



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RIBONUCLEOPROTEÍNA
NATIVA DEL VIRUS DE LA GRIPE**

TESIS DOCTORAL

ROCÍO ARRANZ ÁVILA

Madrid, 2013



Universidad Autónoma de Madrid



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RIBONUCLEOPROTEÍNA NATIVA DEL VIRUS DE LA GRIPE

Memoria presentada por **Rocío Arranz Ávila**
Para optar al título de Doctor

Madrid, Junio 2013

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección del **Dr. Jaime Martín-Benito Romero**.



Para mis padres

Para mis abuelos

Agradecimientos

Después de la tormenta siempre sale el sol

Llegó la hora de los agradecimientos.

Pasamos la vida dando las gracias por cosas insignificantes, gracias porque te abran una puerta, gracias porque te sirvan un café, pero lamentablemente no damos las gracias por las cosas que son verdaderamente importantes.

Llegué al CNB hace ya muchísimos años y no he perdido mi ilusión por mi trabajo. La inmensa mayoría de la gente trabaja por obligación y están pensando: -¡pufs, el lunes a trabajar! Afortunadamente, eso no me ocurre a mí gracias a que lo que hago me encanta y al entorno de gente que me rodea.

Cuando entré a trabajar éramos dos candidatos para ser elegidos por dos investigadores. Uno de los investigadores era Pepe Carrascosa. Cuando escuché hablar a Pepe con esa voz tan serena y tranquila pensé: - por favor, que me elija a mí. ¡Y me eligió!, y así fue como comencé en el mundo de la Microscopía Electrónica. Desde luego, no me equivoqué: -Pepe, gracias por ser un excelente jefe así como persona. Y gracias por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis.

Entonces entré a formar parte del Servicio de Microscopía, donde Cristina Patiño y Carlos me enseñaron mucho acerca de la Microscopía. Gracias a los dos.

En aquellos comienzos éramos muchos en el laboratorio puesto que las líneas de investigación estaban ubicadas en el mismo lugar que el Servicio de Microscopía.

Gracias a todos los que se cruzaron en mi camino en aquella época. Especialmente a Mari Carmen, gracias por tus risas, por tu alegría y por ser una gran persona. Afortunadamente, muchos de los que formábamos parte de aquel grupo hoy en día seguimos estando juntos.

Unos años más tarde se construyó un nuevo edificio "el CNBito" y las líneas de investigación se trasladaron allí. Entonces entré a formar parte del personal técnico del Departamento encargándome de los microscopios.

Y aquí es donde tengo que hablar de otra gran persona, José Mari. Empecé a realizar la tesis con él sacando huecos y trabajando en distintos proyectos obteniendo muy buenos resultados pero eran trabajos de especímenes muy diferentes sin ninguna relación. Así que, decidimos trabajar en un tema concreto.

Gracias José Mari por ser como eres, por haberme dado la oportunidad de hacer la tesis, por creer en mí, por ayudarme...

El nuevo reto planteado era un proyecto sobre gripe donde mi nuevo director de tesis sería y es Jaime.

-Jaime, tratarte como jefe me resulta muy difícil pero no sólo a mí, nos pasa a todos. Gracias por ser una persona envidiable, por ser mi guía, por estar siempre dispuesto a enseñarme, por todo lo aprendido.... El esfuerzo siempre tiene una recompensa y la hemos tenido. Por supuesto que la hemos tenido ¡Un Science! Creo que nuestros niños lo recordaran siempre Oeee Oee Oee Oe Oe.

Otras cuatro personas que forman parte de esta tesis son Juan, Rocío y los dos Javis.

Gracias Juan, eres admirable tanto como persona como científico. Gracias por compartir tus conocimientos, por ser una persona tan sensata, tan amable... Trabajar contigo ha sido muy fácil. ¡No te jubiles Juan, todavía nos queda mucho que descubrir del virus de la gripe!

Gracias Rocío por tu excelente trabajo. Sin una buena bioquímica no hay una buena reconstrucción.

Gracias a Javi Chichón y a Javi Conesa por esos tomogramas. Gracias por compartir cada cosa que íbamos realizando, por vuestras ideas y opiniones. Gracias Javi Chichón por haber compartido todos estos años, los buenos momentos y también los malos. Gracias por ayudarme cuando lo necesito y por ser mi apoyo con el "siempre" inoperativo microscopio.

Gracias Javi Conesa, da gusto ver siempre una cara sonriente en el labo incluso cuando dices que estás enfadado.

Gracias a Encarna y María José por compartir el día a día, las cosas cotidianas: los niños, sus tareas, los agobios de la casa. Gracias por preocuparos por mí. Gracias Encarna porque siempre estar dispuesta a ayudarme en todo lo que está al alcance de tu mano. Gracias María José por ayudarme con mi oposición y con lo que necesito. Todavía recuerdo explicándome las cosas con el niño mamando, eso no lo hace cualquiera.

Muchas gracias a:

A Marina por siempre ofrecerme tu ayuda con cualquier cosa ya sea médicos, astigmatismo, lo dicho cualquier cosa. Siempre que necesito algo estás ahí. A Hugo, acabo de escribir Marina y me acordado de ti ¿por qué será? Por compartir muchos años en el laboratorio y nuestra pasión con los animales. Todavía recuerdo los conejitos tan pequeños. Y mira que te avisé con los hurones, je, je. A Jorge ¡ya llevamos aquí una eternidad y lo que nos queda afortunadamente! Por compartir el día a día y ayudarme con esos revelados. A Ana C., sé que para cualquier cosa que necesite puedo contar contigo, a María, mi maestra de los Grafix. A Elías y a Mar siempre riéndome con vosotros. A Srdja por prestarme esas pipetas RNasa free y esas rejillas que algunas veces nos traen de cabeza. A Alina por compartir esas horas de viaje juntas, esos zumos y chocolatitos en su casa por la tarde y ser mi compañera de escritura de tesis en nuestro despachito particular. A Rebeca, Verónica, Ana Beloso, Begoña, Marta, Ricardo, Charo, José Jesús, M^a Ángeles, Michele, Lucía, Sandra y Borja, Ana, Carlos, Josué, Mariana, Elena y Marta.

A Dani por ayudarnos con ese vídeo de la RNP que quedó muy chulo.

Como no a JR, son muchos años juntos. En este último periodo hemos compartido muchas horas de despacho mientras me dejaba los ojos picando RNPs, contándonos nuestras cosas. Siempre que necesito algo, lo escribes en un post-it y al día siguiente ahí lo tengo. Gracias por darme fuerza animándome con la oposición.

Por supuesto a toda la gente que me ayuda en el día a día:

A la gente de mantenimiento, almacén y compras. Y para no olvidarme de nadie a toda la gente que se ha cruzado en mi camino por el CNB.

Gracias a mis padres por darme todo. Siempre apoyándome, siempre preocupándose por mí, dejando sus cosas para hacer las mías. ¡¡¡¡Que haría yo sin vosotros!!!!

Gracias mamá, no hay palabras suficientes para agradecer lo que haces por mí. Siempre se puede contar contigo para lo que sea. Sin ti hubiera tirado la toalla más de una vez pero como dice papá: "si te dice mamá que te tires desde un tejado pídele a Dios que sea bajito". Así que esta tesis te la debo a ti.

Gracias a mi hermana y a mi tía Sara, por ser mi apoyo en la vida. Por teneros muy cerca aún estando muy lejos.

Gracias a mis hijas por disfrutar con vosotras el día a día. Sois todo para mí.

Gracias a Manolo, por ser mi seguidor y estar ahí en todas mis jugadas.

Gracias a Paqui, mi cuidadora y amiga. Menos mal que al final siempre te termino haciendo caso....Y sé que puedo contar contigo para lo que necesite.

A Mariano, a Juan y a Tere por compartir esas tardes de domingos.

Gracias a Begoña y a Miriam por apoyarnos las unas en las otras. Por reírnos tanto juntas. Por preocuparos por mi trabajo aunque sé que no os enteráis de mucho, je, je... Begoña, eres mi medicina.

Gracias a Cristina y a Ana, siempre estamos tan liadas que es difícil tener un rato para nosotras pero al final aunque sea pequeño siempre estamos en contacto. Gracias por ser mis amigas.

Gracias a los que ya no están y que quiero con toda mi alma.

ÍNDICE

Índice general

Abreviaturas, siglas y símbolos	17
Resumen	21
Introducción	25
1. El virus de la gripe	25
1.1 Historia	25
1.2 Clasificación y nomenclatura	26
1.3 Morfología y componentes estructurales de la partícula viral	27
1.3.1 Características de las proteínas virales	29
1.3.1.1 Proteínas virales asociadas a la membrana viral	29
1.3.1.2 Proteínas virales implicadas en replicación-transcripción	31
1.3.1.3 Proteínas virales accesorias	37
1.3.2 Características de los RNA virales	38
1.3.2.1 El promotor viral	38
1.3.2.2 RNAs virales presentes en la célula durante la infección	40
2. Complejos ribonucleoproteicos (RNPs)	41
2.1 RNPs purificadas	41
2.2 RNPs dentro de viriones	44
3. Ciclo de infección viral	45
4. Transcripción y replicación del virus de la gripe	46
4.1 Ciclo de transcripción y replicación	47
4.2 Mecanismos de replicación y transcripción	47
Objetivos	53
Materiales y Métodos	57
1. Materiales biológicos empleados	57
2. Métodos	57
2.1 Técnicas virológicas	57
2.2 Técnicas bioquímicas	57

2.3 Microscopía electrónica de transmisión	58
2.3.1 Metodología utilizada para el análisis estructural de la región central de la RNP purificada a partir de viriones	58
2.3.1.1 Microscopía electrónica en tinción negativa de la región central de la RNP nativas	58
2.3.1.2 Criomicroscopía electrónica negativa de la región central de la RNP nativas	60
2.3.2 Metodología utilizada para el análisis estructural de los extremos de la RNP purificada a partir de viriones	62
2.3.3 Metodología utilizada para el análisis estructural de la RNP localizada en el interior de los viriones	63
Resultados	69
1. Reconstrucción tridimensional de las RNPs nativas.	
Problemas asociados	69
2. Estructura tridimensional de la región helicoidal de las RNPs nativas	71
2.1 Análisis estructural tridimensional de la región central de las RNPs nativas por tinción negativa.	72
2.2 Análisis estructural tridimensional de la región central de las RNPs nativas por criomicroscopía electrónica.	74
2.3 Ajuste de la estructura atómica de la NP en la estructura tridimensional helicoidal de la RNP nativa.	80
3. Estructuras tridimensionales de los extremos de las RNPs nativas	82
4. Estructura tridimensional de las RNPs nativas en el interior de los viriones	85
Discusión	91
1. Región helicoidal de las RNPs nativas	92
2. Localización del RNA	94
3. La polimerasa de las RNPs nativas	97
4. Modelo de la estructura tridimensional de la RNP nativa	98
5. Estructura de la RNP purificada a partir de viriones <i>versus</i> RNP recombinante	99

6. RNPs dentro del virión	102
7. Implicaciones biológicas de la estructura de la RNP nativa	103
Conclusiones	111
Referencias	115
Material complementario	131
Artículos relacionados	131

Abreviaturas, siglas y símbolos

A	Adenina
Å	Angström (10^{-10} metros)
ASN	Asparagina
ATP	Adenosín Trifosfato
C	Citosina
cRNA	RNA complementario
Cu	Cobre
$e^{-}/\text{Å}^2$	Electrones por Angström al cuadrado.
EM	Microscopía electrónica
G	Guanina
g	en centrifugación, aceleración del campo gravitatorio terrestre
HA	Hemaglutinina
ILE	Isoleucina
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Dalton
MDa	Mega Dalton
mm	Milímetros
mRNA	RNA mensajero
M2	Proteína de matriz 2
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína de exportación nuclear
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetros
NP	Nucleoproteína
nt	Nucleótidos
PA	Proteína ácida
pb	pares de bases
PB1	Proteína básica 1
PB2	Proteína básica 2
Poli-A	Poli-Adenina
Poli-U	Poli-Uracilo
PRO	Prolina
p/v	Porcentaje peso/volumen
Rh	Rodio
RNA	Ácido ribonucleico
RNPs	Ribonucleoproteínas
RpRd	RNA polimerasa RNA dependiente
rpm	Revoluciones por minuto
SER	Serina
ssRNA	RNA de cadena simple (single stranded RNA)
TE	tampón Tris-EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7.4-8.0)
μm	Micrómetro (10^{-6} metros)
μl	Microlitro (10^{-6} litros)
vRNA	RNA genómico
wt	Silvestre (wild type)

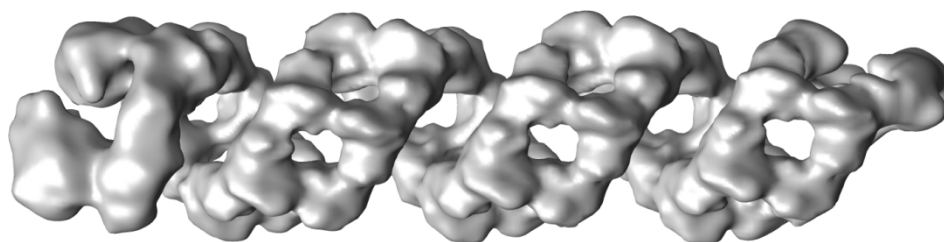
SUMMARY

Summary

The influenza viruses cause annual epidemics of respiratory disease and occasional pandemics, which constitute a major public-health issue. These viruses contain a segmented, single-stranded RNA genome of negative polarity. Each RNA segment is encapsidated by the nucleoprotein (NP) and the polymerase complex into ribonucleoprotein particles (RNPs), which are responsible for virus transcription and replication constituting, therefore, the most important functional complex of the virus. The complete nucleocapsid of the virus is composed of 8 RNPs and they are closely packed forming bundles. Despite their importance, information about the structure of these RNPs is scarce. In this Doctoral Thesis the three-dimensional structure of a native RNP has been determined using a combination of single molecule cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography as well as image processing and docking assays.

The native RNPs isolated from virions show a double helical conformation in which two NP strands of opposite polarity are associated each other along the helix. Both strands are connected by a short loop constituted by three NP monomers at one end of the particle and interact with the polymerase complex at the other end. The double-helical structure is defined by a minor groove between the connected NP strands and a major groove between the NP strands not physically in contact. The docking of the atomic structure of NP into the helix has allowed us to define the interactions between the functional elements of RNPs and to propose the location of the viral RNA. Additionally, our results revealed the existence of two conformations of the polymerase complex but their biological relevance is not clear at the moment. Finally, electron tomography assays have shown that the structure of the RNPs packed inside virions is the same than the isolated ones.

In this Doctoral Thesis has provided the first model for a native negative-stranded RNA virus ribonucleoprotein complex. This structure will be relevant for unraveling the mechanism of nuclear import of parental virus RNPs, their transcription and replication, and the encapsidation of progeny RNPs into virions.



INTRODUCCIÓN

1. El virus de la gripe

1.1 Historia

La gripe es una enfermedad infecciosa de aves y mamíferos causada por un virus RNA perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Este patógeno ocasiona infecciones respiratorias en humanos en forma de epidemias anuales de gran morbilidad y ocasionalmente pandemias con importante mortalidad. Se estima que el número de fallecidos causados por una cepa estacional es de 200.000-500.000 personas y de 2-3 millones de infectados graves por año (Chen & Subbarao, 2009).

Los virus gripales son originariamente patógenos de aves, no obstante, en muchas de sus especies no acusan enfermedad. Sin embargo, ocasionalmente estos virus son transmitidos a otras especies animales o a la población humana, que pueden ser inmunológicamente virgen para el nuevo patógeno, dando lugar a pandemias de gran impacto.

La pandemia más letal fue la denominada “gripe española” causada por el virus A, subtipo H1N1 (Gibbs et al., 2001b ; Gibbs et al., 2001a) en 1918. Datos actuales estiman que la cifra de fallecidos se sitúa entre 20 y 40 millones en todo el mundo (Horimoto & Kawaoka, 2005). En 1997, un nuevo subtipo aviar H5N1 de elevada mortalidad amenazó con generar una nueva pandemia, sin embargo, no adquirió la capacidad de transmitirse entre los humanos (Neumann et al., 2009) aunque su amenaza persiste pudiendo ocasionar una gran pandemia en el futuro http://who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_avian_influenza_update150612N.pdf. La última pandemia surge en Diciembre de 2009, denominándose gripe A (H1N1) causada por un nuevo subtipo H1N1 de origen porcino con baja patogenicidad. Esta pandemia tuvo una mortalidad baja en contraste con su amplia distribución, dejando tras de sí unas 19.000 víctimas y más de 22 millones de personas infectadas, según los datos publicados el día que la OMS declaró el fin de la pandemia http://www.who.int/cr/don/2010_07_16/en/index.html. En la **Tabla II** se presenta un resumen de las pandemias de gripe más conocidas.

Nombre de la pandemia	Fecha	Muertes	Subtipo
Gripe española	1918-1919	20 a 40 millones	H1N1
Gripe asiática	1957-1958	1 a 1.5 millones	H2N2
Gripe de Hong-Kong	1968-1969	0.75 a 1 millones	H3N2
A (H1N1)	2009-2010	19.000	H1N1

Tabla II. Pandemias de la gripe más conocidas.

La elevada capacidad de estos virus para generar variantes antigénicas han permitido definir la gripe como una enfermedad constante causada por un virus cambiante (Kilbourne,

1980). La gran variabilidad de este virus está asociada a sus características genéticas: un genoma segmentado, distintas clases de glicoproteínas de membrana hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y ausencia de actividad correctora en su polimerasa (Palese & Shaw, 2007 ; Tong et al., 2012). Estas características, junto con su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, han hecho de este virus uno de los patógenos conocidos que mayor morbilidad y mortalidad han causado en la historia.

Existen vacunas y antivirales para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por el virus de la gripe. Las vacunas están formuladas a partir de virus inactivados o viriones atenuados de la gripe tipo A en concreto, H1N1 y H3N2, así como, a partir de los virus de gripe tipo B (Suzuki, 2006). Debido a que la antigenicidad de los virus salvajes evoluciona, las vacunas se reformulan anualmente. Sin embargo, cuando la antigenicidad de las cepas que forman parte de las vacunas y la de los virus salvajes que circulan entre la población no coinciden, las vacunas dejan de ser efectivas (Mostow et al., 1970). En otras ocasiones, incluso cuando ambas antigenicidades coinciden, se puede dar el caso de que aparezcan mutantes que escapan a la vacuna (Kilbourne et al., 2002 ; Zharikova et al., 2005). Los fármacos más frecuentes incluyen la amantadina y rimantadina, que inhiben la capacidad de desempaquetamiento del genoma del virus al interferir con la proteína de matriz M2. Son específicos para gripe de tipo A y la aparición de resistencia a los mismos es relativamente rápida. Por otro lado, se emplean oseltamivir (Tamiflu®) y zanamivir (Relenza®) que interfieren en la liberación de los virus progenie de la célula infectada al interferir con NA, evitando así que la infección progrese. Este tratamiento es de gran efectividad contra la mayoría de las cepas virales (Moscona, 2005).

1.2 Clasificación y nomenclatura

Los virus de la gripe pertenecen al grupo de virus cuyo genoma es de RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa ((-) ssRNA). Dentro de este grupo hay diferentes familias según la morfología del virión, de su nucleocápsida, así como, el hospedador al que infectan (Palese & Shaw, 2007).

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se caracteriza por tener una envuelta lipídica y un genoma formado por varias moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa ((-) ssRNA). Dentro de esta familia se distinguen 5 géneros: *Influenzavirus A*, B y C; *Thogovirus* y *Isavirus* (Palese & Shaw, 2007). Solamente los 3 géneros de *Influenzavirus* son causantes de gripe. *Isavirus* infecta al salmón y *Thogovirus* a insectos. Los virus gripales se clasifican en función de las diferencias antigénicas en su nucleoproteína (NP) y en la proteína de matriz (M1), las cuales se encuentran en el interior del virión. *Influenzavirus A* infecta humanos, otros mamíferos y gran variedad de aves. Se clasifican en numerosos subtipos en función de la

naturaleza antigénica de sus glicoproteínas de superficie HA y NA. Existen 17 clases diferentes de HA y 10 de NA (Palese & Shaw, 2007 ; Tong et al., 2012) y el subtipo de cada virus viene definido por la combinación de HA y NA que contiene, por lo que la diversidad antigénica es muy amplia (Fouchier et al., 2005 ; Webster et al., 1992). Estos subtipos difieren en el rango de hospedador y en su patogenicidad (Nicholls et al., 2008 ; Yamada et al., 2006). Los virus tipo A son los más agresivos de los 3 géneros y los únicos que han producido pandemias a lo largo del siglo XX. *Influenzavirus B* infecta casi en exclusiva a humanos, y ocasionalmente focas (Hay et al., 2001) siendo menos frecuente y agresivo que el A. *Influenzavirus C* es menos frecuente que los otros dos géneros e infecta humanos y cerdos (Matsuzaki et al., 2006).

En esta Tesis se hará referencia únicamente a cepas de virus de tipo A ya que es el que afecta más gravemente a humanos y, por tanto, el de mayor importancia debido no sólo a su incidencia en la salud sino también a las importantes pérdidas económicas que ocasiona, tanto en gastos directos sanitario-farmacéuticos como en la pérdida de decenas de millones de horas laborales.

1.3 Morfología y componentes estructurales de la partícula viral

Los viriones de gripe básicamente están compuestos por una envuelta lipídica, derivada de la membrana de la célula hospedadora, que encierra una nucleocápsida que contiene su material genético en forma de complejos RNA-proteína. Son virus pleiomórficos y heterogéneos en tamaño, siendo su forma, en general, esférica o elíptica, con un diámetro de aproximadamente 80-120 nm. Ocasionalmente, podemos encontrar virus filamentosos que llegan a alcanzar hasta 20 µm de longitud, particularmente en cepas aisladas de casos clínicos y en preparaciones específicas de virus (Bourmakina & Garcia-Sastre, 2003 ; Burleigh et al., 2005 ; Elleman & Barclay, 2004).

Fig. I1.

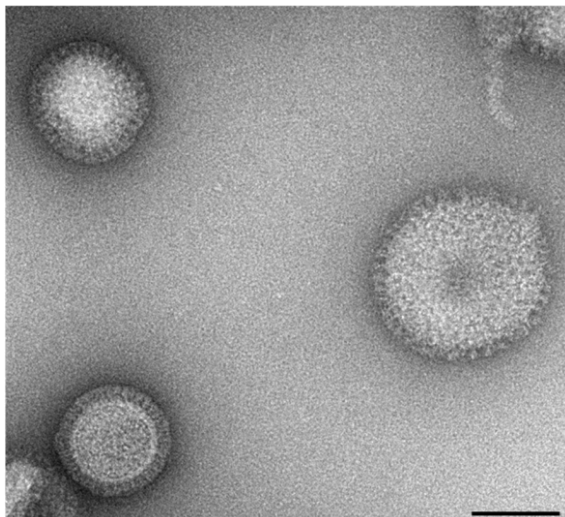


Figura I1. Micrografía de viriones gripales A/WSN/33 (H1N1) Los viriones fueron purificados por ultracentrifugación y visualizados mediante microscopía electrónica en tinción negativa. Barra 100 nm.

Cada virión tiene tres componentes sub-virales mayoritarios (**Fig. I2 A**), a saber: (1) Una **envuelta viral**, a la que se le anclan tres proteínas transmembrana que son la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), y la proteína de la matriz 2 (M2). Las dos glicoproteínas HA y NA forman las espículas de la superficie viral, con una proporción aproximada de cuatro HA por cada NA. (2) Una **capa intermedia** constituida por la proteína periférica de la matriz 1 (M1); que tapiza la cara interna de la envuelta lipídica manteniendo la morfología del virión. Y (3) por debajo de la proteína M1, se encuentra el **genoma viral o nucleocápsida**, que está constituido por ocho segmentos de RNA diferentes, asociados a la polimerasa viral y múltiples copias de una nucleoproteína (NP) formando lo que se conocen como ribonucleoproteínas (RNPs) (Chou et al., 2012) (**Fig. I2 B**). En estas RNPs la estructura básica está formada por la molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa que, con extremos complementarios, forma una estructura cerrada en forma de anillo. Asociada a esta región de cierre de cadena doble se encuentra la polimerasa, un heterotrímero formado por la proteína básica 1 (PB1), la proteína básica 2 (PB2) y la proteína ácida (PA); mientras que en la zona de cadena sencilla está unida a múltiples copias de NP (**Fig. I2 B**) (Neumann et al., 2004 ; Resa-Infante et al., 2011). También existen en el interior del virión pequeñas cantidades de otras proteínas, entre las que cabe destacar la proteína de exportación nuclear (NEP) (Yasuda et al., 1993), aunque su localización concreta no se conoce.

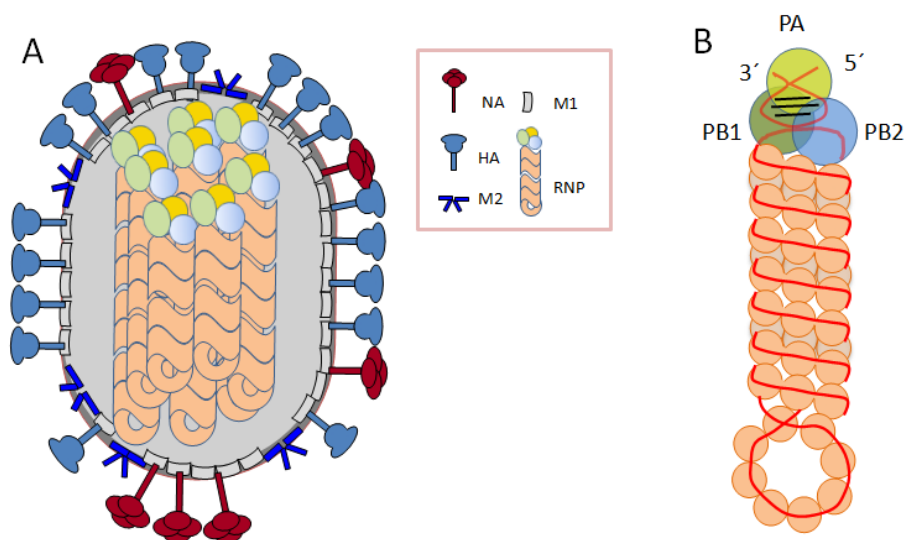


Figura I2. Diagrama esquemático de un virión de gripe basado en estudios de microscopía. (A) Estructura general del virus. La envuelta lipídica se representa en color gris oscuro y la capa de proteína M1 en color azul claro. Se indica la localización de las proteínas asociadas a la membrana (HA, NA, M1 y M2). En el interior de la partícula se muestran las ocho RNPs virales, cada una de ellas compuestas de una molécula de RNA asociada a la polimerasa viral y de monómeros de NP. Adaptado de (Noda, 2012). (B) La RNP está formada por un RNA de cadena sencilla y polaridad negativa con extremos complementarios que originan una estructura cerrada (línea roja). Este RNA está decorado con múltiples copias de la nucleoproteína (círculos en color crudo) y la polimerasa -un trímero formado por PB1, PB2 y PA- se encuentra unida a los extremos complementarios. Adaptado (Portela & Digard, 2002)

1.3.1 Características de las proteínas virales

1.3.1.1 Proteínas virales asociadas a la membrana

El virus de gripe expresa e incorpora en el virión una proteína periférica de membrana (M1) y tres proteínas transmembrana (HA, NA, y M2).

Proteína de matriz 1 (M1). M1 es una de las proteínas más abundantes del virión y forma una capa casi continua por el lado interior de la envuelta lipídica manteniendo su estabilidad e integridad (Sha & Luo, 1997 ; Harris et al., 2001). Parte de su estructura (aproximadamente el 60%) ha sido resuelta a diferentes pH mediante cristalografía de rayos-X (Sha & Luo, 1997 ; Harris et al., 2001 ; Arzt et al., 2001) y de manera natural forma homooligómeros (Zhao et al., 1998) (Zhao et al., 1998 ; Nayak et al., 2004). Estos oligómeros están organizados de manera que la superficie hidrofóbica se asocia a los lípidos la envuelta, mientras que la superficie opuesta cargada positivamente se une al RNA expuesto de las vRNPs; conectándose así los componentes del interior del virión con las proteínas de la membrana (Nayak et al., 2004). También interviene en procesos como la liberación del las RNPs en el citoplasma tras la infección, probablemente debido a los cambios conformacionales que sufre con el cambio de pH por la acidificación del endosoma. Desde el punto de vista bioquímico esta proteína también juega un importante papel debido a que su unión a las RNPs en el núcleo parece inhibir la transcripción viral (Hankins et al., 1990). Además, la interacción de M1-RNPs con NEP promueve la exportación nuclear del complejo (Chen & Krug, 2000). También está implicada en el proceso de ensamblaje mediante el reclutamiento de los componentes virales al sitio de ensamblaje en la membrana plasmática; en la gemación y liberación del virión (Gomez-Puertas et al., 2000 ; Bourmakina & Garcia-Sastre, 2005).

Hemaglutinina (HA). Por toda la superficie del virión se distribuyen abundantes cantidades de HA, constituyendo aproximadamente el 80% de las proteínas del envuelta. La HA desempeña dos funciones esenciales en la infección viral: es responsable de la unión a receptores celulares que contienen ácido siálico, e induce la fusión de membranas viral y membrana endosomal al producirse el cambio de pH del endosoma lo que determina la penetración del genoma viral en el citoplasma celular (Weis et al., 1988). Debido a estas funciones de invasión celular, esta proteína juega un papel crucial en la determinación del rango de hospedadores sensibles al virus así como en su virulencia. Por otro lado, es el antígeno viral contra el que se dirige una parte importante de la respuesta inmunológica neutralizante. Desde el punto de vista estructural, es una glicoproteína tipo I que contiene su extremo C-terminal en el interior de la partícula viral y su extremo hidrofílico se proyecta como una espícula hacia afuera de la superficie de virus. Se expresa como

un precursor denominado HA0, que para tener plena actividad biológica ha de procesarse proteolíticamente para dar lugar a dos polipéptidos independientes (HA1 y HA2) unidos entre sí por puentes disulfuro. La estructura cristalográfica del ectodominio de HA ha sido resuelta tanto para HA0 como para (HA1+HA2) (Wilson et al., 1981 ; Chen et al., 1998) estando en ambos casos formadas por un homotrímero.

Neuraminidasa (NA). Es el otro principal componente de la envuelta lipídica, formando aproximadamente el 20% de las espículas del virus. Aunque se encuentran distribuidas individualmente por toda la superficie del virión, un conjunto de estas proteínas se sitúan en el extremo opuesto al que se localizan las polimerasas de las RNPs en el virión (Calder et al., 2010) (**Fig. I2 A**). La función principal de NA es eliminar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular y viral para permitir la liberación de los nuevos viriones al espacio extracelular tras su gemación y también para facilitar su dispersión. Desde el punto de vista estructural es una glicoproteína tipo II con su N-terminal orientado hacia el interior del virus. Su región extracelular presenta dos zonas claramente diferenciadas: un tallo de longitud variable y una zona globular distal en la que radica la actividad neuraminidasa (N-acil-neuramidilhidrolasa). La estructura atómica de la zona globular es un homotetrámero, donde cada monómero está compuesto de seis láminas β antiparalelas organizadas en forma de **hlice** (Varghese et al., 1983 ; Colman et al., 1983).

Proteína de la matriz 2 (M2). Es una proteína integral de membrana que se encuentra en un número de 15 a 20 moléculas por virión, siendo así la proteína minoritaria de la envuelta viral. La estructura biológicamente activa es un tetrámero donde cada uno de los monómeros tiene un corto ectodominio, un dominio transmembrana y un endodominio fosforilado y con residuos de ácido palmítico. Estos monómeros se unen por sus regiones transmembrana formando un canal iónico selectivo de protones (Bauer et al., 1999 ; Holsinger & Lamb, 1991 ; Sugrue & Hay, 1991 ; Schnell & Chou, 2008). Después de la entrada del virus en la célula el bajo pH del endosoma activa este canal de protones acidificándose el interior del virus y facilitándose así la disociación de la proteína M1 de las RNPs para de esta forma permitir la liberación del genoma viral, un proceso esencial para el progreso de la infección. Además de esta actividad, existen trabajos que sugieren que M2 podría también afectar a la morfología de los virus naciente y podría requerirse para un eficiente empaquetamiento de las vRNP, ensamblaje y gemación de los viriones (Chen et al., 2008 ; Iwatsuki-Horimoto et al., 2006 ; McCown & Pekosz, 2005 ; McCown & Pekosz, 2006 ; Rossman et al., 2010).

1.3.1.2 Proteínas virales implicadas en replicación-transcripción

Como muchos otros virus, el virus de la gripe emplea una gran parte de su información génica para generar la maquinaria de transcripción-replicación. Estos procesos tienen lugar en los complejos macromoleculares anteriormente mencionados denominados RNPs, que contienen además del RNA genómico cuatro proteínas virales: la NP y la polimerasa que es un heteropolímero formado por las subunidades PB1, PB2 y PA.

La nucleoproteína (NP). La NP es la proteína más abundante sintetizada durante la infección. Su principal función es de encapsidación (Portela & Digard, 2002) y aunque su papel no está claro es esencial para la replicación y transcripción viral (Mena et al., 1999 ; Turrell et al., 2013). Es una proteína bastante conservada evolutivamente entre las distintas cepas virales que tiene 498 aminoácidos de longitud con una masa molecular de aproximadamente 56 KDa. Es rica en arginina, glicina y serina y tiene una carga neta positiva a pH neutro, lo que refleja su actividad de unión al RNA (Ye et al., 2006 ; Ng et al., 2008) Se asocia a los RNAs genómicos del virus con alta afinidad siendo esta unión no es específica de secuencia (Baudin et al., 1994). En 2001 se obtiene la primera estructura a baja resolución (27 Å), mediante estudios de microscopía electrónica (EM), formando parte de un RNP recombinante compuesta por 9 NPs y la polimerasa viral; en ella muestra una forma alargada y curvada (Martin-Benito et al., 2001) (**Fig. I3**).

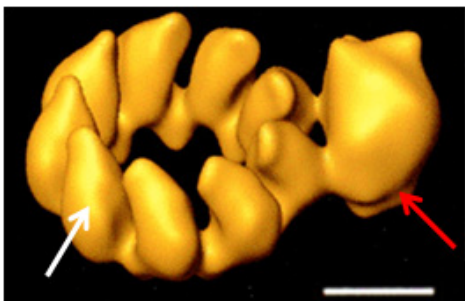


Figura I3. Estructura tridimensional de una RNP recombinante. La estructura circular contiene 9 monómeros de NP asociados entre sí (flecha blanca) La polimerasa (flecha roja) establece contactos con los dos monómeros de NP adyacentes. Adaptado (Martin-Benito et al., 2001). La barra representa 50 Å.

Posteriormente, la proteína se consiguió cristalizar, aunque en ausencia de RNA, y se determinó su estructura a resolución atómica mediante cristalografía de rayos-X (Ye et al., 2006) (**Fig. I4**). En ella, la proteína se encuentra formando un trímero y los monómeros muestran una organización en dos dominios distintos, llamados cabeza y cuerpo, separados por una hendidura. La topología de la proteína muestra que estos dominios no son colineales con la secuencia primaria de la proteína; el dominio cabeza está formado por los aminoácidos 150-270 y 438-452, mientras que el dominio cuerpo comprende 3 segmentos polipeptídicos, 21-149, 273-396 y 453-489 (Ye et al., 2006). La estructura del trímero presenta un lazo intermolecular (posiciones 402-428) que está conectado de manera flexible a la cabeza de la NP y que se inserta en el cuerpo de la NP vecina (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006), de manera tal que el trímero realmente forma un

anillo cerrado (**Fig. I4**). Previamente, y mediante estudios estructurales con EM, se había mostrado la tendencia de esta proteína a generar oligómeros con forma de anillos de diferentes tamaños o estructuras helicoidales de diferentes longitudes, ya sea en ausencia o presencia de RNA (Ruigrok & Baudin, 1995). Es la existencia de este lazo flexible que conecta moléculas de NP adyacentes la responsable de la alta plasticidad de esta molécula para generar ese gran rango de oligómeros (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006 ; Ruigrok & Baudin, 1995 ; Coloma et al., 2009)

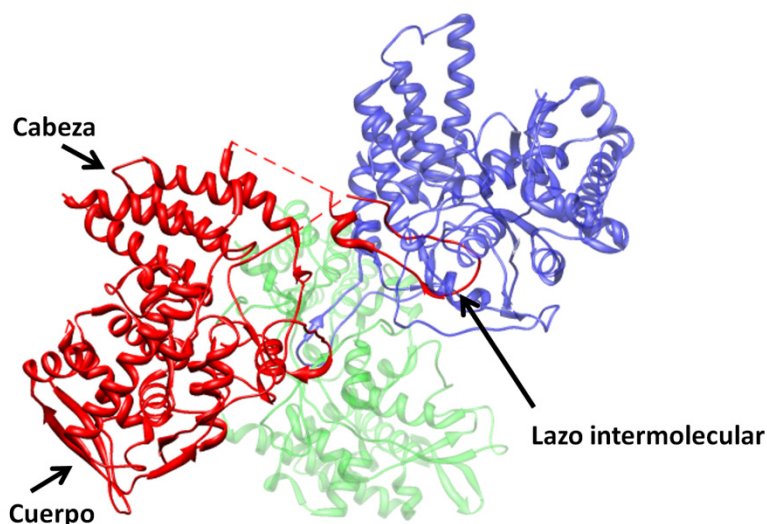


Figura I4. Estructura cristalina a 3.2 Å de resolución de un trímero de NP de H1N1. (Ye et al., 2006). Se muestra la forma general de media luna de NP con dos dominios: cabeza y cuerpo separados por una hendidura. La oligomerización se produce gracias al lazo flexible que se inserta dentro de la molécula vecina.

Mediante estudios de mutagénesis se ha demostrado que el lazo intermolecular es requerido para la actividad de la RNP (Chan et al., 2010 ; Ye et al., 2012). Además, se ha predicho el sitio de unión al RNA en la hendidura localizada entre los dos dominios que es rica en residuos básicos expuestos en su superficie (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006) (**Fig. I5**). Esta predicción localizaría el RNA en la parte más exterior de la NP, lo que explicaría que la RNP de gripe sea sensible a las RNasas, contrariamente a lo que ocurre con otras nucleoproteínas como la del virus de la rabia o de la estomatitis vesicular (Albertini et al., 2006 ; Green et al., 2006). Es necesario señalar que el número de nucleótidos estimado mediante ensayos bioquímicos que se une a cada molécula de NP es aproximadamente 24 (Ortega et al., 2000 ; Compans et al., 1972). Este número es lo suficientemente grande como para que la hebra de RNA no pueda quedar restringida a la hendidura prevista y deba enrollarse o “serpentear” de algún modo en la NP, ya que corresponde a una cadena de nucleótidos que tendría alrededor de unos 140 Å de longitud colocados de manera lineal.

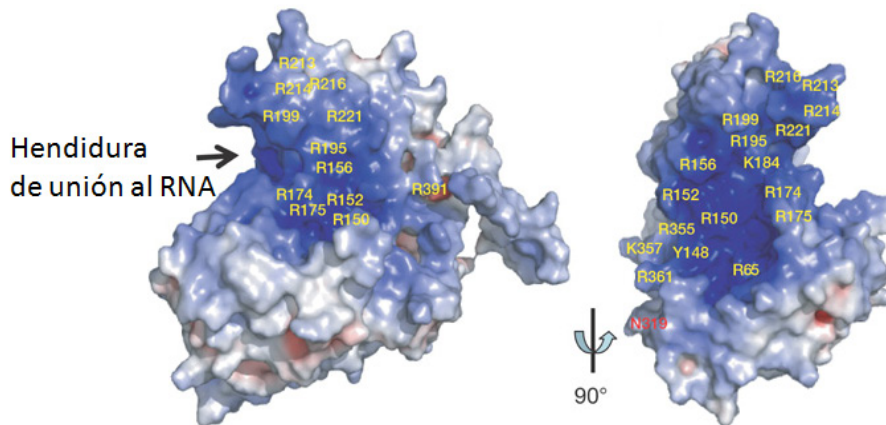


Figura I5. Distribución del potencial electrostático del monómero NP, identificando un posible sitio de unión del RNA. El potencial electrostático positivo se muestra en azul y el negativo en rojo. Adaptado (Ye et al., 2006)

Por otro lado, se ha demostrado que la NP interacciona con la polimerasa viral a través de las subunidades PB1 y PB2, pero no con PA (Area et al., 2004 ; Biswas et al., 1998 ; Fodor et al., 1994), y bioquímicamente la NP es esencial para la replicación y transcripción de RNA genómico completo tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente, se ha demostrado que la polimerasa viral es capaz transcribir y replicar *in vivo* segmentos de RNA cortos, de algunas decenas de nucleótidos, en ausencia de NP (Resa-Infante et al., 2011 ; Turrell et al., 2013), sugiriendo que realmente la NP representa un factor de elongación que estimula la progresividad de la polimerasa viral (Honda et al., 1988 ; Turrell et al., 2013). Otros autores han relacionado esta proteína con el cambio de transcripción a replicación que sufre la polimerasa durante el ciclo viral, aludiendo a la necesidad de NP soluble en el ambiente para que se produzca dicho cambio (Fodor et al., 1994 ; Klumpp et al., 1997).

Además, la NP es determinante para la regulación del transporte bidireccional de las RNPs entre el núcleo y citoplasma durante la infección viral y en el tráfico de éstas ya que es capaz de interactuar con elementos del citoesqueleto. Al menos interactúa con cuatro familias de polipéptidos celulares: receptores de la familia de las importinas α (O'Neill & Palese, 1995), actina, el receptor de exportación celular CRM1 (Elton et al., 2001) y la helicasa UAP56 implicada en el *splicing* y transporte de mRNAs celulares (Momose et al., 2001).

Para la regulación del transporte nuclear la NP presenta al menos dos señales de localización nuclear (NLS), siendo responsables de la importación de las RNP al núcleo a través de su interacción con la importina celular (Wu et al., 2007). La NLS1 o NLS no convencional está situada en el N-terminal de la proteína, entre los aminoácidos 1-13, (Wang et al., 1997) y la NLS2 o NLS bipartita está situada en el centro de la proteína, en la región que comprende los aminoácidos ¹⁹⁸ **KRGINDRNFWRGENERKTR** ⁻²¹⁶ (Weber et al., 1998). Durante estadios tardíos

de la infección, la exportación de las RNPs del núcleo al citoplasma viene mediada por la proteína viral NEP que se une a M1 la cual está unida a su vez NP. Estudios recientes (Yu et al., 2012) han identificado en NP señales de exportación nuclear (NES) responsables de su exportación nuclear y esto sugiere que podría estar promoviendo la exportación nuclear de las vRNPs.

Finalmente, es necesario señalar que los genomas de todos los virus RNA de polaridad negativa (NSV) están ensamblados por NPs. Las estructuras atómicas de diferentes NSVs tienen dos características comunes: una hendidura de unión a RNA cargada positivamente y la existencia de extensos contactos entre NPs adyacentes, lo que sugiere algunos elementos comunes en su función y mecanismo (Ruigrok et al., 2011).

La polimerasa. La polimerasa viral es una RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) formada por las subunidades PA, PB1 y PB2 en una relación estequiométrica 1:1:1 (Detjen et al., 1987 ; Digard et al., 1989 ; Honda et al., 1990 ; Kato et al., 1985) (**Fig. I6 A**). La masa molar del complejo es de 250 kDa aproximadamente.

Los resultados de una amplia variedad métodos de investigación *in vivo* e *in vitro* indican que el heterotrímero es la enzima funcional para llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción viral en el núcleo de la célula infectada, siendo las tres subunidades necesarias para realizar su actividad enzimática (Perales & Ortin, 1997). Este heterotrímero ejerce su acción en el conjunto de RNP, formando una máquina molecular aún más compleja que incluye el RNA y la NP. Además de la polimerasa presente en las RNPs, se ha descrito la presencia de polimerasa soluble en el núcleo de células infectadas (Detjen et al., 1987), aunque no se ha detectado su presencia en los viriones.

La subunidad PB1 forma el núcleo central de la polimerasa y está flanqueada en su extremo N-terminal por PA y en su extremo C-terminal por PB2. Las principales interacciones se producen entre C-terminal de PA y el N-terminal de PB1 y entre C-terminal de PB1 y el N-terminal de PB2 (**Fig. I6 A**) (Ghanem et al., 2007 ; Gonzalez et al., 1996 ; Perez & Donis, 1995 ; Toyoda et al., 1996). Estas interacciones se han verificado por co-cristalización de los correspondientes dominios proteicos e interacciones adicionales han sido descritas como transitorias o por estar involucradas en la regulación de la actividad de la polimerasa (Hemerka et al., 2009 ; Poole et al., 2004). En la actualidad no se dispone de la estructura atómica de la polimerasa completa, aunque sí han podido ser resueltos varios dominios de las subunidades de la polimerasa a resolución atómica (**Fig. I6 B**). Sin embargo, se han obtenido estructuras a baja resolución mediante EM (**Fig. I6 C**). Las reconstrucciones tridimensionales de la polimerasa son las siguientes: polimerasa libre de RNA resulta por tinción negativa y recientemente por crio-EM (Torreira et al., 2007 ; Moeller et al., 2012), polimerasa asociada a una cadena mini-RNA (Resa-Infante et al., 2010) y también asociada a una mini-RNP (Area et al., 2004 ; Coloma et al., 2009).

Estos estudios demuestran una estructura muy poco compacta y flexible que podría cambiar su conformación tras la interacción con el RNA o la NP, así como, presumiblemente con la unión a otros factores virales o celulares.

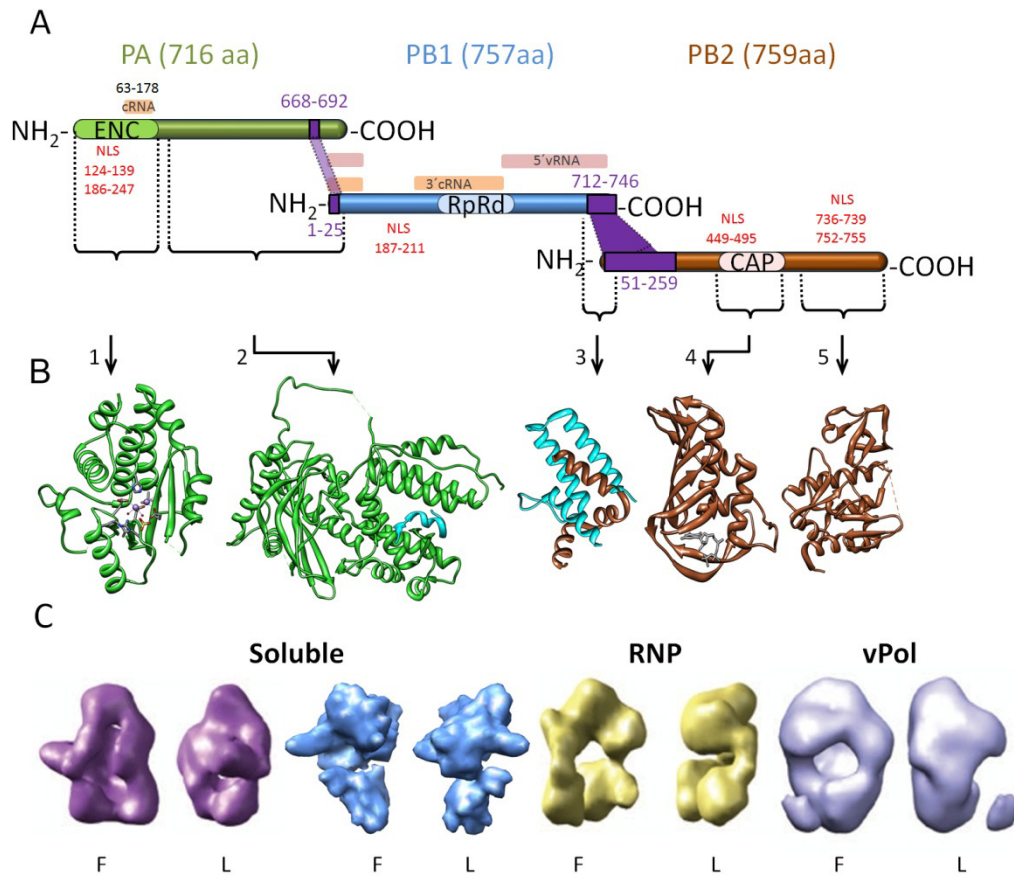


Figura I6. Dominios funcionales de las subunidades de la RNA polimerasa y sus estructuras cristalográficas. (A) Representación las 3 subunidades de la polimerasa viral: PA (verde), PB1 (azul) y PB2 (marrón) y las interacciones entre ambas (regiones moradas). Además, se representan las regiones de interacción con el cRNA y el vRNA así como, las NLSs. (B) Estructuras atómicas determinadas por cristalografía de rayos X. 1) Dominio endonucleasa de PA, residuos 1-209 (PDB ID 2W69, (Dias et al., 2009); 2) interacción entre C-terminal PA (cintas verdes) y N-terminal PB1 (cintas azules), residuos 256-716 y 1-16 respectivamente (PDB ID 3CM8 (He et al., 2008); 3) interacción entre C-terminal PB1 (cintas azules) y N-terminal PB2 (cintas marrones), residuos 679-757 y 1-37 respectivamente (PDB ID 2ZTT (Sugiyama et al., 2009); 4) dominio de unión a CAP de PB2, residuos 318-483 (PDB ID 2VQZ, (Guilligay et al., 2008); 5) y dos dominios del C-terminal de PB2 538-667 y 686-741 (PDB ID 2VY6, (Tarendeau et al., 2008). (C) Estructuras de la polimerasa resueltas por EM: polimerasa soluble a 26 Å (Torreira et al., 2007) polimerasa soluble resuelta por crio-EM a 13 Å (Moeller et al., 2012), polimerasa de mini-RNP (Coloma et al., 2009) y polimerasa asociada a una mini cadena de RNA (vPol) (Resa-Infante et al., 2010), donde (F) es la vista frontal y (L) la vista lateral. Los paneles (B) y (C) no están mostrados a la misma escala.

A lo largo de los años, se han asignado funciones específicas a cada subunidad de la polimerasa, que podemos resumir de la siguiente manera:

Proteína básica 1 (PB1). La subunidad PB1 es una de las dos proteínas básicas del complejo y la más conservada evolutivamente. PB1 cataliza la adición secuencial de nucleótidos durante la elongación de la cadena de RNA (Braam et al., 1983 ; Ulmanen et al., 1981). Además de actuar como núcleo del complejo interaccionando con PB2 y PA se une también con NP (Biswas et al., 1998 ; Medcalf et al., 1999). Posee los motivos conservados característicos de las RNA polimerasas dependientes de RNA (Poch et al., 1989), cuyas mutaciones puntuales afectan drásticamente su actividad (Biswas & Nayak, 1994 ; Mahy, 1983).

La polimerasa viral se asocia al promotor del RNA viral (vRNA) con especificidad de secuencia (Tiley et al., 1994) y PB1 une de manera específica y diferencial los RNAs virales (Fodor et al., 1994 ; Li et al., 1998). Se ha observado que el extremo 5' del vRNA interacciona con PB1 con mayor afinidad que el extremo 3', y a su vez mayor afinidad por vRNA que por RNA complementario (cRNA) (Gonzalez & Ortin, 1999a ; Gonzalez & Ortin, 1999b). Por otra parte, PB1 posee una NLS bipartita compuesta por aminoácidos cargados (Nath & Nayak, 1990). (**Fig. I6 A**). Por último, se ha sugerido que PB1 podría estar implicada en la regulación de la transcripción ya que mutaciones en esta subunidad afectan a la unión del promotor viral del vRNA y a la unión a RNA con estructuras *cap* (Kerry et al., 2008).

Proteína básica 2 (PB2). La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la iniciación de la transcripción ya que es la responsable del reconocimiento de estructuras *cap* tipo1 de los pre-mRNA de la célula huésped, que serán posteriormente cortadas y utilizadas como cebadores para la síntesis de los mRNA virales (Blaas et al., 1982 ; Ulmanen et al., 1981). También está implicada en la replicación ya que mutaciones puntuales en esta subunidad dan lugar a defectos en la replicación pero no en la transcripción (Gastaminza et al., 2003 ; Jorba et al., 2009).

El reclutamiento de la proteína PB2 al complejo de la polimerasa se realiza por las interacciones proteína-proteína con PB1, interaccionando también directamente con NP y con PA (Biswas et al., 1998 ; Digard et al., 1989 ; Hemerka et al., 2009 ; Poole et al., 2004). Al igual que PB1, PB2 es capaz de unir el RNA genómico, aunque se desconoce la región responsable del reconocimiento (Fodor et al., 1993). Por otro lado, se ha determinado la estructura cristalina del C-terminal de PB2 (**Fig. I6 B**), proporcionando información sobre la interacción de la NLS de PB2 con α -importinas que son importantes para la importación nuclear (Resa-Infante et al., 2008 ; Tarendeau et al., 2007) y sobre un dominio de la polimerasa particularmente relevante en la adaptación de los virus aviares a mamíferos (Boivin & Hart, 2011 ; Tarendeau et al., 2008).

Proteína ácida (PA). La subunidad PA tiene un papel fundamental como endonucleasa (Fodor et al., 2002), siendo su dominio N-terminal responsable de llevar a cabo dicha actividad. Este dominio presenta una estructura es muy parecida a las nucleasas de tipo II (**Fig. I6 B**) (Dias et al., 2009 ; Yuan et al., 2009). Además, está implicada en replicación, ya que mutantes termosensibles en PA dan lugar a defectos en la síntesis de cRNA y vRNA (Krug et al., 1975).

También se ha observado su implicación en la unión de la polimerasa a estructuras *cap* y que es necesaria para la estabilización de la unión entre el promotor y la polimerasa (Hara et al., 2006 ; Lee et al., 2002). Se ha descrito que PA interacciona con el extremo 5' del vRNA (Fodor et al., 1994) y con el cRNA (Maier et al., 2008). PA tiene actividad proteolítica sobre sí misma y sobre las proteínas que se expresan con ella (Sanz-Ezquerro et al., 1995). Esta proteína posee una NLS dividida en dos regiones situadas en el extremo N-terminal (Nieto et al., 1994).

La vía de formación del complejo polimerasa parece estar estrechamente vinculada con su importación al núcleo, donde se lleva a cabo su principal actividad (Hutchinson & Fodor, 2012). Aunque cada subunidad tiene sus propias NLSs (Mukaigawa & Nayak, 1991 ; Nath & Nayak, 1990 ; Nieto et al., 1994), varias investigaciones apoyan un modelo donde el heterodímero PB1-PA se forma en el citoplasma y es transportado al núcleo mediante la asociación de RanBP5 a PB1; por su parte PB2 es importado vía α -importina (Deng et al., 2005 ; Fodor & Smith, 2004 ; Hutchinson & Fodor, 2012). Además, la formación del complejo parece requerir no sólo las clásicas chaperonas como Hsp90 (Chase et al., 2008 ; Naito et al., 2007) sino su propia maquinaria de importación, la cual podría ayudar en la formación de la polimerasa plenamente funcional (Hutchinson et al., 2011 ; Resa-Infante et al., 2008).

1.3.1.3 Proteínas virales accesorias

Proteína de exportación nuclear NEP (antes NS2). NEP es una proteína escasamente presente en el virión y que desarrolla varias funciones primordiales, entre ellas lleva a cabo la exportación de las RNPs desde el núcleo al citoplasma de la célula infectada. Actúa como adaptador entre las RNPs virales y la maquinaria de exportación nuclear de la célula, interaccionando con el receptor de exportación nuclear CRM1 (Boulo et al., 2007). No posee actividad intrínseca de unión al RNA pero sí incluye en su C-terminal un dominio de unión a M1. Se cree que este dominio permite el reconocimiento de las RNPs que tienen M1 unida. Además, un gran número de evidencias sugieren que juega un papel fundamental en la regulación de la replicación-transcripción viral en el interior de núcleo (Bullido et al., 2001 ; Robb et al., 2009).

Proteína no estructural 1 (NS1). Es una proteína multifuncional no presente en los virus pero que se sintetiza durante la infección. Realiza gran cantidad de actividades que contribuyen a aumentar la eficiencia de la replicación del virus y su virulencia durante la infección. Se asocia a las RNPs virales por medio de su interacción con NP (Marion et al., 1997 ; Robb et al., 2011).

Proteína PB1-F2. PB1-F2 se expresa durante la infección viral y tampoco se ha detectado en el virión. Se localiza en la membrana de las mitocondrias e induce apoptosis (Gibbs et al., 2003). Favorece la aparición de enfermedades bacterianas secundarias (McAuley et al., 2007) y además regula la actividad de la polimerasa viral (Mazur et al., 2008).

Proteína N40. Se descubrió en 2009 y aún se desconoce su función (Wise et al., 2009 ; Tauber et al., 2012) Se codifica en el segmento 2 del genoma viral, representa la secuencia de PB1 con el N-terminal deleccionado.

Proteína PA-X: La proteína PA-X ha sido recientemente descubierta. Se traduce por medio del desplazamiento del marco ribosómico de gen PA. Está involucrada en la modulación de la respuesta inmune (Yewdell & Ince, 2012)

1.3.2 Características de los RNA virales

El genoma del virus de la gripe tipo A está formado por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. El tamaño de los segmentos comprende desde 890 a 2.341 nt, siendo el tamaño total del genoma de 13.5 Kb. En general, cada segmento codifica una proteína, pero varios de ellos codifican para productos génicos adicionales generados por distintas estrategias. (Fig. I7).

1.3.2.1 El promotor viral

Cada segmento de RNA viral posee regiones no codificantes (UTRs) de distinta longitud en sus extremos 3' y 5' (Fig. I7 e I8) Los primeros 12 y 13 nucleótidos de las UTRs están altamente conservados en todos los segmentos del genoma (Desselberger et al., 1980). Estas secuencias presentan complementariedad parcial e invertida, de manera que les permite aparearse constituyendo de este modo, el promotor viral. Existe una gran controversia respecto al apareamiento de estas bases proponiéndose dos modelos de estructura secundaria para los promotores de vRNA y cRNA; modelo con una conformación *panhandle* o mango o bien modelo con una conformación *corkscrew* o sacacorchos (Desselberger et al., 1980 ; Fodor et al., 1994). El promotor es reconocido por la polimerasa viral para llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción (Fodor et al., 1993 ; Fodor et al., 1994 ; Honda et al., 1987)

Introducción

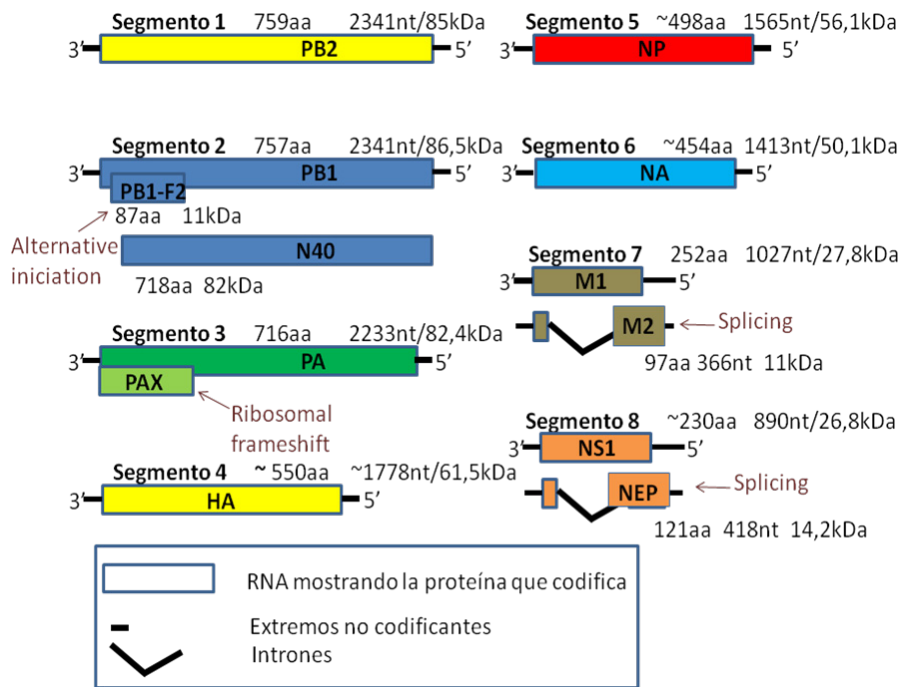


Figura I7. Genoma del virus de la gripe. Se representan los 8 segmentos de RNA en polaridad negativa y se indican las 13 proteínas que codifican. El segmento 2 codifica normalmente para PB1 pero puede ser traducido en una segunda fase de lectura (*alternative initiation*) en PB1-F2. Adaptado de (Palese y Shaw2007). La expresión de N40 es interdependiente con las proteínas PB1 y PB1-F2 (Wise et al., 2009) El segmento 3 codifica para PA pero puede ser traducido por desplazamiento de marco ribosómico (*ribosomal frameshift*) a PA-X (Yewdell & Ince, 2012) . Los segmentos 7 y 8 se transcriben en mRNA que dan lugar a NS1 y M1 respectivamente, pero estos mRNA pueden sufrir un proceso de splicing dando lugar a NEP y M2 respectivamente (Inglis & Mahy, 1979 ; Inglis & Brown, 1981 ; Lamb & Choppin, 1983).

El número de nucleótidos contiguos a estas secuencias conservadas varía desde 4 a 7 nucleótidos entre los segmentos. Estos nucleótidos complementarios son específicos y altamente conservados en todos los segmentos (Li & Palese, 1994) excepto para el segmento 6 que codifica para la proteína NA (Suzuki & Kobayashi, 2012) Otra secuencia compartida en todas las RNAs es una secuencia poli-U expandida localizada en la posición 17-21 en el 5' de la secuencia no codificante, la cual actúa como señal de poliadenilación. (Fig. I8). La información contenida en estas secuencias conservadas es relevante para los procesos de replicación, transcripción, poliadenilación y empaquetamiento, dado que están implicadas en la interacción con la polimerasa viral (Brownlee & Sharps, 2002)

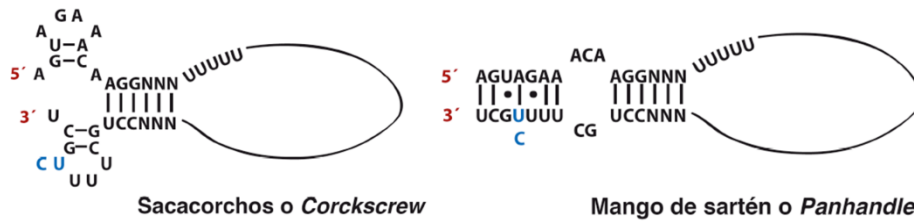


Figura I8. Modelos propuestos de estructuras secundarias del promotor viral. Se muestran los nucleótidos conservados de los extremos 5' y 3' del RNA genómico del virus, así como, un segmento específico de nucleótidos (NNN). La señal de poliadenilación en el extremo 5' se muestra como una poli-U extendida. También se muestran los pares de bases Watson-Crick (Adaptado (Palese & Shaw, 2007))

1.3.2.2 RNAs virales presentes en la célula infectada durante la infección

Dentro de la célula infectada, se pueden encontrar 3 tipos de RNAs virales distintos, todos ellos generados por la polimerasa viral. (**Fig. I9**).

Los **RNAs genómicos o vRNAs** son los RNAs de las RNPs paternas y los que se encapsidan para dar lugar a las RNPs de la progenie. Sus extremos poseen un 5'-trifosfato y un 3'-OH (Young & Content, 1971). Como se ha mencionado los vRNAs contienen una zona rica en uridinas próxima al extremo 5' que se utiliza como molde para la poliadenilación de los mRNAs virales (Luo et al., 1991 ; Robertson, 1979). Este vRNA siempre se encuentra encapsidado por la proteína NP formando vRNPs.

Los **RNAs complementarios o cRNAs** son una copia completa de polaridad positiva del vRNA y son producidos mediante el proceso de replicación. Son intermediarios de la replicación viral ya que se utilizan como molde para generar copias de vRNA que serán incorporadas más tarde a la progenie viral. Al igual que el vRNA, el cRNA se encuentra formando cRNPs pero éstas no salen del núcleo de la célula infectada y no se encapsidan en los nuevos viriones.

Los **RNAs mensajeros o mRNAs** son generados durante los procesos de transcripción a partir de los vRNAs. Tienen polaridad positiva y presentan en sus extremos 5' una estructura *cap* tipo 1 que deriva de mRNAs celulares (Krug et al., 1979) y en su extremo 3' una secuencia poli-A de longitud variable. Dichas modificaciones post-transcripcionales dan lugar a mRNAs virales estructuralmente indistinguibles de los celulares.

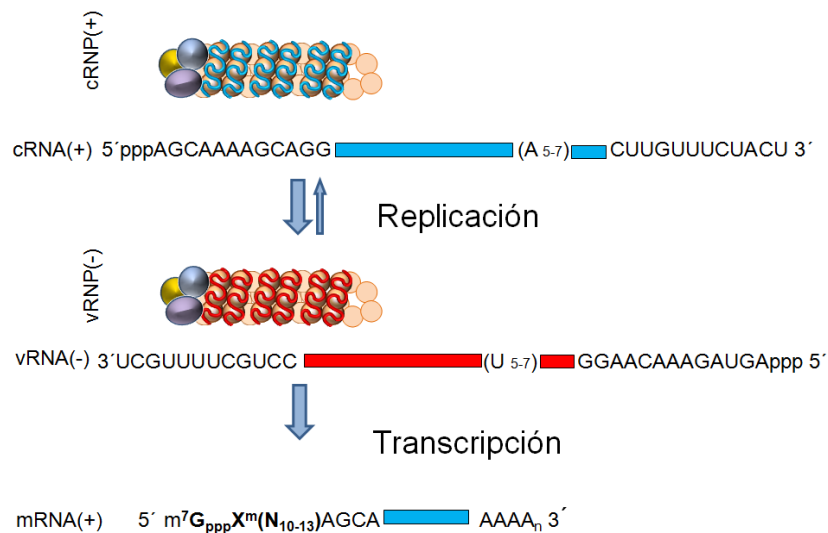


Figura I9. Diagrama de la síntesis del RNA viral. Mediante la replicación se generan los intermedios replicativos (cRNP) con polaridad positiva encapsidados por NPs formando cRNP. Los cRNP sirven de molde para dar a lugar a la progenie viral (vRNA) también encapsidados en forma de vRNPs. Mediante el proceso de transcripción se forman los mRNA virales.

2. Complejos ribonucleoproteicos (RNPs)

Las RNPs son las unidades básicas funcionales que llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada. Como ya se ha descrito anteriormente, los segmentos de vRNA y cRNA jamás se presentan como RNAs desnudos en los virus o en las células infectadas sino que existen como RNPs cuyo tamaño oscila entre los 2.5 a 6.3 MDa. Estos complejos se generan mediante la interacción de cada segmento de RNA con la polimerasa viral y una determinada cantidad de moléculas de NP que depende de la longitud del RNA (890-2341 nt que corresponden a 37-97 copias de NP) (Neumann et al., 2004 ; Resa-Infante et al., 2011 ; Ruigrok et al., 2010) (**Fig. I2**) De este modo, la longitud de cada RNP varía aproximadamente entre 30-110 nm (Compans et al., 1972). Su diámetro es de aproximadamente 12 nm (Compans et al., 1972)

2.1 RNPs purificadas

Hace más de 40 años las RNPs presentes en las partículas virales fueron aisladas e identificadas como estructuras en forma de cintas helicoidales y con alta flexibilidad (Compans et al., 1972 ; Heggeness et al., 1982). Estructuras similares se observaron analizando complejos NP-vRNA, NP purificada o mini-RNPs recombinantes (Ruigrok & Baudin, 1995 ; Yamanaka et al.,

1990 ; Ortega et al., 2000), sugiriendo que la NP contiene importante información estructural respecto a la configuración general de las RNPs. Estas moléculas de NP forman un oligómero que actúa como esqueleto para la unión de RNA, cuyas bases están expuestas y son accesibles a RNAsas y a modificaciones por agentes químicos, excepto los extremos que están protegidos por la unión de la polimerasa (Baudin et al., 1994). Recientemente, se ha demostrado que el reclutamiento de NP para formar parte de las RNPs progenie durante la replicación se produce mediante la homo-oligomerización NP-NP. El crecimiento sucede unidireccionalmente en una orientación donde el ensamblaje primero se produce por el lazo intermolecular siendo independiente de la unión de RNA (Turrell et al., 2013). Adicionalmente, estudios de inmun-EM, determinaron la presencia de la polimerasa viral en uno de los extremos de las RNPs (Murti et al., 1988), siendo importante para el mantenimiento de la conformación cerrada de la estructura (Klumpp et al., 1997).

La intrínseca flexibilidad y variabilidad de tamaño de las RNPs ha hecho imposible hasta la fecha los estudios estructurales, ya que hace imposible su cristalización y su tratamiento por los métodos de microscopía electrónica habituales. Para solventar estos problemas el primer abordaje realizado fue la determinación de la estructura tridimensional de una mini-RNP generada mediante amplificación *in vivo* por expresión de NP, las tres subunidades de la polimerasa y un vRNA-like de 248 nt conteniendo las secuencias terminales altamente conservadas (Ortega et al., 2000 ; Martin-Benito et al., 2001 ; Area et al., 2004 ; Coloma et al., 2009 ; Torreira et al., 2007). Esta mini-RNP era estructuralmente más rígida que las RNPs nativas lo que permitió una reconstrucción por crio-EM a 12 Å de resolución para la región de las NPs y 18Å para la polimerasa. La estructura resuelta presentaba una forma de anillo que contenía 9 monómeros de NP, 2 de ellos asociados la polimerasa que aparecía unida a un lado del anillo (**Fig. I10**) (Martin-Benito et al., 2001 ; Coloma et al., 2009). Cada monómero de NP presentaba una estructura curvada, en caso de menor resolución (Martin-Benito et al., 2001), o claramente los dos dominios correspondientes a la cabeza y cuerpo en el caso de mayor resolución (Martin-Benito et al., 2001 ; Coloma et al., 2009) (**comparar Fig. I3 con Fig. I10**). El complejo de RNA polimerasa presentaba una estructura compacta sin límites claramente discernibles entre las subunidades PB1, PB2 y PA (Area et al., 2004). La posición de estas subunidades fue determinada mediante la utilización de complejos con anticuerpos monoclonales contra las diferentes subunidades de la polimerasa marcando las mini-RNP completas o bien, como en el caso de PB1, marcadas con una etiqueta TAP (Tandem Affinity Purification) y anticuerpos contra esa etiqueta. Esos ensayos determinaron que la región N-terminal de PB2 y la región N-terminal de PA estaban localizadas en el lado opuesto a la interacción polimerasa-NP mientras que la región C-terminal de PB1 estaba situada en el lado de la interacción (Area et al., 2004 ; Coloma et al., 2009). La polimerasa estaba conectada a la sección media de los 2 monómeros de NP a través de PB1 y PB2 (Martin-Benito et al., 2001 ; Coloma et al., 2009), siendo congruente con los datos bioquímicos previos

(Biswas & Nayak, 1994 ; Medcalf et al., 1999 ; Poole et al., 2004). Por otro lado, la estructura tridimensional del complejo polimerasa soluble mostraba una organización más abierta pero con similares características en la estructura general entre ambas (Torreira et al., 2007). La diferencia conformacional era más evidente en el área implicada en las interacciones con los 2 monómeros de NP en la RNP recombinante (Martin-Benito et al., 2001), apareciendo un sustancial desplazamiento de PB2 como resultado de la formación de las RNPs.

En la estructura tridimensional de la mini-RNP fue posible encajar la estructura atómica de NP (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006) y, junto con los análisis mutacionales, permitieron definir las interacciones existentes entre los elementos funcionales de la NP (**Fig. I10**).

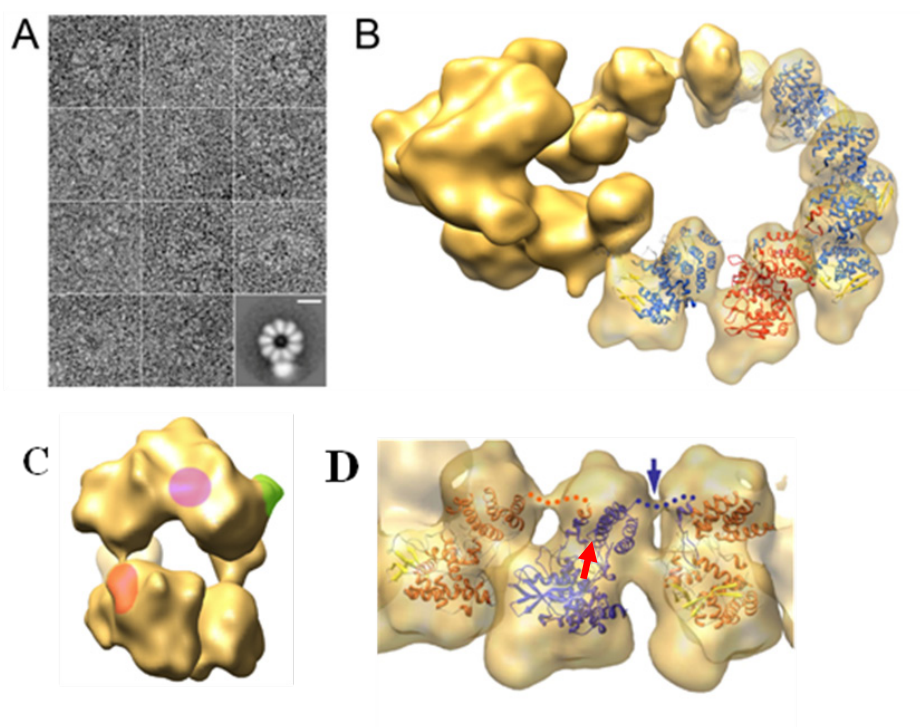


Figura I10. Estructura de RNP recombinante. (A) Galería de imágenes de la RNP recombinante conteniendo un vRNA de 248 nucleótidos. En la esquina inferior derecha se muestra una imagen media cuya estructura presenta una forma circular constituida por 9 NPs y sobresaliendo de ella la polimerasa. Barra 100 Å (Martin-Benito et al., 2001). (B) Estructura tridimensional de la RNP recombinante obtenida mediante crio-ME (Coloma et al., 2009) donde se han encajado las estructuras atómicas de NP (PDB ID 2IQH (Ye et al., 2006)). (C) Vista frontal de la polimerasa de la RNP recombinante en crio-EM donde se exponen las subunidades de la polimerasa: PB1 en verde, PB2, en rojo y PA en rosa obtenidas por comparación con la RNP recombinante marcada con anticuerpos monoclonales y estudiada por tinción negativa (Area et al., 2004) (D) Detalle de las NPs donde se ha realizado el encaje de las estructuras atómicas de NP. Con una flecha azul se muestra la presunta conexión entre la cabeza de la NP y el cuerpo de la NP vecina mediante lazo de interacción intermolecular, con una flecha roja se muestra la posible conexión formada por el RNA entre dos moléculas de NP adyacentes.

Como era de esperar las NPs formaban estructuras cerradas mediante la interacción NP-NP producida por el mismo lazo intermolecular descrito en las estructuras cristalográficas (**Fig. I4 y Fig I10 D**)

Paralelamente a la realización de este trabajo, ha sido obtenida la estructura de una RNPs recombinante, con el mismo tamaño que las nativas, generadas *in vivo* mediante la expresión de las 4 proteínas que forman las RNPs (PA, PB1, PB2 y NP) mediante transfección en una línea celular humana en presencia de sus respectivos segmentos vRNA (Moeller et al., 2012).

En esta Tesis se desarrollarán los resultados del estudio de la estructura tridimensional de la RNP nativa aislada a partir de virus así como, su estudio directo dentro de viriones. Estos resultados junto con los obtenidos por Moeller et al, 2012 fueron publicados a la vez en la misma revista.

2.2 RNPs dentro de viriones

La conformación de las RNPs dentro de los viriones ha sido una fuente considerable de controversia. Se propuso que las RNPs virales existían dentro de los viriones como una simple hélice continua y que podría fragmentarse en múltiples RNPs durante los procesos de purificación (Murti et al., 1980) Más tarde, Ruigrok et al (Ruigrok et al., 1989) revelaron mediante EM de tinción negativa que las hélice continuas de 7-8 nm de diámetro observadas eran probablemente pares de hebras M1. Las estructuras helicoidales no continuas que salían de los virus rotos por criosecado reaccionaban con anticuerpos monoclonales anti-NP (Noda et al., 2006), sugiriendo que las RNPs existen dentro de los viriones como estructuras fragmentadas. Secciones de EM de viriones purificados también apoyan esta noción mostrando estructuras de un diámetro de 10-13 nm morfológicamente similares a las RNPs purificadas (Schulze, 1972).

Finalmente y mediante la utilización de secciones EM, se demostró que la disposición de las RNPs dentro de los viriones era distinta de unos a otros (Noda et al., 2006). Las ocho RNPs, que difieren en longitud, están organizadas en un patrón distinto, en el cual siete RNPs rodean a una RNP central (Noda et al., 2006 ; Calder et al., 2010 ; Harris et al., 2006), sugiriendo que hay interacciones entre las RNPs que mantienen esta organización (Noda et al., 2012) Las ocho RNPs están consistentemente asociadas a la cara interna de la envuelta en el extremo distal del virión naciente y orientadas casi perpendicular al ápice del virus naciente (Noda et al., 2006), indicando una organización polar del virión.

3. Ciclo de infección viral

El ciclo viral se desarrolla en las células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de mamíferos y presenta una duración de aproximadamente ocho horas, estando muy bien regulado espacial y temporalmente (**Fig. I11**)

La infección comienza con la adsorción de las partículas virales a su receptor celular, el ácido siálico, presente en glicoproteínas y fosfolípidos de la membrana celular. Este receptor es reconocido por HA presente en la envuelta del virión (Weis et al., 1988). La entrada ocurre por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y una vez formada la vesícula se fusiona con un lisosoma acidificándose así su interior, dando lugar a un endolisosoma. El bajo pH del interior de las vesículas llega al interior del virión por medio del canal iónico formado por M2 (Helenius, 1992 ; Pinto et al., 1992), produciéndose una desestabilización de la interacción de las RNPs con M1 que favorece el desempaquetamiento del virus. Simultáneamente, un cambio conformacional en HA, también producido por el bajo pH, favorece la fusión de la envuelta del virión con la membrana endolisosomal (Skehel & Wiley, 1995 ; Stegmann et al., 1987a ; Stegmann et al., 1987b). Esto permite la liberación de las RNPs al citoplasma que se dirigen hacia el núcleo (Wang et al., 1997) donde tiene lugar los procesos de replicación y transcripción.

Los mRNAs generados son transportados al citoplasma y traducidos por la maquinaria celular dando lugar a proteínas virales. Durante la replicación las vRNPs paternas dan lugar primero a cRNPs que a su vez originaran nuevas vRNPs que van a formar parte de la progenie viral. Estas vRNPs van acumulándose en el núcleo para posteriormente ser transportadas al citosol a través del poro nuclear. En este proceso interviene M1, que hace de puente entre las vRNPs y NEP (Martin & Helenius, 1991), produciéndose este transporte por la interaccionan con los componentes del poro nuclear (Elton et al., 2001 ; O'Neill et al., 1998). Una vez en el citoplasma, las vRNPs viajan a la membrana plasmática a través de microfilamentos de actina (Avalos et al., 1997) y llegan a regiones ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* (Ali et al., 2000) en las que previamente se han anclado las proteínas HA y NA y en menor medida M2 (Nayak et al., 2004 ; Scheiffele et al., 1999 ; Simpson-Holley et al., 2002). M1 y M2 están implicadas en el ensamblaje y gemación de los virones (Gomez-Puertas et al., 1999 ; Iwatsuki-Horimoto et al., 2006 ; McCown & Pekosz, 2006 ; Rossman et al., 2010). Las partículas virales salen de la célula por gemación, mecanismo mediante el cual el virus adquiere su envuelta lipídica en la que se encontraban ancladas las proteínas virales de membrana. Por último, la proteína NA degrada los receptores del ácido siálico que el virus ha arrastrado de la membrana celular, permitiendo que se produzca su separación de la célula y además, evitando de esta manera que se agreguen, facilitando su propagación.

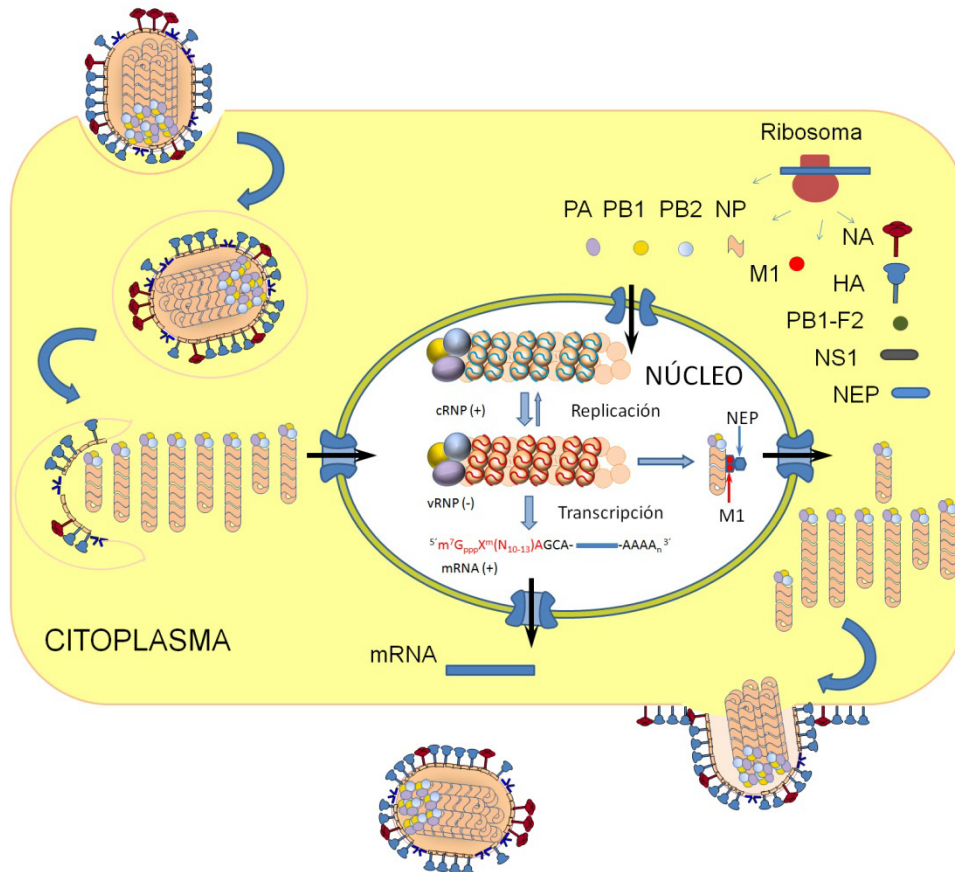


Figura I11. Diagrama esquemático del ciclo de infección viral. Vía endocitosis mediada por receptor, el virus penetra en la célula. Tras la acidificación de endosoma las vRNPs son liberadas al citoplasma y transportadas al núcleo, donde tienen lugar los procesos de replicación y transcripción. Los mRNA salen al citoplasma donde serán traducidos dando lugar a las proteínas virales. Las proteínas necesarias para la formación de las RNP son transportadas interior del núcleo y allí formarán las RNP progenie. Finalmente, estas RNP son exportadas al citoplasma para comenzar el ensamblaje y gemación de las nuevas partículas virales que ocurre en la membrana plasmática (ver texto para más información).

4. Transcripción y replicación del virus de la gripe

Una propiedad que distingue los virus de la gripe de la mayoría de los virus RNA es que replican y transcriben en el núcleo de las células infectadas. Las formas activas de los RNAs virales son las RNP y cada una de ellas actúa como una unidad funcional independiente durante la transcripción y la replicación. Igualmente, el producto final de una RNP replicando nunca es un RNA desnudo sino una nueva RNP, de este modo, la polimerasa además de actuar como una enzima durante el proceso de replicación y transcripción, es requerida como un elemento estructural para el ensamblaje de las RNP durante la replicación.

4.1 Ciclo de transcripción y replicación

En estadios tempranos de la infección, las vRNPs paternas que entran en la célula son transportadas al núcleo donde lo primero que hacen es transcribirse. Esto es lo que se denomina transcripción primaria. Para que se dé esta transcripción no es necesario que se sinteticen proteínas virales. Las RNPs son usadas como moldes para dar lugar a los mRNA, a partir de los cuales se van a expresar las proteínas tempranas (NS1, NP, PB1, PB2 y PA). La producción de proteínas tempranas, o al menos de NP y las tres subunidades de la polimerasa, es esencial para la replicación del RNA (Huang et al., 1990) ya que generan los componentes estructurales de la RNP.

La replicación ocurre en dos etapas. Primero se sintetiza una copia completa del vRNA en polaridad positiva denominado cRNA que se encuentra encapsidado en forma de cRNP. En esta primera ronda de replicación se producen cantidades equivalentes de los cRNAs de cada segmento. Y segundo, este cRNA es usado como molde para producir más vRNA encapsidado como vRNP (**Fig. I9**). La amplificación de estos vRNAs es diferente para cada segmento (Smith & Hay, 1982). Estas nuevas vRNPs se van a transcribir dando lugar a la denominada transcripción secundaria, que permite la expresión de proteínas tardías. La acumulación y síntesis de las proteínas correspondientes son proporcionales a la acumulación del vRNA del que proceden (Hay et al., 1977 ; Hay et al., 1985).

4.2 Mecanismos de transcripción y replicación.

Los mecanismos para la iniciación de la transcripción y la replicación son muy distintos. Se ha propuesto que la polimerasa unida al vRNA molde es la que cataliza la reacción de transcripción, sugiriendo un modelo de transcripción en *cis* (Jorba et al., 2009). Para el inicio de la transcripción, la polimerasa viral que forma parte de las vRNPs presentes en el núcleo reconoce las estructuras *cap* de los pre-mRNAs celulares, en concreto, la unión del cap se produce por la subunidad PB2 (Guilligay et al., 2008) y mediante un proceso denominado *cap-snatching* los corta generando cebadores de entre 9 a 15 nt con extremos 5'-*cap* y 3'-OH (Krug et al., 1979 ; Plotch et al., 1981). El corte es producido por las subunidad PA que tiene actividad endonucleasa (Dias et al., 2009 ; Fodor et al., 2002 ; Yuan et al., 2009) . Este corte se produce de manera preferencial después de una secuencia CA, siendo una G el primer nucleótido en incorporarse en todos los segmentos virales (Rao et al., 2003). La polimerasa viral lleva acabo la elongación del cebador y permanece unida al 5' terminal del molde durante todo el proceso, pudiendo dar lugar a una estructura en forma de nudo corredizo que iría disminuyendo en longitud hasta que la polimerasa llegara a la señal poli-U localizada cerca del extremo 5' del vRNA molde (**Fig. I12**

A). Debido a un impedimento estérico, la polimerasa rebotaría sobre la secuencia de uridinas promoviendo su copia reiterada generando así una secuencia 3' terminal de poliA (Poon et al., 1998 ; Pritlove et al., 1998). Estos mRNAs resultantes son copias incompletas del vRNA molde.

Por otro lado, el proceso de replicación tiene lugar de un modo totalmente diferente al expuesto para la transcripción. Primeramente, los cRNAs y vRNAs son iniciados de *novo* y tienen un trifosfato en su extremo 5', siendo el ATP el primer nucleótido incorporado en todos los RNAs virales (Hay et al., 1982), además los cRNAs y vRNAs sintetizados son copias completas y complementarias del molde utilizado; por último, y contrariamente a los mRNAs, están siempre ensamblados en RNPs y nunca desnudos. Obviamente, la presencia tanto de los complejos de polimerasa y de los monómeros de NP es necesaria para llevar a cabo el ensamblaje de las nuevas cRNPs o vRNPs. Sin embargo, recientemente se ha demostrado *in vivo* una eficiente replicación de un RNA corto, de sólo algunas decenas de bases, en ausencia de NP (Resa-Infante et al., 2011 ; Turrell et al., 2013); indicando que esta proteína no es esencial para la iniciación y terminación de la replicación, aunque sí es esencial como factor de elongación para la obtención de RNAs con la longitud de los nativos (Honda et al., 1988 ; Kawaguchi et al., 2011 ; Turrell et al., 2013). Por otro lado, la capacidad de la polimerasa para oligomerizar (Jorba et al., 2008) y los resultados de complementación *in vivo* de complejos de polimerasa marcada genéticamente (Jorba et al., 2009) sugirieron que la polimerasa libre podría ser crucial para llevar a cabo la replicación. Estos resultados mostraron que el ensamblaje de las vRNPs se realizaba por una polimerasa libre en *trans* y además indicaron que la polimerasa que sintetizaba el vRNA no era la polimerasa que finalmente quedaba asociada a la RNP sino otra tercera polimerasa no residente que también actuaba en *trans* (Jorba et al., 2009). Con estos resultados, los autores propusieron un modelo de replicación para el virus de la gripe (**Fig. I12 B**). Para el inicio de la replicación, la polimerasa no residente en la RNP debe tener acceso al extremo 3' del cRNA. Este paso podría tener lugar por la capacidad de dimerizar que posee la polimerasa descrita anteriormente (Jorba et al., 2008). Una vez la polimerasa soluble ha entrado a formar parte del complejo cRNP empieza la síntesis del vRNA. Cuando el extremo 5' del nuevo RNA queda accesible es protegido por un tercer complejo soluble de polimerasa, distinto del que replica, y comienza la adición de monómeros de NP. La interacción de varios complejos de polimerasa replicando a la vez teniendo como molde una única cRNP podría formar una estructura que se moviera en dirección 3'-5' de manera que se replicara muy eficazmente gracias a esta disposición. Estas estructuras se han observado en otros virus como *Poliiovirus* (Hobson et al., 2001 ; Lyle et al., 2002) y *HCV* (Qin et al., 2002) (Wang et al., 2002), donde sus polimerasas actúan de modo cooperativo para la síntesis de RNA. Un paso que queda sin resolver es cómo la polimerasa pasa sobre la señal de poliadenilación sin impedimentos estéricos con la polimerasa residente, para poder así realizar una copia completa del cRNA, ya que recordemos el extremo 5' del molde tiene unida la polimerasa paterna. Una opción sería que las polimerasas no residentes que sintetizan el RNA pudieran desplazar y reemplazar de forma

transitoria o permanente a la polimerasa residente para realizar la copia completa del molde y además proteger el extremo 5' de su degradación. Tras la replicación, el RNA paterno sería encapsidado por la polimerasa no residente que estaba replicando o bien se produciría la pérdida de la polimerasa residente quedando de esta manera una estructura NP-RNA linearizada. Este modelo debería de ser perfectamente válido también para la obtención de cRNPs a partir de vRNPs, pero de momento no ha podido ser confirmado.

Recientemente, se han descrito por EM, RNPs “ramificadas” sugiriendo que esas ramas son RNPs parcialmente replicadas, es decir, RNPs nacientes desde las completas RNPs parentales (Moeller et al., 2012). Utilizando inmunomarcajes, se ha observado una segunda copia de la polimerasa que está localizada en el sitio ramificado en algunas RNPs. La observación de esta polimerasa es consistente con el modelo de que las RNPs se replican en *trans* por una polimerasa libre y no por la polimerasa unida a la RNP parental. Aunque las RNPs nacientes pudieran ser una atractiva interpretación de esas estructuras ramificadas, todavía hay que esperar una verificación demostrando que sean verdaderos intermediarios replicativos y no unas RNPs formando simplemente contactos. Por otro lado, se han descrito experimentos que sugieren que parte de la replicación de vRNA a cRNA podría ocurrir en *cis* (Vreede & Brownlee, 2007 ; Vreede et al., 2004) mostrando que el cRNA puede acumularse al comienzo de la infección si NP y una polimerasa catalíticamente inactivas son proporcionadas para proteger al RNA de la degradación.

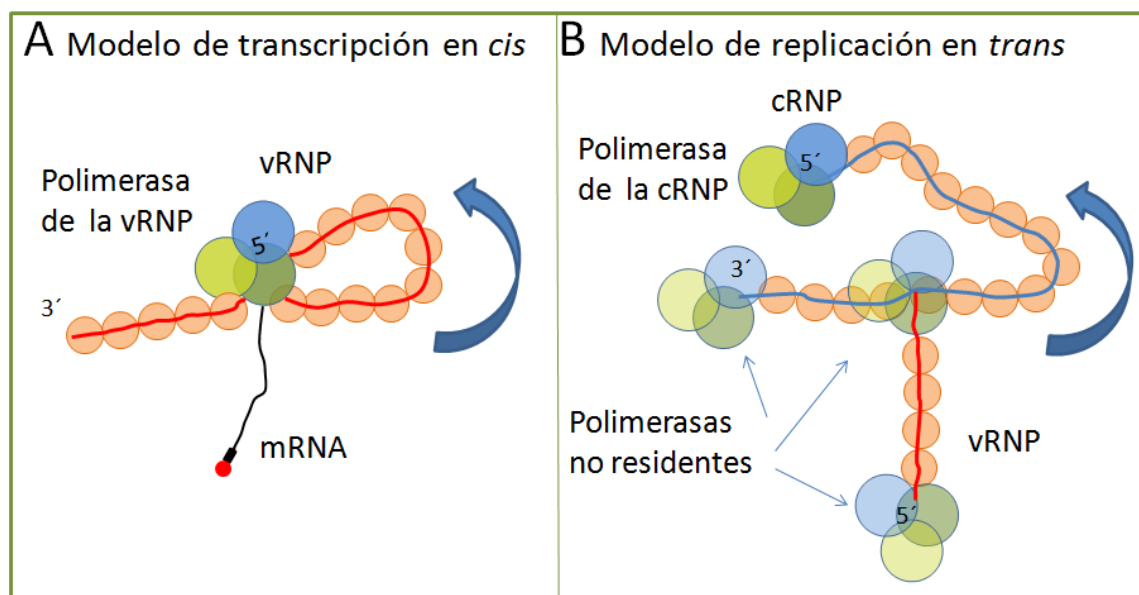


Figura I12. Modelos de transcripción y replicación. (A) Modelo de transcripción en *cis* donde la polimerasa viral residente en la propia RNP que transcribe permanece unida al extremo 5' mientras sintetiza el mRNA; de esta forma se genera una estructura en forma de nudo corredizo. (B) Modelo de replicación en *trans* donde la síntesis de vRNA viene dada por polimerasas no residentes que se unen al extremo 3'. Se produce la unión de otra polimerasa soluble y de NPs al vRNA que se va sintetizando formándose así las nuevas vRNPs (para mayor detalle ver texto).

OBJETIVOS

A pesar de la importancia que el virus de la gripe tiene como patógeno la información estructural sobre su nucleocápsida era muy escasa, limitándose sólo a la estructura atómica determinada por rayos-X de fragmentos de las proteínas que la componen. La obtención de la estructura de las ribonucleoproteínas del virus y la forma de empaquetarse dentro del virión podrían aportar datos de gran relevancia biológica que ayudarían a profundizar en nuestro conocimiento sobre el virus.

Por estos motivos objetivo principal de esta tesis es **la caracterización estructural de la ribonucleoproteína (RNP) nativa del virus de la gripe.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo nuestro estudio fue necesario la producción de virus de la gripe, así como, la purificación de las RNPs nativas a partir de viriones. Estos trabajos fueron realizados en el laboratorio del Prof. J. Ortín por la Dra. R.Coloma.

1. Materiales biológicos empleados

El virus empleado para este estudio fue el virus de gripe perteneciente al género *Influenzavirus A*, subtipo H1N1, concretamente A/WSN/33.

La línea celular empleada para su producción fue MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Estas fueron obtenidas de America Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron como se ha descrito previamente (Ortín et al., 1980)

2. Métodos

2.1. Técnicas virológicas

Para la producción del virus A/WSN/33, monocapas de células MDCK fueron infectadas a una alta multiplicidad de 10^3 unidades formadoras de placa (UFC) por célula. Posteriormente, se incubaron las placas durante 36-48 horas a 37°C. Cuando el efecto citopático fue del 50% se recogió el sobrenadante y centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se guarda este sobrenadante a -80 °C hasta su utilización.

El ensayo de placa fue llevado a cabo en las células MDCK como se ha descrito previamente (Ortín et al., 1980)

2.2 Técnicas bioquímicas

Para la purificación de los virus obtenidos en el sobrenadante de los cultivos se realizó una centrifugación en colchón de sacarosa al 33% en tampón TNE durante dos horas y media a 4°C y a una velocidad de 25.000 rpm, utilizando el rotor SW28. Se resuspendió el pellet en TNE. Se congeló y descongeló en nieve carbónica para posteriormente mantenerla toda la noche a 4°C para que se produzca una buena resuspensión de los viriones (Luytjes et al., 1989 ; Ortega et al., 2000 ; Martín-Benito et al., 2001).

Para la purificación de las RNPs nativas se procede a la lisis de los virus que han sido purificados, como se ha descrito anteriormente. Para ello, se utiliza un tampón que contiene

detergente NP40 al 1% y lisolecitina para destruir la membrana (Parvin et al., 1989); tras esta rotura de la membrana se separan las RNPs nativas por tamaños mediante una ultracentrifugación en gradiente de glicerol del 15 al 30% (Compans et al., 1972). El resultado final es una preparación que contiene las RNPs puras, fraccionadas por tamaño y listas para su observación al microscopio.

2.3. Microscopía electrónica de transmisión

Mediante microscopía electrónica de transmisión se llevó a cabo el estudio estructural de las RNPs nativas purificadas a partir de viriones así como, de las RNPs localizadas en el interior de los viriones.

La principal dificultad técnica para llevar a cabo el análisis estructural de las **RNPs nativas purificadas a partir de viriones** viene dada por la gran heterogeneidad que presentan en longitud y por su alta flexibilidad. Para superar este problema se realizó por separado el análisis estructural de la región central y el análisis de los extremos de estas RNPs.

En estos estudios los protocolos empleados fueron diferentes. Así, la región central se estudió mediante el empleo de EM convencional por tinción negativa para una estimación inicial de los parámetros de la hélice y posteriormente, mediante crio-EM para llevar a cabo la reconstrucción tridimensional. Mientras que la metodología empleada en el estudio de los extremos fue únicamente EM convencional por tinción negativa.

El análisis estructural de las **RNPs dentro de los virus** se llevó a cabo mediante el empleo de criotomografía electrónica.

2.3.1 Metodología utilizada para el análisis estructural de la región central de la RNP nativa purificada a partir de viriones

2.3.1.1 Microscopía electrónica en tinción negativa de la región central de la RNP nativa

Preparación de la muestra por tinción negativa

Se realizó la adsorción de alícuotas de 4 a 7 μ l de RNPs sobre rejillas de Cu/Rh de 400 mesh cubiertas de una fina capa de carbón depositada por evaporación. Estas rejillas fueron

sometidas previamente a una descarga iónica durante 15 segundos para hacer hidrofílica su superficie, favoreciendo así, la adsorción de la muestra.

Tras un periodo de adsorción de 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de muestra y se tiñó con una solución de acetato de uranilo al 2% p/v. A continuación, se retiró el exceso de agente de tinción y la rejilla se dejó secar al aire. (**Fig. MM1**).

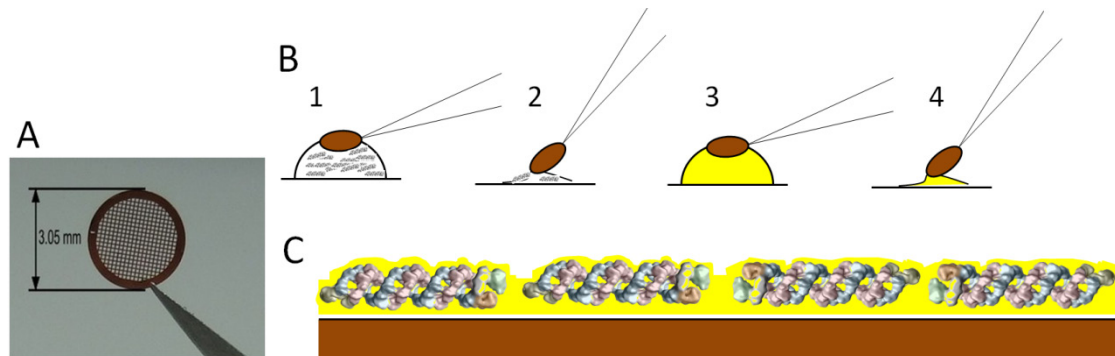


Figura MM1. Preparación de muestras para microscopía electrónica convencional por tinción negativa. (A) La muestra se introduce en el microscopio electrónico adherida a un soporte denominado rejilla, que es un círculo metálico enrejado de 3.3 mm de diámetro sobre el que se deposita por evaporación una capa de carbón, que sirve de soporte a la muestra. (B) Preparación de muestras mediante tinción negativa (1-4) (1) La rejilla se deposita sobre una gota de muestra y se incuba durante 5 minutos. (2) Se elimina el exceso de muestra con un papel de filtro sin permitir que la muestra llegue a secarse completamente. (3) Se deposita sobre una gota de sal de metal pesado, en este caso acetato de uranilo, durante 1-2 minutos (4) La rejilla se seca en un papel de filtro (C) La muestra de esta manera se ha fijado a la rejilla, y la sal de metal pesado se ha intercambiado por el agua, de tal manera que se forma un “molde” que va a proporcionar protección a la muestra estabilidad frente al vacío y a la radiación electrónica, a la vez que un mayor contraste.

La obtención de las micrografías se llevó a cabo en el microscopio FEI Tecnai G² F20 operando a 200 kV. Las imágenes fueron tomadas utilizando una cámara CCD FEI Eagle 4x4K a una magnificación nominal de x65.000, con un rango de desenfoque entre 1-2 μm y en condiciones de mínima dosis ($< 10 \text{ e}^-/\text{\AA}$) para evitar posibles daños por radiación en la muestra biológica.

Procesamiento de las imágenes de tinción negativa.

Se procedió a la corrección de la función de transferencia contraste (CTF) de las imágenes y al submuestreo de las mismas usando los protocolos implementados en el paquete XMIPP (Scheres et al., 2008 ; Sorzano et al., 2004), para un muestreo final de 4.24 $\text{\AA}/\text{pixel}$. Se seleccionó

de manera manual la parte central de las RNPs presentes en las micrografías. Un total de 9.270 imágenes (100x100 píxeles) fueron clasificadas por métodos de agrupamiento libres de patrón implementado en el paquete XMIPP (Sorzano et al., 2010). Este procedimiento clasifica y alinea las imágenes seleccionadas de las micrografías generando grupos los más homogéneos posible. El alineamiento permite llevar a cabo el promediado de cada grupo para generar una imagen media con una relación señal/ruido mucho mayor. En esta imagen es posible apreciar detalles estructurales que son indistinguibles en las imágenes originales de las micrografías, debido a que están enmascarados por el ruido de fondo.

Aquellas clases que contenían RNPs curvadas fueron descartadas y el resto de las imágenes se juntaron de nuevo para proceder a una nueva clasificación para así mejorar el resultado final. Después de esta reclasificación, se obtuvieron varios grupos con RNPs rectas que comprendían entre 600 y 900 imágenes.

Algunos de estos grupos fueron seleccionados para generar una reconstrucción tridimensional sin la aplicación de restricciones de simetría usando el paquete EMAN (Ludtke et al., 1999), y utilizando como modelo inicial un cilindro liso uniforme con un diámetro adecuado. Esta reconstrucción permitió obtener unos primeros parámetros orientativos sobre el ascenso y el ángulo entre monómeros adyacentes que se usaron como base para el refinamiento final. Este último paso se hizo usando el procedimiento conocido como Reconstrucción Helicoidal Iterativa en el Espacio Real (IHRSR, del inglés Iterative Helical Real Space Reconstruction) (Egelman, 2000), que permitió completar con éxito la reconstrucción de la estructura de tinción negativa y una estimación mucho más precisa de los parámetros de ascenso y ángulo entre monómero que luego serían empleados en la reconstrucción final por criomicroscopía.

2.3.1.2 Criomicroscopía electrónica de la región central de la RNP nativa

Preparación de la muestra por congelación

Se emplearon rejillas Cu/Rh 300 mesh Quantifoil R 2/2, recubiertas por una fina capa de carbón de ~2.5 nm. Alícuotas de 3 μ l de RNPs se aplicaron sobre estas rejillas previamente sometidas a una descarga iónica. Tras 5 minutos de adsorción, se retiró el exceso de muestra durante 1-2 segundos con papel de filtro 3M y la rejilla se vitrificó en etano líquido a -180°C empleando la unidad de criofijación Leica EM CPC (**Fig. MM2**).

Las muestras se transfirieron bajo condiciones criogénicas al microscopio FEI Tecnai G² F20 operando a 200 kV. Las imágenes fueron tomadas utilizando una cámara CCD FEI Eagle 4x4K. Se adquirieron en condiciones de mínima dosis ($<10e^{-}/\text{Å}^2$), a 0° de inclinación con subenfoques de entre 1.5 a 3.5 μm . La magnificación nominal fue de x65.000.

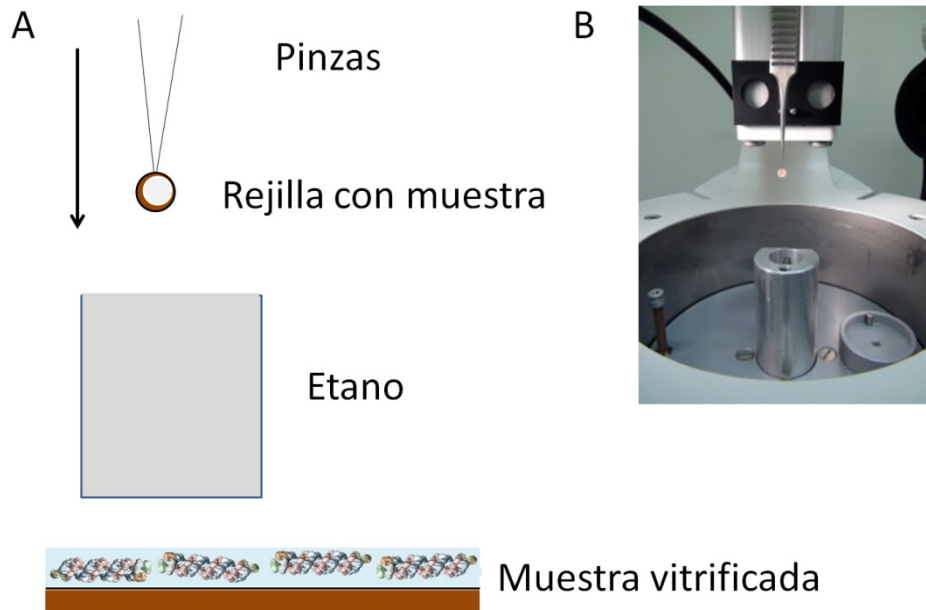


Figura MM2. Preparación de muestras vitrificadas para crió-EM y criotomografía electrónica (A) La rejilla está colocada en unas pinzas unidas a la guillotina. Se coloca la muestra y se incuba durante 1-5 minutos. Se retira el exceso con papel de filtro e inmediatamente se dispara la guillotina y la rejilla se sumerge a gran velocidad en un depósito de etano que ha sido licuado por enfriamiento con nitrógeno líquido, manteniéndolo a $\sim -180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las moléculas individuales de la muestra quedan atrapadas en una fina capa de hielo amorfo que preserva su conformación nativa. **(B)** Detalle de la unidad de vitrificación Leica EM CPC donde se observaba las pinzas con la rejilla y el depósito de etano.

Procesamiento de imagen y encaje de estructuras atómicas en los mapas finales

Se corrigió la CTF y se submuestrearon las imágenes del mismo modo que se ha descrito anteriormente, obteniendo en este caso un paso de muestreo final de $4.42\text{ Å}/\text{pixel}$. Se seleccionó de manera manual la parte central de las RNPs presentes en las micrografías. Un total de 38.408 imágenes (100×100 píxeles) fueron clasificadas para conseguir grupos de imágenes homogéneos, utilizando el mismo protocolo anteriormente descrito para tinción negativa. En este caso, y debido a que ya se habían calculado con precisión el ascenso y ángulo entre monómeros, se procedió

directamente a la reconstrucción por separado de los diferentes grupos clasificados usando el protocolo IHRSR ya descrito (Egelman, 2000). El refinamiento de los distintos grupos de imágenes daba lugar a estructuras cuasi-equivalentes, con mínimas diferencias en los parámetros de convergencia y que básicamente representan las pequeñas diferencias de unas hélices a otras debido a su alta flexibilidad. La resolución final se calculó usando el protocolo de relación espectral señal-ruido (SSNR, Spectral Signal-to-Noise Ratio) (Unser et al., 2005)

Finalmente, sobre los mapas obtenidos mediante criomicroscopía electrónica, se procedió a encajar la estructura atómica del monómero de NP (PDB 2IQH) bien manualmente, con el software UCSF-Chimera (Pettersen et al., 2004), o bien automáticamente, con el software SITUS (Wriggers, 2010), llegando al mismo resultado.

2.3.2 Metodología utilizada para el análisis estructural de los extremos de la RNP nativa purificada a partir de viriones

Se utilizaron las mismas micrografías obtenidas mediante EM en tinción negativa empleadas para la reconstrucción tridimensional de la región central, pero en este caso la selección manual fue realizada en los extremos.

Procesamiento de imagen

Se procedió a la corrección de la CTF de las imágenes y al submuestreo de las mismas usando los protocolos implementados en el paquete XMIPP (Scheres et al., 2008 ; Sorzano et al., 2004), para un muestreo final de 4.24 Å/pixel. Se seleccionaron de manera manual un total de 38.229 imágenes (64x64 píxeles). Estas imágenes fueron sometidas a varias vueltas de clasificación tridimensional usando los protocolos de máxima verosimilitud (ML3D) implementados en el paquete XMIPP (Scheres et al., 2007), utilizándose como modelo inicial un pequeño segmento de la reconstrucción tridimensional obtenida por crio-EM de la región central de las RNPs previamente filtrado a 90 Å.

De los 6 volúmenes obtenidos en esta clasificación, 2 de ellos se pudieron asignar inequívocamente al extremo donde se encuentra la polimerasa y otros dos se asignaron al extremo donde se encuentra el lazo de cierre. El resto de los volúmenes fueron descartados.

Las 11.307 imágenes que estaban asignadas a los dos volúmenes del lazo de cierre se juntaron y se refinaron usando protocolos de refinamiento angular iterativo (*projection matching*) sin aplicación de simetría para generar una estructura final de 27 Å de resolución determinada por

medio de la correlación en el espacio de Fourier (FSC, Fourier Shell Correlation) tomando el criterio de correlación de 0.3.

Por otro lado, las 16.012 imágenes asignadas a los dos volúmenes del extremo polimerasa se juntaron y se reclasificaron utilizando los protocolos ML3D anteriormente descritos. Los resultados mostraron la existencia de dos conformaciones, siendo 8.938 imágenes asignadas a uno de los grupos y 7.074 al otro, con una resolución de 21.7 Å y 20 Å respectivamente (FSC, criterio de 0.3).

Todos los gráficos y figuras fueron generados con UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

2.3.3 Metodología utilizada para el análisis estructural de la RNP localizada en el interior de los viriones

El análisis se llevó a cabo mediante el empleo de **criotomografía electrónica**.

El método de preparación de la muestra fue el mismo que para crio-EM. Se emplearon alícuotas de viriones purificados a las cuales se añadió proteína A conjugada con oro 10 nm BBInternational a una dilución 1:10 como marcador para facilitar el alineamiento posterior de los tomogramas. Las rejillas vitrificadas fueron transferidas bajo condiciones criogénicas al microscopio FEI Tecnai G² F20 operando a 200 kV. Para la adquisición de las series tomográficas se utilizó una cámara CCD FEI Eagle 4K usando el programa FEI Xplore3D. La magnificación nominal empleada fue x65.000 y el desenfoque de aproximadamente 5 µm siendo la dosis total acumulada de 90 a 120 e⁻/Å².

Procesamiento de imagen

Las imágenes fueron submuestreadas con un factor de 2 para un muestreo final de 4.6 Å/pixel y posteriormente, se alinearon usando el programa IMOD (Kremer et al., 1996). Se corrigió la CTF de las series tomográficas utilizando el programa TOMOCTF (Fernandez et al., 2006). Un total de 21 tomogramas se reconstruyeron usando los algoritmos de retroproyección sopesada (WBP, Weighted Backprojection) implementados en el paquete TOMO3D (Agulleiro & Fernandez, 2011). La resolución alcanzada en los tomogramas oscilaba 39 y 41Å, de acuerdo con FSC_{0.5} criteria (Cardone et al., 2005)

Promedio de los subtomogramas

Dieciocho viriones presentes en los tomogramas que mostraban segmentos de RNPs evidentes fueron manualmente seleccionados y extraídos de los tomogramas generales usando el programa IMOD. Dentro de esos viriones, 814 subvolúmenes que contenían RNPs claramente perceptibles fueron seleccionados manualmente. Las coordenadas que indicaban la posición de esos subvolúmenes fueron utilizadas como datos de entrada en el programa Jsubtomo (Huiskonen et al., 2010) para alinear y promediar dichos subvolúmenes, usando un cilindro hueco como modelo inicial. El volumen medio final se obtuvo con los 288 subvolúmenes que mostraban un coeficiente de correlación cruzada por encima del valor medio y un máximo solapamiento del 90%.

Finalmente, se determinaron los parámetros de simetría usando el programa Xhelicals (Egelman, 2000) y los valores obtenidos fueron de -64° para el ángulo y 28.5 \AA para el ascenso entre monómero, valores que concuerdan con los obtenidos con la reconstrucción tridimensional de la hélice. Estos valores fueron aplicados al volumen medio usando el programa Himpose (Egelman, 2000) para generar el volumen final.

La visualización y la segmentación de los volúmenes fue realizada con Amira <http://www.vsg3d.com/amira/overview>, IMOD (Kremer et al., 1996) y UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

RESULTADOS

1. Reconstrucción tridimensional de las RNPs nativas. Problemas asociados.

Conocida la organización básica de la RNP recombinante, (Martin-Benito et al., 2001 ; Coloma et al., 2009) el reto científico planteado en esta tesis fue la determinación de la estructura de las RNPs nativas del virus de la gripe.

Las RNPs virales son macromoléculas helicoidales superenrolladas que presentan una gran flexibilidad así como una gran heterogeneidad en longitud (**Fig. R1**) (Compans et al., 1972 ; Pons & Hirst, 1969). En los estudios estructurales, tanto flexibilidad como heterogeneidad, representan un serio obstáculo ya que impiden la cristalización o la obtención de imágenes de microscopía que se puedan alinear correctamente para determinar la estructura. Así, los principales retos planteados en este proyecto venían dados por: 1) Las RNPs son estructuras de diferente tamaño, su masa molecular varía de aproximadamente 2 a 6 MDa. Suponiendo que fueran estructuras helicoidales perfectas, su longitud oscilaría aproximadamente entre 45 y 120 nm; 2) Las RNPs son muy flexibles, y en la mayoría de los casos presentan estructuras con diferente curvatura; y 3) Adicionalmente, podría existir la posibilidad de que hubiera conformaciones diferentes en alguno de sus componentes.

Si se extraen las imágenes de las RNPs presentes en las micrografías, se obtiene una galería como la que se muestra en la **Fig. R2 A**. En ella se aprecia la heterogeneidad de las partículas y se hace claro la práctica imposibilidad de alinearlas.

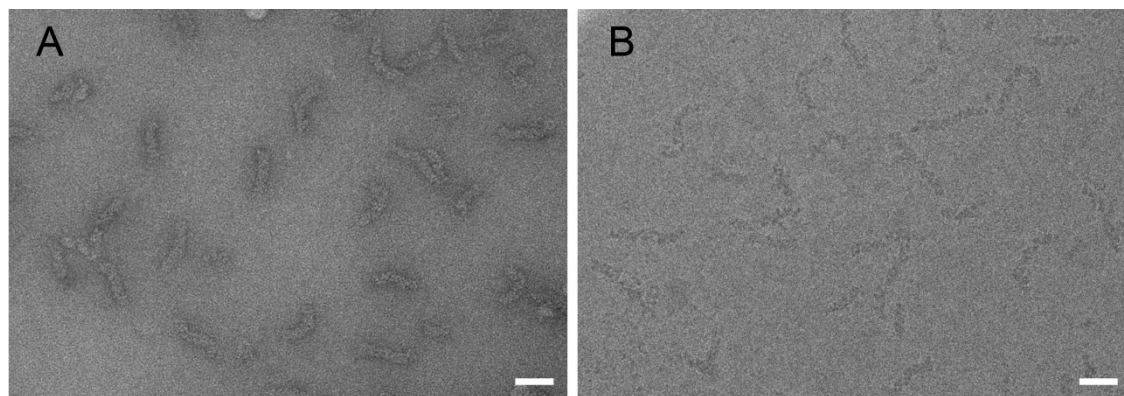


Figura R1. Micrografías de RNPs nativas del virus de la gripe. (A) Micrografía donde se observan las RNPs nativas que han sido teñidas negativamente. **(B)** Micrografía donde se visualizan las RNPs nativas que han sido vitrificadas y posteriormente analizadas por criomicroscopía electrónica. La barra de escala representa 250 Å.

De hecho, aunque el problema de heterogeneidad de longitud se podría eliminar mediante la clasificación y promediado de imágenes de un único tamaño, debido a su flexibilidad, lo que se obtiene son medias bidimensionales de baja resolución. Los ejemplos mostrados en la **Fig. R2 B** pertenecen a dos poblaciones homogéneas, compuestas por unas decenas de imágenes, obtenidas a partir de un grupo inicial de más de 14.000 partículas.

Por tanto, y dada la dificultad del estudio por las características que presentaba la muestra se hace necesario diseñar una aproximación metodológica capaz de solucionar todos estos problemas. Así, se decidió analizar de forma separada la parte central y la parte de los extremos de las RNPs según se indica en los cuadros marcados en la **Fig. R2 A**. Este sistema presentaba múltiples ventajas: 1) Al dividir la RNP en segmentos no importa la longitud que tenga ésta; 2) Trabajar con imágenes más pequeñas disminuye la probabilidad de que estén curvadas; y 3) Al estudiar por separado las regiones que no tienen simetría (los extremos) de las zonas que sí tienen (la parte central), será posible el empleo de la metodología de reconstrucción helicoidal en esta última región.

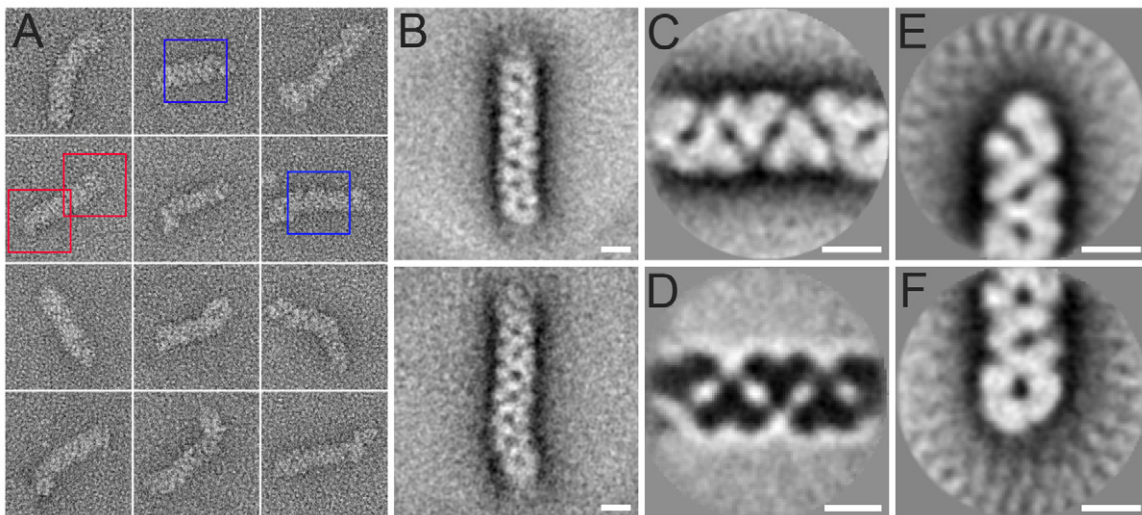


Figura R2. Análisis bidimensional de las RNPs del virus de la gripe. (A) Galería de imágenes de las RNPs nativas del virus de la gripe obtenidas a partir de muestras teñidas negativamente. Los cuadrados azules y rojos muestran las áreas extraídas de las imágenes que han sido utilizadas para el procesamiento de la región helicoidal y de las regiones de los extremos, respectivamente. (B) Medias bidimensionales de RNPs completas obtenidas después de una clasificación de un conjunto de 14.089 imágenes de muestras teñidas negativamente (C) Media bidimensional obtenida a partir de imágenes de muestras teñidas negativamente que corresponde a la región central de las RNPs. (D) Media bidimensional obtenida a partir de muestras vitrificadas que corresponde con la región central de las RNPs. (E y F) Medias bidimensionales de muestras teñidas negativamente donde se muestran los extremos que contienen la polimerasa y el lazo de cierre de la RNP, respectivamente. La barra de escala representa 100 Å.

Esta metodología de trabajo rápidamente mostró sus ventajas generando imágenes promedio de mucha mayor calidad. Las imágenes medias de la región central, como se esperaba, eran compatibles con una estructura helicoidal (**Fig. R2 C y D**), mientras que las imágenes medias de los extremos sugerían dos posibles estructuras, una de las cuales podría contener una masa adicional correspondiente al complejo polimerasa (**Fig. R2 E**) y la otra podría corresponder al lazo de cierre de la RNP (**Fig. R2 D**). Es necesario señalar que estas estructuras no eran visibles en la media de la RNP completa debido a los problemas anteriormente mencionados (**Fig. R2 B**). La yuxtaposición de las dos medias de los extremos (**Fig. R2 E y F**), se asemejaría a una RNP completa con mucha mayor definición (**comparar con Fig. R2 B**).

2. Estructura tridimensional de la región helicoidal de las RNPs nativas

En los casos en los que la heterogeneidad de la muestra es tan elevada, la clasificación de las imágenes para la obtención de grupos homogéneos resulta crucial para una correcta reconstrucción tridimensional. La calidad y fiabilidad de la clasificación depende de la relación señal/ruido de las imágenes, por eso en este caso, se decidió comenzar por hacer un análisis completo de clasificación y reconstrucción tridimensional usando imágenes de tinción negativa que tiene una mayor relación señal/ruido respecto a las imágenes de criomicroscopía. Una vez ese proceso estuviera completo, los parámetros de simetría obtenidos podrían ser usados en la reconstrucción tridimensional utilizando imágenes de criomicroscopía electrónica ya que éstas permiten obtener una reconstrucción más fidedigna de la estructura y alcanzar mayor resolución.

De este modo, el primer paso llevado a cabo fue la optimización del protocolo de tinción negativa para esta muestra en concreto. Después de múltiples ensayos se determinó que los mejores resultados se obtenían en las siguientes condiciones: 1) Preparación de las rejillas inmediatamente tras terminar el proceso de purificación, evitándose así posibles degradaciones. 2) Alargar el tiempo de incubación de la muestra en la rejilla, esto producía una mayor adherencia de la muestra aumentando el número de partícula por placa. Y 3) Eliminar el detergente presente en la muestra tras la purificación lo que producía de manera muy notable un aumento del contraste de la muestra que mejoraba la calidad de las imágenes (**Fig. R1 A**).

Además de la optimización este protocolo, se examinaron distintas purificaciones hasta obtener unas preparaciones donde la calidad y la concentración de la muestra eran óptimas para el estudio. Aquellas muestras seleccionadas fueron vitrificadas para su posterior análisis.

El protocolo de vitricación de la muestra también fue modificado respecto al protocolo habitual utilizado en nuestro laboratorio. Se emplearon las misma rejillas Quantifoil R 2/2 pero en

éstas se depositó una fina capa de carbón de ~2.5 nm. El resultado de esta modificación mejoró considerablemente la visualización de las muestras, así como, la obtención de vistas laterales de las RNPs que, en el caso de estructuras con simetría helicoidal, facilita el procesamiento de las imágenes (**Fig. R2 B**).

2.1 Análisis estructural tridimensional de la región central de las RNPs nativas por tinción negativa

Se tomaron micrografías usando la cámara CCD del microscopio FEI Tecnai G² F20 que fueron submuestreadas y corregidas sus CTFs como se indica en Material y Métodos. De ellas se extrajeron un total de 9.270 imágenes de la región central de las RNPs, que fueron sometidas a un proceso alineamiento y clasificación libre de patrón, utilizando el protocolo CL2D implementado en el paquete de XMIPP (Sorzano et al., 2010) (**Fig. R3**). Esta estrategia de procesamiento agrupa imágenes similares dentro de una misma clase, utilizando exclusivamente la información de los propios datos y sin emplear referencia previa alguna. De este modo, se obtuvieron las medias bidimensionales de grupos de imágenes homogéneos mejorando la señal/ruido y haciendo posible la visualización de las características estructurales de la muestra. En la **Fig. R3** se muestran algunos ejemplos de esas clases.

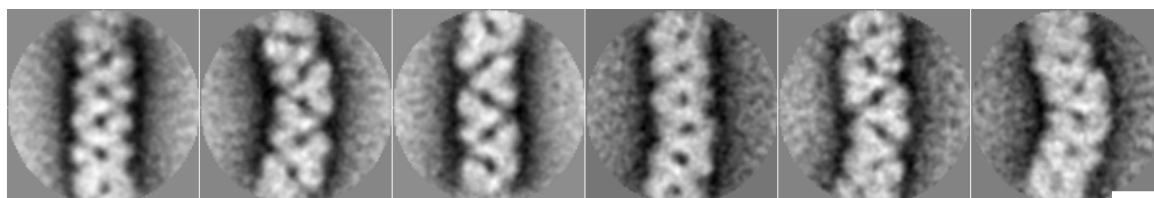


Figura R3. Análisis bidimensional de la región central de las RNPs nativas del virus de la gripe teñidas negativamente. Galería que muestra como ejemplo seis de las clases obtenidas a partir del protocolo CL2D. En ella se aprecia la flexibilidad estructural de esta muestra apareciendo RNPs que están rectas y otras clases donde están curvadas. La barra de escala representa 100 Å.

Estas medias revelaron la existencia de grupos homogéneos de RNPs rectas y también otros grupos que mostraban RNPs curvadas. Estos últimos fueron eliminados y se volvió a realizar una clasificación utilizando únicamente los grupos de RNPs rectas mejorando así la clasificación final. Los grupos finales se componían de unas 600 a 900 imágenes cada uno y los mejores de ellos fueron seleccionados para proceder a realizar la reconstrucción tridimensional.

Debido a la flexibilidad de esta muestra, y al pequeño tamaño de las imágenes que se empleó para evitar en la medida de lo posible la curvatura, es imposible la utilización de los

métodos clásicos de Fourier-Bessel para la reconstrucción tridimensional de estructuras helicoidales. En ese tipo de métodos no es necesario ningún conocimiento previo sobre la hélice para determinar su estructura ya que todos los datos se pueden obtener de la transformada de Fourier de las imágenes. En el caso que nos ocupa tales protocolos son inviables y por eso se debió recurrir al procedimiento conocido como Reconstrucción Helicoidal Iterativa en el Espacio Real (IHRSR, del inglés *Iterative Helical Real Space Reconstruction*) (Egelman, 2000). No obstante, para llevar a cabo este último procedimiento es imprescindible una estimación previa aproximada de los parámetros fundamentales de la simetría helicoidal, que son el ascenso por monómero en la dirección del eje z y el ángulo ϕ existente entre dos monómeros consecutivos en la hélice (**Fig. R4 A**).

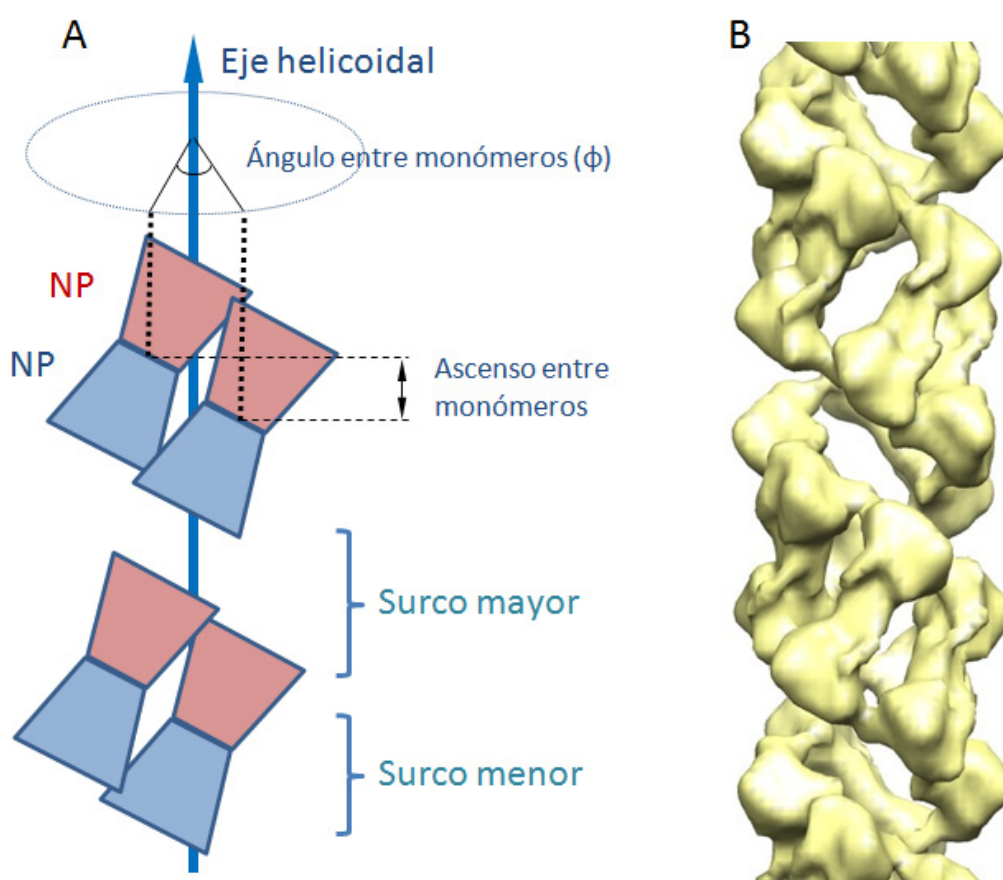


Figura R4. Estructura tridimensional de la región central de las RNPs nativas del virus de la gripe resuelta por tinción negativa. (A) Esquema de la doble hélice donde se representan en color azul y rosa monómeros de distintas cadenas con polaridad opuesta y la posición del surco mayor y menor de la hélice. También se muestra un diagrama describiendo los parámetros que definen una hélice, el ángulo ϕ entre monómeros y el ascenso por monómero. (B) La estructura es una doble hélice formada por dos cadenas de NP de polaridad opuesta. Se observan las uniones entre los monómeros de NP de la misma cadena así como, las conexiones entre los monómeros de distinta cadena.

Para solucionar este problema y obtener una primera estimación de dichos parámetros se tomaron los grupos de imágenes homogéneas y se realizaron reconstrucciones tridimensionales sin la imposición de ninguna simetría usando el software EMAN (Ludtke et al., 1999). En este caso, se utilizó como modelo inicial de referencia un cilindro hueco uniforme de 120 Å de diámetro. Este procedimiento generó estructuras de muy baja resolución pero que permitieron determinar que los parámetros helicoidales de la RNP se encontraban entre unos valores de unos 25 a 30 Å de ascenso por monómero y un ángulo de unos 50-60°. Conocidos estos parámetros ya fue posible continuar el refinamiento utilizando el protocolo IHRSR.

El resultado final fue una doble hélice a 22 Å de resolución, según el criterio 0.3 en la FSC, que presentaba dos cadenas formadas por NPs de polaridad opuesta, definiendo un surco mayor y otro menor, así como, una interacción intracadena NP-NP y otra conexión dimérica NP-NP intercadena (**Fig. R4 B**).

2.2 Análisis estructural tridimensional de la región central de las RNPS nativas por criomicroscopía electrónica.

Una vez determinados los parámetros de simetría helicoidal, y con el fin de aumentar la calidad y resolución de la estructura, se procedió a la reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de criomicroscopía. Este tipo de microscopía permite alcanzar mayor resolución debido a que las imágenes obtenidas son una proyección directa del potencial de los átomos que componen molécula, mientras que en el caso de tinción negativa, el colorante muestra realmente un “molde” de la estructura y la resolución está limitada por el tamaño del grano del agente de tinción.

Un total de 38.408 imágenes fueron seleccionadas manualmente y extraídas de las micrografías realizadas en el microscopio FEI Tecnai G² F20. Estas imágenes se clasificaron de manera análoga al caso de tinción negativa, obteniéndose los grupos mostrados en la **Fig. R5**.

Se seleccionaron los grupos de RNPs rectas, que contenían aproximadamente entre 500 y 900 imágenes cada uno, y se procedió a su reconstrucción tridimensional por separado. En esta paso, el conocimiento previo de los parámetros helicoidales determinados mediante las reconstrucciones de tinción negativa, permitió una rápida obtención de las estructuras correctas siguiendo el protocolo IHRSR (Egelman, 2000), mostrando una excelente reproducibilidad.

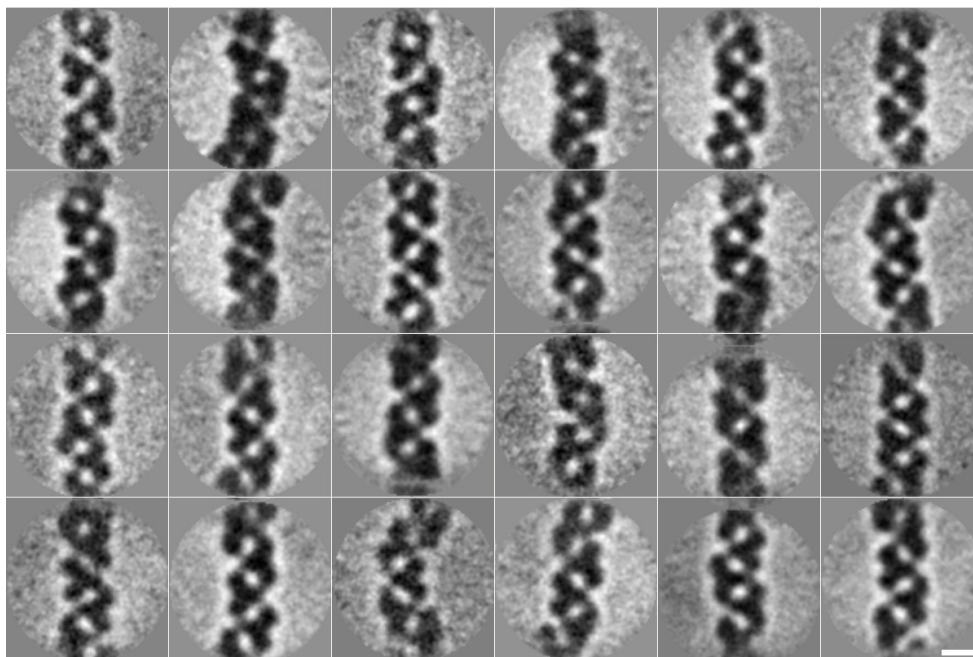


Figura R5. Galería de medias bidimensionales mostrando algunos de los grupos obtenidos con la clasificación de imágenes de RNPs nativas vitrificadas. Se muestra medias donde las RNPs están curvadas y medias donde están rectas. La barra de escala representa 100 Å.

El protocolo de reconstrucción helicoidal parte un grupo homogéneo de imágenes en los que la hélice ha sido previamente colocada verticalmente (como se muestra en las galerías de las **Fig. R3 o R5**). Para evitar la introducción de ningún tipo de sesgo inicial en la reconstrucción tridimensional, el primer paso es una asignación aleatoria de ángulos de refinamiento a las imágenes, seguido de una reconstrucción preliminar y la aplicación de los parámetros de simetría previamente estimados, lo que genera un volumen helicoidal, aunque de aspecto prácticamente cilíndrico, de diámetro igual a la estructura real pero sin ningún detalle (**Fig. R6**). De este volumen de referencia 0 se obtienen sus proyecciones teóricas y se realiza un primer ciclo de refinamiento en el que las imágenes experimentales se comparan con esas proyecciones para realizar una primera asignación angular y una nueva reconstrucción tridimensional. Terminada esta primera reconstrucción un programa realiza una búsqueda de simetría alrededor de los parámetros iniciales suministrados, que en el caso que nos ocupa se realizó entre $\pm 5^\circ$ del ángulo estimado y ± 2 Å del ascenso por monómero, y se aplica la simetría encontrada al volumen calculado. Es aquí necesario explicar que la idea subyacente que hace converger el refinamiento a la estructura correcta es la aplicación de simetría. Veamos, debido a que este primer refinamiento se realiza usando como modelo una hélice sin detalles generada de manera aleatoria la mayoría de las imágenes tiene asignado un ángulo erróneo; no obstante, esta hélice tiene aplicados unos parámetros de simetría que son aproximadamente los correctos, lo que hace que exista un número

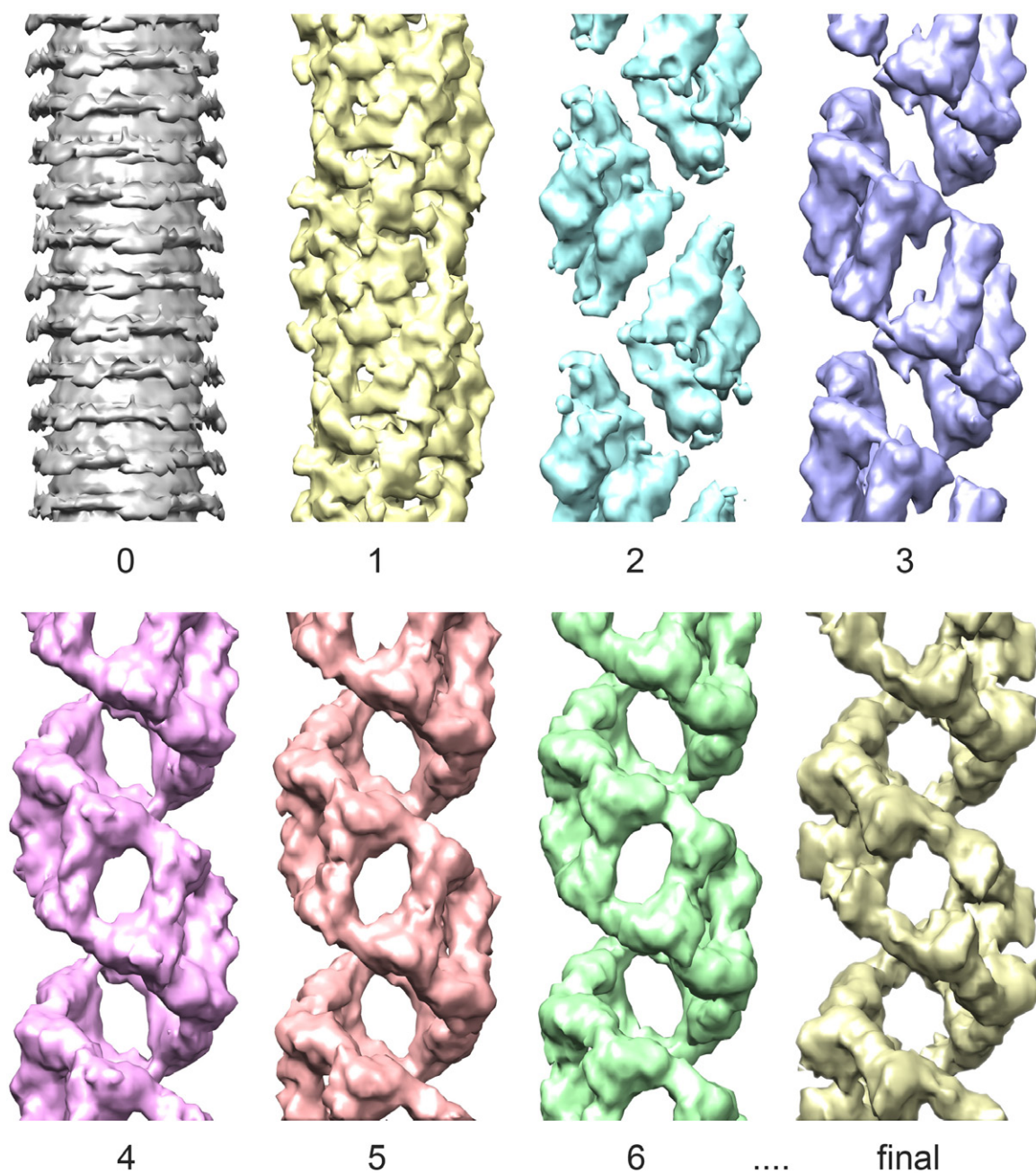


Figura R6. Refinamiento usando el protocolo de Reconstrucción Helicoidal Iterativa en el Espacio Real (IHRSR; Egelman, 2000). Se muestran la evolución de los volúmenes obtenidos en las distintas iteraciones partiendo desde el volumen inicial (0), que se genera mediante la asignación de ángulos arbitrarios al set de imágenes para evitar introducir sesgo en la reconstrucción, hasta la obtención del volumen final. Se aprecia que la convergencia al volumen final es muy rápida, alcanzando en el volumen 6 una estructura donde las principales características ya se encuentran claramente definidas. El motivo de esta convergencia es la homogeneidad de las imágenes, la buena estimación previa de los parámetros de simetría y la robustez del protocolo.

de imágenes que, aunque muy reducido ($\sim >1\%$), tienen sus ángulos correctamente asignados. La aplicación de la simetría sobre el volumen generado por todas imágenes hace que esas pocas que tienen sus ángulos correctamente asignados refuercen su señal, mientras que las que no lo tienen su señal se debilita por no ser coincidente con la simetría helicoidal. Este “refuerzo” de las asignaciones correctas y “debilitamiento” de las incorrectas hace que en muy pocas iteraciones empiecen a aparecer las características reales de la estructura, ya que el número de asignaciones correctas crece rápidamente. Así, en la **Fig. R6** se aprecia que en la iteración 2 ya aparecen estructuras que recuerdan las proyecciones en forma de corazón características de las **Fig. R3 y R5** y ya en la iteración 6 la estructura se encuentra muy próxima a la solución final. Es por este motivo que la correcta estimación inicial de los parámetros de simetría tiene una importancia crucial. También hay que señalar que el protocolo realiza en cada iteración una búsqueda de la simetría más correcta, dentro de un rango relativamente pequeño, ajustando los parámetros ligeramente a lo largo de refinamiento para mejorar la calidad final de la reconstrucción.

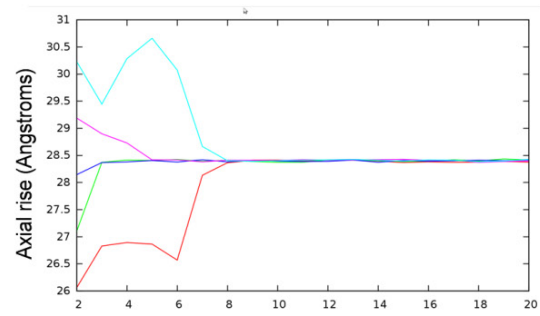
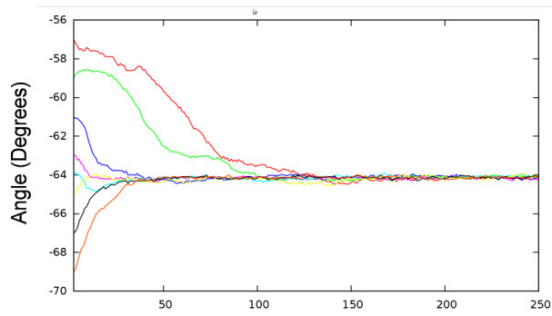
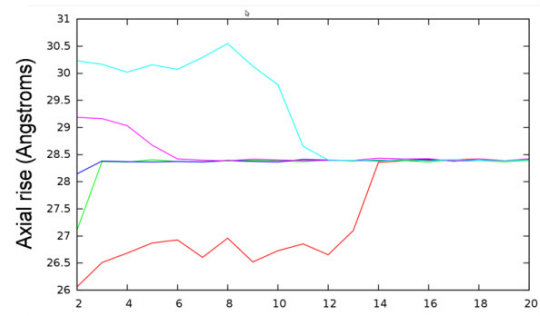
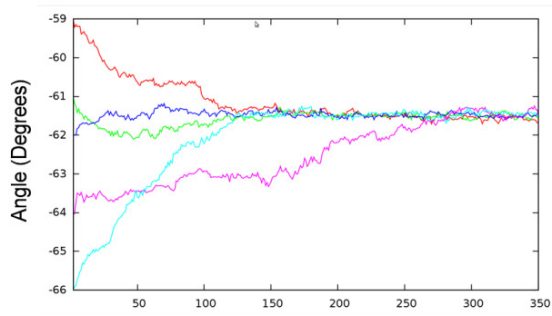
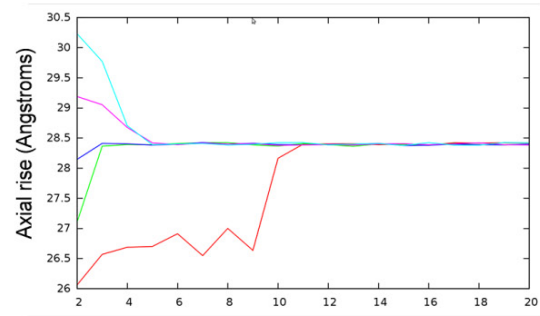
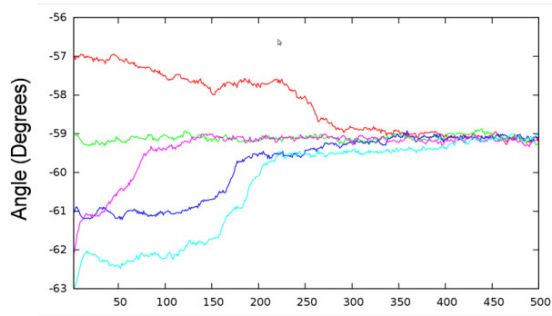
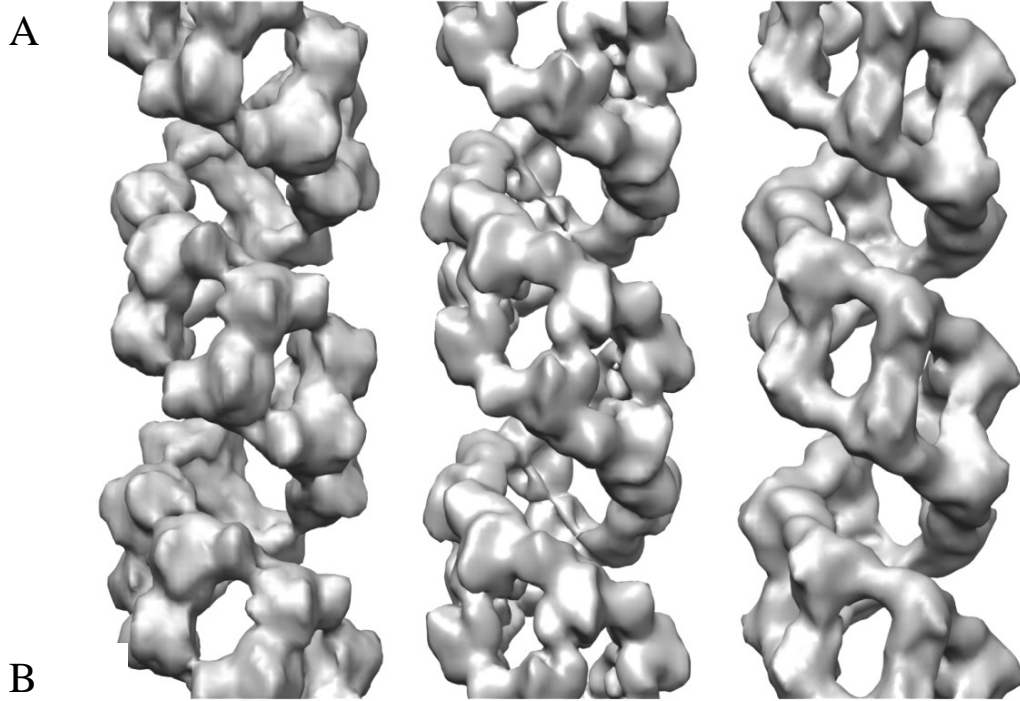
Con todos estos datos, y para probar la reproducibilidad del refinamiento y la fiabilidad de la reconstrucción final, se hicieron múltiples ensayos para cada grupo de RNPs rectas, partiendo de parámetros iniciales ligeramente diferentes. En la **Fig. R7** se muestra como ejemplo la convergencia de tres grupos de imágenes rectas obtenidas tras la clasificación mostrada en la **Fig. R5**. Como se aprecia, aunque se parta de diferentes estimaciones iniciales valores de ángulo (dentro de un rango aproximado de $\pm 5^\circ$ del valor correcto) y ascenso entre monómeros (dentro de un rango de $\pm 2\text{Å}$), al cabo de un determinado número de iteraciones cada grupo acaba convergiendo hacia su valor concreto. La convergencia de todos los refinamientos de un mismo grupo de RNPs, independientemente del valor inicial de simetría dado, hacia una estructura única mostró la robustez de las reconstrucciones.

El análisis en conjunto del comportamiento de los parámetros de simetría de los diferentes grupos de RNPs rectas condujo a varias conclusiones:

1) La estructura de las RNPs no es única, si no que puede variar dentro de un cierto rango de parámetros. Así, el ángulo existente entre monómeros consecutivos de la hélice varía entre -57° y -64° . Este dato está en concordancia con la extrema flexibilidad que la estructura muestra de manera natural. No obstante, todas las reconstrucciones alcanzadas responden a estructuras totalmente equivalentes.

2) Sorprendentemente, y a pesar de la variabilidad que existe en el ángulo, el parámetro correspondiente al ascenso por monómero se mantiene absolutamente constante en todos los grupos analizados (28.4 Å). Esto indica que algo inherente a la estructura hace que este dato permanezca invariable. Comportamientos similares con variabilidad en el ángulo entre monómeros pero constancia en el ascenso por monómero se han encontrado en otras estructuras polímero helicoidales como los filamentos de actina.

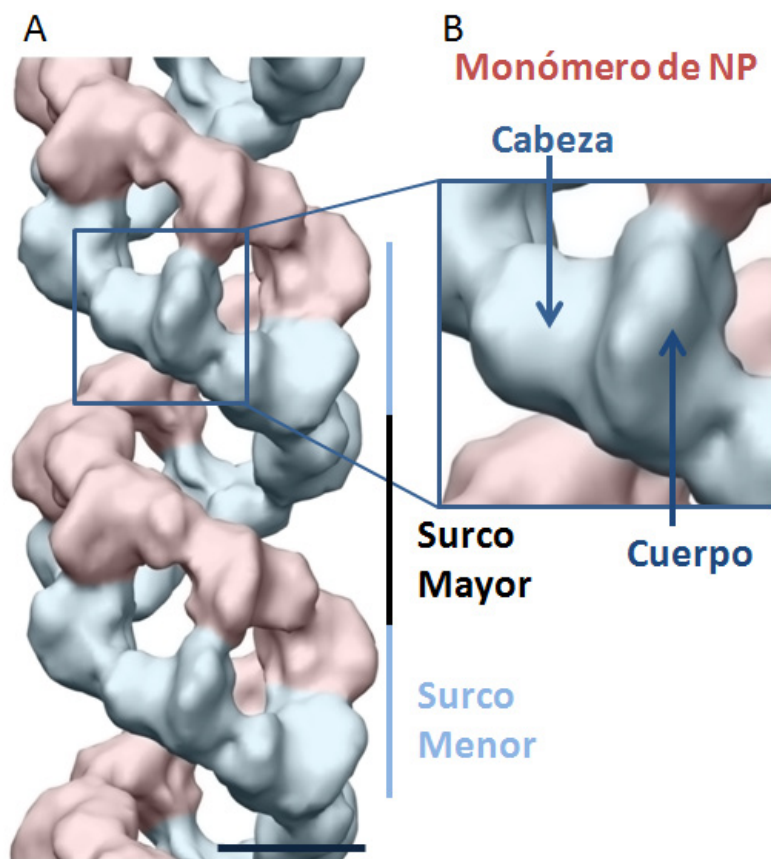
Resultados



3) Desde el punto de vista metodológico se comprobó que durante el refinamiento, la convergencia de las estructuras se ve mucho más afectada por errores en la estimación inicial del parámetro de ascenso por monómero que en la del ángulo. Así, para un grupo cualquiera se alcanzaba siempre convergencia a una estructura correcta si se ponía un valor inicial de ángulo de $\pm 5^\circ$ respecto del correcto, en algunos casos de hasta $\pm 8^\circ$, mientras que el error en el valor inicial del parámetro de ascenso por monómero no podía ser superior a $\pm 2.5 \text{ \AA}$. Así mismo, la convergencia en el ascenso por monómero es mucho más rápida que la convergencia en el ángulo. De manera que, en el caso del ascenso convergen en sólo 15 o 20 iteraciones de refinamiento, mientras que la convergencia en el ángulo no se alcanza hasta al menos 400 iteraciones dependiendo del grupo de imágenes seleccionado.

La estructura tridimensional obtenida por crió-EM, al igual que la analizada por tinción negativa, mostraba una doble hélice definida por un surco menor, formado por las cadenas ascendente y descendente de NPs conectadas, y un surco mayor, correspondiente al espacio presente entre las cadenas que no se encuentran en contacto directo (**Fig. R8 A**). El ángulo entre monómeros hace que el número de NPs por vuelta sea de aproximadamente 12, 6 pertenecientes a la cadena ascendente y 6 a la descendente. La resolución final obtenida en todas las reconstrucciones fue similar y estaba comprendida entre 16 y 20 \AA . Con esta resolución, se define claramente la estructura de los monómeros de NP compuesta por los dominios cabeza y cuerpo como se muestra en la **Fig. R8 B**.

Figura R7. Estructura tridimensional de la región central de las RNPs nativas del virus de la gripe resuelta por tinción negativa (A) Muestra las estructuras tridimensionales obtenidas a partir de los refinamientos de 3 diferentes grupos de RNPs rectas (B) Curvas de convergencia del ángulo, columna izquierda, y del ascenso entre monómeros, columna derecha, obtenidas por el protocolo de refinamiento IHRSR. El programa partiendo de los parámetros iniciales de simetría dados por el usuario, realiza en cada iteración una estimación más precisa del valor real de simetría que tiene la estructura. Si las imágenes forman un grupo lo suficientemente homogéneo, ese valor va evolucionando hasta alcanzar el valor exacto que corresponde a la estructura de las RNPs pertenecientes al grupo. Que el valor de convergencia del ángulo sea negativo, -59.2° , -61.5° y -64° , significa que se trata de una hélice levógira.



2.3 Ajuste de la estructura atómica de la NP en la estructura tridimensional helicoidal de la RNP nativa

La estructura atómica de la NP, libre de RNA, ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X (Ye et al., 2006). El ajuste de estas estructuras dentro de los mapas de microscopía electrónica permite no sólo obtener datos de interés biológico, sino también sirve como método de validación adicional y para la determinación de la mano absoluta de los datos de microscopía. Así, por ejemplo, la estructura de la NP fue encajada en la reconstrucción tridimensional de la RNP recombinante obtenida por cri-EM (**Fig. I10**) (Coloma et al., 2009), permitiendo obtener importante información sobre la organización de la molécula. Por tanto, y para ahondar en la interpretación de la reconstrucción, también se realizó el ajuste de la estructura de NP (PDB 2IQH; (Ye et al., 2006)) en la estructura helicoidal (**Fig. R9**). Este ajuste se llevó a cabo tanto manualmente con UCSF-Chimera (Pettersen et al., 2004), como con automáticamente con SITUS (Wriggers, 2010), rindiendo ambos el mismo resultado.

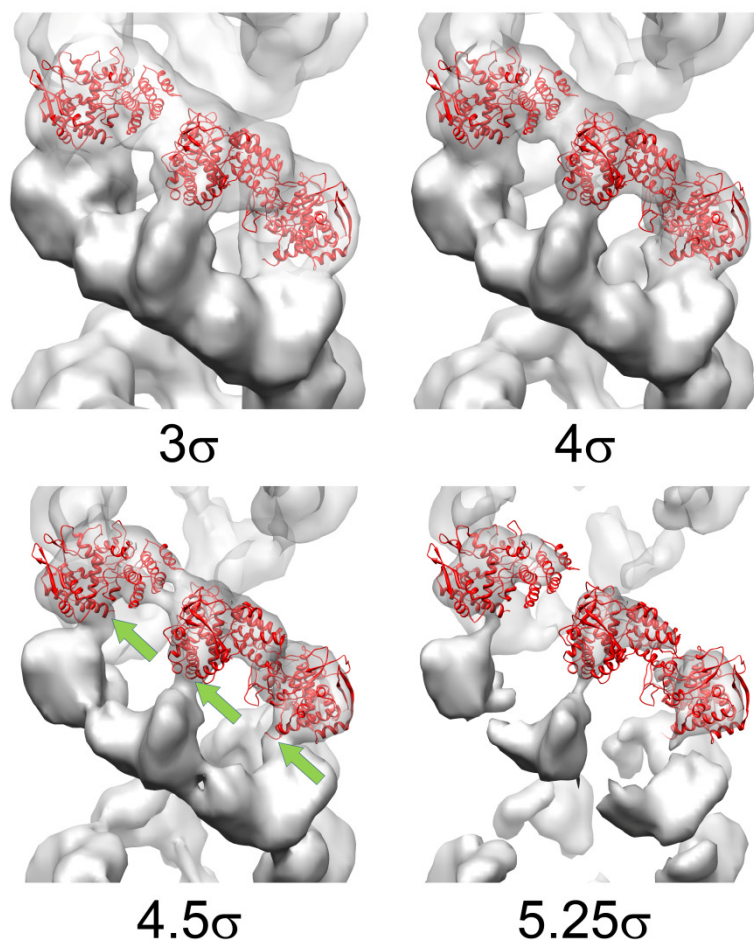


Figura R9. Ajuste de la estructura atómica de la NP en la estructura resuelta por crio-EM. Ajuste del monómero de NP (PDB 2IQH) dentro del mapa de densidad de EM. El mapa se representa en diferentes umbrales, desde 3 a 5.25 veces la desviación estándar de los valores del mapa (σ), para mostrar la fiabilidad del ajuste. Las flechas verdes en el panel 4.5 σ señalan la posición del primer aminoácido del extremo N terminal de la estructura atómica, en concreto ASN 21.

Como resultado, se obtuvo un buen ajuste, con el dominio de la cabeza de cada monómero hacia el surco mayor de la hélice y las regiones N-terminal de la proteína contactando unas con otras en el surco menor. De hecho, una densidad extra aparecía en la conexión NP-NP intercadena que podría pertenecer a los primeros 22 aminoácidos de la NP que no están representados en la estructura cristalina (Ye et al., 2006) (**Fig. R10 A**). En la interacción NP-NP intracadena el lazo intermolecular de la proteína (segmento 402-428) podría estar insertado en el cuerpo de la NP vecina como se indica en la **Fig. R10 B**, de la misma forma que se propuso anteriormente tanto en la formación del trímero cristalográfico (**Fig. I4**) (Ye et al., 2006) como en la estructura de la RNP recombinante (Coloma et al., 2009). Es necesario destacar que las distancias existentes entre el lazo intermolecular y el cuerpo de la NP son compatibles con la extensión de las cadenas de aminoácidos. Concretamente, las distancias que obtenemos en el ajuste son: 25 Å para los 19 aminoácidos comprendidos entre PRO 419 y SER 438 y de 41 Å para los 13 aminoácidos comprendidos entre ASN 395 e ILE 408. Si la distancia entre aminoácidos en una cadena polipeptídica corresponde a unos 3.3 Å, la distancia máxima en el caso de 19 aminoácidos sería de 63 Å, mientras que en la estructura hay 25 Å, de manera que esos aminoácidos pueden estar plegados de algún modo. Por otro lado, en el caso los 13 aminoácidos

la distancia máxima sería de 43 Å, correspondiéndose perfectamente con la extensión de 41 Å que tienen en el ajuste. Además, esta estrecha correspondencia podría explicar porqué el ascenso entre monómeros se encuentra conservado en todas las estructuras determinadas en este trabajo.

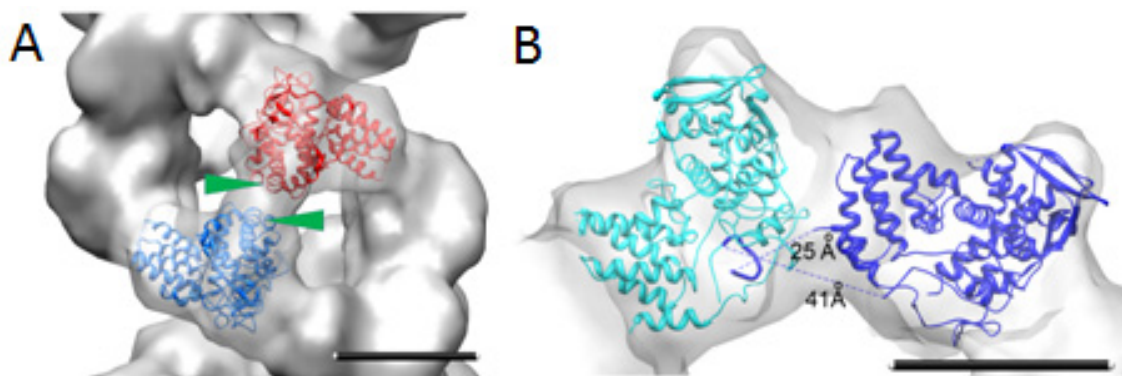


Figura R10. Ajuste de la estructura atómica de los monómeros de NP en la RNP nativa. (A) Ajuste de dos monómeros mostrando la conexión intercadena. Las flechas verdes indican la localización del aminoácido 21 en las estructuras atómicas. El exceso de masa localizada entre ambas flechas verdes podría corresponder con los 22 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de cada monómero no resueltos en el cristal del monómero de NP (B) Ajuste de dos monómeros de NP mostrando la conexión intracadena. El monómero azul oscuro presenta su lazo intermolecular en el interior del cuerpo del otro monómero representado en azul claro. También figuran las distancias entre el PRO 419-SER 438 de 25Å y ASN 395-ILE 408 de 48Å. El PDB utilizado es 2IQH (Ye et al., 2006). La barra de escala representa 50 Å.

Por último, hay que señalar que la alta flexibilidad de lazo intermolecular permite una gran variedad de disposiciones entre monómeros de NP, como las presentes en las estructuras cristalinas (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006), en multímeros (Ruigrok & Baudin, 1995), en la RNP recombinante (Coloma et al., 2009) y en la RNP nativa aquí descrita.

3. Estructuras tridimensionales de los extremos de las RNPs nativas

El análisis de los extremos fue realizado mediante microscopía electrónica por tinción negativa. Un total de 38.229 imágenes fueron seleccionadas manualmente sobre los extremos de las RNPs. Visualmente, aunque la tinción negativa nos permitía obtener un buen contraste no era posible la distinción entre el extremo del lazo de cierre y el extremo de la polimerasa, por lo que se seleccionaron ambos extremos de las RNPs (cuadros rojos Fig. R2 A).

Estas imágenes fueron extraídas a un tamaño de 64x64 píxeles y posteriormente fueron alineadas y clasificadas. Este paso se llevó a cabo de manera similar al empleado en la parte central de la RNP mediante la utilización de algoritmos de alineamiento y clasificación libre de patrón (CL2D) implementado en el paquete de XMIPP (**Fig. R11**) (Sorzano et al., 2010). Se obtuvieron medias en las cuales algunas veces fue posible distinguir entre el extremo de la polimerasa y el extremo del cierre (**Fig. R2 E y F**). Sin embargo, en la mayoría de los casos tales diferencias no se podían determinar de manera tan clara. **Fig. R11**.

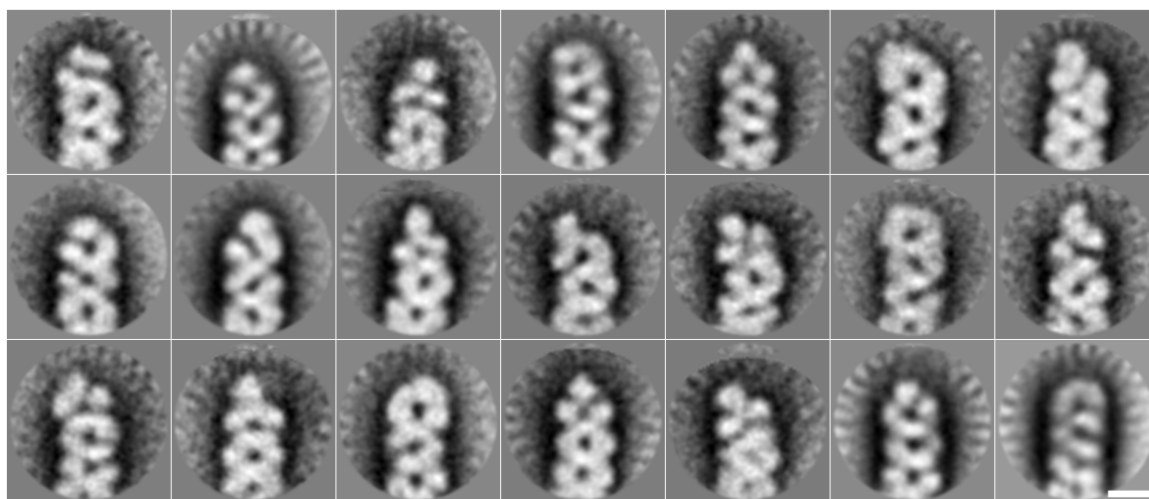


Figura R11. Análisis bidimensional de los extremos de las RNPs nativas del virus de la gripe teñidas negativamente. Galería de imágenes promedio mostrando algunos ejemplos de las clases obtenidas por medio del protocolo de clasificación y alineamiento CL2D. En la gran mayoría de los casos no es posible distinguir inequívocamente el extremo donde se localiza la polimerasa del extremo de cierre. La barra de escala representa 100 Å.

A la vista de que no era posible separar las imágenes de los dos extremos diferentes mediante una clasificación de imágenes (CL2D) se optó por realizar una clasificación tridimensional directa de todo el conjunto de imágenes usando los protocolos de clasificación basados en algoritmos de máxima verosimilitud (ML3D) implementados en el paquete XMIPP (Scheres et al., 2007). Para este tipo de clasificación es necesario emplear un modelo inicial; en nuestro caso, y para no introducir sesgo mediante el volumen de referencia, se utilizó como modelo inicial un pequeño segmento de la reconstrucción tridimensional de crio-ME de la región central de las RNPs filtrado a 90 Å. Como resultado se obtuvieron seis volúmenes, dos de ellos se pudieron asignar inequívocamente al extremo donde se encuentra la polimerasa y otros dos al extremo donde se encuentra el lazo de cierre. El resto de los volúmenes fueron descartados.

Las 11.307 imágenes que estaban asignadas a los dos volúmenes del lazo de cierre se juntaron y se refinaron usando protocolos sin aplicación de simetría para generar una estructura final de 27 Å de resolución (FSC, 0.3 criteria) (**Fig. R12 A**). Esta reconstrucción tridimensional presentaba un pequeño lazo de cierre constituido por solamente tres monómeros de NP, que son suficientes para conectar las dos cadenas de la hélice. (**Fig. R12 A**). Estos resultados son coherentes con la disposición triméricas de las NPs observada en la estructura cristalina (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006) (**Fig. I4**) y la capacidad de la NP de formar pequeñas estructuras cerradas.

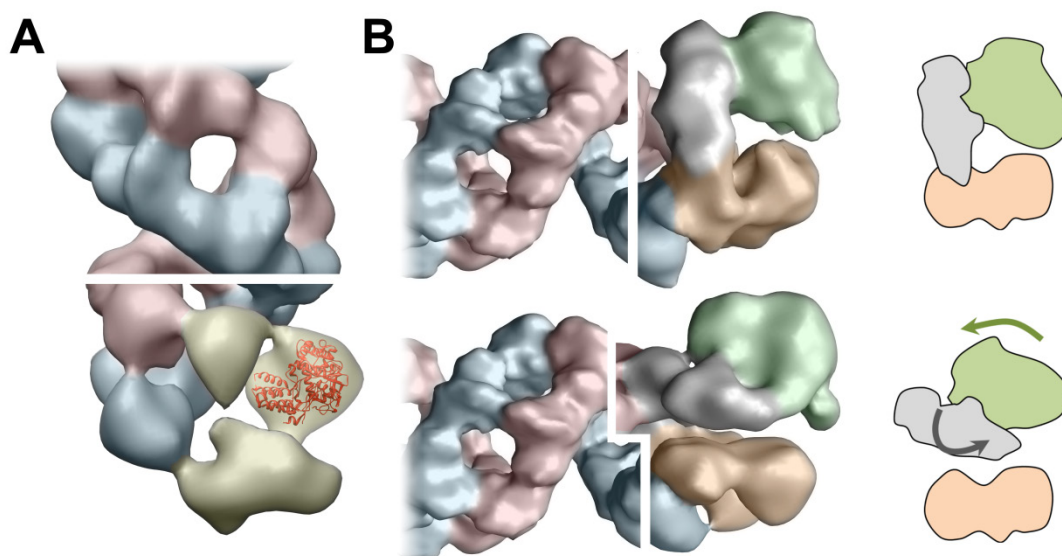


Figura R12. Estructuras tridimensionales de los extremos de la RNP nativa del virus de la gripe.

(A) Estructura del lazo de cierre de la RNP junto con una porción de la estructura de la hélice utilizada como referencia. Las tres RNPs que lo constituyen están representadas en amarillo. El ajuste de la estructura atómica ha sido realizado en una de ellas sólo para servir de guía del tamaño. (B) La estructura del extremo conteniendo la polimerasa de la RNP del virus de la gripe se presenta junto con un segmento de la hélice como referencia. Las dos conformaciones de la polimerasa se muestran en panel superior e inferior y también un esquema de los cambios que se producen a la derecha.

Las 16.012 imágenes asignadas a los dos volúmenes del extremo que contenían la polimerasa se juntaron y se reclasificaron de nuevo utilizando los protocolos ML3D anteriormente descritos. El resultado de este exhaustivo análisis mostró la existencia de dos conformaciones en la polimerasa. La principal diferencia entre ambas estructuras está representada en gris de la **Fig. 12 (Fig. R12 B comparación del panel de arriba con el de abajo)**, donde se aprecia una rotación y desplazamiento de las regiones gris y verde de la polimerasa y el establecimiento de una nueva interacción con un monómero de NP. La proporción de ambas conformaciones es aproximadamente del 50 %, dado que 8.938 imágenes fueron asignadas a uno de los volúmenes y

7.074 al otro. Las reconstrucciones tridimensionales presentaban una resolución de 21.7 Å y 20 Å respectivamente (FSC 0.3 criteria).

4. Estructura tridimensional de las RNPs en el interior de los viriones

Para determinar la estructura de las RNPs dentro de las partículas virales se emplearon las técnicas de criotomografía electrónica, así como el promediado de sub-volúmenes.

Una vez purificadas los viriones A/WSN/33 (H1N1) se procedió a su análisis por tinción negativa. Cuando la purificación obtenida tenía la calidad necesaria para su estudio por criotomografía electrónica, se procedió a su vitrificación. Se le añadió a la muestra oro coloidal de 10 nm (BBInternational) a una dilución 1:10. Estas partículas de oro se emplean para facilitar el alineamiento de los tomogramas. La vitrificación fue realizada según se describe en el apartado de métodos.

Se reconstruyeron un total de 21 tomogramas usando los algoritmos de retroproyección sopesada (WBP) implementados en el paquete TOMO3D (Agulleiro & Fernandez, 2011). La resolución alcanzada en los tomogramas era de 39 a 41Å, de acuerdo con FSCEo criteria (Cardone et al., 2005).

En los tomogramas se visualizaban claramente las proteínas HA y NA, que forman las espículas de la envuelta viral, la capa intermedia por M1, así como la nucleocápsida (**Fig. R13**). Sin embargo, el genoma viral aparece en la mayoría de los casos como una densidad compacta donde las RNPs individuales son perceptibles de manera clara solamente en algunos casos. (**Fig. R13, rectángulos y flechas rojas**).

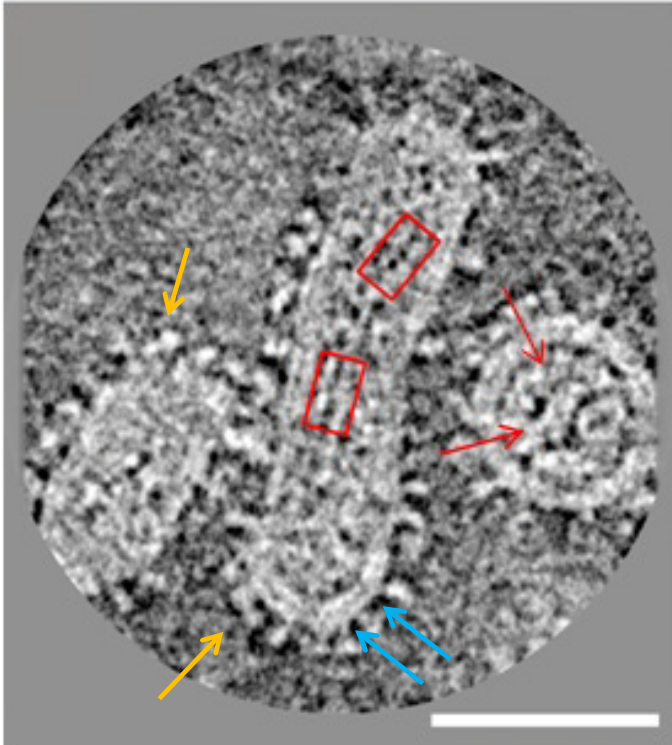


Figura R13. Criotomografía electrónica del virus de la gripe. En la figura se muestra una sección central de un tomograma donde se visualizan tres viriones. Las proteínas de la membrana HA y NA se distinguen claramente protruyendo de la envuelta lipídica (flechas naranjas). En algunos lugares se aprecia la doble capa formada por la membrana viral y la cobertura interna formada por la proteína M1 (flechas azules). Finalmente, partes distinguibles de las RNPs están señaladas por flechas y rectángulos rojos. La barra de escala representa 1000 Å.

Dieciocho de los viriones presentes en los tomogramas mostraron segmentos de RNPs evidentes. De ellos, 814 segmentos de RNPs fueron manualmente seleccionados usando el programa IMOD (Kremer et al., 1996). Posteriormente, se realizó el alineamiento y promediado iterativo para mejorar la resolución y evitar la pérdida de información debido al cono perdido, utilizando como modelo inicial un cilindro hueco. La media final se obtuvo manteniendo los 288 subvolumenes que mostraban un coeficiente de correlación cruzada por encima del valor medio y un máximo solapamiento del 90%. Es necesario destacar que esos alineamientos se realizan sin la aplicación de simetría. Sobre el volumen promedio se determinaron los parámetros de simetría usando el programa Xhelicals (Egelman, 2000) y los valores obtenidos fueron de -64° para el ángulo y 28.5 \AA para el ascenso entre monómero (**Fig. R14**), totalmente coherentes con los de la reconstrucciones de las RNPs aisladas.

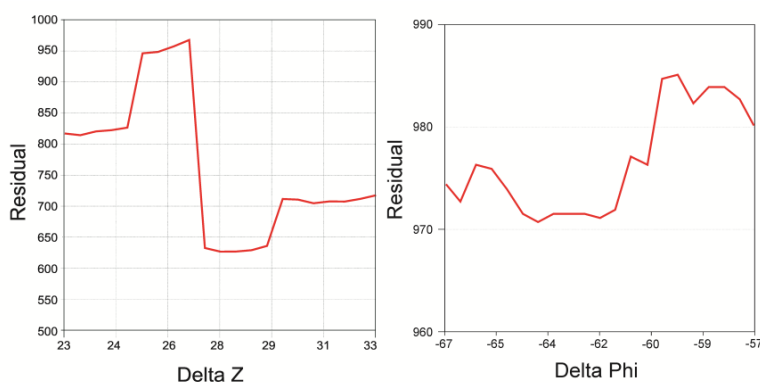


Figura R14. Determinación de la simetría de los volúmenes de los sub-tomogramas promediados.

Las curvas se ha calculado utilizando el programa Xhelical (Egelman, 2000) donde Delta Z representa la distancia entre los monómeros de NP y Delta Phi el ángulo de rotación.

Estos parámetros fueron utilizados para aplicar la simetría helicoidal al volumen promedio usando el programa Himpose (Egelman, 2000) y así generar el volumen final (**Fig. R15 A**). En este caso no se aplicó simetría diédrica. Comparando el sub-volumen promediado simetrizado con la estructura tridimensional de la región central obtenida por criomicroscopía se observaba una gran similitud tanto en dimensiones como en tamaño. Del mismo modo, este subvolumen presentaba un surco mayor y un surco menor confirmando que la disposición general de las RNPs dentro de los viriones es la misma que en las RNPs nativas purificadas.

Finalmente, para verificar cual era la distribución y forma de empaquetamiento de las RNPs dentro del virión, los volúmenes promediados finales fueron devueltos a los criotomogramas utilizando las coordenadas y la orientación del eje helicoidal calculados durante el proceso de alineamiento del sub-tomograma (**Fig. R15 B y C**). Este procedimiento nos permitió incorporar largos fragmentos de RNPs dentro de los viriones y ver su colocación.

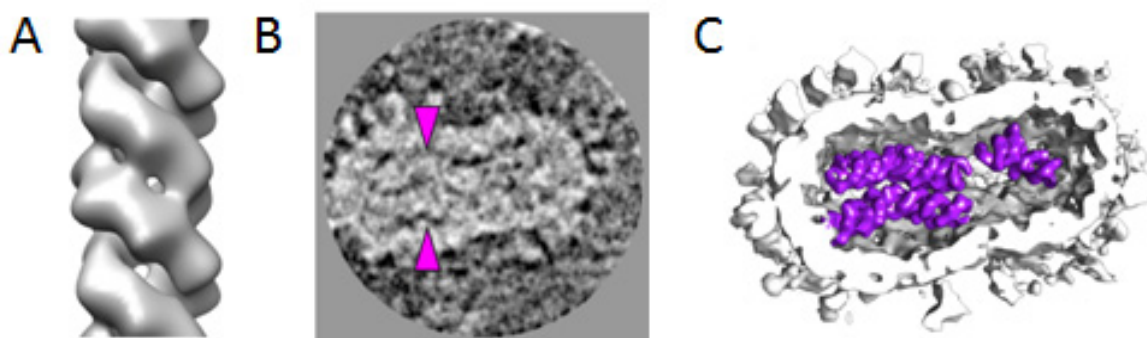


Figura R15. Estructura tridimensional de las RNPs del virus de la gripe en el interior de los viriones. (A) Volumen simetrizado obtenido a partir del promedio de 288 volúmenes extraídos de los tomogramas y alineados. (B) Sección central de un tomograma obtenido por criotomografía de un virión donde se marcan con flechas rosas el genoma viral (C) Representación volumétrica del virión mostrado en el panel B donde los volúmenes de RNP promedio son devueltos al volumen utilizando las coordenadas de posición y orientación obtenida en los alineamientos de los fragmentos.

DISCUSIÓN

El genoma del virus de la gripe tipo A consiste en ocho segmentos de RNA de cadena simple y polaridad negativa que varían en longitud (890-2.341 nt). Dichos segmentos de RNA genómico (vRNA) no se presentan desnudos sino que están acomplejados en sus extremos por una copia del heterotrímero polimerasa viral (Murti et al., 1988) y estabilizados por múltiples copias de nucleoproteínas a lo largo de todo el RNA, y cuyo número varía dependiendo de la longitud del vRNA que ensamblan (Neumann et al., 2004 ; Resa-Infante et al., 2011 ; Ruigrok et al., 2010). Todo el conjunto constituye el macrocomplejo denominado ribonucleoproteína viral o vRNP y es la unidad de replicación y transcripción del virus de la gripe. Dentro de los viriones estas ocho vRNPs están limitadas por la envuelta viral y empaquetadas de manera organizada en forma de haces en distintos patrones, con siete vRNPs alrededor de una vRNP central (Noda et al., 2006 ; Harris et al., 2006).

Durante años se ha intentado estudiar la estructura y funcionamiento de estos complejos ya que constituyen la maquinaria de autopropagación de los virus (Compans et al., 1972 ; Heggeness et al., 1982 ; Ortega et al., 2000). Sin embargo, las RNPs son estructuras helicoidales superenrolladas de diferentes tamaños que se presentan en diferentes conformaciones debido su alta flexibilidad. Ambos factores, flexibilidad y heterogeneidad en tamaño, han ralentizado enormemente el avance de estos estudios.

En el año 2001, en nuestro laboratorio se llevó a cabo el análisis estructural de RNPs reconstituidas *in vivo* a partir de proteínas recombinantes y un vRNA molde de 248 nt, constituyendo una mini-RNP (Martín-Benito et al., 2001). Esta mini-RNP era lo suficientemente rígida para ser analizada mediante microscopía electrónica de transmisión. Las mini-RNPs son transcripcionalmente activas *in vitro* y pueden servir como molde de la replicación cuando se transfectan en cultivos celulares (Jorba et al., 2009), pudiéndose considerar como modelo de las RNPs presentes en los viriones o las RNPs progenie generadas en las células infectadas. La estructura resuelta presentaba un anillo constituido por nueve NPs con forma de media luna, dos de ellas interaccionaban con la polimerasa viral (**Fig. I3**). Este análisis estructural se realizó a partir de las mini-RNPs teñidas negativamente, llegando a obtener una estructura con una resolución para el anillo de 27 Å y para la polimerasa de 33 Å. En 2004, mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales y una etiqueta TAP (*Tanden Affinity Purification*), se obtuvo la primera información de la posición de las subunidades de la polimerasa dentro del complejo (Area et al., 2004).

Años después, optimizando los protocolos de purificación se consiguió un incremento de la concentración y limpieza de la muestra. Esta mejora junto a la utilización de un microscopio equipado con un cañón de emisión de campo, el empleo de la técnica de crió-EM y el avance de los programas computacionales permitió obtener una reconstrucción tridimensional con una resolución para el anillo de NPs de 12Å y de 18 Å para el complejo polimerasa (**Fig. I10 B**)

(Coloma et al., 2009). Este mapa tridimensional de la mini-RNP permitió definir los dominios de la NP y las subunidades de la polimerasa, así como, la unión entre los monómeros.

Conocidos estos datos, en esta Tesis se planteó el reto científico de analizar estructuralmente la RNP nativa purificada a partir de viriones y dentro de ellos. Para ello, se utilizaron una combinación de técnicas de microscopía electrónica de transmisión: microscopía electrónica convencional por tinción negativa, criomicroscopía electrónica, así como, criotomografía electrónica. De este modo, se ha resuelto por primera vez la arquitectura del genoma del virus de la gripe.

El estudio de las RNPs nativas purificadas se realizó seleccionando las RNPs en dos regiones: región central y la región de los extremos, véase en detalle en material y métodos.

1. Región helicoidal de las RNPs nativas

Debido a la estructura cerrada que tiene el RNA genómico, la parte central de las RNPs tiene una organización helicoidal con dos hebras situadas de forma antiparalela. El análisis estructural de los diferentes grupos originados por la clasificación de las imágenes, imprescindible por la flexibilidad de la muestra, dio como resultado estructuras cuasi-equivalentes que tenían las siguientes características en común: (1) una doble hélice constituida por dos cadenas de polaridad opuesta, definida por un surco mayor y otro menor y una interacción intercadena NP-NP. (2) Un único paso de subida entre monómeros de 28.4 Å y un ángulo entre monómeros adyacentes que varía según el grupo de imágenes seleccionadas entre -58 ° a -64 °, siendo así el número de NPs por vuelta de aproximadamente de 12 (6 pares).

Las características básicas de los monómeros de NP, incluyendo los dominios cabeza y cuerpo, son claramente visibles en la estructura helicoidal obtenida pudiéndose comparar con la estructura mini-RNPs. (**Fig. D1**). En ambos casos, las NPs presentan una estructura similar pero su disposición dentro de la estructura cuaternaria del complejo es diferente. En la mini-RNP los monómeros de NP se disponen paralelamente al eje de simetría, mientras que en la estructura helicoidal se disponen perpendicular al eje helicoidal. Esto pudiera ser debido a que los monómeros de NP en la mini-RNP están sometidos a una gran tensión causada por la reducida longitud del RNA que imposibilita el giro para la formación de la hélice. En este sentido, es necesario recordar que, previamente al estudio estructural del recombinante mini-RNP, se analizaron otras RNPs recombinantes que presentaban estructuras circulares o elípticas cuando la longitud del vRNA que las componían estaba por debajo de 350 nt. Sin embargo, se obtenían partículas helicoidales cuando los vRNA eran más largos (Ortega et al., 2000)

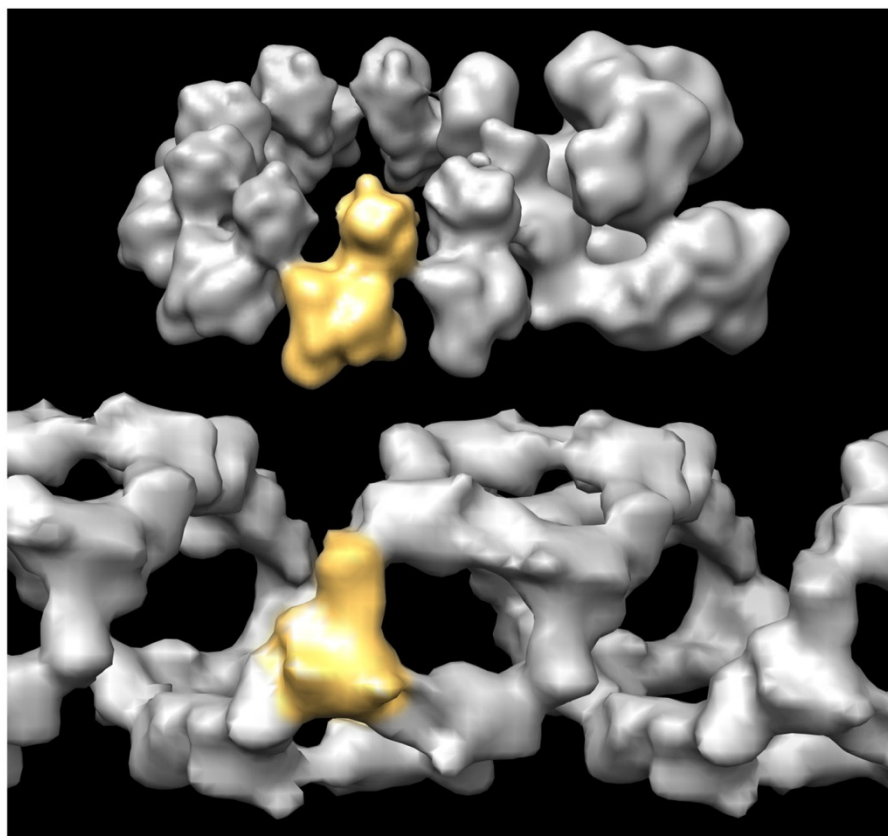


Figura D1. Comparación de la disposición de un monómero de NP entre una mini-RNP recombinante y la nativa. En la parte de arriba se resalta en amarillo uno de los monómeros de NP que forma parte del anillo circular de la mini-RNP. En la parte inferior, se muestra también en amarillo la colocación del monómero de NP en la estructura helicoidal. La transición de una estructura a otra se consigue simplemente por el desplazamiento tangencial de unos monómeros respecto de los otros.

Para poder interpretar la estructura helicoidal obtenida, se realizó el ajuste de la estructura atómica del monómero de NP en virus de la gripe H1N1 (pdb 2IQH) (Ye et al., 2006) en ambas cadenas de la hélice. El ajuste realizado nos permitió elaborar la hipótesis de cómo sería la interacción entre los monómeros de NP y sobre la localización del RNA en la hélice.

Las NPs presentan una capacidad intrínseca para formar estructuras oligoméricas debido a la naturaleza de interacción NP-NP. Esta interacción depende principalmente del lazo intermolecular de la proteína (posiciones 402-428) que se inserta en el cuerpo de la NP adyacente. Además, este lazo está conectado flexiblemente al dominio de cabeza de la NP de la que forma parte, siendo responsable de una gran plasticidad que hace que se produzcan una gran variedad de oligómeros, desde las estructuras triméricas obtenidas en las estructuras cristalinas (Ye et al., 2006 ; Ng et al., 2008), a multímeros (Ruigrok & Baudin, 1995) así como, la mini-RNP (Coloma et al., 2009) y las RNPs nativas aquí descritas. **(Fig. D2).**

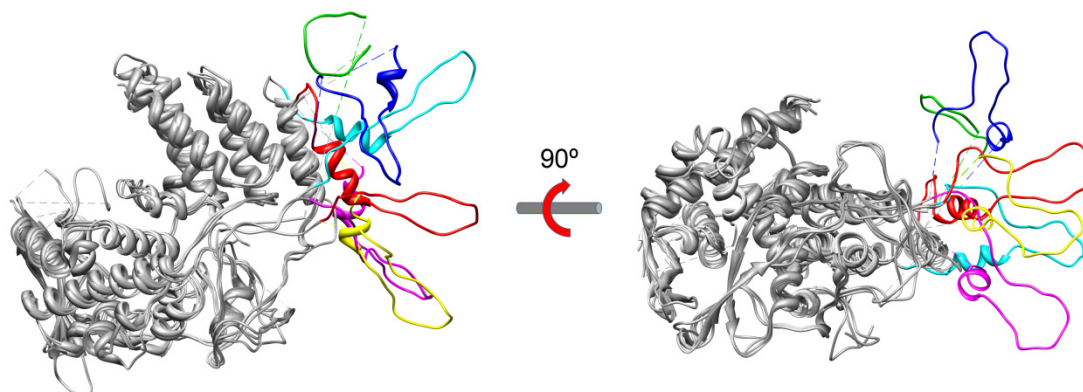


Figura D2. Superposición de los monómeros de NP de diferentes estructuras cristalográficas y de NPs ajustadas en mapas de crio-EM. Los dominios de NP cabeza y cuerpo han sido alineados utilizando el programa Chimera. Solamente el lazo de las estructuras ha sido coloreado de acuerdo al siguiente código: amarillo (2IQH, *Influenza A H1N1* (Ye et al., 2006)), rosa (3RO5, *Influenza A (H1N1)* (Gerritz et al., 2011)), rojo (3TJO, *Influenza B* (Ng et al., 2012)), azul claro (2Q06, *Influenza A (H5N1)* (Ng et al., 2008)), azul oscuro (2WFS) NP ajustada en el mapa de crio-EM (Coloma et al., 2009) y verde (este trabajo). La enorme flexibilidad de este lazo puede explicar la variabilidad en las estructuras cuaternarias que forma la NP. Además, esta flexibilidad podría también conferir la capacidad de conectar la cadena ascendente y descendente de NPs en la RNP nativa con solamente 3 monómeros (Véase Fig. R12 A)

Aunque la estructura atómica está conservada en la estructura helicoidal de la RNP y la distancia de conexión entre el lazo intermolecular y el dominio cuerpo de la NP adyacente sea compatible con la extensión de las cadenas de aminoácidos, tampoco se podría descartar que se dieran algunas pequeñas reorganizaciones locales de la estructura atómica. Además, posiblemente sea esta unión entre NP-NP intracadena la que hace que el valor de ascenso entre los monómeros se mantenga constante.

También, existe otra conexión que se produce entre las NPs de las dos cadenas antiparalelas. Esta conexión intercadena se localiza en la región N-terminal de la NP, en una zona de donde se observa un exceso de masa en el mapa de crio-EM que podría corresponder con los primeros 22 aminoácidos del extremo N-terminal que no están resueltos en el cristal. (Fig. R10).

2. Localización del RNA

El RNA genómico del virus de la gripe se encuentra asociado a la NP. Esta unión se produce con alta afinidad y no es específica de secuencia (Baudin et al., 1994). Además, se sabe por estudios bioquímicos y estructurales que se unen entorno a unos 24 nt por molécula de NP en

las RNPs. Esta cantidad de RNA es lo suficientemente grande como para que la hebra se encuentre enrollada o “serpenteando” sobre la molécula de NP de algún modo.

Los estudios previos de cristalografía de rayos X han predicho que el sitio de unión del RNA viral se localiza en la hendidura situada entre el dominio cabeza y dominio cuerpo de la NP, la cual es rica en aminoácidos básicos (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006). También, mediante la realización de experimentos con mutantes en varios residuos básicos de la NP, tanto situados en dicha hendidura y en regiones fuera de ella, se han localizado aminoácidos que resultan ser esenciales para la de unión del RNA. En este trabajo se reemplazaban los aminoácidos básicos por otros sin carga y se estimaba la capacidad del mutante resultante para unir RNA mediante técnicas de BIACORE (Ng et al., 2008).

Así, conocidos todos estos datos se procedió de la siguiente manera para hipotetizar cuál sería la posición del RNA: 1) Se calculó la superficie de potencial de la cadena de NP ajustada al mapa de crio-EM (**Fig. D3 A**); y 2) se localizó sobre la cadena de NP los aminoácidos que se había mostrado bioquímicamente eran esenciales o importantes para la interacción con RNA (Ng et al., 2008) (**Fig. D3 A**). De este modo, y sabiendo que una hebra de 24 nt debe tener una longitud aproximada de unos 140 Å, se buscó el camino más probable que siguiera las regiones cargadas positivamente y pasara por los aminoácidos que se habían descrito que interaccionaban con RNA y que además que tuviera esa longitud aproximadamente. El resultado final de este proceso se muestra en la **Fig. D3** e hipotetiza un posible trazado del RNA en la RNP nativa.

También, este ajuste muestra que la hendidura de la estructura de la NP, y la práctica totalidad del hipotético camino del RNA, está dispuesta en la superficie del lado externo de la hélice, es decir, hacia el surco mayor. De esta manera, el RNA quedaría expuesto para su interacción con la polimerasa y además sería susceptible de degradarse por medio de RNasas y/o a modificarse por agentes químicos como se ha demostrado anteriormente (Baudin et al., 1994). En la estructura resuelta de la mini-RNP (Coloma et al., 2009) el modelo planteado de localización del RNA también dispondría al RNA por el lado externo del anillo coincidiendo con el modelo aportado en esta Tesis.

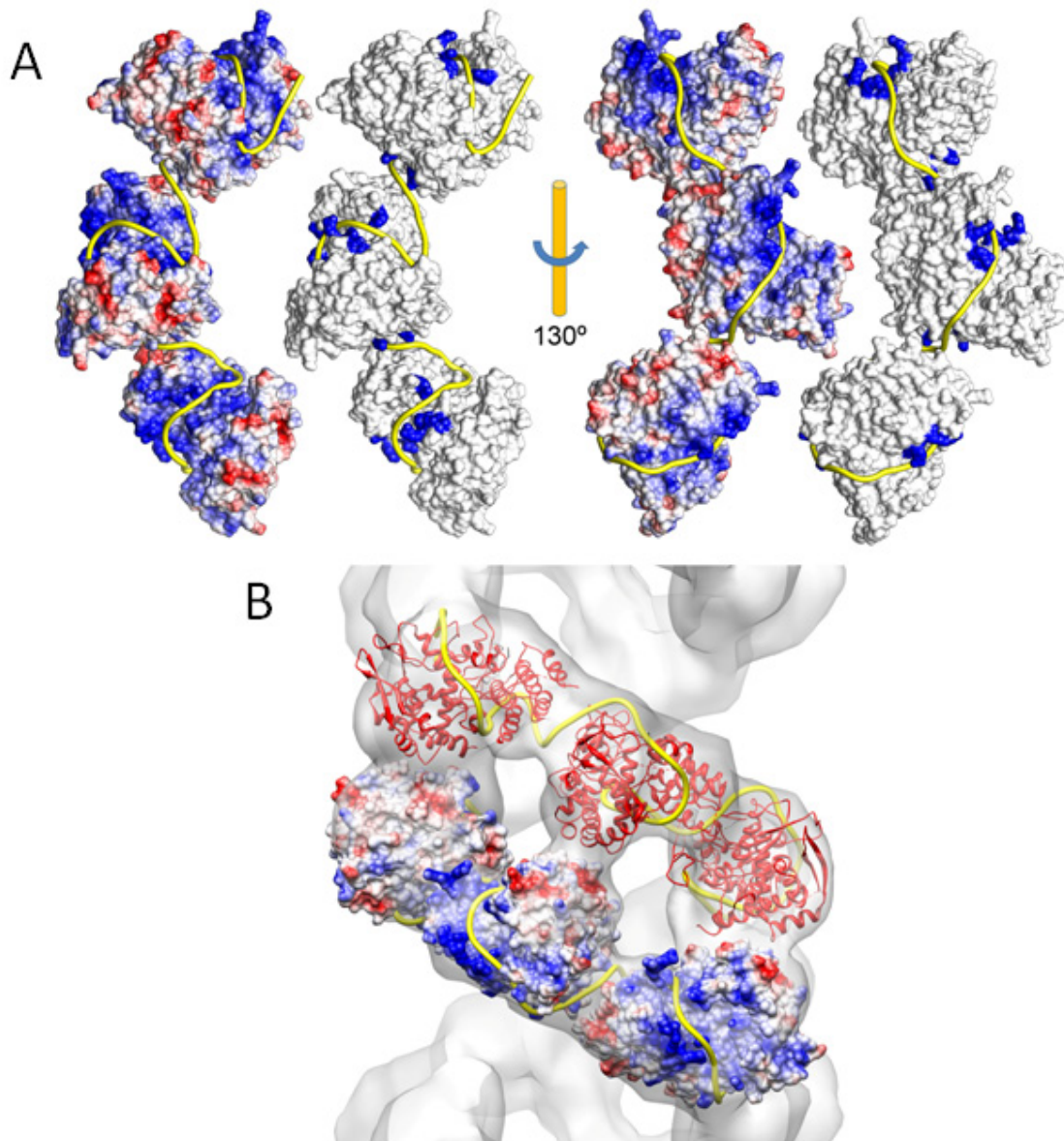


Figura D3. Modelo de localización del RNA viral. (A) Se muestran dos vistas de 3 NPs pertenecientes a una misma cadena en las que se representa su superficie de potencial (en azul los residuos con carga positiva y en rojo con carga negativa). Asimismo, se representan los mismos monómeros de NP pero esta vez se resaltan en azul los residuos cuyas mutaciones reducen la afinidad por el RNA (Ng et al., 2008) El hipotético trazado del RNA viral se muestra como una hebra en color amarillo. (B) Modelo de localización del RNA (hebra de color amarillo) en la estructura helicoidal de una RNP, representando las NPs de una de las cadenas como superficie de potencial y la otra como diagrama de cintas. En esta disposición se aprecia claramente como la mayoría del RNA se encuentra localizado “serpenteando” en la cara del lado que da hacia el surco mayor, el cual presentaría muchos menos impedimentos estéricos para el paso de la polimerasa o el acceso de RNAsas.

3. La polimerasa de las RNPs nativas

La polimerasa viral une los extremos 3' y 5' de los segmentos del vRNA, estando localizada en la horquilla terminal (Klumpp et al., 1997) También esta ubicación ha sido observada en la mini-RNP, ya que la polimerasa se encontraba cerrando el anillo constituido por los nueve monómeros de NP (Martin-Benito et al., 2001; Coloma et al., 2009). De igual modo, en la estructura helicoidal de la RNP nativa, la polimerasa viral se encuentra en el extremo de la hélice coincidiendo con los datos anteriores.

Desde el punto de vista de la estructural se ha observado la existencia de dos conformaciones de la polimerasa del virus de la gripe (**Fig. R12 B**). La proporción de ambas conformaciones es de aproximadamente un 50% y su relevancia biológica no está clara por ahora.

La estructura de la polimerasa en ambas conformaciones muestra un complejo poco compacto con un volumen compatible a 250 KDa de masa molecular. Hasta el momento, no se ha resuelto la estructura atómica completa de la polimerasa, aunque se han resuelto las estructuras de diferentes dominios específicos de las subunidades de la polimerasa (Dias et al., 2009 ; Guilligay et al., 2008 ; He et al., 2008 ; Tarendeau et al., 2008) (**Fig. I6**). Desafortunadamente los mapas de microscopía existentes, y los obtenidos en este trabajo, no tienen la suficiente resolución como para ajustar de manera fiable estos dominios demasiado pequeños y poco conspicuos. En cualquier caso, para saber la localización exacta de las 3 subunidades de la polimerasa y cómo interaccionan entre ellas, habrá que esperar a la obtención de mapas de microscopía a mayor resolución o la cristalización de trozos mayores que permitan su encaje inequívoco en las estructuras de microscopía existentes en la actualidad

Sin embargo, es posible hacer una comparación de ambas conformaciones con la disposición de la polimerasa en la mini-RNP descrita anteriormente (Coloma et al., 2009) (**Fig. D4**). En todas las estructuras la polimerasa tiene la misma apariencia poco compacta, con un gran surco central; aunque cuando se encuentra unida a la RNP nativa parte de sus dominios se encuentran girados respecto a su posición en mini-RNP (**Fig. D4**). Estos cambios estructurales son probablemente debidos a la mínima longitud que presenta el RNA en la RNP recombinante de manera que no permite la formación de la hélice y distorsiona la estructura de la polimerasa.

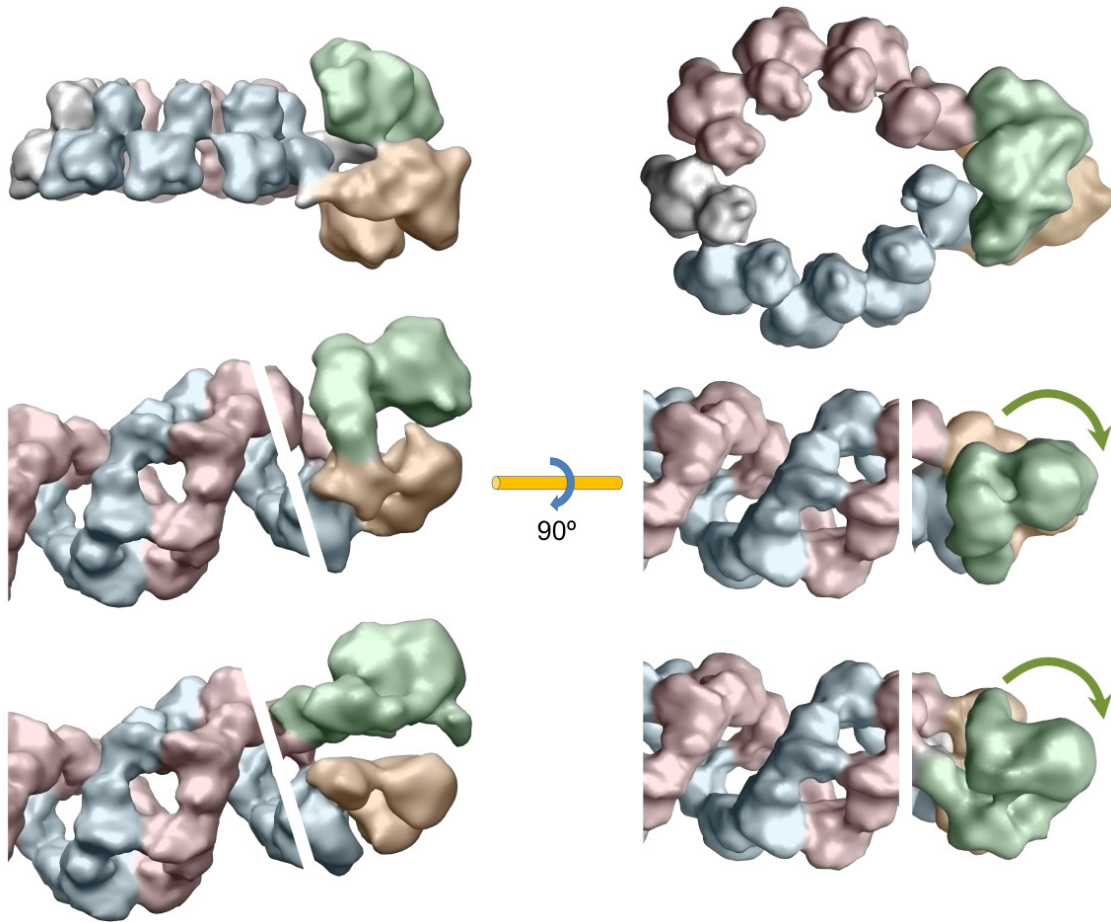


Figura D4. Comparación de la polimerasa en la RNP nativa y en la mini-RNP. Comparación de polimerasa de la mini-RNP (panel superior) respecto a las dos conformaciones de la polimerasa que forma parte de la RNP purificada nativa (panel inferior). Las dos cadenas de la hélice de la RNP están coloreadas en azul y rojo y los monómeros de la mini-RNP del mismo modo para facilitar la comprensión de las estructuras. La polimerasa está representada en dos colores para ilustrar los cambios estructurales entre ambas estructuras.

4. Modelo de la estructura tridimensional de la RNP nativa

La nueva estructura resuelta de las RNPs nativas nos acerca un poco más al conocimiento del virus de la gripe. Esta estructura tiene una enorme relevancia ya que deriva de viriones purificados, concretamente del subtipo H1N1 A/WSN/33 (H1N1). Por lo tanto, es de esperar que representen las RNPs parentales que entran en la célula, así como, las RNPs que van a ser encapsidadas formando la progenie viral.

Es razonable también asumir que las cRNP intermediarias de la replicación viral tengan una arquitectura similar, aunque la conformación de la polimerasa puede ser alterada por la interacción con el promotor cRNA.

Es cierto que no hemos conseguido resolver la estructura tridimensional de la RNP nativa en su conjunto, pero la superposición de las tres estructuras resueltas: extremo con la polimerasa viral, estructura helicoidal de la región central, así como, el lazo de cierre nos dan la información de la RNP nativa al completo.

Como se ha descrito anteriormente, la longitud de cada RNP se correlaciona con la longitud del RNA que encapsida, variando su tamaño aproximadamente entre 45-120 nm (Compans et al., 1972). Conociendo que hay 24 nt por monómero de NP (Ortega et al., 2000 ; Martin-Benito et al., 2001) se puede representar los ocho segmentos virales que constituyen el genoma viral completo. Como ejemplo, hemos representado el segmento 7 que codifica para las proteínas M1 y M2. **Fig. D5**

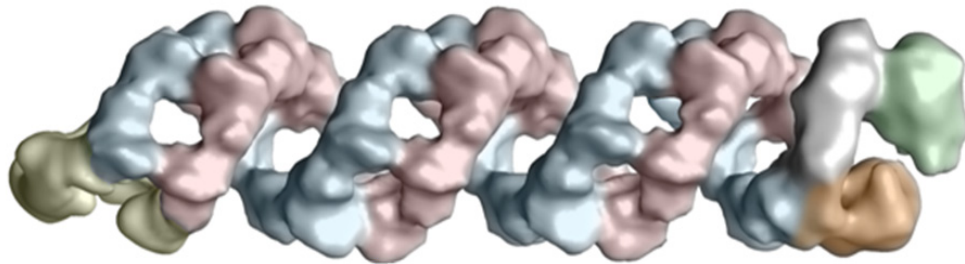


Figura D5. Modelo de la estructura de la RNP 7 del virus de la gripe. Se representa la combinación de la estructura central de una RNP y de sus extremos, mostrando la polimerasa en colores gris, verde y marrón y el lazo de cierre en amarillo. Concretamente, representa el segmento 7 del genoma. La barra de escala representa 50 Å.

5. Estructura de la RNP nativa purificada a partir de viriones *versus* RNP recombinante

Recientemente, a la vez que nuestro grupo de investigación, ha sido publicada la estructura tridimensional de la RNP recombinante de tamaño similar a las nativas a 20 Å de resolución (Moeller et al., 2012).

La reconstrucción obtenida por Moeller se realizó con RNPs generadas por la sobreexpresión *in vitro* de cuatro proteínas (NP, PA, PB1, PB2) junto con un vRNA mediante transfección en una línea celular humana. Al igual que nuestra reconstrucción, su estructura final confirma que la RNP adopta una doble hélice definida por un surco mayor y otro menor, donde las dos cadenas que la constituyen están dispuestas de manera antiparalelas. La polimerasa viral se encuentra localizada en uno de los extremos de la estructura y en el otro extremo el lazo de cierre. (**Fig. D6 A-B**).

No obstante, ambos modelos presentan algunas diferencias notables en los parámetros helicoidales. La estructura de Moeller presenta un ascenso entre monómeros de 32.6 Å, siendo el ángulo de 73.9°, lo que hace que haya aproximadamente 10 NPs por vuelta (5 pares). Nuestros datos son de 28.4 Å para el ascenso entre monómeros y un ángulo que varía entre -57° y -64 ° lo que implica que hay 12 NP por vuelta (6 pares), como se muestra en las gráficas de convergencia (**Fig. R7**) y como se corrobora en los parámetros obtenidos en la reconstrucción de las RNPs dentro de los viriones (**Fig. R14**).

Estas diferencias en los parámetros pudieran ser debidas a la diferente fuente de obtención de las RNPs. Aunque las RNPs obtenidas por Moeller muestran una simetría helicoidal regular, en nuestro caso las RNPs provienen de RNPs que han sido empaquetadas en viriones, donde M1 y NEP han intervenido para su exportación al núcleo para posteriormente ensamblarse e interaccionar las unas con las otras empaquetándose de manera selectiva (Noda et al., 2006).

Se realizó el ajuste de la estructura cristalina (Ye et al., 2006) en ambos modelos (**Fig. D6 C-D**). En nuestra reconstrucción, el ajuste muestra que las NPs intercadena contactan mediante los dominios cuerpo concretamente por la región N-terminal, sin embargo, en el otra estructura la zona de unión es cercana a la cabeza. En la **Fig. D6 C-D** se puede observar el ajuste en ambas estructuras y en la **Fig. D6 E-F** la diferencia de ajuste a umbrales similares.

Otra diferencia notoria es la mano en ambas estructuras, siendo levógira en nuestra estructura y dextrógira en la otra (**Fig. D6 E-F**). La asignación de la mano en nuestra estructura se realizó ajustando la estructura cristalina de NP de manera inequívoca, donde la oligomerización entre los monómeros de NP viene dada por el lazo intramolecular de acuerdo con los resultados anteriores (Ng et al., 2008 ; Ye et al., 2006 ; Ruigrok & Baudin, 1995 ; Coloma et al., 2009) (**Fig. D6 y Fig. R10**); mientras que los otros autores no hacen ninguna referencia en el trabajo publicado a cómo realizaron esa asignación.

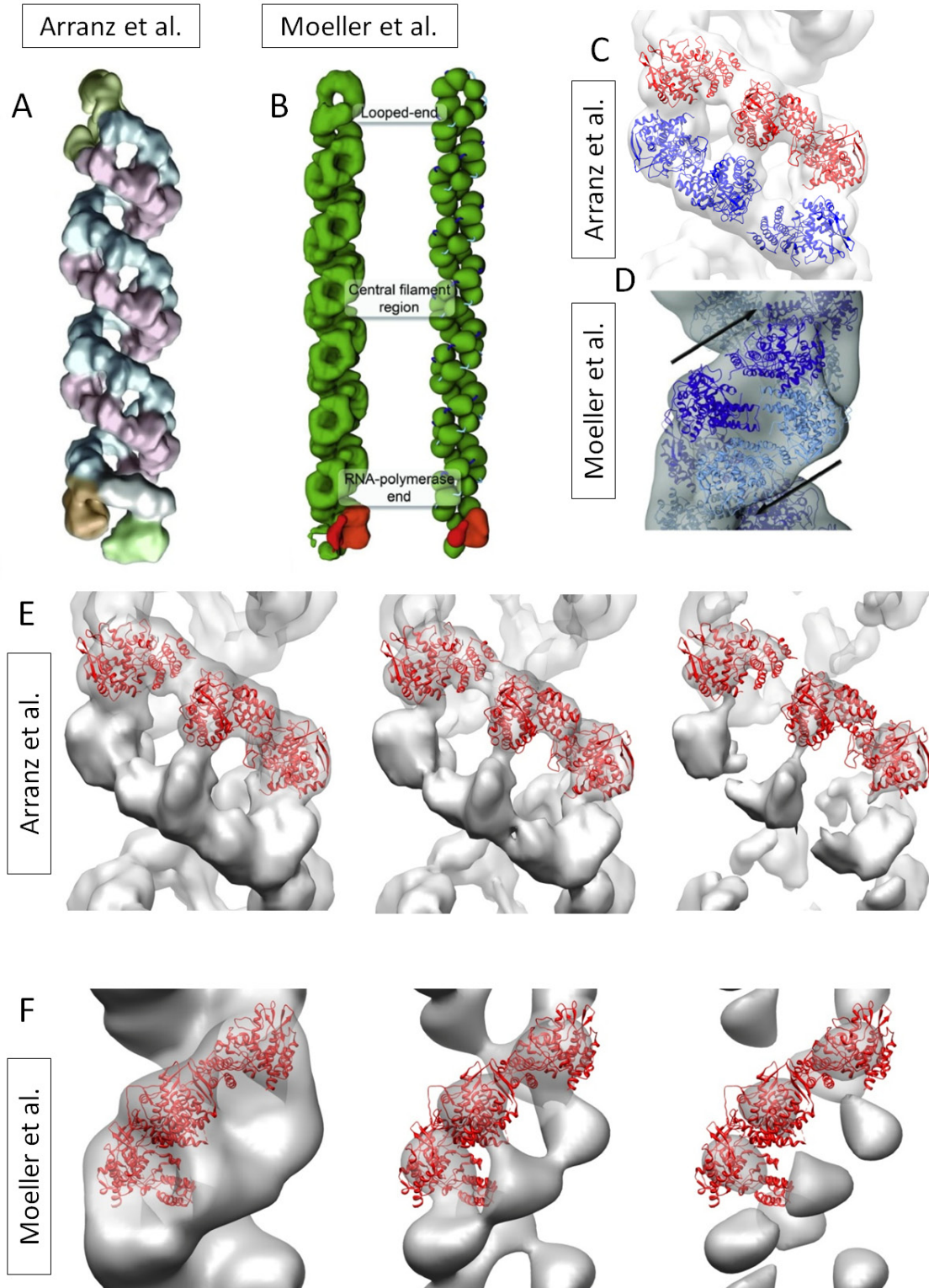


Figura D6. Comparación de la estructura de la RNP obtenida por crió-EM. (A-B) Estructuras generales mostrando una doble hélice con las dos cadenas que la constituyen dispuestas de manera antiparalela. En uno de los extremos se encuentra la polimerasa y en el otro el lazo de cierre. **(C-D)** Ajuste de la estructura cristalina (pdb2IQH) (Ye et al., 2006) en ambas estructura. **(E-F)** Ajuste de la estructura cristalina en ambas estructuras a umbrales similares.

Además, en la estructura de Moeller la hendidura constituida por aminoácidos cargados positivamente expuestos en la superficie de la NP que se ha predicho unen el RNA (Ye et al., 2006 ; Ng et al., 2008) queda hacia el interior de la luz de la hélice (**Fig. D7**), donde se podrían encontrar serios impedimentos estéricos para el tránsito de la polimerasa viral durante los procesos de replicación y transcripción, y no coincidiendo con los resultados previos donde se demuestra que las RNPs son susceptibles a RNasa y/o agentes químicos (Baudin et al., 1994). También, la distancia máxima entre las dos NPs que forman el surco mayor de la hélice es de al menos 4 veces menor que el tamaño de la polimerasa.

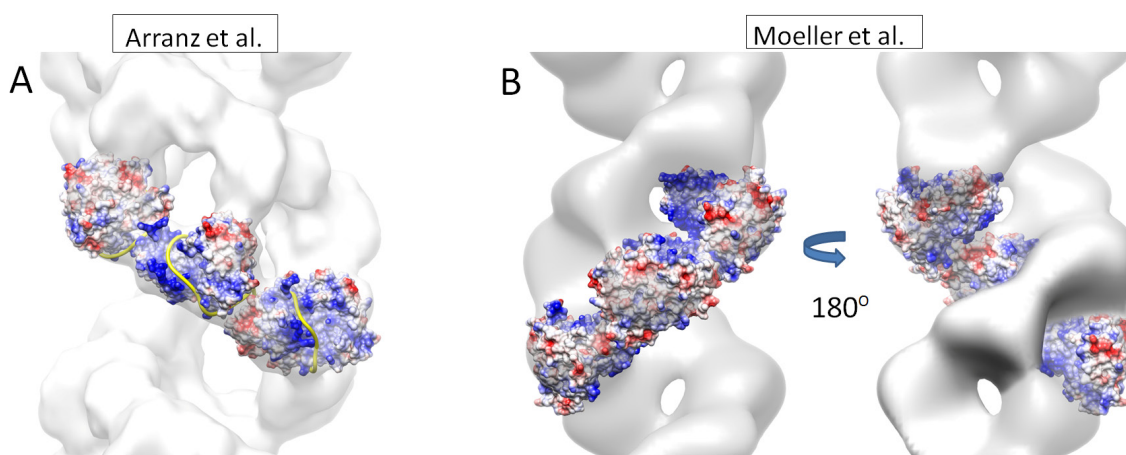


Figura D7. Comparación de la disposición de las superficies de potencial. (A) En nuestro trabajo, la hendidura de unión a RNA (aminoácidos en azul) se localiza hacia el exterior de la estructura en el surco mayor. (B) Contrariamente Moeller et al. presentan un ajuste de la NP que coloca la hendidura de unión a RNA hacia el interior de la luz de la hélice.

6. RNPs dentro del virión

La estructura analizada de las RNPs dentro de los viriones por criotomografía electrónica nos indica que la organización general en estas RNPs es la misma que en las RNPs nativas purificadas. Se observa una gran similitud tanto en el tamaño como en las dimensiones en ambas estructuras, obteniéndose del mismo modo una doble hélice con un surco mayor y otro menor. Los valores de los parámetros de la hélice concuerdan con los conseguidos en las RNPs nativas purificadas. Además, se pudieron reconstituir largos fragmentos de RNPs en los viriones, al devolver dentro de los tomogramas el volumen promedio utilizando las coordenadas y orientación de alineamiento calculados por los programas. Este análisis mostró la organización de las RNPs dentro del virus, en estrecha interacción formando haces paralelos como había sido documentada anteriormente, pero ahora mostrando mayor resolución (Noda et al., 2006 ; Noda et al., 2012)

(**Fig. R15**). Con todos estos datos, es de esperar que la estructura resuelta por crio-EM represente las RNPs encapsidadas en los viriones, conociéndose así, la estructura del genoma del virus de la gripe tipo A.

7. Implicaciones biológicas de la estructura de la RNP nativa

La estructura de la RNP analizada en esta Tesis podría tener distintas implicaciones en varios de los pasos del ciclo de infección viral.

En un estadio temprano de la infección, después de la pérdida de la envuelta viral, las RNPs parentales son transportadas al núcleo por medio de las dos NLSs presentes en la NP (Bullido et al., 2000 ; Cros et al., 2005 ; Ozawa et al., 2007 ; Weber et al., 1998 ; Wu et al., 2007 ; Davey et al., 1985 ; Neumann et al., 1997). La NLS no convencional, que comprende los residuos 1-13 en el N-terminal, probablemente se halla accesible en la estructura de la RNP, aunque al no encontrarse estos residuos en las estructuras atómicas disponibles tal hecho no se puede asegurarse de manera categórica. La NLS bipartita, constituida por los residuos 198-216, se encuentra en la cabeza de la NP en una zona expuesta en la parte externa de la RNP; estando ambas datos de acuerdo con los resultados anteriormente descritos para estas NLSs (Cros et al., 2005 ; Wu et al., 2007).

Una vez en el núcleo, las RNPs virales transcriben y replican el RNA viral encapsidado. La estructura obtenida sugiere cómo son los mecanismos para llevar a cabo estos procesos.

El modelo de disposición del RNA molde alrededor de la NP anteriormente descrito, implica que probablemente se tiene que producir una ruptura transitoria de la interacción intercadena para que la polimerasa pueda copiar este RNA. Además, dado que el RNA está muy accesible, solamente se requiere una desestabilización local de la interacción NP-RNA, estando de acuerdo con los resultados previamente descritos (Baudin et al., 1994) (**Fig. D3**). Para estudiar la relevancia de la interacción NP-NP intercadena, y en colaboración con el laboratorio del Dr. J. Ortín, la Dra. R. Coloma llevó a cabo una serie de ensayos mutacionales sobre la región N-terminal de la NP. En el ensayo se compararon la capacidad de replicación *in vivo* de una RNP helicoidal expresando clorafennicol acetil transferasa (CAT) y una mini-RNP circular (Coloma et al., 2009). En el caso de la mini-RNP no existe interacción intercadena, ya que tienen forma de anillo (**Fig. D4 paneles superiores**), y por tanto mutaciones del N-terminal que afecten a las interacciones NP-NP intercadena podrían no cambiar sus actividad; por otro lado, las RNP-CAT si tienen estructura helicoidal y por tanto el mismo mutante podría afectar su capacidad de replicación. De este modo, se preparó un mutante de delección de los 7 primeros aminoácidos de la NP y se midió en ambos casos la capacidad de acumulación de esas RNPs mutantes en el

núcleo. Como resultado se obtuvo que mientras las RNPs-CAT reducían su acumulación en el núcleo hasta quedar aproximadamente al 25% de la nativa, las mini-RNPs sólo reducían su acumulación hasta el 75%. Este dato indicaba que dicha mutación afectaba más a la capacidad de replicación de las RNPs helicoidales, confirmándose así la importancia de la interacción NP-NP intercadena en el proceso de replicación. Para determinar si la delección afectaba a la estructura helicoidal se prepararon RNPs recombinantes con el gen de HA y este mutante de NP y se analizaron por tinción negativa de manera similar a como se había hecho con las nativas, pero no observaron alteraciones significativas en la estructura (datos no mostrados).

Sobre estos mismos mutantes también se analizó la eficiencia de transcripción *in vitro* para ver cómo estaba afectada y se encontró que ambos tipos de RNPs tenían una capacidad de transcripción similar o incluso más alta que las RNPs nativas.

Estos resultados son consistentes con los modelos de replicación en *trans* y transcripción en *cis* para las vRNPs (Resa-Infante et al., 2011 ; Jorba et al., 2009). En el caso de la replicación, el reconocimiento de la RNP molde sería llevado a cabo por una polimerasa no residente, mientras que en la transcripción es realizada por la polimerasa que forma parte de la RNP (**Fig. D8**). Por lo tanto, el debilitamiento de la interacción intercadena podría afectar al reconocimiento de la RNP molde por una polimerasa no residente y afectar a la replicación a lo largo de la RNP helicoidal, mientras que, para la transcripción esta pérdida podría facilitar la accesibilidad de la polimerasa residente al propio RNA durante la misma.

Un punto que no está claro es cómo se adopta la estructura final de doble hélice una vez se ha ensamblado el extremo 5´terminal del RNA de nueva síntesis y se han incorporado secuencialmente los monómeros de NPs (Resa-Infante et al., 2011 ; Jorba et al., 2009 ; Vreede et al., 2004). Una atractiva posibilidad es que la polimerasa que ensambla el extremo terminal 5´del RNA de nueva síntesis facilite la interacción de este extremo con su propio extremo 3´terminal, y de esta manera, se podría inducir una reacción de ensamblaje en forma de cremallera formando la doble hélice.

La estructura de RNPs helicoidales descritas en esta Tesis también proporciona información sobre un potencial mecanismo para la generación de partículas interferentes defectivas. Dado que las cadenas de RNA ascendente y descendente se encuentran muy próximas en ciertos puntos a lo largo de la estructura de la RNP debido al “serpenteo” de la hebra de RNA sobre las NPs, la polimerasa que está replicando podría fácilmente cambiarse de cadena y continuar la copia del molde en una posición de la secuencia primaria diferente y en la dirección opuesta dando lugar a partículas de delección interna defectuosas (Jennings et al., 1983 ; Nayak et al., 1985).

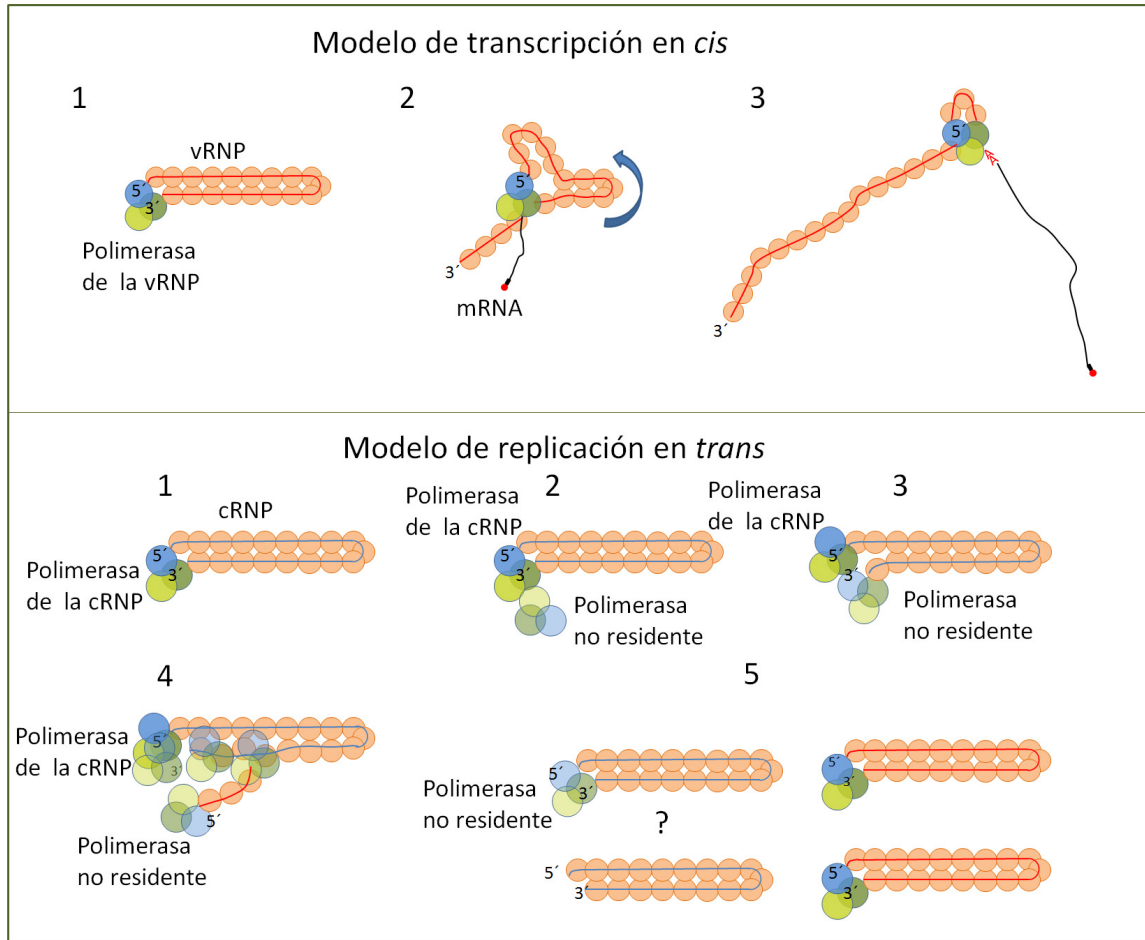


Figura D8. Esquema de los procesos de transcripción y replicación virales. Modelo de transcripción en *cis*: 1) La polimerasa que forma parte de vRNP es la que comienza la síntesis del mRNA. 2) La polimerasa lleva a cabo la elongación del cebador y permanece unida al extremo 5' durante todo el proceso provocando la ruptura de las uniones intercadena. 3) La polimerasa llega a la señal de poliadenilación generando una secuencia poli-A, probablemente por los impedimentos estéricos que la impiden avanzar. **Modelo de replicación en *trans*:** 1) La cRNP parental presenta los dos extremos del RNA unidos a la polimerasa. 2) Una polimerasa no residente se une con la polimerasa de la cRNP. 3) La polimerasa no residente tiene acceso al extremo 3' del RNA y comienza la síntesis de vRNA. 4) El extremo 5' del vRNA que se está sintetizando es protegido por otra tercera polimerasa no residente y el resto de vRNA por moléculas de NP. Se podría producir una plataforma cooperativa donde varias polimerasas replican a la vez a modo de “tren” para aumentar la eficiencia del proceso. N) De este modo, se forman múltiples copias de vRNPs. El final del proceso podría ser alternativo: La polimerasa no residente reemplazaría a la polimerasa que forma parte de cRNP o bien queda una estructura sin polimerasa.

El último paso en el ciclo viral es la encapsidación de las RNPs para formar la nueva progenie viral. Este empaquetamiento es un proceso ordenado donde las 8 diferentes RNPs se asocian con la membrana plasmática de la célula para así adquirir su envuelta. Cada una de las ocho RNPs posee señales de empaquetamiento en su RNA que son requeridas para llevar a cabo la interacción entre las RNPs. Se ha observado un patrón de interacción donde 7 RNPs se disponen alrededor de un RNP central. La secuencia de estas señales específicas ha sido descubierta en cada uno de las RNPs localizándose en las regiones proximales 5' y 3' de cada segmento de RNA (Hutchinson et al., 2010 ; Noda, 2012). De acuerdo con la estructura presentada en esta Tesis, estas señales deberían estar cerca del extremo de la doble hélice donde se localiza la polimerasa. Concretamente, se deberían localizar en la fracción de la secuencia del RNA viral que estaría expuesta en la superficie de la RNP teniendo una disposición espacial específica para que se lleven a cabo las interacciones entre RNPs.

CONCLUSIONES

1.- La combinación de técnicas de microscopía electrónica junto con el procesamiento de imágenes han permitido resolver la arquitectura del genoma del virus de la gripe, demostrándose que son posibles los estudios estructurales detallados de virus pleiomórficos que no presenta simetría intrínseca.

2.-La estructura tridimensional de la ribonucleoproteína del virus de la gripe está compuesta por una doble hélice flexible, con la polimerasa en uno de sus extremos y un lazo de cierre en el otro. Esta doble hélice está definida por un surco mayor y otro menor donde los monómeros de nucleoproteína se disponen interaccionando entre sí mediante uniones intracadena definidas por el lazo intermolecular y una interacción intercadena a través de la región N-terminal. Esta estructura podría tener diferentes implicaciones en las distintas etapas de la infección viral.

3.-El encaje de la estructura atómica de la nucleoproteína en el mapa de microscopía ha permitido interpretar la organización de la parte helicoidal en detalle, mostrando la plasticidad que tiene esta proteína para formar diferentes estructuras cuaternarias.

4.-La polimerasa presente en las ribonucleoproteínas de los virus infectivos se encuentra en dos conformaciones diferentes cuyo significado biológico está aún por determinar, pudiendo tener importantes implicaciones biológicas en la transcripción y/o replicación viral.

5.-Se ha propuesto un modelo de localización de la hebra de RNA sobre la ribonucleoproteína nativa del virus de la gripe.

6.-La estructura tridimensional de las RNPs empaquetadas en el interior de los viriones resuelta por criotomografía electrónica confirma que esta estructura es la misma que la obtenida a partir de las RNP nativas aisladas.

REFERENCIAS

- Agulleiro Ji, Fernandez Jj (2011) Fast tomographic reconstruction on multicore computers. *Bioinformatics*, **27**, 582-583.
- Ali A, Avalos Rt, Ponimaskin E, Nayak Dp (2000) Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol*, **74**, 8709-8719.
- Area E, Martin-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta Jm, Carrascosa Jl, Ortin J (2004) 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 308-313.
- Arranz R, Coloma R, Chichon Fj, Conesa Jj, Carrascosa Jl, Valpuesta Jm, Ortin J, Martin-Benito J (2012) The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science*, **338**, 1634-1637.
- Arzt S, Baudin F, Barge A, Timmins P, Burmeister Wp, Ruigrok Rw (2001) Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology*, **279**, 439-446.
- Avalos Rt, Yu Z, Nayak Dp (1997) Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol*, **71**, 2947-2958.
- Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok Rw (1994) Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J*, **13**, 3158-3165.
- Bauer Cm, Pinto Lh, Cross Ta, Lamb Ra (1999) The influenza virus M2 ion channel protein: probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross-linking. *Virology*, **254**, 196-209.
- Biswas Sk, Boutz Pl, Nayak Dp (1998) Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*, **72**, 5493-5501.
- Biswas Sk, Nayak Dp (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol*, **68**, 1819-1826.
- Blaas D, Patzelt E, Kuechler E (1982) Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res*, **10**, 4803-4812.
- Boivin S, Hart Dj (2011) Interaction of the influenza A virus polymerase PB2 C-terminal region with importin alpha isoforms provides insights into host adaptation and polymerase assembly. *J Biol Chem*, **286**, 10439-10448.
- Boulo S, Akarsu H, Ruigrok Rw, Baudin F (2007) Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res*, **124**, 12-21.
- Bourmakina Sv, Garcia-Sastre A (2003) Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J Gen Virol*, **84**, 517-527.
- Bourmakina Sv, Garcia-Sastre A (2005) The morphology and composition of influenza A virus particles are not affected by low levels of M1 and M2 proteins in infected cells. *J Virol*, **79**, 7926-7932.
- Braam J, Ulmanen I, Krug Rm (1983) Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell*, **34**, 609-618.
- Brownlee Gg, Sharps Jl (2002) The RNA polymerase of influenza a virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter. *J Virol*, **76**, 7103-7113.

- Bullido R, Gomez-Puertas P, Albo C, Portela A (2000) Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. *J Gen Virol*, **81**, 135-142.
- Bullido R, Gomez-Puertas P, Saiz Mj, Portela A (2001) Influenza A virus NEP (NS2 protein) downregulates RNA synthesis of model template RNAs. *J Virol*, **75**, 4912-4917.
- Burleigh Lm, Calder Lj, Skehel Jj, Steinhauer Da (2005) Influenza a viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *J Virol*, **79**, 1262-1270.
- Calder Lj, Wasilewski S, Berriman Ja, Rosenthal Pb (2010) Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 10685-10690.
- Cardone G, Grunewald K, Steven Ac (2005) A resolution criterion for electron tomography based on cross-validation. *J Struct Biol*, **151**, 117-129.
- Colman Pm, Varghese Jn, Laver Wg (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, **303**, 41-44.
- Coloma R, Valpuesta Jm, Arranz R, Carrascosa Jl, Ortin J, Martin-Benito J (2009) The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog*, **5**, e1000491.
- Compans Rw, Content J, Duesberg Ph (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol*, **10**, 795-800.
- Crepin T, Dias A, Palencia A, Swale C, Cusack S, Ruigrok Rw (2010) Mutational and metal binding analysis of the endonuclease domain of the influenza virus polymerase PA subunit. *J Virol*, **84**, 9096-9104.
- Cros Jf, Garcia-Sastre A, Palese P (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*, **6**, 205-213.
- Chan Wh, Ng Ak, Robb Nc, Lam Mk, Chan Pk, Au Sw, Wang Jh, Fodor E, Shaw Pc (2010) Functional analysis of the influenza virus H5N1 nucleoprotein tail loop reveals amino acids that are crucial for oligomerization and ribonucleoprotein activities. *J Virol*, **84**, 7337-7345.
- Chase G, Deng T, Fodor E, Leung Bw, Mayer D, Schwemmle M, Brownlee G (2008) Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture. *Virology*, **377**, 431-439.
- Chen Bj, Leser Gp, Jackson D, Lamb Ra (2008) The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol*, **82**, 10059-10070.
- Chen Gl, Subbarao K (2009) Attacking the flu: neutralizing antibodies may lead to 'universal' vaccine. *Nat Med*, **15**, 1251-1252.
- Chen J, Lee Kh, Steinhauer Da, Stevens Dj, Skehel Jj, Wiley Dc (1998) Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, **95**, 409-417.
- Chou Yy, Vafabakhsh R, Doganay S, Gao Q, Ha T, Palese P (2012) One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 9101-9106.
- Davey J, Dimmock Nj, Colman A (1985) Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. *Cell*, **40**, 667-675.

- Deng T, Sharps J, Fodor E, Brownlee Gg (2005) In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol*, **79**, 8669-8674.
- Desselberger U, Racaniello Vr, Zazra Jj, Palese P (1980) The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene*, **8**, 315-328.
- Detjen Bm, St Angelo C, Katze Mg, Krug Rm (1987) The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol*, **61**, 16-22.
- Dias A, Bouvier D, Crepin T, Mccarthy Aa, Hart Dj, Baudin F, Cusack S, Ruigrok Rw (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, **458**, 914-918.
- Digard P, Blok Vc, Inglis Sc (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology*, **171**, 162-169.
- Egelman Eh (2000) A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. *Ultramicroscopy*, **85**, 225-234.
- Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, Mccauley J, Digard P (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, **75**, 408-419.
- Elleman Cj, Barclay Ws (2004) The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology*, **321**, 144-153.
- Fernandez Jj, Li S, Crowther Ra (2006) CTF determination and correction in electron cryotomography. *Ultramicroscopy*, **106**, 587-596.
- Fodor E, Crow M, Mingay Lj, Deng T, Sharps J, Fechter P, Brownlee Gg (2002) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol*, **76**, 8989-9001.
- Fodor E, Pritlove Dc, Brownlee Gg (1994) The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol*, **68**, 4092-4096.
- Fodor E, Seong Bl, Brownlee Gg (1993) Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol*, **74 (Pt 7)**, 1327-1333.
- Fodor E, Smith M (2004) The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol*, **78**, 9144-9153.
- Fouchier Ra, Munster V, Wallensten A, Bestebroer Tm, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan Gf, Olsen B, Osterhaus Ad (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, **79**, 2814-2822.
- Gastaminza P, Perales B, Falcon Am, Ortin J (2003) Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J Virol*, **77**, 5098-5108.
- Ghanem A, Mayer D, Chase G, Tegge W, Frank R, Kochs G, Garcia-Sastre A, Schwemmle M (2007) Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase. *J Virol*, **81**, 7801-7804.
- Gibbs Js, Malide D, Hornung F, Bennink Jr, Yewdell Jw (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol*, **77**, 7214-7224.

- Gibbs Mj, Armstrong Js, Gibbs Aj (2001a) The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of 'Spanish flu' was a recombinant. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 1845-1855.
- Gibbs Mj, Armstrong Js, Gibbs Aj (2001b) Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 "Spanish flu". *Science*, **293**, 1842-1845.
- Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A (2000) Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol*, **74**, 11538-11547.
- Gomez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Perez-Pastrana E, Portela A (1999) Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol*, **80** (Pt 7), 1635-1645.
- Gonzalez S, Ortin J (1999a) Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol*, **73**, 631-637.
- Gonzalez S, Ortin J (1999b) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J*, **18**, 3767-3775.
- Gonzalez S, Zurcher T, Ortin J (1996) Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4456-4463.
- Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok Rw, Ortin J, Hart Dj, Cusack S (2008) The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 500-506.
- Hara K, Schmidt Fi, Crow M, Brownlee Gg (2006) Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol*, **80**, 7789-7798.
- Harris A, Cardone G, Winkler Dc, Heymann Jb, Brecher M, White Jm, Steven Ac (2006) Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19123-19127.
- Harris A, Forouhar F, Qiu S, Sha B, Luo M (2001) The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology*, **289**, 34-44.
- Hay Aj, Gregory V, Douglas Ar, Lin Yp (2001) The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 1861-1870.
- Hay Aj, Lomniczi B, Bellamy Ar, Skehel Jj (1977) Transcription of the influenza virus genome. *Virology*, **83**, 337-355.
- Hay Aj, Skehel Jj, Mccauley J (1982) Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology*, **116**, 517-522.
- Hay Aj, Wolstenholme Aj, Skehel Jj, Smith Mh (1985) The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*, **4**, 3021-3024.
- He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z, Liu Y (2008) Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature*, **454**, 1123-1126.
- Heggeness Mh, Smith Pr, Ulmanen I, Krug Rm, Choppin Pw (1982) Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology*, **118**, 466-470.
- Helenius A (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell*, **69**, 577-578.

- Hemerka Jn, Wang D, Weng Y, Lu W, Kaushik Rs, Jin J, Harmon Af, Li F (2009) Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol*, **83**, 3944-3955.
- Hobson Sd, Rosenblum Es, Richards Oc, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz Sc (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J*, **20**, 1153-1163.
- Holsinger Lj, Lamb Ra (1991) Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology*, **183**, 32-43.
- Honda A, Mukaigawa J, Yokoiyama A, Kato A, Ueda S, Nagata K, Krystal M, Nayak Dp, Ishihama A (1990) Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem*, **107**, 624-628.
- Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A (1987) Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J Biochem*, **102**, 1241-1249.
- Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A (1988) RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem*, **104**, 1021-1026.
- Horimoto T, Kawaoka Y (2005) Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 591-600.
- Huang Ts, Palese P, Krystal M (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol*, **64**, 5669-5673.
- Huiskonen Jt, Hepojoki J, Laurinmaki P, Vaheri A, Lankinen H, Butcher Sj, Grunewald K (2010) Electron cryotomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses. *J Virol*, **84**, 4889-4897.
- Hutchinson Ec, Fodor E (2012) Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine*, **30**, 7353-7358.
- Hutchinson Ec, Orr Oe, Man Liu S, Engelhardt Og, Fodor E (2011) Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor Ran-binding protein 5. *J Gen Virol*, **92**, 1859-1869.
- Hutchinson Ec, Von Kirchbach Jc, Gog Jr, Digard P (2010) Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol*, **91**, 313-328.
- Inglis Sc, Brown Cm (1981) Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Res*, **9**, 2727-2740.
- Inglis Sc, Mahy Bw (1979) Polypeptides specified by the influenza virus genome. 3. Control of synthesis in infected cells. *Virology*, **95**, 154-164.
- Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y (2006) The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol*, **80**, 5233-5240.
- Jennings Pa, Finch Jt, Winter G, Robertson Js (1983) Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA? *Cell*, **34**, 619-627.
- Jorba N, Area E, Ortin J (2008) Oligomerization of the influenza virus polymerase complex in vivo. *J Gen Virol*, **89**, 520-524.
- Jorba N, Coloma R, Ortin J (2009) Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog*, **5**, e1000462.
- Kato A, Mizumoto K, Ishihama A (1985) Purification and enzymatic properties of an RNA polymerase-RNA complex from influenza virus. *Virus Res*, **3**, 115-127.
- Kawaguchi A, Momose F, Nagata K (2011) Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol*, **85**, 6197-6204.

- Kerry Ps, Willsher N, Fodor E (2008) A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. *Virology*, **373**, 202-210.
- Kilbourne Ed (1980) Influenza: viral determinants of the pathogenicity and epidemicity of an invariant disease of variable occurrence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **288**, 291-297.
- Kilbourne Ed, Smith C, Brett I, Pokorny Ba, Johansson B, Cox N (2002) The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10748-10752.
- Klumpp K, Ruigrok Rw, Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J*, **16**, 1248-1257.
- Kowalinski E, Zubieta C, Wolkerstorfer A, Szolar Oh, Ruigrok Rw, Cusack S (2009) Structural analysis of specific metal chelating inhibitor binding to the endonuclease domain of influenza pH1N1 (2009) polymerase. *PLoS Pathog*, **8**, e1002831.
- Kremer Jr, Mastronarde Dn, Mcintosh Jr (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*, **116**, 71-76.
- Krug Rm, Broni Ba, Bouloy M (1979) Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell*, **18**, 329-334.
- Krug Rm, Ueda M, Palese P (1975) Temperature-sensitive mutants of influenza WSN virus defective in virus-specific RNA synthesis. *J Virol*, **16**, 790-796.
- Lamb Ra, Choppin Pw (1983) The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, **52**, 467-506.
- Lee Mt, Bishop K, Medcalf L, Elton D, Digard P, Tiley L (2002) Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **30**, 429-438.
- Li Ml, Ramirez Bc, Krug Rm (1998) RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *EMBO J*, **17**, 5844-5852.
- Li X, Palese P (1994) Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol*, **68**, 1245-1249.
- Ludtke Sj, Baldwin Pr, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, **128**, 82-97.
- Luo Gx, Luytjes W, Enami M, Palese P (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*, **65**, 2861-2867.
- Luytjes W, Krystal M, Enami M, Parvin Jd, Palese P (1989) Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell*, **59**, 1107-1113.
- Lyle Jm, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science*, **296**, 2218-2222.
- Mahy Bwj (1983) Mutants of influenza virus. In "Genetics influenza viruses". **P.Palese and D.W.Kingsbury** , eds, 192-253.
- Maier Hj, Kashiwagi T, Hara K, Brownlee Gg (2008) Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology*, **370**, 194-204.
- Marion Rm, Zurcher T, De La Luna S, Ortin J (1997) Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol*, **78** (Pt 10), 2447-2451.

- Martin-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta Jm, Carrascosa JI, Ortin J (2001) Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep*, **2**, 313-317.
- Martin K, Helenius A (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, **67**, 117-130.
- Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, Kitaoka S, Mizuta K, Nishimura H (2006) Clinical features of influenza C virus infection in children. *J Infect Dis*, **193**, 1229-1235.
- Mazur I, Anhlan D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S (2008) The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol*, **10**, 1140-1152.
- Mcauley JI, Hornung F, Boyd KI, Smith Am, Mckeon R, Bennink J, Yewdell Jw, Mccullers Ja (2007) Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe*, **2**, 240-249.
- Mccown Mf, Pekosz A (2005) The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J Virol*, **79**, 3595-3605.
- Mccown Mf, Pekosz A (2006) Distinct domains of the influenza a virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol*, **80**, 8178-8189.
- Medcalf L, Poole E, Elton D, Digard P (1999) Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol*, **73**, 7349-7356.
- Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortin J, Arrese M, Vallejo D, Portela A (1999) Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol*, **73**, 1186-1194.
- Moeller A, Kirchdoerfer Rn, Potter Cs, Carragher B, Wilson Ia (2012) Organization of the influenza virus replication machinery. *Science*, **338**, 1631-1634.
- Momose F, Basler Cf, O'neill Re, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K (2001) Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol*, **75**, 1899-1908.
- Moscona A (2005) Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*, **353**, 1363-1373.
- Mostow Sr, Schoenbaum Sc, Dowdle Wr, Coleman Mt, Kaye Hs, Hierholzer Jc (1970) Studies on inactivated influenza vaccines. II. Effect of increasing dosage on antibody response and adverse reactions in man. *Am J Epidemiol*, **92**, 248-256.
- Mukaigawa J, Nayak Dp (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol*, **65**, 245-253.
- Murti Kg, Bean Wj, Jr., Webster Rg (1980) Helical ribonucleoproteins of influenza virus: an electron microscopic analysis. *Virology*, **104**, 224-229.
- Murti Kg, Webster Rg, Jones Im (1988) Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology*, **164**, 562-566.
- Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K (2007) Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol*, **81**, 1339-1349.
- Nath St, Nayak Dp (1990) Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). *Mol Cell Biol*, **10**, 4139-4145.

- Nayak Dp, Chambers Tm, Akkina Rk (1985) Defective-interfering (DI) RNAs of influenza viruses: origin, structure, expression, and interference. *Curr Top Microbiol Immunol*, **114**, 103-151.
- Nayak Dp, Hui Ek, Barman S (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*, **106**, 147-165.
- Neumann G, Brownlee Gg, Fodor E, Kawaoka Y (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **283**, 121-143.
- Neumann G, Castrucci Mr, Kawaoka Y (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*, **71**, 9690-9700.
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, **459**, 931-939.
- Ng Ak, Lam Mk, Zhang H, Liu J, Au Sw, Chan Pk, Wang J, Shaw Pc (2012) Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein. *J Virol*, **86**, 6758-6767.
- Ng Ak, Zhang H, Tan K, Li Z, Liu Jh, Chan Pk, Li Sm, Chan Wy, Au Sw, Joachimiak A, Walz T, Wang Jh, Shaw Pc (2008) Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J*, **22**, 3638-3647.
- Nicholls Jm, Chan Rw, Russell Rj, Air Gm, Peiris Js (2008) Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol*, **16**, 149-157.
- Nieto A, De La Luna S, Barcena J, Portela A, Ortin J (1994) Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol*, **75** (Pt 1), 29-36.
- Noble E, Cox A, Deval J, Kim B (2012) Endonuclease substrate selectivity characterized with full-length PA of influenza A virus polymerase. *Virology*, **433**, 27-34.
- Noda T (2012) Native morphology of influenza virions. *Front Microbiol*, **2**, 269.
- Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng Rh, Kawaoka Y (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, **439**, 490-492.
- Noda T, Sugita Y, Aoyama K, Hirase A, Kawakami E, Miyazawa A, Sagara H, Kawaoka Y (2012) Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nat Commun*, **3**, 639.
- O'Neill Re, Palese P (1995) NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology*, **206**, 116-125.
- O'Neill Re, Talon J, Palese P (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*, **17**, 288-296.
- Ortega J, Martin-Benito J, Zurcher T, Valpuesta Jm, Carrascosa Jl, Ortin J (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol*, **74**, 156-163.
- Ortin J, Najera R, Lopez C, Davila M, Domingo E (1980) Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene*, **11**, 319-331.
- Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y (2007) Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol*, **81**, 30-41.
- Palese P, Shaw M (2007) Orthomyxoviridae. In: *Fields Virology* (ed Knipe Dm Hp, Griffin De, Lamb Ra, Martin Ma, Roizman B, Straus Se (Eds).), Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia., pp. 1647-1689.

- Parvin Jd, Palese P, Honda A, Ishihama A, Krystal M (1989) Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase. *J Virol*, **63**, 5142-5152.
- Perales B, Ortin J (1997) The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol*, **71**, 1381-1385.
- Perez Dr, Donis Ro (1995) A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol*, **69**, 6932-6939.
- Pettersen Ef, Goddard Td, Huang Cc, Couch Gs, Greenblatt Dm, Meng Ec, Ferrin Te (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**, 1605-1612.
- Pinto Lh, Holsinger Lj, Lamb Ra (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- Plotch Sj, Bouloy M, Ulmanen I, Krug Rm (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, **23**, 847-858.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, **8**, 3867-3874.
- Pons M, Hirst Gk (1969) The single- and double-stranded RNA's and the proteins of incomplete influenza virus. *Virology*, **38**, 68-72.
- Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P (2004) Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*, **321**, 120-133.
- Poon Ll, Pritlove Dc, Sharps J, Brownlee Gg (1998) The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol*, **72**, 8214-8219.
- Portela A, Digard P (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, **83**, 723-734.
- Pritlove Dc, Poon Ll, Fodor E, Sharps J, Brownlee Gg (1998) Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences. *J Virol*, **72**, 1280-1286.
- Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, Murakami S (2002) Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*, **277**, 2132-2137.
- Rao P, Yuan W, Krug Rm (2003) Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *EMBO J*, **22**, 1188-1198.
- Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J (2011) The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol*, **8**, 207-215.
- Resa-Infante P, Jorba N, Zamarrero N, Fernandez Y, Juarez S, Ortin J (2008) The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS One*, **3**, e3904.
- Resa-Infante P, Recuero-Checa Ma, Zamarrero N, Llorca O, Ortin J (2010) Structural and functional characterization of an influenza virus RNA polymerase-genomic RNA complex. *J Virol*, **84**, 10477-10487.
- Robb Nc, Chase G, Bier K, Vreede Ft, Shaw Pc, Naffakh N, Schwemmler M, Fodor E (2011) The influenza A virus NS1 protein interacts with the nucleoprotein of viral ribonucleoprotein complexes. *J Virol*, **85**, 5228-5231.
- Robb Nc, Smith M, Vreede Ft, Fodor E (2009) NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol*, **90**, 1398-1407.

- Robertson Js (1979) 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res*, **6**, 3745-3757.
- Rossman Js, Jing X, Leser Gp, Lamb Ra (2010) Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, **142**, 902-913.
- Ruigrok Rw, Baudin F (1995) Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol*, **76 (Pt 4)**, 1009-1014.
- Ruigrok Rw, Calder Lj, Wharton Sa (1989) Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure. *Virology*, **173**, 311-316.
- Ruigrok Rw, Crepin T, Hart Dj, Cusack S (2010) Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Curr Opin Struct Biol*, **20**, 104-113.
- Ruigrok Rw, Crepin T, Kolakofsky D (2011) Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol*, **14**, 504-510.
- Sanz-Ezquerro Jj, De La Luna S, Ortin J, Nieto A (1995) Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol*, **69**, 2420-2426.
- Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem*, **274**, 2038-2044.
- Scheres Sh, Gao H, Valle M, Herman Gt, Eggermont Pp, Frank J, Carazo Jm (2007) Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nat Methods*, **4**, 27-29.
- Scheres Sh, Nunez-Ramirez R, Sorzano Co, Carazo Jm, Marabini R (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat Protoc*, **3**, 977-990.
- Schulze It (1972) The structure of influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. *Virology*, **47**, 181-196.
- Simpson-Holley M, Ellis D, Fisher D, Elton D, Mccauley J, Digard P (2002) A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology*, **301**, 212-225.
- Skehel Jj, Wiley Dc (1995) Influenza viruses and cell membranes. *Am J Respir Crit Care Med*, **152**, S13-15.
- Smith Gl, Hay Aj (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology*, **118**, 96-108.
- Sorzano Co, Bilbao-Castro Jr, Shkolnisky Y, Alcorlo M, Melero R, Caffarena-Fernandez G, Li M, Xu G, Marabini R, Carazo Jm (2010) A clustering approach to multireference alignment of single-particle projections in electron microscopy. *J Struct Biol*, **171**, 197-206.
- Sorzano Co, Marabini R, Velazquez-Muriel J, Bilbao-Castro Jr, Scheres Sh, Carazo Jm, Pascual-Montano A (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol*, **148**, 194-204.
- Stegmann T, Booy Fp, Wilschut J (1987a) Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem*, **262**, 17744-17749.
- Stegmann T, Morselt Hw, Scholma J, Wilschut J (1987b) Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta*, **904**, 165-170.

- Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame Jr, Nagata K, Park Sy (2009) Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *EMBO J*, **28**, 1803-1811.
- Sugrue Rj, Hay Aj (1991) Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*, **180**, 617-624.
- Suzuki Y (2006) Natural selection on the influenza virus genome. *Mol Biol Evol*, **23**, 1902-1911.
- Suzuki Y, Kobayashi Y (2012) Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments. *Infect Genet Evol*, **13**, 175-179.
- Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas Pj, Bougault Cm, Boulo S, Baudin F, Ruigrok Rw, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre Jp, Hart Dj (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 229-233.
- Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok Rw, Cusack S, Hart Dj (2008) Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog*, **4**, e1000136.
- Tauber S, Ligertwood Y, Quigg-Nicol M, Dutia Bm, Elliott Rm (2012) Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo. *J Gen Virol*, **93**, 840-849.
- Tiley Ls, Hagen M, Matthews Jt, Krystal M (1994) Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol*, **68**, 5108-5116.
- Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo Da, Chen Lm, Recuenco S, Ellison Ja, Davis Ct, York Ia, Turmelle As, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil Mr, Tang K, Rowe La, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade Ka, Cox Nj, Anderson Lj, Rupprecht Ce, Donis Ro (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 4269-4274.
- Torreira E, Schoehn G, Fernandez Y, Jorba N, Ruigrok Rw, Cusack S, Ortin J, Llorca O (2007) Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3774-3783.
- Toyoda T, Adyshev Dm, Kobayashi M, Iwata A, Ishihama A (1996) Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol*, **77 (Pt 9)**, 2149-2157.
- Turrell L, Lyall Jw, Tiley Ls, Fodor E, Vreede Ft (2013) The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, **4**, 1591.
- Ulmanen I, Broni Ba, Krug Rm (1981) Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7355-7359.
- Varghese Jn, Laver Wg, Colman Pm (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, **303**, 35-40.
- Vreede Ft, Brownlee Gg (2007) Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol*, **81**, 2196-2204.
- Vreede Ft, Jung Te, Brownlee Gg (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol*, **78**, 9568-9572.

- Wang P, Palese P, O'Neill Re (1997) The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol*, **71**, 1850-1856.
- Wang Qm, Hockman Ma, Staschke K, Johnson Rb, Case Ka, Lu J, Parsons S, Zhang F, Rathnachalam R, Kirkegaard K, Colacino Jm (2002) Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, **76**, 3865-3872.
- Weber F, Kochs G, Gruber S, Haller O (1998) A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. *Virology*, **250**, 9-18.
- Webster Rg, Bean Wj, Gorman Ot, Chambers Tm, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, **56**, 152-179.
- Weis W, Brown Jh, Cusack S, Paulson Jc, Skehel Jj, Wiley Dc (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, **333**, 426-431.
- Wilson Ia, Skehel Jj, Wiley Dc (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, **289**, 366-373.
- Wise Hm, Foeglein A, Sun J, Dalton Rm, Patel S, Howard W, Anderson Ec, Barclay Ws, Digard P (2009) A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, **83**, 8021-8031.
- Wriggers W (2010) Using Situs for the integration of multi-resolution structures. *Biophys Rev*, **2**, 21-27.
- Wu Ww, Weaver Ll, Pante N (2007) Ultrastructural analysis of the nuclear localization sequences on influenza A ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol*, **374**, 910-916.
- Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le Mq, Nidom Ca, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire Lf, Stevens Dj, Russell Rj, Gamblin Sj, Skehel Jj, Kawaoka Y (2006) Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, **444**, 378-382.
- Yamanaka K, Ishihama A, Nagata K (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem*, **265**, 11151-11155.
- Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*, **196**, 249-255.
- Ye Q, Guu Ts, Mata Da, Kuo Rl, Smith B, Krug Rm, Tao Yj (2012) Biochemical and structural evidence in support of a coherent model for the formation of the double-helical influenza A virus ribonucleoprotein. *MBio*, **4**, e00467-00412.
- Ye Q, Krug Rm, Tao Yj (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, **444**, 1078-1082.
- Yewdell Jw, Ince Wl (2012) Virology. Frameshifting to PA-X influenza. *Science*, **337**, 164-165.
- Young Rj, Content J (1971) 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nat New Biol*, **230**, 140-142.
- Yu M, Liu X, Cao S, Zhao Z, Zhang K, Xie Q, Chen C, Gao S, Bi Y, Sun L, Ye X, Gao Gf, Liu W (2012) Identification and characterization of three novel nuclear export signals in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol*, **86**, 4970-4980.

Referencias

- Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature*, **458**, 909-913.
- Zhao H, Ekstrom M, Garoff H (1998) The M1 and NP proteins of influenza A virus form homo- but not heterooligomeric complexes when coexpressed in BHK-21 cells. *J Gen Virol*, **79** (Pt 10), 2435-2446.
- Zharikova D, Mozdzanowska K, Feng J, Zhang M, Gerhard W (2005) Influenza type A virus escape mutants emerge in vivo in the presence of antibodies to the ectodomain of matrix protein 2. *J Virol*, **79**, 6644-6654.

MATERIAL COMPLEMENTARIO

PUBLICACIONES

