



Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

**Análisis multidisciplinar de las
relaciones estructura-función de
los componentes del virus de la
bursitis infecciosa**

- TESIS DOCTORAL -

Daniel Luque Buzo
Madrid, 2007



Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

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

Daniel Luque Buzo

Universidad Autónoma de Madrid
Noviembre de 2005

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. José Ruiz Castón
C.N.B.-C.S.I.C.

Dr. Jose Francisco Rodríguez
C.N.B.-C.S.I.C.

Dr. José López Carrascosa
C.N.B.-C.S.I.C.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (C.N.B.-C.S.I.C.) bajo la dirección conjunta de los Drs. José Ruiz Castón, Jose Francisco Rodríguez y José López Carrascosa. Su financiación corrió a cargo de una Beca de Formación Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología. También se contó con la ayuda de una Beca EMBO para la realización de estancias Breves.

ABREVIATURAS

- 3D:** tridimensional (*Three Dimensional*)
- 3DR:** reconstrucción tridimensional (*Three Dimensional Reconstrucción*)
- Å:** Amstrong
- α -XX:** Anticuerpo anti-XX
- aa:** aminoácido
- BTV:** Virus de la lengua azul (*Bluetongue Virus*)
- S:** Coeficiente de Sedimentación
- CPV:** Virus de la poliedrosis citoplasmática (*Cytoplasmatic Polyhedrosis Virus*)
- CrioME:** criomicroscopía electrónica
- C-terminal:** Carboxilo terminal
- CTF:** función de transferencia de contraste (*Contrast Transfer Function*)
- D:** Coeficiente de Difusión
- DNA:** ácido desoxiribonucleico (*Desoxiribo nucleic acid*)
- dsDNA:** ácido desoxiribinucleico de cadena doble (double stranded DNA)
- dsRNA:** ácido ribonucleico de cadena doble (*double stranded RNA*)
- CD:** dicroísmo circular (*Circular Dichroism*)
- DXV:** virus X de Drosophila (*Drosophila X Virus*)
- FRC:** Correlación de anillos de Fourier (*Fourier Ring Correlation*)
- FSC:** *Fourier Shell Correlation*
- HT:** cola de histidinas (*Histidine Tag*)
- Hv190SV:** Virus 190S de *Helminthosporium victoriae* (*Helminthosporium victoriae 190S Virus*)
- IBDV:** virus de la bursitis infecciosa (*Infectious Bursal Disease Virus*)
- IPNV:** virus de la necrosis pancreática infecciosa (*Infectious Pancreatic Necrosis Virus*)
- kb:** kilobase
- kDa:** kiloDalton
- LmTIM:** Triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexiacana* (*Leishmania mexiacana Triose phosphate Isomerase*)
- ME:** microscopía electrónica
- mRNA:** ácido ribonucleico mensajero
- MW:** peso molecular (*Mollecular Weight*)
- MWM:** marcador de peso molecular (*Mollecular Weight Marker*)
- nm:** nanómetro
- NMR:** resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)
- N-terminal:** Amino terminal
- ORF:** fase abierta de lectura (*Open Reading Frame*)
- PcV:** Virus de *Penicillium chrysogenum* (*Penicillium chrysogenum Virus*)
- PFU:** Unidad formadora de placa (*Plaque Forming Unit*)
- PP:** Partícula Física (*Physical Particle*)
- RDV:** Virus enano del arroz (*Rice Dwarf Virus*)
- RdRp:** RNA polimerasa RNA dependiente (*RNA dependent RNA polymerase*)
- RNA:** ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
- RNP:** Ribonucleoproteína (*Ribo Nucleo Protein*)
- rBV:** baculovirus recombinante (*recombinant Baculovirus*)
- rVV:** virus vaccinia recombinante (*recombinant Vaccinia Virus*)
- T:** número de triangulación
- SDS:** dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecil Sulfate*)
- SDS-PAGE:** Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (*SDS Polyacrilamide Gel Elextrophoresis*)
- SSE:** elementos de estructura secundaria (*Secondary Structure Elements*)
- SVP:** Partícula subviral (*Sub Viral Particle*)
- ssDNA:** DNA de cadena simple (single stranded DNA)
- ssRNA:** RNA de cadena simple (*single stranded RNA*)

(+)ssRNA: RNA de cadena simple y polaridad positiva (*positive single stranded RNA*)

(-)ssRNA: RNA de cadena simple y polaridad negativa (*negative single stranded RNA*)

SVP: partícula subviral (*Subviral Particle*)

UTR: región no traducida (*UnTranslated Region*)

VLP: pseudopartícula viral (*Virus Like Particle*)

WB: Inmunodetección de proteínas en membrana (*Western Blot*)

CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

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

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS | 1 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) | 5 |
| 1.2 Organización genómica de IBDV | 6 |
| 1.3 Estructura y morfogénesis de IBDV | 8 |
| 1.3.1 Componentes estructurales del viri3n de IBDV | 8 |
| 1.3.2 Polimorfismo estructural de la prote3na de la c3psida de IBDV | 9 |
| 1.3.3 Estructura at3mica de VP2 | 11 |
| 1.3.4 Interacciones entre elementos estructurales de IBDV | 11 |
| 1.4 Relaciones estructurales y funcionales de IBDV con los virus ssRNA y dsRNA | 15 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 3 MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| 3.1 Material Biol3gico | 25 |
| 3.1.1 C3lulas procariotas | 25 |
| 3.1.2 C3lulas eucariotas | 25 |
| 3.1.3 Pl3smidos | 25 |
| 3.1.4 Virus | 25 |
| 3.1.5 Anticuerpos | 26 |
| 3.2 Manipulaci3n y obtenci3n de vectores recombinantes | 26 |
| 3.2.1 PCR | 26 |
| 3.2.2 Reacciones de ligaci3n de fragmentos de DNA | 26 |
| 3.2.3 Reacciones de restricci3n enzim3tica | 26 |
| 3.2.4 Obtenci3n de pl3smidos recombinantes | 27 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.5 | Obtención de baculovirus recombinantes | 27 |
| 3.3 | Infecciones y expresión de proteínas | 28 |
| 3.3.1 | Infección con rBV | 28 |
| 3.3.2 | Infección con IBDV | 28 |
| 3.3.3 | Marcaje metabólico con [³⁵ S]-Met y [³³ P]-PO ₄ ³⁻ | 28 |
| 3.3.4 | Titulación de IBDV | 28 |
| 3.4 | Purificación de ensamblados virales | 29 |
| 3.4.1 | Purificación de ensamblados derivados de la expresión con rBV | 29 |
| 3.4.2 | Purificación de viriones de IBDV | 29 |
| 3.4.3 | Purificación de ribonucleopartículas virales | 30 |
| 3.4.4 | Purificación del complejo VPg-dsRNA de IBDV | 30 |
| 3.4.5 | Purificación de dsRNA de IBDV | 30 |
| 3.5 | Análisis bioquímico | 30 |
| 3.5.1 | Determinación de la concentración de proteínas | 30 |
| 3.5.2 | Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida | 31 |
| 3.5.3 | Análisis electroforético en geles nativos de agarosa | 31 |
| 3.5.4 | Electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western Blot</i>) | 31 |
| 3.5.5 | Ensayo de accesibilidad a RNasa III | 32 |
| 3.5.6 | Ensayo de actividad polimerasa | 32 |
| 3.5.7 | Cuantificación de la marca radioactiva incorporada | 32 |
| 3.6 | Análisis biofísico | 33 |
| 3.6.1 | Dicroísmo Circular | 33 |
| 3.6.2 | Centrifugación analítica | 33 |
| 3.6.3 | Dispersión de luz dinámica | 34 |
| 3.7 | Microscopía electrónica | 34 |
| 3.7.1 | Adsorción de muestras | 34 |
| 3.7.2 | Contrastado de muestras | 35 |
| 3.7.2.1 | Tinción negativa | 35 |
| 3.7.2.2 | Sombreado metálico | 35 |
| 3.7.3 | Criomicroscopía electrónica | 35 |
| 3.7.4 | Procesamiento digital de imágenes | 36 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.7.5 | Detección de elementos de estructura secundaria | 37 |
| 3.7.6 | Ajuste de estructuras atómicas en mapas de microscopía | 38 |
| 3.7.7 | Manipulación de modelos atómicos | 39 |
| 3.7.8 | Números de acceso de las estructuras de criomicroscopía electrónica | 40 |
| 4 | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | Análisis del polimorfismo estructural de la proteína pVP2/VP2 | 43 |
| 4.1.1 | Expresión de mutantes de delección del dominio C-terminal de pVP2 | 43 |
| 4.1.2 | Análisis por microscopía electrónica de las estructuras pVP2/VP2 | 45 |
| 4.1.3 | Análisis por microscopía electrónica de las estructuras HT-pVP2/VP2 | 46 |
| 4.1.4 | Caracterización del péptido 443-452 del dominio carboxilo terminal de pVP2 | 50 |
| 4.1.5 | Estructura de la partícula subviral T=1 | 51 |
| 4.1.6 | Flexibilidad conformacional de la hélice α_4 del extremo C-terminal de VP2 | 54 |
| 4.1.7 | Estructura de la cápsida T=13 de IBDV | 55 |
| 4.1.8 | Estructura de la cápsida T=13 de la variante HT-VP2-466 | 59 |
| 4.1.9 | Comparación bioquímica y estructural entre las cápsidas de IBDV y HT-VP2-466 | 60 |
| 4.1.10 | Análisis de la cuasiequivalencia de la cápsida T=13 del virión | 62 |
| 4.1.11 | Conformaciones estructurales de la hélice α_4 anfipática 443- 452 | 63 |
| 4.2 | Caracterización de las ribonucleoproteínas de IBDV | 67 |
| 4.2.1 | Purificación de complejos ribonucleoproteicos de IBDV | 67 |
| 4.2.2 | Caracterización bioquímica y funcional de las RNPs de IBDV | 68 |
| 4.2.3 | Caracterización estructural de las RNPs de IBDV | 69 |
| 4.3 | Caracterización de poblaciones naturales de IBDV | 72 |
| 4.3.1 | Purificación de las poblaciones | 72 |
| 4.3.2 | Determinación de la estequiometría de los componentes estructurales de las poblaciones | 73 |
| 4.3.3 | Caracterización biofísica de las poblaciones | 75 |
| 4.3.4 | Caracterización funcional de poblaciones de IBDV | 77 |
| 5 | DISCUSIÓN | 79 |

| | |
|---|-----|
| 5.1 Ensamblaje y maduración de la cápsida de IBDV | 81 |
| 5.1.1 Procesamiento proteolítico de la proteína de la cápsida | 82 |
| 5.1.2 Interruptores moleculares y factores de activación | 83 |
| 5.1.3 Ensamblaje de pentámeros y hexámeros | 85 |
| 5.2 Función de VP3 durante el ciclo viral | 88 |
| 5.3 IBDV, un virus icosaédrico poliploide | 91 |
| 6 CONCLUSIONES | 95 |
| 7 BIBLIOGRAFÍA | 99 |
| 8 PUBLICACIONES | 115 |

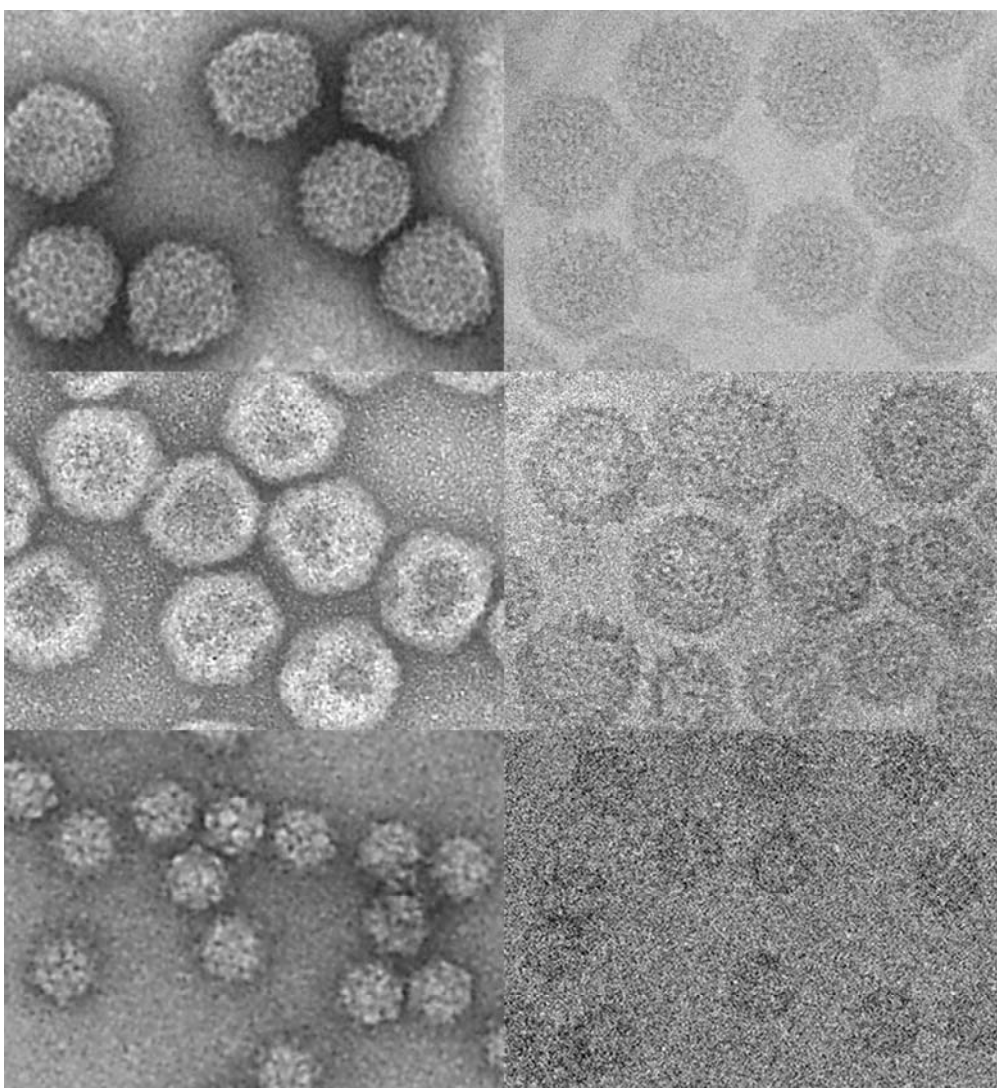
ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS

Infectious bursal disease virus (IBDV), a double-stranded (ds) RNA virus that belongs to the family *Birnaviridae*, is an economically important avian pathogen. Elucidation of the organization of the viral components and their assembly pathway is a key step to understand the IBDV viral cycle, and might provide clues for therapy in new vaccine design and development of new biotechnology tools.

The IBDV viral particle is composed of two major proteins, VP2 and VP3, but its capsid, based on a single-shelled T=13 lattice, is built of VP2 trimers. VP2 is synthesized as a protein precursor, called pVP2, whose C-terminal end is proteolytically processed during the capsid assembly. The structural polymorphism of pVP2, i.e. the ability of VP2 to assemble into hexamers or pentamers, is due to an amphipathic α helix located at this C-terminal end which acts as a transient conformational switch. VP3, the other major protein, would temporally participate in capsid assembly by electrostatic interactions of its C-terminal region with the molecular switch, acting as a molecular triggering factor. In addition, capsid protein oligomerization is also controlled by the progressive trimming of the VP2 C-terminal domain. These molecular mechanisms have been revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy maps at or close to subnanometer resolution combined with atomic models of VP2. Viral assembly is correlated with different conformations of the amphipathic α helix in the precursor capsid, as a five- α -helix bundle at the pentamers or an open star-like conformation at the hexamers. These results are reminiscent of the assembly pathway of positive single-stranded RNA viruses such as nodavirus and tetra virus.

At least six natural virion populations of IBDV can be purified by ultracentrifugation on density gradients from IBDV infected cells. Differences between the IBDV populations are based on their genomic complement; the denser the viral population, the higher the dsRNA content and infectivity efficiency. However, these viral populations share the same protein composition and stoichiometry with an outstanding high copy number of RNA-dependent RNA-polymerase molecules (12). dsRNA molecules at the capsid interior are homogeneously complexed with VP3, making ribonucleoprotein complexes (RNPs). Therefore, VP3 behaves as a scaffolding protein for assembly control but accomplishes additional roles interacting with the genome. We have purified functionally active RNPs that have been biochemically and structurally characterised. Together, all these results point that IBDV is the first described polypliod icosahedral virus.

1 Introducción



Análisis multidisciplinar de las relaciones estructura-función de los componentes del virus de la bursitis infecciosa.

Los virus son un paradigma en la estrategia de optimización de recursos debido a que su limitada capacidad para la codificación de proteínas les hace valerse de principios generales simples para llevar a cabo sus múltiples funciones vitales. Las claves de esta optimización de recursos son el uso de relaciones de simetría y el polimorfismo conformacional de las proteínas estructurales (conformaciones espaciales y temporales). Los contactos intermoleculares en las asociaciones de macromoléculas implican estructuras cuaternarias distintas formadas a partir del mismo producto génico (Johnson y Speir 1997; Harrison 2001; Castón y col. 2008). La flexibilidad conformacional espacial y temporal confiere, al menos, dos ventajas fundamentales: permite que estas superficies de interacción asimilen mutaciones en su evolución, y también que puedan interactuar con numerosos ligandos. Por otra parte, la cápsida viral tiene que encarar múltiples funciones específicas: se ensambla en un compartimento cerrado, selecciona el ácido nucleico viral en el entorno celular, protege el genoma viral durante su transporte de un hospedador a otro, reconoce la siguiente célula huésped y, finalmente, libera el ácido nucleico para su replicación. Algunas cápsidas incluso participan activamente en la replicación del genoma viral (Lawton y col. 1997a; Gouet y col. 1999). Además, tienen que compaginar todas estas funciones con una elevada tasa de mutación para contrarrestar al sistema inmune del hospedador. En consecuencia, la visión de las cápsidas virales como estructuras cerradas inertes es poco adecuada, y deben ser consideradas como estructuras dinámicas.

La arquitectura de los virus icosaédricos puede ser descrita mediante el concepto de la cuasiequivalencia (Caspar y Klug 1962), donde la estructura de la cápsida viene definida por su número de triangulación (T). Los virus más simples están formados por 60 subunidades idénticas dispuestas con simetría icosaédrica, donde todas las subunidades tienen interacciones equivalentes ($T=1$). La formación de cápsidas más grandes, con un volumen adecuado para empaquetar el genoma infeccioso, consiste de múltiplos enteros de 60 subunidades ($T > 1$) con contactos cuasiequivalentes (no idénticos). Es decir, existe una cierta flexibilidad en los contactos intersubunidades, lo que implica ligeras variaciones en la estructura tridimensional de las subunidades proteicas. El número T va a describir por tanto el número de entornos cuasiequivalentes de la subunidad estructural, debiendo modificar ligeramente su plegamiento (en realidad, su patrón de interacciones). En la práctica, los virus muestran un amplio rango de adhesión a este principio, pudiendo disponerse en las diferentes posiciones cuasiequivalentes una única proteína con distintas conformaciones o varias proteínas con conformaciones similares (en cuyo caso se denomina pseudoequivalencia y viene definida por un número P en

lugar de T). Por ello, se habla de cápsidas virales equivalentes, cuasiequivalentes y no-equivalentes.

Los diferentes estados conformacionales pueden estar controlados por factores como regiones proteicas flexibles (bucles y zonas N o C terminales), interacciones con RNA, iones metálicos, pHs o distintas combinaciones entre los anteriores (Johnson 1996). Si consideramos el ensamblaje de virus especialmente grandes y/o complejos, estos factores, denominados interruptores moleculares (*molecular switches*), suelen ser insuficientes. Así, la formación de cápsidas complejas puede requerir una o varias proteínas auxiliares (proteínas de andamiaje, accesorias y/o proteasas) que van a actuar como factores morfogénicos que inducen los cambios estructurales necesarios (Dokland 2000; Morais y col. 2004).

La comprensión de los procesos biológicos mediados por asociaciones de macromoléculas, incluyendo las cápsidas virales, requiere establecer la organización de sus componentes (Thornton y col. 2000; Sali y col. 2003). La difracción de rayos X y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) proporcionan información acerca de las estructuras atómicas de los módulos o subunidades de los complejos supramoleculares. Debido a la dificultad en la producción y cristalización para su análisis por rayos X, la cantidad de estructuras determinadas para estas asociaciones de macromoléculas es baja en comparación con los componentes individuales resueltos. La microscopía electrónica (ME) representa el nexo de unión entre las biología celular y estructural de alta resolución, ya que facilita la comprensión de la estructura atómica en su contexto biológico (a menor resolución), especialmente cuando tanto los ensamblados macromoleculares como sus interrelaciones están implicados.

La aplicación de los métodos de criomicroscopía electrónica (crioME) ha experimentado un crecimiento dramático en los últimos años, ya que permite la visualización directa de ensamblados macromoleculares en su conformación nativa. La combinación de la crioME con métodos de procesamiento de imágenes ha permitido obtener una visión muy completa y detallada de la organización estructural de numerosas macromoléculas y agregados supramoleculares en tres dimensiones como ribosomas, complejo del poro nuclear, RNA polimerasa, microtúbulos, flagelo bacteriano, chaperonas, virus, etc. (Hinshaw y col. 1992; Nogales y col. 1995; Verschoor y col. 1996; Baker y col. 1999; Llorca y col. 1999; Ranson y col. 2001; Yonekura y col. 2003; Kostek y col. 2006). Y, lo que probablemente es más importante, permite un análisis dinámico de dichas máquinas moleculares, que a menudo son complejos transitorios. Por tanto, se presenta como una aproximación experimental básica para la comprensión mecánica de los procesos celulares y bioquímicos.

Las razones del tremendo impulso que ha experimentado la criome son, básicamente, (i) el incremento en resolución de los volúmenes reconstruidos (hasta 5-6 Å), y (ii) la posibilidad de analizar las máquinas moleculares, no sólo en su conformación nativa, sino también en su contexto celular, mediante métodos de tomografía electrónica (Baumeister y Steven 2000). En el campo de la criome, estos avances requieren de métodos bioinformáticos para deducir el plegamiento del complejo (ajuste de estructuras atómicas o modelos homólogos, predicción de elementos de estructura secundaria, etc.).

1.1 El virus de la bursitis infecciosa (IBDV)

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

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

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

1.2 Organización genómica de IBDV

El genoma de IBDV está formado por dos segmentos de RNA de cadena doble (dsRNA) de 3,2 kb (segmento A) y 2.8 kb (segmento B) (Muller y col. 1979; Muller y Nitschke 1987a) con regiones no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3'. El proceso de transcripción del dsRNA viral se lleva a cabo de forma semiconservativa (Spies y col. 1987), siendo la hebra positiva desplazada por el RNA de nueva síntesis (*Figura 1*).

El segmento A contiene dos fases abiertas de lectura (ORFs) parcialmente solapantes. La primera de ellas codifica la proteína no estructural VP5 (145 aa, 17 kDa), una proteína citolítica de membrana (Lombardo y col. 2000) que, aunque dispensable para la replicación del virus en cultivos celulares (Mundt y col. 1997), es importante en la patogénesis *in vivo*, ya que probablemente está implicada en la liberación y dispersión de la progenie viral (Yao y col. 1998). La segunda ORF codifica una poliproteína de 107 kDa (1012 aa) que se autoproteolíticamente dando lugar a las proteínas pVP2 (512 aa, 54 kDa), VP4 (244 aa, 25 kDa) y VP3 (256 aa, 28 kDa) en un proceso cotraduccional mediado por la propia VP4 (Kibenge y col. 1988a; 1988b). Inicialmente, se propuso que la proteasa VP4 de los birnavirus utilizaría un mecanismo catalítico mediado por residuos Ser y Lys conservados en su centro activo, lo que las diferenciaría de otras proteasas virales (Birghan y col. 2000; Lejal y col. 2000; Petit y col. 2000). La reciente resolución de la estructura cristalográfica de la VP4 de varios miembros de la familia (Feldman y col. 2006; Lee y col. 2007), ha demostrado la validez de dicha hipótesis, así como la homología estructural con otras proteasas con una diada catalítica Ser/Lys como la proteasa bacteriana Lon (Botos y col. 2004; Botos y col. 2005), las proteínas de respuesta a daño en el DNA LexA (Luo y col. 2001) y UmuD' (Peat y col. 1996), o el represor cI del bacteriófago λ (Bell y col. 2000).

pVP2 es la forma precursora de la proteína estructural de la cápsida, VP2. Los 71 residuos carboxilo terminales de pVP2 (512 aa), comprendidos en el denominado dominio carboxilo terminal de pVP2 (pVP2CTD), son posteriormente procesados para dar lugar a la forma madura, VP2 (441 aa, 48 kDa). Se ha propuesto que la maduración postraduccional de pVP2 está mediada por dos eventos proteolíticos: el procesamiento de los pVP2CTD en dianas secundarias Ala-Ala de la proteína VP4 en las posiciones 487, 494 y 501 (generando hasta cuatro variantes de pVP2), y el procesamiento entre los residuos 441 y 442, mediante un mecanismo aún sin determinar, que da lugar a la proteína VP2 madura. Estos procesos requieren el ensamblaje de la cápsida viral (Chevalier y col. 2002) y los pequeños polipéptidos generados quedan incorporados en las partículas virales (Da Costa y col. 2002) y podrían conferir

irreversibilidad al ensamblaje al igual que ocurre en los procesos morfogénicos de otros sistemas virales (Gallagher y Rueckert 1988; Zlotnick y col. 1994; Schneemann y col. 1998). Además, dichos péptidos poseen la capacidad de desestabilizar membranas, tanto sintéticas como biológicas, y formar poros en las mismas, por lo que ha sido sugerida su implicación en el proceso de internalización del virus (Chevalier y col. 2005; Galloux y col. 2007).

El segmento B contiene una única ORF que codifica la RNA-polimerasa RNA-dependiente (RdRp) viral, una proteína de 97 kDa (879 aa) denominada VP1 (Muller y Nitschke 1987b; Morgan y col. 1988; von Einem y col. 2004) (*Figura 1*). Al igual que las polimerasas de otros virus dsRNA, VP1 cataliza tanto la transcripción como la replicación del genoma viral (Spies y col. 1987; Xu y col. 2004; Pan y col. 2007), siendo la síntesis de RNA iniciada mediante el cebado proteico del RNA molde (Muller y Nitschke 1987b; Spies y Muller 1990). Aunque la polimerización y el cebado del RNA suelen ser llevados a cabo por componentes virales diferentes, en el caso de los birnavirus la polimerasa realiza ambas funciones. VP1 tiene actividad de autoguanilación mediante la cual es capaz de cebar la síntesis de RNA (Spies y Muller 1990; Dobos 1993; Shwed y col. 2002; Xu y col. 2004). Tras este proceso, la proteína VP1 permanece covalentemente unida a los extremos 5' del RNA viral de nueva síntesis. Esta forma de VP1 es denominada VPg.

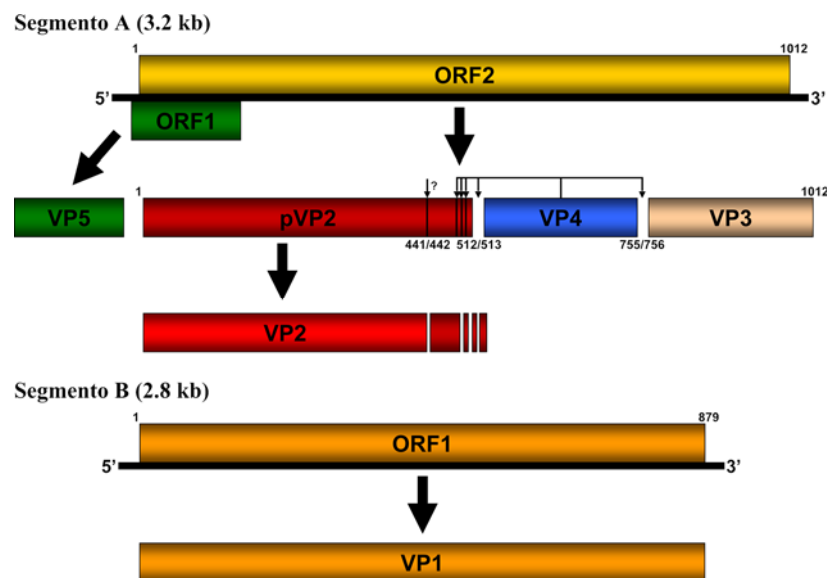


Figura 1. Organización genómica de IBDV. El segmento A contiene dos ORFs que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral, respectivamente. La poliproteína es procesada cotraduccionalmente dando lugar a las proteínas pVP2, VP3 y VP4. pVP2 es procesada postraduccionalmente en su extremo carboxilo terminal para dar lugar a la forma madura VP2. El segmento B contiene una única ORF que codifica la RNA-polimerasa RNA dependiente (RdRp), VP1.

1.3 Estructura y morfogénesis de IBDV

1.3.1 Componentes estructurales del virión de IBDV

IBDV es un virus icosaédrico carente de envuelta lipídica. La estructura tridimensional (3D) de la partícula viral, resuelta mediante reconstrucción de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica, ha mostrado que el virus presenta una única envuelta proteica (Böttcher y col. 1997; Castón y col. 2001). La cápsida del virión muestra una topografía molecular basada en un número de triangulación $T=13$, presentándose las subunidades fundamentales en forma de trímeros (*Figura 2*). La partícula, de un grosor medio de 9 nm, no presenta un carácter esférico, ya que entre los ejes de orden 5 tiene un diámetro de unos 72 nm, mientras que entre los ejes de orden 3 el diámetro aproximado es de 66 nm. Para partículas altamente simétricas como son los virus, el mapa tridimensional no solamente revela la forma del virus sino también la organización y forma de sus componentes, su estequiometría y los cambios sistemáticos en la conformación de sus unidades estructurales que permiten la formación de la cápsida. Así, la cara externa del virión está formada por un total de 260 protusiones triméricas que se disponen en cinco entornos locales (a-e, mostrado en *Figura 2A*), permitiendo interacciones muy estrechas entre algunos trímeros vecinos, mientras que otros se encuentran muy separados (*Figura 2A*). La cara interna de la cápsida, presenta 200 unidades morfológicas en forma de Y localizadas en las posiciones hexaméricas locales, mientras que en las posiciones pentaméricas aparecen unas densidades anulares como consecuencia del estrecho empaquetamiento de los trímeros en las mismas (*Figura 2B*).

VP2 (junto con una pequeña proporción de pVP2) y VP3 son las proteínas mayoritarias del virión maduro. Además de estos componentes, la partícula viral también contiene los segmentos de dsRNA que constituyen el genoma viral, así como una menor proporción de la polimerasa viral VP1 y de la proteasa VP4 (*Figura 2C, recuadro interior*) (Dobos y col. 1979). La posible incorporación de VP4 a la partícula viral está en entredicho debido a su tendencia a formar estructuras tubulares, denominadas tubos de tipo II, que podrían copurificar con los viriones (Granzow y col. 1997). Aunque los primeros análisis indicaban que la cápsida del virión maduro estaba constituida por VP2 y VP3 (Böttcher y col. 1997), estudios posteriores, así como los resultados del presente trabajo, han demostrado que está formada únicamente por trímeros cuasi-equivalentes de VP2 (Coulibaly y col. 2005; Saugar y col. 2005). Este hecho es coherente con que VP2 reúna los principales marcadores de virulencia y patogenicidad (Brandt y col. 2001; van Loon y col. 2002); así como los epítomos de anticuerpos neutralizantes (Schnitzler y col. 1993) de IBDV.

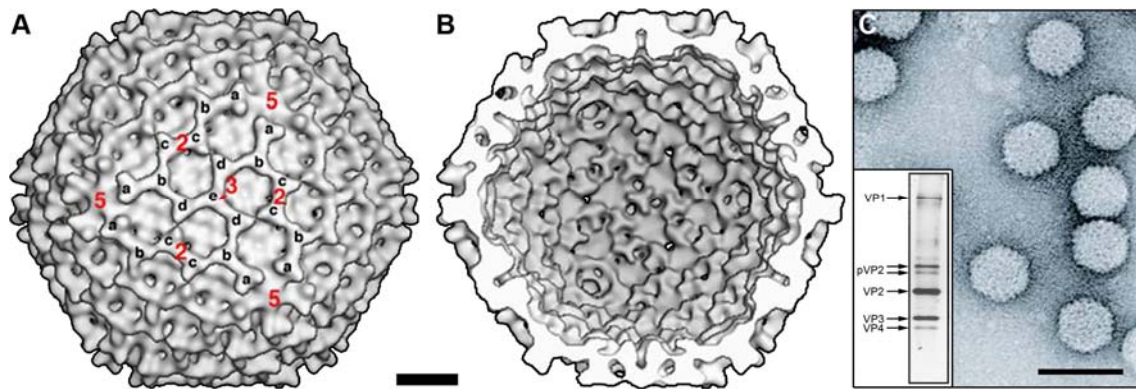


Figura 2. Estructura de la cápsida. (A-B) Estructura tridimensional de las caras externa (A) e interna (B) de la partícula de IBDV a una resolución de 26 Å (Castón y col. 2001). En una cara fundamental del icosaedro se indican las diferentes clases de capsómeros triméricos (a-e) y los ejes de simetría de orden 5, 3 y 2. El enantiómero arbitrariamente mostrado es dextrógiro. La barra de escala corresponde a 100 Å. (C) Viriones de IBDV purificados teñidos negativamente con acetato de uranilo de. La barra corresponde a 100 nm. El recuadro interior muestra el análisis electroforético y tinción con plata de los viriones maduros de IBDV purificados (Lombardo y col. 1999). Se indica con flechas cada una de las proteínas estructurales del virus: VP1 (97kDa), pVP2 (54 kDa), VP2 (48kDa), VP3 (28 kDa) y VP4 (25 kDa).

1.3.2 Polimorfismo estructural de la proteína de la cápsida de IBDV

Una de las aproximaciones más fructíferas para la caracterización del papel específico de cada uno de los polipéptidos individuales, así como de las interacciones de los elementos estructurales de IBDV en el contexto del ensamblaje viral, ha sido el uso de sistemas heterólogos para la expresión de una o varias proteínas que den lugar a la formación de pseudopartículas virales (VLPs) (Fernández-Arias y col. 1998; Lombardo y col. 1999; Martínez-Torrecuadrada y col. 2000; Chevalier y col. 2002; Da Costa y col. 2002).

La expresión de la poliproteína viral en células de mamífero mediante virus vaccinia recombinantes (rVV) (Ward y col. 1995) da lugar a la acumulación de VLPs en el citoplasma de las células infectadas tras el correcto procesamiento de la poliproteína (Fernández-Arias y col. 1998). Dichas VLPs son indistinguibles a 26 Å de resolución de los viriones de IBDV y están compuestas por una proporción variable de pVP2 y VP2, así como por VP3 (Castón y col. 2008). Además, la coinfección de este rVV con otro que expresa VP1, da lugar a la formación de VLPs que incorporan la polimerasa viral (Lombardo y col. 1999). Sin embargo, cuando la poliproteína viral es expresada mediante el sistema de baculovirus recombinantes (rBV) (Smith y col. 1983), los ensamblados predominantes son unas estructuras tubulares de ~50 nm de diámetro y el ensamblaje de VLPs es muy ineficiente (Martínez-Torrecuadrada y col. 2000; Chevalier y col. 2002). Estas estructuras tubulares están formadas por pVP2 y VP3 y se

organizan en una red hexagonal de trímeros similar a los tubos de tipo I observados en las células infectadas con IBDV (Granzow y col. 1997). La formación de estos ensamblados aberrantes está probablemente relacionada con el procesamiento del extremo carboxilo terminal de VP3 (mediado por algún factor del baculovirus o de la célula huésped) que debe jugar un papel fundamental en el correcto ensamblaje de las partículas de IBDV (Maraver y col. 2003b).

La expresión de la forma madura de VP2 con distintos vectores basados en rBV, en ausencia de otras proteínas virales, da lugar a la formación de partículas isométricas con un diámetro de ~26 nm (Castón y col. 2001). La reconstrucción 3D de estas partículas subvirales (SVP) indica que están constituidas por 20 trímeros idénticos de VP2 agrupados exclusivamente en pentámeros que forman una cápsida dodecaédrica con geometría T=1 (*Figura 3A*). Dichos trímeros, presentan la misma morfología y tamaño que los observados en la superficie de la cápsida viral. Sin embargo, la expresión de la forma precursora pVP2 en ausencia de otros componentes virales, da lugar a la formación de estructuras tubulares de baja integridad estructural y con un diámetro de ~16-30 nm consistentes con un ordenamiento hexagonal (*Figura 3B*). Es decir, los dos procesos que tienen lugar durante el ensamblaje de la cápsida viral, formación de pentámeros y hexámeros, han sido separados y, por tanto, cada trímero debe contener la información suficiente para poder ensamblarse como pentámero o como hexámero. Estos resultados indican que la región carboxilo terminal de pVP2 está implicada en el polimorfismo molecular inherente de VP2, o lo que es lo mismo, en su capacidad para adquirir las diferentes conformaciones necesarias para la morfogénesis de la cápsida T=13.

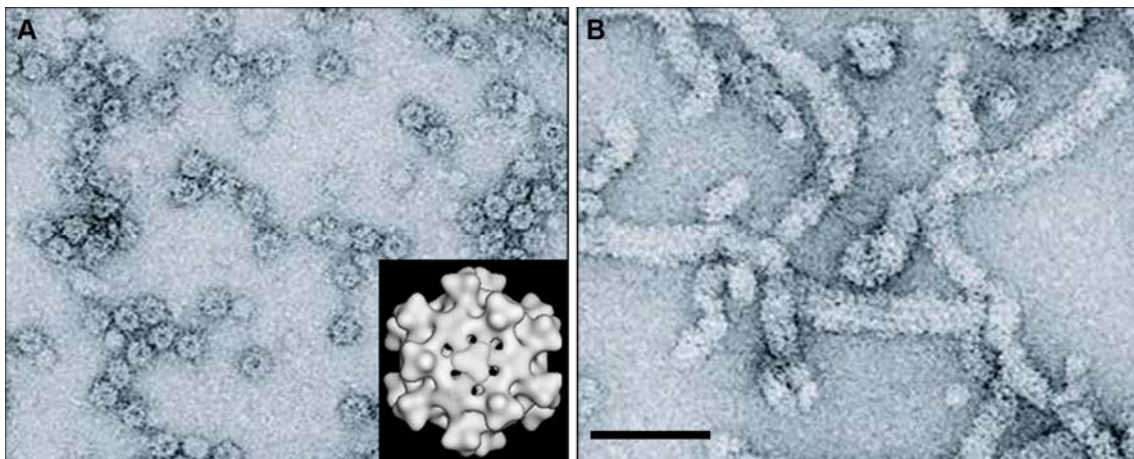


Figura 3. Expresión de pVP2 y VP2 en células de insecto. (A) Tinción negativa con acetato de uranilo de: (A) SVPs T=1 purificadas a partir de células de insecto infectadas con un rBV que expresa la proteína madura VP2. El recuadro interior muestra la 3DR de la SVP a 26 Å de resolución. (B) Tubos flexibles purificados a partir de células de insecto infectadas con un rBV que expresa el precursor pVP2. La barra de escala corresponde a 100 nm.

1.3.3 Estructura atómica de VP2

La estructura atómica de la SVP T=1 de IBDV ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X a 3 Å (PDB 1WCD, Coulibaly y col. 2005) y 2,6 Å (PDB 2GSY y 2DF7, Garriga y col. 2006; Lee y col. 2006). Este hecho ha permitido el trazado de los C_α de VP2 en la cápsida T=13 del virión de IBDV en un mapa de rayos X a 7 Å de resolución (Coulibaly y col. 2005) (PDB 1WCE). La subunidad de VP2 muestra una estructura terciaria con tres dominios, denominados protuberante (*protruding*), armazón (*shell*) y basal (*basement*) (P,B y S respectivamente) (*Figura 4A-B*). Los dominios S y P son barriles β orientados de tal forma que sus láminas β son respectivamente tangenciales (S) y perpendiculares (P) a la superficie de la partícula. El dominio B, esta constituido por una serie de hélices α amino y carboxilo terminales, que tapizan la cara interior de la cápsida (Coulibaly y col. 2005; Garriga y col. 2006).

La gran superficie de contacto en las interacciones intratriméricas de los dominios P, S y B, sugiere que el trímero es la unidad constitutiva básica en el ensamblaje de VP2. Además de estas interacciones, la estabilidad del trímero se encuentra reforzada mediante la coordinación de un ion Ca²⁺ con dos residuos ácidos, D31 y D174, de cada subunidad de VP2 del trímero, en el eje ternario de simetría (*Figura 4C*) (Garriga y col. 2006; Lee y col. 2006). Por otra parte, los contactos intertriméricos en la SVP están mediados por dos tipos de interacciones: contactos laterales entre los dominios S y B en los ejes de simetría de orden 2 y 5, y el intercambio molecular (*molecular swapping*) de la hélice α4 entre trímeros adyacentes a lo largo del eje de simetría de orden 2 (*Figura 4D*) (Garriga y col. 2006).

1.3.4 Interacciones entre elementos estructurales de IBDV

La interacción entre las proteínas mayoritarias VP2 y VP3 ha sido abordada *in vivo* principalmente mediante el uso de vectores de expresión de baculovirus. Mientras que la expresión de VP2 o pVP2 da lugar a un patrón citoplasmático difuso (*Figura 5A-B*), VP3 se distribuye en grandes acúmulos citoplasmáticos perinucleares (*Figura 5C*) (Oña y col. 2004). Este hecho podría deberse a la tendencia de VP3 a oligomerizar a través de su extremo carboxilo terminal (Maraver y col. 2003b). Adicionalmente, La coexpresión de la forma madura de VP2 y VP3 da lugar a patrones citoplasmáticos independientes (*Figura 5D-F*), a partir de las cuales es posible purificar SVPs T=1 compuestas exclusivamente por VP2. Sin embargo, la coexpresión de VP3 con la forma precursora pVP2 da lugar a un patrón de colocación en estructuras semejantes a los viroplasma virales (*Figura 5G-I*). A partir de estas células es

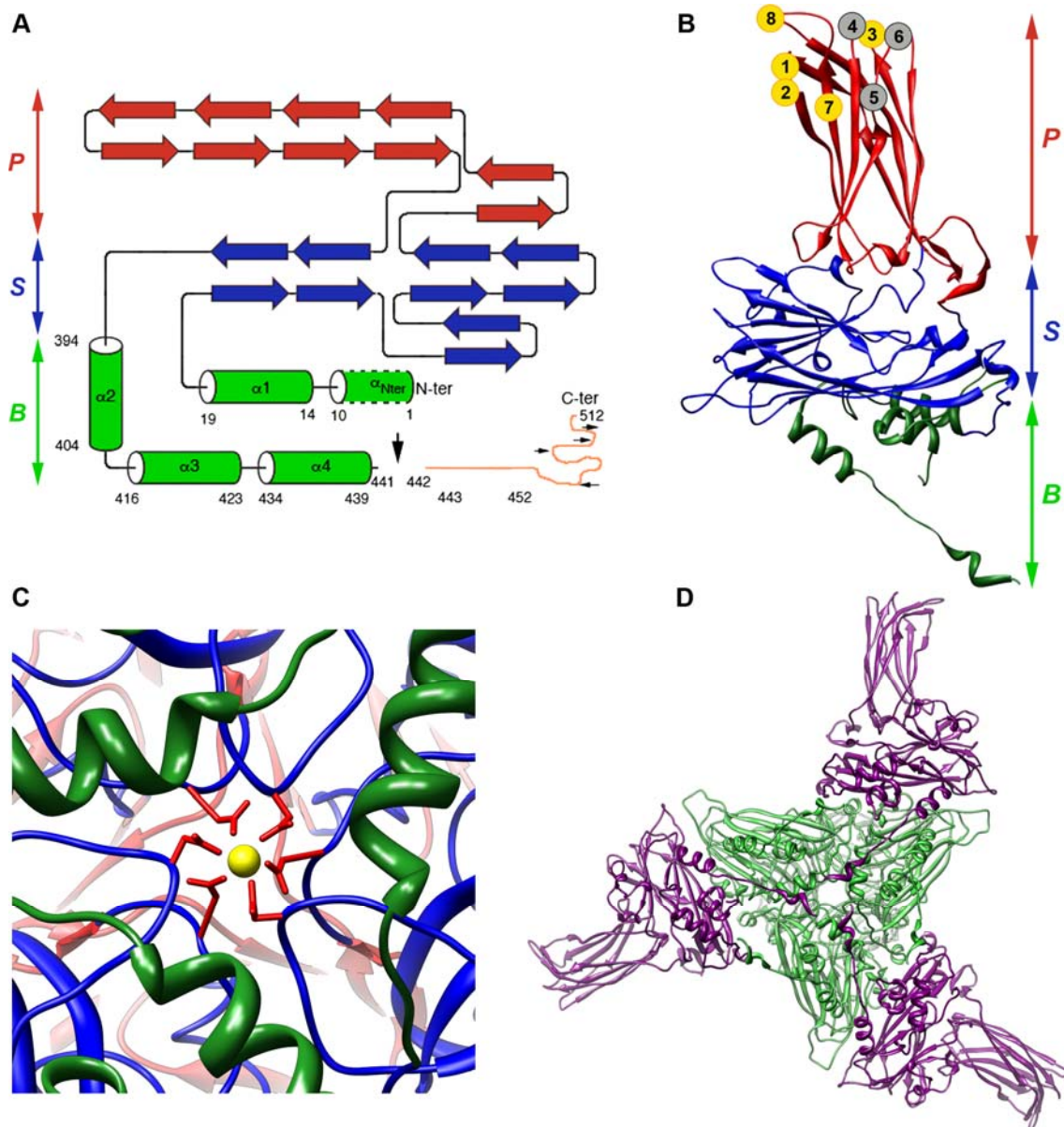


Figura 4. Estructura de VP2. (A) Esquema de la topología de VP2. Los dominios P, S y B están coloreados en rojo, azul y verde respectivamente. Los principales elementos de estructura secundaria están representados como cilindros para las hélices α y flechas anchas para las láminas β (se omiten las hélices 3_{10}). En el dominio B se indican las posiciones iniciales y finales de cada hélice α . La hélice $\alpha_{N\text{-ter}}$ (residuos 1 a 10) se marca en línea discontinua dado que sólo se resuelve en una de las 13 subunidades de VP2 de la unidad asimétrica del virión (Coulibaly y col. 2005). El polipéptido de 71 residuos del extremo carboxilo terminal de pVP2 (512 aa), que está ausente en la forma madura VP2 (441 aa), se representa en naranja. Las flechas negras pequeñas representan las dianas de la proteasa viral VP4, mientras que el procesamiento entre los residuos 441 y 442, llevado a cabo por un mecanismo desconocido, es representado por una flecha negra grande. (B) Modelo 3D de la estructura de VP2 resuelta por difracción de rayos-X a 2.6 Å (Garriga y col. 2006). Se indican con círculos los residuos identificados como implicados en virulencia y patogenicidad (gris) (Brandt y col. 2001; van Loon y col. 2002); así como los epítomos de anticuerpos neutralizantes (amarillo). 1, P222; 2, G223; 3, S251; 4, H253; 5, N279; 6, T284;

7, V313; 8,G322 (Schnitzler y col. 1993). (C) Coordinación de un ion Ca^{2+} (amarillo) con seis residuos Asp (rojo) en el eje de simetría de orden 3. (D) Intercambio molecular en la cara interna de la SVP T=1 mediado por la hélice $\alpha 4$ de las subunidades adyacentes (magenta) de cada trímero de VP2 (verde).

posible purificar VLPs de tamaño y morfología similares a la cápsida del virión, que están compuestas por pVP2 y VP3 (Oña y col. 2004).

Estos resultados y el trabajo previo llevado a cabo en nuestro laboratorio (Castón y col. 2001; Maraver y col. 2003b; Oña y col. 2004) en conjunto sugieren que: (i) el ensamblaje de la cápsida T=13 es independiente de la presencia de la poliproteína precursora y (ii) el pVP2CTD es esencial para la interacción entre VP2 y VP3.

VP3 es una proteína multifuncional ya que además de su interacción con VP2 en el proceso de morfogénesis de la cápsida, está implicada en múltiples interacciones con otros componentes estructurales del virión. VP3, es capaz de interactuar con la polimerasa viral VP1 y con el dsRNA viral (Tacken y col. 2002; Maraver y col. 2003a; Maraver y col. 2003b). De hecho, VP1 se incorpora a la cápsida T=13 mediante la formación de complejos con VP3 (Lombardo y col. 1999; Maraver y col. 2003b). La región implicada en esta interacción corresponde a una secuencia de 16 aa altamente cargada en la región carboxilo terminal de VP3 (residuos 241 a 256). Esta secuencia es suficiente para determinar la interacción entre ambas proteínas *in vitro*, así como para interferir con la producción de virus *in vivo* (Maraver y col. 2003a). Por otra parte, la interacción *in vitro* entre VP3 y el RNA no es dependiente de secuencias específicas, lo que es consistente con la posible función de VP3 como estabilizador general de RNA en las partículas virales (Kochan y col. 2003). De hecho, se ha observado que en otro birnavirus, IPNV, VP3 está asociada con el dsRNA viral formando filamentos ribonucleoproteicos (Hjalmarsson y col. 1999).

Finalmente, VP3 es capaz de interactuar consigo misma, propiedad ampliamente extendida entre las proteínas de andamiaje de otros virus (Tacken y col. 2000). Mediante el uso de mutantes de delección se ha delimitado el dominio de oligomerización en 24 aa entre los residuos 224 y 247 del extremo carboxilo terminal de la proteína. El solapamiento de esta región con la implicada en la interacción con VP1 sugiere la existencia de una serie de interacciones complejas subyacentes al ensamblaje de IBDV.

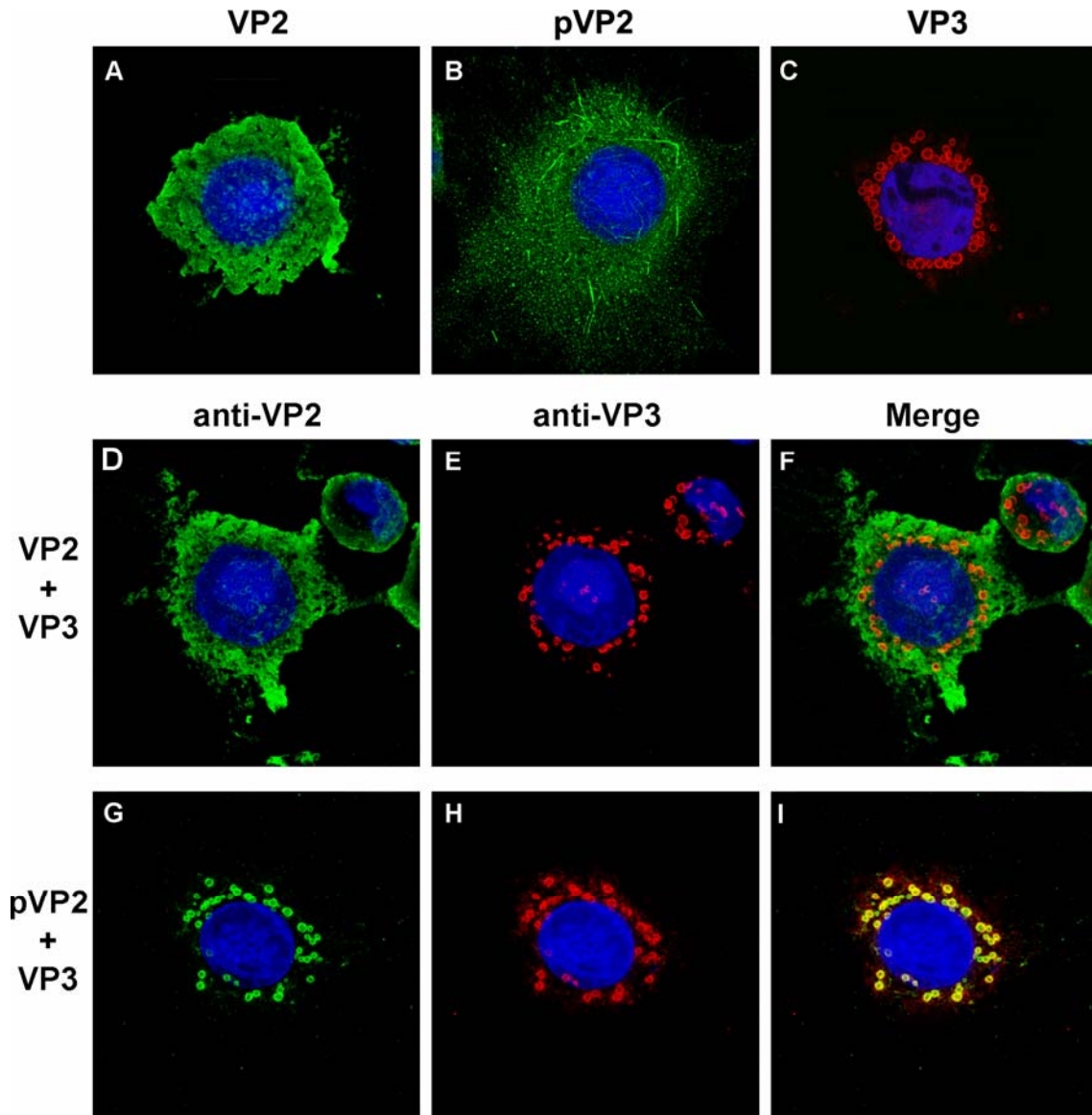


Figura 5. Efecto de la expresión de VP3 sobre la distribución celular de la forma precursora (pVP2) y madura (VP2) de la proteína de la cápsida de IBDV. (A-C) Distribución subcelular de las proteínas (A) VP2, (B) pVP2 y (C) VP3 cuando son expresadas por separado en células de insecto mediante rBV. (D-I) Distribución subcelular en células coinfectadas con rBVs que expresan (D-F) VP2 + VP3 o (G-I) pVP2 + VP3. El marcaje en verde corresponde a pVP2/VP2, en rojo a VP3 y en azul a tinción nuclear. Los paneles F e I muestran la superposición (merge) de las tres señales fluorescentes. Obsérvese que la distribución subcelular de VP2 y VP3 en su coexpresión es independiente (D-F) y similar a la expresión de sus componentes individuales (A y C); mientras que la coexpresión de pVP2 y VP3 (G-I), conlleva un cambio dramático de distribución (comparese con B y C).

1.4 Relaciones estructurales y funcionales de IBDV con los virus ssRNA y dsRNA

Aunque los virus dsRNA constituyen un grupo muy diverso que abarca desde los reovirus de mamíferos hasta el bacteriófago $\phi 6$, incluyendo diversos virus de hongos, todos comparten numerosas características funcionales y estructurales (Prasad y Prevelige 2003). La organización estructural del virión varía desde cápsidas concéntricas contiguas hasta cápsidas únicas, pero todos comparten una cápsida icosaédrica especializada con número de triangulación $T=1$, constituida por 120 subunidades y cuya unidad fundamental es un dímero (*Figura 6A-I*). Esta organización constituye una notable excepción en el marco de la teoría de la cuasiequivalencia y se denomina cápsida $T=2$ (un número de triangulación “prohibido”). Se ha descrito la estructura atómica de cuatro cápsidas $T=2$: la cápsida de VP3 de orbivirus (Grimes y col. 1998), la cápsida $\lambda 1$ de reovirus (Reinisch y col. 2000), la cápsida del virus L-A (Naitow y col. 2002) y la cápsida P3 de fitoreovirus (Nakagawa y col. 2003) (*Figura 6A, 6C, 6E y 6H*).

La cápsida $T=2$ está implicada en la organización del genoma y de la maquinaria replicativa, y en algunos sistemas como rotavirus es imprescindible para que el complejo de la RNA polimerasa sea activo (Lawton y col. 1997a; Gouet y col. 1999). La única excepción a la presencia de esta cápsida ubicua entre los virus dsRNA la constituyen los birnavirus, cuyas partículas infecciosas están formadas por una única cápsida $T=13$ (*Figura 6J*). La similitud observada en la arquitectura de las cápsidas $T=2$ entre el amplio espectro de virus dsRNA da cuenta de los requerimientos particulares en el metabolismo del dsRNA (replicación y transcripción del genoma y liberación de ssRNA). Además, la cápsida $T=2$, literalmente, secuestra el genoma dsRNA a lo largo de todo el ciclo viral, manteniendo su integridad estructural tras la entrada del virus en el hospedador; de esta manera, el virus evita la inducción de respuestas intracelulares mediadas por dsRNA (Prasad y Prevelige 2003). Los birnavirus deben suplir la carencia de la cápsida $T=2$ mediante alguno o algunos de sus componentes estructurales. En este contexto, la interacción de VP3 con la polimerasa VP1 así como con el dsRNA viral apunta a un papel fundamental en la organización funcional de la cápsida de IBDV tanto a nivel morfogénico como en el contexto de la transcripción y replicación del genoma viral (Ahlquist 2005). Así, la interacción extensiva entre VP3 y los segmentos dsRNA en las ribonucleoproteínas virales (Hjalmarsson y col. 1999) podría jugar un papel fundamental en la asunción de alguna de las funciones llevadas a cabo por la nucleocápsida $T=2$ de otros virus dsRNA.

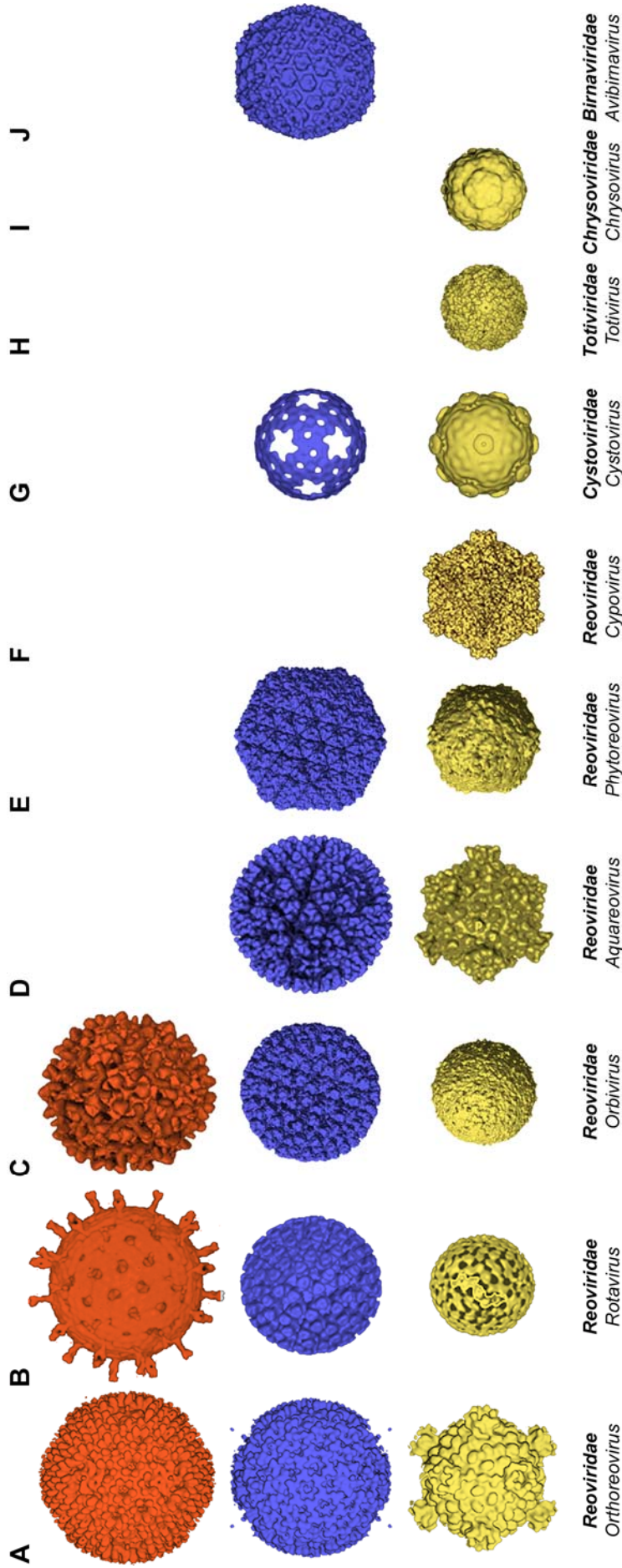


Figura 6. Estructura de los virus dsRNA. Mapas de densidad de cápsidas externas (fila superior coloreada en rojo y fila intermedia coloreada en azul) y nucleocápsidas T=2 internas (fila inferior coloreada en amarillo) de virus representativos de las diferentes familias de virus dsRNA. Bajo cada columna se indica la familia (negrita cursiva) y el género (cursiva) al cual pertenece el virus representado. (A) Orthoreovirus T1L (Dryden y col. 1998). (B) Rotavirus (Prasad y col. 1988; Shaw y col. 1993; Lawton y col. 1997b). (C) Virus de la lengua azul (BTV) (Grimes y col. 1997; Grimes y col. 1998). (D) Aquareovirus (Shaw y col. 1996). (E) Virus del arroz enano (RDV) (Nakagawa y col. 2003). (F) Virus de la poliedrosis citoplasmática (CPV) (Hill y col. 1999). (G) Bacteriófago φ6 (Butcher y col. 1997). (H) Virus L-A (Castón y col. 1997). (I) Virus de *Penicillium chrysogenum* (PcV) (Castón y col. 2003). Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV) (Böttcher y col. 1997; Castón y col. 2001). La nucleocápsida interna T=2 está presente en todas las estructuras resueltas (A-I) a excepción de IBDV (J).

Existen interesantes similitudes estructurales y funcionales entre los birnavirus y los virus ssRNA de polaridad positiva, nodavirus y tetravirus, como son la posesión de un genoma bisegmentado (Fauquet y col. 2005) y la maduración proteolítica de la proteína de la cápsida tras el ensamblaje de ésta (Gallagher y Rueckert 1988; Zlotnick y col. 1994; Schneemann y col. 1998) que apuntan la posible relación evolutiva entre ambos. Además, la resolución de la estructura cristalográfica de VP1 (Garriga y col. 2007; Pan y col. 2007), ha mostrado que, junto con las polimerasas de algunos tetravirus, pertenece a un grupo no canónico de polimerasas definido por la permutación de los motivos del dominio de la palma (Gorbalenya y col. 2002). Este tipo de plegamiento no se ha encontrado en otros virus dsRNA fuera de la familia *Birnaviridae*. Estos resultados sugieren que las RNA polimerasas primigenias podrían haber presentado una organización no canónica en sus dominios de la palma y que las polimerasas canónicas habrían evolucionado a partir de éstas. Desde este punto de vista, se ha sugerido que las RpRd de los birnavirus y tetravirus como vestigios evolutivos de éste proceso.

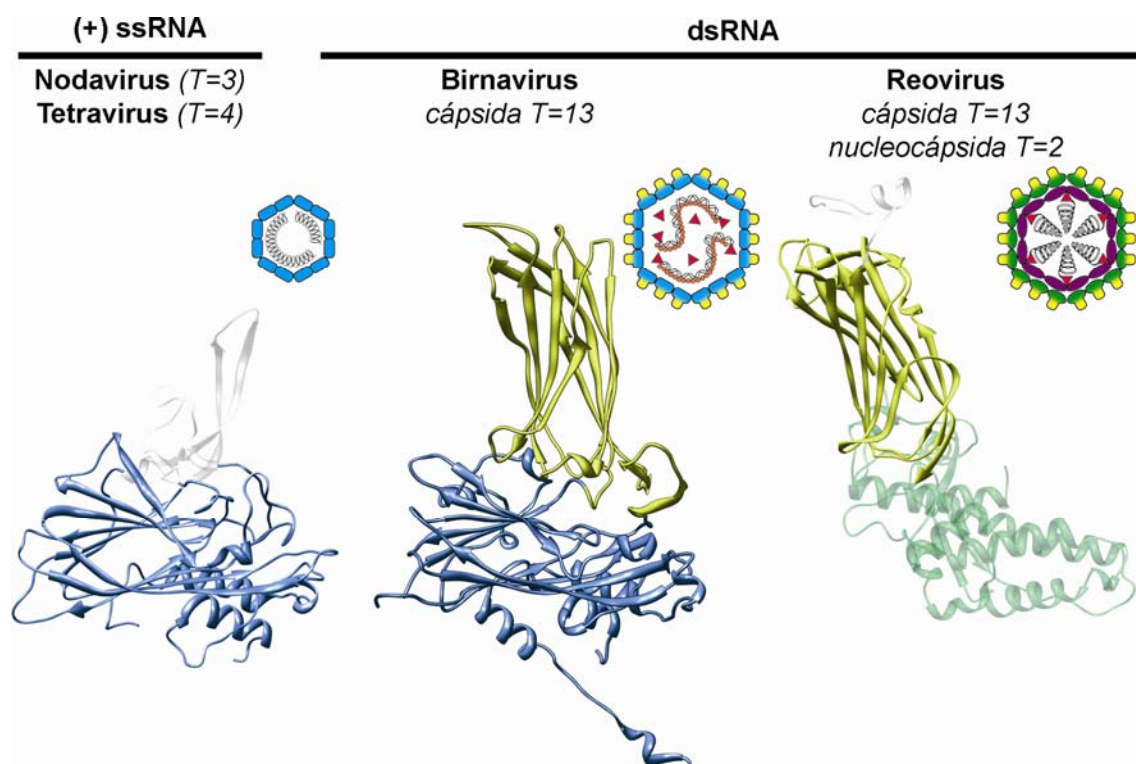
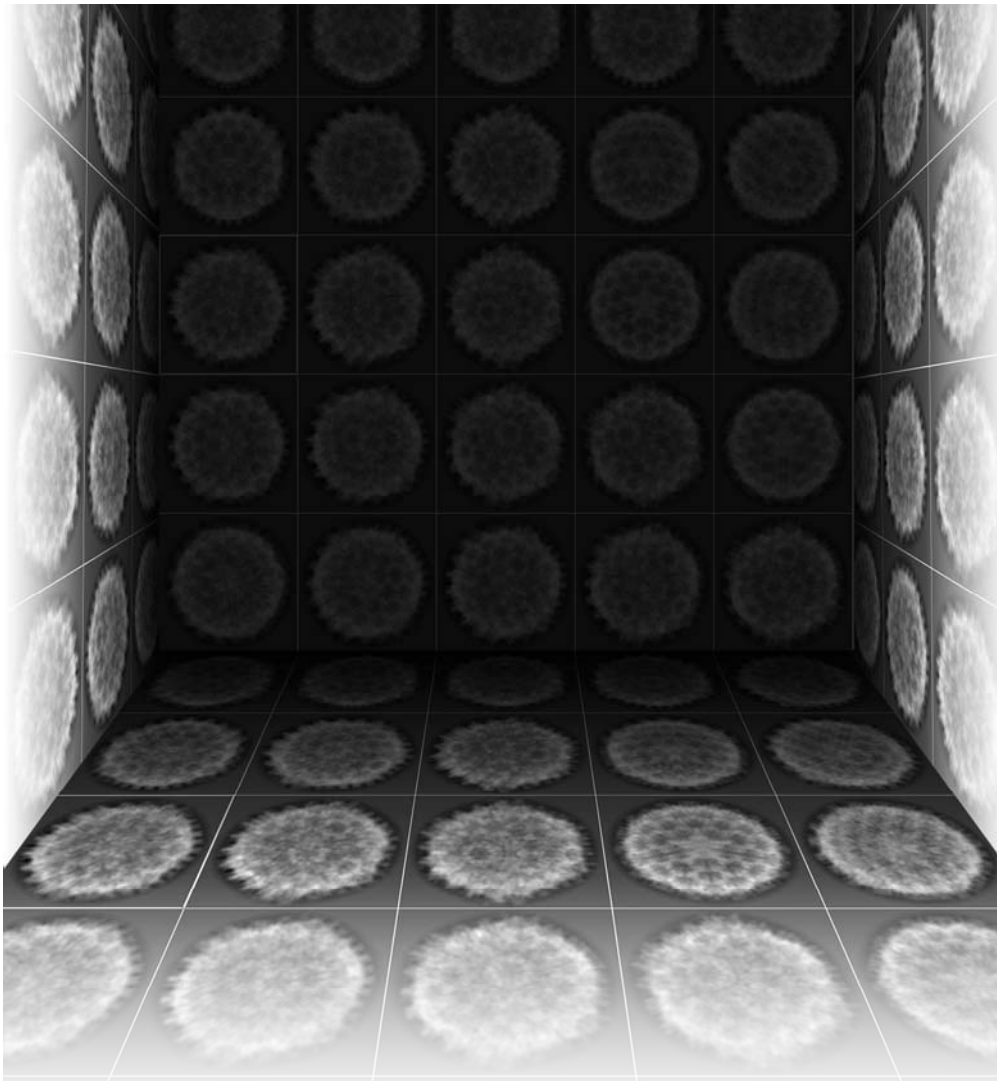


Figura 7. Relación estructural de las proteínas de la cápsida de virus (+)ssRNA y dsRNA. Comparación estructural de la estructura cristalográfica de la proteína de la cápsida de IBDV, VP2 (centro, código PDB 2gsy), con la proteína β (izquierda, código PDB 2bbv) del virus del escarabajo negro (BBV) y con la proteína VP6 (derecha, código PDB 1qhd) de Rotavirus. El código de colores es coincidente con los diagramas comparativos de las principales características estructurales de los viriones de las familias *Nodaviridae/Tetraviridae*, *Birnaviridae* y *Reoviridae* representados en la parte superior. Las proteínas de la cápsida de nodavirus y birnavirus poseen una alta homología estructural (representado

en azul) entre sus dominios B y S. Los birnavirus y los reovirus poseen dominios P (representados en amarillo) similares. Las cápsidas de nodavirus, birnavirus y reovirus contienen, respectivamente, ssRNA desnudo; complejos filamentosos de dsRNA con VP3 (círculos naranjas) y VP1 (triángulos rojos); nucleocápsidas T=2 (morado) con dsRNA ordenado y complejos transcripcionales. Adaptado de (Ahlquist 2005).

Por otra parte la proteína VP2 de los birnavirus representa un híbrido estructural entre la proteína de la cápsida de virus ssRNA de polaridad positiva (nodavirus y tetravirus) y la proteína de la cápsida T=13 de los virus dsRNA de la familia *Reoviridae* (Coulibaly y col. 2005). Mientras los dominios S y B de VP2 presentan un alto grado de homología estructural con sus equivalentes en las proteínas de la cápsida de nodavirus y tetravirus, los dominios protuberantes (P) de VP2 y de la proteína de la cápsida T=13 de reovirus son estructuralmente similares (*Figura 7*). De hecho, tanto en nodavirus y tetravirus como en IBDV, las hélices α que tapizan el interior de la cápsida generan unos canales hidrofílicos (~ 20 Å de diámetro) en los ejes pentaméricos que podrían estar implicados en la translocación de ssRNA de nueva síntesis a través de la cápsida (Munshi y col. 1996; Coulibaly y col. 2005; Garriga y col. 2006). Curiosamente, la extrusión de mRNA a través de los vértices pentaméricos de la cápsida es a su vez una estrategia compartida por los miembros de la familia *Reoviridae* (Lawton y col. 1997a; Diprose y col. 2001).

2 Objetivos



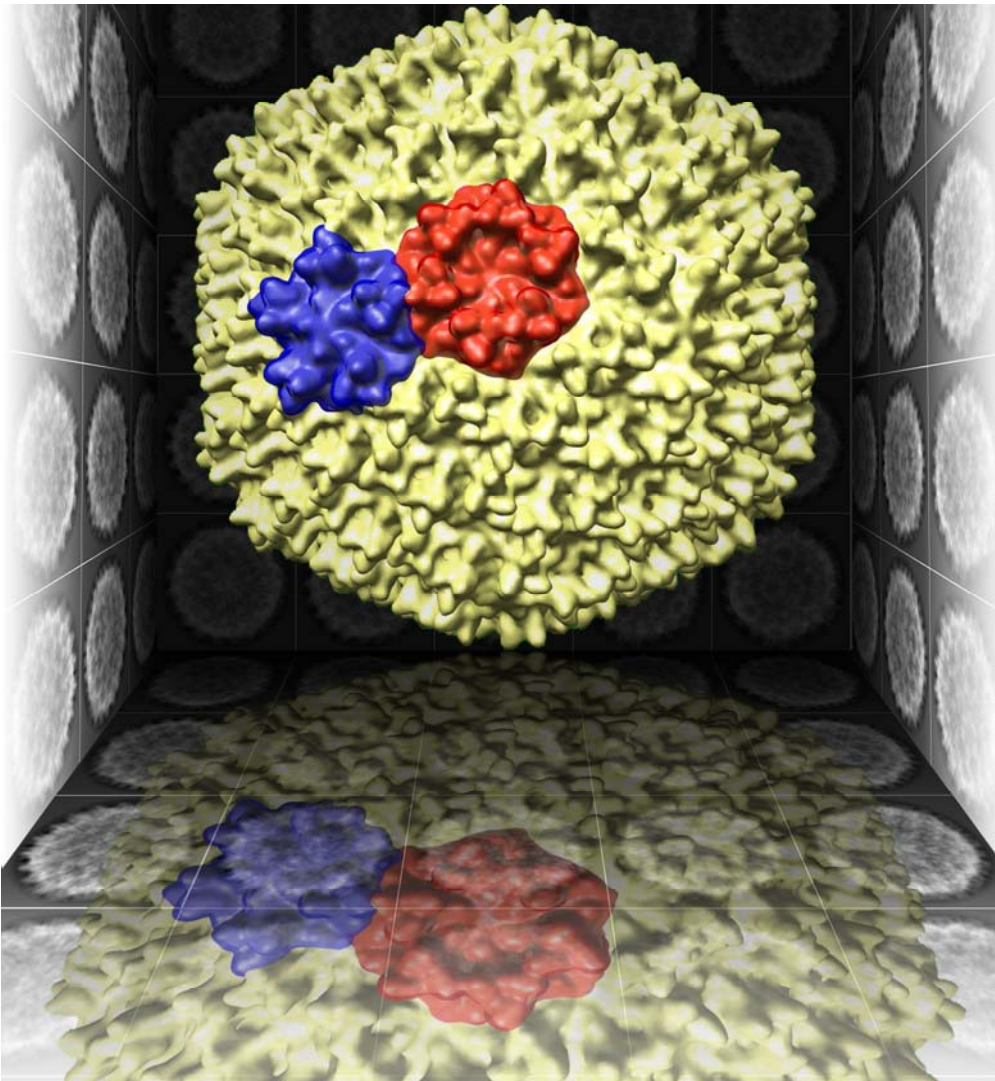
La organización de los componentes estructurales del virión junto con su proceso de ensamblaje y maduración son un reflejo de la estrategia replicativa del mismo. Por lo tanto, su estudio es un paso obligado en la comprensión del ciclo viral, el diseño de estrategias antivirales y el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas, además de proporcionar un excelente sistema modelo para analizar características básicas de las macromoléculas como el polimorfismo estructural y sus conformaciones transitorias.

La proteína de la cápsida de IBDV es sintetizada como un precursor, pVP2, cuyo extremo C-terminal es procesado para dar lugar a la forma madura VP2. Estudios previos llevados a cabo en nuestros laboratorios sugieren que esta región C-terminal de pVP2 está implicada en el polimorfismo estructural inherente de VP2. Por otra parte, aunque la estructura de la cápsida de IBDV ha sido determinada a nivel atómico, se desconoce la estequiometría y la organización de los demás componentes estructurales de la partícula viral.

El objetivo general de esta tesis es el estudio de las relaciones estructura-función de los componentes de la partícula de IBDV. En este contexto, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

1. Obtener mapas 3D de Criome con resolución subnanométrica y combinar esta información con modelos atómicos con el fin de determinar la presencia de elementos de estructura secundaria relacionados con cambios conformacionales en ensamblados icosaédricos derivados de IBDV.
2. Caracterizar el papel de la región del extremo C-terminal de pVP2 implicada en su polimorfismo estructural.
3. Purificar y caracterizar el complejo ribonucleopartículas (RNPs) de IBDV.
4. Determinar la estequiometría de los elementos constituyentes de la partícula viral en diferentes las poblaciones naturales de IBDV.

3 Materiales y Métodos



3.1 Material Biológico

3.1.1 Células procariotas

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

3.1.2 Células eucariotas

Para la generación, amplificación y expresión de rBV se utilizó la línea celular H5, adaptada para el crecimiento en monocapa a partir de la línea celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn y col. 1977, ATCC, CRL-1711). Para la amplificación de IBDV se utilizó la línea celular QM7 derivada de fibroblastos musculares de *Coturnix japonica* (codorniz japonesa) (Antin y Ordahl 1991, ATCC, CRL-1962).

Los cultivos celulares de H5 fueron crecidos y mantenidos en medio TC-100 (GIBCO) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml) y fungizona (1 μ g/ml). Los cultivos celulares de células QM7 fueron crecidos y mantenidos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco y Freeman 1959) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml), fungizona (0.5 μ g/ml) y aminoácidos no esenciales.

3.1.3 Plásmidos

Los plásmidos pFastBac1 y pFastBacHT de la casa comercial *Invitrogen* fueron utilizados para la generación de rBV. En ambos plásmidos, los genes heterólogos se encuentran bajo el control del promotor de la poliedrina y poseen sitios específicos para la transposición del gen recombinante en el bácmido. El plásmido pFastBacHT, además, incorpora una cola de histidinas y un brazo espaciador en el extremo amino terminal de la proteína recombinante.

3.1.4 Virus

Para las infecciones con IBDV ha sido empleada la cepa *Soroa* (Lombardo y col. 1999). Esta cepa viral, perteneciente al serotipo I, fue aislada de un pollo infectado en la región de Soroa

(Cuba) y adaptada a crecer en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF). Posteriormente, la cepa fue adaptada a crecer en diferentes células de mamífero.

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

3.1.5 Anticuerpos

En el presente trabajo han sido empleados antisueros de conejo frente a las proteínas VP2 y VP3 descritos previamente (Lombardo y col. 1999; Sánchez y Rodríguez 1999) y anticuerpos comerciales frente a la cola de histidinas, anti-His, (*Sigma*).

3.2 Manipulación y obtención de vectores recombinantes

3.2.1 PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl con 0.2 mM dNTPs, 200 ng de cada cebador, 2 ng de DNA molde, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 10 mM (NH)₄SO₂, 0.1% Triton X-100 y 2 U de DNA polimerasa *Vent* (*New England Biolabs*). Como protocolo de amplificación se utilizó el siguiente: 1 min a 94°C; 30 ciclos de 40 seg a 92°C, 40 seg a 60°C y 1 min 30 seg a 75°C; 5 min a 75°C.

3.2.2 Reacciones de ligación de fragmentos de DNA

Se realizaron en un volumen final de 15 µl en un tampón compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25 µg/ml BSA; utilizando 200 ng/ml de cada fragmento de DNA y 200 U de T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*). Las reacciones se llevaron a cabo durante 16 h a 16 °C.

3.2.3 Reacciones de restricción enzimática

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

3.2.4 Obtención de plásmidos recombinantes

La obtención de los fragmentos de DNA de pVP2/VP2 necesarios para generar las construcciones VP2-441, VP2-456, VP2-466, VP2-476, VP2-487, VP2-494, VP2-501 y VP2-512, fue realizada mediante PCR usando como molde el plásmido pVOTE-POLY (Fernández-Arias y col. 1998), un cebador 5' común para todas las construcciones y un cebador 3' específico para cada mutante de delección amino terminal (*Tabla 1*). Los fragmentos resultantes de la PCR fueron purificados y digeridos con los enzimas de restricción BglII y HindIII, ligándose con los vectores pFastBac1 y pFastBacHT digeridos con los mismos enzimas.

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

| Oligonucleótido | Secuencia (5'-3') |
|---------------------|-------------------------------------|
| 5'-VP2 | GCGCAGATCTATGACAAACCTGTCAGATCAAACCC |
| <i>NotI</i> -441 | GCGCGCGGCCGCTTATGCTCCTGCAATCTTCAGG |
| <i>HindIII</i> -456 | GCGCAAGCTTACACAGCTATCCTCCTTATGGC |
| <i>HindIII</i> -466 | GCGCAAGCTTAGGCAGGTGGGAACAATGTGG |
| <i>HindIII</i> -476 | GCGCAAGCTTAACCTTCCCAATTGCATGGGGC |
| <i>HindIII</i> -487 | GCGCAAGCTTAGGCCTGGGCCTCATCGCCCAGC |
| <i>HindIII</i> -494 | GCGCAAGCTTAGGCTCGAGCAGTTCCTGAAGC |
| <i>HindIII</i> -501 | GCGCAAGCTTAAGCTCTTGCTTTTCCTGACGC |
| <i>HindIII</i> -512 | GCGCAAGCTTAGGCGAGAGTCAGCTGCCTTATGC |

3.2.5 Obtención de baculovirus recombinantes

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

3.3 Infecciones y expresión de proteínas

3.3.1 Infección con rBV

Cultivos confluentes de células H5 se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 1-5 unidades formadoras de placa por célula (pfu/cel.) del rBV correspondiente en un volumen mínimo. Tras 1h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio TC-100 suplementado con 2% FCS.

3.3.2 Infección con IBDV

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

Para la producción de stock de IBDV se siguió el mismo procedimiento empleando una MOI de 0.02-0.05 pfu/cel. y recogiendo los sobrenadantes de cultivo a las 72-96 hp.i. según el efecto citopático observado.

3.3.3 Marcaje metabólico con [³⁵S]-Met y [³³P]-PO₄³⁻

Se realizaron infecciones con IBDV según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2 y, tras retirar el inóculo, se añadió DMEM suplementado con 2% FCS y una relación 1:9 de [³⁵S]-Met:Met o [³³P]-PO₄³⁻: PO₄³⁻ según el caso. La cantidad de marca empleada corresponde a 100 µCi/ml en ambos casos.

3.3.4 Titulación de IBDV

Los títulos virales tanto del stock como de las diferentes poblaciones de IBDV fueron determinados mediante ensayos de formación de placa. Se infectaron monocapas de células QM7 a una confluencia del 50-60% en un volumen mínimo con diluciones crecientes de virus en DMEM. En el caso de la titulación de poblaciones virales, su concentración de proteína fue determinada previamente mediante BCA (*apartado 3.5.1*) y las infecciones fueron realizadas a igualdad de proteína para cada una de las poblaciones. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió agar semisólido a una concentración final de 0.5% en medio DMEM suplementado

con 2% de FCS. A las 48 hp.i. las monocapas fueron fijadas con formaldehído al 10% y teñidas con una solución acuosa de cristal violeta al 2%. El título se determinó mediante contaje de placas de lisis.

3.4 Purificación de ensamblados virales

3.4.1 Purificación de ensamblados derivados de la expresión con rBV

Se infectaron células H5 con el rBV correspondiente y se recogieron a 48 hp.i. Las células se lavaron con tampón PES (50 mM PIPES pH 6.2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂) y se lisaron incubándolas con tampón PES suplementado con IGEPAL CA-630 (*Sigma*) 1% e inhibidores de proteasas (*Complete Mini; Roche*) durante 20 min. El lisado fue clarificado mediante centrifugación a 3,000 r.p.m. (1,000xg) durante 10 min en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*). El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 20% en PES y ultracentrifugado a 37,000 r.p.m. (170,000xg) durante 2 h 30 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El sedimento resultante fue resuspendido en tampón PES, centrifugado en una microfuga a 13,000 r.p.m. (16,000xg) durante 1 min y el sobrenadante cargado sobre un gradiente lineal de sacarosa del 20%-50% en PES que se ultracentrifugó a 40,000 r.p.m. (200,000xg) durante 45 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El gradiente se recolectó en 12 fracciones que se concentraron 20 veces mediante ultracentrifugación a 50,000 r.p.m. (240,000xg) durante 2 h en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*). Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C.

3.4.2 Purificación de viriones de IBDV

El sobrenadante de cultivos de células QM7 infectadas con IBDV fue mezclado en una relación 1:5 (v:v) con PEG 20% 3M NaCl y fue incubado con agitación toda la noche a 4 °C. Posteriormente, fue centrifugado a 3,000 r.p.m. (1,000xg) durante 30 min en un rotor un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*), el precipitado resultante fue resuspendido en PES suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, Roche*) y nuevamente centrifugado a 3,000 r.p.m. (1,000xg) durante 30 min. El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 r.p.m. (170,000xg) durante 2h 30 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El precipitado resultante fue resuspendido en PES y centrifugado en una microfuga 1 min a 13,000 r.p.m. (16,000xg). El sobrenadante fue mezclado con CsCl₂ en tampón PES a una densidad inicial de 1,33 g/cc y ultracentrifugado a

40,000 r.p.m. (130,000xg) durante 14 h en un rotor NVT65 (*Beckman-Coulter Inc.*). Tras la ultracentrifugación se detectaron un total de seis bandas visibles por refracción de luz (denominadas E1 a E6, de menor a mayor densidad de flotación, respectivamente). Las bandas fueron recuperadas por punción lateral con agujas hipodérmicas 23G y dializadas 48 h frente a tampón PES. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C.

3.4.3 Purificación de ribonucleopartículas virales

La purificación de ribonucleopartículas virales (RNPs) se realizó a partir de las partículas virales de la población E5 purificadas según se describe en el apartado 3.4.2. Éstas fueron desensambladas mediante diálisis frente a tampón Tris-EDTA (5 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA) durante 18 h a temperatura ambiente y cargadas en un gradiente discontinuo formado por cuatro fases al 70, 50, 40 y 33% de glicerol en tampón Tris-EDTA. El gradiente fue ultracentrifugado a 40,000 r.p.m. (150,000xg) durante 2 h a 20 °C en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*) y recolectado en fracciones que fueron dializadas 18 h frente a tampón Tris-EDTA.

3.4.4 Purificación del complejo VPg-dsRNA de IBDV

Para la purificación del complejo VPg-dsRNA se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.4.3 para la purificación de RNPs, excepto que tanto la etapa de desensamblaje como la de ultracentrifugación fueron realizadas en presencia de 0.1% SDS.

3.4.5 Purificación de dsRNA de IBDV

El material de partida para la purificación de dsRNA viral fueron los viriones de la población E5 purificados según lo descrito en el apartado 3.4.2. La muestra fue desnaturalizada en presencia de SDS al 1% durante 3 min a 100 °C y 1 min a 4°C. Posteriormente, fue digerida con proteinasa K a una concentración final de 2 mg/ml durante 1h a 37 °C. Finalmente, el dsRNA viral fue purificado sucesivamente mediante extracción con TriZol (Invitrogen) y adsorción en mini columnas gel de sílice (Quiagen), según las instrucciones de los fabricantes.

3.5 Análisis bioquímico

3.5.1 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en las diferentes muestras fue determinada mediante el método comercial BCA (*Pierce*) (Smith y col. 1985) y utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA).

3.5.2 Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de Laemli de electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras analizadas fueron mezcladas con tampón de desnaturalización 5X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.06% azul de bromofenol, 25% glicerol y 10 mM DTT), hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y cargadas en geles de poliacrilamida (37.5:1) al 11%. Tanto la inclusión de DTT como agente reductor como los tiempos y temperaturas de desnaturalización empleados, son esenciales para evitar la agregación artefactual de pVP2/VP2 durante el proceso de electroforesis. Posteriormente, dichos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa o teñidos con una solución de azul de Coomassie al 2% en 10% metanol, 10% ácido acético.

3.5.3 Análisis electroforético en geles nativos de agarosa

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

3.5.4 Electrotransferencia e inmunodetección (*Western Blot*)

Una vez llevada a cabo la separación electroforética mediante geles de poliacrilamida o agarosa, éstos fueron electrotransferidos en condiciones semisecas durante 45 min a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (*Protran, Schleicher & Schuell*) tras incubar durante 10 min tanto el gel como las membranas en tampón Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375 % (p/v), metanol 20 % (v/v). Las membranas fueron saturadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en tampón fosfato salino (PBS)) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente incubadas con el correspondiente anticuerpo primario diluido (anti-VP2 1:1000;

anti-VP3 1:300; anti-His 1:1000) en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 10 min con PBS, se incubaron 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1:5000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces con PBS durante 10 min y se reveló mediante la utilización del sistema comercial quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*) o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0,025 % de H₂O₂.

3.5.5 Ensayo de accesibilidad a RNasa III

Los ensayos de protección frente a RNasa III fueron realizados con cantidades equivalentes de: dsRNA purificado, complejo VPg-dsRNA, RNPs y viriones de IBDV. Las muestras fueron incubadas en tampón de digestión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM MnCl₂, 0.3 mg/ml BSA) con 0, 125, 500 y 2000 mU de ShortCut RNase III (*New Englan Biolabs*) durante 30 min a 37 °C. La reacción fue detenida mediante la adición de 50 mM EDTA, 0.1 % SDS. Las muestras fueron hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C e incubadas con 0.2 mg/ml proteinasa K durante 2 h a 37 °C. Los productos resultantes fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa y detectados mediante tinción con BrEt (*apartado 3.5.3*).

3.5.6 Ensayo de actividad polimerasa

La actividad polimerasa de las diferentes las muestras (dsRNA purificado, complejo VPg-dsRNA, RNPs y viriones de IBDV) fue determinada según el protocolo previamente descrito (Spies y col. 1987) con ligeras modificaciones. Las reacciones fueron llevadas a cabo en 100 mM Tris-HCL pH: 8.5, 125 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA, 1 mM ATP, GTP, CTP, 0.02 mM UTP, RNasin 0.5 µl (20 U), 10 µCi [α -³²P] UTP. Las muestras fueron incubadas a 40 °C durante 0, 15, 60 y 120 y congeladas a -80 °C. Posteriormente, fueron descongeladas a 37 °C, suplementadas con 1% SDS, hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y digeridas con 0.2 mg/ml proteinasa K durante 2 h a 37 °C. Finalmente los nucleótidos no incorporados fueron eliminados mediante columnas preempaquetadas de sefarosa MicroSpin S-200 HR (*GE Healthcare*). Los productos de reacción fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa (*apartado 3.5.3*) y cuantificados mediante autoradiografía (*apartado 3.5.7*)

3.5.7 Cuantificación de la marca radioactiva incorporada

Las muestras marcadas con isótopos radioactivos fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa según se describe en los apartados 3.5.2 y 3.5.3. Los geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autoradiografiados entre 24 h y 96 h en una pantalla fosfoluminiscente (*Phosfor Screen, Molecular Dynamics*). A continuación, la pantalla fue digitalizada en un scanner Strom 869 (*Molecular Dynamics*) y la marca radioactiva incorporada fue cuantificada mediante el programa informático Quantity One (*Bio Rad*). Para los cálculos de estequiometría proteica de la partícula viral, la señal cuantificada fue normalizada teniendo en cuenta el contenido en residuos de metionina de cada proteína y basándose en la información estructural disponible (Coulibaly y col. 2005; Saugar y col. 2005) se consideraron 780 copias de VP2+ pVP2 como estándar interno. Para la determinación de la relación del contenido de ácido nucleico de las partículas constituyentes de las distintas poblaciones virales, la señal cuantificada fue normalizada respecto a la población E2 para cada ensayo. El promedio y desviación estadística de la población E2 fueron calculados normalizando los valores de ésta respecto al promedio previamente calculado para E5.

3.6 Análisis biofísico

3.6.1 Dicroísmo Circular

El péptido FGFKDIIRAIRRI, correspondiente al segmento C-terminal de pVP2 comprendido entre los residuos 442 y 454, fue obtenido mediante síntesis química y su espectro de dicroísmo circular en ultravioleta lejano fue medido usando celdas de 0.1 y 1 mm a 25 °C en un dicrógrafo *Jasco J-720*. Cada espectro obtenido corresponde al promedio de tres medidas y las concentraciones empleadas están comprendidas entre 10 y 200 μM . El espectro fue analizado según el procedimiento previamente descrito (Jiménez y col. 1999).

3.6.2 Centrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación con las diferentes poblaciones de viriones purificadas, fueron llevados a cabo a 20°C en una ultracentrífuga analítica XL-A (*Beckman-Coulter Inc.*), equipada con un sistema óptico de medida UV-VIS. Se emplearon celdas de doble sector de 12 mm de paso óptico y un volumen de muestra de 400 μL , siendo el campo centrífugo de 8000xg. Las concentraciones de virus utilizadas fueron de 0.1-0.5 mg/ml y todas las medidas fueron realizadas en tampón PES.

El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos se realizó mediante el ajuste directo de los mismos a las soluciones de la ecuación de Lamm con el programa SEDFIT (Schuck 2000; Schuck y col. 2002). El mejor ajuste obtenido proporciona una distribución $c(s)$ que representa la concentración inicial de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación s . Los valores experimentales de sedimentación fueron corregidos a las condiciones estándar $s_{20,w}$ mediante el programa SEDNTERP (Laue y col. 1992).

3.6.3 Dispersión de luz dinámica

Los experimentos de dispersión de luz dinámica se realizaron en un instrumento *DynaPro-MS/X* de *Protein Solutions*. Para ello se hace pasar un haz de luz láser (824.7 nm) sobre la muestra contenida en una cubeta y se registra la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada a 90° en un fotodiodo (tiempo de correlación de 500 ns). La velocidad de fluctuación de las especies moleculares iluminadas está relacionada con su coeficiente de difusión (D), obteniéndose una función de autocorrelación que nos permite calcular D . Las medidas se realizaron a 20°C y la concentración óptima de las muestras fue determinada empíricamente mediante dilución de las mismas en tampón PES, con el fin de evitar saturación de la señal recibida. Para el cálculo de cada valor de D se utilizaron las funciones de autocorrelación promedio de 20 adquisiciones, con un tiempo de cada adquisición de 10 s. Las medidas de D son el promedio de tres adquisiciones.

A partir de los coeficientes de sedimentación (*apartado 3.6.2*) y difusión determinados, se calculó la masa molecular de los viriones de cada población mediante la ecuación de Svedberg:

$$\frac{s_i}{D_i} = \frac{M_i^*}{RT}$$

3.7 Microscopía electrónica

3.7.1 Adsorción de muestras

Sobre una gota (2-5 μl) de la muestra bajo estudio se depositó una rejilla de microscopía electrónica con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (K100X, *Emitech*). La rejilla fue incubada 3-5 min, lavada 2 veces en agua y el exceso de líquido eliminado mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (*Whatman*). En el caso de dsRNA y de complejo VPg-dsRNA, la adsorción fue realizada en presencia de acetato magnésico a una concentración de 10 y 20 mM, respectivamente. La concentración óptima para

microscopía electrónica de transmisión de los diferentes ensamblados de IBDV analizados fue determinada empíricamente mediante la dilución seriada de los mismos en su tampón correspondiente.

3.7.2 Contrastado de muestras

3.7.2.1 Tinción negativa

Las rejillas sobre las que previamente se habían adsorbido las muestras fueron incubadas sobre una gota de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 min y el exceso de agente de tinción se eliminó por contacto de la rejilla con papel de filtro grado 1 (*Whatman*). Para la visualización de la muestra se empleó un microscopio JEOL 12000 EX II estabilizado a 100 kV y las imágenes fueron registradas en micrografías electrónicas (*Kodak SO-163*) a una magnificación nominal 40.000x que fueron reveladas (*Kodak D-19*) durante 8 min a temperatura ambiente.

3.7.2.2 Sombreado metálico

Una vez adsorbidas las muestras sobre las rejillas tal como ha sido descrito en el apartado 3.7.1, éstas se secaron al aire y fueron introducidas en vacío en un equipo Balzers 400T (*Bal-Tec AG*) para ser sombreadas con Pt-C con un ángulo de incidencia de 3° y de un modo rotacional. El espesor de la capa de Pt, ~60 Å, se midió mediante un monitor de cristal de cuarzo. Para la visualización de las muestras se empleó un microscopio JEM 1010 (*Jeol*) estabilizado a 80 kV y las imágenes fueron registradas en una cámara CCD (*Charged Coupled Device*) Bioscan 792 (*Gatan*) a una magnificación nominal 40.000x.

3.7.3 Criomicroscopía electrónica

Para el análisis por criomicroscopía electrónica, 5 µl de la muestra fueron incubados sobre una cara de rejillas de cobre-rodio cubiertas con una película de carbón con agujeros (*Quantifoil R2/2*) previamente lavadas con vapores de acetona. Las muestras fueron vitrificadas en etano líquido a alta velocidad según los procedimientos previamente establecidos (Dubochet y col. 1988), quedando incluidas en una capa de hielo vítreo y conservando su estado nativo. Las muestras se visualizaron en un microscopio Tecnai G² FEG 200 (FEI) equipado con anticontaminador, y estabilizado a 200 kV, en el cual fueron cargadas mediante un criobrazo GATAN 626.53P50. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal 50,000x bajo

condiciones de mínima dosis electrónica en micrografías *Kodak* SO-163 que fueron reveladas (*Kodak* D-19) durante 12 min a temperatura ambiente.

3.7.4 Procesamiento digital de imágenes

Las operaciones generales de procesamiento de imagen fueron llevadas a cabo mediante los paquetes de procesamiento Bsoft (<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/labr/software/bsoft/>, Heymann 2001; Heymann y Belnap 2007), Xmipp (<http://xmipp.cnb.csic.es/>, Marabini y col. 1996) y Spider (http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/, Frank y col. 1996). Las criomicrografías electrónicas seleccionadas (121 para IBDV, 82 para HT-VP2-466 y 23 para las SVPs T=1) fueron digitalizadas en un *scanner* Photoscan TD (Zeiss) con un intervalo de muestreo de 7 $\mu\text{m}/\text{píxel}$, que se corresponde a 1.4 $\text{Å}/\text{píxel}$ sobre el espécimen. Con el objetivo de obtener una mayor eficiencia computacional, durante los pasos iniciales de procesamiento las micrografías fueron submuestreadas inicialmente a 4.2 $\text{Å}/\text{píxel}$ y posteriormente a 2.8 $\text{Å}/\text{píxel}$. Las imágenes de las partículas fueron extraídas manualmente de las micrografías digitalizadas y normalizadas mediante el programa X3d (Conway y col. 1993), siendo en total 15,793 para IBDV, 1,977 para HT-VP2-466 y 26,386 para las SVPs T=1.

Para las micrografías analizadas, se determinó que el rango de desenfoque estaba comprendido entre 0.6 y 3.0 μm (correspondiente a espaciamentos de 11 a 28 Å en los primeros ceros de la función de transferencia de contraste o CTF) con el programa gráfico Bshow mediante el análisis de la media radial de la transformada de Fourier promedio de todas imágenes extraídas de cada micrografía. Dicha información fue empleada para invertir las fases de cada micrografía entre las frecuencias adecuadas la CTF y dividir las imágenes extraídas en grupos de desenfoque.

La orientación y centro inicial de las partículas fue determinada utilizando como modelos iniciales mapas tridimensionales del virión y de las SVP T=1 obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Castón y col. 2001) y apropiadamente escalados a 28 Å de resolución. Se calculó un nuevo mapa de densidad que se usó para las subsiguientes etapas de refinamiento de los ángulos de orientación y centros de las partículas. Tanto la búsqueda de orientaciones y orígenes iniciales como los subsiguientes refinamientos fue realizada mediante un algoritmo basado en la transformada de Fourier en coordenadas polares (Baker y Cheng 1996) modificado para emplear la información tanto de amplitudes como de fases en la búsqueda de orientaciones (Bubeck y col. 2005).

Las 3DRs fueron calculadas usando métodos de Fourier-Bessel (Crowther y col. 1970; Fuller y col. 1996) e imponiendo simetría icosaédrica en los mapas de densidad final. En este proceso se combinaron 9483, 988 y 23754 partículas para las 3DRs de IBDV, HT-VP2-466 y SVP, respectivamente. Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (van Heel 1984) entre dos mapas independientes que contienen cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en cada reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0.5 (criterio FSC=0.5) ó 0.3 (criterio FSC=0.3). Para los límites 0.5 (ó 0.3) las resoluciones calculadas para IBDV, HT-VP2-466 y SVP fueron 11.6 Å (10.4 Å), 15.4 Å (14.0 Å) y 7.8 Å (7.2 Å), respectivamente.

Finalmente, se realizó una compensación de la atenuación de las amplitudes en las altas frecuencias mediante herramientas del paquete informático Spider. Para ello, se calculó el perfil de decaimiento de amplitudes de los mapas de criome (con la resolución efectiva calculada mediante FSC) y de los mapas de rayos X correspondientes filtrados a la misma resolución. Mediante regresión, se calculó una función cuadrática tal que al aplicarla sobre el perfil de decaimiento de los mapas de criome, éstos se ajusten a los perfiles de los mapas de rayos X. Dicha función fue aplicada a los mapas de criome en el rango de frecuencias de 245 Å a la máxima resolución calculada, tal como se describe en el párrafo anterior, y la información a mayor frecuencia espacial fue eliminada mediante un filtro suave de paso bajo.

Mediante herramientas del paquete informático Spider, se calculó el perfil de densidad radial promedio para los mapas de las cápsidas T=13 (IBDV y HT-VP2-466) y fueron normalizados y escalados. Se calcularon dos mapas de diferencia entre las 3DRs alternando el orden de sustracción entre ambas.

3.7.5 Detección de elementos de estructura secundaria

Para el análisis automático de la posible presencia y localización de elementos de estructura secundaria (SSE) en el mapa de la SVP T=1, derivado de los análisis de criome, se empleó el programa SSEHunter (Baker y col. 2007). Este programa analiza sistemáticamente el mapa de densidades mediante tres criterios independientes: i) la generación de una estructura de pseudoátomos en la que se evalúa la posición y distancia de cada pseudoátomo respecto a los situados en su entorno; ii) un algoritmo que define un esqueleto que representa la forma y topología específica del mapa; y iii) correlación de una hélice α prototipo con el mapa de densidad. El conjunto estas valoraciones es reflejado en un nuevo modelo pseudoatómico que es

utilizado para la anotación de los SSE y que permite la generación de un modelo de SSE para el mapa de densidades (ver *Resultados*, *Figura 15*).

3.7.6 Ajuste de estructuras atómicas en mapas de microscopía

El ajuste de las estructuras atómicas en los mapas de criome fue llevado a cabo mediante los paquetes informáticos Situs (Wriggers y Birmanms 2001; Chacon y Wriggers 2002, <http://situs.biomachina.org/>) y Uro (Navaza y col. 2002, <http://mem.ibs.fr/UROX/index.html>). En este proceso se emplearon las estructuras atómicas de VP2 resueltas a 3 y 2.6 Å de resolución a partir de la SVP T=1 (PDBs 1WCD y 2GSY, Coulibaly y col. 2005; Garriga y col. 2006) y de la subunidad asimétrica de la cápsida T=13 de IBDV resuelta a 7 Å de resolución (PDB 1WCE, Coulibaly y col. 2005).

El ajuste en la SVP T=1 realizado con ambos programas genera resultados prácticamente idénticos, con una desviación cuadrática media (rmsd) entre las posiciones de los C α de 1 Å. El ajuste en la SVP T=1 con Uro fue llevado a cabo sobre el mapa de densidades completo, asumiendo simetría icosaédrica y considerando cada cadena de VP2 como un cuerpo rígido independiente. Sin embargo, el ajuste con Situs se realizó sobre zonas del mapa segmentadas, trímeros o pentámeros, considerando cada modelo atómico (en este caso tres o cinco cadenas de VP2) como un cuerpo rígido.

En el caso de las cápsidas T=13 del virus y de HT-VP2-466 se empleó un abordaje experimental similar para el ajuste de la estructura atómica de la unidad asimétrica de IBDV (PDB 1WCE) (Coulibaly y col. 2005) en los mapas de criome. Con Uro se llevaron a cabo tres aproximaciones independientes en las cuales se consideraron como cuerpo rígido: i) cada uno de los trece monómeros de VP2 de forma individual, ii) cuatro trímeros (a-d) y un monómero (del trímero e, ver *Figura 18* en *Resultados*) y iii) la unidad asimétrica completa. El resultado obtenido mediante las tres aproximaciones es esencialmente idéntico, con una rmsd entre las posiciones de los C α de 1.8 Å. El ajuste con Situs fue llevado a cabo sobre densidades segmentadas de los mapas de IBDV y HT-VP2-466 que incluyen: i) la unidad asimétrica completa, ii) un pentámero y iii) las dos clases de hexámeros.

El coeficiente de correlación entre los modelos atómicos ajustados y los mapas de densidad de Criome fueron calculados según los procedimientos previamente establecidos (Navaza y col. 2002; Valle y col. 2003) mediante Spider y Uro. Los valores obtenidos fueron: 89% para la SVP T=1, 85% para la cápsida T=13 de IBDV y 80% para la cápsida T=13 de HT-VP2-466.

3.7.7 Manipulación de modelos atómicos

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.7.5, se calcularon mapas de diferencia entre el mapa de criome y los modelos atómicos previamente ajustados y filtrados a la resolución efectiva del mapa de criome. Para esta sustracción se utilizaron dos modelos atómicos equivalentes: i) la SVP T=1 formada con VP2-441 (PDB 1WCD), en la que la hélice α_4 no es visible y ii) la SVP generada con VP2-452 (PDB 2GSY) tras eliminar manualmente la información correspondiente a la hélice α_4 . Posteriormente, la hélice α_4 fue ajustada mediante Situs en volúmenes segmentados (correspondientes a trímeros) a partir de los mapas de diferencia calculados. El programa genera tres resultados equivalentes, relacionados por la simetría del trímero.

La hélice α_{Nter} (residuos 1 a 10) fue ajustada manualmente como cuerpo rígido en pentámeros segmentados de los mapas de criome del virión y HT-VP2-466 mediante Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, Pettersen y col. 2004) como un cuerpo rígido en la densidad vacía más cercana.

Los bucles que conectan las hélices α_4 y α_{Nter} a las hélices α_3 y α_1 , respectivamente, fueron modelados mediante el algoritmo de descenso cíclico de coordenadas (Canutescu y Dunbrack 2003) incluido en el programa S-flexfit (http://biocomp.cnb.uam.es/biocomp/public/Software/S_flexfit_web/, Velazquez-Muriel y col. 2006). Finalmente, se refinó la geometría de la molécula mediante el programa REFMAC5 (Murshudov y col. 1999) del paquete CCP4 (<http://www.ccp4.ac.uk/>).

El cálculo de superficies de potencial electrostático para pentámeros y hexámeros de VP2 en la cápsida T=13 fue realizado mediante el programa Grasp (Nicholls y col. 1991). Dado que la estructura de las subunidades de VP2 en la cápsida de IBDV (PDB 1WCE) corresponde al trazado de los C α en un mapa de rayos X a 7 Å de resolución, se superpusieron las coordenadas atómicas a 2.6 Å de la VP2 de la SVP T=1 (PDB 2GSY) sobre el esqueleto de C α de las subunidades de VP2 en los pentámeros y hexámeros seleccionados. Las coordenadas de las cadenas laterales de los residuos no coincidentes fueron generadas mediante el servidor MaxSprout (<http://www.ebi.ac.uk/maxsprout/>, Holm y Sander 1991).

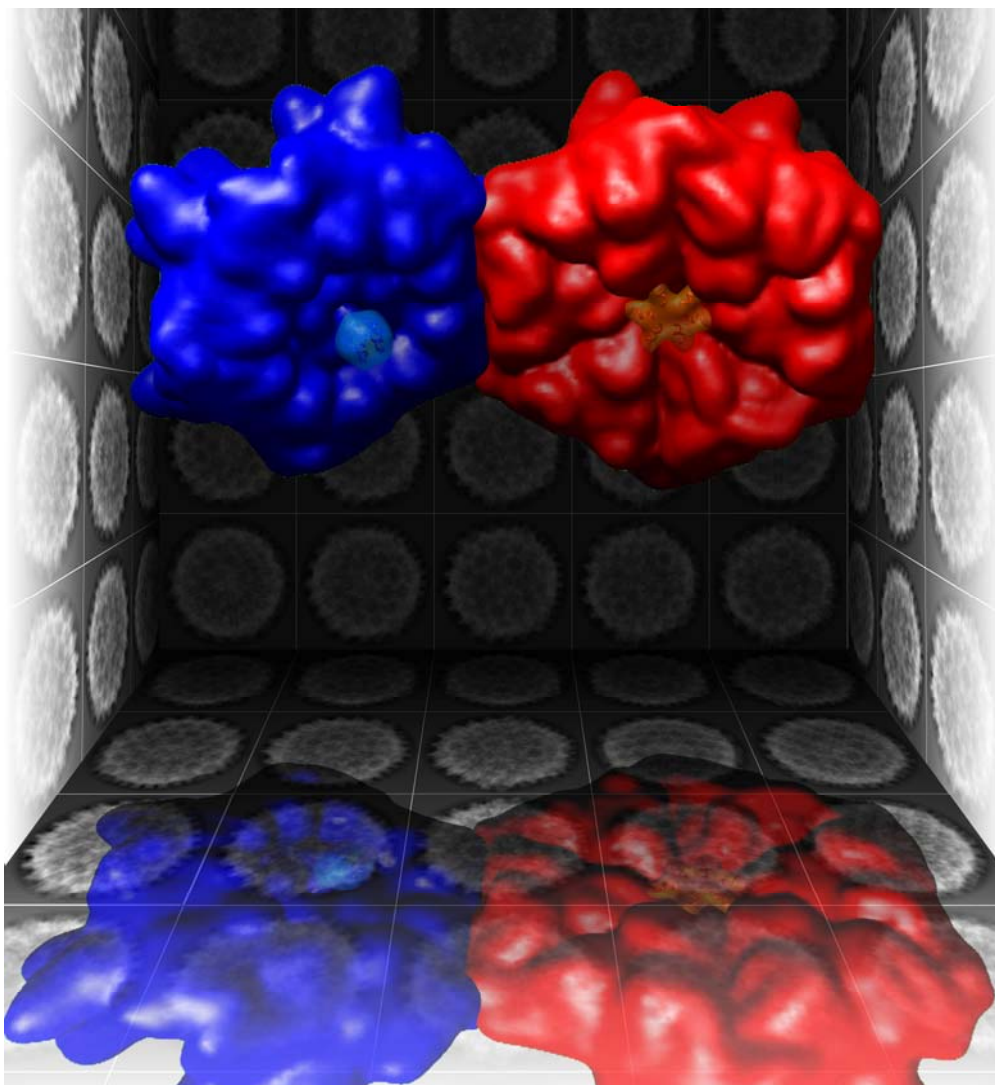
El modelo de la hélice α anfipática de pVP2 (443-GFKDIIRAIR-452) fue generado usando como molde los residuos 241-EFRDIIDATR-250 de la triosa fosfato isomerasa de *Leishmania*

mexicana con el programa gráfico O (<http://xray.bmc.uu.se/alwyn/index.html>, Jones y Kjeldgaard 1997).

3.7.8 Números de acceso de las estructuras de criomicroscopía electrónica

Los mapas de densidad calculados han sido depositados en la base de datos de estructura macromolecular del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/emsearch/index.html>), con números de acceso EMD-1237 para la SVP T=1, EMD-1238 para IBDV y EMD-1239 para HT-VP2-466

4 Resultados



4.1 Análisis del polimorfismo estructural de la proteína pVP2/VP2

4.1.1 Expresión de mutantes de delección del dominio C-terminal de pVP2

La proteína VP2 (441 aa) es la versión madura de la proteína de la cápsida de IBDV que, sin embargo, se sintetiza como un precursor, pVP2 (512 aa). Estudios previos llevados a cabo en nuestros laboratorios (Castón y col. 2001) demostraron que la forma expresada de pVP2 o VP2 determina el tipo de ensamblaje que se produce. Así, mientras la forma precursora, pVP2, da lugar a ensamblados tubulares constituidos por hexámeros, la forma madura, VP2, se ensambla en cápsidas T=1 formadas por pentámeros. Estos resultados sugieren que la región C-terminal (71 aa) de pVP2 está implicada en el polimorfismo estructural inherente de VP2. Además, el procesamiento del extremo C-terminal de pVP2 es abolido totalmente en el sistema de expresión de rBV, de tal forma que si se expresan formas precursoras intermedias de pVP2, el resultado final son éstas y no la versión madura de VP2.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se propuso delimitar con mayor precisión la región del extremo C-terminal de pVP2 implicada en su polimorfismo estructural mediante el empleo de una batería de rBVs que expresan distintas formas de pVP2 con extensiones variables de su extremo C-terminal. Por otra parte, y con la previsión inicial de facilitar la purificación de las distintas variantes de pVP2, se generó la misma serie de mutantes de delección del extremo C-terminal con una cola o *tag* de histidinas (HT) fusionado en su extremo N-terminal. Para analizar esta región uniformemente se eligieron las dianas de corte alternativas de la proteasa VP4 (posiciones 487, 494 y 501) y las posiciones intermedias 456, 466 y 476 (*Figura 8A*). La expresión de las diferentes variantes de pVP2/VP2 fue analizada mediante SDS-PAGE en geles al 11% y WB con un suero policlonal α -VP2 (*Figura 8B-C*) o α -HT (*Figura 8D*). Tanto los mutantes de delección en el extremo C-terminal de pVP2 (denominados mutantes pVP2/VP2), como las variantes químicas con el HT fusionado a su extremo N-terminal (denominados mutantes HT-pVP2/VP2), se expresan correctamente y dan lugar a una única banda mayoritaria, de movilidad electroforética decreciente con la extensión del extremo C-terminal, excepto las variantes de 501 residuos (VP2-501 y HT-VP2-501) que presentan un movilidad electroforética ligeramente mayor que la esperada (*Tabla 2*).

Una vez analizada la expresión de las diferentes construcciones de pVP2/VP2, se llevaron a cabo infecciones a escala semipreparativa con los correspondientes rBV y los posibles ensamblados resultantes fueron purificados mediante ultracentrifugaciones sucesivas en un colchón (20%) y en un gradiente lineal (20-50%) de sacarosa. Como control interno del

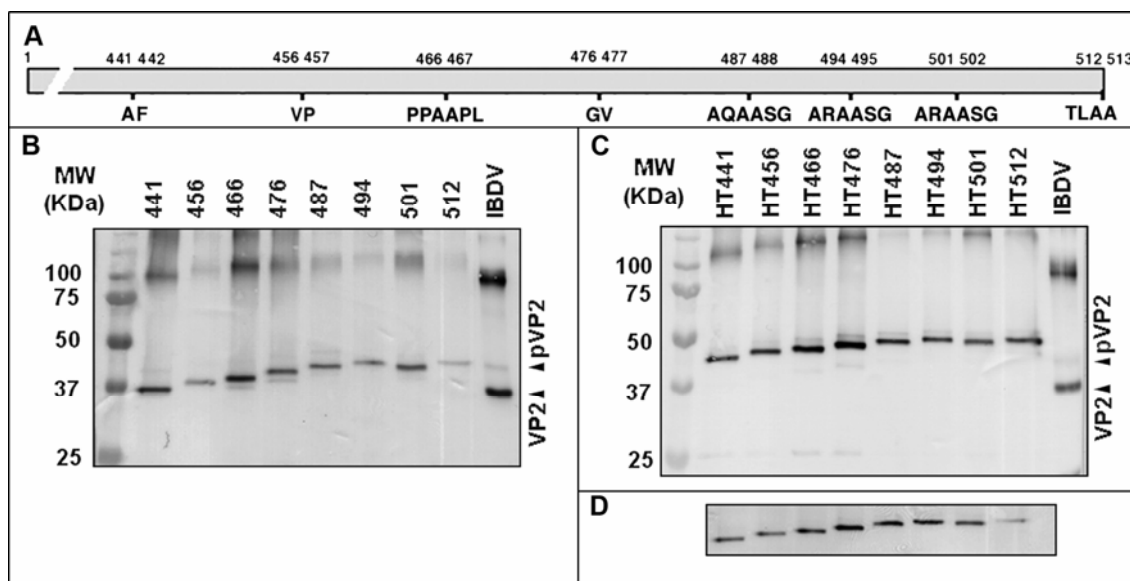


Figura 8. Expresión de mutantes de delección del extremo C-terminal de pVP2. (A) Esquema de la región C-terminal de pVP2 donde se encuentran indicadas las posiciones y secuencias locales elegidas para la generación de los mutantes de delección. (B-D) Análisis por WB de la expresión de los mutantes de pVP2. Las colecciones de mutantes pVP2/VP2 (B) y HT-pVP2/VP2 (C-D) fueron analizadas mediante SDS-PAGE de extractos de células infectadas con el rBV que expresa la construcción correspondiente, seguido por WB con un suero policlonal α -VP2 (B-C) o α -HT (D). Para comparar los niveles de expresión, la cantidad de extracto celular cargada para cada uno de los mutantes expresados fue la misma. Como control positivo se usaron viriones de IBDV purificados (carril derecho de cada gel), donde se indican las posiciones de pVP2 y VP2. Los marcadores de peso molecular (MW) se indican a la izquierda en kDa. Las diferentes versiones de mutantes de delección pVP2/VP2 se indican mediante la posición de su último residuo.

experimento se purificaron los ensamblados formados en células infectadas con IBDV. Las fracciones de los gradientes fueron analizadas mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie (*Figura 9*). El examen del perfil electroforético de los gradientes muestra que, mientras los ensamblados de las variantes de pVP2/VP2 migran en un amplio rango de densidades (*Figura 9A*), las construcciones HT-pVP2/VP2 migran a mayor densidad conforme

Tabla 2. Peso molecular (kDa) de las variantes de pVP2/VP2 generadas

| Mutante | - HT | + HT |
|---------|------|------|
| VP2-441 | 47.1 | 50.5 |
| VP2-456 | 48.9 | 52.2 |
| VP2-466 | 49.9 | 53.3 |
| VP2-476 | 50.8 | 54.2 |
| VP2-487 | 52.0 | 55.3 |
| VP2-494 | 52.6 | 56.0 |
| VP2-501 | 53.2 | 56.6 |
| VP2-512 | 54.4 | 57.8 |

incrementa el tamaño del extremo C-terminal (*Figura 9B*). Estos resultados indican que las subunidades de HT-pVP2/VP2 deben ensamblarse en estructuras de mayor tamaño a medida que se incrementa el tamaño del extremo C-terminal. Los mutantes VP2-487 y VP2-494 no sedimentan después de la centrifugación a través del colchón de sacarosa, por lo que estas variantes deben permanecer solubles, sin formar ensamblados virales, aunque no se puede descartar que formen estructuras lábiles en las condiciones de purificación.

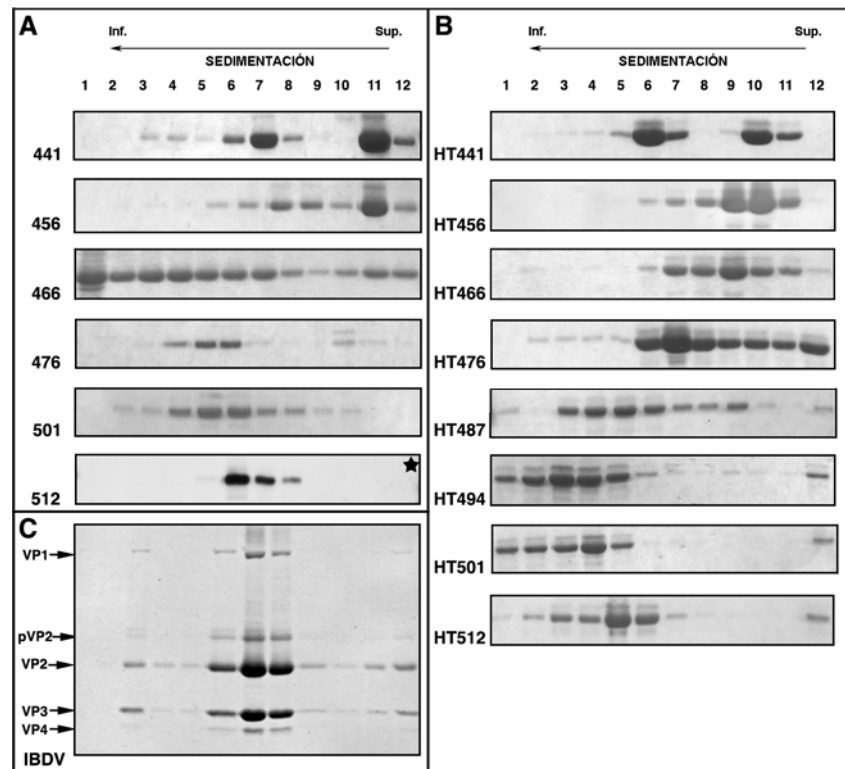


Figura 9. Análisis bioquímico de ensamblados purificados a partir de los mutantes de delección C-terminal de pVP2. Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones del gradiente de sacarosa tras ser concentradas por ultracentrifugación. Las muestras analizadas fueron: (A) mutantes pVP2/VP2, (B) mutantes HT-pVP2/VP2 y (C) IBDV. La estrella indica que el gel correspondiente a pVP2 (512 aa) fue analizado mediante WB con anticuerpos α -VP2 debido a su bajo rendimiento. Se indica la dirección de sedimentación mediante una flecha, de forma que la fracción 12 corresponde a la parte superior del gradiente.

4.1.2 Análisis por microscopía electrónica de las estructuras pVP2/VP2

Las fracciones purificadas de las variantes de pVP2/VP2 (en presencia y ausencia del HT) fueron caracterizadas estructuralmente mediante microscopía electrónica y tinción negativa, observándose ensamblados de diferente tamaño y morfología dependiendo tanto de la longitud

de la región C-terminal como de la presencia o ausencia del HT unido covalentemente al extremo N-terminal (*Figuras 10 y 11*).

Las variantes VP2-441 y VP2-456 (*Figura 10A-B*) se ensamblan en estructuras anulares, de ~26 nm de diámetro, cuyo tamaño y morfología deben corresponderse con SVPs T=1. Tanto VP2-466 (*Figura 10C-E*) como VP2-476 (*Figura 10F-H*) producen ensamblados de diferente tamaño que migran a lo largo del gradiente en un amplio rango de densidades (*Figura 9A*). Así, las fracciones inferiores están constituidas por estructuras tubulares, de ~25 nm de diámetro, cuyo patrón de difracción es consistente con un ordenamiento hexagonal (*Figura 10C, recuadro interior*). Las fracciones intermedias están constituidas por estructuras tubulares de menor longitud y partículas isométricas de aspecto y tamaño similar a las SVPs T=1, junto con un material granulado que probablemente se corresponde con productos de desensamblaje y que sugieren la naturaleza inestable de estos ensamblados. Además, en estas fracciones es posible observar ocasionalmente VLPs (*Figura 10D, recuadro interior*) con una morfología similar a las cápsidas T=13 del virión (*Figura 10N*). La estructura predominante en las fracciones superiores del gradiente se corresponde con SVPs T=1 (*Figura 10E*). VP2-501 (*Figura 10I-J*) se ensambla mayoritariamente en estructuras tubulares de ~35 nm de diámetro, parcialmente ordenadas, que se localizan en las fracciones inferiores e intermedias del gradiente y son similares a los tubos de tipo I (Granzow y col. 1997) ensamblados en las células infectadas con IBVD (*Figura 10M*). En las fracciones superiores del gradiente aparecen estructuras tubulares deformadas y partículas isométricas de tamaño irregular (*Figura 10K*). Finalmente, VP2-512 forma estructuras tubulares cortas y flexibles, así como partículas irregulares (*Figura 10L*).

La caracterización estructural de estos mutantes pVP2/VP2 muestra que mientras las variantes de menor tamaño, VP2-441 y VP2-456, se ensamblan exclusivamente en estructuras formadas por pentámeros, como corresponde a las cápsidas T=1 de las SVPs, la variante VP2-466 contiene la información necesaria para el ensamblaje de hexámeros (tubos de ~25 nm) y pentámeros (SVPs T=1) y, por lo tanto, serían potencialmente competentes para la formación de cápsidas T=13, como ocurre ocasionalmente. En cambio, las variantes con una extensión C-terminal mayor forman mayoritariamente estructuras hexagonales (tubos de ~35 nm). En resumen, podemos inferir un equilibrio en la formación de pentámeros y hexámeros en función de la extensión del extremo C-terminal de pVP2.

4.1.3 Análisis por microscopía electrónica de las estructuras HT-pVP2/VP2

La caracterización estructural de las estructuras derivadas de la expresión de las diferentes variantes de pVP2 con un HT fusionado en su extremo N-terminal fue llevada también a cabo

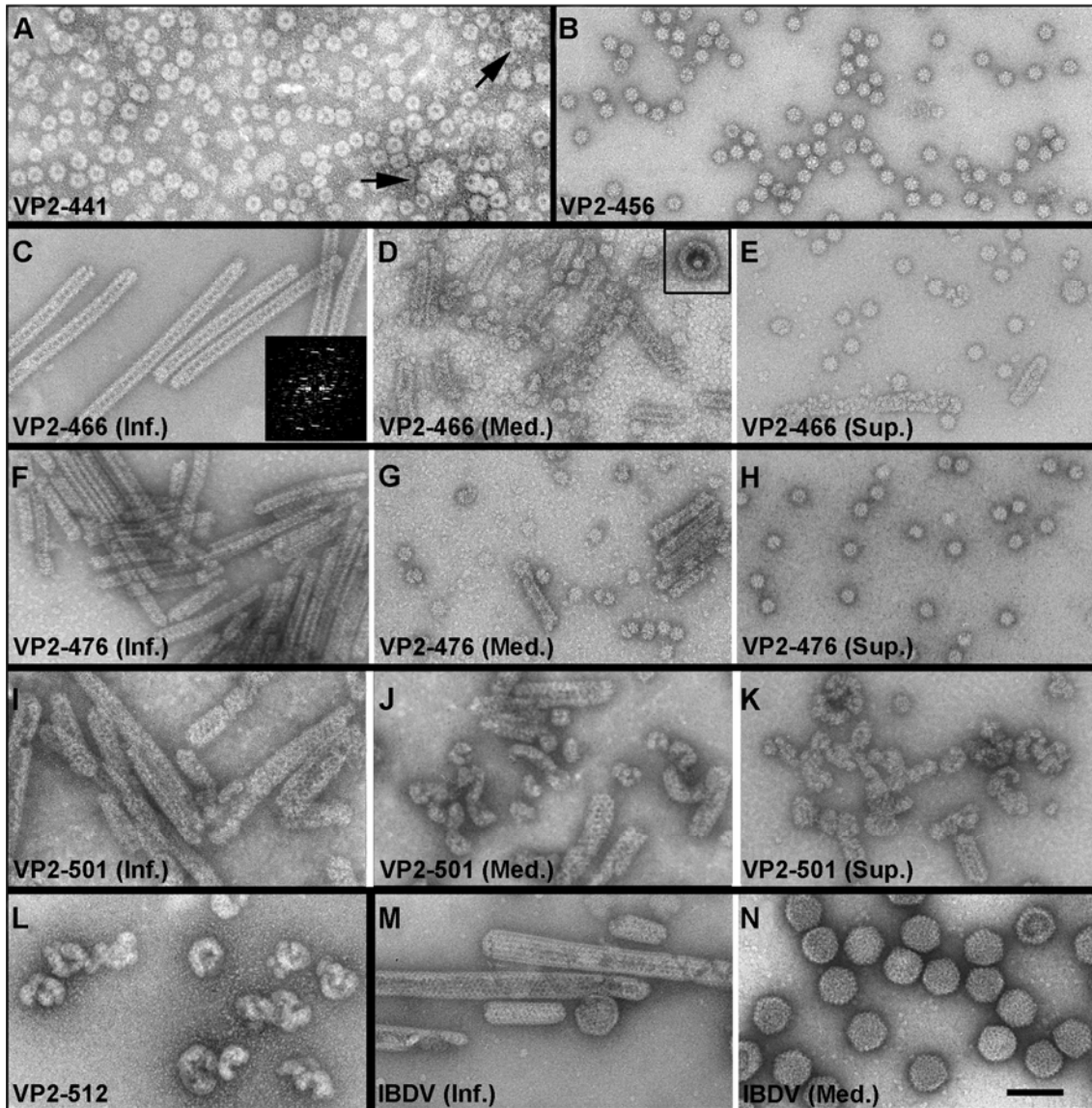


Figura 10. Análisis por microscopía electrónica de las estructuras formadas por los mutantes de delección C-terminal de pVP2. (A) VP2-441 y (B) VP2-456 forman SVPs T=1 de las cuales algunas permanecen agrupadas en ensamblados inestables de 12 partículas dodecaédricas (flechas en [A]). (C, D, E) VP2-466 da lugar a diferentes tipos de ensamblados: (C) estructuras tubulares con organización hexagonal, según revela su transformada de Fourier (recuadro interior), en las fracciones inferiores del gradiente; (D) SVPs T=1, estructuras tubulares cortas y material disociado en las fracciones intermedias, aunque es posible encontrar ocasionalmente VLPs T=13 (recuadro interior); (E) SVPs T=1 en las fracciones superiores. (F, G, H) VP2-476 da lugar a unas estructuras y distribución similares a los de la variante VP2-466. (I, J, K) VP2-501 ensambla mayoritariamente en estructuras tubulares con diferente integridad estructural en las fracciones inferiores (I), intermedias (J) y superiores (K) del gradiente. (L) VP2-512 da lugar a agregados tubulares poco ordenados. (M, N) La mayoría del material purificado a partir de células infectadas con IBDV corresponde a cápsidas T=13 en las fracciones intermedias del gradiente (N), aunque en las fracciones inferiores (M) se observan estructuras tubulares que han sido denominadas tubos de tipo I. La barra de escala corresponde a 100 nm.

también mediante el análisis por microscopía electrónica de las fracciones seleccionadas teñidas negativamente. En las fracciones enriquecidas en HT-VP2-441 se observan partículas isométricas de ~26 nm de diámetro morfológicamente similares a las SVPs T=1 (*Figura 11A*), al igual que en la variante sin HT (*Figura 10A*). Sin embargo, notablemente, la variante HT-VP2-456 se ensambla en VLPs de 65-70 nm de diámetro morfológicamente similares a las cápsidas T=13 del virión (comparar *Figura 11B* con *Figura 10N*), que migran en las fracciones intermedias del gradiente, aunque la mayor parte de este material (~80%) migra en las fracciones superiores del gradiente como SVPs T=1 (*Figura 11C*). Esta tendencia a formar cápsidas morfológicamente similares al virión se incrementa en la variante HT-VP2-466 (*Figura 11E*), por lo que fueron seleccionadas para estudios posteriores de mayor resolución (*apartado 4.1.8*). Además, tanto en la variante HT-VP2-456, como en la HT-VP2-466 son fácilmente distinguibles cápsidas de menor tamaño (~53 nm de diámetro) y con un perfil marcadamente hexagonal (*Figuras 11B y 11E, indicado con flechas*). La variante HT-VP2-466 también se ensambla en estructuras tubulares que migran en las fracciones inferiores del gradiente junto con cápsidas deformadas (*Figura 11D*), mientras que en las fracciones superiores forma pequeñas partículas morfológicamente heterogéneas pero similares a SVPs T=1 (*Figura 11F*). Las variantes HT-VP2-476 (*Figura 11G-I*) y HT-VP2-487 (*Figura 11J-L*) mantienen la capacidad de ensamblar en VLPs, aunque con menor eficiencia. La estructura predominante formada por estas construcciones, así como por las variantes HT-VP2-494, HT-VP2-501 y HT-VP2-512 (*Figura 11M-O*), son unos ensamblados tubulares (diámetro ~40 nm) de longitud variable y un ordenamiento aparentemente hexagonal con una morfología similar a los tubos rígidos de tipo I producidos por IBDV (*Figura 10M*).

El HT unido covalentemente al extremo N-terminal no altera el ensamblaje de estas variantes quiméricas de pVP2/VP2. Mientras la variante HT-VP2-441, al igual que VP2-441, se ensambla exclusivamente en pentámeros (SVPs T=1), la variante HT-VP2-456 no sólo contiene suficiente información para la formación de pentámeros y hexámeros sino que es capaz de ensamblarse en VLPs de tamaño y morfología similares a las cápsidas T=13 de IBDV en ausencia de la proteína VP3, el otro componente estructural mayoritario del virión. Por ello, se hizo patente la necesidad de un análisis más detallado de la región comprendida entre los residuos 441 y 456, así como de la implicación del HT en este fenómeno. Además, el análisis de las variantes con una mayor extensión en su extremo C-terminal muestra un desplazamiento hacia la formación de estructuras hexaméricas. Estos resultados sugieren, nuevamente, que el equilibrio en la formación de pentámeros y hexámeros es dependiente de la extensión del extremo C-terminal.

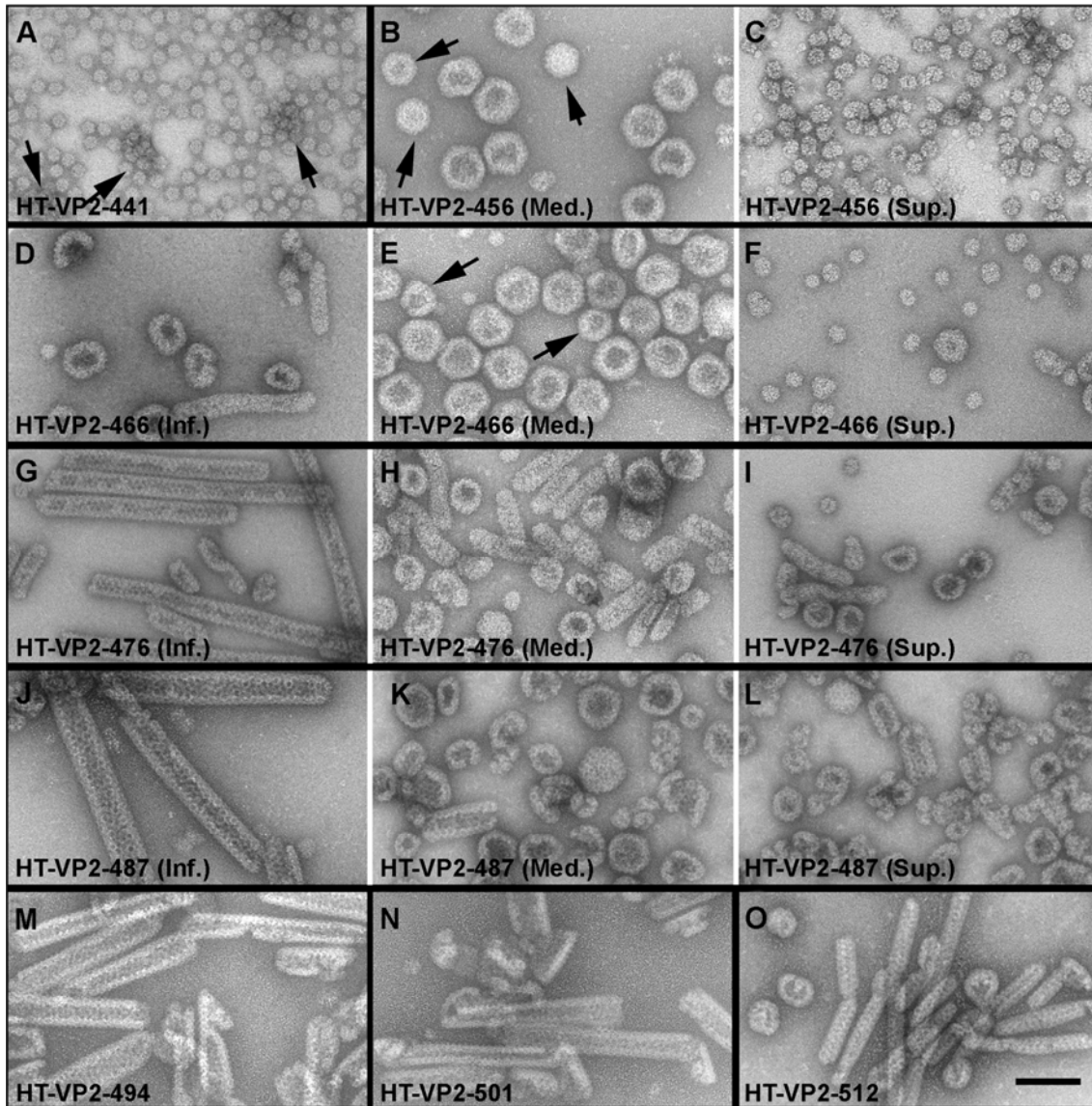


Figura 11. Análisis por microscopía electrónica de las estructuras formadas por los mutantes de delección C-terminal de HT-pVP2. (A) HT-VP2-441: SVPs T=1 y ensamblados dodecaédricos de mayor tamaño (flechas). (B-C) HT-VP2-456: (B) VLPs similares a cápsidas T=13 y T=7 (flechas) en las fracciones intermedias y (C) SVPs T=1 en las fracciones superiores. (D, E, F) HT-VP2-466: (D) estructuras tubulares y cápsidas deformadas en las fracciones inferiores, (E) VLPs similares a cápsidas T=13 y T=7 (flechas) en las fracciones intermedias y (F) partículas isométricas (diámetro 20-30 nm) en las fracciones superiores. (G, H, I) HT-VP2-476: (G) tubos de tipo I en las fracciones inferiores, (H) VLPs similares a cápsidas T=13 y T=7 junto con fragmentos de ensamblados tubulares y otros restos en las fracciones intermedias e (I) ensamblados irregulares en las fracciones superiores. (J, K, L) HT-VP2-487: estructuras similares a HT-VP2-476. (M) HT-VP2-494, (N) HT-VP2-501 y (O) HT-VP2-512 ensamblan mayoritariamente en estructuras tubulares. La barra de escala indica 100 nm.

4.1.4 Caracterización del péptido 443-452 del dominio carboxilo terminal de pVP2

El análisis de las estructuras derivadas de la expresión de las diferentes variantes de pVP2, en presencia y ausencia del HT, no sólo demuestra la implicación del dominio C-terminal de pVP2 en el control del polimorfismo estructural de VP2, sino que indica que la región comprendida entre los residuos 441 y 456 es fundamental. El análisis de predicción de estructura secundaria del extremo C-terminal de pVP2, realizado con el programa Agadir (Muñoz y Serrano 1994), muestra que el péptido 443- GFKDIIRAIR-452 tiene una marcada tendencia helicoidal (*Figura 12A, parte inferior*). Con el objetivo de evaluar esta predicción, y a partir de un péptido sintético correspondiente a los residuos 442-454, se analizó la estructura secundaria promedio mediante análisis de dicroísmo circular (CD). El espectro CD del péptido cuando se analiza en tampón acuoso (tampón PES) se corresponde con una conformación desnaturalizada (*random coil*). Sin embargo, cuando se añade trifluoroetanol (TFE), un cosolvente estabilizador de hélices α (Nelson y Kallenbach 1986), se obtiene un perfil que se corresponde fehacientemente con una estructura helicoidal (mínimo a 208 y 220 nm y un aumento de elipticidad a 195 nm).

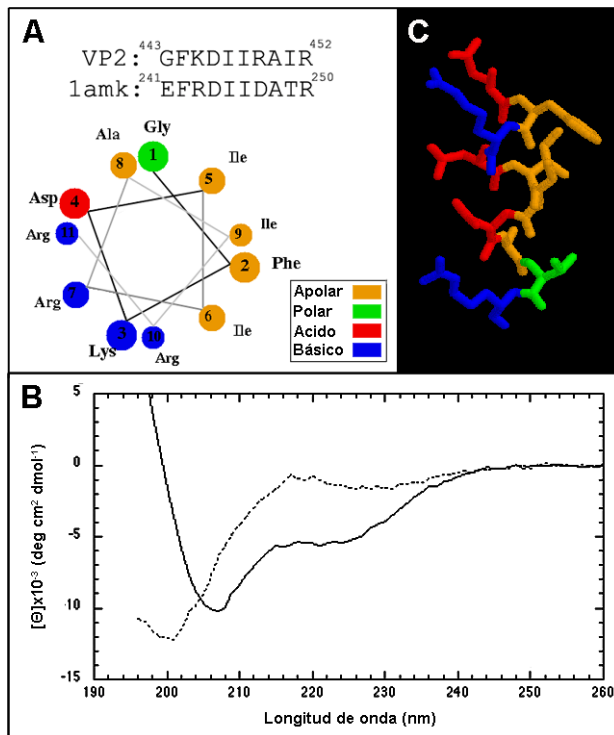


Figura 12. Análisis de la hélice α C-terminal de pVP2. (A) En la parte superior se muestra el alineamiento del péptido GFKDIIRAIR de la secuencia C-terminal de pVP2 (residuos 443-452) con el péptido homólogo EFRDIIDATR de *LmTIM* (residuos 241-250). En la parte inferior se muestra una representación de rueda helicoidal de la hipotética α -hélice para el péptido ¹GFKDIIRAIR¹⁰. (B) Espectro de CD del péptido FGFKDIIRAIRRI (residuos 442-454) de pVP2 en tampón PES en ausencia (línea discontinua) o presencia (línea continua) de TFE al 30%. (C) Estructura secundaria de los residuos 241-245 de *LmTIM*. Obsérvese el carácter anfipático de la hélice α .

Para determinar si esta hélice α pudiese existir en la naturaleza, realizamos una búsqueda sistemática de péptidos homólogos entre las estructuras conocidas (PDB) mediante la herramienta WHATIF (<http://www.cmbi.kun.nl/gv/whatif>, Vriend 1990) Este péptido homólogo fue localizado en los residuos 241-250 de la triosa fosfato isomerasa de *Leishmania mexicana*

(LmTIM, PDB 1AMK) (Williams y col. 1999). Cuando se compara su secuencia, 241-EFRDIIDATR-250, con los 10 residuos equivalentes de pVP2, el carácter anfipático de ambos es prácticamente idéntico; existe un reemplazamiento conservativo (R por K); una sustitución de D por R (cambia la polaridad pero mantiene una cadena lateral cargada) y un reemplazamiento de T por I (*Figura 12A y 12C*).

4.1.5 Estructura de la partícula subviral T=1

Con el fin de llevar a cabo una caracterización estructural más detallada, se generó una 3DR de SVPs T=1 de la variante VP2-456 a partir de imágenes de criome (*Figura 13A*). El mapa de densidad de la cápsida fue calculado a partir de 23754 imágenes y su resolución fue estimada mediante el cálculo de la función FSC entre: i) dos mapas de criome independientes que contienen cada uno la mitad de las partículas empleadas en la reconstrucción final (*Figura 13B, línea continua*); y ii) el mapa de criome final, que contiene la información de todas las imágenes, y un mapa generado a partir del modelo atómico de la SVP=1 (PDB 2GSY) (*Figura 13B, línea discontinua*). En base a los criterios FSC 0.5 y 0.3 la resolución de la reconstrucción es respectivamente: i) 7.1 Å y 6.7 Å; y ii) 7.5 Å y 6.4 Å, respectivamente (*Figura 13B*). La arquitectura de la cápsida dodecaédrica reconstruida es esencialmente igual a la descrita previamente (Castón y col. 2001; Coulibaly y col. 2005), siendo la característica más prominente la presencia de 20 protusiones triméricas ordenadas equivalentemente (*Figura 13C-D*).

A esta resolución es posible apreciar numerosas densidades del mapa de criome, con una morfología tubular y laminar (*Figura 13 C-D y Figura 14A*), que deben corresponderse con elementos de estructura secundaria (SSE) (Chiu y col. 2005). Dichas densidades fueron caracterizadas mediante dos metodologías independientes: i) el ajuste de las estructuras atómicas resueltas por rayos X (PDBs 1WCD y 2GSY) (*Figura 14*); y ii) la identificación computacional de SSE (*Figura 15*).

i) Para el ajuste del modelo atómico de VP2 en el mapa de criome, fueron utilizados dos programas de ajuste cuantitativo: Situs (Wriggers y Birmanns 2001) y URO (Navaza y col. 2002). Los resultados obtenidos con ambos programas son prácticamente idénticos. El excelente ajuste entre los modelos de rayos X y criome (*Figura 14C*) es especialmente patente en las densidades correspondientes a los barriles β de los dominios P y S de VP2, donde cada lámina β se ajusta claramente a la densidad correspondiente en el mapa de criome (*Figura 14D-E*). El dominio B de VP2, que está formado por una serie de hélices α en las regiones N- y C-terminales, tapiza la superficie interna de la SVP T=1 (*Figura 4*). Mientras las hélices α_1 , α_2 y

$\alpha 3$ se encuentran ajustadas a sus correspondientes densidades en forma de varilla en el mapa de criome, la hélice C-terminal $\alpha 4$ no se ajusta a ninguna densidad del mapa de microscopía. Por otra parte, el ajuste realizado da cuenta de todas las densidades cilíndricas del mapa de criome a excepción de unas densidades vacías (*Figura 14A, flechas rojas*), vecinas a la posición de la hélice $\alpha 4$ en la estructura atómica y compatibles con el tamaño de ésta.

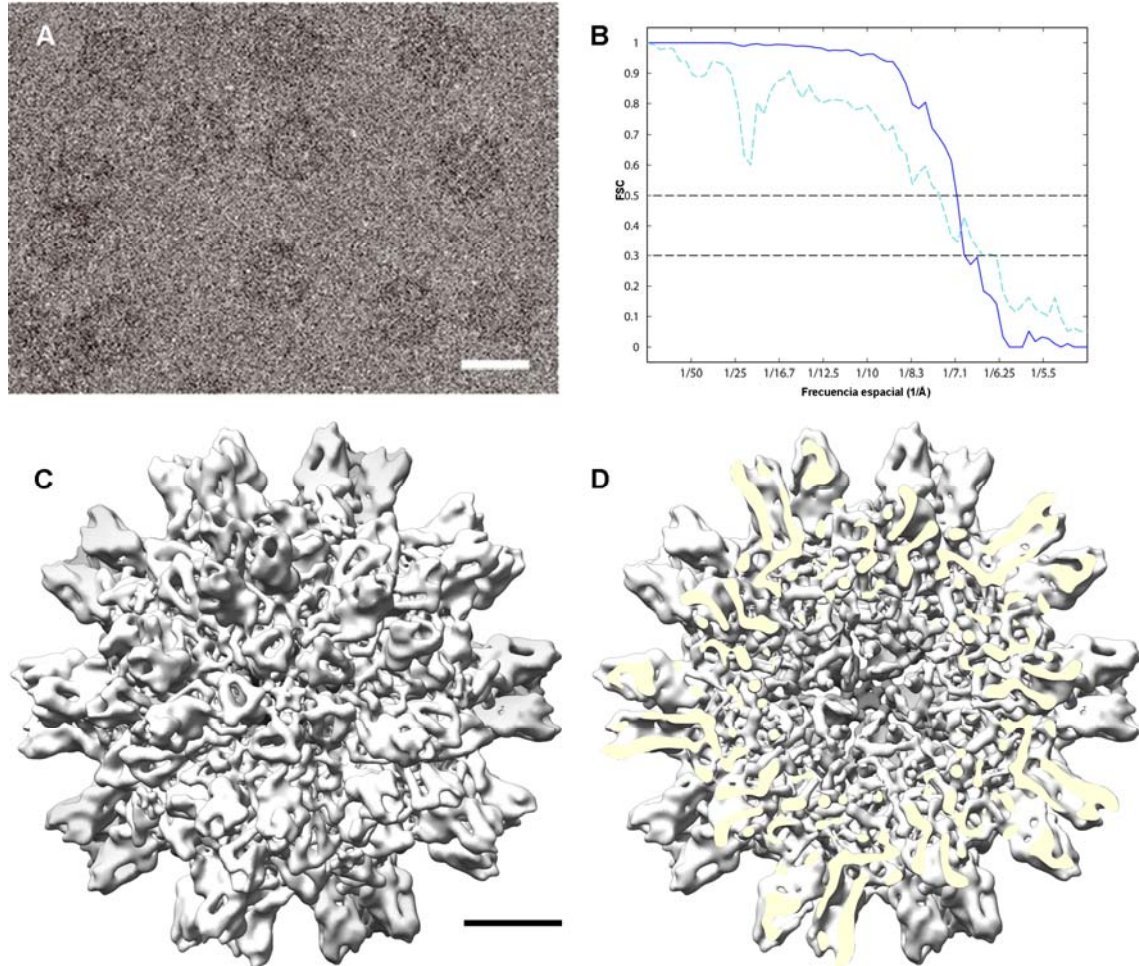


Figura 13. Estructura tridimensional de la SVP T=1. (A) Criomicrografía electrónica de SVPs. La barra de escala corresponde a 200 Å. (B) Determinación de la resolución de 3DR mediante FSC. Las líneas discontinuas negras representan umbrales de FSC iguales a 0.5 y 0.3 para los cuales se obtienen valores de 7.1 y 6.7 Å, respectivamente, al comparar dos mapas independientes con la mitad de las partículas (línea continua azul), y valores de 7.5 y 6.4 al comparar el mapa de criome con el de rayos X (PDB 2GSY). (C,D) Estructura tridimensional de la SVP T=1 vista desde un eje de simetría de orden 5 mostrando las superficies externa (C) e interna (D) de la cápsida. El mapa se muestra umbralizado a 2σ sobre la densidad media. La barra de escala corresponde a 50 Å.

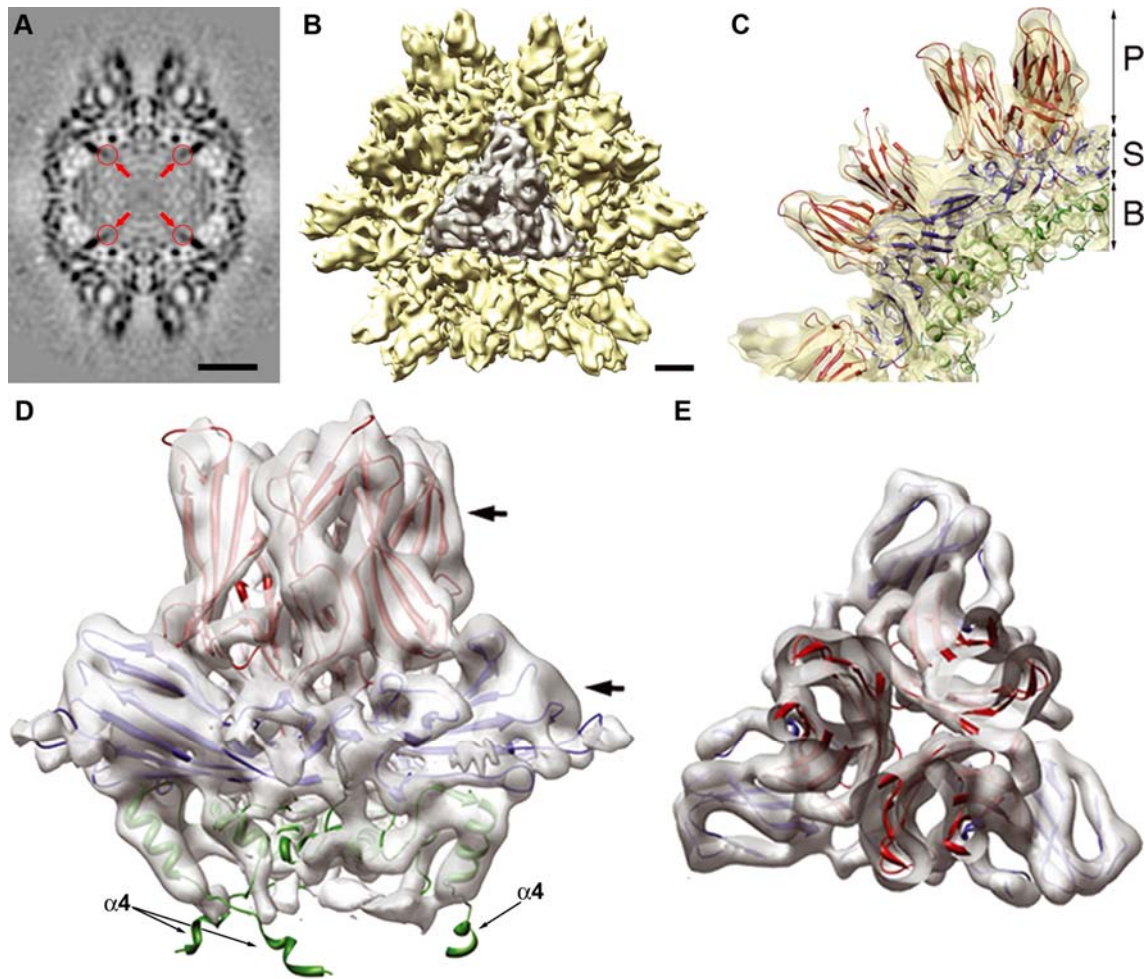


Figura 14. Ajuste de la estructura atómica de VP2 en la 3DR de la SVP T=1. (A) Sección central del mapa de la SVP. Las flechas rojas indican las densidades vacías (círculos rojos) después de ajustar el mapa atómico de VP2 (PDB 2GSY). La barra de escala corresponde a 50 Å. (B) Mapa de superficie de la SVP completa, visto desde un eje de simetría de orden 3, con un trómero resaltado en blanco. (C) Sección de la SVP (50 Å de grosor) con la estructura de VP2 ajustada. El código de colores del modelo indica los diferentes dominios: P, rojo; S, azul y B, verde. (D) Modelo de rayos X de un trómero de VP2 ajustado en la densidad segmentada correspondiente del mapa de criome. Se indican las posiciones de la hélices $\alpha 4$. Las flechas gruesas indican las direcciones de corte para visualizar el ajuste de los dominios P y S en el panel E. (E) Sección transversal a través de los dominios P y S para visualizar el ajuste de los barriles β en ambos dominios. El mapa está umbralizado a 2σ sobre la densidad media, mostrando la separación física entre las láminas β y una cavidad ficticia (el core hidrofóbico) entre ellas.

ii) Mediante el programa SSEHunter (Baker y col. 2007) se estimó la presencia y localización de SSE en un trómero segmentado de la SVP T=1 (Figura 14B y Figura 15). Este programa realiza una búsqueda sistemática de SSE según tres criterios independientes (Figura 15A-E y apartado 3.7.5) y genera un modelo de SSE del mapa de densidades (Figura 15F-G). El modelo de SSE obtenido define dos zonas de láminas β (Figura 15F-G, azul) que se corresponden con los dominios P y S del modelo atómico de VP2. En la densidad correspondiente al dominio B el

modelo de SSE asigna cuatro posibles hélices α por monómero de VP2 (*Figura 15F-G*), de las que tres son coincidentes con las hélices α_1 , α_2 y α_3 del modelo atómico ajustado. Sin embargo, la cuarta hélice asignada por SSEHunter corresponde a la densidad vacía del mapa de criome vecina a la hélice α_4 del modelo atómico (*Figura 15F-G, flechas negras*).

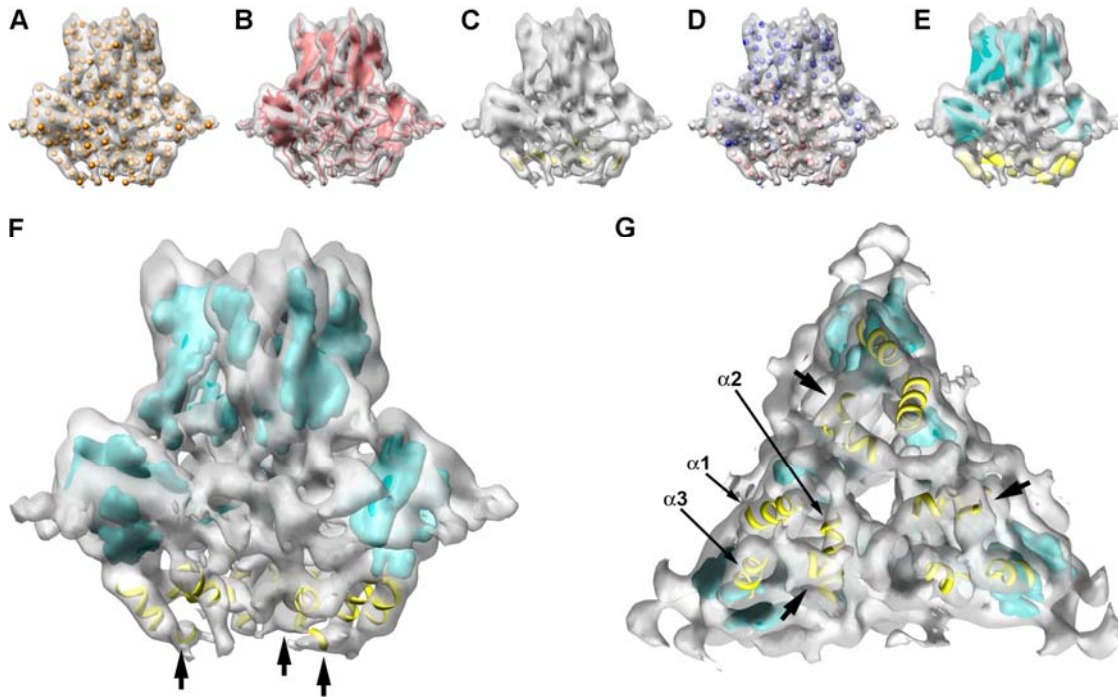


Figura 15. Detección de estructura secundaria en la 3DR de la SVPs. (A-E). Proceso de identificación de SSE mediante SSEHunter. (A) Generación de pseudoátomos (marrón) que definen la distribución de densidad del mapa. (B) Definición de un esqueleto (rojo) que representa la forma y topología de la densidad de la 3DR. (C) Resultado de la croscorrelación (amarillo) con una hélice α prototipo. (D) Valoración de la probabilidad para cada pseudoátomo de pertenecer a una hélice α (rojo) o una lámina β (azul). (E) Representación de la anotación de SSE, en el que las láminas β aparecen como planos azules y las hélices α como cilindros amarillos. (F,G) Modelo de SSE del trímero de la SVP. Las hélices α son representadas como hélices prototipo y las láminas β como superficies. Se indican las hélices α_1 , α_2 y α_3 para un monómero. Las flechas negras gruesas indican las hélices α detectadas en las densidades de las que no da cuenta el modelo de rayos X ajustado.

4.1.6 Flexibilidad conformacional de la hélice α_4 del extremo C-terminal de VP2

La hélice α_4 se proyecta hacia el eje de orden 3 de un trímero de VP2 vecino mediando un intercambio molecular (*molecular switching*) entre subunidades adyacentes (*Figura 16, recuadro*) (Garriga y col. 2006) y es el único SSE que carece de su correspondiente densidad en el mapa de criome. Por otra parte, cuando se calcula un mapa de diferencia entre el mapa de criome y un mapa generado a partir de la estructura de rayos X donde no se visualiza la hélice

$\alpha 4$ (PDB 1WCD), se detecta una única densidad por monómero con una morfología correspondiente a una hélice α (*Figura 16A, flechas gruesas*).

La proximidad entre esta densidad vacía y la hélice $\alpha 4$ del modelo atómico (PDB 2GSY) sugiere la posibilidad de ajustar ambas estructuras de forma que se mantenga el intercambio molecular de la estructura de rayos X (*Figura 16B*). El movimiento propuesto implica una serie de rotaciones permitidas en los ángulos de los $C\alpha$ de los residuos del bucle precedente a la hélice $\alpha 4$. Aunque no se puede descartar que este movimiento sea llevado a cabo por una hélice de la misma cadena (en lugar de una proveniente de una cadena de VP2 adyacente), el movimiento requerido sería mucho más drástico en este caso. Ambas alternativas implican que la posición de la hélice C-terminal $\alpha 4$ es flexible. Esta flexibilidad ha podido ser revelada como consecuencia de las diferentes condiciones de análisis de las SVPs T=1: mientras que las cápsidas fueron vitrificadas en condiciones próximas a su estado nativo, su cristalización se realizó en presencia de 17% PEG y 5% isopropanol. La flexibilidad conformacional de la hélice $\alpha 4$ podría ser crítica si tenemos en cuenta que en la forma precursora de pVP2 tiene asociado temporalmente su dominio C-terminal, fundamental para el ensamblaje de la cápsida.

4.1.7 Estructura de la cápsida T=13 de IBDV

La 3DR se generó a partir de 9483 imágenes de viriones de IBDV purificados a homogeneidad, donde es posible apreciar partículas con una marcada morfología poligonal y un contorno periférico aserrado (*Figura 17A*). El mapa de densidad de la cápsida T=13 fue calculado con una resolución de 11.6 Å y 10.4 Å en base a los criterios FSC 0.5 y 0.3, respectivamente (*Figura 17B*). El mapa de superficie de la 3DR (*Figura 17C y 17D*) presenta las características previamente descritas (Böttcher y col. 1997; Castón y col. 2001). La cápsida es una superficie continua con 260 protuberancias triméricas correspondientes a los dominios P de trímeros de VP2. Es posible distinguir hasta 5 tipos de capsómeros triméricos (nombrados a-e) en función de su entorno (*Figura 17C*), observándose cambios entre trímeros cuasiequivalentes en función de las interacciones que establecen entre sí. La unidad asimétrica esta formada por cuatro trímeros (a-d), denominados triángulo G4 (*Figura 17C, triángulo azul*), y una subunidad del trímero e.

El modelo cristalográfico de la cápsida de IBDV a 7 Å de resolución (Coulibaly y col. 2005) y la 3DR de criomicroscopía electrónica a 10.4 Å se han comparado mediante dos aproximaciones complementarias: el ajuste de las subunidades de VP2 en el mapa completo del virión mediante el programa Uro y el análisis de la unidad asimétrica en volúmenes locales con el programa

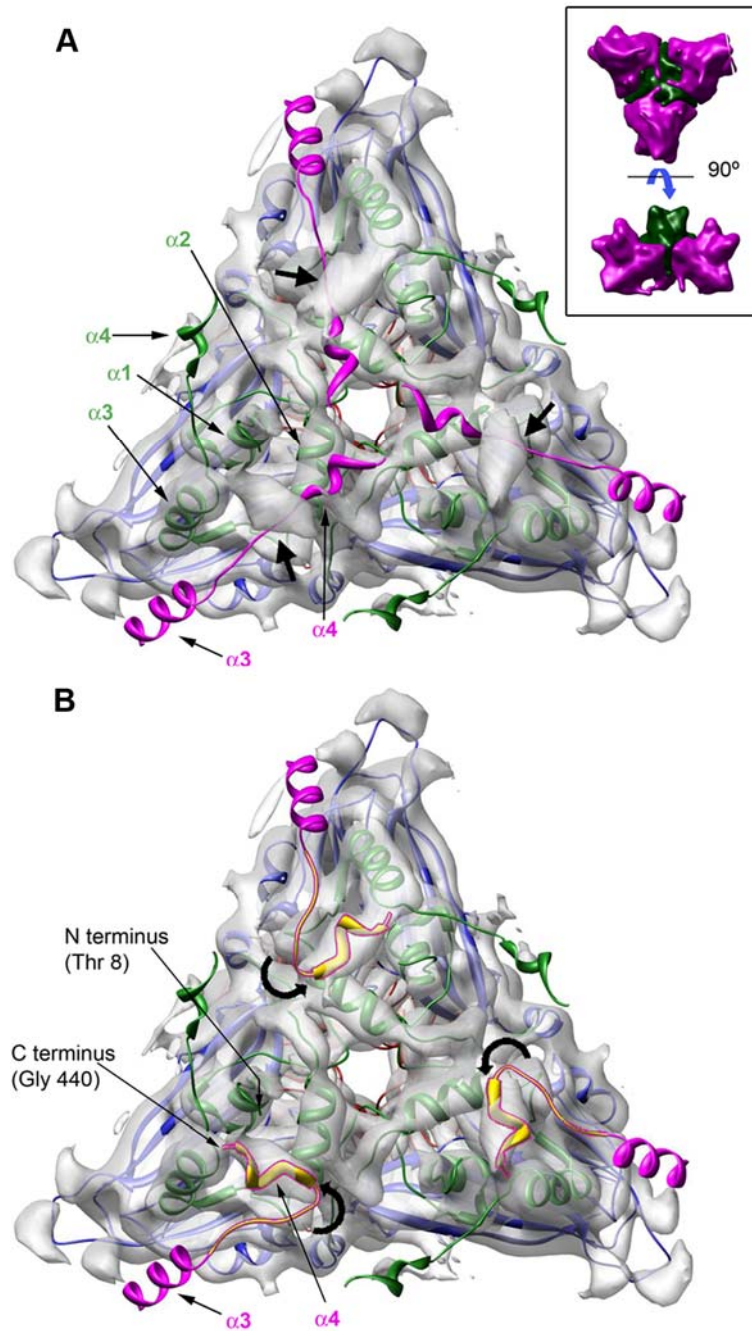


Figura 16. Flexibilidad conformacional de la hélice $\alpha 4$ del extremo C-terminal de VP2. (A) Vista inferior del modelo de rayos X (2GSY) ajustado al mapa de microscopía de la SVP T=1. Se indican las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ del dominio B (verde) para un monómero y las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ que se proyectan del monómero adyacente (magenta). Las flechas gruesas apuntan a las densidades vacías tras el ajuste del modelo original. El diagrama en el recuadro muestra las vistas inferior y lateral de cuatro trímeros tras ser filtrados a 15 Å. Obsérvese el intercambio molecular entre los trímeros de VP2. (B) Igual que panel A, pero las hélices $\alpha 4$ de las cadenas vecinas (amarillo con contorno magenta) han sido remodeladas para ajustarse a la densidad del mapa. Las flechas curvadas indican como la flexibilidad conformacional viene mediada básicamente por la flexión del bucle precedente. Las hélices $\alpha 4$ en verde no han sido modificadas.

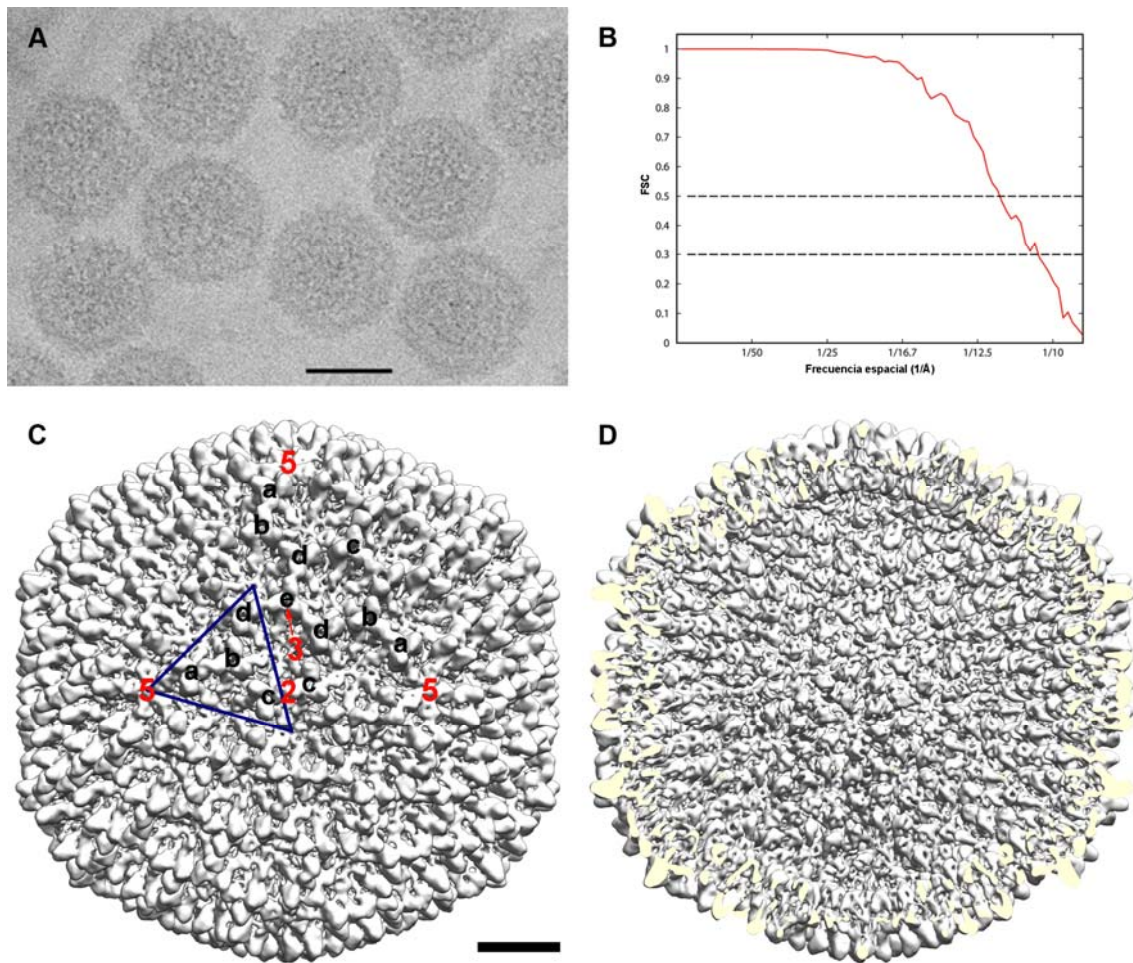


Figura 17. Estructura tridimensional de la cápsida de IBDV. (A) Criomicrografía electrónica de cápsidas de IBDV. La barra de escala representa 50 nm. (B) Determinación de la resolución de la 3DR mediante FSC. Las líneas discontinuas representan umbrales de FSC 0.5 y 0.3 para los cuales se obtienen valores de 11.6 y 10.4 Å de resolución, respectivamente. (C,D) Estructura tridimensional mostrando la cara externa (C) e interna (D) de la cápsida de IBDV. Se indican los cinco tipos de trímeros de VP2 con letras negras (a-e), así como la localización de los ejes de simetría (rojo). El triángulo azul indica los límites de un triángulo G4. La barra de escala corresponde a 100 Å.

Situs (*Figura 18*). Los resultados obtenidos en ambas aproximaciones son prácticamente idénticos (desviación cuadrática media entre las posiciones de los C α menor de 2Å). Mientras que el ajuste entre los dominios P y S es excelente entre ambos mapas, el mapa de criome presenta unas densidades adicionales (*Figura 18C-D, en amarillo*) que no se corresponden con ninguna densidad del dominio B de VP2. Estas densidades adicionales fueron correlacionadas con los 10-12 primeros residuos de las subunidades de VP2, que son invisibles en el mapa excepto en la subunidad F del pentámero (*Figura 18C, recuadro interior*) La posterior comparación entre las 3DR de la cápsida vacía de HT-VP2-466 y la de IBDV es consistente con esta interpretación (*apartado 4.1.9*).

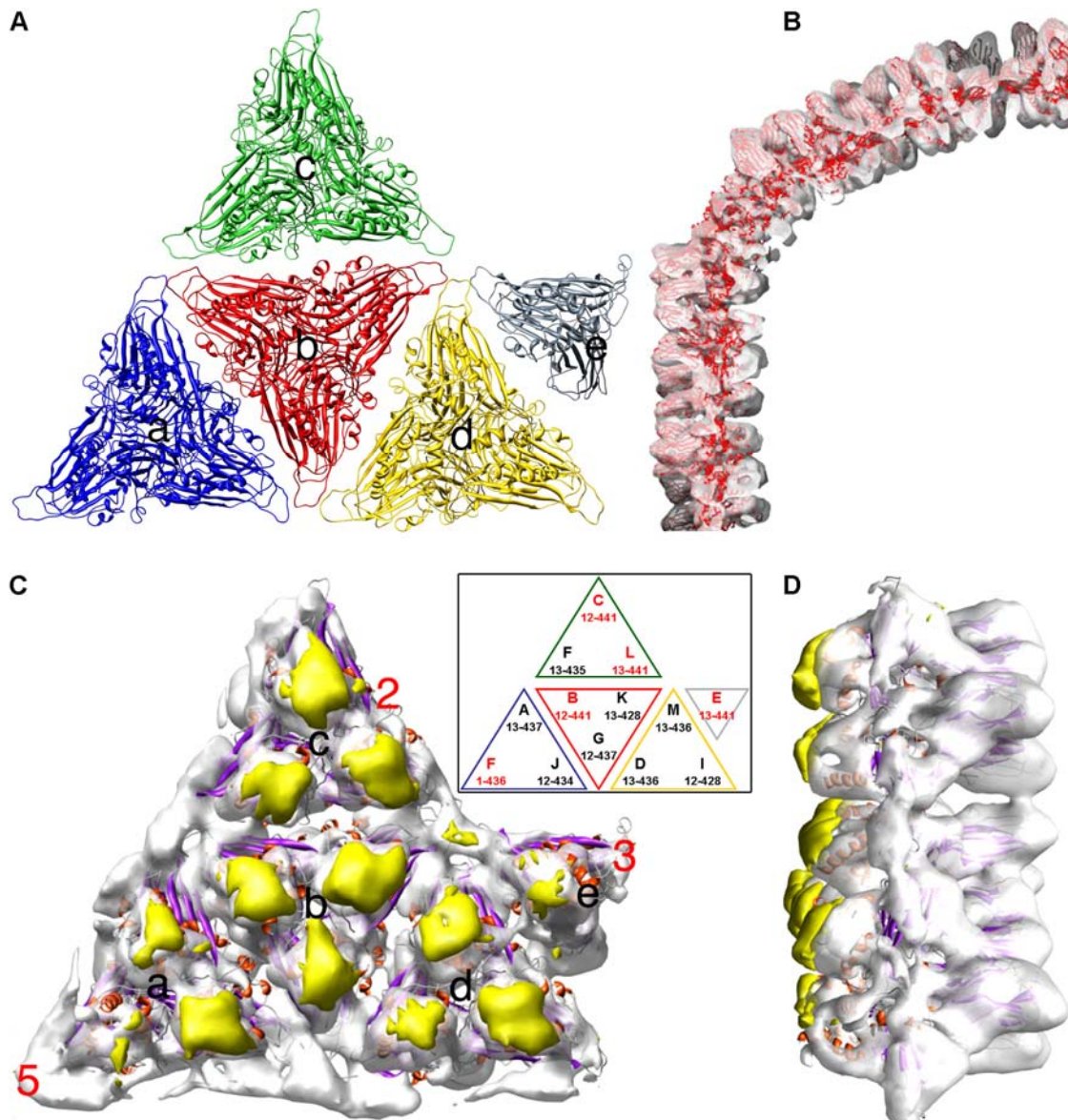


Figura 18. Ajuste del modelo de rayos X de IBDV en la 3DR del virión. (A) Modelo atómico de la unidad asimétrica de IBDV (PDB 1WCE) (Coulibaly y col. 2005) visto desde la superficie interna de la cápsida, indicando los trímeros a-e. (B) Sección (~70 Å de grosor) de la 3DR de IBDV con el modelo atómico ajustado mediante URO. (C,D) Unidad asimétrica de IBDV ajustada en la región correspondiente del mapa de criome visto desde la cara interna de la cápsida (C) y de perfil (D) de. La superficie en blanco muestra las densidades correspondientes al modelo de rayos X filtrado a la misma resolución que el mapa de criome; se puede observar que los dominios P y S de ambos se ajustan totalmente. Las densidades del mapa de microscopía de las que no da cuenta el modelo de rayos X se representan en amarillo. El recuadro interior muestra un esquema de la unidad asimétrica donde se indica el primer y el último residuo visibles en el modelo de rayos X; la mayoría de los extremos amino y/o carboxilo de VP2 son invisibles, excepto los indicados en rojo. Para cada trímero se sigue el mismo código de colores mostrado en (A).

Es interesante destacar que al igual que ocurre con la hélice C-terminal α_4 de SVP T=1 en el mapa de criome (Figura 16, apartado 4.1.6), el ajuste local de cinco cadenas de VP2 en un pentámero segmentado del virión muestra que la hélice α_{Nter} (residuos 1-10) es el único SSE ajustado fuera de la densidad del mapa de criomicroscopía (Figura 19A, azul). Esta hélice α_{Nter} puede ser ajustada en una densidad vacía adyacente mediante la rotación del bucle precedente (residuos 11-13), quedando posicionada de forma paralela a la superficie interna del pentámero en el virión (Figura 19A-C, hélices naranjas). Por lo tanto, la hélice α_{Nter} también puede presentar flexibilidad conformacional en la cápsida T=13. La estructura de rayos X y el mapa de criome de IBDV no muestran vestigios del intercambio molecular mediado por la hélice α_4 , descrito previamente en la SVP T=1 (Garriga y col. 2007). Este hecho podría estar relacionado con la coplanaridad (ángulo diédrico $\sim 180^\circ$) de los trímeros de VP2 adyacentes en la unidad asimétrica en la cápsida T=13 (Figura 18A), mientras que los trímeros de VP2 en la SVP T=1 presenta un ángulo diédrico de $\sim 144^\circ$ que facilitaría el intercambio molecular de la hélice α_4 .

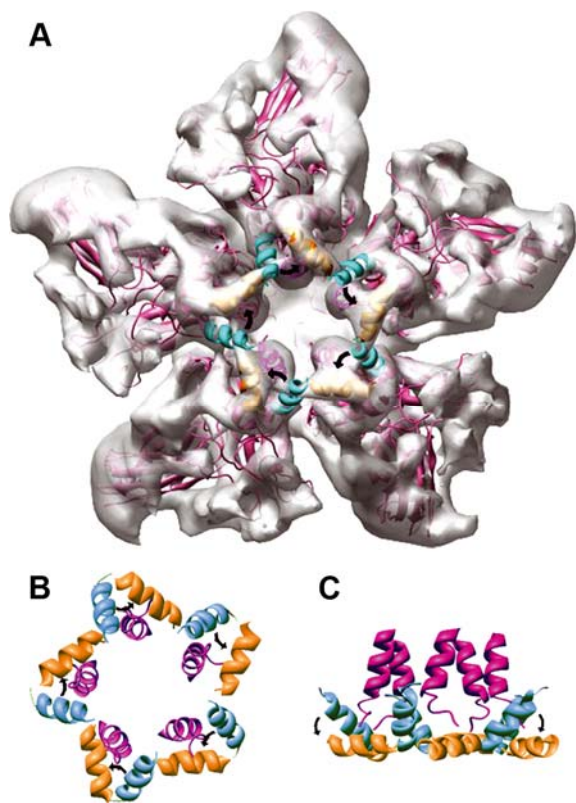


Figura 19. Ajuste del modelo atómico de VP2 en el pentámero de la cápsida del virión. (A) Pentámero del modelo de VP2 del virión (1WCE, cadena F) ajustado en la densidad pentamérica correspondiente del mapa de criomicroscopía de la cápsida de IBDV. La hélice α_{Nter} original se muestra en celeste; tras aplicar un movimiento de rotación (flechas) en el bucle precedente para ajustarla a la densidad vacía más cercana, se muestra en naranja. (B,C) Vistas detalladas (B) inferior y (C) lateral del movimiento aplicado, mostrando como referencia la hélice α_3 C-terminal (magenta).

4.1.8 Estructura de la cápsida T=13 de la variante HT-VP2-466

La visualización directa de las imágenes de criome de las VLPs de HT-VP2-466 indica que se trata de una mezcla compleja de diferentes ensamblados con un marcado contorno hexagonal, con un tamaño que oscila entre ~ 65 nm (similar a las cápsidas T=13 de IBDV) y ~ 53 nm; así

como una variedad de ensamblados isométricos de ~30 nm similares a las SVPs T=1 (*Figura 20A*, círculos azul, verde y rojo, respectivamente). Todas estas estructuras relacionadas presentan el contorno aserrado característico de los trímeros de VP2.

Se realizó una 3DR de las cápsidas HT-VP2-466 de mayor tamaño a partir de 988 imágenes con una resolución de 15.4 Å y 14.0 Å según los criterios de FSC 0.5 y 0.3, respectivamente (*Figura 20B*). El mapa de densidad de HT-VP2-466 muestra que es una cápsida icosaédrica T=13 con una superficie externa prácticamente idéntica a la de IBDV, mientras que las diferencias estructurales más importantes se localizan en la superficie interna (*Figura 20C-D*). También se generó un mapa tridimensional a partir de 108 imágenes de cápsidas HT-VP2-466 de tamaño intermedio a una resolución de ~23 Å (*Figura 20E*) determinada mediante el criterio FRC (*Fourier Ring Correlation*) (Conway y col. 1993). Estas cápsidas tienen una arquitectura T=7 basada en el mismo tipo de capsómeros triméricos observados en las cápsidas T=13 del virión pero sólo se requieren tres tipos de capsómeros según los contactos que establecen los trímeros entre sí (denominados a', b' y c'). Por tanto, las cápsidas T=13 y T=7 comparten el mismo bloque trimérico fundamental para construir la estructura icosaédrica, al igual que la T=1 resuelta previamente (*apartado 4.1.5*).

Los intentos de definir un mapa 3D a partir de las imágenes de las partículas isométricas HT-VP2-466 de aspecto similar a SVPs T=1 fueron fallidos, debidos probablemente a una variabilidad intrínseca en el tamaño de las partículas.

4.1.9 Comparación bioquímica y estructural entre las cápsidas de IBDV y HT-VP2-466

Los mapas tridimensionales de las cápsidas de IBDV y HT-VP2-466 son prácticamente superponibles. Así, las secciones centrales (*Figura 21A-B*) y los perfiles radiales de distribución de densidad de las 3DRs (*Figura 21B*) son muy similares a 15 Å de resolución. Las únicas diferencias detectadas se localizan en dos zonas definidas: la superficie externa de la cápsida de IBDV (radio 325-345 Å) y la superficie interna de la cápsida de HT-VP2-466 (radio 268-285 Å) (*Figura 21A*, flechas rojas). Con el fin de determinar con mayor precisión estas diferencias, se calcularon dos mapas de diferencia entre las 3DRs mediante la sustracción aritmética de los valores de densidad normalizados de cada cápsida y alternando el orden de sustracción. Estos mapas de diferencia muestran las características estructurales propias de cada estructura, en la superficie externa de la cápsida de IBDV (*Figura 21E*, rojo) y en la superficie interna de la cápsida de HT-VP2-466 (*Figura 21F*, rojo). En la superficie externa de IBDV las regiones que muestran mayores diferencias se encuentran en los brazos de conexión entre los trímeros de VP2

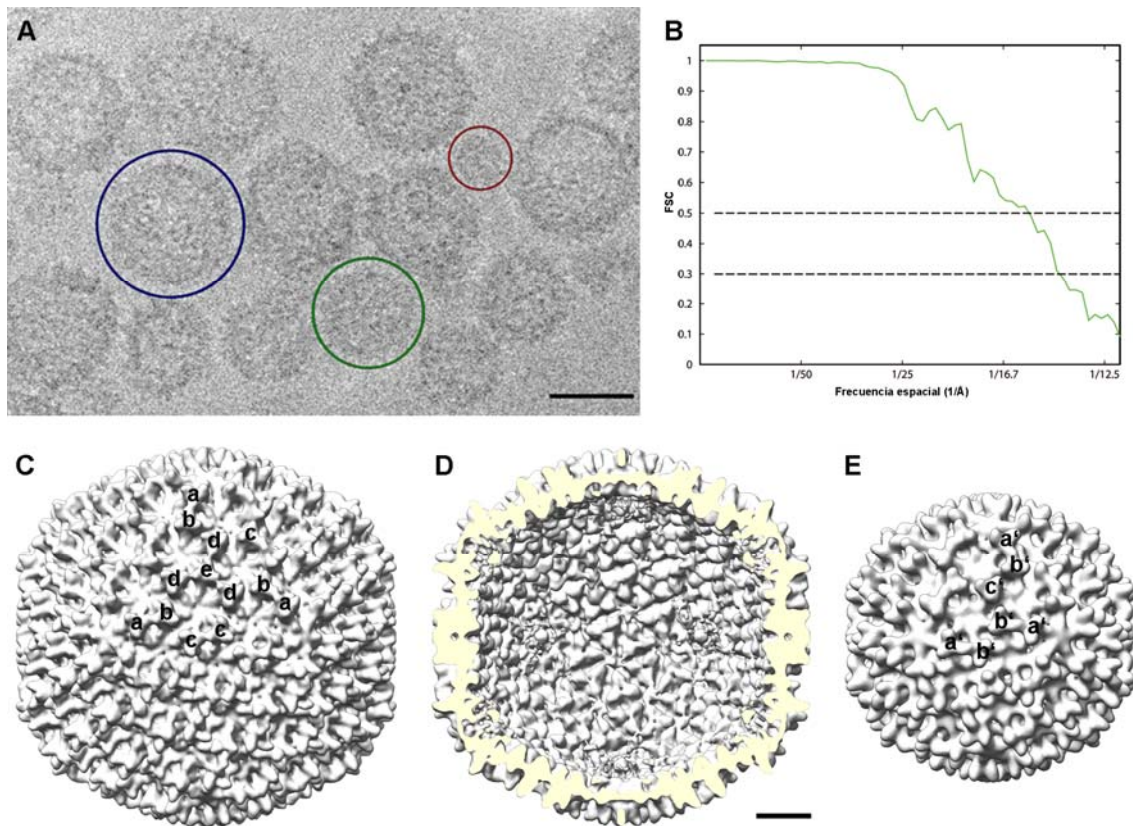


Figura 20. Estructura tridimensional de las cápsidas formadas por HT-VP2-466. (A) Criomicrografía electrónica de VLPs HT-VP2-466. Los círculos rodean los ensamblados icosaédricos de ~65 nm (azul), ~55 nm (verde) y ~30 nm de diámetro (rojo). La barra de escala indica 50 nm. (B) Resolución de la 3DR de la cápsida T=13 de HT-VP2-466 mediante FSC. Las líneas discontinuas representan umbrales de FSC 0.5 y 0.3 para las que se obtienen valores de 15.4 y 14.0 Å de resolución, respectivamente. (C,D) Estructura tridimensional de la cápsida T=13 de HT-VP2-HT466 vista desde un eje de simetría de orden 2 la superficie externa (C) e interna (D). Se indican los cinco tipos de trímeros de VP2 con letras (a-e). (E) Estructura tridimensional de la cápsida T=7 de HT-VP2-466. Se indican los tres tipos de trímeros con letras (a'-c'). La barra de escala indica 100 Å.

adyacentes. Por otra parte, las diferencias en la superficie interna de la cápsida de HT-VP2-466 se localizan en los ejes locales hexaméricos y en los ejes pentaméricos de la cápsida, donde se detectan densidades adicionales. Por otra parte, el análisis electroforético realizado en paralelo muestra que los componentes proteicos mayoritarios los viriones son VP2 y VP3 (~90% w/w de la proteína total) (*Figura 21D*), mientras que el análisis equivalente de las fracciones enriquecidas en cápsidas HT-VP2-466 muestra que están constituidas por un único péptido de ~54 kDa. Por tanto, las pequeñas diferencias estructurales observadas entre ambas cápsidas T=13 no pueden dar cuenta de la diferencia en contenido de VP3. Este resultado implica que ambas cápsidas están constituidas por una única proteína, VP2 en el caso de IBVDV o su variante HT en el de la cápsida HT-VP2-466, y que además VP3 es un componente estructural del virión que no se incorpora como un parte integral la cápsida madura.

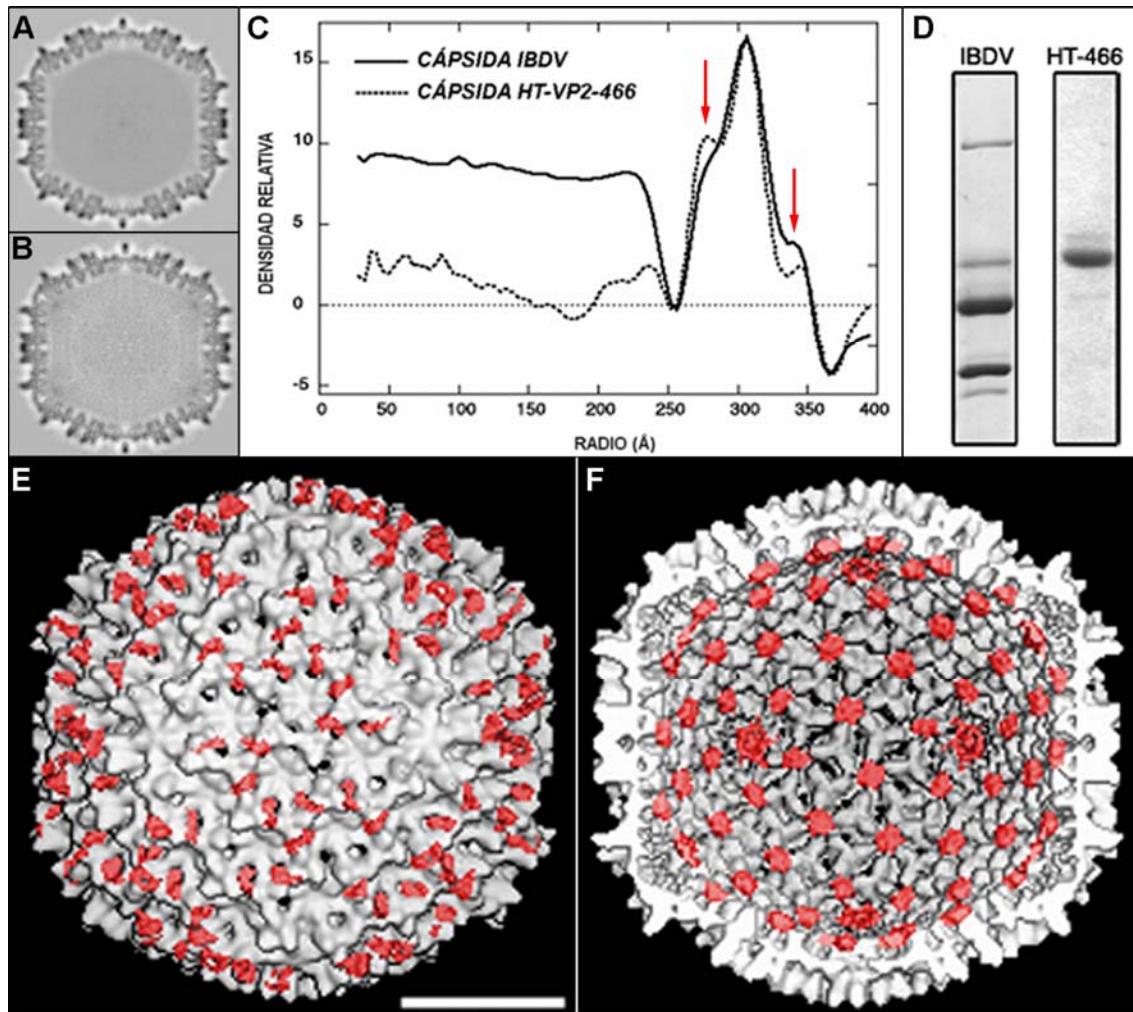


Figura 21. Comparación estructural entre las cápsidas de IBDV y HT-VP2-466. (A, B) Secciones centrales de las 3DRs de las cápsidas T=13 de (A) IBDV y (B) HT-VP2-466 (B). (C) Distribución radial de densidad de las 3DR de las cápsidas de IBDV (línea continua) y HT-VP2-466 (línea discontinua) calculadas a 15 Å de resolución. Los perfiles de la cápsida (comprendido entre los radios 253-350 Å) son prácticamente superponibles, a excepción de las diferencias indicadas con flechas. (D) Análisis por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las fracciones purificadas de IBDV (izquierda) y HT-VP2-466 (derecha). (E) Mapa de diferencia (rojo) calculado mediante la substracción [HT-VP2-466] – [IBDV] y representado sobre la superficie externa de la cápsida de IBDV (blanco). (D) Mapa de diferencia (rojo) calculado mediante la substracción [IBDV] – [HT-VP2-466] y representado sobre la superficie interna de la cápsida de HT-VP2-466. La barra de escala corresponde a 200 Å.

4.1.10 Análisis de la cuasiequivalencia de la cápsida T=13 del virión

Los resultados descritos implican que la cápsida infectiva de IBDV debe ser considerada como una cápsida cuasiequivalente ya que está constituida por un único polipéptido, VP2, que modifica su patrón de interacciones según su entorno local. Para corroborar esta hipótesis y

evaluar adecuadamente las características equivalentes de los mapas de las cápsidas T=13 de IBDV y HT-VP2-466 las secciones icosaédricas de las 3DRs, alineadas y filtradas a 15 Å de resolución, fueron comparadas con el fin de poder apreciar las características equivalentes en ambas (*Figura 22*). En las secciones exteriores se observa que las unidades triméricas son básicamente idénticas (*Figura 22A-C*, radio 328-311 Å). Posteriormente, la continuidad de las densidades en la cápsida es evidente y se pueden observar pequeñas diferencias entre ambas cápsidas (*Figura 22D-E*, radio 302-294 Å). A un radio de ~286 Å (*Figura 22F*), las secciones empiezan a corresponderse con la superficie interna de la cápsidag y se puede observar la continuidad entre las 260 unidades triméricas externas con otras 260 internas, incluidas las que rodean los ejes pentaméricos. Los trímeros pentaméricos se encuentran empaquetados más estrechamente que los hexaméricos y comienzan a fusionarse a un radio de 277 Å (*Figura 22G*), además se observan las densidades adicionales en los ejes locales hexaméricos de la cápsida HT-VP2-466, que son conspicuas a un radio de 269 Å (*Figura 22H*).

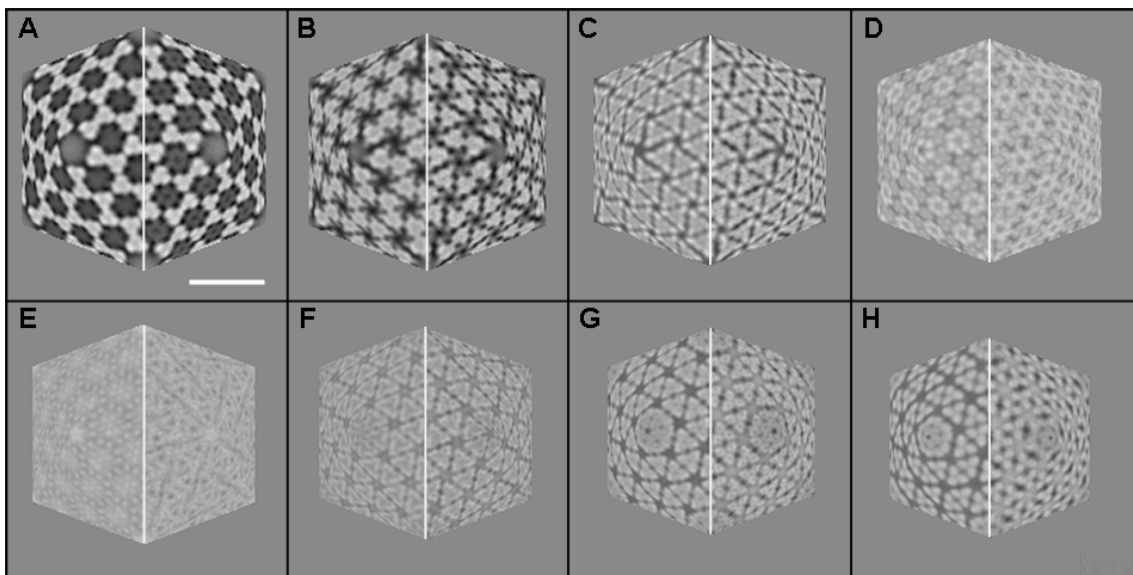


Figura 22. Organización estructural de la cápsida de IBDV y HT-VP2-466. (A-H) Secciones icosaédricas de las cápsidas de IBDV (mitad izquierda) y HT-VP2-466 (mitad derecha) filtradas a 15 Å de resolución y visualizadas a lo largo de un eje de simetría de orden 2. La distancia perpendicular entre las secciones icosaédricas y el centro de las cápsidas T=13 corresponde a (A) 328, (B) 319, (C) 311, (D) 302, (E) 294, (F) 286, (G) 277 y (H) 269 Å. La barra de escala corresponde a 200 Å.

4.1.11 Conformaciones estructurales de la hélice a anfipática 443- 452

El ajuste del modelo atómico de la cápsida de IBDV (PDB 1WCE) en el mapa de criome de la cápsida HT-VP2-466 a 14 Å de resolución (*Figura 23*) muestra que, mientras las superficies externas de ambos mapas son prácticamente superponibles, existen claras diferencias en las

superficies internas. Así, bajo el dominio B de cada subunidad de VP2 se detectan densidades adicionales, al igual que fue descrito en el ajuste entre las estructuras de rayos X y criome de la cápsida de IBDV (*apartado 4.1.7*). Estas densidades se deben corresponder con segmentos comunes entre las proteínas VP2 y HT-VP2-466, es decir los segmentos flexibles del extremo N-terminal y, en menor medida, algunos residuos del extremo C-terminal, que no son visibles en el mapa de rayos X pero que a la resolución de 14 Å serían visibles como densidades poco definidas en los mapas de criome. Por otra lado, en los ejes pentaméricos y hexaméricos locales se detectan densidades adicionales (*Figura 23, superficies azules*), como se describió previamente cuando los mapas de criome de las cápsidas T=13 de virión y HT-VP2-466 fueron comparados entre sí (*apartado 4.2.6*). Estas diferencias pueden estar relacionadas con elementos adicionales de la proteína quimérica HT-VP2-466: considerando que los HT tienden a formar largos bucles o regiones desestructuradas (Ferrer-Orta y col. 2004; McCarthy y col. 2004), estas densidades fueron correlacionadas con la hélice anfipática 443-452 del extremo C-terminal implicada en el polimorfismo estructural (*Figura 23, recuadro interior*).

Las hélices α anfipáticas fueron modeladas y ajustadas en base a la morfología de las densidades locales del mapa de criome siguiendo dos disposiciones diferentes: i) un haz compacto de cinco hélices α en los ejes pentaméricos y ii) una distribución radial de seis hélices α en forma de estrella en los ejes hexaméricos locales (*Figura 22, hélices azules*). La asociación paralela de cinco hélices α no sólo da cuenta de la densidad cilíndrica en los ejes de simetría pentaméricos sino que además la superficie hidrofóbica de cada hélice anfipática queda estabilizada y protegida del medio hidrofílico local (*Figura 24A*). Por otra parte, el modelado de las hélices anfipáticas en los ejes hexaméricos locales con un conformación abierta viene sustentado por: i) la presencia en el mapa de criome de densidades de conexión con las dimensiones adecuadas para ajustar una hélice α (*Figura 23*); y ii) la inspección del potencial electrostático de la cara interna de los hexámeros, que revela la existencia de seis carriles hidrofóbicos donde se acomodarían las hélices anfipáticas a través de sus superficies hidrofóbicas (*Figura 24B*).

En este modelo pseudoatómico de la cápsida de HT-VP2-HT466, el haz pentamérico de las hélices anfipáticas sobresale hacia el interior de la cápsida, ya que las hélices α_3 precedentes forman un estrecho canal pentamérico con un diámetro de ~ 20 Å (*Figura 24A y C, flecha doble*). Sin embargo, las hélices anfipáticas hexaméricas quedan parcialmente incluidas en la región central (~ 35 Å) de la superficie interna del hexámero (*Figura 24B y D, flecha doble*). Estas dos clases de disposición establecen distintas relaciones espaciales entre trímeros adyacentes. Mientras que los trímeros de VP2 que constituyen un pentámero están inclinados

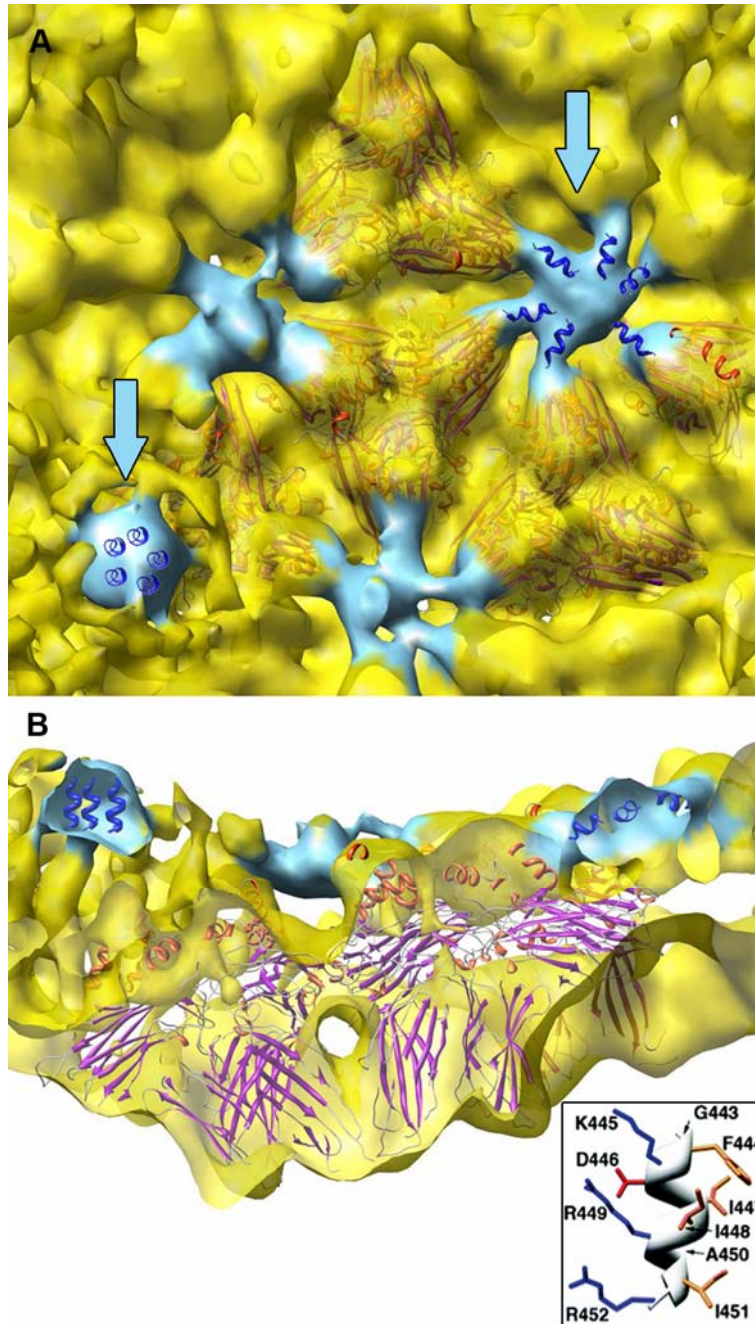


Figura 23. Ajuste de la unidad asimétrica del virión en la cápsida HT-VP2-466. (A) Vista desde la superficie interna del modelo de rayos X ajustado en la región correspondiente del mapa de criome. Las superficies azules indican 4 de las 132 densidades (12 pentaméricas y 120 hexaméricas) correspondientes al mapa de diferencia calculado sustrayendo la cápsida de IBDV a la de HT-VP2-466. Las flechas en azul indican las densidades utilizadas para modelar y ajustar 5 o 6 hélices anfipáticas (residuos 442-452, azul) en un eje pentamérico o uno cuasihexamérico, respectivamente. (B) Igual que A, pero se muestra una vista lateral de una sección de la cápsida. Obsérvese, el ajuste de los dominios P y B de VP2 a sus densidades correspondientes. El recuadro interior muestra el modelo usado para la hélice α anfipática.

unos respecto a otros, generando contactos con un ángulo diédrico de $\sim 144^\circ$, los trímeros de VP2 hexaméricos están orientados con sus dominios P cuasi ortogonales a la superficie externa de la cápsida, generando contactos planares con un ángulo de $\sim 180^\circ$ (Figura 24A y B, recuadros).

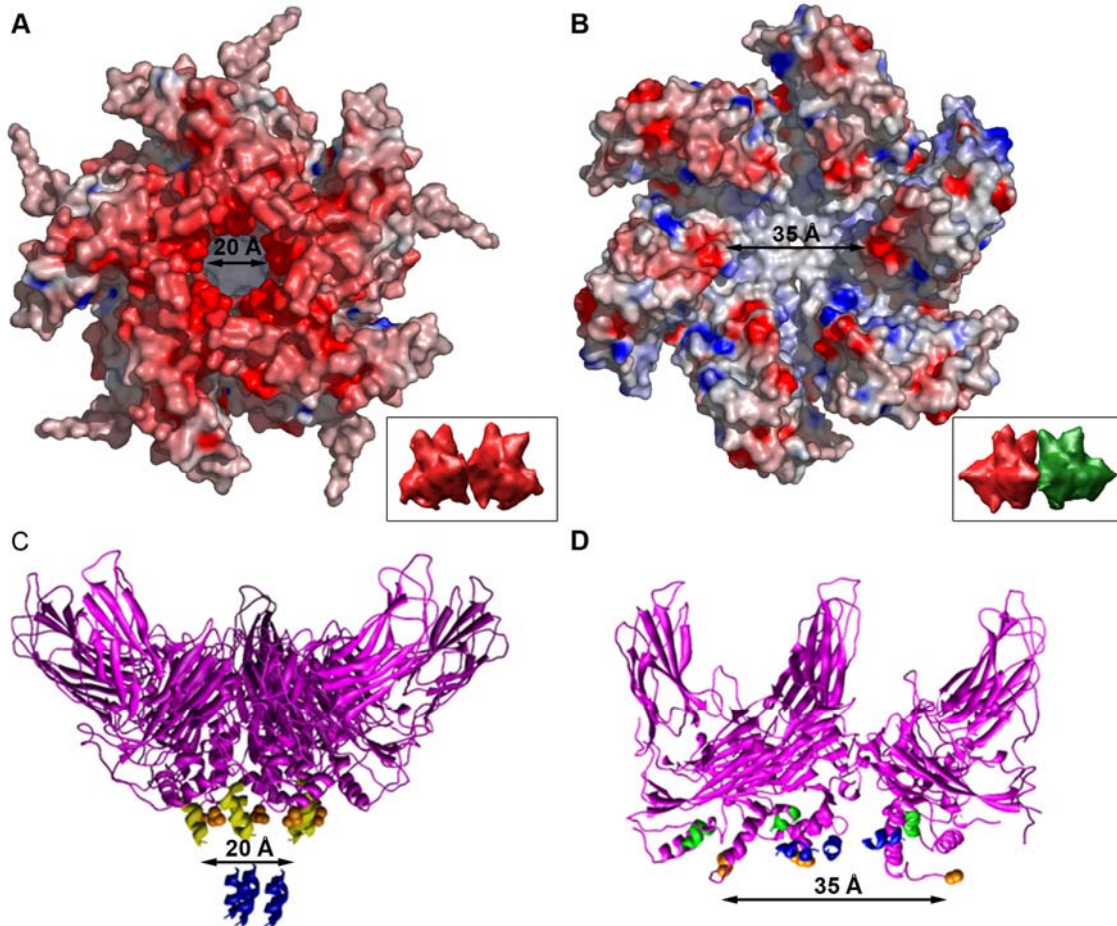


Figura 24. Conformaciones estructurales de la hélice α anfipática de pVP2. (A,B) Superficies internas de potencial electrostático de un pentámero (A) y un hexámero (B) calculadas con GRASP. Se muestra la distribución de cargas negativas (rojo) y positivas (azul). Obsérvese el canal estrecho (flecha doble) formado por las cinco hélices α_3 alrededor del eje pentamérico en contraste con canal ancho formado en el eje hexamérico (flecha doble). Los recuadros interiores ilustran las dos clases de contactos entre trímeros de VP2: inclinados en los ejes pentaméricos (se representan dos trímeros pentaméricos en rojo) o coplanares en los ejes hexaméricos locales (se representa un trímero pentamérico en rojo y uno hexamérico en verde). (C,D) Vistas laterales del modelo pseudoatómico de la cápsida HT-VP2-466 de un pentámero (C) y un hexámero de VP2 (D). Para facilitar la visualización, la mitad frontal del hexámero ha sido eliminada. Las hélices α anfipáticas se muestran en azul, las cadenas de VP2 en magenta y el último residuo visible del extremo C-terminal con esferas naranjas. En el pentámero (C), también se muestran las hélices α_{Nter} (amarillo) ajustadas tal como en la Figura 24G-I. En el hexámero (D) las hélices α_{Nter} (verde) se mantienen en la posición original del modelo de rayos X.

4.2 Caracterización de las ribonucleoproteínas de IBDV

4.2.1 Purificación de complejos ribonucleoproteicos de IBDV

El análisis bioquímico de las cápsidas HT-VP2-466 (*apartado 4.1.9*) y la resolución de la estructura atómica de la cápsida de IBDV (Coulibaly y col. 2005) demuestran que está formada únicamente por trímeros de VP2. VP3, la otra proteína estructural mayoritaria de IBDV, interviene temporalmente en la morfogénesis de la cápsida y se localiza en su interior. En IPNV, VP3 se encuentra asociada con el dsRNA viral formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) que son liberados cuando los viriones son dializados en condiciones de baja fuerza iónica (Hjalmarsson y col. 1999). Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos la purificación de las RNPs de IBDV y su caracterización estructural y funcional. Con este objetivo, partículas de IBDV purificadas a homogeneidad fueron dializadas en condiciones de baja fuerza iónica en presencia de EDTA (tampón Tris-EDTA). El análisis mediante microscopía electrónica muestra la presencia mayoritaria de unas estructuras filamentosas rodeadas de un material granulado que probablemente se corresponde con productos de desensamblaje de las cápsidas, tanto por tinción negativa (*Figura 25A*), como por sombreado metálico (*Figura 25B*). Además, aunque es posible observar puntualmente la presencia de partículas virales, éstas presentan una integridad estructural aparentemente comprometida (*Figura 25A, flechas*). Con el fin de purificar las RNPs de IBDV, las muestras dializadas frente al tampón Tris-EDTA fueron ultracentrifugadas en un gradiente discontinuo de glicerol (33-40-50-75%). Las fracciones del gradiente fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con BrEt (*Figura 25C*), y SDS-PAGE y WB con sueros específicos frente a las proteínas VP1, VP2 y VP3 (*Figura 25F*). El examen electroforético del gradiente muestra que los ácidos nucleicos se localizan en las fracciones centrales del mismo, en dos bandas de movilidad electroforética ligeramente distinta, que probablemente se corresponden a los segmentos A (3.2 kb) y B (2.8 kb) del genoma viral (*Figura 25C*). Mientras VP1 y la mayor parte de VP3 comigran con el dsRNA viral, VP2 se localiza en las fracciones inferiores y superiores del gradiente (*Figura 25D*). Con el fin de purificar el complejo VPg-dsRNA, se llevó a cabo el mismo protocolo (diálisis y ultracentrifugación) en presencia de SDS (*Figura 25E*). En estas condiciones desnaturizantes se rompen todas las interacciones no covalentes entre los elementos constitutivos de la partícula viral pero se mantiene la unión covalente entre la polimerasa viral VP1, denominada en este caso VPg, y los extremos 5' del dsRNA viral (Muller y Nitschke 1987; Spies y Muller 1990). Análisis similares a los realizados con las RNPs mediante SDS-PAGE y WB confirman que únicamente VP1 está formando parte de estos complejos.

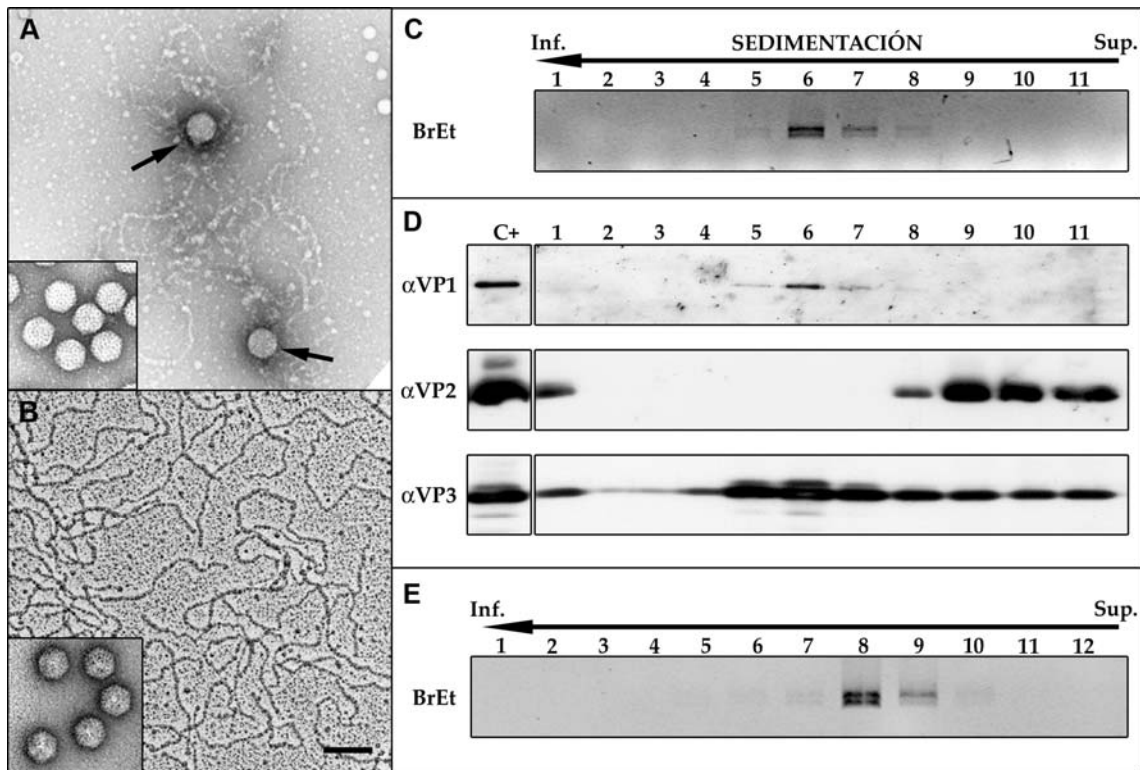


Figura 25. Análisis de los complejos ribonucleoproteicos de IBDV. (A-B) Análisis mediante microscopía electrónica y contrastado por (A) tinción negativa o (B) sombreado metálico de partículas virales de IBDV dializadas frente al tampón de baja fuerza iónica Tris-EDTA. Las flechas indican partículas virales no desensambladas. Los recuadros corresponden a muestras control dializadas frente a PES y, por tanto, estructuralmente íntegras. La barra de escala corresponde a 100nm. (C-D) Análisis mediante (C) electroforesis en geles de agarosa teñidos con BrEt o (D) SDS-PAGE seguido de WB de las fracciones (1-11) de los gradientes discontinuos de glicerol correspondientes a la purificación de RNPs. El control positivo (C+) corresponde a viriones de IBDV. (E) Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con BrEt de las fracciones (1-12) de los gradientes discontinuos de glicerol correspondientes a la purificación de VPg-dsRNA. Para cada gel se indica si la detección corresponde a tinción con BrEt o a WB con el anticuerpo indicado.

4.2.2 Caracterización bioquímica y funcional de las RNPs de IBDV

Para llevar a cabo una serie de estudios funcionales y estructurales de las distintas preparaciones de ácidos nucleicos de IBDV (dsRNA, VPg-dsRNA y RNPs), era determinante establecer la homogeneidad y reproducibilidad de los complejos purificados. Para ello, se llevaron a cabo análisis mediante electroforesis en geles nativos de agarosa teñidos con BrEt (Figura 26A, arriba). Mientras el complejo VPg-dsRNA presenta un retardo definido de movilidad electroforética respecto al dsRNA viral, las RNPs presentan un retardo mayor con respecto al complejo VPg-dsRNA. Además, al igual que ocurre en el dsRNA viral, tanto en complejo VPg-dsRNA como en las RNPs se detectan dos bandas de tamaño definido, lo que implica la unión

de una cantidad constante de proteína a cada uno de los segmentos de dsRNA. Adicionalmente, mediante electrotransferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección con anticuerpos específicos es posible identificar la composición bioquímica de cada complejo (*Figura 26A*).

Los complejos purificados fueron evaluados también mediante experimentos de accesibilidad a RNasa III (una ribonucleasa específica de dsRNA), usando como control positivo el dsRNA viral purificado y como control negativo viriones intactos de IBDV (*Figura 26B*). Mientras el dsRNA del complejo VPg-dsRNA es degradado de forma análoga al dsRNA viral, las RNPs presentan una protección parcial frente a la actividad ribonucleasa. Estos resultados indican una menor accesibilidad del dsRNA en las RNPs a la enzima y sugieren una interacción extensiva de VP3 a lo largo del ácido nucleico.

Finalmente, la funcionalidad de los complejos purificados fue evaluada en presencia de [³²P]-UTP siguiendo las condiciones óptimas para la actividad RNA-polimerasa RNA-dependiente asociada a las partículas virales determinadas previamente (Spies y col. 1987). Tras eliminar los nucleótidos no incorporados, los productos de reacción fueron analizados mediante electroforesis en geles nativos de agarosa y autorradiografía (*Figura 26C, recuadro interior*). En las reacciones correspondientes a las RNPs, al igual que con las partículas virales, se detecta la presencia de dos bandas marcadas radiactivamente con una acumulación de señal radioactiva a lo largo del tiempo. Las partículas virales y las RNPs presentan una curva similar de incorporación de nucleótido marcado, con un máximo de actividad durante la primera hora de reacción. Por el contrario, en las reacciones llevadas a cabo con el dsRNA purificado y el complejo VPg-dsRNA no se detecta incorporación de nucleótido marcado.

Estos resultados sugieren que las RNPs de IBDV están recubiertas homogéneamente por un número definido de copias de VP3 y que son funcionalmente competentes para la síntesis de RNA en ausencia de VP2 y una cápsida estructuralmente integra.

4.2.3 Caracterización estructural de las RNPs de IBDV

Preparaciones de dsRNA purificado, complejos VPg-dsRNA y RNPs de IBDV, analizados en geles nativos de agarosa (*apartado 4.2.2*), fueron caracterizadas en paralelo mediante microscopía electrónica y sombreado metálico (*Figura 27*). Además, como control interno del experimento se incluyeron preparaciones de dsRNA viral. Una primera inspección de las imágenes obtenidas indica que estos complejos están constituidos por estructuras filamentosas de longitud similar (*Figura 27A, C y E*). Con el objetivo de obtener medidas estadísticamente

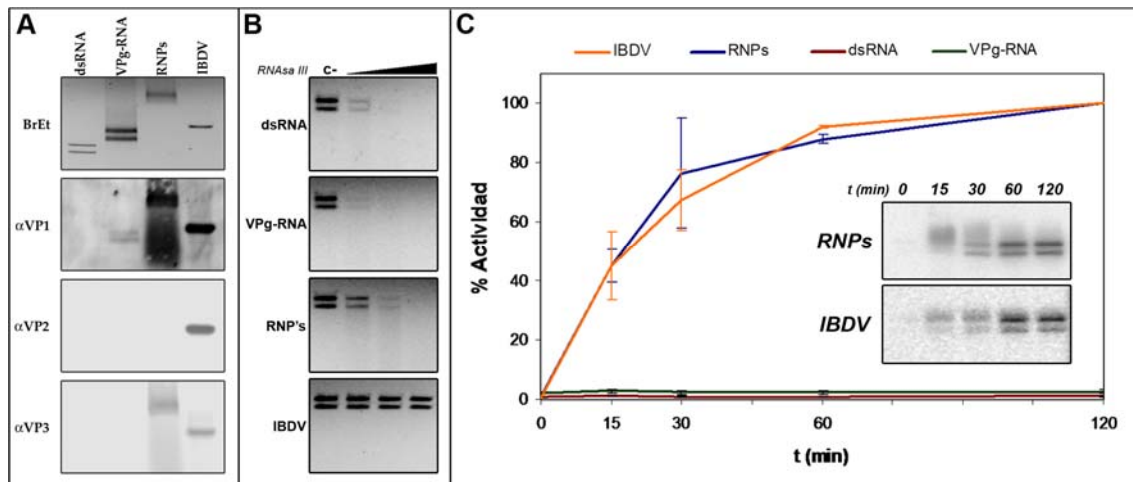


Figura 26. Caracterización bioquímica y funcional de los complejos ribonucleoproteicos derivados de IBDV. (A) Análisis en geles nativos de agarosa del dsRNA viral, complejos VPg-dsRNA, RNP's y partículas virales. Los geles fueron teñidos con BrEt y revelados con anticuerpos α -VP1, α -VP2 y α -VP3. En cada caso se indica si la detección corresponde a tinción con BrEt o a electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección con el anticuerpo indicado. (B) Análisis en geles de agarosa de muestras incubadas con diferentes concentraciones de RNAsa III y tratadas con Proteínasa K para eliminar el componente proteico de las mismas. Los carriles corresponden (de izquierda a derecha) a tratamientos con: 0, 125, 500 y 200 mU/ml de RNAsa III. Para cada gel se indica la muestra analizada. (C) Actividad RNA-polimerasa RNA-dependiente determinada mediante la incorporación de [32 P]-UTP. Cada medida corresponde al promedio de la cuantificación de cuatro ensayos independientes normalizados asumiendo como 100% de actividad la máxima señal detectada. Las barras verticales indican la desviación estándar de cada valor. Los recuadros interiores corresponden autorradiografías del análisis de los productos de reacción en geles de agarosa para un experimento.

significativas de los diferentes complejos, se registró una galería de imágenes (50-60 moléculas por muestra) en las que se determinó su longitud y diámetro. Los histogramas de distribución de las medidas de longitud (*Figura 27B, D y F*) muestran la presencia de dos máximos de distribución en ~ 0.975 y ~ 0.85 μm . Los valores obtenidos son compatibles con las longitudes teóricas calculadas asumiendo un paso de rosca (*pitch*) de 2.8-3.0 $\text{\AA}/\text{pb}$ del dsRNA (Arnott y col. 1972; Nibert y Schiff 2001) para los segmentos A (3.2 kb) y B (2.8 kb): 0.9-0.96 y 0.79-0.84 μm , respectivamente. Este resultado implica que bajo las condiciones de estudio, las RNP's no presentan una compresión longitudinal significativa respecto al dsRNA viral control. Por otra parte, la colección de imágenes de sombreado metálico de los distintos complejos indica que, mientras el dsRNA purificado y los complejos VPg-dsRNA tienen un diámetro equivalente, las RNP's presentan un incremento promedio del $\sim 50\%$ en su diámetro. El inmunomarcaje de RNP's purificadas con un suero policlonal α -VP3 (*Figura 27E, recuadro interior*) correlaciona incremento de diámetro observado con la presencia de moléculas de VP3 interaccionando a lo largo de la doble hélice de RNA.

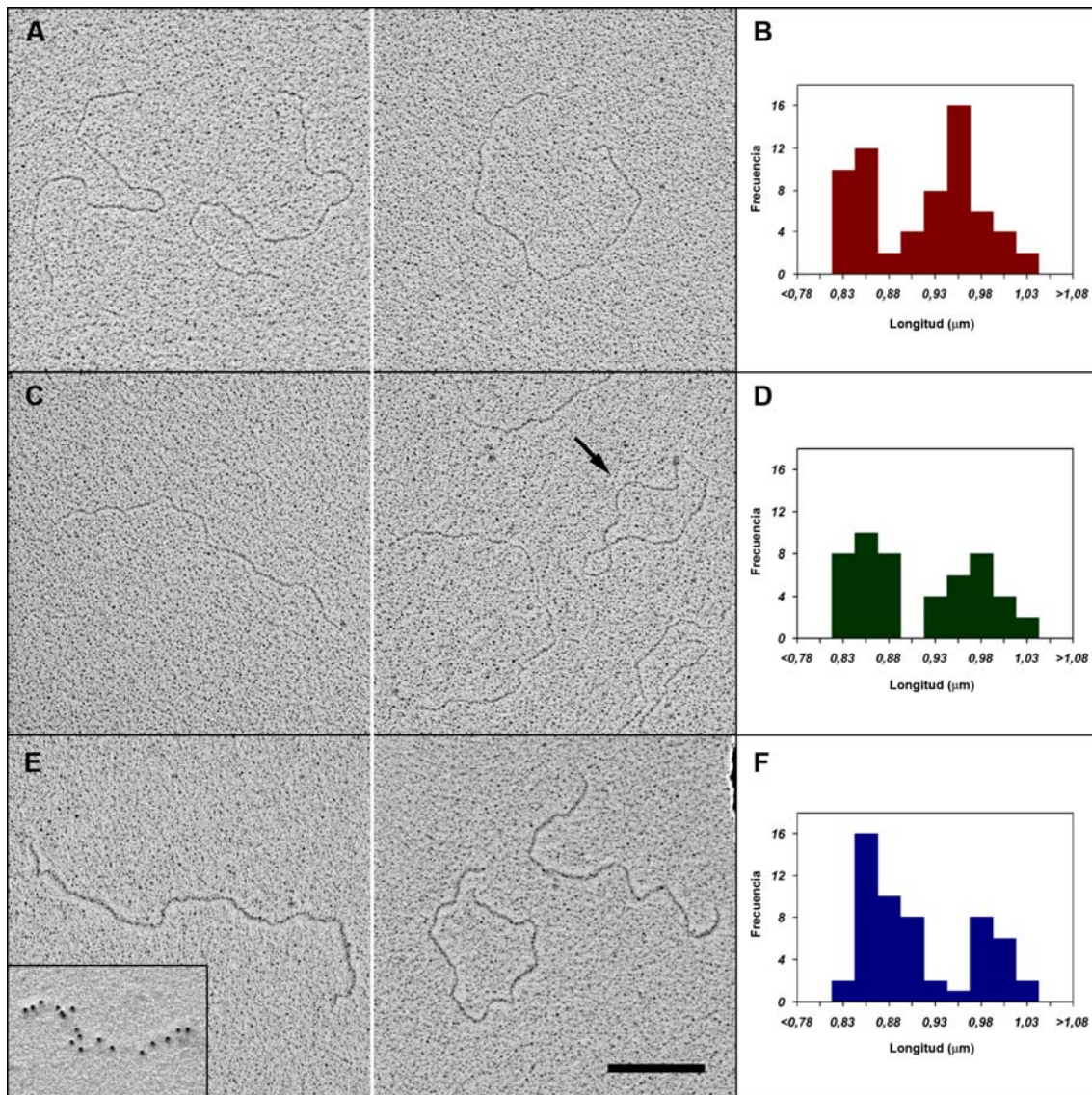


Figura 27. Análisis por microscopía electrónica y sombreado metálico de dsRNA, VPg-dsRNA y RNPs de IBDV. Se muestran imágenes seleccionadas de (A) dsRNA, (C) VPg-dsRNA y (E) RNPs, junto con sus histogramas de distribución de longitudes (B, D y F, respectivamente). La flecha indica un complejo VPg-dsRNA circularizado. La barra de escala corresponde a 0.2 μm . El recuadro interior muestra una RNP purificada, inmunomarcada con un suero policlonal α -VP3 y partículas de oro de 5 nm y contrastada mediante sombreado metálico con Pt-C.

Es interesante destacar que en estas condiciones experimentales de estudio, sólo una fracción (~30%) de los complejos VPg-dsRNA aparecen circularizados (*Figura 27C, flecha*), en contraposición con la totalidad de las poblaciones de dsRNA y RNPs, que son lineales. Considerando que el complejo VPg-dsRNA es purificado en presencia de SDS y por tanto en condiciones desnaturalizantes, las moléculas circularizadas podrían relacionarse con un artefacto generado por la desnaturalización de VPg, unida covalentemente a los extremos de dsRNA. La morfología de las RNPs analizadas en condiciones no desnaturalizantes y próximas

a su estado nativo, ya que son funcionalmente activas, sugiere que las moléculas de dsRNA viral nativas no se encuentran circularizadas.

4.3 Caracterización de poblaciones naturales de IBDV

4.3.1 Purificación de las poblaciones

Si bien se conoce en detalle la estructura de la mayor parte de las proteínas del virión de IBDV (Coulibaly y col. 2005; Garriga y col. 2006; Lee y col. 2006; Lee y col. 2007; Pan y col. 2007), la información disponible sobre la estequiometría de sus componentes se limita a estimaciones realizadas sobre purificaciones virales analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Commassie, con las limitaciones intrínsecas que esta metodología conlleva (Dobos y col. 1979). Por otra parte, tanto a partir de cultivos celulares como de bolsas de Fabricio de pollos infectados (Muller y Becht 1982; Muller y col. 1986; Lange y col. 1987), se ha descrito la presencia de hasta seis poblaciones de virus diferenciadas por su densidad de flotación en análisis realizados mediante ultracentrifugación en gradientes isopínicos de CICs. Por tanto, continuando con la caracterización de la organización estructural del virión, el siguiente aspecto abordado fue el análisis de los elementos constituyentes de cada una de estas poblaciones.

Siguiendo el protocolo de purificación de viriones extracelulares de IBDV (*apartado 3.4.2*) se obtienen seis mayoritarias en los gradientes de CsCl: E1 (~3%), E2 (~5%), E3 (~12%), E4 (~16%), E5 (~48%) y E6 (~16%) (*Figura 28A*). El análisis de las poblaciones mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (*Figura 28B*) muestra un perfil similar en las poblaciones E2-E6, mientras que la población E1 presenta una mayor cantidad relativa de pVP2. La observación de estas poblaciones por separado mediante microscopía electrónica y tinción negativa revela que las bandas E2 a E6 están constituidas por una población homogénea de viriones estructuralmente íntegros (*Figura 28C*). Sin embargo, la población E1 está constituida por viriones íntegros, viriones incompletos o rotos, así como por partículas isométricas de tamaño y una morfología similares a las SVP T=1 y las cápsidas T=7 anteriormente descritas (*Figura 28C, flechas negras y rojas, respectivamente*). La colocalización de estos ensamblados virales en una misma banda con igual densidad de flotación implica una misma relación RNA/proteína y dado que las SVPs T=1 están compuestas exclusivamente por trímeros equivalentes de VP2 (*apartado 4.1.5*), este resultado indica que las cápsidas T=13 y T=7 de la banda E1 no contienen ácidos nucleicos.

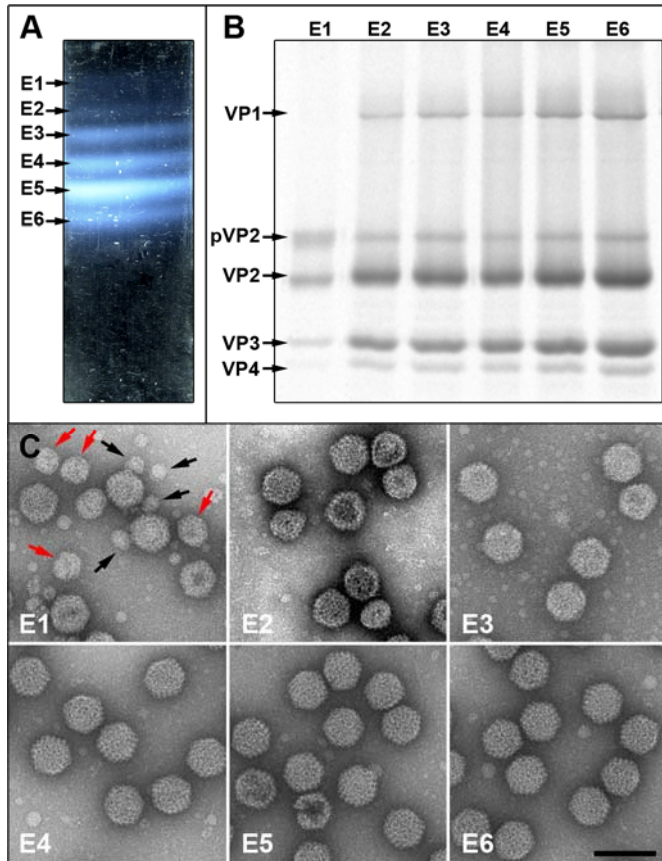


Figura 28. Purificación de las poblaciones de IBDV. (A) Separación de las poblaciones de IBDV mediante ultracentrifugación isopícnica en gradientes de CsCl. El tubo de centrifugación fue iluminado con luz blanca y fotografiado. Se indica cada una de las bandas extraídas mediante punción lateral. (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las poblaciones purificadas. Se indican las proteínas virales. (C) Análisis mediante microscopía electrónica y tinción negativa de las poblaciones purificadas E1, E2, E3, E4, E5 y E6. Todas las muestras están constituidas por cápsidas T=13 a excepción de E1 donde aparecen cápsidas T=13, T=7 (flechas rojas) y T=1 (flechas negras). La barra corresponde a 100 nm.

4.3.2 Determinación de la estequiometría de los componentes estructurales de las poblaciones

Con el fin de determinar la estequiometría de las proteínas presentes en partícula viral y, adicionalmente, poder estimar su masa total de proteína en el virión, las diferentes poblaciones virales de IBDV fueron purificadas a partir de cultivos marcados metabólicamente con [^{35}S]-Met. Las proteínas estructurales de las diferentes poblaciones fueron resueltas mediante SDS-PAGE y la marca incorporada a cada una de las proteínas virales fue cuantificada a partir de imágenes de autorradiografía de estos geles (*Figura 29A*). La población E1 fue excluida de estos análisis, dada su heterogeneidad estructural. El análisis de la cápsida cuasiequivalente T=13 de IBDV (*apartado 4.1.10*; (Coulibaly y col. 2005)) indica de forma inequívoca que existen un total de 780 copias de VP2 + pVP2 en la partícula viral. Por lo tanto, el número de copias de cada proteína viral fue calculado normalizando los valores de intensidad de cada banda respecto al número de residuos de Met de cada polipéptido y utilizando como estándar interno el número de copias de pVP2 + VP2 (*Figura 29C*). Los datos obtenidos muestran que cada una de las poblaciones analizadas contiene un número de copias similar de las diferentes proteínas del virión implica que el componente proteico entre las diferentes poblaciones es

prácticamente idéntico. La cuantificación en paralelo de partículas marcadas radiactivamente mediante autorradiografía y tinción con azul de Coomassie indica que la estimación del número de copias de VP3 y VP1 es variable dependiendo de la metodología utilizada (*Figura 29B-C*), probablemente debido a una tinción diferencial de las proteínas. Finalmente, es de destacar la presencia de ~12 copias de VP1 por virión, un valor excesivamente alto si tenemos en cuenta que el complemento genómico de IBDV está constituido por dos segmentos de dsRNA.

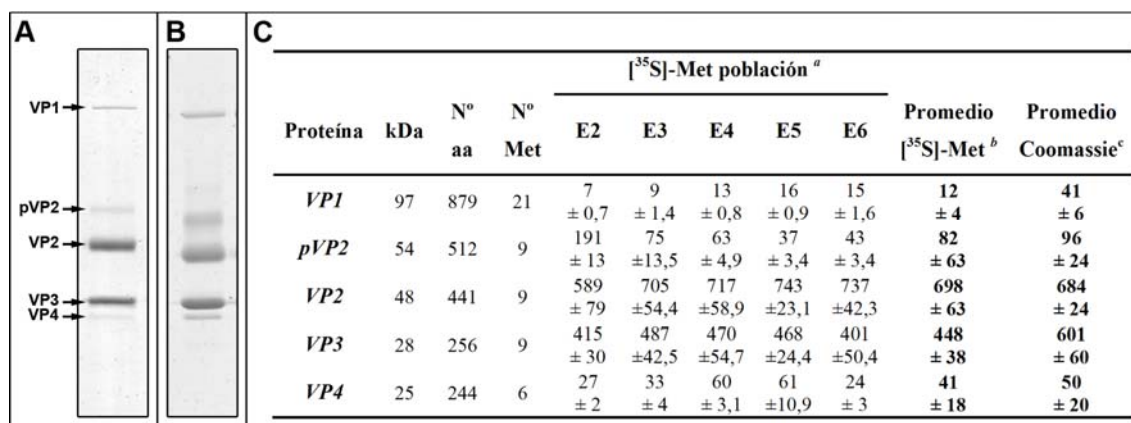


Figura 29. Determinación de la estequiometría proteica en la partícula viral. (A-B) Análisis mediante SDS-PAGE y (A) autorradiografía o (B) tinción con azul de Coomassie de viriones de la población E5 (el análisis electroforético de las poblaciones E2, E3, E4 y E6 presenta un patrón idéntico). (C) Número de copias calculadas de cada proteína por partícula viral. Se indica el peso molecular (kDa) número de aminoácidos y número de Met para cada proteína. Para cada valor determinado experimentalmente se indica el valor promedio y desviación estándar del número de copias de cada proteína estructural. Se muestra el número de copias de cada proteína calculado a partir de la cuantificación de imágenes de autorradiografía de las poblaciones E2-E6 (^a), así como su valor promedio (^b). A la derecha se muestran los valores promedio de las poblaciones E2-E6 correspondientes a la cuantificación mediante tinción con azul de Coomassie (^c), estos valores son similares a los determinados previamente (Dobos y col. 1979).

Siguiendo una estrategia similar a la empleada para la determinación del componente proteico, se purificaron las poblaciones de IBDV a partir cultivos celulares marcados metabólicamente con [³²P]-PO₄³⁻. Dado que los resultados obtenidos previamente indican que las poblaciones E2-E6 poseen el mismo componente proteico, las partículas marcadas fueron analizadas mediante geles de agarosa a igualdad de concentración de proteína. Además, estos ensayos fueron realizados tanto con viriones intactos (*Figura 30A*), como con viriones tratados con proteinasa K con el objetivo de visualizar directamente su componente genómico (*Figura 30B*). El análisis visual de la autorradiografía de las poblaciones E2-E6 muestra que a igualdad de partículas virales, la marca detectada se corresponde con cantidades crecientes de RNA. Las partículas de la población E1, de forma coherente con la información previa, no incorporan marca

radioactiva. El análisis electroforético de las muestras digeridas con proteinasa K (*Figura 30B*) muestra la presencia de dos únicas bandas cuyas movilidades electroforéticas se corresponden con los segmentos de dsRNA del genoma viral y, lo que es más importante, implica que las diferencias de marca observada deben corresponderse con un incremento en el número de segmentos encapsidados. Por lo tanto, la marca incorporada por cada una de las poblaciones fue cuantificada y normalizada de forma que la población E2 tomase el valor más cercano a uno (*Figura 30C*). Los resultados obtenidos muestran que respecto a la población E2 (1x) los ácidos nucleicos de las poblaciones E3, E4, E5 y E6 se aproximan a una relación ideal 2x, 3x, 4x y 4x, respectivamente. El número de segmentos encapsidados por los viriones constituyentes de cada población debe ser un múltiplo entero de estas relaciones y, por tanto, implica que la partícula viral de IBDV es capaz de encapsidar como mínimo cuatro segmentos de dsRNA, es decir dos copias completas de su complemento genómico. Este hecho adquiere especial relevancia ya que en nuestro conocimiento, es el primer caso descrito de un virus icosaédrico poliploide.

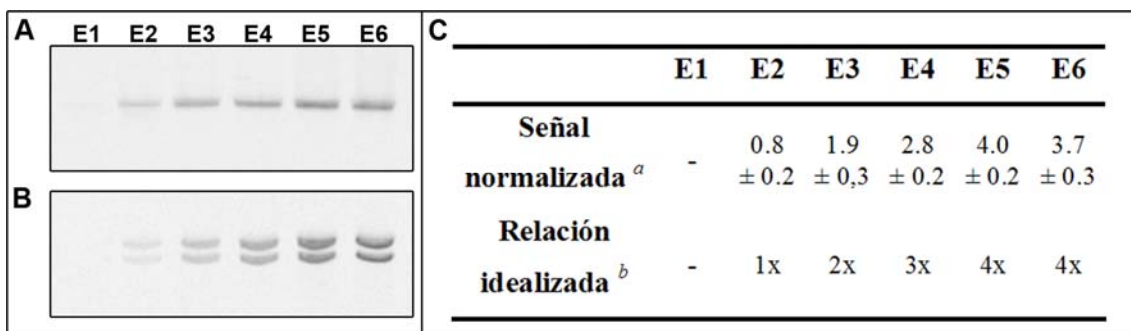


Figura 30. Determinación de la estequiometría genómica en la partícula viral. (A-B) Análisis mediante geles de agarosa y autorradiografía de partículas virales (A) intactas y (B) tratadas con proteinasa K. La misma cantidad de proteína fue analizada para cada población. (C) Cuantificación de marca relativa de las poblaciones E2-E6. Para cada valor se indica el promedio y desviación estadística calculados a partir de tres ensayos independientes normalizados (^a). La relación idealizada corresponde al número entero más cercano a la señal normalizada (^b).

4.3.3 Caracterización biofísica de las poblaciones

Con el fin de correlacionar el contenido relativo de ácidos nucleicos de cada población con el número de moléculas de dsRNA encapsidadas, las diferentes poblaciones de IBDV fueron analizadas mediante ultracentrifugación analítica (*Figura 31*). La distribución de coeficientes de sedimentación de las poblaciones E2-E6 muestra que la mayoría de las partículas de estas poblaciones sedimentan como una única especie bien definida con coeficientes estándar de sedimentación corregidos (s^0) de 290, 336, 370, 418 y 416 S, respectivamente (*Tabla 3*). Los análisis de la población E1 no fueron concluyentes debido a la heterogeneidad de especies

presentes, en línea con los análisis previos mediante microscopía electrónica y tinción negativa (*apartado 4.3.1*), por lo que fue excluida de los cálculos posteriores. Asimismo, las diferentes poblaciones fueron analizadas mediante dispersión de luz dinámica y los coeficientes de difusión traslacional estándar D^0 son similares en todas las poblaciones, con valores comprendidos entre 5.05 y $5.75 \cdot 10^{-8}$ cm^2/s (*Tabla 3*). Las masas moleculares de las partículas constituyentes de cada población fueron determinadas mediante la ecuación de Svedberg (*apartado 3.6.3*) de forma independiente a la morfología de las mismas a partir de los coeficientes D^0 y s^0 . Las masas moleculares de las especies mayoritarias de las poblaciones E2, E3, E4, E5 y E6 fueron de $52 (\pm 4)$, $54 (\pm 2)$, $56 (\pm 3)$, $59 (\pm 2)$ y $58 (\pm 2)$ MDa, respectivamente (*Tabla 3*).

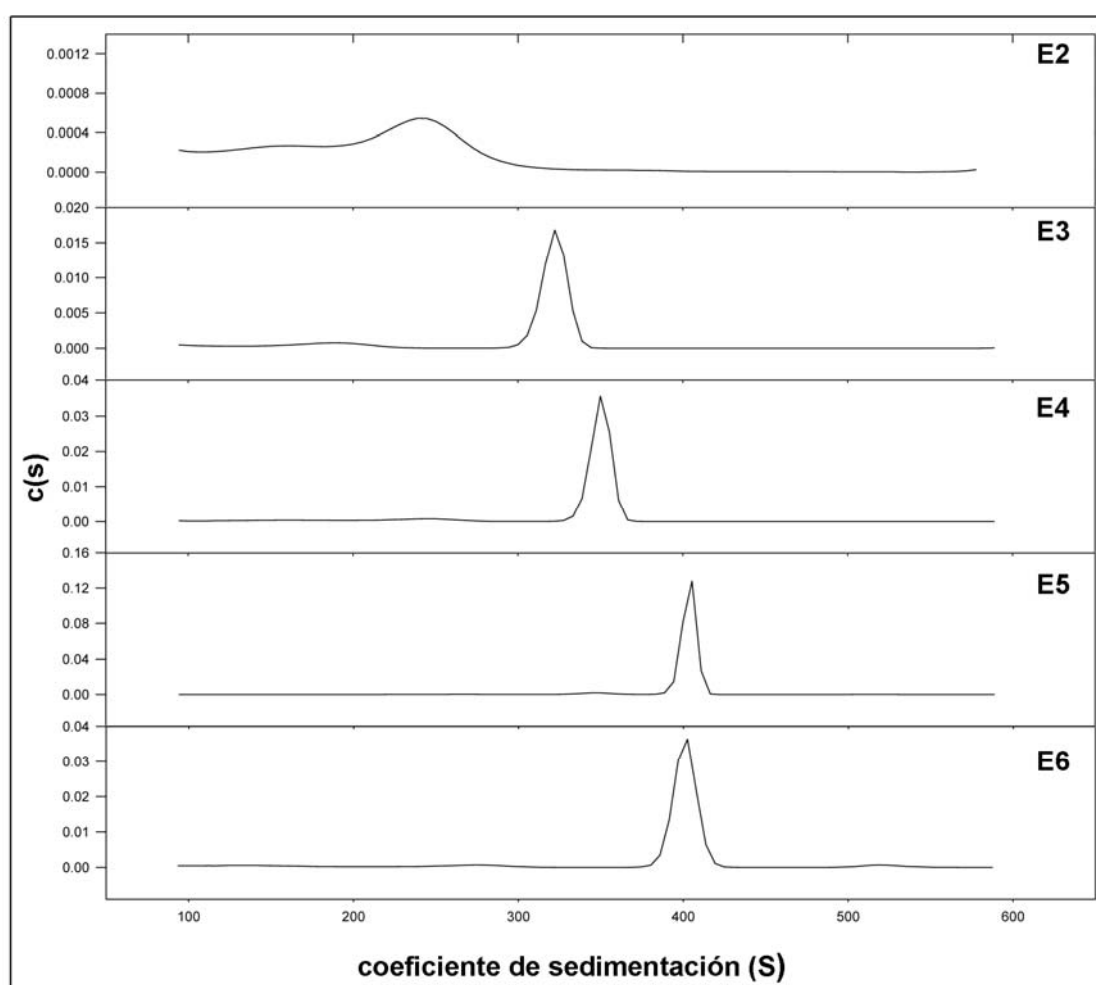


Figura 31. Análisis por velocidad de sedimentación de las poblaciones. Distribución de coeficientes de sedimentación, $c(s)$, de las partículas constitutivas de las poblaciones E2-E6 de IBDV a partir de velocidad de sedimentación a $8000 \times g$ y 20°C para un experimento.

Considerando la estequiometría proteica del virión (*apartado 4.6.2*) y la masa molecular de sus proteínas, la masa molar del componente proteico de la partícula viral de IBDV es de 52 ± 2

MDa. Por otra parte, teniendo en cuenta el tamaño de los segmentos dsRNA incorporados (3.2 y 2.8 kb) y una masa molecular de 682 Da/pb, la masa molecular media de las moléculas de dsRNA sería de ~2 MDa. Los resultados experimentales implican que las masas moleculares de las poblaciones E2-E6 son únicamente compatibles con la incorporación de un número creciente de moléculas de dsRNA, con un incremento medio de una molécula, como se indica en la *Tabla 4*. Aunque los datos presentan cierta flexibilidad, las diferentes poblaciones de IBDV se corresponden desde partículas vacías (E1) hasta partículas que incorporan cuatro segmentos de dsRNA (E5 y E6), el equivalente a dos complementos genómicos de IBDV.

Tabla 3. Propiedades biofísicas de las poblaciones de IBDV

| Población | Densidad de flotación (g/cc) | $S_{20,w}^a$ | $D_{20,w} (cm^2/s)$ | M_w (MDa) | Moléculas dsRNA ^b |
|-----------|------------------------------|--------------|---------------------|-------------|------------------------------|
| E2 | 1.298 | 290 ± 20 | 5.05 ± 0.25 | 52 ± 4 | 1 (54) |
| E3 | 1.303 | 336 ± 12 | 5.47 ± 0.20 | 54 ± 2 | 2 (56) |
| E4 | 1.314 | 370 ± 8 | 5.59 ± 0.15 | 56 ± 3 | 3 (58) |
| E5 | 1.328 | 418 ± 10 | 5.72 ± 0.12 | 59 ± 2 | 4 (60) |
| E6 | 1.330 | 416 ± 15 | 5.75 ± 0.10 | 58 ± 2 | 4 (60) |

^a Coeficientes estándar de sedimentación promediados a partir de cuatro experimentos independientes

^b Número de moléculas de dsRNA compatibles con las masas moleculares experimentales. Entre paréntesis se indican las masas moleculares calculadas para la partícula asumiendo 52 ± 2 MDa de proteína y 2 MDa por molécula de dsRNA incorporada

4.3.4 Caracterización funcional de poblaciones de IBDV

Para evaluar la relación entre el complemento genómico encapsidado y la infectividad de las partículas virales, las diferentes poblaciones fueron tituladas mediante ensayos de formación de placa con diluciones seriadas de las mismas. Considerando los resultados obtenidos previamente (*apartado 4.3.3*), los ensayos fueron realizados con una misma cantidad de proteína y, por tanto, un mismo número de partículas físicas (PP) para cada población (*Figura 32A*). Las medidas experimentales fueron ajustadas mediante regresión lineal con el objetivo de obtener valores significativos para la relación [partícula física / partícula infectiva] en cada población (*Figura 32B*). Los valores calculados presentan incrementos logarítmicos en la relación de infectividad de las poblaciones y apuntan a la posible relación entre el número de segmentos de dsRNA encapsidado por cada población y un incremento en la infectividad de la misma.

La información bioquímica y biofísica implica que la población E1 corresponde a partículas vacías y por lo tanto puede ser considerada como control negativo del experimento. La

coincidencia entre los perfiles de infectividad de las poblaciones E1 y E2 indica que los valores obtenidos para esta última corresponden la infectividad residual intrínseca al propio sistema (purificación de varias poblaciones a partir de un único gradiente). Esta interpretación implica que la infectividad de la población E2 es menor que el valor experimental medido como fondo del experimento (E1).

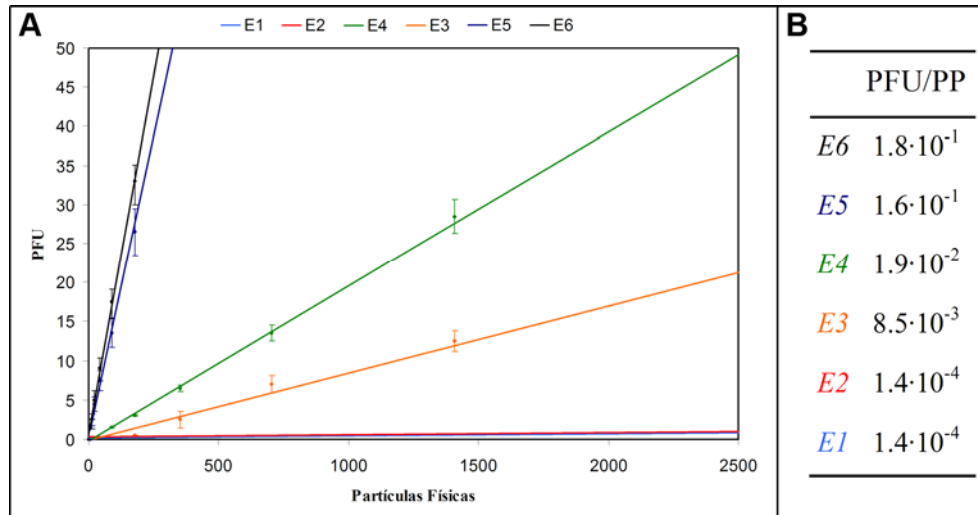
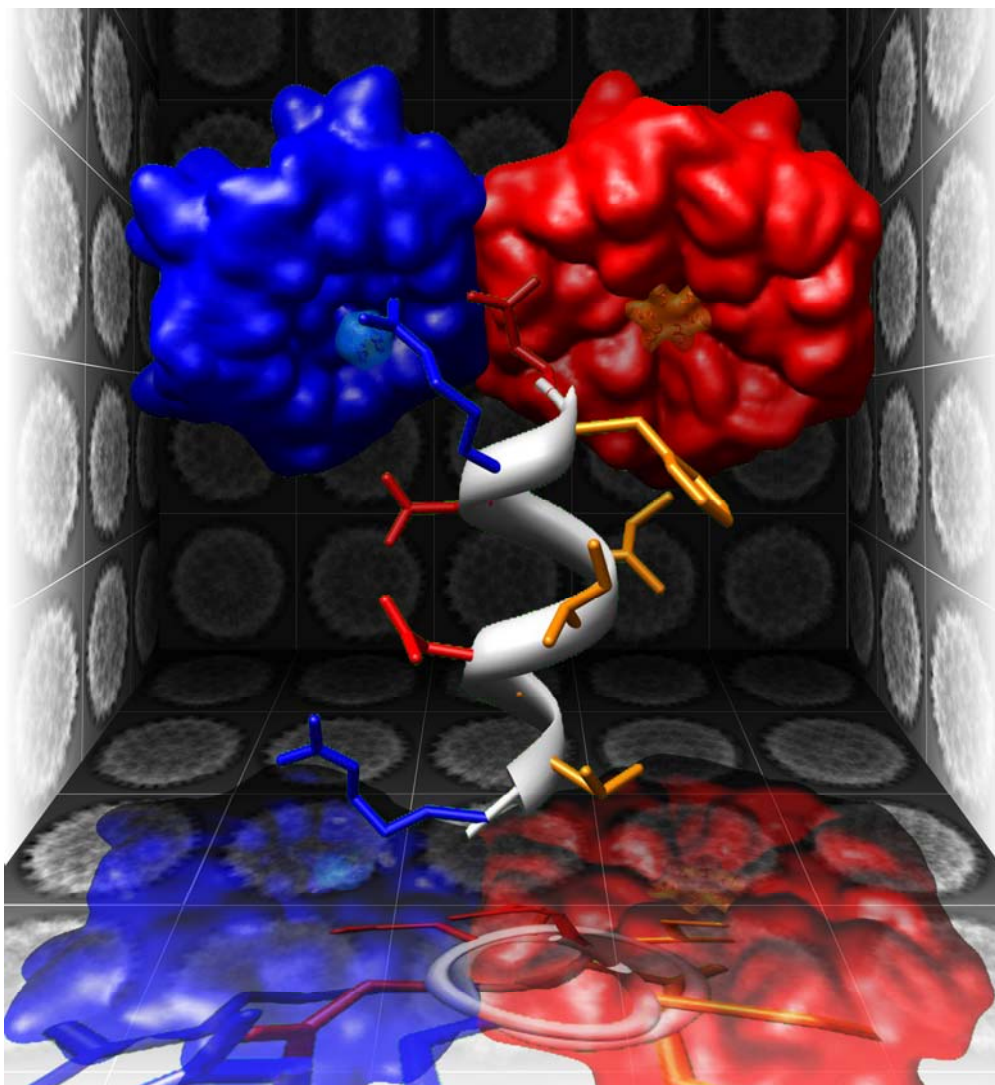


Figura 32. Infectividad de las poblaciones. (A) Titulación de las poblaciones mediante ensayo de formación de placa. Para cada población se representa mediante puntos el promedio del número de placas de lisis (PFU) observadas junto con su desviación estándar para diluciones conocidas de proteína. Las líneas representan la regresión lineal calculada para los valores obtenidos. (B) Relación PFU/PP calculada mediante regresión lineal. El error cuadrático, R^2 , de todas las regresiones es ≥ 0.98 .

5 Discusión



El polimorfismo estructural es una característica intrínseca de las macromoléculas y es la clave para el control de todos los procesos fundamentales en biología. Sin embargo, la potencialidad de una macromolécula para adoptar diferentes conformaciones espaciales y/o temporales requiere de la existencia de un mecanismo(s) de regulación preciso, bien intrínseco o mediado por elementos ajenos. El control del ensamblaje y maduración de una cápsida viral cuasiequivalente, como la de IBDV, va más allá del ensamblaje de la proteína de la cápsida en diferentes posiciones con ligeras variaciones en su estructura tridimensional; además, tiene que estar coordinado con la incorporación, en determinados momentos, de los demás componentes estructurales, tanto ácidos nucleicos como otras proteínas esenciales, de forma que el virión generado sea funcionalmente competente.

5.1 Ensamblaje y maduración de la cápsida de IBDV

La proteína de la cápsida de IBDV, VP2, es sintetizada inicialmente como un precursor de 512 residuos, denominado pVP2, que es procesado en su extremo C-terminal mediante una serie de eventos proteolíticos definidos para dar lugar a la forma madura VP2 (441 aa). En este contexto, muchos de los mutantes de delección C-terminal que han sido expresados en el sistema de rBV, bien podrían corresponderse con formas precursoras de VP2 que se generan de forma natural durante el ensamblaje viral. El control del polimorfismo estructural de VP2 reside en los 71 residuos de su extremo C-terminal, que es eliminado una vez que ha realizado su función, quizás como un mecanismo de seguridad que genera un estado conformacional irreversible en la cápsida. Adicionalmente, VP3 es necesaria para la formación de un contenedor cerrado como la cápsida del virión (Oña y col. 2004). Sin embargo, el ensamblaje eficiente de VLPs en ausencia de VP3, con un tamaño y morfología similares a los del virión infectivo, es posible a partir de una proteína quimérica de VP2 con al menos 456 residuos y un HT fusionado en su extremo N-terminal. La región C-terminal extra (442-456) contiene el mecanismo molecular inherente que permite el polimorfismo estructural de VP2, una hélice α anfipática, mientras que el HT mimetiza parcialmente la función de VP3 durante el ensamblaje de la cápsida.

La interacción entre la hélice α anfipática y el HT, la flexibilidad conformacional de los extremos N- y C- terminales de (p)VP2, y el procesamiento diferencial de la región C-terminal de VP2 determinan el correcto ensamblaje de la cápsida viral que le va a permitir llevar a cabo todas sus funciones. La alteración del equilibrio entre estos factores desemboca en la formación

de ensamblados aberrantes como estructuras tubulares de diferente longitud y diámetro, o cápsidas icosaédricas de menor tamaño que la del virión.

5.1.1 Procesamiento proteolítico de la proteína de la cápsida

La poliproteína de IBDV es una fusión del precursor de la proteína de la cápsida (pVP2), la proteasa viral (VP4) y la proteína de andamiaje (VP3). pVP2 experimenta un procesamiento secuencial mediado por VP4. La forma intermedia de pVP2 resultante es posteriormente procesada para dar lugar a la forma madura VP2 mediante un mecanismo aún sin determinar, posterior a la formación de la cápsida (Chevalier y col. 2002). El procesamiento progresivo de pVP2, por tanto, evita la tendencia natural de la forma madura, VP2, a ensamblarse como SVPs T=1 constituidas únicamente por pentámeros. Un mecanismo de ensamblaje efectivo que evite el predominio de estructuras aberrantes lo constituye el ensamblaje inicial de los viriones como una procápsida que madura mediante una serie de transiciones estructurales postensamblaje (Steven y col. 2005).

Estudios bioquímicos llevados a cabo con IPNV, un birnavirus de peces estrechamente relacionado, han mostrado la existencia de un provirión que madura mediante el procesamiento de pVP2 (Villanueva y col. 2004). La maduración postensamblaje ha sido también descrita en nodavirus y tetravirus, que se ensamblan como proviriones con cápsidas T=3 (Schneemann y col. 1998) y T=4 (Canady y col. 2000), respectivamente, compuestos de una única proteína α . La maduración del provirión es relativamente lenta y tiene lugar mediante el procesamiento autocatalítico de la proteína α , mediado por el residuo Asp75 (Zlotnick y col. 1994). Este proceso genera la proteína madura de la cápsida, β , y el péptido γ , dando lugar a un reordenamiento de las subunidades de la cápsida. Considerando la alta homología estructural entre las proteínas de la cápsida (Coulibaly y col. 2005), la similitud funcional de IBDV, nodavirus y tetravirus (Ahlquist 2005), así como la analogía entre sus mecanismos de ensamblaje, hipotetizamos que la autoproteólisis de VP2 es el evento de procesamiento final que da lugar a la forma madura de VP2. VP2 posee dos residuos Asp (Asp391 y Asp431) que podrían actuar como residuos catalíticos, ya que se encuentran espacialmente próximos al residuo Ala441 de VP2, localizado hacia el interior de la cápsida y presumiblemente inaccesible a las enzimas celulares. Análisis preliminares que están siendo realizados en nuestros laboratorios mediante mutagénesis dirigida de los residuos diana (Ala441 y Phe442) y los potenciales residuos catalíticos (Asp391 y Asp431) avalan esta hipótesis (Irigoyen, comunicación personal).

5.1.2 Interruptores moleculares y factores de activación

Aunque diversos estudios estructurales han proporcionado algunas claves sobre los factores que determinan la conformación de la proteína(s) de la cápsida de un virus, el mecanismo subyacente no se comprende completamente (Abrescia y col. 2004). Los distintos estados conformacionales pueden estar controlados por regiones flexibles de la proteína (bucles de los extremos N- y C- terminal), dsRNA, ssRNA, iones metálicos, pH o combinaciones de todos los anteriores (Johnson 1996). Estos factores, denominados interruptores moleculares, pueden ser insuficientes en cápsidas complejas y se requiere de una o más proteínas auxiliares que actúan como efectores moleculares (proteínas de andamiaje, otras proteínas minoritarias o proteínas enzimáticas) (Dokland 2000).

Nuestros resultados indican que el interruptor molecular de VP2 se localiza en el segmento 443-GFKDIIRAIR-452, unido temporalmente, que está organizado como un hélice α anfipática. Por este motivo, el mutante HT-VP2-456 representa una frontera abrupta para que VP2 adquiera una o múltiples conformaciones. Si las subunidades proteicas son de menor extensión, como es en el caso de la variante HT-VP2-441, sólo se forman estructuras constituidas por pentámeros (cápsidas T=1); por el contrario, si las subunidades proteicas contienen el segmento 443-452 se pueden ensamblar cápsidas T=1 y T=13 (*Figura 33A*).

El perfil helicoidal de la secuencia 442-453 de pVP2 en su análisis mediante CD y su identidad con la secuencia 241-250 de la LmTIM nos ha permitido postular que se pliega como una hélice α anfipática (Saugar y col. 2005). Esta secuencia se encuentra muy conservada entre los diferentes birnavirus analizados (Da Costa y col. 2002). La reciente resolución de la estructura atómica del segmento C-terminal 442-487 de pVP2 mediante NMR (Galloux y col. 2007) ratifica el modelo estructural propuesto (*Figura 33B*).

Los resultados obtenidos con las variantes VP2-456 y VP2-466 demuestran que la presencia de la hélice α anfipática no es suficiente para formar cápsidas T=13. Puesto que la incorporación de un HT en las diferentes variantes de pVP2 es fundamental para el ensamblaje efectivo de las cápsidas T=13, sustituyendo parcialmente la función de VP3, ambas secuencias fueron comparadas. La única similitud se localiza en los cinco últimos residuos del extremo C-terminal de VP3, que se alinean con una región similar del HT (*Figura 33C*). La ausencia de otros segmentos similares en la secuencia de VP3 sugiere su singularidad e importancia. Observaciones previas corroboran su trascendencia para el correcto ensamblaje de la cápsida, ya que los mutantes de VP3 cuyos residuos C-terminales han sido delecionados o alterados no

son capaces de ensamblarse en cápsidas T=13 y forman ensamblados tubulares o aberrantes (Maraver y col. 2003; Chevalier y col. 2004).

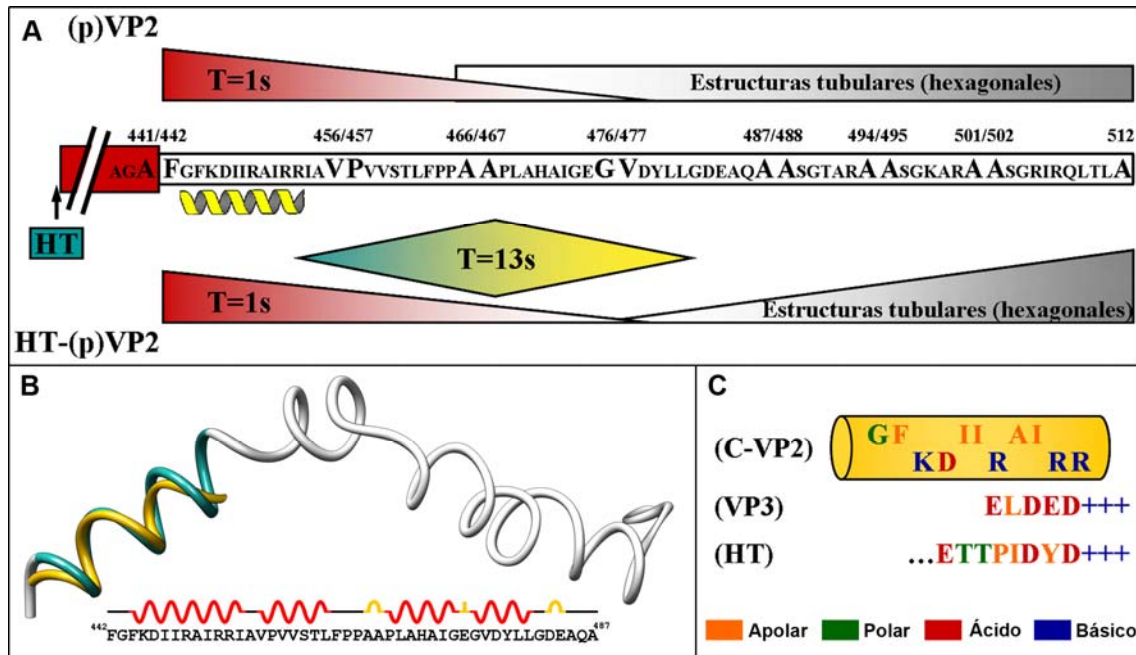


Figura 33. Control del ensamblaje mediante la interacción entre un interruptor molecular y un factor de activación. (A) Esquema de los diferentes ensamblados formados por VP2 (rojo) dependiendo de la extensión de su extremo C-terminal (gris) en ausencia (VP2) o presencia (HT-VP2) de un HT amino terminal (azul). Al incrementar la extensión de la secuencia C-terminal de las variantes de VP2 o HT-VP2 se produce un desplazamiento desde el ensamblaje de cápsidas similares a las SVPs T=1 hacia la formación de estructuras helicoidales con un ordenamiento hexagonal. Se muestra la secuencia completa C-terminal de pVP2, los sitios que delimitan los diferentes mutantes y la hélice α del péptido 443-452 (amarillo). (B) Alineamiento de la hélice α anfipática de VP2 modelada a partir de la secuencia 241-250 de LmTIM (amarillo) y la estructura atómica del péptido 442-487 de pVP2 (PDB 2IMU)(Galloux y col. 2007). Los residuos correspondientes a la hélice α anfipática se representan en azul y el resto en blanco. Se muestra un esquema de los SSE de la estructura resuelta, así como la secuencia de la misma. (C) Complementariedad de cargas entre la hélice α anfipática y los cinco últimos residuos de la región C-terminal de VP3, o la región equivalente del HT. Tanto las secuencias de VP3 como del HT se muestran invertidas (desde el extremo C-terminal al N-terminal).

La comparación de las secuencias del extremo C-terminal de VP3 y la de la hélice α anfipática revela la complementariedad de cargas entre ambas, y sugiere la naturaleza electrostática de la interacción entre ambos elementos. Además, tanto los residuos ácidos del HT como los del extremo C-terminal de VP3 están precedidos por una región básica que podría tener alguna función adicional. En nuestro modelo, esta interacción electrostática sería transmitida al resto de la estructura VP2 induciendo los cambios conformacionales necesarios. Se han descrito a nivel

atómico mecanismos de esta naturaleza como, por ejemplo, la transmisión del cambio conformacional tras la unión del ligando que media la regulación alostérica de las integrinas (Xiao y col. 2004). Estudios en paralelo llevados a cabo en nuestro laboratorio demuestran que el HT mimetiza parcialmente al C-terminal de VP3, y confirman tanto la naturaleza electrostática de las interacciones entre ambos segmentos, como la importancia de las regiones ácida y básica del HT (Saugar, comunicación personal).

5.1.3 Ensamblaje de pentámeros y hexámeros

Las pequeñas diferencias estructurales entre las cápsidas de IBDV y HT-VP2-466 se localizan en sus superficies interna y externa (*Figura 21*). Mientras que las diferencias en las superficies externas, localizadas fundamentalmente en las densidades que conectan los dominios protuberantes de trímeros adyacentes, son residuales, las densidades adicionales observadas en el interior de la cápsida de HT-VP2-466 (radio $\sim 268\text{-}285$ Å) son de mayor tamaño y se distribuyen en los ejes pentaméricos y en los ejes hexaméricos locales. Esas densidades han sido interpretadas como la visualización directa de haces de hélices α .

Aunque la formación del pentámero en la SVP T=1 es independiente de cualquier otro componente viral, los pentámeros correspondientes de las cápsidas del virión y de HT-VP2-466 se ensamblan en un contexto más fisiológico y, por lo tanto, otros factores adicionales deben ser considerados. La comparación de los pentámeros de las diferentes estructuras analizadas sugiere que un extremo C-terminal relativamente grande interfiere en los contactos pentaméricos. Esta interpretación viene sustentada por el desplazamiento hacia la formación de estructuras tubulares al aumentar la extensión del extremo C-terminal en las variantes HT-VP2 (*Figura 33A*). Sin embargo, la estructura de la cápsida T=13 de HT-VP2-466 indica que el procesamiento del dominio C-terminal de VP2 es suficiente para permitir estos contactos en los ejes de simetría de orden 5.

En nuestro modelo de ensamblaje de la cápsida T=13, un procesamiento rápido del extremo C-terminal de pVP2 daría lugar a la formación de un haz de hélices α e impediría la interacción con VP3. Como resultado, las moléculas de VP2 se asociarían como un pentámero en el que los contactos entre trímeros vecinos están curvados. Finalmente, las hélices α anfipáticas serían eliminadas (*Figura 34*). Este mecanismo es conceptualmente análogo al sistema de ensamblaje de nodavirus (Schneemann y col. 1998), aunque el mecanismo de ensamblaje para IBDV debe ser más sofisticado ya que la geometría de la cápsida es más compleja (T=13 *versus* T=3). La cápsida de nodavirus está formada por 60 trímeros en los que la proteína de la cápsida establece

dos tipos de contactos: i) los trímeros relacionados por ejes de simetría icosaédrica de orden 2 que forman 60 contactos planos con un ángulo diédrico de 180° , y ii) los trímeros relacionados mediante ejes locales de simetría de orden 2 que establecen 120 contactos curvados con un ángulo diédrico de 144° . Los contactos planos son debidos a una doble hélice de RNA y un péptido N-terminal insertados en la cavidad entre subunidades (Fisher y Johnson 1993). Además, los análisis cinéticos sugieren que las 120 subunidades que forman contactos curvados son procesadas más rápidamente que las 60 subunidades que forman contactos planos (Gallagher y Rueckert 1988). En la cápsida T=13, los contactos entre los trímeros de VP2 de los vértices pentaméricos presentan un ángulo diédrico de $\sim 140^\circ$, similar al de nodavirus. El haz de hélices α en los ejes pentaméricos es similar al haz pentamérico de hélices que forman los péptidos γ en la cápsida de nodavirus (Cheng y col. 1994; Galloux y col. 2007). Los pentámeros de VP2 actuarían posteriormente como elementos nucleadores de trímeros adicionales con contactos planos.

En este contexto, la flexibilidad conformacional de la hélice C-terminal α_4 , determinada tras la comparación de los mapas de criome y rayos X de las SVPs T=1, desempeñaría un papel fundamental para la formación del haz de hélices y/o el procesamiento proteolítico final mientras VP2 está todavía ensamblada como un intermediario de pVP2. Además, la mayoría de los extremos C-terminal de VP2 permanecen desordenados en el virión, sugiriendo un estado conformacional relajado una vez que el último evento proteolítico ha tenido lugar.

Los contactos coplanares están constituidos por trímeros de VP2 de un triángulo G4 y por el trímero e (*Figura 17*). En nuestro modelo de ensamblaje, la inserción de las hélices α anfipáticas, a modo de cuña, en las cavidades hidrofóbicas de la cara interna de los hexámeros impide la curvatura en estos contactos. En este caso, la función de la hélice α anfipática es análoga a la del extremo N-terminal de la proteína de la cápsida de nodavirus (Fisher y Johnson 1993). Los análisis llevados a cabo de las variantes de pVP2 con diferentes extensiones de su extremo C-terminal muestran que se forman hexámeros con mayor probabilidad si aumenta la longitud del dominio C-terminal y, por lo tanto, se ensamblan fundamentalmente como estructuras tubulares (*Figura 33*). En esta línea, el procesamiento del dominio C-terminal podría ser más lento debido a su interacción con VP3 (*Figura 34*).

En resumen, mediante el análisis de la estructura de la proteína de la cápsida, la arquitectura del virión y el ensamblaje se han revelado similitudes inesperadas entre virus evolutivamente distantes (Bamford y col. 2005). El ensamblaje de IBDV está controlado por una proteína de andamiaje (VP3) y proteínas con actividad proteasa (VP4 y posiblemente VP2) que degradan

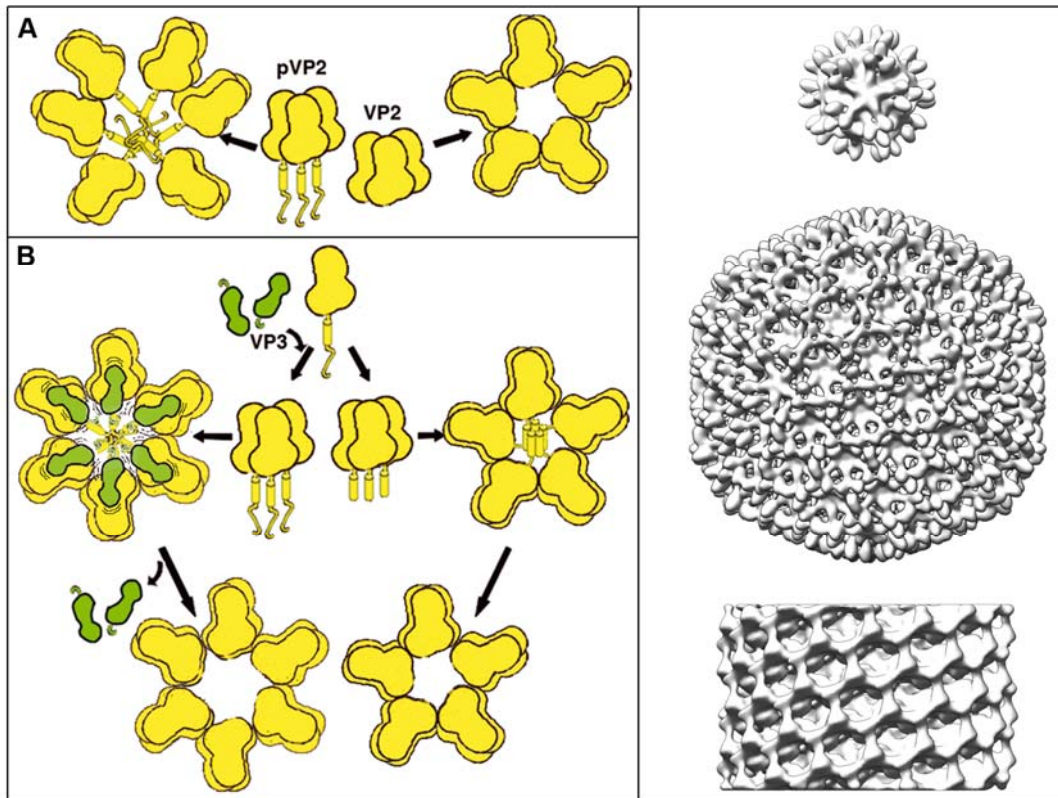


Figura 34. Modelo de ensamblaje de IBDV. VP2 es sintetizada inicialmente como un precursor, pVP2. La extensión C-terminal contiene el interruptor molecular, la hélice α anfipática, que es representado como un cilindro seguido de una zona desestructurada. (A) Cuando pVP2 es expresada en ausencia de otros componentes virales se forman estructuras tubulares constituidas exclusivamente por hexámeros (izquierda). Sin embargo, cuando se expresa directamente la forma madura, VP2, se ensamblan SVPs T=1 constituidas únicamente por pentámeros. (B) La velocidad de procesamiento de extremo C-terminal de pVP2 determina si el extremo C-terminal (mostrado como un bucle) de VP3 (verde) puede interactuar con pVP2. Si el procesamiento es rápido, las hélices α anfipáticas se asocian para formar un haz con contactos inclinados entre los trímeros. En contraste, el procesamiento lento permitiría la interacción entre los extremos C-terminales de VP2 y VP3. Las líneas onduladas indican el dinamismo de la interacción de VP3 con VP2; aunque se indica que seis cadenas de VP3 estabilizan temporalmente la formación del hexámero entre trímeros de VP2 con contactos planos, la estequiometría de esta interacción podría ser mayor. (C) Estructura tridimensional de: SVP T=1 (arriba), cápsida T=13 de IBDV (medio) y partícula helicoidal de HT-VP2-494 (abajo). La reconstrucción de HT-VP2-494 corresponde a procesamiento preliminar con una única partícula helicoidal.

una secuencia corta específica de la proteína de la cápsida en una serie de eventos consecutivos. Estos factores, junto con la flexibilidad conformacional del extremo C-terminal de VP2, inducen que de la hélice α anfipática de VP2 se ensamble interactuando en hexámeros o pentámeros. Las interacciones mediadas por hélices α anfipáticas pueden ser una característica común en la activación de complejos macromoleculares (Johnston y col. 2005) y, como se ha

visto en el caso del ensamblaje de VIH (Ternois y col. 2005), utilizados como dianas de futuras estrategias antivirales. Nuestros datos del mecanismo de ensamblaje de IBDV apoyan la relación evolutiva sugerida entre los virus (+) ssRNA y los birnavirus.

5.2 Funciones de VP3 durante el ciclo viral

La comparación estructural de las cápsidas de IBDV y HT-VP2-466 ha sido fundamental para determinar inequívocamente su identidad estructural básica y para asignar características estructurales a componentes bioquímicos. Las pequeñas diferencias estructurales entre estas cápsidas no dan cuenta del contenido total de VP3 en la composición total de virión (*apartado 4.1.9*). La determinación de la estequiometría proteica de las diferentes subpoblaciones de IBDV muestra que todas las partículas virales contienen ~450 copias de VP3, independientemente del número de segmentos de dsRNA encapsidados. Este resultado indica que, de alguna manera, el número de moléculas de VP3 que se incorporan al virión está relacionado con el número de moléculas de VP2 que forman la cápsida T=13. Una razón plausible puede ser debida a su función estabilizadora temporal, llevada a cabo mediante una estructura de andamiaje regular, que mantendría una cápsida inestable formada por 780 copias de pVP2/VP2, por ejemplo una procápsida (Steven y col. 2005). Por lo tanto, durante el ensamblaje viral, y considerando su participación temporal en la morfogénesis de la cápsida, VP3 actúa como una proteína de andamiaje canónica (Dokland 1999). Además, VP3 establece un complejo patrón de interacciones esencial para la viabilidad del virus: i) recluta a VP1 (Lombardo y col. 1999); y ii) interacciona con el dsRNA viral (Tacken y col. 2002; Kochan y col. 2003). Las proteínas virales que interaccionan con los ácidos nucleicos y median su selección, empaquetamiento y/o condensación dentro de la cápsida viral, se encuentran muy extendidas entre las diferentes familias virales (*Figura 35A*).

Mediante tratamientos químicos, ha sido posible romper controladamente la cápsida de IBDV y caracterizar la organización de los componentes estructurales del virión infectivo (*Figura 35B*). Los análisis bioquímicos y estructurales demuestran que VP3 forma complejos estables con los segmentos de dsRNA y la RNA-polimerasa viral, VP1, formando RNPs funcionalmente competentes para la síntesis de RNA. La definición de las RNPs y los complejos VPg-dsRNA en dos bandas de distinta movilidad electroforética (*apartado 4.2.2*) implican que todas las moléculas de dsRNA tienen VPg unido covalentemente y que el número de moléculas de VP3 unidas al dsRNA es constante. Si consideramos que las poblaciones de IBDV de mayor densidad de flotación son capaces de encapsidar 4 segmentos de dsRNA (*apartado 4.3.3*), cada

segmento estaría acomplejado con ~110 moléculas de VP3, lo que supone ~26 pb/molécula VP3.

Por otra parte, la ausencia de compresión longitudinal de las RNPs respecto de al dsRNA desnudo indica que las moléculas de VP3 deben estar interaccionando a lo largo del dsRNA y excluye la posibilidad de que éste se encuentre enrollado alrededor de la proteína, como ocurre por ejemplo en la heterocromatina (*Figura 35C-D*). No obstante, esta interpretación no excluye la posibilidad de en el interior de la cápsida viral existan interacciones entre las moléculas de VP3 comprimiendo el genoma viral. De hecho, la capacidad de oligomerización de VP3 (Maraver y col. 2003) apoyaría dicha hipótesis y bajo ciertas condiciones de análisis (presencia de glicerol y Mg^{2+}) se observan filamentos de RNPs apilados (resultados no mostrados).

Dado que la célula huésped carece de la maquinaria enzimática necesaria para convertir el dsRNA en una molécula de mRNA traducible, los viriones infectivos de los virus dsRNA también contienen las enzimas necesarias para la transcripción primaria. Los virus dsRNA llevan a cabo la transcripción de su genoma en el interior de una cápsida especializada (nucleocápsida T=2) ya que la maquinaria de transcripción es una parte integral de la misma. La cápsida T=2 mantiene su integridad estructural tras la entrada del virus en la célula infectada, y no sólo actúa como maquinaria transcripcional y replicativa, sino que además protege el dsRNA viral de los mecanismos de defensa celular. La única excepción genuina, que no presenta la cápsida T=2, entre los virus dsRNA se debe a los miembros de la familia *Birnaviridae* (*apartado 1.4*). Considerando que las RNPs virales son competentes para la síntesis de RNA en ausencia de VP2 y/o una cápsida estructuralmente íntegra y que, además, tienen una menor accesibilidad frente a la degradación con ribonucleasas (*apartado 4.2.2*), las RNPs de IBDV podrían asumir parte de las funciones asociadas a la nucleocápsida T=2. Así las RNPs actuarían como parte integral de la maquinaria transcripcional y protegerían el dsRNA de la degradación mediante ribonucleasas que median el mecanismo de defensa de célula hospedadora (Biron y Sen 2007). Sin embargo, no está establecido si la cápsida del virión se desensambla tras la entrada en la célula,

La reciente resolución de las estructuras atómicas de VP1 (Garriga y col. 2007; Pan y col. 2007) y de la región central de VP3 (Casañas y col. 2007) aportan nuevas evidencias sobre la función de VP3 como regulador transcripcional. El sitio activo de VP1 se encuentra parcialmente bloqueado de forma constitutiva por el llamado bucle B. Sin embargo, la interacción del extremo C-terminal de VP3 con VP1 induce un cambio conformacional en la polimerasa viral que retira el bucle B de su posición inicial y elimina el impedimento estérico en el sitio activo (Garriga y col. 2007). Por otra parte el dominio C-terminal de la región central de VP3 presenta

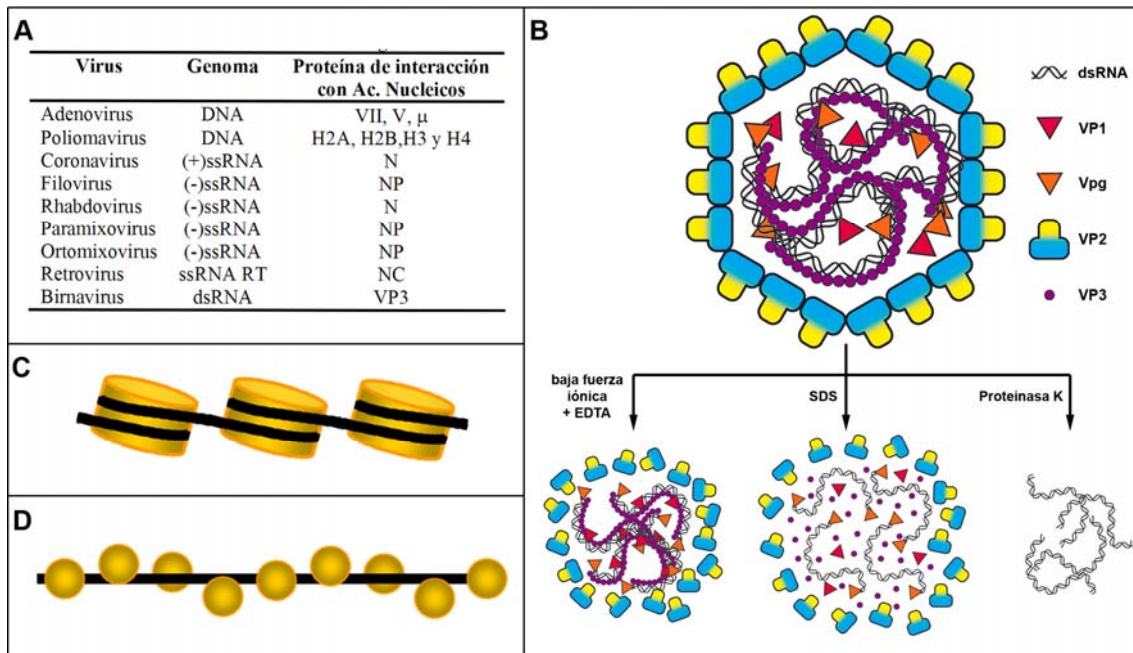


Figura 35. Proteínas de interacción con el genoma viral. (A) Proteínas de interacción con ácidos nucleicos de virus de diferente naturaleza (dsDNA, ssRNA + y -). En cada caso, se indica la familia viral, naturaleza del genoma y proteínas de interacción conocidas. (B) Tratamientos para el desensamblaje de la partícula viral. En la parte superior se muestra el modelo del virión infeccioso de IBDV con cuatro segmentos de dsRNA acomplejados con VP1/VPg y VP3 formando RNPs. En la parte inferior se muestra el efecto de los diferentes tratamientos en la partícula viral. En presencia de baja fuerza iónica y un agente quelante de metales divalentes la cápsida viral se desensambla pero manteniendo las interacciones entre los demás componentes estructurales (izquierda). En presencia de SDS, se rompen todas las interacciones entre los componentes a excepción de la unión covalente entre la VPg y el dsRNA (centro); finalmente, la incubación con proteínasa K degrada el componente proteico del virión y libera el dsRNA (derecha). (C) Modelo de interacción de ácido nucleico rodeando a la proteína que implica compresión longitudinal. (D) Modelo de interacción de la proteína a lo largo del ácido nucleico, que no implica necesariamente compresión longitudinal.

homologías estructurales con factores reguladores de la transcripción. En concreto con el dominio $\sigma 2$ del factor $\sigma 70$ de *Thermus thermophilus* (Vassylyev y col. 2002), y con el dominio SRI de Set2, una metil-transferasa de la histona H3 (Vojnic y col. 2006). Estos factores interactúan con la RNA polimerasa celular y llevan a cabo funciones clave en el proceso de transcripción como el reconocimiento de la secuencia promotora y la desestabilización de la doble hélice del DNA para exponer el sitio de iniciación de la transcripción.

5.3 IBDV, un virus icosaédrico poliploide

Nuestros análisis estructurales implican que la partícula infectiva de IBDV posee una cápsida cuasiequivalente constituida por una única proteína, VP2. Aunque se han descrito numerosas cápsidas T=13 para diferentes virus dsRNA (Prasad y col. 1988; Shaw y col. 1996; Grimes y col. 1997; Dryden y col. 1998; Nakagawa y col. 2003), la nucleocápsida interna T=2 dirige el ensamblaje de la cápsida T=13 y es necesaria para su integridad, como ha sido demostrado en sistema de la cápsida de BTV (Grimes y col. 1998). Por lo tanto, en nuestro conocimiento, la cápsida T=13 de IBDV (y la cápsida de HT-VP2-466) es la mayor cápsida estrictamente cuasiequivalente descrita. No obstante, resulta sorprendente la generación y/o mantenimiento de este tipo de cápsida en los birnavirus para encapsidar un complemento genómico de sólo 6 kpb, que daría lugar a una densidad de empaquetamiento teórica de 10 bp/100 nm³ en el interior de la cápsida (Casjens 1997). Este valor contrasta con la coherencia que presentan los virus icosaédricos entre el tamaño de su genoma y el volumen interno de su cápsida (*Tabla 4, última columna*). A este respecto, el análisis de las diferentes poblaciones de IBDV resulta revelador, ya que demuestra que el virión es capaz de empaquetar hasta cuatro segmentos de dsRNA viral, es decir, se constituyen partículas virales poliploides que contienen el equivalente a dos complementos genómicos completos (12 kpb), que además se encuentran como RNPs interaccionando con las proteínas VP1 y VP3 (*Figura 35B*).

Considerando el volumen interno de la cápsida T=13 del virión (77900 nm³, con un radio interno promedio de 26.5 nm), la longitud del ácido nucleico (3.6 µm, para cuatro segmentos de 3 kpb y un paso de rosca de 3 Å/pb) y sustrayendo el volumen ocupado por VP1 y VP3 en el interior de la cápsida, la distancia promedio entre las cadenas de dsRNA es de ~4.3 nm (*Tabla 4*). Este espaciamiento se encuentra en el rango determinado para los virus dsRNA de hongos de las familias *Totiviridae* y *Chrysoviridae* (Castón y col. 1997; Castón y col. 2003; Castón y col. 2006) (*Tabla 4*) y ha sido relacionado con una mayor facilidad para el movimiento del complejo replicativo y/o transcripcional en el interior de la partícula.

Por otra parte, si consideramos la existencia de VLPs constituidas por VP2 con una geometría T=7, la estimación del espaciamiento teórico del dsRNA indica que el volumen interno de esta cápsida es suficiente para acomodar un único complemento genómico completo, pero con una densidad de empaquetamiento similar a la de los miembros de la familia *Reoviridae* (*Tabla 4*). En conjunto, se podría pensar que el desarrollo y/o mantenimiento de una cápsida grande, como la T=13 de IBDV, puede estar relacionado con un mecanismo para generar menores tensiones durante la síntesis de RNA, ya que al aumentar el volumen disponible, las fricciones

disminuyen. El análisis comparativo de las densidades de empaquetamiento en los diferentes viriones dsRNA (*Tabla 4*) sugiere que existen dos tendencias entre los virus dsRNA en función del número de segmentos empaquetados. Por una parte, los miembros de la familia *Reoviridae*, cuyo genoma está compuesto por 10-12 segmentos de dsRNA, incorporan ~12 moléculas de RNA-polimerasa localizada en el interior de los vértices pentaméricos de la nucleocápsida y alrededor de la cual se organiza el dsRNA de forma compacta. Por otra parte, los virus de hongos, que incorporan una o dos copias de RNA-polimerasa y un único segmento de dsRNA genómico, con un empaquetamiento relativamente laxo. El único modelo que no sigue estos patrones es el bacteriófago $\phi 6$, cuya nucleocápsida contiene ~12 copias de la proteína P2, la RNA-polimerasa, y tres segmentos de dsRNA (Poranen y col. 2001). En este caso, se ha demostrado que varias moléculas de RNA-polimerasa pueden unir y transcribir un mismo RNA molde (Emori y col. 1983). La determinación de la estequiometría proteica de las partículas de IBDV indica que el virión infectivo incorpora ~12 copias de su RNA-polimerasa (*apartado 4.3.2*). Además de con la doble función de VP1 como RNA-polimerasa y como cebador proteico en la síntesis de RNA, el alto número de copias de VP1 podría estar relacionado con la posibilidad de que, al igual que ocurre en el bacteriófago $\phi 6$, varias copias de VP1 transcriban un mismo segmento. Aunque tampoco se puede descartar que este proceso se lleve a cabo fuera de la cápsida viral, ya que las RNPs son por sí solas competentes para la replicación y protegen al genoma de la degradación por ribonucleasas.

El análisis del componente genómico del virión de IBDV no sólo demuestra la incorporación de hasta dos complementos genómicos completos, sino que además los segmentos A y B son incorporados en una misma proporción relativa en las partículas de las poblaciones E2-E6. Es de destacar que aunque las partículas de la población E2 sólo incorporan una molécula de dsRNA, a nivel poblacional los segmentos virales A y B están representados por igual. Esos resultados sugieren que IBDV carece de un mecanismo de selección de los segmentos de dsRNA como ha sido demostrado para el bacteriofago dsRNA, $\phi 6$ (Mindich 2004) y sugerido para otros virus dsRNA como reovirus y rotavirus (Harrison 2001) y, por tanto, las moléculas de dsRNA serían encapsidadas de forma aleatoria en el virión. Si el empaquetamiento de los segmentos A y B fuese aleatorio, la incorporación de dos moléculas de dsRNA implicaría una relación PFU/PP de 0.5, mientras que si se incorporan cuatro segmentos la relación PFU/PP sería cercana a 1. En este contexto, la poliploidía de IBDV supone un mecanismo que incrementa notablemente la posibilidad de ensamblar un virión que incorpore un complemento genómico completo. De hecho, en una infección natural, las poblaciones que contienen más de un complemento genómico completo (E4, E5 y E6) dan cuenta de ~80% de la partículas totales, y el análisis funcional de las mismas indica que existe una correlación directa entre el número de segmentos empaquetados y la infectividad de la partícula.

Tabla 4. Empaquetamiento de ácidos nucleicos en los virus dsRNA

| Familia Viral | Características del dsRNA | | | | | Características de la cápsida | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------|---|
| | Nº Segmentos | Tamaño (kpb) ^a | MW (MDa) ^b | Longitud (µm) ^c | Espaciamiento dsRNA (nm) ^d | T | Copias polimerasa | φ ^e (nm) | R _v ^f (nm) | V (nm ³) | Densidad dsRNA (bp/100nm ³) |
| Reoviridae | | | | | | | | | | | |
| <i>Orthoreovirus</i> | 10 | ~23.5 | 16 | 7.0 | 2.6 | 2 | 12 | ~60 | 24.5 | 61600 | 38 |
| <i>Rotavirus</i> | 11 | ~18.5 | 12.6 | 5.6 | 2.5-3.0 | 2 | 12 | ~52 | 23.5 | 54400 | 34 |
| <i>Orbivirus</i> | 10 | ~19.2 | 13.1 | 5.8 | 3.0 | 2 | 12 | ~52 | 22.0 | 44600 | 43 |
| <i>Aquareovirus</i> | 11 | ~23.6 | 16.0 | 7.1 | | 2 | 12 | ~60 | 23.0 | 51000 | 46 |
| <i>Phytoreovirus</i> | 12 | ~25.7 | 17.5 | 7.7 | | 2 | 12 | ~57 | 26.0 | 73600 | 35 |
| <i>Cypovirus</i> | 10 | ~31.4 | 21.4 | 9.5 | 2.5 | 2 | 12 | ~58 | 24.0 | 57900 | 54 |
| Cystoviridae, fago φ6 | 3 | ~13.4 | 9.1 | 3.4 | | 2 | 12 | ~50 | 20.0 | 33500 | 40 |
| Totiviridae, L-A, HV190S | 1 | ~4.6 | 1.3 | 1.3 | 3.6-4.0 | 2 | 1 | ~43 | 17.0 | 20600 | 22 |
| Chrysoviridae, PcV[§] | 1(4) | ~3.2(12.6) | 2.2(8.6) | 0.9(3.5) | | 1 | 1/2 | ~40 | 16.0 | 17150 | 19 |
| Birnaviridae, IBDV | | | | | | | | | | | |
| Cápsida T=13 | | | | | | 13 | 12 | ~65 | 26.5 | 77900 | |
| 1 genoma | 2 | ~6.0 | 4.1 | 1.8 | 6.1 | | | | | | 10 |
| 2 genomas | 4 | ~12.0 | 8.2 | 3.6 | 4.3 | | | | | | 20 |
| Cápsida T=7 | | | | | | 7 | | ~55 | 18.1 | 24400 | |
| 1 genoma | 2 | ~6.0 | 4.1 | 1.8 | 2.9 | | | | | | 31 |

^a (Fauquet y col. 2005).

^b MW calculados asumiendo 682 Da/pb.

^c Longitud calculada asumiendo un paso de rosca de 3 Å/pb para los miembros de la familia *Reoviridae* e IBDV, 2.56 Å/pb para el fago φ6, y 2.81 2.56 Å/pb para L-A y PcV.

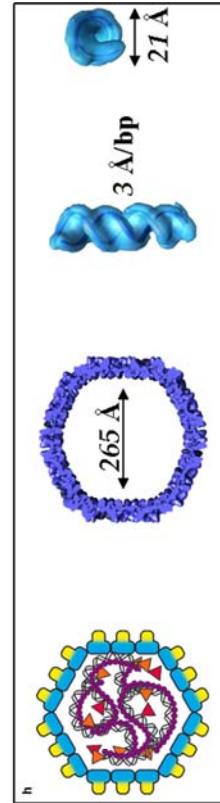
^d Las medidas han sido tomadas mayoritariamente mediante estudios de Criome a partir del promedio de los espaciamientos de Bragg.

^e Diámetro externo.

^f Radio interno.

[§] El genoma de PcV está formado por cuatro moléculas de dsRNA pero se encapsida una molécula de dsRNA por partícula.

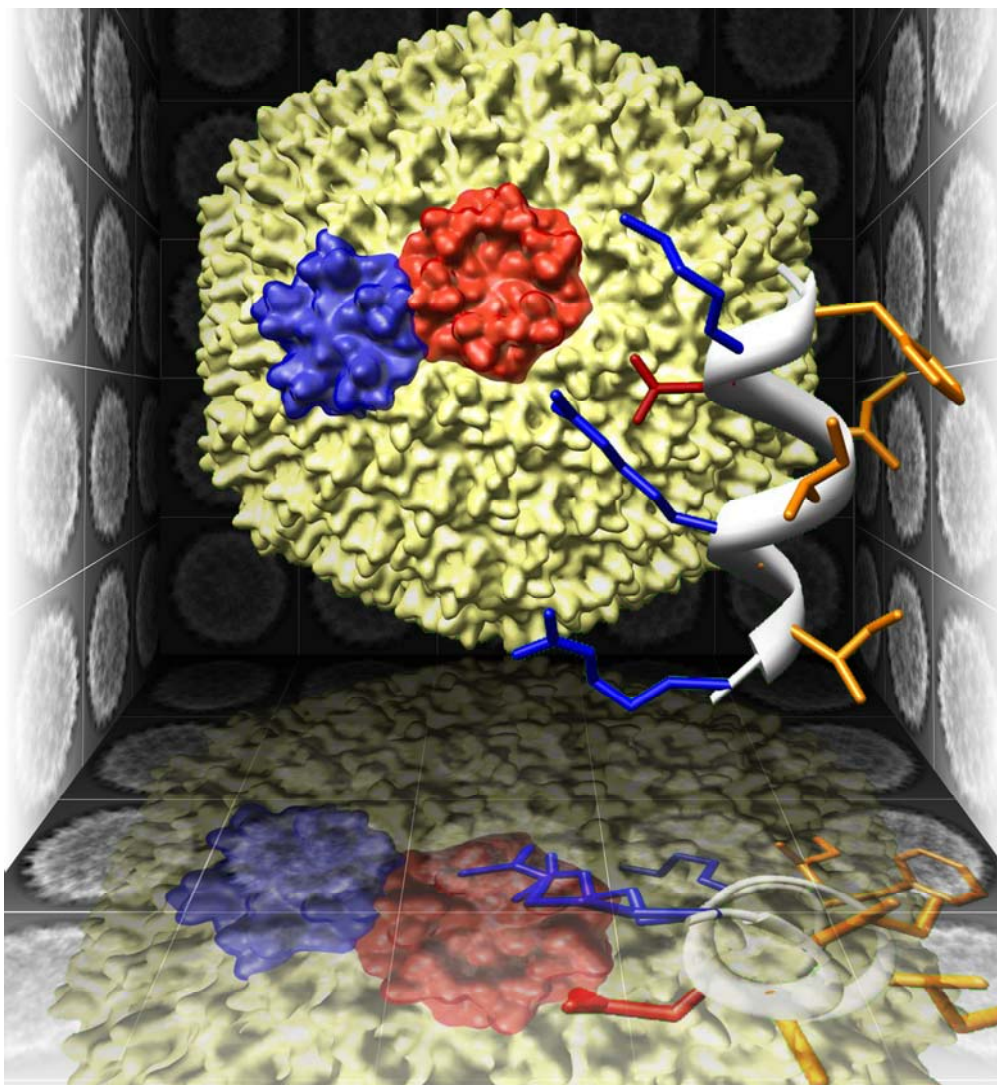
^h A la derecha se muestra un esquema de la información empleada para los cálculos



Mientras algunos virus pleomórficos con una nucleocápsida helicoidal y una envuelta lipídica pueden ser poco restrictivos en cuanto a la longitud del genoma empaquetado (Hosaka y col. 1966; Simon 1972; Enami y col. 1991; Sanchez y col. 2007), los virus icosaédricos tienen un volumen bien definido que impone la incorporación de un único genoma y establece unos límites precisos para la longitud del mismo (Flint y col. 2000). Casos bien definidos de poliploidía son el virus del sarampión (MV), un paramixovirus que produce partículas extremadamente pleomórficas con tamaños que varían desde 120 hasta >300 nm (Rager y col. 2002) y los retrovirus, que incorporan dos copias de su genoma (+)ssRNA en la partícula viral (Paillart y col. 2004). En nuestro conocimiento, IBDV es el primer virus icosaédrico descrito con poliploidía. Este hecho adquiere especial relevancia puesto que no sólo lo diferencia de los demás virus dsRNA sino que supone nuevas posibilidades en su estrategia replicativa viral.

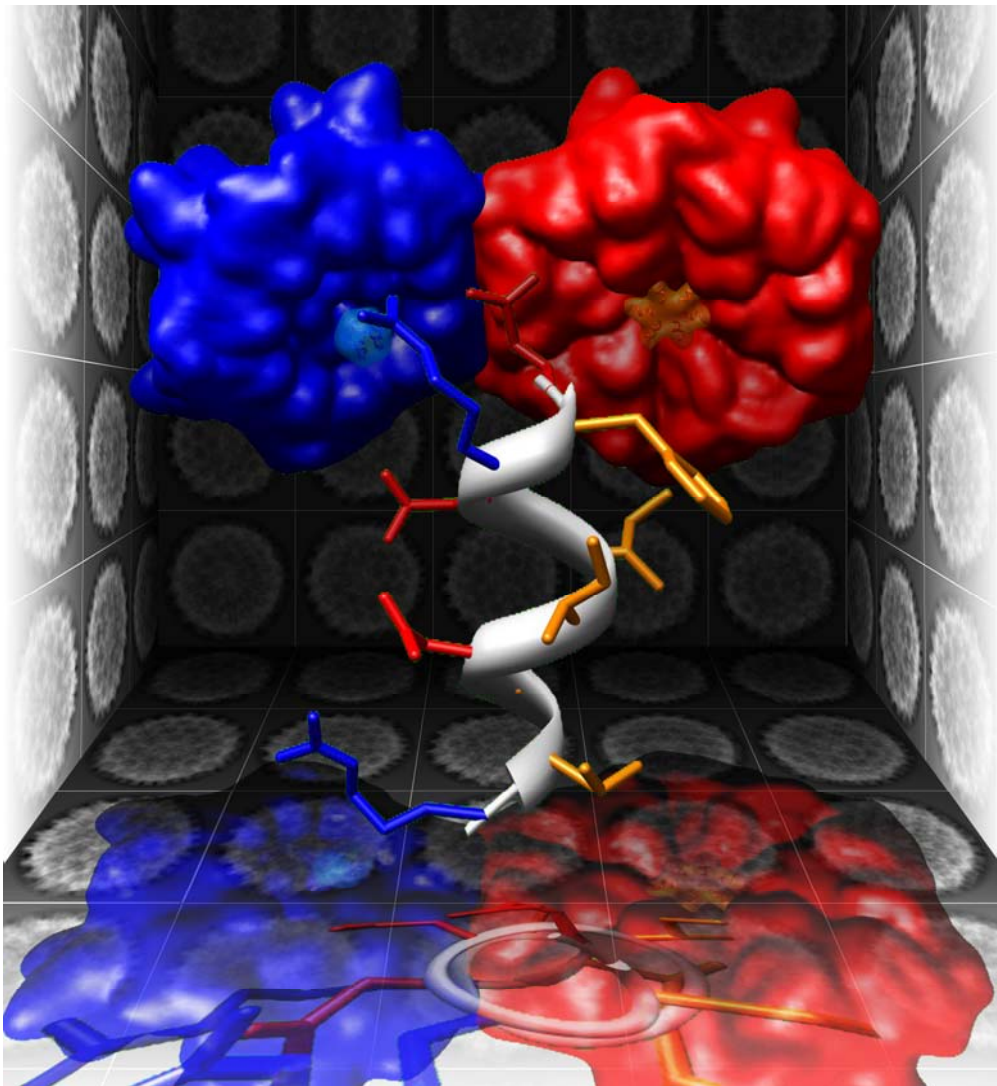
Los birnavirus han sido descritos como un vínculo evolutivo entre los virus dsRNA y (+)ssRNA (Ahlquist 2005; Coulibaly y col. 2005; Pan y col. 2007). La proteína de la cápsida de IBDV, VP2, representa un híbrido estructural entre la proteína de la cápsida de virus (+)ssRNA, como nodavirus y tetravirus, y la proteína de la cápsida externa de virus dsRNA con ciclo extracelular de la familia *Reoviridae*. Asimismo, la relación evolutiva entre los birnavirus y los virus (+)ssRNA se refleja en la permutación de los dominios de la palma de las polimerasas de IBDV y tetravirus, la presencia de un genoma bisegmentado y el proceso proteolítico de maduración de la proteína de la cápsida (*apartado 1.4*). Nuestros resultados evidencian la singularidad de la estrategia replicativa de IBDV. La densidad de empaquetamiento y bajo nivel de organización de los ácidos nucleicos en la cápsida de IBDV es similar a la de los virus dsRNA de hongos (*Totiviridae* y *Chrysoviridae*), mientras que la relación estequiométrica entre los segmentos de dsRNA y la RNA-polimerasa en la partícula viral recuerda a la del bacteriofago $\phi 6$. El mecanismo de maduración de la cápsida viral presenta nuevos elementos comunes con el de nodavirus y tetravirus, ya que ambos sistemas emplean péptidos temporalmente unidos a la proteína de la cápsida para regular el polimorfismo de la misma durante el ensamblaje de la partícula viral y son procesados proteolíticamente una vez han llevado a cabo su función. Finalmente, es de destacar la organización de la maquinaria transcripcional de los birnavirus en RNPs, un ensamblado ausente en las demás familias de virus dsRNA y sin embargo muy extendido entre los virus (-)ssRNA. Curiosamente, la poliploidía genética ha sido descrita en algunos virus pleomórficos (-)ssRNA y en retrovirus. Sin embargo, la poliploidía de IBDV es un fenómeno sin precedentes tanto entre los virus dsRNA como entre los virus con cápsidas icosaédricas.

6 Conclusiones



1. La cápsida T=13 de IBDV esta formada exclusivamente por trímeros cuasiequivalentes de VP2. El polimorfismo estructural del precursor de la proteína de la cápsida de IBDV, pVP2, viene mediado por una hélice α anfipática localizada en su extremo C-terminal. La expresión de una forma quimérica de VP2 que contiene simultáneamente la hélice α anfipática C-terminal y un tag de His N-terminal, que mimetiza al extremo C-terminal de VP3 en la morfogénesis viral, da lugar a cápsidas T=13.
2. La combinación de los mapas tridimensionales a resolución subnanométrica derivados de los análisis de crioME con estructuras atómicas ha permitido identificar con una alta precisión los elementos de estructura secundaria de VP2, y definir la flexibilidad conformacional de sus extremos N- y C-terminal. El procesamiento del extremo C-terminal de pVP2 junto con la disposición alternativa de la hélice α anfipática como un haz compacto de cinco hélices, o una distribución abierta de seis hélices en forma de estrella, determina el ensamblaje de pentámeros o hexámeros de VP2, respectivamente,
3. A partir de células infectadas por IBDV es posible purificar hasta seis poblaciones naturales de viriones que comparten una misma estequiometría proteica pero que, a medida que son mas densas, encapsidan cantidades crecientes de complemento genómico que se correlacionan con un incremento de infectividad. Estos resultados demuestran que IBDV es el primer virus icosaédrico poliploide descrito.
4. Los complejos ribonucleoproteicos, RNPs, de IBDV están constituidos por el dsRNA viral y las proteínas VP1 y VP3. Estas RNPs son ensamblados filamentosos homogéneamente recubiertos por VP3 que son funcionalmente competentes para la síntesis de RNA en ausencia de VP2 y una cápsida estructuralmente íntegra.

7 Bibliografía



- Abrescia, N. G., Cockburn, J. J., Grimes, J. M., Sutton, G. C., Diprose, J. M., Butcher, S. J., Fuller, S. D., San Martin, C., Burnett, R. M., Stuart, D. I., y col. (2004). "Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1." *Nature* **432**(7013): 68-74.
- Ahlquist, P. (2005). "Virus evolution: fitting lifestyles to a T." *Curr Biol* **15**(12): R465-467.
- Antin, P. B. y Ordahl, C. P. (1991). "Isolation and characterization of an avian myogenic cell line." *Dev Biol* **143**(1): 111-121.
- Arnott, S., Hukins, D. W. y Dover, S. D. (1972). "Optimised parameters for RNA double-helices." *Biochem Biophys Res Commun* **48**(6): 1392-1399.
- Baker, M. L., Ju, T. y Chiu, W. (2007). "Identification of secondary structure elements in intermediate-resolution density maps." *Structure* **15**(1): 7-19.
- Baker, T. S. y Cheng, R. H. (1996). "A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy." *J. Struct. Biol.* **116**(1): 120-130.
- Baker, T. S., Olson, N. H. y Fuller, S. D. (1999). "Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from Cryo-Electron Micrographs." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(4): 862-922.
- Bamford, D. H., Grimes, J. M. y Stuart, D. I. (2005). "What does structure tell us about virus evolution?" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**(6): 655-663.
- Baumeister, W. y Steven, A. C. (2000). "Macromolecular electron microscopy in the era of structural genomics." *Trends Biochem Sci* **25**(12): 624-631.
- Bell, C. E., Frescura, P., Hochschild, A. y Lewis, M. (2000). "Crystal structure of the lambda repressor C-terminal domain provides a model for cooperative operator binding." *Cell* **101**(7): 801-811.
- Birghan, C., Mundt, E. y Gorbalenya, A. E. (2000). "A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus." *Embo J* **19**(1): 114-123.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Kozlov, S., Makhovskaya, O. V., Tropea, J. E., Gustchina, A., Rotanova, T. V. y Wlodawer, A. (2005). "Atomic-resolution crystal structure of the proteolytic domain of *Archaeoglobus fulgidus* lon reveals the conformational variability in the active sites of lon proteases." *J Mol Biol* **351**(1): 144-157.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Tropea, J. E., Khalatova, A. G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Wlodawer, A., y col. (2004). "The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site." *J Biol Chem* **279**(9): 8140-8148.

Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. y Crowther, R. A. (1997). "Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy." *J Virol* **71**(1): 325-330.

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

Bubeck, D., Filman, D. J., Cheng, N., Steven, A. C., Hogle, J. M. y Belnap, D. M. (2005). "The structure of the poliovirus 135S cell entry intermediate at 10-angstrom resolution reveals the location of an externalized polypeptide that binds to membranes." *J Virol* **79**(12): 7745-7755.

Butcher, S. J., Dokland, T., Ojala, P. M., Bamford, D. H. y Fuller, S. D. (1997). "Intermediates in the assembly pathway of the double-stranded RNA virus phi6." *Embo J* **16**(14): 4477-4487.

Canady, M. A., Tihova, M., Hanzlik, T. N., Johnson, J. E. y Yeager, M. (2000). "Large conformational changes in the maturation of a simple RNA virus, *nudaurelia capensis* ω virus (NωV)." *J. Mol. Biol.* **299**(3): 573-584.

Canutescu, A. A. y Dunbrack, R. L., Jr. (2003). "Cyclic coordinate descent: A robotics algorithm for protein loop closure." *Protein Sci.* **12**(5): 963-972.

Casañas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., González, D., Rodríguez, J. F. y Verdaguier, N. (2007). "Structural insights into the multifunctional protein VP3 of Birnaviruses." *Structure*(pendiente de publicación).

Caspar, D. L. D. y Klug, A. (1962). "Physical principles in the construction of regular viruses." *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **27**: 1-24.

Castón, J. R., Ghabrial, S. A., Jiang, D., Rivas, G., Alfonso, C., Roca, R., Luque, D. y Carrascosa, J. L. (2003). "Three-dimensional structure of penicillium chrysogenum virus: a double-stranded RNA virus with a genuine T=1 capsid." *J Mol Biol* **331**(2): 417-431.

Castón, J. R., Luque, D., Trus, B. L., Rivas, G., Alfonso, C., González, J. M., Carrascosa, J. L., Annamalai, P. y Ghabrial, S. A. (2006). "Three-dimensional structure and stoichiometry of *Helmintosporium victoriae* 190S totivirus." *Virology* **347**(2): 323-332.

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

Castón, J. R., Rodríguez, J. F. y Carrascosa, J. L. (2008). Infectious Bursal Disease Virus: A Segmented Double-Stranded RNA Virus With a T = 13 Capsid that Lacks a T = 1 Core. *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. Patton, J. T. Bethesda, USA, Caister Academic Press.

Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. y Steven, A. C. (1997). "Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA." J Cell Biol **138**(5): 975-985.

Conway, J. F., Trus, B. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Brown, J. C. y Steven, A. C. (1993). "The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids." J. Struct. Biol. **111**(3): 222-233.

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

Crowther, R. A., DeRosier, D. J. y Klug, A. (1970). "The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its applications to electron microscopy." Proc. R. Soc. Lond. A **317**: 319-340.

Chacon, P. y Wriggers, W. (2002). "Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures." J Mol Biol **317**(3): 375-384.

Cheng, R. H., Reddy, V. S., Olson, N. H., Fisher, A. J., Baker, T. S. y Johnson, J. E. (1994). "Functional implications of quasi-equivalence in a T = 3 icosahedral animal virus established by cryo-electron microscopy and X-ray crystallography." Structure **2**(4): 271-282.

Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J. y Delmas, B. (2005). "Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation." J Virol **79**(19): 12253-12263.

Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B. y Delmas, B. (2004). "The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus." J Virol **78**(7): 3296-3303.

Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. y Delmas, B. (2002). "The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids." J. Virol. **76**(5): 2384-2392.

Chiu, W., Baker, M. L., Jiang, W., Dougherty, M. y Schmid, M. F. (2005). "Electron cryomicroscopy of biological machines at subnanometer resolution." Structure **13**(3): 363-372.

Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. y Delmas, B. (2002). "The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2." J. Virol. **76**(5): 2393-2402.

Diprose, J. M., Burroughs, J. N., Sutton, G. C., Goldsmith, A., Gouet, P., Malby, R., Overton, I., Zientara, S., Mertens, P. P., Stuart, D. I., y col. (2001). "Translocation portals for the substrates and products of a viral transcription complex: the bluetongue virus core." EMBO J. **20**(24): 7229-7239.

Dobos, P. (1993). "In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1." Virology **193**(1): 403-413.

Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. y Teninges, D. (1979). "Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes." J Virol **32**(2): 593-605.

Dokland, T. (1999). "Scaffolding proteins and their role in viral assembly." Cell Mol Life Sci **56**(7-8): 580-603.

Dokland, T. (2000). "Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly." Structure Fold. Des. **8**(8): R157-R162.

Dryden, K. A., Farsetta, D. L., Wang, G., Keegan, J. M., Fields, B. N., Baker, T. S. y Nibert, M. L. (1998). "Internal/structures containing transcriptase-related proteins in top component particles of mammalian orthoreovirus." Virology **245**(1): 33-46.

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. y Schultz, P. (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." Q. Rev. Biophys. **21**(2): 129-228.

Dulbecco, R. y Freeman, G. (1959). "Plaque production by the polyoma virus." Virology **8**(3): 396-397.

Emori, Y., Iba, H. y Okada, Y. (1983). "Transcriptional regulation of three double-stranded RNA segments of bacteriophage phi 6 in vitro." J Virol **46**(1): 196-203.

Enami, M., Sharma, G., Benham, C. y Palese, P. (1991). "An influenza virus containing nine different RNA segments." Virology **185**(1): 291-298.

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

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

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

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

Fisher, A. J. y Johnson, J. E. (1993). "Ordered duplex RNA controls capsid architecture in an icosahedral animal virus." Nature **361**(6408): 176-179.

Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Rancaniello, V. R. y Skalka, A. M. (2000). *Virus Structure. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Washington, ASM Press.

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. y Leith, A. (1996). "SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields." *J Struct Biol* **116**(1): 190-199.

Fuller, S. D., Butcher, S. J., Cheng, R. H. y Baker, T. S. (1996). "Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Particles--The Uncommon Line." *J. Struct. Biol.* **116**(1): 48-55.

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

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

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

Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Rodríguez, J. F. y Verdaguer, N. (2007). "Unprecedented activation mechanism of a non-canonical RNA-dependent RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A*(pendiente de publicación).

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

Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddani, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. y Ward, V. K. (2002). "The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage." *J Mol Biol* **324**(1): 47-62.

Gouet, P., Diprose, J. M., Grimes, J. M., Malby, R., Burroughs, J. N., Zientara, S., Stuart, D. I. y Mertens, P. P. (1999). "The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography." *Cell* **97**(4): 481-490.

Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Kollner, B. y Mundt, E. (1997). "A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4." *J Virol* **71**(11): 8879-8885.

Grimes, J. M., Burroughs, J. N., Gouet, P., Diprose, J. M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P. P. y Stuart, D. I. (1998). "The atomic structure of the bluetongue virus core." *Nature* **395**(6701): 470-478.

Grimes, J. M., Jakana, J., Ghosh, M., Basak, A. K., Roy, P., Chiu, W., Stuart, D. I. y Prasad, B. V. (1997). "An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryomicroscopy." Structure **5**(7): 885-893.

Harrison, S. C. (2001). Principles of virus structure. Fields virology. Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E. y col. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **1**: 53-85.

Heymann, J. B. (2001). "Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy." J Struct Biol **133**(2-3): 156-169.

Heymann, J. B. y Belnap, D. M. (2007). "Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy." J Struct Biol **157**(1): 3-18.

Hill, C. L., Booth, T. F., Prasad, B. V., Grimes, J. M., Mertens, P. P., Sutton, G. C. y Stuart, D. I. (1999). "The structure of a cytovirus and the functional organization of dsRNA viruses." Nat Struct Biol **6**(6): 565-568.

Hinshaw, J. E., Carragher, B. O. y Milligan, R. A. (1992). "Architecture and design of the nuclear pore complex." Cell **69**(7): 1133-1141.

Hjalmarsson, A., Carlemalm, E. y Everitt, E. (1999). "Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2." J Virol **73**(4): 3484-3490.

Holm, L. y Sander, C. (1991). "Database algorithm for generating protein backbone and side-chain co-ordinates from a C alpha trace application to model building and detection of co-ordinate errors." J Mol Biol **218**(1): 183-194.

Hosaka, Y., Kitano, H. y Ikeguchi, S. (1966). "Studies on the pleomorphism of HVJ virions." Virology **29**(2): 205-221.

Jiménez, M. A., Evangelio, J. A., Aranda, C., López-Brauet, A., Andreu, D., Rico, M., Lagos, R., Andreu, J. M. y Monasterio, O. (1999). "Helicity of alpha(404-451) and beta(394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides." Protein Sci **8**(4): 788-799.

Johnson, J. E. (1996). "Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(1): 27-33.

Johnson, J. E. y Speir, J. A. (1997). "Quasi-equivalent Viruses: A Paradigm for Protein Assemblies." J Mol Biol **269**(5): 665-675.

Johnston, C. A., Willard, F. S., Jezyk, M. R., Fredericks, Z., Bodor, E. T., Jones, M. B., Blaesius, R., Watts, V. J., Harden, T. K., Sondek, J., y col. (2005). "Structure of Gα(i1) bound to a GDP-selective peptide provides insight into guanine nucleotide exchange." Structure **13**(7): 1069-1080.

Jones, T. y Kjeldgaard, M. (1997). Electron density map interpretation. Macromolecular crystallography. Carter, C. y Sweet, R. London, Academic Press. **B**: 173-208.

- Kaufer, I. y Weiss, E. (1980). "Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens." Infect Immun **27**(2): 364-367.
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. y Russell, R. G. (1988a). "Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus." J Gen Virol **69**: 1757-1775.
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. y Russell, R. G. (1988b). "Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells." Avian Dis **32**(2): 298-303.
- Kochan, G., González, D. y Rodríguez, J. F. (2003). "Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus." Arch Virol **148**(4): 723-744.
- Kostek, S. A., Grob, P., De Carlo, S., Lipscomb, J. S., Garczarek, F. y Nogales, E. (2006). "Molecular architecture and conformational flexibility of human RNA polymerase II." Structure **14**(11): 1691-1700.
- Lange, H., Muller, H., Kaufer, I. y Becht, H. (1987). "Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro." Arch Virol **92**(3-4): 187-196.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. y Pelletier, S. L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science. Harding, S. E., Rowe, A. J. y Horton, J. C. Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry: 90-125.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. y Prasad, B. V. (1997a). "Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles." Nat Struct Biol **4**(2): 118-121.
- Lawton, J. A., Zeng, C. Q., Mukherjee, S. K., Cohen, J., Estes, M. K. y Prasad, B. V. (1997b). "Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer." J Virol **71**(10): 7353-7360.
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y. y Wang, A. H. (2006). "Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: Implications in virion assembly and immunogenicity." J. Struct. Biol. **155**(1): 74-86.
- Lee, J., Feldman, A. R., Delmas, B. y Paetzl, M. (2007). "Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction." J Biol Chem.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C. y Delmas, B. (2000). "Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites." J Gen Virol **81**(Pt 4): 983-992.

Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. y Rodríguez, J. F. (1999). "VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles." *J Virol* **73**(8): 6973-6983.

Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernández-Arias, A. y Rodríguez, J. F. (2000). "VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis." *Virology* **277**(2): 345-357.

Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. y Olins, P. O. (1993). "Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*." *J Virol* **67**(8): 4566-4579.

Luo, Y., Pfuetzner, R. A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E. A., Cherney, M., Kim, B., Little, J. W. y Strynadka, N. C. (2001). "Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage." *Cell* **106**(5): 585-594.

Llorca, O., Smyth, M. G., Carrascosa, J. L., Willison, K. R., Rademacher, M., Steinbacher, S. y Valpuesta, J. M. (1999). "3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin." *Nat Struct Biol* **6**(7): 639-642.

Marabini, R., Masegosa, I. M., San Martín, M. C., Marco, S., Fernández, J. J., de la Fraga, L. G., Vaquerizo, C. y Carazo, J. M. (1996). "Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy." *J Struct Biol* **116**(1): 237-240.

Maraver, A., Clemente, R., Rodríguez, J. F. y Lombardo, E. (2003a). "Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3." *J. Virol.* **77**(4): 2459-2468.

Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J. A., Castón, J. R., Pazos, F. y Rodríguez, J. F. (2003b). "The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly." *J. Virol.* **77**(11): 6438-6449.

Martínez-Torrecedrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Casal, J. I. (2000). "Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells." *Virology* **278**(2): 322-331.

McCarthy, A. A., Peterson, N. A., Knijff, R. y Baker, E. N. (2004). "Crystal structure of MshB from *Mycobacterium tuberculosis*, a deacetylase involved in mycothiol biosynthesis." *J Mol Biol* **335**(4): 1131-1141.

Mindich, L. (2004). "Packaging, replication and recombination of the segmented genome of bacteriophage Phi6 and its relatives." *Virus Res* **101**(1): 83-92.

- Morais, M. C., Fisher, M., Kanamaru, S., Przybyla, L., Burgner, J., Fane, B. A. y Rossmann, M. G. (2004). "Conformational switching by the scaffolding protein D directs the assembly of bacteriophage ϕ X174." *Mol. Cell* **15**(6): 991-997.
- Morgan, M. M., Macreadie, I. G., Harley, V. R., Hudson, P. J. y Azad, A. A. (1988). "Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product." *Virology* **163**(1): 240-242.
- Muller, H. y Becht, H. (1982). "Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles." *J Virol* **44**(1): 384-392.
- Muller, H., Lange, H. y Becht, H. (1986). "Formation, characterization and interfering capacity of a small plaque mutant and of incomplete virus particles of infectious bursal disease virus." *Virus Res* **4**(3): 297-309.
- Muller, H. y Nitschke, R. (1987a). "Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group." *Med Microbiol Immunol (Berl)* **176**(2): 113-121.
- Muller, H. y Nitschke, R. (1987b). "The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein." *Virology* **159**(1): 174-177.
- Muller, H., Scholtissek, C. y Becht, H. (1979). "The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA." *J Virol* **31**(3): 584-589.
- Mundt, E., Kollner, B. y Kretzschmar, D. (1997). "VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture." *J Virol* **71**(7): 5647-5651.
- Munshi, S., Liljas, L., Cavarelli, J., Bomu, W., McKinney, B., Reddy, V. y Johnson, J. E. (1996). "The 2.8 Å structure of a T = 4 animal virus and its implications for membrane translocation of RNA." *J Mol Biol* **261**(1): 1-10.
- Muñoz, V. y Serrano, L. (1994). "Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters." *Nat Struct Biol* **1**(6): 399-409.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Lebedev, A., Wilson, K. S. y Dodson, E. J. (1999). "Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**(Pt 1): 247-255.
- Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B. y Johnson, J. E. (2002). "L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism." *Nat. Struct. Biol.* **9**(10): 725-728.
- Nakagawa, A., Miyazaki, N., Taka, J., Naitow, H., Ogawa, A., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Higashi, T., Watanabe, Y., Omura, T., y col. (2003). "The atomic structure of rice dwarf virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins." *Structure* **11**(10): 1227-1238.

Navaza, J., Lepault, J., Rey, F. A., Alvarez-Rua, C. y Borge, J. (2002). "On the fitting of model electron densities into EM reconstructions: a reciprocal-space formulation." Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **58**(Pt 10 Pt 2): 1820-1825.

Negash, T., al-Garib, S. O. y Gruys, E. (2004). "Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review." Vet Q **26**(2): 76-87.

Nelson, J. W. y Kallenbach, N. R. (1986). "Stabilization of the ribonuclease S-peptide alpha-helix by trifluoroethanol." Proteins **1**(3): 211-217.

Nibert, M. L. y Schiff, L. A. (2001). Reoviruses and their replication. Fields. Virology. Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E. y col. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins. **2**: 1679-1728.

Nicholls, A., Sharp, K. A. y Honig, B. (1991). "Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons." Proteins **11**(4): 281-296.

Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Luduena, R. F. y Downing, K. H. (1995). "Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site." Nature **375**(6530): 424-427.

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

Paillart, J. C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. y Mak, J. (2004). "Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair." Nat Rev Microbiol **2**(6): 461-472.

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

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

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

Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.

Poranen, M. M., Paatero, A. O., Tuma, R. y Bamford, D. H. (2001). "Self-assembly of a viral molecular machine from purified protein and RNA constituents." Mol Cell **7**(4): 845-854.

Prasad, B. V. y Prevelige, P. E., Jr. (2003). "Viral genome organization." Adv Protein Chem **64**: 219-258.

Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. y Chiu, W. (1988). "Three-dimensional structure of rotavirus." J Mol Biol **199**(2): 269-275.

Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W. P. y Cattaneo, R. (2002). "Polyploid measles virus with hexameric genome length." Embo J **21**(10): 2364-2372.

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

Ranson, N. A., Farr, G. W., Roseman, A. M., Gowen, B., Fenton, W. A., Horwich, A. L. y Saibil, H. R. (2001). "ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy." Cell **107**(7): 869-879.

Reinisch, K. M., Nibert, M. L. y Harrison, S. C. (2000). "Structure of the Reovirus core at 3.6 Å resolution." Nature **404**(6781): 960-967.

Sali, A., Glaeser, R., Earnest, T. y Baumeister, W. (2003). "From words to literature in structural proteomics." Nature **422**(6928): 216-225.

Sanchez, A., Geisbert, T. W. y Feldman, H. (2007). *Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses*. Fields Virology. Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E. y col. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **1**.

Sánchez, A. B. y Rodríguez, J. F. (1999). "Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis." Virology **262**(1): 190-199.

Saugar, I., Luque, D., Oña, A., Rodríguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. y Castón, J. R. (2005). "Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch." Structure **13**(7): 1007-1017.

Schneemann, A., Reddy, V. y Johnson, J. E. (1998). "The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology." Adv. Virus Res. **50**: 381-446.

Schnitzler, D., Bernstein, F., Muller, H. y Becht, H. (1993). "The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus." J Gen Virol **74** (Pt 8): 1563-1571.

Schuck, P. (2000). "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling." Biophys J **78**(3): 1606-1619.

Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J. y Schubert, D. (2002). "Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems." Biophys J **82**(2): 1096-1111.

Shaw, A. L., Rothnagel, R., Chen, D., Ramig, R. F., Chiu, W. y Prasad, B. V. (1993). "Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure." Cell **74**(4): 693-701.

Shaw, A. L., Samal, S. K., Subramanian, K. y Prasad, B. V. (1996). "The structure of aquareovirus shows how the different geometries of the two layers of the capsid are reconciled to provide symmetrical interactions and stabilization." Structure **4**(8): 957-967.

Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. y Duncan, R. (2002). "Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif." Virology **296**(2): 241-250.

Simon, E. H. (1972). "The distribution and significance of multiploid virus particles." Prog Med Virol **14**: 36-67.

Smith, G. E., Summers, M. D. y Fraser, M. J. (1983). "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector." Mol Cell Biol **3**(12): 2156-2165.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Spies, U. y Muller, H. (1990). "Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group." J Gen Virol **71** (Pt 4): 977-981.

Spies, U., Muller, H. y Becht, H. (1987). "Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products." Virus Res **8**(2): 127-140.

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

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

Ternois, F., Sticht, J., Duquerroy, S., Krausslich, H. G. y Rey, F. A. (2005). "The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor." Nat. Struct. Mol. Biol. **12**(8): 678-682.

Thornton, J. M., Todd, A. E., Milburn, D., Borkakoti, N. y Orengo, C. A. (2000). "From structure to function: approaches and limitations." Nat Struct Biol **7 Suppl**: 991-994.

Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M. y Frank, J. (2003). "Locking and unlocking of ribosomal motions." Cell **114**(1): 123-134.

- van den Berg, T. P., Etteradossi, N., Toquin, D. y Meulemans, G. (2000). "Infectious bursal disease (Gumboro disease)." Rev Sci Tech **19**(2): 509-543.
- van Heel, M. (1984). "Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules)." Ultramicroscopy **13**(1-2): 165-183.
- van Loon, A. A., de Haas, N., Zeyda, I. y Mundt, E. (2002). "Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens." J Gen Virol **83**(Pt 1): 121-129.
- Vassylyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M. N., Borukhov, S. y Yokoyama, S. (2002). "Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution." Nature **417**(6890): 712-719.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. y McCawley, P. (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)." In Vitro **13**(4): 213-217.
- Velazquez-Muriel, J. A., Valle, M., Santamaria-Pang, A., Kakadiaris, I. A. y Carazo, J. M. (2006). "Flexible fitting in 3D-EM guided by the structural variability of protein superfamilies." Structure **14**(7): 1115-1126.
- Verschoor, A., Srivastava, S., Grassucci, R. y Frank, J. (1996). "Native 3D structure of eukaryotic 80s ribosome: morphological homology with *E. coli* 70S ribosome." J Cell Biol **133**(3): 495-505.
- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdes, J. A., Jashes, M. M. y Sandino, A. M. (2004). "Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus." J. Virol. **78**(24): 13829-13838.
- Vojnic, E., Simon, B., Strahl, B. D., Sattler, M. y Cramer, P. (2006). "Structure and carboxyl-terminal domain (CTD) binding of the Set2 SRI domain that couples histone H3 Lys36 methylation to transcription." J Biol Chem **281**(1): 13-15.
- von Einem, U. I., Gorbalenya, A. E., Schirrmeier, H., Behrens, S. E., Letzel, T. y Mundt, E. (2004). "VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase." J Gen Virol **85**(Pt 8): 2221-2229.
- Vriend, G. (1990). "WHAT IF: a molecular modeling and drug design program." J Mol Graph **8**(1): 52-56, 29.
- Ward, G. A., Stover, C. K., Moss, B. y Fuerst, T. R. (1995). "Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6773-6777.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. y Wierenga, R. K. (1999). "Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power." Protein Eng **12**(3): 243-250.

Wriggers, W. y Birmanns, S. (2001). "Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data." J. Struct. Biol. **133**(2-3): 193-202.

Xiao, T., Takagi, J., Collier, B. S., Wang, J. H. y Springer, T. A. (2004). "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." Nature **432**(7013): 59-67.

Xu, H. T., Si, W. D. y Dobos, P. (2004). "Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis." Virology **322**(1): 199-210.

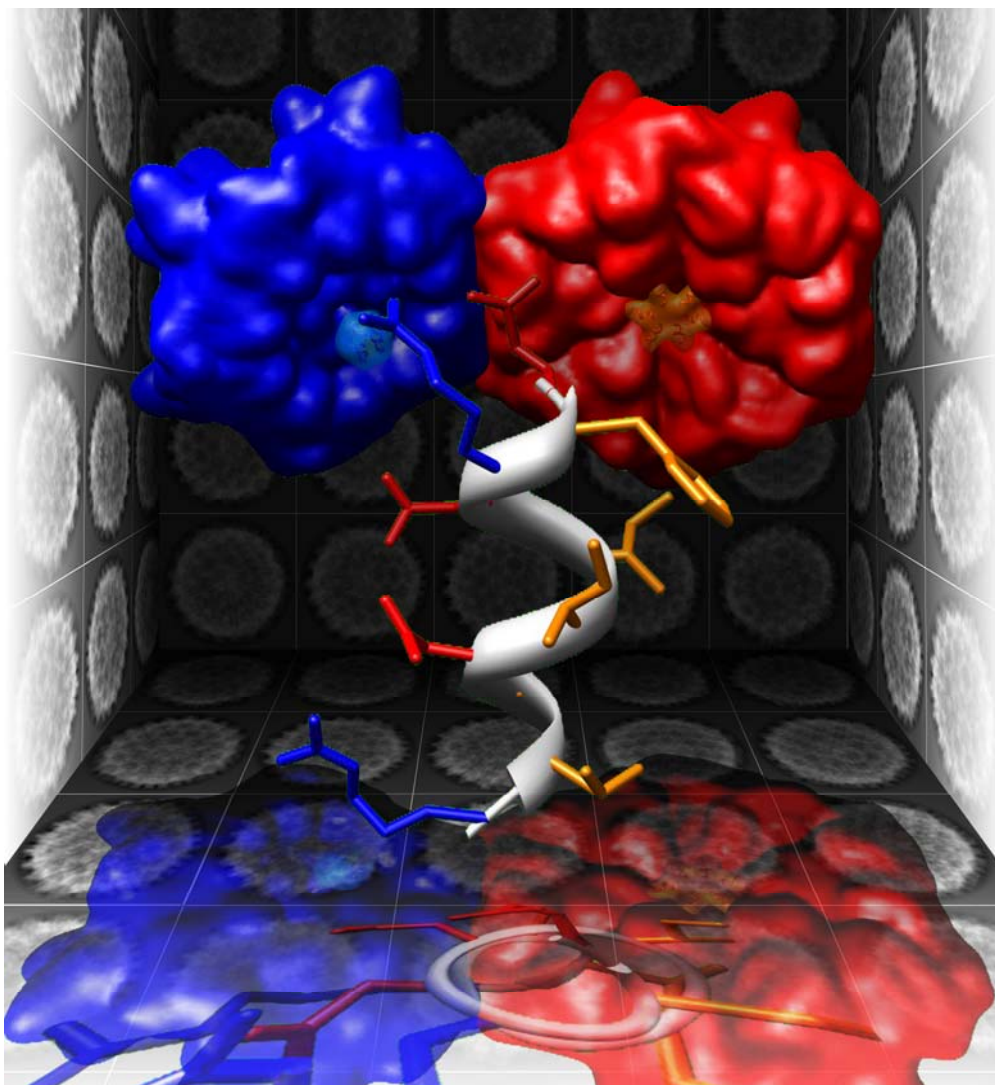
Yamaguchi, T., Setiyono, A., Kobayashi, M., Takigami, S., Fukushi, H. y Hirai, K. (2000). "Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells." Avian Dis **44**(2): 284-290.

Yao, K., Goodwin, M. A. y Vakharia, V. N. (1998). "Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions." J Virol **72**(4): 2647-2654.

Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. y Namba, K. (2003). "Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy." Nature **424**(6949): 643-650.

Zlotnick, A., Reddy, V. S., Dasgupta, R., Schneemann, A., Ray, W. J., Jr., Rueckert, R. R. y Johnson, J. E. (1994). "Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue." J. Biol. Chem. **269**(18): 13680-13684.

8 Publicaciones



Three-dimensional Structure of *Penicillium chrysogenum* virus: A Double-stranded RNA Virus with a Genuine $T = 1$ Capsid

José R. Castón^{1*}, Said A. Ghabrial², Daohong Jiang², Germán Rivas³
Carlos Alfonso³, Ramón Roca¹, Daniel Luque¹ and
José L. Carrascosa^{1*}

¹Department of Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

²Department of Plant Pathology, University of Kentucky, Lexington, KY 40546, USA

³Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28006 Madrid, Spain

Although double-stranded (ds) RNA viruses are a rather diverse group, they share general architectural principles and numerous functional features. All dsRNA viruses, from the mammalian reoviruses to the bacteriophage $\phi 6$, including fungal viruses, share a specialized capsid involved in transcription and replication of the dsRNA genome, and release of the viral plus strand RNA. This ubiquitous capsid consists of 120 protein subunits in a so-called $T = 2$ organization. The stringent requirements of dsRNA metabolism may explain the similarities observed in capsid architecture among a broad spectrum of dsRNA viruses. We have used cryo-electron microscopy combined with three-dimensional reconstruction techniques and complementary biophysical techniques, to determine the structure at 26 Å resolution of the *Penicillium chrysogenum* virus (PcV) capsid. In contrast to all previous studies of dsRNA viruses, PcV capsid is an authentic $T = 1$ capsid with 60 equivalent protein subunits. This $T = 1$ capsid is built with the largest structural protein (110 kDa). Structural comparison between viral particles and capsids devoid of RNA show changes along the inner surface of the capsid, mostly located around the icosahedral 5 and 3-fold axis. Considering that there may be numerous interactions between the inner surface of the protein shell and the underlying RNA, the genome could have an important role in the conformation of the structural subunits. The empty capsid structure suggests a mechanism for transcript release from actively transcribing particles. Furthermore, sequence analysis of the PcV coat protein revealed that both halves of the protein share numerous regions of similar amino acid residues. These results open new perspectives when considering the structural organization of dsRNA virus capsids.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: PcV; double-stranded RNA; virus capsid; cryo-electron microscopy; three-dimensional structure

*Corresponding authors

Introduction

Viruses are a paradigm in optimization of resources due to their limited coding capacity, and for that reason, they must use general simple prin-

ciples to successfully accomplish their life-cycles.¹ Specifically, they need only one or a few different proteins to build an infectious viral particle with a number of essential functions. This is possible for two reasons: the extensive use of symmetry and the conformational polymorphism of the structural proteins.² Thus, without considering complex viruses, two major assemblies are found: icosahedral and helical particles.³ Surface morphology of icosahedral viruses can be described following the traditional concepts of the quasi-equivalence introduced by Caspar & Klug;⁴ from a geometrical

Abbreviations used: cryo-EM, cryo-electron microscopy; 3DR, three-dimensional reconstruction; ds, double-stranded; ss, single-stranded; PcV, *Penicillium chrysogenum* virus.

E-mail addresses of the corresponding authors: jrcaaston@cnb.uam.es; jlcarras@cnb.uam.es

point of view, any icosahedral capsid can easily be described by its triangulation number (T). When capsids are assembled from different gene products, T numbers are no longer valid, and pseudo T (P) numbers are used instead. The simplest capsids are built from 60 identical subunits and assembled into pentamers ($T = 1$); those with more than 60 subunits are assembled into pentamers and hexamers, and cannot have identical but "quasi-equivalent" environments ($T > 1$). The T number describes the number of different environments occupied by a subunit, and the rules of quasi-equivalence allow only certain values of T^5 (those following the relationship $T = h^2 + hk + k^2$, where h and k are non-negative integers). However, there appeared several notable exceptions⁶ that circumvent the quasi-equivalence laws, such as the all-pentamer capsid of papillomaviruses and papovaviruses ($T = 7$), formed by 72 pentamers instead of 12 pentamers and 60 hexamers (360 subunits would correspond to a disallowed $T = 6$).^{7,8} Another striking exception is the inner core of double-stranded (ds) RNA viruses (formally, $T = 1$) formed by 12 decamers, where dimers are the asymmetric unit, i.e. these capsids would correspond to the forbidden " $T = 2$ " (we will refer to this capsid simply as $T = 2$).^{9–11} During the last decade, a number of studies have firmly established that this $T = 2$ architecture is a common feature for dsRNA viruses.¹²

Due to their significance, dsRNA viruses have been intensely studied not only from a structural point of view but also genetically and biochemically. dsRNA viruses infect a diversity of host organisms from bacteria, unicellular and simple eukaryotes (fungi, protozoa) and higher systems (plants and animals). The complexity of the capsid ranges from multilayered concentric^{9,13–15} to single shell capsid.^{16,17} However, with the exception of birnaviruses whose infectious particle is a $T = 13$ single-shelled layer,^{18,19} the ubiquitous capsid structure is a $T = 2$ lattice, where genome replication ([–] strand synthesis) and transcription ([+] strand synthesis) occur within the particle, probably in this order,²⁰ since the viral RNA-polymerase is packaged as an integral component of the capsid. The first unambiguous $T = 2$ layers were reported by Cheng *et al.*²¹ in association with the L-A and P4 totiviruses, which infect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the smut fungus *Ustilago maydis*, respectively. In that study, the structural data from cryo-electron microscopy (cryo-EM) and three-dimensional reconstruction (3DR) techniques, which clearly showed 120 structural protruding subunits on the shell surface of the capsid, were confirmed by complementary experimental studies such as molecular mass determination from dark-field scanning transmission electron micrographs. This organization of protein subunits in the inner capsid layer appears to be a consistent trend among dsRNA viruses. $T = 2$ layers have been described in several members of the family Reoviridae,^{14–16,22–25} the bacteriophage $\phi 6$ of the

family Cystoviridae,²⁶ and the fungal viruses in the family Totiviridae.^{17,21} At present, there are three $T = 2$ layers resolved at atomic resolution: VP3 cores of the orbivirus *Bluetongue virus*,⁹ $\lambda 1$ (among others) cores of the reovirus in the genus *Orthoreovirus*,¹⁰ and Gag of L-A virus.¹¹ Although all three proteins are predominantly α -helical, $\lambda 1$ and VP3 share their overall conformations but Gag has a different tertiary structure. Comparative sequence analyses are not conclusive, since there is no sequence similarity among them.²⁷

Here, we have analyzed by complementary experimental approaches the capsid structure of a dsRNA virus, *Penicillium chrysogenum virus* (PcV), a symptomless fungal virus that belongs to the genus *Chrysovirus*, originally classified in the family Partitiviridae.²⁸ While the fungal totivirus L-A has a genome of a single segment,²⁹ the chrysovirus PcV has a genome consisting of four monocistronic segments,³⁰ which are separately encapsidated in similar virus particles, as deduced from calculations based on RNA:protein ratio and their molecular mass.^{31,32} dsRNA-1 (3562 bp in length), codes for the RNA-dependent RNA polymerase (1117 amino acid residues with a molecular mass of 128,548 Da); dsRNA-2 (3200 bp) encodes the coat protein (982 amino acid residues with a molecular mass of 108,806 Da); and dsRNA-3 (2976 bp) and dsRNA-4 (2907 bp), code for virion-associated proteins of unknown function (912 amino acid residues and molecular mass of 101,458 Da, and 847 amino acid residues with molecular mass of 94,900 Da, respectively). The International Committee on Taxonomy of viruses (ICTV) has recently accepted the establishment of a new family of fungal viruses with multipartite dsRNA genomes, namely the family Chrysoviridae, with PcV as the type species of the family[†].

We have used cryo-EM combined with 3DR techniques, and analytical centrifugation techniques to establish the three-dimensional structure and protein stoichiometry of PcV capsid. In contrast with previous reports, we have found that PcV capsid is a genuine $T = 1$ capsid with 60 protein subunits. Comparison of full and empty capsids indicated major conformational changes; hence, the dsRNA has an important role in the conformation of the structural subunits. These results open new insights into the evolutionary relationships of dsRNA viruses.

Results

Virus purification

Viral particles were purified in the presence or absence of salt (150 mM NaCl) in the buffers used throughout the purification steps (see Materials

[†] <http://www.danforthcenter.org/upload/ictvupload/Partiti-posting-2002.htm>

and Methods). In both cases, homogeneous populations of particles were obtained, as tested by SDS-PAGE and electron microscopy analysis by negative staining (Figure 1). Coomassie blue staining of SDS-PAGE gels showed that the fractions enriched in virus particles consisted of a single major polypeptide of ~110 kDa, which is consistent with the predicted molecular mass of the major coat protein (Figure 1, left). No minor proteins were detected even when higher numbers of virions were analyzed (data not shown), although viral RNA polymerase must also be present in the virions, as it is the case in related viruses.³³ However, when virions are purified in the absence of salt, their observation by cryo-EM showed that most of them were empty, with many even distorted and aggregated, and can hardly be dissociated into individual particles at higher dilutions (Figure 2a). This is probably because the dsRNA molecules released from the broken particles may have acted as a sticky material to promote aggregation (Figure 2a, arrowheads). In order to preserve their structural integrity, as described for L-A virus,^{17,34} virus purification was performed in the presence of 150 mM NaCl. In the latter case, most of the particles (>80%) were full and appeared to be intact (Figure 2b), mostly showing punctuate but also “swirl” patterns corresponding to the dsRNA strand within the particle (Figure 2b, arrowhead). Because of the close similarity in density among the four possible populations of full particles (each containing a single dsRNA molecule of the four genomic dsRNA segments) they are difficult to separate (mean buoyant density is 1.35 g/ml). The observed empty particles (10–20%) may be generated during the extensive dialysis to eliminate CsCl used in the gradient or, alternatively, they may not have packaged the genomic complement during virus assembly in

the cell. Although all particles showed a smooth topography, typical of dsRNA fungal viruses, distinct contours were observed depending on their orientation.

Three-dimensional structures of full and empty particles

Three-dimensional reconstructions were calculated from several micrographs having the same defocus, with the position of the first zero of CTF at 23–25 Å. Empty and full particles were processed separately, but compared directly because both particles were imaged together in the same micrographs. The resolution achieved was 26 Å in both cases. The 3DRs contained 70 and 59 images of empty and full particles, respectively, uniformly distributed in the icosahedral asymmetric unit. Surface representations of the 3DR for both PcV particles along the icosahedral symmetry axis are shown in Figure 3. These maps were contoured assuming the presence of 60 molecules of the coat protein (see below) and a value of 0.73 cm³/g as the partial specific volume of protein, enclosing the same volume for both maps, although it may represent an overestimation. At this contour level, density corresponding to the packaged dsRNA is removed. The outer diameter of the capsid, measured from spherically averaged radial density profiles of maps (Figure 4a, left), was ~406 Å, and the average thickness of the capsid shell was ~44 Å. The capsid exhibits a T = 1 lattice. At this moderate resolution some features are distinguished on the relatively smooth topography of full and empty particles. Thus, the T = 1 full capsid is formed by 12 slightly outward protruding pentamers making an underlying cavity. The pentamers are rather complex; on the outer surface, they are formed by five connected, elongated, ellipsoid-like structures surrounded by another five smaller similar structures that are neither connected to each other, nor intercalated with inner ellipsoid-like structures, but they are in a nearly orthogonal orientation. No holes are evident in the shell (Figure 3a). On contouring the full capsid to a volume enclosing 80% of the expected volume, five small holes (mean diameter of ~10 Å) around the 5-fold axis were evident (Figure 3a, circular inserts). The outer surface of the empty capsid is essentially identical except for the presence of five pores around the inner, elongated, ellipsoid-like structures at the 5-fold axis, and three small pores around the 3-fold axis. For comparison purposes, the empty capsid was also visualized with a density contour level accounting for 80% of expected volume (Figure 3b, circular inserts). In this representation, the holes described above appeared larger, and there were ten instead of five pores around 5-fold axis, making a more porous aspect. Putative holes around the 5-fold axis are close but located in slightly different positions for empty and full capsids (Figure 3a, circular insert at far right).

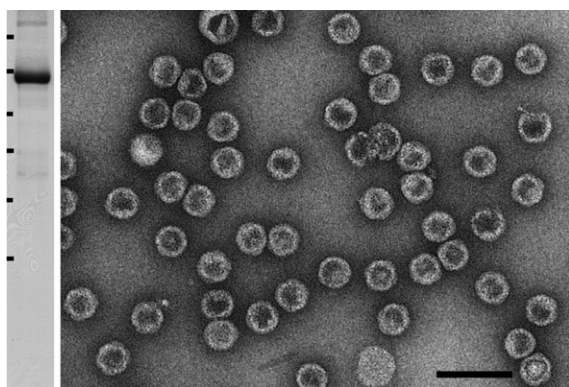


Figure 1. Analysis of PcV particles by SDS-PAGE and negative staining. Left, Purified particles, at 1 mg/ml, were analyzed for protein content by SDS-PAGE on a 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. The apparent molecular mass of protein standards ($\times 10^{-3}$ Da) are 176, 114, 81, 64, 49 and 37. Right, Electron microscopy of negatively stained PcV particles. The scale bar represents 100 nm.

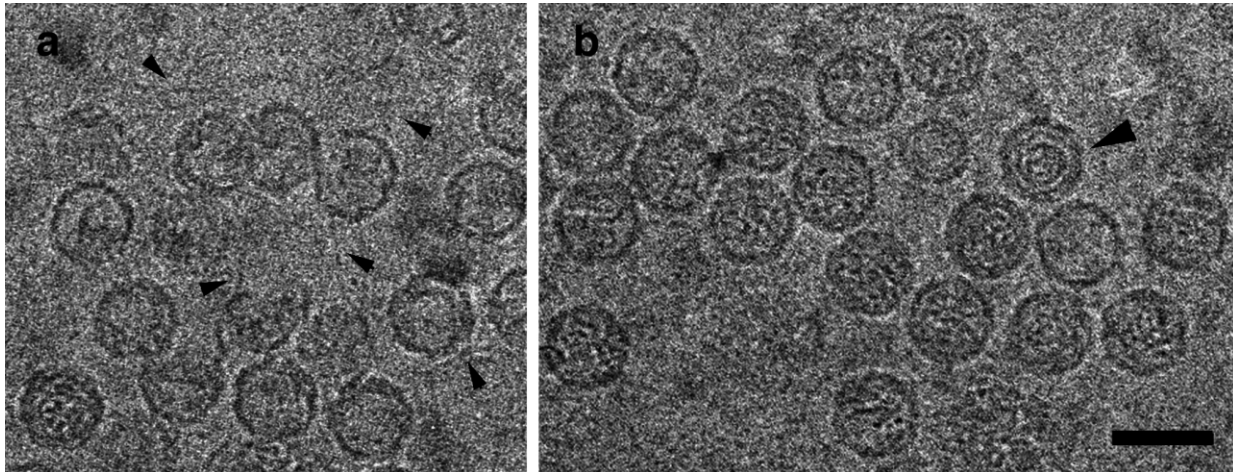


Figure 2. Cryo-electron microscopy of PcV virions. a, PcV particles purified in the absence of salt. Arrowheads identify filamentous material, presumably RNA. b, PcV particles purified in the presence of salt. A full particle exhibiting a “swirl” pattern is indicated by an arrowhead. The scale bar represents 50 nm.

Significant differences were noted on the inner surface of empty and full capsids around the 5 and 3-fold positions, suggesting conformational changes. Whereas a star-shaped pentagonal cavity with a five double spokes was observed in full capsid (Figure 3a, right), a different arrangement was observed in the corresponding region of empty capsid. In the star-shaped cavity of empty capsid, the previously described pores are adjacent to a small inward protruding domain in such a way that is reminiscent of a “peephole” and its “sliding lid” (Figure 3b, right; Figure 4b). The “sliding lid” motif extends inward by ~ 20 Å from the inner surface of the continuous shell. Another difference is located around the 3-fold axis position; this area is

much denser in the empty capsid than in the full capsid (compare central sections in Figure 4c). These structural differences have been consistently seen in an independent 3DR using apparently intact empty PcV capsid images, derived from viral preparations obtained in the absence of salt (data not shown). The locations of these structural changes suggest that the effect of removing the viral genome is to disrupt the proper architecture of the viral shell in the vicinity of the icosahedral vertices. Since both structures contained the same volume, these additional masses around the 5-fold and in the 3-fold axis in the empty capsid must be compensated with their relocation in the vicinity of these icosahedral axis in the full capsid.

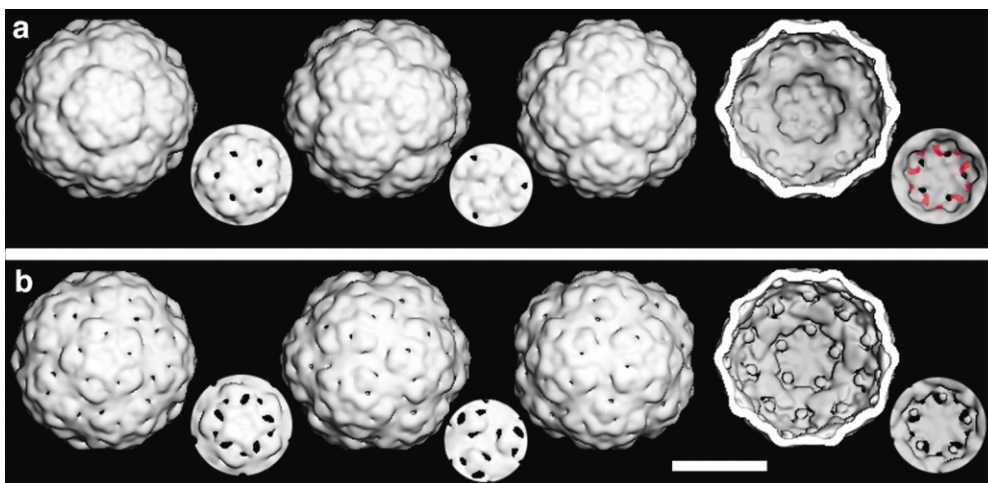


Figure 3. Three-dimensional structures of full and empty PcV capsids. Surface-shaded representations of the outer surfaces of full (a) and empty (b) PcV capsids viewed along a 5-fold, 3-fold, and 2-fold (left to right) axis of icosahedral symmetry. A model with the front half of the protein shell removed viewed along a 5-fold axis is shown (right). The density contour level used accounts for 100% of the expected protein volume if there are 60 copies of the coat protein. Circular inserts show equivalent views at the outer surface along the 5 and 3-fold axis, and the inner surface along the 5-fold axis, with a density contour level accounting for 80% of the expected protein. Pores on the inner surface viewed along the 5-fold axis in the empty capsid are superimposed (red color) on the corresponding region of full capsid (circular insert top, right). The scale bar represents 20 nm.

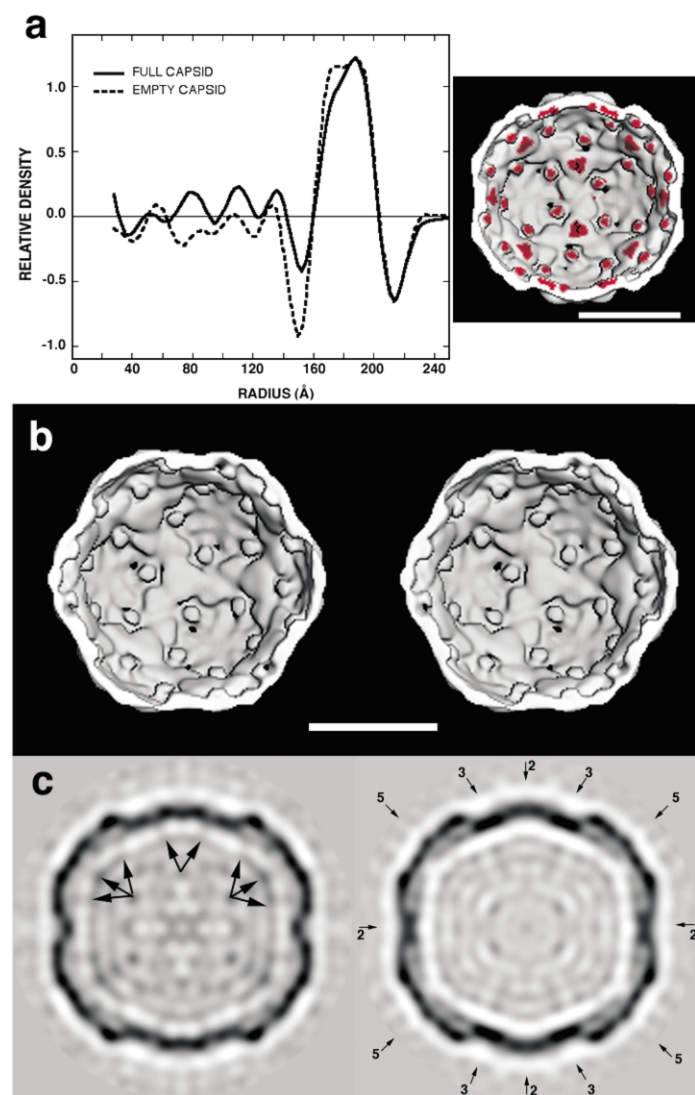


Figure 4. Structural comparison of empty and full capsids. a, Radial density profiles from three-dimensional reconstructions of full (continuous line) and empty (broken line) PcV particles (left). Protein shells ($r = 159\text{--}203\text{ \AA}$) are essentially superimposable except for the density peak at $\sim 175\text{ \AA}$ of the empty capsid. RNA is located at radii $< 155\text{ \AA}$. The plots have been scaled in size and density (see Materials and Methods). Difference map calculated by subtracting full from empty capsid (right). The resulting difference map is represented in red on the inner surface of an empty capsid viewed along the icosahedral 2-fold axis. b, Stereo view of the inner surface of the empty PcV capsid, viewed along a 3-fold axis of symmetry. c, Transverse central sections taken from the 3DR of full (left) and empty (right) capsids. Protein and/or RNA are dark. In the full capsid (left), arrows indicate the contacts between the inner surface of the full capsid and the underlying RNA, mostly located around the 5 and 2-fold axis of symmetry. On the central section of the empty capsid, icosahedral symmetry axes are indicated with arrows and associated numbers. The scale bars represent 20 nm.

Difference mapping between empty and full capsids

The structural differences between full and empty capsids were also clearly observed in their radial density profiles (Figure 4a, left). Map dimensions were practically identical in diameter, since their profiles are positioned at the same radii in both structures, i.e. no detectable capsid shrinking or expansion was noted. At the protein shell (radius $\sim 159\text{--}203\text{ \AA}$), a peak of extra density is observed for empty capsid, mostly located from a radius of 165 \AA to 185 \AA , precisely where the “sliding lids” and the denser areas around the 3-fold axis of empty capsid are located. For that reason, we calculated a difference map by subtracting full from empty capsid, concentrating our attention on the major differences at radii corresponding to the protein shell (see Materials and Methods). The resulting difference map showed clearly the density for the sliding lid blobs and a triangular mass density at the 3-fold axis (Figure 4a, right, denoted

as red color on the inner surface of the empty capsid).

dsRNA packaged within the capsid

As expected, the full capsid showed additional density inside the capsid ($r < 155\text{ \AA}$) in its radial density profile (Figure 4a), which would correspond to packaged dsRNA. However, this density is quite low in comparison with that corresponding to the protein shell. It could be a consequence of the fact that the protein shell accounts for 75% of the virion mass as determined by biochemical analysis, and that the genome is expected to be loosely packaged (see Discussion). In the empty capsid, internal density is at the same level as the solvent outside.

The interference fringes arising from phase contrast are seen as depressions inside and outside the shell in the radial density profiles of empty and full capsids. It is interesting to note that these depressions are less accentuated in the full capsid

on the inner surface. This may be explained by the numerous interactions between the inner surface of the protein shell and the underlying genome-associated density. Effectively, transverse central sections of full capsid showed unambiguous contacts between RNA and the capsid shell at many sites, mostly located around the 3-fold axis (Figure 4c, arrows). These contacts are near, but not precisely at, the positions of the sliding lids. Taken together, these results implied that there are close contacts between RNA and the inner surface of the capsid wall, mostly located around the 5-fold axis.

Analytical ultracentrifugation of PcV particles

To obtain an independent estimation of the copy number for the major capsid protein, and to help us interpret our results from the 3DR map obtained by cryo-EM, analytical ultracentrifugation analysis was performed with samples from the same freshly purified virions, prepared in the presence of salt used for cryo-EM analysis. The sedimentation velocity behaviour of the PcV particles is shown in Figure 5. The predominant species (ca 80%) sedimented with a standard sedimentation coefficient ($s_{20,w}$) of $135(\pm 10)$ S. This sedimentation value is compatible with that calculated for a $T = 1$ particle with a frictional coefficient ratio of 1.30 ± 0.10 . This frictional ratio, which deviates slightly from that expected for an ideal spherical particle, is in very good agreement with the experimental sedimentation behaviour of other closely related viral particles (the frictional coefficient ratio calculated for *Penicillium cyaneo-fulvum virus* and *Penicillium chrysogenum virus*, strain Wis. Q176, was 1.26 ± 0.10).³² On the other hand, the alternative option that the main sedimenting

species was a $T = 2$ particle can be ruled out, because it would imply that the viral particles should be a rod-like elongated particles with a calculated frictional ratio of 1.80 ± 0.10 , which is inconsistent with the images obtained by cryo-EM.

Arrangement of coat protein within the $T = 1$ capsid

Once it was established that 60 copies of the coat protein formed the PcV capsid, full and empty capsids were visualized in different ways to delineate the approximate boundaries and interactions between coat proteins. Density-scaled reconstructions were radially cropped at different radii from the particle center and displayed as surface views down a 2-fold axis. Different density contour levels were applied to each reconstruction to make apparent the boundaries among monomers (Figure 6). The key figure is the full particle radially cropped at ~ 182 Å from the center (Figure 6a, center), where five non-connected stretched structures are clearly seen around the 5-fold axis. These morphological units are characterized by having a bigger domain (or "head") and an extended or "tail" domain. We propose that these entities represent a longitudinally cut view of the monomers making the capsid. Following the symmetry relationships, and favoring the more compact arrangement, we hypothesized that the morphology of the coat protein monomer is as shown in Figure 6a. Monomers of coat protein are elongated molecules that at ~ 188 Å from the center adopt an L-shaped motif (Figure 6a, second from the left) and at the surface of the capsid, subdivide into two non-identical halves (Figure 6a, left). At the inner surface of the full capsid, the stretched structures seen at a radius of ~ 182 Å became thinner and maintain their general elongated shape (Figure 6a, right).

Predicted coat protein monomers of empty capsid showed a similar shape at the outer surface, with slight structural variations (Figure 6b). The empty particle cropped at ~ 182 Å from the center, after comparison with the full capsid, showed five connected putative monomers making the pentamers, indicating that the most important structural changes started at this level. Towards the inner surface of the empty capsid, the extended or tail domain of the monomer split into two regions, one of them forming the sliding lid, while the region around the 3-fold axis is more voluminous.

On the basis of these considerations, and taking into account the larger contact surfaces, the building blocks of the capsid could either be the monomers *per se* or the trimers of the coat protein.

Sequence analysis of PcV coat protein

The amino acid sequence of the PcV capsid protein has been determined (GenBank accession number AAM95602). As expected, no sequence homology was found with other proteins from

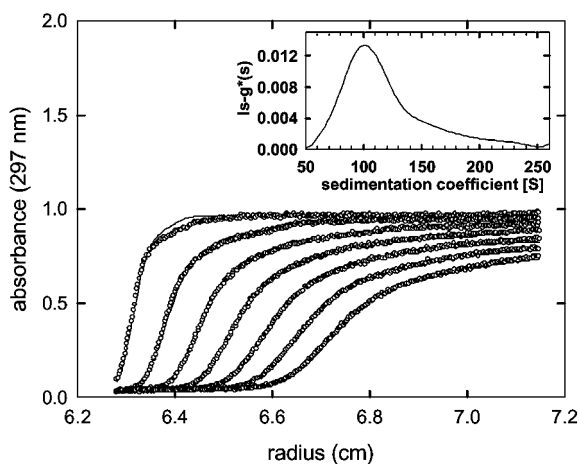


Figure 5. Analytical ultracentrifugation analysis of PcV virions. The symbols show the sedimentation velocity profiles of PcV virions taken at 10,000 rpm and 10°C at different times. The continuous lines are the best fit distributions of the $ls-g^*(s)$ analysis. Inset: apparent sedimentation coefficient distributions, $ls-g^*(s)$.

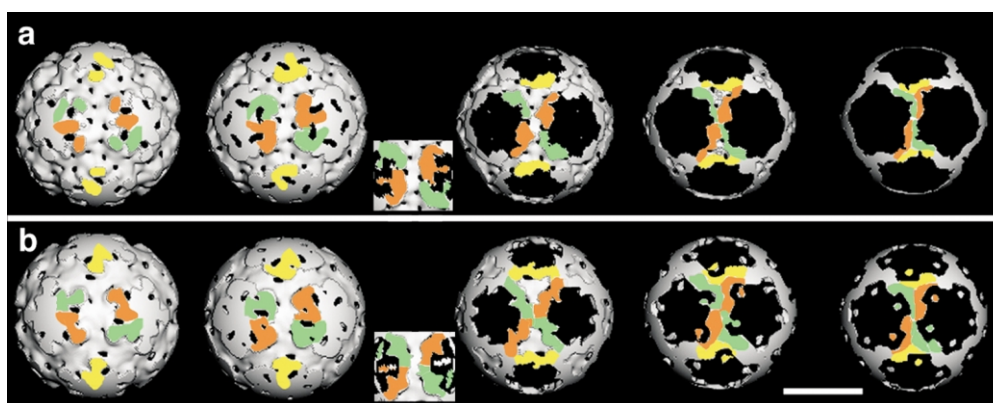


Figure 6. Morphology of coat protein subunits in the PcV capsid. Three-dimensional maps of full (a) and empty (b) capsids were radially cropped at different radii from the particle center (194, 188, 182, 176 and 170 Å, from left to right) and displayed as surface-shaded representations viewed down a 2-fold axis. Density contour levels applied to each reconstruction to make apparent the boundaries among monomers account for $\sim 75\%$ of the expected protein volume in each reconstruction. The rectangular insets correspond to a local view around the 2-fold axis cropped at 185 Å from the particle center. Two trimers of putative monomers of the PcV coat protein are indicated in each map by different colors. The scale bar represents 20 nm.

dsRNA mycoviruses, except for the coat protein of *Helminthosporium victoriae* 145S virus, a closely related chrysovirus (GenBank accession number AAM68954). The PcV coat protein amino acid sequence was analyzed using the REPRO method,^{35,36} a variation of the Smith–Waterman local alignment strategy†. Best alignment, obtained with the two approximate halves of PcV coat protein sequence, is shown in Figure 7, and corresponds to the first hit of top alignments using default parameters and BLOSUM62 matrix. Although these results have to be interpreted with caution due to the gaps introduced, the distribution of conserved segments of amino acid residues could suggest a structural similarity in both halves of the PcV coat protein. Secondary structure predictions of PcV coat protein were not conclusive.

Discussion

The structure of the PcV capsid has been characterized by three-dimensional cryo-EM combined with complementary biophysical analysis. Our results demonstrate that the PcV capsid is composed of 60 monomers of the capsid protein arranged in a $T = 1$ layer that, depending on the presence or absence of genomic dsRNA, can adopt different conformations. Although $T = 1$ lattice is the simplest icosahedral lattice, PcV capsid merits closer examination, at least functionally, when compared with other equivalent dsRNA virus capsids for several reasons: (i) the $T = 2$ capsid with 120 copies of the structural protein is a peculiar architecture in the layer surrounding the genome of dsRNA viruses, PcV capsid being the first described exception; (ii) to our knowledge, it is

the largest coat protein making a $T = 1$ shell, and what makes it more interesting is the ability to form a more spacious capsid than needed if dsRNA is densely packed; (iii) the structural changes that are observed between empty and full particles are unique, although other conformational changes have been characterized in related cores; and (iv) closer inspection of the PcV coat protein sequence reveals a possible relationship with the canonical $T = 2$ layers. In fact, sequence analysis suggests that the PcV capsid subunit falls into two roughly similar domains that are likely to build a similar fold. Leaving apart the fact that they are covalently linked, this peculiar building unit could resemble the regular 120-subunit capsid. In this context, PcV capsid might be considered a pseudo- $T = 2$ structure.

The 120 and 60-subunit capsids

Despite the lack of sequence homology among the structural proteins of dsRNA viruses, they share a common 120-subunit core, and it is thought that this stoichiometry and associated molecular architecture provide an optimal framework to accomplish the numerous activities related to RNA synthesis.^{12,37} The portal vertex proteins of dsDNA phages represent another well-established structural assembly where unrelated proteins are making almost the same three-dimensional structure for DNA translocation.^{38–40}

Paradoxically, a $T = 1$ capsid with only one protein subunit is the least frequently observed quaternary structure in native viruses.⁴¹ Only a few small ssRNA viruses with protein subunits of 20–40 kDa are known to have this capsid type. Other $T = 1$ capsids are formed by single-stranded DNA (ssDNA) viruses such as parvoviruses and microviruses with coat proteins as large as 75 kDa.¹ However, all these viruses represent the

† <http://mathbio.nimr.mrc.ac.uk/~george/repro>

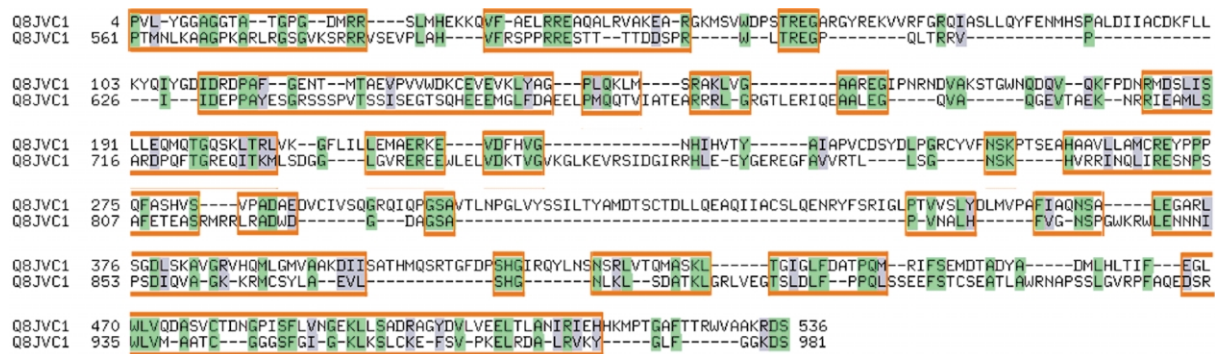


Figure 7. Amino acid sequence comparison between two halves of the PcV coat protein. The best alignment is between residues 4–536 (N-terminal half) and residues 561–981 (C-terminal region). Identical residues are shaded in green; similar residues are shaded in gray; proposed conserved segments of residues are marked inside an orange box. A broken line indicates introduced gaps.

classical vision of capsids as inert containers that protect the infectious genome during the extracellular phase of the virion. The icosahedral asymmetric unit of PcV capsid has a molecular mass of ~110 kDa (982 amino acid residues). This major difference in size of the PcV coat protein compared to equivalent ones of simple $T = 1$ viruses is probably related to the functions that dsRNA cores must carry out, since the PcV $T = 1$ capsid must also be as functional as a standard $T = 2$ capsid. At first glance, although the characterized capsid of fungal dsRNA viruses (LA and P4) differ from the PcV capsid, both having a $T = 2$ layer, it is striking that totiviruses and chrysovirus exhibit similar intravirion dsRNA densities (below; see also Table 1).

Functions of dsRNA cores

The precise reasons for the conservation of this common macromolecular assembly are not known, but some clues have been revealed in recent years. $T = 2$ capsids are used as a template to prime the assembly of surrounding capsids, as organizers of the genome and replicative complex within them, and as micro-cellular compartments or molecular sieves to isolate dsRNA molecules or replicative intermediates from host molecules.

$T = 2$ layers serve as nucleation sites acting as permanent scaffold in multilayered capsids of dsRNA viruses,^{9,42} but this is not applicable to PcV virus or other fungal dsRNA viruses, since their life-cycles are entirely intra-cytoplasmic and outer protective shells, which are involved in attachment to specific receptors, are dispensable. This protective function was probably acquired during evolution of higher eukaryotic dsRNA viruses. Interestingly, the *Giardia lamblia virus*, a protozoal totivirus,⁴³ is infectious as free virions and its entry into the cell is mediated by a receptor.⁴⁴

The innermost capsid is essential for the proper inclusion of the genomic dsRNA and the replicative machinery into the core and, in some systems such as the rotaviruses, it must be present to

ensure that the RNA–polymerase complexes are fully active.⁴⁵ It has been shown that many, if not all, $T = 2$ proteins have a non-specific RNA binding activity.¹² In many of them, the RNA-binding domain has been mapped and shown to be facing the inner surface of the core, such as the VP2 protein of rotavirus.^{23,46,47} The inner surface of the PcV capsid around the 5-fold axis showed many contacts with the underlying shell of dsRNA, in a similar manner as it was demonstrated for the amino-terminal region of VP2.²³ The core of *Blue-tongue virus* and cypoviruses provides an optimal framework to maintain a proper organization of the dsRNA genome, highly ordered and tightly packed, around the replicative complexes located at the 5-fold axis.^{48,49} This probably applies to reovirus and rotavirus as well.^{20,50} This requirement seems to be less stringent for fungal dsRNA viruses, since they are provided with spacious capsids in comparison with other replicative cores. dsRNA shows a high density in the interior of cores of higher eukaryotic dsRNA viruses, with spacing among dsRNA strands of 25–30 Å.^{14,22,48,50} dsRNA of L-A virus is loosely packed, with spacing between filaments of 40–45 Å.¹⁷ Images of PcV full particles showed uniformly dense capsid, i.e. dsRNA is not confined to a shell(s) of density as observed in other viruses such as *Hepatitis B virus*,⁵¹ *Cauliflower mosaic virus*,⁵² and *Cowpea chlorotic mottle virus*.⁵³ Considering the volume available (~17,000 nm³ having an average internal capsid radius = 160 Å), the genome length (0.89 μm assuming an average size = ~3200 bp and 2.81 Å axial rise per base-pair), and provided that the genomic strands are quasi-hexagonally packed and evenly distributed inside the capsid, a spacing of 40 Å is obtained, matching quite well with that of other fungal viruses studied so far, e.g. L-A virus (see Table 1). Support for these calculations came from experiments measuring the absorption spectrum of intact PcV capsid, which was less than 4% hypochromic relative to the absorbance of free dsRNA and free viral protein. In contrast, dsDNA of T-even phages is 11% hyperchromic

Table 1. Structural elements of inner cores of dsRNA viruses: packaging densities

| Virus family | dsRNA features | | | | | Capsid features | | | | | |
|------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|--|-----------------|----------------------|---------------------|----------------------------|--|---|
| | No. of segments | Size ^a (kbp) | MW ^b (MDa) | Length ^c (μm) | Spacing for packed dsRNA (nm) ^d | <i>T</i> | Protein(s) (MW, kDa) | φ ^e (nm) | <i>r</i> ^f (nm) | <i>V</i> ^g (nm ³) | dsRNA density (bp/100.000Å ³) |
| Reoviridae | | | | | | | | | | | |
| <i>Orthoreovirus</i> | 10 | ~23.5 | 16 | 7.0 | 2.6 | 2 | λ1 (142) | ~60 | 24.5 | 61.600 | 38 |
| <i>Rotavirus</i> | 11 | ~18.5 | 12.6 | 5.6 | 2.5–3.0 | 2 | VP2 (94) | ~52 | 23.5 | 54.400 | 34 |
| <i>Orbivirus</i> | 10 | ~19.2 | 13.1 | 5.8 | 3.0 | 2 | VP3 (103) | ~52 | 22.0 | 44.600 | 43 |
| <i>Aquareovirus</i> | 11 | ~23.6 | 16.0 | 7.1 | | 2 | VP3 (126), VP6 (46) | ~60 | 23.0 | 51.000 | 46 |
| <i>Phytoreovirus</i> | 12 | ~25.7 | 17.5 | 7.7 | | 2 | P3 (114) | ~57 | 26.0 | 73.600 | 35 |
| <i>Cypovirus</i> | 10 | ~31.4 | 21.4 | 9.5 | 2.5 | 2 | ND ^h | ~58 | 24.0 | 57.900 | 54 |
| Cystoviridae, phage φ6 | 3 | ~13.4 | 9.1 | 3.4 | | 2 | P1 (85) | ~50 | 20.0 | 33.500 | 40 |
| Birnaviridae, IBDV | 2 | ~6.0 | 4.1 | | | NP ^h | | | | | |
| Totiviridae, L-A | 1 | ~4.6 | 3.1 | 1.3 | 3.6–4.0 | 2 | Gag (76) | ~43 | 17.0 | 20.600 | 22 |
| Chrysoviridae, PcV | 1 (4) ⁱ | ~3.2(12.6) | 2.2 (8.6) | 0.9 (3.5) | | 1 | (110) | ~40 | 16.0 | 17.150 | 19 |
| HSV | 1 | ~152 | 103.7 | 51.4 | 2.6 | – | | ~60 | 43.0 | 333.000 | 46 |

Data are taken from references cited in the main text.

^a Data taken from van Regenmortel *et al.*⁸¹

^b MW were calculated assuming a mass of 682 Da/bp.

^c Length was calculated assuming 3 Å axial rise/bp for members of the family Reoviridae, 2.56 Å for phage φ6, and 2.81 Å for L-A and PcV dsRNAs. HSV dsDNA is assumed to have a B-form structure (3.38 Å/bp).

^d Measurements were mostly obtained from cryo-EM and 3DR studies and represent average Bragg spacings. The corresponding interstrand spacings are calculated by introducing the factor $(2/\sqrt{3})$, if strands exhibit a quasi-hexagonal packing.

^e Outer diameter.

^f Inner radius.

^g Volume when a perfect sphere is assumed and any other internal components are ignored.

^h ND, not determined; NP, not present.

ⁱ PcV dsRNA features: the genome is formed by four dsRNA molecules, but an average value was calculated for each column, since there is a dsRNA molecule/particle.

relative to free dsDNA⁵⁴ indicating the higher degree of condensation of DNA in the phage head, as was directly demonstrated by cryo-EM.^{55,56} It was postulated that the looser packing of the dsRNA would facilitate its mobility in the transcriptional and replicative active particle. It is interesting to note that PcV has a multipartite genome (four molecules with genome sizes ranging from 2907 bp to 3562 bp), and each segment is separately encapsidated in a similar particle. Therefore, it seems that there is an upper size limit of dsRNA that can be packaged within a PcV virion, according to the headful mechanism of replication described for L-A virus.²⁹ PcV particles probably discarded during evolution the option of packaging all segments in the same capsid, as shown by higher eukaryotic dsRNA viruses, probably due to their efficient mean of intracellular transmission *versus* genetic and energetic costs that such changes can imply. Considering comparative analysis of dsRNA packing densities in dsRNA virions (Table 1), it is tempting to speculate about two possible tendencies among dsRNA viruses dictated by the copy number of packaged dsRNA segments: members of the family Reoviridae, whose genome consists of 10–12 segments of dsRNA packaged within the same particles contain 12 RNA-polymerase complexes around which it is densely coiled. On the other hand, fungal viruses and related ones only package a single genomic dsRNA segment per particle where there are one or two copies of the RNA-polymerase complex and the packaged dsRNA shows less internal order since the capsids are more spacious. However, there is at least one representative member of each genus in the family Reoviridae that is structurally well studied, whereas there are many fungal and protozoal dsRNA viruses that remain to be structurally characterized. Thus validation of our predictions must wait. Nevertheless, biochemical data indicate that members of the family Partitiviridae, comprising the genera *Partitivirus* and *Cryptovirus*, and the family Chrysoviridae, encompassing the genus *Chrysovirus*, encapsidate one molecule of dsRNA/particle, contain one or two copies of RNA polymerase, and the dsRNA segments are usually of similar size.^{28,57–59} Bacteriophage $\phi 6$ seems to follow none of these tendencies; each core contains 12 copies of protein P2, the RNA polymerase, and three different dsRNA segments.⁶⁰ This would mean that there is no specific interaction of a particular RNA segment with one RNA polymerase but, instead several RNA polymerases could transcribe the same template, as has been demonstrated.⁶¹

Finally, It has been suggested that sequestering of the dsRNA genome into a capsid would prevent the genomic dsRNA and other small dsRNA molecules, generated during replication, from inducing intracellular responses such as PKR-mediated responses,⁶² and RNA interference mechanisms to avoid suppression of their own

gene expression.^{63,64} This function must be compatible with the ability to allow the exit of freshly synthesized transcripts.⁶⁵

Conformational changes within the PcV capsid

Consistent structural differences are found on the inner surface of empty and full particles, which must be related to the removal of the dsRNA. This may indicate that RNA-protein interactions contribute to increasing the stability of the virion structure. Supporting this notion, we have observed that purified virions, prepared under conditions of low ionic strength, were empty and many were distorted. On the other hand, central sections of 3DR from full particles show contacts between the inner surface of the capsid and the underlying RNA mostly around the fivefold positions. Additional support of a conformational change was obtained from a study of the circular dichroism spectrum of intact and empty particles of PcV.⁵⁴ While intact virus consists of 45% α -helix, empty particles were found to have 30% α -helix. Although the actual size of the pores may be revised when higher-resolution analysis is available, full particles show a continuous shell without pores perforating the capsid wall, whereas empty particles are slightly porous. Those small pores measuring as much as ~ 10 Å in diameter are likely to be too narrow to allow mRNA to pass through. Locally disordered portions of the coat protein may generate these holes when dsRNA is released from the virion. These disordered protein portions, if located around the 5-fold axis, might correspond to the sliding lid structures, than in a full capsid would be closing its corresponding “peephole”. Additional rearrangements must occur in the 3-fold axis that is denser in the empty particles. Furthermore, it remains to be clarified if empty particles did not package dsRNA upon assembly of coat proteins or, alternatively, partially broken particles that lost some monomers of the coat protein. Nevertheless, empty particles may indicate the conformational changes that full particles accommodate to allow new transcripts of mRNA to pass unhindered through wider holes to the cytoplasm.

Equivalent redistributions of mass mostly along the 5-fold axis have been observed in empty rotavirus cores. However, these particles were formed by a deletion mutant of the VP2 protein that comprise the inner cores of rotavirus.²³ The *Bluetongue virus* core is a sealed shell that, in the presence of Mg^{2+} , expands around the 5-fold axis and the small pores become large enough to allow the exit of mRNA.⁶⁶ There have also been described extensive structural rearrangements and an associated expansion on maturation of procapsid (or procore) of phage $\phi 6$ into transcriptionally functional cores that need the packaging of ss (+) RNA.²⁶ This expansion is of an order of magnitude analogous to the maturation process found in the dsDNA viruses. However, full and empty particles of L-A

virus and cypovirus are identical at 16 Å and 13 Å resolution, respectively.^{17,49}

Sequence analysis of PcV coat protein

Although PcV capsid is a $T = 1$ layer, there were some features around the 5-fold axis, as the two non-identical lobular structures on the surface and the star-shaped cavity with double spokes on the inner surface, that vaguely resemble the typical $T = 2$ layers described for dsRNA viruses. For these reasons, and inspired by the large subunit of comoviruses made by fusion of two β -barrel domains,⁶⁷ we were looking for vestiges of gene duplication that would explain the observed structural details and in some way reconcile our results with the accepted notion that a $T = 1$ layer with 120 subunits is a conserved architecture for managing transcription and replication of dsRNA because common requirements apply. Considering the lack of sequence similarity among viral structural proteins, even in the case of the large structural protein of comoviruses, it came to our attention the numerous regions of amino acid residues that seem to be repeated in the two halves of the PcV coat protein. It would be interesting to express separately, and together, the gene fragments coding for each half of the PcV coat protein to determine whether they are able to form an icosahedral particle.

The coat protein of the chrysovirus *Helminthosporium victoriae* 145S virus (895 amino acid residues) shared these repeated segments only in its amino-terminal half, but, unfortunately, structural characterization of the Hv145S particles is lacking.

In this context, it will be worth mentioning that picornavirus capsid might be considered in certain aspects analogous to PcV capsid. The mature capsid of picornaviruses has 60 copies each of three subunits called VP1, VP2 and VP3 that are originally connected to each other in a precursor polyprotein. Again, as in the case of the large subunit of comoviruses, there is very little sequence similarity among them, but they all have the same fold, the canonical β -barrel. To a first approximation the capsid looks like $T = 3$ (180 subunits), and the picornavirus capsid is strictly called a pseudo- $T = 3$ structure.⁶⁸

Materials and Methods

Virion preparation

Penicillium chrysogenum strain ATCC 9480 was used as a source of PcV. Mycelium was harvested from ten-day stationary cultures grown on potato dextrose broth containing 0.5% (w/v) yeast extract, and homogenized in a Waring blender with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.2 M KCl and 0.5% (v/v) β -mercaptoethanol. The homogenate was blended with an equal volume of chloroform and the emulsion was broken by centrifugation at 8000g for 20 minutes. The aqueous layer was then subjected to two cycles of differential cen-

trifugation (27,000 rpm for 150 minutes in a Beckman type 30 rotor and 10,000 rpm for ten minutes in a Beckman JA-20 rotor). High-speed pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) or alternatively in buffer A (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 5 mM EDTA and 150 mM NaCl). The final step in purification was made by rate zonal centrifugation in sucrose density gradients (100–400 mg/ml). The gradients were made in the 50 mM Tris-HCl buffer (or in buffer A) and centrifuged at 24,000 rpm in a Beckman SW28 rotor for 150 minutes. The broad virus band was withdrawn with a syringe from the side of the tube, diluted with buffer and the virions were concentrated by overnight centrifugation at 40,000 rpm in a Beckman 50Ti rotor. The pellets were resuspended in the Tris-HCl buffer or buffer A.

Conventional electron microscopy

Samples (5 μ l) were applied to glow-discharged carbon-coated grids for two minutes. Samples were negatively stained with 2% (w/v) aqueous uranyl acetate. Micrographs were recorded with a Jeol 1200 EXII electron microscope operating at 100 kV at a nominal magnification of 40,000 \times .

Cryo-electron microscopy

Fractions containing virions (at ~ 2 mg/ml), were dialyzed against buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA), and diluted until a uniform distribution of particles was observed (when examined by negative staining). Samples (5 μ l drops) were applied to one side of a holey carbon grid, blotted, and plunged into a bath of liquid ethane (-180°C) following established procedures,⁶⁹ essentially as described previously.^{17,19} Micrographs were recorded under minimal exposure conditions so that the specimens imaged received exposures of 8–10 e^-/nm^2 at nominal magnifications of 40,000 \times on a JEOL 1200 EXII electron microscope operating with a tungsten filament. In some experiments, bacteriophage T4 was vitrified, and the 40.5 Å axial spacing of its tail-sheath was used as an internal magnification standard.⁷⁰ Micrographs were assessed for resolution and astigmatism by computer Fourier analysis, and their defocus values estimated from the positions of the first zero of the contrast transfer function (CTF).⁷¹ For the selected micrographs analyzed, the first zero was at approximately (22–25 \AA^{-1}).

Image analysis

Micrographs were digitized on a Zeiss PhotoScan TD scanner (Zeiss, Germany) with a square pixel size corresponding to 5.5 Å/pixel at the specimen. General image processing operations were carried out using the PIC Software system⁷² running on an Alpha workstation DPW600au (Compaq). Particles were extracted and pre-processed using the automated procedure of Conway *et al.*⁷³ Empty and full capsids were respectively selected based on their gray level inside the capsid. The empty capsids were represented by clear densities, while full capsids appeared with a dark gray interior. Intermediate gray particles were interpreted as partially filled, and, consequently, they were not included in the data sets for further processing. Particle orientations were determined by means of the polar Fourier transform algorithm, an iterative procedure,⁷⁴ taking as starting model the three-dimensional map of empty L-A particles, filtered at

35 Å resolution, due to the similarity observed between profiles of PcV and L-A particles.²¹ The model-based procedures were also used for all subsequent orientation and phase origin refinements.⁷⁴ Reconstructions, with a set of particles that adequately represented the icosahedral asymmetric unit, were calculated using Fourier–Bessel techniques⁷⁵ and complete icosahedral (532) symmetry was imposed in the final density maps. The underfocus value of the selected electron micrographs permitted reconstructions of the structures to a resolution within the first zero of the CTF of the electron microscope.

Each reconstruction was based on data from several micrographs taken in the same session to include 70 images of empty PcV particles, and 59 images of full PcV particles. The relative low number of particles included in our 3DRs, although appropriate to the achieved resolution, may be due either to a certain structural heterogeneity of the purified virions and/or to the imaging conditions used in this work. Another independent reconstruction for empty PcV capsid was calculated from micrographs of virus stocks obtained in the absence of salt. The resolution of the final reconstructions was estimated to be ~26 Å, as assessed by Fourier ring correlation (FRC) analysis.^{73,76} Data quality was also assessed by eigen-value spectra.⁷⁷ At the achieved resolutions, 99–95% of the mean inverse eigenvalues of the 70 and 59 particles were less than 0.01, indicating that the data were adequately sampled in the Fourier space.⁷⁸

Reliability of the reconstructions was also tested by reprojecting the three-dimensional maps along the orientations of the individual particles included in the reconstructions.

Difference maps analysis

A threshold value was determined that included 100% of the expected volume for the full and empty capsids given a copy number of 60 molecules of the coat protein and a partial specific volume of protein of 0.73 cm³/g. Spherically averaged radial density profiles were calculated for empty and full maps, and they were normalized and scaled to match the fit between both profiles. A difference map was then obtained by subtraction. For surface rendering of the resulting maps, the density was set to zero inside a radius of 155 Å, and small islands of density were filtered out.

Analytical centrifugation

The sedimentation velocity experiments with the PcV viral particles (loading concentration ca 1 mg/ml) were carried out in an XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman-Coulter Inc.) at 10,000 rpm and 10 °C, using an An60Ti rotor and 12 mm double-sector centrepieces. Absorbance scans were taken at 297 nm. The sedimentation coefficient distributions were calculated by least-squares boundary modelling of sedimentation velocity data using the *ls-g**(s) method,⁷⁹ as implemented in the SEDFIT program. These experimental sedimentation values were corrected to standard conditions to get the corresponding *s*_{20,w} values using the SEDNTERP program.⁸⁰ The latter program was also used to calculate the partial specific volumes of T = 1 (0.68(±0.01) ml/g) and T = 2 (0.70(±0.01) ml/g) viral particles, taking into account the amino acid composition and the mass fraction of RNA. Further hydrodynamic analysis (i.e. calcu-

lation of frictional coefficient ratio) was performed with the SEDFIT program.

Data Bank accession numbers

The complete nucleotide sequences of PcV dsRNAs 1–4 have been deposited in the GenBank under accession numbers AF296439, AF296440, AF296441, and AF296442, respectively (D.J. & S.A.G., unpublished results).

Acknowledgements

This work was supported by grant BMC2002-00996 from the MCYT. J.R.C. holds a contract from the “Ramón y Cajal” program (MCYT). We are pleased to acknowledge A. C. Steven, B. L. Trus (NIH) and T. S. Baker (Purdue University, West Lafayette, IN) for sharing their reconstruction software. We deeply thank A. C. Steven and B. L. Trus for their continuous encouragement and support. We also thank Wendy Havens (University of Kentucky) for technical assistance.

References

- Harrison, S. C. (2001). Principles of virus structure. In *Fields Virology* (Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. & Strauss, S. E., eds), 4th edit., vol. 1, pp. 53–85, Lippincott, Philadelphia, PA.
- Dokland, T. (2000). Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Struct. Fold. Des.* **8**, R157–R162.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2000). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*, ASM Press, Washington, DC.
- Caspar, D. L. D. & Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 1–24.
- Baker, T. S., Olson, N. H. & Fuller, S. D. (1999). Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 862–922.
- Steven, A., Trus, B., Booy, F., Cheng, N., Zlotnick, A., Castón, J. & Conway, J. (1997). The making and breaking of symmetry in virus capsid assembly: glimpses of capsid biology from cryoelectron microscopy. *FASEB J.* **11**, 733–742.
- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. & Murakami, W. T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*, **295**, 110–115.
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L. & Harrison, S. C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*, **354**, 278–284.
- Grimes, J. M., Burroughs, J. N., Gouet, P., Diprose, J. M., Malby, R., Zientara, S. *et al.* (1998). The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature*, **395**, 470–478.
- Reinisch, K. M., Nibert, M. L. & Harrison, S. C.

- (2000). Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature*, **404**, 960–967.
11. Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B. & Johnson, J. E. (2002). L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nature Struct. Biol.* **9**, 725–728.
 12. Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (2000). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Advan. Virus Res.* **55**, 185–229.
 13. Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W. & Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*, **382**, 471–473.
 14. Shaw, A. L., Samal, S. K., Subramanian, K. & Prasad, B. V. (1996). The structure of aquareovirus shows how the different geometries of the two layers of the capsid are reconciled to provide symmetrical interactions and stabilization. *Structure*, **4**, 957–967.
 15. Lu, G., Zhou, Z. H., Baker, M. L., Jakana, J., Cai, D., Wei, X. *et al.* (1998). Structure of double-shelled rice dwarf virus. *J. Virol.* **72**, 8541–8549.
 16. Hill, C. L., Booth, T. F., Prasad, B. V., Grimes, J. M., Mertens, P. P., Sutton, G. C. & Stuart, D. I. (1999). The structure of a cytovirus and the functional organization of dsRNA viruses. *Nature Struct. Biol.* **6**, 565–568.
 17. Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. & Steven, A. C. (1997). Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J. Cell Biol.* **138**, 975–985.
 18. Bottcher, B., Kiselev, N., Stel'Mashchuk, V., Perevozchikova, N., Borisov, A. & Crowther, R. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* **71**, 325–330.
 19. Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodriguez, J. F., Casal, J. I. & Carrascosa, J. L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* **75**, 10815–10828.
 20. Tao, Y., Farsetta, D. L., Nibert, M. L. & Harrison, S. C. (2002). RNA synthesis in a cage—structural studies of reovirus polymerase I3. *Cell*, **111**, 733–745.
 21. Cheng, R. H., Castón, J. R., Wang, G.-j., Gu, F., Smith, T. J. & Baker, T. S. (1994). Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers. *J. Mol. Biol.* **244**, 255–258.
 22. Dryden, K., Wang, G., Yeager, M., Nibert, M., Coombs, K., Furlong, D. *et al.* (1993). Early steps in reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biol.* **122**, 1023–1041.
 23. Lawton, J. A., Zeng, C. Q., Mukherjee, S. K., Cohen, J., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (1997). Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *J. Virol.* **71**, 7353–7360.
 24. Hewat, E. A., Booth, T. F., Loudon, P. T. & Roy, P. (1992). Three-dimensional reconstruction of baculovirus expressed bluetongue virus core-like particles by cryo-electron microscopy. *Virology*, **189**, 10–20.
 25. Zhang, H., Zhang, J., Yu, X., Lu, X., Zhang, Q., Jakana, J. *et al.* (1999). Visualization of protein–RNA interactions in cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Virol.* **73**, 1624–1629.
 26. Butcher, S. J., Dokland, T., Ojala, P. M., Bamford, D. H. & Fuller, S. D. (1997). Intermediates in the assembly pathway of the double-stranded RNA virus φ6. *EMBO J.* **16**, 4477–4487.
 27. Reinisch, K. M. (2002). The dsRNA Viridae and their catalytic capsids. *Nature Struct. Biol.* **9**, 714–716.
 28. Ghabrial, S. A., Bozarth, R. F., Buck, K. W., Martelli, G. P. & Milne, R. G. (2000). Family Partitiviridae. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses* (van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K. & Lemon, S. M., eds), pp. 503–513, Academic Press, San Diego, CA.
 29. Wickner, R. (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **60**, 250–265.
 30. Edmondson, S. P., Lang, D. & Gray, D. M. (1984). Evidence for sequence heterogeneity among the double-stranded RNA segments of *Penicillium chrysogenum* mycovirus. *J. Gen. Virol.* **65**, 1591–1599.
 31. Wood, H. A. & Bozarth, R. F. (1972). Properties of viruslike particles of *Penicillium chrysogenum*: one double-stranded RNA molecule per particle. *Virology*, **47**, 604–609.
 32. Buck, K. W. & Girvan, R. F. (1977). Comparison of the biophysical and biochemical properties of *Penicillium cyaneum-fulvum* virus and *Penicillium chrysogenum* virus. *J. Gen. Virol.* **34**, 145–154.
 33. Wickner, R. B. (2001). Viruses of yeast, fungi, and parasitic microorganisms. In *Fields Virology* (Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. & Strauss, S. E., eds), 4th edit., vol. 1, pp. 629–658, Lippincott, Philadelphia, PA.
 34. Esteban, R. & Wickner, R. B. (1986). Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: *in vitro* M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1552–1561.
 35. George, R. A. & Heringa, J. (2000). The REPRO server: finding protein internal sequence repeats through the Web. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 515–517.
 36. Heringa, J. & Argos, P. (1993). A method to recognize distant repeats in protein sequences. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **17**, 391–411.
 37. Patton, J. T. & Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*, **277**, 217–225.
 38. Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Ruth, F. X., Valpuesta, J. M., Sousa, N. *et al.* (2002). Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. *J. Mol. Biol.* **315**, 663–676.
 39. Valpuesta, J. M. & Carrascosa, J. L. (1994). Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. *Quart. Rev. Biophys.* **27**, 107–155.
 40. Carrascosa, J. L. & Valpuesta, J. M. (1999). Bacteriophage connectors: structural features of a DNA translocating motor. *Recent Res. Dev. Virol.* **1**, 449–465.
 41. Rossmann, M. & Johnson, J. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 533–573.
 42. Johnson, J. E. & Reddy, V. S. (1998). Biggest virus molecular structure yet! *Nature Struct. Biol.* **5**, 849–854.
 43. Wang, A. L., Yang, H. M., Shen, K. A. & Wang, C. C. (1993). Giardavirus double-stranded RNA genome

- encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 8595–8599.
44. Sepp, T., Wang, A. L. & Wang, C. C. (1994). Giardavirus-resistant *Giardia lamblia* lacks a virus receptor on the cell membrane surface. *J. Virol.* **68**, 1426–1431.
 45. Patton, J. T., Jones, M. T., Kalbach, A. N., He, Y. W. & Xiaobo, J. (1997). Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* **71**, 9618–9626.
 46. Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D. & Cohen, J. (1994). Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J. Gen. Virol.* **75**, 3423–3430.
 47. Zeng, C. Q., Labbe, M., Cohen, J., Prasad, B. V., Chen, D., Ramig, R. F. & Estes, M. K. (1994). Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology*, **201**, 55–65.
 48. Gouet, P., Diprose, J. M., Grimes, J. M., Malby, R., Burroughs, J. N., Zientara, S. *et al.* (1999). The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell*, **97**, 481–490.
 49. Xia, Q., Jakana, J., Zhang, J.-Q. & Zhou, Z. H. (2003). Structural comparisons of empty and full cytoplasmic polyhedrosis virus. Protein–RNA interactions and implications for endogenous RNA transcription mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 1094–1100.
 50. Pesavento, J. B., Lawton, J. A., Estes, M. E. & Venkataram Prasad, B. V. (2001). The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 1381–1386.
 51. Zlotnick, A., Cheng, N., Stahl, S. J., Conway, J. F., Steven, A. C. & Wingfield, P. T. (1997). Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 9556–9561.
 52. Cheng, R. H., Olson, N. H. & Baker, T. S. (1992). Cauliflower mosaic virus: a 420 subunit ($T = 7$), multilayer structure. *Virology*, **186**, 655–668.
 53. Fox, J. M., Wang, G., Speir, J. A., Olson, N. H., Johnson, J. E., Baker, T. S. & Young, M. J. (1998). Comparison of the native CCMV virion with *in vitro* assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Virology*, **244**, 212–218.
 54. Edmondson, S. P. & Gray, D. M. (1983). A circular dichroism study of the structure of *Penicillium chrysogenum* mycovirus. *Nucl. Acids Res.* **11**, 175–192.
 55. Booy, F. P., Newcomb, W. W., Trus, B. L., Brown, J. C., Baker, T. S. & Steven, A. C. (1991). Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell*, **64**, 1007–1015.
 56. Lepault, J., Dubochet, J., Baschong, W. & Kellenberger, E. (1987). Organization of double-stranded DNA in bacteriophages: a study by cryo-electron microscopy of vitrified samples. *EMBO J.* **6**, 1507–1512.
 57. Buck, K. W. & Ratti, G. (1975). Biophysical and biochemical properties of two viruses isolated from *Aspergillus foetidus*. *J. Gen. Virol.* **27**, 211–224.
 58. Buck, K. W. & Kempson-Jones, G. F. (1973). Biophysical properties of *Penicillium stoloniferum* virus S. *J. Gen. Virol.* **18**, 223–235.
 59. Ghabrial, S. A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, **16**, 119–131.
 60. Poranen, M. M., Paatero, A. O., Tuma, R. & Bamford, D. H. (2001). Self-assembly of a viral molecular machine from purified protein and RNA constituents. *Mol. Cell*, **7**, 845–854.
 61. Emori, Y., Iba, H. & Okada, Y. (1983). Transcriptional regulation of three double-stranded RNA segments of bacteriophage phi 6 *in vitro*. *J. Virol.* **46**, 196–203.
 62. Ung, T. L., Cao, C., Lu, J., Ozato, K. & Dever, T. E. (2001). Heterologous dimerization domains functionally substitute for the double-stranded RNA binding domains of the kinase PKR. *EMBO J.* **20**, 3728–3737.
 63. Dector, M. A., Romero, P., Lopez, S. & Arias, C. F. (2002). Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* **3**, 1175–1180.
 64. Zamore, P. D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Struct. Biol.* **8**, 746–750.
 65. Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Struct. Biol.* **4**, 118–121.
 66. Diprose, J. M., Burroughs, J. N., Sutton, G. C., Goldsmith, A., Gouet, P., Malby, R. *et al.* (2001). Translocation portals for the substrates and products of a viral transcription complex: the bluetongue virus core. *EMBO J.* **20**, 7229–7239.
 67. Lomonosoff, G. P. & Johnson, J. E. (1991). The synthesis and structure of comovirus capsids. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **55**, 107–137.
 68. Racaniello, V. R. (2001). Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Fields In Virology* (Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. & Strauss, S. E., eds), 4th edit., vol. 1, pp. 685–722, Lippincott, Philadelphia, PA.
 69. Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. & Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quart. Rev. Biophys.* **21**, 129–228.
 70. Moody, M. F. & Makowski, L. (1981). X-ray diffraction study of tail-tubes from bacteriophage T2L. *J. Mol. Biol.* **150**, 217–244.
 71. Lepault, J. & Leonard, K. (1985). Three-dimensional structure of unstained, frozen-hydrated extended tails of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **182**, 431–441.
 72. Trus, B. L., Kocsis, E., Conway, J. F. & Steven, A. C. (1996). Digital image processing of electron micrographs: the PIC system-III. *J. Struct. Biol.* **116**, 61–67.
 73. Conway, J. F., Trus, B. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Brown, J. C. & Steven, A. C. (1993). The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J. Struct. Biol.* **111**, 222–233.
 74. Baker, T. S. & Cheng, R. H. (1996). A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J. Struct. Biol.* **116**, 120–130.
 75. Crowther, R. A. (1971). Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Phil. Trans. Roy. Soc. ser. B*, **261**, 221–230.
 76. Saxton, W. O. & Baumeister, W. (1982). The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J. Microsc.* **127**, 127–138.
 77. Fuller, S. D., Butcher, S. J., Cheng, R. H. & Baker, T. S. (1996). Three-dimensional reconstruction of icosahedral particles—the uncommon line. *J. Struct. Biol.* **116**, 48–55.
 78. Crowther, R. A., DeRosier, D. J. & Klug, A. (1970). The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its applications to electron microscopy. *Proc. Roy. Soc. ser. A*, **317**, 319–340.

-
79. Schuck, P. & Rossmann, P. (2000). Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers*, **54**, 328–341.
80. Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. & Pelletier, S. L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* (Harding, S. E., Rowe, A. J. & Horton, J. C., eds), pp. 90–125, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
81. van Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M.; Bishop, D. H. L.; Carstens, E. B.; Estes, M. K.; Lemon, S. M. (2000). Editors of *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, CA.

Edited by W. Baumeister

(Received 1 April 2003; received in revised form 28 May 2003; accepted 28 May 2003)

The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus

Ana Oña,^{a,1} Daniel Luque,^{a,b} Fernando Abaitua,^a Antonio Maraver,^{a,2}
José R. Castón,^b and Jose F. Rodríguez^{a,*}

^aDepartment of Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bDepartment of Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 10 November 2003; returned to author for revision 22 January 2004; accepted 22 January 2004

Abstract

The interaction between the infectious bursal disease virus (IBDV) capsid proteins VP2 and VP3 has been analyzed in vivo using baculovirus expression vectors. Data presented here demonstrate that the 71-amino acid C-terminal-specific domain of pVP2, the VP2 precursor, is essential for the establishment of the VP2–VP3 interaction. Additionally, we show that coexpression of the pVP2 and VP3 polypeptides from independent genes results in the assembly of virus-like particles (VLPs). This observation demonstrates that these two polypeptides contain the minimal information required for capsid assembly, and that this process does not require the presence of the precursor polypeptide.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: IBDV; Birnavirus; Capsid; Assembly; Polyprotein; Virus-like particle

Introduction

Infectious bursal disease virions are non-enveloped icosahedra ($T = 13$ symmetry) of 65–70 nm enclosing a bipartite dsRNA genome (Leong et al., 2000). According to 3D models (Böttcher et al., 1997; Castón et al., 2001; Lombardo et al., 1999), the infectious bursal disease virus (IBDV) capsid is a single protein layer formed by two polypeptides, VP2 (48 kDa) and VP3 (29 kDa). The external surface is a continuous lattice built up by 260 VP2 trimers. Associated to the inner surface of the VP2 lattice are at least 200 trimers of VP3. In addition to VP2 and VP3, the virus particle contains the putative virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase (VP1) (Gorba-

lenya and Kooning, 1988; Müller and Nitschke, 1987). VP2 and VP3 are generated from a 109-kDa polyprotein in a process involving two independent proteolytic events. First, the polyprotein is autocatalytically processed releasing three polypeptides, pVP2, VP4, and VP3 (Kibenge et al., 1988). Thereafter, the pVP2 precursor undergoes a second proteolytic event that removes a 71-amino acid stretch, termed as pVP2-specific C-terminal domain (pVP2CTD), from its C-terminal end (Da Costa et al., 2002). pVP2CTD cleavage is subsequent to capsid assembly (Chevalier et al., 2002). Mutations near or within the pVP2CTD either reduce or arrest virus replication (Da Costa et al., 2002). The pVP2CTD regulates the assembly of pVP2 trimers (Castón et al., 2001). Hence, individual expression of pVP2 and VP2 yields different structural assemblages. While pVP2 self-assembles into irregular tubules, apparently formed by hexamers of pVP2 trimers, VP2 expression renders 23-nm capsid-like structures made up exclusively by pentamers of VP2 trimers (Castón et al., 2001). Additionally, correct capsid assembly requires a concerted interaction between the precursor and mature VP2 with the inner capsid protein VP3 (Castón et al., 2001; Maraver et al., 2003). The

* Corresponding author. Departamento de Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Fax: +34-91-5854506.

E-mail address: jfrodri@cnb.uam.es (J.F. Rodríguez).

¹ Present address: Bionostra S.A., Ronda de Poniente 4, 28760 Tres Cantos, Madrid, Spain.

² Present address: Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University Medical Center, 540 First Avenue, New York, NY 10016.

interaction of VP3 with the surface capsid VP2 is a key step for IBDV assembly. Failure of classical approaches, such as immunoprecipitation and yeast two-hybrid systems (Tacken et al., 2000, 2003), to detect VP2–VP3 complexes has hampered the progress on this subject. Data presented here demonstrate that VP3 colocalizes exclusively with the pVP2 precursor, thus showing that pVP2CTD plays a key regulatory role within the IBDV assembly pathway. Additionally, we show for the first time that simultaneous expression of two independent genes encoding the pVP2 and VP3 polypeptides leads to formation of virus-like particles (VLPs).

Results

VP3 interacts with the precursor but not with the mature form of the VP2 polypeptide

We sought to analyze the ability of pVP2 and VP2 to interact *in vivo* with the inner capsid protein VP3. Three

previously described recombinant baculoviruses (rBVs), namely FB/his-VP3 (Kochan et al., 2003), FB/pVP2, and FB/VP2 (Martínez-Torrecuadrada et al., 2000) were used for these experiments. Insect cells were grown on coverslips and independently infected with each rBV, or subjected to double infections with FB/his-VP3 + FB/pVP2 or FB/his-VP3 + FB/VP2. At 40 h postinfection (pi), cells were fixed, incubated with sera anti-VP2 and -VP3, and processed for confocal laser scanning microscopy (CLSM).

When independently expressed, the three structural polypeptides display distinctive distribution patterns: (i) VP2 is homogeneously distributed throughout the cytoplasm (Fig. 1A, panel i); (ii) pVP2 forms fine granules interspersed with needle-like formations (Fig. 1A, panel ii); and (iii) VP3 produces discrete ring-like accumulations surrounding the cell nuclei (Fig. 1A, panel iii). Coexpression of VP2 and VP3 does not alter the characteristic distribution patterns of these polypeptides (Fig. 1B, panels i–iii). In contrast, pVP2–VP3 coexpression dramatically modifies the pVP2 pattern. The typical pVP2 granular distribution is replaced

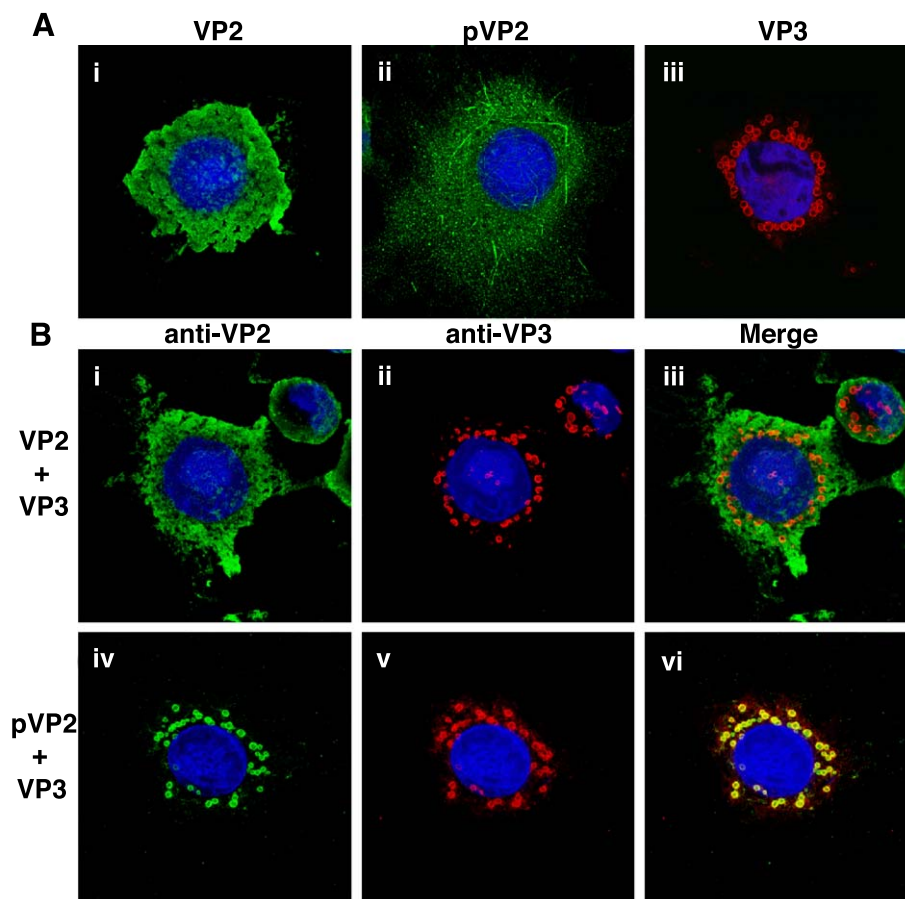


Fig. 1. Effect of VP3 expression on the subcellular distribution of the precursor, pVP2, and mature, VP2, forms of the external capsid IBDV polypeptide. (A) Subcellular distribution of the VP2 (panel i), pVP2 (panel ii), and his-VP3 (panel iii) polypeptides when independently expressed in insect cells. Infected cultures were processed for CLSM using specific antibodies. Green (Alexa 488) corresponds to VP2 and pVP2, and Red (Alexa 594) corresponds to VP3. Blue signal (ToPro-3) corresponds nuclear staining. (B) Subcellular distribution in coinfecting cells. Cells were coinfecting with rBVs expressing VP2 + his-VP3 or pVP2 + his-VP3. Panels i and iv show green fluorescent signals corresponding to anti-VP2 superimposed to the ToPro-3 signal. Panels ii and v show fluorescent signals corresponding to anti-VP3 superimposed to the ToPro-3 signal. Panels iii and vi show the overlay of the three fluorescent signals.

by accumulation of the pVP2 fluorescent signal into ring-like formations (Fig. 1B, panels iv and vi). These formations are also stained with VP3-specific serum (Fig. 1B, panels v and vi). Taken together, these results suggest that VP3 interacts with the pVP2 precursor but not with the mature form of the protein VP2.

pVP2–VP3 coexpression leads to formation of IBDV-like structures

The results described above prompted a further characterization of the pVP2–VP3 interaction using an alternative approach. Hence, cells were coinfecting with either FB/pVP2 + FB/his-VP3 or FB/VP2 + FB/his-VP3. At 40

h pi, cells were fixed and processed for immunoelectron microscopy (IEM) using anti-VP2 or -VP3 specific sera. As controls for this experiment, cells infected with FB/his-VP3, FB/VP2, or FB/pVP2, respectively, were also analyzed.

As assessed by sucrose gradient purification, infection with FB/VP2 and FB/pVP2 leads to formation of 23-nm capsid-like and flexible tubular structures, respectively (Fig. 2A). However, under the experimental conditions used in this analysis, these structures were not detectable by transmission electron microscopy (EM) of thin sections. EM observation of FB/his-VP3-infected cells showed the presence of numerous electron-dense aggregates within the cell cytoplasm (Fig. 2A). These aggregates were not found in cells infected with

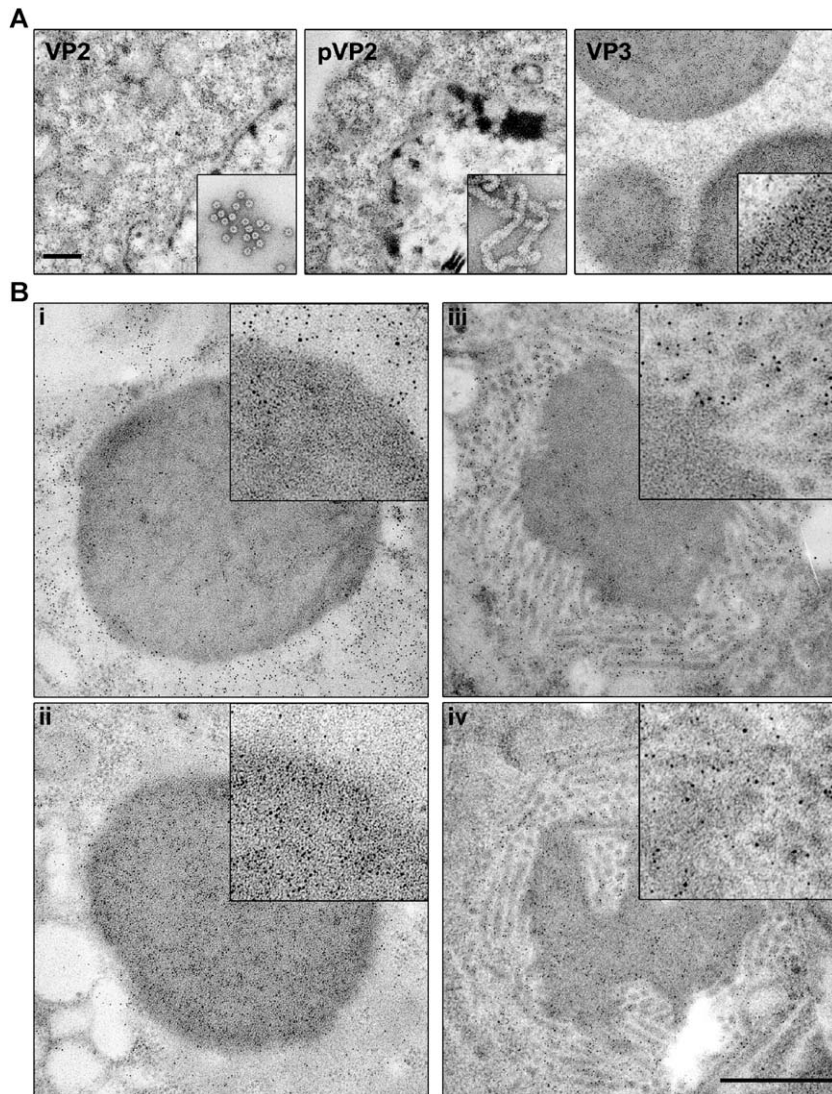


Fig. 2. Detection of intracellular IBDV-like assemblages by EM. (A) Ultrathin sections of H5 cells coinfecting with rBVs expressing the VP2, pVP2, and his-VP3 polypeptides, respectively. The specimens were incubated with either rabbit anti-VP2 or -VP3 sera, followed by incubation with goat anti-rabbit Ig conjugated to 5-nm colloidal gold. Inlets in panels corresponding to VP2 and pVP2 specimens correspond to negatively stained IBDV-like assemblages purified from FB/VP2- and FB/pVP2-infected cells. The inlet in panel VP3 shows a higher magnification ($\times 3$) detail of a VP3-aggregate. Scale bar indicates 250 nm. (B) Ultrathin sections of H5 cells coinfecting with rBVs coexpressing VP2 + his-VP3 (panels i and ii) or pVP2 + his-VP3 (panels iii and iv). The specimens were incubated with either rabbit anti-VP2 or -VP3 sera, followed by incubation with goat anti-rabbit Ig conjugated to 5-nm colloidal gold. Inlets show higher magnification ($\times 3$) details of the original images. Scale bar indicates 500 nm.

wild-type FB virus (data not shown). In agreement with previous LSCM data showing the presence of large VP3 accretions in FB/his-VP3-infected cells (Fig. 1A, panel iii), these aggregates were heavily stained with anti-VP3 serum.

Electron-dense aggregates were also detected in cells coinfecting with FB/VP2 + FB/his-VP3 (Fig. 2B, panels i and ii). The anti-VP3 strongly recognized these amorphous aggregates while giving a weak cytoplasmic signal (Fig. 2B, panel ii). In contrast, the anti-VP2 serum produced a strong cytoplasmic staining while faintly staining the VP3 aggregates (Fig. 2B, panel i). These results confirmed previous LSCM, and further support the notion that under these conditions the VP2 and VP3 polypeptides do not colocalize.

As shown in Fig. 2B, panels iii and iv, the cytoplasm of cells coinfecting with FB/pVP2 + FB/his-VP3 contained numerous accumulations formed by a mixture of tubules and capsid-like assemblages that, in most cases, enwrap irregularly shaped accretions. The anti-VP3 serum recognized the aggregates as well as the surrounding structures (Fig. 2B, panel iv). On the contrary, the VP2-specific serum strongly recognized both the tubular and capsid-like assemblages while giving a weak staining on the electron-dense accretions (Fig. 2B, panel iii).

Taken together, these results demonstrate that VP3 colocalizes with the pVP2 precursor but not with the mature VP2 polypeptide. Additionally, EM observations showed that pVP2–VP3 coexpression leads to formation of assemblages that strongly resemble those found in cells infected with IBDV or vT7 Poly, a recombinant vaccinia virus (rVV) expressing the IBDV polyprotein (Fig. 3).

VLP assembly in cells coexpressing pVP2 and VP3 from independent genes

The results of the IEM analysis strongly suggested that pVP2–VP3 coexpression might lead to formation of VLP. To investigate this possibility, H5 cultures were coinfecting with either FB/pVP2 + FB/his-VP3 or FB/VP2 + FB/his-VP3. At 30 h pi, cells were harvested, homogenized, and used for VLP purification in sucrose density gradients. Gradient fractions were negatively stained and analyzed by transmission electron microscopy. Two different IBDV-

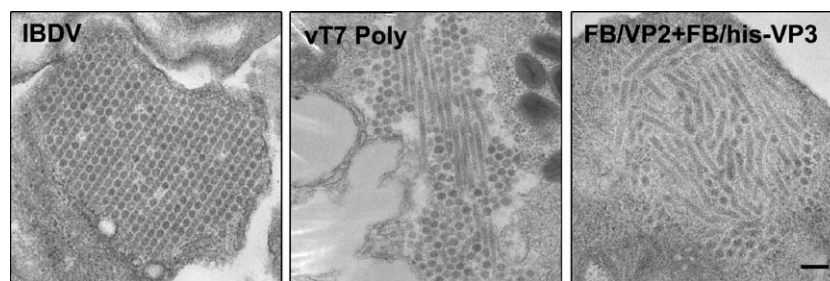


Fig. 3. Detection of IBDV assemblages formed in different systems. EM images correspond to chicken embryo fibroblast infected with IBDV, BSC-1 cells infected the rVV virus vT7 Poly that expresses de IBDV polyprotein, and H5 cells coinfecting with FB/pVP2 + FB/his-VP3, respectively. Scale bar indicates 250 nm.

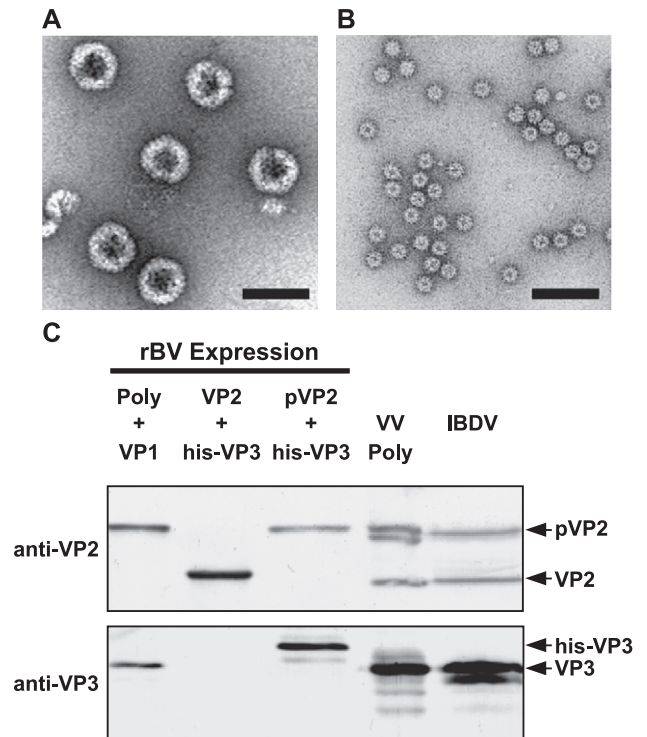


Fig. 4. Characterization of IBDV-like assemblages. (A) EM image of negatively stained VLP purified from H5 cells coexpressing the pVP2 and his-VP3 polypeptides. Scale bar indicates 100 nm. (B) EM image of negatively stained capsid-like structures purified from H5 insect cells coexpressing the VP2 and his-VP3 polypeptides. Scale bar indicates 100 nm. (C) Western blot analysis of IBDV-like assemblages. Samples corresponding to VLP produced in H5 cells infected with the rBV FBD/Poly-VP1 (Poly + VP1), 23-nm capsid-like structures produced in H5 cells coinfecting with the rBVs FB/VP2 + FB/his-VP3 (VP2 + VP3), VLP purified from H5 insect cells infected with FB/pVP2 + FB/his-VP3 (pVP2 + VP3), VLP produced in mammalian cells infected with the rVV vT7/Poly (VV Poly), and purified IBDV (IBDV), were analyzed by Western blot using rabbit anti-VP2 and -VP3 antisera, respectively.

like assemblies were detected in samples corresponding to FB/pVP2 + FB/his-VP3-infected cells: (i) type I rigid tubules in fractions close to the bottom of the gradient (not shown); and (ii) 65–70 nm VLP, detected in the middle and upper gradient fractions (Fig. 4A). The purified VLPs are morphologically undistinguishable from

those previously obtained after polyprotein expression in mammalian or insect cells (Fernández-Arias et al., 1998; Maraver et al., 2003). The only assemblage detected in samples corresponding to FB/VP2 + FB/his-VP3-coinfected cells consisted on 23-nm capsid-like structures (Fig. 4B) identical to those previously found in H5 cells expressing the VP2 polypeptide (Castón et al., 2001). The polypeptide profiles of VLP purified from H5 cells coinfecting FB/pVP2 + FB/his-VP3, and 23-nm capsid-like assemblages were compared to those of purified IBDV, VLP generated either in mammalian cells infected with the rVV VT7Lac/Poly or in insect cells infected with the rBV FBD/Poly-VP1. Samples were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot using anti-VP2 and -VP3 sera. The results obtained are shown in Fig. 4C. An immunoreactive band of 54 kDa, corresponding to pVP2, was detected in all samples except in that from VP2/his-VP3-coexpressing cells. Significant amounts of VP2 (48 kDa) were only detectable in samples corresponding to 23-nm assemblages, IBDV particles, and VLP produced in mammalian cells. The VP3 polypeptide was detected in all samples, except in that corresponding to 23-nm assemblages. The different electrophoretic mobility of the VP3 product detected in VLP purified from pVP2/his-VP3-coexpressing cells reflects the presence of the 3-kDa 6xhis tag at the N-terminus of the his-VP3 polypeptide.

These results demonstrate that simultaneous expression of the pVP2 and VP3 ORFs, driven by independent promoters, allows the assembly of IBDV-like structures including type I tubules and VLP. It is also noteworthy that the fusion of the 6xhis tag to the VP3 N-terminal end does not prevent VLP assembly. This finding provides a new putative target site for the insertion of foreign polypeptide sequences to generate chimerical IBDV VLP.

Expression from independent ORFs enhances pVP2 and VP3 accumulation

LSCM data suggested that pVP2–VP3 accumulation was higher in cells coexpressing these polypeptides from independent genes than in those expressing the complete polyprotein (data not shown). To further assess this possibility, a comparative time-course expression analysis was carried out. To facilitate this study, a dual rBV, FBD/pVP2-his-VP3, was constructed. FBD/pVP2-his-VP3 contains the pVP2 and the his-VP3 ORFs under the control of the BV polyhedrin and p10 promoters, respectively. Infection of H5 cells with FBD/pVP2-his-VP3 also leads to formation of IBDV VLP (data not shown). Monolayers of H5 cells were infected with either FB/Poly or FBD/pVP2-his-VP3 at an MOI of 5 PFU/cell. At different times pi, cells were harvested, and the corresponding lysates subjected to SDS-PAGE and Western blot using anti-VP3 serum. After immunostaining (Fig. 5A), filters were analyzed by densitometry and the relative VP3 accumulation at the different time points compared. The results obtained (Fig. 5B) demonstrate that VP3 accumulation is approximately 2-fold

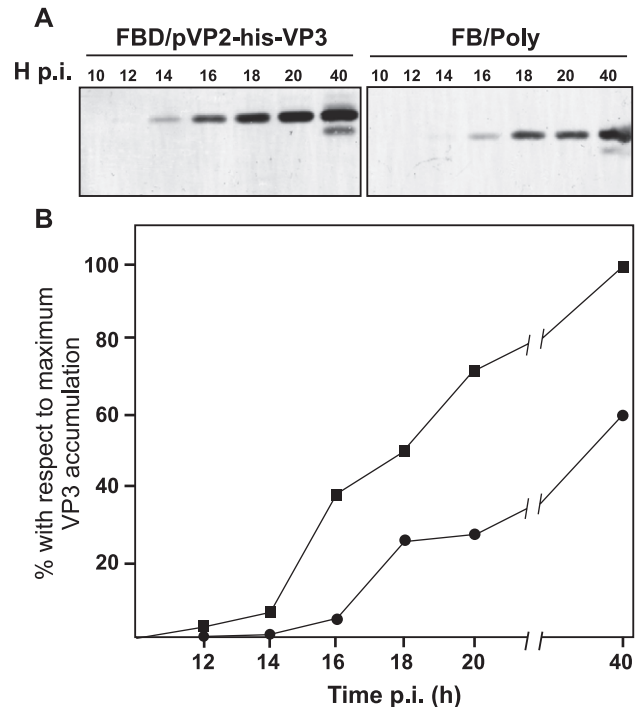


Fig. 5. Comparative analysis of VP3 accumulation rates in insect cells expressing the polyprotein gene or coexpressing the pVP2 and his-VP3 from independent recombinant genes. H5 cell monolayers grown in 24-multiwell plates were infected with either FB/Poly or FBD/pVP2-his-VP3. (A) At the indicated times pi, cells extracts were analyzed by SDS-PAGE and Western blot analysis using rabbit anti-VP3 antiserum. (B) Densitometric analysis. The filter was scanned, and the integrated density of each band determined using the NIH image software. The graph shows the relative VP3 accumulation in samples corresponding from cells infected with FB/Poly (●) or FBD/pVP2-his-VP3 (■) with respect to the maximum accumulation value.

higher in FBD/pVP2-his-VP3-infected cells than in those infected with FB/Poly. Almost identical results were obtained with the pVP2 polypeptide (data not shown).

Discussion

IBDV assembly pathway

The results presented demonstrate that pVP2–VP3 coexpression leads to colocalization, unambiguously detectable both by CLSM and IEM. Furthermore, this interaction results in the formation of structures, type I tubules and VLP, akin to those detected in cells infected either with recombinant virus vectors expressing the complete polyprotein or with IBDV (Fernández-Arias et al., 1998; Granzow et al., 1997). In contrast, the presence of VP2–VP3 complexes was not detected in cells simultaneously expressing these polypeptides. Indeed, purification of IBDV-like assemblages from these cultures exclusively rendered 23-nm capsid-like structures identical to $T = 1$ capsid-like structures produced in cells expressing VP2 individually.

The results described demonstrate that pVP2-CTD plays an essential role in the establishment of pVP2–VP3 complexes. At this time, it is not feasible to ascertain whether pVP2-CTD, either alone or in cooperation with other protein domain(s), (i) directly interacts with VP3 or (ii) regulates the establishment of pVP2 homotypic interactions, thus allowing the formation pVP2 complexes with a conformation that allows the subsequent docking of VP3 subunits. Experiments to gain a better understanding on this matter are in progress.

In this report, we provide the first experimental evidence showing that the minimal information required for IBDV capsid assembly is contained within the pVP2 and VP3 polypeptides. Our data indicate that both pVP2 and VP3 acquire a functional conformation when expressed out of the polyprotein context. This is in agreement with previous observations suggesting that polyprotein processing is co-translational (Kibenge et al., 1988), and suggests that, as it has been shown for the Semliki forest virus polyprotein (Nicola et al., 1999), the IBDV polyprotein domains acquire their native folding co-translationally. Our results suggest the hypothesis that the IBDV capsid assembly pathway is initiated after the primary polyprotein processing event that releases pVP2, VP4, and VP3. According to this hypothesis, pVP2 and VP3 would form an immature procapsid, similar to those found during the assembly of other RNA viruses, that is, retro, noda, tetra viruses (Agrawal and Johnson, 1995; Canady et al., 2000; Freed, 1998; Pringle et al., 2001; Zlotnick et al., 1994). It is exciting to speculate that VLP described here, lacking mature VP2, might represent an intermediate stage in capsid maturation. Work on the 3D reconstruction of pVP2 + VP3 VLP is in progress. Hopefully, this will allow determining whether they exhibit structural differences with respect to native virus particles.

IBDV VLP assembly in insect cells

We have recently shown that the VP3 polypeptide expressed in insect cells undergoes a C-terminal proteolytic cleavage that results in the accumulation of a functionally inactive VP3 product lacking 13-aa residues. Consequently, expression of the IBDV polyprotein in insect cells leads, almost exclusively, to the assembly of rigid type I IBDV tubules (Chevalier et al., 2002; Martínez-Torrecuadrada et al., 2000). Hence, detection of VLP in H5 cells coexpressing pVP2 and VP3 was somewhat unexpected. The reasons for the observed improvement on VLP accumulation remain unclear. VP3 proteolytic trimming begins to be noticeable after 24 h pi, before detectable VLP levels have been accumulated in cells expressing the complete polyprotein (Maraver et al., 2003). It seems feasible that the improvement on VLP production detected in insect cells coexpressing the pVP2 and VP3 genes might be at least partially due to the detected increase on pVP2–VP3 accumulation. Alternatively, expression of pVP2 and VP3 from independent genes might facilitate the establishment of pVP2–VP3 interactions leading to a more efficient VLP assembly.

Materials and methods

Cells and viruses

rBVs FB/pVP2, FB/VP2, FB/his-VP3, and FBD/Poly-VP1 have been previously described (Kochan et al., 2003; Maraver et al., 2003; Martínez-Torrecuadrada et al., 2000). Construction of FBD/pVP2-his-VP3 is described below. rBVs were grown and titrated in *Spodoptera frugiperda* H5 insect cells (Invitrogen) as described before (Maraver et al., 2003). The rVV vT7/Poly (Fernández-Arias et al., 1998) was grown and titrated in BSC-1 cells (American Type Culture Collection) as previously described (Lombardo et al., 1999). The IBDV Soroa strain was propagated in chicken embryo fibroblast as previously described (Lombardo et al., 1999).

Construction of FBD/pVP2-his-VP3

A DNA fragment containing the pVP2 coding sequence, nucleotides 1–1536 of the polyprotein ORF, fused to an artificial stop codon was generated by PCR. The reaction was carried out using the plasmid pVOTE.2/POLY (Fernández-Arias et al., 1998) as template and the oligonucleotides 5'-GCGCAGATCTATGACAAACCTGTCTAGATCAAACCC and 5'-GCGCAAGCTTAGGCGAGAGTCAGCTGCCT-TATGC as primers. The resulting fragment was digested with *Bgl*III and *Hind*III, and inserted into the plasmid pFBDual (Invitrogen) previously digested with *Bam*HI and *Hind*III, generating the plasmid pFBD/pVP2. Thereafter, a fragment containing the his-VP3 ORF was obtained by digesting the pFB/his-VP3 (Kochan et al., 2003) with *Rsr*II followed by Klenow treatment and *Kpn*I digestion. This DNA fragment was purified and cloned into pFBD/pVP2 previously digested with *Sma*I and *Kpn*I. The resulting plasmid, pFBD/pVP2-his-VP3, contains the pVP2 and his-VP3 ORFs under the control of the polyhedrine and p10 promoters, respectively. The corresponding rBV, FBD/pVP2-his-VP3, was generated using the Bac-to-Bac system following the manufacturers' instructions (Invitrogen).

Purification of IBDV-like structures

H5 cells were subjected to single (5 PFU/cell) or double (5 PFU of each rBV/cell) infections with the appropriate rBVs. At 30 h pi, cells were harvested, lysed, and processed by sucrose gradient sedimentation as described previously (Lombardo et al., 1999). Purification of IBDV particles and vT7/Poly-derived VLP was carried out using cultures of BSC-1 cells as previously described (Lombardo et al., 1999).

Electron microscopy

Samples from sucrose gradient sedimentation were dialyzed against 40 mM Pipes, pH 6.2; 150 mM NaCl. After dialysis, samples were applied to glow-discharged carbon-

coated grids for 1 min and negatively stained with 2% aqueous uranyl acetate for 1 min. IEM was carried out on infected H5 cells. At 40 h pi, H5 monolayers were fixed in situ with 4% paraformaldehyde 0.1% glutaraldehyde in PBS at 4 °C for 4 h. After fixation, cell pellets were resuspended in glycerol and frozen in liquid ethane. Frozen specimens were transferred to a Riechert-Jung AFS freeze-substitution unit (Leika) and maintained at -90 °C in a mixture of methanol and 0.5% (wt/vol) uranyl acetate for 48 h. Thereafter, samples were infiltrated in Lowicryl KYM (EML laboratories) at 30 °C. Polymerization was induced with UV light. Ultrathin sections of the samples were immunolabelled with anti-VP2 or -VP3 rabbit sera followed by incubation with goat anti-rabbit Ig conjugated to 5-nm colloidal gold. Micrographs were recorded with a Jeol 1200 EXII electron microscope operating at 100 kV.

SDS-PAGE and Western blotting

Protein extracts were resuspended in Laemmli's sample buffer and heated at 100 °C for 5 min. Electrophoreses were performed on 12% polyacrylamide gels. Western blot analyses were carried out using anti-VP2 and -VP3 specific rabbit sera as previously described (Fernández-Arias et al., 1998). After immunostaining, nitrocellulose filters were scanned with a UMAX PowerLook 2000 scanner (Umax Systems GmbH). Densitometric analyses were performed using the NIH Image program developed at the U.S. National Institutes of Health (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Confocal laser scanning microscopy

H5 cells seeded onto glass coverslips were subjected to either single (5 PFU/cell) or double infections (5 PFU of each rBV/cell) with the indicated rBVs. Monolayers of H5 insect cells were infected with rBVs expressing VP2, pVP2, or his-VP3. At 40 h pi, cells were fixed, incubated with rabbit anti-VP2 and rat anti-VP3 specific sera, followed by incubation with goat anti-rabbit Ig coupled to Alexa 488 (green) and goat anti-rat Ig coupled to Alexa 594 (red). Cell nuclei were stained with ToPro-3. Fluorescent signals detected by CLSM were recorded separately by using appropriate filters. Samples were visualized by epifluorescence using a Zeiss Axiovert 200 microscope equipped with a Bio-Rad Radiance 2100 confocal system. Images were captured using the Laser Sharp software package (Bio-Rad).

Acknowledgments

This work was supported by grants BIO-2000-0905 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, and 09/0043/2001 and 07B/0041/2002 from Subdirección General de Investigación de Comunidad Autónoma de Madrid. JRC was supported by the Ramón y Cajal Program from Ministerio de Ciencia y

Tecnología. A.O. and F.A. were recipients of fellowships from Comunidad Autónoma de Madrid. We are grateful to the technical assistance provided by the CNB Electron Microscopy, Confocal Laser Scanning Microscopy, and Photography Services.

References

- Agrawal, D.K., Johnson, J.E., 1995. Assembly of the T = 4 Nudaurelia capensis omega virus capsid protein, post-translational cleavage, and specific encapsidation of its mRNA in a baculovirus expression system. *Virology* 207, 89–97.
- Böttcher, B., Kiselev, N.A., Stel'Mashchuk, V.Y., Perevozchikova, N.A., Borisov, V., Crowther, R.A., 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71, 325–330.
- Canady, M.A., Tihova, M., Hanzlik, T.N., Johnson, J.E., Yeager, M., 2000. Large conformational changes in the maturation of a simple RNA virus, nudaurelia capensis ω virus (NoV). *J. Mol. Biol.* 299, 573–584.
- Castón, J.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J.F., Casal, J.L., Carrascosa, J.L., 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *J. Virol.* 75, 10815–10828.
- Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B., Delmas, B., 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76, 2384–2392.
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J.C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H., Delmas, B., 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* 76, 2393–2402.
- Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J.P., Rodríguez, J.F., 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79, 1047–1054.
- Freed, E.O., 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251, 1–15.
- Gorbalenya, A.E., Kooning, E.V., 1988. Birnavirus RNA polymerase is related to polymerases of positive strand RNA viruses. *Nucleic Acids Res.* 16, 7735.
- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T.C., Beyer, J., Kollner, B., Mundt, E., 1997. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J. Virol.* 71, 8879–8885.
- Kibenge, F.S., Dhillon, A.S., Russell, R.G., 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1757–1775.
- Kochan, G., González, D., Rodríguez, J.F., 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Arch. Virol.* 148, 723–744.
- Leong, J.C., Brown, D., Dobos, P., Kilbenge, F.S.B., Ludert, J.E., Müller, H., Nicholson, B., 2000. Family *Birnaviridae*. In: Van Regenmortel, M.H.V., Faquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (Eds.), *Virus Taxonomy—The Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, pp. 481–490.
- Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J.R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73, 6973–6983.
- Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J.R., Pazos, F., Rodríguez, J.F., 2003. The oligomerization

- domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *J. Virol.* 77, 6438–6449.
- Martínez-Torrecuadrada, J.L., Castón, J.R., Castro, M., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., Casal, J.I., 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278, 322–331.
- Müller, H., Nitschke, R., 1987. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* 159, 174–177.
- Nicola, A.V., Chen, W., Helenius, A., 1999. Co-translational folding of an alphavirus capsid protein in the cytosol of living cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 341–345.
- Pringle, F.M., Kalkmakoff, J., Ward, V.K., 2001. Analysis of the capsid processing strategy of *Thosea asigna* virus using baculovirus expression of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 82, 259–266.
- Tacken, M.G., Rottier, P.J., Gielkens, A.L., Peeters, B.P., 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3. *J. Gen. Virol.* 81, 209–218.
- Tacken, M.G., Van Den Beuken, P.A., Peeters, B.P., Thomas, A.A., Rottier, P.J., Boot, H.J., 2003. Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins VP3, pVP2, VP4, and VP5: mapping of the interacting domains. *Virology* 312, 219–306.
- Zlotnick, A., Reddy, V.S., Dasgupta, R., Schneemann, A., Ray Jr., W.J., Rueckert, R.R., Johnson, J.E., 1994. Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue. *J. Biol. Chem.* 269, 13680–13684.

Structural Polymorphism of the Major Capsid Protein of a Double-Stranded RNA Virus: An Amphipathic α Helix as a Molecular Switch

Irene Saugar,¹ Daniel Luque,¹ Ana Oña,² José F. Rodríguez,² José L. Carrascosa,¹ Benes L. Trus,^{3,4} and José R. Castón^{1,*}

¹Department of Structure of Macromolecules

²Department of Molecular and Cellular Biology

Centro Nacional de Biotecnología/CSIC
Campus Universidad Autónoma de Madrid
28049 Madrid

Spain

³Imaging Sciences Laboratory

Center for Information Technology

⁴Laboratory of Structural Biology Research

National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and
Skin Diseases

National Institutes of Health

Department of Health and Human Services
Bethesda, Maryland 20892-5624

Summary

The infectious bursal disease virus T=13 viral particle is composed of two major proteins, VP2 and VP3. Here, we show that the molecular basis of the conformational flexibility of the major capsid protein precursor, pVP2, is an amphipathic α helix formed by the sequence GFKDIIRAIR. VP2 containing this α helix is able to assemble into the T=13 capsid only when expressed as a chimeric protein with an N-terminal His tag. An amphiphilic α helix, which acts as a conformational switch, is thus responsible for the inherent structural polymorphism of VP2. The His tag mimics the VP3 C-terminal region closely and acts as a molecular triggering factor. Using cryo-electron microscopy difference imaging, both polypeptide elements were detected on the capsid inner surface. We propose that electrostatic interactions between these two morphogenic elements are transmitted to VP2 to acquire the competent conformations for capsid assembly.

Introduction

Macromolecules and macromolecular assemblies control all fundamental processes in biology (Nogales and Grigorieff, 2001). The structural polymorphism observed in macromolecules is an intrinsic feature required for these processes. Examples of the use of dynamic conformations include muscle contraction, which requires dramatic changes in the contacts between actin and myosin (Holmes et al., 2003); protein complexes in intracellular signaling pathways, such as those of the cytokines and their receptors (Hart et al., 2002); transcription factor interactions (Muller and Tora, 2004); ribosome-mediated translation reactions (Agrawal et al., 2004); the apoptosome (Shi, 2004); and virus capsids.

The structure of viral capsids provides a paradigm in

the analysis of nonequivalent interactions among identical subunits. Structural polymorphism, together with the extensive use of symmetry, is an example of nature's efficient use of limited coding capacity (Harrison, 2001). The protein lattice of icosahedral viruses can be described by the traditional concept of quasiequivalence introduced by Caspar and Klug (1962). Icosahedral capsids are defined by their triangulation number (T). The simplest capsids are made of 60 identical subunits and are assembled into pentamers (T=1). Exceptions aside (e.g., the all-pentamer capsid of papillomaviruses and papovaviruses [Liddington et al., 1991; Rayment et al., 1982], and the all-decamer inner core of double-stranded [ds] RNA viruses [Grimes et al., 1998; Naitow et al., 2002; Reinisch et al., 2000]), those with more than 60 subunits are assembled into pentamers and hexamers and cannot have identical, but only "quasiequivalent," environments (T > 1). The T number describes the number of different environments occupied by a subunit, and the rules of quasiequivalence allow only certain values of T. In theory, quasiequivalence involves small differences in subunit interactions and conformations. In practice, for capsids analyzed to date, viruses show wide variation in this principle, and the literature describes equivalent, quasiequivalent, and nonequivalent capsids (Baker et al., 1999). High-resolution structural studies have revealed some clues as to how identical subunits adopt different conformations, although the structural basis is still poorly understood.

This study addresses the mechanisms that control conformational flexibility of the major structural protein in the icosahedral capsid of a dsRNA virus, the infectious bursal disease virus (IBDV), classified in the family *Birnaviridae*. The IBDV genome has two segments (Hudson et al., 1986). Segment A (3.2 kbp) contains two partially overlapping open reading frames (ORFs), the first of which codes for the nonstructural protein VP5 (145 residues with an M_r of 16,700), involved in virus release and dissemination (Lombardo et al., 2000). The second ORF encodes a polyprotein (1,012 residues; M_r of 109,700) that is trimmed by the viral Ser-Lys protease VP4 (Birghan et al., 2000), rendering three proteins: pVP2 (512 residues; M_r of 54,400; apparent M_r of ~48,000), VP3 (258 residues; M_r of 28,900; apparent M_r of ~32,000 kDa), and VP4 (244 residues; M_r of 26,700). Most of the pVP2 C-terminal domain is further processed at three Ala-Ala bonds, which are secondary VP4 targets (positions 487, 494, and 501) (Sánchez and Rodríguez, 1999). The resulting intermediate pVP2 is again cleaved by an unknown mechanism between residues 441 and 442, giving the mature VP2 (441 residues; M_r of 47,100; apparent M_r of ~41,000). The pVP2 maturation process requires capsid assembly (Chevalier et al., 2002), and the released C-terminal segments remain in its interior (Da Costa et al., 2002). Segment B (2.8 kbp) contains an ORF that encodes VP1 (880 residues; M_r of 97,800; apparent M_r of ~95,000), the RNA-dependent RNA polymerase (von Einem et al., 2004).

The IBDV infectious particle is a T=13 single-shelled

*Correspondence: jrcaston@cnb.uam.es

capsid (~65–70 nm diameter) (Böttcher et al., 1997). pVP2 and VP2, representing ~50% of the total protein, and VP3 (~40%) are the structural components in the virions, as shown by biochemical analysis of purified virions (Dobos et al., 1979).

Studies of the structures formed by expression of VP2 or pVP2 alone showed that VP2 forms exclusively a T=1 capsid (all-pentamer capsid), whereas pVP2 expression leads to poorly ordered tubular structures with a hexagonal lattice (Castón et al., 2001). These results suggested that the pVP2 C-terminal region plays an important role in allowing the formation of multiple VP2 conformations. In addition, VP3 must participate in the inherent ability of pVP2 to acquire different conformations through the pVP2 C-terminal end (Oña et al., 2004). We analyzed the C-terminal domain of pVP2 by generating a series of pVP2 C-terminal deletion mutants, which were also expressed with an N-terminal His tag. pVP2 C-terminal domain residues 443–453 form an amphiphilic α helix, as indicated by sequence and circular dichroism analysis. This α helix, together with the His tag, confers conformational polymorphism on VP2, and correct T=13 capsid assembly thus takes place. To determine the similarity between these T=13 virus-like particle and virion capsids, both structures were analyzed by cryo-electron microscopy (cryo-EM) and image processing techniques and compared at 15 Å resolution. The three-dimensional maps showed only minor structural differences, implying that VP3, whose function is successfully restored by the His tag, acts as a canonical scaffolding protein rather than as a permanent component of the final capsid. The finding that an amphipathic α helix acts as a molecular switch could have important implications for the assembly of viruses and other macromolecular aggregates.

Results

pVP2 C-Terminal Deletion Mutants with and without an N-Terminal His Tag

Since C-terminal processing events of pVP2 (512 residues) to VP2 (441 residues) are abolished when this protein is expressed in recombinant baculoviruses, we expressed different pVP2 constructs by varying the length of the C-terminal extension. To cover this region uniformly, we selected positions 456, 466, 476, 487, 494, and 501 (Figure 1A). Western blot analysis of these pVP2/VP2 variants showed that all pVP2 C-terminal deletion mutants were correctly expressed, rendering a major band (Figure S1; see the Supplemental Data available with this article online). We also generated the same series of pVP2/VP2 variants fused to an N-terminal His tag (HT-VP2). The molecular masses of the pVP2/VP2 variants generated are shown in Table S1.

pVP2/VP2 variants were expressed at high levels and were purified on a sucrose cushion, followed by a linear sucrose gradient. Gradient fractions were characterized by SDS-PAGE. Coomassie blue staining of SDS-PAGE gels showed that fractions containing the different pVP2 variants banded in a broad density range (Figures 1B and 1C). For comparative purposes, resulting assemblies from IBDV-infected cells were purified by following the same strategy (Figure 1D). Whereas

pVP2 variants lacking the His tag produced heterogeneous assemblies (Figure 1B), His-tagged pVP2/VP2 proteins assembled into particulate material of increasing size with increasing length of the C-terminal domain (Figure 1C).

Electron Microscopy Analysis of pVP2/VP2 Assemblies

Analysis of the sucrose gradient fractions negatively stained by EM showed different morphologies depending on the length of the pVP2 C-terminal domain and the presence/absence of the His tag (Figures 2 and 3).

VP2-441 (Figure 2A) and VP2-456 (Figure 2B) produced doughnut-shaped assemblies, ~23 nm in diameter, which corresponded to dodecahedral capsids with a T=1 shell (Castón et al., 2001). Depending on which assembly VP2-466 formed, this variant was located throughout the sucrose gradient. Bottom fractions contained ~25 nm diameter thin tubes (Figure 2C), regularly ordered with a helical pattern (Figure 2C, inset). Middle fractions showed shorter, thin tubules and T=1 capsid-like structures surrounded by punctuate material, probably indicating the unstable nature of these assemblies (Figure 2D). T=13 capsid-like structures were also observed occasionally (Figure 2D, inset). The predominant structures at the top of the gradient were small isometric particles (Figure 2E). VP2-476 behaved similarly to VP2-466. Most VP2-501 migrated to the bottom-half fractions and was assembled into ~35 nm diameter partially ordered tubes (Figure 2F). In the top half of the gradient, VP2-501 was assembled as twisted tubular structures and a few isometric, irregularly sized particles (not shown). Finally, VP2-512 was found as short, curled tubules and irregular particles.

In IBDV-infected cells, most of the purified structures were located at the middle of the gradient and corresponded to 65–70 nm diameter icosahedral particles (Figure 2H). Near the bottom of the gradient, however, we found tubular structures with a hexagonal arrangement, the so-called type I tubes (Figure 2G).

Together, these results suggested that VP2-466 contains sufficient information for hexamer (thin tube) and pentamer (T=1 capsid) formation and thus for potential T=13 capsid assembly.

Electron Microscopy Analysis of (His-) pVP2/VP2 Assemblies

His-tagged pVP2/VP2 assemblies were analyzed in a similar manner. In HT-VP2-441-enriched fractions, we observed ~23 nm diameter particles (Figure 3A). Strikingly, HT-VP2-456 was able to assemble into structures morphologically similar to true T=13 infectious capsids (compare Figure 3B and Figure 2H), which banded at the middle of the gradient. Nonetheless, most HT-VP2-456 was located at the top of the gradient as T=1 capsids. The tendency to form good capsids was further improved with the HT-VP2-466 protein (Figure 3C). T=13 capsid-like particles were more abundant and, as they were obtained at high efficiency, were selected for higher-resolution structural studies. Intermediate size ~53 nm diameter capsid-like structures were easily distinguished among T=13 capsids (Figure 3B and C, arrows).

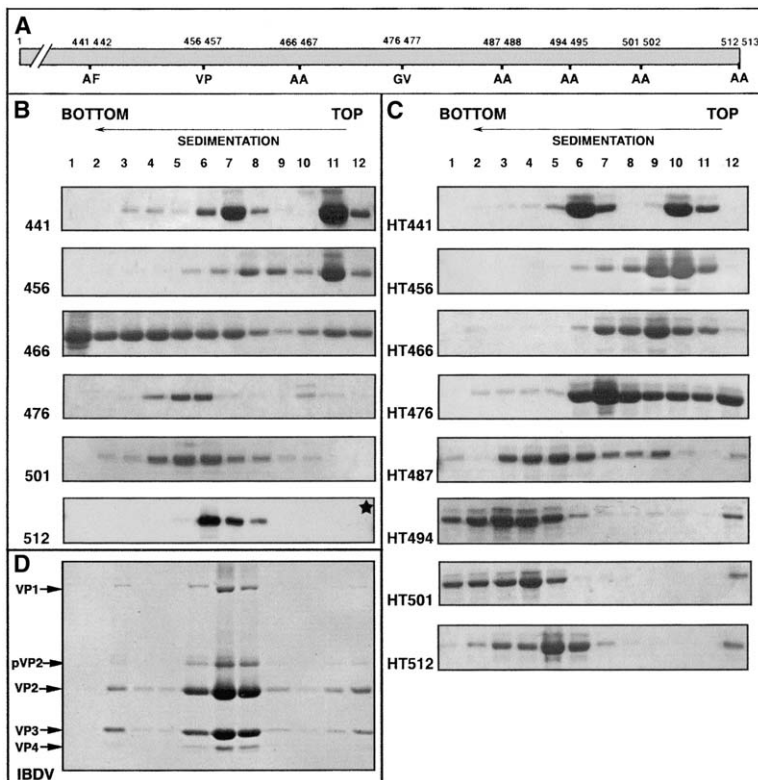


Figure 1. Coomassie-Stained SDS-PAGE Analysis of pVP2 and His-Tagged pVP2 Mutant Proteins

(A) Scheme of the pVP2 C-terminal region, indicating the positions and sequences selected for generation of deletion mutants. His-tagged mutant versions were also generated.

(B and C) (B) Untagged and (C) tagged pVP2 mutants were expressed at high levels (Experimental Procedures), purified by two-step centrifugation; 12 fractions were collected and were concentrated 20-fold, and 1–10 μ l of each fraction was loaded (0.1 μ l for pVP2 tagged mutants), analyzed by SDS-PAGE, and developed by Coomassie staining. The star denotes that the gel was analyzed by Western blot with anti-VP2 antibodies (VP2-512). Mutants VP2-487 and VP2-494 did not assemble structures sufficiently stable to resist purification conditions, as they did not pellet through the initial sucrose cushion (not shown).

(D) A typical profile of IBDV proteins from IBDV-infected cells. The direction of sedimentation was right to left, with fraction 12 representing the top of each gradient.

HT-VP2-476 (Figures 3D–3F) and HT-VP2-487 proteins retained the ability to assemble into viral capsid-like structures, albeit with lower efficiency; the predominant structures were hexagonal tubes of varying lengths (Figure 3D). Finally, HT-VP2-494, HT-VP2-501, and HT-VP2-512 proteins formed only tubular structures with apparent hexagonal ordering.

The N-terminal His tag of different pVP2/VP2 proteins did not affect subunit assembly into regular particles. His-tagged VP2-456 allowed correct assembly of T=13 capsid-like structures in the absence of VP3 protein, the other major structural component of the capsid.

Circular Dichroism Analysis of pVP2 C-Terminal Domain Residues 443–452

The secondary structure of the peptide GFKDIIRAIR, representing residues 443–452 of the pVP2 C-terminal domain, was predicted by using the Agadir program (Muñoz and Serrano, 1994). The program detected a marked helical propensity in the peptide (Figure 8B, left). To test this prediction, a synthetic peptide of residues 442–454 was synthesized, and its average secondary structure was measured by circular dichroism (CD). In aqueous buffer, the peptide had negligible helical structure and adopted a random coil conformation. Addition of the helix-inducing cosolvent trifluoroethanol (TFE) (Nelson and Kallenbach, 1986) nonetheless resulted in the appearance of a clear helical component (Figure S2). To ascertain whether similar peptides are found in known structures, we scanned the PDB database with WHATIF (<http://www.cmbi.kun.nl/gv/whatif>) (Vriend, 1990) and found such a peptide in residues

241–250 of the *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase (*LmTIM*) (Williams et al., 1999). When its sequence, EFRDIIDATR, was compared with the ten pVP2 residues, their amphipathic character was nearly identical: there is a conservative replacement (R for K); a substitution of D for R, changing the polarity but maintaining a charged side chain; and a replacement of T for I.

Structure of the IBDV Capsid

A cryo-electron micrograph of IBDV particles shows clear peripheral serrations (Figure 4A). The final density map of the T=13 capsid was calculated to 12 Å resolution. The molecular architecture of the capsid, in which the most outstanding feature is the presence of 260 protruding VP2 trimers on the outer surface arranged in five distinct conformations (Figure 4B, a–e), is essentially as described by Böttcher et al. (1997) and Castón et al. (2001). On the inner surface, there are 200 inwardly protruding, Y-shaped trimeric structures. The significant improvement in resolution allowed us to identify a number of fine structural details with more precision, particularly at the 5-fold axis on the inner shell. Thus, the 60 absent inner trimers, 5 per pentamer, are replaced by 2 annular rims. Whereas the outermost rim is formed by ten intimately connected globular densities, the innermost rim is formed of five blobs, as predicted (see also Figure 7). Another relevant feature concerns the porous appearance of the capsid wall. These pores (616 in total) are ~15 Å in diameter and are exactly situated below density connections, called con-

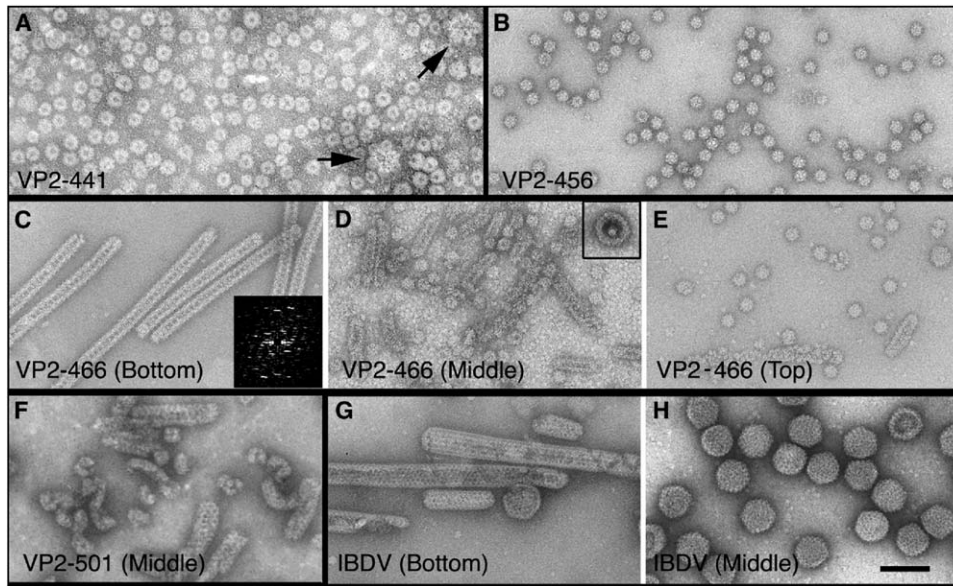


Figure 2. Electron Microscopy of pVP2 C-Terminal Deletion Mutant Assemblies

(A and B) (A) VP2-441 and (B) VP2-456 only form T=1 capsid-like particles, although a few remained associated in larger, unstable structures formed by 12 dodecahedral particles (arrows in [A]).

(C–E) VP2-466 forms different assemblies: (C) tubular structures with hexagonal ordering as deduced from its Fourier transforms (inset) at the lower fractions, (D) T=1 capsid-like particles, broken thin tubes and dissociated material as the predominant structures, but occasionally T=13 capsid-like particles (inset) at the middle fractions, and (E) T=1-like particles at the upper fractions.

(F) VP2-501 assembles mostly to tubular structures with different structural integrity (assemblies from a middle fraction are shown).

(G and H) Most assemblies from IBDV-infected cells are T=13 capsids at (H) middle fractions, although, at the (G) lower fractions, tubular structures are also observed at longer infection times. The scale bar represents 100 nm.

necting arms, between adjacent trimers on the outer surface.

Structure of the His-VP2-466 Capsid

Cryo-EM analysis of selected fractions enriched in virus-like particles showed that HT-VP2-466 capsids

were a rather complex mixture of different, related assemblies (Figure 5A). These capsids ranged from ~65 nm (similar to T=13 IBDV capsids) to ~53 nm in diameter; there was also a variety of smaller isometric assemblies. All of these structures showed the same typical serrations in the periphery. The 3DR of larger HT-VP2-

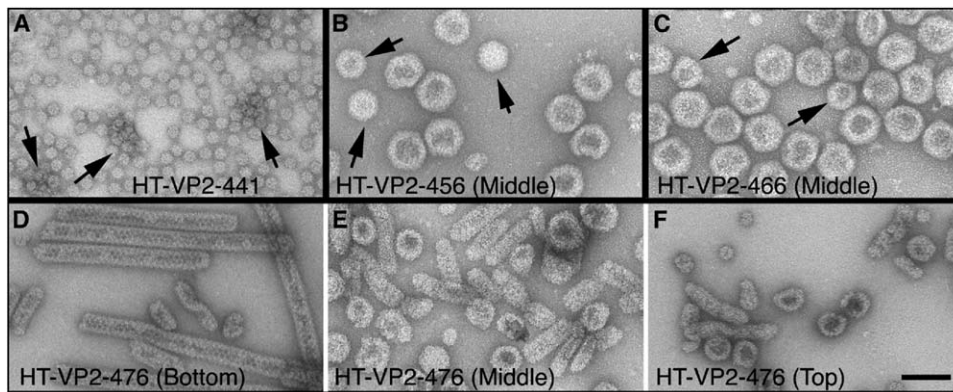


Figure 3. Electron Microscopy of His-Tagged pVP2 C-Terminal Deletion Mutant Assemblies

Concentrated fractions were diluted (1/50) for an optimum view of resulting assemblies.

(A) HT-VP2-441 assemblies: T=1 capsid-like structures and larger dodecahedral assemblies (arrows).

(B) HT-VP2-456 assemblies: T=13 and T=7 (arrows) capsid-like particles at the middle fractions.

(C) HT-VP2-466 assemblies: T=13 and T=7 (arrows) capsid-like particles at the middle fractions.

(D–F) HT-VP2-476 assemblies: type I tube-like structures at the (D) lower fractions; T=13 and T=7 capsid-like particles and pieces of tubular assemblies at the (E) middle fractions; and irregular assemblies at the (F) upper fractions. The scale bar represents 100 nm.

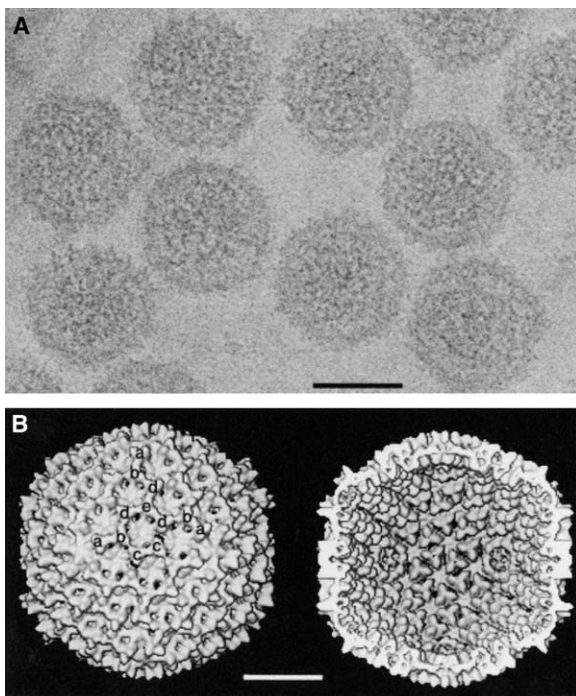


Figure 4. Three-Dimensional Structure of the IBDV Capsid
(A) Cryo-electron micrograph of IBDV capsids. The scale bar represents 50 nm.
(B) Surface-shaded representations of the outer (left) and inner (right) surface of the IBDV capsid viewed along a 2-fold axis of icosahedral symmetry. The surface-shaded map was contoured assuming the presence of 780 molecules of VP2-441 and a value of 0.73 cm³/g as the partial specific volume of protein. To observe with clarity the pores in the shell, only the front hemisphere of the map is shown. The five types of trimeric capsomers are indicated by letters a–e. The scale bar represents 200 Å.

466 capsids was determined at 15 Å resolution (Figure 5B, left and center). The outer surfaces of the IBDV and HT-VP2-466 capsids are almost superimposable, whereas the inner surfaces showed apparent differences. The main structural distinction is related to the local 6-fold and 5-fold axis, where an extra density that connects Y-shaped trimeric structures is observed in the HT-VP2-466 capsid, unlike in the IBDV capsid.

The density map of intermediate size HT-VP2-466 capsids showed a T=7 lattice (Figure 5B, right), which was based on equivalent trimeric capsomers such as T=13 capsids, except for the requirement for only three different classes of triangular capsomers (denoted a', b' and c'). T=13 and T=7 capsids share the same fundamental HT-VP2-466 trimer block in the icosahedral lattice.

Structural and Biochemical Comparison of IBDV and HT-VP2-466 Capsids

Structural similarity was also found between IBDV and HT-VP2-466 capsids in their radial density profiles (Figure 6A) and transverse central sections (Figures 6C and 6D), which were practically superimposable. Two minor differences were noted at the protein shell (radius

~253–350 Å) (Figure 6A, arrows). A peak of extra density is observed for the IBDV capsid, located mostly in a 325–345 Å radius, and another extra density for the HT-VP2-466 capsid on the inner surface (in a 268–285 Å radius). To locate these differences more precisely, we calculated difference maps by arithmetic subtraction of the density values within the protein shell in both structures. By alternating the order of subtraction of the two maps, the resulting difference maps showed only those structural features that could be attributed to each structure, denoted in red on the outer IBDV capsid surface (Figure 6E) and on the inner HT-VP2-466 capsid surface (Figure 6F). The location of the structural differences on the outer IBDV capsid surface suggests that the regions of greatest difference are found at the connecting arms between adjacent VP2 trimers. The structural differences along the inner surface are located mainly at the local 6-fold and 5-fold axis, precisely where the extra inner densities of HT-VP2-466 capsid are located.

Coomassie blue staining of SDS-PAGE gels showed that the virus particle-enriched fractions consisted of pVP2/VP2 and VP3 as the major components (Figure 6B), accounting for ~90% (% weight) of the total protein. Equivalent analysis of fractions used to obtain cryo-EM data for HT-VP2-466 capsids showed that they consisted of a single ~54 kDa polypeptide, as predicted. As minor differences at the protein shell level cannot account for the VP3 content difference, these observations implied that both capsids are built of a single protein, VP2, or its His-tagged derivative variant, for IBDV and HT-VP2-466 capsids, respectively, and that VP3 is not incorporated as an integral component into the IBDV shell.

Quasiequivalence Analysis in a T=13 Capsid

A new scenario must be considered for the IBDV capsid, as it should be considered a quasiequivalent capsid. To test this hypothesis, aligned maps of IBDV and HT-VP2-466 capsids were compared on icosahedral sections to assess their equivalent features conveniently (Figure 7). The outermost sections (328–311 Å) showed that trimeric units are essentially identical (Figures 7A–7C). Further in (302–294 Å), the continuous shell is evident, and minor differences can be appreciated (Figures 7D and 7E). At a 286 Å radius, the sections corresponding to the starting inner surface of both T=13 capsids showed that the 260 external trimeric units have clear continuity with another 260 internal trimeric units, including those around the 5-fold axis (Figure 7F). The pentameric trimers are packed more tightly against one another than the hexameric trimers and become fused at a 277 Å radius, where extra densities at local 6-fold axes of the HT-VP2-466 capsid are visible (Figure 7G). At 269 Å radius, local 6-fold axis densities are conspicuous elements (Figure 7H).

Discussion

We analyzed the conformational polymorphism of the IBDV major coat protein VP2. VP2 is initially synthesized as a 512 residue precursor, pVP2, which undergoes a variety of defined C-terminal processing

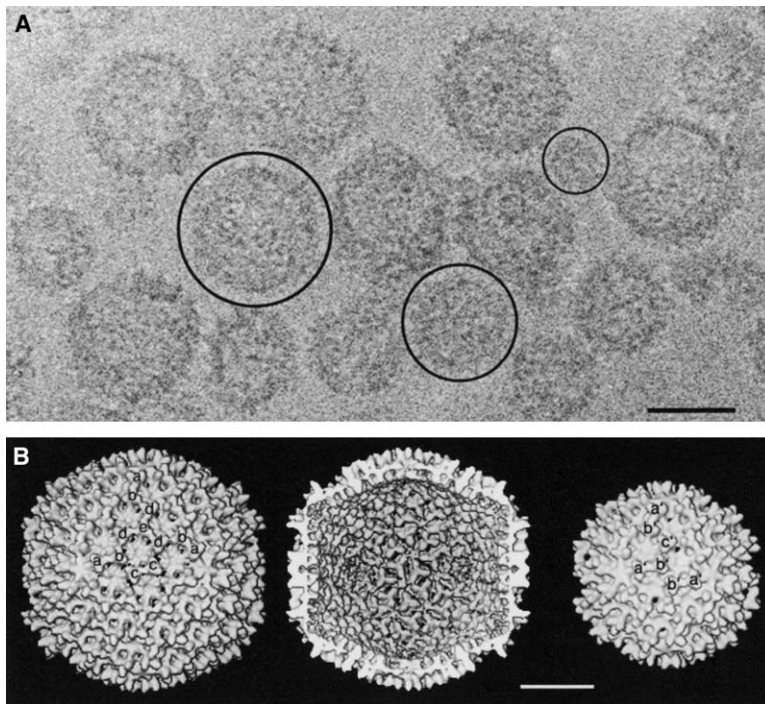


Figure 5. Three-Dimensional Structure of HT-VP2-466 Capsids

(A) Cryo-electron micrograph of HT-VP2-466 assemblies (fraction 7). Circles enclose the three clearly discernible icosahedral assemblies with a T=13, T=7, and, probably, T=1 shell. The scale bar represents 50 nm.

(B) Three-dimensional structure of HT-VP2-466 T=13 (left and middle) and T=7 (right) capsids. These density maps were contoured to enclose a volume for 780 (T=13 shell) or 420 molecules (T=7 shell) of HT-VP2-466. Classes of HT-VP2-466 trimers are indicated. The scale bar represents 200 Å.

events to render the mature VP2 (441 residues). Most mutants expressed in our baculovirus system could thus correspond to naturally occurring intermediates during virus assembly. The molecular switch controlling VP2 polymorphism resides in this temporally bound, 71 residue C-terminal sequence, which is removed when its function has been completed. In the absence of VP3, efficient T=13 capsid-like assembly nonetheless required the presence of a His tag at the VP2 N terminus, indicating that the His tag mimics VP3 function during virion assembly. Assembly control of the complex IBDV T=13 capsid thus requires the interaction of two separate polypeptide elements that can be disengaged in our system. A scheme summarizing our results for VP2 C-terminal deletion mutants with and without the His tag is shown in Figure 8A.

Structure of the Molecular Switch

Structural studies have provided some clues as to how a capsid protein determines the conformation that it must adopt (Abrescia et al., 2004), although the underlying mechanism is not yet fully understood. The distinct conformational states may be controlled by flexible regions in the protein (loops, N and C termini), double-stranded or single-stranded RNA, metal ions, pH, or combinations of these (Johnson, 1996). These factors, referred to as molecular switches, may be insufficient, especially when large T number capsids are considered, and would require one or more auxiliary proteins that would act as molecular effectors (scaffold, minor capsid, or enzymatic proteins) (Dokland, 2000).

Our results indicate that the VP2 molecular switch is located in the temporally bound 443-GFKDIIRAIR-452 segment that is organized as an amphipathic α helix. The HT-VP2-456 mutant represents the abrupt frontier

between the single and multiple conformations that VP2 can display. If assembly subunits are shorter, as is the case with HT-VP2-441, only all-pentamer structures (T=1 capsids) are formed, whereas, if assembly subunits include residues 443–452, both T=13 and T=1 capsids can be formed.

The pVP2 443–452 sequence is nearly identical to an *Lm*TIM amphipathic α helix, whose hydrophobic side is buried, while leaving surface-exposed hydrophilic side chains. The hydrophilic side of residues 443–452 is constituted of basic residues, although the same restrictions apply for the hydrophobic side of the VP2 peptide (Figure 8B). Accordingly, this side would be buried by interaction with other VP2 region(s), although interaction with other protein(s) cannot be excluded by the available data.

Molecular Switch and Triggering Factors

Since VP2-456 cannot, and VP2-466 can only rarely, assemble into T=13 shells, the presence of an amphipathic α helix morphogenetic element is insufficient to support polymorphism. The presence of a His tag in different pVP2 variants is nonetheless essential for production of genuine virus-like structures. We compared His tag and VP3 sequences to attempt to deduce why the His tag partially emulates VP3 function during morphogenesis. The last five residues in the VP3 C terminus aligned with the similar His tag region (Figure 8B, right). There are no other similar segments in the VP3 sequence, confirming its importance and uniqueness. As charge complementarity with the proposed α helix is evident, this alignment tempts us to suggest that electrostatic interactions may be the initial event in the adoption of different conformational states. Both acid segments in the His tag and the VP3 C-terminal resi-

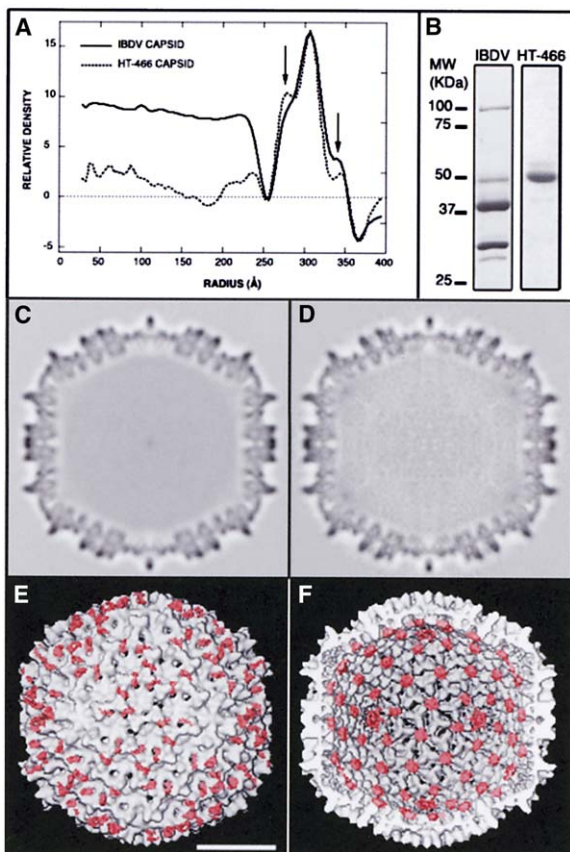


Figure 6. Structural Comparison of IBDV and HT-VP2-466 Capsids (A) Radial density profiles from 3DR of IBDV (continuous line) and HT-VP2-466 (dotted line) T=13 capsids computed both at 15 Å resolution. Protein shells ($r = 253\text{--}350$ Å) are almost superimposable, except for minor differences (arrows). (B) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gels of purified IBDV and HT-VP2-466 T=13 capsids used for cryo-EM data acquisition. pVP2/VP2 and VP3 were quantified from similar gels. (C and D) Transverse central sections taken from the 3DRs of (C) IBDV and (D) HT-VP2-466 capsids. Protein and RNA are dark. (E) Difference map calculated by subtracting HT-VP2-466 from IBDV capsid. The resulting difference map is represented in red on the outer surface of an IBDV capsid viewed along an icosahedral 2-fold axis. (F) Difference map calculated by subtracting IBDV from HT-VP2-466 capsid. The resulting difference map, showed as 132 bigger blobs, is shown in red on the inner surface of a HT-VP2-466 capsid viewed along an icosahedral 2-fold axis. Each of these density islands, using $0.73\text{ cm}^3/\text{g}$ as the partial specific volume of protein, corresponds to ~ 26 kDa. On the other hand, the mass of 5–6 copies of 442–466 (~ 2.6 kDa) and His tag (~ 3.4 kDa) segments ranges from ~ 31 to 37 kDa each. The scale bar represents 200 Å.

dues are preceded by a basic segment that may have an additional function. We postulate that this electrostatic interaction is transmitted to the rest of VP2, inducing the correct conformational change. Such changes have been described at atomic detail for allosteric regulation of integrins, which transmit conformational change after activation by ligand binding (Xiao et al., 2004). In several cases, the His tag was shown to be a long loop or to form part of an α helix, thereby inducing artifactual symmetric aggregates due to specific interaction with

other regions of the protein under study (Ferrer-Orta et al., 2004; McCarthy et al., 2004). The presence of numerous charged and polar residues in the His tag used here may justify both the tendency to interact with other regions and its random coil structure. We are currently focused on modifications of the His tag and the proposed counterpart to obtain new VP2 chimeric proteins able to successfully organize into a T=13 shell with higher efficiency.

Previous observations suggested that the acid segment of the VP3 C-terminal region is essential for correct capsid assembly. Thus, VP3 mutants with altered or deleted C-terminal residues (Chevalier et al., 2004), or entirely lacking the last 13 residues (Maraver et al., 2003b), fail to assemble into T=13 capsids, and hexagonal tubular or aberrant assemblies are formed.

Virion Capsid Structure: A New Scenario

Structural comparison of IBDV and HT-VP2-466 capsids has been crucial to unambiguously determine their basic structural similarity and to assign structural features with biochemical components. Structural differences between these capsids, as shown by their radial density profiles, are small and do not account for the amount of VP3 in total virion composition. VP3 would remain trapped, together with the genomic complement, in the interior volume of the virion capsid. In virus assembly, and considering its temporal participation during capsid morphogenesis, VP3 acts as a canonical scaffolding protein (Dokland, 1999). VP3 has additional functions, including VP1 (Lombardo et al., 1999) and RNA binding activity (Kochan et al., 2003). It is nonetheless intriguing that VP3 stoichiometry inside the virion remains constant at ~ 600 copies, in our purifications and in those of others (Dobos et al., 1979). A plausible reason may be its temporal stabilizing role, carried out by a nonicosahedral but regular scaffold structure (Zandi et al., 2004; Zlotnick, 2004), to maintain an unstable capsid made up of 780 (p)VP2 copies, i.e., a pro-capsid-like assembly.

Minor differences between IBDV and HT-VP2-466 capsids are found at their outermost and inner surfaces. Outermost surface differences, located mainly in the connectivity densities between adjacent protuberant VP2 trimers, are probably spurious (they are small and homogeneous). On the other hand, the peak of additional density observed in the interior of the HT-VP2-466 capsid (radius $\sim 268\text{--}285$ Å) is much larger and is distributed along the local 6-fold and 5-fold axes. We interpret the inner differences as a direct visualization of bundles of α helices. This interpretation is supported by measurements of volume difference, which is distributed into 12 pentameric and 120 hexameric larger densities and numerous spurious blobs (see Figure 6 legend).

Finally, our observations imply that the IBDV capsid is a fully quasiequivalent shell built of a single protein, VP2. A number of T=13 capsids have been described for different dsRNA viruses. In the case of the Bluetongue virus capsid, the inner T=2 layer was shown to have a scaffolding role, directing and maintaining assembly of the T=13 layer (Grimes et al., 1998). To our knowledge, the IBDV capsid and the virus-like HT-VP2-

Characterization and Purification of pVP2 Deletion Mutant Protein-Derived Structures

H5 cells ($2-5 \times 10^8$ cells) were infected with appropriate rBV (m.o.i. 1–5 PFU/cell). At 48 hr postinfection, infected cells were harvested, lysed in PES buffer plus 1% IGEPAL CA-630 (Sigma) on ice, and processed on a 20% sucrose cushion and a linear 20%–50% sucrose gradient. The particulate material containing pVP2 deletion mutant proteins of sucrose gradient fractions were concentrated 20-fold by ultracentrifugation and were used for SDS-PAGE, Western blot, and EM analyses. Enriched fractions consisting of T=13 capsids were selected for structural studies and were used within 1–2 days of purification.

SDS-PAGE and Western Blot Analysis

Infected cell extracts (10–15 μ l) or concentrated sucrose gradient fractions (2–5 μ l) were added to Laemmli sample buffer to a 1 \times final concentration and were heated (100°C, 2 min). Electrophoresis was performed in 11% polyacrylamide gels (stock formulation containing 38.96% [w/v] acrylamide and 1.04% [w/v] methylene bis acrylamide). Western blot analyses were carried out by using anti-VP2 serum as described (Lombardo et al., 1999). Rabbit anti-VP3 serum was used as an internal negative control. Anti-His tag was provided by Sigma.

Conventional Electron Microscopy Analysis

A 2–5 μ l sample of each concentrated sucrose gradient fraction was negatively stained with 2% aqueous uranyl acetate. Micrographs were recorded with a JEOL 1200 EXII electron microscope operating at 100 kV at a nominal magnification of 40,000 \times .

Cryo-Electron Microscopy

Samples (5 μ l drops) of fractions containing virions or HT-466 capsids were applied to one side of a holey carbon film, washed twice on water drops, blotted, and plunged into a liquid ethane bath following standard procedures (Castón et al., 2001). Micrographs were recorded under minimal exposure conditions so that the imaged specimens received exposures of 6–10 e^-/nm^2 at nominal magnification of 50,000 \times on a Tecnai G2 electron microscope operating at 200 kV and equipped with a field emission gun. Bacteriophage T4 was vitrified, and the 40.5 Å axial spacing of its tail sheath was used as an internal magnification standard.

Circular Dichroism Spectroscopy

The peptide FGFKDIIRAIRRI was chemically synthesized, and its far UV CD spectra was recorded in a Jasco J-720 dichrograph, by using 0.1 and 1 mm cells at 25°C. Each spectrum is the accumulation of three scans. The peptide concentrations used were comprised of between 10 and 200 μ M. The CD spectra were analyzed as described (Jiménez et al., 1999) (Figure S2).

Image Analysis

General image processing operations were performed by using PIC Software (Trus et al., 1996). Micrographs were assessed for resolution and astigmatism by computer Fourier analysis, and defocus values were estimated from the positions of the first zero of the contrast transfer function (ctf). For selected micrographs analyzed (81 for IBDV particles, and 82 for HT-466 capsids), defocus values, determined with the Bsoft package (Heymann, 2001), ranged from 0.6 to 3.7 μ m (first ctf zeros at spacings of 12–30 Å, respectively). Suitable micrographs were scanned with a Zeiss PhotoScan TD scanner at 7 μ m/pixel and were binned to give 21 μ m pixels (4.2 Å at the specimen). Particle images were extracted and preprocessed with X3dp (Conway et al., 1993). Initial estimates of orientation angles were obtained for a base set of particles by the Polar Fourier Transform (PFT) algorithm (Baker and Cheng, 1996), taking as a starting model the IBDV 3DR, appropriately scaled, at 28 Å resolution (Castón et al., 2001). A new density map was calculated and was used for all subsequent orientation and origin refinements, by using a modified version of the PFT algorithm altered to use both phase and amplitude information (D.M. Belnap et al., personal communication). Phases were ctf corrected by simply flipping the phases in the required lobes of the ctf. No amplitude corrections were applied. Reconstructions were calculated by using Fourier-

Bessel techniques (Crowther, 1971). The final reconstructions combined 10,849 and 1,557 images for IBDV and HT-466 capsids and achieved resolutions by the Fourier shell correlation (FSC) criterion (0.5 threshold) of 12 and 15 Å, respectively. Another reconstruction for smaller HT-466 capsids was calculated from the same set of micrographs. The resolution of the final reconstruction, containing 108 particles, was estimated to be \sim 23 Å, as assessed by Fourier ring correlation analysis (Conway et al., 1993).

Spherically averaged radial density profiles were calculated for both T=13 maps and were normalized and scaled to match the fit between both profiles. Difference maps were then obtained by subtraction and changing the order of the two maps. For surface rendering of the resulting difference maps (shown in red in Figures 8E and 8F), small islands of density were filtered out, considering only the major differences at radii corresponding to the protein shell.

Supplemental Data

Supplemental Data including two figures and two tables are available at <http://www.structure.org/cgi/content/full/13/7/1007/DC1>.

Acknowledgments

We are pleased to acknowledge Drs. T. Baker, D. Belnap, J. Conway, J.B. Heymann, and A.C. Steven for sharing their reconstruction software, their programming assistance, and their continuous encouragement and support; J.M. Andreu for assistance in CD spectroscopy experiments; F. Pazos for pVP2 peptide structure prediction; and C. Mark for editorial assistance. This work was supported by grants 07B/0041/2002 from the Subdirección General de Investigación de the Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) and BMC 2002-00996 from the Dirección General de Investigación of the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). I.S. is a postdoctoral fellow from CAM, and J.R.C. holds a contract from the “Ramón y Cajal” program (MEC).

Received: December 21, 2004

Revised: April 5, 2005

Accepted: April 5, 2005

Published: July 12, 2005

References

- Abrescia, N.G., Cockburn, J.J., Grimes, J.M., Sutton, G.C., Diprose, J.M., Butcher, S.J., Fuller, S.D., San Martin, C., Burnett, R.M., Stuart, D.I., et al. (2004). Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1. *Nature* 432, 68–74.
- Agrawal, R.K., Sharma, M.R., Kiel, M.C., Hirokawa, G., Booth, T.M., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Kaji, A., and Frank, J. (2004). Visualization of ribosome-recycling factor on the *Escherichia coli* 70S ribosome: functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8900–8905.
- Baker, T.S., and Cheng, R.H. (1996). A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J. Struct. Biol.* 116, 120–130.
- Baker, T.S., Olson, N.H., and Fuller, S.D. (1999). Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 862–922.
- Birghan, C., Mundt, E., and Gorbalenya, A.E. (2000). A non-canonical ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* 19, 114–123.
- Böttcher, B., Kiselev, N.A., Stel'Mashchuk, V.Y., Borisov, A.V., and Crowther, R.A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71, 325–330.
- Caspar, D.L.D., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 1–24.

- Castón, J.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J.F., Casal, J.I., and Carrascosa, J.L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* **75**, 10815–10828.
- Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B., and Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* **76**, 2384–2392.
- Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B., and Delmas, B. (2004). The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* **78**, 3296–3303.
- Conway, J.F., Trus, B.L., Booy, F.P., Newcomb, W.W., Brown, J.C., and Steven, A.C. (1993). The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J. Struct. Biol.* **111**, 222–233.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B., and Rey, F.A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* **120**, 761–772.
- Crowther, R.A. (1971). Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **261**, 221–230.
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J.C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H., and Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* **76**, 2393–2402.
- Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T., Becht, H., and Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* **32**, 593–605.
- Dokland, T. (1999). Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 580–603.
- Dokland, T. (2000). Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Struct. Fold. Des.* **8**, R157–R162.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguier, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 47212–47221.
- Grimes, J.M., Burroughs, J.N., Gouet, P., Diprose, J.M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P.P., and Stuart, D.I. (1998). The atomic structure of the Bluetongue virus core. *Nature* **395**, 470–478.
- Harrison, S.C. (2001). Principles of virus structure. In *Fields Virology*, S.E. Strauss, ed. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 53–85.
- Hart, P.J., Deep, S., Taylor, A.B., Shu, Z., Hinck, C.S., and Hinck, A.P. (2002). Crystal structure of the human TbetR2 ectodomain-TGF-beta3 complex. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 203–208.
- Heymann, J.B. (2001). Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **133**, 156–169.
- Holmes, K.C., Angert, I., Kull, F.J., Jahn, W., and Schroder, R.R. (2003). Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**, 423–427.
- Hudson, P.J., McKern, N.M., Fahey, K.J., and Azad, A.A. (1986). Predicted sequence of the host-protective immunogen of infectious bursal disease virus. *FEBS Lett.* **201**, 143–146.
- Jiménez, M.A., Evangelio, J.A., Aranda, C., López-Brauet, A., Andreu, D., Rico, M., Lagos, R., Andreu, J.M., and Monasterio, O. (1999). Helicity of alpha(404–451) and beta(394–445) tubulin C-terminal recombinant peptides. *Protein Sci.* **8**, 788–799.
- Johnson, J.E. (1996). Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 27–33.
- Kochan, G., González, D., and Rodríguez, J.F. (2003). Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* **148**, 723–744.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., and Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8 Å resolution. *Nature* **354**, 278–284.
- Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J.R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., and Rodríguez, J.F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* **73**, 6973–6983.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernández-Arias, A., and Rodríguez, J.F. (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* **277**, 345–357.
- Maraver, A., Clemente, R., Rodríguez, J.F., and Lombardo, E. (2003a). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.* **77**, 2459–2468.
- Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J.A., Castón, J.R., Pazos, F., and Rodríguez, J.F. (2003b). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* **77**, 6438–6449.
- McCarthy, A.A., Peterson, N.A., Knijff, R., and Baker, E.N. (2004). Crystal structure of MshB from *Mycobacterium tuberculosis*, a deacetylase involved in mycothiol biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **335**, 1131–1141.
- Muller, F., and Tora, L. (2004). The multicoloured world of promoter recognition complexes. *EMBO J.* **23**, 2–8.
- Muñoz, V., and Serrano, L. (1994). Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 399–409.
- Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R.B., and Johnson, J.E. (2002). L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 725–728.
- Nelson, J.W., and Kallenbach, N.R. (1986). Stabilization of the ribonuclease S-peptide alpha-helix by trifluoroethanol. *Proteins* **1**, 211–217.
- Nogales, E., and Grigorieff, N. (2001). Molecular machines: putting the pieces together. *J. Cell Biol.* **152**, F1–10.
- Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Castón, J.R., and Rodríguez, J.F. (2004). The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* **322**, 135–142.
- Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L., and Murakami, W.T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* **295**, 110–115.
- Reinisch, K.M., Nibert, M.L., and Harrison, S.C. (2000). Structure of the Reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* **404**, 960–967.
- Sánchez, A.B., and Rodríguez, J.F. (1999). Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* **262**, 190–199.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117**, 855–858.
- Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., and Steven, A.C. (1996). Digital image processing of electron micrographs: the PIC system-III. *J. Struct. Biol.* **116**, 61–67.
- von Einem, U.I., Gorbalenya, A.E., Schirmeier, H., Behrens, S.E., Letzel, T., and Mundt, E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **85**, 2221–2229.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52–56.
- Williams, J.C., Zeelen, J.P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P.A., Lambeir, A.M., and Wierenga, R.K. (1999). Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* **12**, 243–250.

Xiao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J.H., and Springer, T.A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* *432*, 59–67.

Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R.F., Gelbart, W.M., and Rudnick, J. (2004). Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 15556–15560.

Zlotnick, A. (2004). Viruses and the physics of soft condensed matter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 15549–15550.

Accession Numbers

The maps of the T=13 IBDV and HT-VP2-466 particles have been deposited in the EMBL-EBI Macromolecular Structure Database under accession codes EMD-1115 and EMD-1118, respectively.

Note Added in Proof

During revision of this manuscript, the atomic structures of T=1 VP2-441 and T=13 IBDV capsids, at 3 and 7 Å resolution, respectively, were published (Coulibaly et al., 2005). These authors reported that the absolute hand of the IBDV surface lattice is *laevo*.

Three-dimensional structure and stoichiometry of *Helminthosporium victoriae* 190S totivirus

José R. Castón^{a,*}, Daniel Luque^a, Benes L. Trus^{b,c}, Germán Rivas^d, Carlos Alfonso^d, José M. González^a, José L. Carrascosa^a, Padmanaban Annamalai^e, Said A. Ghabrial^e

^a Department of Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Darwin no 3, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

^b Imaging Sciences Laboratory, CIT, NIAMS, NIH, DHHS, Bethesda, MD 20892-5624, USA

^c Laboratory of Structural Biology Research, NIAMS, NIH, DHHS, Bethesda, MD 20892-5624, USA

^d Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28006 Madrid, Spain

^e Department of Plant Pathology, University of Kentucky, Lexington, KY 40546, USA

Received 9 August 2005; returned to author for revision 28 September 2005; accepted 22 November 2005
Available online 18 January 2006

Abstract

Most double-stranded RNA viruses have a characteristic capsid consisting of 60 asymmetric coat protein dimers in a so-called T = 2 organization, a feature probably related to their unique life cycle. These capsids organize the replicative complex(es) that is actively involved in genome transcription and replication. Available structural data indicate that their RNA-dependent RNA polymerase (RDRP) is packaged as an integral capsid component, either as a replicative complex at the pentameric vertex (as in reovirus capsids) or as a fusion protein with the coat protein (as in some totivirus). In contrast with members of the family Reoviridae, there are two well-established capsid arrangements for dsRNA fungal viruses, exemplified by the totiviruses L-A and UmV and the chrysovirus PeV. Whereas L-A and UmV have a canonical T = 2 capsid, the PeV capsid is based on a T = 1 lattice composed of 60 capsid proteins. We used cryo-electron microscopy combined with three-dimensional reconstruction techniques and hydrodynamic analysis to determine the structure at 13.8 Å resolution of *Helminthosporium victoriae* 190S virus (Hv190SV), a totivirus isolated from a filamentous fungus. The Hv190SV capsid has a smooth surface and is based on a T = 2 lattice with 60 equivalent dimers. Unlike the RDRP of some other totiviruses, which are expressed as a capsid protein-RDRP fusion protein, the Hv190SV RDRP is incorporated into the capsid as a separate, nonfused protein, free or non-covalently associated to the capsid interior.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Hv190SV; Double-stranded RNA; Virus capsid; Cryo-electron microscopy; Three-dimensional structure

Introduction

Double-stranded (ds)RNA viruses share numerous general architectural and functional principles (Lawton et al., 2000; Mertens, 2004). With the exception of birnaviruses (Böttcher et al., 1997; Castón et al., 2001) and chrysoviruses (Castón et al., 2003), all dsRNA viruses from the mammalian reoviruses to the bacteriophage $\phi 6$, including plant and fungal viruses, share

a specialized capsid consisting of 120 protein subunits in a so-called T = 2 organization. T = 2 capsids are used as a template to prime the assembly of surrounding capsids (Grimes et al., 1998; Johnson and Reddy, 1998), as organizers of the genome and replicative complex within them (Lawton et al., 2000; Patton et al., 1997), and as molecular sieves to isolate dsRNA molecules or replicative intermediates (Diprose et al., 2001; Lawton et al., 1997). This tendency is followed by numerous well-studied members of the family Reoviridae. There are nonetheless many fungal and protozoal dsRNA viruses that remain to be characterized structurally. L-A virus (Wickner, 2001), the type species of the genus *Totivirus* in the family *Totiviridae*, which infects the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is the best molecularly and structurally characterized totivirus, and has a canonical T = 2 layer (Castón et al., 1997). The

Abbreviations: 3DR, three-dimensional reconstruction; CP, capsid protein; cryo-EM, cryo-electron microscopy; ds, double-stranded; ctf, contrast transfer function; Hv190SV, *Helminthosporium victoriae* 190S virus; RDRP, RNA-dependent RNA polymerase.

* Corresponding author. Fax: +34 91 5854506.

E-mail address: jrcaston@cnb.uam.es (J.R. Castón).

totivirus UmV, which infects the corn pathogen *Ustilago maydis*, also has a T = 2 layer (Cheng et al., 1994). Furthermore, *Penicillium chrysogenum virus* (PcV), a symptomless fungal virus of the family *Chrysoviridae* (Ghabrial et al., 2005; Jiang and Ghabrial, 2004), has an authentic T = 1 capsid with 60 equivalent protein subunits (Castón et al., 2003).

This study addresses the capsid structure of the totivirus *Helminthosporium victoriae* 190S virus (Hv190SV). Hv190SV infects the phytopathogenic filamentous fungus *Helminthosporium victoriae* (teleomorph: *Cochliobolus victoriae*), the causal agent of Victoria blight of oats (Sanderlin and Ghabrial, 1978). The Hv190SV genome is a single-segment dsRNA molecule (5178 bp; (Huang and Ghabrial, 1996)) that encodes the capsid protein (CP, 772 residues; M_r 81,200; apparent M_r ~88,000), and a minor virion-associated protein, the RNA-dependent RNA polymerase (RDRP, 770 residues; M_r 84,300; apparent M_r ~92,000). In a major difference from L-A virus, however, Hv190SV RDRP is expressed as a separate nonfused protein rather than as a CP-RDRP fusion protein, even though CP and RDRP open reading frames (ORF) have overlapping stop and start codons (Soldevila and Ghabrial, 2000). This implies that the RDRP is incorporated into the capsid interior as a free protein, thus sharing certain analogies to the PcV particle (Castón et al., 2003). Although the Hv190SV capsid is encoded by a single gene, it contains three closely related CP, p78, p83 and p88 (Ghabrial et al., 1987). p88 is the primary translation product, and p83 and p78 represent posttranslational proteolytic processing products of p88 at its C-terminal region (Huang and Ghabrial, 1996; Huang et al., 1997). In addition, whereas p88 and p83 are phosphoproteins, p78 is nonphosphorylated (Ghabrial and Havens, 1992). Purified Hv190SV virion preparations contain two types of particles, 190S-1 and 190S-2, that differ slightly in sedimentation rates and in capsid composition, and probably represent different stages in the virus life cycle (Ghabrial, 1994). The 190S-1 capsids contain p88 and p83 in equimolar amounts, and the 190S-2 capsids are composed of similar amounts of p88 and p78.

These functional and molecular features make characterization of the Hv190SV capsid structure an attractive prospect. We used cryo-electron microscopy (cryo-EM) combined with three-dimensional reconstruction (3DR) and complementary biophysical techniques to determine the structure at 13.8 Å resolution and the protein stoichiometry of the Hv190SV capsid. We found that Hv190SV, as a representative of totiviruses that infect filamentous fungi (forming a separate cluster by phylogenetic analysis), shares the canonical T = 2 capsid with totiviruses that infect yeast and possibly those that infect parasitic protozoa. Comparative analyses of L-A and Hv190SV CP nonetheless suggest a new arrangement of the Hv190SV capsid protein domains.

Results

Virions and virus-like particle purification

Hv190SV virions and empty capsids were purified after two cycles of differential centrifugation and linear sucrose density gradient centrifugation (see Materials and methods). Whereas full virions were purified from a naturally infected fungal isolate, Hv190SV empty capsids were expressed in a virus-free fungal host transformed with a CP recombinant vector (pCB190S-mt; Annamalai and Ghabrial, unpublished results). In both cases, homogeneous populations of particles were obtained, as tested in Coomassie blue stained SDS-PAGE gels (Fig. 1A). Fractions enriched in Hv190SV particles were identical and consisted of two major polypeptides (p88 and p78) in equimolar amounts and a minor polypeptide (p83). As predicted, no other minor proteins were detected in full virion preparations, although viral RDRP is known to be present. The final yield of purified 190SV virions from the naturally infected isolate is generally low, since two cycles of density gradient centrifugation are required to remove the chrysovirus Hv145S, commonly associated with Hv190SV (Sanderlin and Ghabrial, 1978). A substantially higher yield (20–50 fold) of

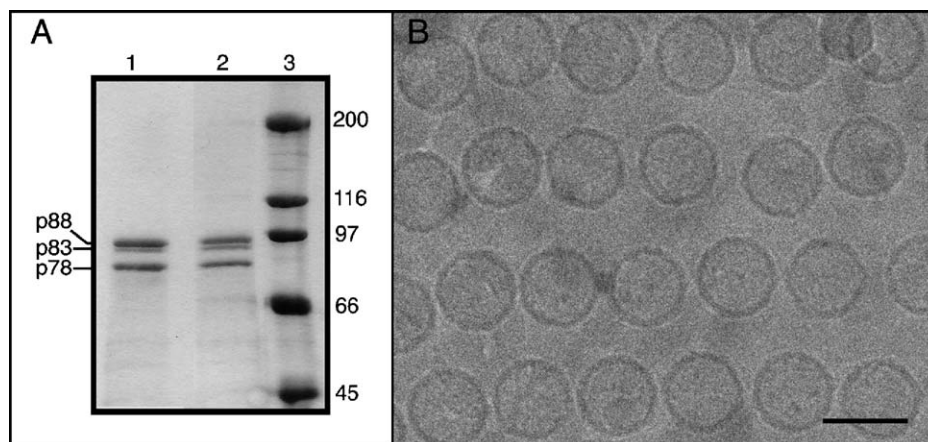


Fig. 1. Analysis of Hv190SV empty particles by SDS-PAGE and cryo-electron microscopy. (A) Purified empty particles from a virus-free isolate transformed with a vector containing CP coding region (lane 1), and purified Hv190SV virions from a naturally infected fungal isolate (lane 2) were analyzed for protein content by 7.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. Positions of p88, p83 and p78 are indicated. The apparent molecular weights of protein standards are indicated (lane 3). (B) Cryoelectron micrograph of Hv190SV empty capsids. Scale bar, 50 nm.

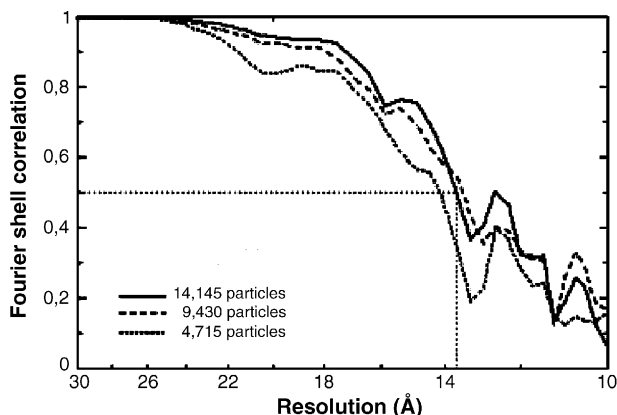


Fig. 2. Assessment of the resolution of the Hv190SV reconstruction. Resolution curves using the 0.5 FSC criterion were calculated for the Hv190SV empty capsid with different numbers of particles. Each set of particle images was subdivided randomly into two subsets, and independent reconstructions were computed from these data. The resolution (13.8 Å) at which the correlation drops below 0.5 is indicated for the set of 14,145 particles.

highly purified Hv190S empty capsids was obtained from the fungal isolate transformed with the pCB190S-mt vector. For that reason, Hv190SV virus-like particles (VLP) containing only the CP were selected for subsequent structural analysis by cryo-EM. Although all apparently empty particles (~40 nm in

diameter) showed a smooth topography typical of dsRNA fungal viruses, distinct contours were observed depending on orientation (Fig. 1B).

Three-dimensional structure of Hv190SV empty particles

The three-dimensional structure of Hv190SV VLP was determined from different cryo-electron micrographs covering a wide defocus range (first contrast transfer function [ctf] zeros at spacings of 11 to 28 Å). The 3DR of Hv190SV VLP was determined to 13.8 Å resolution (Fig. 2). The molecular topography of the capsid as viewed along an icosahedral two-fold symmetry axis is shown in Figs. 3A and C. VLP are completely empty, since internal density is at the same level as the solvent outside. This map was contoured on the assumption that 120 CP molecules make up each capsid (see below), using a value of 0.73 cm³/g as the partial specific volume of protein. The outer diameter of the capsid, measured from the spherically averaged radial density profile of the map, was ~404 Å, and the average thickness of the capsid shell was ~37 Å. The capsid exhibits a typical T = 2 lattice (or a T = 1 lattice with 120 morphological units). At this moderate resolution, some features are distinguished on the relatively smooth topography of the Hv190SV particles. For comparative

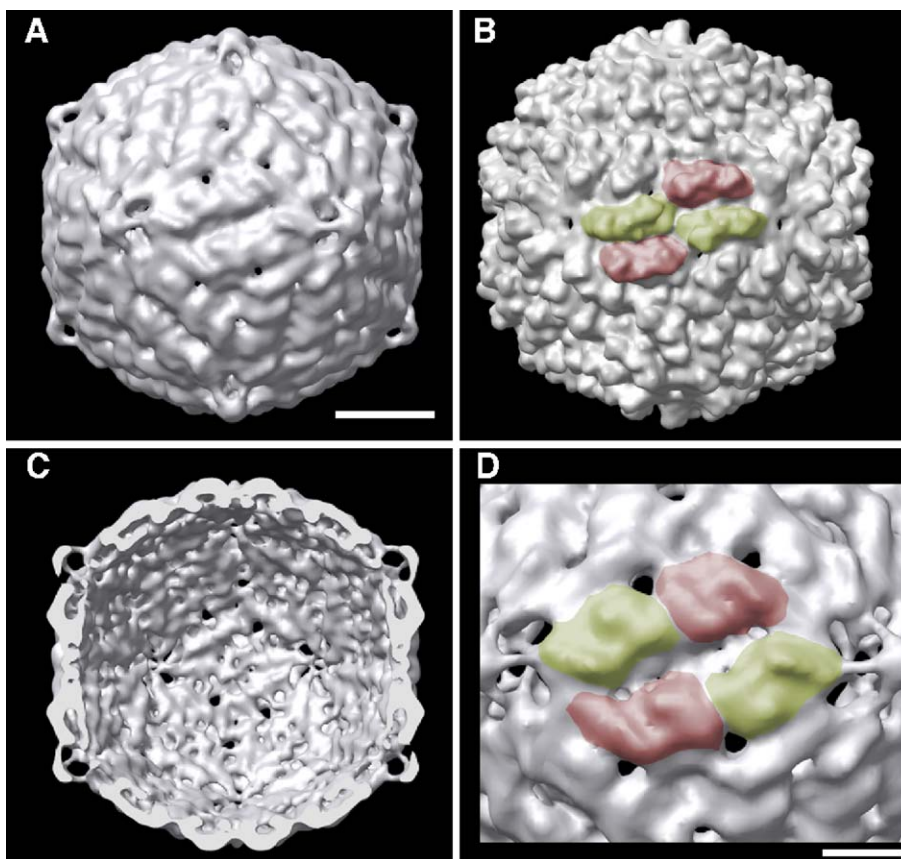


Fig. 3. Three-dimensional structure of empty Hv190SV capsids. Surface-shaded representations of the outer (A) and inner (C) surface of the empty Hv190SV capsid viewed along a two-fold axis of icosahedral symmetry. To observe the pores in the shell with clarity, only the front hemisphere of the map is shown in panel A. (B) Surface-shaded representation of the outer L-A capsid surface after applying a soft low-pass filter damped from 14 Å down to zero amplitude at 12 Å, viewed along a twofold axis of icosahedral symmetry. A- and B-subunits are represented in green and red, respectively. (D) Close-up view down a twofold axis from outside of the empty Hv190SV capsid. A- and B-subunits are colored as above for L-A map. Scale bars: (A–C) 100 Å; (D) 50 Å.

purposes, a three-dimensional map of L-A virus was calculated from the atomic structure coordinates (Naitow et al., 2002) filtered to ~ 14 Å resolution (Fig. 3B). L-A and Hv190SV capsids show relatively rougher and smoother outer surfaces, respectively. From an structural point of view, the Bluetongue virus core (BTV core), which is also based on a $T = 2$ lattice (Grimes et al., 1998), shares a similar smooth outer surface with the Hv190SV capsid, even though both viruses are phylogenetically distant (not shown).

Considering the comparison with L-A (and other $T = 2$ capsids), and favoring the more compact arrangement, we thus proposed the tentative placement of subunits on this surface lattice (indexed by colors in Fig. 3D). The outer surface of the pentamers is formed of five elongated structures subdivided in two similar bean-like halves (A-subunits in green), with another five comparable subunits partially intercalated (B-subunits in red), but with distinct morphology. Numerous holes may perforate the shell as in the L-A capsid, and the major holes at the five-fold axis are partially occluded by a density.

Another aspect, although more pronounced and resembling the L-A capsid, pertains to the lower density area between the inner and outer surfaces of the capsid wall (Figs. 3C, 4B, C). In fact, the protein shell in the radial density profile of the Hv190SV map shows two discernible density peaks located at ~ 193 and ~ 174 Å from the particle center (not shown).

Structural features of the CP subunits are conveniently viewed in spherical sections through the density map and the approximate boundaries and interactions between CP are colored (Fig. 4A). The putative CP dimer as the protomer of the capsid is formed by A- and B-subunits oriented in parallel, with the A-subunit slightly protruding (~ 4 Å) over the B-subunit (coded red (B) and green (A) in Fig. 4A). An A-subunit seen at a radius of 193 Å is thus easily superimposed on a B-subunit seen at a radius of 189 Å (Fig. 4A). We observed that the quaternary organization of the Hv190SV particle is strikingly similar to the cores of other dsRNA viruses and the L-A virus: A-subunits cluster around the five-fold axis and B-subunits around the three-fold axis.

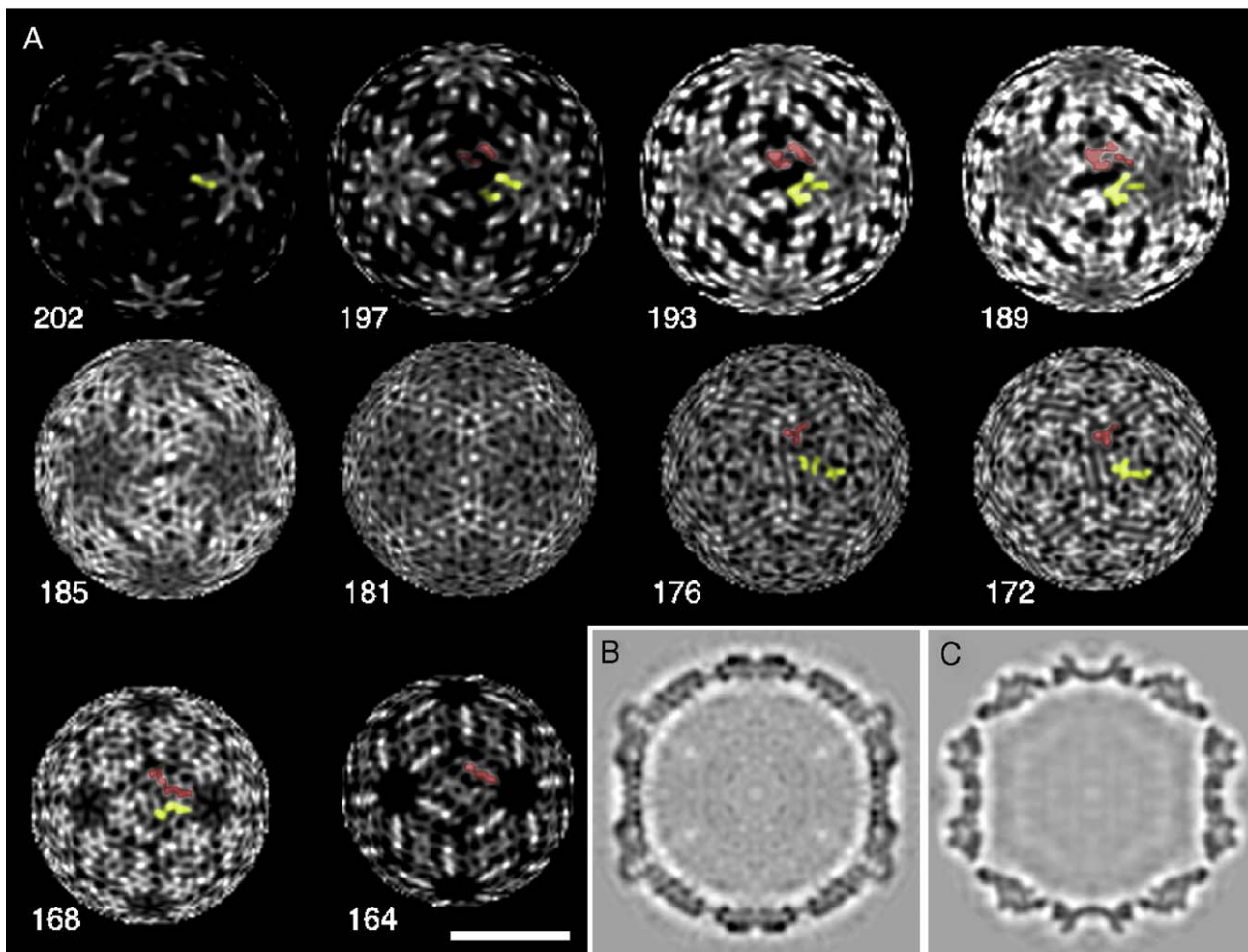


Fig. 4. Structural organization of the two nonequivalent CP monomers in the Hv190SV empty capsid. (A) Spherical sections through the density map of the Hv190SV capsid, as viewed along a twofold axis. The range of the sections shown is from 202 to 164 Å, with a radial step of 4–5 Å between sections. The numbers refer to the perpendicular distances of the spherical sections from the center of the particle. Protein is white. A dimer of putative A- and B-subunits is indicated in most sections in green and red, respectively. (B, C) Transverse central sections taken from the maps of empty Hv190SV (B) and L-A (C) capsids. Here, darker shades represent higher densities (i.e., the contrast is reversed relative to Fig. 3A). Scale bar, 200 Å.

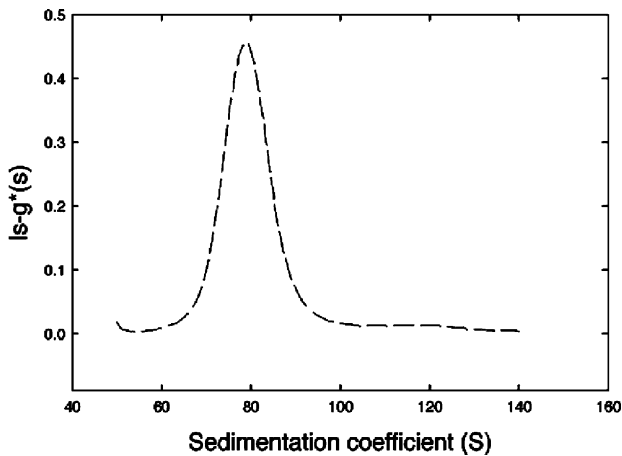


Fig. 5. Sedimentation velocity analysis of Hv190SV empty particles. Apparent sedimentation coefficient distribution, $I_{s-g^*}(s)$, of Hv190S empty particles (~ 1 mg/ml) obtained from sedimentation velocity taken at 12,000 rpm and 20 °C.

Analytical ultracentrifugation of empty Hv190SV particles

To estimate the copy number for the CP, and to confirm our 3DR map results obtained by cryo-EM, analytical ultracentri-

fugation analysis was performed with several samples of purified Hv190SV VLP (~ 1 mg/ml); their sedimentation velocity behavior is shown in Fig. 5. The sedimentation coefficient distributions are independent of protein concentration in the range studied (not shown). Most particles ($>95\%$) sediment with an apparent sedimentation coefficient of ~ 80 S. This value corresponds to a corrected standard s^0 value of 86 ± 4 S. Dynamic light scattering experiments with the same viral particles gave a corrected standard translational diffusion coefficient D^0 of 9.48 ± 0.10 $m^2 s^{-1}$. From the combined s^0 and D^0 coefficients, using the Svedberg equation (van Holde, 1985), the molecular mass of the viral particles can be determined in a shape-independent manner. Using this approach, we determined that the main species of Hv190SV particle has a molar mass of $8.6 \pm 0.4 \times 10^6$ $g mol^{-1}$; these data correspond to 106 ± 5 subunits and are compatible with the 120-CP model.

Phylogenetic analysis of totivirus CP and RDRP

Amino acid sequences of the eight RDRP conserved motifs (Ghabrial, 1998) and complete CP sequences of 17 totiviruses

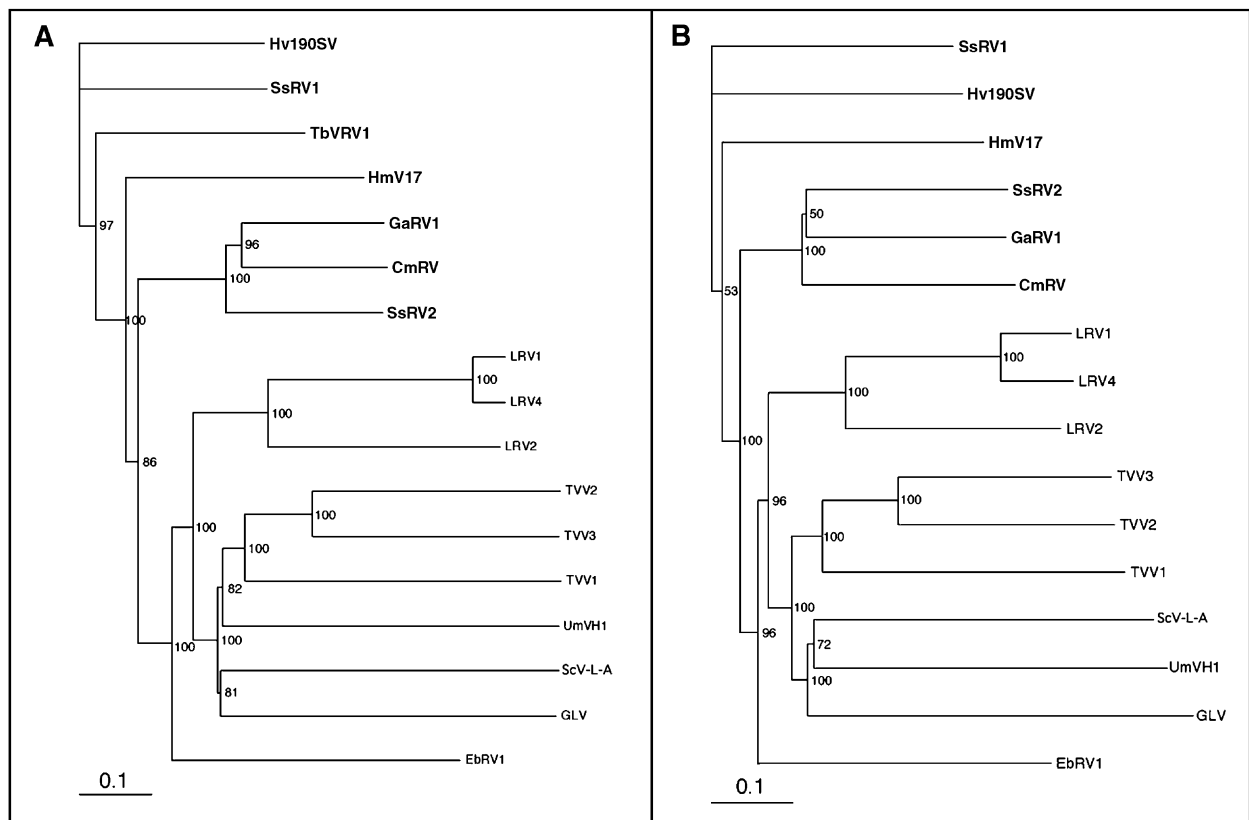


Fig. 6. Phylogenetic trees of CP and conserved RDRP motifs of totiviruses. The phylogenetic trees are based on amino acid sequences of the totivirus coat proteins (A) and the putative RNA-dependent RNA polymerase proteins (B) of members of the family *Totiviridae*. Percent bootstrap numbers (1000 replicates) are shown on the nodes. Abbreviations and GenBank sequence acquisition numbers are: Hv190SV, *Helminthosporium victoriae* 190S virus [U41345]; SsRV1, *Sphaeropsis sapinea* RNA virus 1 [AF038665]; TbRV1, *Thielaviopsis basicola* dsRNA virus 1 [AY561500]; HmV17, *Helicobasidium mompa* No.17 dsRNA virus [AB085814]; GaRV1, *Gremmeniella abietina* RNA virus LI [AF337175]; CmRV, *Coniothyrium minitans* RNA virus [AF527633]; SsRV2, *Sphaeropsis sapinea* RNA virus 2 [AF039080]; LRV1, *Leishmania* RNA virus 1-1 [M92355]; LRV2, *Leishmania* RNA virus 2-1 [U32108]; LRV4, *Leishmania* RNA virus 1-4 [U01899]; TVV1, *Trichomonas vaginalis* virus 1 [U08999]; TVV2, *Trichomonas vaginalis* virus II [AF127178]; TVV3, *Trichomonas vaginalis* virus 3 [AF325840]; UmVH1, *Ustilago maydis* virus H1 [U01059]; ScV-L-A, *Saccharomyces cerevisiae* virus L-A [J04692]; GLV, *Giardia lamblia* virus [L13218]; EbRV1, *Eimeria brunetti* RNA virus 1 [AF356189]. The names of totiviruses that infect filamentous fungi are printed in bold.

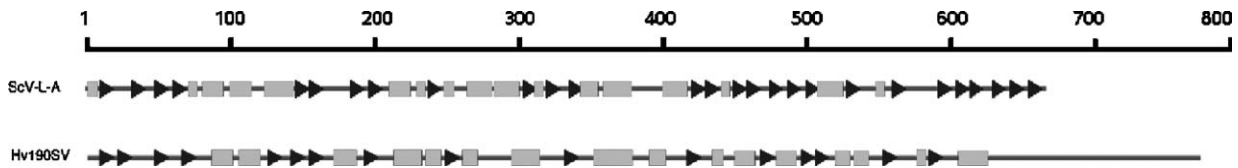


Fig. 7. Secondary structure prediction of Hv190SV CP. The secondary structure of L-A CP (680 amino acid residues, ScV-L-A) is compared with the predicted secondary structure of Hv190SV CP (772 residues). For this analysis, the following CP sequences were used: Hv190SV, TbRV1, HmV17, CmRV, EbRV1, GaRV1, SsRV1, SsRV2, LRV1, LRV2, and LRV4. Secondary structure motifs are shown as black arrowheads for β -strands, and grey rectangular boxes for α -helices.

were aligned using the CLUSTAL X program (Thompson et al., 1997). Two phylograms based on multiple alignments of either CP sequences or RDRP conserved regions, generated by the PAUP program (Swofford, 2000), are shown in Figs. 6A and B; the resulting trees were similar. RDRP sequence analysis suggested that Hv190SV and other totiviruses that infect filamentous fungi may form a separate cluster from those that infect the yeast (e.g., L-A), the smut fungus (UmV) and the protozoa (GLV, LRV and TVV) (Cheng et al., 2003). When only CP sequence analyses are considered, similar inferences can be reached. Our analysis of the Hv190SV capsid indicates, however, that $T = 2$ architecture is a conserved feature of totivirus capsids. No significant sequence identity was found between the CP from these putative clusters.

Hv190SV CP secondary structure prediction

Secondary structure prediction of Hv190SV CP based on multiple sequence alignments suggested clear differences in comparison to L-A CP secondary structure (Fig. 7). The prediction was done using the PHD method (Rost and Sander, 1993), and included 11 CP sequences (see Fig. 7 legend). Similar results were obtained using the Psipred (McGuffin et al., 2000) and YASPIN methods (Lin et al., 2005). The average identity among CP sequences of the Hv190SV cluster is 36%, although LRV CP sequences were also included in this analysis (average identity 17%). The low structural similarity between Hv190SV and L-A CP makes it impossible to obtain a meaningful superposition of the L-A CP onto the Hv190SV CP, or to attempt to dock the L-A CP atomic structure into the Hv190SV 3D map. We therefore infer that the Hv190SV CP may have different folding.

Discussion

We analyzed the structure and stoichiometry of the Hv190S empty capsid by three-dimensional cryo-EM combined with complementary hydrodynamic analysis. Our results demonstrate that this capsid with a smooth outer surface is composed of 120 monomers of the CP arranged in a $T = 2$ layer, or 60 asymmetric dimers in a $T = 1$ layer. The $T = 2$ capsid is a peculiar, yet common architecture for the layer surrounding the genome of most dsRNA viruses. The two well-established capsid structures of dsRNA fungal viruses are exemplified by the canonical $T = 2$ capsid of the totiviruses (LA and UmV) and the $T = 1$ shell of chrysovirus PcV. In contrast with the extensively studied members of the *Reoviridae*, it is clear that more structural data on the features of fungal and protozoal

dsRNA viruses are required for comparisons of the function and evolution of these viruses.

The family *Totiviridae* encompasses a broad group of viruses characterized by isometric particles, ~ 40 nm in diameter, that contain a single-segment dsRNA genome, and persistently infect protozoa and fungi. At present, three genera have been placed in this family: *Totivirus* (including L-A and Hv190S viruses), *Giardiavirus*, and *Leishmanivirus* (the last two include members that infect parasitic protozoa). Two distinct RDRP expression strategies have been reported for totiviruses, (i) those that express their RDRP as a fusion protein (CP-RDRP) by ribosomal frameshifting, such as L-A and the totiviruses that infect parasitic protozoa (Dinman et al., 1991; Stuart et al., 1992; Wang et al., 1993), and (ii) those with an RDRP as a separate nonfused protein, synthesized by an internal initiation mechanism (e.g., a coupled termination–reinitiation mechanism), as proposed for Hv190SV and others that infect filamentous fungi (Huang and Ghabrial, 1996; Soldevila and Ghabrial, 2000).

Phylogenetic analysis of CP or RDRP sequences reflects these differences, and two separate clusters can be envisaged (Fig. 6). Hv190SV and other viruses infecting filamentous fungi are closer to each other than to viruses infecting yeast, smut fungi and protozoa. Since both independent alignments give similar phylogenetic relationships, the question might be raised as to whether these viruses should reside in a genus of their own. *Leishmania* RNA virus (LRV) behaves as an intermediate between the two putative clusters; LRV express its RDRP as a CP-RDRP fusion protein, but the latter is specifically cleaved by its own cysteine protease (Carrion et al., 2003; Ro et al., 1997). This might justify why LRV CP shares higher sequence identity (17%) with Hv190SV and related CP than with viruses in the second cluster.

Based on the CP sequence analysis of the cluster containing Hv190SV, we performed secondary structure prediction analyses. Detailed structural comparisons with L-A CP structure (Naitow et al., 2002) or with core proteins of other *Reoviridae* are inconclusive, since there is no sequence similarity among them (Reinisch, 2002). At present, there are four $T = 2$ layers resolved at atomic resolution; these are VP3 cores of the orbivirus *Bluetongue virus* (Grimes et al., 1998), $\lambda 1$ (as well as $\lambda 2$ and $\sigma 2$) cores of the reovirus in the genus *Orthoreovirus* (Reinisch et al., 2000), P3 cores of the *Rice dwarf virus* in the genus *Phytoreovirus* (Nakagawa et al., 2003), and Gag (CP) of L-A virus (Naitow et al., 2002). Although all four proteins are predominantly α -helical, $\lambda 1$, P3 and VP3 share overall conformations and are separated into three domains. Gag has a different tertiary structure, and Hv190SV CP is apparently

separated into two similar domains. In addition, Hv190SV and related CP have proline-rich regions near the C-terminus (Cheng et al., 2003). Together, these data suggest that the Hv190SV CP may have a new folding motif.

In contrast to the smooth outer surface of the Hv190SV empty particles, the surface of L-A CP is uneven. This may reflect the different roles of the particle surfaces. L-A CP generates uncapped cellular mRNA by the enzymatic removal of their 5' cap structures and attachment to His 154 of L-A CP (Blanc et al., 1994). The active site of the decapping reaction is located in a trench structure that contributes the wrinkled appearance to the outer surface (Naitow et al., 2002; Tang et al., 2005). L-A can thus compete with host mRNA for the use of the translation machinery, since it lacks the mRNA capping machinery (as in reovirus; (Reinisch et al., 2000)). The decapping and cap binding activities have yet to be demonstrated for totiviruses other than L-A, although alternative strategies to enhance viral mRNA expression are possible. It is tempting to speculate that the totiviruses from filamentous fungi as a phylogenetic group (Fig. 6) might all have smoother surfaces. The biological function of the Hv190SV smooth outer surface, if any, remains an open question. The smooth Hv190SV particle is similar to the VP3 particle from BTV, which serves as a template for assembly of a T = 13 outer protein shell, although this is not applicable to Hv190SV since it lacks outer protective shells. The putative new folding of the Hv190SV CP inferred using various secondary structure prediction methods (Fig. 7) might explain the important differences between L-A and Hv190SV outer surfaces.

Capsid heterogeneity is another well-studied, striking feature of Hv190SV (Ghabrial et al., 2002). The CP is initially synthesized as p88, and may be further posttranslationally modified by phosphorylation and/or proteolytic processing (Huang et al., 1997). Nonetheless, none of these modifications are required for capsid assembly. Instead, we propose that these modifications play an important role in the life cycle of Hv190SV, including regulation of transcription/replication and/or packaging/release from virions of the viral (+) strand RNA transcript (Soldevila et al., 1998). These different capsid states can be purified to at least two particle types, distinguishable as slower (190S-1) and faster (190S-2) sedimenting components (Ghabrial and Havens, 1992). We also isolated an intermediate replicative form of Hv190SV that contains single-stranded RNA and sediments at ~145S (unpublished results). The Hv190SV empty capsid we characterize, with a corrected standard s^0 value of ~90S, co-sediments with the described 113S component from purified virus preparations (Sanderlin and Ghabrial, 1978). The 113S component resolved by sucrose density gradient analysis is typically a broad peak, and the values of ~90S, as determined from analytical centrifugation, would be more accurate. It will be of interest to determine whether these functional states of the capsid are associated with structural differences.

The T = 2 stoichiometry and associated molecular architecture is probably related to the numerous activities related to RNA synthesis (Lawton et al., 2000; Patton and Spencer, 2000). dsRNA viruses of unicellular and simple eukaryotes,

whose life cycles are entirely intracytoplasmic, have only a single-shelled T = 2 capsid. This is essential for the proper inclusion of the genome and the replicative machinery, and as a molecular sieve to isolate dsRNA molecules or replicative intermediates from host molecules. Although our studies are limited to Hv190SV empty capsids, some inferences can be made for Hv190SV full particles. Considering that the diameter (and therefore, the volume available at the interior of the capsid) and the genome size for Hv190SV and L-A are in the same range (~400 Å, and 5.1 and 4.6 kbp, respectively), the viruses should share a relatively low density of packed dsRNA (which corresponds to an interstrand spacing of ~35–45 Å). These calculations show that fungal dsRNA viruses are provided with spacious capsids in comparison with other replicative cores (e.g., the core of BTV and cypoviruses), which have spacing between dsRNA strands of ~25 Å [reviewed in (Castón et al., 2003)]. The looser packing of the dsRNA would probably improve the template motion in the more spacious transcriptional and replicative active particle. This greater spacing would apply to fungal and related viruses that only package a single genomic dsRNA segment per particle and contain 1–2 copies of the RDRP complex.

The dsRNA virus transcription/replication complex(es) can be associated to the capsid following two well-described tendencies, either covalently bound to the inside of the particle wall as in L-A, or noncovalently associated with the underside of the T = 2 capsid, as in members of the family *Reoviridae*. Since the Hv190SV RDRP is not expressed as a fusion protein with the CP, it might be organized as in reoviruses, although we cannot rule out that RDRP is free in the interior volume or noncovalently bound to the genome.

Materials and methods

Virion preparation, plasmid construction and fungal transformation

H. victoriae isolate A-9 (ATCC 42018), known to contain both Hv190S and Hv-145V (Sanderlin and Ghabrial, 1978), was used as a source of Hv190S virions. A single conidial isolate of *H. victoriae* strain B-2 (B-2ss; ATCC 42020), which was previously shown to be virus-free (Soldevila et al., 2000), was used for fungal transformation experiments. A transformation vector based on the hygromycin B resistance marker was used to transform isolate B-2ss with a full-length cDNA clone of Hv190SV (pBC190S) or modified versions thereof (Annamalai and Ghabrial, unpublished). Expression of Hv190SV genes is controlled by *Cochliobolus heterostrophus* *GPD1* promoter and *Aspergillus nidulans* *trpC* terminator signals. The vector contains an engineered hygromycin resistance gene under the control of *A. nidulans* *trpC* promoter. Expression of the Hv190SV CP and RDRP genes in the hygromycin-resistant transformants was determined by immunoblot analysis, as previously described (Huang and Ghabrial, 1996). A modified version of the vector, designated pCB190S-mt, in which the RDRP ORF was rendered nontranslatable, was selected for our study since the generated transformants

produced only the CP and the yield of the assembled virus particles was superior to that of other transformants or naturally infected fungal isolate (Annamalai and Ghabrial, unpublished results).

For virion or empty virus particle purification, all fungal isolates or transformants were grown on potato dextrose broth containing 0.5% yeast extract. The purification procedure previously described for *Penicillium chrysogenum virus* (Jiang and Ghabrial, 2004) was followed with the final purification step made by rate zonal centrifugation in sucrose density gradients (100–400 mg ml⁻¹). All steps were carried out in buffer A (50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.8, containing 5 mM EDTA and 150 mM NaCl). Selected fractions containing the Hv190SV particles were used for SDS-PAGE and electron microscopy analyses.

Cryo-electron microscopy

Samples of fractions containing Hv190SV empty capsids were diluted until a uniform distribution of particles was observed (when examined by negative staining). Samples (5 µl drops) were applied to one side of a holey carbon film, washed twice on buffer A drops, blotted, and plunged into a liquid ethane bath following standard procedures, as described (Castón et al., 2001; Saugar et al., 2005). Micrographs were recorded under minimal exposure conditions so that the specimens imaged received exposures of 6–10 e⁻/Å², at nominal magnification of 50,000× (calibrated using the 40.5 Å axial spacing of bacteriophage T4 tail-sheath) on a Tecnai G2 electron microscope operating at 200 kV and equipped with a field emission gun.

Image analysis

General image processing operations were performed using PIC Software (Trus et al., 1996). Micrographs were assessed for resolution and astigmatism by computer Fourier analysis, and defocus values estimated from the positions of the first zero of the ctf. For the 30 selected micrographs analyzed (which includes 15,717 particles), defocus values, determined with Bsoft package (Heymann, 2001), ranged from 0.6 to 3.0 µm (first ctf zeros at spacings of 11–28 Å, respectively). Suitable micrographs were scanned with a Zeiss PhotoScan TD scanner at 7 µm/pixel and binned to give 21 µm/pixels (4.2 Å at the specimen). Particle images were extracted and preprocessed with X3dp (Conway et al., 1993). Initial estimates of orientation angles were obtained for a base set of particles by the Polar Fourier Transform (PFT) algorithm (Baker and Cheng, 1996), taking as starting model the three-dimensional map of empty L-A particles, band-limited to 35 Å resolution and appropriately scaled (Cheng et al., 1994). A new density map was calculated and used for all subsequent orientation and origin refinements, using a modified version of the PFT algorithm altered to use both phase and amplitude information (D.M. Belnap et al., unpublished). Phases were ctf corrected by simply flipping the phases in the required lobes of the ctf. Enhancement of the high-resolution Fourier amplitudes was

based on X-ray data from L-A viral capsid (Naitow et al., 2002). The decay of amplitudes was calculated using the spatial frequency components from the Hv190SV map (with an effective resolution of 13.8 Å) and the X-ray map of L-A virus. The decay profile of the Hv190SV map was then adjusted to match the profile from the X-ray map, and the fitted function was applied to the Hv190SV map between the frequency range 245 to 12 Å. Finally, a soft low-pass filter was applied between 14 and 12 Å. This is analogous to adjusting the temperature factor of the two structures to be similar.

Reconstructions were calculated using Fourier–Bessel techniques (Crowther, 1971). The final reconstruction combined 14,152 images (90% of the total particles), and achieved resolution by the Fourier shell correlation (FSC) criterion (0.5 threshold) of 13.8 Å. Although only two other tests are shown in Fig. 2 (60%–9430 particles and 30%–4715 particles), additional tests were calculated, from 20% to 80% (data not shown), but no improvement was observed.

The L-A X-ray three-dimensional map was generated by VIPER (Reddy et al., 2001) (<http://mmts.scripps.edu/viper/viper.html>), and the resolution of the three-dimensional map was filtered to 14 Å by using the Spider software package. The central section of the L-A map (Fig. 4C) was made with a ctf imposed by scaling its one-dimensional power spectrum to the Hv190SV capsid map section's one-dimensional power spectrum. A two-dimensional FFT was calculated for the central section of Hv190SV map, and a one-dimensional radial average was calculated. This one-dimensional radial average is representative of the power spectrum of the electron microscope ctf. The same operations were done on the central section from the filtered L-A X-ray map. The one-dimensional power spectrum of the Hv190SV map was divided by that of the X-ray map generating a set of scaling factors, which when appropriately multiplied times the two-dimensional FFT of the LA map imposed the electron microscope ctf of HV190SV onto LA. This scaling method assumes that the signal component of each power spectrum is roughly the same, and that differences in the power spectrum represent primarily the electron microscope's ctf. The inverse FFT yielded the image shown in Fig. 4C.

Three-dimensional model images were produced using the UCSF Chimera package (Pettersen et al., 2004).

Hydrodynamic analysis of Hv190SV empty particles

Sedimentation velocity

The experiments were done using viral particles (loading concentration ranging from 0.5 to 5 mg/ml) equilibrated in buffer A. The sedimentation velocity runs were carried out at 12000 rpm and 20 °C in an XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman-Coulter Inc.) with the interference optics detection system, using an An60Ti rotor and 12 mm double-sector centrepieces. The sedimentation coefficient distributions were calculated by least-squares boundary modeling of sedimentation velocity data using the $ls - g^*(s)$ method (Schuck and Rossmanith, 2000), as implemented in the SEDFIT program. These experimental sedimentation coefficients were corrected

to standard conditions (water, 20 °C, and infinite dilution; (van Holde, 1985)) using the SEDNTERP program (Laue et al., 1992) to get the corresponding s^0 values. The latter program was also used to calculate the partial specific volume of Hv190S (0.729 ml/g) from its amino acid composition (Huang and Ghabrial, 1996).

Dynamic light scattering

The DLS experiments were performed at 20 °C in a DynaPro-MS/X instrument (Protein Solutions Inc.), using two concentrations of viral particles (0.5 and 1 mg/ml). The translational diffusion coefficients (D) of the viral particles were determined from the scattering data with the DYNAMICS autocorrelation analysis software (version 6, Protein Solutions Inc.). These experimental values were corrected for buffer and concentration (van Holde, 1985) to get the standard D^0 coefficients.

Acknowledgments

We thank T. Baker (University of California, San Diego), D. Belnap (Brigham Young University), J. Conway (IBS, Grenoble), J. B. Heymann, and A.C. Steven (NIH) for sharing their reconstruction software, W. Havens (University of Kentucky) for technical assistance, A. Valencia (CNB, Madrid) for useful discussion, and C. Mark for editorial assistance. JRC holds a contract from the “Ramón y Cajal” program (MCYT). This work was supported by Grant BMC2002-00996 from the MCYT, and in part by the Intramural Program of the NIH, CIT.

References

- Baker, T.S., Cheng, R.H., 1996. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J. Struct. Biol.* 116 (1), 120–130.
- Blanc, A., Ribas, J.C., Wickner, R.B., Sonenberg, N., 1994. His-154 is involved in the linkage of the *Saccharomyces cerevisiae* L-A double-stranded RNA virus Gag protein to the cap structure of mRNAs and is essential for M1 satellite virus expression. *Mol. Cell. Biol.* 14 (4), 2664–2674.
- Böttcher, B., Kiselev, N., Stel'Mashchuk, V., Perevozchikova, N., Borisov, A., Crowther, R., 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71 (1), 325–330.
- Carrión Jr., R., Ro, Y.T., Patterson, J.L., 2003. Purification, identification, and biochemical characterization of a host-encoded cysteine protease that cleaves a *Leishmanivirus* gag-pol polyprotein. *J. Virol.* 77 (19), 10448–10455.
- Castón, J.R., Trus, B.L., Booy, F.P., Wickner, R.B., Wall, J.S., Steven, A.C., 1997. Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J. Cell Biol.* 138 (5), 975–985.
- Castón, J.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J.F., Casal, J.I., Carrascosa, J.L., 2001. C terminus of Infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* 75 (22), 10815–10828.
- Castón, J.R., Ghabrial, S.A., Jiang, D., Rivas, G., Alfonso, C., Roca, R., Luque, D., Carrascosa, J.L., 2003. Three-dimensional structure of *Penicillium chrysogenum* virus: a double-stranded RNA virus with a genuine T = 1 capsid. *J. Mol. Biol.* 331 (2), 417–431.
- Cheng, R.H., Castón, J.R., Wang, G.-j., Gu, F., Smith, T.J., Baker, T.S., Bozarth, R.F., Trus, B.L., Cheng, N., Wickner, R.B., Steven, A.C., 1994. Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric gag dimers. *J. Mol. Biol.* 244 (3), 255–258.
- Cheng, J., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., Peng, Y., Ghabrial, S.A., 2003. Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Virus Res.* 93 (1), 41–50.
- Conway, J.F., Trus, B.L., Booy, F.P., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Steven, A.C., 1993. The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J. Struct. Biol.* 111 (3), 222–233.
- Crowther, R.A., 1971. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Philos. Trans. R. Soc., Ser. B* 261, 221–230.
- Dinman, J.D., Icho, T., Wickner, R.B., 1991. A-1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1), 174–178.
- Diprose, J.M., Burroughs, J.N., Sutton, G.C., Goldsmith, A., Gouet, P., Malby, R., Overton, I., Zientara, S., Mertens, P.P., Stuart, D.I., Grimes, J.M., 2001. Translocation portals for the substrates and products of a viral transcription complex: the bluetongue virus core. *EMBO J.* 20 (24), 7229–7239.
- Ghabrial, S.A., 1994. New developments in fungal virology. *Adv. Virus Res.* 43, 303–388.
- Ghabrial, S.A., 1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16 (1), 119–131.
- Ghabrial, S.A., Havens, W.M., 1992. The *Helminthosporium victoriae* 190S mycovirus has two forms distinguishable by capsid protein composition and phosphorylation state. *Virology* 188 (2), 657–665.
- Ghabrial, S.A., Bibb, J.A., Price, K.H., Havens, W.M., Lesnaw, J.A., 1987. The capsid polypeptides of the 190S virus of *Helminthosporium victoriae*. *J. Gen. Virol.* 68 (7), 1791–1800.
- Ghabrial, S.A., Soldevila, A.I., Havens, W.M., 2002. Molecular genetics of the viruses infecting the plant pathogenic fungus *Helminthosporium victoriae*. In: Tavanantzis, S. (Ed.), *dsRNA Genetic Elements*. CRC Press, Boca Raton, pp. 213–236.
- Ghabrial, S.A., Jiang, D., Castón, J.R., 2005. Chrysovirus. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 591–595.
- Grimes, J.M., Burroughs, J.N., Gouet, P., Diprose, J.M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P.P., Stuart, D.I., 1998. The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* 395 (6701), 470–478.
- Heymann, J.B., 2001. Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 133 (2–3), 156–169.
- Huang, S., Ghabrial, S.A., 1996. Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (22), 12541–12546.
- Huang, S., Soldevila, A.I., Webb, B.A., Ghabrial, S.A., 1997. Expression, assembly, and proteolytic processing of *Helminthosporium victoriae* 190S totivirus capsid protein in insect cells. *Virology* 234 (1), 130–137.
- Jiang, D., Ghabrial, S.A., 2004. Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum* virus: reconsideration of the taxonomy of the genus *Chrysovirus*. *J. Gen. Virol.* 85 (7), 2111–2121.
- Johnson, J.E., Reddy, V.S., 1998. Biggest virus molecular structure yet!. *Nat. Struct. Biol.* 5 (10), 849–854.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., Pelletier, S.L., 1992. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In: Harding, S.E., Rowe, A.J., Horton, J.C. (Eds.), *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 90–125.
- Lawton, J.A., Estes, M.K., Prasad, B.V., 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.* 4 (2), 118–121.
- Lawton, J.A., Estes, M.K., Prasad, B.V., 2000. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv. Virus Res.* 55, 185–229.
- Lin, K., Simossis, V.A., Taylor, W.R., Heringa, J., 2005. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics* 21 (2), 152–159.

- McGuffin, L.J., Bryson, K., Jones, D.T., 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16 (4), 404–405.
- Mertens, P., 2004. The dsRNA viruses. *Virus Res.* 101 (1), 3–13.
- Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R.B., Johnson, J.E., 2002. L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat. Struct. Biol.* 9 (10), 725–728.
- Nakagawa, A., Miyazaki, N., Taka, J., Naitow, H., Ogawa, A., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Higashi, T., Watanabe, Y., Omura, T., Cheng, R.H., Tsukihara, T., 2003. The atomic structure of rice dwarf virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins. *Structure* 11 (10), 1227–1238.
- Patton, J.T., Spencer, E., 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277 (2), 217–225.
- Patton, J.T., Jones, M.T., Kalbach, A.N., He, Y.W., Xiaobo, J., 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 71 (12), 9618–9626.
- Petersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25 (13), 1605–1612.
- Reddy, V.S., Natarajan, P., Okerberg, B., Li, K., Damodaran, K.V., Morton, R.T., Brooks III, C.L., Johnson, J.E., 2001. Virus Particle Explorer (VIPER), a website for virus capsid structures and their computational analyses. *J. Virol.* 75 (24), 11943–11947.
- Reinisch, K.M., 2002. The dsRNA Viridae and their catalytic capsids. *Nat. Struct. Biol.* 9 (10), 714–716.
- Reinisch, K.M., Nibert, M.L., Harrison, S.C., 2000. Structure of the Reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* 404 (6781), 960–967.
- Ro, Y.T., Scheffter, S.M., Patterson, J.L., 1997. Specific in vitro cleavage of a *Leishmania* virus capsid-RNA-dependent RNA polymerase polyprotein by a host cysteine-like protease. *J. Virol.* 71 (12), 8983–8990.
- Rost, B., Sander, C., 1993. Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (16), 7558–7562.
- Sanderlin, R.S., Ghabrial, S.A., 1978. Physicochemical properties of two distinct types of virus-like particles from *Helminthosporium victoriae*. *Virology* 87 (1), 142–151.
- Saugar, I., Luque, D., Oña, A., Rodríguez, J.F., Carrascosa, J.L., Trus, B.L., Castón, J.R., 2005. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic α -helix as a molecular switch. *Structure* 13 (7), 1007–1017.
- Schuck, P., Rossmann, P., 2000. Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* 54 (5), 328–341.
- Soldevila, A.I., Ghabrial, S.A., 2000. Expression of the Totivirus *Helminthosporium victoriae* 190S virus RNA-dependent RNA polymerase from its downstream open reading frame in dicistronic constructs. *J. Virol.* 74 (2), 997–1003.
- Soldevila, A.I., Huang, S., Ghabrial, S.A., 1998. Assembly of the Hv190S totivirus capsid is independent of posttranslational modification of the capsid protein. *Virology* 251 (2), 327–333.
- Soldevila, A.I., Havens, W.M., Ghabrial, S.A., 2000. A cellular protein with an RNA-binding activity co-purifies with viral dsRNA from mycovirus-infected *Helminthosporium victoriae*. *Virology* 272 (1), 183–190.
- Stuart, K.D., Weeks, R., Guilbride, L., Myler, P.J., 1992. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (18), 8596–8600.
- Swofford, D.L., 2000. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods (software). Sinaur Associates, Sunderland, MA.
- Tang, J., Naitow, H., Gardner, N.A., Kolesar, A., Tang, L., Wickner, R.B., Johnson, J.E., 2005. The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G ‘caps’ by a viral capsid protein: a unique viral response to host defense. *J. Mol. Recognit.* 18 (2), 158–168.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25 (24), 4876–4882.
- Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., Steven, A.C., 1996. Digital image processing of electron micrographs: the PIC system—III. *J. Struct. Biol.* 116 (1), 61–67.
- van Holde, K., 1985. *Physical Biochemistry*. Englewood Cliffs, N.J.
- Wang, A.L., Yang, H.M., Shen, K.A., Wang, C.C., 1993. Giardavirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (18), 8595–8599.
- Wickner, R.B., 2001. Viruses of yeast, fungi, and parasitic microorganisms. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B., Strauss, S.E. (Eds.), *Fields. Virology* 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 629–658.

Infectious Bursal Disease Virus Capsid Assembly and Maturation by Structural Rearrangements of a Transient Molecular Switch[∇]

Daniel Luque,¹ Irene Saugar,^{1†} José F. Rodríguez,² Nuria Verdaguer,³ Damiá Garriga,³
Carmen San Martín,¹ Javier A. Velázquez-Muriel,¹ Benes L. Trus,⁴
José L. Carrascosa,¹ and José R. Castón^{1*}

Departments of Structure of Macromolecules¹ and Molecular and Cellular Biology,² Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; Institut de Biologia Molecular de Barcelona/CSIC, Parc Científic de Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Spain³; and Imaging Sciences Laboratory, CIT, NIH, Bethesda, Maryland 20892-5624⁴

Received 11 January 2007/Accepted 6 April 2007

Infectious bursal disease virus (IBDV), a double-stranded RNA (dsRNA) virus belonging to the Birnaviridae family, is an economically important avian pathogen. The IBDV capsid is based on a single-shelled T=13 lattice, and the only structural subunits are VP2 trimers. During capsid assembly, VP2 is synthesized as a protein precursor, called pVP2, whose 71-residue C-terminal end is proteolytically processed. The conformational flexibility of pVP2 is due to an amphipathic α -helix located at its C-terminal end. VP3, the other IBDV major structural protein that accomplishes numerous roles during the viral cycle, acts as a scaffolding protein required for assembly control. Here we address the molecular mechanism that defines the multimeric state of the capsid protein as hexamers or pentamers. We used a combination of three-dimensional cryo-electron microscopy maps at or close to subnanometer resolution with atomic models. Our studies suggest that the key polypeptide element, the C-terminal amphipathic α -helix, which acts as a transient conformational switch, is bound to the flexible VP2 C-terminal end. In addition, capsid protein oligomerization is also controlled by the progressive trimming of its C-terminal domain. The coordination of these molecular events correlates viral capsid assembly with different conformations of the amphipathic α -helix in the precursor capsid, as a five- α -helix bundle at the pentamers or an open star-like conformation at the hexamers. These results, reminiscent of the assembly pathway of positive single-stranded RNA viruses, such as nodavirus and tetravirus, add new insights into the evolutionary relationships of dsRNA viruses.

Infectious bursal disease virus (IBDV) infects young chickens, causing a highly contagious disease that targets the precursors of antibody-producing B cells (4). This avian disease is economically relevant to the poultry industry worldwide (45). IBDV belongs to the genus *Avibirnavirus* in the family *Birnaviridae*. The IBDV virion is spherical, with a diameter of ~650 to 700 Å, and contains two double-stranded RNA (dsRNA) segments, of 3.2 and 2.8 kbp (segments A and B, respectively), and five encoded mature proteins (VP1 to VP5) (15). Most of these proteins are encoded by segment A, which has two partially overlapping open reading frames; the first one encodes a dispensable nonstructural protein, VP5 (17 kDa), and the second encodes three proteins synthesized as a polyprotein (110 kDa). Segment B has a single open reading frame encoding VP1 (98 kDa), the RNA-dependent RNA polymerase (47). The viral polyprotein is cotranslationally processed by the viral protease VP4 (5, 17), rendering the VP2 precursor, termed pVP2 (512 residues; 54.4 kDa), VP3 (29 kDa), and VP4 (27 kDa). Most of the pVP2 C-terminal region is further processed at three Ala-Ala bonds, which are secondary VP4 targets (po-

sitions 487, 494, and 501) (38). The resulting intermediate pVP2 is again cleaved, by an unknown mechanism, between residues 441 and 442, giving the mature VP2 polypeptide (47 kDa) (Fig. 1). The released C-terminal peptides remain inside the capsid (14). VP2 (and a residual amount of pVP2), representing ~50% of the total protein, is the structural component in the capsid, and VP3 (~40%) is a multifunctional protein that interacts with pVP2, dsRNA, VP1, and itself (28, 29).

IBDV has a relatively complex icosahedral capsid (protein mass, ~37 MDa) based on a single T=13 levo lattice (6, 12, 39) and formed by 260 VP2 trimers making 12 pentamers and 120 hexamers. From strict geometric considerations, VP2 trimers adopt five distinct conformations (a to e); however, contacts between VP2 trimers are all quasi-equivalent. Differences in subunit interactions and conformations are variable in all icosahedral capsids analyzed to date. The distinct conformational states may be controlled by alternatives between order and disorder of flexible regions in the protein (loops and N and C termini), ds- and ssRNA, metal ions, pHs, or combinations of all these (23). These factors, referred to as molecular switches, may be insufficient, especially when large and/or complex viruses are considered. Complex capsids require one or more auxiliary proteins (scaffold, accessory, and proteolytic proteins) acting as morphogenic factors to trigger structural changes (16, 32).

Recent studies of the IBDV capsid have resulted in progress towards understanding the molecular factors involved in assembly. Expression of mature VP2 alone results in the spon-

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, C/ Darwin no. 3, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. Phone: 34-91-5854971. Fax: 34-91-5854506. E-mail: jrcaston@cnb.uam.es.

† Present address: Cancer Research UK, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Herts EN6 3LD, United Kingdom.

[∇] Published ahead of print on 18 April 2007.

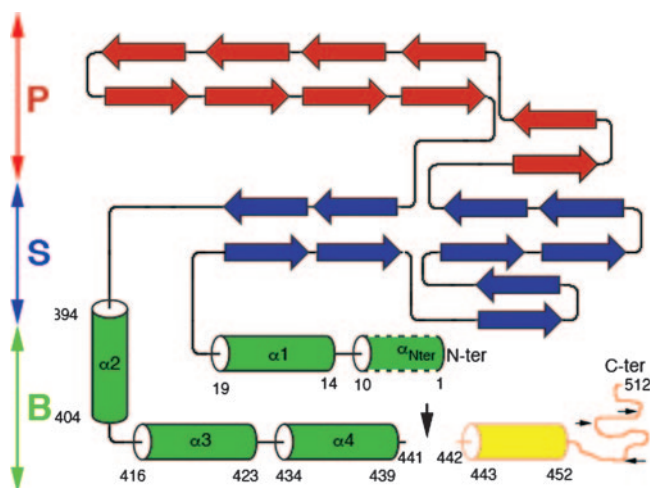


FIG. 1. Schematic topology of VP2. Domains P, S, and B are colored red, blue, and green, respectively. Major secondary structural elements are shown (with α -helices as cylinders and β -strands as arrows; 3_{10} helices were omitted). Initial and final positions of the α -helices of domain B are labeled. The α_{Nter} helix (containing residues 1 to 10) is ordered only in a VP2 subunit of the asymmetric unit in the virion capsid (12). The 71-residue C-terminal sequence (yellow) of the precursor pVP2 (512 residues), which is absent in mature VP2 (441 residues), contains the amphipathic α -helix (the 443-452 sequence) acting as a molecular switch (39). The viral VP4 protease targets are indicated by small arrows; cleavage between residues 441 and 442 is performed by an unknown mechanism (large arrow).

taneous assembly of icosahedral T=1 subviral particles (SVP) with an all-pentamer capsid, whereas pVP2 or intermediate pVP2 variant expression leads to the assembly of tubular structures with a hexagonal lattice (9, 39). The pVP2 C-terminal domain, a 71-residue sequence (Fig. 1), is responsible for allowing the formation of multiple VP2 conformations; specifically, this ability resides within the amphipathic α -helix at residues 443 to 452 (39). VP3, the other major structural protein, also participates in the inherent polymorphism of pVP2 through interaction with the pVP2 C-terminal end (36), working as a canonical scaffolding protein. In the absence of VP3, efficient T=13 capsid-like assembly can be achieved but requires a His tag bound covalently at the VP2 N terminus (chimeric protein His-VP2-466; 466 residues), which probably mimics VP3 function during virion assembly (39). Comparison of VP3 and His tag sequences revealed some degree of similarity between the VP3 C-terminal residues (DEDLE) and the acidic region of the His tag (DYDIPTTE).

The atomic structure of the T=13 virion was recently solved by X-ray crystallography to 7 Å (12), and that of the T=1 SVP capsid was resolved to 3 (12) and 2.6 Å (21, 27). The VP2 subunit is folded into three domains, termed the projection (P), shell (S), and base (B) domains (Fig. 1). Domains S and P are β -barrels, oriented such that the β -strands are tangential and radial to the particle surface, respectively. The B domain consists of N- and C-terminal α -helices that line the inner capsid surface. Domains S and B together are unexpectedly similar to the capsid proteins (CPs) of positive-sense ssRNA viruses, such as noda- and tetra- viruses (12). In this study, we investigated different IBDV-related structures at or close to subnanometer resolution, combined with VP2 atomic models.

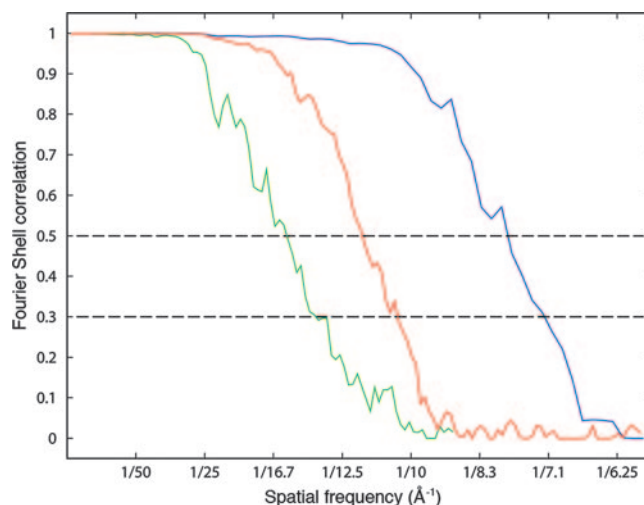


FIG. 2. Assessment of the resolutions of the T=1 SVP, virion capsid, and His-VP2-466 capsid reconstructions. FSC resolution curves were calculated for the T=1 SVP capsid (blue line), the T=13 virion capsid (red line), and the T=13 His-VP2-466 capsid (green line). Each set of particle images was subdivided randomly into two subsets, and independent reconstructions were computed from these data. The resolutions where the correlations drop below 0.5 and 0.3 are indicated. For the 0.3 threshold, the value for IBDV was 10.4 Å, that for the His-VP2-466 capsid was 14.0 Å, and that for T=1 SVP was 7.2 Å (for the 0.5 threshold, the values were 11.6, 15.4, and 7.8 Å, respectively).

The availability of three-dimensional models close to the native state allows us to define major conformational changes of specific secondary structural elements of VP2 that regulate the formation of pentamers and hexamers during the assembly process.

MATERIALS AND METHODS

Purification of virions and pVP2 deletion mutant protein-derived capsids. IBDV strain Soroa was purified from QM7 quail muscle cells (39) and stored in PES buffer [25 mM piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), pH 6.2, 150 mM NaCl, and 20 mM CaCl₂]. H5 insect cells were infected with the appropriate recombinant baculoviruses (39), and T=1 SVP and His-VP2-466 capsids were purified as described previously (9).

Cryo-electron microscopy (cryo-EM). Capsid samples (5 μ l) were applied to one side of a holey carbon film, washed twice with water, blotted, and plunged into liquid ethane following standard procedures (9, 39). Micrographs were recorded under low-dose conditions (~ 10 e⁻/Å²) in a Tecnai G2 electron microscope operating at 200 kV and equipped with a field emission gun, using a nominal magnification of $\times 50,000$ (calibrated using the 40.5-Å axial spacing of the phage T4 tail sheath).

Image analysis. General image processing operations were performed using Bsoft (<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/labr/software/bsoft/>), Xmipp (<http://xmipp.cnb.csic.es/>), and Spider (http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/). For selected micrographs analyzed (129 for IBDV particles, 82 for His-VP2-466 capsids, and 23 for T=1 SVP), defocus values determined with Bshow (<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/labr/software/bsoft/bshow/bshow.html>) ranged from 0.6 to 3.0 μ m (first zeros of the contrast transfer function [ctf] at spacings of 11 to 28 Å). A Zeiss PhotoScan TD scanner was used to digitize suitable micrographs at 7 μ m/pixel (1.4 Å at the specimen), and micrographs were binned to give 14 or 21 μ m/pixel during initial refinement steps. X3d (11) was used to manually extract particle images, including 15,793 images for IBDV particles, 1,977 images for His-VP2-466 capsids, and 26,386 images for T=1 SVP. Initial estimates of the origin and orientation angles were determined for a base set of particles, using polar Fourier transform procedures (2), taking previous maps, appropriately scaled at a 20-Å resolution, as a starting model (39). A new density map was calculated and used for all subsequent orientation and origin

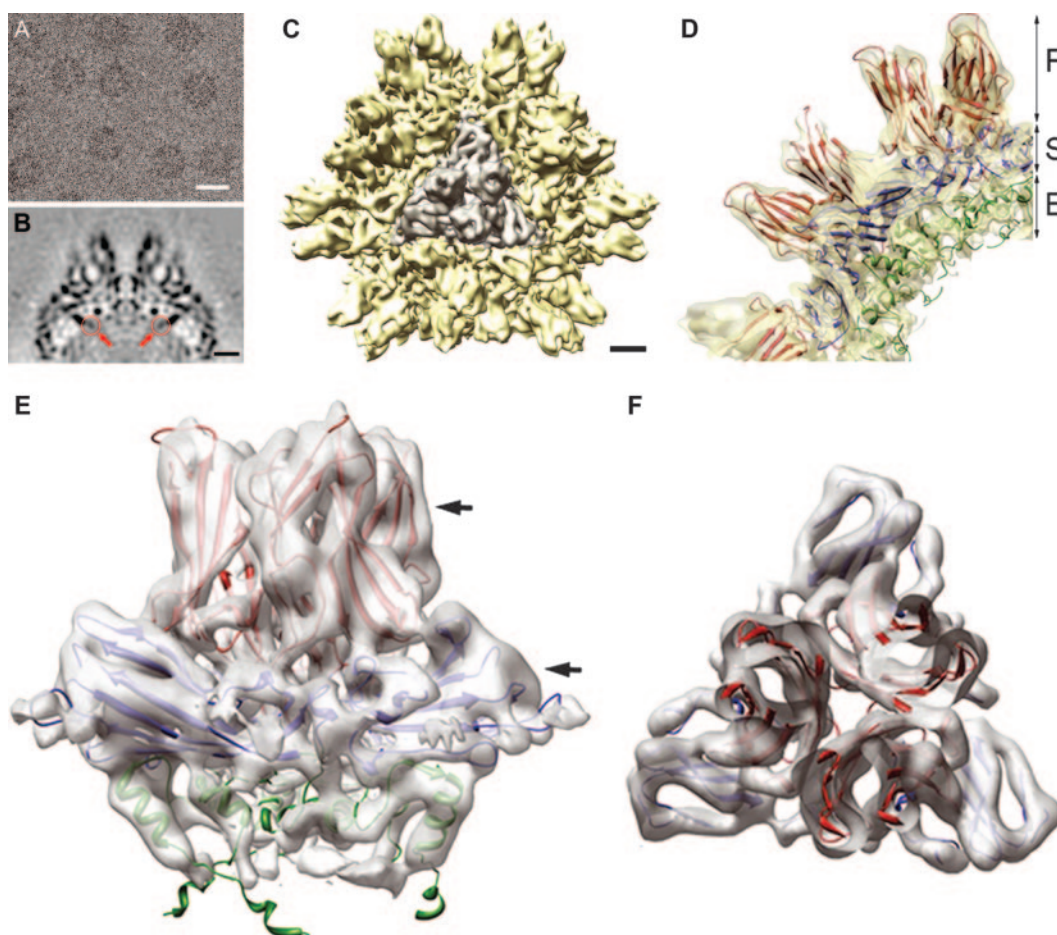


FIG. 3. T=1 SVP cryo-EM reconstruction. (A) Representative cryo-electron micrograph of T=1 SVP capsids. Bar = 200 Å. (B) Central section of the SVP map. Red arrows point to the densities (red circles) where the $\alpha 4$ helix was fitted. Bar = 25 Å. (C) Shaded surface representation of the complete SVP, at 7.2-Å resolution, with a highlighted VP2 trimer (white). Bar = 25 Å. (D) SVP 50-Å-thick slab. VP2 (PDB entry 2GSY) secondary structure elements are color coded by domain (red, P; blue, S; and green, B). (E) VP2 trimer X-ray model (PDB entry 2GSY) fitted into the corresponding density in the 7.2-Å cryo-EM map. The VP2 chain (452 residues) lacks 7 N-terminal and 11 C-terminal residues. The C-terminal $\alpha 4$ helices from adjacent VP2 chains that project towards the base of the threefold axis are not shown. Arrows indicate the cut directions to show P and S domain fits in panel F. (F) Transversal sections through P and S domains to visualize the fit of the two β -sheets. The map is contoured at 2σ above the mean density (i.e., less density is visible), showing the physical separation of the two β -sheets and a fictitious cavity (the hydrophobic core) between them.

refinements. Phases were ctf corrected by flipping them in the required lobes of the ctf with the Bsoft bctf routine. Enhancement of the high-resolution Fourier amplitudes was based on X-ray data from SVP (21) and IBDV (12) capsids and was carried out with Spider. Amplitude decay was calculated using the spatial frequency components from the cryo-EM maps (with an effective resolution determined by Fourier shell correlation [FSC]) and corresponding X-ray maps. The decay profile of the cryo-EM maps was then adjusted to match the profile of the X-ray maps, and the fitted function was applied to the cryo-EM maps in the frequency range from 245 Å to the maximum resolution achieved. A soft low-pass filter was then applied.

Three-dimensional density maps were calculated using Fourier-Bessel methods (13). The final reconstructions combined 9,483, 988, and 23,754 images for IBDV, His-VP2-466, and SVP capsids, respectively. Resolution was assessed by FSC calculated between independent half-data-set maps, applying a correlation limit of 0.5 (or 0.3). The resolutions calculated for IBDV, His-VP2-466, and T=1 SVP capsids were 11.6 Å (10.4 Å), 15.4 Å (14.0 Å), and 7.8 Å (7.2 Å), respectively (Fig. 2).

Density maps and atomic models were visualized with UCSF Chimera software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), except for Fig. 8A and B, which were made with PyMol (<http://pymol.sourceforge.net>).

Atomic model manipulation and fitting into cryo-EM maps. The crystal structures of the T=13 virion capsid and the T=1 SVP containing the first 441 VP2

residues have been determined to 7-Å and 3-Å resolutions, respectively, by Coulibaly et al. (12) (PDB entries 1WCE and 1WCD). Recently, we determined the crystal structure of the closely related T=1 SVP containing the first 452 amino acids of pVP2 at a 2.6-Å resolution (21) (PDB entry 2GSY). Situs (48; <http://situs.biomachina.org/>) and Uro (34) were used to fit the atomic structures of VP2 derived from SVP (PDB entries 2GSY and 1WCD) and the IBDV T=13 asymmetric unit (PDB entry 1WCE) to cryo-EM maps. For the T=1 SVP, both programs yielded essentially the same fits. Uro fitting was carried out on the entire cryo-EM map; each VP2 chain (PDB entry 1WCD) in the complete X-ray structure was treated independently, and icosahedral symmetry was applied. The excellent matching of the original and fitted X-ray models demonstrated that the shell and protruding spikes are stable structures. Situs fitting was carried out on local volumes encompassing the target density (segmentation of the volume corresponding to a trimer or a pentamer was done with Spider), and each X-ray model (comprising three or five VP2 chains) was treated as a single rigid body. For T=13 capsids, a similar approach was performed. Uro yielded essentially identical results with the three X-ray models used for the T=13 cryo-EM maps, with 13 independent VP2 monomers, 4 independent trimers (a to d) and a monomer (e), and the entire asymmetric unit, with a root mean square deviation between C- α positions of 1.8 Å. Situs fitting was carried out on densities comprising the asymmetric unit, a pentamer, and the two classes of hexamers for IBDV and His-VP2-466 capsids.

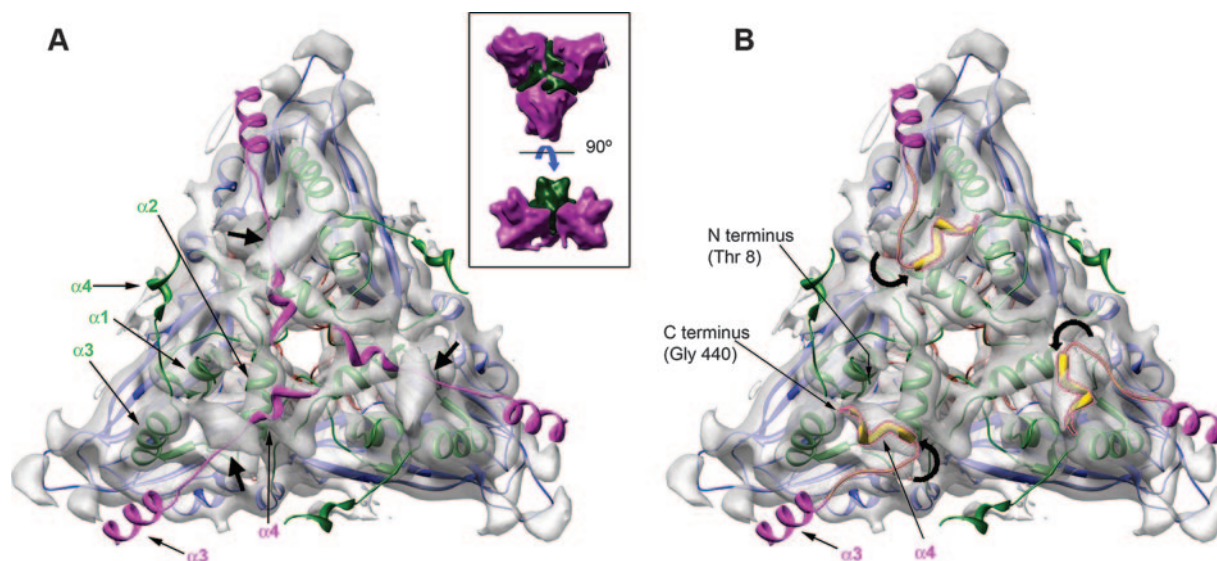


FIG. 4. Conformational flexibility of the VP2 C-terminal α -helix. (A) Bottom view (facing the inner surface of the particle) of the X-ray model of the VP2 trimer fitted into the T=1 SVP cryo-EM map. α -Helices (1 to 4) of domain B (green) are indicated for a VP2 chain. α 3 and α 4 helices of three neighboring VP2 chains (magenta) that project towards the threefold axis of the trimer are also shown (labeled for a neighboring VP2 chain). Black arrows point to the three cryo-EM densities that remained empty after fitting of the original VP2 X-ray model (PDB entry 2GSY). The schematic diagram in the inset indicates bottom and side views of four VP2 trimers after filtration to 15 Å. Note the α -helix swapping (bottom view) and bent contacts (side view) between T=1 SVP VP2 trimers. (B) Same as panel A, but the C-terminal α 4 helices of neighboring VP2 chains (shown in yellow and contoured in magenta) were remodeled to completely fill the cryo-EM density. Curved black arrows indicate that the conformational flexibility essentially involves bending the loop preceding the α 4 helix. The C-terminal α 4 helices of VP2 chains at the threefold axis are shown unaltered (green).

The T=1 SVP cryo-EM density encompassing helix α 4 at the C-terminal end of VP2 (residues 434 to 439) was revealed in a difference map. Since helix α 4 in the X-ray model did not superimpose with its corresponding rod-like density in the cryo-EM map, the following two equivalent X-ray models were used: SVP made by VP2-441 (12) (PDB entry 1WCD), in which helix α 4 is not visible, and SVP made by VP2-452 (21) (PDB entry 2GSY) after deleting the position information for the α 4 helix. Identical difference maps were obtained by subtracting either X-ray model from the cryo-EM reconstruction. Next, a region in the difference volume encompassing a VP2 trimer was used to fit the α 4 helix by the colores routine of Situs. Situs generated the same set of three nearly identical, symmetry-related results. Correlation coefficients between atomic models and cryo-EM density maps were calculated with Uro and Spider as described previously (44) and were as follows: for T=1 SVP, 89%; for the T=13 virion capsid, 85%; and for the T=13 His-VP2-466 capsid, 80%.

The helix α_{Nter} (residues 1 to 10) in pentamers of the T=13 capsids did not superimpose with their corresponding rod-like densities in the cryo-EM map. T=13 X-ray and cryo-EM maps were less comparable in the resolution range analyzed, and numerous differences existed between them (see Results). For those reasons, the helix α_{Nter} was manually fitted as a rigid body to the nearest empty density.

Connecting loops between helices α 4 and α 3 at the C terminus (for T=1 SVP) and α 1 and α_{Nter} at the N terminus (for T=13 capsids) were modeled using implementation of the Cyclic Coordinate Descent algorithm (8) included in S-flexfit (http://www.biocomp.cnb.uam.es/biocomp/public/Software/S_flexfit_web/), and geometry idealization was performed with the REFMAC5 program (33).

Electrostatic surface potentials for the VP2 pentamer and hexamer (lacking domain P) were calculated with Grasp (35). For this purpose, the 2.6-Å atomic coordinates of VP2 from a T=1 SVP were superimposed on the C- α carbon skeletons of the VP2 subunits conforming the pentamers and hexamers, determined at 7 Å. The side chain coordinates of the nonmatching residues were generated with the server MaxSprout (<http://www.ebi.ac.uk/maxsprout/index.html>).

The pVP2 amphipathic α helix (443-GFKDIIRAIR-452) was generated by using residues 241-EFRDIIDATR-250 of the *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase (PDB entry 1AMK), which have a nearly identical amphipathic character, as a template. The correct VP2 sequence was then replaced using the graphic program O (25).

Protein structure accession numbers. Density maps have been deposited in the Macromolecular Structure Database at the European Bioinformatics Institute, with accession numbers EMD-1237 for T=1 SVP, EMD-1238 for IBDV, and EMD-1239 for His-VP2-466.

RESULTS

Structure of T=1 SVP. A cryo-micrograph of T=1 SVP assembled from a 456-amino-acid pVP2 variant is shown in Fig. 3A. The final density map of the T=1 capsid was calculated to a 7.2-Å resolution (Fig. 3B and C). The molecular architecture of the dodecahedral capsid is essentially as previously described (6, 9, 12); the most prominent feature is the presence of 20 trimeric protrusions arranged equivalently (Fig. 3C). At this resolution, numerous rod-like and, less clearly, sheetlike densities are apparent (Fig. 3B and C). Secondary structural elements were identified by docking the closely related 2.6-Å VP2 X-ray map (containing the first 452 residues; PDB entry 2GSY) (21) into the cryo-EM map (Fig. 3D to F). Using two quantitative model-fitting programs, Situs (48) and Uro (34), the results were almost identical. Independently, secondary structural elements were partially identified with Helixhunter (22) as well as with Sheetminer and Sheettracer (26; not shown). The concordance of the two maps is clear in the matching of P and S domain β -barrels in the corresponding regions of the cryo-EM map, which shows β -sheets of both domains (Fig. 3E and F).

Conformational flexibility of the VP2 C-terminal α -helix. VP2 domain B (PDB entry 2GSY) is formed mainly by α -helices from N- and C-terminal extensions facing the T=1 SVP inner surface. Whereas the N-terminal α 1 and C-terminal α 2

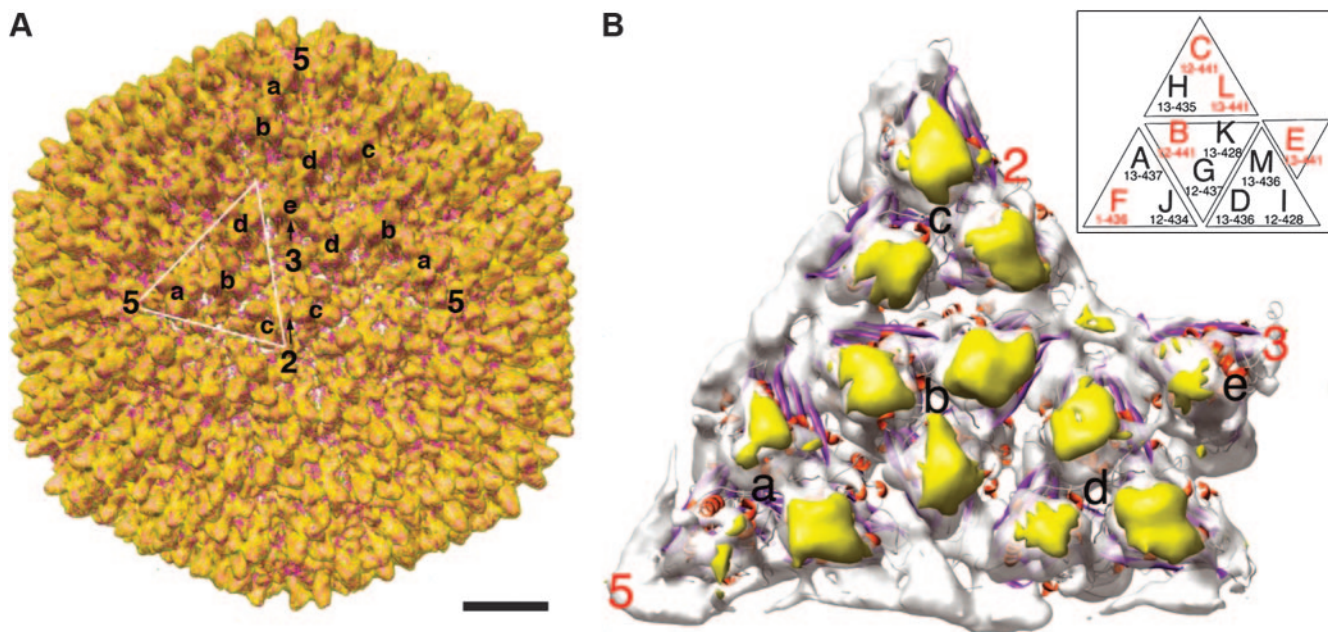


FIG. 5. Fit of the IBDV X-ray model into the virion cryo-EM map. (A) Complete capsid virion (yellow), rendered at ~ 10 Å, with the superimposed X-ray IBDV structure (magenta). The five VP2 trimer types are indicated by letters a to e; the white triangle indicates the limits of a G4 triangle. The locations of fivefold, threefold, and twofold axes are also indicated. Bar = 100 Å. (B) View from inside the capsid of the asymmetric unit X-ray model fitted into the corresponding region of the cryo-EM map. White surfaces show densities according to the X-ray model, displayed at a contour slightly lower than that of the cryo-EM map. Even at this threshold for the filtered atomic model, with P and S domains being well matched, the solid yellow densities correspond to empty cryo-EM virion densities; these densities probably arise from disordered VP2 N-terminal segments. A scheme of the asymmetric unit, seen from the inner surface, is shown in the inset. The first and last residues visible in the X-ray model are indicated for each of the 13 VP2 chains (A to M).

and $\alpha 3$ helices fitted remarkably well in the cryo-EM structure, the C-terminal α -helix $\alpha 4$ did not have a corresponding density in the cryo-EM map (Fig. 4A; also see Fig. 1). At the achieved resolution in our cryo-EM map, disordered VP2 segments remain invisible, as in the equivalent X-ray map. In the 2.6-Å-resolution map, helix $\alpha 4$ of each VP2 molecule is projected towards the threefold axis of a neighboring VP2 trimer, mediating domain swapping (21) (Fig. 4A, inset). The cryo-EM reconstructed volume shows a discernible vacant rod-shaped density located at the base of each VP2 molecule, adjacent to helix $\alpha 4$ of a neighboring VP2 molecule (Fig. 3B, red arrows, and 4A, black arrows). This rod-shaped density was the strongest feature in a difference map calculated between our cryo-EM map and a density map for a truncated version of the SVP X-ray structure in which helix $\alpha 4$ was manually deleted (data not shown). In addition, we considered that the VP2 structure in the vitrified T=1 SVP was analyzed under conditions closer to the native state than the crystallized one (e.g., in the presence of 17% polyethylene glycol and 3% isopropanol) and assumed that the $\alpha 4$ folding was maintained in both maps.

The proximity between helix $\alpha 4$ of a neighboring VP2 molecule and the rod-like density suggests the plausible possibility of fitting helix $\alpha 4$ into this rod, thus maintaining the domain swapping detected in the X-ray map (Fig. 4B) (see Materials and Methods). The proposed movement involves allowed rigid-body rotations of the C- α angles in the loop preceding helix $\alpha 4$. We cannot rule out the possibility that this movement is undergone by helix $\alpha 4$ of the same chain (rather than by that from the neighboring chain), although in this case the movement required

for the α -helix is much greater than in the former possibility. In any case, both alternatives imply that the C-terminal $\alpha 4$ helix is flexible. This conformational flexibility would be critical when temporally bound peptides are attached at the end of the $\alpha 4$ helix, as in the precursor pVP2.

Structure of the T=13 virion capsid. Although the IBDV capsid X-ray structure has been described at 7-Å resolution, detailed analysis of our cryo-EM data set allowed the observation of important differences, especially in flexible regions. The T=13 capsid density map was calculated to a resolution of ~ 10 Å (Fig. 5A). The IBDV capsid surface consists of 260 protruding VP2 trimers, arranged in five distinct conformations (a to e), on the outer surface. The asymmetric unit is formed by four trimers (a to d), termed the G4 triangle (Fig. 5A, white triangle), and one trimer e subunit. In the T=13 lattice, trimer e bridges three G4 triangles to make the 20 flat faces of the icosahedral capsid. We used Uro to position the VP2 X-ray map from the 7-Å crystal structure of the IBDV capsid (12) within the virion cryo-EM map (Fig. 5A) and Situs to analyze local volumes. Besides the excellent matching of P and S domains, the inner surface of the cryo-EM virion map showed densities beneath each B domain with no corresponding masses in the VP2 atomic models (Fig. 5B, shown in yellow). Since all VP2 N-terminal segments (comprising about 10 to 12 residues) were invisible in the X-ray structure (Fig. 5B, inset), except those of the pentameric VP2 chains (Fig. 5B, inset, F chain), we interpreted these densities as disordered VP2 N-terminal segments. Comparison of full IBDV and empty His-VP2-466 capsids supported our interpretation (see

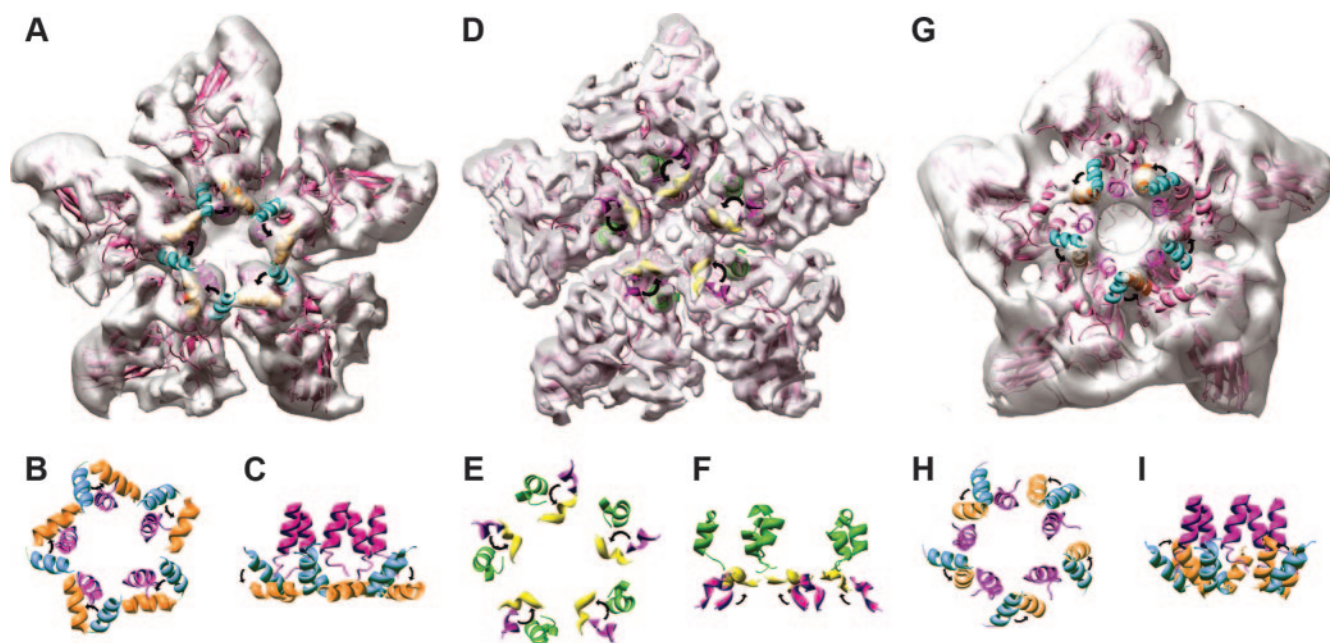


FIG. 6. VP2 pentamer X-ray model fitted into virion, SVP, and His-VP2-466 capsids. (A) A VP2 pentamer (PDB entry 1WCE; VP2 chain F lacks five C-terminal residues from position 441) was fitted into the corresponding T=13 virion pentameric cryo-EM density. The α_{Nter} helix is shown in cyan; after applying the rotation movement in the downstream loop, the α_{Nter} helix is shown in orange, as fitted to the closest empty cryo-EM density. Black arrows indicate directions of movement. (B and C) Detailed bottom (B) and side (C) views of the T=13 virion shell innermost region at the fivefold axis. α_{Nter} helix positions are color coded as in panel A. In these views, only the C-terminal $\alpha 3$ helices are shown (magenta). (D) A VP2 pentamer (PDB entry 2GSY) was fitted into the corresponding T=1 pentameric cryo-EM density. The C-terminal $\alpha 4$ helix is shown in magenta; after applying appropriate rotation movement in the preceding loop, the $\alpha 4$ helix is shown in yellow and fitted to the closest rod-shaped cryo-EM density. Black arrows show directions of movement. (E and F) Detailed bottom (E) and side (F) views of the T=1 shell innermost region at the fivefold axis. Helix $\alpha 4$ positions are color coded as in panel D. In these views, only the N-terminal $\alpha 1$ helices are shown (green). (G) A VP2 pentamer (as in panel A) was fitted in the corresponding T=13 His-VP2-466 pentameric cryo-EM density. For clarity, the helical bundle density (see text) has been removed computationally. The α_{Nter} helix is shown in cyan; after applying rotation movement to the downstream loop, the α_{Nter} helix is shown in orange and fitted into the closest empty cryo-EM density. Black arrows indicate directions of movement. (H and I) Detailed bottom (H) and side (I) views of the T=13 His-VP2-466 shell innermost region at the fivefold axis. α_{Nter} helix positions are color coded as in panels A and G. Only C-terminal $\alpha 3$ helices are shown (magenta).

below). In addition, fitting five VP2 chains into a segmented virion pentamer showed that the N-terminal α -helix (containing residues 1 to 10) (Fig. 1), which is disordered in SVP VP2, was the only secondary structural element that was outside the cryo-EM density map (Fig. 6A, cyan areas). This N-terminal α -helix, denoted α_{Nter} , fitted correctly in the nearest empty cryo-EM density by a rotation in the downstream loop (segments 11 to 13) and was positioned parallel to the inner surface of the pentamer (Fig. 6B and C, orange helices). The N-terminal α_{Nter} helix in the T=13 capsid therefore exhibits conformational flexibility, like the C-terminal $\alpha 4$ helix in the T=1 SVP capsid (Fig. 6D to F).

The molecular swapping mediated by helix $\alpha 4$ in the T=1 SVP is not present in T=13 particles, as shown both in the 7-Å X-ray structure of intact virions and in our 10-Å cryo-EM map. This feature can be explained by the coplanarity of neighboring VP2 trimers in the T=13 shell asymmetric unit (Fig. 5B), whereas VP2 trimers in the T=1 SVP form a dihedral angle of $\sim 144^\circ$, facilitating $\alpha 4$ helix swapping (Fig. 4A, inset).

Structure of the His-VP2-466 capsid. The chimeric protein His-VP2-466, containing an N-terminal His tag and the non-processed amphipathic α -helix (see scheme in Fig. 1), assembles into empty T=13, T=7, and T=1-like particles (39). We fitted the IBDV capsid X-ray model into the T=13 cryo-EM

map determined at a 14-Å resolution (Fig. 7A and B). The outer surfaces of the IBDV and His-VP2-466 capsids were almost superimposable, whereas the inner surfaces showed clear differences (39). As inferred above for virion capsids, we also detected similar extra densities beneath each VP2 domain B. These extra densities should therefore correspond to the common segments between CPs that form both T=13 capsids, i.e., the disordered N-terminal segment of VP2 chains in the asymmetric unit and, to a lesser extent, some C-terminal residues (Fig. 5B, inset).

The main structural difference is related to the densities distributed at the local sixfold (120) and fivefold (12) axes in the His-VP2-466 capsid, which are absent in the IBDV capsid (Fig. 7A and B, cyan helices). These densities were mostly attributable to the C-terminal amphipathic α -helix (443-GFK-DIIRAIR-452) (Fig. 7B, inset), since His tags tend to form a long loop or random coiled regions (18, 30). We consequently modeled and manually fitted the amphipathic α -helices in these extra densities following two different arrangements, namely, a compact bundle of five α -helices at the fivefold axis and an open star-like ring of six α -helices at the local sixfold axis (Fig. 7A and B, shown in blue). A bundle of five amphipathic α -helices not only accounts for the egg-like densities at the fivefold axes but is also stabilized by interactions among the

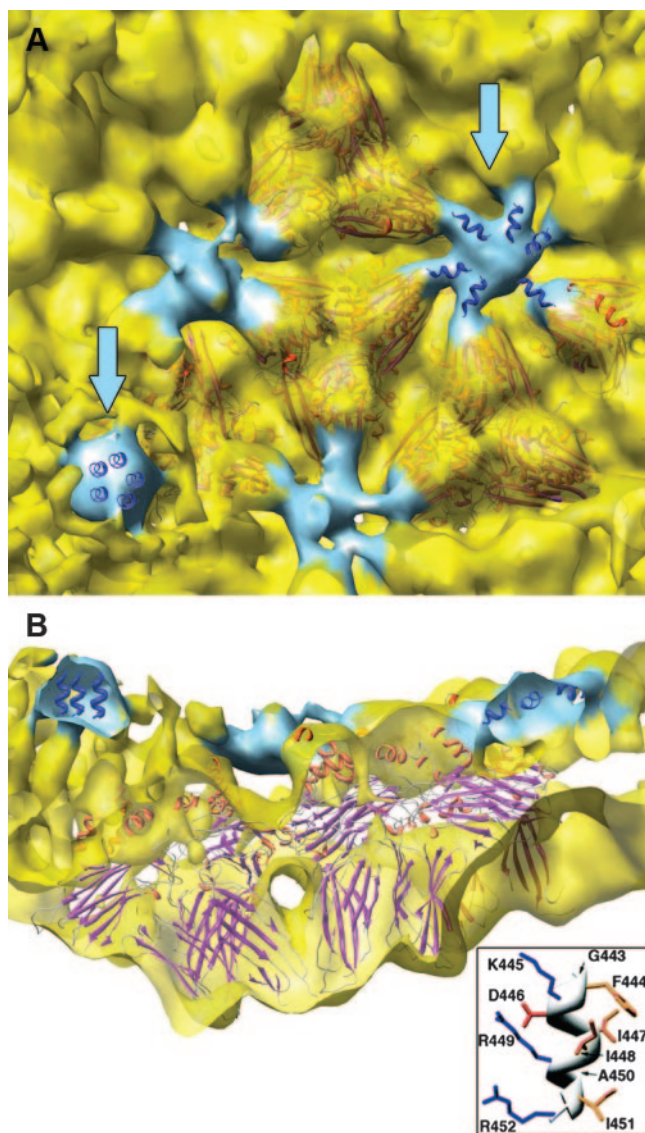


FIG. 7. Fit of the virion asymmetric unit into the chimeric His-VP2-466 cryo-EM map. (A) Inner surface view of the X-ray model of the asymmetric unit fitted into the corresponding region of the T=13 His-VP2-466 cryo-EM map. Cyan surfaces indicate 4 of the 132 (12 pentameric and 120 hexameric densities) difference densities calculated by subtracting IBDV from the His-VP2-466 capsid. Cyan arrows indicate the difference densities used to model and fit five and six amphipathic α -helices (segment 443-452 of pVP2 [blue]) at a fivefold axis (bottom left) and a quasi-sixfold axis (top right), respectively. (B) Same as panel A, but showing a side view section of the shell. Note that the S and P domains match with their corresponding densities. The model used for the amphipathic α -helix is shown (inset).

hydrophobic surfaces of the helices, which would therefore be protected from the local hydrophilic environment (Fig. 8A). Following a similar approach to that used for the SVP and IBDV pentamers, we found that the VP2-466 chain helix α_{Nter} also displays conformational flexibility; α_{Nter} helices were re-oriented, making an $\sim 45^\circ$ angle with the capsid inner surface (Fig. 6G to I). This change is probably necessary to accommodate the densities corresponding to the helical bundle and the His tag.

The following two major reasons support the modeling of the amphipathic α -helices at the local sixfold axis with an “open” conformation: (i) connectivity arms with appropriate dimensions to fit an α -helix were visualized directly at the quasi-sixfold axis in the cryo-EM map (Fig. 7A and B), and (ii) inspection of the electrostatic potential at the inner surface shows the hydrophobic local environment that would favor this conformation by interacting with the hydrophobic side of the amphipathic helix (Fig. 8B). In this pseudo-atomic model of the His-VP2-466 capsid, the pentameric helical bundle protrudes inwards, since α_3 helices of the VP2 domain B form a pentameric channel with a small, ~ 20 -Å diameter (Fig. 8A and C), whereas amphipathic α -helices are partially included in a broader central region on the inner hexamer surface (Fig. 8B and D). These distinct spatial arrangements establish different relationships between adjacent VP2 trimers; VP2 trimers building the same pentamer are tilted (as in T=1 particles and native T=13 virions), making bent contacts between them (dihedral angle, $\sim 144^\circ$), whereas hexameric VP2 trimers are oriented with domain P almost orthogonal to the outer capsid surface, making flat contacts (dihedral angle, $\sim 180^\circ$) (Fig. 8A and B, insets).

DISCUSSION

Structural polymorphism and transient conformations are common in multiprotein assemblies, such as those described during cyclic reactions of chaperones (37), dynamic biomachines such as ribosomes (31) and spliceosomes (41), and virus capsid assembly and maturation (42). The IBDV assembly pathway is based on a transient molecular switch responsible for the inherent structural polymorphism of pVP2; for this reason, no vestige remains in the mature capsid indicating how this event occurred. The results indicate that the spatial conformation of the (p)VP2 C-terminal region defines whether a pentamer or a hexamer is formed. Once the C-terminal region has performed this function, it is removed, probably as a safety mechanism, to render the conformational state irreversible.

Proteolytic processing of the capsid protein precursor. The IBDV polyprotein is a fusion of precursor pVP2 with the viral protease (VP4) and the scaffolding protein (VP3). pVP2 undergoes sequential C-terminal processing events mediated by VP4. The resulting pVP2 intermediate is further cleaved by an unknown mechanism to render the mature VP2. The progressive processing of pVP2 thus seems to avoid the natural tendency of mature VP2 to assemble into all-pentameric T=1 SVP. An effective assembly pathway that avoids the dominance of aberrant assemblies would be provided by a postassembly maturation step in which virions are initially assembled as a procapsid that matures through structural transitions.

Biochemical studies of infectious pancreatic necrosis virus, a closely related birnavirus, showed the existence of a provirion (46) that matures by pVP2 processing. Postassembly maturation has been described for noda- and tetra- viruses, which assemble as provirions with T=3 (40) and T=4 (7) lattices, respectively, composed of a single α -protein. Provirion maturation is relatively slow and takes place through autocatalytic cleavage of the α -protein (49) mediated by a single aspartic acid residue. This yields the mature CP β and the γ -peptide and leads to rearrangement of the capsid subunits. Considering

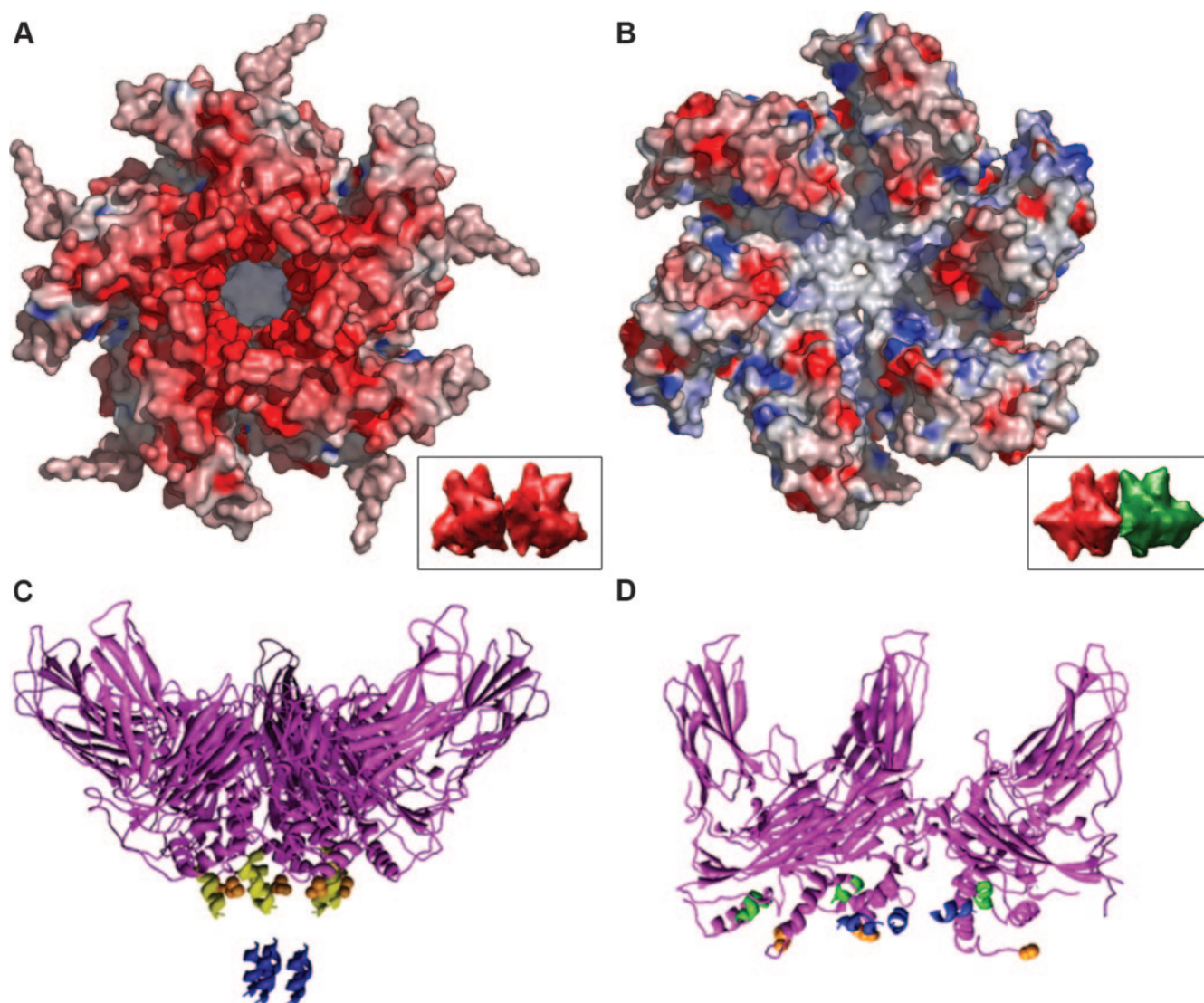


FIG. 8. Structural conformations of pVP2 amphipathic α -helix. (A and B) Inner surfaces of a pentamer (A) and a hexamer (B). Surfaces are represented with electrostatic potentials calculated with the GRASP program, showing the distributions of negative (red) and positive (blue) charges. Note the narrow channel (diameter, ~ 20 Å) formed by five $\alpha 3$ helices around the fivefold axis, in contrast with the broader channel at the quasi-sixfold axis (diameter, ~ 35 Å). The insets indicate the two classes of contacts between adjacent VP2 trimers, namely, bent at the fivefold axis (two pentameric trimers in red) or flat at the local sixfold axis (a pentameric red trimer and a hexameric green trimer). (C and D) Side views of ribbon diagrams of a VP2 pentamer (C) and a hexamer (D). For simplicity, the hexamer front half has been removed. The amphipathic α -helices are shown in blue. VP2 chains are shown in magenta, except for the last visible C-terminal amino acid, which is represented as an orange sphere. At the pentamer (C), $\alpha_{N_{\text{Ter}}}$ helices (yellow) are shown fitted as described in the legend to Fig. 6G to I. At the hexamer (D), $\alpha_{N_{\text{Ter}}}$ helices (green) are unchanged with respect to the original X-ray model.

the functional links (1) and the unexpectedly high structural similarity between CPs of IBDV and noda- and tetra- viruses (12), as well as their similarities in the assembly pathway, we postulate that VP2 autoproteolysis is the final processing event that renders the mature VP2 protein. Furthermore, VP2 has two aspartic acid residues (Asp391 and -431), either of which could act as a catalytic residue, as in the CPs of nodavirus provirions. These residues are in close proximity to VP2 Ala441, located on the interior of the protein shell and inaccessible to cellular enzymes.

Pentamer assembly. Although SVP pentamer assembly is independent of any other viral component, the corresponding

virion and His-VP2-466 capsid pentamers are built in a more physiological context, and additional factors must be considered. Comparison of almost identical pentamers from the various analyzed structures suggests that the relatively large pVP2 C-terminal domain would interfere with the fivefold contacts. This interpretation is supported by the analysis of T=1-like capsids made by His-VP2-466, whose behavior was refractory when we attempted to identify their orientations (lack of icosahedral symmetry). The structure of the T=13 His-VP2-466 capsid indicated that the VP2 C-terminal domain is processed sufficiently to allow contacts for those VP2 chains at the fivefold axis. In virion assembly, this rapid processing would pre-

clude the interaction with VP3, resulting in α -helical bundle formation. As a result, VP2 molecules associate as a pentamer in which contacts between neighbor trimers are bent. Finally, amphipathic α -helices would be removed. This is reminiscent of basic concepts from the well-established nodavirus assembly system (40). The different lattice geometry (T=13 versus T=3), together with increased complexity, indicates a more sophisticated assembly pathway for IBDV. The nodavirus capsid is formed by 60 trimers, and the CP forms two different contacts, as follows: (i) those related by icosahedral twofold symmetry axes form 60 flat contacts with a 180° dihedral angle, and (ii) those related by quasi-twofold symmetry axes form 120 bent contacts with a 144° dihedral angle. Flat contacts are due primarily to insertion of an ordered RNA duplex and, to a lesser extent, to the presence of an ordered N-terminal peptide arm in the groove between subunits (19). Kinetic studies suggested that 120 bent subunits are cleaved at a higher rate than the remaining 60 flat subunits (20). In the T=13 lattice, the contacts between VP2 trimers at the fivefold axis are similarly bent, with a dihedral angle of $\sim 140^\circ$. Rapid processing would lead to helical bundle formation that, once again, is similar to the pentameric helical bundle made by the γ -peptide in the nodavirus capsid (10). In this model, VP2 pentamers could act as nucleating centers for capsid assembly after joining additional VP2 trimers with flat contacts (see below).

The conformational flexibility of the $\alpha 4$ helix in SVP VP2 probably has a key role, when VP2 is still assembled as a pVP2 intermediate, for helical bundle formation and/or removal at the final assembly step. In the virion, most VP2 C-terminal ends remain disordered, suggesting a relaxed conformational state once the last proteolytic event has occurred.

Hexamer assembly. Coplanar contacts are formed by VP2 trimers within a G4 triangle and by the e trimer. In our model, insertion of the VP2 amphipathic α -helix into the highly hydrophobic grooves that form the broad cavity at the quasi-sixfold axes would preclude the bending of these contacts. The amphipathic α -helix has an Asp residue (Asp446) between its hydrophobic and enriched basic residue sides, which could further stabilize the dominant hydrophobic interactions (Fig. 7B, inset, and 8B). Amphipathic α -helix behavior would resemble that of the ordered N-terminal peptide arm of the nodavirus capsid. Previous analysis of pVP2 polypeptides with variable-length C-terminal extensions showed that the longer the C-terminal domain, the more probable is hexamer formation, which would produce primarily tubular structures (39). Accordingly, the C-terminal domain cleavage would be slower and thus stabilized by its interaction with VP3.

Our analysis was restricted to His-VP2-466 capsid particles similar in size to IBDV virions from a sample containing heterogeneous assemblies in equilibrium. These particles probably represent an arrested morphogenetic intermediate and may constitute a set of conformationally metastable particles. This interpretation is reflected in the density arms around the quasi-sixfold axis, which are not identical, and one of which is almost completely absent (Fig. 7A).

Conclusions. We show a scheme that summarizes our model for the IBDV assembly pathway in Fig. 9. Structural analysis of CP topology, virion architecture, and assembly between evolutionarily distant viruses revealed unexpected similarities (3). IBDV capsid assembly is controlled by scaffolding (VP3) and

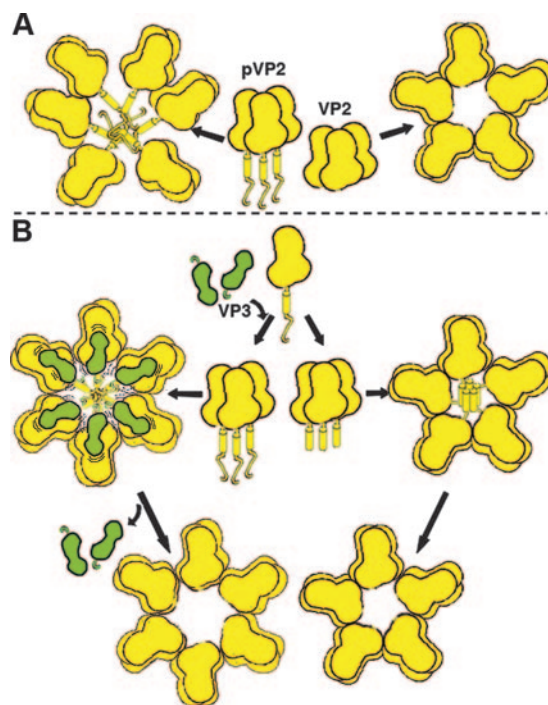


FIG. 9. IBDV assembly model. Mature VP2 is originally synthesized as a precursor, pVP2. The removable C-terminal extension (71 residues) contains the molecular switch, an amphipathic α -helix (segment 443-452), and is represented as a cylinder followed by a random coil. (A) When pVP2 (or shorter pVP2 variants) is expressed in a recombinant baculovirus system in the absence of other viral components, irregular helical tubes (all-hexamer structures) are formed (left); nonetheless, if the initial product is mature VP2, T=1 all-pentamer capsids form spontaneously (right). (B) The processing rate of the pVP2 C-terminal extension determines whether the C-terminal region (shown as a loop) of VP3 (green) can interact with pVP2. If processing is rapid, amphipathic α -helices associate to form a bundle, and a pentamer is formed with bent contacts between VP2 trimers (for simplicity, only a monomer is shown). In contrast, slow processing allows a longer, stable interaction between VP2 and VP3 C termini. Wavy lines indicate the dynamism of the VP3 interaction with VP2; six VP3 chains temporally stabilize hexamer formation between VP2 trimers with flat contacts, but the interaction ratio between pVP2 intermediates and VP3 might be higher.

proteolytic (VP4 and possibly VP2) proteins that degrade short CP-specific sequences in consecutive events. This, together with the VP2 C-terminal flexibility, triggers interactions of the amphipathic α -helix for VP2 assembly into hexamers or pentamers. Interactions via amphipathic α -helices may be a common feature of macromolecular complex activation (24) and, as found for HIV assembly (43), may serve as an attractive target for future antiviral strategies. Our data for the IBDV assembly pathway reinforce the recently suggested evolutionary relationships between birnavirus and positive-strand ssRNA viruses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Baker, J. Conway, J. B. Heymann, and A. C. Steven for sharing reconstruction software and programming assistance, M. Valle for critically reading the manuscript, and C. Mark for editorial help.

D.L.B. was supported by an FPI fellowship from the Spanish Ministry of Education (MEC). J.R.C. was the holder of a contract from the Ramón y Cajal Programme (MEC). This work was supported by grants

BFU2005-06487 and BIO2002-00517 from the Spanish Dirección General de Investigación (MEC) and by the Intramural Research Program of the NIH, Center for Information Technology. Support from EU contract LSHG-CT-2004-502828 is acknowledged.

REFERENCES

- Ahliquist, P. 2005. Virus evolution: fitting lifestyles to a T. *Curr. Biol.* **15**:R465–R467.
- Baker, T. S., and R. H. Cheng. 1996. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J. Struct. Biol.* **116**:120–130.
- Bamford, D. H., J. M. Grimes, and D. I. Stuart. 2005. What does structure tell us about virus evolution? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:655–663.
- Becht, H. 1980. Infectious bursal disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **90**:107–121.
- Birghan, C., E. Mundt, and A. E. Gorbalenya. 2000. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* **19**:114–123.
- Böttcher, B., N. A. Kiselev, V. Y. Stel'Mashchuk, N. A. Perevozchikova, A. V. Borisov, and R. A. Crowther. 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* **71**:325–330.
- Canady, M. A., M. Tihova, T. N. Hanzlik, J. E. Johnson, and M. Yeager. 2000. Large conformational changes in the maturation of a simple RNA virus, *nudaurelia capensis* ω virus (N ω V). *J. Mol. Biol.* **299**:573–584.
- Canutescu, A. A., and R. L. Dunbrack, Jr. 2003. Cyclic coordinate descent: a robotics algorithm for protein loop closure. *Protein Sci.* **12**:963–972.
- Castón, J. R., J. L. Martínez-Torrecuadrada, A. Maraver, E. Lombardo, J. F. Rodríguez, J. I. Casal, and J. L. Carrascosa. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* **75**:10815–10828.
- Cheng, R. H., V. S. Reddy, N. H. Olson, A. J. Fisher, T. S. Baker, and J. E. Johnson. 1994. Functional implications of quasi-equivalence in a T=3 icosahedral animal virus established by cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *Structure* **2**:271–282.
- Conway, J. F., B. L. Trus, F. P. Booy, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and A. C. Steven. 1993. The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J. Struct. Biol.* **111**:222–233.
- Coulibaly, F., C. Chevalier, I. Gutsche, J. Pous, J. Navaza, S. Bressanelli, B. Delmas, and F. A. Rey. 2005. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* **120**:761–772.
- Crowther, R. A. 1971. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **261**:221–230.
- Da Costa, B., C. Chevalier, C. Henry, J. C. Huet, S. Petit, J. Lepault, H. Boot, and B. Delmas. 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* **76**:2393–2402.
- Dobos, P., B. J. Hill, R. Hallett, D. T. Kells, H. Becht, and D. Teninges. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* **32**:593–605.
- Dokland, T. 2000. Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Struct. Fold Des.* **8**:R157–R162.
- Feldman, A. R., J. Lee, B. Delmas, and M. Paetzel. 2006. Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J. Mol. Biol.* **358**:1378–1389.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo, and N. Verdaguier. 2004. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **279**:47212–47221.
- Fisher, A. J., and J. E. Johnson. 1993. Ordered duplex RNA controls capsid architecture in an icosahedral animal virus. *Nature* **361**:176–179.
- Gallagher, T. M., and R. R. Rueckert. 1988. Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J. Virol.* **62**:3399–3406.
- Garriga, D., J. Querol-Audí, F. Abaitua, I. Saugar, J. Pous, N. Verdaguier, J. R. Castón, and J. F. Rodríguez. 2006. The 2.6-angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J. Virol.* **80**:6895–6905.
- Jiang, W., M. L. Baker, S. J. Ludtke, and W. Chiu. 2001. Bridging the information gap: computational tools for intermediate resolution structure interpretation. *J. Mol. Biol.* **308**:1033–1044.
- Johnson, J. E. 1996. Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:27–33.
- Johnston, C. A., F. S. Willard, M. R. Jezyk, Z. Fredericks, E. T. Bodor, M. B. Jones, R. Blaesiuss, V. J. Watts, T. K. Harden, J. Sondek, J. K. Ramer, and D. P. Siderovski. 2005. Structure of G α (11) bound to a GDP-selective peptide provides insight into guanine nucleotide exchange. *Structure* **13**:1069–1080.
- Jones, T., and M. Kjeldgaard. 1997. Electron density map interpretation, p. 173–208. *In* C. Carter and R. Sweet (ed.), *Macromolecular crystallography*, vol. B. Academic Press, London, United Kingdom.
- Kong, Y., X. Zhang, T. S. Baker, and J. Ma. 2004. A structural-informatics approach for tracing β -sheets: building pseudo-C(α) traces for β -strands in intermediate-resolution density maps. *J. Mol. Biol.* **339**:117–130.
- Lee, C. C., T. P. Ko, C. C. Chou, M. Yoshimura, S. R. Doong, M. Y. Wang, and A. H. Wang. 2006. Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: implications in virion assembly and immunogenicity. *J. Struct. Biol.* **155**:74–86.
- Maraver, A., R. Clemente, J. F. Rodríguez, and E. Lombardo. 2003. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.* **77**:2459–2468.
- Maraver, A., A. Oña, F. Abaitua, D. Gonzalez, R. Clemente, J. A. Ruiz-Díaz, J. R. Castón, F. Pazos, and J. F. Rodríguez. 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* **77**:6438–6449.
- McCarthy, A. A., N. A. Peterson, R. Knijff, and E. N. Baker. 2004. Crystal structure of MshB from *Mycobacterium tuberculosis*, a deacetylase involved in mycothiol biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **335**:1131–1141.
- Mitra, K., and J. Frank. 2006. Ribosome dynamics: insights from atomic structure modeling into cryo-electron microscopy maps. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**:299–317.
- Morais, M. C., M. Fisher, S. Kanamaru, L. Przybyla, J. Burgner, B. A. Fane, and M. G. Rossmann. 2004. Conformational switching by the scaffolding protein D directs the assembly of bacteriophage ϕ X174. *Mol. Cell* **15**:991–997.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin, A. Lebedev, K. S. Wilson, and E. J. Dodson. 1999. Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallogr. D* **55**:247–255.
- Navaza, J., J. Lepault, F. A. Rey, C. Alvarez-Rua, and J. Borge. 2002. On the fitting of model electron densities into EM reconstructions: a reciprocal-space formulation. *Acta Crystallogr. D* **58**:1820–1825.
- Nicholls, A., K. A. Sharp, and B. Honig. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**:281–296.
- Oña, A., D. Luque, F. Abaitua, A. Maraver, J. R. Castón, and J. F. Rodríguez. 2004. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* **322**:135–142.
- Ranson, N. A., D. K. Clare, G. W. Farr, D. Houldershaw, A. L. Horwich, and H. R. Saibil. 2006. Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**:147–152.
- Sánchez, A. B., and J. F. Rodríguez. 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* **262**:190–199.
- Saugar, I., D. Luque, A. Oña, J. F. Rodríguez, J. L. Carrascosa, B. L. Trus, and J. R. Castón. 2005. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure* **13**:1007–1017.
- Schneemann, A., V. Reddy, and J. E. Johnson. 1998. The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology. *Adv. Virus Res.* **50**:381–446.
- Stark, H., and R. Luhrmann. 2006. Cryo-electron microscopy of spliceosomal components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**:435–457.
- Steven, A. C., J. B. Heymann, N. Cheng, B. L. Trus, and J. F. Conway. 2005. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:227–236.
- Ternois, F., J. Sticht, S. Duquerroy, H. G. Krausslich, and F. A. Rey. 2005. The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:678–682.
- Valle, M., A. Zavalov, J. Sengupta, U. Rawat, M. Ehrenberg, and J. Frank. 2003. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**:123–134.
- van den Berg, T. P., N. Eterradossi, D. Toquin, and G. Meulemans. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.* **19**:509–543.
- Villanueva, R. A., J. L. Galaz, J. A. Valdes, M. M. Jashes, and A. M. Sandino. 2004. Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **78**:13829–13838.
- von Einem, U. I., A. E. Gorbalenya, H. Schirmeier, S. E. Behrens, T. Letzel, and E. Mundt. 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **85**:2221–2229.
- Wriggers, W., and S. Birmanns. 2001. Using Situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J. Struct. Biol.* **133**:193–202.
- Zlotnick, A., V. S. Reddy, R. Dasgupta, A. Schneemann, W. J. Ray, Jr., R. R. Rueckert, and J. E. Johnson. 1994. Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue. *J. Biol. Chem.* **269**:13680–13684.