



Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

**Anàlisi estructural de partícules i proteïnes del
virus de la bursitis infecciosa**

TESI DOCTORAL UPF / 2009

Damià Garriga i Rigau

Directora de la tesi: Núria Verdaguer i Massana

IBMB-CSIC

“Així funcionava, res de màgia... Però, al seu moment, *havia sigut* màgic. I les coses no deixen de ser màgiques només pel sol fet que descobreixis com es fan.”

(The Wee Free Men, de Terry Pratchett)

“Al cap i a la fi – va continuar en Melmoth-, l’escepticisme és un començament. No heu de creure en el que no entengueu. Heu d’entendre el que us creieu.”

(Les ovelles de Glennkill, de Leone Swann)

AGRAÏMENTS

Arribats a aquest punt, ara que sembla que ja s'acaba, és hora de posar-se romàntic i aprofitar que aquest serà l'únic tros que es llegirà tothom per a dir-vos **Moltes gràcies!** als que m'heu ajudat al llarg d'aquests sis (¿sis? ja?) anys, tant a dins com a fora del laboratori.

Primer de tot, als **meus pares**, que sempre són al meu costat. Gràcies per animar-me a seguir, gràcies per seguir intentant entendre la meua feina (“*A veure, torna'm a explicar això que dius que feu...*”). Gràcies pels consells, les correccions (sí, mare, sí) i els tuppers.

Gràcies també a la **Núria Verdguer**, per tot el que m'ha ensenyat, però sobretot per la seva confiança i suport al llarg d'aquest temps. I per donar sempre una oportunitat a les meves teories, per molt paranoiques que semblin.

A mis otros Jefes-a-ratos del CNB, **Paco Rodríguez** y **Pepe (JR) Castón**, gracias por las oportunidades que me habéis dado y por las horas y horas de discusiones científicas (y no tan científicas).

També vull agrair a la resta de Jefatura que he tingut, la **Juana Díez** i en **Pepe Rodríguez**, que em donessin l'oportunitat de treballar amb ells i que em deixessin aprendre a fer ciència en els seus laboratoris.

Al **Xavi Xifró (de Borbó)**, per ensenyar-me tot el que un bon becari ha de saber...

Als meus companys de penes del laboratori de la UPF, amb qui només vaig passar un any però el vaig viure com si fossin molts més: l'**Antonio**, amb qui sempre es pot comptar, l'**Encarna**, en **Jordi**, la **Patri**, la **Isabel**, en **Ferran** i, sobretot, la **Txell**, guia espiritual, confident oficial i parella de tango incansable.

I a l'**Esther**, la **Lourdes**, la **Glòria**, l'**Olga** i en **Tomàs**, pels sopars de xafarderies i consells amorosos... Torneu d'una vegada, que us enyoro!

A los de los Madriles, por su acogida. Aunque no se sepan mi nombre...

A **Aitor**, mi incansable suministrador, con quién aprendí (y bebí) mucho. A la **Nere**, por las ikerianas tardes de megaterios y misterios en Lavapiés 71... Dale recuerdos a Raimundita de mi parte. A **Idoia**, por su empeño en aprender y sus ganas de discutir: la pobre Laura aún no ha olvidado nuestras sesiones de “ciencia oral”. A **Ana**, por su pegadizo optimismo. A **Dani**, por sus sabios consejos (y sus lecciones de informática). A **Laura**, por su fe en mis teorías. A la **Máster**, mi pareja de tango en el extranjero, y a **Sonia**, por poner orden en este gallinero.

Y, por supuesto, a **Susi**, por soportar nuestras invasiones, por sus cuidados y sus calditos, por sacarme siempre de parranda (aunque no aguante nada).

A tothom de CRI, per aguantar-me cada dia i ajudar-me quan calia. Gràcies a tots aquells amb qui he compartit laboratori i sincrotrons, però també cerveses, disfresses, xafardejos, festes de Gràcia, concerts de Rauxa, aventures subaquàtiques, viatges sorpresa, congressos (i pre-congressos!) i un munt d'experiències.

A en **Jordi**, per ensenyar-me el que sé de cristal·lografia, per les interminables nits de sincrotró i les inigualables nits de parranda, per aguantar les nostres bromes (i les nostres disfresses). A la **Nere**, per donar-me aire (literalment i figurada). Per la seva atenció i el seu interès per tothom. Per apuntar-se a tot, absolutament tot. A la **Babi**, capaç de tenir idees perverses i esbojarrades i de renyar-te com una germana gran. Gràcies per cuidar-me tant. A l'**Arnau**, per la seva habilitat d'emmerdar les coses (i fer-les mooolt més entretingudes). Per les hores dedicades a entendre els programes cristal·logràfics, i les cerveses consegüents per intentar oblidar-los. A l'**Anna**, per la seva espontaneïtat i la seva habilitat per curar-me el mal humor. I pels modelets dels dijous (*A la cua!*). A en **Lionel**, per solucionar-m'ho tot sempre. A la **Cris**, per portar-me a buscar austríaques desmaiades enlloc d'ensenyar-me cristal·lografia. A la **Vane**, per preocupar-se. A la **Sol**, pels corrillos del laboratori (però jo no he sigut, eh, ho ha dit ella...). A l'**Oriol**, sinònim de festa. A en **Xavi**, el nostre guia bioespiritual. Al duo **Rosa-Maria**, per revolucionar el laboratori. A la **Yuyu**, per lianta. A l'**Esther**, per aguantar els meus interrogatoris (sense fer més mala cara que la habitual). A la **Leo**, amb qui sempre es pot comptar (i que balla de meravella!). A la **Queri**, per l'ajuda i les empanades. A en **David**, en **Tiago** i l'**Anie**, pels *durs* dies de Cancún... A la **María** (la **González**), per no tenir pèls a la llengua (ni quan parlava català). A la **Mailys** i el seu esperit gracienc. A la **Cristinha**, que encara no sap on s'ha ficat. A en **Joan**, per ensenyar-me que Fortran és el culpable de gairebé tot, i per donar-me un cop de mà sempre que m'embolico amb les matrius. A la **Maite**, per llogar-me Gerència. I a en **Paco**, per deixar-nos fer de La Jarra la nostra segona residència.

Qui de veritat ha estat sempre allà (tot i que fos jo qui no hi era gaire) han estat els meus amics. Moltes gràcies **Dani**, **Nyaki**, **Rumo**, **Esteve** i **Xava** per tot el que hem viscut junts (encara que aneu convencent a la gent que tot és culpa meva...). Gràcies també a l'*expansion kit* de la Ponderosa, en **Víctor** i les **germanes Herrera**.

A l'**Aida**, la **Marta** (altre cop), en **Granfu**, l'**Eli**, la **Laia** i la resta de la secta escoltil, per totes les hores invertides en millorar el món. (Heu pillat lo del “verd associatiu”?)

A la **Malèfica del Coll**, amb qui he descobert com de divertit resulta “*preservar la cultura catalana*”.

Finalment, i sobretot, moltes gràcies **Nunu**. Gràcies per aguantar-me, ajudar-me i fer-me costat. Gràcies també per haver suportat tu el meu estrès i els meus horaris, la part menys divertida de la tesi. I moltes gràcies per la dedicació que poses en fer d'incubadora; tan de bo la **Gatxan** s'assemblés més a tu que a mi...

Clàusula de bon ús

"Queda absolutament prohibida la utilització, recerca i desenvolupament, de manera directa o indirecta, de qualsevol de les aportacions científiques pròpies de l'autor que es presenten en aquesta memòria, per part de qualsevol exèrcit del món o per part de qualsevol grup armat, per a qualsevol ús militar i per a qualsevol altre ús que atempti contra els drets humans o contra el medi ambient, si no és amb el permís escrit de totes les persones del món."

Good Use Right

"It is strictly prohibited to use, to investigate or to develop, in a direct or indirect way, any of the scientific contributions of the author contained in this work by any army or armed group in the world, for military purposes and for any other use which is against human rights or the environment, unless a written consent of all the persons in the world is obtained"

Extret de la web de la Fundació per la Pau:

<<http://www.prouinvestigacionmilitar.org/clausula.htm#dalt>>

PREFACI

Aquesta tesi ha estat realitzada principalment al Departament de Biologia Estructural de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), en el grup de virologia estructural, sota la direcció de la doctora Núria Verdguer. L'interès principal del grup de investigació està centrat en la caracterització estructural de proteïnes d'origen viral, especialment càpsides virals i complexos de replicació.

Per a poder obtenir aquesta informació estructural, la principal tècnica utilitzada al nostre grup és la cristal·lografia de proteïnes, que permet obtenir informació de l'estructura d'una proteïna (o conjunt de proteïnes) a una resolució propera a la atòmica.

En el cas concret del treball presentat en aquesta memòria, s'ha aplicat aquesta tècnica a unes partícules pseudovirals derivades del virus de la bursitis infecciosa per tal d'obtenir l'estructura tridimensional de la proteïna de la càpside, la VP2. Així mateix, també es va determinar l'estructura cristal·logràfica de la VP1, la RNA polimerasa dependent de RNA del mateix virus.

En aquesta memòria s'inclouen també alguns dels assajos d'activitat que es van realitzar per a confirmar les observacions derivades de l'anàlisi de les estructures determinades. Els assajos d'activitat presentats s'han realitzat al laboratori del doctor José Francisco Rodríguez, al Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).

RESUM

La malaltia de la bursitis infecciosa, o malaltia de Gumboro, és una patologia aviària d'origen viral que afecta principalment les cries d'aus. En les granges de cria d'aviram, el virus que la origina, l'IBDV, provoca una elevada mortalitat en els pollastres.

La determinació de l'estructura tridimensional a alta resolució de la proteïna de la càpside d'aquest virus, la VP2, ha permès caracteritzar alguns dels elements que medien l'assemblatge i l'estabilitat de la càpside viral. També s'han identificat els residus implicats en la formació de cossos d'inclusió, que confereixen resistència a les partícules virals en l'entorn extracel·lular.

D'altra banda, la determinació de l'estructura tridimensional de la polimerasa del virus, la VP1, ha aportat noves dades sobre la iniciació de la polimerització i sobre la regulació de la seva activitat per part de la VP3, la proteïna encarregada de la coordinació del cicle viral.

SUMMARY

The infectious bursal disease, also known as Gumboro disease, is an avian pathology that affects broilers and chicks. In chicken farms, this virus, called IBDV, is responsible for high mortalities.

The tridimensional structure determination at atomic resolution of this virus capsid protein, VP2, allowed us to characterize some of the elements that mediate the capsid assembly and stabilization. Furthermore, the residues implicated in the formation of inclusion bodies, that provide extra resistance to the virus in the extracellular stage, have been identified.

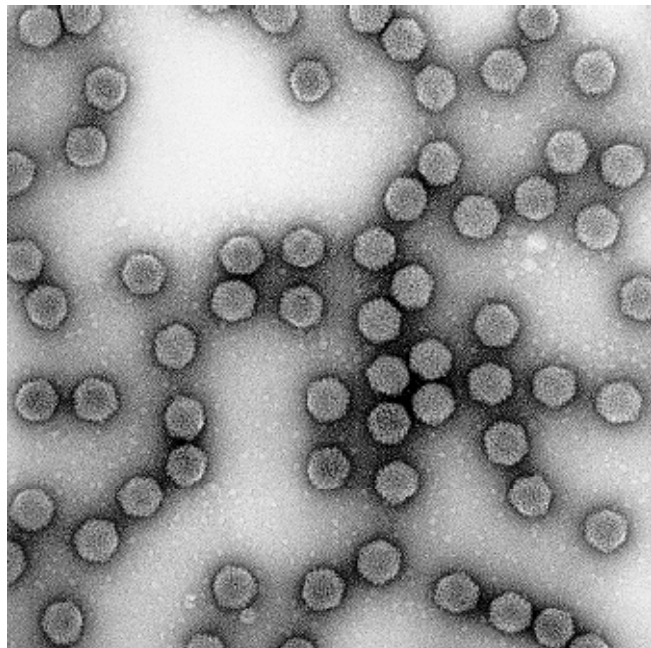
Moreover, the tridimensional structure determination of the viral polymerase, VP1 protein, brought some light on the mechanisms involved in polymerization initiation and regulation of the activity mediated by VP3, the viral cycle coordination protein.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	3
1.1 LA BURSITIS INFECCIOSA.....	5
1.2 EL VIRUS DE LA BURSITIS INFECCIOSA	7
1.2.1 Organització genòmica del virus	8
1.2.2 La VP5	9
1.2.3 La VP3	9
1.2.4 La VP4	11
1.3 LES CÀPSIDES DELS VIRUS	13
1.4 LA VP2, LA PROTEÏNA DE LA CÀPSIDE DE L'IBDV.....	16
1.5 LES POLIMERASES DELS VIRUS	18
1.5.1 El mecanisme de catàlisi de les polimerases	19
1.5.2 Les RNA polimerases dependents de RNA	21
1.5.3 Mecanismes d'iniciació de la síntesis de RNA	25
1.6 LA VP1, LA POLIMERASA DE L'IBDV.....	27
2. OBJECTIUS.....	33
3. RESULTATS	37
3.1 L'ESTRUCTURA DE LA VP2.....	39
3.1.1 Generalitats del model de la VP2.....	39
3.1.2 Generalitats del model de la SVP T=1.....	40
3.2 L'ESTRUCTURA DE LA VP1	55
3.2.1 Generalitats del model de la VP1.....	55
3.2.2 Generalitats del model del complex VP1-Mg ²⁺	57
3.2.3 Generalitats del model del complex VP1-pèptid de la VP3.....	57
3.3 L'ACTIVITAT DE LA VP1	71
3.3.1 Efecte de la VP3 en l'activitat polimerasa de la VP1	71
3.3.2 Efecte de la regió 3'UTR en l'activitat polimerasa de la VP1	72
3.3.3 Activitat guanililtransferasa de la VP1	73
4. DISCUSSIÓ	75
4.1 LA VP2.....	77

4.1.1 La formació de la càpside T13.....	77
4.1.2 L'empaquetament com a estratègia de resistència.....	82
4.1.3 El canal als eixos quinaris.....	85
4.1.4 El motiu IDA i l'entrada a l'hoste.....	86
4.2 LA VP1	89
4.2.1 El palmell girat.....	89
4.2.2 El control de l'activació de la VP1 per la VP3.....	90
4.2.3 La interacció VP1-VP3.....	92
4.2.4 La guanililació de la VP1	94
4.2.5 Model de síntesi del RNA viral	98
4.3 ESQUEMA DE LA INFECCIÓ VIRAL	102
4.4 IMPLICACIONS EVOLUTIVES.....	107
5. CONCLUSIONS	109
6. ANNEX I: METODOLOGIA	113
6.1 LA CRISTAL·LOGRAFIA DE PROTEÏNES.....	115
6.1.1 Obtenció de proteïna.....	116
6.1.2 Cristal·lització	116
6.1.3 Congelació i muntatge dels cristalls	120
6.1.4 Els rajos X.....	121
6.1.5 Interacció dels rajos X amb el cristall.....	122
6.1.6 Recollida i processat de dades	123
6.1.7 Resolució de l'estructura tridimensional	126
6.1.8 Modelat, afinament i validació de l'estructura.....	131
6.2 ASSAJOS D'ACTIVITAT POLIMERASA	132
6.3 ASSAIG DE GUANILILACIÓ	133
7. ANNEX II: ALTRES PUBLICACIONS	135
8. REFERÈNCIES.....	157
INDEX DE FIGURES I TAULES	171
GLOSSARI.....	175

1. INTRODUCCIÓ



El virus de la bursitis infecciosa

1.1 LA BURSITIS INFECCIOSA

L'any 1962, en una granja de pollastres de la localitat de Gumboro, Estats Units, es va enregistrar el primer cas conegut de la malaltia de la bursitis infecciosa o IBD (de l'anglès *Infectious Bursal Disease*) (Cosgrove, 1962). Aquesta malaltia, altament contagiosa, afectava a pollets i pollastres joves, als quals provocava la mort o deixava greument immunodeprimits.

Des de llavors, la IBD s'ha convertit en un dels principals maldecaps de la indústria avícola mundial (Muller et al., 2003; van den Berg et al., 2000).

L'agent causant d'aquesta malaltia aviària és el virus de la bursitis infecciosa, o IBDV (de l'anglès *Infectious Bursal Disease Virus*). Aquest virus infecta unes cèl·lules immunològiques immadures, els precursors dels limfòcits B, els quals usa com a hostes per a la seva replicació (Becht and Muller, 1991). En les aus, aquestes cèl·lules es concentren sobretot en la bossa de Fabrici (BF, en endavant) i per aquesta raó les lesions característiques d'una infecció d'IBDV són fruit de la necrosi d'aquest òrgan (Kaufer and Weiss, 1980), com es mostra a la figura 1.

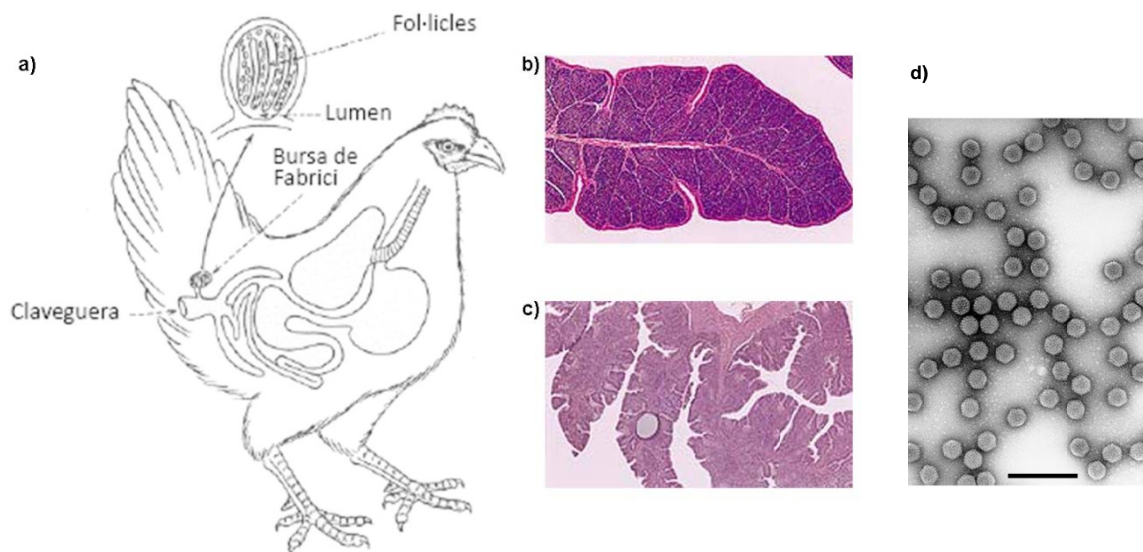


Figura 1: La bossa de Fabrici i la infecció per IBDV. a) Esquema de la situació de la bossa de Fabrici en les aus. Als dos panells del centre es comparen (b) el tall histològic d'una bossa sana i (c) el d'una bossa danyada a causa de la infecció per IBDV. Es mostra també la micrografia d'una preparació de virions d'IBDV tenyits amb acetat d'uranil (d). La barreta negra representa 100 nm.

La malaltia es presenta de dues formes clarament diferenciades, segons el nivell de maduresa del sistema immunològic de les aus infectades:

1) En cries de més de tres setmanes d'edat, la necrosi desemboca en una greu inflamació que provoca hemorràgies i lesions a la BF i als altres òrgans limfoides, fet que causa una mortalitat de fins al 30-50%.

2) En pollets de menys de tres setmanes amb baixos nivells d'anticossos materns, no es dona aquesta resposta immune, per la qual cosa la necrosi degenera en l'atròfia de la BF i la consegüent immunosupressió de les aus afectades (Muller et al., 2003).

Per tant, els pollets infectats, si no moren, queden severament immunodeprimits, amb una producció deficient d'anticossos i amb una resposta pobra als programes de vacunació. Això els deixa pràcticament indefensos davant d'altres agents patògens. Aquesta capacitat immunosupressora del virus, combinada amb la seva ràpida difusió, l'han convertit en un dels agents patògens amb més impacte negatiu en la indústria avícola.

S'han identificat dos serotips diferents d'IBDV (McFerran et al., 1980); el serotip 1 té com a hoste natural el pollastre, mentre que l'hoste del serotip 2 es considera que és el gall d'indi (Lasher and Shane, 1994). Tot i això, gràcies als estudis de detecció en sèrum d'anticossos neutralitzants contra IBDV, s'ha descobert i descrit que tots dos serotips poden infectar no només aviram domèstic, sinó també un gran nombre d'aus salvatges, tant d'hàbits migratoris com sedentaris (Ogawa et al., 1998; Wilcox et al., 1983). Això, a part de tenir un paper rellevant en la dispersió i epidemiologia del virus, pot comportar greus conseqüències en la viabilitat de les poblacions d'algunes aus salvatges. L'àmplia distribució geogràfica que ha adquirit aquest virus, present en tots els continents (com es pot observar a la figura 2), es va fer especialment patent amb la detecció d'anticossos específics contra IBDV en sèrum de pingüins de colònies antàrtiques (Gardner et al., 1997).

La situació, a més, es veu empitjorada per l'aparició a finals dels anys 80 de soques altament virulentes (vvIBDV) (Chettle et al., 1989) que arriben a causar mortalitats de fins al 70% i que s'han escampat ràpidament per tot el món (van den Berg et al., 2000).



Figura 2: Distribució de l'IBDV en el món. En el mapa es destaquen els països on s'han descrit casos d'infecció per IBDV. Adaptat de Van den Berg et al., 2000.

L'IBDV, que es transmet per via fecal-oral (Weiss and Kaufer, 1994), és molt resistent a la inactivació per calor, per dessecament o per agents químics (Edgar and Cho, 1976). Això, junt amb la seva àmplia distribució, fa que la indústria avícola consideri essencial la vacunació de l'aviram (Lutticken, 1997). De fet, aquest és l'únic tractament de què es disposa actualment per a fer front a aquest virus.

Els plans de vacunació actuals es basen en l'ús combinat de vacunes inactivades (generades amb virus inactivats) i vacunes vives (generades amb virus atenuats). Aquestes vacunacions intensives, però, presenten una sèrie de problemes, com ara l'alliberació de virus infecciosos a l'entorn, el dany de la bursa, la immunosupressió dels pollets vacunats, els problemes per diferenciar els animals vacunats dels infectats, etc. (Guittet et al., 1992; Yamaguchi et al., 2000). Urgeix, doncs, trobar mesures alternatives per a combatre l'IBDV.

La caracterització molecular de les diferents proteïnes codificades pel genoma d'aquest virus, així com de la seva funció, poden aportar informació clau que permeti el disseny de noves teràpies antivirals.

1.2 EL VIRUS DE LA BURSITIS INFECCIOSA

L'IBDV està classificat dins del gènere *Avibirnavirus*, pertanyent a la família dels *Birnaviridae* (Leong et al., 2000). En aquesta mateixa família s'hi engloben també altres virus amb característiques similars, com ara l'IPNV (*Infectious Pancreatic Necrosis Virus*) i el BSNV

(*Blotched Snakehead Virus*), que infecten peixos, el TV (*Tellina Virus*) i OV (*Oyster Virus*), que infecten mol·luscs, el RBV (*Rotifer Birnavirus*), que infecta rotífers, o el DXV (*Drosophila X Virus*), que té la mosca *Drosophila melanogaster* com a hoste (Comps et al., 1991; Da Costa et al., 2003; Dobos et al., 1979).

Els virus de la família dels *Birnaviridae* es caracteritzen per tenir una càpside icosaèdrica d'uns 60 nm de diàmetre i sense envolta, així com un genoma de RNA bicatenari (dsRNA) constituït per dos segments (anomenats A i B) (Dobos et al., 1979).

El fet de tenir el genoma dividit en dos segments permet l'intercanvi i combinació de la informació genètica entre soques virals diferents quan es dona una coinfecció (pel mecanisme conegut en anglès com a *genetic reassortment*, o intercanvi de segments). Això té un paper molt important en l'evolució dels birnavirus, la seva virulència i el rang d'hostes que poden infectar (Wei et al., 2006). D'altra banda, aquesta capacitat d'intercanviar segments genòmics implica un risc addicional en la utilització de vacunes vives, ja que aquestes poden actuar com a donants genètics i combinar-se amb altres soques més patogèniques.

D'altra banda, recentment s'ha descrit que els virions d'IBDV contenen fins a quatre segments de dsRNA genòmic (l'equivalent a dos genomes sencers o variacions amb diferents números de cada segment genòmic), és a dir, que es tractaria de virus poliploides (Luque et al., 2009a).

1.2.1 Organització genòmica del virus

En el cas d'IBDV, els segments genòmics A i B tenen 3.2 kb i 2.8 kb, respectivament (Muller and Nitschke, 1987a), i estan flanquejats per regions no codificants (UTR) a ambdós extrems 3' i 5' (Boot et al., 1999; Nagarajan and Kibenge, 1997).

El segment A té dos marcs oberts de lectura (ORF, de l'anglès *open reading frame*) parcialment solapats (Spies et al., 1989): el primer codifica per una proteïna no estructural, la **VP5** (17 kDa), implicada en patogenicitat. El segon ORF, més gran, codifica per una poliproteïna de 110 kDa. Aquesta poliproteïna s'autoprocessarà donant lloc a tres polipèptids: la **pVP2** (54 kDa – el precursor de la proteïna de la càpside), la **VP3** (28 kDa – la coordinadora del cicle viral) i la **VP4** (26 kDa – la proteasa viral).

El segment B, en canvi, codifica per una sola proteïna, la **VP1** (97 kDa.), una RNA polimerasa dependent de RNA – la responsable de la replicació i transcripció del genoma viral (Duncan et al., 1991).

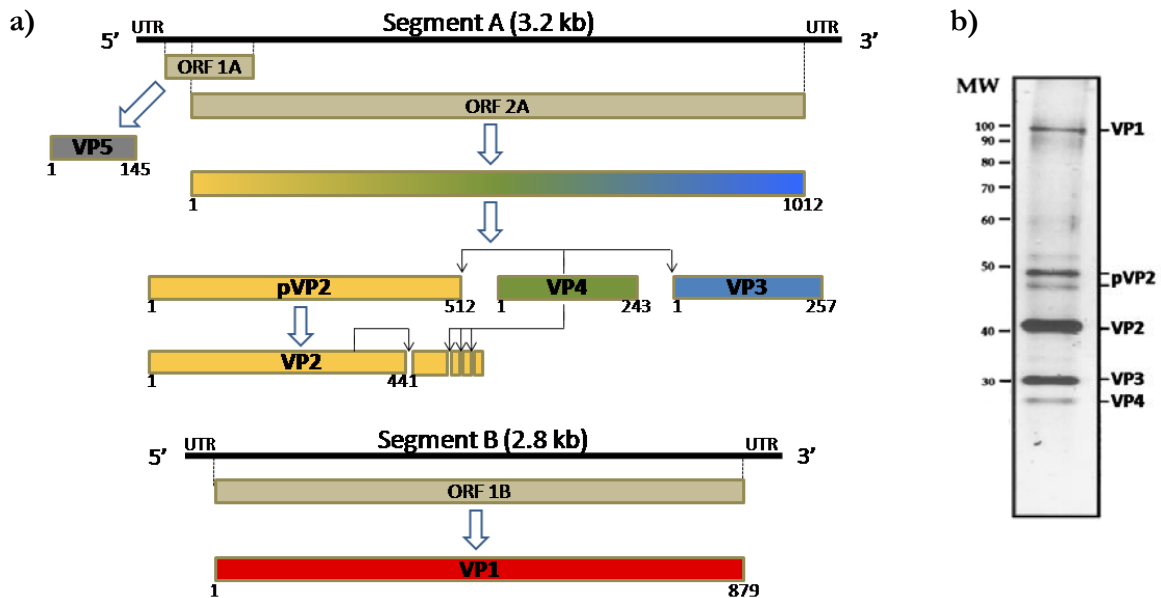


Figura 3: El genoma de l'IBDV. a) Esquema de l'organització genòmica de l'IBDV i dels processos que donen lloc a les cinc proteïnes virals per les que codifiquen els seus dos segments genòmics. **b)** Anàlisi electroforètic i tinció de plata de virions madurs d'IBDV (adaptat de Lombardo et al., 1999). Les proteïnes estructurals estan indicades a la dreta del panell: VP1 (kDa), pVP2 (kDa), VP2 (kDa), VP3 (kDa) i VP4 (kDa).

1.2.2 La VP5

També coneguda com a NS pel fet de ser una proteïna no estructural, aquesta proteïna de 145 aa és expressada durant la infecció d'IBDV, però no és incorporada en els virions assemblats (Mundt et al., 1995). De fet, la generació de mutants d'IBDV que no expressen la VP5 ha permès demostrar que aquesta proteïna no és necessària per a la replicació *in vitro* del virus (Mundt et al., 1997), però que, en canvi, és molt important per a la seva disseminació *in vivo* (i, en conseqüència, està relacionada amb la patogenicitat d'IBDV) (Yao et al., 1998).

Durant la infecció, la VP5 s'acumula a la membrana plasmàtica, a la que es creu que s'uniria per una hèlix transmembrana que s'ha predit que té a la regió central. Aquesta acumulació de VP5 altera la membrana plasmàtica (Shai, 1995), tot causant alteracions en la morfologia de la cèl·lula i la inducció de la lisi cel·lular. Això facilita l'alliberació de la progènie viral (Lombardo et al., 2000).

1.2.3 La VP3

Aquesta és una proteïna multifuncional de 256 residus (32 kDa) que està implicada en gairebé tots els processos clau del cicle viral, des de la replicació fins a la morfogènesi de la càpside. És una de les proteïnes majoritàries dels virions d'IBDV (al voltant de 400-450 molècules per partícula (Luque et al., 2009a)), cosa que ha propiciat que, fins fa poc, es considerés que aquesta proteïna formava una càpside interna T=2, com les que es troben

als virus dsRNA de la resta de famílies. Aquesta idea, a més, es veia secundada pel fet que l'extrem C-terminal de la VP3 interacciona amb el domini C-terminal de la pVP2, en una interacció essencial per al correcte assemblament de la càpside viral (Caston et al., 2001; Chevalier et al., 2004; Oña et al., 2004; Saugar et al., 2005). La determinació de l'estructura tridimensional de la càpside del virus va demostrar que no existeix tal càpside interna en els birnavirus, i que la VP3 no es troba ordenada de forma icosaèdrica en les partícules virals (Coulibaly et al., 2005).

D'altra banda, la VP3 interacciona, també per la regió més C-terminal, amb la polimerasa viral, la VP1 (Tacke et al., 2002; Tacke et al., 2000), de manera independent de la presència de RNA (Maraver et al., 2003a) i com a pas necessari per a l'encapsidació de la polimerasa (Lombardo et al., 1999). A més, per una regió rica en residus bàsics intercalats amb prolines que hi ha al domini C-terminal, just una mica més N-terminal de la regió d'interacció amb la VP1, la VP3 interacciona amb el dsRNA viral (Kochan et al., 2003; Tacke et al., 2002). De fet, en els virions, la VP3 es troba formant filaments de ribonucleoproteïnes (RNP, en endavant) amb el genoma viral, que confereixen al dsRNA protecció front les nucleases de l'hoste i que, a més, poden actuar com a nuclis transcripcionals (Hjalmarsson et al., 1999; Luque et al., 2009b).

El fet que la regió C-terminal de la VP3 acumuli tantes funcions fa que la VP3 sigui considerada una *moonlighting protein* (Luque et al., 2009b), és a dir, una proteïna capaç de dur a terme múltiples funcions, aparentment no relacionades entre elles, amb la mateixa regió de la proteïna (Jeffery, 2004; Tompa et al., 2005). Aquesta estratègia permet als virus augmentar la seva complexitat sense haver de comptar amb un major nombre de proteïnes – i sense variar, per tant, la seva capacitat codificant.

Finalment, s'ha observat també que la VP3 realitza una interacció homotípica (VP3-VP3) (Tacke et al., 2003), i que aquesta oligomerització, guiada pels 42 residus C-terminals, és un pas fonamental per a l'assemblatge de la càpside (Maraver et al., 2003b). Des de l'any passat, també disposem de l'estructura cristal·logràfica de la regió central de la VP3 (residus 92–220), a una resolució de 2.3Å (Casañas et al., 2008). Aquesta regió central està formada exclusivament per hèlix α , organitzades en dos dominis separats per un *loop* llarg. El mateix estudi determina que la unitat estructural de la VP3 és un dímer, en el qual les dues molècules de la VP3 s'associen de manera simètrica al llarg d'un eix de simetria d'ordre dos. Estudiant l'estructura del dímer, s'observa que aquesta organització es podria haver donat pel mecanisme anomenat “intercanvi de dominis” (de l'anglès *domain swapping*), en què dues o més proteïnes intercanvien part de la seva estructura per formar oligòmers (Bennett et al., 1995; Rousseau et al., 2003). En el cas de la VP3, el dímer es forma intercanviant la regió de la xarnera i del segon domini entre els dos protòmers. Així, els oligòmers descrits per a la VP3 (Maraver et al., 2003b; Tacke et al., 2003) són, en realitat, multímers de dímers de VP3.

Dels dos dominis del monòmer, el primer dirigeix la dimerització de la VP3 i no sembla estar relacionat amb cap altra proteïna o domini d'estructura coneguda. El segon domini,

en canvi, presenta similituds amb diferents factors reguladors de la transcripció, especialment amb el domini $\sigma 2$ del factor $\sigma 70$ de la bactèria *Thermus thermophilus* i el domini SRI Set2 de la histona H3 metil transferasa.

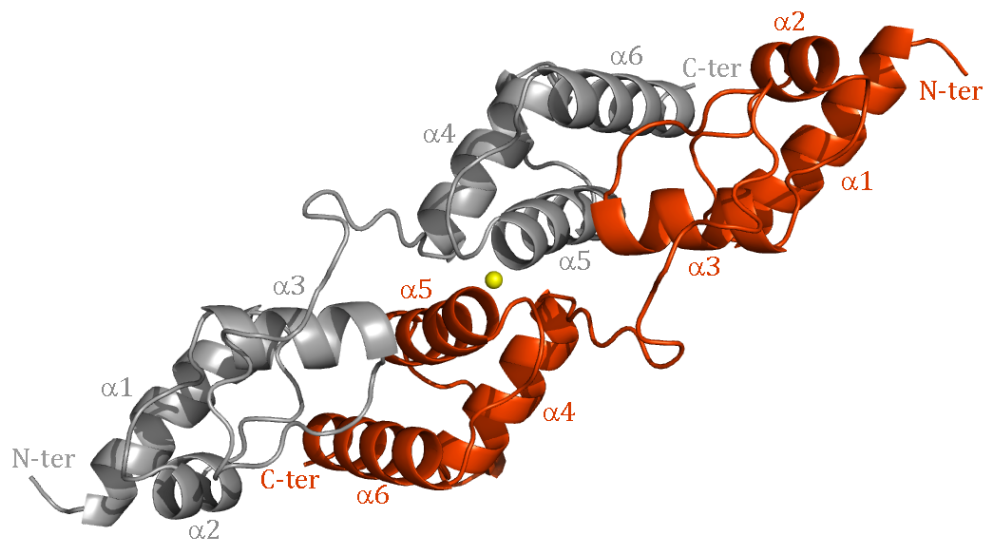


Figura 4: La VP3. Representació en cintes de l'estructura cristal·logràfica del dímer de la VP3 d'IBDV. Les subunitats, capicuaades en el dímer, estan representades una en vermell i l'altra en gris. Adaptat de Casañas et al., 2008.

1.2.4 La VP4

Sintetitzada en el context de la poliproteïna, la VP4 és la proteasa responsable de catalitzar-ne el tall proteolític de manera cotraduccional i d'alliberar així la pVP2 i la VP3 (Jagadish et al., 1988; Kibenge et al., 1997). Es considera un component estructural ja que és present en els virions d'IBDV, tot i que la seva encapsidació és variable (Luque et al., 2009a).

Recentment, s'han publicat les estructures cristal·logràfiques de la VP4 de BSNV i de IPNV (Feldman et al., 2006; Lee et al., 2007), que han confirmat que es tracta d'una proteasa Lon no canònica: està relacionada amb la família de proteases Lon, però no té el domini ATPasa que actua com a regulador de l'activitat en les proteases d'aquest tipus. Presenta una Serina i una Lisina (S652 i K692, en el cas d'IBDV) com a díada catalítica (on la lisina actua com a base general, augmentant la capacitat nucleofílica de la cadena lateral del residu serina) (Birghan et al., 2000; Lejal et al., 2000).

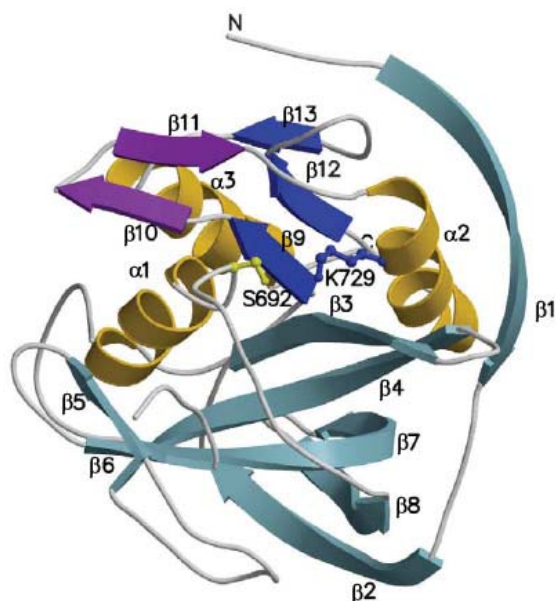


Figura 5: La VP4. Representació en cintes de l'estructura cristal·logràfica de la VP4 de BSNV. La díada catalítica –Ser 692 i Lys 729- està aquí representada en pals i boles. Adaptat de Feldman et al., 2006.

També s'ha vist que les proteases VP4 dels birnavirus tenen diferents dianes de tall, similars però específiques per a cada virus de la família. En el cas d'IBDV, la VP4 talla l'enllaç peptídic entre dos residus alanina, sent la diana de tall: (Thr/Ala)-X-Ala | Ala (Lejal et al., 2000; Sanchez and Rodriguez, 1999). Així, la VP4 talla els enllaços peptídics 512/513 i 755/756 de la poliproteïna, tot alliberant pVP2 i VP3, respectivament. Durant el procés d'assemblatge de la càpside viral, la VP4 també actua sobre altres llocs de tall secundaris de la proteïna pVP2, també dipèptids d'alanina, situats a les posicions 501, 494 i 487 (Da Costa et al., 2002; Sanchez and Rodriguez, 1999).

D'altra banda, hom creu que la VP4 podria activar, a través de la seva activitat proteolítica, l'expressió del segment B de RNA viral (que codifica per la polimerasa VP1) (Birghan et al., 2000).

En les cèl·lules infectades amb IBDV, s'ha observat que la VP4 forma uns agregats tubulars d'uns 25 nm. de diàmetre (Granzow et al., 1997). Es postula que aquests túbuls podrien servir per segrestar la proteïna una cop ja ha complert amb la seva funció – alliberar pVP2 i VP3. D'aquesta manera s'evitaria un excés d'activitat proteasa que podria causar danys a la cèl·lula hoste i als nous virions.

La **VP1** i la **VP2**, les proteïnes objectes d'estudi de la present memòria, es tractaran tot seguit amb més detall.

1.3 LES CÀPSIDES DELS VIRUS

Per tal de poder protegir i transportar el seu genoma d'una cèl·lula a una altra i d'un hoste a un altre, la majoria de virus compten amb una coberta proteica: la càpside. Per a treure el màxim profit a la seva capacitat genètica, sovint aquestes càpsides estan formades per una sola proteïna (o molt poques de diferents), capaç d'autoassemblar-se i formar, per repetició dels mateixos contactes entre les diferents subunitats, una partícula tancada i regular amb capacitat per a contenir el genoma viral (Crick and Watson, 1956).

La majoria de càpsides dels virus amb genoma ssRNA de cadena positiva, així com tots els de genoma dsRNA coneguts fins ara, presenten càpsides que segueixen una simetria icosaèdrica (Ahluwalia, 2005).

Per definició, un icosaedre presenta 20 cares triangulars, 12 vèrtexs i 30 cares, corresponents als eixos de simetria d'ordre 3, 5 i 2, respectivament. Aquest tipus de simetria es pot aconseguir assemblant, com a molt, 60 còpies d'una mateixa unitat, on totes quedaran disposades en entorns perfectament idèntics i equivalents. Ara bé, donada la mida de les càpsides virals i la de les proteïnes que les formen, les càpsides virals icosaèdriques han d'estar formades per més de 60 subunitats (Caspar and Klug, 1962). Per poder resoldre aquesta contradicció, Caspar i Klug (Caspar and Klug, 1962) van definir el **principi de quasiequivalència**: la càpside pot estar formada per un sol tipus d'unitats estructurals, tot i que aquestes no es trobaran en un entorn idèntic per a totes les subunitats, sinó que presentaran diversos tipus de contactes subunitat-subunitat; similars, però lleugerament diferents, és a dir, *quasiidèntics*.

Això, de fet, acaba significat que, mentre que en un icosaedre perfecte totes les subunitats estan organitzades al voltant de 12 eixos de simetria d'ordre 5 (generant pentàmers), en una càpside quasiicosaèdrica trobem també subunitats organitzades al voltant d'eixos d'ordre 6, formant hexàmers que s'intercalaran entre els pentàmers (que segueixen estant situats als vèrtexs i, per tant, són només 12).

Així mateix, Caspar i Klug (Caspar and Klug, 1962) també van definir el **número de triangulació T** , que descriu el nombre de subunitats contingudes en la unitat asimètrica de l'icosaedre (és a dir, el número d'entorns diferents en que poden estar les subunitats que formaran la càpside del virus). El número de triangulació es defineix com a $T = h^2 + hk + k^2$, on h i k són índexs independents que determinen el número d'hexàmers que es troben entre dos pentàmers de la càpside (és a dir, entre dos vèrtexs de la càpside).

El número de triangulació ens permet caracteritzar qualsevol càpside (quasi)icosaèdrica, sabent que totes tindran $60T$ subunitats, organitzades en $10(T-1)$ hexàmers i 12 pentàmers (Caspar and Klug, 1962).

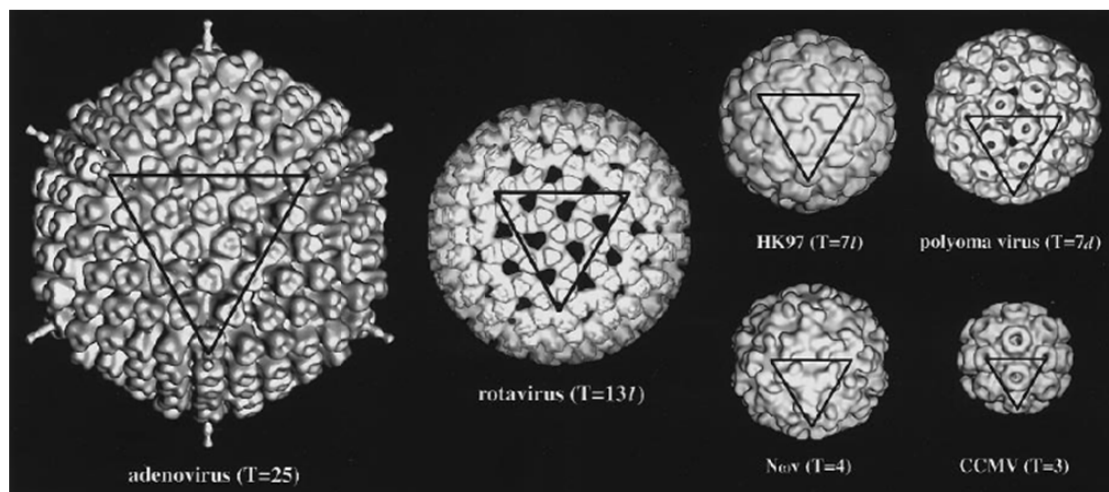


Figura 6: Exemples de càpsides virals amb diferents valors de número de triangulació T . Es mostren les reconstruccions de crioelectromicroscopia de virus amb valors de T des de 3 a 25. En cada cas, s'hi ha marcat amb un triangle l'equivalent a una cara de l'icosaedre. Es mostren les superfícies exteriors de totes les partícules tret del cas del rotavirus (centre), en que es mostra la superfície interior de la partícula per a que la simetria $T=13I$ sigui més evident. La mida dels virus mostrats va dels 285Å de diàmetre del CCMV ($T=3$) als 1000Å de diàmetre (sense comptar les espícules) de l'adenovirus ($T=25$). En general, l'augment en el número de triangulació va lligat a un augment en la mida de la partícula. Adaptat de Johnson i Speir, 1997.

Així doncs, podem visualitzar les càpsides virals com un seguit d'hexàmers de la proteïna de la càpside en què hi ha intercalats 12 pentàmers (els vèrtexs de la càpside). Seguint aquesta definició, els hexàmers es poden considerar com a organitzacions planes, mentre que els pentàmers formen organitzacions convexes, que introdueixen curvatura en el punt on estiguin inserits en la "fulla" d'hexàmers (Johnson, 1996). A nivell molecular, això implica que una única proteïna de la càpside ha de ser capaç d'adoptar més d'una conformació, en aquest cas per a poder formar tant hexàmers com pentàmers. Aquest fenomen es coneix com a *polimorfisme conformacional* (Johnson and Speir, 1997).

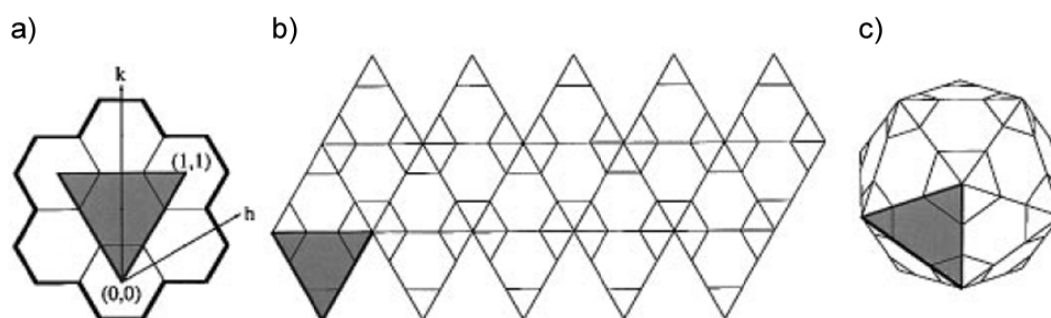


Figura 7: Construcció d'una superfície icosaèdrica quasiequivalent. (a) Un conjunt d'hexàmers formen una superfície plana, en la que podem definir un triangle equilàter entre l'origen (0,0), un punt definit pels valors de h i k - (1,1) en aquest exemple- i l'equivalent per simetria ternària. (b) Arranjant 20 triangles iguals en una xarxa hexamèrica i substituint els hexàmers dels vèrtexs per pentàmers, podem obtenir una fulla que, plegada, donarà lloc a un icosaedre quasiequivalent (c), un $T=3$ en aquest cas. Adaptat de Johnson i Speir, 1997.

En el cas concret d'IBDV, un estudi de microscopia electrònica de les seves partícules va determinar que presentava una càpside d'uns 65-70 nm amb una estructura icosaèdrica d'organització $T=13$ (*levo*) formada per 780 subunitats (780 molècules de VP2), agrupades en 260 trímers (Bottcher et al., 1997). La determinació de l'estructura cristal·logràfica del virió a 7 Å de resolució (Coulibaly et al., 2005) va permetre comprovar que la partícula viral està formada exclusivament per VP2, i que la VP3 (que fins llavors es creia que podia estar formant una segona càpside, més interna) no està organitzada en el virió, si més no seguint una disposició icosaèdrica. En aquesta estructura s'aprecia també que les molècules de VP2 s'organitzen en trímers, que s'associen entre ells de tal manera que donen a la càpside viral una forma marcadament polièdrica, amb 20 cares gairebé planes formades per 13 trímers de VP2 cada una.

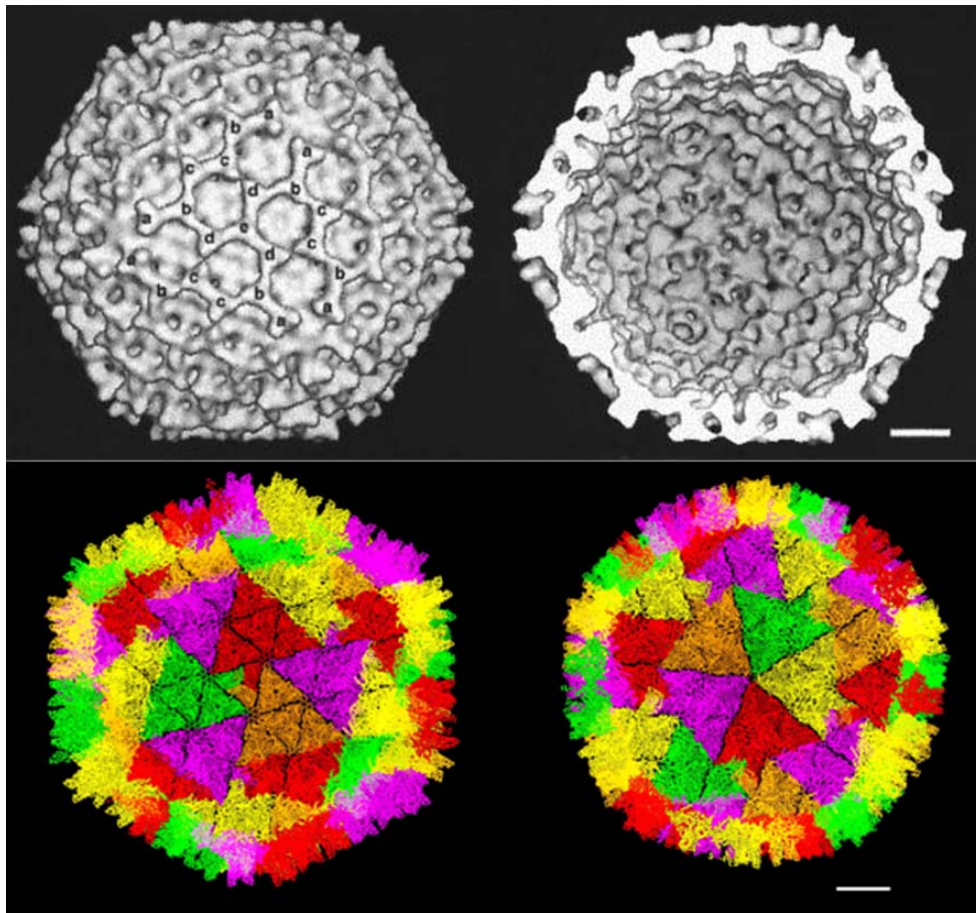


Figura 8: La càpside de l'IBDV. En la fila superior es mostra una vista de la superfície exterior (esquerra) i interior (dreta) de la reconstrucció tridimensional a 10 Å de resolució de la càpside viral de l'IBDV, resolta per criomicroscopia electrònica i vista al llarg de l'eix ternari (adaptat de Castón et al., 2001). En la fila inferior es mostra la cara interior de l'estructura cristal·logràfica de la càpside viral, resolta a 7 Å de resolució (adaptat de Coulibaly et al., 2005). Es presenta la vista al llarg de l'eix ternari (esquerra) i de l'eix quinari (dreta). Les barretes equivalen a 100 Å.

1.4 LA VP2, LA PROTEÏNA DE LA CÀPSIDE DE L'IBDV

La proteïna de la càpside s'expressa com a part de la poliproteïna codificada pel segment A. Un cop alliberada per la VP4, resta en forma de pVP2 (512 aminoàcids), el precursor de la VP2.

En algun moment de l'assemblatge de la càpside (Chevalier et al., 2002), la pVP2 pateix un altre procés proteolític, en el qual perd els 71 aminoàcids C-terminal i dona lloc a la forma madura de la VP2 (441 aminoàcids). S'ha vist que aquest procés de maduració de la pVP2 es dona en diversos esdeveniments proteolítics diferents:

- i) el processament per VP4 en un seguit de dianes secundàries, també dipèptids d'alanina, a les posicions 501, 494 i 487 (Da Costa et al., 2002; Sanchez and Rodriguez, 1999);
- ii) el tall, per acció d'una proteasa cel·lular, d'algunes de les molècules de pVP2 entre els residus 452 i 453 (Irigoyen, 2009);
- iii) el tall entre els residus 441 i 442, catalitzat pel residu Asp431 de la pròpia VP2 (és un tall autocatalític i intramolecular), que dona lloc a la forma madura de VP2 (Irigoyen et al., 2009).

Són precisament aquests 71 aminoàcids que es perden amb la maduració de la VP2 els que conformen el domini d'interacció de pVP2 amb VP3 (Oña et al., 2004), per la qual cosa, un cop madurada, la VP2 ja no interaccionarà amb la VP3. D'altra banda, s'ha descrit que els petits pèptids generats en la maduració de pVP2 romanen associats a la partícula viral (Da Costa et al., 2002), i que tenen la capacitat de deformar i perforar membranes, raó per la qual podrien estar implicats en el procés d'internalització dels virions en la cèl·lula hoste (Galloux et al., 2007).

Aquest procés de maduració de pVP2 a la VP2, però, sembla que no sempre és complet en totes les 780 molècules de la càpside, ja que l'anàlisi de virions madurs purificats mostra que totes dues formes de la proteïna de la càpside hi són presents (tot i que la proporció de pVP2 no arriba al 10%) (Luque et al., 2009a).

El desenvolupament de sistemes d'expressió *in vitro* de proteïnes d'IBDV en sistemes induïbles de baculovirus i vaccinia recombinants ha permès observar que, segons el context cel·lular en que és expressada la proteïna de la càpside, i segons si es tracta de la forma madura VP2 o del seu precursor pVP2, aquesta es pot assemblar de diferents maneres, formant estructures de morfologies molt diverses. Així, quan s'usa el sistema de vaccinia per expressar la poliproteïna (pVP2-VP4-VP3) en cèl·lules de mamífer, aquesta es processa espontàniament i dona lloc a unes partícules icosaèdriques de mida i morfologia idèntics als dels virions T=13 d'IBDV (Fernandez-Arias et al., 1998; Lombardo et al., 1999). En el

sistema d'expressió de baculovirus en cèl·lules d'insecte, la poliproteïna també es processa espontàniament, però en aquest cas, en canvi, no s'obtenen partícules T=13, sinó estructures diverses, majoritàriament estructures tubulars de tipus helicoidal d'uns 50 nm de diàmetre (Chevalier et al., 2002; Martínez-Torrecuadrada et al., 2000), resultats similars als que s'obtenen quan s'expressa directament la pVP2 (512 residus) en aquests sistemes de baculovirus (Caston et al., 2001; Saugar et al., 2005). Finalment, si s'expressa la forma madura de VP2 (441 residus) en qualsevol d'aquests sistemes, aquesta s'assembla formant SVP (de l'anglès *subviral particles*), que són càpsides icosaèdriques amb una disposició de T=1 (enlloc de la T=13 dels virions d'IBDV) (Caston et al., 2001).

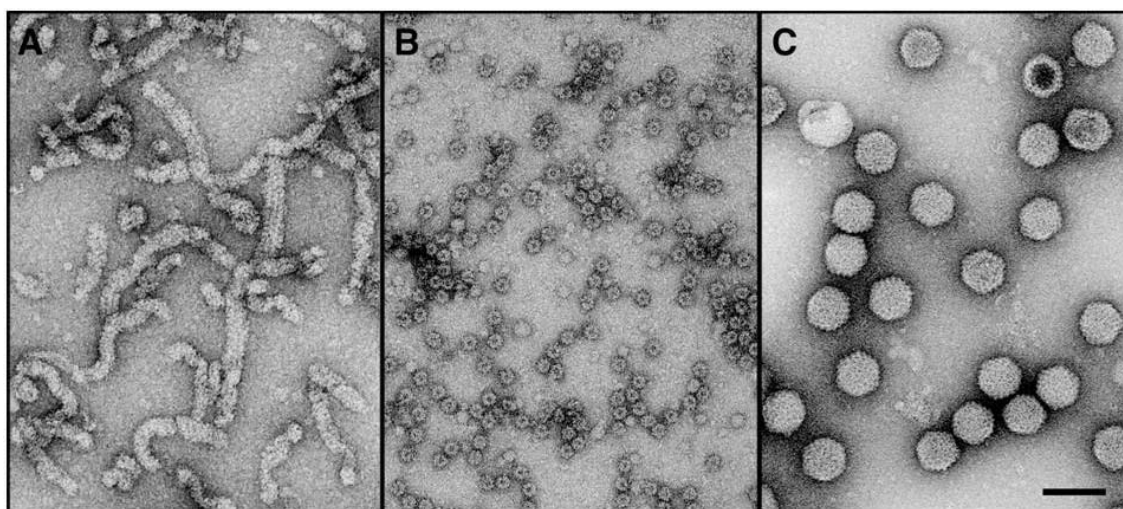


Figura 9: Diferents morfologies que pot adoptar la proteïna de la càpside de l'IBDV. Imatges de microscopia electrònica de (A) les estructures tubulars formades de pVP2, (B) les SVP de T=1 en que s'assembla la VP2 i (C) una purificació de virions d'IBDV (T=13). La barra equival a 100 nm. Adaptat de Castón et al., 2001.

Aquestes SVP estan constituïdes únicament per proteïna VP2, i per només 60 molècules d'aquesta, disposades en 20 trímers. Això fa que les SVP resultin més senzilles i regulars que les càpsides dels virions d'IBDV (Caston et al., 2001), cosa que les converteix en uns bons models per a estudiar les interaccions que s'estableixen entre les subunitats de VP2 en una càpside i per a determinar quines són les regions d'aquesta proteïna que participen en els processos d'encapsidació i desencapsidació del virus.

En ser la VP2 l'única proteïna constituent de la càpside viral, és fàcil entendre que és en aquesta proteïna on estan localitzats els residus relacionats amb les diferències d'antigenicitat dels diferents serotips d'IBDV i amb les mutacions d'escapament als anticossos neutralitzants. Els estudis de patogenicitat i virulència han permès localitzar aquests residus majoritàriament entre les posicions 206 i 350 (Schnitzler et al., 1993). Així mateix, s'ha descrit que les posicions 253, 279 i 284 estan implicades en la definició de la

virulència de la soca viral (Brandt et al., 2001; van Loon et al., 2002) i l'adaptació a cultius en teixits (Brandt et al., 2001; Lim et al., 1999; Mundt, 1999; van Loon et al., 2002).

1.5 LES POLIMERASES DELS VIRUS

El procés de còpia de la informació genètica, tant per replicació del genoma com per la transcripció d'aquest en mRNAs, es basa en l'addició de nucleòtids a una cadena polinucleotídica, seguint el patró de seqüència marcat per una altra cadena polinucleotídica que actua com a motlle. Els enzims encarregats de catalitzar aquest procés són les *polimerases*.

En general, les polimerases es classifiquen segons l'especificitat que presenten pels nucleòtids a addicionar i per la seqüència motlle que utilitzen, segons si aquests són d'àcid ribonucleic (RNA) o desoxiribonucleic (DNA). Tot i això, totes les polimerases presenten una arquitectura general molt similar que recorda la forma d'una mà dreta, on s'hi poden diferenciar els subdominis dels *dits*, el *palmell* i el *polze* (Ollis et al., 1985):

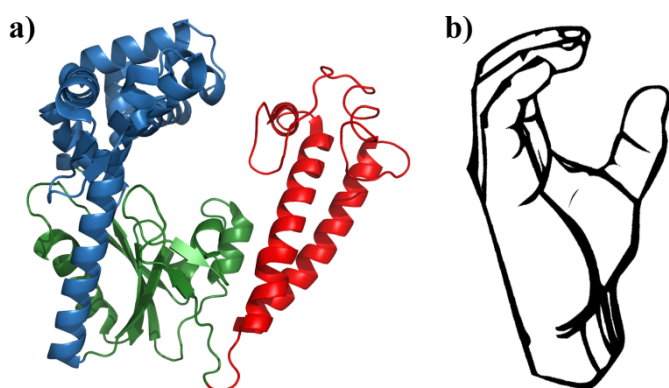


Figura 10: Forma general de les polimerases. a) Representació de cintes del fragment Klenow de la DNA polimerasa I d'*E.Coli* (codi PDB: 1D8Y). S'han usat diferents colors per a diferenciar els subdominis dels *dits* (en blau), el *palmell* (en verd) i el *polze* (en vermell). Per a facilitar la comparació, es mostra també un diagrama d'una mà dreta (b).

Aquesta forma de mà dreta, amb una cavitat central envoltada pels subdominis dels *dits*, *palmell* i *polze*, crea l'entorn adient pel posicionament correcte d'ions i de molècules substrat en el centre actiu, permeten així la catàlisi de la reacció d'addició de nucleòtids. En totes les polimerases, tant dependents de DNA com de RNA, els diferents subdominis semblen tenir una funció anàloga: el *palmell* conté els residus catalítics i és el responsable de la unió del nucleòtid entrant a l'extrem 3' de l'iniciador. El subdomini dels *dits* uneix la cadena senzilla de motlle i la dirigeix cap al centre actiu, i el del *polze* interacciona amb la doble cadena motlle- iniciador a partir del lloc de síntesi (Joyce and Steitz, 1995).

1.5.1 El mecanisme de catàlisi de les polimerases

La reacció que catalitzen les polimerases és la transferència d'un grup fosforil a una cadena nucleotídica ja formada, per via d'un atac nucleofílic del grup hidroxil 3' terminal de la cadena sobre el fosfat α d'un nucleòtid trifosfat (NTP).

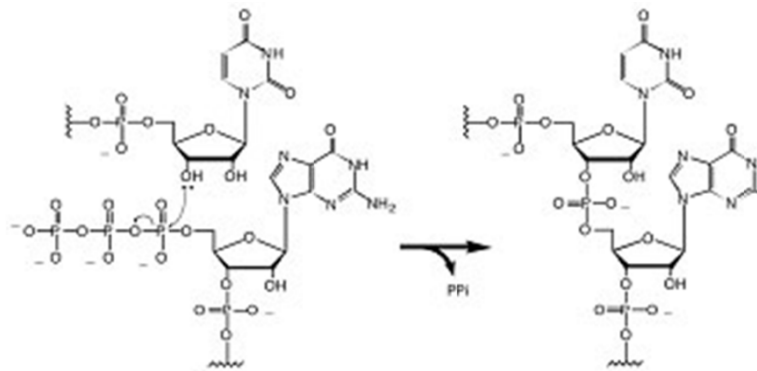


Figura 11: Esquema de la reacció de polimerització. En aquesta reacció, un atac nucleofílic, es crea un enllaç fosfodièster entre el grup hidroxil 3' de la ribosa d'un nucleòtid i el fosfat α d'un segon nucleòtid.

Aquesta reacció, vital per als organismes vius ja que en garanteix la utilització i preservació de la informació genètica, és catalitzada per un mecanisme universal (almenys segons les dades de les que disposem avui dia) i relativament senzill (Steitz, 1998). Diversos estudis estructurals sobre el fragment Klenow de la DNA polimerasa I en complex amb DNA de cadena simple o amb el producte de cadena doble (Freemont et al., 1988; Ollis et al., 1985) han permès estudiar el mecanisme que regeix la seva activitat exonucleasa 3'-5'. Així, es va veure que la polimerasa requeria de la presència de dos ions metàl·lics divalents, que prenen un paper clau en el procés de catàlisi.

Donades les similituds estructurals que hi ha entre les diferents polimerases descrites, i l'elevada conservació dels seus motius estructurals, s'ha postulat un mecanisme general de catàlisi, conegut amb el nom del **mecanisme dels dos ions**, per analogia amb el mecanisme de l'activitat exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa I (Beese and Steitz, 1991).

Segons aquest mecanisme, la catàlisi es basa en dos residus carboxílics situats al centre actiu (una zona altament conservada en totes les polimerases) que serveixen d'anclatge a un parell d'ions divalents (ió A i ió B), els quals s'encarregaran d'orientar les molècules d'aigua al centre actiu i de dissipar la càrrega negativa que es crea durant la transferència nucleotídica (vegeu la figura 12).

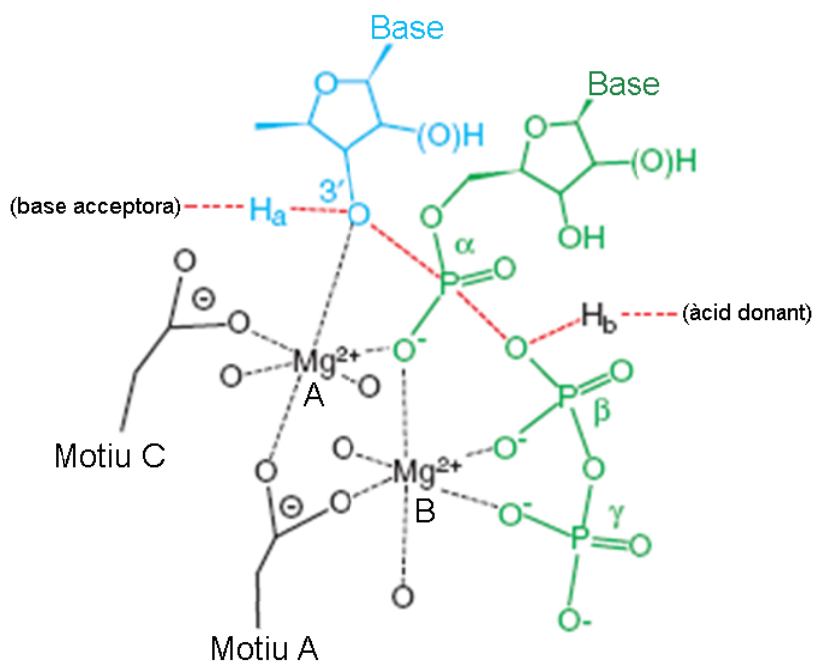


Figura 12: Mecanisme dels dos ions. Els dos ions (A i B) estan coordinats amb dos residus carboxílics (un del motiu A i l'altre del motiu C). També coordinen els grups fosfat del nucleòtid entrant i l'oxigen 3' del darrer nucleòtid de la cadena, estabilitzant així l'estat de transició previ a la formació de l'enllaç fosfodièster. La línia vermella indica el camí de la transferència electrònica. Adaptat de Castro et al., 2009.

Així, els dos residus carboxílics no estan involucrats directament en la funció de catàlisi, sinó que únicament uneixen i orienten els dos ions divalents i el substrat (una molècula d'aigua i els dos nucleòtids 3' terminals de la cadena substrat) (Steitz and Steitz, 1993). L'ió metàl·lic A promou la deprotonació de l'extrem 3' hidroxil de l'iniciador, que llavors atacarà el P α del nucleòtid que s'està incorporant. L'ió metàl·lic B estabilitza l'estat de transició pentacovalent del fosfat α del NTP i facilita la sortida del grup pirofosfat (PPi) generat (Joyce and Steitz, 1995). Aquesta catàlisi només es pot donar si els grups implicats estan situats en les posicions apropiades, cosa que ocorre quan hi ha l'aparellament Watson-Crick correcte del nucleòtid entrant amb el nucleòtid corresponent de la cadena motlle (Steitz, 1998). Un cop la reacció s'ha dut a terme i el pirofosfat alliberat s'ha dissociat de l'ió B, el RNA rota fins que l'extrem 3' de l'iniciador i queda a la posició adient per tal que tingui lloc un altre cycle catalític (Brautigam and Steitz, 1998).

Aquest mateix mecanisme s'ha postulat també per altres reaccions de transferència de fosforils (Joyce and Steitz, 1995) i s'ha vist abonat darrerament per la resolució de l'estructura de la polimerasa del bacteriòfag T7 en complex amb dNTP i amb un DNA motlle-iniciador, en què s'observen dos ions de Mg $^{2+}$ units als fosfats del dNTP entrant i als dos aspàrtics catalítics de la polimerasa (Doublié et al., 1998). Tanmateix, en la majoria de les estructures de polimerases resoltes s'hi observen només un dels dos ions.

Recentment s'ha publicat una extensió del mecanisme dels dos ions (Castro et al., 2009), on es proposa que, en l'estat de transició de la reacció de transferència del grup nucleotídic, cal que una base accepti el protó del grup hidroxil 3' de l'iniciador per tal que aquest pugui acceptar, al seu torn, el grup fosfat α del nucleòtid entrant. De la mateixa manera, cal que un àcid protoni el grup pirofosfat sortint. Els autors d'aquest estudi defensen que qui

aporta aquest protó és precisament un residu bàsic del centre actiu de la polimerasa (Ha i Hb en la figura 12).

1.5.2 Les RNA polimerases dependents de RNA

Els genomes de RNA, pel que sabem avui dia, es troben únicament en virus. Els virus amb genoma RNA es classifiquen en quatre grups: a) els virus amb genoma de cadena simple, de polaritat positiva (o +ssRNA); b) els virus amb genoma de cadena simple, de polaritat negativa (o -ssRNA); c) els virus amb RNA de cadena doble (o dsRNA); i d) els virus amb genoma RNA que usen una transcriptasa reversa per a la replicació del genoma. Tots els virus dels tres primers grups –que no tenen una fase amb DNA en el seu cicle viral – codifiquen per una RNA polimerasa dependent de RNA (RpdR, en endavant), sigui quina sigui la seva estratègia de replicació i de transcripció (Baltimore, 1971). Aquestes RpdR són, juntament amb altres proteïnes virals o provinents de la cèl·lula hoste (Lai, 1998), els enzims encarregats de dur a terme la replicació del genoma viral. De fet, els gens que codifiquen per les RpdR són els més conservats de tots els genomes virals (Koonin and Dolja, 1993), probablement per la transcendència de la reacció que catalitzen.

Abans de la publicació de l'estructura tridimensional de la polimerasa d'IBDV s'havien resolt ja les estructures d'una dotzena de RpdRs, procedents de virus de diverses famílies: la polimerasa NS5B de dos genotips del virus de l'Hepatitis C (HCV) (Ago et al., 1999; Biswal et al., 2005; Bressanelli et al., 1999; Lesburg et al., 1999), la del virus de l'oest del Nil (WNV) (Malet et al., 2007) i la RpdR del virus de la diarrea bovina viral (BVDV) (Choi et al., 2004), pertanyents a la família dels Flavivirus; les RpdRs del virus de la malaltia hemorràgica dels conills (RHDV) (Ng et al., 2002), del virus de Norwalk (Ng et al., 2004) i del sapovirus (SV) (Fullerton et al., 2007), de la família dels Calicivirus; la RpdR del bacteriòfag $\phi 6$ (Butcher et al., 2001); la del reovirus $\lambda 3$ (Tao et al., 2002); les polimerases 3D del poliovirus (PV) (Thompson and Peersen, 2004), del virus de la febre aftosa (FMDV) (Ferrer-Orta et al., 2004) i de tres serotips del virus del refredat humà (HRV) (Appleby et al., 2005; Love et al., 2004), tots tres de la família dels Picornavirus.

Comparant aquestes estructures es pot observar que, si bé totes les polimerases de DNA i RNA comparteixen una estructura bàsica, les RpdR presenten més similituds entre elles que no pas amb la resta de polimerases, tot i tenir, en general, una baixa similitud a nivell de seqüència, més enllà d'uns quants motius conservats (Bruenn, 2003).

Així, totes les RpdR presenten un seguit de característiques generals comunes. La més evident és potser la seva conformació de mà dreta tancada, en contraposició de la conformació en forma de “U” o de mà oberta que caracteritza les altres polimerases. La connexió dels subdominis dels *dits* i el *polze* que dona aquesta conformació tancada s'estableix gràcies al domini N-terminal d'aquestes proteïnes i a un seguit de *loops* que sobresurten del domini dels *dits* (anomenats, en el seu conjunt, “*puntes dels dits*”). Això fa que el centre actiu de les RpdR quedi completament encerclat (Ferrer-Orta et al., 2006b), com s'observa a la figura 13.

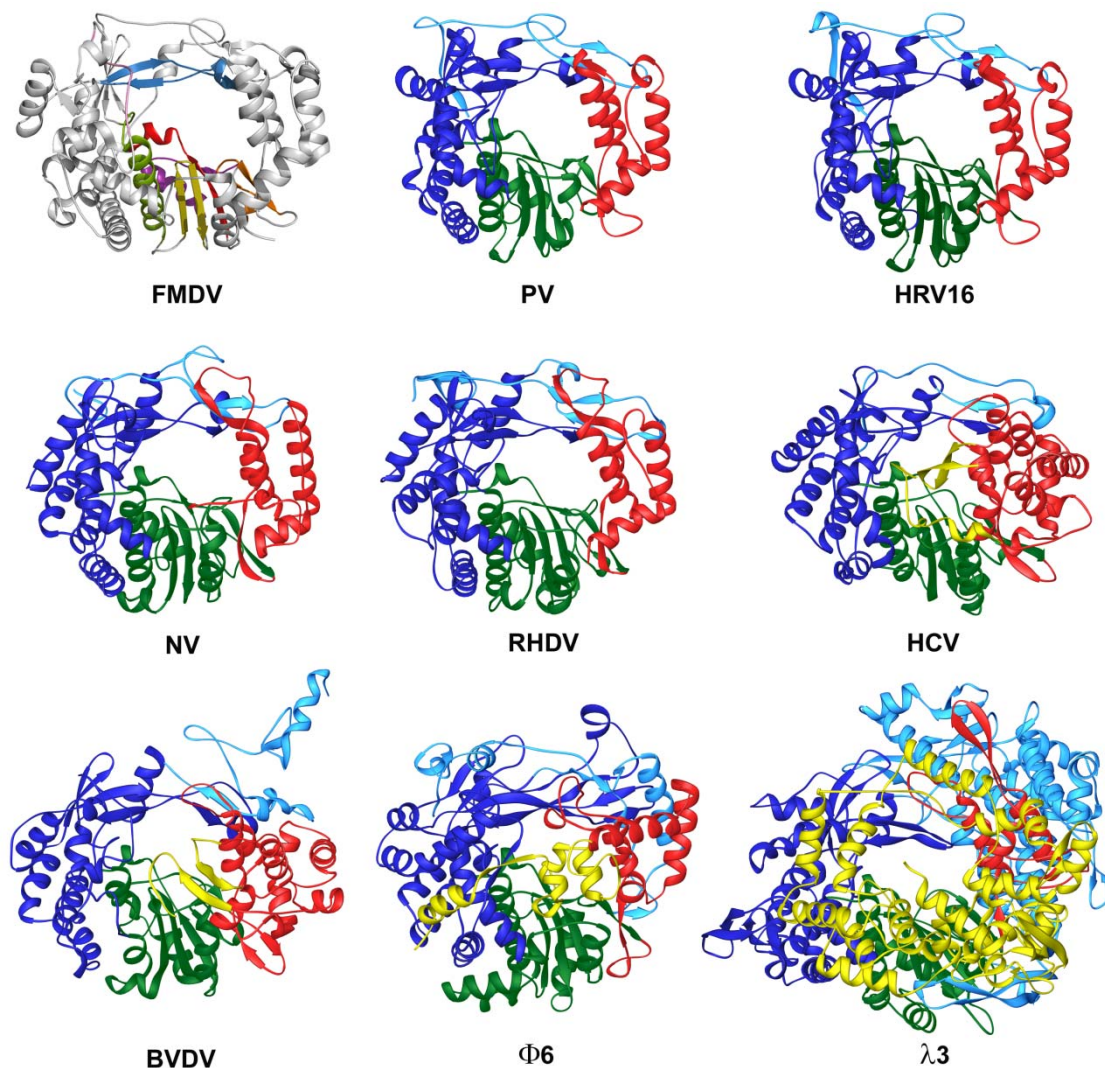


Figura 13: Les RpdR. Comparació de 9 RpdR virals, representades en cintes i mostrades en una orientació equivalent. En la polimerasa de FMDV (a dalt, a l'esquerra), s'hi ha marcat els motius polimerasa conservats: A (vermell), B (verd), C (groc), D (lila), E (taronja), F (blau) i G (rosa). En els altres casos s'hi han destacat en diferents colors els dominis polimerasa: els *dits* (blau fosc), el *palmell* (verd) i el *polze* (vermell). El domini N-terminal està destacat en blau cel i el domini C-terminal en groc. Adaptat de Ferrer-Orta et al., 2006.

Un altre element comú en les RpdR és la presència de dos túnels, un a la part de darrere de l'enzim i un altre que baixa pel subdomini dels *dits*. El primer, més curt i carregat positivament, serviria de porta d'entrada per als NTP substrat (Bressanelli 2002); la càrrega negativa dels nucleòtids entrants els faria anar interaccionant de forma seqüencial amb els residus bàsics del túnel fins a arribar al centre actiu. Aquesta podria ser, també, la via de sortida dels grups pirofosfat alliberats en la reacció de polimerització.

El segon túnel, com es va veure en l'estructura del complex d'iniciació de la RpdR de $\phi 6$ (Butcher et al., 2001) i en la de la polimerasa NS5B de HCV en complex amb un fragment de RNA (O'Farrell et al., 2003), és un canal ric en residus bàsics on s'uneix el RNA motlle. Aquest canal té l'entrada a la regió de la *punta dels dits* i s'estén pel subdomini dels *dits* fins a

arribar al centre actiu. És justament a l'entrada d'aquest canal, a la regió de la punta dels *dits*, on les RpdR presenten mecanismes encarregats d'assegurar l'entrada de forma correcta i de la cadena de RNA adequada cap al centre actiu de l'enzim i, en els virus de dsRNA, on es dóna la separació de la doble cadena (Butcher et al., 2001; Ferrer-Orta et al., 2006b; Tao et al., 2002).

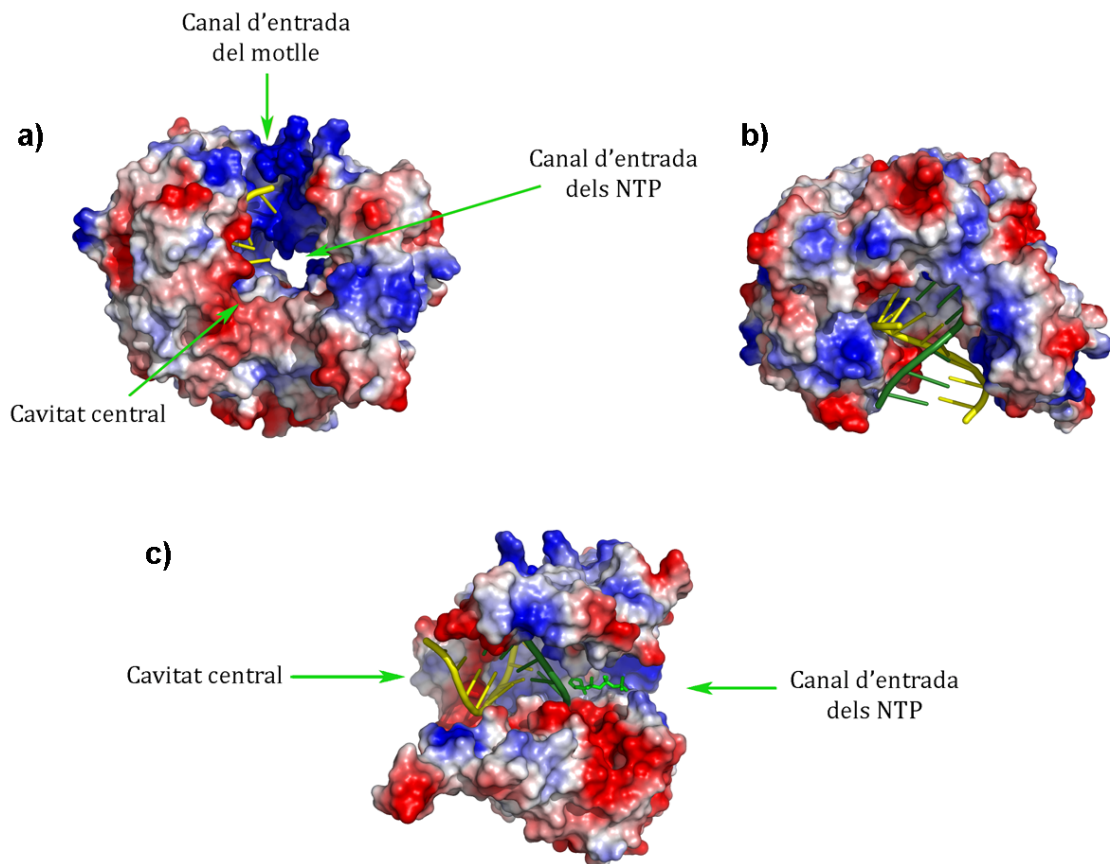


Figura 14: Els canals de les RpdR. Representació de la superfície de potencials de la polimerasa del FMDV, en que s'aprecien el canal d'entrada del RNA motlle i el d'entrada dels NTP substrat, així com la cavitat central en la que es genera el dsRNA. **a)** Vista frontal. **b)** Vista apical, des del canal d'entrada del motlle. **c)** Vista lateral (s'ha eliminat la regió del *polze*, per a facilitar la visualització del canal).

S'han pogut definir 7 motius estructurals conservats en totes les RpdRs, anomenats de la A a la G (veure figura 13). Els quatre primers (A-D) són comuns amb els altres tipus de polimerases, mentre que els altres tres són específics de les RpdR (Gorbalenya et al., 2002; Lesburg et al., 1999; Poch et al., 1989). Aquests motius estan implicats en el reconeixement i unió dels rNTPs entrants (A i B), catàlisi de la reacció de transferència de fosfats (A i C), manteniment de la integritat estructural del subdomini del *palmell* (D), posicionament de la cadena iniciadora (E), entrada i unió dels rNTPs (D i F) i entrada de la cadena motlle (F i G).

Cinc d'aquests motius (A-E) es localitzen al subdomini del *palmell*, que és, de fet, la regió més conservada entre totes les polimerases (tant les dependents de DNA com les dependents de RNA) (Delarue et al., 1990). D'aquests, el motiu A (de seqüència 'DX₄₋₅D',

en les RpdR) i el motiu C ('GDD', en les RpdR) aporten els dos residus aspàrtics (estrictament conservats en totes les polimerases) necessaris per a la unió dels dos ions divalents i són, per tant, crucials per a la catàlisi.

Catàlisi

En el cas de les RpdR, els dos residus carboxílics implicats en el mecanisme dels dos ions són dos àcids aspàrtics situats als motius A i C. Pel que fa als ions divalents, el més comú com a cofactor en la reacció d'addició nucleotídica és el Mg^{2+} . Tot i això, enlloc d'aquest també s'hi poden trobar altres cations divalents, com ara el Mn^{2+} i el Ca^{2+} , cosa que pot afectar l'activitat polimerasa i la seva regulació (van Dijk et al., 2004).

Així, s'ha descrit que el Mn^{2+} estimula l'activitat de les RpdR (Bressanelli et al., 2002), facilitant-ne la iniciació (van Dijk et al., 2004), però que per altra banda les torna menys selectives vers el rNTP entrant i, per tant, en disminueix la fidelitat. S'ha constatat que el Mn^{2+} uneix més fort el grup trifosfat del NTP, estabilitzant així el complex ternari polimerasa-cadena naixent-NTP; això fa que les interaccions que s'estableixen entre el sucre i la base del NTP entrant i el motlle no siguin necessàries perquè tingui lloc l'addició nucleotídica (Castro et al., 2005).

El Ca^{2+} , per contra, inhibeix la síntesi de RNA (Sargent and Borsa, 1984; van Dijk et al., 1995). Això es deu al fet que les interaccions que els ions Ca^{2+} realitzen amb l'entorn i els substrats del centre actiu alteren el posicionament correcte dels grups que han d'interaccionar, cosa que impedeix la transferència del grup fosforil (Salgado et al., 2004).

Conformacions activa i inactiva

Una altra característica observada en diverses estructures de RpdR (com ara les de RHDV i HCV) és la capacitat que tenen d'adoptar més d'una conformació. Les dues formes observades ("tancada" i "oberta") difereixen en la posició del subdomini del *polze*, que pot estar rotat uns 8 graus respecte als subdominis del *palmell* i els *dits*. Això repercuteix en les posicions on s'uneixen els ions metàl·lics que han de catalitzar la reacció, raó per la qual la capacitat catalítica d'aquestes dues formes serà diferent.

Per les RpdR dels calicivirus i la de HCV, s'ha proposat que la conformació més tancada, en què la coordinació dels ions era l'adequada, és la forma activa i, per contra, la forma oberta és inactiva. Hom creu que aquestes polimerases podrien adoptar preferentment la conformació inactiva i que revertirien a l'estat catalíticament competent en unir el motlle, l'iniciador, els ions divalents i els nucleòtid correctes (Ng et al., 2002). Aquest comportament, però, no s'ha observat en els complexos de replicació resolts per les altres RpdR (Butcher et al., 2001; Ferrer-Orta et al., 2007).

1.5.3 Mecanismes d'iniciació de la síntesi de RNA

Com hem vist en l'apartat 1.5.1, les polimerases catalitzen la reacció d'addició de nucleòtids a l'extrem 3' d'una cadena polinucleotídica. Però per a això, cal que hi hagi disponible un extrem 3' on poder afegir els nucleòtids. Aquest pas, conegut com a iniciació, és l'etapa limitant de la reacció de síntesi de RNA i per aquesta raó es tracta d'un pas clau en la regulació del procés de replicació viral. D'altra banda, també cal assegurar que l'inici de la replicació tingui lloc tan a prop de l'extrem 3' del genoma com sigui possible, per tal que no es perdi informació (van Dijk et al., 2004).

Així, doncs, tot i el variadíssim repertori d'estratègies de replicació que presenten els virus RNA, hi ha només dos mecanismes principals per a iniciar la síntesi del RNA: *de novo* (Kao et al., 2001) o dependent d'iniciador (Paul et al., 1998) (veure figura 15).

Iniciació *de novo*

En la iniciació *de novo*, també anomenada independent d'iniciador, un nucleòtid trifosfat aporta el grup 3' hidroxil necessari per l'addició del següent nucleòtid (es podria veure com un iniciador d'un sol nucleòtid). Per tal que això es pugui donar, cal com a mínim que al centre catalític de la polimerasa hi interaccionin un nucleòtid iniciador (NTP_i), un segon nucleòtid (NTP₂) i una seqüència motlle que tingui els dos primers nucleòtids 5' complementaris al NTP_i i al NTP₂. D'aquesta manera, el primer enllaç fosfodièster es forma entre el NTP_i i el NTP₂.

Aquest mecanisme presenta l'avantatge que no requereix de cap altre enzim per a la generació d'un iniciador. De fet, alguns virus usen aquest mecanisme per a la generació d'oligonucleòtids iniciadors. En aquests casos, la iniciació *de novo* no va seguida de l'elongació, sinó que es dona una iniciació abortiva: la síntesi no continua, i es generen els "RNAs abortius", oligonucleòtids molt curts (2 a 5 nucleòtids) que posteriorment poden ser emprats com a iniciadors. Aquest és el cas, per exemple, de la replicació dels reovirus (Yamakawa et al., 1981).

En altres casos, però, la iniciació va seguida de l'elongació del RNA. Per a això, cal que les interaccions que tenen lloc durant la iniciació siguin prou estables perquè el complex d'iniciació es formi correctament, però no tan estables com per impedir el pas de la iniciació a l'elongació. En alguns casos, com la RpdR del HCV, s'ha observat que la polimerasa té més afinitat per als NTPs de l'elongació que no pas per a l'NTP_i de la iniciació (Luo et al., 2000).

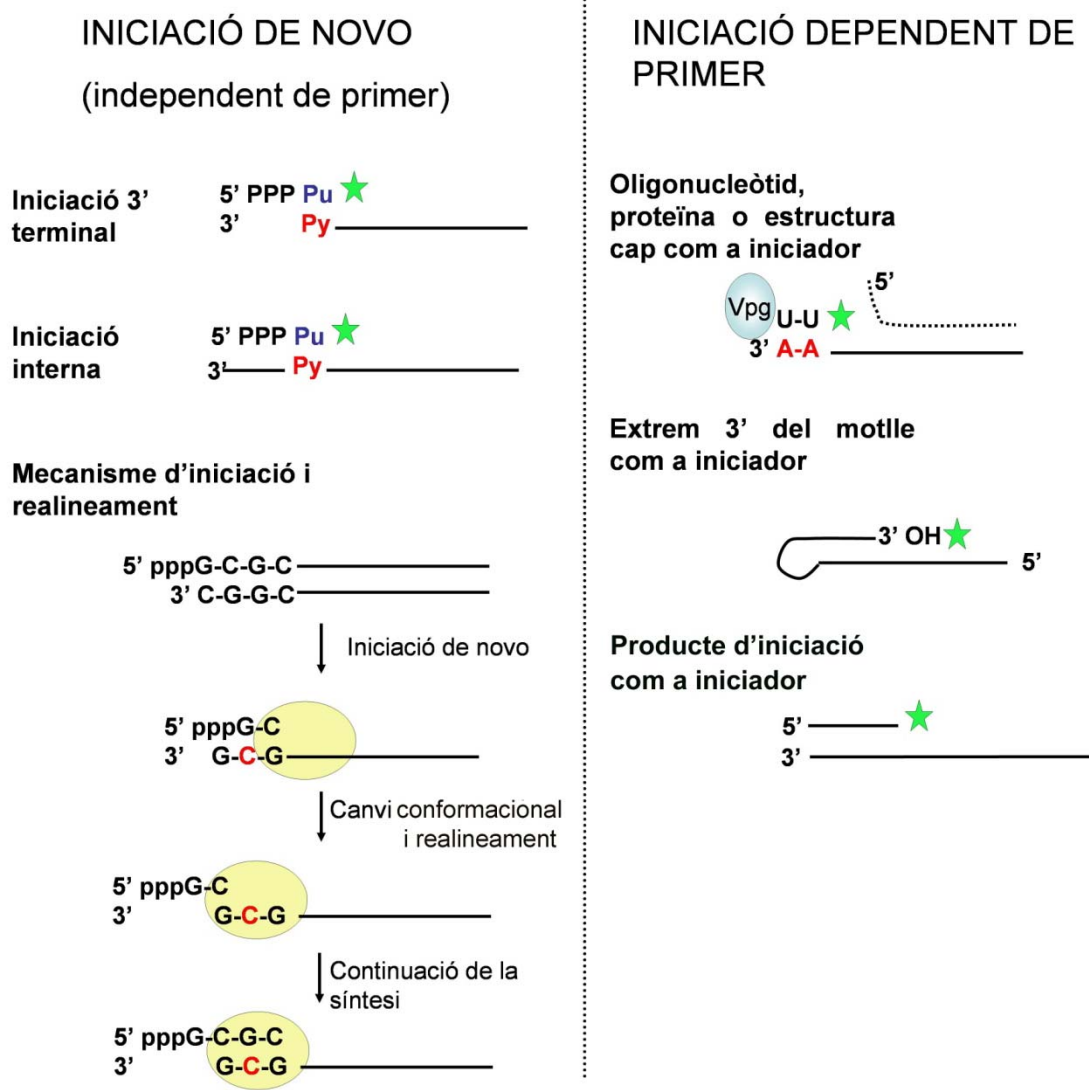


Figura 15: Esquema dels diferents mecanismes d'iniciació de la polimerització usats per les RpdR virals. Cortesia de C.Ferrer-Orta.

En una altra variant d'aquest mecanisme, que segueixen alguns virus RNA de cadena negativa (-ssRNA) com ara els arenavirus, la síntesi *de novo* no es dona a partir l'extrem 3' de la cadena motlle, sinó a partir d'un nucleòtid intern. Quan s'han sintetitzat uns quants nucleòtids, la cadena naixent es desprèn i es torna a unir altre cop en una altra regió, més cap a l'extrem 3' del motlle, a partir d'on continua la síntesi de la nova cadena. Això es coneix com a mecanisme de "iniciació i realineament" i permet que la iniciació *de novo* tingui lloc a un nucleòtid intern més protegit sense que es perdi informació genètica (Kao et al., 2001).

Iniciació dependent d'iniciador

Hi ha molts virus que necessiten d'un iniciador que proporcioni el grup 3' hidroxil necessari per la incorporació del següent nucleòtid. Aquest iniciador pot ser: (i) un oligonucleòtid obtingut a partir del tall de l'extrem 5' d'un RNA missatger de la cèl·lula hoste (procés conegut com a *cap-snatching*, o segrest del “*cap*” dels mRNA); (ii) un oligonucleòtid generat per iniciació abortiva; (iii) una proteïna que fa la funció d'iniciador de la síntesi d'RNA, on un aminoàcid proporciona el grup hidroxil necessari per la formació d'un enllaç fosfodièster amb el primer nucleòtid; (iv) l'extrem 3' del propi RNA motlle que s'ha doblegat sobre si mateix, aportant el grup hidroxil del seu extrem 3'. Aquí la cadena que fa de motlle té alhora la funció d'iniciador.

La iniciació mitjançant una proteïna iniciadora (en anglès, *protein primer*), usada pels picornavirus (Paul et al., 1998) i per virus de DNA, com els adenovirus i els bacteriòfags φ 29 i PRD1 (Salas, 1991), és també, com veurem en el proper apartat, el mecanisme d'iniciació d'IBDV i de la resta de birnavirus.

1.6 LA VP1, LA POLIMERASA DE L'IBDV

El virus objecte del nostre estudi, l'IBDV, presenta, com s'ha dit en l'apartat 1.2, un genoma compost per una doble cadena de RNA. Durant el cicle viral, el virus necessitarà fer còpies de la cadena positiva (+ssRNA) per tal d'usar-les com a mRNA per a l'expressió de les proteïnes virals. De la mateixa manera, li caldrà fer còpies de la cadena negativa (-ssRNA) per tal de dotar de genoma viral (dsRNA) a tota la progènie. i usar-lo com a motlle per a la síntesi de noves cadenes positives.

Per a aquestes dues funcions, els birnavirus compten amb una RNA polimerasa dependent de RNA: la proteïna VP1. L'activitat RNA polimerasa de VP1 ha estat demostrada, *in vitro*, en IBDV (Spies et al., 1987), IPNV (Mertens et al., 1982) i DXV (Bernard, 1980), els tres birnavirus més estudiats.

La VP1 dels birnavirus es troba en els virions en dues formes diferents: en forma lliure i unida al genoma. En aquesta darrera forma, referida com a VPg, la proteïna es troba unida covalentment a l'extrem 5' dels dos segments (tant en l'A com en el B) mitjançant un enllaç fosfodièster entre una serina i la guanosina monofosfat (GMP) del 5' del RNA (Calvert et al., 1991; Muller and Nitschke, 1987b). Recentment s'ha descrit que en aquest complex VP1-genoma també s'hi troba, i en gran quantitat, la proteïna VP3, que recobreix el dsRNA formant partícules ribonucleoproteïques (RNP) (Luque et al., 2009b). Pel que fa a la forma “lliure” de VP1, hi ha evidències que indiquen que també està unida a RNA, encara que en aquest cas es tracta d'oligonucleòtids curts (Kibenge and Dhama, 1997).

S'ha descrit que la VP1 s'autoguanilila, és a dir, uneix una molècula de GMP (Dobos, 1993; Shwed et al., 2002; Spies and Muller, 1990). Aquesta unió es dona per la formació d'un enllaç fosfodièster entre la cadena lateral d'una serina de la polimerasa i l'extrem 5' del GMP en un procés independent de motlle, on la VP1 actua alhora d'enzim i d'acceptor (Xu et al., 2004). S'ha proposat que el lloc de guanililació en la VP1 de IPNV es troba al residu Ser163, que en la VP1 d'IBDV correspondria als residus Thr168 (Xu et al., 2004) o Ser 166 (Pan et al., 2007).

Després d'aquesta primera guanililació, al complex VP1-GMP (VP1pG) se li incorpora una altra molècula de GMP en un procés, ara sí, dependent de motlle i que dona lloc al complex VP1pGpG (Dobos, 1993). És aquest complex VP1pGpG el que actua com a iniciador en la síntesi de la cadena positiva de RNA, com s'ha vist tant *in vitro* (Dobos, 1995) com *in vivo* (Magyar et al., 1998). D'aquesta manera, en acabar la reacció de polimerització del +ssRNA, la VP1 queda covalentment unida a la nova cadena. Això explica perquè els genomes dels birnavirus tenen una molècula de VP1 unida al seu extrem 5' (Calvert et al., 1991).

El que no s'ha pogut aclarir encara és si també hi ha una molècula de VP1 unida a l'extrem 5' de la cadena no codificant. L'ús d'oligonucleòtids marcats específics pel reconeixement dels extrems de les dues cadenes va permetre a Magyar i col. detectar la unió de la VPg al 5' de la cadena codificant, però no al 5' de la cadena no codificant, tant a temps d'infecció curts com a llargs (Magyar et al., 1998). Això, però, sembla contradir-se amb l'observació per microscopia electrònica de complexos de VPg-RNA circularitzats que esdevenen lineals per tractament amb proteïnasa K (Persson and Macdonald, 1982); donat que la VP1 tendeix a agregar, es va especular que la proteïna VP1 era present a tots dos extrems del genoma dsRNA (unida tant al 5' de la cadena positiva com al de la negativa) i que la circularització del RNA era deguda a la interacció de les molècules de VP1 dels dos extrems. A més, els estudis filogenètics del genoma de DXV, IPNV i IBDV mostren que tots dos segments (A i B) tenen els extrems 3' i 5' altament conservats: l'extrem 3' de la cadena codificant acaba sempre amb el triplet CCC (on s'aparellarien les dues bases de guanilil del complex VP1pGpG), mentre que l'extrem 5' comença per GGA (corresponent a les dues guanines que quedarien a l'extrem en iniciar la síntesi a partir del complex VP1pGpG) (Shwed et al., 2002) (veure figura 16). Aquest fet suggereix que la síntesi de totes dues cadenes podria iniciar-se a partir del complex VP1pGpG, cosa que implica que la cadena no codificant també tindria, en acabar la replicació del genoma, una molècula de VP1 unida al seu extrem 5' (Boot et al., 1999).

En qualsevol cas, la presència d'una molècula de VP1 unida a un o a tots dos extrems del genoma, converteix els birnavirus en els únics virus dsRNA amb una proteïna unida al genoma (VPg), així com els únics virus dsRNA amb una síntesi de RNA iniciada mitjançant una proteïna iniciadora (Dobos, 1995).

DXV-A	5' - GGAAAATAAAA...GGTGGTTCCC -3'
DXV-B	5' - GGAAAATAAT...GACGGCTCCC -3'
IBDV-A	5' - GGATACGATG...GGGGGCCCCC -3'
IBDV-B	5' - GGATACGATG...GGGGGCCCCC -3'
IPNV-A	5' - GGAAAGAGAG...AGGGGGCCCC -3'
IPNV-B	5' - GGAAACAGTG...CAGGGACCCC -3'

Figura 16: Conservació dels extrems 3' i 5' dels segments genòmics entre els birnavirus. Es mostren les seqüències d'ambdós extrems de la cadena codificant dels segments A i B, pels virus IBDV, IPNV i DXV. Adaptat de Shwed et al., 2002.

Actualment, les dades de les que disposem no permeten aclarir si aquesta unió VP1-genoma es trenca en algun moment del cicle viral, ni, en aquest cas, com es dona aquest trencament. Igualment, tampoc no s'ha pogut determinar si per a la iniciació de la síntesi del RNA en birnavirus calen dues molècules de VP1 –una per a fer d'iniciador i una altra com a polimerasa per a fer l'elongació- o si una mateixa molècula de VP1 pot realitzar les dues funcions.

Pel que fa al mecanisme que la VP1 usa per a sintetitzar el RNA, es creu que és diferent per a la generació de la cadena de polaritat positiva (la codificant) que per la de polaritat negativa (no codificant). Estudis *in vitro* amb la VP1 d'IPNV indiquen que les cadenes de RNA de polaritat positiva es sintetitzen usant el genoma (dsRNA) com a motlle. (Mertens et al., 1982). Es creu que, en els birnavirus, la reacció de transcripció segueix un mecanisme asimètric, o semiconservatiu, en què la nova cadena generada (de polaritat positiva) queda unida a la cadena de polaritat negativa del motlle, i la cadena parental de sentit positiu va quedant desplaçada (Dobos, 1995; Mertens et al., 1982). D'aquesta manera, en acabar la reacció, l'antiga cadena +ssRNA queda lliure (no estarà interaccionant amb la cadena de polaritat negativa) i podrà ser usada com a mRNA per a la expressió de proteïnes virals (vegeu la figura 17).



Figura 17: Replicació semiconservativa. La cadena de nova síntesi queda aparellada a la cadena motlle, formant una doble cadena. Això provoca que la cadena que anteriorment s'aparellava amb la cadena motlle (del mateix sentit que la nova) sigui desplaçada i quedi com a cadena simple.

Per a la síntesi de la cadena de polaritat negativa, en canvi, es creu que la VP1 pren la cadena codificant (RNA de cadena simple) com a motlle (Boot et al., 1999).

D'altra banda, pel que fa al centre catalític de la VP1, es va observar que, tot i l'elevada conservació de la tríada d'aminoàcids 'GDD' (motiu C) en la resta de les RpdRs, les anàlisis bioinformàtiques de la seqüència de les VP1 d'IPNV, IBDV i DXV semblaven indicar que les RpdRs dels birnavirus no presenten aquest motiu (ni, per tant, el dipèptid Asp-Asp necessari per a la catalisi de la síntesi de RNA) (Duncan et al., 1991; Gorbalenya and Koonin, 1988; Shwed et al., 2002).

Aquesta contradicció va quedar solucionada amb l'observació que els birnavirus, juntament amb uns altres virus d'insectes -els tetravirus TaV (virus del *Thosea asigna*) i EeV (virus del *Euprosterna elaeasa*)-, formen un grup de RpdRs no canòniques que es diferencien de la resta de polimerases per una permutació del subdomini del *palmell* (Gorbalenya et al., 2002). Aquesta permutació implica una reorganització en els motius del *palmell*, on en lloc de l'ordre canònic A-B-C, el motiu C es troba situat més a prop de l'extrem N-terminal que el motiu A, quedant així en ordre C-A-B (veure figura 18). Aquests canvis, segons Gorbalenya i col., no afecten l'organització dels elements d'estructura secundària, però sí la seva connectivitat. Així, es va postular que el *palmell* de les RpdR dels birnavirus seguiria tenint una fulla β central, de quatre cadenes β , i emmarcada per hèlixs α , però els *loops* que uneixen aquests elements estarien arranats de manera diferent.

Així mateix, també es va observar que el motiu C dels birnavirus no contenia la seqüència 'GDD' (que sí que es troba en TaV i EeV) i es va proposar que enlloc d'aquest tripèptid en tenia un de diferent: 'ADN'.

Finalment, diversos estudis bioquímics sobre la IBDV han determinat que, a part d'interaccionar amb el RNA viral, la polimerasa VP1 també interacciona amb la proteïna multifuncional VP3. Aquesta interacció, necessària per a l'encapsidació de la VP1 (Lombardo et al., 1999), es dona de manera independent de la presència de RNA (Maraver et al., 2003a) i es creu que implica la regió de 10 residus més C-terminals de la VP3 i la regió central de la VP1 (Tacken et al., 2002; Tacken et al., 2000).

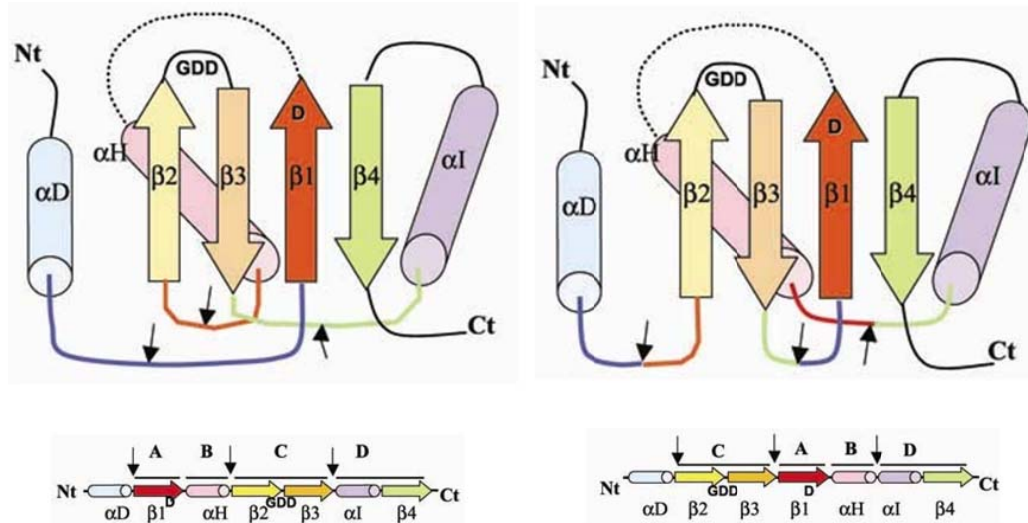
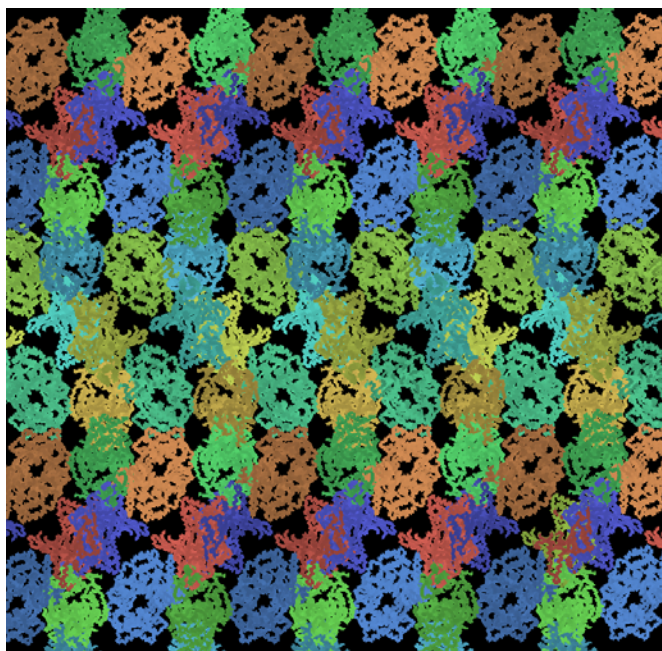


Figura 18: Permutació al subdomini del *palmell*. A l'esquerra es mostra la disposició i connectivitat dels elements d'estructura secundària que constitueixen el subdomini del *palmell* de les polimerases canòniques. A la dreta es mostra la disposició i connectivitat dels elements d'estructura secundària del *palmell* en les polimerases no canòniques. Les fletxes indiquen les connectivitats afectades. Adaptat de Gorbalenya et al., 2002.

2. OBJECTIUS



Empaquetament de les molècules de VP1 en el cristall

En iniciar els treballs presentats en aquesta memòria la informació estructural disponible sobre l'IBDV i les seves proteïnes es limitava a l'estructura de la partícula viral i de les SVP derivades de VP2 obtingudes per microscopia electrònica, i, per tant, a resolucions mitjanes. No es disposava, doncs, d'informació a resolució atòmica de cap de les proteïnes de l'IBDV.

Per això ens vam proposar obtenir informació de l'estructura a resolució propera a l'atòmica sobre algunes d'aquestes proteïnes.

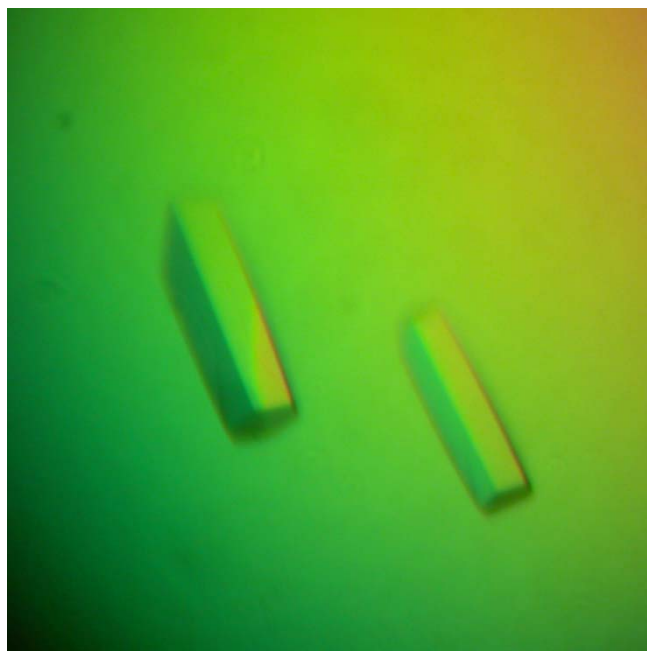
En concret, ens vam plantejar:

- Cristal·litzar i determinar l'estructura de les partícules SVP derivades de la VP2 d'IBDV.
- Cristal·litzar i determinar l'estructura de la VP1, la RNA polimerasa dependent de RNA d'IBDV.
- Cristal·litzar i determinar l'estructura de la VP1 en complex amb un pèptid que mimetitza l'extrem C-terminal de la proteïna VP3 d'IBDV.

D'altra banda, per a poder contextualitzar i refermar la informació obtinguda de l'anàlisi d'aquestes estructures cristal·logràfiques, vam considerar convenient de realitzar alguns assajos amb els que determinar l'activitat de la VP1. Això ens va permetre plantejar-nos un objectiu addicional:

- Determinar l'efecte de la VP3 en l'activitat de la VP1.

3. RESULTATS



Cristalls de VP1

3.1 L'ESTRUCTURA DE LA VP2

Hem cristal·litzat i determinat l'estructura tridimensional de les partícules subvirals (SVP) d'organització T=1 que forma la proteïna de la càpside d'IBDV, la VP2, a una resolució de 2.6 Å. Les coordenades atòmiques estan dipositades al Protein Data Bank (PDB), amb el codi 2GSY. Aquests resultats estan publicats en l'article: Garriga, D., J. Querol-Audi, F. Abaitua, I. Saugar, J. Pous, N. Verdaguer, J. R. Caston, J. F. Rodriguez (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): 6895-905.

3.1.1 Generalitats del model de la VP2

En la determinació estructural de la VP2 es van poder assignar 433 residus dels 452 que té la proteïna VP2 recombinant usada per a la cristal·lització. Els 19 residus que manquen són els 7 aminoàcids N-terminal i els 12 aminoàcids C-terminal, zones probablement desordenades.

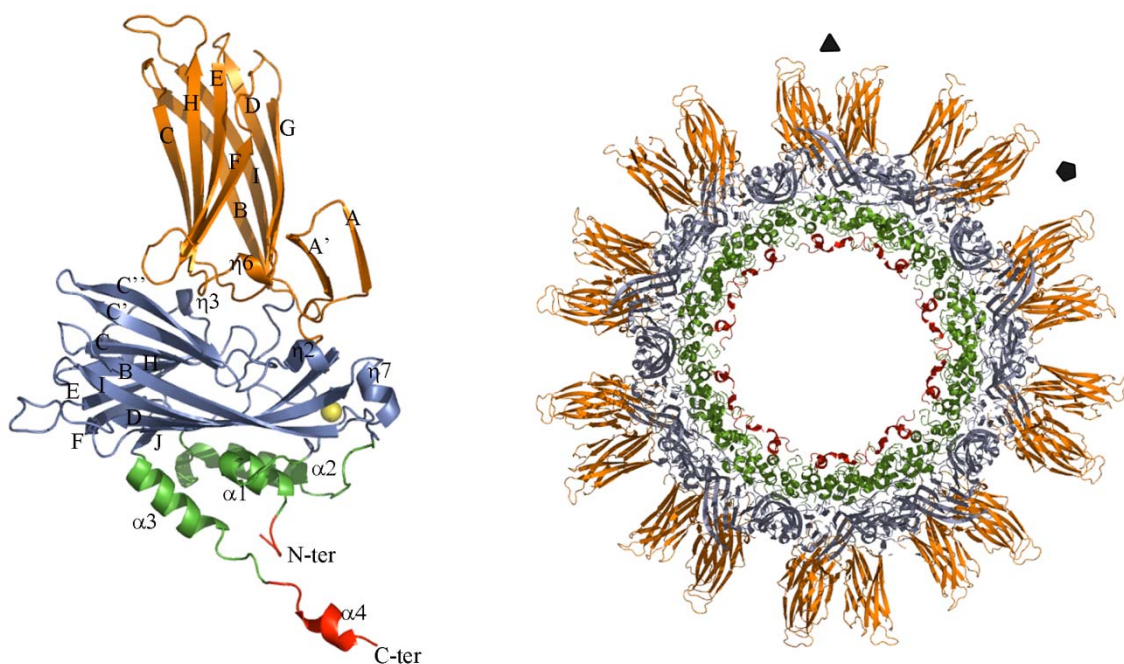


Figura 19: La VP2. Representació en cintes de l'estructura cristal·logràfica de la VP2 (dreta) i de la secció d'una SVP (esquerra). La subunitat de VP2 està organitzada en tres dominis: P (en taronja), S (en blau) i B (en verd). En vermell es destaquen els nous residus determinats en la nostra estructura. L'ió Ca^{2+} està representat com una bola groga. En la secció de la SVP s'hi indiquen la posició d'un eix ternari i d'un de quinari.

Seguint la definició de Coulibaly et al. (2005) (Coulibaly et al., 2005), en la molècula de VP2 hi podem definir 3 dominis: el P (de *protuberant*), el S (de *coberta*, o *shell*, en anglès) i el B (de *base*), com es mostra en la figura 19.

El domini S, el central, està compost per un barril β format per 11 cadenes β amb 5 hèlix 3_{10} intercalades. El domini P està inserit en un *loop* entre dues cadenes β del domini S i també està compost per un barril β , en aquest cas perpendicular a l'anterior. En aquest cas, el barril β està format per 10 cadenes β i una hèlix 3_{10} . Finalment, el domini B engloba les extensions N- i C-terminal de la cadena polipeptídica i està constituït per 4 hèlix α i una hèlix 3_{10} .

Una de les principals diferències respecte l'estructura cristal·logràfica de la VP2 dipositada per altres grups (Coulibaly et al., 2005; Lee et al., 2006) rau en la llargada de la proteïna recombinant usada per a la cristal·lització (452 residus, enlloc dels 441 usats en els altres treballs). Això ha permès que els extrems N- i C-terminal de la proteïna quedin més ordenats i apareguin en el nostre mapa de densitat electrònica. Així, s'han pogut modelar nou residus més en l'extrem C-terminal i tres en el N-terminal (en vermell en la figura 19). Aquests nou residus addicionals del C-terminal adopten una conformació d'hèlix α en la nostra estructura i es projecten allunyant-se del cos de la proteïna, orientades cap a l'eix ternari del trímer veí.

3.1.2 Generalitats del model de la SVP T=1

L'estructura general de les SVP presentada en aquesta memòria aporta també noves dades sobre l'existència d'un ió Ca^{2+} als eixos ternaris de cada trímer de VP2. Aquest ió coordina un grup de sis residus aspàrtics (Asp 31 i Asp 174 de cada una de les tres VP2 del trímer) en una geometria octaèdrica perfecta. Per a comprovar la contribució d'aquests ions en l'estabilitat de les SVP, es va dialitzar una suspensió de SVP contra un tampó amb EGTA, tractament que resulta en la dissociació de les partícules (com es mostra a la figura 20).

Aprofitant que la qualitat de les dades a 2.6Å ho permetia, l'afinament de l'estructura es va realitzar relaxant la simetria icosaèdrica. Gràcies a aquesta relaxació parcial de la simetria no cristal·logràfica (NCS) hem pogut observar variacions en l'estructura de les diferents molècules de VP2 de la SVP. Aquestes diferències semblen estar relacionades amb l'empaquetament de les partícules al cristall i estan concentrades en els *loops* exposats de les espícules i dels eixos quinaris. La rellevància de l'anàlisi de l'empaquetament de les SVP serà comentada més endavant, en l'apartat 4.1.2.

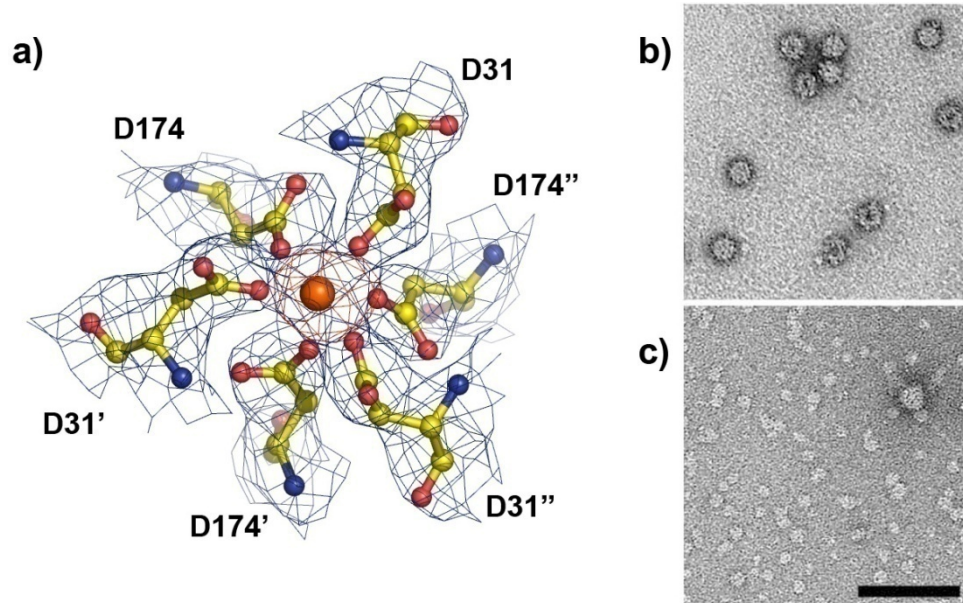


Figura 20: L'ió calci en el trímer de VP2. a) Representació en pals i boles de la coordinació de l'ió Ca^{2+} (bola taronja) per part dels residus Asp 31 i Asp 174 de les tres subunitats del trímer. b) i c) Micrografia de les SVP dialitzades contra un tampó sense i amb 5mM EGTA, respectivament.

Garriga D, Querol-Audí J, Abaitua F, Saugar I, Pous J, Verdaguer N, Castón JR, Rodríguez JF.

[The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid.](#)

J Virol. 2006 Jul;80(14):6895-905.

3.2 L'ESTRUCTURA DE LA VP1

Hem cristal·litzat i determinat l'estructura tridimensional de la RNA polimerasa dependent de RNA (RpdR) d'IBDV, la VP1, a una resolució de 2.4 Å. També hem resolt l'estructura de la VP1 unida a ions Mg^{2+} i en complex amb un pèptid amb la seqüència de l'extrem C-terminal de la proteïna VP3, a 3.1 i 2.7 Å de resolució, respectivament.

Les coordenades atòmiques d'aquestes tres estructures estan dipositades al *Protein Data Bank* (PDB), amb els codis 2PUS (forma *apo*), 2R70 (complex amb el pèptid de VP3) i 2R72 (complex amb els ions Mg^{2+}). Aquests resultats estan publicats en l'article: Garriga, D., A. Navarro, J. Querol-Audi, F. Abaitua, J. F. Rodriguez, N. Verdaguer (2007). "Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(51): 20540-5.

3.2.1 Generalitats del model de la VP1

En la determinació estructural de la VP1 es van poder assignar 781 residus dels 845 que té la proteïna recombinant usada per a la cristal·lització. Entre els residus que no s'han pogut determinar hi ha els 26 primers residus de l'extrem N-terminal de la VP1 i dos *loops* exposats, regions probablement desordenades en el cristall i que no són visibles en la nostra estructura. Tampoc apareixen en el nostre model els 40 residus més C-terminals, part (o la totalitat) dels quals resulten tallats durant el procés de purificació, per acció de la proteasa rTEV.

La VP1 està plegada formant una unitat compacta de 95 x 55 x 54 Å³, de forma ovalada i amb una cavitat central. Aquesta estructura està constituïda per 25 hèlix α , 12 hèlix 3_{10} i 17 cadenes β , organitzades en els tres dominis comuns en les RpdR virals (Ferrer-Orta et al., 2006b): un domini polimerasa central (residus 169-657), emmarcat per un domini N-terminal (residus 26-168), per un cantó, i un domini C-terminal (residus 658-804), per l'altre.

Tot i que la organització general dels diferents dominis de la polimerasa és semblant a la d'altres RdRPs virals resoltes anteriorment, els dominis amino- i carboxi-terminals de VP1 són especialment grans i presenten un conformació particular. Aquest fet va impossibilitar que l'estructura es resolgués per substitució molecular. Així doncs, l'estructura es va determinar per MAD a partir d'un derivat de Sm.

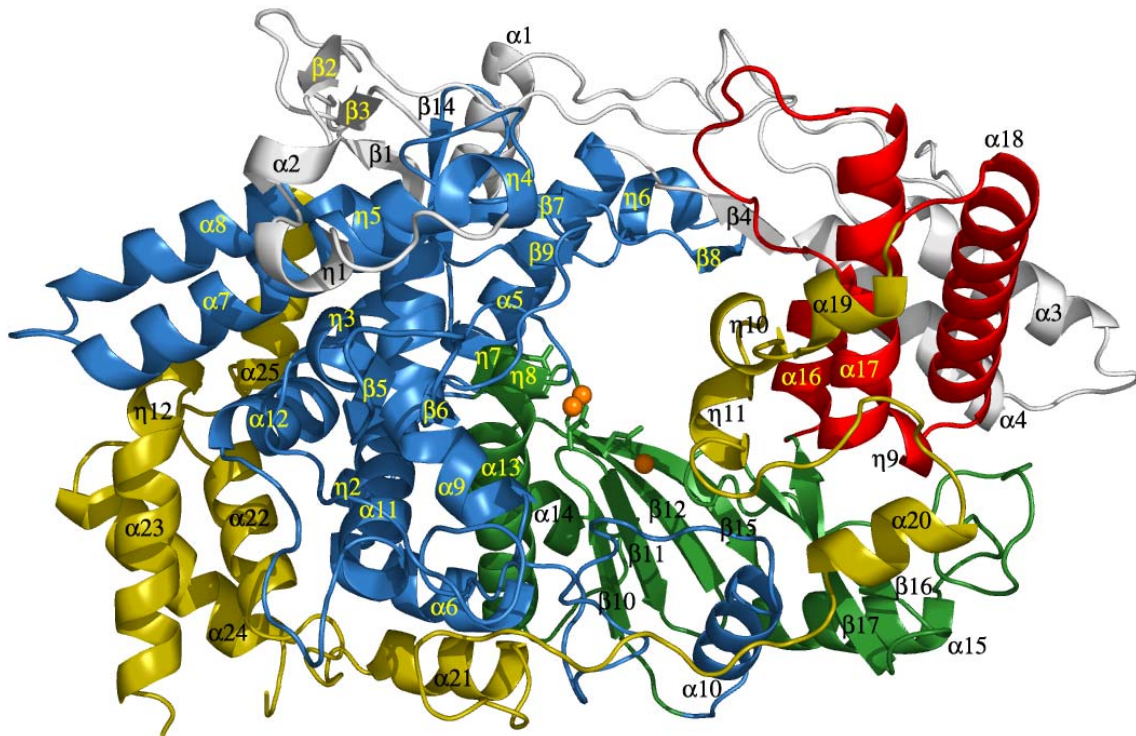


Figura 21: La VP1. Representació en cintes de l'estructura cristal·logràfica de la VP1. Els dominis s'han destacat en colors diferents: domini N-terminal, en gris; subdomini dels *dits*, en blau, subdomini del *palmell*, en verd; subdomini del *polze*, en vermell; domini C-terminal, en groc. Els ions Mg^{2+} trobats es representen com a boles taronja. Els residus aspàrtics catalítics es representen en pals.

El domini polimerasa presenta la clàssica forma de “mà dreta tancada” i inclou els subdominis dels *dits*, el *palmell* i el *polze* que es troben també en la resta de polimerases, així com els motius estructurals A-G característics de les RpdR. De fet, l'arquitectura general del domini polimerasa de la VP1 presenta una sorprenent similitud amb la de les polimerases dels virus de les famílies dels picornavirus i calicivirus. En l'estructura de la VP1, però, es pot observar que al subdomini del *palmell* la connectivitat entre els elements d'estructura secundària presenta un plegament del tipus $\beta\beta\alpha\alpha\beta$, permutat respecte el clàssic plegament $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ que es dona en la resta de RpdR resoltes. L'estructura, a més, demostra que, malgrat aquesta permutació en la connectivitat dels elements de l'estructura secundària, la disposició general del subdomini del palmell, i en particular la dels residus aspàrtics catalítics, es manté inalterada.

Una altra diferència rellevant amb la resta de polimerases és que en la VP1 el *loop* que precedeix l'hèlix que conté el motiu B (adjacent a la fulla β que suporta els residus catalítics) es projecta cap a la cavitat del centre actiu, tot bloquejant-lo.

3.2.2 Generalitats del model del complex VP1-Mg²⁺

La incubació dels cristalls de VP1 en una solució amb GTP i MgCl va donar lloc a la incorporació de tres ions Mg²⁺ a l'estructura (vegeu la figura 22). Dos d'aquests tres ions estan situats al centre actiu, en una posició similar a l'esperada pels ions catalítics (comentats en l'apartat 1.5.1); un dels dos està coordinat amb el residu Asp 402 (del motiu C) i Asn 439 (motiu B) i una molècula d'aigua, mentre que l'altre està coordinat pel residu Asp 402 i l'oxigen de la cadena principal de la Leu 417 (motiu C). El tercer ió se situa a uns 6 Å del centre actiu, perfectament coordinat per residus de la fulla β del *palmell* (Asn 403, Ser 414, Ile 415 i Asp 416), en una posició similar a la descrita en les estructures de les RpdR del bacteriòfag φ6 (Butcher et al., 2001) i del FMDV (Ferrer-Orta et al., 2004). A part d'això, el complex VP1-Mg²⁺ no presenta canvis conformacionals rellevants respecte a l'estructura de la forma *apo* de VP1, ni es va poder observar cap densitat en el mapa que permetés posicionar el GTP en l'estructura.

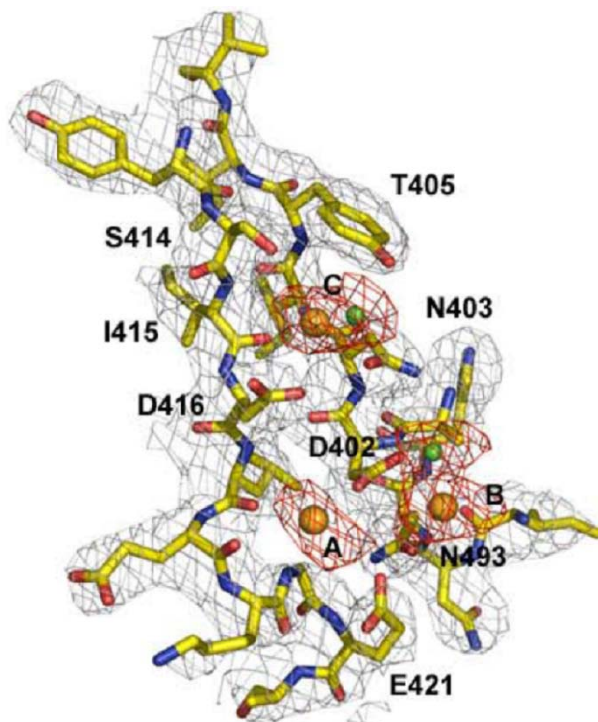


Figura 22: Situació i coordinació dels ions en la VP1. L'estructura del complex VP1-Mg²⁺ va permetre determinar la posició de tres ions Mg²⁺, descrits també en altres RpdR. Dos d'aquests ions estan situats al centre actiu i tenen funció catalítica; el tercer ió està situat a la fulla β del *palmell*, on sembla que tindria una funció més estructural.

3.2.3 Generalitats del model del complex VP1-pèptid de la VP3

L'encapsidació de la VP1 en les partícules virals es dona via la interacció de la VP1 amb la proteïna VP3 (Lombardo et al., 1999). Per tal d'estudiar la naturalesa d'aquesta interacció, ens vam proposar obtenir l'estructura de la VP1 en complex amb un pèptid que mimetitzava el motiu d'unió a la VP1 de la VP3, que s'ha descrit en el seu extrem C-terminal (Maraver et al., 2003a). A tal efecte, es van obtenir cristalls a partir d'una mostra de VP1 incubada amb aquest pèptid (en una relació molar VP1:pèptid de 1:4). L'estructura resultant és, en general, molt similar a la de la forma *apo* de la VP1, tret d'una diferència molt remarcable: en l'estructura del complex, la regió del *loop* que bloquejava el centre actiu ha patit un canvi

conformacional i els residus que impediien el pas de la cadena motlle i els nucleòtids substrat s'han desplaçat uns 7.5 cm (vegeu la figura 23), alliberant així l'accés dels substrats al centre catalític (vegeu la figura 24).

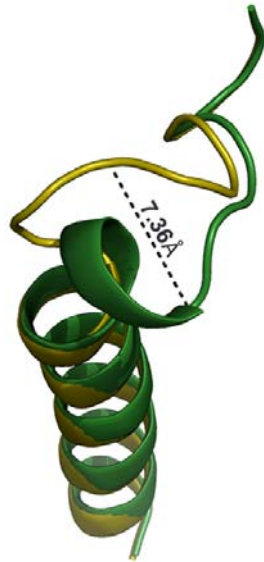


Figura 23: Canvi conformacional en la regió del *loop B*. Representació en cintes de l'hèlix que conté el motiu B i el *loop* que la precedeix (*loop B*) de la VP1 en forma *apo* (en verd) i de la VP1 en complex amb el pèptid que mimetitza la regió C-terminal de la VP3 (groc). Es marca la distància entre les posicions del residu Asn 486 en les dues conformacions, de gairebé 7.5 Å.

En aquesta estructura, però, no s'hi va poder posicionar amb certesa el pèptid del C-terminal de la VP3, tot i que sí que es va detectar una densitat elongada en el canal d'entrada de nucleòtids, que podria interpretar-se com uns 5 aminoàcids en conformació estesa.

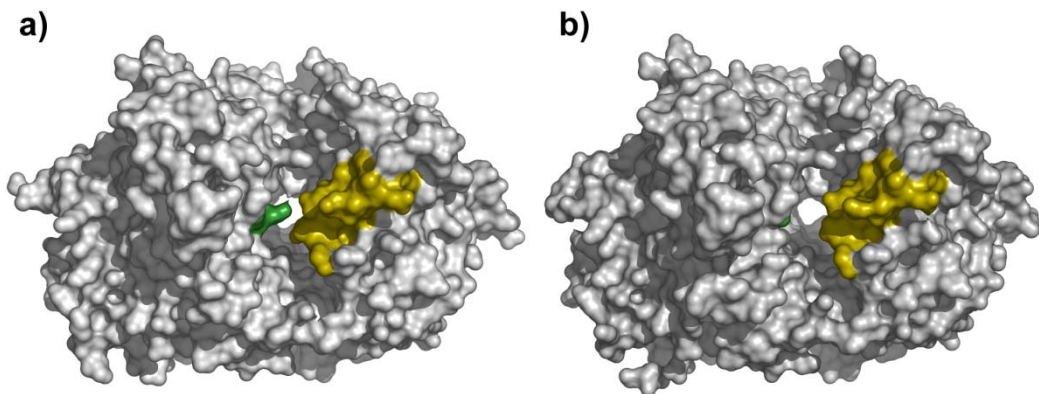


Figura 24: L'efecte de la incubació amb el pèptid de la VP3. Vista general de les superfícies de les estructures de la forma *apo* de la VP1 (a) i del complex de la VP1 amb el pèptid que mimetitza la regió C-terminal de la VP3 (b). Com es pot observar, el tractament fa reorganitzar la protuberància verda que bloquejava el centre actiu, corresponent a la regió de l'hèlix $\alpha 13$. En groc es destaca l'altra regió que bloqueja l'accés al centre actiu, corresponent a les hèlixs $\alpha 19$ - $\eta 10$ - $\eta 11$.

Garriga D, Navarro A, Querol-Audí J, Abaitua F, Rodríguez JF, Verdaguer N.

[Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase.](#)

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 18;104(51):20540-5.

3.3 L'ACTIVITAT DE LA VP1

Estudis anteriors ja havien demostrat que la proteïna VP1 és la polimerasa viral i que, com a tal, és capaç de catalitzar la síntesi de RNA (Letzel et al., 2007; Pan et al., 2007; von Einem et al., 2004). Així mateix, assajos *in vitro* han mostrat que la VP1 només usa com a motlle els RNA que presenten les regions 3'UTR dels segments del genoma viral (von Einem et al., 2004). Ens interessava determinar, però, quin efecte tenia la interacció de la VP1 amb la VP3 sobre l'activitat polimerasa i la seva regulació. També preteníem caracteritzar millor la capacitat de VP1 per actuar com a proteïna iniciadora en la reacció de polimerització que ella mateixa catalitza, pas per al qual es requereix la unió d'un grup GMP a la RpdR.

En aquest apartat es presenta el treball realitzat en aquest sentit, el qual consta de dos assajos d'activitat polimerasa i un assaig de guanilació. El primer dels resultats presentats està publicat també en l'article: Garriga, D., A. Navarro, J. Querol-Audi, F. Abaitua, J. F. Rodriguez, N. Verdaguer (2007). "Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(51): 20540-5. Dels altres dos assajos, en canvi, se'n presenten només els resultats preliminars.

3.3.1 Efecte de la VP3 en l'activitat polimerasa de la VP1

Per tal de corroborar els efectes observats en l'estructura de la VP1 en incubar-la amb el pèptid de la VP3, vam voler comprovar com afectaven aquests canvis a l'activitat catalítica de la VP1. A tal efecte, una versió recombinant de la proteïna VP1 (formada pels primers 845 residus de la VP1 units a una cua d'histidines; la proteïna usada en les primeres proves de cristal·lització, d'ara endavant hVP1) es va purificar i es va incubar 30 minuts amb diferents concentracions tant del pèptid amb la seqüència de l'extrem C-terminal de la VP3 com de la proteïna VP3 completa purificada. Seguidament, es va determinar la capacitat de sintetitzar RNA que tenien aquestes mostres, usant com a motlle un ssRNA de cadena positiva amb part de la seqüència del segment B, incloses les regions no traduïdes dels extrems 3' i el 5'.

Com es pot observar a la figura 25, la proteïna hVP1, *in vitro*, té activitat polimerasa per si mateixa, sense intervenció de la VP3 (carril 2). A mesura que s'augmenta la concentració de pèptid, però, aquesta activitat "basal" de VP1 també s'incrementa, fins a multiplicar-se per tres quan la relació molar pèptid:hVP1 és de 10:1 (carril 5). En canvi, concentracions de pèptid majors causen una dràstica reducció de l'activitat catalítica (resultats no mostrats).

Com era d'esperar, la incubació de la polimerasa amb la proteïna VP3 completa té un efecte encara major que el del pèptid i arriba a augmentar l'activitat catalítica de la hVP1 fins a cinc vegades (carril 6).

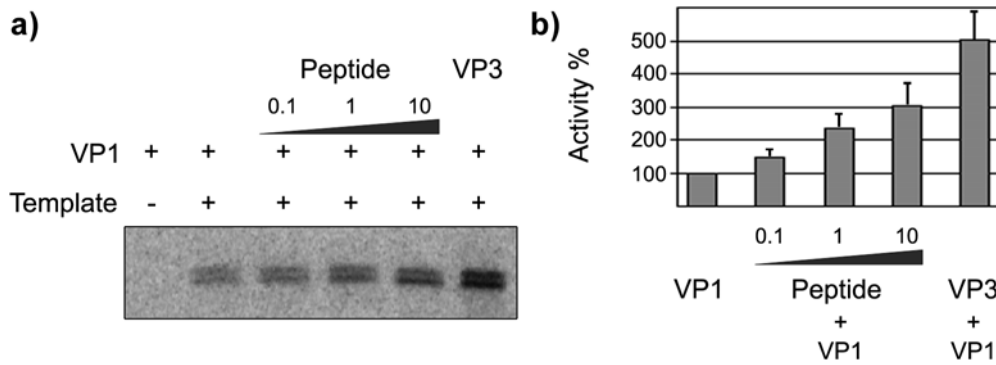


Figura 25: Efecte de la VP3 en l'activitat polimerasa de la VP1. **a)** La hVP1 purificada es va incubar amb diferents relacions molars (de 0.1 a 10) del pèptid que mimetitza la regió C-terminal de la VP3 (carrils "Peptide"), o amb hVP3 purificada (carril "VP3"), a una relació molar de 2:1 (hVP3/hVP1). D'aquestes reaccions, se'n mostren els productes de la reacció separats en un gel d'acrilamida al 5%. **b)** Activitat polimerasa de la VP1 registrada a partir de la radioactivitat incorporada en els productes de la reacció. El valor de l'activitat de la VP1 sola es va prendre com a 100%. El valor promig per cada condició es va obtenir a partir de 3 experiments independents.

3.3.2 Efecte de la regió 3'UTR en l'activitat polimerasa de la VP1

Per tal de poder estudiar els efectes de la regió 3'UTR del genoma viral en l'activitat de la VP1, es van generar dos tipus de motlles ssRNA derivats dels genomes virals: uns amb el mateix extrem 3' dels segments genòmics (**A+** i **B+**) i els altres amb uns nucleòtids extres després de l'UTR del 3' (**A-** i **B-**).

Amb aquests motlles, es va repetir l'assaig polimerasa, usant tant la hVP1 sola com la hVP1 incubada amb el pèptid de l'extrem C-terminal de la VP3 (en una relació molar pèptid:hVP1 de 2:1) amb tots quatre ssRNAs. El resultat d'aquest assaig, com es pot observar en la figura 26, indica que la hVP1 sola té una activitat similar, tant si s'usen els motlles amb el 3'UTR genòmic com si no (carrils 3 a 6). En el cas de la hVP1 preincubada amb el pèptid, en canvi, l'activitat decau dràsticament si el motlle usat no té la seqüència exacta de l'UTR en el seu extrem 3'. De fet, comparat amb l'activitat de la hVP1 no tractada amb el pèptid, l'activitat registrada quan s'usen els motlles A+ i B+ amb la hVP1 tractada és superior (carrils 7 i 8); quan s'usen els motlles A- o B-, en canvi, la síntesi de RNA no només no es veu incrementada sinó que disminueix per sota dels valors obtinguts per la hVP1 no tractada (carrils 9 i 10). Aquests resultats, però, són encara preliminars.

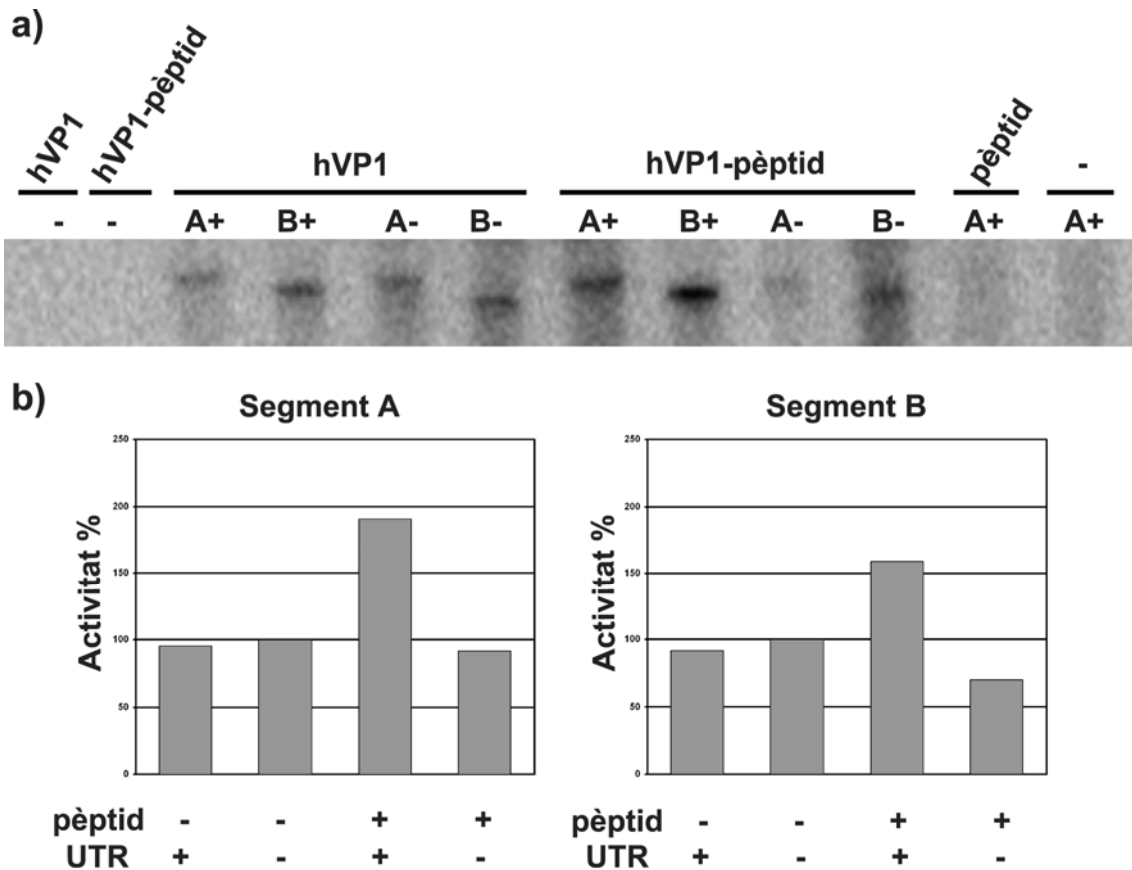


Figura 26: Efecte de la regió 3'UTR en l'activitat polimerasa de la VP1. a) La hVP1 purificada es va incubar (+) o no (-) amb el pèptid que mimetitza la regió C-terminal de la VP3, a una relació molar de 2:1 (pèptid/hVP1). Després de 20 min d'incubació les mostres es van usar per a realitzar un assaig d'activitat polimerasa, utilitzant com a motlles uns +ssRNA amb la regió 3'UTR del virus (A+ i B+) o uns +ssRNA amb les regions 3'UTR modificades (A- i B-). b) Activitats polimerasa de la VP1 registrades en (a) a partir de la radioactivitat incorporada en els productes de la reacció, ordenades per a cada segment genòmic. Com a referència (100%) es va prendre el valor de l'activitat de la hVP1 sense incubar amb pèptid i usant un motlle sense el 3'UTR natiu.

3.3.3 Activitat guanililtransferasa de la VP1

La determinació de l'estructura atòmica de la VP1 evidencia també que el residu proposat com a putatiu lloc de guanililació de la RpdR (Pan et al., 2007; Xu et al., 2004) és molt poc accessible i queda molt allunyat del centre actiu (més de 20Å). Això crea alguns dubtes sobre la viabilitat d'aquesta posició per a poder dur a terme la seva funció d'iniciador de la reacció, tal i com serà discutit en l'apartat 4.2.4 d'aquesta memòria.

L'estructura mostra també que l'extrem N-terminal de la VP1 és una regió poc estructurada i molt flexible. A més, en els alineaments de la seqüència de la polimerasa dels diferents birnavirus es pot observar que aquesta regió conté un residu Serina molt conservat en tota la família viral. Això suggereix que la regió amino-terminal de la VP1 podria presentar un candidat alternatiu de lloc de guanililació.

Amb la intenció de comprovar el lloc de guanililació de la VP1 es va provar de posar a punt un assaig per a poder comparar així la capacitat de guanililació de la VP1 nativa comparada amb la de mutants puntuals en diferents residus. Malgrat els nostres intents, però, no es van aconseguir els resultats esperats, en no poder obtenir senyal de la guanililació més que quan s'usava VP1 en el context del virió (vegeu la figura 27, carrils 1 i 2). La VP1 expressada en el sistema de vaccinia va unir GTP marcat (carril 4), però el resultat no es va poder reproduir. Usant hVP1 expressada en el sistema de baculovirus tampoc no es va poder obtenir senyal de guanililació en cap condició.

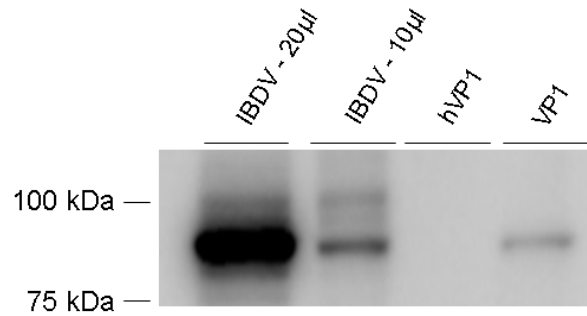
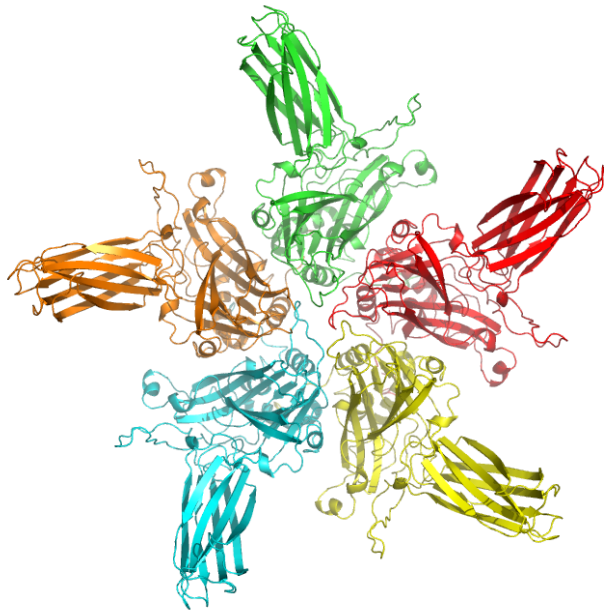


Figura 27: Assaig de guanililació. Diferents mostres de VP1 es van incubar 10 min a 42°C amb un tampó amb 50 mM MgCl₂ i 30 µCi de [α -³²P]GTP. Els productes de reacció es van separar en un gel d'acrilamida al 10%. L'assaig es va realitzar amb una purificació de virions d'IBDV (com a control positiu), una preparació de hVP1 1-845 purificada, expressada en cèl·lules d'insecte, i un extracte de cèl·lules de mamífer que expressaven la VP1.

4. DISCUSSIÓ



Les molècules de VP2 al voltant de l'eix quinari

4.1 LA VP2

4.1.1 La formació de la càpside T13

Amb l'anàlisi de l'estructura tridimensional de les SVP, juntament amb les dades disponibles actualment sobre l'assemblatge de la càpside T=13, podem hipotetitzar un model de formació de la càpside d'IBDV:

1- En l'IBDV, la proteïna de la càpside s'expressa en el context de la poliproteïna (pVP2-VP4-VP3), que posteriorment és alliberada per l'activitat proteolítica de la VP4, fet que dóna lloc a la pVP2, de 512 residus (vegeu la figura 28; c).

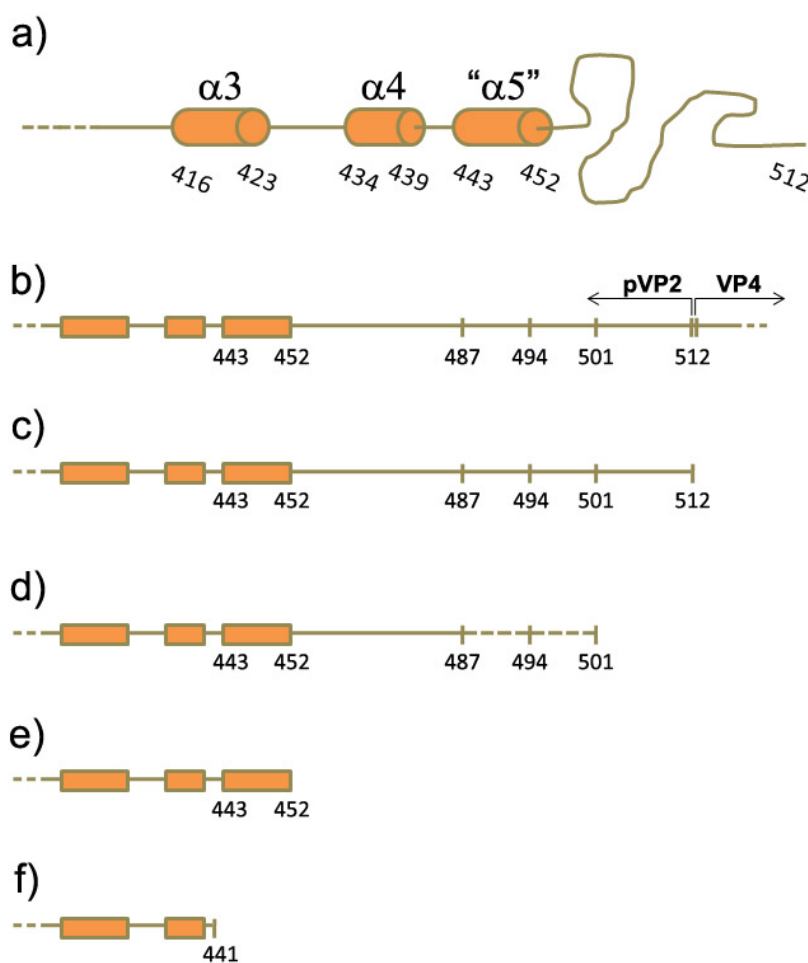


Figura 28: Esquema dels diferents processos proteolítics que pot patir la proteïna de la càpside.

a) Esquema de la regió C-terminal de la pVP2. Es mostren les dues darreres hèlixs que s'observen a l'estructura cristal·logràfica, $\alpha 3$ i $\alpha 4$, juntament amb una hèlix amfipàtica que s'ha predit abans de la regió desestructurada, " $\alpha 5$ ". **b) a f)** Regió C-terminal de les diferents versions de VP2, en el context de **(b)** la poliproteïna; **(c)** la pVP2 sencera, un cop alliberada per l'acció de la VP4; **(d)** la pVP2 processada per VP4 en les dianes de tall secundàries; **(e)** la VP2-452, producte del tall catalitzat per la proteasa cel·lular PSA i **(f)** la versió madura de VP2, obtinguda per un tall autocatalític dirigit pel residu Asp 431.

La VP4 tornarà a tallar la pVP2 en 3 dianes de tall secundàries, a les posicions 487, 494 i 501 (Lejal et al., 2000; Sanchez and Rodriguez, 1999). Això genera quatre versions diferents de la pVP2 (vegeu la figura 28; c i d), que segurament tindran cinètiques i afinitats diferents per la interacció amb les proteïnes implicades en les següents etapes del procés d'assemblatge. S'ha observat, a més, que els pèptids alliberats en aquests talls queden associats a la càpside viral (Da Costa et al., 2002).

2- Un cop alliberades de la poliproteïna, les molècules de la pVP2 s'agruparan de 3 en 3 formant trímers. Aquests trímers són mantinguts per contactes entre les tres molècules en què participen residus de tots tres dominis i per la presència d'un ió Ca^{2+} en l'eix ternari a l'alçada del domini S que coordina fortament sis residus acídics (Asp31 i Asp 174 de les tres molècules del trímer) en una geometria perfectament octaèdrica. La presència d'aquest ió actua com una pega que manté unides les tres molècules del trímer, com demostra el fet que les SVP es dissocien en tractar-les amb EGTA. Donada la quantitat d'interaccions que estableixen els trímers de la VP2, aquests són considerats la unitat bàsica de formació de la càpside d'IBDV (Coulibaly et al., 2005).

3- Paral·lelament a la formació de trímers, les molècules de la pVP2 patiran un altre procés clau que definirà el tipus d'interaccions que tindran un cop formada la càpside. Per a cada molècula de la pVP2 hi ha dues opcions: o bé interacciona amb la VP3 o bé pateix un altre tall proteolític. És possible que l'ocurrència d'un o altre procés depengui de la llargada del domini C-terminal de la pVP2 i, per tant, del grau de processament proteolític per la VP4 que hagi sofert.

El tall proteolític es dona entre els residus 452 i 453 i és catalitzat per una proteasa cel·lular, l'aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) (Irigoyen, 2009). Això crea una forma intermèdia entre la pVP2 i la VP2 madura, la VP2-452, que conserva en el seu extrem C-terminal una hèlix amfipàtica que va del residu 443 al 452 (vegeu la figura 28; e).

La interacció amb la VP3 es donarà a través del seu extrem més C-terminal i el domini C-terminal de la pVP2. Els últims 5 residus de la VP3, amb una elevada càrrega negativa, es complementaran amb les càrregues positives de l'hèlix amfipàtica 443-452 de la pVP2 (Saugar et al., 2005). És probable, a més, que en aquesta interacció hi estiguin implicades altres regions de la pVP2 i la VP3 (Chevalier et al., 2004), que podrien ser prou rellevants com perquè la interacció entre aquestes dues proteïnes no es pugui donar de forma estable si la pVP2 ha estat tallada a VP2-452. D'altra banda, la interacció amb la VP3 protegiria, per raons estèriques, el C-terminal de la pVP2 del tall per la PSA.

Aquests dos processos –la interacció amb VP3 i la proteòlisi per PSA– donaran lloc a dos tipus d'organitzacions de VP2 diferents: pentàmers i hexàmers.

4- El tall proteolític a 452 genera una forma de la VP2, la VP2-452, que per si sola no és capaç d'assemblar-se en partícules $T=13$, sinó que forma partícules SVP de $T=1$ (Saugar et al., 2005). Això es deu al fet que la VP2-452 tendeix a organitzar-se només en pentàmers i que no pot fer-ho en hexàmers (necessaris per a la formació de càpsides $T=13$).

Es creu que el tall proteolític desbloqueja la α -hèlix amfipàtica 443-452, que s'associarà amb les hèlix 443-452 provinents d'altres 4 molècules de la VP2-452 per a estabilitzar el seu cantó hidrofòbic. Això permet la formació d'un feix d'hèlixs en l'eix pentamèric que promou la formació del pentàmer de la VP2 i l'estabilitza (vegeu la figura 29). La formació d'aquests feixos d'hèlixs a l'eix quinari ja s'havia observat en el mapa de criomicroscopia electrònica d'una partícula T=13 formada per una VP2 quimèrica que mimetitzava un intermediari del procés d'assemblatge (Luque et al., 2007).

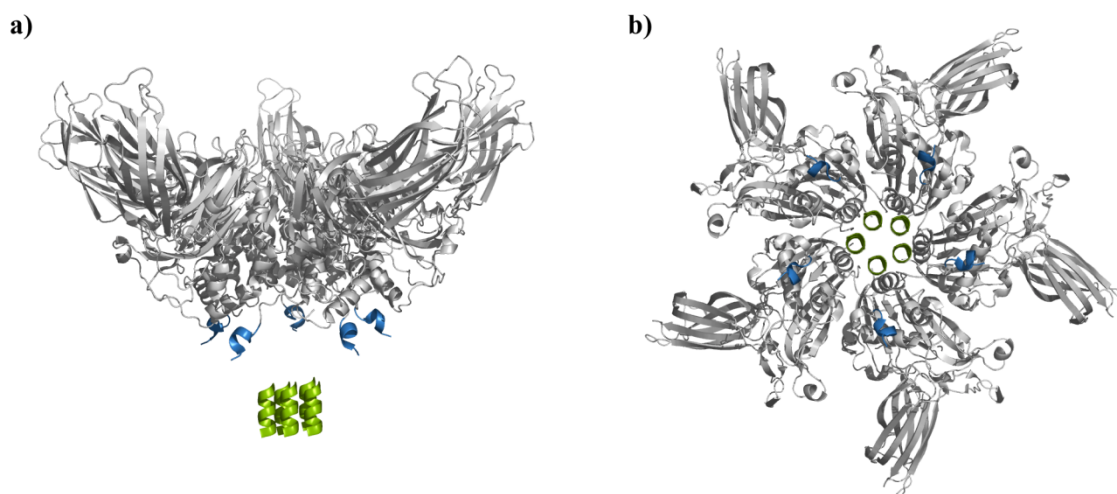


Figura 29: Feix d'hèlixs a l'eix quinari. Representació en cintes d'un pentàmer de VP2 (en gris) amb el feix d'hèlixs α amfipàtics modelat segons la densitat no assignada en la reconstrucció tridimensional per criomicroscopia electrònica d'un intermediari del procés d'ensamblatge (en verd). En blau es destaquen la regió més C-terminal del nostre model (corresponent a l'hèlix $\alpha 4$). **a)** Vista lateral. **b)** Vista apical, des de l'interior de la partícula, seguint l'eix quinari. Adaptat de Luque et al., 2007.

Aquest sistema d'assemblatge de pentàmers és similar al que es dona en nodavirus (virus +ssRNA) (Schneemann et al., 1998), on un event proteolític diferencia unes quantes molècules de la proteïna de la càpside i permet així la interacció dels seus pèptids- γ per a formar un feix d'hèlixs pentamèric (Cheng et al., 1994).

5- Les molècules que han interaccionat amb la VP3, en canvi, conservaran el domini C-terminal prou llarg com perquè causi impediments estèrics i impossibiliti l'adopció de la inclinació entre molècules de la VP2 necessària per a l'assemblatge en pentàmers. Això es pot comprovar en l'estructura resolta de la SVP (T=1), on s'observa que l'extrem C-terminal de VP2 va a parar molt a prop de l'eix quinari.

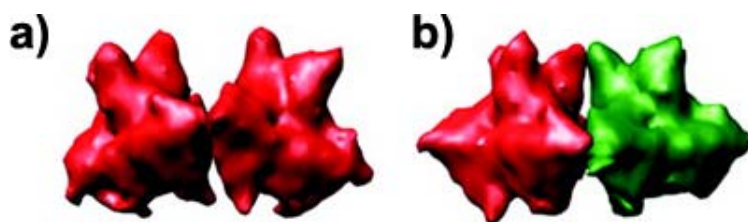


Figura 30: Contactes entre els trímers. a) Vista lateral de la interacció entre dos trímers adjacents disposats en un eix quinari. b) Vista lateral de la interacció entre dos trímers adjacents disposats en un eix senari. Es pot apreciar que la inclinació entre dues subunitats és major al voltant eix quinari. Adaptat de Luque et al., 2007.

Està descrit, en canvi, que les molècules de la pVP2 s'assemblen en hexàmers (Caston et al., 2001). De fet, un estudi del comportament de molècules de la pVP2 amb dominis C-terminals de llargades diferents va determinar que com més s'allargui el C-terminal més tendirà la molècula a la formació d'hexàmers, independentment de la presència o absència de la VP3 (Saugar et al., 2005). En la disposició hexamèrica, la inclinació entre molècules adjacents és nul·la (Coulibaly et al., 2005; Luque et al., 2007) i la presència del domini C-terminal no causa problemes estèrics.

Analitzant la distribució de càrregues en la superfície de la cara interna de la càpside, s'observa que en els eixos senaris s'hi formen uns canals hidrofòbics entre les subunitats que conformen els hexàmers. Aquests canals podrien acomodar la cara hidrofòbica de l'hèlix amfipàtica 443-452 (que té les càrregues de la cara polar apantallades per interacció amb la VP3, però té la cara hidrofòbica lliure). Això ajudaria a estabilitzar els hexàmers, impedit la inclinació de les subunitats de la pVP2 i fixant-ne la posició.

6- Probablement, part de les molècules de VP2-452 quedaran formant trímers "heterogenis", en el quals les altres dues molècules del trímer són pVP2 que conserven encara el domini C-terminal. Això permetrà que, en interaccionar 5 molècules de VP2-452 i organitzar-se al voltant d'un eix quinari, es formi un pentàmer de trímers amb les molècules de pVP2 situades als límits i, per tant, accessibles per a interaccionar amb altres molècules de pVP2 (que s'organitzen al voltant d'eixos senaris).

Així, doncs, podem visualitzar els pentàmers (de trímers) formats per VP2-452 com a nuclis d'assemblatge per a la resta dels trímers (de pVP2).

7- Un cop situades en la posició apropiada, les molècules de pVP2/VP2-452 patiran un darrer tall proteolític que escurçarà el domini C-terminal i donarà lloc, ara sí, a la forma madura de la VP2. Aquest tall es dona entre els residus Ala441 i Phe442 i és catalitzat per l'Asp431 de la pròpia VP2 (Irigoyen et al., 2009). Es tracta d'un tall autocatalític i intramolecular de les molècules de VP2, un procés irreversible que permet la compactació i fixació de la càpside (vegeu la figura 28; f).

Perquè es pugui donar aquest tall intramolecular, cal que la regió de l'hèlix $\alpha 4$ (on es troben tant l'Asp431 com l'enllaç 441-442) es reorganitzi, potser fins i tot perdent part de la estructura secundària helicoidal. De la mateixa manera, cal que aquesta regió, immediatament anterior a l'hèlix amfipàtica 443-452, sigui prou flexible per a permetre també la interacció amb la VP3 i les diferents disposicions que s'han de donar en la formació de pentàmers i hexàmers. De fet, les diferències en la posició de l'hèlix $\alpha 4$ entre les estructures resoltes per cristal·lografia de rajos X i per criomicroscopia electrònica (Luque et al., 2007) donen fe de la flexibilitat d'aquesta regió. Per a poder tenir una idea més quantitativa d'aquesta flexibilitat, podem comparar els *B-factors* de les diferents regions de la nostra estructura de la proteïna de la càpside; les hèlixs $\alpha 3$ (residus 416-423) i $\alpha 4$ (residus 434-440) de les 20 subunitats de la VP2 tenen un *B-factor* promitjat de 13.4 i 21.2, respectivament, mentre que el *B-factor* promitjat de la resta de l'estructura és de 11.7.

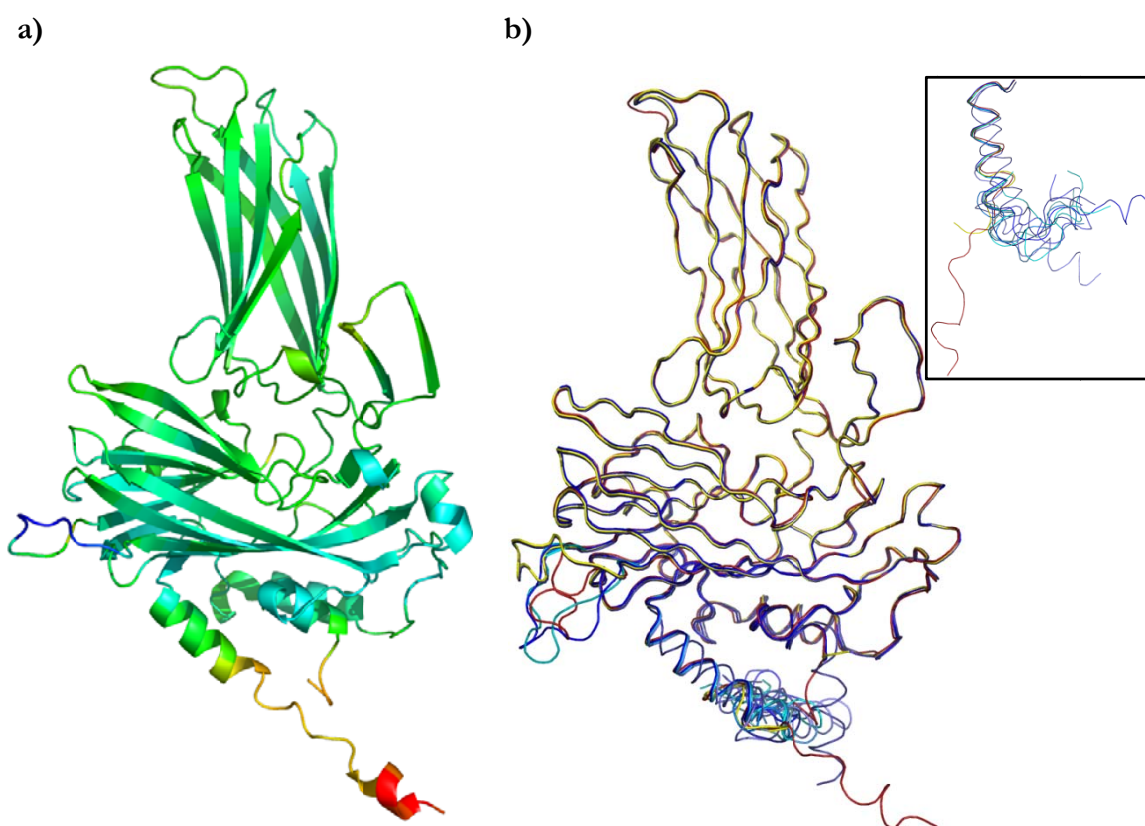


Figura 31: La flexibilitat de l'hèlix $\alpha 4$. **a)** Representació en cintes d'una subunitat de VP2, pintada en funció del *B-factor* de cada residu (blau per valors baixos, vermell per valors alts). **b)** Superposició de les diferents estructures obtingudes de VP2: l'estructura presentada en aquesta memòria (en vermell), la mateixa estructura posicionada en el mapa de microscopia de la partícula viral T=13 (en groc) i les 13 conformacions que adopta la VP2 en l'estructura cristal·logràfica de la partícula viral (en diferents blaus). En el requadre es mostra la regió C-terminal (a partir del residu 413) en una altra orientació, per a facilitar la visualització.

4.1.2 L'empaquetament com a estratègia de resistència

Una de les coses que més dificulta el control i la contenció d'IBDV és la seva elevadíssima resistència a les agressions ambientals (calor, acidesa, dessecament, etc.) i als agents virucides (agents químics, anticossos, ...) (Edgar and Cho, 1976).

Una de les característiques d'IBDV que contribueix a aquesta capacitat de resistència és la formació, en les cèl·lules infectades per aquest virus, de viroplasmes o cossos d'inclusió (CI): agregats formats per un gran nombre (de centenars a milers) de partícules virals altament empaquetades, organitzats en xarxes paracristal·lines d'aparença similar a un rusc d'abelles (Lunger and Maddux, 1972). Aquests CI, que són alliberats al medi extracel·lular al final de la infecció, amb la lisi de la cèl·lula hoste permeten la conservació de les partícules situades més a l'interior, les quals queden protegides de les agressions per les partícules que les envolten.

Aquesta estratègia és utilitzada també per altres virus, com ara el virus de la poliedrosi citoplasmàtica (CPV), un *Cypovirus* que genera grans xarxes d'un poliedre proteic en què queden revestides les càpsides de la progènie viral. Aquests cossos d'inclusió es dissolen en el tracte digestiu dels insectes, alliberant així els virions (Hill et al., 1999). La formació de CI també és característica dels virus iridiscent d'invertebrats (IIV), de la família dels *Iridoviridae*, les partícules dels quals s'organitzen dins el citoplasma de l'hoste formant unes estructures paracristal·lines que reflecteixen la llum i provoquen una coloració iridiscent en l'hoste (Juhl et al., 2006; Smith and Xeros, 1954).

L'anàlisi de l'empaquetament de les partícules SVP ($T=1$) en els nostres cristalls (de grup espacial $P2_13$) va permetre observar que aquestes partícules s'organitzen en un entramat molt similar al dels CI, també amb la característica aparença de rusc (vegeu la figura 32). És més, en revisar les dades dipositades per Coulibaly i col. (Coulibaly et al., 2005) sobre la cristallització de virions nadius d'IBDV (partícula $T=13$; codi PDB: 1WCE) vam comprovar que l'empaquetament dels cristalls responia també a aquest tipus d'entramat.

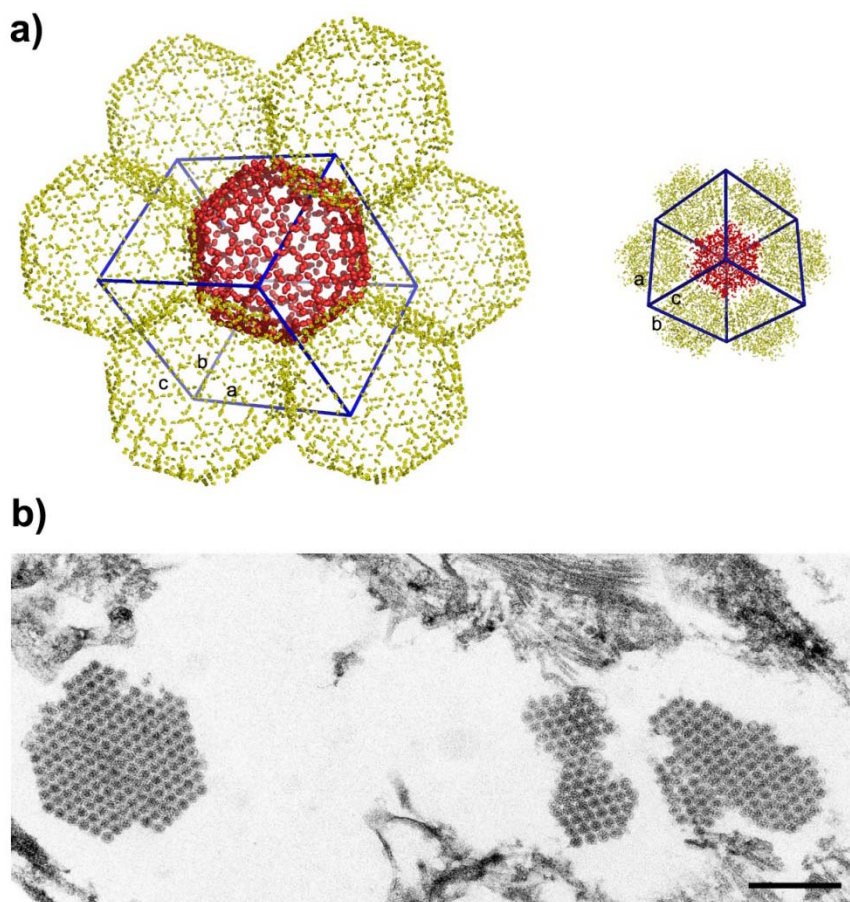


Figura 32: Comparació de la disposició de les partícules T=1 i T=13 en el cristall amb els cossos d'inclusió que el virus forma espontàniament en les cèl·lules infectades. **a)** Empaquetament en els cristalls de partícules T=13 (esquerra) i T=1 (dreta). El virus de referència (en vermell) està envoltat per sis partícules, relacionades per simetria. Les línies blaves defineixen la cel·la cristal·logràfica. **b)** Secció ultrafina de fibroblasts d'embrió de pollastre infectats amb IBDV (soca Soroa). La barreta representa 500 nm.

Aquesta observació va en la línia dels resultats publicats per Natarajan i col. (1998), que mitjançant l'anàlisi dels contactes cristal·lins de diverses estructures cristal·logràfiques de partícules virals van descriure van demostrar que els residus implicats en els contactes partícula-partícula sovint també formen part de regions dissenyades amb una funció biològica demostrada, com ara l'estimulació immunogènica o la interacció amb els receptors cel·lulars (Natarajan and Johnson, 1998). Així doncs, no és estrany que si els virions d'IBDV s'empaqueten formant CI el patró d'empaquetament de les partícules es reproduïxi en els nostres cristalls.

En els cristalls de les SVP, la interacció entre partícules veïnes ve determinada pels contactes entre residus d'uns quants *loops* flexibles del domini P (*loops* P_{BC}, P_{DE}, P_{FG}, P_{HI} i P_{AA'}) amb els residus del voltant de l'eix quinari (als *loops* S_{BC}, S_{DE}, S_{CC'}) i de l'espícula (als *loops* P_{BC} i P_{HI}) de les partícules veïnes, en un conjunt d'interaccions que impliquen almenys 42 residus (vegeu la figura 33). Són justament aquestes interaccions les que provoquen les

variacions conformacionals entre alguns *loops* de les diferents subunitats que es van poder observar gràcies a la relaxació de les restriccions de NCS en l'afinament de l'estructura.

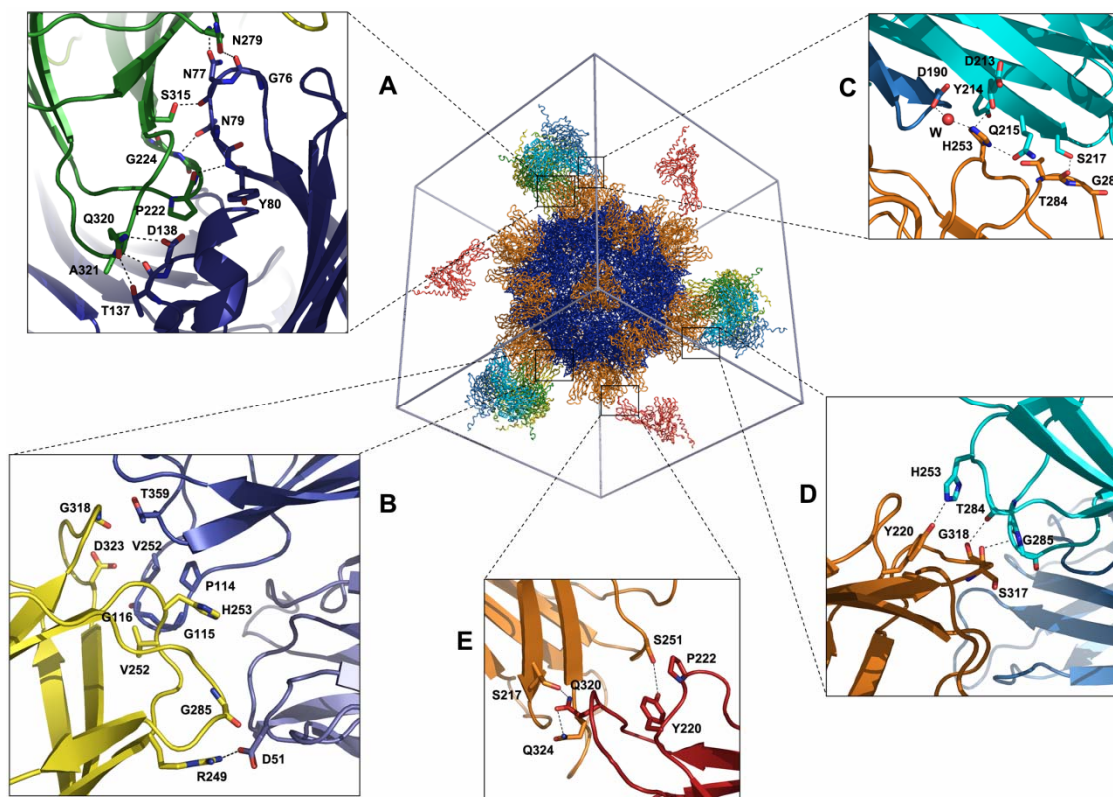


Figura 33: Interaccions partícula-partícula en el cristall. Al centre de la figura es representen una partícula SVP de referència (en taronja i blau pels dominis P i S, respectivament) i els protòmers de les partícules veïnes que hi estableixen contactes. En els plafons (A-E) s'hi mostren els detalls de les interaccions que s'estableixen entre els protòmers, amb els residus directament implicats en ponts d'hidrogen o contactes hidrofòbics representats com en pals.

L'estructura del viriò d'IBDV (partícula T=13) no està resolta a prou resolució com per a tenir informació sobre les cadenes laterals dels aminoàcids, però analitzant l'empaquetament s'observa que els *loops* implicats en els contactes partícula-partícula són bàsicament els mateixos (incloent-hi els *loops* P_{DE} i P_{FG}). Podem extrapolar, doncs, que els residus responsables de l'empaquetament de les SVP als nostres cristalls són també els aminoàcids implicats en la formació de CI en els virions d'IBDV.

Entre els residus que intervenen en l'empaquetament (vegeu la figura 33), hi trobem curiosament les posicions 253, 279 i 284 (situades als *loops* flexibles P_{DE} la primera i al P_{FG} les altres dues), que s'ha observat que estan implicades en la definició de la virulència de la soca viral (Brandt et al., 2001; van Loon et al., 2002) i l'adaptació a cultius en teixits (Brandt et al., 2001; Lim et al., 1999; Mundt, 1999; van Loon et al., 2002). El que no s'ha pogut esbrinar encara és el mecanisme pel qual aquests residus determinen les característiques de cada soca viral.

Tot això sembla suggerir un relació entre els processos en què estan implicats aquests residus, de manera que l'habilitat d'IBDV per a formar cossos d'inclusió no sigui només una estratègia de resistència en la fase extracel·lular sinó que estigui també lligada a la virulència i al tropisme del virus.

4.1.3 El canal als eixos quinaris

Tant en les SVP ($T=1$) com en les càpsides dels virions ($T=13$), hi ha 12 vèrtexs, cadascun d'ells organitzat al voltant d'un eix quinari. Analitzant l'estructura de les partícules SVP $T=1$, es pot observar que les molècules de VP2, en assemblar-se en pentàmers, deixen desocupat l'espai al voltant d'aquest eix quinari, fet que dona lloc a un canal que travessa la càpside de dins fins a fora. Aquest canal, d'uns 20Å de diàmetre, només queda tancat en la superfície externa de la càpside, on els *loops* S_{DE} de les cinc subunitats de VP2 s'estenen fins l'eix de simetria formant una "tapa" del canal. En la nostra estructura de les SVP, a més, hem pogut observar aquests *loops* S_{DE} en cinc conformacions diferents, cosa que prova la seva flexibilitat i fa factible pensar que puguin estar implicats en els canvis conformationals que es donin al voltant de l'eix quinari.

En calcular el potencial electrostàtic de la superfície interna d'aquest canal, es va veure que aquesta és majoritàriament electronegativa, tot i que presenta algunes regions carregades positivament i un anell de residus hidrofòbics prop de la sortida exterior del canal.

L'organització de les molècules de VP2 en els eixos pentamèrics és igual en les càpsides $T=13$ natives, per la qual cosa els virions d'IBDV presenten també 12 canals d'igual forma, mida i càrrega que els observats en les SVP.

Així, tenint en compte que una molècula de ssRNA té un diàmetre d'uns 10Å i que també està carregada negativament, tant la mida com la distribució de càrregues d'aquests canals resulten apropiades per a la extrusió de ssRNA virals, que passarien flotant repel·lits per la càrrega de les parets. D'aquesta manera els ssRNA podrien travessar l'embolcall proteic del virus i arribar al medi intracel·lular, on podrien actuar com a mRNA.

S'han descrit casos similars en la literatura científica, com ara la càpside intermèdia del rotavirus (RV, un reovirus, també amb genoma dsRNA). Aquesta càpside presenta als eixos quinaris uns canals de característiques similars (Mathieu et al., 2001), per on s'ha observat, per criomicroscopia electrònica, que surten els transcrits del RNA viral (Lawton et al., 1997). També en la càpside dels nodavirus i els tetravirus (com la $T=4$ del virus del Nudaurelia ω Capensis (N ω V), un tetravirus, de genoma +ssRNA), s'ha observat que als quinaris s'hi agrupen uns feixos d'hèlixs que formen un canal hidrofílic per on es pot translocar el genoma viral i iniciar la infecció (Munshi et al., 1996). De la mateixa manera, existeixen altres complexos proteics dedicats a la translocació d'àcids nucleics que també són "canals" amb una estructura i distribució de càrregues similars, com ara la proteïna bacteriana de conjugació TrwB (Gomis-Ruth and Coll, 2001; Gomis-Ruth et al., 2001) o el connector del bacteriòfag $\phi 29$ (Guasch et al., 2002).

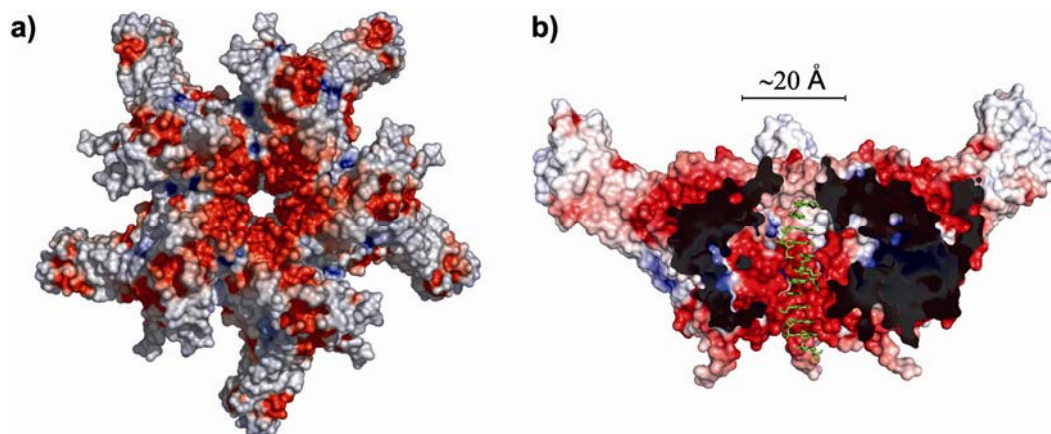


Figura 34: El canal als eixos quinaris. Representació de la superfície de potencial electrostàtic d'un pentàmer de VP2, vist des de l'interior de la partícula **(a)** i des del costat **(b)**. Les superfícies de potencial es van calcular amb el programa GRASP (Nicholls et al., 1993); el color blau correspon a les càrregues positives i el vermell a les negatives. En la vista lateral (b) s'hi ha modelat un ssRNA atravesant el canal.

En el cas d'IBDV, per a poder dur a terme l'extrusió de mRNA, caldria primer que els *loops* S_{DE} de les VP2 que participen del canal canviessin de conformació i “destapessin” la sortida del canal. Això podria anar lligat a l'entrada del viriò a la cèl·lula hoste, per exemple obrint-se per un canvi en el pH, ...

D'altra banda, si el canal dels quinaris quedés obert en entrar a l'hoste, també permetria l'entrada al viriò dels substrats necessaris per a l'activitat polimerasa de la RpdR viral VP1, (nucleòtids trifosfat, ions, ...), així com la sortida dels altres productes d'aquesta reacció (els grups pirofosfats alliberats, ...). Així, la reacció de transcripció del genoma viral podria tenir lloc *dins* de la càpside del virus, sense risc d'haver d'exposar el dsRNA (producte de la reacció de la VP1) al sistema de defensa de la cèl·lula. Això concorda amb algunes evidències experimentals que suggereixen no només que l'activitat polimerasa d'IBDV està lligada a les partícules virals (Luque et al., 2009b), sinó que aquesta pot tenir lloc *a l'interior* de la càpside (Spies et al., 1987).

Hi ha, també, una altra consideració respecte la temporalitat d'aquest potencial ús del canal del quinari: el feix d'hèlixs amfipàtiques que provoca l'assemblatge de la VP2-452 en pentàmers està situada a l'eix quinari, tapant l'entrada del canal en la cara interna de la càpside (Luque et al., 2007). Això fa que la replicació en la càpside, independentment de l'estat d'activació de la polimerasa VP1, no pugui tenir lloc fins que s'hagi donat la maduració de la càpside i es desbloquegi el canal (almenys si la síntesi de nou RNA depèn de l'entrada de nucleòtids i de la sortida dels transcrits).

4.1.4 El motiu IDA i l'entrada a l'hoste

El primer pas per a poder iniciar una infecció viral és sempre l'entrada a la cèl·lula hoste. Per a poder-ho aconseguir, la majoria dels virus requereixen la interacció de la seva càpside

amb els receptors de la superfície cel·lular. Donat que la VP2 és l'únic component de la càpside d'IBDV, és lògic pensar que serà també la proteïna responsable d'aquesta interacció.

En un estudi publicat recentment, Delgui i col. (Delgui et al., 2009) identifiquen la seqüència Ile-Asp-Ala (IDA) (residus 234-236) de la VP2 com a motiu responsable de la unió a integrines de tipus $\alpha 4\beta 1$. Aquesta seqüència es troba situada en el *loop* flexible que connecta les fulles β C i D, a la base del domini P. Mirant l'estructura general de la VP2 en el context del trímer (que és igual tant en les SVP com en la càpside T=13), el motiu IDA es localitza a la cara inferior de l'espícula, amb l'aspàrtic 235 (el residu acídic crític (Ruoslahti, 1996)) encarat cap a la interfase entre els dominis P i S.

Així, doncs, cal suposar que s'haurà de donar algun tipus de canvi conformacional per tal de deixar accessible l'Asp 235 i permetre la interacció amb la integrina cel·lular. Si ens fixem en les connectivitats del domini P, veurem que presenta tres punts de fixació: la interacció del barril β d'un domini P amb el β -*hairpin* A-A' del domini P subjacent uneix entre sí els tres dominis P de cada trímer, donant així consistència a l'espícula. A més, en la molècula de VP2 cada domini P està unit al domini S a través de dos *loops* llargs i flexibles: el *loop* S_G-P_A (175-184) i el *loop* P_I-S_H (338-348). Una possibilitat seria que el domini P pivotés sobre aquests dos *loops* i arribés a inclinar-se prou respecte el domini S com per a deixar exposat el motiu IDA (vegeu la figura 35; segona fila). Com que els tres dominis P del trímer estan units entre ells pel β -*hairpin*, aquest moviment podria ser concertat, fet que provocaria una "obertura" de l'espícula.

Una altra possibilitat podria ser també que es trenqués la interacció dels β -*hairpins* A-A' amb el barril β de la molècula veïna i que el β -*hairpin* es desplaçés, deixant accessible el motiu IDA (vegeu la figura 35; tercera fila). En aquest model, però, la superfície accessible no és tanta com en l'anterior, cosa que fa pensar que requeriria també algun altre desplaçament del domini P, que en quedar "lliure" de la interacció amb el β -*hairpin* tindria menys restriccions per a moure's.

Aquests grans canvis conformacionals són força habituals en les proteïnes de la càpside dels virus, com s'ha vist en la VP4 de rotavirus (Pavel et al., 2008; Pesavento et al., 2005), en l'hemaglutinina del virus de la grip (Skehel and Wiley, 2000; Wiley and Skehel, 1987) o en l'externalització de la VP1 en poliovirus i rinovirus (Fricks and Hogle, 1990). Aquests canvis permeten exposar regions "amagades" implicades en la unió al receptor cel·lular o en la fusió amb la membrana cel·lular de l'hoste; així el virus pot mantenir aquestes regions, necessàriament conservades, fora de l'abast dels anticossos de l'hoste i de la resta d'agressions de l'entorn extracel·lular (Hogle, 2002).

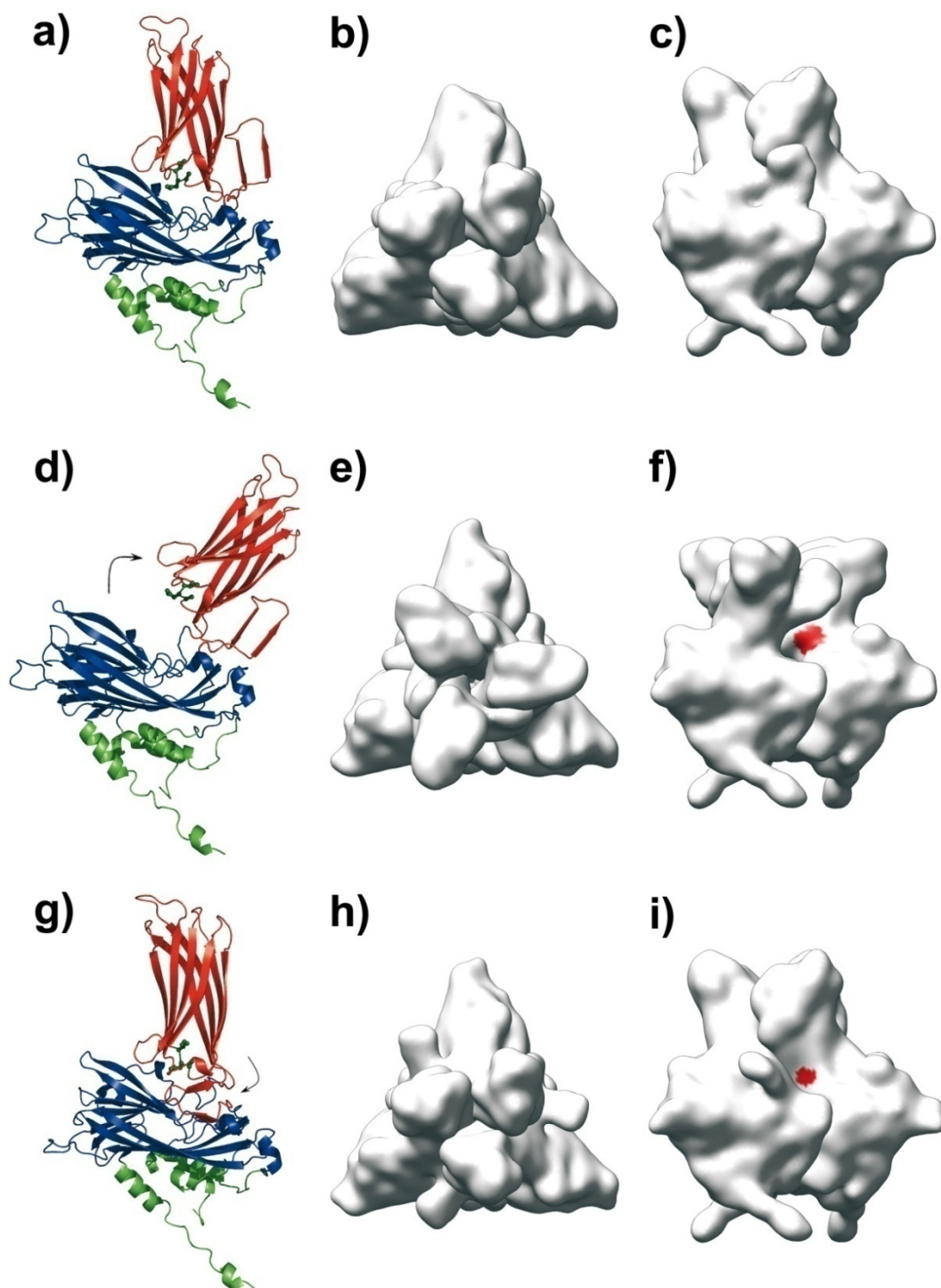


Figura 35: Models d'obertura de l'espícula per a permetre l'exposició del motiu IDA. **a)** Estructura d'un monòmer de la VP2, amb els dominis indicats amb diferents colors (P, taronja; S, blau; B, verd) i els residus del motiu IDA (234-236) representats per boletes. **b) i c)** Vistes apical i lateral d'un trímer de VP2. La superfície es representa en blanc tret de la regió de l'IDA, que està pintada en vermell (la regió només serà visible si queda exposada). **d)** Esquema de l'obertura de l'espícula fent pivotar el domini P sobre els *loops* que el separen del domini S. **e) i f)** Vistes apical i lateral la superfície del trímer corresponent, on s'observa que el motiu IDA queda exposat. **g)** Esquema de l'obertura de l'espícula fent pivotar el *hairpin* A-A'. **h) i i)** Vistes apical i lateral la superfície del trímer corresponent, on s'observa que el motiu IDA queda exposat.

4.2 LA VP1

4.2.1 El palmell girat

Basant-se en l'anàlisi filogenètica de les seqüències de diferents RpdR virals, Gorbalenya i col. (Gorbalenya et al., 2002) van postular que la VP1 d'IBDV, junt amb la polimerasa d'IPNV i la dels tetravirus TaV i EeV, es diferenciava de la resta de polimerases per una permutació al subdomini del *palmell* que afecta la connectivitat entre els elements d'estructura secundària on es localitzen els motius polimerasa A, B i C. La determinació de l'estructura tridimensional de la VP1 d'IBDV presentada en aquesta memòria confirma aquest fet, ja que s'observa que la connectivitat entre aquests elements segueix l'ordre no canònic C-A-B, fet que dóna lloc a un plegament de tipus $\beta\beta\beta\alpha\beta$ (enlloc del canònic $\beta\alpha\beta\beta\alpha$). En l'estructura atòmica, a més, s'hi observa clarament que la disposició general del *palmell* no es veu afectada: igual que en les altres RpdR, segueix tenint una fulla β central de quatre cadenes β emmarcada per hèlixs α . De la mateixa manera, també es manté inalterada la disposició dels residus aspàrtics claus per a la catàlisi de la reacció de polimerització (veure figura 36).

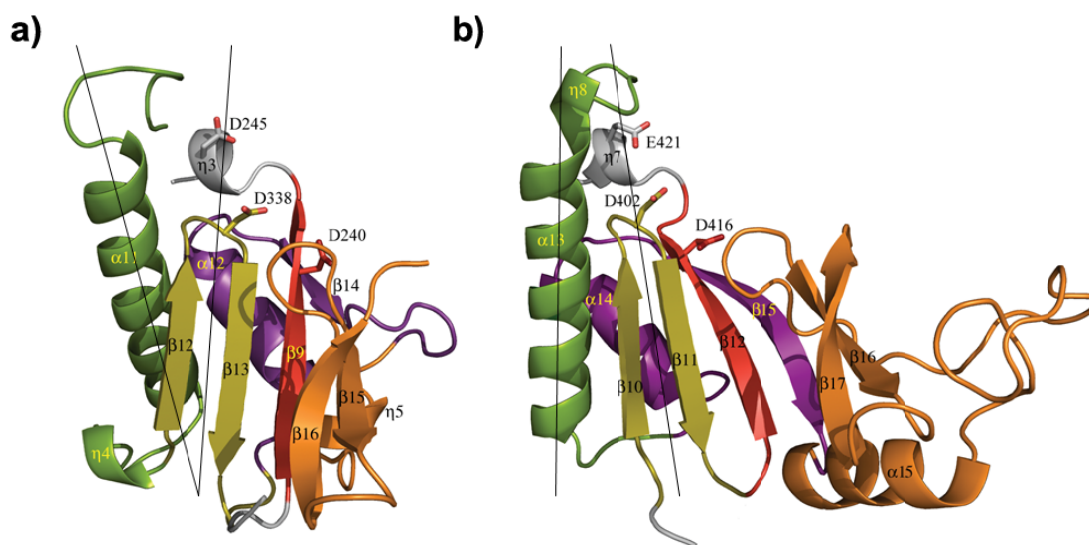


Figura 36: Comparació de l'organització estructural del *palmell* canònic i el no canònic. Representació en cintes del subdomini del palmell de les polimerases de FMDV (a) i IBDV (b). Les dues estructures estan orientades superposant els residus àcids del centre catalític (representats en la figura per palets), que presenten disposicions equivalents en les dues polimerases. Els elements d'estructura secundària que contenen els motius conservats s'indiquen en colors: A, vermell; B, verd; C, groc; D, lila; E, taronja; F, blau; G, rosa. Per a remarcar les diferències en la inclinació de l'hèlix que conté el motiu B, s'han traçat dues línies seguint la direcció d'aquesta hèlix i de la fulla β central.

No obstant això, aquesta permutació de les connectivitats sí que té repercussions en la cavitat del centre actiu. Si comparem l'estructura de la VP1 amb la d'una RpdR canònica alineant-ne els seus residus catalítics (Asp402, Asp416, Glu421, en la VP1 d'IBDV), es pot

observar que l'angle entre l'hèlix que conté el motiu B (hèlix B) i la fulla β central difereix marcadament en les dues estructures.

En la VP1, l'hèlix B està inclinada dirigint la seva part superior cap a la fulla β central, en lloc de la inferior, com passa en les polimerases canòniques. L'hèlix B, a més, comença en l'extrem superior (N-terminal) en una hèlix 3_{10} , la $\eta 8$, que dóna mitja volta de rosca més. Això fa que el *loop* que precedeix l'hèlix B (*loop* B, en endavant), i especialment la cadena lateral del residu Asn486, sobresurtin cap a la cavitat del centre actiu (vegeu la figura 36).

El modelat d'un RNA motlle en l'estructura de la VP1 per superposició amb el complex d'iniciació de RpdR de $\varphi 6$ permet observar clarament que el *loop* B bloqueja l'accés de la cadena de RNA motlle al centre catalític. Això implica que, per tal de ser activa, la RpdR VP1 haurà de patir un canvi conformacional en aquesta regió. Aquest canvi, com hem vist, és provocat per la interacció de la VP1 amb l'extrem C-terminal de la VP3. En l'estructura de la VP1 cocrystal·litzada amb el pèptid del C-terminal de la VP3, els residus que formaven l'hèlix $\eta 8$ han perdut aquest plegament i es troben formant part del *loop* B. Això fa que l'hèlix B comenci mitja volta de rosca més tard, per la qual cosa el *loop* B es projecta en sentit oposat al que té en la forma *apo* (no unida al pèptid) i l'accés al centre actiu queda desbloquejat. En aquesta forma oberta (o desbloquejada), el *loop* B segueix la mateixa conformació que el *loop* equivalent en les polimerases de $\varphi 6$ i FMDV, pel que cal suposar que aquesta és la forma activa de la polimerasa d'IBDV (veure figura 37). La participació de la VP3 en el control de l'activació de la VP1 serà discutit en el següent apartat.

L'alineament de les seqüències d'aminoàcids de la proteïna VP1 d'IBDV, IPNV, BSNV i DXV (vegeu la figura suplementària 5, a la pàgina 65) indica que aquesta permutació es dóna en la polimerasa de tots quatre virus, cosa que suggereix que aquesta és una característica general de la família dels *Birnaviridae*. Això fa suposar que tots els virus d'aquesta família podrien tenir sistemes de control de l'activitat polimerasa similars, o que, si més no, la proteïna VP3 estarà implicada en la iniciació de la síntesi de RNA en tots aquests virus.

4.2.2 El control de l'activació de la VP1 per la VP3

Diversos estudis bioquímics sobre IBDV han detectat una interacció entre la polimerasa VP1 i la proteïna multifuncional VP3 (Lombardo et al., 1999; Maraver et al., 2003a; Tacken et al., 2002; Tacken et al., 2000). La comparació de les estructures de la VP1 sola (forma *apo*) i en complex amb un pèptid que mimetitza la regió C-terminal de la VP3 fa patent que la interacció VP1-VP3 té clares implicacions en l'activitat de la RpdR, ja que en desbloqueja el centre actiu, fet que permet l'entrada del RNA motlle.

D'altra banda, els assajos d'activitat polimerasa realitzats usant com a motlle un +ssRNA que conté les regions no traduïdes (UTR) del 5' i el 3' del segment B d'IBDV, mostren clarament que la interacció de la VP1 amb la VP3 multiplica per cinc l'activitat de la VP1, corroborant l'observació estructural que la VP3 promou l'activació de la VP1 com a RpdR.

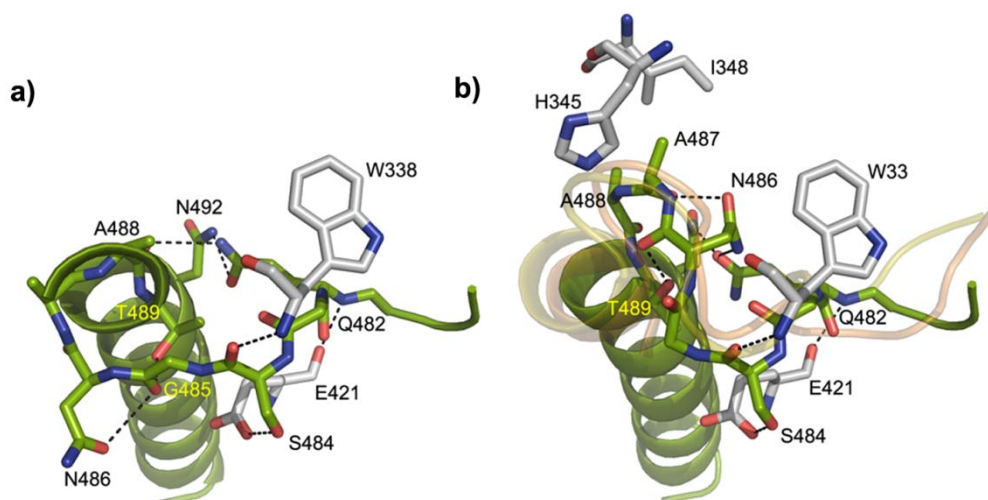


Figura 37: Canvis en la disposició del *loop* B per acció de la VP3. Representació de la regió del *loop* que precedeix l'hèlix que conté el motiu B en l'estructura de la VP1 (a) i en l'estructura del complex VP1-VP3 (b), on s'observa el canvi de conformació tancada (a) a oberta (b) que provoca la interacció amb el pèptid de la VP3. S'hi indiquen els residus implicats en els contactes intramoleculars que estableixen les dues conformacions. La disposició del *loop* equivalent en les RpdR de FMDV i ϕ 6, representades a (b) en groc i taronja, respectivament, es correlaciona bé amb la conformació oberta del *loop* B.

Tot i això, els resultats preliminars dels assajos d'activitat polimerasa usant motlles amb diferents 3'UTR aporten noves dades que permeten matisar l'efecte de la VP3 en l'activitat de la VP1. En aquests assajos, la VP3 també fa augmentar l'activitat de la VP1, però només si la cadena de RNA usada com a motlle conté a l'extrem 3' l'UTR específica dels dos segments de genoma d'IBDV; si el motlle no presenta aquesta UTR, la VP3 *inhibeix* la síntesi de dsRNA, fins i tot per sota dels nivells d'activitat de la VP1 no tractada amb el pèptid. Això encaixa amb l'observació de von Einem i col., que van descriure que, *in vitro*, els extrems 3'UTR dels segments A i B són crítics per l'activitat de la VP1 (von Einem et al., 2004).

Així, doncs, a part d'activar-la, la VP3 també fa que la VP1 esdevingui selectiva i que només accepti els RNAs virals com a motlle per a la síntesi de RNA. La interacció VP1-VP3, doncs, permet que l'activació de la RpdR es doni de manera simultània a la restricció dels RNA motlles que es poden usar per a la síntesi de RNA. Aquesta capacitat és, de ben segur, crítica per a l'èxit del procés d'infecció viral: si la VP1 ja fos activa quan és expressada als ribosomes i alliberada al citoplasma cel·lular, podria usar els mRNA cel·lulars com a motlles per a la síntesi. Aleshores, en alliberar el dsRNA produït, provocaria l'activació del sistema de resposta antiviral de la cèl·lula hoste (Garcia-Sastre and Biron, 2006; Levy and Garcia-Sastre, 2001). En canvi, si la VP3 és present quan es doni la síntesi del nou RNA, podrà embolcallar el dsRNA naixent – cosa que el protegirà de la degradació per nucleases cel·lulars (Luque et al., 2009b)- i reclutar la VP1 cap a les càpsides que s'estiguin assemblant (Lombardo et al., 1999) - on el dsRNA generat quedarà aïllat del citoplasma cel·lular, i, per tant, no activarà el sistema de silenciament de l'hoste.

4.2.3 La interacció VP1-VP3

La determinació de l'estructura atòmica de la proteïna VP3 d'IBDV (Casañas et al., 2008) va revelar que el segon domini (residus 160 a 220) presentava homologia amb un domini del factor de transcripció bacterià $\sigma 70$ (codi PDB: 1IW7), el qual interacciona amb una regió de la RNA polimerasa bacteriana que té forma de ferradura, estructurada com a hèlix-gir-hèlix (Vassylyev et al., 2002). Tenint en compte això, i a partir de la comparació de la VP1 amb la regió interaccionant de la polimerasa bacteriana, podem postular que el segon domini de la VP3 podria interaccionar amb una regió hèlix-gir-hèlix del subdomini dels *dits* de la VP1 formada per les hèlix $\alpha 7$ i $\alpha 8$. La distribució de les càrregues d'aquestes regions concorda amb aquest model, ja que la superfície de la regió $\alpha 7$ - $\alpha 8$ de la VP1 conté bàsicament càrregues positives, i la de les hèlixs $\alpha 4$ i $\alpha 5$ de la VP3 està carregada negativament (vegeu la figura 38).

Així, la VP3 quedaria “recolzada” prop del canal d'entrada del RNA motlle de la VP1 i el seu extrem C-terminal (que segons les prediccions estaria desestructurat) quedaria prou proper al canal d'entrada de nucleòtids de la VP1 com per a poder-hi interaccionar i desbloquejar-ne el centre actiu. Aquest model, en què la VP3 interacciona amb la VP1 per una regió diferent del seu extrem C-terminal, explicaria per què en els assajos d'activitat s'obtenen millors resultats usant la VP3 sencera que no pas usant el pèptid sol, fins i tot quan la relació molar VP3:VP1 és de 2:1 per la VP3 sencera i de 10:1 pel pèptid. Presumiblement, l'accés de la regió C-terminal de la VP3 al centre actiu de la VP1 serà més eficient si la molècula de VP3 resta unida a la VP1 que no pas si cada cop que cal iniciar la síntesi les dues proteïnes han de tornar a posicionar-se correctament per a poder tornar a interaccionar.

Tenint en compte l'estructura proposada per les RNPs d'IBDV, on el dsRNA viral està embolcallat per la VP3 (Luque et al., 2009b), podria ser que la molècula de VP3 unida a la VP1 faciliti, per interacció amb alguna de les VP3 de la RNP, l'aproximació del RNA motlle al canal d'entrada de la cadena motlle a la VP1.

D'altra banda, aquest model d'interacció no afecta les regions de dimerització de la VP3, per la qual cosa la interacció de la VP1 amb la VP3 seria compatible amb la dimerització d'aquesta.

Cal tenir en compte, també, que aquest model situa la regió d'interacció de la VP3 prop de l'extrem C-terminal del nostre model de la VP1, al que seguirien els 75 residus més C-terminals de la VP1 que no apareixen en la nostra estructura però que podrien estar també implicats en la interacció amb la VP3.

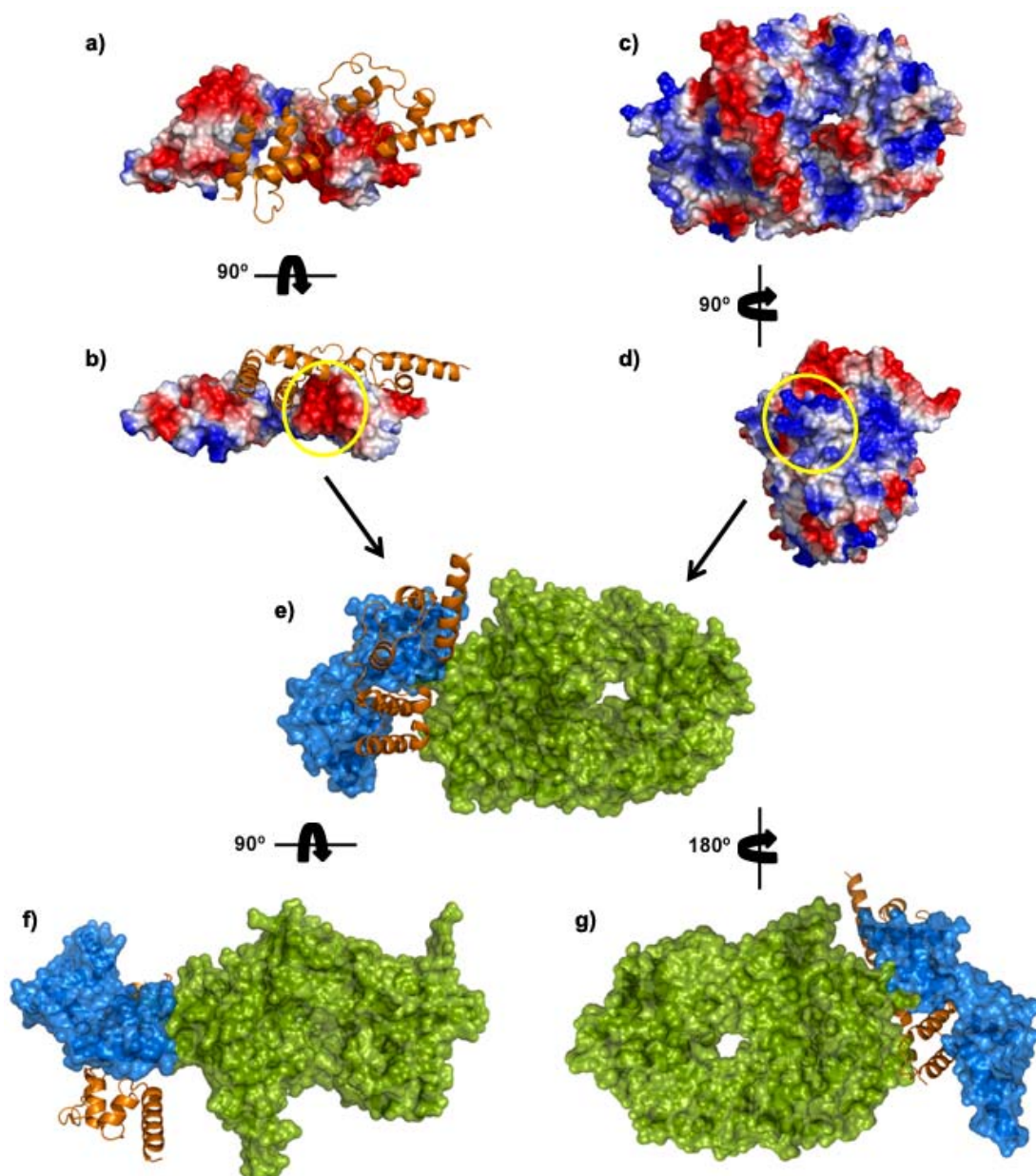


Figura 38: Model d'interacció entre la VP1 i la VP3. a) i b) La superfície de potencials electrostàtics del dímer de la VP3. Una de les subunitats es representa en cintes, per a facilitar-ne la identificació. El cercle groc indica la regió de les hèlixs $\alpha 4$ i $\alpha 5$, carregada positivament. c) i d) La superfície de potencials electrostàtics de la VP1. El cercle groc indica la regió de les hèlixs $\alpha 7$ i $\alpha 8$, carregada negativament. e) Vista frontal del model del complex VPP1-VP3, basat en la interacció de les regions marcades a (b) i (d). La VP1 (verd) i el monòmer de VP3 que hi interacciona (blau) estan representats en superfícies, mentre que per l'altra molècula de VP3 s'ha mantingut la representació en cintes. f) i g) Vistes del model des de dalt i des de darrera.

Manca, doncs, validar experimentalment aquest model, per exemple determinant l'estructura cristal·logràfica del complex VP1-VP3, o amb la generació de mutants puntuals en la zona putativa d'interacció i l'anàlisi de com aquests afecten l'activitat de la VP1 i la seva interacció amb la VP3.

4.2.4 La guanililació de la VP1

S'ha proposat un lloc de guanililació de la VP1 d'IPNV al residu Ser 163 (Xu et al., 2004), que en l'IBDV correspondria al residu Ser 166 (Pan et al., 2007) o al Thr 168 (Xu et al., 2004), segons l'alineament de seqüències que s'utilitzi. En l'estructura cristal·logràfica de la polimerasa d'IBDV, aquests dos residus estan situats al final del domini N-terminal, prop de la regió de la *punta dels dits* (vegeu la figura 39; a).

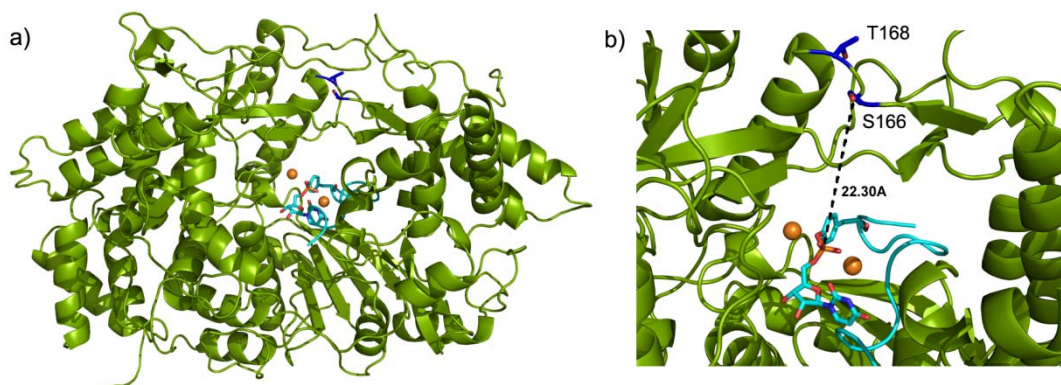


Figura 39: Posició dels residus Ser 166 i Thr 168 en l'estructura de la VP1. a) Visió general de l'estructura de la VP1 (amb el *loop* B en conformació oberta), en verd, amb els ions catalítics representats com a boles taronges. Les cadenes laterals dels residus Ser 166 i Thr 168 estan representades com a palets i destacades en blau fosc. Al centre actiu s'hi ha modelat la VPg de FMDV unida a un UMP (Ferrer-Orta et al., 2006a), en blau cel, per a usar-la com a referència. b) Ampliació de la regió del centre actiu. La distància que separa el grup hidroxil de la Ser 166 de la posició apropiada per a poder-se unir al fosfat α d'un nucleòtid està representada amb una línia discontinua.

Aquests dos residus, però, queden a més de 20 Å del centre actiu (com s'observa a la figura 39; b) i, per tant, dels residus catalítics que haurien d'unir-hi les molècules de GMP (la Ser 166, per exemple, queda a 24 Å de l'aspàrtic catalític Asp 402). A més, l'estructura de la VP1 mostra que tots dos residus, especialment la Thr 168, estan situats en una regió molt poc accessible. D'altra banda, encara que es poguessin guanililar, és difícil explicar com aquests residus poden actuar d'iniciador de la síntesi de RNA si queden tan apartats del motlle amb el qual hauran d'aparellar les dues molècules de GMP. Tampoc es pot considerar que puguin actuar com a iniciadors per a la reacció d'una altra molècula de VP1, ja que caldria un canvi conformacional molt gran perquè qualsevol d'aquests dos residus quedés exposat i pogués posicionar-se correctament en el centre actiu d'una altra molècula. I, de fet, aquest tipus de canvi resulta poc probable ja que implicaria una reorganització radical de la regió N-terminal de la VP1, que presenta una estructura molt compacta.

Una alternativa a aquestes posicions la podem trobar analitzant l'alineament entre les seqüències d'aminoàcids de la proteïna VP1 dels diferents birnavirus, on podem observar que els vuit primers residus de la proteïna, en l'extrem més N-terminal, conformen una regió amb un alt grau de conservació entre els diferents virus de la família (vegeu la figura

suplementària 5, a la pàgina 65). En aquesta regió conservada s'hi troba un residu serina, la Ser 2. D'altra banda, les prediccions d'estructura secundària concorden que es tracta d'una regió desestructurada, si més no fins la posició 11. Així mateix, en l'estructura cristal·logràfica els 26 primers residus de la VP1 estan desordenats i no hi apareixen, i els residus 26 a 33 es troben també desestructurats, projectant-se cap a fora del cos de la polimerasa. Tot això, juntament amb l'anàlisi de les interaccions VP1-VP1 en el cristall, ens fa pensar que el lloc de guanilació de la VP1 podria estar situat en el residu Ser 2, a l'extrem N-terminal, ja que és una regió desestructurada i molt flexible, amb capacitat per a entrar amb facilitat a la cavitat catalítica de la VP1 i posicionar adequadament el seu grup hidroxil en el centre actiu.

A partir de l'estructura de la polimerasa 3D de FMDV en complex amb una molècula de VPg utilitzada (codi PDB: 2D7S (Ferrer-Orta et al., 2006a)), podem modelar la posició de la VPg de FMDV en l'estructura de la VP1 d'IBDV (vegeu la figura 40; a). Així, prenent com a referència la posició d'aquesta VPg, podem veure que l'extrem N-terminal de la VP1 no pot accedir al seu propi centre actiu pel canal de sortida del dsRNA naixent, i molt menys encara situar el residu Ser 2-GMP-GMP en la posició de la Tyr 3-UMP de la VPg modelada. En canvi, considerant l'empaquetament de les molècules de VP1 en els nostres cristalls, podem veure que l'extrem N-terminal d'una VP1 pot accedir amb facilitat (considerant-la com una regió flexible) al centre actiu de la molècula de VP1 veïna. Aquesta observació ens permet postular un mecanisme de guanilació **intermolecular**, en què una molècula de VP1 aporta el residu guanilable i una segona molècula de VP1 aporta el centre catalític que durà a terme la reacció (vegeu la figura 40; b). De la mateixa manera, la iniciació de la síntesi de dsRNA requerirà de dues molècules de VP1, una que actuarà com a enzim i l'altra que actuarà d'iniciador.

No obstant això, no hem pogut posar a punt un assaig de guanilació de la VP1 usant VP1 recombinant com a substrat, per la qual cosa no s'ha pogut confirmar aquesta hipòtesi assajant la capacitat de guanilació de la VP1 amb mutacions en aquesta regió N-terminal.

DESGUANILILACIÓ DE LA VP1

Un cop acabada la síntesi del genoma viral, la molècula de VP1 guanilada que ha servit d'iniciador quedarà unida al dsRNA generat per un enllaç covalent que l'uneix amb les guanines de l'extrem 5' de la nova cadena.

Per a poder tornar a actuar d'iniciador, cal que la VP1 quedi lliure altre cop, cosa que requereix que l'enllaç VP1-genoma es trenqui. Per tal que el genoma no s'escurci a cada ronda de replicació i es perdi informació genètica, aquest tall s'ha de donar en l'enllaç fosfodièster entre el grup hidroxil del residu guanilat de la VP1 i el GMP del 5' del genoma, alliberant per un cantó la proteïna VP1 sense nucleòtids i per altre el genoma complet.

D'altra banda, si assumim que la càpside viral no es desassembla quan el virió entra a la cèl·lula hoste (evitant així exposar el genoma dsRNA als sistemes de defensa cel·lulars) i que la generació dels nous transcrits +ssRNA es dona a recer de la càpside viral, com suggereixen els resultats de diversos grups (Mertens et al., 1982; Spies et al., 1987), cal assumir que aquests transcrits que actuaran com a mRNAs seran extrudits pels canals que la càpside té als eixos quinaris (com s'ha comentat en l'apartat 4.1.3). Aquests canals tenen un diàmetre d'uns 20 Å, cosa que fa que els transcrits virals només els puguin travessar si ja s'han alliberat de la molècula de VP1 (de 95 x 55 x 54 Å³ de dimensió). La hipòtesi del trencament de l'enllaç entre la VP1 i el RNA, a més, es veu abonada per l'observació experimental que, almenys *in vitro*, la presència de la VPg no és necessària per a que el +ssRNA genòmic d'IPNV sigui traduït (Nagy et al., 1987).

Així, doncs, és plausible pensar que la VPg (la VP1 unida al genoma) es desguanilila, tot i que no disposem de dades que expliquin com i quan es trenca l'enllaç entre la VP1 i el +ssRNA. Tanmateix, podem postular algunes opcions:

- La separació de la VP1 podria anar lligada a la iniciació de la síntesi de la nova cadena de +ssRNA.
- També pot ser que la desguanililació es doni dins la càpside, però un cop el complex VP1-ssRNA hagi estat desplaçat de la doble cadena per la síntesi de la cadena nova i quedi lliure per a interaccionar amb algun dels altres components del virió o alguna molècula cel·lular que hi hagi dins la càpside. Una de les opcions més evidents seria que pogués transferir el GMP del 5' (junt amb la resta de la cadena) a una molècula acceptora, com un grup pirofosfat o a una molècula de GTP, però les evidències experimentals semblen indicar que la VP1 no és capaç de dur a terme aquest tipus de reacció (Dobos, 1993). Una altra opció podria ser que transferís la cadena de +ssRNA a algun dels pèptids derivats de la maduració de la VP2, que tenen una mida apropiada per a travessar el canal de l'eix quinari (les VPg dels picornavirus, per exemple, són extrudides de la càpside amb el genoma viral unit i tenen uns 20-24 aminoàcids (Paul, 2002)).
- Finalment, la desguanililació podria tenir lloc fora de la càpside. En el cas del poliovirus, per exemple, l'enllaç entre la VPg i el genoma viral és trencat per un enzim de la cèl·lula hoste (Ambros et al., 1978). En el cas dels birnavirus, en què la VPg és una proteïna força més gran i no pot ser extrudida de la càpside, caldria, perquè un enzim cel·lular pugui actuar sobre l'enllaç fosfodièster, que el residu serina amb què es troba unit el 5' del RNA estigués situat en una regió flexible i desestructurada, que pogués sortir pel canal del quinari i quedar accessible per l'enzim de l'hoste. Aquest mecanisme, doncs, només seria compatible amb la localització del residu guanililable de VP1 en una zona flexible que pogués passar pel canal, com ara el domini N-terminal.

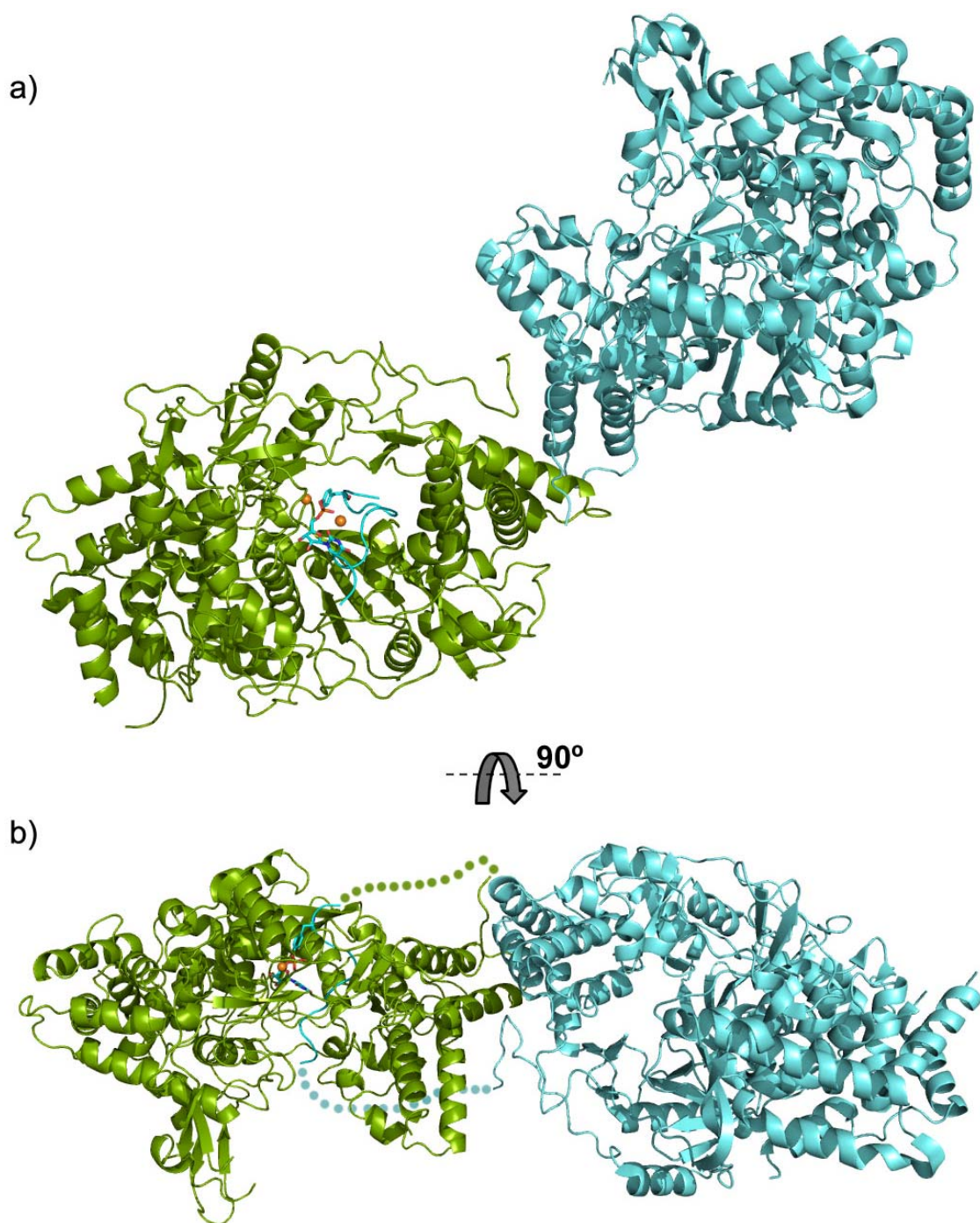


Figura 40: Model de guanililació de la VP1. a) Representació en cintes d'una molècula de VP1 (en verd), a la que se li ha modelat la VPg del FMDV (Ferrer-Orta et al., 2006a), amb una molècula de UMP unida a la Tyr 3. En blau cel, es representa també la molècula de VP1 veïna en el cristall, relacionada per un eix binari cristal·logràfic. b) En la figura anterior, un cop rotada per a facilitar la comprensió, s'hi indica el recorregut que hauria de seguir el domini N-terminal (no resolt en l'estructura cristal·logràfica) per tal de poder situar la Ser 2 al centre catalític. En verd, el recorregut si es considera la guanililació intramolecular; en blau cel si es considera la guanililació intermolecular.

4.2.5 Model de síntesi del RNA viral

Les estructures dipositades de la VP1 no contenen RNA en el model. Tot i els nostres intents, no ha sigut possible obtenir una estructura de la VP1 en complex amb una cadena de RNA i/o un nucleòtid trifosfat. Per a mirar d'identificar els residus de la VP1 que queden en la posició adient per a poder interaccionar amb les molècules substrat, hem superposat l'estructura de la VP1 cocristal·litzada amb el pèptid C-terminal de VP3 (codi PDB: 2R70) amb el complex d'iniciació de la polimerasa de $\varphi 6$ (Butcher et al., 2001), basant-nos en l'elevat grau d'homologia estructural existent entre les dues proteïnes. El modelat de la cadena de RNA de l'estructura de $\varphi 6$ en el centre actiu de la VP1 revela que molts dels residus estrictament conservats en les polimerases dels diferents birnavirus (vegeu la figura suplementària 5, a la pàgina 65) estan en posicions adequades per a la interacció amb els lligands. De fet, molts d'aquests residus estan també conservats en les polimerases de FMDV i $\varphi 6$ (vegeu la figura suplementària 8, a la pàgina 68). Aquestes observacions, doncs, avalen el modelat del RNA en l'estructura de la VP1.

En aquest model, el motiu estructural G (residus 252-261, en el *loop* que connecta la cadena $\beta 6$ i l'hèlix $\eta 4$) forma el canal d'entrada del motlle. En aquesta regió s'hi torben la Gly 259 i la Pro 261 (en la forma *cis*), estrictament conservades en la regió homòloga de les polimerases de picornavirus. Mitjançant experiments amb mutacions puntuals en les polimerases de FMDV i poliovirus, s'ha observat que aquests residus tenen un paper clau en la unió de la cadena motlle i en la translocació de l'àcid nucleic durant la síntesi del RNA (Arias et al., 2005; Thompson and Peersen, 2004). La polimerasa de $\varphi 6$ també té una cisprolina en una posició equivalent, fet que suggereix que les RpdR dels birnavirus, picornavirus i cystovirus podrien tenir mecanismes similars d'unió de la cadena motlle i de translocació del RNA.

En l'estructura de l'apofорма de la VP1 (en absència de la VP3), el *loop* B bloqueja l'accés de la cadena de RNA motlle al centre catalític. Tot i això, després de la interacció amb la regió C-terminal de la VP3 i el conseqüent canvi de conformació del *loop* B, el canal queda alliberat i la base acceptora, al 3' del motlle, pot accedir al centre actiu. La posició d'aquesta base quedaria estabilitzada per la interacció amb els residus Ser 339 i Ile 337 del motiu F i Gly 485 del motiu B (vegeu la figura 41; a).

De la mateixa manera, el modelat de la cadena motlle i els nucleòtids aparellats del complex d'iniciació de $\varphi 6$ en l'estructura del complex VP1- Mg^{2+} permet comprovar que els dos ions Mg^{2+} del centre actiu, que estan coordinats pel residu Asp 402 (del motiu C) de la VP1, també estan ben situats per a unir els rNTPs entrants. A part, les cadenes laterals dels residus Glu 421 (motiu A) i Asn 493 (motiu B) també poden interaccionar amb els grups hidroxil 2' i 3' del rNTP, cosa que concorda amb els resultats obtinguts en picornavirus, on s'ha vist que els residus equivalents (Asp i Asn) juguen un paper clau tant en la selecció com en la unió dels nucleòtids (Gohara et al., 2000). Finalment, les cadenes laterals dels residus bàsics Lys 333 i Arg 335 (motif F), Lys 419 (motiu A), Lys 529 (motiu D) i Arg 175 (de l'hèlix $\alpha 5$), situades al canal d'entrada de nucleòtids, podrien estabilitzar els grups fosfat del nucleòtid entrant (vegeu la figura 41; b).

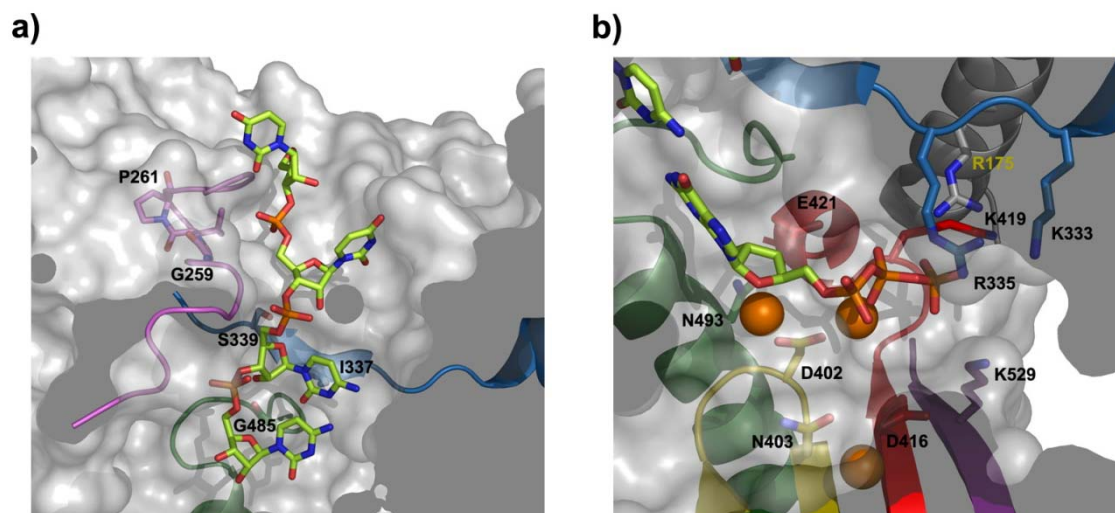


Figura 41: Interaccions de la VP1 amb el RNA i els rNTP. **a)** Model de les interaccions de la VP1 amb la cadena motlle de RNA. El motiu G (en rosa) forma l'entrada del canal d'accés del motlle al centre actiu. La posició de la base acceptora en el centre actiu de la VP1 queda establitzada per la interacció amb els residus Ile 337 i Ser 339 del motiu F (blau) i la Gly 485 del motiu B (verd). **b)** Model de les interaccions de la VP1 amb els rNTP entrants. La posició del nucleòtid entrant quedaria establitzada pels dos ions Mg^{2+} i pels residus Asp 402 i Asn 403 del motiu C (groc), Arg 529 del motiu D (lila), Lys 333 i Arg 335 del motiu F (blau) i el residu Arg 175 de l'hèlix $\alpha 5$ (gris).

Tot això sembla avalar la funcionalitat de la polimerasa VP1 tal com aquesta apareix en les estructures determinades.

Aquestes estructures mostren també un segon obstacle que impediria la replicació del genoma viral: la regió $\alpha 19$ - $\eta 10$ - $\eta 11$, que bloqueja parcialment el canal de sortida. Cal considerar, doncs, que aquesta regió ha de patir un reordenament conformacional que permeti l'entrada de l'iniciador (part d'una molècula de VP1 unida a un grup GMP) i la sortida del dsRNA sintetitzat. Tenint en compte que les hèlix $\eta 11$ i $\alpha 20$ estan separades per un *loop* llarg i flexible, podem pensar, per exemple, en un moviment de la regió $\alpha 19$ - $\eta 10$ - $\eta 11$ en que aquesta pivotaria sobre el *loop* $\alpha 18$ - $\alpha 19$, allunyant-se de la cavitat central cap enfora, resseguint el domini del *polze*.

La síntesi de la cadena positiva, o transcripció del genoma viral, es donarà a partir del genoma dsRNA i en el context de la càpside viral. Quan, dins aquesta, hi hagi rNTPs accessibles, provinents del citoplasma cel·lular, es podrà donar la guanilació d'algunes molècules de VP1 i la síntesi de les noves cadenes codificants.

La interacció homotípica VP1-VP1 podria ajudar a situar la VP1 que ha de fer de polimerasa (o VP1e, de VP1-enzim) al 3' del motlle, per interacció amb la VP1 que hi ha unida al 5' de la cadena positiva sortint (o VP1g, de VP1-genòmica).

Paral·lelament, la interacció amb la regió C-terminal de la VP3 desbloquejarà el canal d'entrada del motlle de la VP1e (vegeu la figura 42; b). La densitat sense assignar que apareix en els mapes del complex VP1-pèptid de la VP3 suggereix que la VP3 introduiria el

seu extrem C-terminal pel canal d'entrada de nucleòtids. En qualsevol cas, un cop hagi promogut el canvi conformacional que alliberarà el pas de la cadena motlle, l'extrem de VP3 haurà de sortir de la cavitat catalítica de la VP1 per a permetre l'entrada dels nucleòtids i la sortida dels grups pirofosfat que es generen com a productes de reacció.

Un cop la cadena motlle hagi entrat a la VP1e, la regió $\alpha 19$ - $\eta 10$ - $\eta 11$ d'aquesta s'haurà de desplaçar per permetre l'entrada de la regió guanililada de la VP1 (o VP1i, de VP1-iniciador) que ha de fer d'iniciador. Així, la GMP de la VP1i s'aparellarà amb la base acceptora del motlle (vegeu la figura 42; e), i això la situarà la ribosa en la posició adequada per a la interacció del seu grup hidroxil 3' amb el fosfat α del nucleòtid entrant (vegeu la figura 42; f). A mesura que es vagi sintetitzant la nova cadena, la VP1i anirà sortint del centre actiu, ara ja unida al dsRNA que s'està generant (vegeu la figura 42; g).

Donat que el genoma viral es troba en forma de RNP (Luque et al., 2009b), a mesura que la VP1e avanci en la replicació d'un motlle, les VP3 associades al dsRNA viral s'hauran d'anar desprenent per a permetre que la doble hèlix es desaparelli i una de les dues cadenes pugui entrar a la RpdR. Tenint en compte que la VP3 interacciona amb més afinitat amb el dsRNA que amb el ssRNA (Navarro, 2009), podem suposar que a mesura que el ssRNA viral vagi entrant a la polimerasa per ser usat com a motlle i, per tant el dsRNA de les RNPs es vagi dissociant, les molècules de VP3 aniran perdent afinitat per la cadena ssRNA parental que no entri a la RpdR, i, probablement, interaccionin amb el dsRNA naixent que vagi sortint de la polimerasa per tornar a formar la RNP. D'aquesta manera, la nova cadena codificant quedarà integrada en la RNP genòmica, mentre que l'antiga cadena de polaritat positiva és alliberada.

La síntesi de la cadena negativa, o replicació del genoma viral, es donarà a partir de la cadena positiva, és a dir, d'un ssRNA. El mecanisme d'iniciació en aquest cas encara no ha estat aclarit, ja que no s'han trobat evidències de la presència de molècules de VP1 (VP1g) unides a l'extrem 5' de la cadena no codificant (Magyar et al., 1998), tot i que l'extrem 3' de la cadena codificant està altament conservat i acaba sempre amb el triplet CCC, on es podrien aparellar els guanilils de la VP1i (Shwed et al., 2002). S'ha postulat també que la cadena positiva podria formar, al seu extrem 3', un *hairpin* que podria estar implicat en la iniciació de la síntesi de la cadena negativa (Boot et al., 1999). Un cop iniciada, però, la reacció es donarà de manera anàloga a la síntesi de la cadena positiva i donarà lloc a una cadena de dsRNA a la qual aniran revestint les molècules de VP3, formant així les RNPs.

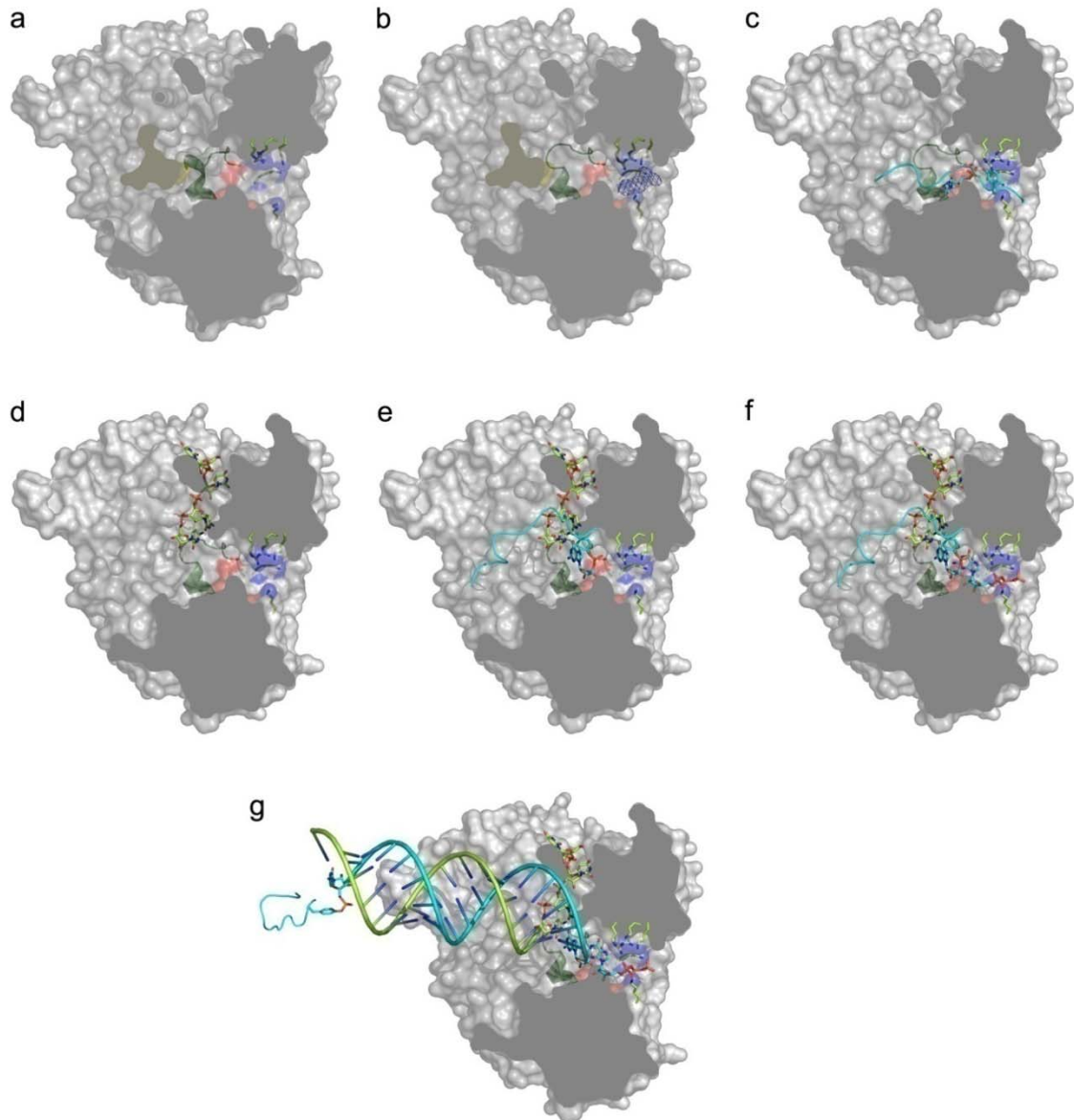


Figura 42: Model de síntesi del RNA viral. La representació de la superfície de la VP1 (en gris) s'ha tallat i orientat de manera que es puguin observar els tres canals pels que els substrats accedeixen al centre actiu (superfície vermella). **a)** En l'estructura de la forma apo de la VP1, el *loop* B (cinta verda) ocupa parcialment el lloc d'unió de la base acceptora del motlle. **b)** L'extrem C-terminal de la VP3 podria accedir al centre actiu de la VP1 pel canal d'entrada de rNTP (indicat per la superfície blava i les cadenes laterals dels residus bàsics), com suggereix la densitat electrònica no assignada (xarxa blava), que es podria interpretar com a part del pèptid de la VP3. Això promourà un canvi conformacional en el *loop* B que permetrà l'accés dels substrats al centre actiu. **c)** El moviment de la regió $\alpha 19$ - $\eta 10$ - $\eta 11$ (superfície groga en (a) i (b)) desbloquejarà el canal de sortida, permetent que l'extrem N-terminal d'una altra molècula de VP1 accedeixi al centre actiu i se situï en la posició apropiada per a poder unir una molècula de GMP (ambdues indicades en blau cel). Aquest pas és independent de motlle, i no té perquè anar seguit immediatament per l'inici de la síntesi de RNA; de fet, la VP1 guanilada haurà de sortir del centre actiu per a permetre l'entrada de la resta de substrats. **d)** Quan el centre actiu quedi desocupat i el seu accés desbloquejat, la cadena de RNA motlle accedirà al centre actiu. **e)** Una molècula de VP1 guanilada entrarà al centre actiu i la GMP que porta unida s'aparellarà amb la base acceptora del motlle. **f)** Això permetrà que una segona molècula de GTP, un cop aparellada amb el motlle, quedi situada en la posició apropiada per a unir-se a la GMP de la VPg. **g)** En continuar la síntesi del dsRNA, la molècula de VP1 que ha servit d'iniciador de la reacció quedarà unida a l'extrem 5' de la nova cadena.

4.3 ESQUEMA DE LA INFECCIÓ VIRAL

A partir de la informació disponible actualment, junt amb les dades i hipòtesis presentades en aquesta memòria, proposem un esquema dels processos que tenen lloc durant el cicle viral d'IBDV.

Entrada a l'hoste: L'IBDV es transmet per la via fecal-oral (Weiss and Kaufer, 1994), per la qual cosa els virions entren a l'hoste a través del seu sistema digestiu, probablement en el context d'un cos d'inclusió format per milers de virions. L'organització en cossos d'inclusió és precisament el que ajuda als virions a mantenir la seva viabilitat quan travessen els suc digestius de l'au. Així, alguns dels virions podran travessar la paret intestinal, entrar al corrent sanguini de l'hoste i accedir a la bursa, on es troben els precursors dels limfòcits B.

Infecció de les cèl·lules diana: La internalització dels virions d'IBDV a la cèl·lula hoste requereix la interacció de la càpside viral amb els receptors de la superfície cel·lular. Gràcies a la flexibilitat dels *loops* que connecten els dominis S i P de la proteïna de la càpside, el motiu IDA de la base del domini P pot quedar prou exposat com per ser reconegut per les integrines de tipus $\alpha 4\beta 1$ (Delgui et al., 2009). Gràcies a la interacció amb aquestes integrines i, probablement, per acció d'algun(s) altre(s) coreceptor(s) encara no identificat(s), els virions entrarien a la cèl·lula per endocitosi, quedant així continguts dins un endosoma (vegeu la figura 43; pas 1).

Donada l'elevada homologia entre els dominis S i P de la VP2 (la part que conforma la coberta del virus) i la proteïna de la càpside dels nodavirus (Coulibaly et al., 2005), junt amb la gran similitud que hi ha amb els mecanismes d'assemblatge de les càpsides d'aquestes dues famílies virals (Irigoyen et al., 2009), s'ha hipotetitzat que el seu mecanisme de translocació del genoma viral podria ser similar al que s'ha descrit per nodavirus i tetravirus (Munshi et al., 1996): un cop endocitats, un canvi en l'entorn de la càpside (possiblement el canvi de pH, o la disminució de la concentració de calci (Galloux et al., 2007)) promou l'obertura dels canals dels eixos quinaris, per on sortiran (alguns de) els pèptids generats durant la maduració de VP2 (pep46). Aquests pèptids s'insertarien a la membrana de l'endosoma i hi formarien un porus (Chevalier et al., 2005; Galloux et al., 2007) (vegeu la figura 43; pas 2). Això pot ser que provoqui la desestabilització de l'endosoma i el virió pugui passar al citoplasma, o que, senzillament, el canal serveixi per a connectar el virió amb el citoplasma cel·lular.

Qualsevol d'aquestes dues opcions permetrà l'entrada de NTPs cel·lulars al virió (també a través dels canals dels eixos quinaris), cosa que reactivarà l'activitat de la VP1. Això permet que dins la càpside hi tingui lloc la transcripció del genoma, és a dir, que a partir del genoma dsRNA es sintetitzin noves còpies del RNA de polaritat positiva. Aquesta síntesi es dona seguint un mecanisme semiconservatiu (Mertens et al., 1982), de manera que a mesura que es generi la nova cadena s'anirà desplaçant la cadena de polaritat positiva original. Una segona molècula de VP1, un cop guanilada (VP1pGpG), servirà una

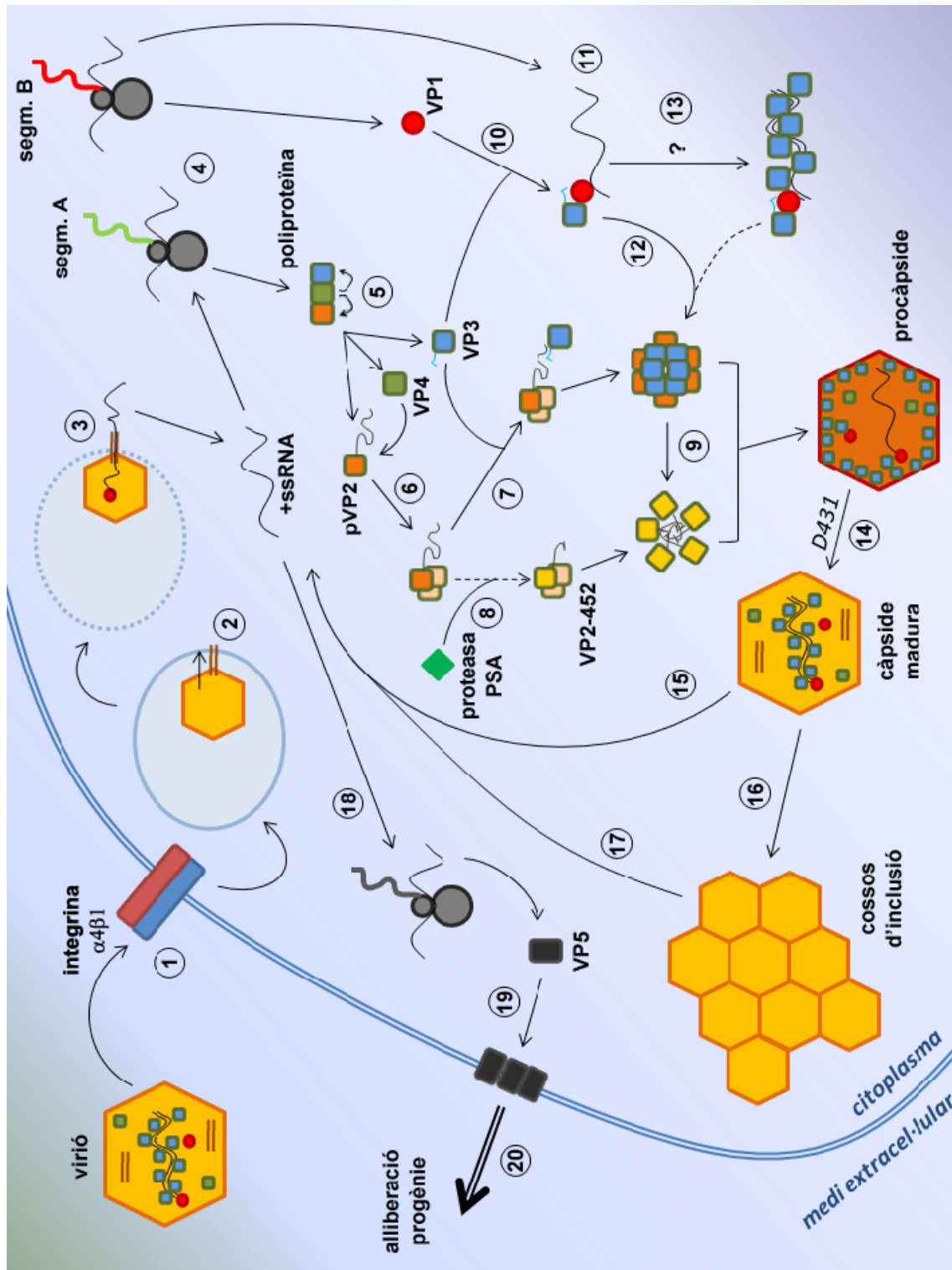


Figura 43: Esquema de la infecció viral.

proteïna iniciadora, per la qual cosa les cadenes +ssRNA desplaçades del dsRNA portaran una molècula de VP1 unida a l'extrem 5' (Magyar et al., 1998). Per a poder sortir de la càpside, aquest enllaç entre la VP1 i el primer nucleòtid del genoma s'haurà de trencar. Un cop lliure, la cadena de RNA podrà ser extrudida a través del canal de l'eix quinari i del porus de la membrana endoplasmàtica (si la membrana de l'endosoma no s'ha lisat en el pas anterior), passant així al citoplasma (vegeu la figura 43; pas 3).

Síntesi de les proteïnes virals: El +ssRNA corresponent al segment A del genoma d'IPNV, sense cap proteïna viral unida, resulta apte per a la seva traducció *in vitro*, probablement gràcies a una regió d'iniciació de la traducció (o IRES, de l'anglès *internal ribosome entry site*) (Nagy et al., 1987). Això permet suposar que, un cop al citoplasma, els +ssRNA virals podran interaccionar amb els ribosomes i servir de motlle per a la síntesi de les proteïnes virals. El segment A codificarà per a la síntesi de la poliproteïna, mentre que el segment B codificarà per a la síntesi de la RpdR VP1 (vegeu la figura 43; pas 4). El primer ORF del segment A, que codifica per la proteïna VP5, també és expressat en aquesta fase de la infecció viral, però la iniciació de la seva traducció es dona de manera molt desfavorida en comparació a la del ORF que codifica per la poliproteïna; això farà que la síntesi de la VP5 es doni a nivells molt menors i la seva acumulació sigui molt lenta.

La poliproteïna serà processada per l'activitat proteolítica de VP4 (Jagdish et al., 1988), alliberant així les proteïnes pVP2, VP3 i la pròpia VP4 (vegeu la figura 43; pas 5). La síntesi de pVP2 i de VP3 en el context d'una poliproteïna permet assegurar nivells comparables de producció de les dues proteïnes i, a més, fa que aquestes quedin pròximes en l'espai i, per tant, en facilita la interacció.

Un cop alliberada, la pVP2 pot continuar sent processada per la VP4 en tres dianes de tall secundàries.

Processament i assemblatge de la proteïna de la càpside: Com s'ha comentat en l'apartat 4.1.1, les molècules de pVP2 s'uniran entre elles per a formar trímers (vegeu la figura 43; pas 6). Aquests trímers estan estabilitzats per un gran nombre d'interaccions de diferents tipus i seran la unitat bàsica de formació de la càpside.

A part d'aquesta interacció homotípica pVP2-pVP2, gran part de les molècules de pVP2 interaccionaran amb la VP3 (vegeu la figura 43; pas 7). Els residus àcids de l'extrem C-terminal de la VP3 complementaran les càrregues positives de la cara polar de l'hèlix amfipàtica 443-452 de la proteïna de la càpside (Saugar et al., 2005).

Aquesta interacció protegirà el domini C-terminal de pVP2 del tall dut a terme per la proteasa cel·lular PSA i, per altra banda, estabilitzarà l'hèlix amfipàtica. La presència del domini C-terminal limitarà la inclinació que es podrà donar entre les pVP2 dels diferents trímers, que s'organitzaran al voltant d'eixos de simetria d'ordre 6, donant lloc a associacions hexamèriques. Els hexàmers de pVP2 presenten uns canals hidrofòbics en la seva superfície interna, on es podrà encaixar la cara apolar de l'hèlix amfipàtica, cosa que estabilitzarà l'organització hexamèrica (Luque et al., 2007).

D'altra banda, una petita part de les molècules de pVP2 seran proteolitzades per una proteasa cel·lular, la PSA (Irigoyen, 2009), abans no quedin protegides per la interacció amb la VP3. Aquest tall dona lloc a una altra forma de la proteïna de la càpside, la VP2-452 (vegeu la figura 43; pas 8). En tenir un domini C-terminal més curt i menys protuberant, les VP2-452 de diferents trímers podran interaccionar en un angle més pronunciat que les molècules de pVP2. Això permet establir una disposició pentamèrica, on les hèlixs amfipàtiques (en la forma VP2-452, l'extrem C-terminal) se situen just a l'eix de simetria d'ordre 5, on poden formar un feix d'hèlixs per a estabilitzar la seva cara hidrofòbica. Aquest feix d'hèlixs taponen el canal que travessa el pentàmer i contribueix en l'estabilització d'aquesta organització.

Un cop cinc trímers s'han associat formant un pentàmer, aquest actuarà com a nucli per l'assemblatge de la resta de trímers (vegeu la figura 43; pas 9). En cada un dels trímers del pentàmer, les proteïnes de la càpside que no estan tocant l'eix quinari (i que probablement siguin encara pVP2) podran interaccionar amb trímers de pVP2 per a formar hexàmers, augmentant així el nombre de molècules assemblades fins a formar una procàpside T=13 que contindrà 260 trímers (780 molècules de proteïna de la càpside).

Activació i reclutament de la proteïna de la càpside: Paral·lelament a la síntesi de la poliproteïna i l'assemblatge de la càpside, els ribosomes traduiran també els mRNA del segment genòmic B, que codifica per la RpdR VP1. Tal i com s'ha explicat en l'apartat 4.2.2 d'aquesta memòria, la VP1 es sintetitzarà en la forma inactiva, amb el centre actiu bloquejat pel *loop* B. Això evitarà que VP1 usi els ssRNA del citoplasma (tant els mRNA cel·lulars com els d'origen viral) per a sintetitzar dsRNA, que activaria els mecanismes de defensa antivirals de la cèl·lula hoste.

La VP1, però, podrà interaccionar amb la proteïna VP3 (Maraver et al., 2003a), que, mitjançant la seva regió més C-terminal, desbloquejarà el centre actiu de la RpdR (vegeu la figura 43; pas 10). El desbloqueig del centre actiu potencia la selectivitat de la VP1 enfront dels RNA que podrà usar com a motlles. Així, la VP1 complexada amb la VP3 unirà preferentment els +ssRNA virals que es trobin al citoplasma (vegeu la figura 43; pas 11).

D'altra banda, aquesta interacció VP1-VP3 permetrà la encapsidació de la polimerasa (Lombardo et al., 1999). Gràcies a la capacitat de la VP3 de dimeritzar i oligomeritzar, el complex VP1-VP3 (i VP1-VP3-ssRNA viral) podrà ser reclutat per les molècules de VP3 unides a la cara interna de les associacions hexamèriques formades per pVP2. Això farà que la càpside T=13 s'assembli al voltant de les molècules de VP1, cosa que permetrà que aquesta -i els genomes virals que porti associats- quedin encapsidats (vegeu la figura 43; pas 12).

Ara bé, mentre estigui lliure en el citoplasma cel·lular, la VP1 tindrà accés als nucleòtids que necessita per a realitzar la seva activitat polimerasa. Per tant, podria ser que un cop hagi estat activada per la interacció amb la VP3 i hagi unit un +ssRNA viral que pugui usar com a motlle, la VP1 sintetitzi la cadena negativa del genoma viral i generi el dsRNA. En aquest cas, les molècules de VP3 disponibles, que tenen una gran afinitat pel dsRNA, revestiran

aquest genoma (Luque et al., 2009b) i evitaran que provoqui l'activació dels mecanismes cel·lulars de defensa antiviral (vegeu la figura 43; pas 13). Aquestes partícules ribonucleoproteïques també podrien ser reclutades cap a la càpside per la interacció de la VP3 que les recobreix amb les molècules de VP3 que estableixen els hexàmers de proteïna de la càpside.

Encapsidació del genoma viral i de les proteïnes estructurals: La càpside viral està formada per molècules de pVP2 i de VP2-452. A dins, s'hi trobaran la resta dels elements estructurals dels virions:

- i) la VP3, encapsidada per interacció amb el domini C-terminal de pVP2;
- ii) la VP1, encapsidada per la interacció indirecta amb pVP2, mediada per la VP3;
- iii) el genoma viral (en forma +ssRNA o dsRNA), que s'encapsidaria també indirectament, per reclutament de la VP1 a la que estaria unit; i
- iv) la VP4, que probablement no s'encapsida per interacció directa, sinó perquè la formació de la càpside comença quan encara no s'han processat totes les molècules de poliproteïna, i això pot fer que la VP4 quedi envoltada per la càpside que s'està assemblant.

Aquesta estratègia de reclutament i encapsidació, no estaria basada en un procés serial i regulat, sinó en la interacció directa o indirecta amb la proteïna de la càpside de manera simultània a l'assemblament d'aquesta. Això fa que l'empaquetament d'un nombre concret dels diferents elements estructurals (inclòs el genoma viral) no sigui necessari per a l'assemblatge de la càpside, cosa que explicaria la gran variabilitat dels càlculs de l'estequiometria dels components de la càpside, especialment en el cas de la VP1 i, sobretot, de la VP4 (Luque et al., 2009a). La possibilitat que s'encapsidin molècules de VP1 que no portin unit un RNA viral justifica també l'existència, en la progènie d'una infecció, de poblacions de virions amb un nombre diferent de segments genòmics (de cap a quatre segments) (Luque et al., 2009a).

Maduració de la càpside viral: A mesura que es va assemblant la procàpside viral, les molècules de proteïna de la càpside, tant les pVP2 com les VP2-452, patiran un últim procés proteolític. Aquest tall, catalitzat pel residu Asp 431 de la pròpia molècula, donarà lloc a la forma madura de la proteïna de la càpside, la VP2, de 441 aminoàcids (Irigoyen et al., 2009) (vegeu la figura 43; pas 14). Els pèptids resultants d'aquesta maduració quedaran englobats dins la càpside viral i serviran en la següent ronda d'infecció, per a permetre la sortida de l'endosoma al genoma viral (vegeu la figura 43; pas 2). La maduració proteolítica de la càpside, a més d'assegurar la compactació i fixació de la càpside, allibera els feixos d'hèlixs formats per l'hèlix amfipàtica 443-452 en els eixos quinaris de la càpside. Això "destapa" els canals que hi ha al llarg d'aquests eixos (com s'ha comentat en l'apartat 4.1.3), cosa que permet l'entrada de NTPs del citoplasma i, per tant, l'activitat polimerasa de la VP1 del virió. Així, a partir de les cadenes +ssRNA que han servit de mRNA per a la infecció, se sintetitzarà el -ssRNA necessari per a obtenir el genoma viral de dsRNA. En

aquest cas no es tenen prou dades per a saber com es du a terme la iniciació de la síntesi, tot i que es creu que podria ser també iniciada per una molècula de VP1 guanililada. A mesura que el dsRNA vagi sent produït, les molècules de VP3 (alliberades de la seva interacció amb la pVP2 un cop s'ha donat la maduració) l'aniran recobrint. Això donarà lloc a les RNP virals, compostes de VP1, VP3 i dsRNA, que són, de fet, la unitat transcripcionalment activa dels virions (Luque et al., 2009b). Un cop sintetitzada la segona cadena del genoma i assemblada la RNP, la càpside madura podrà actuar com a nova font de mRNAs virals i transcriure noves cadenes codificants a partir de la cadena de polaritat negativa del genoma (vegeu la figura 43; pas 15). Aquests mRNAs aniran als ribosomes, on codificaran per més proteïnes virals o serviran de genoma per als virions que s'estiguin assemblant.

A més a més, les càpsides madures de la progènie viral poden interaccionar entre si i empaquetar-se per a formar cossos d'inclusió (CI), tal i com hem vist en l'apartat 4.1.2 (vegeu la figura 43; pas 16), sense deixar d'extrudir nous mRNAs virals (vegeu la figura 43; pas 17).

Sortida de la cèl·lula hoste: Cap al final del procés infectiu, s'haurà anat acumulant la proteïna VP5, codificada pel primer dels ORF del segment A (vegeu la figura 43; pas 18). La VP5 s'anirà acumulant a la membrana plasmàtica de la cèl·lula i hi formarà uns porus que en poden provocar la desestabilització (vegeu la figura 43; pas 19). Això podria causar la lisi de la cèl·lula hoste, amb la conseqüent alliberació de la progènie viral (Lombardo et al., 2000) (vegeu la figura 43; pas 20).

Un cop alliberades al medi extracel·lular, les partícules virals que no estiguin formant part d'un cos d'inclusió podran infectar les cèl·lules veïnes, mentre que els cossos d'inclusió sortiran de la bursa i viatjaran per la claveguera de l'au infectada fins a ser alliberades a l'exterior amb els excrements de l'animal. La resistència que confereix l'empaquetament en CI permetrà que els virions entrin, per via oral, en un nou individu, en el qual tindrà lloc una nova infecció.

4.4 IMPLICACIONS EVOLUTIVES

No existeix registre fòssil de virus o d'àcids nucleics virals, ja que les molècules riques en nitrogen i en fòsfor no es conserven en fòssils de més d'un milió d'anys. Podem, però, hipotetitzar sobre l'origen dels virus i de les seves relacions evolutives en base a la comparació de la seqüència genòmica i de les característiques dels diferents virus (organització genòmica, estructura de les proteïnes virals, mecanismes d'assemblatge, mecanismes d'iniciació i regulació de la replicació, etc.) (Domingo, 2007).

En aquesta línia, s'han descrit diverses característiques dels birnavirus que semblen relacionar-los més amb alguns virus de genoma +ssRNA que no pas amb la resta de virus de genoma dsRNA (Ahlquist, 2005). En especial, s'han observat diverses similituds amb els nodavirus i, sobretot, amb alguns tetravirus. Aquestes similituds inclouen, per exemple, l'organització general de les partícules, sense una nucleocàpside interna (Coulibaly et al., 2005), i del genoma (Pan et al., 2007), així com els mecanismes d'assemblatge i maduració de la càpside (Irigoyen, 2009) o l'estratègia de iniciació de la síntesi del RNA basada en l'ús d'una proteïna iniciadora (VPg) (Xu et al., 2004). També s'han observat semblances a nivell molecular, com ara la homologia estructural de part de la proteïna de la càpside (Coulibaly et al., 2005) o la connectivitat no canònica dels motius estructurals del *palmell* de la polimerasa viral (Gorbalenya et al., 2002).

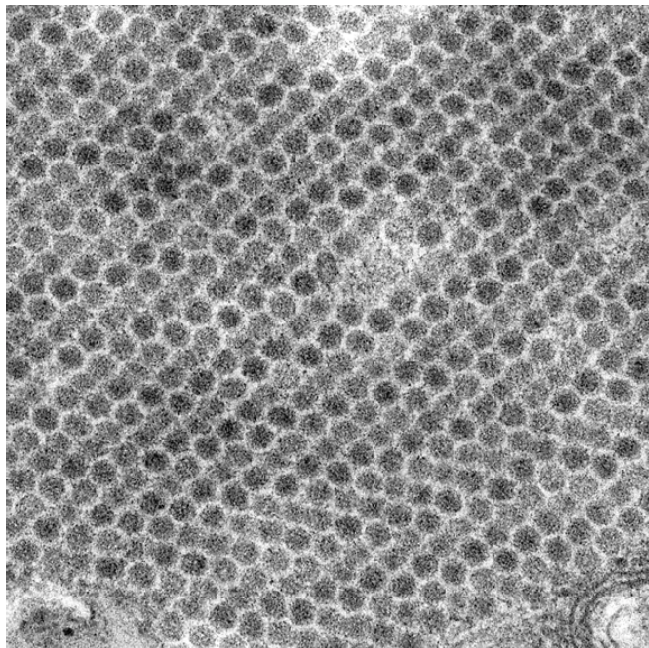
Totes aquestes evidències donen suport a la teoria que els birnavirus podrien derivar d'un virus ancestral de genoma +ssRNA, similar als nodavirus i tetravirus actuals, del qual haurien adquirit tant la proteïna de la càpside com la replicasa amb el palmell permutat (Ahlquist, 2005). Aquest virus ancestral, al seu temps, hauria cedit el gen codificant per la càpside T=13 a un totivirus ancestral (de càpside T=2), donant lloc així a la línia viral que originaria la resta de virus dsRNA (que compten amb una càpside T=13 i una de T=2) (Coulibaly et al., 2005).

En aquest sentit, part dels resultats presentats en aquesta memòria aporten nous indicis en aquesta línia: els resultats preliminars dels assajos d'activitat polimerasa de la VP1 presentats indiquen que la VP3 actua no només com un activador transcripcional, potenciant l'activitat de la VP1, sinó també com un modulador d'aquesta activitat, aportant a la polimerasa la capacitat de ser selectiva pel que fa al motlle que utilitza per a la síntesi del nou RNA. Aquesta capacitat moduladora de la VP3 recorda el paper que juguen la proteïna NS5A del HCV (un flavivirus, de genoma +ssRNA) o la proteïna CP del virus del mosaic de l'alfals (o AIMV, un virus de plantes, també de genoma +ssRNA) en la regulació de l'activitat de la polimerasa viral.

En el cas de l'AIMV, la interacció de la CP amb la RpdR viral (complex P1/P2) inhibeix la unió del complex a la cadena positiva i, per tant, la síntesi de la cadena negativa del RNA viral (Quadt et al., 1991; Van der Kuyl et al., 1991), permetent així el pas de la traducció del genoma (de sentit positiu) a la replicació (a partir de la cadena de sentit negatiu). En el cas del HCV, la similitud amb els birnavirus és més evident encara, ja que la unió de la NS5A a la polimerasa NS5B força aquesta a usar com a motlle un RNA que contingui el 3'UTR o el (-)IRES del genoma del HCV (Ivanov et al., 2009).

Així, doncs, la capacitat que presenta la VP3 d'unir la RpdR viral i modular-ne la selectivitat pel motlle resulta un tret comú amb aquestes proteïnes de virus +ssRNA, cosa que dona fe de l'estreta relació evolutiva entre els birnavirus i els virus de genoma de RNA de cadena positiva.

5. CONCLUSIONS

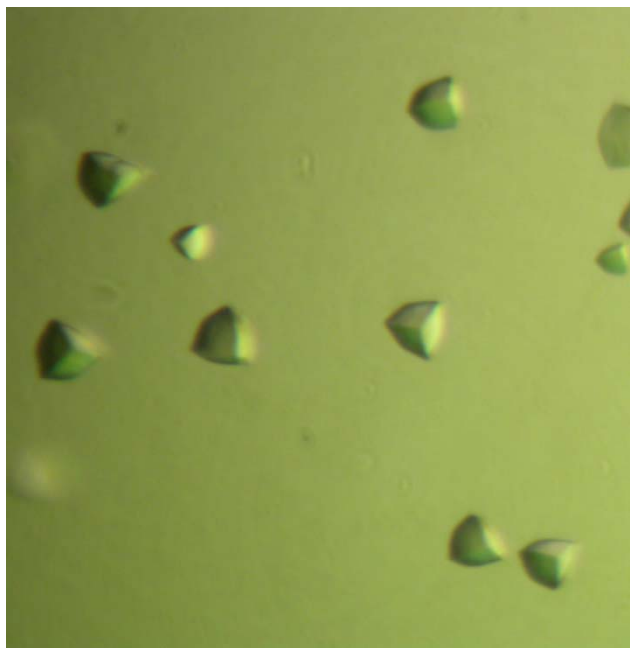


Cos d'inclusió format per partícules d'IBDV

1. S'han cristal·litzat les partícules SVP derivades de la VP2 d'IBDV i se n'ha determinat l'estructura tridimensional a 2.6 Å de resolució.
2. L'estructura mostra que les trímers de la VP2 estan estabilitzats per la presència d'un ió Ca^{2+} situat a l'eix ternari. Aquest ió està coordinat pels residus Asp 31 i Asp 174 de cada una de les tres subunitats. S'ha comprovat, per tractament amb EGTA, que aquest ió Ca^{2+} té un paper clau en l'estabilització de la partícula.
3. La relaxació parcial de la NCS en l'afinament de l'estructura ha permès resoldre sense ambigüitats les regions implicades en els contactes partícula-partícula, que sortien de la simetria icosaèdrica estricta.
4. L'empaquetament de les partícules SVP (de $T=1$) en els nostres cristalls és comparable amb el de les partícules $T=13$, resolt anteriorment, i amb el dels cossos d'inclusió que el virus forma. L'anàlisi de les regions implicades en els contactes d'aquest empaquetament ha revelat que alguns dels residus relacionats amb la virulència de l'IBDV estan també implicats en l'empaquetament.
5. S'ha cristal·litzat la RpdR VP1 i se n'ha determinat l'estructura tridimensional a una resolució de 2.4 Å, sent aquesta la primera polimerasa no canònica de la que se'n resol l'estructura.
6. L'estructura de la VP1 mostra que aquesta presenta els dominis i motius estructurals conservats en totes les RpdR.
7. L'estructura mostra també que les connectivitats entre els elements d'estructura secundària del *palmell* estan permutades en comparació amb les de les polimerases canòniques. Tot i això, aquesta permutació no afecta la disposició general del subdomini del *palmell* ni dels residus àcids catalítics (Asp 402, Asp 416 i Glu 421, en aquesta estructura).
8. El modelat de la cadena motlle a partir del complex d'iniciació de $\phi 6$ mostra que l'accés del RNA al centre actiu queda bloquejat pel *loop* que precedeix l'hèlix $\alpha 13$ (*loop B*).
9. També s'han cristal·litzat i resolt el complex de la VP1 unida a ions Mg^{2+} i la VP1 en complex amb un pèptid amb la seqüència de l'extrem C-terminal de la proteïna VP3 a 3.1 Å i 2.7 Å de resolució, respectivament.
10. En l'estructura del complex VP1- Mg^{2+} s'hi han trobat tres ions Mg^{2+} , dos en posicions catalítiques i l'altre coordinat pels residus de la fulla β del *palmell*.

11. La incubació de la VP1 amb el pèptid que mimetitza l'extrem C-terminal de la VP3 provoca, en l'estructura de la VP1, un canvi conformacional del *loop* B. Això desbloqueja l'accés del motlle i els rNTP substrats al centre actiu .
12. Els assajos d'activitat polimerasa confirmen que en incubar la VP1 amb la VP3, o el pèptid que mimetitza seu l'extrem C-terminal, l'activitat d'aquesta augmenta fins a 5 vegades.
13. Els assajos preliminars semblen indicar que la incubació amb el pèptid de la VP3 també conferiria selectivitat vers el motlle a la VP1, de manera que l'augment de l'activitat polimerasa només es donaria quan el motlle usat tingués la regió 3'UTR dels segments genòmics d'IBDV.

6. ANNEX I: METODOLOGIA



Cristalls de VP2

6.1 LA CRISTAL·LOGRAFIA DE PROTEÏNES

L'objectiu de l'aplicació de les tècniques de cristal·lografia de proteïnes és determinar l'estructura tridimensional d'una macromolècula, és a dir, la posició relativa dels seus àtoms en l'espai. Això vol dir que hem d'obtenir dades experimentals amb prou resolució per a ser capaços de diferenciar dos àtoms propers. En el context d'una proteïna, els àtoms estan separats per distàncies de l'ordre d'1Å (per exemple, un enllaç peptídic cobreix una distància d'aproximadament 1.3Å). Així, doncs, com que no podem obtenir informació d'entitats més petites que la longitud d'ona de la radiació que estiguem usant (és el que es coneix com a *límit de difracció*), hem d'utilitzar **rajos X durs**, de longituds d'ona del voltant de 10^{-10} m (1Å) (corresponent a energies de l'ordre dels 10^4 eV), per a poder cobrir aquestes resolucions.

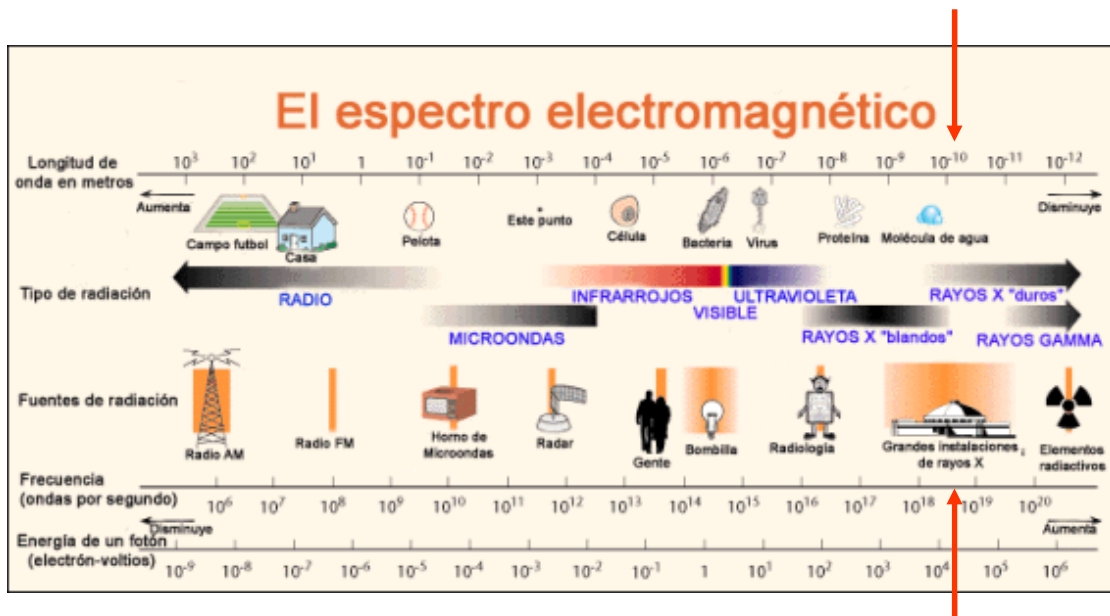


Figura 44: Esquema de l'espectre de radiacions electromagnètiques. Les fletxes vermelles assenyalen el tipus de radiació utilitzada en els experiments de cristal·lografia de proteïnes.

D'altra banda, el fet que intentem obtenir informació d'una molècula de dimensions tant reduïdes -una proteïna pot tenir una mida al voltant d'uns 100Å- planteja certs problemes tècnics. El més important és que la difracció dels rajos X produïda per una sola molècula és massa dèbil per a ser detectada, i seria indiferenciable del soroll de fons. La manera de solucionar aquesta trava és usant **crystals**. Un cristall conté un elevat nombre de molècules ordenades seguint la mateixa disposició i periodicitat, fet que dóna lloc a una dispersió ordenada. D'aquesta manera les ones dispersades poden sumar-se, fet que permet que el senyal augmenti fins a un nivell detectable.

El procés de resolució de l'estructura tridimensional d'una proteïna per mètodes cristal·logràfics es pot dividir en dues fases. La primera fase -l'experimental- té com a finalitat l'obtenció de cristalls, mentre que la segona fase -la fase computacional- engloba tot el treball de recollida de dades de difracció, processat, resolució de l'estructura, construcció i anàlisi de models i posteriors aplicacions.

6.1.1 Obtenció de proteïna

Un cristall és una estructura ordenada en què un conjunt de molècules iguals estan disposades de manera periòdica. Així, doncs, per a poder obtenir cristalls d'una proteïna, caldrà que la solució de partida sigui el màxim d'homogènia possible, sense impureses que puguin interferir en la ordenació de les proteïnes i impedir la formació de la xarxa cristal·lina. Per aquesta raó, abans d'iniciar la cristal·lització pròpiament dita, cal primerament obtenir la proteïna en condicions apropiades. Això implica que, tant si la proteïna s'obté per vies de clonació i expressió com si s'extreu a partir de mostres biològiques, sempre serà necessari com a mínim un pas de purificació.

En el nostre cas, les proteïnes estudiades ens van ser subministrades per un laboratori col·laborador. En concret, el grup on he realitzat la tesi té establerta una col·laboració amb els laboratoris del Dr. Rodríguez i del Dr. Castón, del CNB (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid), on s'estudia la biologia molecular de l'IBDV. Allà disposen de la metodologia adequada per a l'obtenció i purificació a gran escala de partícules SVP de T=1 a partir de la VP2 recombinant (Martinez-Torrecedra et al., 2000; Saugar et al., 2005). En concret, es va expressar un plàsmid que codifica pels 452 primers residus de la poliproteïna (VP2_452) en cèl·lules de llevat, obtenint-se així una VP2 que s'autoassembla en partícules SVP de T=1. Aquestes partícules es van purificar per ultracentrifugació.

De la mateixa manera, es va produir la proteïna recombinant hVP1 (que té els 845 primers residus VP1 amb una cua d'histidines a l'extrem N-terminal) en cèl·lules d'insecte (cèl·lules H5, d'Invitrogen), mitjançant un sistema d'expressió de baculovirus. En aquest cas, la hVP1 es va purificar mitjançant resines de níquel, i es va concentrar fins a la concentració apropiada (uns 10 mg/ml) (Garriga et al., 2007).

6.1.2 Cristal·lització

Quan la proteïna és pura i està suficientment concentrada (entre 2 i 20 mg/ml, segons la proteïna), s'inicia el procés de cristal·lització. Per a cristal·litzar una macromolècula hem d'obtenir-ne una solució sobresaturada, perquè es formin uns nuclis cristal·lins que serveixin com a punt de partida pel creixement dels cristalls. Aquest procés, anomenat

nucleació, es pot dur a terme de diverses maneres. Ara bé, en el nostre cas ens interessa poder controlar el grau de sobresaturació a què exposem la solució, ja que, com es pot observar en el diagrama de fases (vegeu la figura 45), només es dona la nucleació en una franja restringida de condicions.

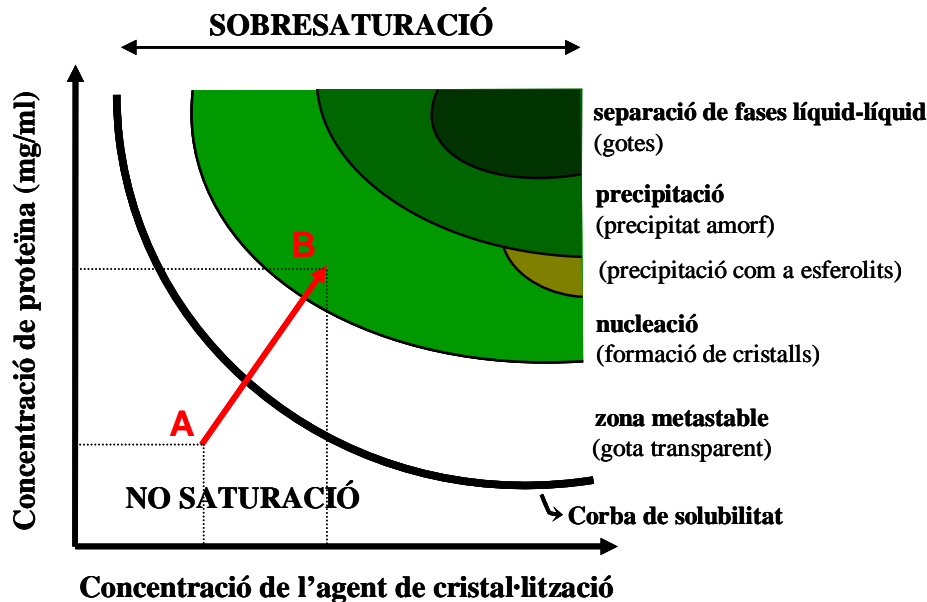


Figura 45: Diagrama de fases dels diferents estats de saturació d'una solució proteica, en funció de les concentracions de proteïna i d'agent precipitant. La fletxa vermella indica el canvi que pateix la solució proteica, a causa de la variació de les condicions en la gota, cap a un estat en què es poden formar nuclis cristal·lins.

A tal efecte, tant la cristal·lització de la VP1 com la de les SVP de VP2 s'han dut a terme mitjançant el mètode de **difusió de vapor en gota penjant**. Aquest mètode consisteix a dipositar una gota de 1-6 μl de solució proteica damunt d'un cobreobjectes de vidre, i mesclar-la amb un volum igual o similar de solució de cristal·lització (normalment composta per tampó, sal i agent precipitant). El cobreobjectes es gira, deixant la gota cap per avall, i s'usa com a tapa per a segellar un pou on hi ha un dipòsit de 0.5-1 ml de solució de cristal·lització (vegeu la figura 46).

La diferència de concentració de sals i precipitants entre la gota i el dipòsit força la difusió de les espècies més volàtils i dona lloc a una nova situació d'equilibri (Bergfors, 1999). Aquesta difusió de solvents fa variar el volum de la gota, per la qual cosa la concentració de la nostra proteïna en la gota també varia.

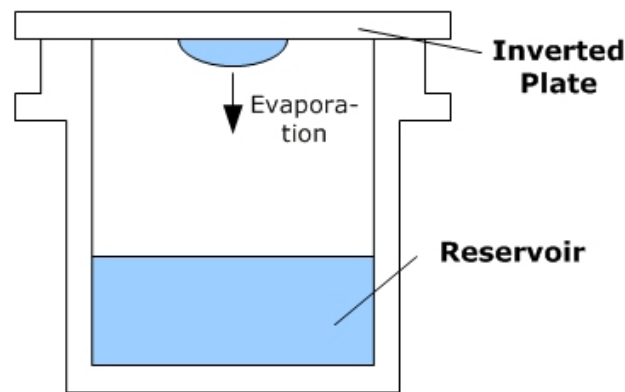


Figura 46: Esquema del mètode de difusió de vapor en gota penjant. En la gota, la solució de cristal·lització es troba barrejada amb proteïna que volem cristal·litzar, per la qual cosa els agents precipitants estaran menys concentrats que en el dipòsit. Això farà que el solvent de la gota vagi evaporant, de manera que la concentració de la proteïna anirà augmentant.

La **mida de la gota** i la **quantitat de precipitants** que hi hagi en la solució de cristal·lització influiran en el nombre de centres de nucleació que es formaran, així com en la velocitat d'equilibri, la qual influirà directament en el temps requerit per a l'aparició de cristalls (que pot anar de 1-2 dies fins a mesos). Ens interessa vigilar bé aquests dos paràmetres, ja que si forcem l'evaporació apareixeran massa nuclis en una mateixa gota, i això impedirà que els cristalls formats creixin suficient, ja que competiran entre ells per la proteïna que encara resti en solució. No obstant això, si limitem la difusió, tindrem el problema contrari: no se'ns formaran nuclis a partir dels quals puguin créixer cristalls.

Un altre factor que cal tenir en compte és el fet que la tècnica de difusió de vapor és sensible a les variacions de temperatura. És per això que les plaques preparades es guarden en una cambra a temperatura constant de 20°C o 4°C, segons el que convingui. D'aquesta manera evitem que hi hagi diferències de temperatura entre la coberta on hi ha la gota (el cobreobjectes) i el reservori amb el tampó de cristal·lització, al mateix temps que assegurem la reproductibilitat de l'experiment.

A més, les gotes es preparen sobre cobreobjectes de vidre de 22 mm x 22 mm prèviament tractats amb diclorometilsilà, un reactiu que permet aconseguir una superfície hidrofòbica que impedeix deformacions i desplaçaments de la gota. Això ajuda a controlar la forma de les gotes, un factor que també influeix en la velocitat d'evaporació i, per tant, en la cinètica de la cristal·lització.

És extremadament difícil poder predir les condicions apropiades per a la nucleació o el creixement de cristalls ben ordenats (Rupp and Wang, 2004). Per això, en la pràctica es realitzen cribatges, assajant diverses condicions. Això permet trobar una o més condicions

en les quals s'afavoreixi la formació de cristalls de la proteïna. En aquests cribatges, es realitzen múltiples combinacions de la proteïna a estudiar amb mescles de diferents agents precipitants, com ara sals (fosfats, citrats, sulfat amònic, ...), precipitants (polietilenglicol (PEG), glicerol, ...), alcohols (metilpentendiol, isopropanol, ...) i tampons (HEPES, Tris, ...) ajustats a diferents pHs. Tots aquests compostos s'usen amb la finalitat de disminuir la solubilitat de les molècules a cristal·litzar.

Una vegada obtinguts uns cristalls inicials, es procedeix a la seva optimització, és a dir, es proven lleugeres variacions de les condicions inicials, buscant unes noves condicions que possibilitin l'obtenció de cristalls de major qualitat.

Seguint aquest procés es van poder determinar les condicions òptimes per obtenir cristalls de les SVP, que es van créixer a 20°C barrejant 1 µl de la suspensió de SVP amb 1 µl d'una solució amb 10-17% PEG 4K, 3% (vol/vol) d'isopropanol i un rang de pH entre 7.5 i 9.0.

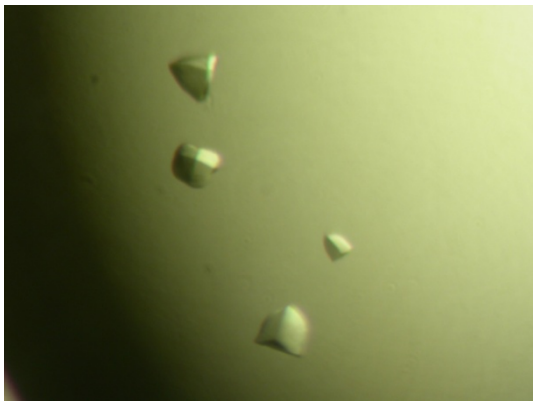


Figura 47: Cristalls de SVP derivades de VP2.

Aquests cristalls apareixien al cap de 3-4 dies d'incubar una mescla de 1 µl de la solució de partícules SVP amb 1 µl d'una solució de cristal·lització que contenia 14% PEG 4K, 10 mM de HEPES pH 7.0 i 3% (vol/vol) d'isopropanol com a additiu.

Hi ha diversos factors que poden inhibir la formació d'un cristall o comprometre'n la qualitat, com ara les vibracions fortes o els canvis bruscs de temperatura. Un dels problemes més habituals és la presència d'impureses en la mostra (o en les solucions de cristal·lització) que poden interferir en el posicionament correcte de les molècules en el cristall i fer-ne minvar la regularitat (fet determinant per la qualitat del cristall) o fins i tot impedit-ne el creixement. La flexibilitat conformacional de la molècula a cristal·litzar també pot fer minvar les possibilitats d'obtenir un cristall, donada l'entropia que aporta al sistema.

Quan no s'aconsegueix cristal·litzar una molècula d'interès, normalment s'intenta provar-ho de nou amb una versió lleugerament modificada de la molècula, ja que petits canvis en les propietats moleculars poden causar grans diferències en el seu comportament en la cristal·lització. És per això que, en el cas de la proteïna VP1, un cop provats tots els cribatges disponibles en el laboratori sense obtenir resultats, vam optar per tractar-la amb la proteasa rTEV, amb la idea de tallar la cua d'histidines unida a l'extrem N-terminal de la VP1. Això va donar lloc a una versió modificada de la hVP1, a la qual s'havia tallat no

només la cua d'histidines N-terminal, sinó també entre 20 i 40 aminoàcids de l'extrem C-terminal. Aquesta nova versió de la VP1, un cop repurificada i concentrada, sí que es va poder cristal·litzar. Els cristalls de la VP1 també s'obtenen en gotes de 1 μ l + 1 μ l, en aquest cas usant una solució de cristal·lització amb 10–12% de PEG 3350, 0.3-0.5 M de LiNO₃ i un rang de pH entre 6.5 i 8.0. Aquests cristalls també es van fer créixer a 20°C.

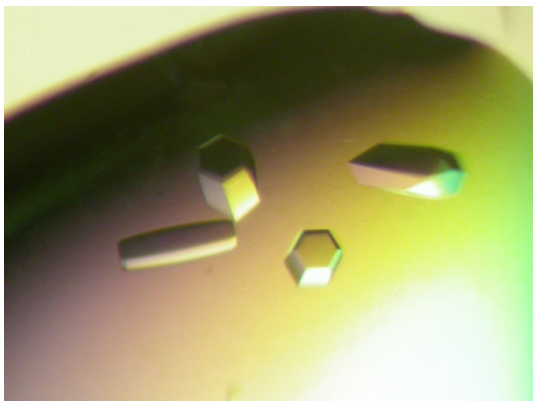


Figura 48: Cristalls de VP1. Aquests cristalls es van fer créixer mesclant 1 μ l de la solució de VP1 purificada (10 mg/ml) amb 1 μ l d'una solució de cristal·lització que contenia 10% PEG 3350, 0.5 M de LiNO₃ i 10 mM de Bis/Tris pH 6.5.

6.1.3 Congelació i muntatge dels cristalls

Estrictament parlant, els cristalls obtinguts ja són aptes per a realitzar experiments de difracció de rajos X, però la radiació a què exposem els cristalls és molt energètica, ja que té una longitud d'ona molt petita, i acaba trencant els enllaços químics, ionitzant els àtoms, etc. Això fa que el cristall es vagi degradant i que el senyal, especialment el d'alta resolució, decaigui molt ràpidament.

Per a preservar els cristalls dels danys produïts per la radiació, s'utilitzen tècniques de **criocristal·lografia**, les quals ens permeten protegir el cristall de la formació de gel sense alterar-ne l'estabilitat ni el senyal. Es tracta de congelar el cristall i dur a terme la recollida a una temperatura propera als 100 °K (-173 °C) (Jeruzalmi, 2007).

Cal evitar, però, que les molècules d'aigua del solvent contingut en el cristall formin gel en ser congelades, ja que això provocaria que el cristall es trenqués. A tal efecte, un cop crescuts els cristalls, es submergeixen en una solució que, un cop congelada, formi una capa d'aigua vitrificada (“vidre amorf”), en lloc de formar gel cristal·lí. Aquesta solució s'anomena **solució crioprotectora** i sovint consisteix en una solució de composició anàloga a la solució de cristal·lització a la qual s'ha afegit un agent crioprotector com ara glicerol, etilenglicol, o altres alcohols de baix pes molecular (Helliwell, 2005).

En el nostre cas, per exemple, per a protegir els cristalls de les SVP de VP2 es va usar una solució similar a la solució de cristal·lització però que contenia un 20% de glicerol. Pels cristalls de la VP1 es van usar també solucions amb la composició de la solució de cristal·lització, però en aquest cas amb menys glicerol, entre 10 i 15%.

Finalment, els cristalls es munten en “*loops*”, unes barretes metàl·liques acabades amb un petit llaç de niló de les dimensions adequades, i es congelen per immersió en nitrogen líquid.

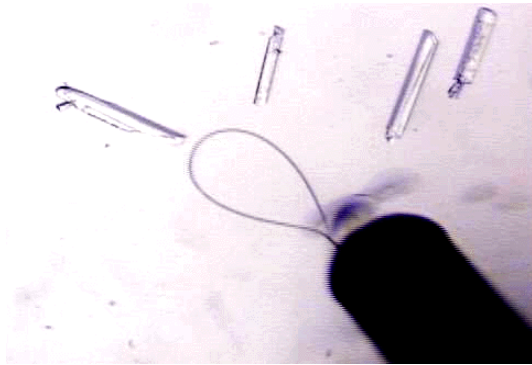


Figura 49: *Loop* de niló usat per a extreure el cristall de la gota on es troba i poder-lo congelar. Aquest mateix *loop* serveix també com a suport per a mantenir el cristall centrat davant del feix de rajos X, durant la recollida de dades. La mida d'aquests llaços de niló és de l'orde de 0.01 a 0.7 mm.

6.1.4 Els rajos X

Com ja s'ha comentat, per a obtenir les dades de difracció, és necessari disposar de rajos X durs, d'alta energia. A tal efecte, per a obtenir dades dels nostres cristalls es va usar radiació de sincrotró, de la qual el nostre grup pot disposar a l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), a Grenoble (França).



Figura 50: Vista aèria de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), a Grenoble. L'edifici en forma d'anell que s'aprecia a la fotografia és l'anell d'emmagatzematge (*storage ring*), de 844 metres de circumferència, pel qual circulen els electrons a alta velocitat i del qual surten tangencialment els rajos X cap a les cabines d'utilització (*beamlines*).

Per a la generació d'aquests rajos X es parteix d'electrons que han estat accelerats fins a elevades energies. Mitjançant imans, es fa variar la trajectòria d'aquests electrons, els quals, amb cada canvi de direcció, emeten part de la seva energia en forma de rajos X que surten en direcció tangencial al gir dels electrons.

En les instal·lacions del sincrotró, el feix de rajos X de què podem disposar no només és d'elevada intensitat, sinó que a més també és monocromàtic (d'una única longitud d'ona) i està col·limat (totes les ones són paral·leles i corren en la mateixa direcció).

Per a poder dur a terme la recollida de dades cal col·locar el cristall de manera que quedi centrat en el feix de radiació X i que, a més, es pugui anar rotant sense descentrar-se. Això se soluciona acoblant el *loop* amb el cristall a un **capçal goniomètric**, que permet rotar el cristall sense traslladar-lo, mantenint-lo sempre dins l'àrea irradiada pel feix.

6.1.5 Interacció dels rajos X amb el cristall

Quan un feix de rajos X incideix sobre un cristall, aquest interacciona amb els electrons dels àtoms que el componen, fent-los vibrar de manera acoblada a les variacions periòdiques del seu camp elèctric. Els electrons oscil·lants es converteixen així en focus d'una nova radiació X que s'emet en forma esfèrica. Aquest fenomen es coneix com a *dispersió*, i normalment es dona de forma elàstica, fet pel qual la longitud d'ona de la radiació emesa serà la mateixa que la de la radiació que ha impactat el cristall.

A més, cada raig dispersat interferirà amb els rajos dispersats pels altres electrons. Com que els àtoms del cristall estan ordenats de manera regular i periòdica, la geometria del cristall marcarà la interacció entre els rajos dispersats, fent que, en determinades direccions, aquests es combinin i es reforcin (interferència constructiva) per a donar lloc al que es denomina dispersió cooperativa o **difracció** (vegeu la figura 51).

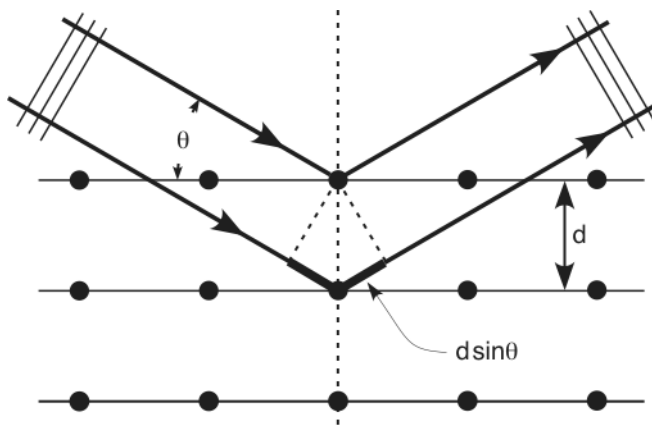


Figura 51: Llei de Bragg. Dos rajos paral·lels que incideixin sobre una xarxa cristal·lina seran difractats seguint un angle θ . Sempre que la separació entre els dos plans cristal·lins sigui tal que $2d \cdot \sin\theta$ coincideixi amb un múltiple de la longitud d'ona, és a dir, que:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta,$$

l'ona que incideix en el pla inferior sortirà en fase amb l'ona del pla superior, les ones interferiran constructivament i la senyal mesurada es reforçarà.

Això també implica que els rajos dispersats per tots els àtoms de la molècula irradiada es combinaran entre ells, pel que cada una de les reflexions registrades contindrà informació de tots els àtoms irradiats.

6.1.6 Recollida i processat de dades

Per a poder detectar els rajos difractats pel cristall, se situa un detector en línia amb la sortida dels rajos X i de la mostra. Normalment, en el sincrotró, s'usen detectors del tipus *CCD*, on una pantalla de fòsfor rep l'energia dels rajos difractats durant el temps de recollida i la transforma en llum visible, que va quedant registrada. Al final de la recollida les intensitats registrades es digitalitzen, cosa que permet obtenir una imatge dels punts on han impactat els rajos i amb quina intensitat ho han fet. Aquesta imatge s'anomena **diffractograma**.

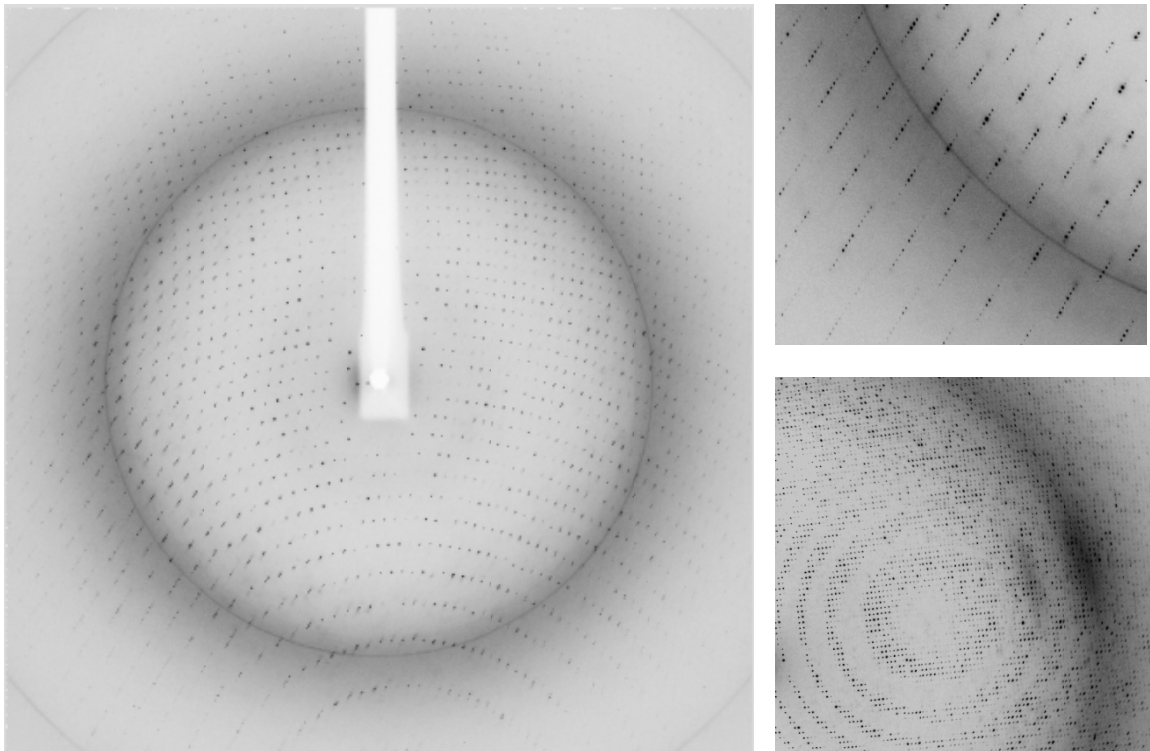


Figura 52: Diffractogrames obtinguts en difractar els cristalls de la VP1 i la VP2. Al diffractograma de la VP1 (esquerra) hi ha emmarcada una regió que es mostra ampliada en la imatge superior de la dreta, on es poden observar clarament les reflexions registrades. En la imatge inferior dreta, detall de les llunes observades en els diffractogrames de la VP2.

En un diffractograma, els punts de senyal propers al centre (angles petits de difracció) corresponen a les dades de baixa resolució, mentre que els punts a angles de difracció grans contenen informació de l'alta resolució.

Aquest procés de recollida de les intensitats de difracció es va repetint a mesura que anem fent rotar el cristall sobre si mateix de manera que obtinguem informació de diferents orientacions del mateix cristall, ja que el patró de difracció i la informació estructural

continguda en aquest varien segons l'angle de rotació del cristall. Segons les simetries que contingui la macromolècula estudiada i el grup espacial que hagi adoptat en cristal·litzar, caldrà recollir més o menys dades per a poder obtenir una informació completa de la seva estructura.

Els paràmetres que s'avaluaran a partir d'aquest patró seran la **posició de cada raig difractat**, que depèn de la xarxa cristal·lina, i la **intensitat de cada reflexió**, que depèn de la distribució dels àtoms en la cel·la. Així, doncs, els difractogrames recollits es processen i s'indexen, fet que ens permetrà deduir-ne la simetria del cristall i el grup espacial a què pertany. Els programes d'indexat analitzen la disposició de les reflexions en el difractograma (normalment s'usen dues imatges, preses a 0° i a 90° de rotació del cristall) i calculen l'orientació del cristall. Tenint en compte la longitud d'ona de la radiació i la distància entre el detector i el cristall, a més, es pot calcular també la mida de la cel·la unitat i predir-ne el grup espacial. Un cop determinades aquestes dades, es poden utilitzar per predir la situació de les reflexions de la resta d'imatges. Això, a banda de comprovar si l'indexat s'ha realitzat correctament, permetrà mesurar, per a cada imatge recollida, la intensitat registrada en cada una d'aquestes prediccions (corresponents a les reflexions). Finalment, els valors obtinguts en les diferents imatges s'escalen entre si, generant un arxiu amb un llistat on consta, per cada una de les reflexions mesurades, les seves tres coordenades (***h***, ***k*** i ***l***, els índexs de Miller) i la seva intensitat (I_{hkl}).

Per a avaluar la qualitat i adequació de les dades, un cop ja processades, ens fixarem en alguns dels indicadors, com el *Rmerge* i el *Rsym*, el quocient I / σ i la *completeness* (o completesa de les dades) (Drenth, 1995; Glusker et al., 1994):

- *Rmerge* i *Rsym*: Paràmetres estadístics que valoren la precisió amb què s'han fet les prediccions de senyal en el processat i com encaixen amb les intensitats experimentals observades. El que es mesura són les desviacions estàndard entre les intensitats observades múltiples vegades, bé sigui per repetició, bé per simetria. Es considera que un processat és correcte quan aquests valors han baixat del 10%, tot i que en el cas dels virus (i partícules similars, com les SVP) s'accepten valors més grans, de 15-20%.

- I / σ : Mesura de la rellevància de les senyals d'intensitat mesurades respecte la desviació deguda al soroll de fons i als errors instrumentals. Com més gran sigui aquest indicador, més acurades seran les nostres dades. Generalment, s'accepten valors de I / σ a partir de 1,3.

Taula 1: Estadístiques de la recollida i processat de dades i de l'afinat de les estructures.

	Partícules SVP		VP1 polimerasa			
	derivades de VP2	derivat de Sm	derivat de E ₁₉	Natiu	Cocristal·lització peptid VP3	Complex amb Mg ²⁺
Recollida i processat de dades						
Grup espacial	P2 ₁ 3	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22	P6 ₁ 22
Dimensions cel·la (Å)	326.4 326.4 326.4	123.1 123.1 355.4	122.8 122.8 356.1	123.3 123.3 363.0	123.8 123.8 361.8	122.8 122.8 354.3
Longitud d'ona	1.072	<i>Pic</i> 1.845	1.776	1.072	0.975	0.933
Resolució (Å)	20-2.6 (2.74-2.6)	40-3.85 (4.06-3.85)	60-2.85 (3.00-2.85)	40-2.40 (2.49-2.40)	107-2.70 (2.85-2.70)	37-3.15 (3.32-3.15)
R _{sym}	0.18 (0.51)	0.09 (0.35)	0.07 (0.31)	0.09 (0.27)	0.10 (0.43)	0.12 (0.36)
I/σI	3.1 (1.4)	17.7 (5.8)	21.7 (5.0)	21.4 (1.9)	4.9 (1.7)	5.1 (1.9)
Completesa (%)	87.8 (48.2)	99.7 (98.7)	97.1 (80.5)	97.6 (81.5)	95.0 (96.3)	98.4 (98.6)
Redundància		9.2 (7.9)	7.0 (6.8)	9.0 (2.2)	12.2 (12.5)	6.5 (4.2)
Afinat de l'estructura						
Resolució (Å)	20-2.6			20.0-2.40	40.0-2.70	20.0-3.15
Nº. reflexions	315093			58279	41053	26153
R _{merge} / R _{free}	0.24/0.26			0.23/0.26	0.22/0.25	0.21/0.23
Nº. residus proteïna	433			765	754	765
Nº. ions	1 a cada termini			-	-	3
Nº. aigües	-			268	137	3
Promig B _{factor}	35.5			39.8	48.4	63.9
Desviacions r.m.s						
Llarg. enllaços (Å)	0.007			0.006	0.009	0.006
Angles enllaços (º)	1.282			0.920	1.257	0.962

*Els valors de la capa de major resolució s'indiquen entre parèntesis.

- *Completeness*: Indicador de fins a quin punt són completes les dades obtingudes, de si la informació que hem aconseguit recollir sobre la estructura de la macromolècula és total o parcial. En principi, ens interessa que aquest valor sigui el més gran possible (del 100% o, si més no, valors ben propers), tot i que segons el grau de simetria no cristal·logràfica (pròpia de la molècula, i no de l'empaquetament en el cristall) que tingui la macromolècula estudiada podem servir-nos de dades amb valors molt més baixos de completesa.

Les estadístiques de la recollida i processat de les dades d'ambdós projectes es mostra a la taula 1.

Totes les dades d'aquesta memòria s'han processat i escalat mitjançant els paquets informàtics DENZO/Scalepack (Otwinowski and Minor, 1997) o MOSFLM/SCALA (Evans, 1994; Leslie, 1991).

6.1.7 Resolució de l'estructura tridimensional

Les dades recollides en la difracció es poden relacionar amb la xarxa cristal·lina perquè en són l'equivalent en l'espai recíproc. De la mateixa manera, per a poder obtenir un mapa de la densitat electrònica ($\rho_{(xyz)}$) de la molècula cristal·litzada ens caldrà determinar el seu equivalent en l'espai recíproc: els **factors d'estructura**. Els factors d'estructura, de fet, són la representació matemàtica de les reflexions obtingudes per la difracció del cristall.

A partir dels difractogrames, com hem vist, podem obtenir les intensitats I_{hkl} de les reflexions, que ens permetran calcular fàcilment les amplituds dels factors d'estructura ($|F_{hkl}|^2$), ja que:

$$I_{hkl} = |F_{hkl}|^2$$

El factor d'estructura, però, és un nombre complex, que conté informació tant de l'amplitud com de la fase ($\Phi_{(hkl)}$) de l'ona difractada (vegeu la figura 53), i necessitarem totes dues dades per a poder desfer la transformada de Fourier i obtenir el mapa de densitat electrònica.

$$\rho(x,y,z) = 1/V \cdot [\sum_h \sum_k \sum_l IF(hkl)I \cdot \cos 2\pi \cdot (hx + ky + lz - \Phi \cdot (hkl))]$$

Figura 53: Equació que relaciona els factors d'estructura $F_{(hkl)}$ amb les densitats electròniques $\rho_{(xyz)}$.

El problema és que les fases associades a cada factor d'estructura no són magnituds que puguem mesurar experimentalment, per això cal recórrer a diversos mètodes que possibilitin la seva determinació: és el que es coneix com a **problema de la fase**.

Per a la determinació d'aquestes fases es poden utilitzar diferents mètodes, segons les dades de què es disposi. La informació sobre les fases, un cop combinada amb les amplituds dels factors d'estructura que extraiem de les intensitats del difractograma, permetrà reconstruir la posició relativa de la font de la difracció (els electrons de les molècules del cristall) i obtenir un mapa de densitat electrònica. Els mètodes més utilitzats són el Reemplaçament Molecular, el Reemplaçament Isomòrfic i el de la Dispersió Anòmala.

- Si disposem d'un model de l'estructura tridimensional d'alguna proteïna similar a la nostra proteïna problema, podem usar el **mètode de reemplaçament molecular** (MR), que consisteix a assignar les fases de l'estructura model com a fases inicials per a la nostra estructura. Per a fer-ho, s'han de calcular primer els paràmetres de rotació i translació que es requereixen per a posicionar la proteïna model en la cel·la unitat del cristall de la proteïna per resoldre; tot seguit s'usen aquests valors per a poder extrapolar les dades de les fases. Ara bé, per a poder usar aquest mètode, cal que la proteïna model sigui molt semblant a la proteïna problema; altrament les fases del model no ens serviran.

Aquest és el mètode que hem aplicat per a determinar l'estructura de les SVP d'IBDV, partint de l'estructura tridimensional de les SVP derivades d'una altra soca estretament relacionada d'IBDV (soca CT), que s'havia resolt prèviament a 3.0Å de resolució (Coulibaly et al., 2005). Utilitzant el programa AMoRe (Navaza, 1994), es va partir del rang de resolució de 50 a 7Å de les nostres dades de difracció per a posicionar aquest model; així es van obtenir 20 solucions de rotació equivalents (corresponents als 20 eixos ternaris de la partícula SVP), pels quals hi havia una solució de translació correcta (a $\frac{1}{4} \frac{1}{4} \frac{1}{4}$ de la cel·la, o les posicions equivalents per simetria). Un cop ajustades aquestes 20 solucions, les quatre millors es van tornar a ajustar usant les dades de difracció del rang de resolució de 50 a 5Å. Finalment, aquestes noves solucions de rotació i translació es van tornar a ajustar contra el rang de resolució de 50 a 4Å. Això va donar lloc a una solució inequívoca per les funcions de rotació i translació, amb la qual s'obtenia una correlació amb les intensitats observades del 63% i un *Rfactor* de 38,2%.

L'anàlisi de l'empaquetament de les partícules, tenint en compte la mida i el grup espacial de la cel·la, indicava que les SVP estaven col·locades de tal manera que un dels seus eixos ternaris coincidia amb l'eix ternari cristal·logràfic (propi del grup espacial P2₁3). Això implica que la unitat asimètrica del cristall conté una tercera part de la partícula de la SVP, és a dir, 20 subunitats de VP2. Quan, com en aquest cas, la molècula cristal·litzada presenta una simetria pròpia independent del grup espacial, o simetria no cristal·logràfica (NCS), aquesta es pot aprofitar com a constricció (*constraint*) per a la modificació dels mapes de densitat

electrònica en l'extensió de fases i l'afinat. Així, per exemple, a partir dels mapes a 4Å de resolució es va aplicar el promitjat de la NCS d'ordre 20 de la unitat asimètrica usant el programa DM (Cowtan and Main, 1998) per a realitzar una extensió de les fases fins a 2.6Å.

Per a determinar l'existència d'aquestes NCS, es pot calcular la funció d'autorotació (*self-rotation functions*), que ens indica la rotació relativa entre dues molècules de la unitat asimètrica. En una projecció estereogràfica, aquestes simetries apareixen com a pics en unes posicions concretes, que de vegades permeten reconstruir la orientació de la molècula problema en el cristall. En el nostre cas, per exemple, la funció d'autorotació es va calcular amb el programa MOLREP (CCP4, 1994) i va donar obtenir una senyal clara per les simetries pròpies de les partícules icosaèdriques: simetria d'ordre 2, d'ordre 3 i d'ordre 5 (vegeu la figura 54).

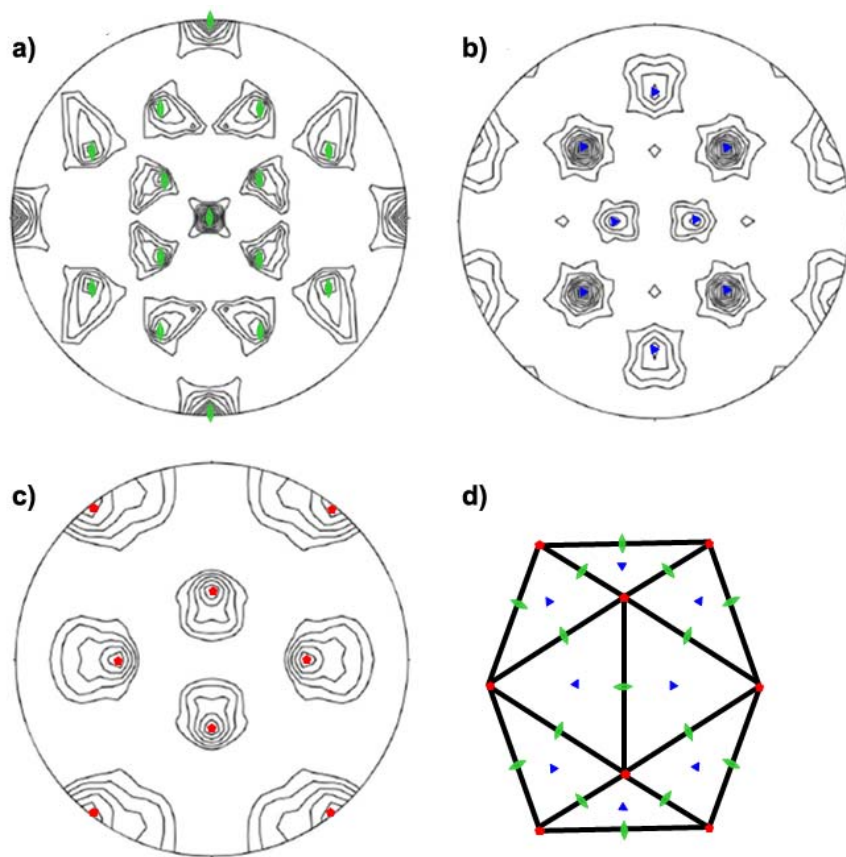


Figura 54: Orientació de les partícules SVP en el cristall. Es mostren les funcions d'autorotació a **a)** 180° (simetria d'ordre 2); **b)** 120° (simetria d'ordre 3) i **c)** 72° (simetria d'ordre 5). **d)** Esquema de la orientació de la partícula T=1 en el nostre cristall. La posició dels eixos de simetria s'indica en verd pels binaris, blau pels ternaris i vermell pels quinaris.

El reemplaçament molecular també es va utilitzar per a resoldre els complexos de la VP1 amb els ions Mg^{2+} i amb el pèptid que mimetitza l'extrem C-terminal de la VP3. En aquest cas, però, els cristalls dels complexos pertanyien al mateix grup espacial que els cristalls nadius i que les cel·les eren prou semblants, cosa que permetia suposar que ni els ions ni el pèptid no afectaven les interaccions VP1-VP1 del cristall i que l'empaquetament seria

similar. Així, els mapes inicials pels dos complexos es van obtenir realitzant un ajustat de cos rígid (*rigid body fitting*) de les coordenades de la VP1 nativa en les noves cel·les.

- Quan no es disposa d'un model similar al de la molècula problema, utilitzarem les tècniques de reemplaçament isomòrfic i/o de dispersió anòmala múltiple. Ambdues es basen en “reduir” l'estructura problema a un nombre petit d'àtoms i provar d'afrontar la determinació per mètodes directes o de Patterson. A tal efecte, s'usen àtoms pesants, que tenen una contribució més gran en la difracció i presenten anisotropicitat (dispersió anòmala) quan la longitud d'ona dels rajos X correspon a un dels seus pics d'absorció (*edges*).

El mètode del **reemplaçament isomòrfic múltiple** (MIR) consisteix a recollir (per separat) dades de difracció de diversos cristalls isomorfs (és a dir, amb la mateixa cel·la i el mateix grup espacial). D'aquests cristalls, l'un serà el cristall natiu i els altres seran cristalls derivats, als quals hem incorporat àtoms pesants (Au, Hg, W, U, ...). Les diferències que s'observin entre els difractograms dels cristalls nadius i els de diferents derivats ens donaran informació sobre les intensitats de les reflexions degudes als àtoms pesants incorporats. Tot aplicant la funció de Patterson, que permet resoldre estructures de pocs àtoms, a les dades dels àtoms pesants podrem calcular-ne la posició. Sabent aquestes posicions, podem obtenir les fases dels àtoms pesants, que podrem extrapol·lar les fases de la proteïna i obtenir el mapa de densitat electrònica.

El mètode de la **dispersió anòmala múltiple** (MAD) consisteix a recollir més d'un joc de dades de difracció d'un sol cristall derivat, cada vegada a una longitud d'ona diferent. Les longituds d'ona es trien, normalment, de manera que una d'elles estigui en el màxim d'absorció de l'àtom pesant, una altra en el punt d'inflexió i la darrera en la zona remota, després d'aquest màxim.

Com que totes les mesures són preses en el mateix cristall, les reflexions obtingudes a les diferents longituds d'ona són comparables i, com en el cas del MIR, ens permetran determinar les fases dels àtoms pesants, que podrem aplicar a les reflexions de la resta d'àtoms de l'estructura.

Per a resoldre l'estructura de la VP1 d'IBDV es va intentar fer un reemplaçament molecular a partir de les estructures de RpdRs virals resoltes anteriorment, intentant aprofitar que l'organització general dels diferents dominis és semblant en totes les polimerases. Tot i això, aquest mètode no va donar resultats, probablement a causa dels dominis amino- i carboxi-terminals de la VP1, que són especialment grans i presenten un conformació diferent de la resta d'estructures resoltes de RpdR. En el cas de la VP1, doncs,

la determinació de les fases es va aconseguir mitjançant el mètode de MAD a partir d'un cristall derivat amb àtoms de Sm, del qual vam recollir un joc de dades a les energies del pic

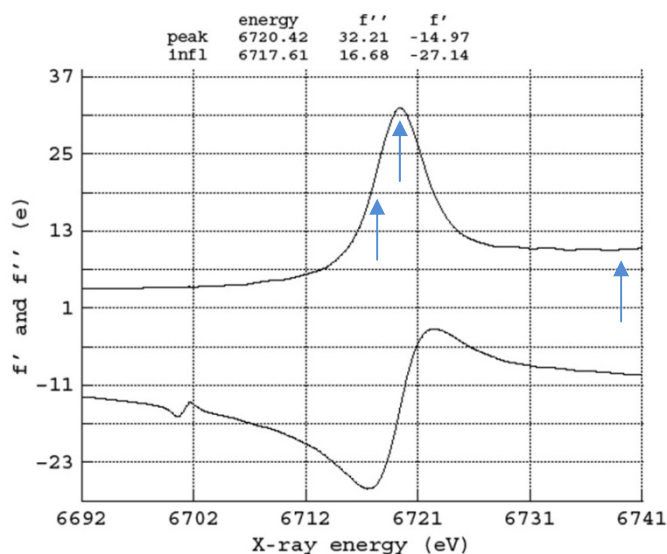


Figura 55: Espectre dels factors de difusió atòmics (f' i f'') del cristall de VP1 derivat amb Sm. Per a comprovar la presència de l'àtom pesant dins el cristall i poder calcular-ne el perfil d'absorció, se sotmet el cristall a un rang d'energies variable i es mesura la fluorescència produïda (que serà màxima en el pic d'absorció de l'àtom pesant). A partir d'aquest espectre de fluorescència es calculen els factors de difusió atòmics dels àtoms pesants, que ens permetran determinar a quines longituds d'ona hem de recollir els jocs de dades (generalment el pic, el punt d'inflexió i una de remota, marcades amb fletxes blaves en la figura).

i de la remota (vegeu la figura 55) a 3.8\AA de resolució. Mitjançant el programa SHARP (Bricogne et al., 2003) es van poder determinar i refinar les posicions de set àtoms de Sm en la cel·la unitat. Remarcablement, un cop resolta l'estructura es va comprovar que en els cristalls derivats algun dels àtoms de samari havien substituït els ions divalents del centre actiu. Les fases inicials calculades a partir d'aquestes posicions no es van poder aplicar a les dades del cristall natiu (de major resolució) per falta d'isomorfisme entre els dos cristalls. Malgrat això, sí que es van poder aplicar a un joc de dades d'un altre cristall, derivat amb Eu, amb el qual sí que era prou isomorf. D'aquest segon cristall derivat no se n'havia pogut obtenir informació anòmala (no servia per a calcular les fases via un MAD), però havia difractat a més resolució que el derivat de Sm i presentava una cel·la prou similar com per a poder-hi aplicar les fases calculades. D'aquesta manera es van poder obtenir uns nous mapes de densitat electrònica a 2.8\AA de resolució, que es van millorar usant el programa DM, aplicant la comparació d'histogrames (*histogram matching*) i l'aplanament de solvent (*solvent flattening*), aprofitant que aquests cristalls contenien un 70% de solvent.

6.1.8 Modelat, afinament i validació de l'estructura

Després d'obtenir les fases inicials per un dels mètodes comentats en l'apartat anterior, es procedeix a calcular el mapa de densitat electrònica. Aquests mapes ens indiquen la distribució electrònica en els diferents punts de l'espai. A partir d'aquí, amb l'ajut de programes d'assignació automàtica, podem situar la cadena polipeptídica, tot col·locant els diferents àtoms segons la situació de les zones de major densitat, i tenint en compte les restriccions espacials i les distàncies permeses. Posteriorment, s'ajusta manualment el traçat de l'estructura proteica en el mapa de densitat, tot servint-nos de programes de visualització i modelatge en sistemes gràfics, com ara Coot (Emsley and Cowtan, 2004), TURBO-FRODO (Roussel and Cambilleau, 1989) o O (Jones and Kjeldgaard, 1997).

Per a minimitzar les energies, es realitza un afinament automàtic de l'estructura, mitjançant programes com REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) o CNS (Brunger et al., 1998). Normalment, tot aquest procés és iteratiu: solen realitzar-se varis cicles de traçat i ajust manual, intercalats amb cicles d'afinament automàtic, fins que totes les cadenes de la proteïna resultin traçades de la millor manera possible.

En el cas de la VP1, per exemple, partint dels mapes de densitat obtinguts a 2.8Å, el protocol de reconeixement d'hèlixs del programa ARP/wARP (CCP4, 1994) va identificar automàticament diverses hèlixs α , a partir de les qual es va començar a traçar manualment la cadena polipeptídica, prenent com a guia els motius estructurals conservats de les RpdR de FMDV i $\varphi 6$ (Butcher et al., 2001; Ferrer-Orta et al., 2004). Un cop afinat, aquest model inicial (d'uns 400 residus i sense les cadenes laterals assignades) es va usar com a model de partida per a realitzar un reemplaçament molecular a partir del joc de dades natives no isomorfes, a 2.4Å de resolució, utilitzant el programa AMoRe. A partir del nou mapa obtingut es va poder construir manualment la resta de cadena polipeptídica i assignar-ne la seqüència gràcies al posicionament de les cadenes laterals, alternant-ho amb cicles d'afinat de REFMAC5.

En el cas de la VP2, en canvi, el reemplaçament molecular va resultar en un model gairebé complet i l'extensió de fases va permetre calcular un mapa amb el que es van poder traçar còmodament les diferències de la nostra estructura amb el model de partida. Tot i això, en algunes regions, com ara els *loops* S_{DE} , al voltant dels eixos quinaris, i els *loops* P_{DE} i P_{HI} , de la punta de les espícules, el mapa de densitat electrònica provinent del promitjat de NCS era molt feble i el model resultant apareixia parcialment desordenat. Un anàlisi més profund de la unitat asimètrica va revelar que aquestes regions estaven implicades en els contactes partícula-partícula del cristall, i que això els feia adoptar conformacions que diferien de la simetria icosaèdrica estricta, cosa que provocava que en aquestes regions els mapes s'empobrissin en aplicar el promitjat. Per a solucionar aquest problema, es va aprofitar

L'elevada completesa de les dades (87.8% en el rang de resolució de 20 a 2.6Å) per a alliberar les restriccions de la NCS en l'afinat d'aquestes regions. Gràcies a la relaxació parcial de la NCS es van poder traçar cinc conformacions diferents per al *loop* S_{DE} i diferenciar les variacions en la cadena principal i en les cadenes laterals dels *loops* P_{DE} i P_{HI}. Els darrers cicles d'afinament es van realitzar utilitzant restriccions (*restraints*), i no constriccions (*constraints*), de la simetria molecular, seguint el protocol de REFMAC5. A més, es van alliberar totalment les restriccions de NCS per la part de l'estructura implicada en els contactes cristal·logràfics.

Per tal d'avaluar l'evolució del procés d'afinament ens basem en una sèrie de paràmetres estadístics que ens donen informació de com està millorant el sistema (Glusker et al., 1994):

- *Rfactor*: Mesura de la precisió dels resultats de l'afinament, que s'obté comparant el model obtingut amb les dades experimentals. Ens permet saber si amb l'afinament estem assolint menors energies; com més baixi, millor evoluciona el procés. En estructures grans, com ara càpsides de virus, es donen per bons valors <30%.

- *Rfree*: Mesura la idoneïtat del model comparant-lo amb les dades experimentals. És una mesura independent de l'objectivitat del nostre afinament. Per al càlcul d'aquest paràmetre usem un 5-10% de les dades originals de les reflexions, que no utilitzarem en la construcció del model, reservant-les per a aquest càlcul. Usem aquest paràmetre per a validar el procés d'afinament: si després d'un cicle d'afinament el *Rfree* disminueix, podem assumir que el nostre model ha millorat. Si va augmentant, encara que el *Rfactor* baixi, significa que estem contaminant el nostre model; estarem arribant a una solució més estable que l'anterior, però que no és la real.

Les estadístiques de l'afinament de les estructures presentades en aquesta memòria es mostra a la taula 1.

Un cop finalitzats els afinaments, es verifiquen diferents paràmetres estereoquímics de les estructures obtingudes i se'n calcula el grau de desviació respecte els seus valors ideals mitjançant el programa PROCHECK (Laskowsky et al., 1993).

6.2 ASSAJOS D'ACTIVITAT POLIMERASA

Per a la realització dels assajos d'activitat polimerasa de la proteïna VP1 es va seguir el protocol descrit per von Einem i col. 2004 (von Einem et al., 2004) amb algunes modificacions. Les mescles de reacció, de 20µl, contenien 1 µg de la proteïna hVP1 (residus 1 a 845) i quantitats apropiades del pèptid GRLGRWIRTVSDEDLE, que mimetitzava la regió C-terminal de la VP3. El tampó de reacció contenia 100 mM TrisHCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA, 20 unitats de RNAsin, 1mMATP, CTP i GTP, i 0.02mMUTP. Després d'incubar les mostres a 20°C durant 30 min, s'hi van afegir 5 µl del motlle pertinent (a 0.2 mg/ml), diluït en el tampó de reacció amb 10 µCi de [α -³²P]UTP. Després de 2h d'incubació a 40°C, es retiraven els nucleòtids sobrants (no incorporats al producte de reacció), es parava la reacció afegint 3 µ de tampó de càrrega (6X) i escalfant les mostres 5 min a 65°C i es carregaven en un gel d'acrilamida-TBE al 5%. El gel es feia córrer, s'assecava i se'n mesurava la senyal radioactiva (amb el sistema de Storm Gel Imaging, de Molecular Dynamics), que posteriorment es podia quantificar usant el programa ImageQuant (també de Molecular Dynamics).

Per tal de poder estudiar els efectes de la regió 3'UTR del genoma viral en l'activitat de la hVP1, es van generar uns motlles ssRNA amb la seqüència d'un o altre dels dos segments genòmics A i B. Per a cada una d'aquestes seqüències es van generar dos tipus de motlle: un amb uns nucleòtids extres afegits a continuació de l'extrem 3' de la seqüència genòmica, mentre que l'altre té l'extrem 3' amb la mateixa seqüència que els genomes virals. Per tal de generar aquests extrems, els RNA es van transcriure a partir d'un constructe que conté la seqüència del ribozim de l'hepatitis δ després de l'UTR del 3'. El ribozim talla la cadena just després del darrer nucleòtid del 3'UTR, de manera que els ssRNA resultants tenen exactament la mateixa seqüència que els transcrits virals, incloent-hi els UTR dels 5' i 3'. D'aquesta manera, doncs, es van obtenir quatre motlles diferents: dos amb el UTR "natiu", que anomenem **A+** i **B+**, i dos més amb un 3' quimèric, que anomenem **A-** i **B-**.

Per a poder optimitzar els efectes de la VP3 (i del pèptid que mimetitzava el seu extrem C-terminal) sobre l'activitat de hVP1 es va usar un motlle similar al **B+**, però més curt. Es va transcriure a partir d'un constructe de DNA de 554 parells de bases que contenia les UTR dels 5' i 3' del segment B d'IBDV, seguit del ribozim de l'hepatitis δ (a l'extrem 3').

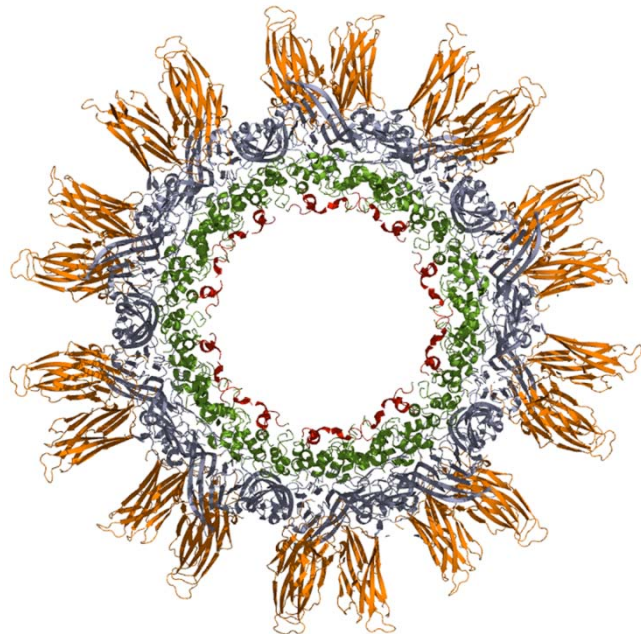
6.3 ASSAIG DE GUANILILACIÓ

Amb la intenció de comprovar el lloc de guanililació de la VP1 es va provar de posar a punt un assaig, basat en els protocols descrits en la bibliografia (Dobos, 1993; Spies and Muller, 1990; Xu et al., 2004).

Així, doncs, es van preincubar diferents mostres de VP1 a 37°C durant 5 minuts, per afegir-hi tot seguit un tampó amb 50 mM MgCl₂ i 30 µCi de [α -³²P]GTP i incubar la reacció 10 minuts a 42°C. A fi de parar la reacció s'afegien 50 µl de tampó de càrrega de proteïnes (2X) a cada mostra i es bullien 10 minuts a 90°C. Aquestes mostres es feien córrer en un gel del 10% d'acrilamida, que posteriorment es fixava amb una solució de 7.5% d'àcid acètic, 25% de metanol i 10% de glicerol. Un cop fixat, el gel s'assecava i se'n mesurava la senyal radioactiva (amb el sistema de Storm Gel Imaging, de Molecular Dynamics), que posteriorment es va quantificar usant el programa ImageQuant (també de Molecular Dynamics).

L'assaig es va provar amb mostres de hVP1 (residus 1-845 de la polimerasa, amb una cua d'histidines a l'extrem N-terminal) purificada per resina de níquel i amb extractes de cèl·lules de mamífer (BSC40) en les quals s'havia expressat la seqüència sencera de la VP1 (mitjançant el sistema d'expressió de vaccinia). Com a control positiu es va usar una solució de virions IBDV purificats en gradient de CsCl.

7. ANNEX II: ALTRES PUBLICACIONS



Partícula pseudoviral de VP2

Luque D, Saugar I, Rodríguez JF, Verdaguer N, Garriga D, Martín CS, Velázquez-Muriel JA, Trus BL, Carrascosa JL, Castón JR.

[*Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch.*](#)

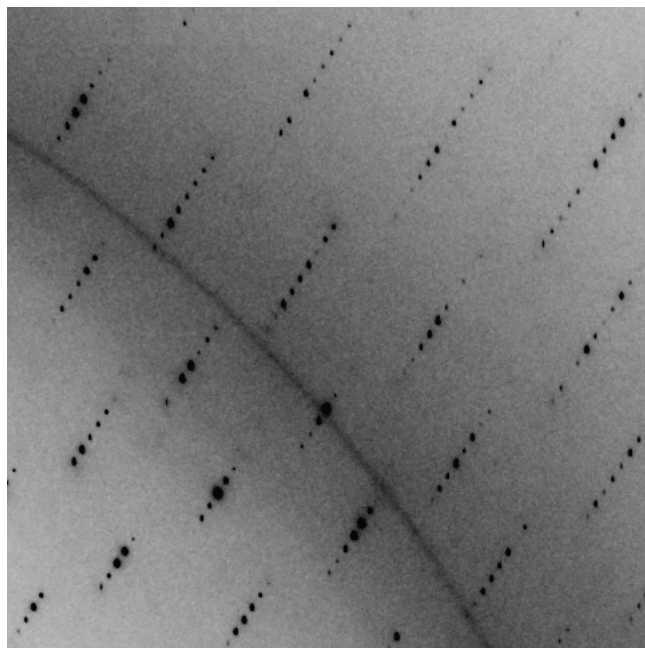
J Virol. 2007 Jul;81(13):6869-78.

Irigoyen N, Garriga D, Navarro A, Verdaguer N, Rodríguez JF, Castón JR.

[Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein.](#)

J Biol Chem. 2009 Mar 20;284(12):8064-72.

8. REFERÈNCIES



Difracció d'un cristall de VP1

- Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., and Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* *7*, 1417-1426.
- Ahlquist, P. (2005). Virus evolution: fitting lifestyles to a T. *Curr Biol* *15*, R465-467.
- Ambros, V., Pettersson, R.F., and Baltimore, D. (1978). An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* *15*, 1439-1446.
- Appleby, T.C., Luecke, H., Shim, J.H., Wu, J.Z., Cheney, I.W., Zhong, W., Vogeley, L., Hong, Z., and Yao, N. (2005). Crystal structure of complete rhinovirus RNA polymerase suggests front loading of protein primer. *J Virol* *79*, 277-288.
- Arias, A., Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Perez-Luque, R., Airaksinen, A., Brocchi, E., Domingo, E., Verdaguer, N., and Escarmis, C. (2005). Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J Mol Biol* *353*, 1021-1032.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* *35*, 235-241.
- Becht, H., and Muller, H. (1991). Infectious bursal disease--B cell dependent immunodeficiency syndrome in chickens. *Behring Inst Mitt*, 217-225.
- Beese, L.S., and Steitz, T.A. (1991). Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *Embo J* *10*, 25-33.
- Bennett, M.J., Schlunegger, M.P., and Eisenberg, D. (1995). 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* *4*, 2455-2468.
- Bergfors, T.M., ed. (1999). *Protein Crystallization. Techniques, Strategies and Tips. A Laboratory Manual.* (International University Line).
- Bernard, J. (1980). *Drosophila X* virus RNA polymerase: tentative model for in vitro replication of the double-stranded virion RNA. *J Virol* *33*, 717-723.
- Birghan, C., Mundt, E., and 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*, 114-123.
- Biswal, B.K., Cherney, M.M., Wang, M., Chan, L., Yannopoulos, C.G., Bilimoria, D., Nicolas, O., Bedard, J., and James, M.N. (2005). Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. *J Biol Chem* *280*, 18202-18210.
- Boot, H.J., ter Huurne, A.A., Peeters, B.P., and Gielkens, A.L. (1999). Efficient rescue of infectious bursal disease virus from cloned cDNA: evidence for involvement of the 3'-terminal sequence in genome replication. *Virology* *265*, 330-341.
- Bottcher, B., Kiselev, N.A., Stel'Mashchuk, V.Y., Perevozchikova, N.A., Borisov, A.V., and Crowther, R.A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* *71*, 325-330.
- Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R.A., and Vakharia, V.N. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol* *75*, 11974-11982.
- Brautigam, C.A., and Steitz, T.A. (1998). Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* *8*, 54-63.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A., and De Francesco, R. (2002). Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol* *76*, 3482-3492.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F.A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13034-13039.

- Bricogne, G., Vornrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M., and Paciorek, W. (2003). Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *59*, 2023-2030.
- Bruenn, J.A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* *31*, 1821-1829.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *54*, 905-921.
- Butcher, S.J., Grimes, J.M., Makeyev, E.V., Bamford, D.H., and Stuart, D.I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* *410*, 235-240.
- Calvert, J.G., Nagy, E., Soler, M., and Dobos, P. (1991). Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol* *72 (Pt 10)*, 2563-2567.
- Casañas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., Gonzalez, D., Rodriguez, J.F., and Verdager, N. (2008). Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure* *16*, 29-37.
- Caspar, D.L., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *27*, 1-24.
- Caston, J.R., Martinez-Torrecedrada, J.L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodriguez, 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.
- Castro, C., Arnold, J.J., and Cameron, C.E. (2005). Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Res* *107*, 141-149.
- Castro, C., Smidansky, E.D., Arnold, J.J., Maksimchuk, K.R., Moustafa, I., Uchida, A., Gotte, M., Konigsberg, W., and Cameron, C.E. (2009). Nucleic acid polymerases use a general acid for nucleotidyl transfer. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 212-218.
- CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *50*, 760-763.
- Comps, M., Mari, J., Poisson, F., and Bonami, J.R. (1991). Biophysical and biochemical properties of an unusual birnavirus pathogenic for rotifers. *J Gen Virol* *72*, 1229-1236.
- Cosgrove, A.S. (1962). An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian dis* *6*, 385-389.
- 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.
- Cowtan, K., and Main, P. (1998). Miscellaneous algorithms for density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *54 (Pt 4)*, 487-493.
- Crick, F.H., and Watson, J.D. (1956). Structure of small viruses. *Nature* *177*, 473-475.
- Cheng, R.H., Reddy, V.S., Olson, N.H., Fisher, A.J., Baker, T.S., and 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*, 271-282.
- Chettle, N., Stuart, J.C., and Wyeth, P.J. (1989). Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet Rec* *125*, 271-272.
- Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J., and Delmas, B. (2005). Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol* *79*, 12253-12263.

- 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.
- 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.
- Choi, K.H., Groarke, J.M., Young, D.C., Kuhn, R.J., Smith, J.L., Pevear, D.C., and Rossmann, M.G. (2004). The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhoea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4425-4430.
- 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.
- Da Costa, B., Soignier, S., Chevalier, C., Henry, C., Thory, C., Huet, J.C., and Delmas, B. (2003). Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J Virol* *77*, 719-725.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., and Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* *3*, 461-467.
- Delgui, L., Oña, A., Gutierrez, S., Luque, D., Navarro, A., Caston, J.R., and Rodriguez, J.F. (2009). The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology* *386*, 360-372.
- Dobos, P. (1993). In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology* *193*, 403-413.
- Dobos, P. (1995). Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* *208*, 19-25.
- 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.
- Domingo, E. (2007). Virus Evolution. In *Fields' Virology*, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, USA, Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 389-422.
- Doublet, S., Tabor, S., Long, A.M., Richardson, C.C., and Ellenberger, T. (1998). Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* *391*, 251-258.
- Drenth, J. (1995). *Principles of Protein X-ray Crystallography.*, 2nd edn (Springer).
- Duncan, R., Mason, C.L., Nagy, E., Leong, J.A., and Dobos, P. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* *181*, 541-552.
- Edgar, S.A., and Cho, Y. (1976). The epizootiology of infectious bursal disease and prevention of it by immunization. *Dev Biol Stand* *33*, 349-356.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *60*, 2126-2132.
- Evans, P.R. (1994). Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing. *Acta Crystallogr sect D* *50*, 760-763.
- Feldman, A.R., Lee, J., Delmas, B., and Paetzel, M. (2006). Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J Mol Biol* *358*, 1378-1389.
- Fernandez-Arias, A., Risco, C., Martinez, S., Albar, J.P., and Rodriguez, J.F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol* *79* (Pt 5), 1047-1054.

- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2006a). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *Embo J* *25*, 880-888.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmis, C., and Verdaguer, N. (2006b). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* *16*, 27-34.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and 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*, 47212-47221.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2007). Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 9463-9468.
- Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson, M.R., and Steitz, T.A. (1988). Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 8924-8928.
- Fricks, C.E., and Hogle, J.M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* *64*, 1934-1945.
- Fullerton, S.W., Blaschke, M., Coutard, B., Gebhardt, J., Gorbalenya, A., Canard, B., Tucker, P.A., and Rohayem, J. (2007). Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* *81*, 1858-1871.
- Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J., and Delmas, B. (2007). Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem* *282*, 20774-20784.
- Garcia-Sastre, A., and Biron, C.A. (2006). Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science* *312*, 879-882.
- Gardner, H., Kerry, K., Riddle, M., Brouwer, S., and Gleeson, L. (1997). Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature* *387*, 245.
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodriguez, J.F., and Verdaguer, N. (2007). Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20540-20545.
- Glusker, J., Lewis, M., and Rossi, M. (1994). *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists.*, 1st edn (VCH).
- Gohara, D.W., Crotty, S., Arnold, J.J., Yoder, J.D., Andino, R., and Cameron, C.E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs A and B. *J Biol Chem* *275*, 25523-25532.
- Gomis-Ruth, F.X., and Coll, M. (2001). Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation. *Int J Biochem Cell Biol* *33*, 839-843.
- Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., and Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* *409*, 637-641.
- Gorbalenya, A.E., and Koonin, E.V. (1988). Birnavirus RNA polymerase is related to polymerases of positive strand RNA viruses. *Nucleic Acids Res* *16*, 7735.
- Gorbalenya, A.E., Pringle, F.M., Zeddani, J.L., Luke, B.T., Cameron, C.E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T.N., Gordon, K.H., and 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*, 47-62.

- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T.C., Beyer, J., Kollner, B., and Mundt, E. (1997). A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol* *71*, 8879-8885.
- Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Ruth, F.X., Valpuesta, J.M., Sousa, N., Carrascosa, J.L., and Coll, M. (2002). Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. *J Mol Biol* *315*, 663-676.
- Guittet, M., Le Coq, H., Picault, J.P., Etteradossi, N., and Bennejean, G. (1992). Safety of infectious bursal disease vaccines: assessment of an acceptability threshold. *Dev Biol Stand* *79*, 147-152.
- Helliwell, J.R. (2005). Protein crystal perfection and its application. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *61*, 793-798.
- Hill, C.L., Booth, T.F., Prasad, B.V., Grimes, J.M., Mertens, P.P., Sutton, G.C., and Stuart, D.I. (1999). The structure of a cypovirus and the functional organization of dsRNA viruses. *Nat Struct Biol* *6*, 565-568.
- Hjalmarsson, A., Carlemalm, E., and Everitt, E. (1999). Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol* *73*, 3484-3490.
- Hogle, J.M. (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol* *56*, 677-702.
- Irigoyen, N. (2009). Analysis of the assembly and maturation processes of the Infectious Bursal Disease Virus. In Facultad de Ciencias (Madrid, Universidad Autónoma de Madrid (UAM)), pp. 191.
- Irigoyen, N., Garriga, D., Navarro, A., Verdaguer, N., Rodriguez, J.F., and Caston, J.R. (2009). Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J Biol Chem* *284*, 8064-8072.
- Ivanov, A.V., Tunitskaya, V.L., Ivanova, O.N., Mitkevich, V.A., Prassolov, V.S., Makarov, A.A., Kukhanova, M.K., and Kochetkov, S.N. (2009). Hepatitis C virus NS5A protein modulates template selection by the RNA polymerase in in vitro system. *FEBS Lett* *583*, 277-280.
- Jagdish, M.N., Staton, V.J., Hudson, P.J., and Azad, A.A. (1988). Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol* *62*, 1084-1087.
- Jeffery, C.J. (2004). Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr Opin Struct Biol* *14*, 663-668.
- Jeruzalmi, D. (2007). First analysis of macromolecular crystals: biochemistry and x-ray diffraction. *Methods Mol Biol* *364*, 43-62.
- Johnson, J.E. (1996). Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 27-33.
- Johnson, J.E., and Speir, J.A. (1997). Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies. *J Mol Biol* *269*, 665-675.
- Jones, T.A., and Kjeldgaard, M. (1997). Electron density map interpretation. In *Macromolecular Crystallography*, C.W. Carter, and R.M. Sweet, eds. (London, Academic Press), pp. 173-208.
- Joyce, C.M., and Steitz, T.A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol* *177*, 6321-6329.
- Juhl, S.B., Chan, E.P., Ha, Y.-H., Maldovan, M., Brunton, J., Ward, V., Dokland, T., Kalmakoff, J., Farmer, B., Thomas, E.L., *et al.* (2006). Assembly of *Wiseana Iridovirus*: Viruses for Colloidal Photonic Crystals. *Adv Funct Mater* *16*, 1086 - 1094.

- Kao, C.C., Singh, P., and Ecker, D.J. (2001). De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology* 287, 251-260.
- Kaufers, I., and Weiss, E. (1980). Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun* 27, 364-367.
- Kibenge, F.S., and Dhama, V. (1997). Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch Virol* 142, 1227-1236.
- Kibenge, F.S., Qian, B., Cleghorn, J.R., and Martin, C.K. (1997). Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch Virol* 142, 2401-2419.
- Kochan, G., Gonzalez, D., and Rodriguez, J.F. (2003). Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 148, 723-744.
- Koonin, E.V., and Dolja, V.V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28, 375-430.
- Lai, M.M. (1998). Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* 244, 1-12.
- Lasher, H.N., and Shane, S.M. (1994). Infectious bursal disease. *World's Poultry Science Journal* 50, 133-166.
- Laskowsky, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of a protein structure. *J Appl Crystallog* 24, 946-950.
- Lawton, J.A., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol* 4, 118-121.
- Lee, C.C., Ko, T.P., Chou, C.C., Yoshimura, M., Doong, S.R., Wang, M.Y., and 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, 74-86.
- Lee, J., Feldman, A.R., Delmas, B., and Paetzel, M. (2007). Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction. *J Biol Chem* 282, 24928-24937.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J.C., and 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, 983-992.
- Leong, J.C., Brown, D., Dobos, P., Kibenge, F.S.B., Ludert, J.E., Muller, H., Mundt, E., and Nicholson, B. (2000). Family Birnaviridae. In *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.L. Bishop, E.B. Cartens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, *et al.*, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 481-1490.
- Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., and Weber, P.C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6, 937-943.
- Leslie, A.G.W. (1991). Macromolecular data processing. In *Crystallographic Computing*, D. Moras, A.D. Podjarny, and J.C. Thiery, eds. (Oxford, Oxford University Press), pp. 27-38.
- Letzel, T., Mundt, E., and Gorbalenya, A.E. (2007). Evidence for functional significance of the permuted C motif in Co²⁺-stimulated RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 88, 2824-2833.
- Levy, D.E., and Garcia-Sastre, A. (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 143-156.

- Lim, B.L., Cao, Y., Yu, T., and Mo, C.W. (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J Virol* *73*, 2854-2862.
- Lombardo, E., Maraver, A., Caston, J.R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., and Rodriguez, J.F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol* *73*, 6973-6983.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A., and Rodriguez, 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.
- Love, R.A., Maegley, K.A., Yu, X., Ferre, R.A., Lingardo, L.K., Diehl, W., Parge, H.E., Dragovich, P.S., and Fuhrman, S.A. (2004). The crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from human rhinovirus: a dual function target for common cold antiviral therapy. *Structure* *12*, 1533-1544.
- Lunger, P.D., and Maddux, T.C. (1972). Fine-structure studies of the avian infectious bursal agent. I. In vivo viral morphogenesis. *Avian Dis* *16*, 874-893.
- Luo, G., Hamatake, R.K., Mathis, D.M., Racela, J., Rigat, K.L., Lemm, J., and Colonno, R.J. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol* *74*, 851-863.
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J.L., Rodriguez, J.F., and Caston, J.R. (2009a). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 2148-2152.
- Luque, D., Saugar, I., Rejas, M.T., Carrascosa, J.L., Rodriguez, J.F., and Caston, J.R. (2009b). Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol* *386*, 891-901.
- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J.F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martin, C.S., Velazquez-Muriel, J.A., Trus, B.L., Carrascosa, J.L., and Caston, J.R. (2007). Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol* *81*, 6869-6878.
- Lutticken, D. (1997). Viral diseases of the immune system and strategies to control infectious bursal disease by vaccination. *Acta Vet Hung* *45*, 239-249.
- Magyar, G., Chung, H.K., and Dobos, P. (1998). Conversion of VP1 to VPg in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* *245*, 142-150.
- Malet, H., Egloff, M.P., Selisko, B., Butcher, R.E., Wright, P.J., Roberts, M., Gruez, A., Sulzenbacher, G., Vornrhein, C., Bricogne, G., *et al.* (2007). Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem* *282*, 10678-10689.
- Maraver, A., Clemente, R., Rodriguez, J.F., and Lombardo, E. (2003a). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol* *77*, 2459-2468.
- Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J.A., Caston, J.R., Pazos, F., and Rodriguez, J.F. (2003b). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol* *77*, 6438-6449.
- Martinez-Torrecuadrada, J.L., Caston, J.R., Castro, M., Carrascosa, J.L., Rodriguez, J.F., and Casal, J.I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* *278*, 322-331.

- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V., Cohen, J., and Rey, F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *Embo J* 20, 1485-1497.
- McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Connor, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S., and Allan, G.M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol* 9, 395-404.
- Mertens, P.P., Jamieson, P.B., and Dobos, P. (1982). In vitro RNA synthesis by infectious pancreatic necrosis virus-associated RNA polymerase. *J Gen Virol* 59, 47-56.
- Muller, H., Islam, M.R., and Raue, R. (2003). Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet Microbiol* 97, 153-165.
- Muller, H., and 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* 176, 113-121.
- Muller, H., and Nitschke, R. (1987b). The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* 159, 174-177.
- Mundt, E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J Gen Virol* 80 (Pt 8), 2067-2076.
- Mundt, E., Beyer, J., and Muller, H. (1995). Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol* 76, 437-443.
- Mundt, E., Kollner, B., and Kretzschmar, D. (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 71, 5647-5651.
- Munshi, S., Liljas, L., Cavarelli, J., Bomu, W., McKinney, B., Reddy, V., and 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, 1-10.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.
- Nagarajan, M.M., and Kibenge, F.S. (1997). The 5'-terminal 32 basepairs conserved between genome segments A and B contain a major promoter element of infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 142, 2499-2514.
- Nagy, E., Duncan, R., Krell, P., and Dobos, P. (1987). Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. *Virology* 158, 211-217.
- Natarajan, P., and Johnson, J.E. (1998). Molecular packing in virus crystals: geometry, chemistry, and biology. *J Struct Biol* 121, 295-305.
- Navarro, A. (2009). Análisis Estructural y Funcional del Complejo Transcripcional del Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV). In Departamento de Biología Molecular Facultad de Ciencias (Madrid, Universidad Autónoma de Madrid (UAM)), pp. 152.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr A* 50, 157-163.
- Ng, K.K., Cherney, M.M., Vazquez, A.L., Machin, A., Alonso, J.M., Parra, F., and James, M.N. (2002). Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 277, 1381-1387.
- Ng, K.K., Pendas-Franco, N., Rojo, J., Boga, J.A., Machin, A., Alonso, J.M., and Parra, F. (2004). Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem* 279, 16638-16645.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R., and Honig, B. (1993). GRASP: graphical representation and analysis of surface proteins. *Biophys J* 64, 166.

- O'Farrell, D., Trowbridge, R., Rowlands, D., and Jager, J. (2003). Substrate complexes of hepatitis C virus RNA polymerase (HC-J4): structural evidence for nucleotide import and de-novo initiation. *J Mol Biol* 326, 1025-1035.
- Ogawa, M., Wakuda, T., Yamaguchi, T., Murata, K., Setiyono, A., Fukushi, H., and Hirai, K. (1998). Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. *J Vet Med Sci* 60, 1277-1279.
- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G., and Steitz, T.A. (1985). Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313, 762-766.
- Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Caston, J.R., and Rodriguez, J.F. (2004). The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* 322, 135-142.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In *Methods in Enzymology*, C.W. Carter, and R.M. Sweet, eds. (Academic Press), pp. 307-326.
- Pan, J., Vakharia, V.N., and Tao, Y.J. (2007). The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7385-7390.
- Paul, A.V. (2002). Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, B.L. Semler, and E. Wimmer, eds. (Washington, DC., ASM Press), pp. 227-246.
- Paul, A.V., van Boom, J.H., Filippov, D., and Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393, 280-284.
- Pavel, I., Gutiérrez, M., Arias, C.F., and López, S. (2008). Rotavirus Cell Entry: Conformational Changes. *Future Virology* 3, 135-146.
- Persson, R.H., and Macdonald, R.D. (1982). Evidence that infectious pancreatic necrosis virus has a genome-linked protein. *J Virol* 44, 437-443.
- Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Roberts, E., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2005). pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *J Virol* 79, 8572-8580.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., and Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* 8, 3867-3874.
- Quadt, R., Rosdorff, H.J., Hunt, T.W., and Jaspars, E.M. (1991). Analysis of the protein composition of alfalfa mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 182, 309-315.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J.W., and Itzhaki, L.S. (2003). The unfolding story of three-dimensional domain swapping. *Structure* 11, 243-251.
- Roussel, A., and Cambilleau, C. (1989). Turbo-Frodo. In *Silicon Graphics Geometry Partners Directory* (Mountain View, CA, Silicon Graphics), pp. 77-79.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697-715.
- Rupp, B., and Wang, J. (2004). Predictive models for protein crystallization. *Methods* 34, 390-407.
- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* 60, 39-71.
- Salgado, P.S., Makeyev, E.V., Butcher, S.J., Bamford, D.H., Stuart, D.I., and Grimes, J.M. (2004). The structural basis for RNA specificity and Ca²⁺ inhibition of an RNA-dependent RNA polymerase. *Structure* 12, 307-316.
- Sanchez, A.B., and Rodriguez, J.F. (1999). Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* 262, 190-199.

- Sargent, M.D., and Borsa, J. (1984). Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the switch-on of transcriptase function in reovirus in vitro. *Can J Biochem Cell Biol* *62*, 162-169.
- Saugar, I., Luque, D., Ona, A., Rodriguez, J.F., Carrascosa, J.L., Trus, B.L., and Caston, J.R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure* *13*, 1007-1017.
- Schneemann, A., Reddy, V., and 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., and 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.
- Shai, Y. (1995). Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem Sci* *20*, 460-464.
- Shwed, P.S., Dobos, P., Cameron, L.A., Vakharia, V.N., and Duncan, R. (2002). Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology* *296*, 241-250.
- Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* *69*, 531-569.
- Smith, K.M., and Xeros, N. (1954). An unusual virus disease of a dipterous larva. *Nature* *173*, 866-867.
- Spies, U., and Muller, H. (1990). Demonstration of enzyme activities required for capsid 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., and Becht, H. (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* *8*, 127-140.
- Spies, U., Muller, H., and Becht, H. (1989). Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic Acids Res* *17*, 7982.
- Steitz, T.A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* *391*, 231-232.
- Steitz, T.A., and Steitz, J.A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 6498-6502.
- Tacken, M.G., Peeters, B.P., Thomas, A.A., Rottier, P.J., and Boot, H.J. (2002). Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol* *76*, 11301-11311.
- Tacken, M.G., Rottier, P.J., Gielkens, A.L., and 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*, 209-218.
- Tacken, M.G., Van Den Beuken, P.A., Peeters, B.P., Thomas, A.A., Rottier, P.J., and 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*, 306-319.
- Tao, Y., Farsetta, D.L., Nibert, M.L., and Harrison, S.C. (2002). RNA synthesis in a cage--structural studies of reovirus polymerase lambda3. *Cell* *111*, 733-745.
- Thompson, A.A., and Peersen, O.B. (2004). Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Embo J* *23*, 3462-3471.
- Tompa, P., Szasz, C., and Buday, L. (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* *30*, 484-489.
- van den Berg, T.P., Etteradossi, N., Toquin, D., and Meulemans, G. (2000). Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech* *19*, 509-543.

- Van der Kuyl, A.C., Neeleman, L., and Bol, J.F. (1991). Role of alfalfa mosaic virus coat protein in regulation of the balance between viral plus and minus strand RNA synthesis. *Virology* 185, 496-499.
- van Dijk, A.A., Frilander, M., and Bamford, D.H. (1995). Differentiation between minus- and plus-strand synthesis: polymerase activity of dsRNA bacteriophage phi 6 in an in vitro packaging and replication system. *Virology* 211, 320-323.
- van Dijk, A.A., Makeyev, E.V., and Bamford, D.H. (2004). Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J Gen Virol* 85, 1077-1093.
- van Loon, A.A., de Haas, N., Zeyda, I., and 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, 121-129.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417, 712-719.
- von Einem, U.I., Gorbalenya, A.E., Schirrmeier, 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.
- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L., and Yu, L. (2006). Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 277-287.
- Weiss, E., and Kaufer, I. (1994). Pathology and pathogenesis of infectious bursal disease. Paper presented at: International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia (Germany).
- Wilcox, G.E., Flower, R.L., Baxendale, W., and Smith, V.W. (1983). Infectious bursal disease in Western Australia. *Aust Vet J* 60, 86-87.
- Wiley, D.C., and Skehel, J.J. (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56, 365-394.
- Xu, H.T., Si, W.D., and Dobos, P. (2004). Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* 322, 199-210.
- Yamaguchi, T., Setiyono, A., Kobayashi, M., Takigami, S., Fukushi, H., and 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, 284-290.
- Yamakawa, M., Furuichi, Y., Nakashima, K., LaFiandra, A.J., and Shatkin, A.J. (1981). Excess synthesis of viral mRNA 5-terminal oligonucleotides by reovirus transcriptase. *J Biol Chem* 256, 6507-6514.
- Yao, K., Goodwin, M.A., and Vakharia, V.N. (1998). Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J Virol* 72, 2647-2654.

INDEX DE FIGURES I TAULES

Figura 1: La bossa de Fabrici i la infecció per IBDV	5
Figura 2: Distribució de l'IBDV en el món	7
Figura 3: El genoma de l'IBDV	9
Figura 4: La VP3	11
Figura 5: La VP4	12
Figura 6: El número de triangulació T	14
Figura 7: Construcció d'una superfície icosaèdrica quasiequivalent	14
Figura 8: La càpside de l'IBDV	15
Figura 9: Morfologies de la proteïna de la càpside de l'IBDV	17
Figura 10: Forma general de les polimerases	18
Figura 11: Esquema de la reacció de polimerització	19
Figura 12: Mecanisme dels dos ions	20
Figura 13: Les RpdR	22
Figura 14: Els canals de les RpdR	23
Figura 15: Mecanismes d'iniciació de la polimerització	26
Figura 16: Extrems 3' i 5' dels segments genòmics entre els birnavirus	29
Figura 17: Replicació semiconservativa	29
Figura 18: Permutació al subdomini del palmell	31
Figura 19: La VP2	39
Figura 20: L'ió calci en el trímer de VP2	41
Figura 21: La VP1	56
Figura 22: Els ions en la VP1	57
Figura 23: Canvi conformacional en la regió del loop B	58
Figura 24: Efecte de la incubació amb el pèptid de la VP3	58

Figura 25: Efecte de la VP3 en l'activitat polimerasa de la VP1	72
Figura 26: Efecte de la regió 3'UTR en l'activitat polimerasa de la VP1	73
Figura 27: Assaig de guanililació	74
Figura 28: Esquema dels processos proteolítics de la proteïna de la càpside	77
Figura 29: Feix d'hèlixs a l'eix quinari	79
Figura 30: Contactes entre els trímers	80
Figura 31: La flexibilitat de l'hèlix $\alpha 4$	81
Figura 32: Disposició de les partícules en el cristall i els cossos d'inclusió	83
Figura 33: Interaccions partícula-partícula en el cristall	84
Figura 34: El canal als eixos quinaris	86
Figura 35: Obertura de l'espícula	88
Figura 36: Comparació del palmell canònic i el no canònic	89
Figura 37: Canvis en la disposició del loop B per acció de la VP3	91
Figura 38: Model d'interacció entre la VP1 i la VP3	93
Figura 39: Posició dels residus Ser 166 i Thr 168	94
Figura 40: Model de guanililació de la VP1	97
Figura 41: Interaccions de la VP1 amb el RNA i els rNTP	99
Figura 42: Model de síntesi del RNA viral	101
Figura 43: Esquema de la infecció viral.	103
Figura 44: Esquema de l'espectre de radiacions electromagnètiques	115
Figura 45: Diagrama de fases	117
Figura 46: Mètode de difusió de vapor en gota penjant	118
Figura 47: Cristalls de SVP derivades de VP2	119
Figura 48: Cristalls de VP1	120
Figura 49: Loop de niló	121
Figura 50: Vista aèria de l'ESRF	121

Figura 51: Llei de Bragg	122
Figura 52: Difractogrames dels cristalls de la VP1 i la VP2	123
Figura 53: Els factors d'estructura $F(hkl)$ i les densitats electròniques $\rho(xyz)$	126
Figura 54: Orientació de les partícules SVP en el cristall	128
Figura 55: Espectre dels factors de difusió atòmics	130
Taula 1: Estadístiques de les dades cristal·logràfiques	125

GLOSSARI

ATP	Adenosina 5' trifosfat
BF	Bossa de Fabrici
BSNV	Virus del peix <i>Channa maculata</i>
CI	Cos d'inclusió
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DXV	Virus de la Drosophila
EGTA	Àcid etilenglicol tetraacètic
FMDV	Virus de la febre aftosa
GMP	Guanosina 5' monofosfat
GTP	Guanosina 5' trifosfat
HCV	Virus de l'hepatitis C
HRV	Rhinovirus humà (virus del refredat)
IBD	Malaltia de la bursitis infecciosa
IBDV	Virus de la bursitis infecciosa
vvIBDV	Soques molt virulentes de l'IBDV
IPNV	Virus de la necrosi del pàncrees
IRES	Lloc intern d'unió al ribosoma
MAD	Dispersió anòmala múltiple
MR	Reemplaçament molecular
NCS	Simetria no cristal·logràfica
NS	Proteïna no estructural
NTP	Nucleòtid trifosfat
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat
rNTP	Ribonucleòtid trifosfat
ORF	Marc obert de lectura

PDB	Banc de dades de proteïnes
PEG	Polietilenglicol
PPi	Grup pirofosfat
PSA	Aminopectidasa sensible a la puromicina
RNA	Àcid ribonucleic
mRNA	RNA missatger
dsRNA	RNA de doble cadena
ssRNA	RNA de cadena simple
-ssRNA	RNA de cadena simple i de polaritat negativa
+ssRNA	RNA de cadena simple i de polaritat positiva
RNP	Ribonucleoproteïna
RpdR	RNA polimerasa dependent de RNA
SVP	Partícula pseudoviral
UMP	Uridina 5' monofosfat
UTP	Uridina 5' trifosfat
UTR	Regió no traduïda del genoma
VPg	Proteïna viral unida al genoma

NOMENCLATURA D'UNA I TRES LLETRES PELS AMINOÀCIDS

A (Ala) – Alanina	I (Ile) - Isoleucina	R (Arg) - Arginina
C (Cys) – Cisteïna	K (Lys) - Lisina	S (Ser) - Serina
D (Asp) – Àc. aspàrtic	L (Leu) - Leucina	T (Thr) - Treonina
E (Glu) – Àc. glutàmic	M (Met) – Metionina	V (Val) - Valina
F (Phe) – Fenilalanina	N (Asn) - Asparagina	W (Trp) - Triptòfan
G (Gly) – Glicina	P (Pro) - Prolina	Y (Tyr) - Tirocina
H (His) – Histidina	Q (Gln) – Glutamina	

