP1 active site is stabilized by interactions mediated by residues Ile-337 and Ser-339 of motif F (blue) in fingers and Gly-485 of motif B (green) in the palm. (f) The position of the incoming nucleotide appears stabilized by residues Asp-402, Asn-403 (motif C; yellow), Arg-529 (motif D; purple), Lys-333, and Arg-335 (motif F; blue), and residue Arg-175 (helix  $\alpha$ 5; gray). The docking model also shows how the two  $Mg^{2+}$  ions (orange balls) that coordinate the acidic residues Asp-402 (yellow) and Asp-416 and Asp-421 (red) of the active site are in good position to bind the incoming rNTP.

that is preceded by a 100% conserved glycine (equivalent to Gly-259 in IBDV). Mutational experiments in FMDV and poliovirus revealed the critical role of these residues in template binding and nucleic acid translocation during synthesis (21, 22). The  $\phi$ 6 RDRP also has a *cis*-Pro in an equivalent position but lacks the neighboring Gly. The structural similarities of the region containing motif G in picornavirus, birnavirus, and bacteriophage  $\phi$ 6 suggest similar template binding and RNA translocation modes in the three virus families.

The docking model shows how the two  $Mg^{2+}$  ions bound to the polymerase active site in the VP1- $Mg^{2+}$  complex (SI Fig. 6) are in good position to bind the incoming rNTP (Fig. 4f). The basic residues of helix  $\alpha$ 5 and motif F are also in an ideal position to interact with the negatively charged phosphates of the incoming nucleotide (Fig. 4f). In our model, the side chains of Glu-421 (motif A) and Asn-493 (motif B) are in close proximity to both the OH2' and OH3' of the rNTP. In picornaviruses, it has been shown that equivalent Asp and Asn residues play a critical role for both rNTP selection and binding (23).

The model also shows how the VP1 C-terminal region,  $\alpha$ 19- $\eta$ 10- $\eta$ 11, impedes the exit of the nascent dsRNA product. On the formation of the first phosphodiester bond, a new conformational rearrangement would be required to allow the elongation stage of RNA synthesis (Fig. 4c and d).

**Evolutionary Relationships.** The striking structural similarities between FMDV 3D and the IBDV VP1 polymerases suggest a direct evolutionary link between picornavirus and birnavirus RDRPs. The structural similarity of the RDRPs also correlates with other similarities: Protein priming of RNA synthesis with a

special viral protein (VPg) was originally discovered in picornaviruses, and all picorna-like viruses may use this mechanism. In birnaviruses, a fraction of the replicase molecules are covalently linked to the 5' end of genome dsRNAs, and these molecules are likely to be used to prime RNA synthesis (8).

Computational analyses indicate that canonical and permuted palms originated via circular permutation from a single polypeptide ancestor (2). The overwhelming overrepresentation of canonical palms in RDRPs of current virus families, suggests that original polymerases might have possessed a noncanonical palm organization. A single circular permutation event might have led to the assembly of a somewhat more efficient canonical palm configuration that was rapidly fixed and disseminated through the virus world. According to this view, the noncanonical RDRPs of birnaviruses and tetraviruses could be considered as "living fossil" replicases.

The most remarkable biological signature of birnaviruses is the lack of an inner icosahedral ( $T = 2$ ) transcriptional core, an essential element of particles from any other dsRNA virus family with extracellular phases in their life cycles (5). It has been recently proposed that prototypical dsRNA viruses might have evolved from the merging of a birnavirus precursor (affording the  $T = 13$  capsid) and a totivirus ancestor (providing the  $T = 2$  inner core) (24). Previous data supported the notion that VP3, although incapable of assembling into icosahedral structures, effectively substitutes the  $T = 2$  core roles, providing a scaffold for  $T = 13$  particle assembly (25) and concealing the dsRNA genome from cellular sensors (7). Data presented here suggest that, in addition to the proposed structural role, VP3 plays a functional role interacting with VP1 and regulating its RDRP activity.



## Methods

**Generation of Recombinant Viruses.** A recombinant baculovirus (rBV) expressing a full-length VP1 polypeptide fused to a 6× histidine tag was generated from the plasmid pBSK/VP1 described in ref. 9. pBSK/VP1 was digested with XhoI, blunt-ended, digested with NotI, and subcloned into the transfer vector pFastBacHtc (Invitrogen) previously digested with Ehel and NotI. The resulting plasmid, pFBHtc\_VP1, was used to generate an rBV by using the Bac-to-Bac system following the manufacturers' instructions (Invitrogen). A second rBV expressing an his-tagged version of the VP1 polypeptide lacking the 34 C-terminal residues was generated from pFBHtc\_VP1. For this, a KpnI fragment from pFBHtc\_VP1 was replaced by a PCR-derived DNA fragment containing an artificial stop codon immediately downstream of codon Leu-845 of the VP1 sequence. The PCR was carried out by using pBSK/VP1 as template and the oligonucleotides 5'-CAGGGGCAAGCTGAGACAGC and 5'-GCGCGGTACCT-TAGAGAAGAGCGGCTGGACACC as primers. The DNA was purified, treated with KpnI, and inserted into KpnI-digested pFBHtc\_VP1 to produce pFBHtc\_VP1Δ846–879, which was used to generate an rBV as described above.

The vaccinia virus recombinant (rVV) VT7LacOI/hVP3 was generated and amplified as described in ref. 26. For this, African green monkey kidney epithelial BSC-1 cells (American Type Culture Collection) were infected with the rVV VT7LacOI (27), and transfected with pVOTE.2/hVP3. pVOTE.2/hVP3 was generated by subcloning a PCR-derived DNA fragment, containing the VP3 coding sequence fused to an N-terminal 6× histidine tag, into the multiple cloning site of the vector pVOTE2 (27). The PCR was performed by using plasmid pFB-Htc-VP3wt (28) as template and the oligonucleotides 5'-GCGCCATATGTCGTACTACCATCACCATCACC and 5'-CCTCTACAAATGTGG-TATGGCTG as primers. The resulting DNA fragment was purified, treated with NdeI and Sall, and inserted into pVOTE.2 digested with the same enzymes.

**Production and Purification of VP1 and VP3 Polypeptides.** HighFive cells (Invitrogen) were infected with rBVs, harvested at 72 h after infection, washed twice with PBS, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 0.1% igeal) supplemented with protease inhibitors (Complete Mini; Roche), and maintained on ice for 20 min. Thereafter, extracts were centrifuged at 13,000 × g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and subjected to metal affinity chromatography (IMAC) purification with a Ni<sup>2+</sup> affinity column (HisTrap HP; GE Healthcare). Resin-bound polypeptides were eluted with elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 250 mM imidazol). hVP1-containing fractions were pooled, dialyzed against lysis buffer lacking igeal, and subjected to a second purification round. hVP1 samples were treated with rTEV (65 μg/mg hVP1; 20 h; 20°C) and dialyzed against a 50 mM Tris, pH 8.0, and 300 mM NaCl buffer. A third Ni<sup>2+</sup> affinity column (HisTrap HP; GE Healthcare) was used to purify the untagged VP1 protein. Finally, protein samples were concentrated to a final concentration of ≈10 mg/ml by using Centricon YM-10 filters (Millipore).

The hVP3 polypeptide was expressed in BSC-1 cells infected with VT7LacOI/hVP3 in the presence of the inducer IPTG. At 48 h after infection, cultures were harvested and processed for hVP3 purification following a protocol similar to that used for hVP1.

**Crystallization and Data Collection.** Crystals of the recombinant VP1 were obtained by the vapor diffusion method in hanging drops at 20°C, by mixing equal volumes of VP1 (≈10 mg/ml) and the precipitant solution, containing 10–12% PEG3350, 0.3–0.5 M LiNO<sub>3</sub>, and a pH range between 6.5 and 8.0. Samarium derivative was prepared by soaking native crystals for 30 min in stabilizing solutions containing the crystallization buffer and 3 mM samarium (III) acetate [(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Sm·3H<sub>2</sub>O] before freezing. The VP1–GRLGRWIRTSD-EDLE complex was obtained and crystallized as follows: VP1 was mixed with the VP3-derived peptide (1:4 molar ratio) and incubated for 8 h at 4°C before the crystallization trials. Crystals were grown at 20°C from a solution containing 5% PEG3350, 0.4 M LiNO<sub>3</sub>, and 0.1 M Tris, pH 7.2. VP1–GTP–Mg<sup>2+</sup> complexes were obtained by soaking VP1 native crystals in stabilizing solutions containing 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM GTP.

Diffraction data were collected from single frozen crystals by using synchrotron radiation at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) (beamlines BM16, ID23.1, and ID14.2). All diffraction images were processed with programs MOSFLM and SCALA (29).

**Structure Determination and Refinement.** The structure was determined by using phase information from multiwavelength anomalous dispersion of a Samarium derivative (peak and remote wavelength data sets) at 3.8-Å resolution. Seven heavy atom sites were determined and refined by using program SHARP (30). Initial phases were applied to a isomorphous data set at 2.8-Å resolution and improved by solvent flattening and histogram matching with DM (29). Experimental maps allowed the automatic identification of several helical elements in the structure by using the helix recognition procedure of ARP/wARP (29). The VP1 initial model (≈400 aa as polyalanine chains) was manually built by using programs O (31) and Coot (32) by using the conserved structural motifs of FMDV and φ6 RDRPs as a guide. This model was then subjected to a preliminary refinement with REFMAC5 (33) and used as a molecular replacement model for the structure determination with AMoRe (34) of the nonisomorphous 2.4-Å native data (SI Table 1). Manual model rebuilding and sequence assignment was alternated with automatic refinement by using REFMAC5. The final model contains 781 residues of 845 in total (Fig. 1). The missing part includes the 26th N-terminal residues of VP1, two flexible regions within the loops connecting the 3<sub>10</sub> helix η1 and strand β3 (residues 85 and 90) and the α-helices α23–α24 (residues 760 and 765) and the 40 C-terminal residues (from 805 to 845). SDS/PAGE from the VP1 crystals showed that the treatment with rTEV cleaves not only the His-tag but also an additional flexible region of the VP1 protein. The N-terminal sequencing of this species showed an intact amino terminal end, indicating that the cleavage occurred within the 40 C-terminal residues not determined in the crystal structure.

The initial maps for the VP1–GTP–Mg and VP1–GRLGRWIRTSD-EDLE peptide complexes were obtained after a rigid body fitting of the coordinates of isolated VP1 to the new unit cells (SI Table 1). The final refinement cycles resulted in models with free R factors of 26%, 23%, and 25.6% for the isolated, Mg<sup>2+</sup>, and VP3 peptide complexes, respectively, and good stereochemistry (SI Table 1).

**Polymerization Assays.** VP1 polymerization assays were carried out following a protocol described in ref. 6 with minor modifications. Briefly, reaction mixtures containing 1 μg of purified hVP1 and the appropriate amount of the VP3 C-terminal peptide or purified hVP3, were prepared in 20 μl of transcription buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 4 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 0.01 mM EGTA, 20 units of RNasin, 1 mM ATP, CTP and GTP, and 0.02 mM UTP]. Samples were incubated at 20°C for 30 min, supplemented with 5 μl of ssRNA+ template (0.2 mg/ml) diluted in transcription buffer containing 10 μCi of [α-<sup>32</sup>P]UTP. After incubation at 40°C for 2 h, samples were digested with proteinase K, extracted with phenol/chloroform, ethanol-precipitated, and resuspended in 18 μl of diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated H<sub>2</sub>O. After adding 3 μl of 6× loading buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15% Ficoll 400, 50 mM EDTA, 0.4 orange G, 0.03% bromophenol blue, and 0.03% xylene cyanol), samples were heated at 65°C for 5 min, loaded onto 5% acrylamide TBE (90 mM Tris, 64.6 mM boric acid, and 2.5 mM EDTA, pH 8.3) gels. Radioactive signals were detected with a Storm gel imaging system (Molecular Dynamics). Results were analyzed and quantified with ImageQuant software (Molecular Dynamics).

The ssRNA+ template used for the assays was prepared by *in vitro* transcription, using bacteriophage T7 RNA polymerase (New England Biolabs), of a plasmid harboring a transcriptional cassette, generated by *in vitro* DNA synthesis (GenScript Corporation), formed by a 554-bp DNA fragment containing the 5' and 3' untranslated regions of IBDV segment B flanked by the T7 promoter and the hepatitis δ ribozyme sequences. After transcription, samples were digested with DNase I (Roche), extracted with phenol/chloroform, precipitated with ethanol, and resuspended in DEPC-treated H<sub>2</sub>O.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Dr. C. Vonnrhein for his help in phase determination; Dr. B. Moss (Bethesda, MD) for the VOTE expression system; and Drs. I. Fita, J. L. Carrascosa, and E. Domingo for critical reading of the manuscript. This work was supported by Ministerio de Educacion y Ciencia Grants AGL2003-07189 (to J.F.R.) and BFU2005-02376/BMC (to N.V.). D.G. and J.Q.-A were supported by I3P contracts from Consejo Superior de Investigaciones Cientificas. X-ray data were collected at the European Molecular Biology Laboratory protein crystallography beam lines BM16, ID23.1, and ID14.2 at the European Synchrotron Radiation Facility within a Block Allocation Group (Barcelona). Financial support was provided by the European Synchrotron Radiation Facility.

- Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV (2006) *Biol Direct* 1:29.
- Gorbalenya AE, Pringle FM, Zeddam JL, Luke BT, Cameron CE, Kalkmakoff J, Hanzlik TN, Gordon KH, Ward VK (2002) *J Mol Biol* 324:47–62.
- van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G (2000) *Rev Sci Tech* 19:509–543.

- Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakharia VN, Wu JL (2004) in *Virus Taxonomy*, eds Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball AL (Academic, London), pp 561–560.
- Bottcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, Perevozchikova NA, Borisov AV, Crowther RA (1997) *J Virol* 71:325–330.

6. von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, Behrens SE, Letzel T, Mundt E (2004) *J Gen Virol* 85:2221–2229.
7. Hjalmarsson A, Carlemalm E, Everitt E (1999) *J Virol* 73:3484–3490.
8. Xu HT, Si WD, Dobos P (2004) *Virology* 322:199–210.
9. Lombardo E, Maraver A, Caston JR, Rivera J, Fernandez-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL, Rodriguez JF (1999) *J Virol* 73:6973–6983.
10. Pan J, Vakharia VN, Tao YJ (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:7385–7390.
11. Maraver A, Ona A, Abaitua F, Gonzalez D, Clemente R, Ruiz-Diaz JA, Caston JR, Pazos F, Rodriguez JF (2003) *J Virol* 77:6438–6449.
12. Ferrer-Orta C, Arias A, Escarmis C, Verdaguer N (2006) *Curr Opin Struct Biol* 16:27–34.
13. Steitz TA (1998) *Nature* 391:231–232.
14. Ferrer-Orta C, Arias A, Perez-Luque R, Escarmis C, Domingo E, Verdaguer N (2004) *J Biol Chem* 279:47212–47221.
15. Ng KK, Pendas-Franco N, Rojo J, Boga JA, Machin A, Alonso JM, Parra F (2004) *J Biol Chem* 279:16638–16645.
16. Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI (2001) *Nature* 410:235–240.
17. Leveque VJ, Johnson RB, Parsons S, Ren J, Xie C, Zhang F, Wang QM (2003) *J Virol* 77:9020–9028.
18. Ago H, Adachi T, Yoshida A, Yamamoto M, Habuka N, Yatsunami K, Miyano M (1999) *Structure (London)* 7:1417–1426.
19. Tao Y, Farsetta DL, Nibert ML, Harrison SC (2002) *Cell* 111:733–745.
20. Maraver A, Clemente R, Rodriguez JF, Lombardo E (2003) *J Virol* 77:2459–2468.
21. Thompson AA, Peersen OB (2004) *EMBO J* 23:3462–3471.
22. Arias A, Agudo R, Ferrer-Orta C, Perez-Luque R, Airaksinen A, Brocchi E, Domingo E, Verdaguer N, Escarmis C (2005) *J Mol Biol* 353:1021–1032.
23. Gohara DW, Crotty S, Arnold JJ, Yoder JD, Andino R, Cameron CE (2000) *J Biol Chem* 275:25523–25532.
24. Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B, Rey FA (2005) *Cell* 120:761–772.
25. Sagar I, Luque D, Ona A, Rodriguez JF, Carrascosa JL, Trus BL, Caston JR (2005) *Structure (London)* 13:1007–1017.
26. Earl PL, Moss B (1993) *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York).
27. Ward GA, Stover CK, Moss B, Fuerst TR (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6773–6777.
28. Kochan G, Gonzalez D, Rodriguez JF (2003) *Arch Virol* 148:723–744.
29. Collaborative computational project N (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50:760–763.
30. Bricogne G, Vonrhein C, Flensburg C, Schiltz M, Paciorek W (2003) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:2023–2030.
31. Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) *Acta Crystallogr A* 47:110–119.
32. Emsley P, Cowtan K (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126–2132.
33. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240–255.
34. Navaza J (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:1367–1372.

# Structural Insights into the Multifunctional Protein VP3 of Birnaviruses

Arнау Casañas,<sup>1,3</sup> Aitor Navarro,<sup>2,3,4</sup> Cristina Ferrer-Orta,<sup>1</sup> Dolores González,<sup>2</sup> José F. Rodríguez,<sup>2</sup> and Núria Verdaguer<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologia Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parc Científic de Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028-Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Molecular and Cell Biology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Darwin 3, 28049-Madrid, Spain

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>4</sup>Present address: Kapsid Link S.L., Alcalá 420, 28017-Madrid, Spain.

\*Correspondence: [nvmcri@ibmb.csic.es](mailto:nvmcri@ibmb.csic.es)

DOI 10.1016/j.str.2007.10.023

## SUMMARY

Infectious bursal disease virus (IBDV), a member of the *Birnaviridae* family, is the causative agent of one of the most harmful poultry diseases. The IBDV genome encodes five mature proteins; of these, the multifunctional protein VP3 plays an essential role in virus morphogenesis. This protein, which interacts with the structural protein VP2, with the double-stranded RNA genome, and with the virus-encoded, RNA-dependent RNA polymerase, VP1, is involved not only in the formation of the viral capsid, but also in the recruitment of VP1 into the capsid and in the encapsidation of the viral genome. Here, we report the X-ray structure of the central region of VP3, residues 92–220, consisting of two  $\alpha$ -helical domains connected by a long and flexible hinge that are organized as a dimer. Unexpectedly, the overall fold of the second VP3 domain shows significant structural similarities with different transcription regulation factors.

## INTRODUCTION

Infectious bursal disease virus (IBDV) is responsible for an immunosuppressive disease that inflicts a heavy economic burden on the poultry industry. IBDV belongs to the *Birnaviridae* family, which includes nonenveloped viruses possessing a bisegmented double-stranded RNA (dsRNA) genome (segments A and B of 3.2 and 2.8 kbp, respectively) enclosed within a single icosahedral capsid ( $T = 13$  Laevo) with a diameter of ~65–70 nm (Bottcher et al., 1997). Members of this small family are known to infect birds, fishes, insects, and rotifers (Delmas et al., 2004). Information gathered over the last few years has triggered an unprecedented interest in both the origin and taxonomic relationships of members of the *Birnaviridae* family (Ahlquist, 2006). Birnaviruses exhibit a series of structural, genetic, and biological features that clearly differentiate them from the rest of the dsRNA viruses (reviewed by Ahlquist, 2005). In contrast to the general rule for icosahedral dsRNA viruses with life cycles including extracellular phases, birnaviruses do not possess an internal transcriptional core (Bottcher et al., 1997; Coulibaly et al., 2005). The

lack of this structure imposes specific challenges on the birnavirus replication strategy. Interestingly, they efficiently cope with a rather limited protein arsenal formed by five mature polypeptides (VP1–VP5). The major components of the birnavirus particle arise from the proteolytic processing of the 110 kDa polyprotein pVP2-VP4-VP3 encoded by segment A. The polyprotein is cotranslationally cleaved by the virus-encoded serine-lysine protease VP4 (Birghan et al., 2000; Feldman et al., 2006), releasing the protein capsid precursor pVP2 and proteins VP4 and VP3. pVP2 is further processed, giving the mature VP2 polypeptide (Sanchez and Rodriguez, 1999). Segment A contains a second, smaller open reading frame in the 5' end region that encodes the nonstructural protein VP5, a membrane-associated protein that has been associated with the control of apoptotic responses and virus egress (Mundt et al., 1995). Segment B has a single open reading frame encoding VP1, a RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Pan et al., 2007; von Einem et al., 2004). The multifunctional protein VP3 plays a key role in virus assembly: (1) it provides a scaffold for the assembly of the capsid polypeptide (Maraver et al., 2003b); (2) it recruits the RdRp (VP1) into the capsid (Lombardo et al., 1999); and (3) it interacts with the dsRNA genome segments (Kochan et al., 2003; Tacken et al., 2002). Additionally, it has recently been shown that the interaction of the VP3 C-terminal tail with VP1 removes the inherent structural blockade of the polymerase active site (Garriga et al., 2007), and that VP3 thus acts as a transcriptional activator.

According to available information, the inner space of birnavirus virions is occupied by a ribonucleoprotein (RNP) complex formed by genome dsRNA segments; the RdRp, VP1; and the VP3 polypeptide. Electron microscope images of purified RNPs strongly suggest that dsRNA genome segments are entirely surrounded by VP3 molecules (Hjalmarsson et al., 1999). It has been proposed that RNP complexes might play a role akin to transcriptional cores found in other dsRNA viruses (Ahlquist, 2005).

In this report, we present the 2.3 Å crystal structure of the central region of the IBDV VP3 protein. The polypeptide is folded into two  $\alpha$ -helical domains, organized in a dimeric structure. Structural comparisons revealed that the overall architecture of the first domain of VP3 constitutes a new, to our knowledge, domain fold lacking significant homologies with any other protein domains of known structure. In contrast, the second VP3 domain shows significant structural similarities with polymerase-interacting domains of bacterial  $\sigma$  factors.

**Table 1. Data Collection, Phase Determination, and Refinement Statistics**

	Peak	Inflexion	Remote	Native
Data Collection				
Wavelength (Å)	1.0397	1.04	1.037	1.0358
Resolution (Å)	30–2.6	30–2.3	30–2.6	49.0–2.3
Space group	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Unit cell (Å)	a = b = 69.75, c = 71.66	a = b = 69.58, c = 71.55	a = b = 69.46, c = 71.61	a = b = 68.32, c = 71.30
Total data	27,354	42,097	39,519	33,087
Unique data	5,285	7,858	5,822	6,695
Mean (<I/σ>)	9.7	13.4	13.1	13.5
R <sub>merge</sub>	8.6	6.7	6.2	7.2
Completeness (%)	89.4	93.4	99.7	79.3
Phasing power <sup>a</sup>	1.48	1.25	1.99	
FOM <sup>a</sup> centric/acentric	0.14/0.36			
R <sub>culis</sub>	0.80	0.78	0.58	
Refinement Statistics				
Resolution range	2.0–2.4, 49–2.3			
R <sub>work</sub> (%)	23.6			22.2
R <sub>free</sub> (%)	28.4			26.4
Number of residues				
Protein	125			128
Solvent	29			54
Ions	3			–
Rmsd				
Bond lengths (Å)	0.008			0.009
Bond angles (°)	1.051			1.135
Average temperature factors (Å <sup>2</sup> )				
All	66.2			41.0
Protein	66.4			40.5
Solvent	58.3			50.4
Model Quality (Ramachandran Plot) <sup>b</sup>				
Residues in most favored regions (%)	93.5			90.9
Residues in additional allowed regions	5.6			9.1
Residues in generously allowed regions	0.9			0.0

<sup>a</sup> Phasing power and figure of merit (FOM) are as defined in SHARP (Bricogne et al., 2003).

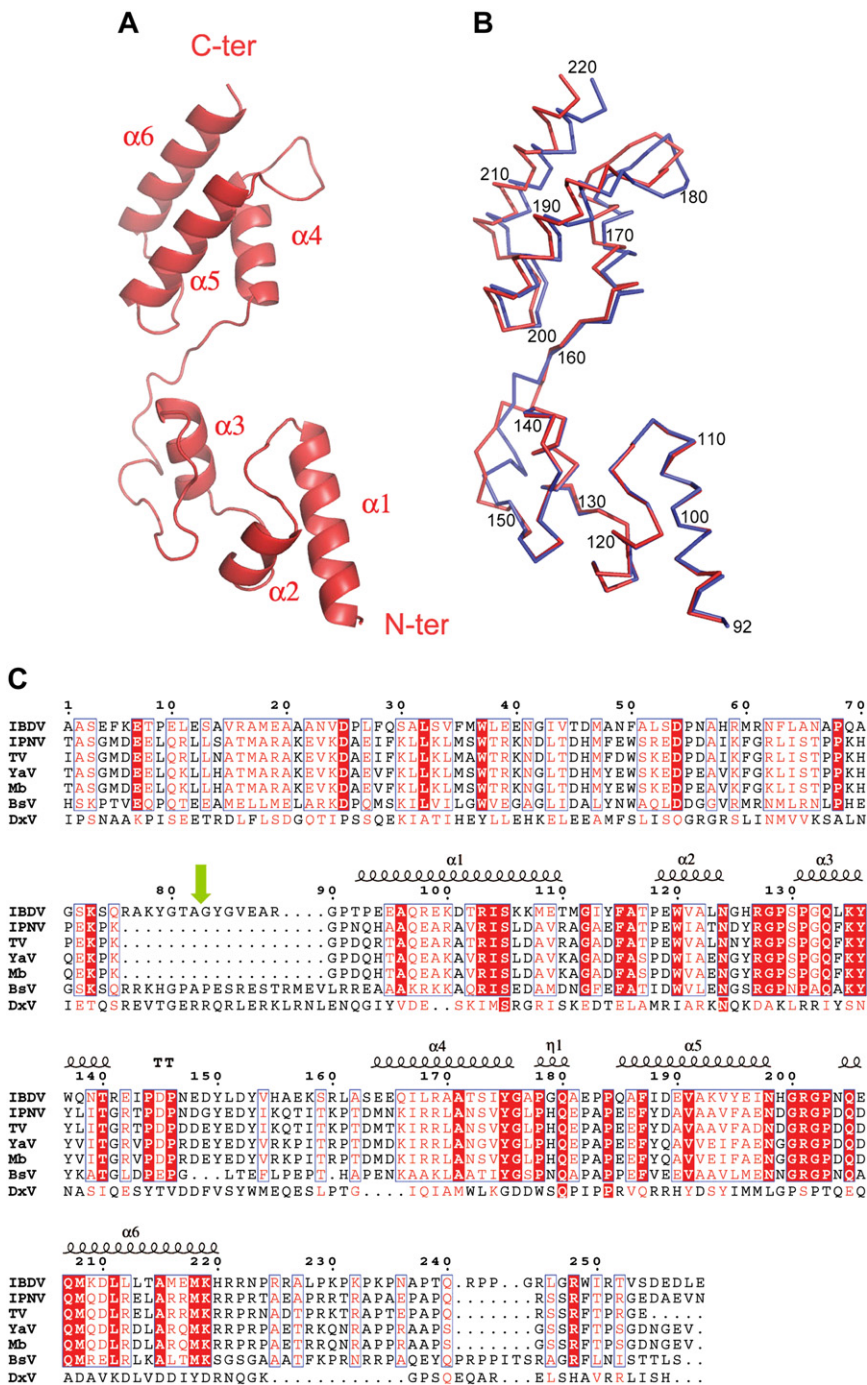
<sup>b</sup> Values from PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Protein Preparation and Structure Determination

VP3 contains a highly hydrophilic C-terminal tail region that is rich in charged amino acids and proline residues (Maraver et al., 2003a). Due to this electrostatic and hydrophilic nature, this C-terminal tail is predicted to be well exposed and disordered. Therefore, this region has the potential to bind proteins and nucleic acids. Unfortunately, we found that this region compromises its solubility and stability. Hence, in order to obtain high-quality crystals, we expressed and crystallized a construct lacking the 36 C-terminal residues (hisVP3Δ222–258). This

recombinant form crystallized in space group P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 and with unit cell parameters of a = b = 68.3 Å, c = 72.3 Å. The structure was determined by multiwavelength anomalous dispersion of a single crystal of gold derivative at 2.4 Å resolution. Native data were also used to refine the structure to a resolution of 2.3 Å (see [Experimental Procedures](#) and [Table 1](#)). Experimental maps allowed for the immediate interpretation of the structure, in which residues from T92 to A220 were placed unambiguously. No room was observed in the crystal packing to accommodate the remaining 91 residues at the N-terminal end of the protein, suggesting that the missing residues were cleaved during the crystallization process. SDS-PAGE from the VP3 crystals,



showing a band at ~15 kDa, demonstrated the cleavage of half of VP3. To determine the molecular mass of the crystallized fragment, crystals were recovered, resuspended in H<sub>2</sub>O, and analyzed by mass spectrometry. A single polypeptide of 15,753 Da was detected. The observed value matches almost exactly the predicted molecular mass (15,770 Da) of the purified hisVP3 $\Delta$ 222–258 polypeptide lacking the 107 N-terminal residues. This would correspond to the 82 amino acids of the true VP3 N terminus (Figure 1) plus the 25-residue fused peptide, which contains the His tag.

axis is rotated by 37° clockwise with respect to helix  $\alpha 1$ . Helix  $\alpha 3$  starts at residue S130, after a 6 residue spacer. This helix runs until residue R141, and its axis is rotated 38° counterclockwise away from helix  $\alpha 2$ . A long and flexible region (from residue N147 to residue S159) with poor secondary structure forms the hinge between the two central VP3 domains (Figures 1A–1C). The overall architecture of the first VP3 domain is stabilized by a network of hydrophobic interactions involving residues (1) D101, I104, and S105 of helix  $\alpha 1$ , which contact residues A116, P118, and V121 of helix  $\alpha 2$ ; (2) F115, within the  $\alpha 1$ - $\alpha 2$

**Figure 1. Structure of the Central Region of the IBDV Protein VP3**

(A) Ribbon diagram of the unbound form of VP3 showing the secondary structure elements explicitly labeled.

(B) View of the  $\alpha$ -carbon trace of the unbound VP3 (blue) with every tenth residue numbered. The structure of the gold-bound VP3 (red) is superimposed.

(C) Multiple sequence alignment of birnavirus VP3 proteins. IBDV (accession number: CAI54275), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV; CAI54275), Tellina virus (TV; AAK32157), Yellow ascites virus (YaV; BAA22055), Marine birnavirus (Mb; BAA09608), Blotched Snakehead virus (BSNV; YP052872), and *Drosophila* X virus (DxV; NP690836). The recombinant hisVP3 $\Delta$ 222–258 construct used in the crystallization experiments contained an additional 25 residue His tag peptide (sequence MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGA) fused to the VP3 N terminus (Kochan et al., 2003). The strictly conserved residues are shown as red blocks and white characters, and similar residues are shown in blue boxes and red characters. Secondary structure definitions, as determined in the crystal structure of the central region of IBDV VP3 (residues 92–220), are drawn above the sequence alignment. The cleavage site, determined by mass spectrometry, is indicated by a green arrow.

The final models for the gold-bound ( $R_{\text{work}} = 23.6$ ,  $R_{\text{free}} = 28.4$ ) and unbound ( $R_{\text{work}} = 22.2$ ,  $R_{\text{free}} = 26.4$ ) VP3 structures contained 128 protein residues and 28 and 54 solvent molecules, respectively. All residues exhibited good stereochemistry (Table 1).

### Overall Structure

The central region of VP3 consists entirely of  $\alpha$  helices connected by loops of different sizes. It can be divided into two structural domains linked by a flexible hinge (Figures 1A–1C). The first domain starts at the long helix  $\alpha 1$ , spanning residues T92–T110. This regular secondary structural element is followed by a 7 residue loop (M111–T117) that connects helix  $\alpha 1$  to the second helix, helix  $\alpha 2$ . Helix  $\alpha 2$  is formed by residues P118–N124. Its

loop, which contacts residue I143 of helix  $\alpha 3$ ; and (3) P131, G132, and Y136 of helix  $\alpha 3$ , which contact residues Y150, L151, and Y153, located at the beginning of the hinge between the two VP3 domains (Figures 1B and 1C). All of these residues, involved in intradomain stabilizing interactions, are conserved among birnaviruses (Figure 1C).

The structure of the second domain is organized into three  $\alpha$  helices arranged in a left-handed bundle (Figure 1A). The linker between helices  $\alpha 4$  (S163–G176) and  $\alpha 5$  (Q185–N198) includes a short  $3_{10}$  helix spanning residues A177–Q180. Finally, helix  $\alpha 6$ , running from residue Q205 to residue H220, forms the C-terminal end of the recombinant VP3 protein. A hydrophobic core is formed by numerous residues located at the interface between the three helices, including I167, A170, A171, I174, and Y175 of helix  $\alpha 4$ ; F187, V191, V194, and Y195 of helix  $\alpha 5$ ; P203 of the  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  loop; and L211 and A215 of helix  $\alpha 6$ . The hydrophobic core residues are also conserved among birnaviruses (Figure 1C).

### The Stable Structural Unit of VP3 Is a Dimer

Previous studies (Maraver et al., 2003b) showed that VP3 oligomerization is a fundamental step in IBDV capsid assembly. The oligomerization domain was mapped within the 42 C-terminal residues of the polypeptide. Size-exclusion chromatography on a calibrated column showed that the different recombinant forms of VP3 analyzed here, VP3(1–220) and VP3(82–220), lacking the oligomerization domain, are dimers in solution under the tested experimental conditions (pH = 8, 0.5 M NaCl, 8% glycerol). At a concentration of 1.5 mg/ml, which led to crystallization, the protein is completely dimeric. Noteworthy, taking into account the inner volume of the IBDV capsid (77,900 Å<sup>3</sup>) (Coulibaly et al., 2005), and the presence of ~450 VP3 molecules per virion (D. Luque, personal communication), the concentration of VP3 (28 kDa) in IBDV particles exceeds 150 mg/ml.

As shown in Figure 2A, chromatographic analyses showed that VP3 dimers are maintained over a wide range of concentrations. Similar results were obtained by analytical sedimentation equilibrium ultracentrifugation experiments (data not shown). These results show that, in addition to the previously described oligomerization domain, VP3 possesses an independent dimerization domain. It seems likely that VP3 oligomers might be formed by multimerization of preformed VP3 dimers. Experiments aimed to test this hypothesis are currently underway.

In the present structure, two VP3 subunits associate in a symmetrical manner by using the crystallographic two-fold axes. Each subunit contributes 1460 Å<sup>2</sup> of its surface (~30% of the total surface) to form the dimer (Figures 2B and 2C). A total of 81 interprotomeric close contacts (<3.6 Å), including polar bonds and van der Waals contacts, are observed (Figure 3A). The interface of the interaction mostly involves the second domain, in which different amino acids of the three helices, helices  $\alpha 4$  (E164, E165),  $\alpha 5$  (Q185, D189, E190, E196, I197, and H199), and  $\alpha 6$  (E206, Q207, D210, L213, T214, E217, and M218), participate in contacts. Residues T140, R141, E142, A162, and S163, at the interdomain linker, and loop  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  of the first domain (E109, Y114) are also involved in interactions (Figure 3A). Most residues forming the dimer interface are completely conserved among birnaviruses (Figure 1C).

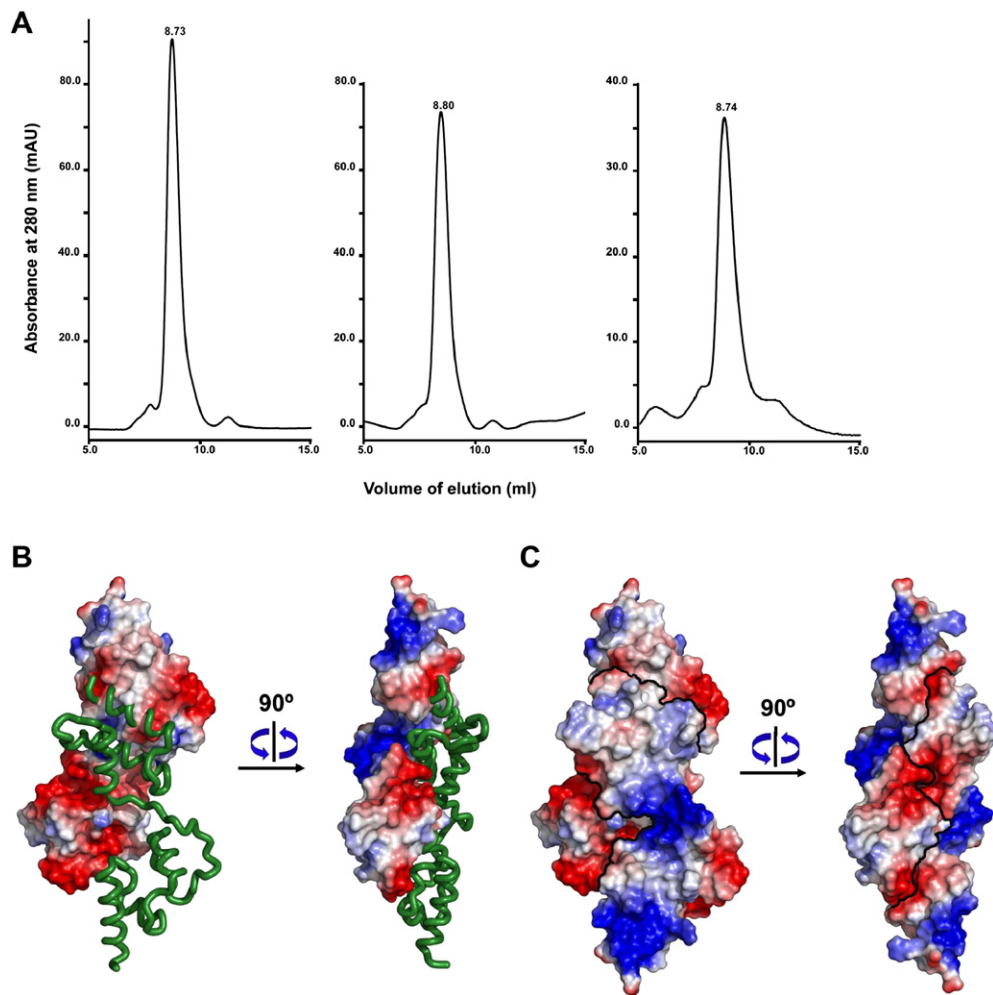
In the dimer, the N terminus of one subunit is located at ~86 Å and 25 Å of the N- and C-terminal ends, respectively, of the second subunit. The distances between two C termini in the dimer are ~49 Å. All ends are completely accessible to the solvent (Figures 3A and 3B). This arrangement leaves enough room to accommodate the remaining N- and C-terminal extensions, not determined in the present structure, without causing distortions in the dimeric organization.

Bioinformatic analysis with the program NOXclass (Zhu et al., 2006) predicted that the interface of the VP3 dimer in crystals is biologically meaningful (not due to the crystal packing), with a confidence of 99.86%, and that it is associated with a nonobligate interaction, with a confidence of 86.07%. Protomers of nonobligate complexes may dissociate while remaining as stable and functional units.

The overall architecture of the VP3 dimer determined here shares many features of proteins that present domain-swapping interactions (Figures 3A and 3B). This process, in which two or more protein molecules exchange part of their structure to form intertwined oligomers (Bennett et al., 1994), was originally proposed to be a mechanism for the emergence of oligomeric proteins, as a means for functional regulation, but also to be a potentially harmful process leading to misfolding and aggregation (Rousseau et al., 2003). In VP3, the swapped dimer would be formed by exchanging the hinge region and the second domain between the two protomers (Figure 3B). Similar observations have been made in the structures of the dimers of the C-terminal domain of the HIV capsid and in the mammalian SCAN domains (Ivanov et al., 2005, 2007).

### Comparison between the Isolated and Gold-Bound Forms of VP3

The structure of the VP3 central region was obtained in its unbound state and bound to gold ions that served as anomalous scatters in phasing (Table 1). The comparison of both structures will be instrumental for finding alternative molecule conformations and for the identification of putative VP3 residues, acting as metal binders. The two structures display close structural similarity, as indicated by root-mean-square deviations of 0.47 and 0.39 Å for the superimposition of 61 and 58 equivalent residues of the first and second domains, respectively. Important main chain shifts are observed in the region D152–S159, located at the interdomain linker, between the gold-bound and unbound structures (Figures 1B and 4). In the isolated structure, this region seems to be highly flexible, as deduced from the high B factors and the weak electron density. In the gold-bound structure, large main chain and side chain rearrangements are observed in the region, facilitating the interaction between the side chain of His155, which moves ~6 Å from its initial position, and the gold ion. This ion bridges H155 with a second histidine (H126), belonging to a symmetry-related molecule in the crystal packing (Figure 4). Two additional gold ions were found in the structure, but the positioning of these ions does not induce significant conformational changes in the structure. The second metal forms an intramolecular bridge between H220 and K106, and the third metal, which is found at the crystallographic two-fold axis, binds two symmetrically related histidines at position 199. This third gold ion is located at the interface between two VP3 protomers in the dimer (Figure 3A). Although H199 is not conserved across



**Figure 2. The VP3 Dimer**

(A) Analytical gel-filtration assay to assess the stability of the VP3 dimers. The chromatography was performed on a Superdex 75 HR 10/65 column previously calibrated with protein markers of known molecular mass and equilibrated with a Tris (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 8% glycerol buffer. The peak profiles show the maintenance of the dimer at all concentrations tested. The concentrations of the loaded samples were 0.5 mg/ml (18  $\mu$ m; left curve), 0.25 mg/ml (9  $\mu$ m; middle curve), and 0.125 mg/ml (4.5  $\mu$ m; right curve).

(B) Structure of VP3, displaying one protomer with its Connolly surface, colored according to its electrostatic potential, and the second protomer as a green back-bone worm in two different views.

(C) Same type of surface as in (B), but displaying a whole dimer.

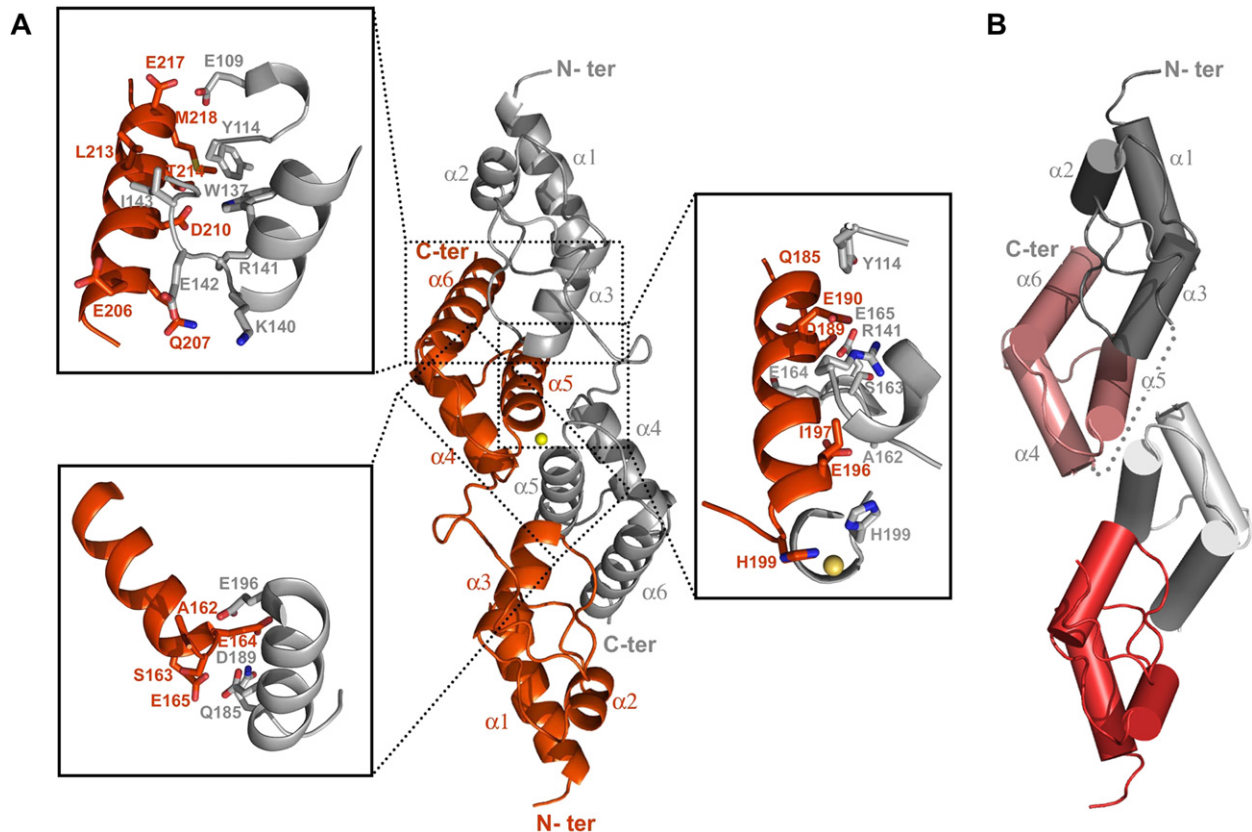
birnaviruses, it could be needed for chelating a metal like Zn in IBDV. However, the presence of a metal ion at the dimer interface does not seem to be essential for dimer formation or stability because it is absent in the native VP3 structure. More research will be needed in order to determine a possible role of metal ions in VP3 oligomerization.

Structural comparisons also showed that the positioning of the first domain relative to the second differs significantly between gold-bound and unbound structures (Figure 1B). The interdomain “elbow” angles between the major axes of the two domains are 127° and 135° in the unbound and gold-bound structures, respectively, indicating some degree of flexibility in the linker region. The flexibility observed in the VP3 hinge might be used to optimize the interactions when VP3 binds different protein and dsRNA ligands.

### The Second Domain of VP3 Shares Similarities with Distinct Transcription Regulation Factors

The lack of identifiable homologs to birnavirus VP3 was first described by Hudson et al. (1986). The unsuccessful homology searches performed on updated protein databases (data not shown) strongly suggest that, according to the recently proposed virus gene categories (Koonin et al., 2006), birnavirus VP3 should be considered to be an ORFan-encoded polypeptide, lacking detectable homologs in other virus families.

Comparison of our structure with known folds in the database Dali (Holm and Sander, 1995) revealed that the overall topology of the first VP3 domain is not related to any other protein or protein domain of known structure. In contrast, the same search revealed unexpected relationships between the second VP3 domain and different transcription regulation factors. The



**Figure 3. Interactions Stabilizing the VP3 Dimer**

(A) Ribbon plot of a VP3 dimer with one protomer shown in red and the second one in gray. The secondary structure elements and the amino- and carboxy-terminal ends of the protein are explicitly labeled. The different boxes show close-up views of residues involved in close contacts (<math><3.6 \text{ \AA}</math>) between protomers. In the gold-bound structure, one of the gold ions (yellow) occupies the two-fold axis and also participates in protomer-protomer interactions.

(B) Diagram illustrating dimerization by domain swapping. A more compact protomer would result from exchanging the hinge region and the second domain between protomers, i.e., by connecting the polypeptide chain from the gray helix  $\alpha 3$  to the pink helix  $\alpha 4$  (dotted line in gray).

highest hits were the bacterial sigma factor  $\sigma 70$  of *Thermus thermophilus* (Vassilyev et al., 2002) (PDB code: 1W7) and the Set2 SRI domain (Vojnic et al., 2006) (PDB code: 2C5Z), which showed Dali scores of 3.6 and 3.5 for the superimposition of 53 and 57  $C\alpha$  carbons, respectively (Figure 5). The region of  $\sigma 70$  that is structurally related to VP3 corresponds to domain 2 ( $\sigma 2$ ; residues 190–256).  $\sigma 2$  interacts with the  $\beta'$  chain of the core RNA polymerase upon holoenzyme formation (Vassilyev et al., 2002).

Dissociable  $\sigma$  factors bind bacterial RNA polymerases directing key aspects of the transcription process, including the recognition of the DNA promoter and DNA melting to expose the transcription initiation site (Mooney et al., 2005). VP3 has been shown to bind to the viral RdRP, VP1, and is responsible for its encapsidation (Lombardo et al., 1999). VP3 also interacts with both dsRNA segments of the viral genome, forming RNP filaments (Hjalmarsson et al., 1999). The 16 C-terminal residues of VP3 have been implicated in VP1 binding (Maraver et al., 2003a; Tacken et al., 2002). In addition, we have recently shown that the interaction of the VP3 C-terminal segment with VP1 regulates polymerase activity by inducing a conformational change in the active site that facilitates the accommodation of the tem-

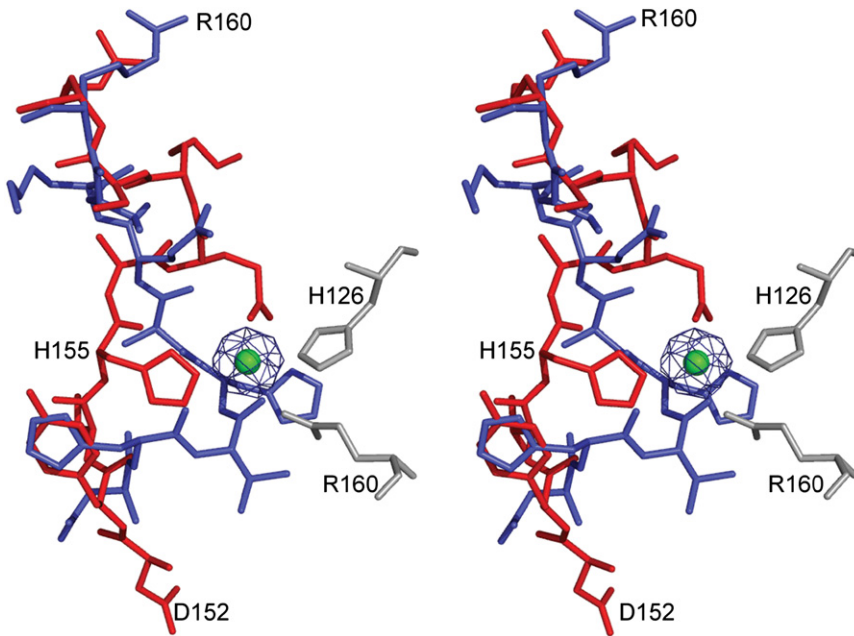
plate and incoming nucleotides for catalysis (Garriga et al., 2007). However, many aspects of birnavirus polymerase regulation are still largely unknown, and the parallelism observed between VP3 and  $\sigma$  factors might serve as starting point for the understanding of the mechanisms governing birnavirus transcriptional regulation.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

##### Recombinant Baculoviruses

The construction of rBV his-VP3 expressing the full-length VP3 polypeptide fused to a 6 $\times$  Histidine tag peptide has been previously described (Kochan et al., 2003). The generation of rBV his-VP3 $\Delta 222$ –258 was performed as follows. A 686 residue DNA fragment containing a truncated version of the VP3 sequence encoding a polypeptide lacking the 36 C-terminal residues, flanked by EheI and BamHI restriction sites, was generated by PCR with primers 5'-GCGCGCGCGCTGCATCAGAGTTCAAAGA-3' and 5'-GCGCGGATCCTTAGCGATGCTTCATCTCCATCGCAGTC-3' and the previously described plasmid pVOTE/POLY (Fernandez-Arias et al., 1998) as template. The DNA fragment was digested with EheI and BamHI and was inserted into the multiple cloning site of the baculovirus transfer vector pFastBachTb (Invitrogen), previously digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmid, pFB\_hisVP3 $\Delta 222$ –258, was subjected to nucleotide sequencing to assess the correctness of the inserted VP3 sequence, and it was then used to produce





**Figure 4. Structural Superimpositions of the Unbound and Gold-Bound VP3 Structures**

The unbounded VP3 is shown in blue, and the gold-bound VP3 is shown in red. The region shown (amino acids D152–R160) illustrates the largest conformational changes observed between the two structures. The gold ion is depicted in green; the corresponding anomalous difference Fourier map is shown as chicken wire in dark blue. The amino acids H155 (from the reference molecule; red) and H126 and R160 (from a symmetry-related VP3; gray) are involved in contacts that stabilize the gold-bound conformation.

the corresponding rBV by using the Bac-to-Bac system and by following the manufacturer's instructions (Invitrogen).

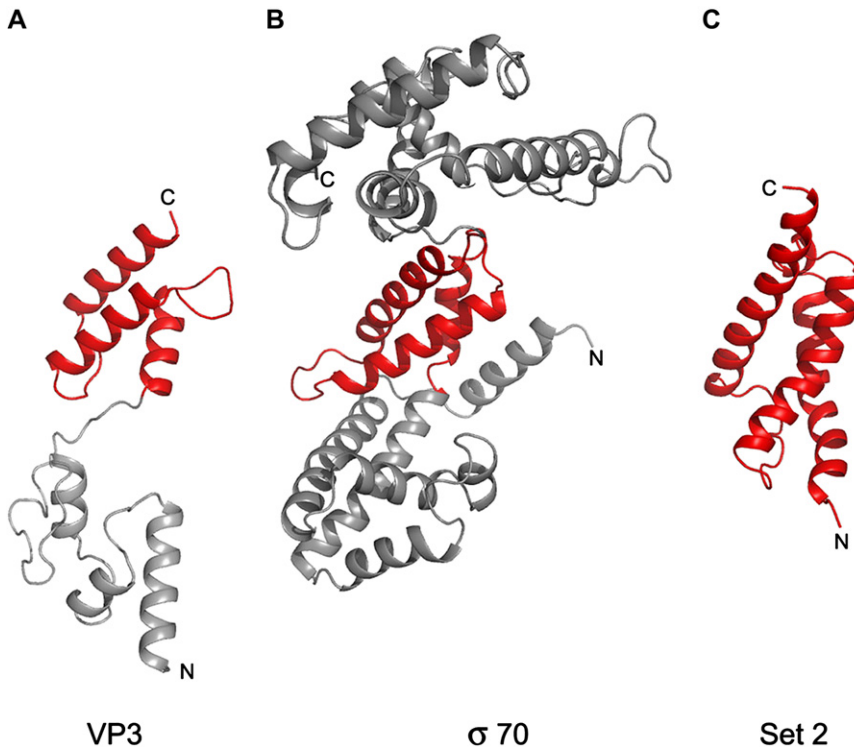
#### Production and Purification of VP3 Polypeptides

HighFive cells (Invitrogen) were infected with rBVs at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Cells were harvested at 72 hr postinfection, washed twice with phosphate-buffered saline, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl, 0.1% ipegal) supplemented with protease inhibitors

against lysis buffer lacking ipegal, and subjected to a second purification round under identical conditions. Finally, protein samples were concentrated to a final concentration of ~3 mg/ml by using Centricon YM-10 filters (Millipore).

#### Crystallization and Data Collection

Crystals of recombinant VP3 were obtained by using the vapor diffusion method in hanging drops at 20°C and by mixing equal volumes of VP3 (~3 mg/ml) and the reservoir solution, containing 2.6 M NaCl and 0.1 M sodium



**Figure 5. The Second Domain of VP3 Resembles Distinct Transcription Regulation Factors**

(A–C) The structures of (A) VP3, (B)  $\sigma 70$  (PDB code: 1W7), and (C) SRI set2 (PDB code: 2C5Z) are shown with the domain of structural homology highlighted in red.

acetate (pH 5). Crystals were transferred to a reservoir solution supplemented with 20% (v/v) glycerol before they were flash frozen in liquid nitrogen. Gold derivatives were prepared by soaking native crystals for 3 hr in stabilizing solutions containing the crystallization buffer and 5 mM AuCl<sub>3</sub> before freezing.

X-ray data of native and gold-bound VP3 crystals were collected at the synchrotron beamlines ID23 and ID29, respectively (European Synchrotron Radiation Facility [ESRF]; Grenoble, France). Three data sets were recorded at 100K from a single gold-derivative crystal at wavelengths corresponding to the gold absorption maximum, inflection point, and a hard remote (Table 1). All diffraction images were processed and reduced by using the Denzo/Scalepack package (Otwinowski and Minor, 1997) (Table 1).

### Structure Determination and Refinement

The initial phases were determined by using a multiwavelength anomalous dispersion of gold derivatives at 2.4 Å resolution (Table 1). Three heavy-atom sites were determined and refined by using SHARP (Bricogne et al., 2003). Experimental phases were further improved by solvent flattening and histogram matching with DM (CCP4, 1994). Experimental maps allowed for the automatic construction of 107 residues with ARP/wARP (CCP4, 1994). The VP3 initial model was completed manually by using programs O (Jones et al., 1991) and Coot (Emsley and Cowtan, 2004). This model was then subjected to a refinement by using REFMAC5 (Murshudov et al., 1997). The resulting structure was further refined against the 2.3 Å data from native crystals with REFMAC5. Additional rounds of manual rebuilding and refinement of the differences between native and gold-bound structures produced the final models (Table 1).

### Analytical Gel-Filtration Experiments

To assess the stability of the recombinant VP3 dimers, a peak fraction of the last purification step, which rendered crystals, was diluted in a Tris (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 8% glycerol buffer and was subjected to analytical gel filtration on a Superdex 75 HR 10/65 column previously calibrated with protein markers of known molecular mass and equilibrated with the same buffer.

### Mass Spectrometry Analysis

VP3 crystals (~10 µg) were recovered, resuspended in 10 µl H<sub>2</sub>O, and passed through C-18 ZipTip tips (Millipore, Bedford, MA), and the eluted protein was mixed 1:1 with matrix solution (saturated 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid in 33% aqueous acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid). A 0.7 µl aliquot of this mixture was deposited onto a stainless steel matrix-assisted laser desorption ionization probe and was allowed to dry at room temperature. Samples were measured on a Bruker Reflex IV matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT source in positive ion reflector mode with delayed extraction. The ion acceleration voltage was 20 kV. The equipment was externally calibrated by employing protonated mass signals from bovine serum albumin and bovine serum albumin dimer covering the 20–130 m/z range.

### Bioinformatic Analysis of the Dimer Interface

NOXclass (Zhu et al., 2006) is a program that predicts the type of interface from the crystal structure of a protein complex. The program distinguishes between three types of interfaces: “crystal packing,” “obligate,” and “nonobligate.” These last two interfaces are the ones with biological meaning. The core of the program is a support vector machine (SVM) trained with examples of the three types of interfaces. The numerical descriptors of the interface used for feeding the program are parameters previously demonstrated to be related to the biological type of interface: interface area, type of residues, gap volume, etc. The reported accuracy of this method predicting the type of interface is 91.8%.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Pazos for theoretical calculations, G. Rivas for analytical ultracentrifugation determinations, A. Hernando for mass spectrometry analyses, and D. Garriga for helpful discussions. This work was supported by grants AGL2003-07189/BIO2006-09407 and BFU2005-02376/BMC from The Ministerio de Educacion y Ciencia to J.F.R. and to N.V., respectively. A.C. was sup-

ported by an I3P fellowship from Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC)-Ministerio de Educacion y Ciencia, and C.F.-O. was supported by a Proyecto Intramural de Frontera fellowship from CSIC. X-ray data were collected at the protein crystallography beamlines ID23.1 and ID29 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) (Grenoble, France) within a Block Allocation Group (Block Allocation Group Barcelona). Financial support was provided by the ESRF.

Received: August 2, 2007

Revised: October 30, 2007

Accepted: October 31, 2007

Published: January 8, 2008

### REFERENCES

- Ahlquist, P. (2005). Virus evolution: fitting lifestyles to a T. *Curr. Biol.* 15, R465–R467.
- Ahlquist, P. (2006). Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 371–382.
- Bennett, M.J., Choe, S., and Eisenberg, D. (1994). Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3127–3131.
- Birghan, C., Mundt, E., and Gorbalenya, A.E. (2000). A non-canonical ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* 19, 114–123.
- Bottcher, B., Kiselev, N.A., Stel'Mashchuk, V.Y., Perevozchikova, N.A., Borisov, A.V., and Crowther, R.A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71, 325–330.
- Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M., and Paciorek, W. (2003). Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 2023–2030.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4) (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B., and Rey, F.A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 120, 761–772.
- Delmas, B., Kibenge, F.S.B., Leong, J.C., Mundt, E., Vakharia, V.N., and Wu, J.L. (2004). Birnaviridae. In *Virus Taxonomy*, C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and A.L. Ball, eds. (London: Academic Press), pp. 561–569.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- Feldman, A.R., Lee, J., Delmas, B., and Paetzel, M. (2006). Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J. Mol. Biol.* 358, 1378–1389.
- Fernandez-Arias, A., Risco, C., Martinez, S., Albar, J.P., and Rodriguez, J.F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79, 1047–1054.
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodriguez, J.F., and Verdaguier, N. (2007). Unprecedented activation mechanism of a non-canonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 20540–20545. Published online December 11, 2007. 10.1073/pnas.0704447104.
- Hjalmarsson, A., Carlemalm, E., and Everitt, E. (1999). Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J. Virol.* 73, 3484–3490.
- Holm, L., and Sander, C. (1995). Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem. Sci.* 20, 478–480.
- Hudson, P.J., McKern, N.M., Power, B.E., and Azad, A.A. (1986). Genetic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14, 5001–5012.

- Ivanov, D., Stone, J.R., Maki, J.L., Collins, T., and Wagner, G. (2005). Mammalian SCAN domain dimer is a domain-swapped homolog of the HIV capsid C-terminal domain. *Mol. Cell* *17*, 137–143.
- Ivanov, D., Tsodikov, O.V., Kasanov, J., Ellenberger, T., Wagner, G., and Collins, T. (2007). Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 4353–4358.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* *47*, 110–119.
- Kochan, G., Gonzalez, D., and Rodriguez, J.F. (2003). Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* *148*, 723–744.
- Koonin, E.V., Senkevich, T.G., and Dolja, V.V. (2006). The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol. Direct* *1*, 29.
- Laskowski, R.A., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* *231*, 1049–1067.
- Lombardo, E., Maraver, A., Caston, J.R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., and Rodriguez, J.F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* *73*, 6973–6983.
- Maraver, A., Clemente, R., Rodriguez, J.F., and Lombardo, E. (2003a). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.* *77*, 2459–2468.
- Maraver, A., Ona, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J.A., Caston, J.R., Pazos, F., and Rodriguez, J.F. (2003b). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* *77*, 6438–6449.
- Mooney, R.A., Darst, S.A., and Landick, R. (2005). Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* *20*, 335–345.
- Mundt, E., Beyer, J., and Muller, H. (1995). Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* *76*, 437–443.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *53*, 240–255.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* *276*, 307–326.
- Pan, J., Vakharia, V.N., and Tao, Y.J. (2007). The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 7385–7390.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J.W., and Itzhaki, L.S. (2003). The unfolding story of three-dimensional domain swapping. *Structure* *11*, 243–251.
- Sanchez, A.B., and Rodriguez, J.F. (1999). Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* *262*, 190–199.
- Tacken, M.G., Peeters, B.P., Thomas, A.A., Rottier, P.J., and Boot, H.J. (2002). Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.* *76*, 11301–11311.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* *417*, 712–719.
- Vojnic, E., Simon, B., Strahl, B.D., Sattler, M., and Cramer, P. (2006). Structure and carboxyl-terminal domain (CTD) binding of the Set2 SRI domain that couples histone H3 Lys36 methylation to transcription. *J. Biol. Chem.* *281*, 13–15.
- von Einem, U.I., Gorbalenya, A.E., Schirmeier, H., Behrens, S.E., Letzel, T., and Mundt, E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* *85*, 2221–2229.
- Zhu, H., Domingues, F.S., Sommer, I., and Lengauer, T. (2006). NOXclass: prediction of protein-protein interaction types. *BMC Bioinformatics* *7*, 27.

#### Accession Numbers

The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes [2R18](#) and [2Z7J](#), respectively.



# Autoproteolytic Activity Derived from the Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein<sup>\*S</sup>

Received for publication, November 25, 2008, and in revised form, December 19, 2008. Published, JBC Papers in Press, January 14, 2009, DOI 10.1074/jbc.M808942200

Nerea Irigoyen<sup>†1</sup>, Damià Garriga<sup>S2</sup>, Aitor Navarro<sup>‡</sup>, Nuria Verdaguer<sup>S</sup>, José F. Rodríguez<sup>‡</sup>, and José R. Castón<sup>†13</sup>

From the <sup>†</sup>Departments of Molecular and Cellular Biology and <sup>¶</sup>Structure of Macromolecules, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain and <sup>S</sup>Institut de Biologia Molecular de Barcelona/CSIC, Parc Científic de Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028-Barcelona, Spain

Viral capsids are envisioned as vehicles to deliver the viral genome to the host cell. They are nonetheless dynamic protective shells, as they participate in numerous processes of the virus cycle such as assembly, genome packaging, binding to receptors, and uncoating among others. In so doing, they undergo large scale conformational changes. Capsid proteins with essential enzymatic activities are being described more frequently. Here we show that the precursor (pVP2) of the capsid protein VP2 of the infectious bursal disease virus (IBDV), an avian double-stranded RNA virus, has autoproteolytic activity. The pVP2 C-terminal region is first processed by the viral protease VP4. VP2 Asp-431, lying in a flexible loop preceding the C-terminal most  $\alpha$ -helix, is responsible for the endopeptidase activity that cleaves the Ala-441–Phe-442 bond to generate the mature VP2 polypeptide. The D431N substitution abrogates the endopeptidase activity without introducing a significant conformational change, as deduced from the three-dimensional structure of the mutant protein at 3.1 Å resolution. Combinations of VP2 polypeptides containing mutations affecting either the cleavage or the catalytic site revealed that pVP2 proteolytic processing is the result of a monomolecular *cis*-cleavage reaction. The D431N mutation does not affect the assembly of the VP2 trimers that constitute the capsid building block. Although VP2 D431N trimers are capable of assembling both pentamers and hexamers, expression of a polyprotein gene harboring the D431N mutation does not result in the assembly of IBDV virus-like particles. Reverse genetics analyses demonstrate that pVP2 self-processing is essential for the assembly of an infectious IBDV progeny.

Multiprotein assemblies are the basic cellular entities controlling fundamental biological processes. Viral capsids represent an excellent framework for the analysis of “built-in” features such as structural polymorphism and transient conformations. In addition, complex capsids may require one or more auxiliary proteins (scaffold, accessory, and proteolytic proteins) to trigger structural and functional changes. In this context, assembly of birnavirus capsid has resulted in an appropriate process for studying the coordination of molecular factors involved that, like in many other viruses, rarely leads to aberrant assemblies *in vivo*.

Birnaviruses are a family of naked icosahedral viruses infecting rotifers, insects, fishes, and birds (1). Their genome, formed by two segments of double-stranded RNA (dsRNA),<sup>4</sup> encodes only five mature polypeptides. Although most of the research has been focused on the infectious bursal disease virus (IBDV), an important avian pathogen (2), available information suggests that all members of the family share similar replication strategies.

The IBDV particle possesses a relatively complex icosahedral capsid based on a triangulation number  $T = 13$  *levo* lattice composed by a single polypeptide known as VP2. Whereas the simplest capsids are built from 60 identical subunits and assembled into pentamers ( $T = 1$ ), those with more than 60 subunits are assembled into pentamers and hexamers and cannot have identical but “quasi-equivalent” environments ( $T > 1$ ) (3). The  $T$  number also describes the number of different environments occupied by the protein subunit (4). The VP2 protein assembles into 260 trimers that form 12 pentamers and 120 hexamers (5–7). From strict geometric considerations, VP2 trimers have five distinct conformations.

VP2 is synthesized as part of a polyprotein (~110 kDa) that is cotranslationally self-cleaved, releasing three polypeptides, namely pVP2 (the VP2 precursor), VP4 (the protease), and VP3 (a polypeptide with scaffolding activity among others). pVP2 (512 residues, 54.4 kDa) undergoes subsequent, and much slower, processing events mediated by VP4 at three secondary targets (positions 487, 494, and 501) (8), and the resulting intermediates are further cleaved between residues Ala-441 and Phe-442 to yield VP2 (47 kDa) and several C-terminal fragments (accounting for 7.4 kDa). Both the mechanism and the

\* This work was supported by Spanish Dirección General de Investigación (MEC) Grants BIO2006-09407, BFU2005-02376, and BFU2005-06487. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>S</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables 1 and 2.

The atomic coordinates and structure factors (code 3FBM) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

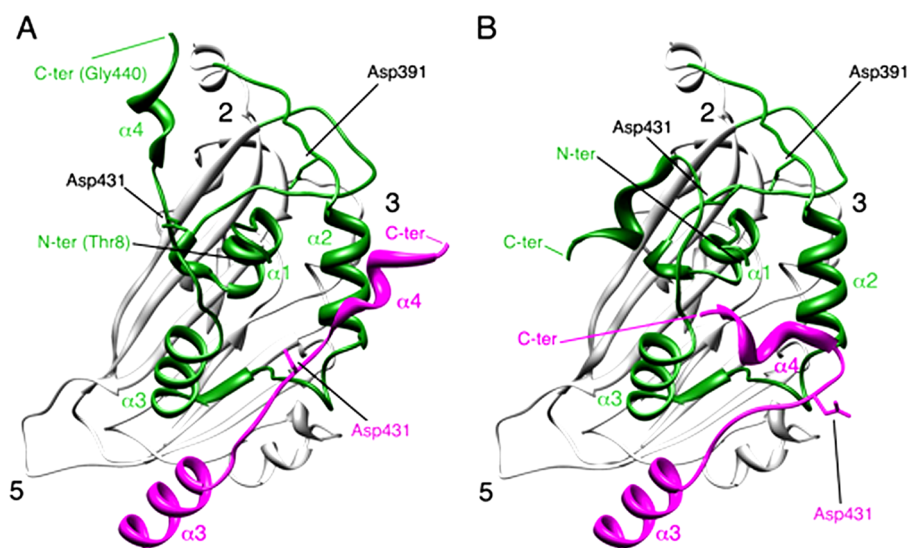
<sup>1</sup> Supported by “Residencia de Estudiantes” and Gobierno de Aragón and by an FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education (MEC).

<sup>2</sup> Recipient of an I3P fellowship from Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed: Dpto. de Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, C/ Darwin no. 3, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain. Tel.: 34-91-5854971; Fax: 34-91-5854506; E-mail: jrcaston@cnb.csic.es.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: dsRNA, double-stranded RNA; ssRNA, single-stranded RNA; IBDV, infectious bursal disease virus; IPNV, infectious pancreatic necrosis virus; CP, capsid protein; rBV, recombinant baculovirus; rVV, recombinant vaccinia virus; SVP, subviral particle; VLP, virus-like particle; DMEM, Dulbecco’s modified Eagle’s medium; pi, postinfection.

## IBDV Capsid Protease Activity



**FIGURE 1. Conformational flexibility of the VP2 C-terminal  $\alpha$ -helix around its cleavage site.** *A*, bottom view, facing the inner surface of the viral capsid, of the VP2 protein x-ray model (PDB entry 2GSY).  $\alpha$ -Helices (1–4) of domain B (green) are indicated for a VP2 chain; the candidate catalytic residues Asp-391 and Asp-431 are also indicated.  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4 helices of the closer neighboring VP2 chain (magenta) that projects toward the 3-fold axis of the trimer are shown, and to simplify the view, only its Asp-391 residue is indicated. The locations of 5-, 3-, and 2-fold axes of icosahedral symmetry are indicated. *B*, same as panel *A*, but the C-terminal  $\alpha$ 4 helices of VP2 chains were remodeled after fitting the x-ray model into an equivalent cryo-electron microscopy map (21).

executor of the last pVP2- $\rightarrow$ VP2 proteolytic maturation remain unknown and are associated with the pVP2 assembly into a procapsid-like structure (9). The released C-terminal segments remain associated to the capsid (10) and appear to be involved in the entry mechanism by promoting the disruption of host cell membranes (11).

Studies carried out with another birnavirus, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), a pathogen of the aquatic fauna (12), suggest that the pVP2  $\rightarrow$  VP2 conversion is required for the maturation of quasi-spherical provirions into mature icosahedral virions (13). This maturation mechanism is reminiscent of the post-assembly proteolytic maturation that takes place during the morphogenesis of some ssRNA icosahedral viruses, and in particular to those of noda- and tetra- viruses (14, 15). The capsid protein (CP) precursor, the  $\alpha$ -protein, associates as a trimer, building a quasi-spherical provirion (16). At low pH, the  $\alpha$ -protein is autocatalytically processed, rendering the mature CP, known as  $\beta$ -protein, and the C-terminal  $\gamma$ -peptide (17). This reaction is slow and dependent on a conserved Asp residue located in close proximity of the CP scissile bond (18). Maturation of the  $\beta$ -protein is accompanied by large conformational changes on the CP that irreversibly transforms the quasi-spherical (non-infectious) provirions into icosahedral infective virions (14, 17).

The molecular mechanisms that define the multimeric state of the mature VP2 as hexamers or pentamers have been intensively analyzed (7, 19–21). Expression of VP2 alone results in the spontaneous assembly of icosahedral T = 1 subviral particles (SVP), an all-pentamer capsid  $\sim$ 23 nm in diameter composed of 20 trimeric clusters of VP2. On the other hand, pVP2 expression leads to the assembly of tubular structures with a hexagonal lattice (7, 19). The pVP2 C-terminal processing events are abolished when this protein is expressed using a

baculovirus-based system. Notably, the pVP2 C-terminal region contains an amphipathic  $\alpha$ -helix that plays an important role in allowing the formation of multiple VP2 conformations. VP3 also participates in the inherent conformational polymorphism of pVP2 through interaction with the pVP2 C-terminal end, working as a canonical scaffolding protein.

The atomic structure of the VP2 polypeptide has been recently solved from T = 1 SVP (5, 22, 23). The VP2 subunit folds into three domains termed projection (P), shell (S), and base (B). Domains S and P are  $\beta$  barrels with a jelly roll topology, whereas the B domain is formed by  $\alpha$ -helices facing the interior of the shell, corresponding to its N and C termini. The helical C-terminal arm of VP2 establishes a domain swapping and mediates interactions between adjacent VP2

trimers increasing their stability. S and B domains share a high degree of structural similarity with noda- and tetra- virus  $\alpha$ -protein. pVP2 and  $\alpha$ -protein cleavage sites are deeply buried inside the capsid shell, thus sheltered from possible attacks by cellular proteases. Fitting the VP2 atomic structure into the three-dimensional cryo-electron microscopy map of IBDV T = 1 SVP allowed us to identify at least two conformations for its C-terminal region (19, 21). These structural considerations tempted us to suggest Asp-391 and/or Asp-431 as candidate catalytic residues capable of triggering a hydrolytic cleavage either on its own scissile bond or on that from a neighboring pVP2 molecule (Fig. 1). The results presented here demonstrate that residue Asp-431 is essential for pVP2 proteolytic maturation, thus leading us to propose that birnavirus pVP2 polypeptides are autocatalytically processed. This finding provides yet another piece of evidence reinforcing the hypothesis about a common ancestor linking icosahedral ssRNA and dsRNA viruses.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cells and Viruses**—Recombinant vaccinia virus (rVV) VT7LacOI/POLY and recombinant baculoviruses (rBV) FB/VP2-452 and FB/VP2-501 were previously described (7, 24, 25). Expression experiments were carried out with BSC-1 mammalian cells or QM7 quail muscle cells for rVV infections and *Trichoplusia ni* (H5) insect cells (Invitrogen) for rBV infections. BSC-1 and QM7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum. H5 cells were grown in TC-100 medium (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum. rVVs and rBVs were grown and titrated as previously described (25, 26).

**Generation of the Recombinant Viruses VT7/LacOI**—Using PCR overlap extension five mutant pVP2 genes were constructed containing the following single and double muta-

## IBDV Capsid Protease Activity

tions: A441G, F442G, A441G/F442G, D431N, and D391N. PCR reactions were carried out using the pVP2 gene, cloned in the pFB/POLY plasmid as template, and the set of mutator primers (supplemental Table 1) in combination with primers 5'-GCCATCACAAGCCTCAGCGTTGG and 5'-GTGCACCGCGGAGTACCCAG for A441G, F442G, and A441G/F442G. Primers 5'-GATGCCATCACAAGCCTCAGC and 5'-CGCAGTCGAGTTGTGTGCAC were used for D431N and D391N. The resulting DNA fragments were digested with NdeI and SphI and used to replace the original NdeI-SphI fragment of the pVOTE.2/POLY plasmid previously described (25). The plasmids pVOTE/A441G, pVOTE/F442G, pVOTE/A441G/F442G, pVOTE/D391N, and pVOTE/D431N were used to obtain the recombinant vaccinia viruses VT7LacOI/A441G, VT7LacOI/F442G, VT7LacOI/A441G/F442G, VT7LacOI/D391N, and VT7LacOI/D431N. For this, BSC-1 cells were infected with the vaccinia virus recombinant VT7LacOI (27) and transfected with the previous plasmids. Selection and amplification of VT7LacOI/A441G, VT7LacOI/F442G, VT7LacOI/A441G/F442G, VT7LacOI/D391N, and VT7LacOI/D431N were carried out as previously described (28).

**Construction of Recombinant Baculoviruses**—rBV FB/VP2-452 and FB/VP2-501 were previously described (7, 19). The pVOTE.2/D431N and pVOTE.2/D391N plasmids were used as a template for PCR synthesis to generate rBV/VP2-452D431N, rBV/VP2-452D391N, and rBV/VP2-501D431N. PCR was performed with Vent DNA polymerase (Biolabs) with common 5' and 3' end primer (5'-GCGCAGATCTATGACAAACCTGT-CAGATCAAACCC and 5'-GCGCAAGCTTACCTTATG-GCCCGGATTATGTCTTTGAAGC). BglII-HindIII-digested PCR fragments were cloned into FastBac (Invitrogen) BamHI-HindIII polylinker sites for protein expression. Selection of derived bacmids from the DH10Bac *Escherichia coli* strain and preparation for Lipofectine transfection were performed according to the manufacturer's protocols (Invitrogen). The constructs were expressed in H5 insect cells (29).

**Immunoprecipitation of VP2**—QM7 cell monolayers were infected with the corresponding rVV at a multiplicity of infection of 2 plaque-forming units/cell and maintained in the presence of isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosidase. At 18 h postinfection (pi), cells were washed twice and metabolically labeled with methionine-free DMEM containing 125  $\mu$ Ci/ml [<sup>35</sup>S]Met and isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosidase for 1 h. After this period cells were washed 3 times with DMEM containing a 10-fold concentration of cold methionine and then maintained in DMEM supplemented with isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosidase and 2% fetal calf serum. At 0, 24, 48, and 72 h post-labeling, cells were harvested, washed twice with phosphate-buffered saline, and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% IGEPAL CA-630). Immunoprecipitations were carried as described elsewhere (26). Immunoprecipitated samples were resuspended in Laemmli sample buffer to a 1 $\times$  final concentration and subjected to 11% SDS-PAGE followed by autoradiography.

**Reverse Genetic Analysis**—DNA fragments containing cDNA versions corresponding to the complete positive strand RNAs of to the IBDV Soroa strain segments A and B, fused to the T7

bacteriophage promoter (in 5' position with respect of the IBDV cDNAs), and a cDNA corresponding to the hepatitis delta virus ribozyme (in 3' position with respect of the IBDV cDNAs) sequences were generated by *in vitro* gene synthesis (Genescript Co.) and inserted into the multiple cloning site of the pUC57 cloning plasmid (GenBank<sup>TM</sup>/EMBL). These plasmids were named pT7-SA-Rz and pT7-SB-Rz, containing the cDNA corresponding to segment A and B, respectively.

Plasmid pVOTE/D431N, described above, was digested with SphI and NdeI and ligated to pT7-SA-Rz previously digested with the same enzymes. The resulting plasmid, pT7-SA(D431N)-Rz, was sequenced to determine the correctness of its sequence.

QM7 cells were transfected with a combination of either pT7-SA-Rz and pT7-SB-Rz or pT7-SA(D431N)-Rz and pT7-SB-Rz, respectively, using Lipofectamine (Invitrogen). 6 h after transfection cultures were infected with 1 plaque-forming unit/cell of VT7LacOI, an rVV inducibly expressing the T7 RNA polymerase. After infection, cultures were maintained at 37  $^{\circ}$ C in DMEM containing 10% fetal calf serum supplemented with 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosidase. At 72 h pi, cultures were harvested and subjected to three freeze-thawing cycles. After removing cell debris by low speed centrifugation, supernatants were recovered and passed through 0.1- $\mu$ m filters (Millipore) to eliminate contaminant rVV particles and used to infect fresh QM7 cell monolayers. Infections were performed in triplicate with undiluted and 10<sup>-1</sup>–10<sup>-5</sup> serial dilutions of the initial stocks. A set of infected cells was used to determine the IBDV titer at 72 h pi. Another set was harvested at 72 h pi, and the corresponding extracts were analyzed for the presence of VP1 and VP2 proteins. The absence of contaminant infecting rVV particles was also monitored by Western blot using the mAbC3. The third set was also harvested at 72 h pi and used to collect cells originally infected with the undiluted stocks. These samples were subjected to three freeze-thawing cycles, and the procedure described above was repeated, thus allowing the analysis of the initial virus stock and two subsequent virus amplification rounds.

**Purification of IBDV Polyprotein-derived Structures**—QM7 and H5 cells (2–5  $\times$  10<sup>8</sup> cells) were infected with appropriate rVV or rBV (multiplicity of infection 1–5 plaque-forming units/cell). At 72 h pi in rVV assays and at 48 h pi in rBV assays, cells were harvested, lysed in PES buffer (25 mM piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid), pH 6.2, 150 mM NaCl, and 20 mM CaCl<sub>2</sub>) plus 1% IGEPAL CA-630 (Sigma) on ice, and processed on a 25% sucrose cushion and a linear 20–50% sucrose gradient (19). The particulate material containing polyprotein-derived structures was concentrated 20-fold by ultracentrifugation and used for SDS-PAGE, Western blot, and electron microscopy analysis.

**SDS-PAGE and Western Blot**—Infected cell extracts (25 ml) or concentrated sucrose gradient fractions (10 ml) were added to Laemmli's sample buffer to a 1 $\times$  final concentration and heated at 100  $^{\circ}$ C for 3 min. Electrophoresis was performed in 11% polyacrylamide gels. Western blot analyses were carried out using an anti-VP2 serum as described (26).

**Electron Microscopy**—2–5- $\mu$ l samples of concentrated sucrose gradient fractions were applied to glow-discharged car-

## IBDV Capsid Protease Activity

bon-coated grids for 2 min and negatively stained with 2% aqueous uranyl acetate. Micrographs were recorded with a JEOL 1200 EXII electron microscope operating at 100 kV at a nominal magnification of 40,000 $\times$ .

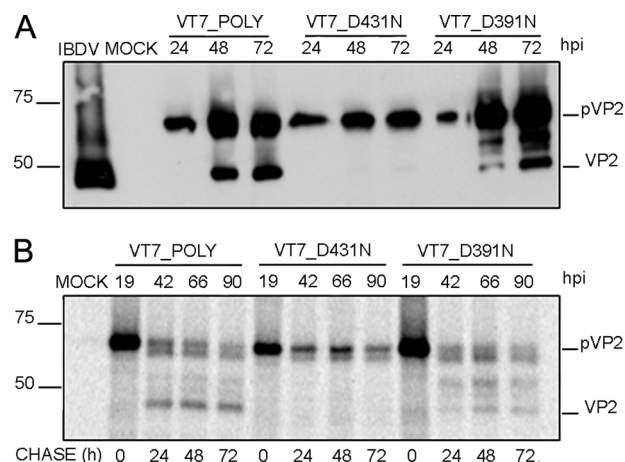
**Crystallization and Data Collection**—Cubic crystals belonging to space group P213 ( $a = b = c = 326.72 \text{ \AA}$ ) were obtained by the vapor diffusion method in hanging drops at room temperature by mixing 2 volumes of VP2–452\_D431N-derived SVP (1.6 mg/ml) and 1 volume of the reservoir solution containing 14–17% polyethylene glycol 4000, 0.1 M Tris, pH 9.0, and 5% isopropanol. Crystals were transferred to a cryoprotecting solution containing 20% glycerol in the crystallization buffer and incubated for 1 min before they were flash-frozen by immersion in liquid nitrogen. X-ray data were collected from a single crystal using synchrotron radiation at the European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France (beamline ID14-2) to 3.1  $\text{\AA}$  resolution. Diffraction images were processed using MOSFLM (30) and internally scaled with SCALA (31).

**Structure Refinement**—Crystals of D431N-mutated SVP were isomorphous to the previously obtained of native VP2 SVPs (PDB code 2GSY (22)). The initial maps for D431N-mutant were obtained after a rigid body fitting of the coordinates of native SVPs (PDB code 2GSY) to the new unit cell. The D431N mutation and other subtle changes were manually rebuilt using Coot (32), and the structure was then refined with CNS (33) using the 20-fold non crystallographic symmetry as a restraint. The final refinement statistics are summarized in [supplemental Table 2](#). The coordinates and structure factors have been deposited into the Protein Data Bank (code 3FBM).

## RESULTS

**Effect of Mutations on Asp Residues Potentially Involved on pVP2  $\rightarrow$  VP2 Proteolytic Maturation**—(p)VP2 residues Asp-391 and Asp-431 appeared to be likely candidates to trigger a nucleophilic attack on the pVP2 441–442 scissile bond. The IBDV polyprotein expressed by an inducible rVV provided an excellent framework to analyzing the possible role of residues Asp-391 and Asp-431 on pVP2 proteolytic maturation. As described above, the use of this system allows the accumulation of pVP2 and VP2 and the efficient assembly of virus-like particles (VLP), structurally undistinguishable from purified IBDV virions (26, 34). Hence, two single-point mutant versions of the IBDV polyprotein gene were generated and used to construct two rVV, called VT7LacOI/D431N and VT7LacOI/D391N, in which Asp residues under study at positions 431 and 391 were replaced by Asn residues, respectively. Cultures infected with these two rVV were harvested at different times pi (24, 48, and 72 h), and the corresponding extracts were analyzed by Western blot using VP2-specific serum. As a control for this experiment, cultures were also infected with VT7LacOI/POLY, a rVV expressing the wild-type polyprotein gene (26).

Although expression of wild-type and D391N polyproteins led to accumulation of both pVP2 and VP2 polypeptides, samples from cells expressing polyprotein D431N showed equivalent pVP2 levels but did not contain detectable VP2 (Fig. 2A). These results strongly suggested that the D431N substitution specifically abrogated pVP2 proteolytic processing and were further confirmed using an alternative experimental approach.



**FIGURE 2. Effect of conservative mutations of residues Asp-431 and Asp-391 on pVP2/VP2 proteolytic maturation.** A, Western blot analysis of proteins expressed in cells infected with rVV VT7LacOI/POLY, VT7LacOI/D431N, or VT7LacOI/D391N, respectively. Infected cultures were harvested at 24, 48, and 72 h pi, respectively. The corresponding extracts were subjected to SDS-PAGE and Western blot using anti-VP2 serum. B, QM7 cells infected with rVV VT7LacOI/POLY, VT7LacOI/D431N, or VT7LacOI/D391N were metabolically pulse-labeled with [ $^{35}\text{S}$ ]Met for 1 h at 19 h pi (hpi). The radioactivity was chased with by adding fresh medium containing an excess of cold methionine. Cultures were harvested at 0, 24, 48, and 72 h post-labeling, and the corresponding extracts were immunoprecipitated using anti-VP2 serum. The resulting samples were subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography. Molecular weight markers (expressed in kDa, left) and bands corresponding to proteins pVP2 and VP2 (right) are indicated.

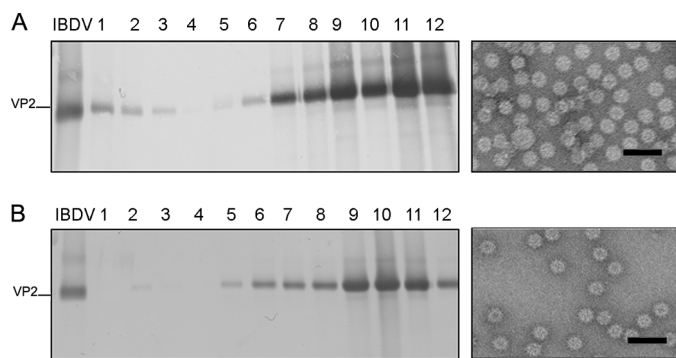
QM7 cells were infected with the three described rVV and, at 19 h pi, the cultures were metabolically labeled with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine for 1 h. Thereafter, cultures were extensively washed and incubated with fresh medium supplemented with an excess of cold methionine. At different times post-labeling (0, 24, 48, and 72 h), cells were harvested, and the corresponding extracts were subjected to immune precipitation using anti-VP2 antiserum. The results of this analysis (Fig. 2B) demonstrate that whereas in cells infected with VT7LacOI/POLY and VT7LacOI/D391N, the pVP2 polypeptide is progressively processed to mature VP2, the pVP2 polypeptide encoded by VT7LacOI/D431N remains intact for the duration of the experiment (72 h after its synthesis). Taken together, these results demonstrate that the conservative D431N substitution causes a complete blockade on pVP2  $\rightarrow$  VP2 proteolytic maturation.

**D431N Substitution Allows the Assembly of VP2 Trimers**—VP2 trimers constitute the building block of the IBDV-related icosahedral capsids with different T as well as different tubular structures with helical symmetry (19, 21). Therefore, it seemed likely that the results described above might be caused by deficiency on trimer assembly induced by a VP2 conformational change generated in the D431N mutant. Such a conformational change might prevent both the assembly of IBDV provirions and the subsequent pVP2 proteolytic processing event.

Expression of chimerical VP2 genes in insect cells leads to the spontaneous assembly of T = 1 SVP built by 20 VP2 trimers arranged into pentamers. We have exploited this system to determine the effect of the D431N mutation on the assembly of VP2 trimers. A VP2 gene with the N-terminal 452 residues harboring the D431N substitution was generated, VP2–452\_D431N, inserted into the pFastBac1 transfer vector, and



## IBDV Capsid Protease Activity



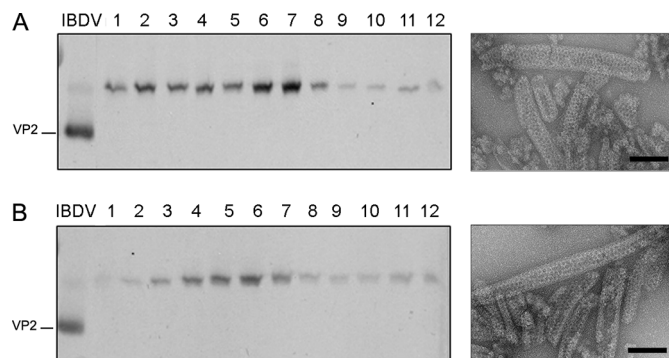
**FIGURE 3. VP2 with the D431N substitution assembles as T = 1 subviral particle VP2 trimers.** *A*, wild-type VP2–452 SVP were purified by ultracentrifugation on sucrose gradients. Gradients were collected into 12 fractions, concentrated by ultracentrifugation, and analyzed by SDS-PAGE and Western blot using anti-VP2 serum. The direction of sedimentation was *right to left*, with fraction 12 representing the gradient top. The image shown on the *right* corresponds to a representative electron microscopy micrograph (negative staining) of wild-type SVP, present at the upper gradient fractions. *B*, mutant VP2–452\_D431N assemblies were analyzed as described above. The image shown on the *right* corresponds to a representative electron microscopy micrograph (negative staining) of mutant VP2–452\_D431N SVP present at the upper gradient fractions. Bars = 100 nm.

then used to generate the corresponding rBV, rBV/VP2–452\_D431N. Extracts from cells infected with rBV/VP2–452\_D431N were used for SVP purification. As shown in Fig. 3, expression of the VP2–452D431N gene results in the assembly of T = 1 SVP that is undistinguishable under electron microscopy observation by negative staining from those produced by wild-type protein and D391N mutant (data not shown).

The possibility nevertheless existed that the mutation D431N might somehow affect the formation of VP2 hexamers formed by six VP2 trimers. To analyze this possibility we took advantage of a previous observation. As described above, we have shown that expression of VP2 long forms in a rBV expression system leads to the assembly of tubular structures formed exclusively by hexamers built by pVP2 intermediate precursor trimers (7, 19). Therefore, the D431N gene was subcloned into pFB/VP2-501, and the resulting plasmid, pFB/VP2-501\_D431N, was used to generate the corresponding rBV. As shown in Fig. 4, expression of VP2-501\_D431N in insect cells results in the assembly of rigid tubules with an identical morphology to that of tubules purified from cells expressing wild-type VP2-501 gene. The results of this series of experiments demonstrate that the D431N substitution do not prevent either the trimer assembly or the subsequent formation of pentamers and hexamers.

Finally, to rule out the possibility that the D431N substitution might induce conformational changes on the VP2 polypeptide undetectable by electron microscopy, the crystal structure of VP2–452\_D431N-derived SVP was determined at 3.1 Å resolution (supplemental Table S1). The root mean square deviation of the superimposition of all 428 equivalent C $\alpha$  atoms from VP2 in the structures of native and D431N SVP is 0.20 Å, showing that these structures are essentially identical in conformation. This similarity is also maintained within the flexible linker between helices  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4 (residues 428–435), containing the D431N mutation (Fig. 5).

*pVP2 Undergoes an Intramolecular Proteolytic Processing—* To get a better understanding of the pVP2 maturation mecha-



**FIGURE 4. pVP2 variant with the D431N substitution assembles as tubular assemblies with hexagonal symmetry.** *A*, wild-type pVP2-501 assemblies were purified by ultracentrifugation on sucrose gradients. Gradients were collected into 12 fractions, concentrated by ultracentrifugation, and analyzed by SDS-PAGE and Western blot using anti-VP2 serum. The direction of sedimentation was *right to left*, with fraction 12 representing the gradient top. The image shown on the *right* corresponds to a representative electron microscopy micrograph (negative staining) of wild-type tubular structures present at the lower fractions. *B*, mutant pVP2-501\_D431N assemblies were analyzed as described above. The image shown on the *right* corresponds to a representative electron microscopy micrograph (negative staining) of pVP2-501\_D431N rigid tubules at the lower fractions. Bars = 100 nm.

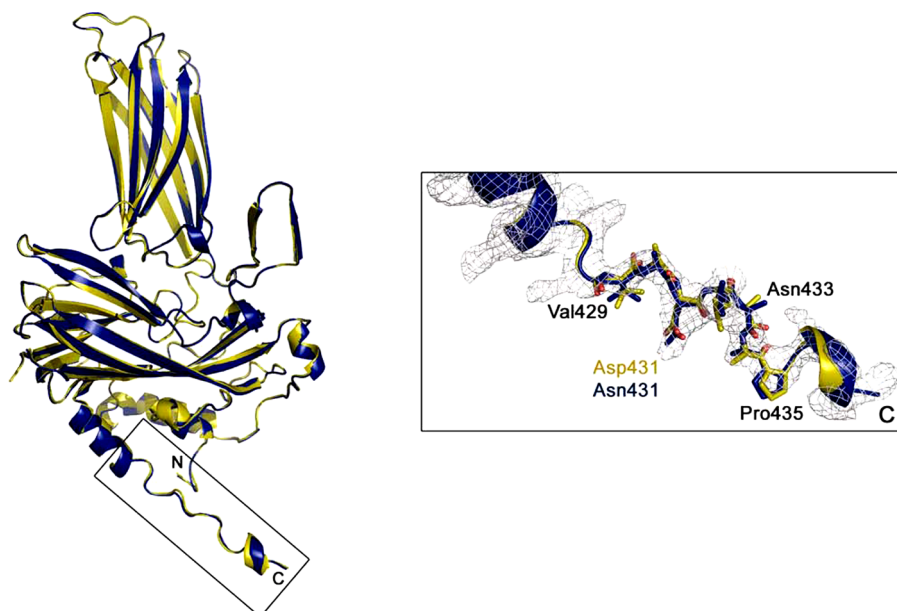
nism, it was important to determine whether the pVP2  $\rightarrow$  VP2 cleavage is the result of an intra- (*cis*-cleavage) or intermolecular (*trans*-cleavage) event.

To discriminate between these two possibilities, a polyprotein mutant containing an intact Asp-431 residue but resistant to self-proteolytic processing was required. Such a mutant would be used for co-expression analysis to provide the pVP2  $\rightarrow$  VP2 proteolytic activity in *trans*. With this aim, three polyprotein genes containing one or two amino acid substitutions affecting either one or both amino acids at the pVP2 scissile bond (Ala-441–Phe-442) were generated. The mutant genes contain the following substitutions: (i) A441G, (ii) F442G, and (iii) A441G/F442G. Mutant genes were then inserted within the vaccinia virus genome, giving rise to rVV VT7LacOI/A441G, VT7LacOI/F442G, and VT7LacOI/A441G/F442G, respectively. The effect of the described mutations on pVP2 processing was analyzed by Western blot and pulse-chase/immune precipitation analysis. As shown in Fig. 6, whereas single substitutions cause a major but partial pVP2  $\rightarrow$  VP2 blockade, the double mutation A441G/F442G completely abolishes pVP2 processing. Accordingly, this mutant gene was selected for subsequent experiments.

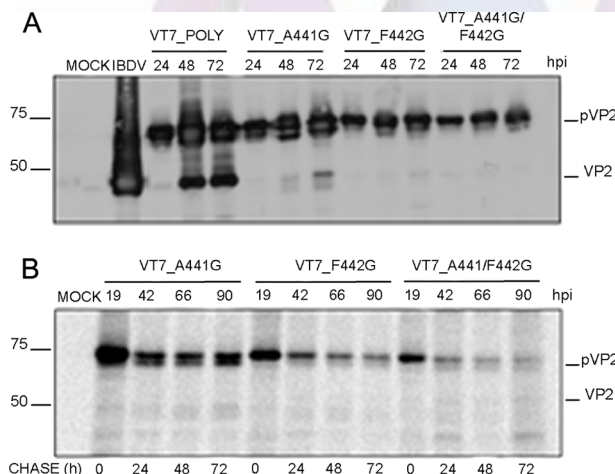
Next, cells were coinfecting with VT7LacOI/POLY and VT7LacOI/D431N, VT7LacOI/POLY and VT7LacOI/A441G/F442G or VT7LacOI/D431N and VT7LacOI/A441G/F442G. Cultures were harvested at 48 and 72 h pi, and the corresponding extracts were analyzed by Western blot. As shown in Fig. 7, the presence of mature VP2 was exclusively detected in samples from cells expressing the wild-type polyprotein gene that provides both the catalytic Asp-431 residue and the intact cleavage site. Coinfection with VT7LacOI/D431N and VT7LacOI/A441G/F442G showed that pVP2-D431N remains uncleaved and is not proteolytically processed in *trans* by the wild-type pVP2, thus strongly suggesting that pVP2 processing is the result of a monomolecular *cis*-cleavage reaction.

*D431N Substitution Completely Abolishes IBDV Infectivity—* It was important to assess the relevance of the Asp-431 on

## IBDV Capsid Protease Activity



**FIGURE 5. Structure of the VP2 D431N T = 1 SVP monomer.** Ribbon diagrams of wild-type (yellow) and mutant D431N (blue) VP2 proteins. The superposition was performed using all the 428 residues of both molecules. Shown on the right is an electron density map of the VP2 C-terminal boxed region around residue Asp-431. Residues from Val-429 to Pro-435 are shown as sticks and explicitly labeled every two residues.



**FIGURE 6. Analysis of the pVP2 cleavage site Ala-441-Phe-442.** A, Western blot analysis of proteins expressed in cells infected with rVV VT7LacOI/POLY, VT7LacOI/A441G, VT7LacOI/F442G, and VT7LacOI/A441G/F442G. Infected cultures were harvested at 24, 48, and 72 h pi (hpi). B, QM7 cells were infected with different recombinants VT7LacOI/A441G, VT7LacOI/F442G, or VT7LacOI/A441G/F442G were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]Met for 1 h at 19 h pi. The radioactivity was chased with by adding with fresh medium containing an excess of cold methionine. Cultures were harvested at 0, 24, 48, and 72 h post-labeling, and the corresponding extracts immunoprecipitated using anti-VP2 serum. The resulting samples were subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography. Molecular weight markers (expressed in kDa, left), and bands corresponding to proteins pVP2 and VP2 (right) are indicated.

IBDV infectivity. This analysis was carried out using a reverse genetics approach using plasmids pT7\_SA\_Rz and B pT7\_SB\_Rz containing the cDNA sequences corresponding to IBDV segments A and B, respectively, and plasmid pT7\_SA/D431N\_Rz, harboring a mutant version of segment A containing the D431N substitution.

The results obtained demonstrate that the D431N substitution completely abolishes the production of an infectious IBDV progeny (Table 1). Western blot analysis indicated that cells

transfected with plasmids pT7\_SA/D431N\_Rz and pT7\_SB\_Rz failed to trigger the generation of infectious IBDV. This finding, in agreement with the observations described above, highlights the critical importance of the VP2 D431N residue on IBDV infectivity.

*pVP2 → VP2 Maturation Blockade Prevents the Assembly of Stable IBDV-derived VLP—IPNV morphogenesis* involves the assembly of provirions containing a high proportion of pVP2 molecules. Provion maturation appears to be associated to pVP2 proteolytic processing (13). Hence, it seemed feasible that blocking pVP2 → VP2 processing might favor the accumulation and isolation of IBDV provirions. To test this possibility, QM7 cultures were infected with VT7LacOI/POLY or VT7LacOI/D431N. Expression of the IBDV polyprotein in avian cells

using an inducible rVV results in the accumulation of abundant levels of VLP with similar size and shape to those of authentic IBDV particles (26, 35). Remarkably, the assemblies produced with the rBV system in insect cells were nevertheless structurally varied, and in general, the formation of IBDV-like particles was rather inefficient. Insect cells might, therefore, have an important cellular factor(s) that interferes negatively with VLP assembly (e.g. cellular proteins and/or host environment).

Cultures harvested at 2 different times, 36 and 72 h pi, and the corresponding extracts were then used for the isolation of IBDV-derived assemblies using a sucrose gradient-based purification protocol followed by electron microscopy and Western blot analyses of the collected fractions. As described previously, extracts from cells infected with the rVV expressing the wild-type polyprotein gene contained abundant icosahedral VLPs with a relatively high VP2/pVP2 ratio (26). In contrast, no IBDV-derived assemblies were detected in samples from VT7LacOI/D431N-infected cells. The use of gentler extraction conditions and/or alternative purification protocols yielded similar results. The same results were observed with extracts from cells infected with the three rVVs expressing polyprotein genes containing mutations on the pVP2 cleavage site described above.

## DISCUSSION

We analyzed the protease activity of the IBDV CP VP2. The IBDV polyprotein is a fusion of capsid precursor pVP2 with the viral protease (VP4) and the scaffolding protein (VP3). pVP2, a 512-residue precursor, undergoes sequential C-terminal processing events mediated by the viral protease VP4 to render shorter pVP2 polypeptides. These pVP2 intermediates with C-terminal extensions of variable length are further cleaved to render the mature VP2 (441 residues). Based on the VP2 x-ray structure, we examined the role of two likely candidate resi-

## IBDV Capsid Protease Activity

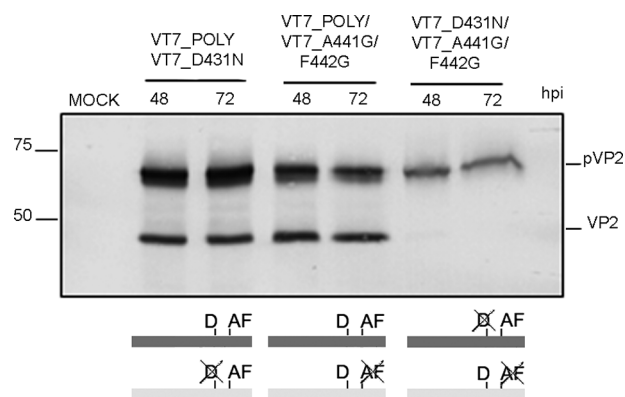


FIGURE 7. **pVP2 intramolecular proteolytic processing.** Western blot analysis of proteins expressed in QM7 cells coinfecting with VT7LacOI/POLY and VT7LacOI/D431N, VT7LacOI/POLY and VT7LacOI/A441G/F442G, or VT7LacOI/A441G/F442G and VT7LacOI/D431N. Infected cultures were harvested at 48 and 72 h pi (*hpi*). A scheme indicating the combinations of rVV used in this experiment (mutated positions are *crossed out*) is shown at the *bottom*.

**TABLE 1**  
Virus titers obtained by reverse genetics

Coinfections	Virus titers		
	First round	Second round	Third round
pT7-SA-Rz/pT7-SB-Rz	$1.3 \pm 0.5 \times 10^2$	$9.0 \pm 1.3 \times 10^4$	$6.0 \pm 1.5 \times 10^7$
pT7-SA(D431N)-Rz/ pT7-SB-Rz	0	0	0

dues, Asp-391 and Asp-431, for catalyzing the last proteolytic event that occurs during capsid maturation. These residues were selected taking into account the structural analogies of domains S and B of IBDV CP to their counterparts in some positive-sense ssRNA viruses such as noda- and tetra- viruses, in which the cleavage is mediated by acid residues, specifically Asp-75 of Flock House virus (FHV) (18) and Glu-103 of Nudaurelia capensis  $\omega$  virus (36).

Our results indicate that the D431N mutation blocks the pVP2  $\rightarrow$  VP2 proteolytic trimming and affects the assembly of stable IBDV particles. Assembly of VLPs with the proper size and morphology, *i.e.* the T = 13 capsid, was not detected in cells expressing the polyprotein gene harboring the D431N mutation. Expression of pVP2 intermediate polypeptides with the point mutation D431N nonetheless can assemble either as all-pentamer structures (T = 1 SVP) or tubular structures built of pVP2 hexamers. The isolation of these assembly products excluded a possible misfolding of the polypeptide as they are built by the same structural block, VP2 trimers (19). The crystal structure of the mutant D431N VP2 protein provides additional experimental evidence supporting this interpretation. Similarly, mutations on the scissile bond Ala-441—Phe-442 yielded no production of particles.

We previously reported that the molecular switch controlling VP2 polymorphism resides in the C-terminal<sup>443</sup>GFKDII-RAIR<sup>452</sup> segment that is organized as an amphipathic  $\alpha$ -helix (19). In addition, most of the temporally bound 71-residue C-terminal segment consists of  $\alpha$ -helices (11). Our working model assumes that assembly control of the complex IBDV T = 13 capsid requires the electrostatic interaction of the acidic segment of the VP3 C-terminal region, whose importance was

previously established (29, 37), with the pVP2 amphipathic  $\alpha$ -helix as an initial event in the adoption of different conformational states. In this context it is easily envisioned how the D431N mutation is not only unable to cleavage the Ala-441—Pro-442 scissile bond but also might preclude or alter the interaction of VP3 with the helical region of VP2 at their inner base-ment of the VP2 S domain. Furthermore, we believe that the interaction of the C-terminal VP3 segment with the pVP2 amphipathic  $\alpha$ -helix might be necessary to temporally inhibit the last proteolytic event because, as reported previously, the pVP2 conformational state becomes irreversible (only able to assemble as pentamers) when its C-terminal region has been removed (21). Another fact that remains to be clarified in the sophisticated succession of interactions between VP3 and (p)VP2 refers to the high flexibility exhibited by the VP2 C-terminal end (21). It is likely that the conformational change originates from a rearrangement of some helical regions in the procapsid internal VP2 S domains as described for the Nudaurelia capensis  $\omega$  virus conformational change (14, 17, 38).

Noda- and tetra- viruses undergo a biphasic maturation process. During the first step, triggered by a reduction in pH, the procapsids undergo large scale structural rearrangements, thus quickly evolving to smaller, less porous, capsids; the second step is dependent on the first and consists of a relatively slow auto-proteolytic cleavage of the precursor CP subunits. Maturation of IPNV, a closely related birnavirus, also occurs by pVP2 processing to VP2 in which spherical provirions evolve to relatively smaller icosahedral virions (13). Our attempts to isolate IBDV-derived provirions using a wide variety of approaches have failed at present. This could be due to several factors: (i) a comparatively faster pVP2  $\rightarrow$  VP2 conversion rate for the IBDV capsid than that of its IPNV counterpart; or (ii) a weaker interaction between the IBDV pVP2 with the scaffolding protein VP3, thus leading to the assembly of more labile provirions.

In addition to the structural similarities between their CP polypeptides described above, birna-, noda-, and tetra- viruses share many other features at multiple levels (39). These viruses possess bipartite genomes with a similar overall organization (one segment coding for the RNA polymerase, and the other one encoding the capsid precursor protein). Interestingly, birna-, noda-, and tetra- virus mRNA lack 3'-terminal poly(A) tails (15, 40). Their RNA-dependent RNA polymerases exhibit a non-canonical organization exclusive of this three-virus group containing a specific sequence permutation of the catalytic palm subdomain (41–43). An additional similarity between birnaviruses and positive-sense ssRNA viruses is the protein priming of RNA synthesis, described for IPNV (44) and originally discovered in picornaviruses (45). A further parallel among noda-, tetra-, and birnaviruses refers to the presence of active capsid-associated  $\alpha$ -helical peptides generated during the proteolytic processing of the CP precursor C-terminal region. These peptides form hydrophilic channels that permeabilize biological membranes, allowing genome translocation during the virus entry process (11, 46). Finally, the multifunctional IBDV VP3 protein (involved in virus assembly as a scaffolding protein and RNA synthesis as an RNA-dependent RNA polymerase activator) is mostly found associated to the dsRNA segments forming ribonucleoprotein complexes (47). In this

## IBDV Capsid Protease Activity

sense, nodavirus also expresses a dsRNA-binding protein that acts as a potent suppressor, inhibiting host RNA silencing (48, 49). Our finding that the IBDV CP precursor is self-cleaved in a *cis*-processing event mediated by an aspartic acid residue adds further experimental evidence reinforcing the structural and functional relationships among icosahedral ssRNA and dsRNA viruses.

Viral CPs ensure the successful propagation of viral genomes by sheltering them from a hostile environment and guiding them through the interaction with specific cell receptors in their journey to reach an appropriate milieu for a successful replication process. Nevertheless, there is increasing evidence that CPs play other important roles. In addition to the Asp- or Glu-based proteolytic activities associated to birna-, noda-, and tetra virus, other CPs such that of Semliki Forest virus, an enveloped plus strand RNA virus, exhibits a self-cleaving serine protease activity (50). Enzymatic activities associated to CP in most known examples found in fully assembled virus particles are not exclusively restricted to protease activities. The CP of *Leishmania* RNA virus, a dsRNA virus that persistently infects the parasitic protozoan *Leishmania*, possesses a site-specific RNA endoribonuclease activity that cleaves viral positive-sense RNA (51, 52). L-A virus, another dsRNA virus that infects the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, has a CP that removes the m<sup>7</sup>GMP caps from host cellular mRNAs and covalently attaches them to a His residue on the capsid outer surface (53, 54). Unfortunately, the lack of specific sequence consensus motifs complicates the search for CP-associated enzymatic activities. Finally, these studies might settle the basis for the future design of capsid-targeted antiviral compounds trapping IBDV virion particles at an intermediate maturation stage rather than interrupting the assembly of capsid subunits, e.g. binding to trimers.

*Acknowledgment*—We thank J. L. Carrascosa (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) for stimulating discussions and other helpful input.

## REFERENCES

- Delmas, B., Kibenge, F. S. B., Leong, J. C., Mundt, E., Vakharia, V. N., and Wu, J. L. (2005) in *Virus Taxonomy* (Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A., eds) Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
- van den Berg, T. P., Eterradossi, N., Toquin, D., and Meulemans, G. (2000) *Rev. Sci. Tech.* **19**, 509–543
- Caspar, D. L. D., and Klug, A. (1962) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 1–24
- Baker, T. S., Olson, N. H., and Fuller, S. D. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 862–922
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B., and Rey, F. A. (2005) *Cell* **120**, 761–772
- Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V., and Crowther, R. A. (1997) *J. Virol.* **71**, 325–330
- Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I., and Carrascosa, J. L. (2001) *J. Virol.* **75**, 10815–10828
- Sánchez, A. B., and Rodríguez, J. F. (1999) *Virology* **262**, 190–199
- Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B., and Delmas, B. (2002) *J. Virol.* **76**, 2384–2392
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H., and Delmas, B. (2002) *J. Virol.* **76**, 2393–2402
- Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J., and Delmas, B. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 20774–20784
- Dobos, P. (1996) *Annu. Rev. Fish. Dis.* **5**, 25–54
- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdes, J. A., Jashes, M. M., and Sandino, A. M. (2004) *J. Virol.* **78**, 13829–13838
- Canady, M. A., Tihova, M., Hanzlik, T. N., Johnson, J. E., and Yeager, M. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 573–584
- Schneemann, A., Reddy, V., and Johnson, J. E. (1998) *Adv. Virus Res.* **50**, 381–446
- Gallagher, T. M., and Rueckert, R. R. (1988) *J. Virol.* **62**, 3399–3406
- Taylor, D. J., Krishna, N. K., Canady, M. A., Schneemann, A., and Johnson, J. E. (2002) *J. Virol.* **76**, 9972–9980
- Zlotnick, A., Reddy, V. S., Dasgupta, R., Schneemann, A., Ray, W. J., Jr., Rueckert, R. R., and Johnson, J. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13680–13684
- Saugar, I., Luque, D., Ona, A., Rodriguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L., and Caston, J. R. (2005) *Structure* **13**, 1007–1017
- Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Castón, J. R., and Rodríguez, J. F. (2004) *Virology* **322**, 135–142
- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J. F., Verdaguier, N., Garriga, D., Martin, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L., and Caston, J. R. (2007) *J. Virol.* **81**, 6869–6878
- Garriga, D., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguier, N., Castón, J. R., and Rodriguez, J. F. (2006) *J. Virol.* **80**, 6895–6905
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y., and Wang, A. H. (2006) *J. Struct. Biol.* **155**, 74–86
- Fernandez-Arias, A., Martinez, S., and Rodriguez, J. F. (1997) *J. Virol.* **71**, 8014–8018
- Martinez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F., and Casal, J. I. (2000) *Virology* **278**, 322–331
- Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L., and Rodriguez, J. F. (1999) *J. Virol.* **73**, 6973–6983
- Ward, G. A., Stover, C. K., Moss, B., and Fuerst, T. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6773–6777
- Earl, P. L. a. M. B. (1993) *Generation of Recombinant Vaccinia Viruses* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., More, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds) New York
- Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J. A., Castón, J. R., Pazos, F., and Rodríguez, J. F. (2003) *J. Virol.* **77**, 6438–6449
- Leslie, A. (1991) in *Crystallographic computing* (Moras, D., Podjarny, A., and Thiery, J., eds) Oxford University Press, Oxford
- Evans, P. (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921
- Castón, J. R., Rodríguez, J. F., and Casrascosa, J. L. (2008) in *Segmented double-stranded RNA viruses: Structure and Molecular Biology* (Patton, J. T., ed) Caister Academic Press, Norfolk
- Fernandez-Arias, A., Risco, C., Martinez, S., Albar, J. P., and Rodriguez, J. F. (1998) *J. Gen. Virol.* **79**, 1047–1054
- Taylor, D. J., and Johnson, J. E. (2005) *Protein Sci.* **14**, 401–408
- Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B., and Delmas, B. (2004) *J. Virol.* **78**, 3296–3303
- Bothner, B., Taylor, D., Jun, B., Lee, K. K., Siuzdak, G., Schultz, C. P., and Johnson, J. E. (2005) *Virology* **334**, 17–27
- Ahlquist, P. (2005) *Curr. Biol.* **15**, 465–467
- Hanzlik, T. N., and Gordon, K. H. (1997) *Adv. Virus Res.* **48**, 101–168
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodriguez, J. F., and Verdaguier, N. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20540–20545
- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddard, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H., and Ward, V. K. (2002) *J. Mol. Biol.* **324**, 47–62
- Pan, J., Vakharia, V. N., and Tao, Y. J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7385–7390

## IBDV Capsid Protease Activity

44. Xu, H. T., Si, W. D., and Dobos, P. (2004) *Virology* **322**, 199–210
45. Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., and Wimmer, E. (1998) *Nature* **393**, 280–284
46. Cheng, R. H., Reddy, V. S., Olson, N. H., Fisher, A. J., Baker, T. S., and Johnson, J. E. (1994) *Structure* **2**, 271–282
47. Hjalmarsson, A., Carlemalm, E., and Everitt, E. (1999) *J. Virol.* **73**, 3484–3490
48. Chao, J. A., Lee, J. H., Chapados, B. R., Debler, E. W., Schneemann, A., and Williamson, J. R. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 952–957
49. Chen, H. Y., Yang, J., Lin, C., and Yuan, Y. A. (2008) *EMBO Rep.* **9**, 754–760
50. Morillas, M., Eberl, H., Allain, F. H., Glockshuber, R., and Kuennemann, E. (2008) *J. Mol. Biol.* **376**, 721–735
51. MacBeth, K. J., and Patterson, J. L. (1995) *J. Virol.* **69**, 3458–3464
52. MacBeth, K. J., and Patterson, J. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8994–8998
53. Blanc, A., Ribas, J. C., Wickner, R. B., and Sonenberg, N. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2664–2674
54. Tang, J., Naitow, H., Gardner, N. A., Kolesar, A., Tang, L., Wickner, R. B., and Johnson, J. E. (2005) *J. Mol. Recognit.* **18**, 158–168

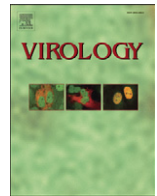






Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yviro](http://www.elsevier.com/locate/yviro)

## The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional $\alpha 4\beta 1$ integrin ligand motif

Laura Delgui<sup>a</sup>, Ana Oña<sup>a,1</sup>, Sylvia Gutiérrez<sup>a</sup>, Daniel Luque<sup>b,1</sup>, Aitor Navarro<sup>a,1</sup>, José R. Castón<sup>b</sup>, José F. Rodríguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco, Calle Darwin no. 3, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Structure of Macromolecules, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 October 2008  
Returned to author for revision  
17 December 2008  
Accepted 22 December 2008  
Available online xxxx

#### Keywords:

Infectious bursal disease virus  
Birnavirus  
Integrin  
Cell binding  
Virus entry

### ABSTRACT

Infectious bursal disease virus (IBDV), a member of the dsRNA *Birnaviridae* family, is an important immunosuppressive avian pathogen. We have identified a strictly conserved amino acid triplet matching the consensus sequence used by fibronectin to bind the  $\alpha 4\beta 1$  integrin within the protruding domain of the IBDV capsid polypeptide. We show that a single point mutation on this triplet abolishes the cell-binding activity of IBDV-derived subviral particles (SVP), and abrogates the recovering of infectious IBDV by reverse genetics without affecting the overall SVP architecture. Additionally, we demonstrate that the presence of the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer is a critical determinant for the susceptibility of murine BALB/c 3T3 cells to IBDV binding and infectivity. Our data suggests that the IBDV might also use the  $\alpha 4\beta 1$  integrin as a specific binding receptor in avian cells.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Infectious bursal disease virus (IBDV) is the best characterized member of the *Birnaviridae* family that groups naked viruses with a bipartite double-stranded (dsRNA) RNA genome (Delmas et al., 2004). IBDV is responsible for an immunosuppressive disease that affects young domestic chickens (*Gallus gallus*), and causes major economic losses to the poultry industry world-wide (van den Berg et al., 2000).

The knowledge about IBDV structural and molecular biology has experienced a great progress over the last few years, thus the crystal structure of all structural polypeptides has been completely or partially solved (Casañas et al., 2008; Coulibaly et al., 2005; Feldman et al., 2006; Garriga et al., 2007, 2006; Lee et al., 2006; Pan et al., 2007), and the virus assembly pathway has been extensively characterized (Chevalier et al., 2005; Luque, 2007; Oña et al., 2004; Saugar et al., 2005). However, our understanding about fundamental aspects of the virus replication cycle, e.g. the entry and egress mechanisms is, as yet, scarce.

Viruses are obligate intracellular parasites, thus the first requirement to initiate a successful infection consists on the recognition of a suitable receptor(s) on the surface of target cells. This recognition sets off a series of events, generally involving an elaborated interplay between different cellular and viral components, allowing the virus to

reach the appropriate cellular compartment for virus replication (Smith and Helenius, 2004). Indeed, the presence and distribution of specific virus receptor(s) molecules are in many cases critical determinants for virus host-range, tropism, and pathogenesis.

The IBDV capsid (65–70 nm in diameter) is a single shell built by 260 trimers of the VP2 polypeptide arranged in an icosahedral lattice with T=131 symmetry (Bottcher et al., 1997; Coulibaly et al., 2005; Saugar et al., 2005). VP2 is produced by proteolytic maturation of a precursor polypeptide, known as pVP2 (Birghan et al., 2000; Feldman et al., 2006). VP2 is the only component of the virus capsid, and thus responsible to the interaction with host cell receptors. Although the tropism of IBDV for lymphocytic cell populations found at the Fabricius bursa has been extensively characterized (Becht, 1980; Kibenge et al., 1988), the identification of specific cell binding receptor (s) has remained elusive.

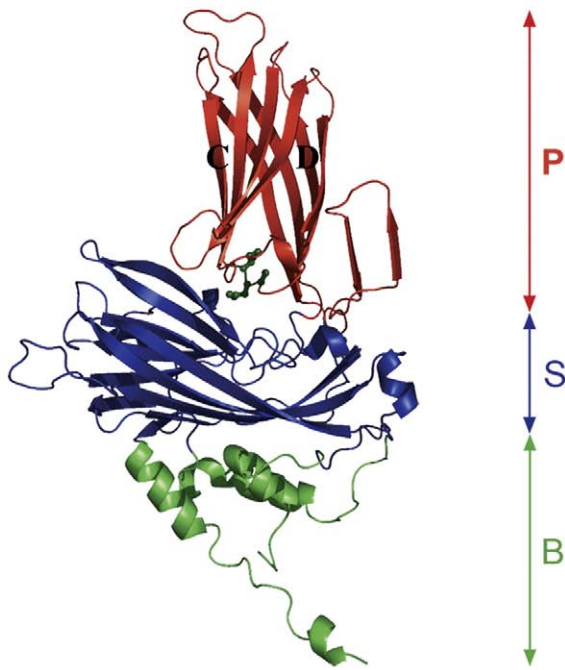
The VP2 crystal structure, independently solved by three different groups (Coulibaly et al., 2005; Garriga et al., 2006; Lee et al., 2006), revealed the presence of three distinct domains designated base (B), shell (S), and projection (P) (Fig. 1A). Domain P, formed by a  $\beta$ -barrel with a jelly roll topology, is well exposed to the solvent, thus being a likely candidate to interacting with the host cell binding receptor(s). This hypothesis is supported by the presence within this domain of several neutralizing epitopes (Fahey et al., 1989), and amino-acid residues directly involved both in virulence and tissue-culture adaptation (Brandt et al., 2001; van Loon et al., 2002). Additionally, the P domain shows a high degree of structural homology with projection domains of reovirus capsid polypeptides directly involved

\* Corresponding author. Fax: +34 91 5854506.

E-mail address: [jfrodri@cnb.csic.es](mailto:jfrodri@cnb.csic.es) (J.F. Rodríguez).

<sup>1</sup> Present address: Kapsid Link S.L., Alcalá 420, 28017 Madrid, Spain.

A



B

Soroa	<b>TITLFSANIDAITSLSVGGE</b>	(226–245)	AAD30136
D78	<b>TITLFSANIDAITSLSVGGE</b>	(226–245)	AAO15768
52/70	<b>TITLFSANIDAITSLSIGGE</b>	(219–238)	BAA00745
UK661	<b>TITLFSANIDAITSLSIGGE</b>	(226–245)	NP690838
Variant_E	<b>TITLFSANIDAITSLSVGGE</b>	(226–245)	AAD32617
OH	<b>KTTLFTANIDALTSLVGGE</b>	(226–245)	AAC55351

**Fig. 1.** Identification of a conserved putative integrin binding motif on the VP2 capsid polypeptide. (A) Ribbon diagram of the VP2 polypeptide. The three VP2 domains, namely P, S, and B, colored in red, blue, and green, respectively, are delimited by arrows. The lateral chains of the IDA motif amino acid residues are shown in dark green. The position of the C and D  $\beta$ -strands is indicated. (B) Multiple alignment comparing the predicted amino acid sequences of the IBDV VP2 from attenuated (D78), classical virulent (52/70), very virulent (UK661), and variant (Variant E) serotype 1, and classical serotype 2 (OH) strains to that of the virulent serotype 1 Soroa isolate. The image shows 20 residues-long protein regions containing the putative IDA integrin binding motif (shown in bold). Non-strictly conserved residues are shown in red. The amino acid positions and the GenBank accession numbers of the different proteins are indicated on the right. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

in cell adhesion and/or penetration processes (Graham et al., 2005, 2006; López and Arias, 2004; Maginnis et al., 2006; Tan et al., 2001).

Early studies on the nature of the IBDV cell receptor(s) showed that the treatment of chicken B lymphoblastoid cells with proteases and/or N-glycosylation inhibitors cause a major reduction on IBDV infectivity, thus strongly suggesting the involvement of a N-glycosylated membrane polypeptide(s) during the first stages of virus infection (Ogawa et al., 1998). Initial attempts to identifying IBDV specific receptor polypeptides were based on the use of virus overlay protein binding assays. This approach led to the detection of several membrane polypeptides specifically interacting with immobilized IBDV particles (Nieper and Muller, 1996; Setiyono et al., 2001). However, their identity and the actual implication on IBDV cell binding and entry remain uncharacterized. More recently, the use of IBDV-derived subviral particles (SVP), generated by VP2 recombinant expression, has led to the identification of the chicken heat shock protein 90 (cHsp90) as a major component of a putative IBDV receptor complex including other cellular polypeptides (Lin et al., 2007).

Similarly to many other icosahedral viruses (Boulanger, 1999), some members of the dsRNA *Reoviridae* family use integrins as binding receptors and/or essential entry molecules (Graham et al., 2005, 2006; López and Arias, 2004; Maginnis et al., 2006; Tan et al., 2001). Integrins form a superfamily of adhesion receptors involved in a wide variety of matrix–cell and cell–cell interactions. Members of this superfamily are heterodimers formed by two glycosylated transmembrane proteins termed  $\alpha$  and  $\beta$ , respectively. Both the structural similarity of the IBDV VP2 P domain to the corresponding projection domains of reovirus capsid polypeptides (Coulibaly et al., 2005), and the glycosylated nature of the integrins suggested that IBDV might also employ an integrin(s) during its cell entry process.

Integrins mediate cell adhesion to extracellular matrix, cell membrane, and virus capsid polypeptides through the recognition of short linear ligand sequence motifs. Many integrin-binding motifs have been extensively characterized (Hynes, 1999; Komoriya et al., 1991; Plow et al., 2000; Staatz et al., 1991), facilitating the search for putative integrin-binding motifs within the VP2 sequence. This search resulted in the identification of the Ile-Asp-Ala (IDA) sequence within the VP2 P domain. That motif matches the XDY triplet (X=G, L, I, E; Y=V, A) used by the  $\alpha 4\beta 1$  integrin in binding to fibronectin (Fn) (Mould and Humphries, 1991). This finding prompted us to perform a series of experiments aimed to characterizing the roles of both the VP2 IDA motif and the  $\alpha 4\beta 1$  integrin on the binding of IBDV to susceptible cells.

The results described in this report show that, with the virus strain and cell lines used for the present study, the VP2 IDA motif plays a critical role in the binding of IBDV-derived SVP and virus particles to IBDV-susceptible cells, and that a single point mutation on this motif completely abrogates SVP cell binding and virus infectivity. Additionally, we demonstrate that transformation with a recombinant expression plasmid harboring the  $\alpha 4$  subunit gene is sufficient to turn naturally  $\alpha 4$ -lacking murine BALB/c 3T3 fibroblasts from resistant to IBDV attachment and infection to permissive for both phenomena.

## Results

### Identification of a putative integrin–ligand motif within the IBDV capsid polypeptide

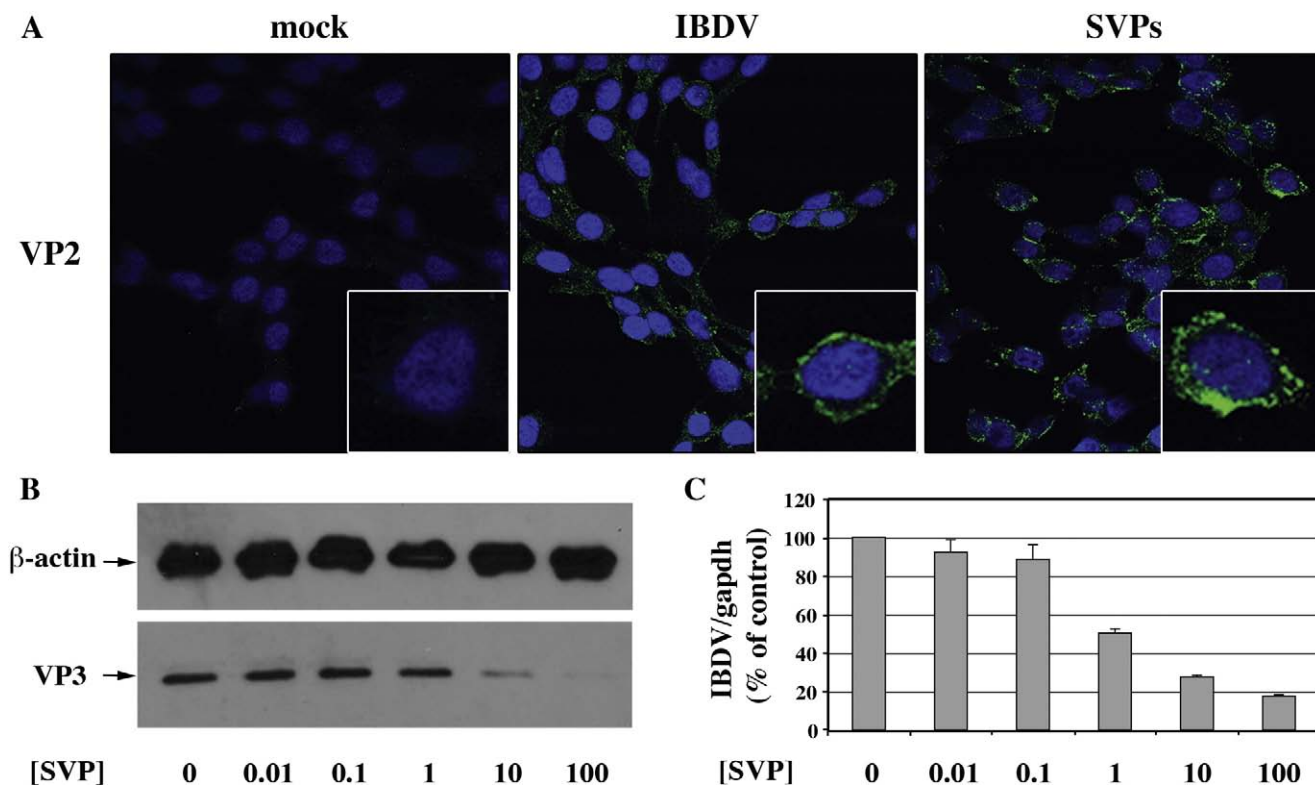
The amino acid sequence of the VP2 polypeptide from the IBDV Soroa strain was scanned for integrin-binding sequences. This led to the identification of the Ile-Asp-Ala sequence (IDA, residues 234–236) (Fig. 1B) matching the XDY (X=G, L, I, E; Y=V, A) amino acid triplets used by the  $\alpha 4\beta 1$  integrin in binding to Fn, and in particular to the IDA motif found in the Fn H1 fragment (Mould and Humphries, 1991). The identified VP2 IDA sequence is located within a flexible loop, connecting the C and D  $\beta$  strands, at the base of the P domain (Fig. 1A).

A multiple alignment performed with over 100 VP2 sequences from antigenic variant, classical virulent, very virulent, as well as tissue culture-adapted IBDV serotype 1 and serotype 2 isolates, indicated that the IDA triplet is strictly conserved in all members of the *Avibirnavirus* genus. Fig. 1B, showing a multiple alignment of VP2 sequences from representative IBDV strains, summarizes this finding.

### Binding of IBDV-derived SVP to DF-1 cells

In order to assess the feasibility of using IBDV-derived SVP as a model to analyze the role of the IDA motif on cell attachment, it was critical to determine whether they were able to bind to IBDV-susceptible cells. IBDV and SVP were produced, purified, and analyzed by EM as previously described (Castón et al., 2001a). DF-1 monolayers, grown on coverslips, were incubated for 1 h at 4 °C with a suspension of either purified virus or SVP. Thereafter, cells were processed for CLSM using an anti-VP2 specific antiserum. As shown in Fig. 2A, cells





**Fig. 2.** IBDV-derived SVP bind to the surface of DF-1 cells and inhibit IBDV infection. (A) DF-1 cultures were incubated for 1 h at 4 °C with a suspension containing either purified virus (IBDV) or purified SVP (SVP). Control cultures (mock) were incubated with DMEM. After incubation, cells were processed for CLSM using specific anti-VP2 antibodies. The green signal (Alexa 488) corresponds to VP2. The blue signal (ToPro-3) corresponds nuclear staining. Inlets show a 2.5 $\times$  magnification of selected image areas. DF-1 cultures were incubated with suspensions containing a constant amount of purified IBDV and increasing SVP concentrations. Cultures were harvested at 16 h p.i., and the corresponding extracts were analyzed by Western blotting and qRT-PCR. (B) Western blot analysis. The accumulation of the IBDV-encoded VP3 polypeptide was analyzed using specific anti-VP3 serum. The total protein load in the different samples was evaluated using a mouse anti-chicken  $\beta$ -actin antibody. The positions of the  $\beta$ -actin and VP3 polypeptides are indicated by arrows. (C) qRT-PCR analysis. The amount of IBDV-specific RNA accumulated in the different cultures was determined by qRT-PCR. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

incubated with SVP show an intense membrane staining pattern, similar to that observed after incubation of cell monolayers with purified virus, thus demonstrating that SVP efficiently bind to the surface of DF-1 cells.

#### SVP efficiently block IBDV infection

Results described above suggested that both IBDV and SVP might bind to the same cell receptor(s) on the membrane of DF-1 cells. To test this hypothesis, the ability of SVP to block IBDV infection was tested. DF-1 monolayers were incubated for 30 min at 37 °C with suspensions containing a constant amount of purified IBDV and increasing SVP concentrations. After incubation, cultures were maintained at 39 °C during 16 h. Accumulation of the virus-encoded

VP3 polypeptide and viral RNA was determined by Western blot and qRT-PCR, respectively. As shown in Figs. 2B and C, the presence of SVP at concentrations  $\geq 1$   $\mu$ g/ml causes a major reduction on the accumulation of both IBDV polypeptides and RNAs. These results strongly suggest that virions and SVP compete for the same receptor (s) on the cell surface, and support the use of SVP as a tool to characterizing IBDV entry mechanism.

#### Effects of single point mutations of the VP2 IDA sequence on SVP cell binding

Mutations on the D residue present in the Fn H1 fragment IDA motif completely abolish the ability of the fragment to interact with the  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Mould and Humphries, 1991). Hence, it was important to

**Table 1**  
Oligonucleotide primers used for VP2 mutagenesis and RT-PCR assays

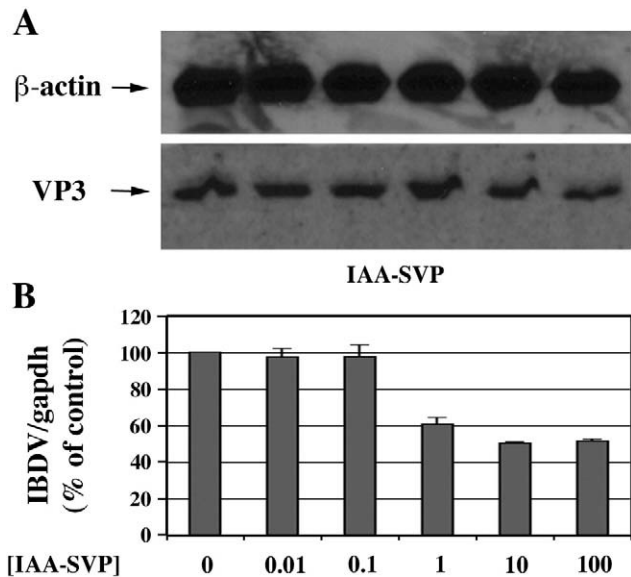
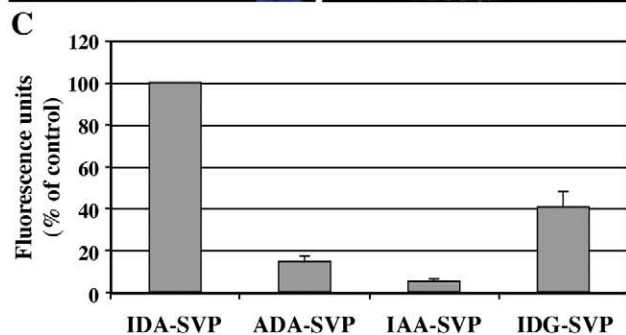
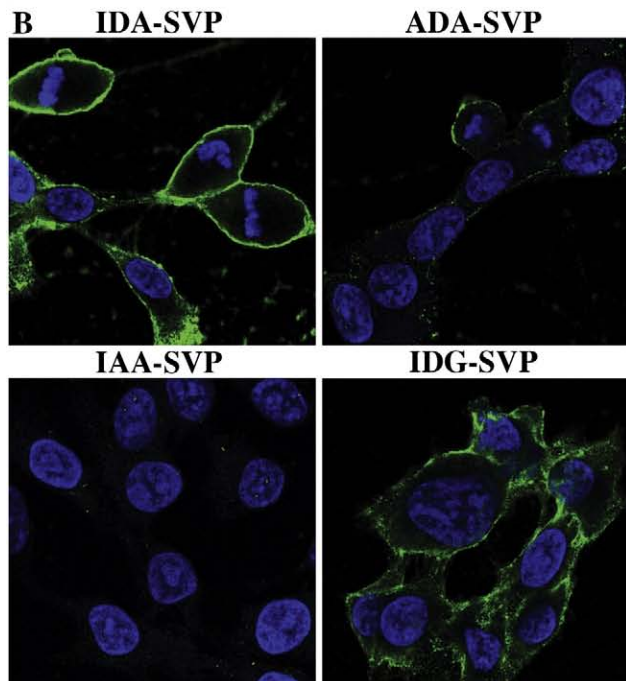
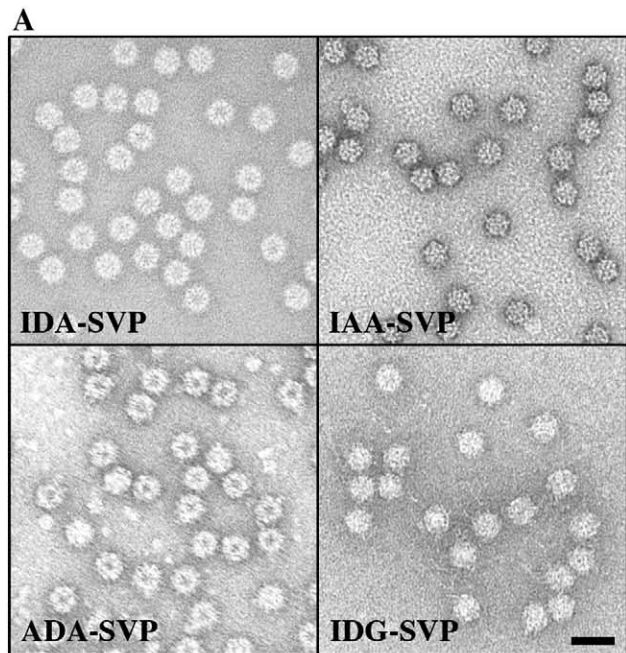
	Sense primer (5'-3')	Anti-sense primer
<b>Mutation</b>		
I234A	CTCAGCCAACGCTGATGCCATCACAA	GAGGCTTGTGATGGCATCAGCGTTGGCTGA
D234A	AGCCAACATTGCTGCCATCAC	GTGATGGCAGCAATGTTG
A236G	AACATTGATGGCATCACAAAGC	GCTTGTGATGCCATCAATGTT
<b>Gene</b>		
VP2 (IBDV) <sup>a</sup>	TACCAACAGGTGGGGTAACA	GCTGGGTTATCTCGTTTGTGG
GAPDH ( <i>Gallus gallus</i> ) <sup>b</sup>	ATGGTGAAGTCCGAGTCAACG	GACAGTGCCTTGAAGTGTC
GAPDH ( <i>Mus musculus</i> ) <sup>c</sup>	TGACGTGCCCGCTGGAGAAA	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG

<sup>a</sup> Accession number AAD30136.

<sup>b</sup> Accession number AF047874.

<sup>c</sup> Accession number NM008084.

determine the effect of single point mutations of the VP2 IDA triplet on the ability of SVP to bind DF-1 cells. Accordingly, three mutant VP2 recombinant genes harboring the following single amino acid substitutions were generated: i) I234A (ADA-SVP); ii) D235A (IAA-SVP); and iii)



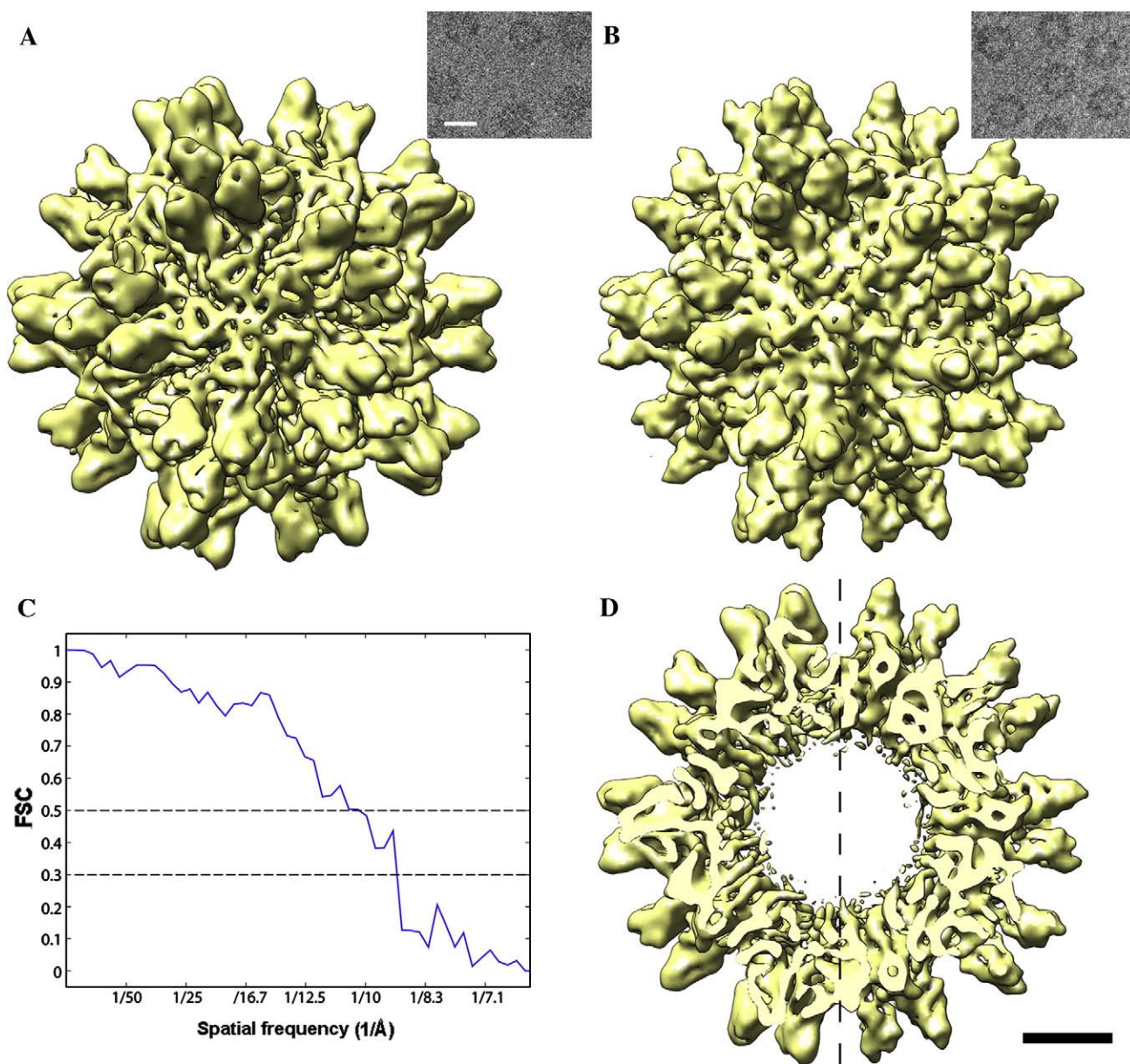
**Fig. 4.** A single point mutation on IDA sequence motif abrogates the ability of SVP to block IBDV infection. DF-1 cultures were incubated with suspensions containing a constant amount of purified IBDV and increasing concentrations of IAA-SVP. At 16 h p.i., cells were harvested, and the corresponding extracts analyzed by Western blotting, and qRT-PCR, respectively. (A) Western blot analysis. The accumulation of the IBDV-encoded VP3 polypeptide was analyzed using specific anti-VP3 serum. The total protein load in the different samples was evaluated using a mouse anti-chicken  $\beta$ -actin antibody. The positions of the  $\beta$ -actin and VP3 polypeptides are indicated by arrows. (B) qRT-PCR analysis. The amount of IBDV-specific RNA accumulated in the different cultures was determined by qRT-PCR.

A236G (IDG-SVP) (Table 1). All three mutant polypeptides, expressed in H5 cells using rBVs, gave rise to standard amounts of SVP. SVP resulting from the expression of mutant VP2 genes were purified, negatively-stained, and observed by EM. As shown in Fig. 3A, the mutations introduced on the VP2 sequence do not cause a microscopically detectable effect on the morphology or the size of the resulting SVP.

To characterize the effect of the described mutations on SVP cell binding activity, DF-1 monolayers were incubated with suspensions of purified SVP. After incubation, cultures were processed for CLSM analysis using anti-VP2. The results of this analysis, shown in Fig. 3B, demonstrate that whilst mutant ADA- and IDG-SVP retain to some extent the ability to attach to DF-1 cells, IAA-SVP are apparently unable to bind to the cell surface. In order to confirm these results, a quantitative analysis was performed using images collected from three independent experiments simultaneously performed with all SVP under analysis. The results of this analysis (Fig. 3C) confirmed the initial observations. Reductions of 85 and 59% with respect to control WT-SVP were observed with ADA- and IDG-SVP, respectively. As expected, a higher drop on cell binding activity ( $\geq 95\%$ ) was documented with IAA-SVP.

These results led us to hypothesize that IAA-SVP might have also lost the ability to compete IBDV infectivity. To assess this possibility, a series of SVP/IBDV competition experiments was performed. DF-1 cell monolayers were incubated for 30 min at 37 °C with suspensions

**Fig. 3.** Characterization of IBDV-derived SVP containing single point mutations on the IDA sequence motif. (A) Electron microscopy images corresponding to negatively stained WT IDA-, mutant ADA-, IAA-, and IDG-SVP, respectively. The scale bar represents 50 nm. (B) Binding of mutant SVP to DF-1 cells. DF-1 cultures were incubated with suspensions containing WT- ADA-, IAA-, and IDG-SVP, respectively. After incubation, cells were processed for CLSM using specific anti-VP2 antibodies. Green (Alexa 488) corresponds to VP2. Blue signal (ToPro-3) corresponds to nuclear staining. (C) Quantification of the relative intensity of fluorescence signals. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 5.** Three-dimensional reconstructions of WT IDA- and mutant IAA-SVP. (A, B) Surface-shaded representations of the outer surfaces of WT- (A) and IAA-SVP (B) viewed along a five-fold axis of icosahedral symmetry, at 9.1 Å resolution. Inlets show representative cryo-micrographs of WT- (left) and IAA-SVP (right). The scale bar represents 200 Å. (C) Structural homology of WT- and IAA-SVP assessed by the FSC resolution curve between both maps. The resolutions where the correlations drop below 0.5 and 0.3 are indicated. For the 0.3 threshold, both maps are identical at 9.1 Å (for the 0.5 threshold, the value is 10.5 Å). (D) SVP 50-Å-thick slab of WT- (left) and IAA-SVP (right) three dimensional reconstructions. The scale bar represents 50 Å.

containing a constant amount of purified IBDV and increasing concentrations of either WT- or IAA-SVP. After incubation, monolayers were maintained at 39 °C during 16 h. After this period, cultures were harvested, and the accumulation of the virus-encoded VP3 polypeptide and viral RNA determined by Western blot and qRT-PCR, respectively.

As shown in Figs. 4 and B, IAA-SVP have a much lesser impact on IBDV infectivity than that observed with WT-SVP (Fig. 2), thus indicating that, in addition to the reduction on the binding capacity, the D235A substitution strongly reduces the ability of SVP to block IBDV infection. The observation that non-binding IAA-SVP retain to some extent their ability to block IBDV infection was not unexpected. We have previously shown that SVP and IBDV particles form regularly shaped aggregates (Castón et al., 2001a). X-ray analysis revealed that this phenomenon is due to the establishment of extensive contacts between the VP2 P domains of neighboring particles (Garriga et al.,

2006). Hence, it seems likely that, when present at high concentrations, SVP might interact with infectious virus particles, thus preventing the contact of the latter with specific cell receptor molecules, and consequently reducing their infectivity.

The results obtained correlate with the definition of Fn H1 IDA motif, where mutations affecting the central aspartate residue cause the loss of the Fn H1 adhesive activity (Mould and Humphries, 1991), and further support the hypothesis that the VP2 IDA sequence is directly implicated in the binding of SVP and virus particles to DF-1 cells.

#### Structural characterization of IAA-SVPs

The results described above strongly suggested that the D235A substitution might be responsible for a drastic alteration on the ability of the resulting SVP to interact with a cell surface receptor. However, the available information did not rule out the possibility that this

**Table 2**  
Virus titers obtained by reverse genetics

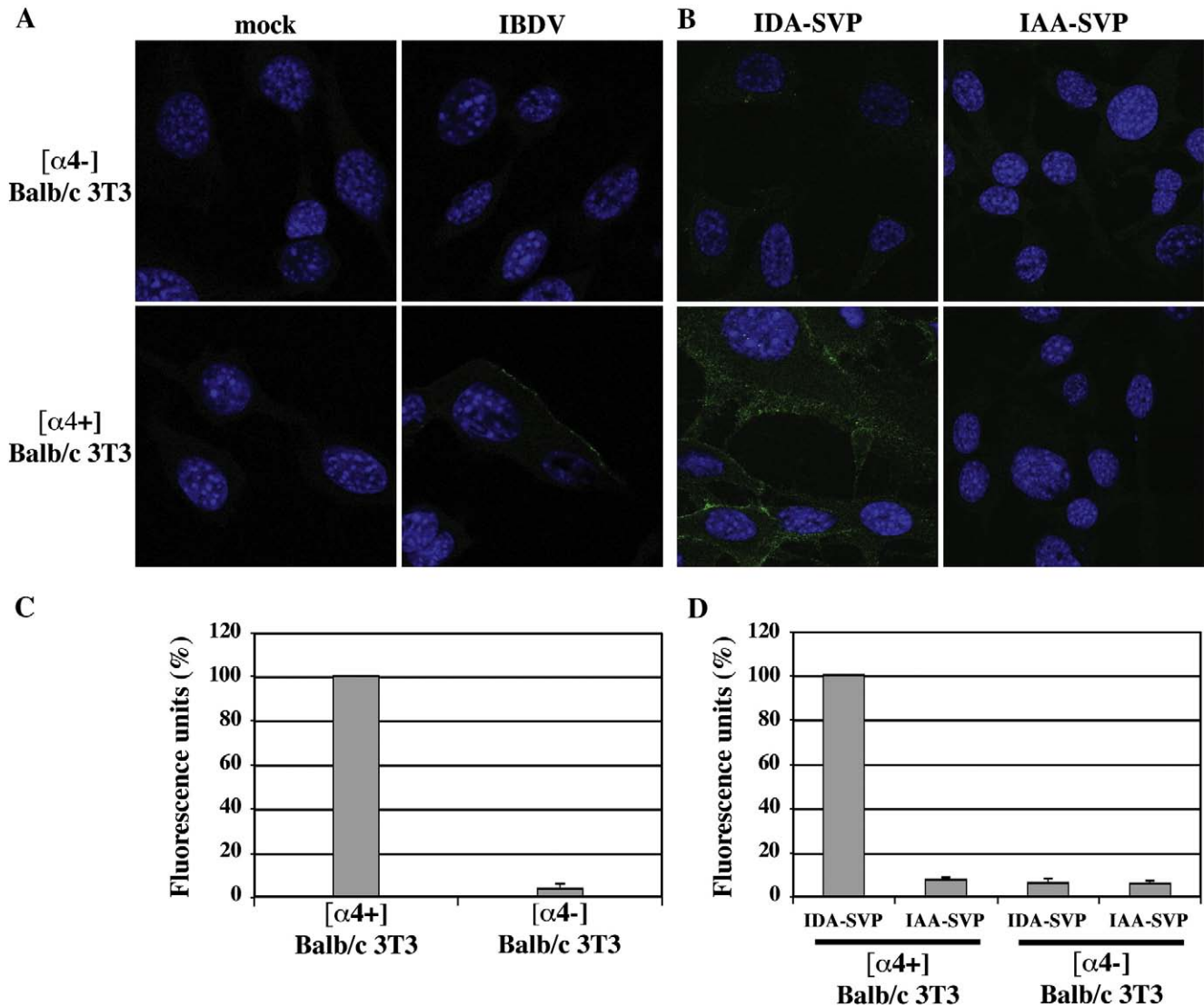
	Virus titers (PFU/ml)		
	First round	Second round	Third round
pT7-SA-Rz + pT7-SB-Rz	$1.3 \pm 0.5 \times 10^2$	$9.0 \pm 1.3 \times 10^4$	$6.0 \pm 1.5 \times 10^7$
pT7-SA(D235A)-Rz + pT7-SB-Rz	0	0	0

mutation might affect either the stability and/or the overall architecture of the SVP. To gather information about SVP stability, suspensions containing 100 µg/ml of either WT- or IAA-SVPs were prepared using DMEM, and collected after a 2 h incubation period at 4 °C, from DF-1 cultures. SVP suspensions were subjected to a sucrose-gradient-based purification process as previously described. Samples from fractions collected from the corresponding gradients were

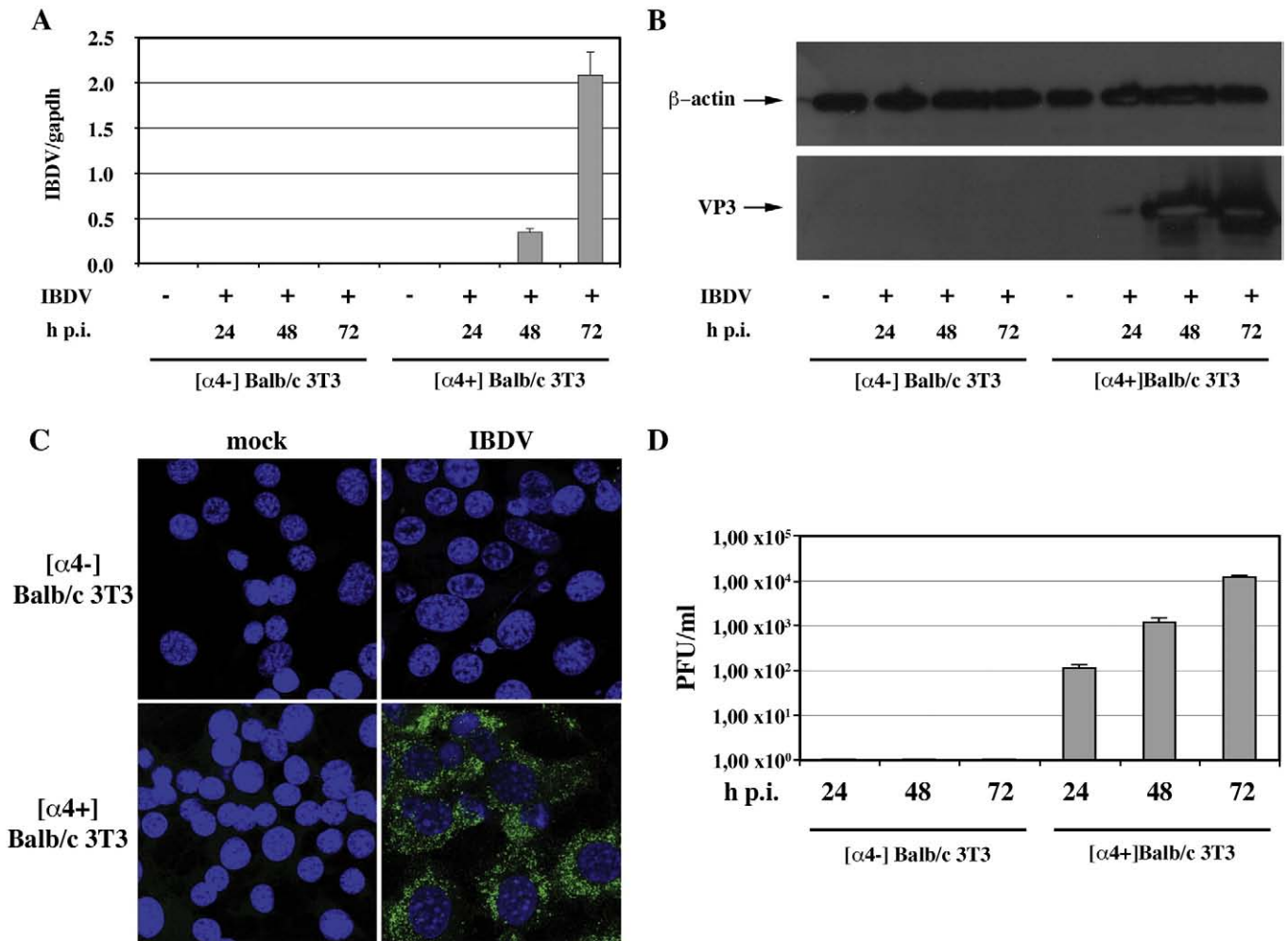
subjected to SDS-PAGE and Western blot using anti-VP2 serum. The results of this analysis did not evidenced significant differences on the stability of wild type and mutant SVPs (data not shown).

In order to explore the effect of the D235A substitution on the structure of the mutant SVP, three-dimensional density maps of WT- and IAA-SVP capsids were generated using images from cryomicrographs (Figs. 5A, B, insets). The final SVP density maps were calculated to a 7.2 Å and 9.3 Å resolution, respectively (Figs. 5A, B). At this resolution, numerous rod- and sheet-like densities are apparent (Figs. 5A, B, and D), and secondary structural elements were identified by docking the closely related 2.6 Å VP2 X-ray map (PDB entry 2GSY) (Garriga et al., 2006) into both density maps (Supplemental information, Fig. S1). The molecular architecture of IAA-SVP is essentially identical to that of previously described WT-SVP (Bottcher et al., 1997; Castón et al., 2001a; Coulibaly et al., 2005) at ~9 Å resolution, as assessed by FSC calculated between them (Fig. 5C).

Altogether, the results of the structural analysis rule out the possibility that the non-binding phenotype observed with IAA-SVPs might be due to a conspicuous alteration on SVP architecture.



**Fig. 6.** The binding of IBDV and SVP to BALB/c 3T3 cells is dependent upon the expression of the α4 integrin subunit. (A and B) [α4-] and [α4+] BALB/c 3T3 cultures were incubated with (A) suspensions of purified virus or (B) purified WT- and IAA-SVP, respectively. After incubation, cells were processed for CLSM using specific anti-VP2 antibodies. The green signal (Alexa 488) corresponds to VP2. The blue signal (ToPro-3) corresponds nuclear staining. (C and D) Quantification of the relative intensity of fluorescence signals. Data are represented as percentages with respect to values obtained in cultures of [α4+] Balb/c 3T3 cells (C) or in cultures incubated with WT-SVP (D). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 7.** Expression of the  $\alpha 4$  integrin subunit is essential for the susceptibility of BALB/c 3T3 cells to IBDV infection. [α4-] and [α4+] BALB/c 3T3 cultures were incubated with purified IBDV or with normal medium (-), and maintained at 37 °C. At 24, 48, and 72 h p.i., cells were harvested and the corresponding extracts analyzed by qRT-PCR and Western blot. (A) qRT-PCR analysis. The amount of IBDV-specific RNA accumulated in the different cultures was determined by qRT-PCR. (B) Western blot analysis. The accumulation of the IBDV-encoded VP3 polypeptide was analyzed using specific anti-VP3 serum. The total protein load in the different samples was evaluated using a rabbit anti-mouse  $\beta$ -actin antibody. The positions of the  $\beta$ -actin and VP3 polypeptides are indicated by arrows. (C) CLSM analysis. [α4-] and [α4+] BALB/c 3T3 cultures were incubated with purified IBDV, and maintained at 37 °C. At 24, 48, and 72 h p.i., cells were processed for CLSM using specific anti-VP3 antibodies. The green signal (Alexa 488) corresponds to VP3. The blue signal (ToPro-3) corresponds to nuclear staining. (D) Virus titrations. Supernatants corresponding to the different cultures were used for virus titrations. Virus titers are expressed as PFU/ml. Presented data corresponds to three independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

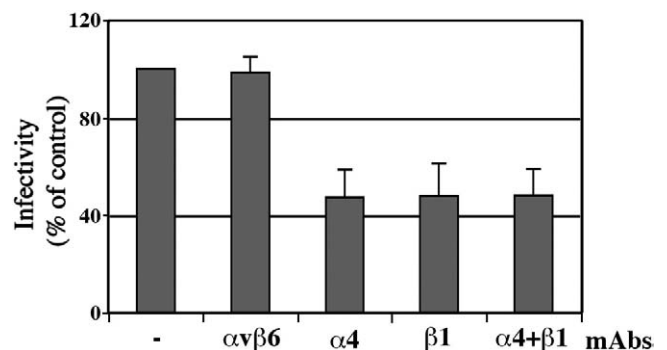
#### VP2 D235A substitution abolishes IBDV infectivity

Results described so far demonstrate that the VP2 IDA triplet is critical for the binding of SVP to the membrane of IBDV-susceptible DF-1 cells. Hence, it was important to assess the relevance of this tripeptide on IBDV infectivity. This analysis was carried out using a reverse genetics approach using plasmids pT7-SA-Rz and B pT7-SB-Rz containing the cDNA sequences corresponding to IBDV segments A and B, respectively. A third plasmid, pT7-SA/D235A-Rz, harboring a mutant version of segment A cDNA containing the D235A substitution was generated as described above.

QM7 cells were transfected with a mixture of plasmids pT7-SA-Rz and pT7-SB-Rz, and pT7-SA/D235A-Rz and pT7-SB-Rz, respectively. After transfection, cultures were infected with VT7LacOI. At 72 h p.i., cultures were harvested, and used to assess the presence of infective IBDV.

The results obtained, presented in Table 2, demonstrate that the D235A substitution abolishes the production of an infectious IBDV progeny. Western blot analysis indicated that failure to recovering infectious IBDV from cells transfected with plasmids pT7-SA/D235A-Rz and pT7-SB-Rz was not due to problems in the expression of the polyprotein containing the D235A substitution (data not shown).

This finding, in agreement with the observations described above, evidences the critical importance of the VP2 D235 residue on IBDV infectivity.



**Fig. 8.** Inhibition of IBDV infectivity by anti-integrin specific Abs. [α4+] BALB/c 3T3 cells cultures were pretreated for 1 h at 4 °C with Abs specific to integrin subunits before infecting with purified IBDV for 20 h. Results, corresponding to three independent experiments performed in duplicate, are presented as the percentage of virus infectivity obtained in cells preincubated in the absence of Abs (-).

### *Expression of the $\alpha 4\beta 1$ integrin is necessary for SVP attachment to murine BALB/c 3T3 cells*

The results described above suggested that the  $\alpha 4\beta 1$  integrin might act as a binding receptor for IBDV. Our initial strategy to assess this possibility was based on the silencing of  $\alpha 4$  and/or  $\beta 1$  subunit gene expression. However, repeated attempts to blocking the expression of these genes using different RNA oligonucleotide sets failed (data not shown). Consequently, we decided to explore an alternative approach based on the use of a previously described BALB/c 3T3 cell system. Murine BALB/c 3T3 fibroblasts do not naturally express the  $\alpha 4$  subunit, thus their cell membrane lacks the  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Zeller et al., 1998). Caruso et al. (2003) generated a couple of BALB/c 3T3-derived cell lines, termed  $[\alpha 4+]$  and  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3, respectively. The only documented difference between these two cell lines being the expression of the  $\alpha 4$  subunit, and the consequent presence of the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer on the membrane of  $[\alpha 4+]$  cells.

Before initiating our experiments, the expression of the  $\alpha 4$  and  $\beta 1$  integrins at the surface of  $[\alpha 4+]$  and  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3 cells was analyzed by flow cytometry. The  $\beta 1$  subunit was abundantly expressed on both  $[\alpha 4+]$  and  $[\alpha 4-]$  cells. As expected, the expression of the  $\alpha 4$  subunit was exclusively detected in  $[\alpha 4+]$  BALB/c 3T3 cells (Data not shown).

The ability of IBDV particles as well as WT- and IAA-SVP to bind to  $[\alpha 4+]$  and  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3 cells was analyzed by CLSM. Cell monolayers were incubated with suspensions containing purified virus, WT-, and IAA-SVP, respectively. After incubation, cells were processed for CLSM analysis using anti-VP2 antiserum. As shown in Figs. 6A, B, IBDV virions and WT-SVP efficiently attach to  $[\alpha 4+]$  BALB/c 3T3 cells but do not to  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3 cells. Interestingly, IAA-SVP do not bind neither  $[\alpha 4+]$  nor  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3 cells (Figs. 6A, B). Quantitative analyses of CLSM images (Figs. 6C, D) confirmed the information gathered by the direct microscopic observation.

As described above, IBDV uses the Hsp90 polypeptide as a post-binding receptor (Lin et al., 2007). It has been recently shown that depletion of the Hsp90 polypeptide from murine B lymphocytes results in a major reduction on the surface expression of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Liu and Li, 2008). Accordingly, it seemed feasible that  $\alpha 4\beta 1$  expression might enhance Hsp90 surface expression. This might facilitate the interaction of SVP with Hsp90 instead of with the  $\alpha 4\beta 1$  integrin under study. However, as determined by flow cytometry analyses, both cell lines,  $[\alpha 4+]$  and  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3, exhibit negligible Hsp90 surface levels (Supplemental data Fig. S2), thus ruling out such possibility.

The results of this series of experiments show that the attachment of both IBDV and SVP to BALB/c 3T3 cells is strictly dependent upon the presence of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin at the cell membrane.

### *$\alpha 4\beta 1$ integrin expression is an essential factor for the susceptibility of BALB/c 3T3 cells to IBDV infection*

Results described above demonstrate that the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer is essential for IBDV attachment to BALB/c 3T3 cells. However, at this point we could not rule out that IBDV binding to  $\alpha 4\beta 1$ -expressing cells might be unrelated with the ability of the virus to enter the cells and initiate a productive infection. To investigate this possibility  $[\alpha 4+]$  and  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3 monolayers were incubated for 1 h at 37 °C with purified IBDV. At 24, 48, and 72 h p.i., cells were harvested and used for qRT-PCR, CLSM, Western blot, and virus titration analyses. The results obtained clearly evidenced that incubation of  $[\alpha 4+]$  BALB/c 3T3 cells leads to accumulation of IBDV-specific RNAs (Fig. 7A), and the IBDV VP3 polypeptide (Figs. 7B and C). Additionally, virus titrations showed that  $[\alpha 4+]$  BALB/c 3T3 support the production of an infectious progeny (Fig. 7D). The low IBDV titers obtained were expected due to the fact that the virus had not been previously adapted to growing in this cell

line. As expected from previous results,  $[\alpha 4-]$  BALB/c 3T3 were completely resistant to IBDV infection as evidenced by their resistance to accumulate IBDV-specific RNAs and polypeptides, and to produce infective virus (Figs. 7A–D).

Taken together, these results demonstrate that the presence of the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer allows the initiation of a productive IBDV replication cycle, thus demonstrating that the  $\alpha 4\beta 1$  integrin acts as a bona-fide receptor for IBDV in  $[\alpha 4+]$  BALB/c 3T3 cells.

### *Inhibition of IBDV infectivity by function-blocking anti- $\alpha 4$ and - $\beta 1$ mAbs*

To further confirm the role of the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer on the ability of transfected  $[\alpha 4+]$  BALB/c 3T3 cells to support IBDV infection, the effect of anti- $\alpha 4\beta 1$  function-blocking mAbs was analyzed.  $[\alpha 4+]$  BALB/c 3T3 cultures were incubated for 1 h at 4 °C with mAbs directed against the  $\alpha 4$  or the  $\beta 1$  polypeptide, or a combination of both. As controls for this experiment, cultures were also incubated with anti- $\alpha V\beta 6$  integrin mAb as well as with irrelevant mAbs of the same isotype to those specific for  $\alpha 4$  and  $\beta 1$  subunits. Cultures were then incubated for 1 h at 4 °C with 1 PFU/cell of purified IBDV and maintained for 20 h at 37 °C. Infectivity was calculated by counting the number of VP3-positive cells versus the total cell count. Infectivity reductions of 53±11% and 52±13% were observed in cells pre-treated with anti- $\alpha 4$  and - $\beta 1$  mAbs, respectively (Fig. 8). The combination of the anti- $\alpha 4$  and - $\beta 1$  mAbs do not further increase the blocking activity observed with single mAb treatments. As expected, pretreatments with irrelevant control mAbs do not significantly affect IBDV infectivity.

Reductions on IBDV infectivity, nearing 50%, obtained with the anti- $\alpha 4$  and - $\beta 1$  mAbs used in our study are similar to those previously described with other function-blocking mAbs directed against integrins involved in the attachment and/or entry of different naked icosahedral viruses (Coulson et al., 1997; Guerrero et al., 2000; Hewish et al., 2000; Londrigan et al., 2000). Together with data described above, these results demonstrate that the  $\alpha 4\beta 1$  integrin is involved in the entry of IBDV into BALB/c 3T3 cells.

## Discussion

IBDV SVP are produced as a result of the expression of the mature form of the VP2 protein (Castón et al., 2001a). This recombinant polypeptide self-assembles into all-pentamer particles (23 nm in diameter) formed by 20 VP2 trimers exhibiting an icosahedral T=1 symmetry (Castón et al., 2001a; Saugar et al., 2005). The SVP atomic structure has been solved by X-ray crystallography (Coulbaly et al., 2005; Garriga et al., 2006; Lee et al., 2006). SVP VP2 trimers are identical to the type a trimers that conform the 12 pentamers found within the IBDV particle (Castón et al., 2001a). The use of IBDV-derived SVP to studying the IBDV entry process was first described by Lin et al (Lin et al., 2007). In their report, the authors showed that SVP readily bind the membrane of IBDV-susceptible DF-1 cells, and are able to efficiently block IBDV infection. The results presented here agree with previously published information (Lin et al., 2007). Additionally, our work demonstrates that SVP compete, in a dose-dependent manner, the binding of infectious particles to the cell membrane, thus indicating that the ability to prevent IBDV infection is due a direct blockade of virus attachment. Although data presented here were obtained with DF-1 cells, similar observations were made with other IBDV-susceptible avian cell lines, i.e. QM7 (quail muscle cells) and DT40 (bursal chicken lymphocytes), as well as with  $\alpha 4\beta 1$ -expressing BALB/c 3T3 murine cells (data not shown), thus showing that the SVP-induced blockade of IBDV attachment and infectivity is a general phenomenon. Despite size and structural differences between IBDV virions and SVP, the results presented here reinforce the notion that the latter constitute a valuable tool to dissecting the IBDV entry mechanism.

### The role of the VP2 IDA sequence motif on IBDV cell binding and replication

A large number of viruses use members of the integrin superfamily as specific cell receptors at the attachment or post-attachment level (Stewart and Nemerow, 2007). The interaction of integrins to their ligands occurs through the recognition of short linear sequence motifs on their ligands. The availability of a number of well-characterized integrin–ligand motifs facilitated our search for putative integrin ligand motifs on the VP2 primary sequence. As described above, this search resulted in the identification of the IDA motif, matching the previously described consensus sequence of amino acid triplets employed by Fn to bind the  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Mould and Humphries, 1991). Additionally, the detected VP2 IDA triplet is placed within a flexible loop connecting two long  $\beta$  sheets, thus fulfilling an important structural feature common to integrin ligands: the location of the critical acidic (D or E) residue within a flexible loop (Michishita et al., 1993; Ruoslahti, 1996).

The strict conservation of VP2 IDA triplet across the *Avibirnavirus* genus suggested that this tripeptide might play a critical role on virus replication. Furthermore, the putative specificity of the IDA sequence for the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer, a highly abundant integrin in immature lymphocytes (Rose et al., 2002) the main IBDV cell target (Becht, 1980; Kibenge et al., 1988), led to the hypothesis that IBDV might use this integrin during its entry mechanism. Although RT-PCR analyses showed the presence of RNA transcripts corresponding to both  $\alpha 4$  and  $\beta 1$  integrin subunit genes in DF-1 cells (data not shown), the lack of commercially available antibodies specifically recognizing the avian  $\alpha 4$  subunit precluded the possibility of directly assessing the presence of the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer on the membrane of the avian cells. The generation of a set of antibodies directed to the extracellular moiety of the  $\alpha 4$  subunit, currently ongoing in our laboratory, will provide an essential tool for the future characterization of its expression in chicken cells, and to further analyze its role on IBDV infection both in vivo and in vitro.

Results gathered with SVP harboring single point mutations on the IDA triplet demonstrate that this sequence, and in particular the central aspartate residue, is essential for: i) SVP binding to the cell membrane; and ii) the ability of SVP to hinder the attachment of IBDV virions to the cell membrane, and block virus infection. These results strongly resemble those obtained with soluble peptides used to characterize the specificity of  $\alpha 4\beta 1$ -binding sequences within the Fn H1 (Mould and Humphries, 1991). The structural analysis performed on mutant IAA-SVP indicates that the documented non-binding phenotype of mutant IAA-SVP is a direct consequence of the functional inactivation of the  $\alpha 4\beta 1$  binding motif. Furthermore, the results of the reverse genetic experiments demonstrate that the D235A mutation completely arrests virus viability. It seems plausible that the lethality of the D235A mutation might be a direct consequence of the inability of the VP2 D235A-bearing IBDV particles to attach to the membrane of target cells.

Noteworthy, a comparison of VP2 primary sequences from representative members of the different birnavirus genus (*Avibirnavirus*, *Acquibirnavirus*, and *Entomobirnavirus*) showed a strict conservation of the IDA D residue across the family (Supplemental information Fig. S3), thus suggesting that it might also play a critical role in the life cycle of other birnaviruses.

### The role of $\alpha 4\beta 1$ integrin on IBDV cell binding and replication

Murine BALB/c 3T3 cells do not naturally express the  $\alpha 4$  subunit, thus being devoid of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Zeller et al., 1998). Two stably transfected BALB/c 3T3-derived cell lines, exclusively differing on the expression of the  $\alpha 4$  subunit, were previously generated by Caruso et al (Caruso et al., 2003) as a convenient tool analyzing the

role of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin during the entry process of murine polyomavirus. We borrowed these cell lines to determine whether the expression of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin might be related with the ability of IBDV to bind to the cell membrane. The analysis of the results obtained with this cell system clearly demonstrate that the presence of the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer is a critical factor for the binding of both IBDV and IBDV-derived SVP to the cell surface. The specificity of these results was further confirmed by the non-binding phenotype exhibited by mutant IAA-SVP lacking an active  $\alpha 4\beta 1$ -binding motif.

According to results obtained with BALB/c 3T3 cells, in addition to facilitating the binding to the cell membrane, the  $\alpha 4\beta 1$  heterodimer acts as a key factor for IBDV infection. This shows that, in this cell system, the IBDV– $\alpha 4\beta 1$  interaction is essential in triggering the access of the virus to a cellular compartment suitable for virus replication, and thus allowing the production of an infective virus progeny. Hence, demonstrating that the murine  $\alpha 4\beta 1$  integrin acts as bona-fide binding receptor for IBDV.

IBDV isolates have been successfully adapted to replicate in established mammalian cells, i.e. Vero and BSC-1 cells (Lombardo et al., 2000; Yip et al., 2007). Tissue culture-adapted IBDV strains are able to bind to a specific cell receptor(s), enter the cell, and carry out a productive replication process, thus giving rise to an infective virus progeny. It was previously thought that tissue culture adaptation was strictly related to the ability of the adapted viruses to bind to a receptor(s) different from that present in natural IBDV cell targets. However, it has been recently shown that VP2 polypeptides from the non-adapted very virulent HK46 isolate and the tissue culture-adapted D78 IBDV strain share the same binding receptor on the membrane of Vero cells (Yip et al., 2007). This finding shows that the restriction to tissue culture growth exhibited by, at least, some non-adapted viruses takes place at a post-binding step (Lombardo et al., 2000; Yip et al., 2007). In view of the results presented here, it seems feasible that the  $\alpha 4\beta 1$  integrin might also act as a binding receptor in bursal lymphoid cells. However, further studies will be required to determine whether this is the case.

Although specific information regarding the IBDV entry mechanism is scarce, available data suggests that IBDV enters susceptible cells using a receptor-mediated endocytic pathway (Galloux et al., 2007; Lin et al., 2007). The interaction between IBDV particles and the  $\alpha 4\beta 1$  integrin might afford virus–cell binding. This step could be followed by the interaction with the cHsp90 $\alpha$  protein and, probably, other cellular polypeptides required for successful virus entry.

## Materials and methods

### Viruses, cells, and antibodies

The IBDV Soroa strain, a virulent serotype 1 virus, was propagated and titrated in QM7 quail muscle cells (ATCC, CRL-1962) as previously described (Lombardo et al., 1999). BALB/c 3T3-derived cell lines [ $\alpha 4+$ ] and [ $\alpha 4-$ ] BALB/c 3T3, kindly provided by Dr. Paolo Amati, were grown in DMEM containing 10% FCS and supplemented with puromycin at 1.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . [ $\alpha 4+$ ] BALB/c 3T3 cells are stably transfected with pRK5- $\alpha 4$ , a plasmid expression vector carrying the cDNA of the murine  $\alpha 4$  integrin subunit. [ $\alpha 4-$ ] BALB/c 3T3 cells are stably transfected with the empty version of the pRK5 plasmid (Caruso et al., 2003). Construction of recombinant baculoviruses (rBVs) FB/VP2-452, FB/VP2-452(I234A), FB/VP2-452(D235A) and FB/VP2-452(A236G) is described below. rBV stocks were grown and titrated in *S. frugiperda* H5 insect cells (Invitrogen) as described before (Maraver et al., 2003). H5 insect cells were infected with the appropriate rBVs, and used to produce and purify SVP using sucrose gradients as described previously (Castón et al., 2001b). The recombinant vaccinia virus (rVV) VT7LacOI was grown and titrated as previously described (Ward et al., 1995). H5 cells

were grown at 28 °C in TC100 medium containing 10% inactivated fetal calf serum (FCS). QM7 and DF-1 cells (ATCC, CRL-12203) were grown at 37 °C and 39 °C, respectively, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% inactivated fetal calf serum (FCS). [ $\alpha$ 4+] and [ $\alpha$ 4-] BALB/c 3T3 cells were grown at 37 °C in DMEM containing 10% FCS and supplemented with 1.3  $\mu$ g/ml of puromycin.

Western blot and confocal laser scanning microscopy (CLSM) analyses were carried out using anti-VP2 and -VP3 specific sera as previously described (Fernandez-Arias et al., 1998). The monoclonal antibody (mAb) mAbC3, specific for the 14K rVV structural polypeptide (Rodriguez et al., 1985), was used to detect the presence of contaminant rVV in reverse genetic assays.

Function-blocking antibodies directed to mouse integrin subunits  $\alpha$ 4 (CD49d, clone R1-2) and its isotype control mAb (A95-1) were purchased from BD PharMingen. mAbs directed to mouse integrin subunit  $\beta$ 1 (CD29, clone HM $\beta$ 1-1) and its control isotype mAb (eBio299Arm) were purchased from eBioscience. mAbs to  $\alpha$ V $\beta$ 6 integrin (mAb 2077Z) was purchased from Chemicon. The mAb anti- $\beta$ -actin (AC-15), purchased from Sigma, was used to control the total protein content of cell extracts under study.

#### IBDV titration

Monolayers of DF-1 cells grown in 6-well tissue culture plates were infected with serial dilutions of infected cell supernatants. Following virus adsorption for 60 min at 37 °C, the inoculums were removed. Infected cells were washed twice with DMEM without serum and incubated with fresh DMEM containing 2% of FCS at 39 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At 72 h p.i., cells were fixed in acetone-methanol (1:1), washed, and incubated for 60 min with anti-VP3 antibodies, followed by incubation with horseradish-peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-rabbit antibody. Thereafter, plates were washed with phosphate buffer saline (PBS), and horseradish-peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-rabbit antibody (GE Healthcare) added. The mixture was incubated for 45 min at 20 °C. After washing with PBS, antibody-labeled cells were developed using 3, 3'-diaminobenzidine (Sigma) substrate solution, foci of stained cells were counted, and virus titers calculated.

#### Reverse genetic analysis

DNA fragments containing cDNA versions corresponding to the complete positive strand RNAs corresponding to the IBDV Soroa strain segments A and B, fused to the T7 bacteriophage promoter (in 5' position with respect of the cDNA) and a cDNA corresponding to the hepatitis delta virus ribozyme (in 3' position with respect of the cDNA) sequences were generated by in vitro gene synthesis (Genescript Co.), and inserted into the multiple cloning site of the pUC57 cloning plasmid (GenBank/EMBL accession number Y14837). These plasmids were named pT7-SA-Rz, containing the cDNA corresponding to segment A, and pT7-SB-Rz, containing the cDNA corresponding to segment B, respectively.

Plasmid pT7-SA-Rz was used as the template for the introduction of selected point mutations, using a PCR-based protocol, on the VP2 coding region. The core-coding region of VP2 was amplified using primers (Table 1) containing the desired nucleotide changes to generate the D235A mutation. Primary PCR products containing the engineered mutations were assembled by PCR amplification with the flanking primers 5'-TCACCGTCTCAGCTTAC and 5'-TCAGGATTTGGGATCAGC. The resulting DNA fragments were purified, digested with BamHI and NdeI, and ligated to pT7-SA-Rz previously digested with the same enzymes. The resulting plasmid, pT7-SA(D235A)-Rz, was amplified, and analyzed by nucleotide sequencing to determine the correctness of its sequence.

QM7 cells seeded in 60-mm dishes (1.5  $\times$  10<sup>6</sup> cells/dish) were transfected with a combination of either pT7-SA-Rz and pT7-SB-Rz or

pT7-SA(D235A)-Rz and pT7-SB-Rz, respectively. Transfections were carried out with 2.5  $\mu$ g of each plasmid using lipofectamine (Gibco BRL). At 6 h after transfection, cultures were infected with 1 PFU/cell of VT7LacOI, an rVV inducibly expressing the T7 RNA polymerase (Ward et al., 1995). After infection, cultures were maintained at 37 °C in DMEM containing 10% FCS supplemented with the inducer isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) (1 mM final concentration). At 72 h p.i., cultures were harvested, and subjected to three freeze-thawing cycles. After removing cell debris by low speed centrifugation (10,000  $\times$ g for 5 min at 4 °C), supernatants were recovered and passed through 0.1  $\mu$ m filters (MillexVV, Millipore) to eliminate contaminant rVV particles, and used to infect fresh QM7 cell monolayers. Infections were performed in quadruplicate with undiluted and 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-5</sup> serial dilutions of the initial stocks. Two sets of infected cells were used to determine the IBDV titer at 72 h p.i. Another set was harvested at 72 h p.i., and the corresponding extracts used to detect the presence of IBDV VP1 and VP2 polypeptides by Western blot using specific antibodies. The absence of contaminant infecting rVV particles was also monitored by Western blot, using the mAbC3. The fourth cell set was also harvested at 72 h p.i., and used to collect cells originally infected with the undiluted stocks. These samples were subjected to three freeze-thawing cycles, and used to repeat the procedure described above. The process was repeated once more, thus allowing the analysis of the initial virus stock and two subsequent virus amplification rounds.

#### Construction of rBVs

A DNA fragment corresponding to the region encoding the 452 N-terminal residues of the IBDV polyprotein was generated by PCR synthesis using pFastBac/POLY (Martinez-Torrecuadrada et al., 2000). PCR reactions were carried out with Vent DNA polymerase (New England Biolabs) using primers 5'-GCCGAGATCTATGACAACTGTCA-GATCAAACCC and 5'-GCGCAAGCTTACCTTATGGCCCGATTATGCTTT-GAAGC. The resulting DNA fragment was purified, digested with BglIII and HindIII and cloned into the pFastBac1 plasmid (Invitrogen) previously digested with BglIII and HindIII. The resulting plasmid vector, pFB/VP2-452, was used as the template for the introduction of selected point mutations using a PCR-based protocol. The core-coding region of VP2-452 was amplified using primers containing the desired changes (Table 1). Primary PCR products containing the engineered mutations were assembled by amplification with the flanking primers 5'-TCACCGTCTCAGCTTAC and 5'-TCAGGATTTGGGATCAGC. The resulting DNA fragments were purified, digested with BamHI and NdeI, and ligated to pFB/VP2-452 previously treated with the same enzymes, giving rise to plasmids pFB/VP2-452(I234A), pFB/VP2-452(D235A), and pFB/VP2-452(A236G).

#### Protein sequence analysis

Searches for integrin binding consensus sequences within the IBDV VP2 protein, and sequence alignments were carried out using the CLUSTAL W multiple-sequence alignment software (Larkin et al., 2007). Birnavirus VP2 sequences were retrieved from UniProt (<http://www.pir.uniprot.org/>).

#### SVP blockade of virus infectivity

DF-1 and transfected BALB/c 3T3 cells were grown into 24-well plates with DMEM supplemented with 5% FCS for 16 h. Thereafter, the medium was removed, and cells incubated with suspensions containing a constant amount of 5  $\times$  10<sup>5</sup> PFU/ml of purified IBDV and increasing SVP concentrations (0.01–100  $\mu$ g/ml). SVP/virus suspensions were prepared in DMEM. Monolayers were covered with 500  $\mu$ l of the corresponding SVP/virus suspension, and maintained at 37 °C for 30 min. Thereafter, cultures were washed, supplemented with



fresh medium, and maintained for 16 h at 39 °C (DF-1 cells) or 32 h at 37 °C (transfected BALB/c 3T3 cells). Finally, cultures were harvested and divided into two aliquots used to determine the accumulation of both virus-encoded proteins and viral RNA, respectively.

#### Western blot analysis

Cell extracts were added to Laemmli's sample buffer to a 1× final concentration, and heated (100°C, 2 min). Electrophoreses were performed in 11% polyacrilamide gels, followed by electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were cut into two halves. The lower half was used to evaluate the accumulation of the IBDV-encoded VP3 polypeptide, and the upper one to assess the total protein content using mouse anti-human or rabbit anti-mouse  $\beta$ -actin antibodies. For this, membranes were incubated with the appropriate Abs, and immunoreactive bands detected by the enhanced chemiluminescence reaction (GE Healthcare).

#### Conventional electron microscopy analysis

2–5  $\mu$ l aliquots of SVP-containing samples were placed on top of copper grids covered with collodion and carbon that had previously been made hydrophilic by glow discharge. Grids were then incubated at 20 °C for 2 min. Adsorbed particles were negatively stained for 30 s with a 2% solution of uranyl acetate. Micrographs were recorded with a JEOL 1200 EXII electron microscope operating at 100 kV at a nominal magnification of 40,000×.

#### Cryo-electron microscopy (cryo-EM)

SVP suspensions (5  $\mu$ l drops) were applied to one side of a holey carbon film, blotted, and plunged into a liquid ethane bath following standard procedures (Castón et al., 2001b; Saugar et al., 2005). Micrographs were recorded under minimal exposure conditions. Imaged specimens received exposures of 6–10 e<sup>-</sup>/nm<sup>2</sup> at a nominal magnification of 50,000× on a Tecnai G2 electron microscope operating at 200 kV and equipped with a field emission gun.

#### SVP image analysis

General image processing operations were performed using Bsoft (<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbran/labr/software/bsoft/>), Xmipp (<http://xmipp.cnb.csic.es/>), and Spider ([http://www.wadsworth.org/spider\\_doc/spider/docs/](http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/)) programs. For the selected micrographs analyzed, defocus values were determined with the Bshow program (<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/labr/software/bsoft/bshow/bshow.html>), ranged from 0.6 to 3  $\mu$ m (first zeros of the contrast transfer function [ctf] at spacing of 11 to 28 Å). A Zeiss PhotoScan TD scanner was used to digitalize suitable micrographs at 7  $\mu$ m/pixel (1.4 Å at the specimen), and micrographs were binned to give 14 or 21  $\mu$ m/pixel during the initial refinements. The X3d program (Conway et al., 1993) was used to manually extract particle images, including 26,386 for wild type IDA (WT-SVP) and 19,433 for mutant IAA-SVP. Initial estimates of the origin and orientation angles were determined for a base set of particles, using polar Fourier transform procedures (Baker and Cheng, 1996), taking previous maps, appropriately scaled at a 28-Å resolution, as a starting model (Saugar et al., 2005). A new density map was calculated and used for all subsequent orientation and origin refinements. Phases were ctf-corrected by flipping them in the required lobes of the ctf with Bsoft bctf routine. Enhancement of the high-resolution Fourier amplitudes was carried out with the Spider program as previously described (40). Three-dimensional density (3D) maps were calculated using Fourier–Bessel methods (Crowther, 1971). The final reconstructions combined 23,754 and 17,505 images for WT- and IAA-SVP, respectively. The resolution was assessed by FSC calculated between independent half-data-set

maps, applying a correlation limit of 0.5 (or 0.3). The resolutions calculated for WT- and IAA-SVP were of 7.8 Å (or 7.2 Å) and 10.5 Å (or 9.3 Å), respectively. The structural identity of both density maps was assessed by FSC calculated between them. Density maps and atomic models were visualized with UCSF Chimera software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

#### RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from frozen cells ( $1 \times 10^7$ ) using Trizol (Invitrogen) following the manufacture's recommendations. DNase digestion of contaminating DNA in the RNA samples was carried out with the RNase-Free DNase Set (Qiagen). Final RNA purification was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to standard protocols. Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed in a reaction mixture of 20  $\mu$ l containing 1× PCR Buffer II (Applied Biosystem), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 20 U RNase inhibitor, 50 U MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems), 5  $\mu$ M random primers (Gibco) and DEPC treated dH<sub>2</sub>O.

#### Real-time quantitative RTPCR (qRTPCR) assays

Transcript levels were determined by qRTPCR using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and SYBR Green dye (Applied Biosystems). Reactions were performed in a final volume of 20  $\mu$ l containing 10  $\mu$ l of 2× Power SYBR Green PCR Master Mix (including AmpliTaq Gold DNA Polymerase-LD, dNTPs and SYBR Green dye), 250 nM forward and reverse specific primers (Table 1) and a 1:10 dilution of cDNA. After enzyme activation at 95 °C for 10 min, amplifications were carried out using a two-step PCR procedure with 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation and 1 min at 60 °C for annealing/extension. Gene specific primers were designed using the Oligo Explorer 1.2 software (Gene Link) based on sequences information deposited at the National Center of Biotechnology Information. Primer sequences used in the qRTPCR analyses are described in Table 1.

Non-template controls were included for each primer pair, and each PCR reaction was completed in triplicate. Data were analyzed using the 7300 SDS software 1.3 (Applied Biosystems). Dissociation curves for each amplicon were then analyzed to verify the specificity of each amplification reaction; the dissociation curve was obtained by heating the amplicon from 60 °C to 95 °C. For IBDV-SVP competition experiments specific RNA contents were calculated using the standard curve method from triplicate data obtained with the *Gallus gallus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, as internal control, and control cultures, infected with IBDV in the absence of SVP, as reference control samples. For experiments carried out in [ $\alpha$ 4+] and [ $\alpha$ 4-] transfected BALB/c 3T3 cells, specific RNA contents were calculated using data obtained with the *Mus musculus* GAPDH gene, as internal control, and control uninfected cultures. Results are means of triplicate data of one representative experiment, and are represented as the percentage with respect to the reference sample representing a 100% infection value.

#### Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis

For binding experiments, purified IBDV or SVP were used. DF-1 or [ $\alpha$ 4+] and [ $\alpha$ 4-] transfected BALB/c 3T3 cells seeded onto glass coverslips were incubated with suspensions containing either SVP (50  $\mu$ g/ml) or IBDV virions (10 PFU/cell) at 4 °C for 30 min. Afterwards, cells were methanol-fixed, incubated with rabbit anti-VP2 specific serum, followed by incubation with goat anti-rabbit Ig coupled to Alexa 488 (green). Cell nuclei were stained with ToPro-3. Fluorescent signals detected by CLSM were visualized by epifluorescence using a Zeiss Axiovert 200 microscope equipped with a Bio-Rad Radiance 2100 confocal system. Images were captured using the Laser Sharp software package (Bio-Rad). Relative quantification of fluorescence was performed using LaserPix 4.0 software (ImagePro Plus. Media

Cybernetics, LP). Six different regions of interest with the same size in each single confocal section were analyzed to obtain the relative fluorescence units. Images from three different experiments were used and media and standard deviation values were calculated.

#### Treatment of cells with function-blocking anti-integrin MAbs

[ $\alpha$ ]-BALB/c 3T3 cells were grown in 24-well plates, washed twice with DMEM and incubated at 4 °C for 1 h with or without function-blocking anti-integrin subunit mAbs (10  $\mu$ g/ml) diluted in DMEM, and then infected with IBDV (1 PFU/cell) at 4 °C for 1 h. Cells were washed and maintained for 20 h at 37 °C in DMEM supplemented with 10% serum. At this point, cells were fixed and processed for CLSM analysis using anti-VP3 serum as described above. The percentage of infected cells was determined by counting the number of infected cells with respect to the total nuclei number on randomly selected fields. A minimum of 5,000 nuclei was counted for each mAb treatment.

#### Acknowledgments

We thank Drs M. A. García-Pardo and N. Verdaguer, and D. Garriga for helpful discussion and advice. We wish to thank Dr. Paolo Amati for his generous gift of transfected BALB/c 3T3 cell lines, and Dr. Bernard Moss for the vaccinia virus and the VOTE expression system. DL was supported by an FPI fellowship from the Spanish Ministry of Education (MEC). This work was supported by grants AGL2003-07189, BIO2006-09407 and BFU 2005-06487 from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.virol.2008.12.036](https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.036).

#### References

- Baker, T.S., Cheng, R.H., 1996. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J. Struct. Biol.* 116, 120–130.
- Becht, H., 1980. Infectious bursal disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 90, 107–121.
- Birghan, C., Mundt, E., Gorbalenya, A.E., 2000. A non-canonical ion protease lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* 19, 114–123.
- Botcher, B., Kiselev, N.A., Stel'Mashchuk, V.Y., Perevozchikova, N.A., Borisov, A.V., Crowther, R.A., 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71, 325–330.
- Boulanger, P., 1999. Cell receptors for human adenoviruses. *J. Soc. Biol.* 193, 77–84.
- Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R.A., Vakharia, V.N., 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75, 11974–11982.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.I., 2003. Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol.* 77, 3913–3921.
- Casañas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., González, D., Rodríguez, J.F., Verdaguer, N., 2008. Structural insights into the multifunctional protein VP3 of Birnaviruses. *Structure* 16, 29–37.
- Castón, J.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J.F., Casal, J.I., Carrascosa, J.L., 2001a. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* 75, 10815–10828.
- Castón, J.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J.F., Casal, J.I., Carrascosa, J.L., 2001b. C Terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *J. Virol.* 75, 10815–10828.
- Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J., Delmas, B., 2005. Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J. Virol.* 79, 12253–12263.
- Conway, J.F., Trus, B.L., Booy, F.P., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Steven, A.C., 1993. The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J. Struct. Biol.* 111, 222–233.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B., Rey, F.A., 2005. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 120, 761–772.
- Coulson, B.S., Londrigan, S.L., Lee, D.J., 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5389.
- Crowther, R.A., 1971. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 261, 221–230.
- Delmas, B., Kibenge, F.S.B., Leong, J.C., Mundt, E., Vakharia, V.N., Wu, J.L., 2004. *Birnaviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, A.L. (Eds.), *Virus Taxonomy*, Academic Press, London, pp. 561–569.
- Fahey, K.J., Erny, K., Crooks, J., 1989. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J. Gen. Virol.* 70, 1473–1481.
- Feldman, A.R., Lee, J., Delmas, B., Paetzel, M., 2006. Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J. Mol. Biol.* 358, 1378–1389.
- Fernandez-Arias, A., Risco, C., Martinez, S., Albar, J.P., Rodriguez, J.F., 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79, 1047–1054.
- Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J., Delmas, B., 2007. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 20774–20784.
- Garriga, D., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Castón, J.R., Rodríguez, J.F., 2006. The 2.6-Ångstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J. Virol.* 80, 6895–6905.
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Rodríguez, J.F., Verdaguer, N., 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20540–20545.
- Graham, K.L., Fleming, F.E., Halasz, P., Hewish, M.J., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., Takada, Y., Coulson, B.S., 2005. Rotaviruses interact with  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *J. Gen. Virol.* 86, 3397–3408.
- Graham, K.L., Takada, Y., Coulson, B.S., 2006. Rotavirus spike protein VP5\* binds  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *J. Gen. Virol.* 87, 1275–1283.
- Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., López, S., Arias, C.F., 2000. Integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ (3) mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 14644–14649.
- Hewish, M.J., Takada, Y., Coulson, B.S., 2000. Integrins  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 can mediate sa11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol.* 74, 228.
- Hynes, R.O., 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 15, 33–37.
- Kibenge, F.S., Dhillon, A.S., Russell, R.G., 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1757–1775.
- Komoriya, A., Green, L.J., Mervic, M., Yamada, S.S., Yamada, K.M., Humphries, M.J., 1991. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J. Biol. Chem.* 266, 15075–15079.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Lee, C.-C., Ko, T.-P., Chou, C.-C., Yoshimura, M., Doong, S.-R., Wang, M.-Y., Wang, A.H.J., 2006. crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6 Å resolution: implications in virion assembly and immunogenicity. *J. Struct. Biol.* 155, 74–86.
- Lin, T.-W., Lo, C.-W., Lai, S.-Y., Fan, R.-J., Lo, C.-J., Chou, Y.-m., Thiruvengadam, R., Wang, A. H.J., Wang, M.Y., 2007. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 81, 8730–8741.
- Liu, B., Li, Z., 2008. Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin. *Blood* 112, 1223–1230.
- Lombardo, E., Maraver, A., Caston, J.R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73, 6973–6983.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A., Rodríguez, J.F., 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 277, 345–357.
- Londrigan, S.L., Hewish, M.J., Thomson, M.J., Sanders, C.G.M., Mustafa, H., Coulson, B.S., 2000. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. *Soc. Gen. Microbiol. Vol.* 81, 2203–2213.
- López, S., Arias, C.F., 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12, 271–278.
- Luque, D., 2007. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Maginnis, M.S., Forrest, J.C., Kopecky-Bromberg, S.A., Dickeson, S.K., Santoro, S.A., Zutter, M.M., Nemerow, G.R., Bergelson, J.M., Dermody, T.S., 2006. Beta1 integrin mediates internalization of mammalian reovirus. *J. Virol.* 80, 2760–2770.
- Maraver, A., Ona, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J.A., Caston, J.R., Pazos, F., Rodríguez, J.F., 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* 77, 6438–6449.
- Martinez-Torrecuadrada, J.L., Castón, J.R., Castro, M., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., Casal, J.I., 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278, 322–331.
- Michishita, M., Videm, V., Arnaout, M.A., 1993. A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* 72, 857–867.
- Mould, A.P., Humphries, M.J., 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin  $\alpha$ 4  $\beta$ 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO J.* 10, 4089–4095.
- Nieper, H., Muller, H., 1996. Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites. *J. Gen. Virol.* 77, 1229–1237.

- Ogawa, M., Yamaguchi, T., Setiyono, A., Ho, T., Matsuda, H., Furusawa, S., Fukushi, H., Hirai, K., 1998. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Arch. Virol.* 143, 2327–2341.
- Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Caston, J.R., Rodriguez, J.F., 2004. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* 322, 135–142.
- Pan, J., Vakharia, V.N., Tao, Y.J., 2007. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7385.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J.W., 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275, 21785–21788.
- Rodriguez, J.F., Janeczko, R., Esteban, M., 1985. Isolation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies to vaccinia virus. *J. Virol.* 56, 482–488.
- Rose, D.M., Han, J., Ginsberg, M.H., 2002.  $\alpha$ 4 integrins and the immune response. *Immunol. Rev.* 186, 118–124.
- Ruoslahti, E., 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 697–715.
- Saugar, I., Luque, D., Ona, A., Rodriguez, J.F., Carrascosa, J.L., Trus, B.L., Caston, J.R., 2005. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic  $[\alpha]$  helix as a molecular switch. *Structure* 13, 1007–1017.
- Setiyono, A., Hayashi, T., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 2001. Detection of cell membrane proteins that interact with virulent infectious bursal disease virus. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 219–221.
- Smith, A.E., Helenius, A., 2004. How viruses enter animal cells. *Am. Assoc. Adv. Sci.* Vol. 304, 237–242.
- Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodriguez, B.A., Santoro, S.A., 1991. Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the  $\alpha$ 2  $\beta$ 1 integrin in collagen. *J. Biol. Chem.* 266, 7363–7367.
- Stewart, P.L., Nemerow, G.R., 2007. Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol.* 15, 500–507.
- Tan, B.H., Nason, E., Staeuber, N., Jiang, W., Monastyrskaya, K., Roy, P., 2001. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to culicoides cells. *J. Virol.* 75, 3937–3947.
- van den Berg, T.P., Etteradossi, N., Toquin, D., Meulemans, G., 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.* 19, 509–543.
- van Loon, A., de Haas, N., Zeyda, I., Mundt, E., 2002. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *Soc. Gen. Microbiol.* Vol. 83, 121–129.
- Ward, G.A., Stover, C.K., Moss, B., Fuerst, T.R., 1995. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6773–6777.
- Yip, C.W., Yeung, Y.S., Ma, C.M., Lam, P.Y., Hon, C.C., Zeng, F., Leung, F.C.C., 2007. Demonstration of receptor binding properties of VP2 of very virulent strain infectious bursal disease virus on Vero cells. *Virus Res.* 123, 50–56.
- Zeller, Y., Lohr, J., Sammar, M., Butcher, E.C., Altevogt, P., 1998. Asp-698 and Asp-811 of the integrin  $\alpha$ 4-subunit are critical for the formation of a functional heterodimer. *J. Biol. Chem.* 273, 6786–6795.

