



Proteïnes no estructurals de picornavirus: implicacions funcionals de les estructures cristal·logràfiques de 2B i 3D^{POL}

Laia Vives Adrián

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**PROTEÏNES NO ESTRUCTURALS DE
PICORNAVIRUS: IMPLICACIONS FUNCIONALS
DE LES ESTRUCTURES
CRISTAL·LOGRÀFIQUES DE 2B I 3D^{POL}**

LAIA VIVES ADRIÁN

2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA





UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA

**PROTEÏNES NO ESTRUCTURALS DE PICORNAVIRUS:
IMPLICACIONS FUNCIONALS DE LES ESTRUCTURES
CRISTAL·LOGRÀFIQUES DE 2B I 3D^{POL}**

Memòria presentada per Laia Vives Adrián per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directora: Núria Verdaguer Massana

Doctoranda: Laia Vives Adrián

Tutora: Josefa Badia Palacín

LAIA VIVES ADRIÁN 2014

Al Guillem,

Perquè amb tu he entès la frase: “Sempre el portaràs dins teu”

“Un escolta xiula i somriu davant les adversitats”

(*Scouting for boys*, Lord Robert Baden-Powell)

AGRAÏMENTS

I en aquest punt només queda agrair a totes les persones que han format part d'aquesta etapa del camí que s'acaba. Per haver-me ajudat a arribar al final amb la formació i experiència per iniciar la següent. Per haver fet les coses més fàcils i agradables.

Abans però, no vull perdre l'oportunitat per desagrair. M'agradaria deixar constància que el cinisme de la política actual en ciència al nostre país és aberrant. El retrocés sense precedents del sector ens arrossega cap a la cua de la ciència mundial i, mentrestant, totes ens ho mirem. El progrés el fa una societat crítica i optimista i la ciència ha de ser-ne un element protagonista, no un capritx. Perquè un tanc o l'última versió d'una Kalasnikov, perdoneu la meva incultura militar, no ens salvaran de virus, càncers o pandèmies. I també hem de vetllar perquè aquesta ciència sigui per tothom. A la carrera teníem l'assignatura de bioètica i crec que el concepte que em va quedar més clar era que els beneficis, a l'igual que els perjudicis, generats per la ciència havien de repercutir a tota la població. La ciència és un dret de totes i no es pot permetre que els quatre que es dediquen a legislar i repartir el pastís decideixin per totes. La ciència és de i per totes. Sense ciència no hi ha futur.

I ara sí, agraïments. Començaré amb la família científica, els que hi han sigut, hi són o hi seguiran sent!

A la Núria Verdaguer per confiar en mi i fer-me un lloc al laboratori. I, sobretot, per deixar-me fer mil cursos i assistir a mil reunions que m'han permès créixer moltíssim a nivell científic.

Al Dieter Blaas i l'R-team (R de Rinovirus) per acollir-me de forma tan genial durant un mes al seu laboratori. Per ensenyar-me que tot laboratori hauria de tenir un calaix de les depressions ple de xocolatines.

A tota la gent de CRI pels: -això com ho feu?, -teniu aquest reactiu?, -qui ve al cool-off?, per tot!

Als CRI-2, als de quan vaig arribar un estiu amb 20 anys i als d'ara. A la Babi, per acompanyar-me a l'hospital el primer dia que em va conèixer i estar sempre disposada a donar un cop de mà. Al David, al Xavi, la Queri i la Mercè. A la Rosa per l'atenció constant a tot i la serenitat i a la Marieta per contagiar la seva alegria i tenir sempre un somriure preparat (amb crit incorporat;). Al Luca, el creador del millor pastís de formatge amb melmelada per sobre que he provat mai.

A les reines de les purificacions, la Jenny i la Isabel, per fer que els Akta semblin comprensibles.

Als CRI-7, per fer que compartir laboratori fos tota una aventura. Al Pablo Viejo per ser un forat negre de permanents i pels "Buenos días!" amb un somriure i salutació amb la mà. A la Cuppi per ser capaç de fer que parlis per ella només amb la seva presència ;). A l'Oskar-Alvarito perquè encara que breu va ser molt intens! A l'Arka, per tenir sempre bona disposició i sorprendre'm festa rera festa. A la Nere per ser dolçor inacabable. A l'Anna Rubio, per ser una fantàstica companya de viatge i una gran amiga. Tens un cor gegant!

CRI-6! CRI-SIS! Al Nuevo, pel treball colze a colze literal, per l'habilitat d'aconseguir pronunciar deu paraules en el temps d'una i per les seves sessions de punxa-discos amb "Fiesta científica". A la Cris (Rubia), per ser la incansable companya de SILVER i per tenir preparat sempre un vinga va! quan estàs desanimada. A Tito Jorg Pokémon, per fer sempre les preguntes adients i compartir tot el seu coneixement amb mi. A l'Arnau, per tenir la capacitat de trobar-se sempre en situacions inversemblants i aconseguir implicar-t'hi. Per la festa en silenci a Can Creueta! Al Diego per la fer que les "celulillas" es portessin bé. A la Cristinha per la seva curiosa forma de reivindicar desenganxant tiretes de la bioincubadora i per tot el suport durant aquests anys. A la Celdilla, per ser les meves mans a la poiata durant molt de temps i per l'optimisme i energia que feien d'un mal dia un dia millor.

Al Damià, per ser el meu gurú científic des de que era una estudiant de carrera. Per tot el que m'ha ensenyat al laboratori, però també al cau. Per les tardes prèvies a festes de Gràcia amenitzades amb la polca d'Ours i *Lollypop*. Per ser el germà gran que no he tingut mai.

I perquè el suport fora del laboratori és imprescindible.

Al Guillem, Maluta, per les divagacions sobre la distribució de les poblacions europees tot fent un cafè-tè després d'haver-me matxacat corrent amunt i avall del passeig marítim. Per amenitzar les sessions de boulder al Park Güell amb aquella ràdio cutre. Per haver-me infectat amb la passió per la ciència i per les birres dels *Crazy Fridays*. Perquè, sense saber ben bé perquè, estàs sempre present en el meu dia a dia i et trobo molt a faltar.

Als Bioguapos per la fantàstica aventura de buscar el lloc secret per tot arreu amb vosaltres: Marc, Laury, Romaní, Penny, Pao, Ernestu, Cla, Heleia, Anneta, Dra. Olalla, Amado i Arús. A la Txell, pels tres anys i mig de convivència, els seminaris al menjador i les trompetes de la mort!

A les nenes del Wézi per estar sempre a punt per una birreta, una birreta o una birreta. A la Mariale per fer del disseny una ciència i crear les enquestes més estranyes que he respost mai, a la Maria per la sensibilitat extrema i per estar sempre en tot, la Clara per fer de la "pajareria" un estil de vida amb èxit, l'Eus per la seva passió infinita, l'Anna per la capacitat de canviar de racional a irracional en un glop de birra, l'Ester per lez millorz abrazades amoroses i la Cate per compartir el seu clown amb mi. A la Neus, pels nous projectes que iniciés amb valentia. A la Gina, per fer-me veure que el verb "precipitar" té més significats que el que s'utilitza al laboratori.

Als Wézizos, Brancaires i Corkis d'Escoltes Catalans per compartir el dia a dia i creure, com jo, que educant transformarem la societat i aconseguirem un món millor.

A la família més Màlèfica del Coll: “Perquè som de la Malèfica del Coll!!! Del Coll, del Coll, del Coll, del Coll, del Coll. Hem vingut a cremar Gràcia i el resultat ens és igual!!!”

A les Trementinaires de Vallcarca, per obrir-me les portes del projecte de consum responsable i donar-me tota la energia, en sentit literal, per tirar endavant aquests anys de tesi. Al Gio i els del Palauet per Rieres i soparets. Al Noah i al Marc per compartir la creació de la cervesa més amarga de tot Vallcarca, i les que vindran...

Als pocavergonyes de Clown, per fer que sortir a l’escenari sempre sigui diferent i, sobretot, divertit.

A la família guitarrista, els actuals i els del passat, per infinitat d’assajos, concerts, viatges i sessions de manicura compartides durant 17 anys. A les “Quartetes”, Marta, Laia i Emilia, per la grandesa de guanyar un concurs i no anar a buscar el premi, entre altres “BridgetJonades” que tenim al currículum.

A la Montse i el Gabriel, per alimentar-me els dies d’escriptura a casa.

Als meus pares, Ramon i Maica per recolzar-me en tot, absolutament tot, el que he decidit fer. Per confiar en mi i estar al peu del canó en els moments més difícils. Al meu germanet Eloi per l’art d’aconseguir que m’esbronquessin i per moltes tardes jugant a imitar al *Tiranosaurus rex*.

Al Dani, per acollir amb alegria a casa la meva amant aquests últims mesos, la Tesi. Per tenir sempre alguna cosa *super*-interessant amb què distreure’m de l’escriptura. Sobretot per recolzar-me incondicionalment i aconseguir sempre que tot sigui més imprevisit i emocionant. Per decidir compartir-ho tot amb mi.

Aquesta tesi ha estat realitzada al Departament de Biologia Estructural de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona del CSIC (IBMB-CSIC) sota la direcció de la Dra. Núria Verdaguer. El finançament per realitzar-la ha estat una beca FI-DGR de la Generalitat de Catalunya.

ÍNDIX

1	INTRODUCCIÓ	17
1.1	La família <i>Picornaviridae</i>	18
1.1.1	El genoma dels picornavirus	18
1.1.2	Taxonomia de la família <i>Picornaviridae</i>	22
1.1.3	El Cocksackievirus B3	25
	<i>Figura 3. Micrografia electrònica del Cocksackievirus B4.</i>	25
1.1.4	El virus de l'encefalomiocarditis	26
1.1.5	El virus de l'Hepatitis A	27
1.2	Les proteïnes virals	29
1.2.1	Proteïnes estructurals	29
1.2.2	Proteïnes no estructurals	31
1.3	La proteïna 2B	33
1.4	Les polimerases virals	36
1.4.1	La catàlisi: el mecanisme dels dos ions	37
1.4.2	Les RNA polimerases dependents de RNA	39
1.4.3	Mecanismes d'iniciació de la síntesi d'ARN	48
	<i>De novo</i>	48
	<i>Iniciació dependent d'encebador</i>	50
1.4.4	La 3D ^{pol} i la teràpia antiviral	52
	<i>Figura 18. Formula estructural de la (a) guanosina, (b) l'adenosina i la (c) Ribavirina.</i>	54
2	OBJECTIUS	59
3	RESULTATS	63
3.1	Capítol 1: La proteïna 2B del virus de l'hepatitis A	67
3.1.1	Obtenció de la poliproteïna 2AB	69
3.1.2	Cristal·lització de la poliproteïna 2AB	69
3.1.3	Difracció de raigs X i resolució de l'estructura tridimensional	70

3.1.4	L'estructura tridimensional de la proteïna 2B.....	73
3.1.5	L'empaquetament cristal·lí: organització quaternària de la 2B ^{sol}	74
3.1.6	La 2B ^{sol} forma fibres tipus amiloide en solució.....	78
3.2	Capítol 2: El complex de la 3D^{pol} de CVB3 amb GPC-N114	83
3.2.1	Estudi de l'activitat antiviral de GPC-N114 a CBV3	83
3.2.2	Cristal·lització del complex de la 3D ^{pol} amb GPC-N114.....	84
3.2.3	Difracció de raigs X i resolució de l'estructura tridimensional.....	85
3.2.4	El GPC-N114 competeix amb el dúplex motlle-encebador	88
3.3	Capítol 3: LA 3D^{pol} d'EMCV i els mutants de resistència A GPC-N114: M300V i I304V	93
3.3.1	Activitat de la 3D ^{pol} recombinant <i>in vitro</i>	93
3.3.2	Inhibició de la 3D ^{pol} de EMCV pel GPC-N114	94
3.3.3	Cristal·lització de la 3D ^{pol} d'EMCV	96
3.3.4	Difracció de raigs X i resolució de l'estructura tridimensional.....	97
3.3.5	L'estructura de la 3D ^{pol} d'EMCV	98
3.3.6	Avaluació de l'estabilitat del motiu A en les conformacions estàndard i alterada.....	104
3.3.7	Cristal·lització i resolució de l'estructura tridimensional de les 3D ^{pol} mutants d'EMCV M300V i I304V	106
3.3.8	Les estructures dels mutants de la 3D ^{pol} d'EMCV M300V i I304V	107
3.4	Capítol 4: El mutant S299T de la 3D^{pol} de CVB3	113
3.4.1	Cristal·lització i resolució de l'estructura tridimensional de la 3D ^{pol} S299T.....	113
3.4.2	Estudis d'activitat de la 3D ^{pol} de CVB3 i els mutants S299T i S299A	116
3.4.3	Cristal·lització i resolució de l'estructura del mutant S298T de la 3D ^{pol} de PV	118
3.4.1	Anàlisi de l'entorn del residu 299 de CVB3	120
3.4.2	Estructura del mutant S298T a la 3D ^{pol} de PV	121
4	DISCUSSIÓ.....	123
4.1	La 2B de HAV	125
4.1.1	Relació evolutiva dels gèneres enterovirus i hepatovirus.....	125
4.1.2	Rol de les fibres de 2B en la reorganització de membranes cel·lulars.	127
4.2	Les 3D^{pol} de CVB3 i EMCV.....	131
4.2.1	Primera 3D ^{pol} de cardiovirus: una nova conformació.....	131

4.2.2	Implicacions de l'estructura alterada del motiu A pel disseny de nous antivirals.....	137
4.2.3	El GPC-N114 s'uneix a la 3D ^{pol} de CVB3	138
4.2.4	La resistència a fàrmacs específics de la 3D ^{pol}	139
4.2.5	La resistència a amilorida de la 3D ^{pol} S299T de CVB3.....	141
5	CONCLUSIONS.....	143
6	MATERIALS I MÈTODES	147
6.1	Materials	149
6.1.1	Plàsmids.....	149
6.1.2	Soques <i>Escherichia coli</i>	150
6.2	Mètodes: la cristal·lografia de proteïnes.....	152
6.2.1	Obtenció de proteïna pura.....	152
6.2.1.1	Precipitació per Sulfat Amònic.....	153
6.2.1.2	Cromatografia d'afinitat.....	153
6.2.1.3	Cromatografia de bescanvi iònic.....	154
6.2.1.4	Cromatografia per exclusió molecular.....	154
6.2.1.5	Anàlisi electroforètic en condicions desnaturalitzants	155
6.2.2	Obtenció de les proteïnes de la tesi.....	155
6.2.2.1	La poliproteïna 2AB	155
6.2.2.2	La 3D ^{pol} de CVB3	158
6.2.2.3	La 3D ^{pol} d'EMCV	159
6.2.2.4	Les 3D ^{pol} M300V i I304V d'EMCV	161
6.2.2.5	La 3D ^{pol} S299T de CVB3.....	162
6.2.2.6	La 3D ^{pol} S298T de PV.....	162
6.2.3	Cristal·lització de la proteïna	163
	<i>Figura 59. Esquema de la gota asseguda en el mètode de difusió de vapor.</i>	<i>165</i>
6.2.4	Muntatge de cristalls i congelació.....	166
6.2.5	Difracció de raigs X.....	167
6.2.6	Recollida i processat de dades.....	169
6.2.7	Resolució de l'estructura tridimensional	171
6.2.7.1	Reemplaçament molecular	171
6.2.7.2	Dispersió anòmala simple.	172
6.2.8	Modelat, refinament i validació de l'estructura.....	174

6.3	Mètodes complementaris	175
6.3.1	Predicció d'hèlixs transmembrana	175
6.3.2	Alineament estructural de proteïnes	176
6.3.3	Assajos d'activitat de les 3Dpol i del GPC-N114	176
6.4	Taules de protocols específics	177
7	<i>ANNEX: PUBLICACIONS</i>.....	181
8	<i>REFERÈNCIES</i>.....	193
	<i>GLOSSARI</i>.....	221
	<i>NOMENCLATURA AMINOÀCIDS</i>	222

1 INTRODUCCIÓ

1.1 LA FAMÍLIA *PICORNAVIRIDAE*

La família Picornaviridae és una de les famílies de virus més antigues i diverses que existeix. Els picornavirus són virions icosaèdrics no embolcallats d'uns 30nm de diàmetre. El material genètic consisteix en una cadena senzilla de polaritat positiva d'àcid ribonucleic (ARN) d'aproximadament 7500 nucleòtids que uneix covalentment la proteïna VPg (*Viral Protein genome-linked*) a l'extrem 5' (Flanegan et al., 1977) i una cua poliadenilada a l'extrem 3'. Aquesta família inclou molts patògens humans i animals com el poliovirus, el virus del refredat comú, el virus de l'hepatitis A o el virus de la febre aftosa.

1.1.1 El genoma dels picornavirus

El genoma dels picornavirus consisteix en una cadena d'ARN simple, de polaritat positiva que és traduït directament a proteïna. La llargada d'aquest ARN oscil·la entre 7000 i 9000 nucleòtids i la seva estructura està molt conservada a tota la família. El genoma està flanquejat per dues regions no codificants (UTR) als dos extrems, 5' i 3'.

La UTR 5' pot presentar dos elements *cis* que permeten regular-ne l'expressió: un domini implicat en replicació (el *Coverleaf* en enterovirus (Larsen et al., 1981; Toyoda et al., 2007) i les *Stems* no ramificades en la resta (Brown et al., 1991; Duke et al., 1992; Ghazi et al., 1998; Le et al., 1993) i un IRES (*Internal Ribosome Entry Site*, llocs d'entrada interns dels ribosomes) necessari per la traducció, independent de la modificació *Cap*¹ (Figura 1). Tots els picornavirus contenen l'IRES, però n'hi ha quatre tipus segons les diferents estructures secundàries que dibuixen (revisat a Belsham 2009). Entre els dominis terminals de l'extrem 5' i l'inici de l'IRES hi ha un domini espaciador que conté regions riques en citosines implicades en la regulació de la replicació del virus: la mutació o deleció d'aquestes en poliovirus i mengovirus determinen la reducció o

¹ Durant la síntesi de l'ARN missatger (ARNm) un nucleòtid de guanina metilat s'afegeix a l'extrem 5'. Aquesta modificació és clau per al correcte reconeixement del l'ARNm pel ribosoma, la seva protecció de les 5' exonucleases, l'*splicing* i el transport.

eliminació de la replicació de l'ARN viral (Martin and Palmenberg, 1996; Toyoda et al., 2007) (Figura 1).

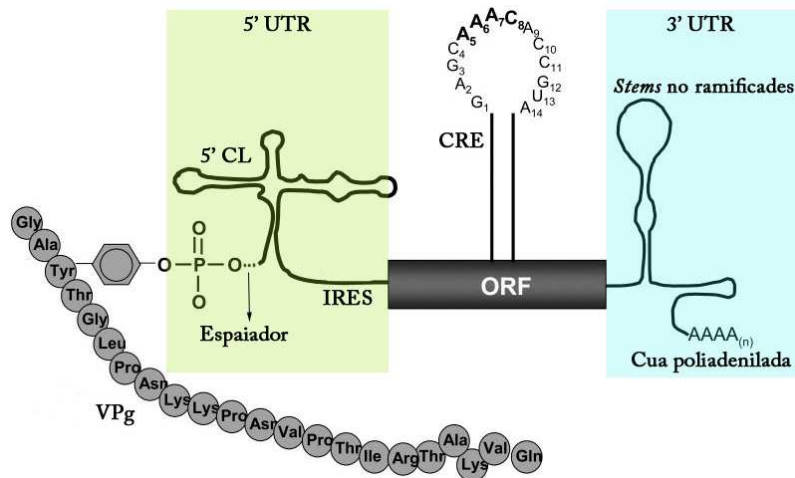


Figura 1. Esquema dels elements *cis* del genoma de poliovirus amb la VPg. On 5'CL és la *coverleaf*, el CRE és el *cis replication element* i ORF és la regió del marc obert de lectura.

D'altra banda, l'extrem 5' presenta al seu inici dos residus UU on es troba covalentment unida la VPg (Flanegan et al., 1977; Lee et al., 1977). La forma uridilada de la VPg (VPgpUpU_{OH}) funciona també com a encebador de la replicació (Crawford and Baltimore, 1983). L'extrem 3' inclou una regió no codificant i una cua poliadenilada d'entre 35 i 120 bases que forma *Stems* no ramificades i participa dels processos de replicació i traducció (Zoll et al., 2009).

Els CRE (*cis replication element*) són estructures d'ARN molt conservades localitzades en diferents regions del genoma dels picornavirus i formen un *hairpin* com a estructura secundària. Va ser descrit per primera vegada dins la regió codificant per la proteïna 1 de la càpsida (VP1) en el rinovirus humà de serotip 14 (McKnight and Lemon, 1998, 1996). Fins ara, s'han identificat elements CRE a sis gèneres i la seva localització varia en funció dels gèneres i alguna vegada també de l'espècie (Taula 1).

Espècie	Gènere	Localització CRE	Referències
Poliovirus	Enterovirus	Regió 2C	(Goodfellow et al., 2000; Paul et al., 2000)
Coxsackievirus	Enterovirus		
Rinovirus 14 Humà	Enterovirus	Regió VP1	(McKnight and Lemon, 1998)
Rinovirus 2 Humà	Enterovirus	Regió 2A	(Gerber et al., 2001)
	Cardiovirus	Regió VP2	(Lobert et al., 1999)
	Aftovirus	Regió 5' NTR	(Mason et al., 2002)
	Parechovirus	Regió VP0	(Al-Sunaidi et al., 2007)
	Hepatovirus	Regió 3D	(Yang et al., 2008)

Taula 1. Localització dels CREs identificats en diferents gèneres i espècies de picornavirus.

Malgrat els CREs són variables en longitud (14–23 residus), part del *loop* apical presenta una seqüència conservada en tots els picornavirus: AAAC; aquesta serveix com a motlle per la uridilació de la VPg: l'addició de dos uracils units covalentment per un enllaç fosfodièster al grup hidroxil de la tirosina 3 de la VPg donant lloc a la VPgpUpU_{OH}, encebador en la replicació (Paul et al., 2003, 2000; Steil and Barton, 2009).

El genoma conté un únic marc obert de lectura (ORF) que codifica per una poliproteïna de que és co- i post-traduccionament processada mitjançant proteases virals i, en alguns casos, de l'hoste per obtenir precursors i les proteïnes madures necessàries per la replicació del virus. La part codificant del genoma agrupa les proteïnes bàsicament en tres regions: la P1 que conté les proteïnes estructurals de la càpsida (VP1-VP4), P2 i P3 que contenen les proteïnes implicades en la replicació viral (2A-2C i 3A-3D) (Figura 2). En alguns gèneres, la poliproteïna comença amb un pèptid líder que té funcions en la seva maduració (Figura 2).

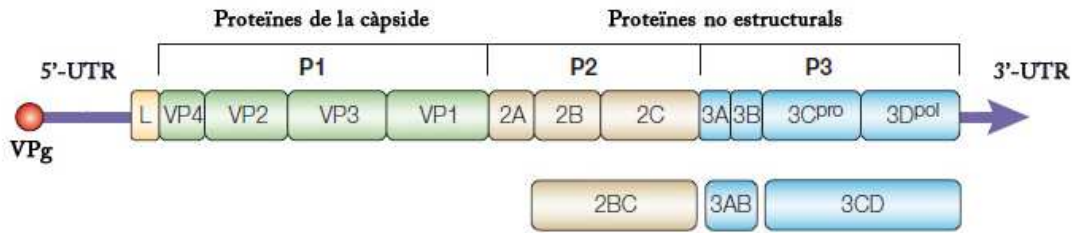


Figura 2. Esquema del genoma dels picornavirus. S'especifiquen les proteïnes madures (VP1-4, 2A-C, 3A-D i L) resultat del final de la proteòlisi de la poliproteïna dins la seva regió (P1-P3) i els tres intermediaris principals (2BC, 3AB i 3CD). Figura modificada de Whitton et al. 2005.

El processament de la poliproteïna és seqüencial. La primera divisió és cotraduccional i ràpida, resultant-ne la separació del domini de les proteïnes estructurals i no estructurals. En picornavirus existeixen tres mecanismes per dur-la a terme.

En el cas d'enterovirus i sembla que també en sapelovirus, la proteïna 2A és una proteasa que, al final de la seva síntesi, produeix un tall en el seu extrem N-terminal separant P1 de P2-P3. En ambdós casos es dona també un processament primari entre 2C i 3A mitjançant la proteasa 3C. En hepatovirus, la proteasa 3C s'encarrega del tall primari a l'extrem C-terminal de 2A (Harmon et al., 1992; Jia et al., 1993) i sembla que també podria ser així en parechovirus i kobuvirus.

En cardio-, tescho-, cosa-, seneca-, afto- i erbovirus la presència del motiu de seqüència NPGP (Asn-Pro-Gly-Pro) provoca un lliscament del ribosoma que impedeix la síntesi de l'aminoàcid d'unió entre 2A i 2B de manera que es separen durant la síntesi (Donnelly et al., 2001). En el cas d'aftovirus i erbovirus, la proteïna L és una proteïnasa que participa del processament primari del seu extrem C-terminal (Strebel and Beck, 1986).

Malgrat en alguns casos proteïnes de l'hoste i el polipèptid 3CD, precursor de la proteasa 3C, duen a terme alguna proteòlisi, la segona divisió és protagonitzada per la 3C que, un cop sintetitzada, processa tots els talls necessaris per a la obtenció de

intermediaris i proteïnes madures. En la última etapa de la formació del virió té lloc la divisió de maduració, on es talla la VP0 (VP4 VP2). És un estat molt difícil d'observar i sembla que pot estar potenciat per la unió d'ARN a l'estructura de la càpsida (Baltimore, 1968).

1.1.2 Taxonomia de la família *Picornaviridae*

L'adaptació constant dels virus a diferents entorns ha determinat que les eines utilitzades anteriorment per classificar els picornavirus com l'estabilitat segons el pH, l'especificitat d'hoste o de receptor hagin sigut substituïdes per les similituds filogenètiques i l'organització del genoma.

Segons el criteri del Grup d'Estudi de *Picornaviridae* dins el Comitè Internacional de Taxonomia de Virus s'estableixen diverses directrius per la classificació dels gèneres dins de la família:

- a. Els polipèptids Líder, 2A, 2B i 3A haurien de ser homòlogues entre els membres d'un mateix gènere.
- b. Els membres d'un mateix gènere haurien de tenir un IRES estructuralment homòleg. Si (a) es compleix, aquesta no té perquè complir-se. D'altra banda, membres de diferents gèneres poden compartir un mateix tipus d'IRES.
- c. Les regions del genoma P1, P2 i P3 haurien de ser filogenèticament properes entre els membres d'un mateix gènere, compartint una seqüència d'aminoàcids en >40%, >40% i >50%, respectivament.

Les espècies contenen diferents serotips o soques que haurien de compartir:

- a. Un rang limitat d'hostes i receptors cel·lulars.
- b. Un grau significatiu de compatibilitat en processament proteolític, replicació, encapsidació i recombinació genètica.
- c. Mapes genòmics idèntics a nivell fonamental.

Actualment, la família Picornaviridae està formada per 37 espècies agrupades en 17 gèneres (veure la Taula 1): *Aphthovirus* (4 espècies), *Aquamavirus* (1 espècie), *Avihepatovirus* (1 espècie), *Cardiovirus* (2 espècies), *Cosavirus* (1 espècie), *Dicpivirus* (1 espècie), *Enterovirus* (12 espècies), *Erbovirus* (1 espècie), *Hepatovirus* (1 espècie), *Kobuvirus* (3 espècies), *Megrivirus* (1 espècie), *Parechovirus* (2 espècies), *Salivirus* (1 espècie), *Sapelovirus* (3 espècies), *Senecavirus* (1 espècie), *Teschovirus* (1 espècie) i *Tremovirus* (1 espècie) (Adams et al., 2013).

Gènere	Espècie
<i>Aphthovirus</i>	<i>Virus de la Febre Aftosa</i>
	<i>Bovine rhinitis A virus</i>
	<i>Bovine rhinitis B virus</i>
	<i>Equine rhinitis A virus</i>
<i>Aquamavirus</i>	<i>Aquamavirus A</i>
<i>Cardiovirus</i>	<i>Virus de l'Encefalomiocarditis</i>
	<i>Theilovirus</i>
<i>Cosavirus</i>	<i>Cosavirus A</i>
<i>Dicipivirus</i>	<i>Cadivirus A</i>
<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus A</i>
	<i>Enterovirus B</i>
	<i>Enterovirus C</i>
	<i>Enterovirus D</i>
	<i>Enterovirus E</i>
	<i>Enterovirus F</i>
	<i>Enterovirus G</i>
	<i>Enterovirus H</i>
	<i>Enterovirus J</i>
	<i>Rinovirus A</i>
	<i>Rinovirus B</i>
	<i>Rinovirus C</i>
<i>Erbovirus</i>	<i>Virus de la rinitis equina B</i>
<i>Hepatovirus</i>	<i>Virus de l'Hepatitis A</i>
<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichivirus A</i>
	<i>Aichivirus B</i>
	<i>Aichivirus C</i>
<i>Megrivirus</i>	<i>Melegrivirus A</i>
<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus humà</i>
	<i>Virus Ljungan</i>
<i>Salivirus</i>	<i>Salivirus A</i>
<i>Sapelovirus</i>	<i>Sapelovirus porcí</i>
	<i>Sapelovirus simià</i>
	<i>Sapelovirus aviar</i>
<i>Senecavirus</i>	<i>Virus Seneca Valley</i>
<i>Teschovirus</i>	<i>Teschovirus porcí</i>
<i>Tremovirus</i>	<i>Virus de l'Encefalomièlitis Aviar</i>

Taula 2. Gèneres i espècies continguts en la família dels picornavirus segons l'última actualització de del Comitè Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV) a febrer de 2013.

En aquesta tesi s'han estudiat proteïnes de tres espècies diferents de picornavirus dins els gèneres enterovirus, cardiovirus i hepatovirus: el Coxsackievirus B3 (CVB3), el virus de l'encefalomiocarditis (EMCV) i el virus de l'hepatitis A (HAV), respectivament. 3D^{pol}

1.1.3 El Coxsackievirus B3

La ciutat de Coxsackie (Nova York) on, el 1948, es va aïllar el virus causant d'una paràlisi flàccida que era molt diferent als virus de la Polio va donar el nom als Coxsackievirus. Aviat se'n van identificar dos tipus segons a patogeneïtat: A i B (Crowell and Landau, 1997). Aquest virus es classifica dins el gènere enterovirus i la transmissió es dona bàsicament per via fecal-oral.

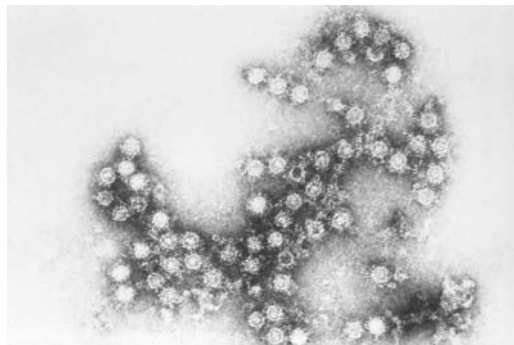


Figura 3. Micrografia electrònica del Coxsackievirus B4.

Clínicament no es manifesta com a una malaltia severa, però pot desencadenar en afectacions serioses del cor, pàncrees i sistema nerviós central, especialment en recent nascuts, infants i adults amb deficiències immunitàries (revisat a Esfandiarei and McManus, 2008). La infecció per CVB3 generalment desenvolupa una miocarditis aguda que pot esdevenir en malaltia crònica en un 10-20% dels casos (O'Connell et al., 1986). D'altra banda, CVB3 també pot induir pancreatitis (Mena et al., 2000) mitjançant la infecció de les cèl·lules acinars que presenten una elevada concentració dels seus receptors. A més, també pot desencadenar meningitis asèptica i hepatitis (Feuer et al., 2003; Wessely et al., 2001).

Actualment, el tractament de les infeccions per CVB3 és simptomàtic: antitèrmics per baixar la febre i remeis locals per les butllofes i irritacions de boca, mans i peus. En casos de miocarditis derivada de la infecció en que el dany és provocat per la lisi cel·lular vírica i la resposta immunitària, s'utilitzen diferents estratègies amb importants efectes secundaris: fàrmacs de baix pes molecular (pleconaril, ribavirina), interferó, anàlegs solubles del receptor o elements d'ARN inhibidors (Fechner et al., 2011). La raó bàsica per la qual no existeixen vacunes per prevenir les infeccions de CBV3 és el poc interès comercial ja que, a dia d'avui, generalment no es manifesta com una malaltia greu (Henke et al., 2003). No obstant, estudis sobre l'atenuació del virus ofereixen possibilitats pel desenvolupament de vacunes així com de la teràpia gènica (Bråve et al., 2007; Rolph and Ramshaw, 1997). Com poliovirus, CVB3 té característiques bones per a la seva consideració com a vector viral: es coneix tota la seqüència del genoma i no s'integra al de l'hoste, no hi ha risc de mutagènesi per inserció perquè no presenta un pas de doble cadena de ADN, pot replicar en cèl·lules que no es divideixen, es coneix molt bé la biologia molecular, receptors, cicle i creixement en teixits del virus i té un molt bon model animal (revisat a (Kim and Nam, 2011). Tot i així, la persistència de la infecció pel virus atenuat entre d'altres són inconvenients que cal sobreposar per ser bon candidat a teràpia viral (Kim et al., 2005).

1.1.4 El virus de l'encefalomiocarditis

El virus de l'encefalomiocarditis (EMCV) es classifica dins el gènere *cardiovirus* i va ser aïllat per primera vegada l'any 1945 a Miami d'un orangutan en captivitat que va morir sobtadament per un edema pulmonar i miocarditis (Helwig and Schmidt, 1945). El 1948, al districte de Mengo de la ciutat d'Entebbe a Uganda, es va aïllar el mengovirus d'un macaco que presentava paràlisi a les potes de darrere. Estudis antigènics indicaren que EMCV i mengovirus formaven part de la mateixa espècie.

El virus EMCV s'ha detectat a moltes regions de tot el món: Europa (Maurice et al., 2005), Canadà (Dea et al., 1991), Amèrica del Sud (Czechowicz et al., 2011), Austràlia (Reddacliff et al., 1997), Corea (An et al., 2009) o la Xina (Ge et al., 2010). El virus pot

infectar un rang ampli d'animals, però el seu reservori natural són rosegadors (ratolins o rates) i pot ser que aquests participin en la propagació del virus (Spyrou et al., 2004). Infeccions en humans han sigut detectades (Oberste et al., 2009), però és probable que moltes hagin sigut asimptomàtiques o no diagnosticades (Tesh, 1978).

La transmissió de EMCV es dona per la ingestió de menjar o aigua contaminats pel virus o d'animals morts que havien estat malalts (Gainer, 1967). Els símptomes i el desenvolupament de la malaltia són específics de la soca infectiva i venen determinats per l'espècie animal infectada i el sexe i l'edat de l'individu. En primats no humans generalment impliquen congestió pulmonar o edema amb fallada cardíaca i la mort i en porcs es provoca una miocarditis amb mort sobtada. En rosegadors pot ser asimptomàtica, però en ratolins normalment provoca encefalitis, paràlisi d'extremitats, miocarditis o diabetis tipus 1 (revisat a Carocci & Bakkali-Kassimi 2012).

Aquest virus utilitza les proteïnes L i 2A com a essencials per determinar l'espectre d'hostes i la virulència del virus (Agol and Gmyl, 2010; Paul and Michiels, 2006; Zhu et al., 2011). Tot i que EMCV actualment no representa un problema mèdic greu en humans, cal tenir-lo en compte degut al seu ampli espectre d'hostes i a la utilització de cors de porc per xenotrasplantaments.

1.1.5 El virus de l'Hepatitis A

El 1912 es va reconèixer per primera vegada la naturalesa infecciosa del que es coneixia popularment per icterícia vírica (Cockayne, 1914). Després de la Segona Guerra Mundial, estudis diferenciaren dos tipus d'icterícia vírica segons temps d'incubació i via d'infecció (Havens, 1945). Fou als anys 40 quan es distingí entre Hepatitis A i B. El virus de l'Hepatitis A (HAV) va ser identificat per microscòpia electrònica en matèria fecal humana l'any 1973 (Feinstone et al., 1973). Tot i que la recerca per interès comercial va finalitzar amb la sortida de les vacunes als anys 90, encara resten molts aspectes del virus i la malaltia sense resoldre.

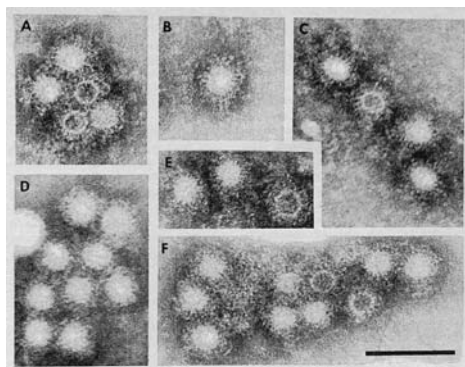


Figura 4. Fotografies de microscòpia electrònica del virus de l'Hepatitis A. Imatge extreta de Feinstone 1973.

El HAV es classifica dins el gènere hepatovirus i es transmet per ruta fecal-oral. Això implica que la prevalença de la infecció sigui desigual segons la regió, essent més comú en zones on les condicions higièniques i sanitàries són deficientes.

La manifestació del virus és una hepatitis aguda que pot anar acompanyada de nàusees, pèrdua de gana, febre, dolor abdominal, coloració fosca de la orina i icterícia (Lemon, 1985). Els infants poden presentar una hepatitis A asimptomàtica. Malgrat la majoria de casos són resolts en unes setmanes, una proporció petita de les infeccions resulta en una fallada hepàtica que pot ser fatal si no es realitza un transplantament. La baixa mortalitat de l'hepatitis A no implica que no sigui una malaltia severa: pot requerir atenció hospitalària durant dies o setmanes i absentisme laboral o escolar de setmanes a mesos de durada. Així, els costos mèdics i de producció laboral són elevats.

El virus HAV es caracteritza per una baixa taxa de replicació en cultius cel·lulars i, a diferència de la resta de picornavirus, provoca infeccions persistents sense induir efectes citopàtics. Tampoc sembla que generi grans canvis en la ultraestructura cel·lular excepte una acumulació citoplasmàtica de membranes al voltant de la zona de replicació de virus vista en cultius cel·lulars (Gosert et al., 2000; N. Teterina et al., 1997). Diferents hipòtesis puntualitzen la sortida del virus a l'exterior de la cèl·lula sense lisi a través de la membrana apical o basolateral (Blank et al., 2000; Snooks et al., 2008).

La baixa taxa de replicació de HAV està relacionada amb la ineficiència de l'IRES i amb un ús deoptimitzat dels codons (Pintó et al., 2007; Whetter et al., 1994). Aquesta estratègia consisteix en un ús abundant de codons rars que implica un creixement quiescent i sembla jugar un paper en l'evasió de les defenses de la cèl·lula hoste. D'altra banda, la baixa taxa de replicació també podria tenir un paper en el plegament correcte de les proteïnes del virus. Per exemple, la càpside de HAV presenta aglomeracions de codons rars que semblen imprescindibles per una bona estabilitat de la càpside i, en definitiva, per la supervivència del virió (Aragonès et al., 2010, 2008; Sanchez et al., 2003). Respecte a l'IRES, s'ha vist que l'eficiència de replicació d'aquest en HAV és bastant més baixa que en el virus de l'encefalomiocarditis o el virus de la polio (Whetter et al., 1994).

1.2 LES PROTEÏNES VIRALS

1.2.1 Proteïnes estructurals

La càpsida icosaèdrica dels picornavirus està formada per 60 còpies de cada una de les proteïnes estructurals: VP1-VP4 (Putnak and Phillips, 1981). Aquestes proteïnes provenen del processament proteolític del precursor P1, codificat al terç N-terminal del genoma.

L'assemblatge de la càpsida s'inicia amb la formació de protòmers formats per VP0, VP1 i VP3. Seguidament, cinc protòmers s'uneixen per formar un pentàmer i dotze d'aquests s'assemblen per formar el virió immadur (Putnak and Phillips, 1981) (Figura 5). En tots els picornavirus la maduració del virió es produeix amb el processament del precursor VP0 en VP2 i VP4, excepte en els kobuvirus i parechovirus (Hyypiä et al., 1992; Reuter et al., 2011; Stanway et al., 1994).

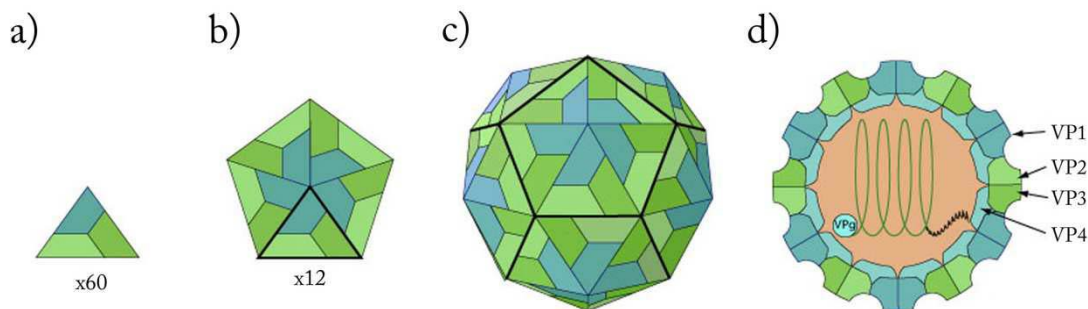


Figura 5. Esquema de les càpsides de picornavirus. (a) Protòmer: unitat de repetició de la càpside. (b) Pentàmer format per cinc protòmers. (c) Càpside icosaèdrica amb simetria pseudo T3 formada per 12 pentàmers. (d) Tall sagital de la càpsida on s'especifiquen les proteïnes que la formen. Imatges extretes de *Swiss Institute of Bioinformatics*.

L'organització d'aquestes proteïnes en el viriò determina diferents propietats de reconeixement als virus. La proteïna VP1 en rinovirus presenta un *loop* molt prominent que deixa un fossar envoltant l'eix quinari poc accessible pels anticossos, al qual se l'anomena *canyó* i s'ha proposat com al lloc d'unió a receptor (Rossmann et al., 1985). En altres membres de la família com cardiovirus, el *canyó* no és continu, però també presenta parts enfonsades (Luo et al., 1987); FMDV, però, té una superfície llisa (Acharya et al., 1989). Tot i així, segueix sent un *loop* de la VP1 exposat a la superfície qui desenvolupa la funció de reconeixement i unió al receptor (Mason et al., 1994).

Els *loops* de la VP1 exposats a la superfície són reconeguts pels anticossos i, per tant, contenen mutacions d'escapament que permeten al virus evadir la resposta immune de l'hoste. Estudis estructurals i funcionals en enterovirus i també en FMDV han demostrat que aquestes mutacions d'escapament es localitzen en determinats residus que no comprometen l'estructura o funcions biològiques de la càpsida (Lea et al., 1994; Mateu et al., 1994; Smith et al., 1993).

La càpsida dels picornavirus presenta un equilibri d'estabilitat i flexibilitat que permet protegir el material genètic i, alhora, alliberar-lo quan és necessari. Un element important en la regulació de l'estabilitat de la càpsida és el *Pocket*, cavitat hidrofòbica de

la proteïna VP1, ocupada per lípids endògens (*Pocket Factor*) en el cas d'enterovirus (Fry et al., 2003; Hogle et al., 1985; Oliveira et al., 1993) o per voluminoses cadenes laterals en afto- i cardiovirus (Fry et al., 1991). Dels primers antivirals proposats contra els picornavirus van ser inhibidors hidrofòbics que s'unien al pocket factor desplaçant lligands naturals i afectant l'estabilitat de la càpsida, com els derivats del pleconaril, per exemple els WIN (Badger et al., 1988; Smith et al., 1986). Així, mutacions en aquesta cavitat sovint comporten l'aparició de soques resistents de virus a aquest tipus de fàrmacs (Shepard et al., 1993).

1.2.2 Proteïnes no estructurals

Les proteïnes no estructurals són les responsables de totes les funcions que permeten la replicació viral: la maduració de les proteïnes, la transcripció i replicació de l'ARN genòmic i la creació d'un entorn idoni per a que aquesta es dugui a terme. Aquest treball es centra en dues d'aquestes proteïnes, la 2B i la 3D, que seran tractades en més profunditat en propers apartats de la introducció.

S'ha designat com a proteïna L (leader) qualsevol proteïna codificada entre l'extrem 5' de l'ORF i l'inici de la regió P1. No és present a tots els picornavirus i la seva funció depèn del gènere. Els aftovirus i els erbovirus són *papain-like cystein proteïnases* (Gorbalenya et al., 1991; Guarné et al., 1998). En cardiovirus, la proteïna L presenta un domini d'unió a zinc i participa de la regulació de la traducció (Dvorak et al., 2001), la fosforilació de nucleoporines (Porter and Palmenberg, 2009) i la inhibició de la síntesi d'interferó (Hato et al., 2007; Zoll et al., 2002). Altres 5 gèneres presenten la proteïna L, però no se'n coneix la seva funció.

La proteïna 2A és bastant variable en seqüència, longitud i funció entre els picornavirus. En enterovirus, la 2A actua com a proteasa tallant entre P1-2A i proteïnes cel·lulars, inactivant-les durant la infecció, com el factor eucariòtic d'iniciació de la traducció 4G (eIF-4G), l'encarregat de reconèixer l'ARN missatger cel·lular amb *Cap* (Schlick et al., 2002; Svitkin et al., 1999). La 2A dels afto-, cardio-, erbo-, tescho- i senecavirus

INTRODUCCIÓ

presenta el motiu NPGP que permet la separació de P1-2A pel sistema de lliscament descrit a l'apartat 1.1.1. No obstant, la 2A de cardiovirus és més llarga i té una seqüència consens conservada de localització nuclear idèntica a la de proteïnes ribosomals de llevat (G/P-K/R₃-X₁₋₄-G/P, Stuger et al. 2000), participa en la unió de ARN ribosomal i la inhibició de la traducció cel·lular dependent de *Cap* (Aminev et al., 2003; Groppo and Palmenberg, 2007). En hepatovirus, la proteïna 2A no és proteasa i els seus aminoàcids queden ancorats a la proteïna VP1 de la càpsida (Cristina and Costa-Mattioli, 2007).

La proteïna 2C, així com el seu precursor 2BC, està implicada en la producció d'estructures vesiculars membranoses on té lloc la replicació (Cho et al., 1994). La 2C té activitat ATPasa (Mirzayan and Wimmer, 1994) i uneix ARN (Rodriguez and Carrasco, 1995). Tot i que el seu paper en la replicació viral no està clar, sembla que necessita oligomeritzar formant anells de 5 a 8 monòmers per ser activa (Adams et al., 2009).

La proteïna 3A té una mida petita, variable segons el virus, i conté una seqüència transmembrana; juntament amb el seu precursor 3AB juguen diferents rols durant el cicle viral. La 3A es troba al complex membranós citoplasmàtic on es duu a terme la replicació (Towner et al., 1996; Wessels et al., 2006); en poliovirus, presenta la forma 3AB orientant correctament la 3B (VPg) per permetre la iniciació de la replicació (Paul et al., 1998). Es proposa com a co-factor per a la polimerasa 3D i la unió de 3CD a les estructures *stem* en la replicació (Lama et al., 1994; Molla et al., 1994). També s'ha vist que pot inhibir el tràfic de proteïnes del reticle endoplasmàtic i el Golgi, però és una característica limitada a Coxsackievirus B3 i poliovirus (HEV-C) (Choe et al., 2005). Finalment, s'ha vist que pot estar implicada en l'afectació de l'autofàgia cel·lular per reclutar membranes en alguns virus (Choe et al., 2005).

La proteïna 3B o VPg és petita (20-23 aminoàcids). Està unida covalentment a l'extrem 5' del genoma via l'oxigen de la cadena lateral de la tirosina 3 de la VPg amb el fosfat alfa de la uridina terminal de l'extrem 5' del RNA (Palmenberg et al., 1984). La VPg uridilada actua com a encebador de la replicació.

La proteïna 3C té una longitud entre 180 i 220 aminoàcids i és una proteasa que s'encarrega de la majoria de processaments en la cascada proteolítica. En alguns picornavirus, com el virus de l'hepatitis A (HAV) o el virus de l'encefalomiocarditis (EMCV), és la única proteasa viral encarregada del processament (Harmon et al., 1992). Els precursors 3ABC i 3CD també actuen com a proteases (Parks et al., 1989). Al seu torn, el precursor 3CD participa de la preparació del genoma per la síntesi de l'RNA de cadena negativa (Walter et al., 2002) i uneix el CRE, el motlle per la uridilació de la VPg (Pathak et al., 2008).

1.3 LA PROTEÏNA 2B

La proteïna 2B té longituds molt diferents entre els picornavirus, de 98 a 251 aminoàcids. La seva funció és també variable i en alguns casos encara no s'ha aclarit del tot, com en el cas del virus de l'hepatitis A (HAV).

La proteïna 2B resulta del processament del precursor 2BC durant la cascada proteolítica. Aquest precursor s'ha vist implicat en reorganització de membranes produint estructures vesiculars on la replicació viral té lloc (Cho et al., 1994). En enterovirus, la proteïna 2B presenta dues regions hidrofòbiques: HR1 i HR2 (Figura 6). La HR1, segons la distribució d'aminoàcids, és una putativa α -hèlix amfipàtica que conté residus hidrofòbics en una cara i residus hidrofílics a l'altra (van Kuppeveld et al., 1996). Els resultats d'estudis de mutagènesi, bioquímics i de doble híbrid o FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) suggereixen la formació de porus mitjançant l'associació de diverses 2B que adopten una conformació hèlix-*loop*-hèlix, en que les dues travessen la membrana, com indica la figura 6 (Agirre et al., 2002; Cuconati et al., 1998; de Jong et al., 2003, 2002; van Kuppeveld et al., 2002).

INTRODUCCIÓ

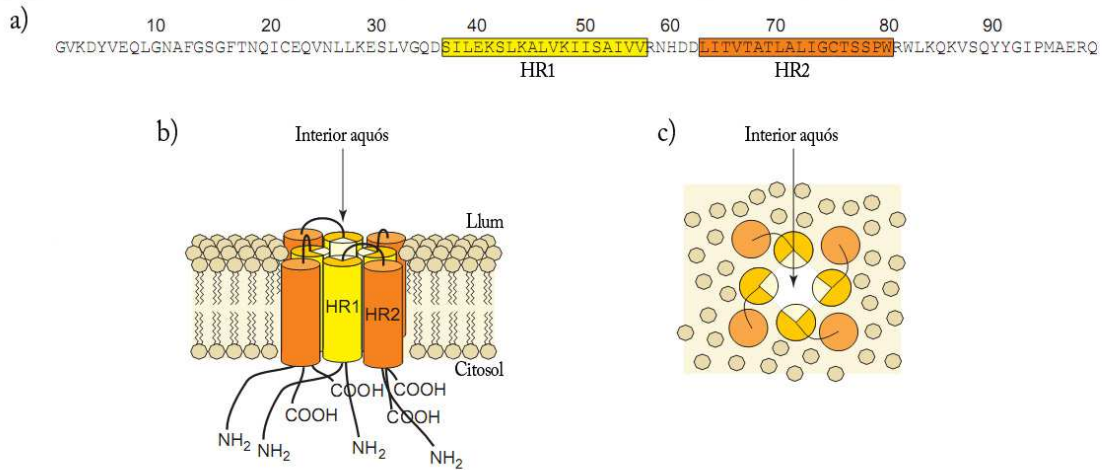


Figura 6. Formació de porus per la 2B. (a) Seqüència aminoacídica de la 2B de Coxsackievirus. Les regions HR1 i HR2 hi són assenyalades. (b) Visió lateral i (c) apical.

Diversos estudis han determinat la seva localització a l'aparell de Golgi i reticle endoplasmàtic impeding el tràfic de proteïnes i afectant la permeabilitat de les membranes d'aquests elements, alterant les concentracions d'ió Ca^{2+} (de Jong et al., 2008; van Kuppeveld et al., 1997). Una infecció per enterovirus pot comportar una disminució de la concentració d'ions Ca^{2+} al reticle endoplasmàtic i el Golgi d'un 40% aproximadament i un augment de la concentració d'aquest ió al citosol (Aldabe et al., 1997; de Jong et al., 2008; van Kuppeveld et al., 1997). La transferència de ions Ca^{2+} del reticle endoplasmàtic al mitocondri juga un paper molt important en l'apoptosi (Boehning et al., 2003): l'augment de la concentració d'ions calci al mitocondri resulta en l'aparició de factors cel·lulars pro-apoptòtics. La baixa concentració de Ca^{2+} al reticle endoplasmàtic provocada per l'expressió de 2B té un efecte anti-apoptòtic.

Les 2B dels aftovirus, els cardiovirus i els hepatovirus no presenten totes aquestes propietats i el seu rol biològic encara resta per determinar.

Tot i que el lloc de tall de la 3C^{pro} d'enterovirus es troba conservat en HAV, aquesta proteïna té una especificitat diferent en aquest virus canviant el lloc de tall entre 2A i 2B 144 residus cap a l'N-terminal (Gosert et al., 1996; Malcolm, 1995; Martin et al., 1995). Així, la proteïna 2B d'Hepatitis A és més llarga (251 aminoàcids) i la 2A més

curta (71 aminoàcids) del que s'havia predit inicialment segons el model de processament de poliproteïna d'enterovirus.

Experiments de microscòpia electrònica han permès observar el fenomen d'alteració de membranes en cèl·lules infectades per diferents soques del virus i la localització de la proteïna 2B en les membranes alterades (Gosert et al., 2000; N. Teterina et al., 1997) (Figura 7).

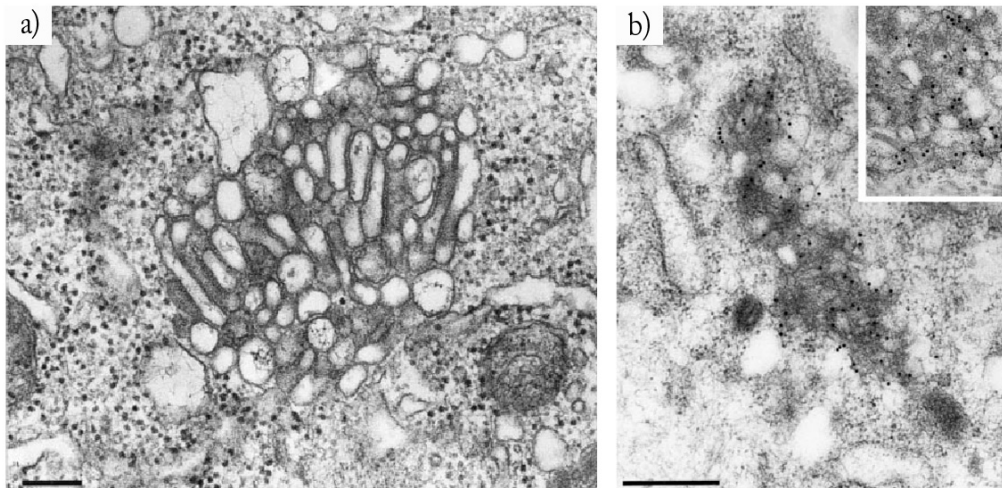


Figura 7. Imatges de microscòpia electrònica de cèl·lules de ronyó de fetus de *Macaca mulatta* (FRhK-4) infectades amb la soca HM175/24a de HAV. Es pot observar la formació de vesícules tubulars allargades formant una xarxa (a) i una magnificació (b) on s'observa la co-localització de la proteïna 2B amb la xarxa de membranes reorganitzades.

Figura modificada de Gosert et al. 2000.

En HAV s'ha vist que la 2B és capaç d'inhibir la síntesi d'interferó β (IFN- β) mitjançant la interferència de l'activació del seu factor regulador 3 (IRF-3) (Paulmann et al., 2008). La via d'activació d'aquest factor regulador implica els receptors RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) i MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*), que regulen l'activitat de les encarregades de l'activació de l'IRF-3: la quinasa TBK1 (*TANK binding kinase*) i la quinasa IKK ϵ , que inhibeix el factor nuclear NF- κ B (Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003). La proteïna de senyalització antiviral (MAVS), localitzada a la membrana del mitocondri, s'encarrega de reclutar els receptors i el seu substrat, les

quinases (Kawai et al., 2005; Seth et al., 2005). La 2B, mitjançant el seu efecte de reorganització de membranes, podria interferir la dinàmica xarxa de membranes mitocondrials tot impeding el correcte funcionament de MAVS (Chan, 2006).

1.4 LES POLIMERASES VIRALS

Les polimerases són enzims indispensables durant el cicle viral per la producció d'ARN missatger traduïble a proteïna i per la generació de còpies idèntiques del genoma per la formació de nous virus. Una cadena polinucleotídica amb un patró de seqüència determinat serveix com a motlle a la polimerasa durant la catàlisi de formació d'enllaços fosfodièster entre un nucleòtid que s'afegeix a una nova cadena polinucleotídica i el nucleòtid que es troba a l'extrem d'unió d'aquesta.

Les polimerases es classifiquen segons el tipus de nucleòtids que addicionen i el tipus de cadena motlle, segons si és d'àcid ribonucleic (ARN) o d'àcid desoxiribonucleic (ADN). Així, trobem les ARN polimerases dependents d'ARN (RdRp), les ARN polimerases dependents d'ADN (DdRp), les ADN polimerases dependents d'ARN (RdDp) i les ADN polimerases dependents d'ADN (DdDp). Malgrat difereixen en el tipus de substrat i de motlle, totes presenten una estructura molt similar que recorda a una mà dreta on s'hi diferencien els subdominis dels dits, el palmell i el polze.

La forma de mà dreta va ser definida arrel de la resolució del fragment Klenow de la DdDp I d'*Escherichia coli* (Ollis et al., 1985) (Figura 8). Les següents estructures resoltes amb dominis polimerasa, com la transcriptasa reversa del virus de la immunodeficiència humana 1 (Kohlstaedt et al., 1992), la RdDp del fag T7 (Sousa et al., 1993) o la RdRp de poliovirus (Hansen et al., 1997), presentaven la mateixa estructura de mà dreta i els corresponents subdominis. Aquesta estructura permet definir una cavitat central, un entorn adient pel correcte posicionament d'ions i substrats on dur a terme la catàlisi de la reacció d'addició de nucleòtids. A més, els 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'encebador. El subdomini dels dits uneix la cadena senzilla de motlle fins al centre actiu i el polze interacciona amb la doble cadena motlle-encebador a partir del lloc de síntesi (Joyce and Steitz, 1995).

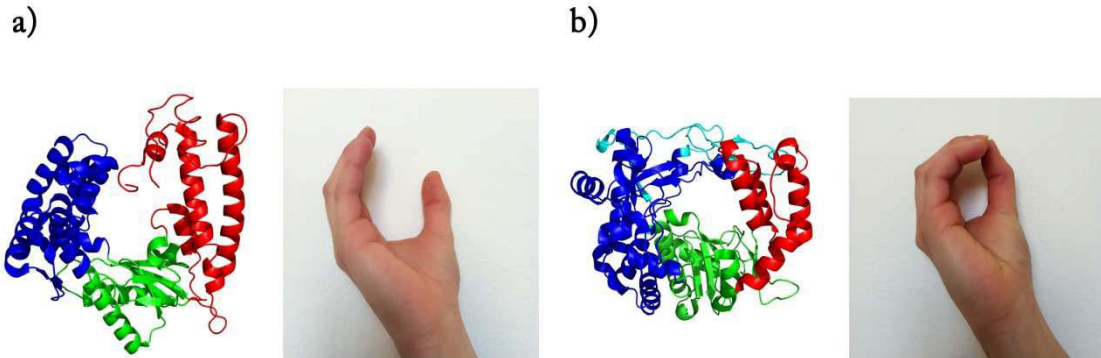


Figura 8. Estructura global de les polimerases. (a) Fragment Klenow de l'ADN polimerasa d'Escherichia coli (1DPI) i representació fotogràfica e la mà dreta oberta (b) ARN polimerasa de poliovirus (1RDR) i representació fotogràfica de la mà dreta tancada.

1.4.1 La catàlisi: el mecanisme dels dos ions

Evolutivament, l'habilitat de replicar el genoma acuradament per assegurar la transmissió de la informació genètica esdevingué un fet necessari des de temps ancestrals. Aquesta premissa portà a pensar que la reacció que duen a terme les polimerases hauria de ser catalitzada per un mecanisme universal i relativament senzill.

El 1993, Steitz definí el mecanisme dels dos ions metàl·lics (Steitz and Steitz, 1993) en base als resultats estructurals que obtingueren dels complexos del domini amb activitat 3'-5' exonucleasa de la DdDp I amb una cadena senzilla d'ADN o el producte de cadena doble (Beese and Steitz, 1991; Freemont et al., 1988). Aquest mecanisme de catàlisi és general per a totes les polimerases donada l'elevada conservació dels motius estructurals entre elles.

El mecanisme dels dos ions metàl·lics requereix la presència de dos residus carboxílics (aspàrtics en les polimerases) que ancoren dos ions metàl·lics divalents (ió A i ió B). El

INTRODUCCIÓ

nucleòtid trifosfat (NTP) entra al centre actiu juntament un catió divalent (l'ió B). Aquest ió està coordinat amb els fosfats α -, β - i γ - del nucleòtid i amb un residu carboxílic i molècules d'aigua. L'ió B permet la orientació del NTP cap al centre actiu i la neutralització de la càrrega durant la catàlisi. Una vegada el NTP està ben situat, l'ió A es coordina amb el 3'-OH, el fosfat α - i els dos residus carboxílics, dos àcids aspàrtics en picornavirus (Figura 9). Aquest ió s'encarrega de disminuir el pK_a del 3'-OH facilitant la seva desprotonació a un pH fisiològic provocant l'atac al fosfat α - del nucleòtid. Tal com s'ha vist en la polimerasa d'ADN η humana, només en el moment en què els dos ions estan units i el nucleòtid posicionat, una molècula d'aigua transitoria catalitza la desprotonació del 3'-OH (Nakamura et al., 2012). L'ió B facilita la sortida del grup pirofosfat generat en la reacció i protonat per part d'un aminoàcid bàsic del centre actiu, la qual cosa augmenta amb escreix l'eficiència de la reacció (Castro et al., 2009). Un cop la reacció s'ha dut a terme, l'ARN rota fins que l'extrem 3' de l'encebador queda a la posició adient per tal que tingui lloc un altre cicle catalític (Brautigam and Steitz, 1998).

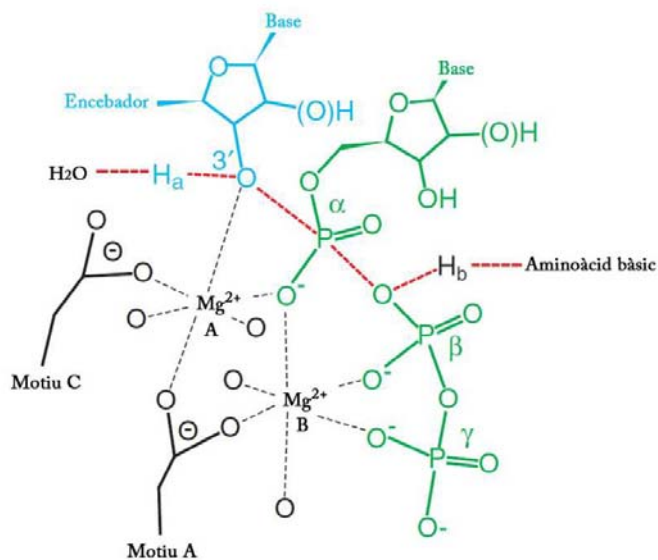


Figura 9. Esquema del mecanisme dels dos ions. Els dos ions divalents A i B estan coordinats amb els residus carboxílics dels motius A i C i amb els grups fosfats de l'encebador i el nucleòtid entrant. S'hi representen l'aminoàcid bàsic i la molècula d'aigua que hi participen.

S'ha postulat que la presència d'un tercer ió Mg^{2+} pot ser un fet general en totes les polimerases. Aquest ió estabilitza la transició durant la transferència de nucleòtids i facilita l'alliberació dels productes de la reacció (Nakamura et al., 2012)

1.4.2 Les RNA polimerases dependents de RNA

Els virus amb genoma RNA, que no tenen una fase amb DNA en el seu cicle, codifiquen per una RNA polimerasa dependent de RNA (RdRp) (Baltimore, 1971). Les RdRp són les encarregades de dur a terme la transcripció i replicació del genoma viral juntament amb altres proteïnes virals o de la cèl·lula hoste (Lai, 1998). La importància de la reacció que duen a terme aquests enzims probablement determina que les seves regions codificants siguin les més conservades entre els genomes virals (Koonin and Dolja, 1993).

La primera informació estructural sobre les RdRp va ser l'estructura parcial de la polimerasa 3D de Poliovirus (Hansen et al., 1997) i indicava que les RdRp compartien l'estructura global i els subdominis amb el fragment Klenow de la DdDp I d'*Escherichia coli* (Ollis et al., 1985). Des de llavors fins ara, s'han resolt les estructures de les RdRps d'almenys nou representats de virus amb ARN de cadena senzilla (Taula 3), però també RdRp de virus amb ARN de cadena doble com la del bacteriòfag $\Phi 6$ (Butcher et al., 2001); dels reovirus $\lambda 3$ (Tao et al., 2002) i rotavirus (Lu et al., 2008); les de dos membres de la família Birnaviridae: el virus de la bursitis infecciosa (Garriga et al., 2007) i el virus de la necrosi pancreàtica infecciosa (Graham et al., 2011).

INTRODUCCIÓ

Família	Virus	Referència
Flavivirus	Hepatitis C	(Ago et al., 1999; Bressanelli et al., 1999)
	Virus de la diarrea viral bovina	(Choi et al., 2004)
	Virus de l'Oest del Nil	(Malet et al., 2007)
	Virus del Dengue	(Yap et al., 2007)
Calicivirus	Virus de la malaltia hemorràgica dels conills	(Ng et al., 2002)
	Virus de Norwalk	(Ng et al., 2004)
	Sapovirus	(Fullerton et al., 2007)
	Norovirus	(Lee et al., 2011)
Picornavirus	Poliovirus	(Hansen et al., 1997; Thompson and Peersen, 2004)
	Virus de la febre aftosa	(Ferrer-Orta et al., 2004)
	Rinovirus humà	(Appleby et al., 2005; Love et al., 2004)
	Coxsackievirus B3	(Campagnola et al., 2008; Gruez et al., 2008)
	Enterovirus 71	(Wu et al., 2010)
Tetravirus		(Ferrero 2013, Tesi Doctoral)

Taula 3. Relació de la majoria virus d'ARN de cadena senzilla dels quals s'ha resolt l'estructura.

Les polimerases d'ADN i d'ARN presenten una estructura bàsica en comú, però les RdRp tenen més similitud entre elles que no amb la resta de polimerases. A nivell de seqüència, tot i ser de les regions genòmiques més conservades, presenten una baixa similitud en general excepte per certs motius conservats (Bruenn, 2003; Garriga et al., 2013).

La conformació de mà dreta tancada és la característica comuna més evident de les RdRp, en contraposició a la conformació de mà oberta o forma d'U que presenten les altres polimerases (Figura 8). El tancament és degut a la connexió que es dona entre un conjunt de *loops* que sobresurten del domini dels dits (anomenat puntes dels dits) i el polze. Aquesta unió permet encerclar el centre actiu de l'enzim, limitant un entorn recollit per catalitzar la reacció com es pot observar a la figura 10 (Ferrer-Orta et al. 2006a).

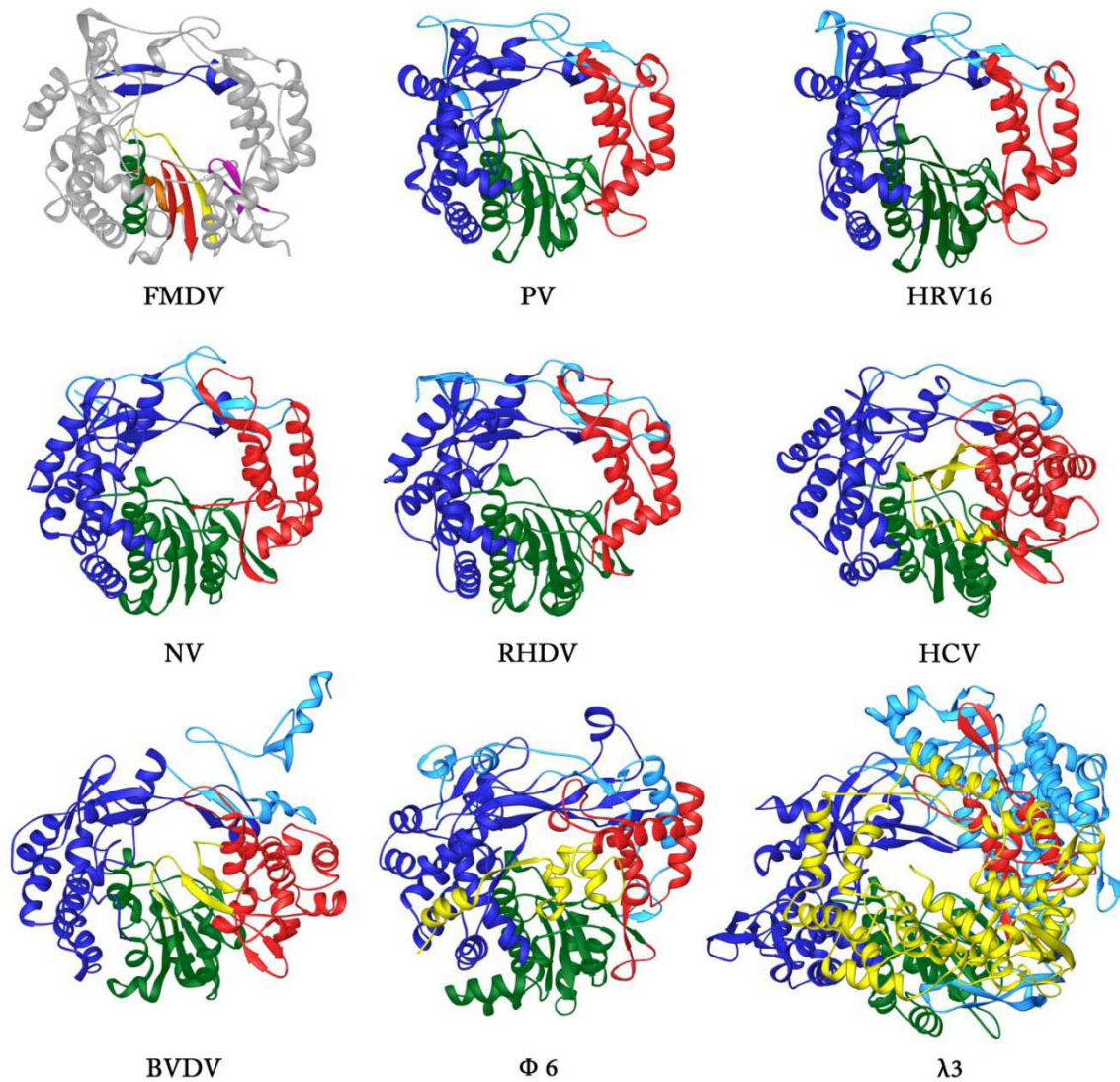


Figura 10. Polimerases d'ARN dependents d'ARN. Representació convencional de RdRps. L'estructura de FMDV, en gris, té els motius conservats representats en color: A (groc), B (verd), C (vermell), D (taronja), E (magenta), F (blau fosc). En la resta, es representen els subdominis de les polimerases: polze (vermell), palmell (verd), dits (blau fosc) i les puntes dels dits (blau cel). En groc es representen les protrusions C-terminals de les polimerases de HCV, BVDV, Φ6 i λ3. La polimerasa de λ3 és la més gran i té extensions N- i C-terminals extres que envolten els subdominis del polze, palmell i dits. Extret de Ferrer-Orta et al. 2006a.

INTRODUCCIÓ

En totes les RdRps s'han definit set motius estructurals conservats, anomenats de la A a la G (Figura 10). Aquests motius juguen papers molt importants en l'activitat de l'enzim: els motius A i B s'encarreguen del reconeixement i la unió dels nucleòtids trifosfat entrants (rNTP) i el motiu C, juntament amb el motiu A, contenen els àcids aspàrtics que coordinen els ions Mg^{2+} responsables de la catàlisi. El motiu D manté la integritat estructural del palmell on resideixen els dominis anteriors, però alhora presenta una flexibilitat que permet el tancament del complex catalític quan s'ha reclutat el nucleòtid correcte al centre actiu (Yang et al., 2012). El motiu E és el responsable de posicionar la cadena encebadora, l'F permet l'entrada i el posicionament dels rNTP i el G l'entrada de la cadena motlle.

La conformació que presenten les RdRps permet la formació de tres canals (Figura 11). El primer, més curt i carregat positivament, és el túnel d'entrada dels rNTP (Bressanelli et al., 1999) i, mitjançant interaccions seqüencials dels rNTP carregats negativament amb els residus bàsics, principalment del motiu F, arriben fins al centre actiu. També és el canal de sortida dels grups pirofosfat alliberats de la reacció.

El segon canal és ric en residus bàsics i s'estén des de la regió de la punta dels dits, a través el subdomini dels dits, fins al centre actiu com s'ha vist en l'estructura del complex d'iniciació de la RdRp de $\Phi 6$ (Butcher et al., 2001) i en els complexos de RdRps de picornavirus i calicivirus amb ARN (Ferrer-Orta et al., 2004; Gong et al., 2013; O'Farrell et al., 2003; Zamyatkin et al., 2008). A l'entrada d'aquest canal és on les RdRp presenten els mecanismes encarregats d'assegurar l'entrada de la cadena adequada i amb la orientació correcta cap al centre actiu de l'enzim (Butcher et al. 2001; revisat a Ferrer-Orta et al. 2006a). La cavitat central de la polimerasa també és un canal, on es duu a terme la catàlisi i pel qual en surt el producte, l'ARN de doble cadena.

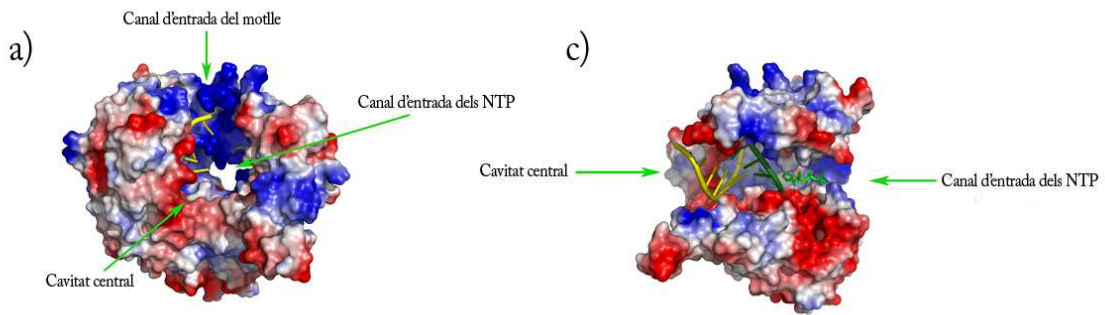


Figura 11. Els canals de les RdRp. Representació de la superfície de potencials de la RdRp de FMDV on es poden apreciar els canals d'entrada de l'ARN motlle i els NTPs i la cavitat central on es duu a terme la reacció d'addició nucleotídica. (a) Vista frontal. (b) Vista lateral, s'ha eliminat el polze per facilitar la visió.

L'ió emprat més freqüentment com a cofactor en els estudis de polimerització “in vitro” ha estat el Mg^{2+} ja que és el catió natural per les RdRps. No obstant, s'hi poden unir altres ions divalents com el Mn^{2+} . Moltes estructures cristal·lines s'han obtingut en presència de Mn^{2+} i algunes amb Ca^{2+} .

El Mn^{2+} estimula l'activitat de les RdRp (Bressanelli et al., 2002) i en facilita la iniciació (van Dijk et al., 2004), però en disminueix la capacitat selectiva dels rNTP i, per tant, la fidelitat de replicació. Aquesta situació és deguda a la capacitat que té el Mn^{2+} per unir fortament el motiu trifosfat del rNTP, estabilitzant el complex format per la polimerasa, la cadena motlle i el rNTP. Així, les interaccions que s'estableixen entre la base acceptora i el nucleòtid entrant no són necessàries perquè es dugui a terme la reacció (Castro et al., 2005). A més, s'ha descrit que la presència de Mn^{2+} al medi de replicació pot provocar una polimerització *de novo* en polimerases que, de normal, necessiten un encebador, com per exemple en poliovirus (van Dijk et al., 2004).

Al contrari, el Ca^{2+} inhibeix la síntesi d'ARN (van Dijk et al., 1995). L'estructura de la polimerasa del bacteriòfag $\Phi 6$ en complex amb Ca^{2+} mostra que un ió es col·locaria de la mateixa manera que un Mg^{2+} interaccionant amb el trifosfat del rNTP, però l'altre

INTRODUCCIÓ

estaria desplaçat distorsionant les interaccions que haurien de tenir lloc per al correcte funcionament del centre actiu (Salgado et al., 2004).

Així com les polimerases dependents d'ADN presenten reorganització de dominis segons si són actives o inactives, en les dependents d'ARN no s'hi han observat grans canvis estructurals.

La comparació de les estructures de la polimerasa d'ADN de *Thermus aquaticus* (Taq) (Kim et al., 1995) i la transcriptasa reversa del virus de immunodeficiència humana tipus I (HIV-RT) (Rodgers et al., 1995) en complex amb ADN motlle-encebador i amb nucleòtid entrant mostren grans canvis conformacionals al subdomini dels dits (Doublé et al., 1999). En concret, la part superior del subdomini dels dits en la Taq rota 46° en direcció al centre actiu en la conformació activa respecte la inactiva. En el cas de la HIV-RT aquest desplaçament és de 20° (Figura 12). En la conformació tancada es redueix considerablement l'espai al centre actiu assegurant l'entrada del nucleòtid correcte. Un cop incorporat, la polimerasa es tornarà a obrir per permetre el desplaçament del motlle i la incorporació d'un nou nucleòtid. La forma de mà dreta oberta de les polimerases d'ADN permet aquesta mobilitat, en canvi, la connexió dels subdominis dels dits i el polze en forma de mà dreta tancada a les polimerases d'ARN limita aquests canvis conformacionals.

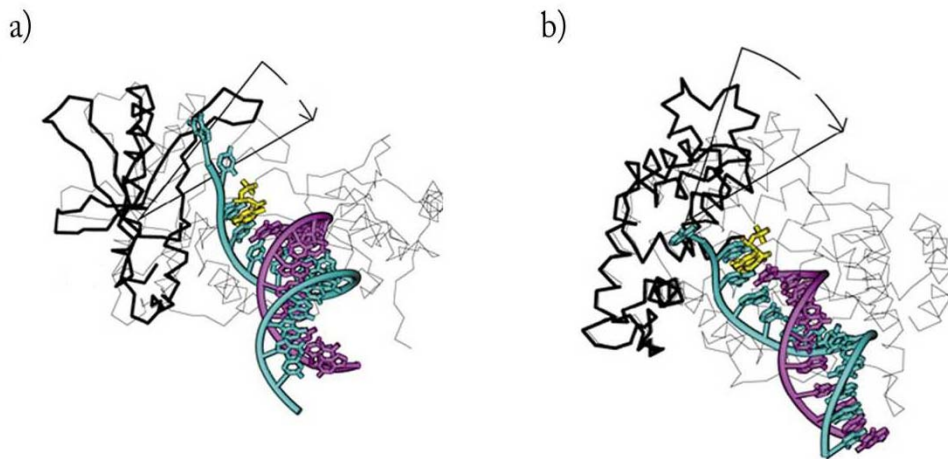


Figura 12. Comparació de les estructures actives i inactives de dues polimerases d'ADN. La (a) Retrotranscriptasa de HIV i la (b) polimerasa Taq amb la conformació activa (gris) i inactiva (negre). Extretes de Doublí et al. 1999.

Malgrat el moviment general de les RdRps està més limitat degut a la rigidesa conferida per les puntes del subdomini dels dits, en algunes polimerases s'ha pogut observar un moviment relatiu entre subdominis. Inicialment, la resolució de l'estructura de la RdRp del virus de la malaltia hemorràgica de conills (RHDV) permeté veure que, per superposició de dues conformacions presents a la unitat asimètrica del cristall, hi havia una rotació de 8° del subdomini del polze respecte al palmell i els dits entre les dues (Ng et al., 2002). Els autors postularen que la forma tancada seria activa degut a que la coordinació dels ions en aquesta conformació era l'adequada per la reacció d'addició nucleotídica. La comparació de dues formes cristal·lines de la $3D^{pol}$ de HCV mostrà que també hi havia una rotació de $7,5^\circ$ del subdomini del polze respecte al palmell i els dits (Biswal et al., 2005). Complexes amb inhibidors no anàlegs de nucleòtid només es formaren en la forma cristal·lina de la conformació tancada (activa) provocant, però, que l'estructura presentés la forma oberta (inactiva) (Biswal et al., 2005). No obstant, el moviment més destacat s'ha observat en la $3D^{pol}$ del virus de l'HCV comparant de les estructures cristal·lines de la forma apo de la $3D^{pol}$ i el complex de la $3D^{pol}$ amb motlle-encebador: 20° de rotació del polze respecte el dits. Aquest canvi conformacional es va

poder observar després de deletar un β -*hairpin* (residus 444-453) que bloqueja la cavitat central de la polimerasa estabilitzant el complex d'iniciació i impedit la sortida de l'ARN (Figura 13). Això facilita el desplaçament del polze i el desordre de la regió C-terminal ampliant la cavitat central deixant prou espai per la unió de l'ARN de cadena doble (Mosley et al., 2012).

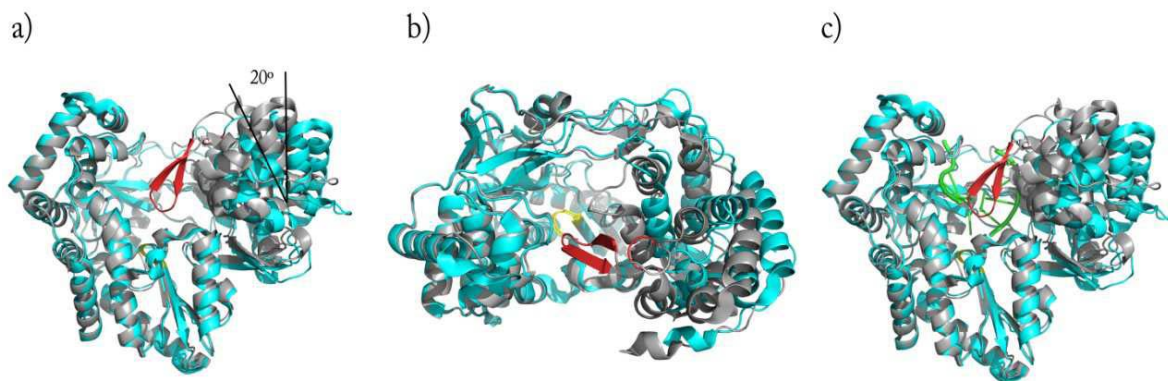


Figura 13. Comparació de les conformacions adoptades per la 3D^{pol} de HCV. (a) Vista frontal de la superposició dels dominis dels dits i el palmell de la 3D^{pol} apo (gris) i la 3D^{pol} Δ444-456 (turquesa). El *hairpin* deletat i la regió equivalent en la 3D^{pol} Δ444-456 es mostren en vermell. El motiu GDD del centre catalític es troba en groc. S'assenyala la desviació de 20° de la 3D^{pol} Δ444-456 respecte la 3D^{pol} apo. (b) Vista de dalt, gir de 90° en l'eix de les x respecte d'(a). (c) Vista frontal d'a amb el dúplex motlle-encebador (verd). Codis de la base de dades PDB: 2XXD (apo) i 4E7A (Δ444-456 en complex amb dúplex motlle-encebador).

En Poliovirus s'ha determinat que el tancament de la polimerasa ve donat per canvis estructurals subtils al palmell mitjançant un desplaçament del motiu A amb l'objectiu de col·locar l'aspàrtic A essencial per a la unió d'un dels ions metàl·lics (Gong and Peersen, 2010). En la conformació oberta, la fulla beta formada pels motius A i C estaria subtilment distorsionada (Figura 14). També s'ha vist, en comparacions de les 3D^{pol} de PV, CVB3 i FMDV en complexos d'elongació amb ARN i la seva forma sola, que presenten una conformació més oberta del canal central per acomodar l'ARN sortint del centre actiu (Gong et al., 2013).

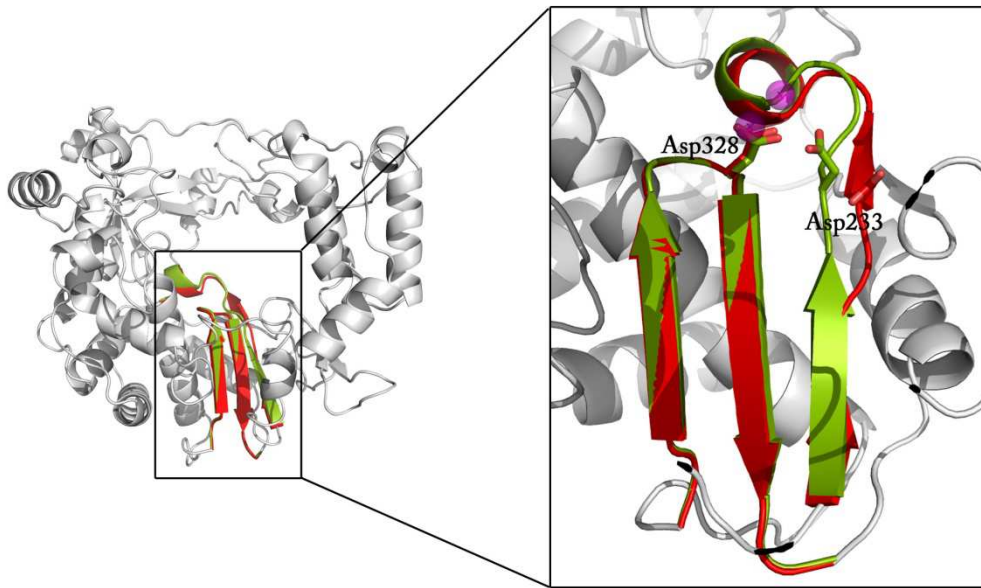


Figura 14. Comparació de les conformacions oberta i tancada de la polimerasa de PV. L'ampliació mostra en detall la desviació del motiu A en la conformació oberta (vermell) que impedeix la formació de la fulla beta a diferència de la conformació tancada (verd). S'assenyalen els ions divalents (esferes magenta) i els àcids aspàrtics que els coordinen: Asp328 (motiu C) i Asp 233 (motiu A).

Actualment, estudis de dinàmica molecular de quatre 3D^{pol} amb l'estructura resolta per cristal·lografia de raigs X de diferents picornavirus (Poliavirus, CVB3, rinovirus humà de serotip 16 i FMDV) han determinat que aquestes poden expandir-se i contraure's (Shen et al., 2012) i que la major flexibilitat es troba al domini dels dits i la menor al palmell (Moustafa et al., 2011) (Figura 15). Tot i que els motius altament conservats de les RdRps (A-G) intervenen en els canvis conformacionals, presenten diferents graus de mobilitat davant d'aquests. Així, els motius implicats en la unió de l'encebador, el motlle o els nucleòtids (A, D, E, F i G) són prou dinàmics. No obstant, els motius implicats en la unió dels ions divalents (regió del motiu A amb l'AspA, l'hèlix alfa del motiu B i el motiu C) semblen ser molt menys flexibles. S'observen també canvis conformacionals entre dominis que impliquen l'obertura i el tancament correlatiu del canal central i el d'entrada de nucleòtids de manera que es mobilitzarien els reactius i els productes de la reacció al centre actiu (Moustafa et al., 2011).

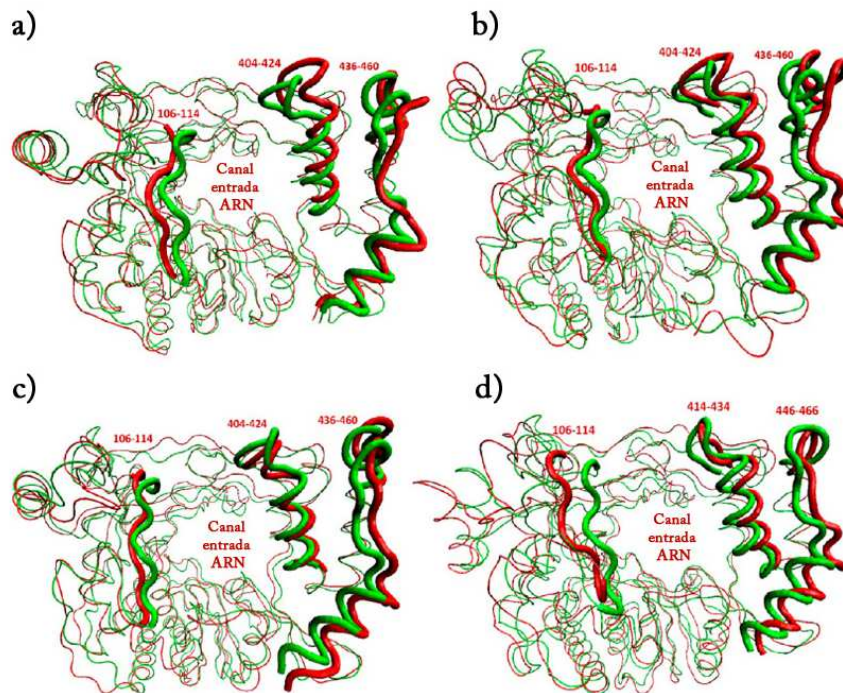


Figura 15. Conformacions oberta (vermella) i tancada (verda). Resultat de simulacions de dinàmica molecular amb les 3D^{pol} de (a) PV, (b) CVB3, (c) HRV16 i (d) FMDV. S'indiquen els residus dels segments amb més mobilitats i presenten més gruix en la representació.

1.4.3 Mecanismes d'iniciació de la síntesi d'ARN

La iniciació de la reacció d'addició de nucleòtids que realitzen les polimerases és un pas clau en la regulació de la replicació viral. Cal assegurar la producció de les quantitats necessàries de cadenes d'ARN i que l'inici de la replicació sigui en el punt correcte per tal d'evital la pèrdua d'informació genètica. Hi ha bàsicament dos mecanismes possibles d'iniciació de la síntesi d'ARN: de novo i depenent d'encebador (Figura 16).

De novo

La iniciació *de novo* requereix la presència de, com a mínim, quatre elements: la RdRp, la cadena d'ARN motlle, un nucleòtid d'iniciació i un segon nucleòtid, complementaris a l'extrem 5' de la cadena motlle. El primer enllaç fosfodièster es forma entre aquests dos

rNTPs, essent el primer el que aporta l'hidroxil 3' per l'addició del segon (essencialment un encebador d'un nucleòtid). Aquest sistema evita la pèrdua d'informació genètica durant la replicació i no necessita proteïnes auxiliars per generar un encebador o per tallar l'encebador de l'ARN sintetitzat de nou.

Les interaccions que s'estableixen durant la iniciació han de ser estables per permetre una correcta formació del complex encebador, però no han d'impedir el pas a l'elongació. Així, s'ha observat en la 3D^{pol} del virus de l'Hepatitis C (HCV) que la polimerasa té més afinitat per als rNTPs de l'elongació que no pas per l'rNTP d'iniciació (Luo et al., 2000).

En la majoria dels casos, d'iniciació *de novo* va seguida de l'elongació, però en alguns casos es produeix una iniciació abortiva que dona lloc a oligonucleòtids molt curts (2 a 5 nucleòtids) que al seu torn poden ser utilitzats com a encebadors. Les RdRps de reovirus (Yamakawa et al., 1981) o rotavirus (Chen and Patton, 2000) en són un exemple.

Alguns virus amb ARN de cadena negativa utilitzen el mecanisme d'iniciació i realiniament. Un cop la iniciació *de novo* ha sintetitzat un oligonucleòtid curt, aquest es desprèn de la cadena motlle i s'hi torna a hibridar desplaçant-se cap a l'extrem 3' de manera que la base inicial del motlle queda emparellada amb l'últim nucleòtid afegit a l'encebador. Aquest sistema permet que la iniciació *de novo* tingui lloc en un nucleòtid intern més protegit evitant que es perdi informació genètica (Kao et al., 2001). Els arenavirus (Garcin and Kolakofsky, 1990) i els bunyavirus (Garcin et al., 1995) utilitzen el mecanisme d'iniciació i realiniament.

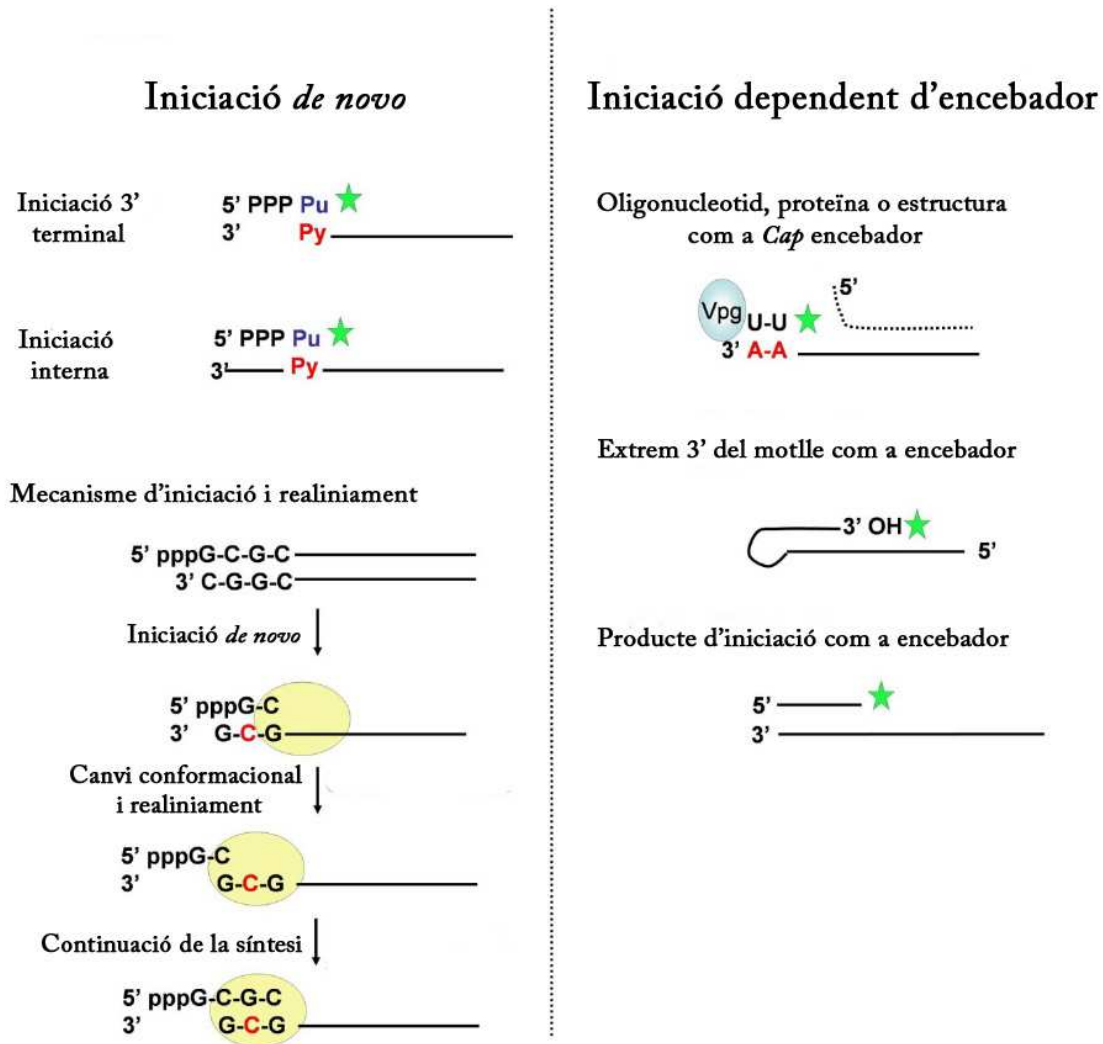


Figura 16. Esquema dels mecanismes d'iniciació de la síntesi d'ARN. Cortesia Cristina Ferrer-Orta.

Iniciació dependent d'encebador

Molts virus necessiten un encebador que proporcioni l'hidroxil 3' necessari per l'addició del següent nucleòtid:

- a. Un oligonucleòtid obtingut a partir del tall de l'extrem 5' amb *Cap* d'un ARN missatger de la cèl·lula hoste (*cap snatching*).
- b. Un petit encebador (de dos a cinc nucleòtids) sintetitzat per RdRps virals mitjançant iniciacions abortives.

- c. L'extrem 3' del propi motlle doblegat sobre si mateix.
- d. Una proteïna un aminoàcid de la qual aporta un grup hidroxil.

L'última estratègia és utilitzada en la família *Picornaviridae* (Paul et al., 1998) i la proteïna que utilitzen és la VPg (codificada com a 3B).

El primer pas d'aquest mecanisme d'iniciació de la replicació és la uridililació de la VPg, l'unió covalent de dos nucleòtids monofostat al grup hidroxil de la tirosina 3. Aquesta reacció la catalitza la pròpia polimerasa (Paul et al., 1998) , requereix la presència de l'element CRE que actua com a motlle del procés (Mason et al., 2002), veure apartat 1.1.1, i és estimulada pel precursor 3CD (Rieder et al., 2000).

La reacció d'uridililació dona lloc a VPgpUpU_{OH} que es dissocia de la polimerasa acumulant-se a l'interior de la cèl·lula, essent assequibles com a encebadors per la síntesi d'ARN i deixant la polimerasa lliure per seguir uridililant (Crawford and Baltimore, 1983).

Estudis sobre la síntesi d'ARN de cadena positiva i negativa a Poliovirus han mostrat que la uridililació de la VPg no és sempre necessària per la iniciació. La síntesi d'ARN de cadena negativa no requereix la presència de la VPgpUpU_{OH}, però sí de la tirosina 3 de la VPg. En canvi, la síntesi de cadena positiva necessita de la presència de VPgpUpU_{OH} (Murray and Barton, 2003).

Fins ara, els tres models cristal·logràfics existents de complexes de 3D^{pol} amb VPg en picornavirus, concretament per FMDV, CVB3 i EV71, indiquen tres llocs d'unió diferents (Ferrer-Orta et al. 2006b; Gruez et al. 2008; Chen et al. 2013) (Figura 17). En el model proposat en FMDV, la VPg s'uneix a la cavitat central de l'enzim situant la Tyr3 al centre catalític. La localització d'un intermediari del procés d'uridililació (VPgpU) al centre actiu de l'enzim a FMDV seria compatible amb una uridililació en *cis* (Ferrer-Orta, et al. 2006b). En l'estructura de CBV3, en canvi, només va poder-se localitzar la part C-terminal de la VPg i s'unia a la zona de transició entre els subdominis del polze i el palmell (Gruez et al., 2008), allunyada de la cavitat central de

l'enzim. Aquest lloc d'unió concorda, almenys en una part, amb el lloc d'unió predit per estudis mutacionals en PV (Tellez et al., 2006). En EV71, la VPg es localitza a la base del palmell extenent-se des de “darrere” fins al “davant” de la polimerasa. Tan en EV71 com en CVB3, la Tyr3 de la VPg es trobaria massa lluny del centre catalític de 3D^{pol} per poder ser uridilada en *cis* (Chen et al., 2013). Aquests darrers llocs d'unió de VPg només poden ser compatibles amb un mecanisme d'uridilació en *trans* o amb un paper alternatiu de les VPg (Gruez et al., 2008). Tot i que les 3D^{pol} i les VPg de picornavirus són molt semblants entre sí, les zones d'interacció detectades a les estructures de CVB3 i EV71 són més variables en seqüència (Chen et al., 2013). Estudis d'uridilació *in vitro* amb combinació de 3D^{pol} sense activitat (D238H) i 3D^{pol} defectives en unió de VPg indicaren que, en EV71, aquesta es produïa en *trans* (Chen et al., 2013). Així, el lloc d'unió de VPg en picornavirus sembla ser variable i el mecanisme d'uridilació no està del tot clar.

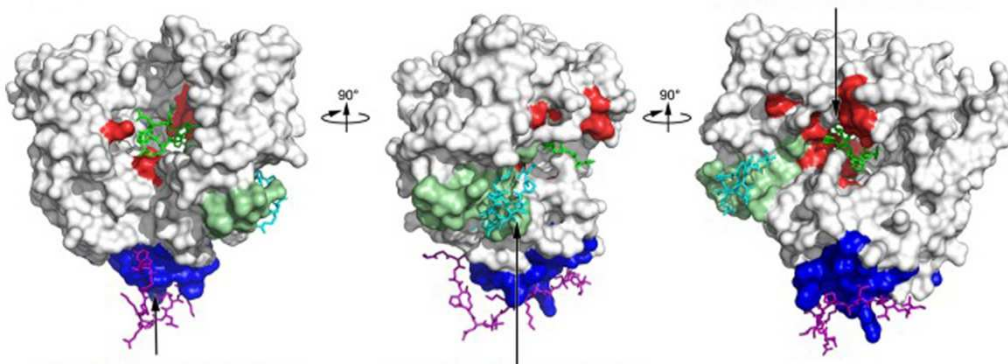


Figura 17. Llocs d'unió de la VPg en FMDV, EV71 i CVB3. Es representa en superfície blanca la 3D^{pol} d'EV71 i en colors els residus implicats en la unió de les diferents VPg en FMDV (vermell), EV71 (verd pastel) i CVB3 (blau). Les VPg respectives s'assenyalen en verd, turquesa i lila.

1.4.4 La 3D^{pol} i la teràpia antiviral

Avui en dia no existeix cap teràpia antiviral efectiva per cap membre de la família dels picornavirus i només existeixen vacunes preventives per alguns d'ells. Per tant, davant de

la prevalença d'infeccions causades per picornavirus i la complexitat de serotips que presenten totes les espècies, la cerca de fàrmacs d'ampli espectre per tractar les infeccions d'un gran rang de virus és una àrea de recerca de molt interès.

Les cèl·lules de mamífer no sintetitzen ARN utilitzant ARN com a motlle, de manera que els inhibidors de la 3D^{pol} són bons candidats per la teràpia antiviral pel fet de ser molt selectius. Aquests inhibidors es classifiquen en dos grans grups en funció de la seva estructura química i del mecanisme d'acció: inhibidors anàlegs de nucleòsid i inhibidors no nucleòsids (NNIs).

Els inhibidors anàlegs de nucleòsids s'uneixen al centre actiu de la polimerasa emulant els substrat natural i aquesta els incorpora a l'ARN en síntesi. Així poden provocar una terminació prematura de la síntesi (Carfi' et al., 2007; De Clercq and Neyts, 2009), com l'aciclovir en el virus de l'herpes o l'azidotimidina en el virus de la immunodeficiència humana, o bé ser incorporats a la cadena d'ARN en síntesi, causant una acumulació d'errors a la seqüència i contribuint a l'extinció del virus per mutagènesi letal (Domingo, 2005).

Els enzims encarregats de replicar material genètic estableixen un compromís entre la velocitat de síntesi i la fidelitat del producte sintetitzat respecte el motlle. Les RdRps en virus ARN han desplaçat l'equilibri per aconseguir una gran velocitat de replicació en detriment de la fidelitat. Això fa que els virus ARN presentin la taxa de mutagènesi més alta que qualsevol altre organisme (Drake, 1993), la qual cosa també reporta avantatges. L'alta taxa de mutació i altres mecanismes com la recombinació són les principals causes que determinen la ràpida evolució dels virus ARN (Domingo and Holland, 1994; Domingo, 2000, 1997). Aquest sistema genera el que s'anomenen quasiespècies, poblacions que contenen diferents genomes amb totes les mutacions viables representades per un determinat ambient, que són seleccionades segons la seva capacitat replicativa i eficiència (Domingo et al., 2000, 1998). És a dir, tenir una àmplia gamma de variants genòmiques és un avantatge perquè permet l'adaptació a un canvi sobtat en l'ambient. Tot i així, existeix un límit màxim de mutacions per mantenir les poblacions

viables a partir del qual es produeix la mutagènesi letal i la població esdevé inviable (Domingo and Holland, 1994; Domingo, 2005; Domingo et al., 2005; Eigen, 2002).

Un exemple de fàrmac que desencadena l'extinció del virus principalment mitjançant la mutagènesi letal és la ribavirina (Crotty et al., 2000). La ribavirina, un anàleg de purina que pot aparellar-se tant amb la citosina com amb l'uracil, va ser el primer mutagen letal que es va descobrir, veure figura 18. (Airaksinen et al., 2003; Contreras et al., 2002; Crotty et al., 2000; Severson et al., 2003). A més, la ribavirina també desenvolupa la seva activitat antiviral per altres mecanismes davant d'aquests virus i de virus ADN (revisat a Vignuzzi et al. 2005).

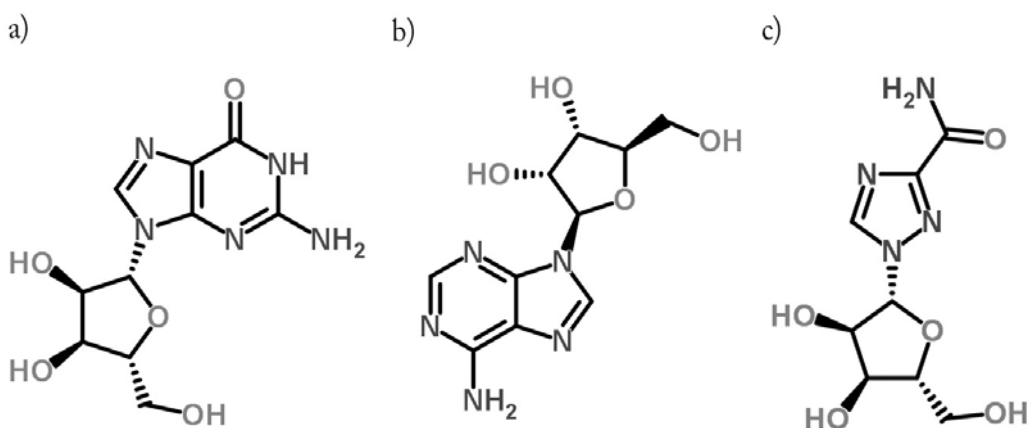


Figura 18. Formula estructural de la (a) guanosina, (b) l'adenosina i la (c) Ribavirina.

Els NNIs, per contra, s'uneixen generalment de forma al·lostèrica causant alteracions en la dinàmica de l'enzim. Poden estabilitzar una conformació inactiva, bloquejar el canal d'entrada del motlle o bé segrestar l'enzim en una conformació activa impedit la transició entre dos estats necessaris per l'activitat de l'enzim, com per exemple entre iniciació i elongació (Biswal et al., 2006; De Francesco et al., 2003; Niyomrattanakit et al., 2010).

Sovint, el tractament amb antivirals promou l'aparició de soques víriques resistents. Això s'explica per l'elevada capacitat d'adaptació a entorns hostils que els confereix l'alta taxa

de mutació que presenten. Aquesta resistència pot venir donada per una mutació puntual o diverses mutacions simultànies en diferents proteïnes del virus. Per això, la cerca de fàrmacs contra virus d'ARN, com els picornavirus, és encara una àrea emergent d'investigació. L'estudi estructural dels complexos de la RdRp amb els inhibidors així com dels mutants de resistència amb els inhibidors poden permetre explicar els mecanismes pels quals es donen. Conèixer les característiques del lloc d'unió d'un fàrmac pot ajudar en la seva optimització, per exemple, per augmentar l'afinitat. D'altra banda, entendre com el virus evadeix l'efecte de l'inhibidor també pot aportar informació interessant de cara a millorar el fàrmac.

Com a part d'aquesta tesi s'ha estudiat estructuralment el mecanisme d'unió d'un nou pro-fàrmac NNI, el GPC-N114, a la 3D^{pol} de CVB3 i d'EMCV. També s'han resolt les estructures de dos mutants de la polimerasa d'EMCV resistents al pro-fàrmac.

El compost té l'origen en una sèrie de 5-nitro-2-fenoxibenzonitrils entre els quals, el GPC-N114, presentava l'activitat antiviral *in vitro* més potent i selectiva per CVB3 (Pürstinger et al., 2008) (Figura 19). Altres virus testats també presenten resultats comparables als de CVB3 com per exemple EV71, HRV14, HRV2, EMCV o SAFV. Així, el GPC-N114 és un inhibidor de la replicació dels enterovirus i alguns cardiovirus. Estudis de resistència i assaigs bioquímics han indicat que l'activitat antiviral es dona per la inhibició de la 3D^{pol} (comunicació personal de F.M. van Kuppeveld) i que no competeix amb els NTPs, però fins ara no se sabia on s'uneix.

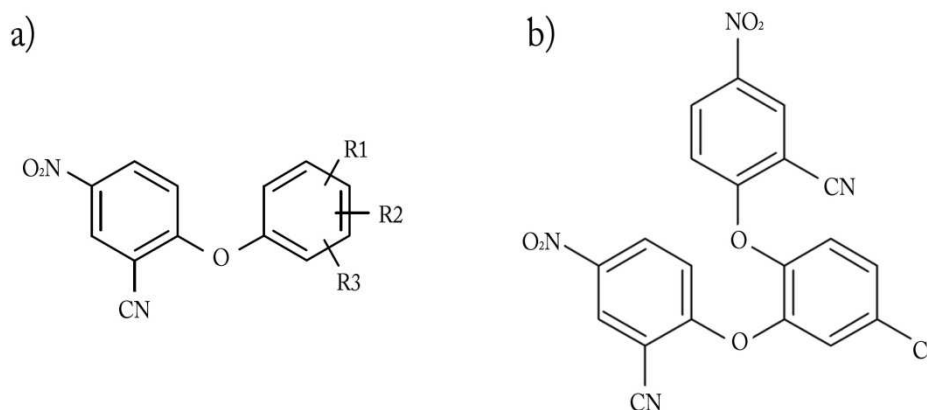


Figura 19. Fórmula estructural del precursor i del GPC-N114. (a) Precursor de la sèrie de 5-nitro-2-fenoxibenzonitrils de la qual va sortir el GPC-N114. (b) Estructura del GPC-N114.

Un altre NNI àmpliament estudiat és l'amilorida. L'amilorida i els seus derivats eren coneguts com a bloquejants de dels canals epitelials de Na⁺, Na⁺/H⁺ i Na⁺/Ca²⁺ i dels anti-transportadors Na⁺/Mg²⁺ (Kleyman and Cragoe, 1988). Més tard es va veure que l'amilorida inhibia la replicació de CVB3 en cèl·lules HeLa afectant a la uridilació de la VPg i l'elongació de l'ARN per part de la 3D^{pol} (Gazina et al., 2011; Harrison et al., 2008). S'ha proposat un model d'unió a la 3D^{pol} de CVB3 indica que l'amilorida ocuparia part del lloc d'unió del ió Mg²⁺ B i del nucleòtid entrant (Gazina et al., 2011), com es pot veure a la figura 20.

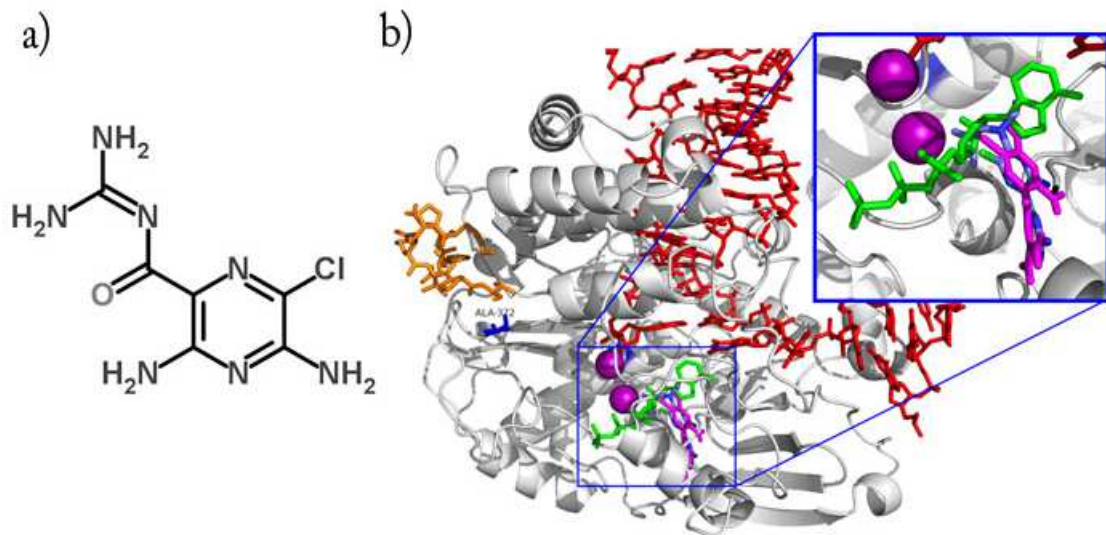


Figura 20. (a) Fórmula estructural de l'amilorida. (b) Model d'unió de l'amilorida generat mitjançant estudis computacionals.

La presència d'aquest inhibidor en sèries successives de passis de cèl·lules HeLa infectades va permetre l'aïllament de virus resistents que presentaven mutacions en la 3D^{pol}: S299T i A372V (Harrison et al., 2008). El residu 299 es troba al motiu B, al costat del lloc d'unió de la ribosa (Ferrer-Orta et al., 2004; Gong and Peersen, 2010), i el 372 resideix al motiu E i col·labora en el posicionament de l'extrem 3' de l'encebador (Ferrer-Orta et al. 2006a; Gruez et al. 2008; Gong & Peersen 2010). A més, tot i que el mutant S299T presenta una disminució de la fidelitat de còpia, protegeix contra l'efecte mutagènic de l'amilorida, degut a l'alteració de les concentracions intracel·lulars d'ions divalents, i contra la inhibició de la síntesi d'ARN (Levi et al., 2010). L'anàlisi estructural del mutant S299T de CVB3 s'ha dut a terme en aquest treball per tal d'intentar explicar la base molecular del mecanisme de resistència i entendre el com aquesta mutació pot alterar la fidelitat de l'enzim.

2 OBJECTIUS

El treball d'aquesta tesi doctoral gira al voltant de les proteïnes no estructurals dels picornavirus implicades en la replicació. Presenta dos blocs diferencials: la proteïna 2B del virus de l'hepatitis A (HAV) i les 3D^{pol} 3D de Coxsackievirus B3 (CVB3) i el virus de l'encefalomiocarditis (EMCV).

El virus de HAV presenta peculiaritats respecte la majoria dels membres de la família dels picornavirus i, tot i que s'han observat diferències en la replicació, és un virus poc estudiat. Només existeix informació estructural de la proteasa 3C. Així ens plantejarem com a objectius:

- Caracteritzar estructuralment la proteïna 2B del virus HAV

Les polimerases d'ARN dependents d'ARN (3D^{pol}) han sigut àmpliament estudiades a nivell funcional i estructural. No obstant, la 3D^{pol} de EMCV encara no havia estat cristal·litzada. Actualment, la cerca de fàrmacs específics contra les 3D^{pol} és un interès emergent de cara a donar resposta a la infecció per aquests virus. Aquests tipus d'estudis sovint es troben amb l'aparició de virus resistents que presenten mutacions puntuals en la 3D^{pol} que en modifiquen la seva activitat. Els segon bloc d'aquest treball es centra en l'estudi de les 3D^{pol} de CVB3 i EMCV en presència i absència d'inhibidors i d'alguns mutants de resistència, concretament:

- Caracteritzar a nivell estructural el mecanisme d'unió i inhibició del GPC-N114 a la 3D^{pol} de CVB3.
- Caracteritzar estructuralment la 3D^{pol} de EMCV i el mecanisme d'unió i inhibició del GPC-N114.
- Caracteritzar estructuralment el mecanisme de resistència dels mutants M300V i I304V de la 3D^{pol} de EMCV.
- Analitzar estructuralment l'efecte de la mutació S299T de la 3D^{pol} de CVB3 que presenta resistència a l'amilorida i fidelitat de còpia alterada

3 RESULTATS



CAPÍTOL 1

LA PROTEÏNA 2B

DEL VIRUS DE

L'HEPATITIS A

3.1 CAPÍTOL 1: LA PROTEÏNA 2B DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A

Els límits de la seqüència codificant per la proteïna 2B no sempre s'han conegut com estan descrits actualment. L'any 1987, Cohen et al. publicaren la seqüència nucleotídica completa del virus HAV i, mitjançant la comparació amb seqüències d'altres picornavirus en les quals els llocs de tall entre proteïnes s'havien definit, es determinà el lloc de tall entre les proteïnes 2A i 2B equivalent al d'enterovirus (Cohen et al., 1987). L'any 1995, estudis d'especificitat de la proteasa 3C i de processament de la poliproteïna de HAV determinaren un canvi del lloc de tall, reassignant-lo 144 residus cap a l'N-terminal, tal com s'ha comentat a la introducció (Malcolm, 1995; Martin et al., 1995) (Figura 21).

En un primer moment, aquest estudi plantejava la resolució de l'estructura de la proteïna 2A de HAV, ja que fins llavors només es coneixien dues estructures d'enterovirus, CVB3 i HRV14 (Baxter et al., 2006; Petersen et al., 1999). Durant l'escriptura d'aquesta tesi es resolgué l'estructura de la 2A d'EV71, la tercera del gènere enterovirus, la qual no presenta diferències destacables respecte les dues anteriors (Mu et al., 2013). La seqüència de la 2A, necessària per a fer el clonatge, s'extragué de la base de dades GenBank. L'única seqüència disponible en aquell moment era l'associada a la publicació de Cohen et al. del 1987 (codi d'accés al GenBank M14707.1). Així, tenint en compte la descripció de les seqüències de la base de dades i les definicions posteriors del lloc de tall, el que realment es va clonar fou una poliproteïna que contenia la 2A i el domini N-terminal de 2B, el qual inclou pràcticament tota la regió soluble de la proteïna.

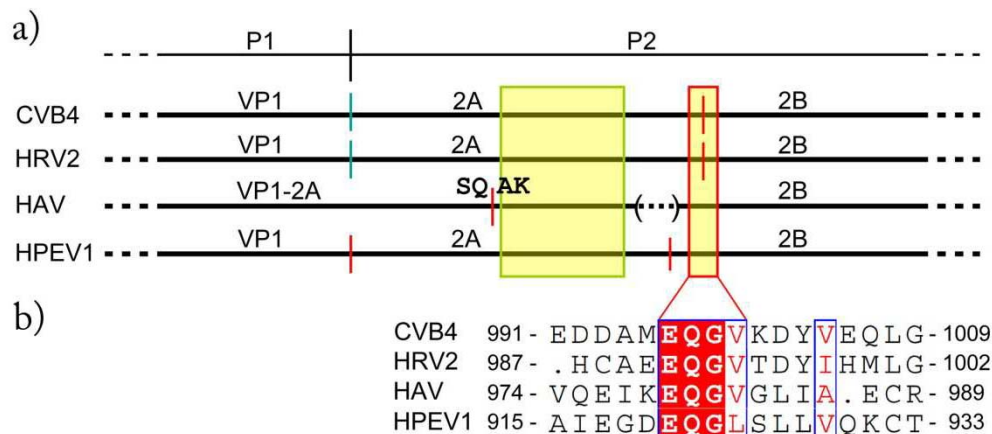


Figura 21. Esquema i alineament dels llocs de tall entre les proteïnes 2A i 2B a picornavirus. (a) Representació esquemàtica del lloc de tall 2A/2B i VP1/2A en picornavirus: enterovirus (CVB4 i HRV2), hepatovirus (HAV) i parechovirus (HPEV1). El tall s'indica amb les línies vermelles verticals quan és realitzat per la 3C^{pro} i en blau si el fa la 2A^{pro}. El requadre vermell indica la regió de tall corresponent a enterovirus que es conserva als quatre virus. S'indiquen els residus específics pel nou lloc de tall de la 3C^{pro} de HAV. El requadre verd indica la part superposable estructuralment entre la 2B de HAV i 2A d'enterovirus. Els punts suspensius entre parèntesi representen 75 residus de HAV compactats per simplificar la comparació. (b) Alineament de seqüència del lloc de tall 2A/2B d'enterovirus indicat a (a). Els residus estrictament conservats s'emmarquen en requadres vermells i estan enumerats segons la seva posició en la poliproteïna. S'utilitzaren les seqüències amb els codis d'accés ABF19105, P04936, P08617 i CAQ76820, per ordre en l'alineament.

A hores d'ara no existeix informació de l'estructura atòmica de la proteïna 2B de cap picornavirus. En el cas de HAV, la proteïna 2B s'ha vist implicada en la reorganització de membranes cel·lulars (Gosert et al., 1996). Per altra banda, la proteïna 2A de HAV forma part del precursor de la proteïna VP1, però tampoc se'n coneix l'estructura.

Els resultats presentats mostren l'estructura tridimensional del domini soluble de la proteïna 2B i una hipòtesi a partir de l'organització cristal·lina i anàlisi del comportament en solució de com modifiquen les estructures membranoses cel·lulars.

En aquest apartat de resultats mostrarem l'estructura tridimensional del domini soluble de la proteïna 2B, la seva organització cristal·lina en forma de fibres i l'anàlisi del comportament d'aquesta proteïna en solució.

3.1.1 Obtenció de la poliproteïna 2AB

La descripció de la implicació de la 2B en reorganització de membranes intracel·lulars implica la presència de fragments hidrofòbics a la proteïna capaços d'ancorar-s'hi. L'anàlisi de la seqüència aminoacídica de la poliproteïna 2A-2B mitjançant diferents servidors de predicció d'hèlix transmembrana (veure l'apartat de materials i mètodes) indicà la presència d'una putativa hèlix transmembrana entre els residus 178 i 197 de la proteïna 2B (20 dels 251 aminoàcids totals). Per tant, el nostre constructe que contenia la seqüència de la 2AB fins al residu 146 de la proteïna 2B evitava la presència del fragment transmembrana.

Es va dissenyar un gen sintètic ja que l'ús de codons del virus HAV no és apropiat per la sobreexpressió en *E. coli*. La sobreexpressió de la poliproteïna presentà grans dificultats també degudes a la peculiar baixa taxa de replicació d'aquest virus. Per tal d'obtenir 2AB soluble es testaren moltes condicions: tipus cel·lular, temperatures i temps d'inducció i vectors d'expressió. Finalment, els nostres col·laboradors, el grup de la Dra. Sandra Ribeiro a l'IBMC (Porto), aconseguiren obtenir 2AB soluble amb una temperatura d'inducció de 12°C. A l'apartat de materials i mètodes s'especifiquen els passos de l'obtenció de la proteïna.

3.1.2 Cristal·lització de la poliproteïna 2AB

Es va realitzar un cribatge de condicions mitjançant difusió de vapor en gota assegurada en plaques de 96 pous a 4 i 20°C. La condició on van aparèixer cristalls petits (0.1M MES pH 6 i 1.26M sulfat amònic a 20°C) va ser extrapolada a plaques de 24 pous per obtenir cristalls més grans. En gotes d'1 o d'1,5 µl fetes a partir de la mescla de volums iguals de proteïna a 6.5 mg/ml i solució de cristal·lització (0.1M MES pH 5.2-5.8, 1,26M sulfat amònic i 5mM DTT) equilibrades contra 750 µl de reservori s'obtingueren

cristalls en 4 setmanes. Tot i l'optimització, els cristalls obtinguts eren molt petits (mida màxima $8000 \mu\text{m}^3$) (Figura 22).

Els cristalls de proteïna amb selenometionina foren aconseguits en les mateixes condicions.

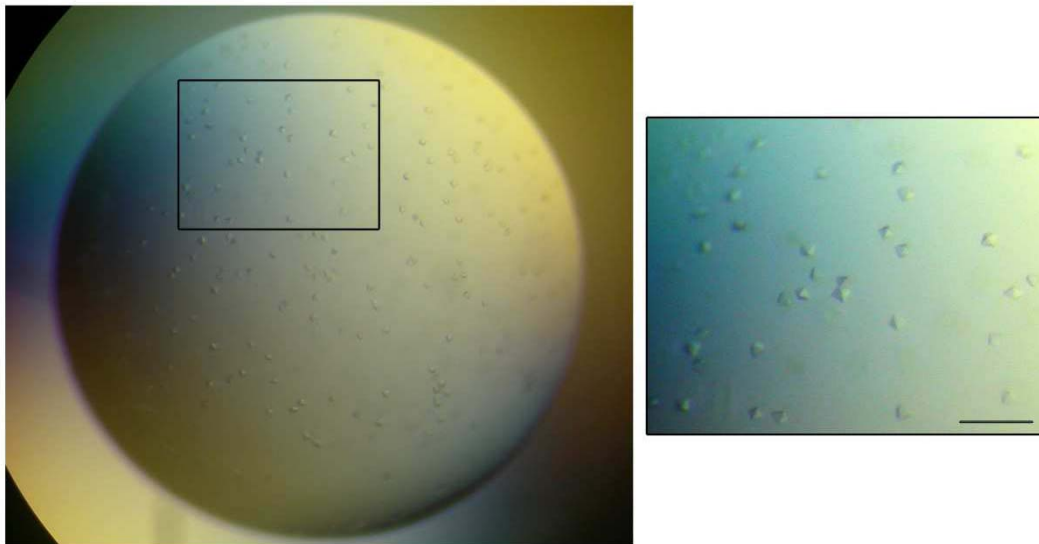


Figura 22. Cristalls ortogonals de la poliproteïna 2AB. Cristalls obtinguts en una gota d' $1\mu\text{l}$ en una placa de 24 pous a 4°C (Esquerra). En l'ampliació (dreta) es pot observar la morforlogia ortogonal. La barra d'escala correspon a $100\mu\text{m}$.

3.1.3 Difracció de raigs X i resolució de l'estructura tridimensional

Malgrat l'optimització, els cristalls eren força petits i per aconseguir dades de difracció calgué utilitzar la línia ID23-2 de l'ESRF, la qual proporciona un feix de radiació d'un diàmetre menor a $10\mu\text{m}$. Es van recollir dades a una $\lambda=0.973$ i 100K de temperatura. La resolució de la difracció dels pocs cristalls que es van poder extreure de les gotes dequeia molt ràpidament, així que es van poder recollir unes 100 imatges a 1° de rotació de cada cristall.

Les dades es van processar mitjançant iMOSFLM (Leslie and Powell, 2007) i es van escalar amb Scala (CCP4i, (Evans, 2006)). En un inici, s'intentà la derivació dels cristalls mitjançant immersions en presència de mercuri, osmi i or, però no els àtoms no

es van introduir al cristall. Finalment, per la determinació de l'estructura es va utilitzar un grup de dades d'un cristall natiu a una resolució de 2.7Å i dos grups de dades combinats a 3.2Å de cristalls derivats amb selenometionina, amb l'objectiu d'augmentar la multiplicitat de la senyal anòmala a alta resolució. L'anàlisi de les absències sistemàtiques i la posterior obtenció de les fases ens permeté determinar que el grup espacial era $P4_3$. El coeficient de Matthews indicà, tenint en compte les dimensions de la unitat asimètrica, la possible presència de dues molècules de 2AB (Matthews, 1968).

L'estructura va ser resolta mitjançant el mètode de la dispersió anòmala simple (SAD) utilitzant el seleni com a àtom pesat. El programa autoSHARP (Vonrhein et al., 2007) va permetre determinar i refinar la localització de sis àtoms de seleni a partir dels quals s'estimaren les fases experimentals, amb figures de mèrit de 0.41 per els reflexions centrals i 0.21 per les no centrals. Els mapes inicials permeteren traçar 230 residus automàticament mitjançant ARP/wARP ("The CCP4 suite: programs for protein crystallography," 1994) i el primer model permeté identificar 2 molècules a la unitat asimètrica. Tenint els selenis com a referència es va construir la resta del model manualment mitjançant COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Les fases d'aquest model es van aplicar a les dades obtingudes del cristall natiu, que contenia informació a major resolució (fins a 2.7Å) i es procedí a múltiples cicles de refinament automàtic amb BUSTER (Bricogne et al., 2010) i reconstrucció manual amb COOT (Emsley and Cowtan, 2004). El model final inclou 280 residus aminoacídics: 138 pertanyents a una molècula, del 4 al 141, i 142 a l'altra, de l'1 al 142.

	Derivats selenometionina			Natiu
	1	2	Combinat	
Paràmetres de recollida i estadística de processat				
Línia de recollida	ID23-2 (ESRF)	ID23-2 (ESRF)	ID23-2 (ESRF)	ID23-2 (ESRF)
λ (Å)	0.973	0.973	0.973	0.973
Grup espacial	P4 ₃	P4 ₃	P4 ₃	P4 ₃
Cel·la unitat				
a, b, c (Å)	90.2, 90.2, 73.2	90.4, 90.4, 73.2	90.3, 90.3, 73.2	90.4, 90.4, 73.4
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolució (Å)	63.0-3.3 (3.48-3.3)	56.7-3.2 (3.37-3.2)	63.9-3.2 (3.37-3.2)	57.0-2.7 (2.85-2.7)
Reflexions totals/úniques	609356/11920	436072/11963	1045128/11920	54920/13343
Multiplicitat	18.3 (5.4)	20.7 (13.1)	38.9 (18.3)	2.4 (1.3)
Completesa (%)	100 (100)	99.9 (100)	100 (100)	81.0 (62.9)
Rmerge (%)	17 (47)	14 (41)	17 (45)	10 (27)
I/ σ (I)	14.9 (3)	19.2 (6.3)	27.3 (6.7)	8.9 (2)
Multiplicitat anòmala	100 (99.7)	99.7 (98.7)	100 (100)	
Completesa anòmala (%)	9.3 (2.7)	10.6 (6.6)	19.9 (9.4)	
Estadístiques del fasejat				
Nombre àtoms pesats per u.a.				12
Poder de fasejat				1.99
Rcullis				0.58
FOM (cèntrica/acèntrica)				0.21/0.41
Estadístiques de refinat de l'estructura				
Resolució (Å)				57.0-2.7
Rwork (%)				18.4
Rfree (%)				21.5
Nombre d'àtoms/residus				
Proteïna				2263
Lligands				10
Aigua				25
Factor B (Å)				67.5
Rmsd Longitud d'enllaç				0.010
Rmsd Angle d'enllaç				1.140
Diagrama de Ramachandran				
Residus en regions preferents				271 (96.8 %)
Residus en regions permeses				9 (3.2 %)

Taula 4. Paràmetres i estadística de la recollida, el processat i refinament de les dades de la proteïna 2B de HAV. Els valors entre parèntesi dels paràmetres de recollida i estadística del processat representen els valors de l'última capa de resolució. Les definicions dels paràmetres R estan especificades als apartats 6.2.6 i 6.2.8 de materials i mètodes.

La regió modelada correspon només al domini soluble de la 2B (2B^{sol}) ja que els primers 70 residus de la poliproteïna, corresponents a la 2A, no són visibles en la densitat electrònica. L'anàlisi per SDS-PAGE demostrà que el fragment cristal·litzat correspon a la poliproteïna 2AB intacta (Figura 23). El desordre de la 2A concorda amb el resultat de diferents programes de predicció de desordre intrínsec com Foldindex (Prilusky et al., 2005), DisEMBL (Linding et al., 2003), Disprot (Vucetic et al., 2005) o PrDOS (Ishida and Kinoshita, 2007).

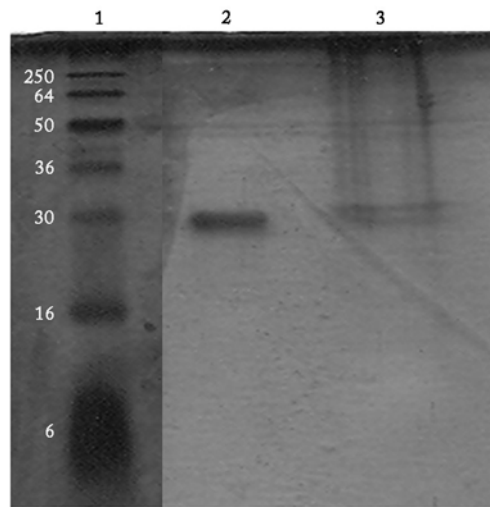


Figura 23. SDS-PAGE tenyit amb plata dels cristalls de 2AB. El carril 1 correspon al marcador, el carril 2 a la 2AB recent purificada i el carril 3 a cristalls de 2AB dissolts.

El pes molecular de la banda dels cristalls de 2AB es correspon al de la proteïna purificada.

3.1.4 L'estructura tridimensional de la proteïna 2B

La 2B^{sol} està plegada en 5 hèlixs alfa i 8 cadenes beta organitzades de dos subdominis (Figura 24a i b). El domini N-terminal consisteix en un pseudo barril beta format per 5 cadenes ($\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ i $\beta 7$) organitzades en una fulla beta antiparal·lela corbada. Les dues cadenes més llargues, $\beta 1$ i $\beta 4$, es prolonguen amb un *hairpin* format per $\beta 2$ i $\beta 3$. El segon subdomini s'organitza en una troca d'hèlixs ($\alpha 1-4$) com es pot veure a la figura 24.

L'extrem C-terminal consisteix en una cadena beta ($\beta 8$), estabilitzada per una interacció antiparal·lela amb la cadena $\beta 4$, seguida d'una petita hèlix alfa ($\alpha 5$).

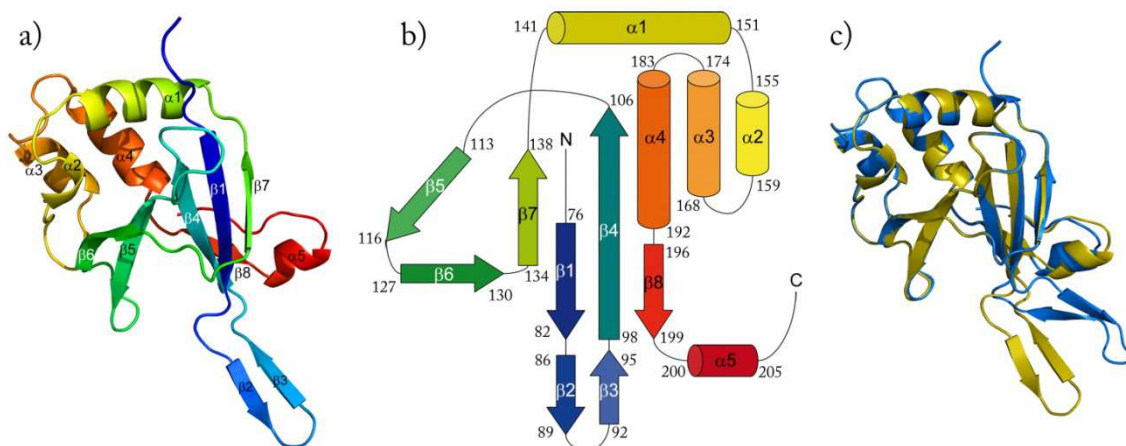


Figura 24. Estructura i topologia de la $2B^{sol}$. Representació gràfica de l'estructura de la $2B^{sol}$, acolorida de N-terminal (blau) a C-terminal (vermell). Els elements d'estructura secundària estan assenyalats. (b) Topologia de la $2B^{sol}$, la representació de colors equival a l'a. S'assenyalen els residus inicials i finals per cada estructura secundària. (c) Superposició de les dues molècules presents a cada unitat asimètrica, en blau i groc. La diferència principal resideix al *hairpin* $\beta 2$ - $\beta 3$.

La superposició dels 122 residus coincidents de les dues molècules de la unitat asimètrica dóna un rmsd de 0.51\AA , indicant que són pràcticament iguals (Figura 24c). Les diferències resideixen en el *hairpin* format per $\beta 2$ i $\beta 3$: respecte la molècula 1 el *hairpin* de la molècula 2 rota 140° , sobre el propi eix, i gira 40° cap a l'hèlix $\alpha 5$. En conseqüència, a la molècula 2, la $\beta 4$ és més curta i desestabilitza la interacció amb la $\beta 8$, la qual perd la seva conformació de cadena beta. L'hèlix $\alpha 5$ també està una mica desplaçada (Figura 24c).

3.1.5 L'empaquetament cristal·lí: organització quaternària de la $2B^{sol}$

Al cristall, la $2B^{sol}$ s'organitza en una fibra helicoidal al llarg de l'eix C on les molècules estableixen contactes a través del *hairpin* ($\beta 2$ - $\beta 3$). Els dos *hairpins* estan orientats ortogonalment respecte la fibra, concatenant-se formant una espina beta antiparal·lela

(Figura 25). El *hairpin* $\beta 2$ - $\beta 3$ de les dues molècules s'estabilitza mitjançant una interacció π -catió entre les cadenes laterals de Trp90 i Arg91 i un agrupament hidrofòbic format per Met86, Phe88 i Val93. L'espina beta està polaritzada: una banda del *hairpin* conté el conjunt hidrofòbic que estableix contacte amb la zona hidrofòbica del *hairpin* adjacent; l'altra banda és hidrofílica i presenta les cadenes laterals de Lys87 i Thr94 exposades que estableixen ponts d'hidrogen amb la cadena lateral de la Thr93 del *hairpin* adjacent (Figura 25a). A més, les interaccions entre el residu Trp90 de la molècula 1 i l'Ala120 de la molècula 2 i entre els residus Ser89, Trp90 i Arg91 de la molècula 1 amb Glu84, Tyr78 i Thr97 de la molècula 2 respectivament connecten l'espina beta amb el cos principal de la 2B (Figura 25b, c i d).

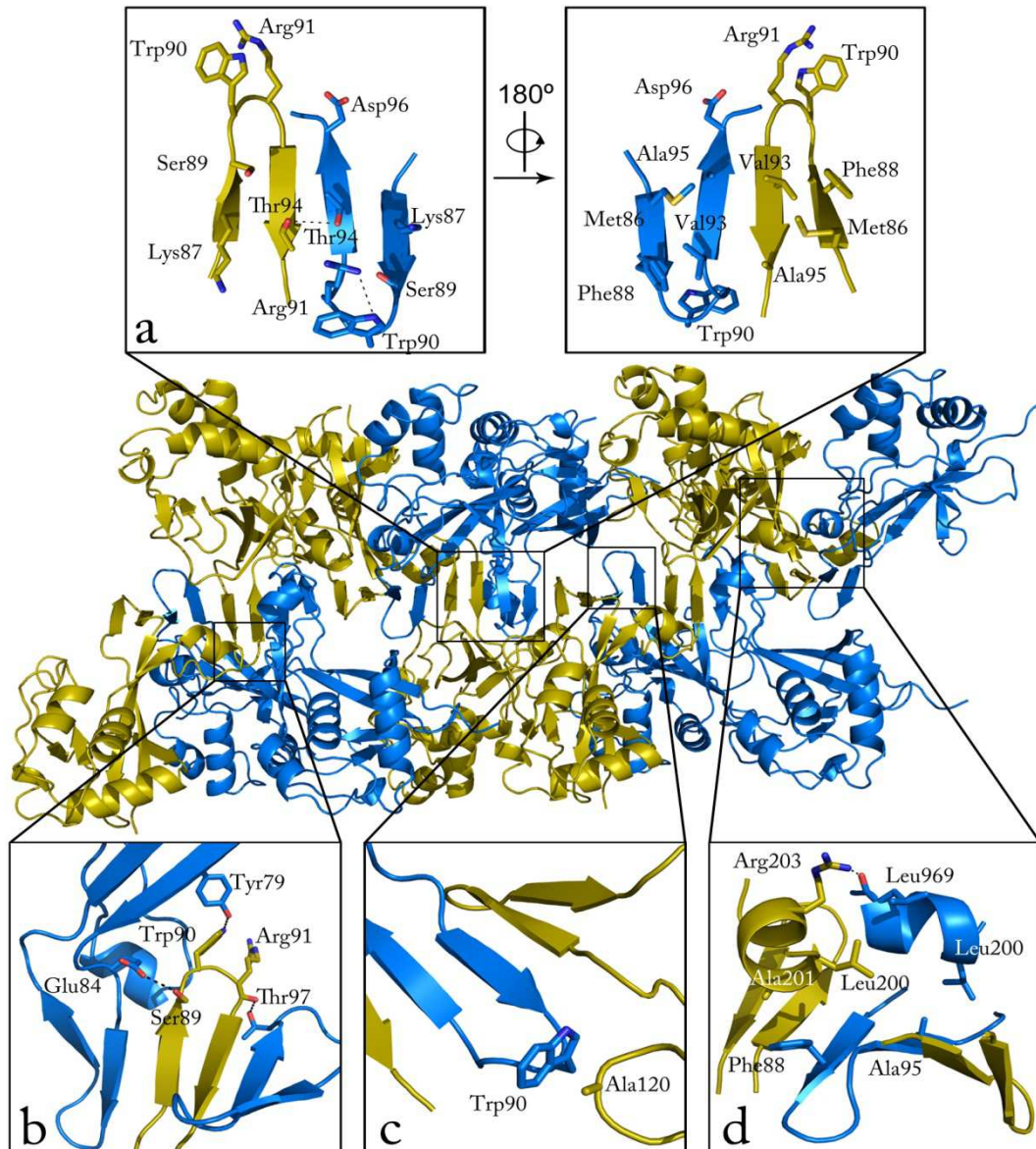


Figura 25. Representació de la fibra que forma la $2B^{sol}$ al llarg de l'eix C del cristall. Les dues molècules a la unitat asimètrica es mostren en groc i blau. Els augments a-d mostren els detalls de les interaccions entre els protòmers i els punts d'hidrogen estan marcats amb línies de punts. (a) Detall de dos *hairpins* consecutius on es pot observar la polarització de la fibra: el dret mostra la banda hidrofòbica i l'esquerra, a 180° de rotació, la hidrofílica. (b) Interaccions establertes entre les $\beta 2$ - $\beta 3$ de la molècula 1 i el cos principal de la molècula 2. (c) Interacció entre les $\beta 2$ - $\beta 3$ de la molècula 2 i el cos principal de la molècula 1. (d) Interacció entre l'hèlix $\alpha 5$ de la molècula 1 i l'hèlix $\alpha 5$ i la cadena $\beta 2$ de la molècula 2.

El cossos principals de les 2B^{sol} es disposen en creu al llarg de la fibra seguint l'empaquetament marcat pel grup espacial P4₃ (Figura 26a). En el context cristal·lí, les fibres s'empaqueten mitjançant contactes entre $\alpha 3$ i $\alpha 4$ d'una molècula 1 i una molècula 2 generant un pseudo-eix binari de simetria com s'indica a la figura 26b. Aquest empaquetament genera unes grans cavitats ortoèdriques de base quadrada al llarg de l'eix C, d'aproximadament 76Å x 76Å, els vèrtexs de les quals són les fibres i que probablement estarien ocupades pel fragment N-terminal desordenat corresponent al fragment de 2A.

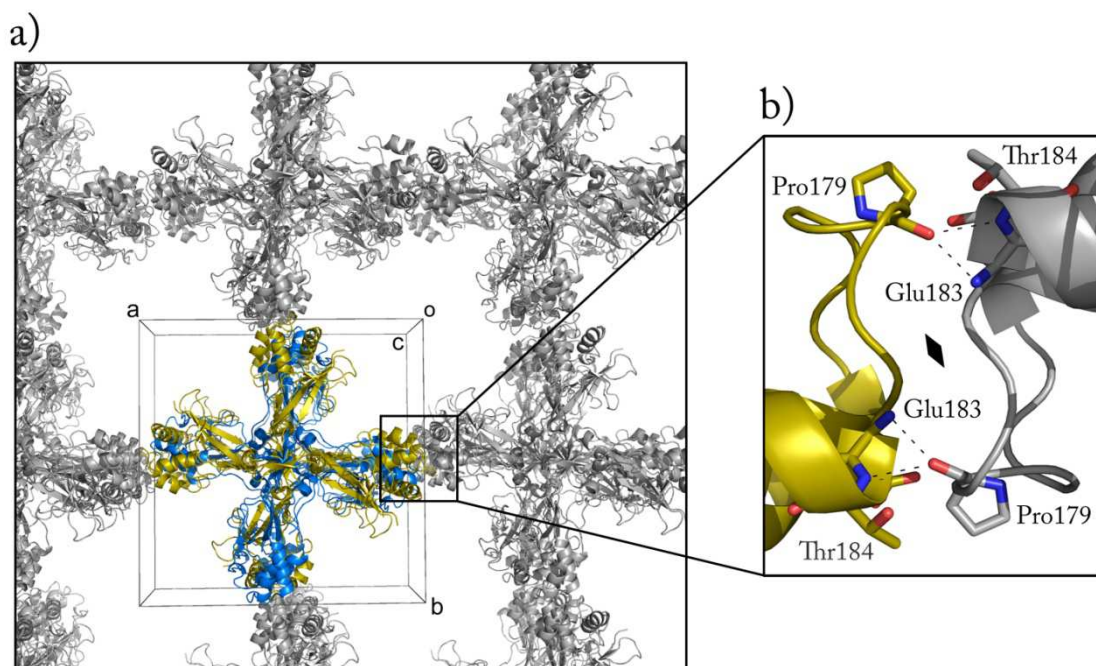


Figura 26. Empaquetament cristal·lí de les fibres de la 2B^{sol}. (a) Representació de l'empaquetament en el pla a-b del cristall. La fibra de referència està acolorida en blau i groc i les simètriques en gris. (b) Vista de les interaccions establertes entre fibres veïnes al cristall entre els residus Pro179, Glu183 and Thr184 dels *loops* $\alpha 3$ - $\alpha 4$ de dues molècules 1 i 2 relacionades per un pseudo-eix binari de simetria (rombe negre).

Les grans cavitats que presenta l'empaquetament cristal·lí entre les fibres, així com l'orientació del cos globular de la 2B^{sol} al llarg d'aquestes, indiquen que la 2A podria estar ocupant-les. Aquest desordre intrínsec de la proteïna 2A probablement hagi sigut

la causa de l'extrema dificultat per aconseguir cristalls i de la mida reduïda de tots els que s'han obtingut.

3.1.6 La 2B^{sol} forma fibres tipus amiloide en solució

L'assemblatge de la 2B^{sol} en una fibra helicoïdal al llarg de l'eix C recorda a estructures de fibres amiloides (Shewmaker et al., 2011). Es va analitzar la seqüència amb diferents algorismes de predicció (*FoldAmyloid* (Garbuzynskiy et al., 2010) i *Aggrescan* (Conchillo-Solé et al., 2007)) que indicaren que la regió del *hairpin* β 2- β 3 presentava una probabilitat alta d'agregació i/o de formació de fibres amiloides.

Al laboratori de la Dra. Sandra Ribeiro, a l'IBMC (Porto), es realitzaren estudis de monitoratge continu de la cinètica d'agregació de Thioflavina-T durant la incubació de la proteïna en solució a 37°C en diferents tampons. Com es pot veure a la figura 27a, en condicions semblants a les fisiològiques (50mM HEPES pH7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA i 1mM DTT), la cinètica d'agregació presentava tres fases: una latència de 13 hores seguida per una pujada pronunciada i una fase final d'augment progressiu de la fluorescència. La fase de latència s'escurçava quan la força iònica del tampó era baixa (50mM HEPES pH7.5, 1mM EDTA i 1mM DTT) i la pujada esdevenia més pronunciada amb un tampó a pH més baix, semblant al de cristal·lització (0.1M MES pH 6, 1.26M sulfat amoni i 5mM DTT). Es van tenyir els agregats de la última fase amb vermell Congo i presentaven una birefringència de color groc quan eren observats amb filtres polaritzadors creuats, característica d'estructures de tipus amiloide (Figura 27b). A més, presentaven una morfologia fibril·lar replegada quan s'observaven mitjançant microscòpia electrònica. Les fibres tenen un diàmetre mitjà de 14nm, compatible amb les dimensions de la fibra observades al cristall (\approx 9nm) completades amb dos extrems formats per la 2A N-terminal, que no s'observen al cristall, unides a la superfície externa del cos principal de la 2B^{sol} (Figura 27c i d).

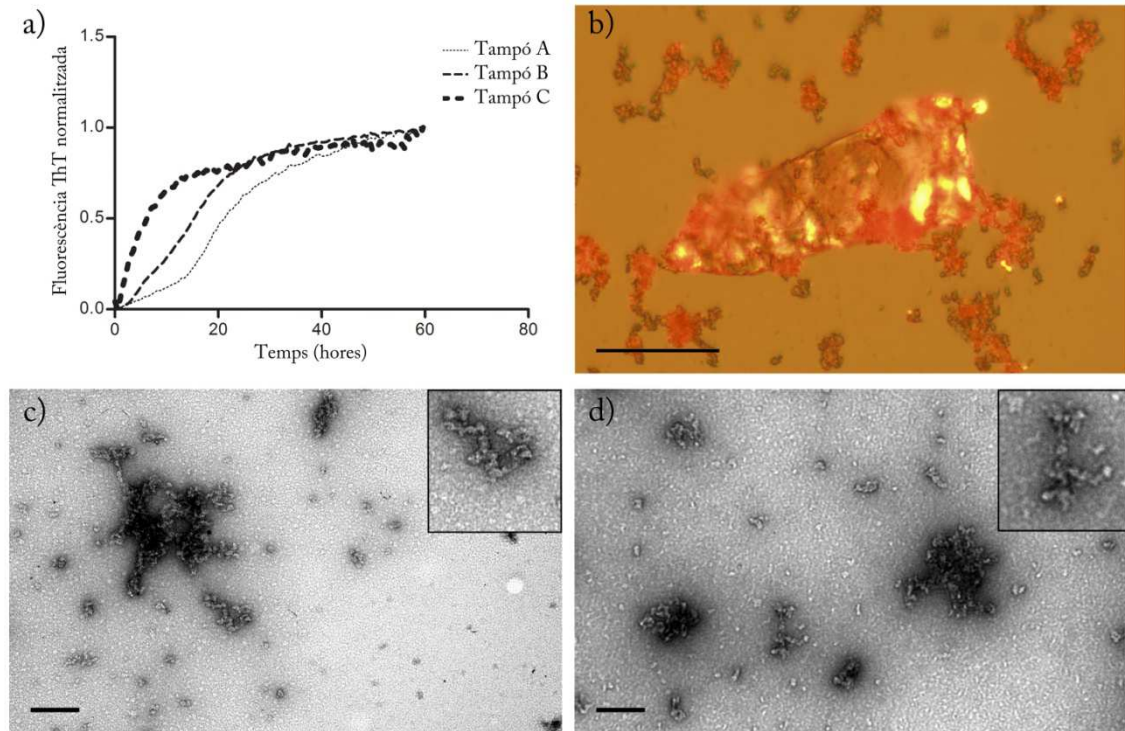
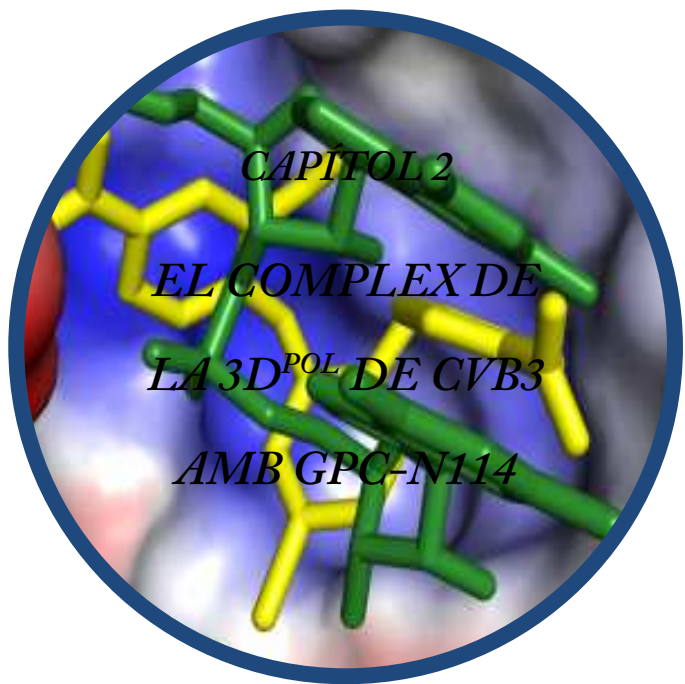


Figura 27. La $2B^{sol}$ forma fibres amiloides *in vitro*. (a) Cinètica d'agregació de Thioflavina-T a $37^{\circ}C$ en condicions properes a les fisiològiques (tampons A i B) i en les de cristal·lització (tampó C). (b) Tinció amb Congo que desprèn una birefringència groga, típica de polaritzadors creuats. (c i d) Fotografies de tinció negativa on s'observen fibres de la $2B^{sol}$ a $37^{\circ}C$ en el tampó A (c) i el tampó C (d). Escala: 200nm.



CAPÍTOL 2

EL COMPLEX DE

LA 3D^{POL} DE CVB3

AMB GPC-N114

3.2 CAPÍTOL 2: EL COMPLEX DE LA 3D^{pol} DE CVB3 AMB GPC-N114

Aquest capítol presenta els resultats estructurals del complex de la 3D^{pol} de CVB3 amb l'inhibidor no anàleg a nucleòtid GPC-N114. També recull els resultats dels assajos d'activitat antiviral realitzats als laboratoris del Dr. Frank M. van Kuppeveld, Universitat d'Utrecht (Utrecht, Holanda) i el Dr. Bruno Canard (AFMB-UMR, Marsella, França) col·laboradors d'aquest treball. Es prengué el CVB3 com a membre representatiu dels enterovirus.

Els primers treballs estructurals de la 3D^{pol} de CVB3 es van dur a terme al grup del Dr. Bruno Canard a Marsella i, en paral·lel, al grup del Dr. Olve Peersen a Colorado (Campagnola et al., 2008; Gruez et al., 2008). Els protocols d'obtenció i purificació de la 3D^{pol} que s'han fet servir en aquest treball deriven del treball original del grup del Dr. Bruno Canard (veure apartat 6.2.2.2).

3.2.1 Estudi de l'activitat antiviral de GPC-N114 a CBV3

Els estudis d'activitat antiviral del GPC-N114, amb una activitat selectiva i potent envers CBV3, que les nostres col·laboradores Lonneke van der Linden (Utrecht) i Barbara Selisko (Marsella) van dur a terme indicaren una EC_{50}^2 de $0.15 \pm 0.02 \mu\text{M}$. L'efecte inhibidor màxim es troba a $3 \mu\text{M}$, però tot i així no hi ha una inhibició total de la replicació del virus fins a concentracions de $10 \mu\text{M}$ o més altes (Figura 28a i b). Per determinar quin és el pas del cicle de replicació afectat es realitzaren assajos d'expressió de luciferasa associada a la poliproteïna. Els resultats indicaren que fins les dues hores, quan la traducció té lloc, els nivells d'expressió eren comparables en absència o presència de GPC-N114, però, passat aquest temps, els nivells en cèl·lules tractades disminuïen respecte les no tractades. Així, l'efecte del GPC-N114 afectava el pas de replicació en el cicle viral (veure Figura 28c). Assajos d'uridilació de VPg mostraren que l'inhibidor no

² Concentració d'inhibidor que permet reduir en un 50% el efectes citopàtics provocats pel virus.

la inhibia, de manera que el GPC-N114 afectava exclusivament el procés d'elongació de l'ARN.

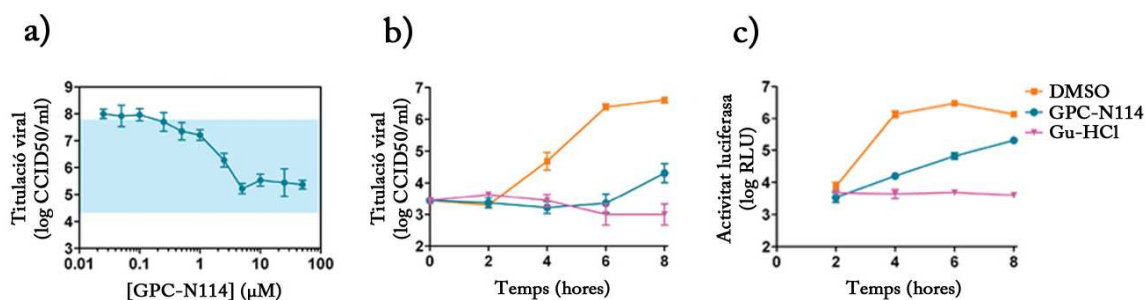


Figura 28. El GPC-N114 inhibeix la replicació de CBV3. Activitat antiviral de GPC-N114 contra CBV3. Cèl·lules BGM(cèl·lules de ronyó de *Chlorocebus sabaesus*) van ser infectades amb un MOI (multiplicitat d'infecció) de 0.1. Immediatament després de la infecció es va tractar el cultiu amb GPC-N114 a les concentracions indicades (a) o a 10µM (b). (c) Mesura dels nivells de luciferasa a diferents temps per determinar el nivell de replicació i traducció. També es tractaren cultius amb DMSO (control negatiu) i GuGCl (control positiu).

3.2.2 Cristal·lització del complex de la 3D^{pol} amb GPC-N114

Malgrat la co-cristal·lització de la polimerasa i l'inhibidor es va intentar a diferents condicions de cristal·lització, temperatures, temps d'incubació i concentracions de GPC-N114, només s'obtingueren gotes amb precipitat. El complex amb l'inhibidor s'obtingué per immersió dels cristalls obtinguts de la proteïna WT en la solució de cristal·lització (50mM Tris pH7.5, 24.5% (w/v) glicerol i 1.29M sulfat amònic) amb una concentració de l'inhibidor a 10mM durant 72 hores. Tot i que a la gota d'immersió s'obtingué precipitat i a les parets dels cristalls aparegueren estries, aquests van resistir el tractament i la seva difracció va generar grups de dades suficients per a resoldre l'estructura (Figura 29).

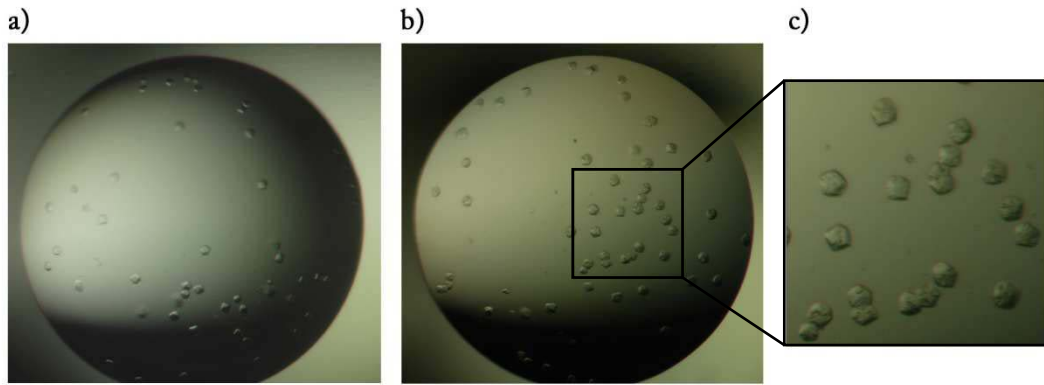


Figura 29. Imatges de cristalls de la 3D^{pol} WT. (a) Cristalls en bon estat. (b) Cristalls esquerdat, aspecte que presentaven després de la immersió amb la solució d'inhibidor. (c) Ampliació on es pot apreciar el mal estat dels cristalls. La mida dels cristalls és d'aproximadament 50µm x 50µm x 50µm.

3.2.3 Difracció de raigs X i resolució de l'estructura tridimensional

Es difractaren els cristalls a la línia ID29 de l'*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF), Grenoble, França. Es recolliren i processaren dades de molts cristalls amb diferents condicions d'immersió amb l'inhibidor. La determinació de les fases es realitzà mitjançant un reemplaçament molecular utilitzant el model de la 3D^{pol} nativa de CVB3 (codi d'accés a la base de dades PDB: 3DDK). Com que les cel·les cristal·lines del complex 3D^{pol} amb GPC-N114 i de la 3D^{pol} nativa eren gairebé idèntiques, un refinament de cos rígid va ser suficient per ajustar el model a la nova cel·la i calcular els mapes de diferències.

Paràmetres de recollida i estadística de processat		Estadístiques de refinat de les estructures	
Línia de recollida		Resolució (Å)	72.36-2.9
λ (Å)	0.97	Rwork (%)	21.7
Grup espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2	Rfree (%)	23.2
Cel·la unitat		Nombre d'àtoms/residus	
a, b, c (Å)	74.7, 74.7, 289.1	Proteïna	3746
α , β , γ (°)	90, 90, 90	Lligands	80
Resolució (Å)	72.4-2.9 (3.05-2.9)	Aigua	25
Reflexions totals/úniques	141404/32777	Factor B (Å)	41.7
Multiplicitat	3.6 (3.6)	Rmsd Longitud d'enllaç	0.008
Completesa (%)	99.8 (99.3)	Rmsd Angle d'enllaç	1.087
Rmerge (%)	8.1 (45.0)	Diagrama de Ramachandran	
I/ σ (I)	7.6 (17.4)	Residus en regions preferents	370 (89.8%)
		Residus en regions permeses	42 (10.2%)

Taula 5. Paràmetres i estadística de la recollida, el processat i refinament de les dades de la 3D^{pol} de CVB3. Els valors entre parèntesi dels paràmetres de recollida i estadística del processat representen els valors de l'última capa de resolució. Les definicions dels paràmetres R estan especificades als apartats 6.2.6 i 6.2.8 de materials i mètodes.

Els mapes de densitat electrònica $2|F_o|-|F_c|$ i $|F_o|-|F_c|$, calculats a 2.9Å, permeteren posicionar una molècula de GPC-N114 en una cavitat localitzada a la paret inferior del canal d'entrada del motlle, imitant la posició del nucleòtid acceptor que hauria d'aparellar-se amb el nucleòtid entrant. L'omissió de la molècula d'inhibidor en diversos cicles de refinat i el càlcul posterior del mapes permeté verificar la seva posició i els contactes amb els diferents aminoàcids de la cavitat (Figura 30).

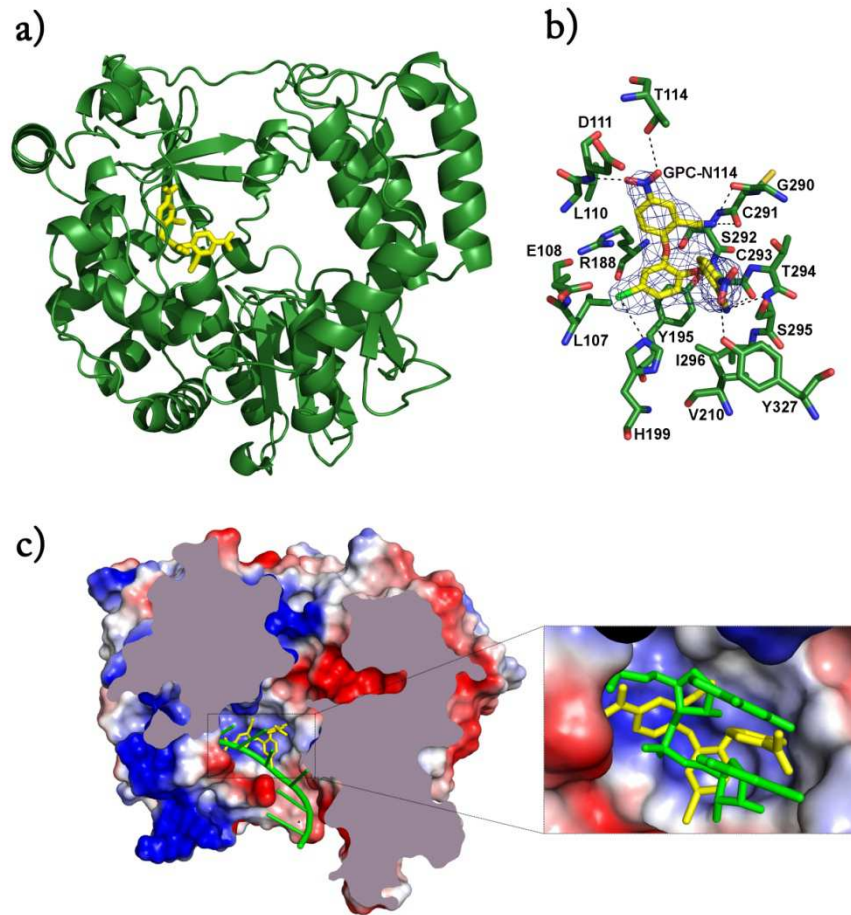


Figura 30. El lloc d'unió de GPC-N114 a CVB3. (a) Model de la unió al canal del motlle de la 3D^{pol} de CBV3 (verd) de l'inhibidor GPC-N114 (groc). (b) Xarxa d'interaccions entre el GPC-N114 i la cavitat d'unió. La densitat electrònica apareguda al mapa d'omissió $|F_o| - |F_c|$ està representada per una malla de color blau. Els ponts d'hidrogen estan senyalats amb línies discontinües. (c) Secció lateral de la superfície de la 3D^{pol} amb potencial electrostàtics (blau negatiu i vermell positiu). L'augment mostra la posició equivalent de l'inhibidor i el motlle (verd) a la cavitat.

L'inhibidor pren una conformació de mitja lluna que encaixa perfectament amb la cavitat. Aquesta cavitat està formada pels residus L107, E108, L110, D111, T114 del motiu G; R188, Y195, H199 de motiu F; T294, S285, I296 del motiu B i Y327 del motiu A. Molts d'aquests residus estan conservats en les polimerases de picornavirus, veure Figura 31. De tots els contactes establerts, la interacció per apilament aromàtic entre el residu Y195 i l'anell clorofenol central del GPC-N114 sembla jugar un paper important en la unió. El primer anell 2-ciano-4-nitrofenil està orientat cap als residus

dels motius B i G, mentre que el segon està parcialment exposat al solvent ocupant la posició esperada per al motlle.

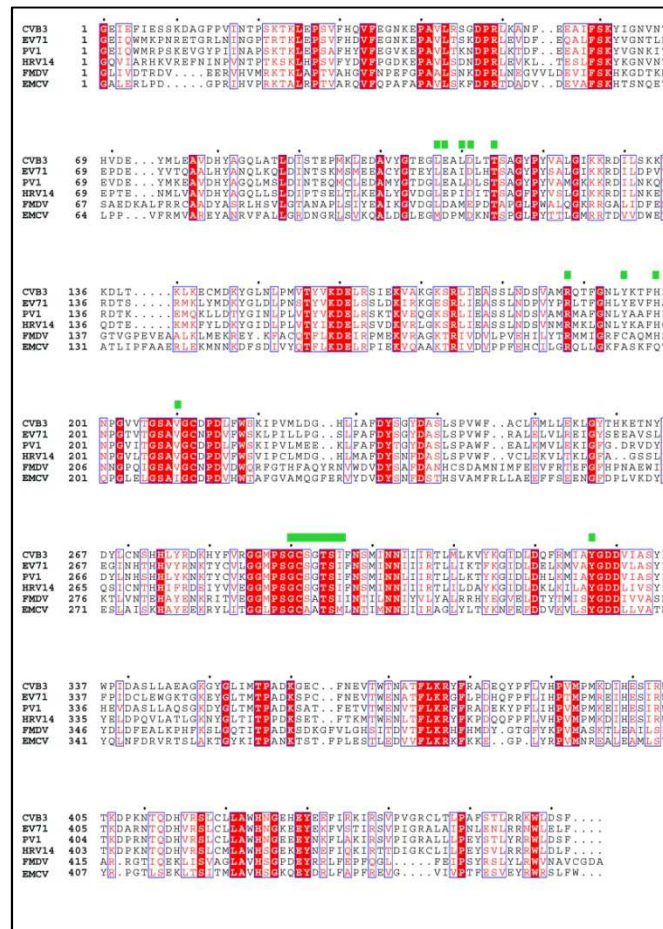


Figura 31. Alineament de seqüència de 3D^{pol} de Picornavirus. Els residus estrictament conservats s’assenyalen en quadres vermells i els similars en quadres blaus. Els residus que interaccionen amb el GPC-N114 estan marcats amb quadres verds.

3.2.4 El GPC-N114 competeix amb el dúplex motlle-encebador

El lloc d’unió del GPC-N114 coincident amb el del motlle suggerí estudiar la possible competició entre l’inhibidor i el dúplex motlle-encebador. Al laboratori del Dr. Bruno Canard es realitzaren experiments de competició segons ordre d’addició amb un resultat positiu: l’inhibidor afegit abans que el dúplex presenta una IC₅₀ 12 vegades més baixa que quan s’afegeix després (Figura 32). Per tant, podríem dir que el GPC-N114

interfereix amb el correcte posicionament del dúplex motlle-encebador bloquejant la síntesi d'ARN.

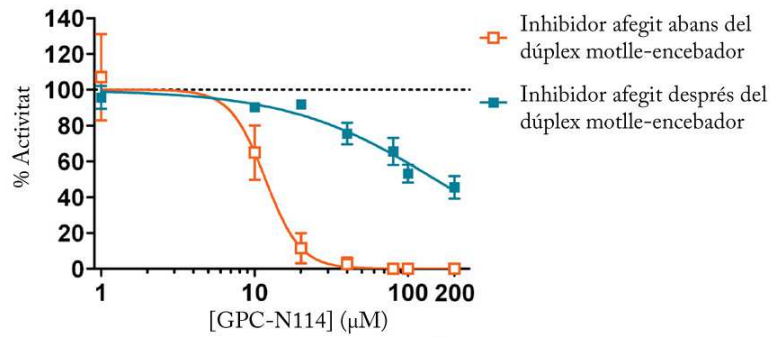
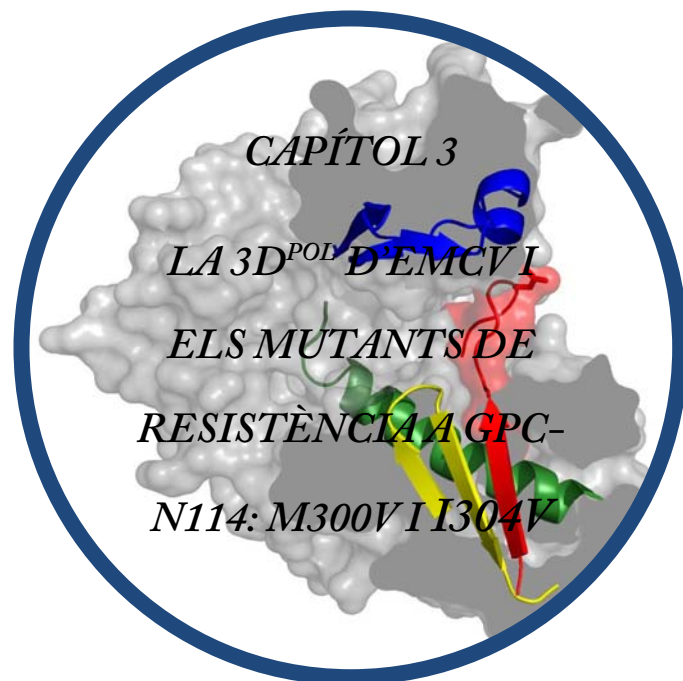


Figura 32. El GPC-N114 impedeix l'activitat de la 3D^{pol} de CVB3 per competició amb el dúplex motlle-encebador. Mesura de l'activitat d'elongació segons l'ordre d'addició del GPC-N114 i el dúplex motlle-encebador (poli(rA)/dT15).



3.3 CAPÍTOL 3: LA 3D^{pol} D'EMCV I ELS MUTANTS DE RESISTÈNCIA A GPC-N114: M300V I I304V

En l'avaluació de l'efecte antiviral del GPC-N114, s'escollí l'EMCV com a representant del gènere cardiovirus. En aquest cas, el tractament amb l'inhibidor determinà l'aparició de dos soques resistents amb una mutació a la 3D^{pol}. En aquest capítol es mostren els resultats de l'estudi estructural de la 3D^{pol} d'EMCV, de la qual encara no se'n coneixia l'estructura, i dels mutants M300V i I304V resistents a GPC-N114. L'obtenció de complexos d'aquestes proteïnes amb el GPC-N114 no fou possible malgrat els esforços dedicats.

3.3.1 Activitat de la 3D^{pol} recombinant *in vitro*

Prèviament als assajos d'inhibició i a l'estudi estructural es comprovà com es comportava *in vitro* la proteïna 3D^{pol} de EMCV pel que feia a la seva activitat. Els estudis d'elongació de la polimerasa de EMCV i d'uridilació de la VPg van ser realitzats al laboratori del Dr. Kuppeveld. Un cop les condicions òptimes per a l'assaig d'elongació van ser trobades (50mM MOPS pH 7.0, 10mM KCl, 4mM MgCl₂, 9% glicerol, 2μM dT15 anellat amb 350nM poli(rA), 0.5μM 3D^{pol} d'EMCV, 100μM UTP and 2μCi [³H]UTP) la síntesi de dT15-poli(rU) es donà a alta velocitat (Figura 33a). A més, es pogué observar també uridilació en un assaig en presència de VPg purificada i una cadena de poliA (Figura 33b). Aquests resultats demostraren que la 3D^{pol} d'EMCV recombinant era activa *in vitro* i que podia uridilar la VPg.

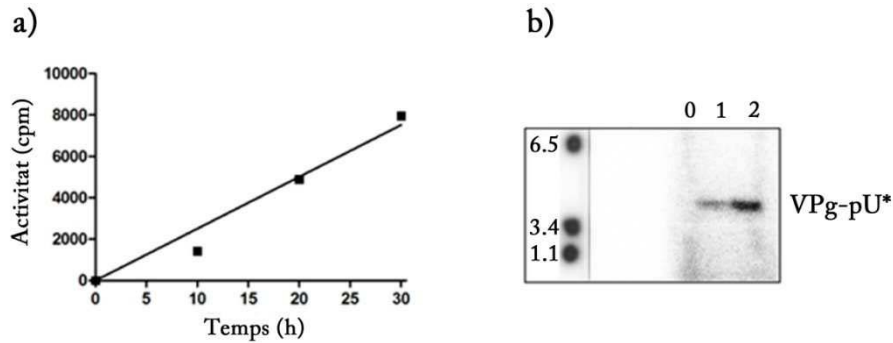


Figura 33. Assajos *in vitro* de l'activitat polimerasa de la 3D^{pol} d'EMCV. (a) Activitat d'elongació de la 3D^{pol} en un tampó 50mM MOPS pH7.0, 10mM KCl, 4mM MgCl₂, 9% (w/v) glicerol, 2μM dT15 anellat amb 350nM poli(rA), 0.5μM 3D^{pol} EMCV, 100μM UTP i 2μCi [³H]UTP. (b) Tris-Tricina-SDS-PAGE de l'assaig d'uridilació per addició de [³²P]UTP a un motlle poli(rA).

3.3.2 Inhibició de la 3D^{pol} de EMCV pel GPC-N114

Com en el cas de CVB3, al laboratori del Dr. Kuppeveld es realitzaren estudis per determinar l'activitat antiviral del GPC-N114 envers EMCV. Aquest inhibidor inhibeix totalment la replicació de EMCV a una concentració de 10μM ($EC_{50}=5.4\pm 0.49 \mu M$) (veure Figura 34a). Com en CVB3, els resultats dels assajos d'expressió de luciferasa associada a la poliproteïna indicaren que el pas afectat del cicle viral és la replicació i no la traducció. (veure Figura 34b).

Després de tres o quatre passis en presència de GPC-N114, a concentracions més baixes de les òptimes, aparegueren dues soques de virus resistents amb una mutació puntual a la 3D^{pol}: M300V i I304V. En el cas de CVB3, amb més de 30 passis no s'obtingué cap soca resistent. Per verificar la resistència del fenotip, es generaren virus mutants amb aquestes mutacions a la 3D^{pol}. Els fenotips mutats presentaren un increment dramàtic de la EC_{50} : passaren de $5.44\pm 0.49\mu M$ a més de 100μM i els títols de virus obtinguts després de 8h amb 10 μM de GPC-N114 no es van veure afectats, indicant que eren resistents al compost (veure Figura 34c i d).

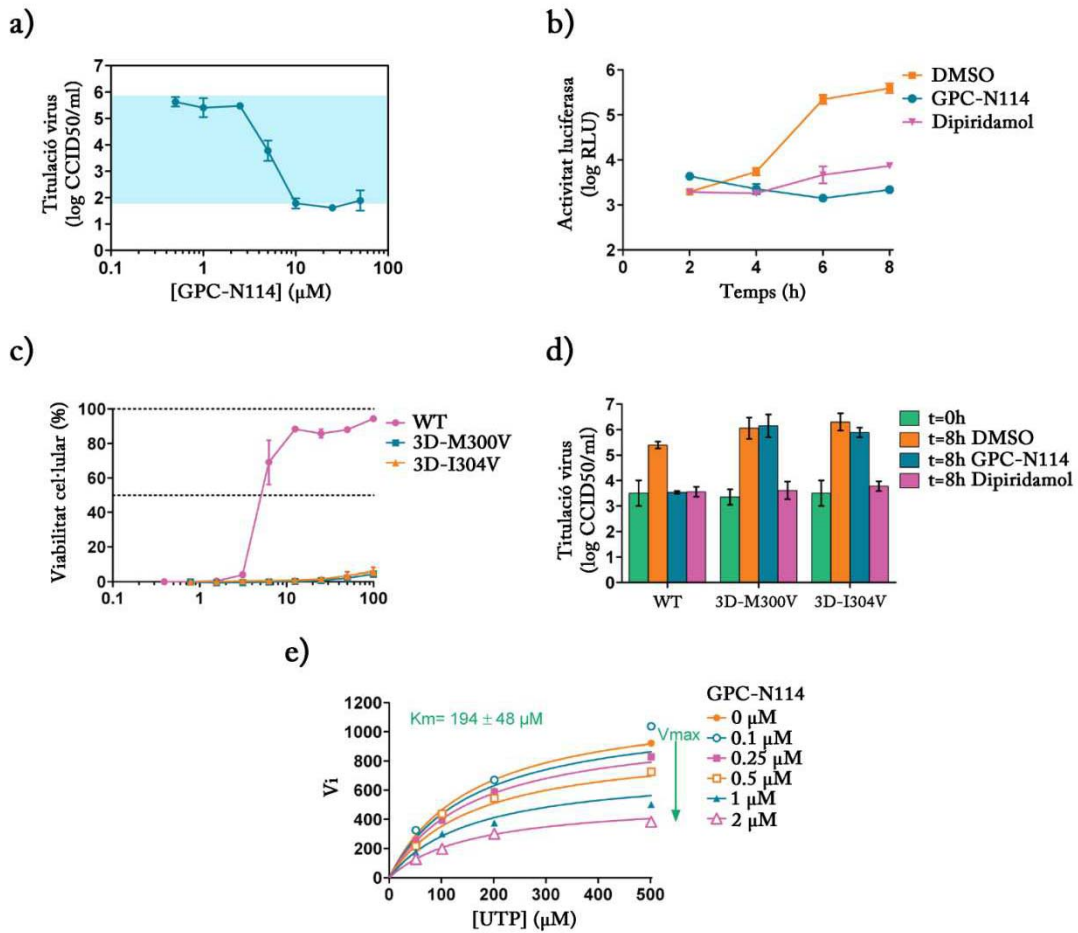


Figura 34. El GPC-N114 inhibeix la replicació d'EMCV i genera l'aparició de mutants de resistència. (a) Activitat antiviral del GPC-N114 a les concentracions indicades en cèl·lules BGM infectades amb un MOI de 0.1. (b) Assaig d'activitat luciferasa associada a la replicació i traducció del virus. L'inhibidor de Cardiovirus Dipiridamol s'incloué com a control. (c) Assaig de reducció d'efecte citopàtic a diferents concentracions i (d) titulació de virus a 8h post-transfecció. El DMSO s'utilitza com a control negatiu. (e) Gràfic Michaelis-Menten de les velocitats d'elongació de la 3D^{pol} mesurades segons l'addició de [³H]UTP usant poli(rA)/dT15 com a motlle-encebador a diferents concentracions d'UTP i de GPC-N114.

La localització de les mutacions suggerí que la diana d'acció del GPC-N114 era la 3D^{pol}. Assajos d'elongació quantitativs, segons la taxa d'incorporació de [³H]UTP a un primer amb motlle poliA, indicaren la inhibició de la 3D^{pol} dependent de la dosi de GPC-N114 (veure Figura 34e). Tenint en compte diverses mesures de l'activitat d'elongació a diferents concentracions d'UTP i inhibidor se n'extragué una constant d'inhibició (K_i)

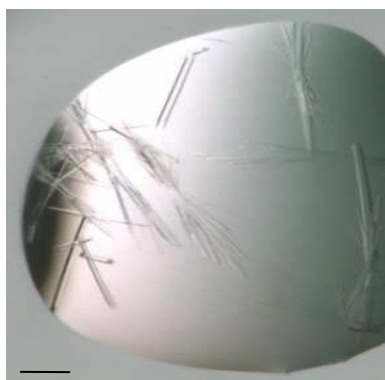
de $1.3\mu\text{M}$. En canvi, als mutants M300V i I304V la K_i era de $26.9\mu\text{M}$ i $10.3\mu\text{M}$ respectivament. Així, la inhibició de l'activitat d'elongació de la 3D^{pol} provocada pel GPC-N114 és contrarestada pels mutants.

3.3.3 Cristal·lització de la 3D^{pol} d'EMCV

La polimerasa es cristal·litzà utilitzant el mètode de difusió de vapor en gota assegurada. En primer lloc es va realitzar un cribatge de condicions a 4 i 20°C en plaques de 96 pous i gotes de 200nl mitjançant robot on la solució proteïna a 10mg/ml (50mM Tris pH 8.0, 500mM NaCl, 10% (w/v) glicerol, 1mM DTT i 1mM EDTA) era mesclada a volums iguals amb la solució de cristal·lització i el volum de reservori eren 100 μl .

En el cas de la 3D^{pol} WT s'obtingueren dos tipus de cristalls en dues condicions diferents. La primera forma cristal·lina (I4_122 , anomenada així per la simetria que adopta el cristall) aparegué a 4°C i una solució de 10% PEG 6K i 2M NaCl, però la optimització només es pogué dur a terme en plaques de 96 pous a un volum màxim de gota de 400nl (Figura 35a). La segona forma (C2) aparegué a 20°C i s'optimitzà en plaques de 24 pous en gotes de 2 μl a volums iguals de solució de proteïna i de la solució de cristal·lització 4M acetat d'amoni i 0.1M acetat de sodi pH 4.6 (Figura 35b).

a)



b)

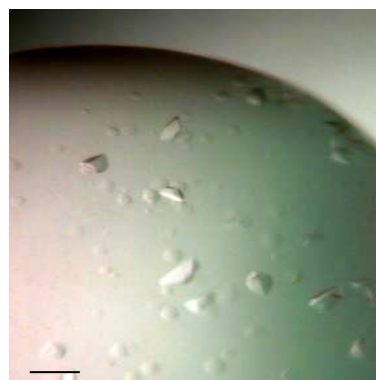


Figura 35. Cristalls de la 3D^{pol} EMCV WT. (a) Gota del 400nl de la forma I4_122 , obtinguda a 4°C i 10% PEG 6K i 2M NaCl. (b) Gota d'1 μl de la forma C2, obtinguda a 20°C i 4M acetat d'amoni i 0.1M acetat de sodi pH 4.6. Les barretes corresponen a 50 μm .

3.3.4 Difracció de raigs X i resolució de l'estructura tridimensional

Les dades de difracció es recolliren a la línia XALOC del sincrotró ALBA-CELLS (Barcelona).

En el cas de la 3D^{pol} WT, les dues formes cristal·lines van ser difractades, obtenint grups espacials diferents. La forma I4₁22 difractà fins a una resolució de 2.15Å, en canvi, la C2 arribà fins a una resolució de 2.8Å. En ambdós casos les imatges van ser processades mitjançant XDS (Kabsch, 2010) i escalades amb Scala (Evans, 2006).

Les fases van ser calculades mitjançant reemplaçament molecular amb PHENIX (McCoy et al., 2007) usant com a model un model d'homologia de la 3D^{pol} d'EMCV generat pel *Swiss Model Server* (Arnold et al., 2006; Peitsch, 1995) basat en l'estructura de la 3D^{pol} de FMDV (codi d'accés a la base de dades PDB: 1U09), que presenta el grau similitud més alta a nivell de seqüència (veure Figura 31). Les formes I4₁22 i C2 presenten dos grups espacials diferents, com el seu nom indica. El reemplaçament molecular indicà que els cristalls C2 contenen 6 molècules independents a la unitat asimètrica, en canvi, els I4₁22 només hi contenen una molècula.

Els models inicials van ser sotmesos a múltiples cicles de refinaments alternant la reconstrucció manual en COOT (Emsley and Cowtan, 2004) i el refinament automàtic amb Refmac5 (Murshudov et al., 1997).

	I4 ₂₂	C2		I4 ₂₂	C2
Paràmetres de recollida i estadística de processat			Estadístiques de refinat de les estructures		
Línia de recollida	XALOC (ALBA)	XALOC (ALBA)	Resolució (Å)	43.15-2.15	48.97-2.8
λ (Å)	0.98	0.98	Rwork (%)	22.9	24.7
Grup espacial	I4 ₂₂	C2	Rfree (%)	25.2	25.8
Cel·la unitat	Nombre d'àtoms/residus				
a, b, c (Å)	122.6, 122.6, 189.8	230.4, 140.8, 170.6	Proteïna	3697	22105
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 125.9, 90	Lligands	23	61
Resolució (Å)	43.1-2.15 (2.27-2.15)	49.3-2.8 (2.95- 2.8)	Aigua	110	85
Reflexions tots/úniques	201287/40499	250575/107270	Factor B (Å)	32.2	48.4
Multiplicitat	5.0 (5.0)	2.3 (2.3)	Rmsd Longitud d'enllaç	0.004	0.004
Completesa (%)	98.4 (98.3)	98.9 (99.2)	Rmsd Angle d'enllaç	0.887	1.050
Rmerge (%)	9.0 (77)	5.0 (56)	Diagrama de Ramachandran		
I/ σ (I)	13.1 (2.8)	10.2 (1.8)	Residus en regions preferents	438 (96.7%)	2544 (94.9%)
			Residus en regions permeses	15 (3.3%)	137 (5.1%)

Taula 6. Paràmetres i estadística de la recollida, el processat i refinament de les dades de la 3D^{pol} d'EMCV. Els valors entre parèntesi dels paràmetres de recollida i estadística del processat representen els valors de l'última capa de resolució. Les definicions dels paràmetres R estan especificades als apartats 6.2.6 i 6.2.8 de materials i mètodes.

Els mapes de densitat electrònica obtinguts dels dos tipus de cristalls van permetre modelar tots els residus de la 3D^{pol} de EMCV: de laGly1 al Trp460. La polimerasa presenta la clàssica conformació de mà dreta tancada amb els subdominis del polze, el palmell i dits (Figura 36).

3.3.5 L'estructura de la 3D^{pol} d'EMCV

La polimerasa 3D d'EMCV presenta, com era d'esperar, unes característiques generals molt semblants a les descrites per les altres 3D^{pol} de picornavirus. El subdomini dels dits

es pot dividir en dues parts: la interna, que envolta i s'empaqueta al costat del subdomini del palmell i que està formada per una troca d'hèlixs alfa ($\alpha 1-4$, $\alpha 6$, $\alpha 8$ i $\alpha 9$), i l'externa, que projecta fora del palmell rica en cadenes beta ($\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 7$, $\beta 9$ i $\beta 10$) (Figura 36). El llarg *loop* format per les cadenes $\beta 5$ i $\beta 7$ (residus del 151 al 179) juntament amb l'extrem N-terminal (1-65) s'extenen des del subdomini dels dits fins al del polze formant les anomenades puntes dels dits. En aquesta regió s'hi troben diversos residus hidrofòbics que són els responsables d'establir les connexions entre els dits i el polze. Per exemple, els residus Val24 i Phe29 de l'extrem N-terminal s'insereixen dins les hèlixs $\alpha 12$ i $\alpha 14$ i la Leu162 de la regió $\beta 5-\beta 7$ participa d'una agrupació hidrofòbica amb diversos residus de l'hèlix $\alpha 13$. D'altra banda, a la regió $\beta 5-\beta 7$ també s'hi troba el motiu conservat F que conté residus carregats positivament i forma el sostre del canal d'entrada de nucleòtids. També dins el subdomini dels dits, el *loop* connector de les hèlixs $\alpha 3$ i $\eta 2$ conté el motiu G (110-120) que forma l'entrada del canal del motlle (Figura 36).

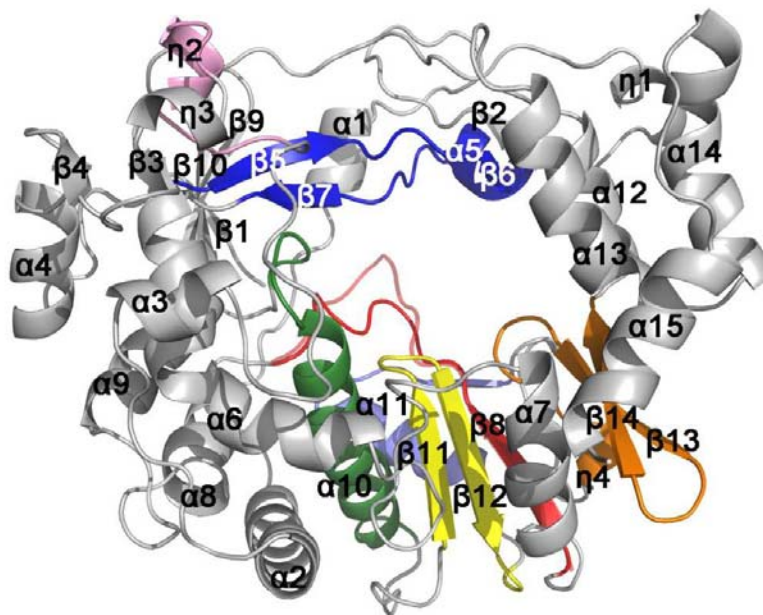


Figura 36. Estructura tridimensional de la $3D^{pol}$ d'EMCV. Els motius conservats en $3D^{pol}$ també són presents en aquesta estructura: A (vermell), B (verd), C (groc), D (violeta clar), E (taronja), F (blau) i G (rosa). El motiu A presenta dues conformacions la de la forma $I4_{122}$ (vermell clar) i la de la forma C2 (vermell fosc).

El domini del palmell de la 3D^{pol} d'EMCV consisteix en una fulla beta central de tres cadenes ($\beta 8$, $\beta 11$ i $\beta 12$) situada entre les hèlixs $\alpha 7$ i $\alpha 11$ seguida de les cadenes beta $\beta 13$ i $\beta 14$ que formen la interfase entre el palmell i el polze i inclouen el motiu E. La cadena $\beta 8$ forma el motiu A i conté els residus conservats Asp235 i Asp240. L'Asp240 juntament amb l'Asn302, també conservada (hèlix $\alpha 10$), s'han descrit com a fonamentals en la selecció de rNTPs per davant dels dNTPs mitjançant un pont d'hidrogen amb el grup hidroxil 2' del nucleòtid entrant. En l'estructura, estan units per el pont d'hidrogen ja descrit en altres 3D^{pol} de picornavirus. L'hèlix $\alpha 10$ i el *loop* N-terminal que l'uneix amb la $\beta 10$ formen el motiu B. Aquest motiu conté, a més de l'Asn302 mencionada abans, els residus estrictament conservats Gly289, Ser293, Gly294 i Thr298 que estan implicats en la unió del motlle i dels nucleòtids entrants, tal com s'ha vist a les estructures de complexos catalítics de 3D^{pol} d'altres picornavirus. L'hèlix $\alpha 10$ està empaquetada al costat de la fulla beta del centre catalític, format pels motius A i C. El motiu C està localitzat al gir format per la $\beta 11$ i la $\beta 12$ i conté la seqüència Gly332-Asp333-Asp334 (GDD) conservada gairebé universalment en les RdRps. Els ions metàl·lics implicats en la reacció de catàlisi interaccionaran amb els àcids aspàrtics 235 i 333 dels motius A i C. L'hèlix $\alpha 11$ juntament amb el *loop* que el segueix, C-terminal ($\alpha 11$ - $\beta 13$), conformen el motiu D que recolza la fulla beta central.

El subdomini del polze està format per les hèlixs $\alpha 12$ - $\alpha 15$ formant una troca. La mida reduïda d'aquest subdomini permet la formació d'un gran canal localitzat al centre de la molècula típic de les RdRps dependents d'encebador. L'extrem C-terminal de l'hèlix $\alpha 15$ està ancorat al domini del palmell mitjançant interaccions hidrofòbiques entre la Phe459 amb la Val 216 de l' $\alpha 7$ i la Leu390 del motiu E. El residu Trp460, del qual s'havia descrit que establia un contacte funcional amb els dominis del polze i el palmell (Dmitrieva et al., 2007), es troba exposat al solvent i, al cristall, en algunes molècules participa en interaccions amb 3D^{pol} veïnes.

Les sis molècules presents a la unitat asimètrica de la forma cristal·lina C2, malgrat alguns *loops* no queden del tot ben definits en alguna molècula, presenten una

conformació gairebé idèntica quan es realitza una superposició de tots els carbonis alfa ($\text{rmsd}=0.5\text{\AA}$).

La superposició de les estructures obtingudes dels dos grups espacials, C2 i I4₁₂₂, amb un $\text{rmsd}=1.1\text{\AA}$ també ens indica que ambdues són molt semblants. No obstant, l'estructura de la forma cristal·lina I4₁₂₂ presenta un canvi conformacional important al centre actiu (Figura 37). Aquesta reorganització afecta principalment al *loop* format pels residus Tyr236 a Ala246 del motiu A. Aquest *loop* conté l'Asp240 que es troba desplaçat 10 Å respecte la seva posició esperada al centre actiu en direcció al canal d'entrada dels nucleòtids quedant totalment exposat al solvent (Figura 37b i d). La nova conformació del *loop* està estabilitzada mitjançant una interacció π -catió entre l'anell de la Phe239 i el grup amino de la Lys56, localitzada a la hèlix α 1 al subdomini dels dits, i dues fortes interaccions hidrofòbiques amb la Lys172 i la Arg163 del motiu F (Figura 37b). Les interaccions que s'estableixen entre la cadena lateral de la Thr242 amb l'Asn60 i les cadenes principals de la His243 amb la Leu291 i l'Asn306 també contribueixen a l'estabilitat d'aquesta conformació.

L'espai generat com a conseqüència del desplaçament és ocupat per les cadenes laterals de residus de l'entorn que han canviat la seva orientació, com per exemple l'Asn302 o l'Asn306, i per una glutamina provinent del tampó d'equilibrat de la membrana del concentrador. La proteïna que s'utilitzà per crear ambdues formes cristal·lines, I4₁₂₂ i C2, seguí el mateix protocol de concentració, però en l'estructura del C2 no apareix cap molècula de glutamina (veure apartat 6.2.2.3 de materials i mètodes).

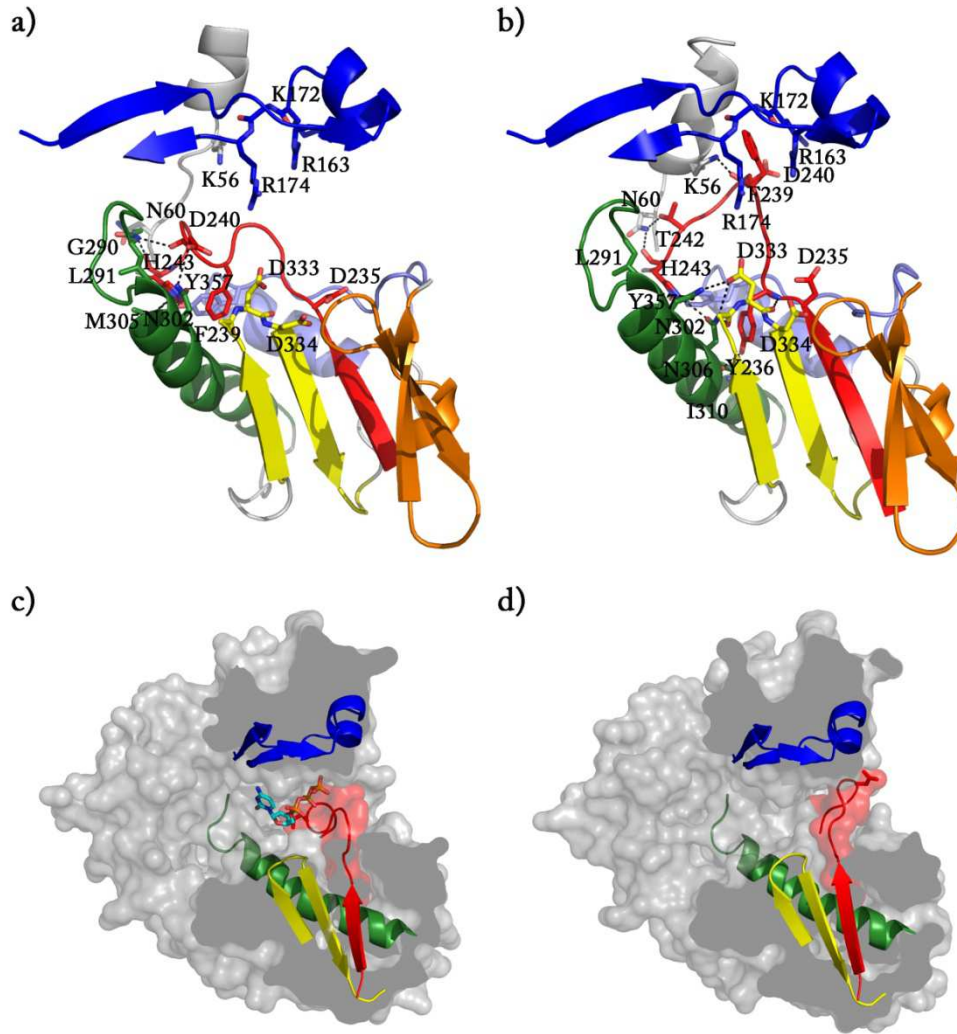


Figura 37. Centre actiu amb (a) conformació estàndard, forma C2 i (b) conformació alterada, forma I4₁₂₂. Els residus implicats en l'estabilitat de cada conformació estan representats amb pals i etiquetats. Representació de superfícies de la 3D^{pol} d'EMCV en la conformació estàndard (c) i l'alterada (d) amb els motius implicats en el reconeixement de nucleòtids i catàlisi de la síntesi marcats. Un nucleòtid entrant està representat en (c), però en la conformació alterada, el desplaçament del motiu A n'impediria l'entrada.

L'estructura I4₁₂₂ presenta també altres canvis conformacionals que semblen estar directament relacionats amb aquest canvi del motiu A. Concretament, s'observen canvis a la regió C-terminal de $\alpha 1$ i al *loop* $\alpha 1$ - $\alpha 2$ (residus 54-63) que es manté en contacte amb el motiu A malgrat el seu desplaçament. D'altra banda, també s'han observat diferències

importants a l'extrem N-terminal de la proteïna. A les sis molècules de 3D^{pol} resoltes a partir del grup espacial C2, la Gly1 es troba enterrada dins el domini dels dits participant de la xarxa de ponts d'hidrogen que connecta els dits amb l'Asp240 del motiu A. Aquesta xarxa es troba a totes les estructures de RdRps conegudes fins al moment i s'ha descrit que és essencial per mantenir el correcte posicionament de l'Asp240 al centre actiu i per l'activitat de l'enzim (Thompson & Peersen 2004). A l'estructura I4₁₂₂, la Gly1 presenta una orientació completament exposada i la xarxa de ponts d'hidrogen totalment alterada (Figura 38).

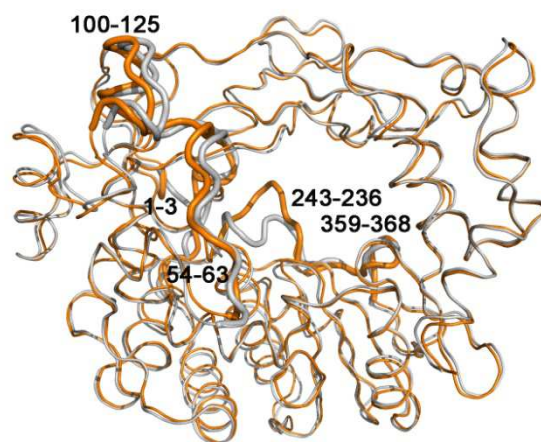


Figura 38. Superposició de les dues conformacions de la 3D^{pol} de EMCV. S'enumeren les regions de residus que presenten més diferències entre la conformació C2 (gris) i la I4₁₂₂ (taronja).

Al marge dels canvis conformationals esmentats fins ara, directament relacionats amb la reorganització del motiu A, l'estructura I4₁₂₂ presenta també altres canvis que impliquen a regions essencials pel funcionament de la polimerasa. El primer, a la regió Leu99-Val125, inclou el motiu G i els seus aminoàcids conservats Gly112 i Pro114, que s'han vist implicats en la unió del motlle i la translocació de la cadena durant la síntesi en estructures de complexes catalítics. El segon, dins el motiu D, inclou els residus Ile359 a Pro369 (Figura 38). No és estrany que aquestes regions presentin canvis

conformacionals perquè són flexibles per poder adaptar-se al moviment de l'ARN durant la síntesi.

3.3.6 Avaluació de l'estabilitat del motiu A en les conformacions estàndard i alterada

Al laboratori del Dr. Oliva es realitzaren estudis computacionals de l'estabilitat basada en potencials de les dues conformacions del motiu A de la 3D^{pol} d'EMCV amb el programa Prosa2003 (Sippl, 1993; Wiederstein and Sippl, 2007). Aquest programa analitza la qualitat de les interaccions entre residus (*potencial parella*) i del residus amb el solvent (*potencial superfície*) i es representa amb un valor Z. La combinació d'ambdós potencials dóna una idea de l'estabilitat general de l'estructura que s'està analitzant.

En comparació, les dues formes del motiu A (residus 237 a 243) presenten un valor Z combinat igual: -13.53. En canvi, si es comparen els valors Z dels potencials de parella i superfície per separat es pot veure que en el cas de I4₁₂₂ són -10.64 i -9.92 respectivament i que per la forma C2 són -10.45 i -10.03 respectivament. Per tant, la forma I4₁₂₂ és més estable a nivell de conformació interna (el valor Z és més alt respecte C2), però menys estable en la interacció amb el solvent (el valor Z és més baix respecte C2).

Per entrar més en detall, es van analitzar els efectes de la mutació puntual de cada residu de l'entorn proper al motiu A per tots els residus possibles. La comparació dels valors Z combinats de cada residu mutat respecte el residu original revela en quants casos el canvi estabilitza la posició (ME, mutacions estabilitzadores) i en quants la desestabilitza (MD, mutacions desestabilitzadores). Per conveni, si més d'un 75% (≥ 15) de les substitucions augmenten el valor de Z es considera que el residu és inestable. Tot i que en la majoria de casos les mutacions desestabilitzarien la conformació respecte als residus originals, algunes posicions serien estabilitzades (veure Taula 7). S'analitzaren els residus 1, 50-64 i 237-243. A nivell de potencials de superfície, el residu Lys56 es presenta inestable en les dues conformacions del motiu A. En la conformació I4₁₂₂ també apareixen com a

inestables la Ser237 i la Ser241. En el cas del C2, la Gly1, el D50 i el D240 també presentarien inestabilitat, en el cas de l'últim la qual cosa concordaria amb la reactivitat necessària per intervenir en la catàlisi. En l'anàlisi de l'estabilitat conformacional mitjançant les interaccions entre residus, tan sols la Phe239, en la conformació C2, és inestable. Això indica que la seva posició en el *loop* actiu, C2, no és òptima i la interacció π -catió que estableix en la conformació alterada estabilitzaria l'estructura.

Residu		Potencial Superfície						Potencial Parella					
Nº	Tipus	I4122			C2			I4122			C2		
		ME	MD	N	ME	MD	+	ME	MD	N	ME	MD	N
1	G	0	19	N	17	2	+	3	16	N	1	18	N
50	D	2	17	N	17	2	+	2	17	N	0	19	N
51	E	1	18	N	1	18	N	1	18	N	1	18	N
52	V	5	14	N	14	5	N	4	15	N	3	16	N
53	A	6	13	N	9	10	N	0	19	N	4	15	N
54	F	0	19	N	0	19	N	4	15	N	9	10	N
55	S	6	13	N	3	16	N	8	11	N	6	13	N
56	K	16	3	+	16	3	+	3	16	N	2	17	N
57	H	9	10	N	9	10	N	6	13	N	6	13	N
58	T	0	19	N	0	19	N	1	18	N	1	18	N
59	S	2	17	N	2	17	N	1	18	N	1	18	N
60	N	13	6	N	13	6	N	7	12	N	4	15	N
61	Q	14	5	N	14	5	N	7	12	N	13	6	N
62	E	1	18	N	4	15	N	7	12	N	5	14	N
63	T	9	10	N	9	10	N	12	7	N	5	14	N
64	L	2	17	N	2	17	N	0	19	N	0	19	N
237	S	16	3	+	6	13	N	3	16	N	1	18	N
238	N	12	7	N	12	7	N	1	18	N	2	17	N
239	F	0	19	N	0	19	N	12	7	N	15	4	+
240	D	2	17	N	18	1	+	0	19	N	12	7	N
241	S	16	3	+	12	7	N	1	18	N	5	14	N
242	T	11	8	N	11	8	N	4	15	N	8	11	N
243	H	9	10	N	9	10	N	3	16	N	3	16	N

Taula 7. Resultats de l'anàlisi de mutacions dels residus. Mutació estabilitzadora (ME), mutació desestabilitzadora (MD), efecte no estabilitzador de la mutació (N) i efecte estabilitzador (+).

3.3.7 Cristal·lització i resolució de l'estructura tridimensional de les 3D^{pol} mutants d'EMCV M300V i I304V

Per la cristal·lització dels dos mutants se seguí el mateix procediment que per la 3D^{pol} WT, tant en els criatges com en la optimització. En el cas del mutant M300V s'obtingueren cristalls en les condicions de la forma I4₁22 de la WT amb la mateixa morfologia. Pel mutant I304V aparegueren cristalls en les condicions de la forma C2 de la WT, compartint-ne també la morfologia.

La qualitat de les dades de difracció recollides a la línia XALOC del sincrotró ALBA-CELLS es resumeix a la Taula 8. Els mapes de densitat electrònica $2|F_o|-|F_c|$ i $|F_o|-|F_c|$ es van obtenir directament a partir model WT després d'un refinament de cos rígid per ajustar la posició de les molècules a les noves cel·les cristal·lines que eren gairebé iguals a la del model. Així, pel mutant M300V es va utilitzar el model de la WT dels cristalls de forma I4₁22 i pel mutant I304V el dels cristalls de forma C2, als quals prèviament s'havien substituït els residus mutats per alanina. Les estadístiques del refinat i la qualitat dels models es resumeix a la Taula 8.

	M300V	I304V		M300V	I304V
Paràmetres de recollida i estadística de processat			Estadístiques de refinat de les estructures		
Línia de recollida	XALOC (ALBA)	XALOC (ALBA)	Resolució (Å)	40.0-2.2	47.0-3.2
λ (Å)	0.98	0.98	Rwork (%)	21.9	20.6
Grup espacial	I4 ₁ 22	C2	Rfree (%)	25.5	25.0
Cel·la unitat			Nombre d'àtoms/residus		
a, b, c (Å)	122.6, 122.6, 198.5	232.3, 140.8, 171.8	Proteïna	3711	22088
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 126.0, 90	Lligands	24	61
Resolució (Å)	43.4-2.2 (2.32-2.2)	139-3.2 (Aigua	176	72
Reflexions tots/úniques	34387	255102/73585	Factor B (Å)	31.3	77.9
Multiplicitat	2.8 (2.6)	2.9 (3.0)	Rmsd Longitud d'enllaç	0.004	0.004
Completesa (%)	94.5 (97.4)	99.5 (99.5)	Rmsd Angle d'enllaç	0.876	0.912
Rmerge (%)	9.9 (82.3)	16.8 (56.8)	Diagrama de Ramachandran		
I/ σ (I)	7.3 (22.1)	3.1 (6.4)	Residus en regions preferents	449 (98.1%)	2586 (94.1%)
			Residus en regions permeses	9 (1.9%)	162 (5.9%)

Taula 8. Paràmetres i estadística de la recollida, el processat i refinament de les dades de les 3D^{pol} mutants d'EMCV. Els valors entre parèntesi dels paràmetres de recollida i estadística del processat representen els valors de l'última capa de resolució. Les definicions dels paràmetres R estan especificades als apartats 6.2.6 i 6.2.8 de materials i mètodes.

3.3.8 Les estructures dels mutants de la 3D^{pol} d'EMCV M300V i I304V

Les estructures tridimensionals dels dos mutants són pràcticament idèntiques a la del WT (rmsd=0.4 per les C2 i rmsd=0.2 per les I4₁22) excepte en els residus de les mutacions i el *loop* N-terminal a aquestes (β 10- α 10), veure la figura 39c. Les dues mutacions estan localitzades a l'hèlix α 10 que, juntament amb el *loop* situat al seu extrem N-terminal, formen el motiu B de la 3D^{pol}.

Tot i que es van intentar obtenir co-cristalls de complexes de la 3D^{pol} d'EMCV amb el GPC-N114, tant de la WT com de les mutants, no va ser possible. Les proves

d'immersió dels cristalls en solucions que contenien diferents concentracions de l'inhibidor per obtenir complexos per immersió tampoc van resultar perquè, en el cas dels I4₁₂₂, el cristall es dissolia i, en el cas dels C2, quedaven malmesos però sense contenir l'inhibidor. Per tant, per entendre quin seria el context de l'inhibidor en EMCV i entendre l'efecte de les mutacions V300 i V304 es van realitzar superposicions amb l'estructura del complex de la 3D^{pol} de CVB3 amb el GPC-N114. En el model resultant, la disposició de l'inhibidor no és compatible amb la disposició del *loop* β 10- α 10 en EMCV, com representaria el núvol de densitat groc a la figura 39, ja que el *loop* bloqueja parcialment el seu lloc d'unió. Cal recordar, però, que aquest *loop* és de per si flexible.

El model de la figura 39 també mostra que aquests dos residus, 300 i 304, es troben molt a prop del lloc d'unió del GPC-N114, però sense fer-hi cap interacció directa. L'anàlisi de les interaccions a la zona de les mutacions a la proteïna WT mostra que les cadenes laterals de la Met300 i l'Ile304 estableixen interaccions hidrofòbiques amb Tyr75 (α 2); Phe194, Ala195 i Phe199 (α 6); la Ile210 (*loop* α 6- α 7); Leu251, Phe255 i Phe256 (α 8). En l'estructura dels mutants M300V i I304V les interaccions hidrofòbiques amb l'Ala195, l'Ile210 i la Phe256 desapareixerien o, com a mínim, esdevindrien més febles (Figura 39). D'aquesta manera s'augmentaria la possibilitat de moviment de l'hèlix i, per tant, de *loop* contigu. Als mutants es pot observar una petita distorsió de l'hèlix α 10 generada per un desplaçament del residu Ala297 respecte el WT, el qual estableix encara un pont d'hidrogen amb la Thr298 estabilitzant l'última volta d'hèlix. Aquest fet determinaria encara més flexibilitat al *loop* en qüestió i podríem pensar que facilitaria que aquest es disposés en conformacions incompatibles amb la unió de l'inhibidor.

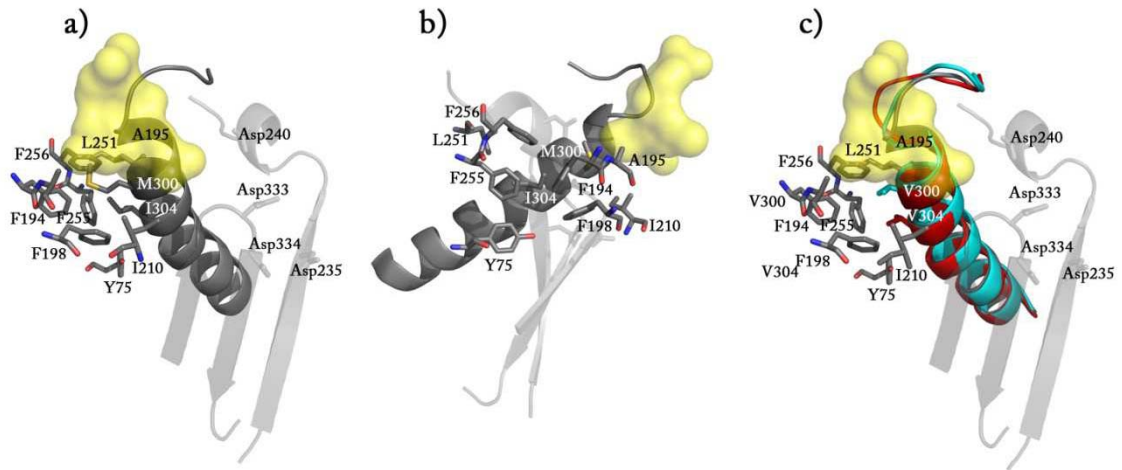
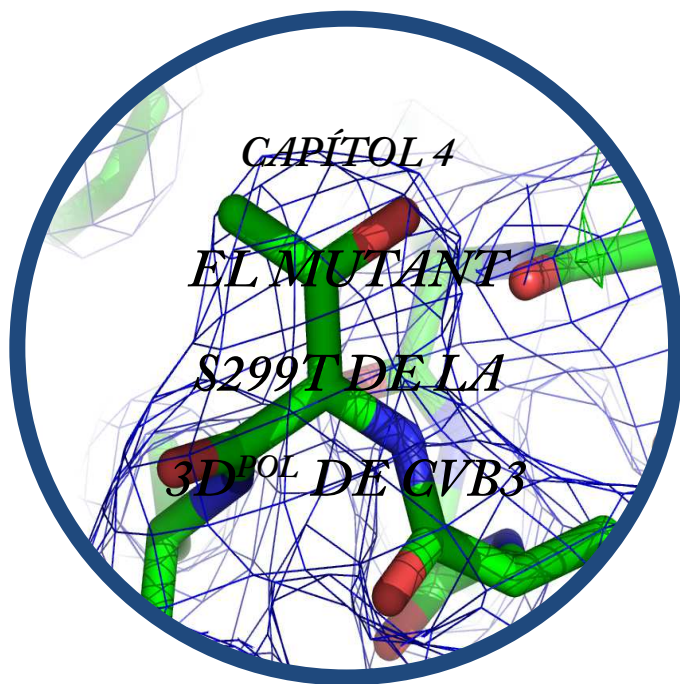


Figura 39. Entorn dels residus 300 i 304 en les 3D^{pol} d'EMCV WT i mutants. (a) Representació dels motius B (color gris sòlid), A i C (color gris amb transparència) de la 3D^{pol} WT. S'indiquen els residus implicats en la catàlisi (en motius A i C) i els residus 300 i 304 i els que hi interaccionen. En superfície (groc) es representa la densitat electrònica que ocupen les dues posicions del GPC-N114 en CVB3. (b) Representació anterior rotada 90° a la dreta. (c) Representació equivalent a l'(a), però amb el motiu B dels mutants i les cadenes laterals dels residus mutats (M300V en turquesa i I304V en vermell).



3.4 CAPÍTOL 4: EL MUTANT S299T DE LA 3D^{POL} DE CVB3

L'estudi d'activitat antiviral de l'amilorida contra CVB3 provocà l'aparició diversos mutants de resistència, un dels quals té una sola mutació situada al residu 299 de la 3D^{pol} (S299T). En aquest apartat es recullen els resultats de l'estudi estructural d'aquest mutant i del mutant homòleg en PV (S298T).

3.4.1 Cristal·lització i resolució de l'estructura tridimensional de la 3D^{pol} S299T

Les condicions de cristal·lització d'aquest mutant de la polimerasa van ser exactament les mateixes que per la proteïna WT. Un cop obtinguts els cristalls, es realitzaren immersions en una solució d'amilorida a una concentració 100mM per formar el complex 3D^{pol}-inhibidor (Figura 40).

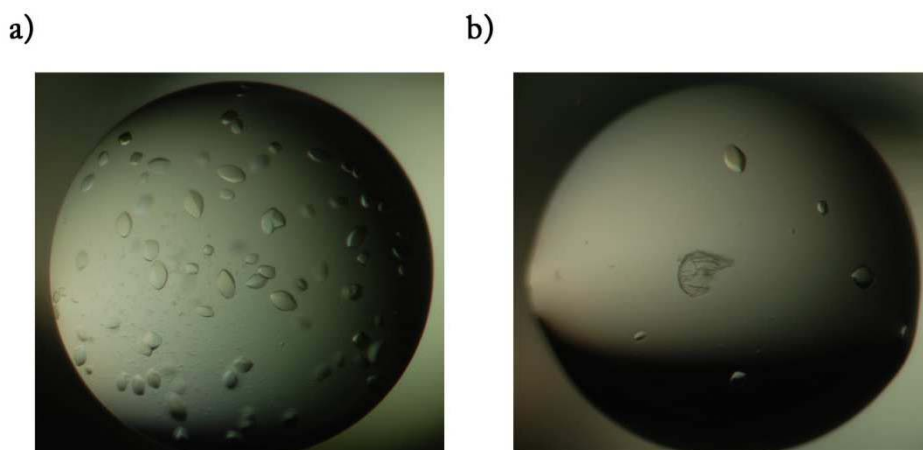


Figura 40. Cristalls de la 3D^{pol} S299T de CVB3. (a) Gota amb alta nucleació on es presenta una mica de precipitat a banda dels cristalls. (b) Gota de baixa nucleació. La mida dels cristalls és d'aproximadament 50µm x 50µm x 50µm.

La qualitat de les dades de difracció recollides a la línia ID29 del sincrotró ESRF (Grenoble) es resumeix a la Taula 9. La determinació de les fases es realitzà mitjançant la tècnica de reemplaçament molecular utilitzant com a model inicial l'estructura de la

3D^{pol} de CVB3 resolta anteriorment (3DDK). Els mapes de diferències, tot i que mostraven algunes densitats extra, un cop realitzats diversos cicles d'omissió no permeteren posicionar l'amilorida dins l'estructura. Les estadístiques del refinat de l'estructura es resumeixen a la taula 9.

Paràmetres de recollida i estadística de processat		Estadístiques de refinat de les estructures	
Línia de recollida	ID29 (ESRF)	Resolució (Å)	75.25-2.8
λ (Å)	0.98	Rwork (%)	19.5
Grup espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2	Rfree (%)	21.6
Cel·la unitat		Nombre d'àtoms/residus	
a, b, c (Å)	74.6, 74.6, 288.7	Proteïna	3728
α, β, γ (°)	90, 90, 90	Lligands	76
Resolució (Å)	72.2-2.8 (2.95-2.8)	Aigua	99
Reflexions totals/úniques	151409/20877	Factor B (Å)	40.7
Multiplicitat	7.3 (7.4)	Rmsd Longitud d'enllaç	0.006
Completesa (%)	98.9 (99.3)	Rmsd Angle d'enllaç	1.067
Rmerge (%)	7.1 (28.5)	Diagrama de Ramachandran	
I/ σ (I)	10.5 (27.6)	Residus en regions preferents	452 (97.6%)
	10.5 (27.6)	Residus en regions permeses	12 (2.4%)

Taula 9. Paràmetres i estadística de la recollida, el processat i refinament de les dades de la 3D^{pol} S299T de CVB3. Els valors entre parèntesi dels paràmetres de recollida i estadística del processat representen els valors de l'última capa de resolució. Les definicions dels paràmetres R estan especificades als apartats 6.2.6 i 6.2.8 de materials i mètodes.

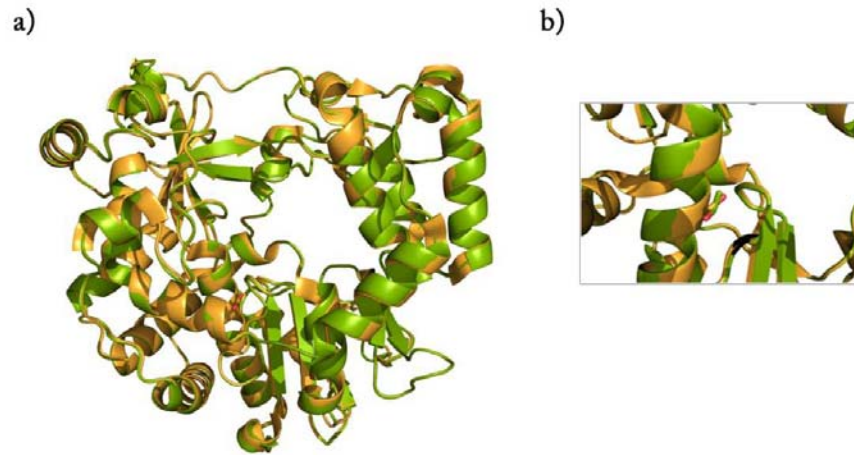


Figura 41. Comparació de la 3D^{pol} WT i la 3D^{pol} S299T de CVB3. (a) Visió general de la superposició de la 3D^{pol} WT (verd) i la S299T (taronja). Els residus 299 estan representats amb pals. (b) Augment on es pot percebre la orientació de les cadenes laterals.

L'estructura de la 3D^{pol} S299T sense l'inhibidor no presenta diferències a nivell global respecte la WT (Rmsd=0.4Å) i només el residu 299 presenta variacions: l'orientació del grup -OH dador d'electrons en la Thr és oposat al de la Ser WT (Figura 41). Els mapes de diferència $|F_o|-|F_c|$ ho confirmen ja que s'adapten millor a aquesta conformació (Figura 42).

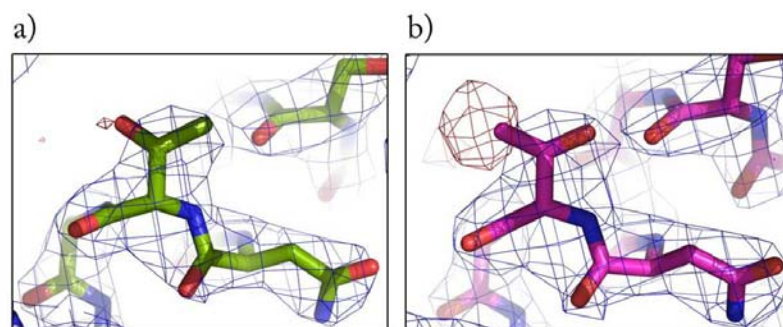


Figura 42. Representació del mapa de densitat electrònica i del mapa de diferències $|F_o|-|F_c|$ al voltant del residu 299. (a) Mapes resultants del refinament de la 3D^{pol} mutant amb l'hidroxil de la cadena lateral de la Thr299 amb orientació oposada al de la Ser299 de la 3D^{pol} WT. (b) Mapes resultants del refinament de la 3D^{pol} mutant amb l'hidroxil de la cadena lateral de la Thr299 amb la mateixa orientació que el de la Ser299 de la 3D^{pol} WT.

L'anàlisi d'interaccions del residu 299 amb l'entorn en la polimerasa WT defineix només un pont d'hidrogen entre la cadena lateral de la Ser i l'amida de la cadena principal de la Gly328, localitzada al motiu catalític conservat a totes les RdRp (Glicina- Àcid aspàrtic- Àcid aspàrtic/ GDD). En el cas de la polimerasa S299T, el grup -OH de la Thr es troba exposat al solvent i no estableix cap interacció amb l'entorn, tampoc el pont d'hidrogen del seu homòleg WT (Figura 43).

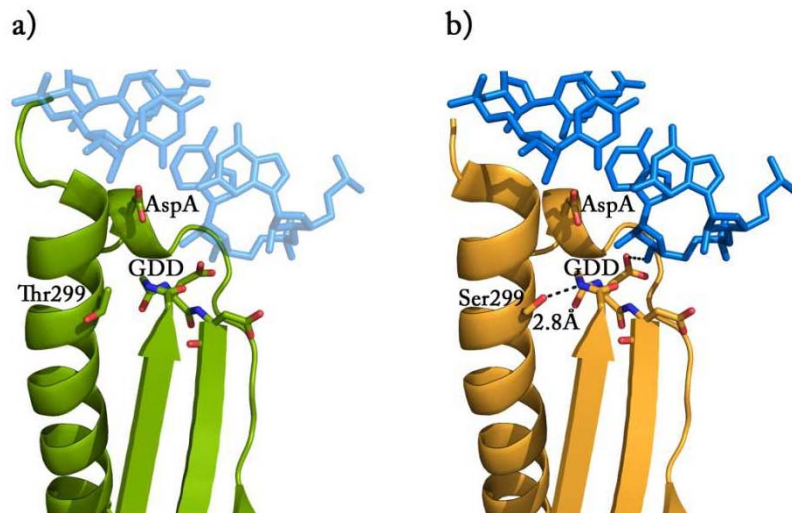


Figura 43. Interaccions del residu 299 en la 3D^{pol} S299T i WT de CVB3. (a) Representació dels motius A, B i C de la 3D^{pol} S299T, amb l'ARN modelat a partir del (b) complex 3D^{pol} -ARN (4K4X). S'assenyalen el residu 299 (motiu B), el centre actiu (motiu C, GDD) i l'aspàrtic A (motiu A) implicat en el reconeixement dels nucleòtids entrants.

3.4.2 Estudis d'activitat de la 3D^{pol} de CVB3 i els mutants S299T i S299A

Estudis de viabilitat infectiva en cèl·lules BGM amb CVB3 realitzats al laboratori de F.M. van Kuppeveld indicaren que els virus amb la 3D^{pol} S299T tenien un fenotip termostable. La titulació del virus a 8 hores post transfecció indicà clarament que els virus amb la 3D^{pol} WT no eren viables a 39°C. A 36°C, però, la viabilitat era la mateixa en els dos casos (Figura 44a). Una PCR quantitativa permeté confirmar que la causa de la quantitat imperceptible de virus WT a 39°C era la inhibició de la replicació de l'ARN

(Figura 44b). A més, la incubació a 39°C augmenta molt la taxa de mutació del CVB3 WT i molt poc del S299T de manera que a aquesta temperatura el mutant té un efecte de protector (Figura 44c).

En aquesta línia també es va estudiar l'efecte d'una alanina al residu 299, que no té cadena lateral evitant així qualsevol tipus d'interacció. S'observà l'activitat luciferasa de les cèl·lules transfectades amb ARN WT o mutat a les 6 hores post-transfecció (eliminant el soroll de fons del propi ARN transfectat mitjançant la comparació amb un control tractat amb GuaHCl, un inhibidor de la replicació en enterovirus) Aquest mutant era capaç de replicar a nivells comparables al WT a 32°C, però no era viable a 36°C (Figura 44d). Aquestes dades indiquen que el virus amb la mutació S299A a la 3D^{pol} també té un fenotip termosensible.

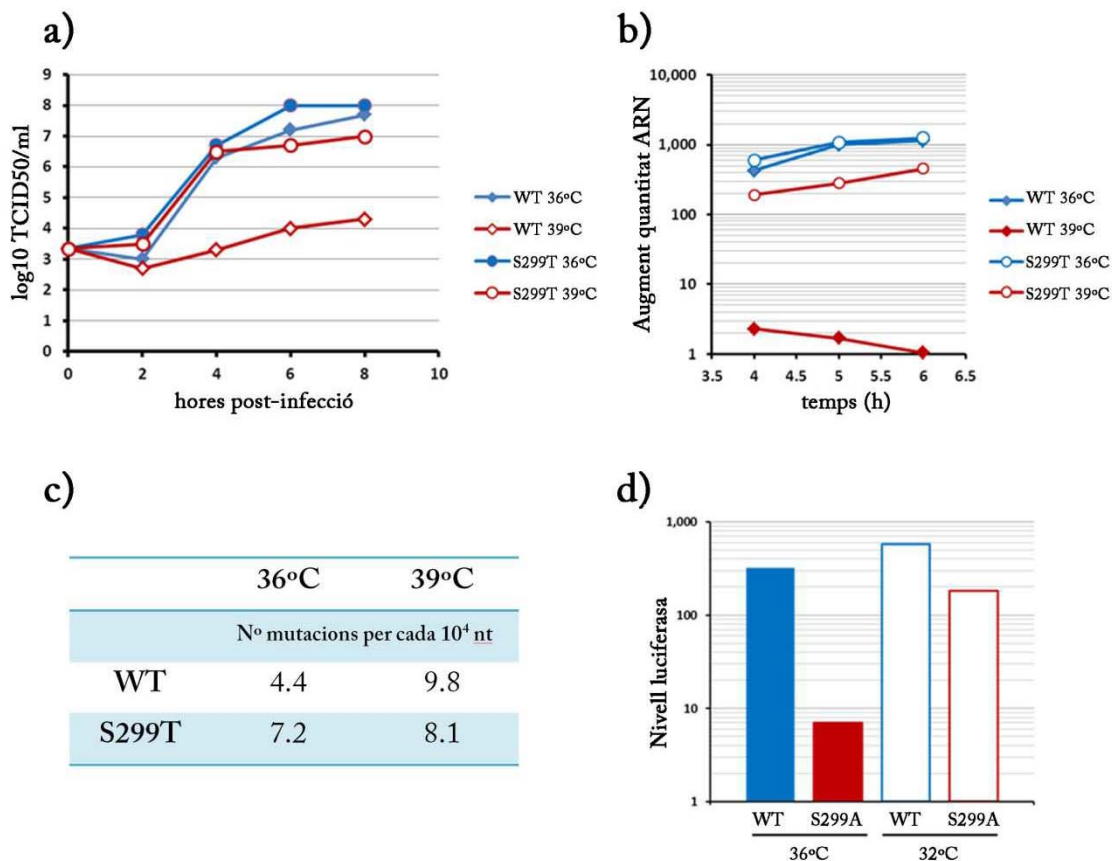


Figura 44. Assajos de viabilitat i replicació viral dels mutants S299T i S299A. (a) Corba de creixement simple de cèl·lules BGM a 36 (blau) i 39°C (vermell). Les cèl·lules van ser infectades a un MOI de 10 TCID₅₀ per cèl·lula amb virus amb la 3D^{pol} WT (rombes) i 3D^{pol} S299T (rodona). (b) Cèl·lules infectades igual que (a). Als temps indicats, l'ARN era aïllat i l'ARN viral quantificat per PCR quantitativa. Es representa l'augment respecte la quantitat d'ARN viral inicial. (c) Taula on es representen el nombre de mutacions per cada 10⁴ nucleòtids afegits per la 3D^{pol}. (d) Cèl·lules infectades igual que (a) però amb virus amb la 3D^{pol} WT i 3D^{pol} S299A i incubades a 32 i 36°C. S'assenyala l'augment del nivell de luciferasa respecte les cèl·lules control tractades amb GuaHCl.

3.4.3 Cristal·lització i resolució de l'estructura del mutant S298T de la 3D^{pol} de PV

La 3D^{pol} de PV és molt semblant a la de CVB3, per tant, semblà interessant reproduir el mateix estudi per al virus mutant amb la 3D^{pol} S298T. L'estudi de l'activitat del virus indicà un comportament equivalent al del virus salvatge, és a dir, no presentava el mateix fenotip termostable del mutant de CVB3 amb la 3D^{pol} S299T (comunicació de F.M.

Van Kuppeveld). L'estudi estructural ens permetria determinar si la cadena lateral del residu 298 adopta la conformació equivalent a la 3D^{pol} salvatge o bé si presenta la mateixa que la de la 3D^{pol} S299T de CVB3. Per obtenir la proteïna s'utilitzà el protocol descrit anteriorment per Freistadt et al. (Freistadt et al., 2007), el qual està descrit a l'apartat 6.2.2.6 de materials i mètodes.

La cristal·lització de la S298T es realitzà directament en plaques de 24 pous seguint les condicions de cristal·lització que s'indicaven per la cristal·lització de la proteïna WT (Thompson et al., 2007). Finalment s'obtingueren cristalls en forma de barres a 20°C en dos dies a 2.2M d'acetat sòdic, 0.1M cacodilat a pH7.1 i 2mM DTT (Figura 45). Malgrat les gotes amb cristalls també presentaven precipitat, aquests es pogueren extreure nets i el tractament amb el tampó de crio (2.2M d'acetat sòdic, 0.1M cacodilat a pH7.1, 2mM DTT i 20% (w/v) glicerol) ajudà a netejar possibles restes de precipitat de la superfície dels cristalls. A l'hora de recollir els cristalls en *loops* es separaren les barres de les agulles adjacents intentant tenir un sol cristall.

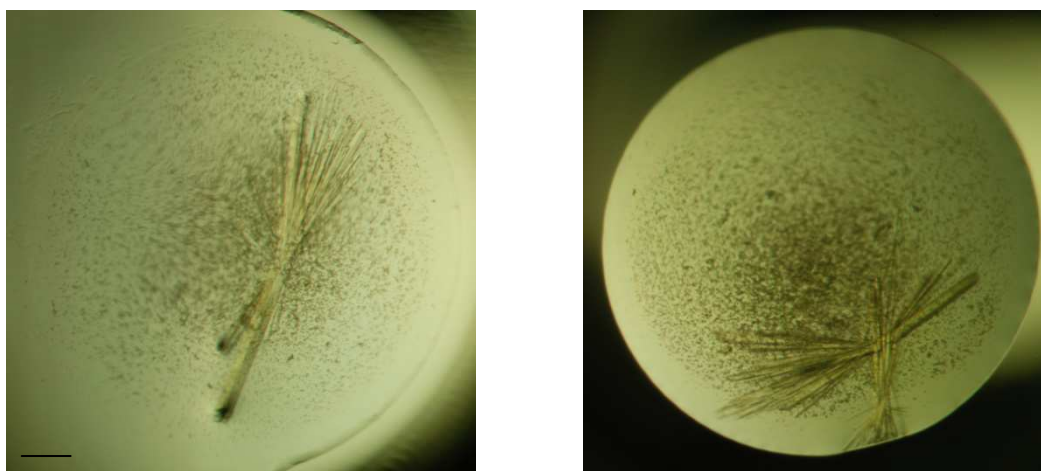


Figura 45. Cristalls de la 3D^{pol} S298T de Poliovirus. La barreta indica 50µm.

La qualitat de les dades de difracció recollides a la línia XALOC del sincrotró ALBA-CELLS (Barcelona) es resumeix a la Taula 10. Les fases per poder determinar el model tridimensional d'aquesta proteïna s'obtingueren mitjançant un reemplaçament molecular

amb l'estructura de la 3D^{pol} de PV (codi d'accés a la base de dades PDB: 2ILY). Es realitzà la mutació puntual S298T al model preliminar mitjançant la interfície gràfica COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Posteriorment es realitzaren diversos cicles de refinament automàtic i modelat manual mitjançant Refmac5 (Murshudov et al., 1997) i COOT. Les estadístiques del refinat de l'estructura es resumeixen a la taula 10.

Paràmetres de recollida i estadística de processat		Estadístiques de refinat de les estructures	
Línia de recollida	XALOC (ALBA)	Resolució (Å)	112.8-2.85
λ (Å)	0.98	Rwork (%)	17.0
Grup espacial	P6 ₅	Rfree (%)	20.3
Cel·la unitat		Nombre d'àtoms/residus	
a, b, c (Å)	127.3, 127.3, 112.8	Proteïna	3746
α, β, γ (°)	90, 90, 120	Lligands	80
Resolució (Å)	112.8-2.85 (3.0-2.85)	Aigua	25
Reflexions totals/úniques	204850/24363	Factor B (Å)	67.1
Multiplicitat	7.2 (7.2)	Rmsd Longitud d'enllaç	0.006
Completesa (%)	99.9 (99.9)	Rmsd Angle d'enllaç	1.076
Rmerge (%)	7.6 (47.5)	Diagrama de Ramachandran	
I/ σ (I)	8.3 (18.2)	Residus en regions preferents	435 (95.6%)
		Residus en regions permeses	20 (4.4%)

Taula 10. Paràmetres i estadística de la recollida, el processat i refinament de les dades de la 3D^{pol} S298T de PV. Els valors entre parèntesi dels paràmetres de recollida i estadística del processat representen els valors de l'última capa de resolució. Les definicions dels paràmetres R estan especificades als apartats 6.2.6 i 6.2.8 de materials i mètodes.

3.4.1 Anàlisi de l'entorn del residu 299 de CVB3

En l'afany d'entendre perquè la orientació de l'hidroxil de la Thr299 al mutant de CVB3 presenta una orientació diferent, es van estudiar les disposicions i interaccions de tots els residus contigus en comparació amb el mutant de PV. Només es trobaren canvis en residus llunyans implicats en interaccions amb residus a menys de 6Å del 299 (L196A, T197A, L200K, S235T i I304L), però la part del residu implicada en les interaccions era la cadena principal, de manera que no afectava la disposició dels residus propers al 299.

Més enllà, es va comparar la 3D^{pol} S299T de CVB3 amb la 3D^{pol} WT en complex amb ARN (codi d'accés de la base de dades PDB: 4K4Z), per veure la disposició dels residus en el mateix entorn quan la polimerases està en contacte amb l'ARN. No s'observaren diferències en les interaccions i conformacions dels residus inclosos en l'anàlisi

3.4.2 Estructura del mutant S298T a la 3D^{pol} de PV

L'estructura de la S298T és pràcticament idèntica a la WT. En aquest cas, a diferència de la S299T de CVB3, l'hidroxil de la cadena lateral de la treonina presenta la mateixa orientació que el de la serina de la proteïna WT (Figura 46).

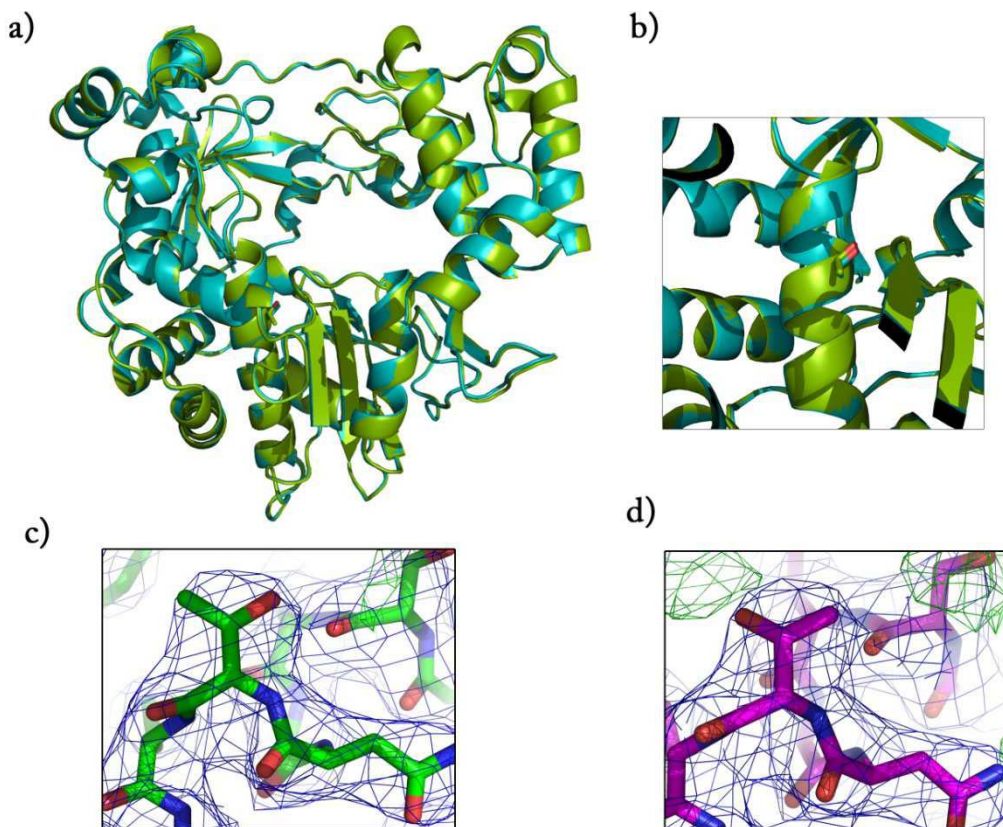


Figura 46. Comparació de la 3D^{pol} WT i la 3D^{pol} S298T de PV. (a) Visió general de la superposició de la 3D^{pol} WT (turquesa) i la S298T (verd). Els residus 298 estan representats amb pals. (b) Augment on es pot percebre la orientació de les cadenes laterals. (c) i (d) Representació del mapa de densitat electrònica i del mapa de diferències $|F_o| - |F_c|$ al voltant del residu 298 en la conformació correcta (c) i l'equivalent a la 3D^{pol} S299T de CVB3 (d).

4 DISCUSSIÓ

4.1 LA 2B DE HAV

4.1.1 Relació evolutiva dels gèneres enterovirus i hepatovirus

La família *Picornaviridae* és una de les que conté més gèneres de virus sota el seu paraigües i forma part de l'ordre dels Picornavirals. Tot i que el paper principal de l'evolució dels virus ARN s'ha assignat a la recombinació (Agol, 2010; Hirst, 1962; Romanova et al., 1980), les quasi-espècies, poblacions amb un genoma dinàmic i heterogeni, generen alhora un procés evolutiu constant cap a les variants més eficients del virus envers l'entorn. L'alta taxa de mutació durant la replicació dels virus ARN deguda, en part, a la baixa fidelitat de les ARN polimerases dependents d'ARN és la que permet aquest procés adaptatiu (Domingo, 2007; Drake, 1993).

El genoma dels picornavirus presenta diferents graus de diversitat segons les zones que s'analitzen. Per exemple, la proteïna L no és present en tots els picornavirus, i només comparteix, com a mínim en cardio- i aftovirus, el fet de ser prescindible per la replicació (Kong et al., 1994; Piccone et al., 1995). La proteïna 2A també presenta diversitat de longitud i funció entre els picornavirus. Per explicar-ho, s'han proposat mecanismes d'adquisició independent d'aquestes proteïnes durant l'evolució (Romanova et al., 1980) o bé insercions o delecions, ambdós processos pel mecanisme de la recombinació (Johansson et al., 2002).

En HAV, semblaria que la diferència de longitud de la proteïna 2A és deguda al desplaçament del lloc de tall de la 2A/2B, pel canvi d'especificitat de la proteasa 3C, generant també una proteïna 2B amb una longitud gairebé el doble que en enterovirus (Malcolm, 1995; Martin et al., 1995) (Figura 21).

Les estructures de les 2A^{pro} de HRV2 i CVB4 presenten un domini N-terminal petit format per una fulla beta antiparal·lela de 4 cadenes, un domini C-terminal més gran format per un barril beta de 6 cadenes antiparal·leles i el centre actiu situat entremig dels dos (Baxter et al., 2006; Petersen et al., 1999). En HAV, no hi ha cap altra proteasa a

part de la 3C, ni a la 2A ni a la 2B se'ls ha descrit cap activitat proteolítica similar a la de 2A d'entero-, afto- o cardiovirus. Els alineaments estructurals entre el domini N-terminal de la proteïna 2B^{sol}, que presenta una estructura de pseudo fulla β corbada, i el domini C-terminal de les 2A^{pro} d'enterovirus suggereixen que ambdós dominis podrien tenir el mateix origen (Figura 47).

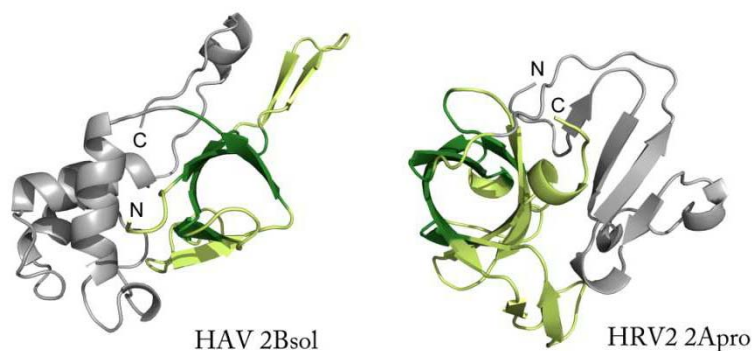


Figura 47. Alineament estructural entre l'N-terminal de la 2B de HAV i la 2A d'Enterovirus. Entre la 2B^{sol} (esquerra) i la HRV2 2A^{pro} (dreta), les dues en gris. En verd clar els dominis equivalents estructuralment i els superposables mitjançant SHP en verd fosc. Resultaren 28 equivalències (més de 50% del barril beta de 2A^{pro}) situades en 4 cadenes beta del pseudo-barril beta de la 2B^{sol} i 4 cadenes beta del barril de 2A^{pro}, amb un Rmsd de 2,23Å.

Aquesta relació estructural entre els dominis C-terminal de la 2A^{pro} i l'N-terminal de la 2B^{sol}, juntament amb el canvi del lloc de tall entre 2A/2B i la conservació de la seqüència, fan pensar que aquesta regió del genoma de HAV hagi evolucionat d'un ancestre semblant als enterovirus, la 3C^{pro} del qual adquirís canvis d'especificitat de substrat. Aquest canvi d'especificitat hauria determinat el desplaçament del lloc 2A/2B generant una proteïna 2A truncada i una 2B elongada amb el seu barril C-terminal, però també un trencament del centre catalític de la 2A ja que dos residus de la tríade catalítica (His18 i Asp35, a la 2A^{pro} de HRV2) quedarien a la nova 2A i el tercer (Cys106, a la 2A^{pro} de HRV2) es trobaria al nou segment N-terminal de la 2B (Figura

47). Això explicaria la pèrdua de la funció catalítica de la 2A en HAV (Schultheiss et al., 1994).

Els enterovirus bloquegen la traducció de l'hoste per destinar tots els recursos cel·lulars a la replicació viral. La 2A^{pro} executa la proteòlisi del factor d'iniciació de la traducció 4G (eIF4G) (Kräusslich et al., 1987) de manera que s'inhibeix el reclutament d'ARN missatger amb *Cap* i la replicació dependent d'IRES, com la dels picornavirus, és potenciada (Hambidge and Sarnow, 1992; Liebig et al., 1993). La pèrdua de la funció proteolítica per part de HAV dóna coherència a la seva estratègia de replicació: aquest virus no causa un efecte de citòlisi i permet infeccions persistents a diferència d'altres membres de la família dels picornavirus. L'absència del segrest de la traducció cel·lular en les infeccions de HAV probablement hagi desencadenat l'ús dels codons rars evitant així competir amb la cèl·lula pels ARN de transferència.

Sembla clar que existí un ancestre comú a partir del qual derivaren els gèneres enterovirus i hepatovirus de la família picornavirus. És difícil determinar quina situació presentava l'ancestre, és a dir, si el canvi puntual de l'especificitat de la 3C^{pro} va generar l'aparició del gènere hepatovirus o si aquest fou l'ancestre a partir del qual derivaren els enterovirus. Tenint en compte que el fenotip de HAV implica un comportament molt concret d'infeccions lentes i persistents, probablement l'aparició d'aquest fos una adaptació concreta que funcionà en l'entorn determinat del virus i que li ha permès perdurar fins a dia d'avui.

4.1.2 Rol de les fibres de 2B en la reorganització de membranes cel·lulars.

La reorganització de membranes cel·lulars internes per formar estructures associades amb la síntesi d'ARN viral és característica de les infeccions de virus ARN de polaritat positiva (Bienz et al., 1987; Egger et al., 2002; Gosert et al., 2000; Monaghan et al., 2004; Pedersen et al., 1999; Schwartz et al., 2004; N. Teterina et al., 1997). Aquest procés permet generar un entorn adequat on reclutar totes les proteïnes implicades en la

DISCUSSIÓ

replicació del virus formant factories virals. Les proteïnes no estructurals 2B i 2C, i el seu precursor 2BC, juguen un rol clau en aquesta reorganització, però mitjançant, a hores d'ara, un mecanisme desconegut (Aldabe et al., 1996; Cho et al., 1994; N. L. Teterina et al., 1997).

Tot i que la replicació de HAV té un ritme molt més lent que la resta dels membres de la família *Picornaviridae*, també presenta mecanismes similars. L'observació per microscòpia electrònica de cultius cel·lulars infectats amb una soca de HAV adaptada o amb sobreexpressió de la proteïna 2B mostra estructures membranoses úniques que no s'observen en les cèl·lules no infectades. Aquestes estructures són conjunts de vesícules amb forma tubular que servirien per generar l'entorn adequat del lloc de replicació viral (Gosert et al., 2000; N. Teterina et al., 1997), reclutant les proteïnes virals i de l'hoste necessàries per a la replicació i aïllant els intermediaris de replicació per a protegir-los de les defenses de l'hoste.

L'estructura obtinguda de la 2B^{sol} de HAV i la seva disposició al cristall ens ha permès postular un possible mecanisme per la reorganització de membranes intracel·lulars induïda per 2B. L'organització de la 2B^{sol} en forma de fibra al cristall (Figura 25) suggereix una estructura semblant a amiloide, coincident amb el que s'observa en solució en tenyir la mostra amb vermell Congo (Figura 27b). A més, assajos d'unió de Tioflavina-T mostren que aquest ordenament fibril·lar es dona espontàniament en condicions fisiològiques (Figura 27a). D'aquesta manera, l'estructuració en forma d'espina beta en l'empaquetament cristal·lí de la 2B^{sol} podria reflectir l'organització adoptada per les proteïnes 2B en les cèl·lules infectades (Figura 48).

La capacitat de la 2B de HAV d'unir membranes sembla estar relacionada amb la presència d'una putativa hèlix transmembrana localitzada a l'extrem C-terminal, l'inici de la qual està predit 30 residus cap al C-terminal de l'estructura cristal·logràfica (Garriga et al., 2011; Gosert et al., 2000). Les interaccions establertes entre les cadenes $\beta 4$ i $\beta 8$ situarien l'extrem C-terminal a prop del *hairpin* i, així, assistirien l'ancoratge de les fibres de 2B determinant la formació de la xarxa de vesícules tubulars observades *in*

vitro en cèl·lules infectades per HAV (de Jong et al., 2008; Gosert et al., 2000) (Figura 48).

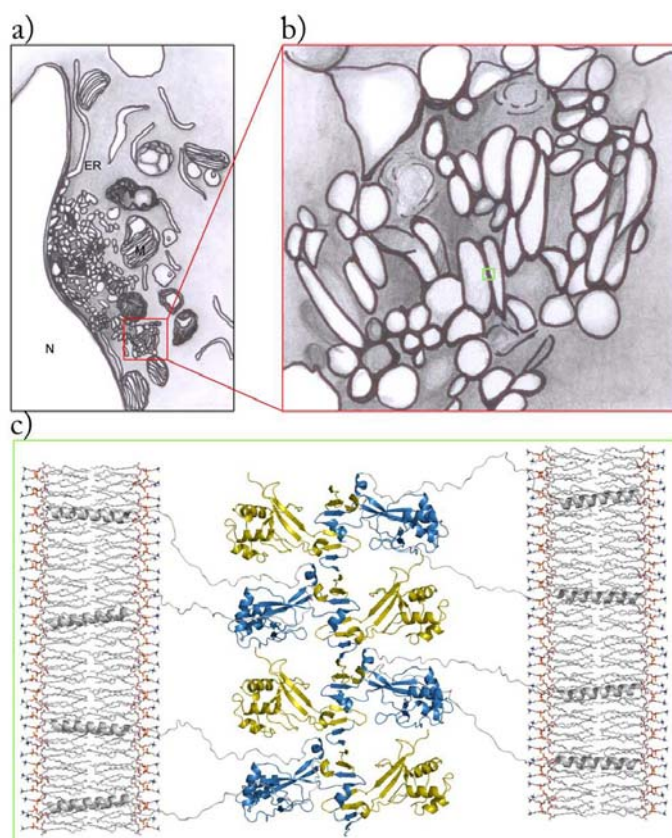


Figura 48. Model d'unió a membrana i contextualització en l'espai cel·lular de la proteïna 2B. (a) i (b) Representacions del citoplasma d'una cèl·lula infectada per HAV, mostrant les reorganitzacions sofertes per les membranes cel·lulars i la formació de xarxes de cossos membranosos tubulars adaptada de Gosert et al. 2000. S'hi indica el nucli (N), una mitocòndria (M) i una part del reticle endoplasmàtic (ER). El requadre verd a (b) indica el lloc on es trobaria la fibra de 2B (c), unint dues membranes de vesícules i provocant la formació de xarxes tubulars. (c) Model de la unió a la membrana vesicular de la fibra de 2B, amb el fragment C-terminal modelat segons la predicció d'hèlix transmembrana (gris).

L'agregació fibril·lar provocada per la proteïna 2B (sigui en la seva forma madura com en forma de precursor 2BC) permet generar un entorn adequat i aïllat, mitjançant la reorganització de membranes, per reclutar tots els agents implicats en la replicació viral.

DISCUSSIÓ

Probablement, el mecanisme de reorganització de membranes que es proposa en aquest treball sigui exclusiu de HAV perquè, malgrat en enterovirus s'hagi definit la presència de putatius fragments transmembrana a la proteïna 2B, sembla ser que funcionaria com un porus, desestabilitzant les concentracions iòniques citoplasmàtiques (Agirre et al., 2002; Cuconati et al., 1998; de Jong et al., 2008, 2003, 2002; van Kuppeveld et al., 1997, 2002). Així, aquesta estratègia pot representar una peça clau en les infeccions per HAV probablement lligada a la baixa taxa de replicació.

Actualment s'estan desenvolupant experiments *in vivo* per comprovar si la hipòtesi creada sobre el mecanisme de reorganització de membranes provocada per la 2B és certa. Tenint en compte que el *hairpin* format per $\beta 2$ - $\beta 3$ de la 2B és crucial per l'assemblatge de la fibra, s'intenta veure si la transfecció de la proteïna 2B amb la zona del *hairpin* deletcionada pot provocar també les reorganitzacions de membrana o no. En aquest moment s'estan posant a punt els controls negatius i explorant condicions d'immunomarcatge que permetran localitzar la proteïna 2B en el context cel·lular (Figura 49).

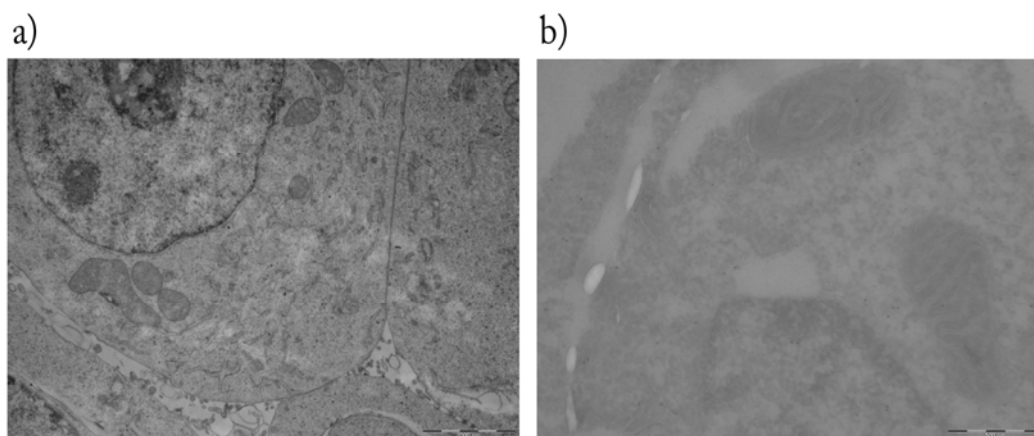


Figura 49. Fotografies de microscòpia electrònica d'experiments preliminars d'expressió *in vivo* de 2B en cèl·lules S293. Ultraestructura de cèl·lules S293 a 48h post transfecció amb expressió de la proteïna 2B salvatge, barra 200nm (dreta). Immunomarcatge de la proteïna 2B, barra 500nm (esquerra).

4.2 LES 3D^{POL} DE CVB3 I EMCV

4.2.1 Primera 3D^{pol} de cardiovirus: una nova conformació

Les ARN polimerases dependents d'ARN són enzims indispensables per l'existència dels virus ARN ja que s'encarreguen de la síntesi del material genètic tant per la posterior traducció a proteïna com per la generació de nous virions. Dins la família *Picornaviridae*, a nivell de seqüència, en les 3D^{pol} només es pot identificar un alt grau d'homologia en dominis concrets, tots ells involucrats directament o indirecta en la catàlisi de la reacció, i en residus puntuals d'aquests dominis que presenten una conservació absoluta entre totes les 3D^{pol} (Bruenn, 2003; Garriga et al., 2013).

No obstant, les estructures cristal·logràfiques permeten determinar que presenten un alt grau de similitud estructural i se les ha definit a grans trets com una mà dreta tancada encerclant el centre actiu i determinant els canals necessaris per l'entrada i sortida de substrats i productes (Ferrer-Orta et al. 2006a). L'estructura de la 3D^{pol} d'EMCV no és una excepció i presenta la mateixa conformació global en ambdues formes cristal·lines. No obstant, sí que s'ha pogut observar un canvi pronunciat en el motiu A al grup espacial I4₁22.

Aquesta estructura presenta una conformació del motiu A que no s'havia descrit fins el moment: el *loop* continent del residu Asp240, implicat en el mecanisme de reconeixement del NTP entrant, es desplaça aproximadament 10 Å de la posició esperada. Així, aquest residu ocupa una posició propera a la del trifosfat del nucleòtid entrant (Figura 37). Tots els residus que haurien d'estar implicats en el tancament del centre actiu estableixen aquest desplaçament. La Phe239 es troba formant una interacció π -catió amb la Lys56 i interaccions hidrofòbiques amb Lys172 i Arg174 del motiu F (Figura 37). Les cadenes principals de la Gly290, la Leu291, la Ile310 (motiu B) i la l'Asp333 (motiu C) també estableixen contacte amb la conformació alterada del motiu A. Els residus de l'entorn d'aquesta regió del motiu A han canviat la orientació de les cadenes laterals per ocupar l'espai buit generat a conseqüència del desplaçament

DISCUSSIÓ

(Figura 50c i d). En concret, l'Asp333 catalític del motiu C presenta una conformació de rotàmer alterada i forma ponts d'hidrogen amb l'Asn306 i l'Asn302 que, al seu torn, interacciona amb l'Asp240 (Figura 37b). A més, cal considerar també la presència de la glutamina que ocupa l'espai que ha deixat el *loop* A i que en la 3D^{pol} C2 no hi és present malgrat també s'usà per concentrar-la. En aquest sentit, les diferències observades en els residus de l'entorn del *loop* A en ambdues conformacions i la presència de la glutamina sembla que siguin conseqüència del desplaçament i no al revés.

Les estructures tridimensionals de les 3D^{pol} han revelat diferents passos del procés catalític i s'ha evidenciat, mitjançant comparacions estructurals, que les 3D^{pol} no requereixen grans canvis entre dominis (Ferrer-Orta et al., 2007, 2004; Gong and Peersen, 2010; Gong et al., 2013). Concretament, la fulla beta formada pels dominis A i C al palmell determina una conformació oberta pre-catalítica en què es troba parcialment formada i una conformació tancada activa en què està completament formada permetent la catàlisi via el mecanisme dels dos ions (Arnold et al., 2005; Gong and Peersen, 2010).

Les dues estructures resoltes de la 3D^{pol} d'EMCV reflecteixen les dues conformacions de la fulla beta del palmell (Figura 50c i d). Les sis molècules independents de la unitat asimètrica dels cristalls C2 presenten una conformació oberta del centre actiu, com cabria esperar d'una estructura cristal·litzada en absència d'ARN i rNTPs. Sorprenentment, els cristalls I4₁22 presenten una conformació tancada i l'Asp235 posicionat frontalment amb l'Asp333 del motiu C, la qual cosa no s'ha observat mai en una 3D^{pol} sense lligands. En la conformació oberta, l'àcid aspàrtic conservat 240 (en EMCV) de la regió C-terminal del motiu A i els residus Asn302 i Ser293 del motiu B s'encarregarien del reconeixement i, amb alguns residus bàsics del motiu F, de la unió del nucleòtid entrant (Ferrer-Orta et al., 2009, 2007; Lescar and Canard, 2009). Un petit desplaçament del motiu A posicionaria l'àcid aspàrtic catalític 235, situat al seu extrem N-terminal, en l'orientació adient per unir l'ió metàl·lic (Figura 50b). Aquest moviment subtil del palmell i els residus implicats descrits són l'únic mecanisme de fidelitat que

tenen les 3D^{pol}, ja que no presenten activitat de correcció (revisat a Lescar & Canard 2009). En el cas de l'estructura I4₁₂₂, els residus implicats en aquest reconeixement tenen la cadena lateral en una conformació diferent a la que tindrien en una conformació tancada estàndard.

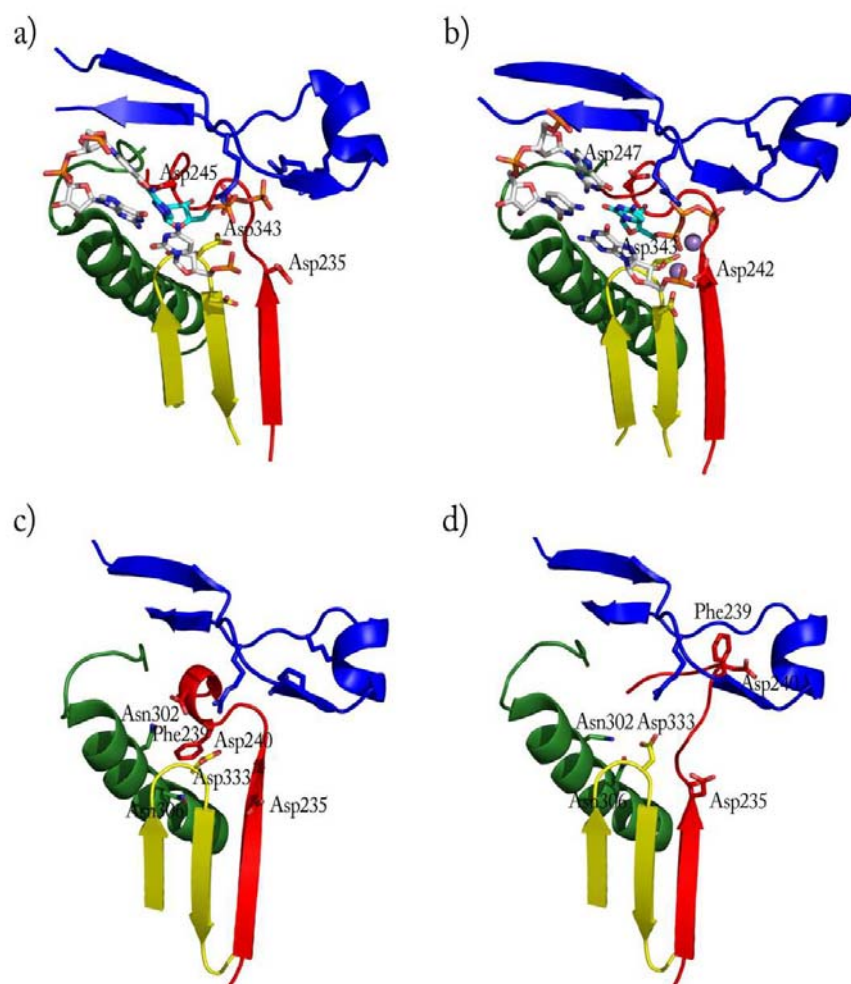


Figura 50. Tancament del centre actiu durant l'activitat de la polimerasa. (a) 3D^{pol} de FMDV en complex amb el motlle-encebador en un pas pre-catalític on la polimerasa mostra una conformació oberta de la fulla beta formada pels motius A i C (2E9R). (b) 3D^{pol} de Norovirus en complex amb el motlle-encebador en un estat catalític (3BSO). (c) 3D^{pol} d'EMCV en conformació C2 amb la fulla beta oberta. (d) 3D^{pol} d'EMCV en conformació I4₁₂₂ amb la fulla beta tancada. Es mostren els motius A, B, C i F (vermell, verd, groc i blau) i a (a) i (b) tenen l'esquema del motlle-encebador i (b) dos ions metàl·lics com esferes liles.

Un altre caràcter conservat de les 3D^{pol} present a totes les estructures de polimerases resoltes fins el moment és una xarxa de ponts d'hidrogen establerta entre la glicina N-terminal, inserida en una cavitat a la base dels dits, i altres glicines conservades dels dominis del palmell i els dits (Thompson & Peersen 2004; Ferrer-Orta et al. 2006a; Marcotte et al. 2007). Aquesta xarxa ajuda al correcte posicionament del nucleòtid unint l'Asp240 del centre actiu (Thompson and Peersen, 2004). A enterovirus i aftovirus, el grup amino de la Gly1 estableix ponts d'hidrogen amb tres glicines conservades, una al subdomini dels dits i les altres dues al *loop* del motiu B (Figura 51a). Altres ponts d'hidrogen entre cadenes principals de residus dels motius A i B contribueixen a estabilitzar-ho. Estudis mutacionals, bioquímics i estructurals en la 3D^{pol} de PV i la falta d'activitat del precursor 3CD indiquen que l'activitat de la 3D^{pol} és molt sensible a modificacions a l'N-terminal i, en conseqüència, a la pèrdua de la xarxa de ponts d'hidrogen (Hobson et al., 2001; Marcotte et al., 2007; Rothstein et al., 1988; Thompson and Peersen, 2004). Les glicines situades al motiu B estan totalment conservades a totes les 3D^{pol} de Picornavirus, però la glicina del subdomini dels dits només està conservada a enterovirus i aftovirus. En EMCV, aquest residu és una serina (Ser59) i, en les set molècules independents resoltes en aquest treball, la cadena lateral resta exposada al solvent i no participa en contactes intramoleculars. A més, els residus que formen la cavitat dels dits que acull la Ser59 (53-63) són molt flexibles i adopten diferents conformacions en cada molècula. No obstant, la xarxa de ponts d'hidrogen es manté en cinc de les sis molècules del cristall C2 i en la sisena les connexions es perden (Figura 51b i c). En la setena, la del cristall I4₁22, la xarxa de ponts d'hidrogen està completament distorsionada (Figura 51d).

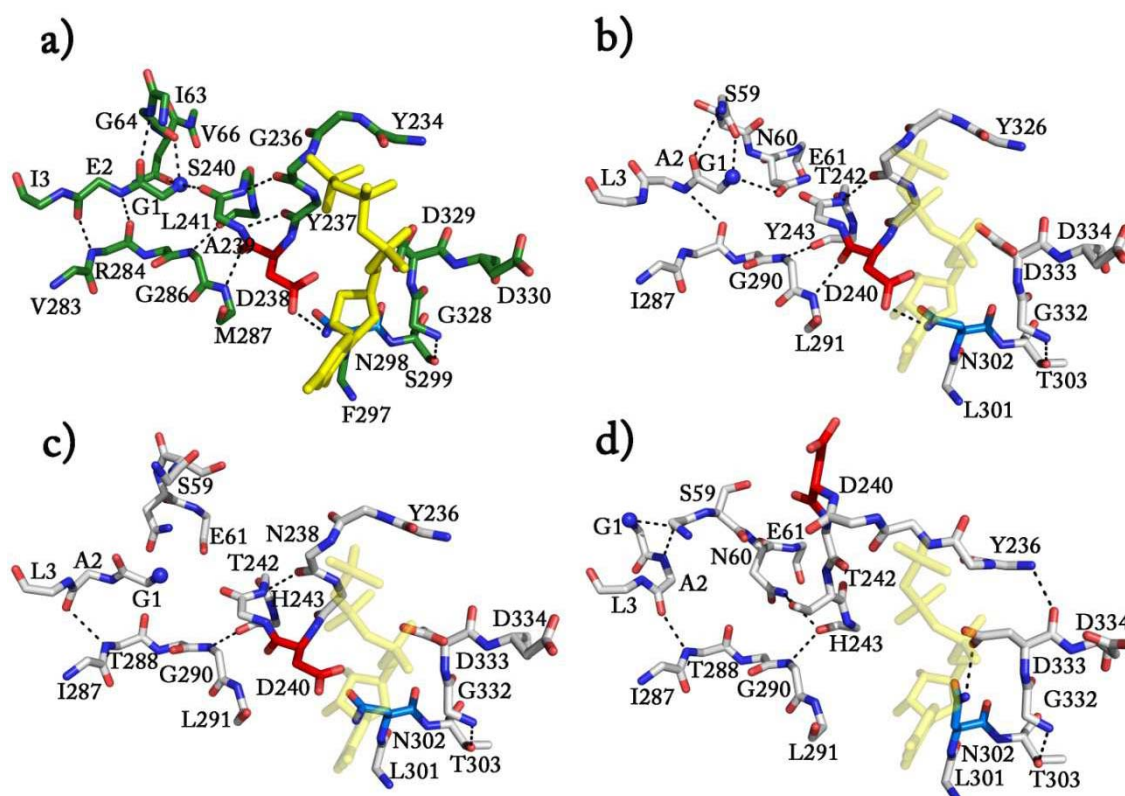


Figura 51. Xarxa de ponts d'hidrogen entre l'extrem N-terminal i el centre actiu en diferents 3D^{pol}. (a) 3D^{pol} de PV unida a un rNTP (groc) (PDB: 1RA6). (b) 3D^{pol} d'EMCV dels cristalls C2 (cinc de les sis molècules). (c) 3D^{pol} d'EMCV dels cristalls C2 (sisena molècula). (d) 3D^{pol} d'EMCV dels cristalls I4₁₂₂. En totes les imatges els residus es representen en colors segons els àtoms i l'Asp240 del motiu A s'assenyala en vermell. El rNTP de l'estructura de PV s'ha modelat a EMCV mitjançant la superposició dels residus del centre actiu i es representa en groc semitransparent.

L'estructura del grup espacial C2 reproduceix les característiques de la majoria de les 3D^{pol} de picornavirus resoltes sense lligand. No obstant l'estructura del grup espacial I4₁₂₂ contindria elements tant de conformació activa com d'inactiva. Per una banda, la conformació tancada de la fulla beta determinaria una 3D^{pol} activa. Per altra, la disrupció de la xarxa de ponts d'hidrogen i, per suposat, el desplaçament del *loop* del motiu A descol·locant residus imprescindibles per la reacció i obstruint el canal d'entrada de nucleòtids són elements que determinarien una 3D^{pol} inactiva. Podria ser que ens trobéssim davant d'un estat previ o posterior a la reacció de síntesi ja que un estat

DISCUSSIÓ

entremig de la reacció semblaria poc probable degut a la magnitud dels canvis que cal fer. Així, podria ser un mecanisme de regulació de la replicació viral en el qual coexistirien polimerases actives i polimerases inactives segons la necessitat. Aquest mecanisme es podria extrapolar a altres picornavirus ja que els residus implicats en l'estabilització de la conformació estan conservats.

El 2007, Dmitrieva et al. determinaren mitjançant estudis de mutacions que el Trp460, o un residu voluminós i polar, era crític per la reproducció viral (Dmitrieva et al., 2007). Mitjançant l'anàlisi d'un model estructural creat en base a l'estructura de la 3D^{pol} de FMDV definiren que aquest residu establí un contacte funcional entre els subdominis del polze i el palmell (Dmitrieva et al., 2007). No obstant, en cap de les 7 molècules independents resoltes aquest residu fa un pont d'hidrogen amb la Thr219 ni estableix una interacció hidrofòbica amb la Val216 com s'havia descrit. El Trp460 està exposat al solvent i, malgrat la superposició de les molècules és equivalent, segons la molècula, interacciona amb el solvent o fa *stacking* amb la cadena lateral d'una arginina exposada d'una molècula contigua. En totes les molècules de 3D^{pol} d'EMCV resoltes, la Phe459 estableix els contactes amb els residus Val216 i Thr219 que s'havien descrit teòricament pel Trp460 (Dmitrieva et al., 2007) (Figura 52). Així, el mecanisme proposat per explicar la necessitat de la presència del Trp460 per la reproducció viral no es veu recolzat per les estructures obtingudes en aquest estudi. Podria ser que aquest residu, que a les estructures trobem exposat al solvent, estigui involucrat en interaccions amb altres proteïnes del complex replicatiu necessàries pel correcte funcionament d'aquest.

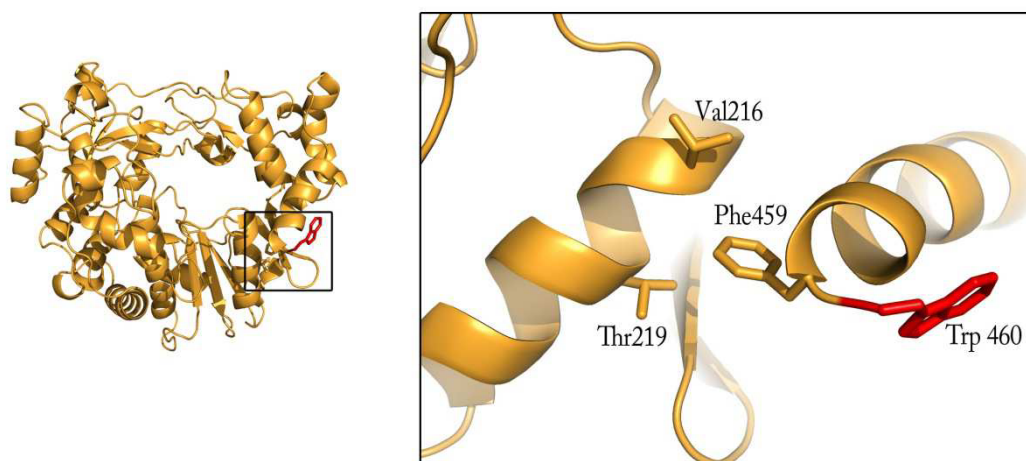


Figura 52. El Trp460 a l'estructura C2 de la 3D^{pol} d'EMCV. L'ampliació de la zona assenyalada a la visió global de la polimerasa mostra el Trp460 (vermell) exposat al solvent i la Phe465 realitzant contactes amb la Val216 i la Thr219 que teòricament, segons Dmitrieva et al. 2007, hauria de fer el Trp460.

4.2.2 Implicacions de l'estructura alterada del motiu A pel disseny de nous antivirals

La síntesi d'ARN, com altres reaccions del cicle viral, requereix certa dinàmica. Les regions flexibles de les 3D^{pol}, ben determinades i majoritàriament conservades, són un punt clau per la seva activitat estant implicades en la unió del motlle, l'encebador o els nucleòtids, la translocació de les cadenes o la catàlisi pròpiament, entre d'altres. Aquesta dinàmica pot ser modulada per agents externs que activin l'enzim o bé l'inhibeixin com per exemple petites molècules que s'uneixin a determinat lloc estabilitzant certa conformació.

En el cas d'EMCV, una possibilitat seria buscar una molècula que estabilitzés la conformació alterada del motiu A per evitar l'entrada de nucleòtids i evitar així l'activitat de la polimerasa i, en conseqüència, la replicació viral. Degut a que es podria extrapolar aquesta reorganització del motiu A per la resta de picornavirus, aquest compost podria esdevenir un fàrmac d'espectre ampli útil per eradicar les infeccions provocades per aquesta família de virus.

Concretament, la glutamina podria ser utilitzada com a punt de partida de la cerca d'aquesta molècula estabilitzadora de la conformació inactiva I4₁₂₂. Tenint en compte que la 3D^{pol} en el grup espacial C2 no presenta cap molècula de glutamina malgrat hagi estat purificada i concentrada de la mateixa manera fa pensar que la unió d'aquesta és posterior al desplaçament del *loop* A. Així, si la conformació alterada representa un mecanisme de regulació natural de la 3D^{pol}, es podria decantar l'equilibri cap a la presència de polimerases inactives que, degut a la unió de la molècula dissenyada, serien incapaces de recuperar la conformació activa i quedar segrestades. D'aquesta manera s'impediria la replicació de l'ARN viral.

4.2.3 El GPC-N114 s'uneix a la 3D^{pol} de CVB3

La manca de tractaments efectius envers les infeccions de Picornavirus a dia d'avui determina la necessitat de trobar fàrmacs eficients i d'ampli espectre ja que, encara que en general no impliquen la mort, tenen una alta prevalença i el tractament simptomàtic genera importants despeses mèdiques. No obstant, existeixen compostos que afecten el cicle viral involucrant tan proteïnes estructurals com no estructurals. La ribavirina, anàleg de nucleòtid, l'amilorida, NNI, o el pleconaril, que s'uneix a la VP1 impedeixen el correcte desenvolupament del cicle viral. El GPC-N114 és un nou compost que inhibeix la replicació d'ARN d'un gran espectre d'enterovirus i algun cardiovirus com EMCV.

La resolució de l'estructura tridimensional del complex de la 3D^{pol} de CVB3 amb el GPC-N114 determina que el lloc d'unió es troba a la conjuntura del palmell amb els dits i es superposa amb el nucleòtid de l'extrem 3' del motlle. Aquest resultat està recolzat parcialment pels experiments de competició en els que el GPC-N114 únicament competeix amb el complex motlle-encebador quan s'afegeix abans que aquest a la reacció. Això no voldria dir, però, que el motlle no pugui unir-se a la polimerasa ja que té una superfície d'unió molt més gran que l'inhibidor. No obstant, la presència de l'inhibidor podria determinar una unió defectuosa del motlle que impediria l'aparellament de la base acceptora amb el nucleòtid entrant.

La majoria dels residus implicats en la unió d'aquest compost estan conservats en altres gèneres de picornavirus a part dels enterovirus i cardiovirus. Així doncs, és probable que aquesta situació sigui extrapolable a altres virus.

4.2.4 La resistència a fàrmacs específics de la 3D^{pol}

La resistència als fàrmacs és un dels principals problemes en els tractaments d'infeccions virals. Per tant, molècules que no propiciïn l'aparició de mutacions d'escapament, que permeten al virus sobrepassar l'efecte del fàrmac, són les més desitjables. En l'estudi realitzat no s'obtingueren soques resistents de CVB3 o PV1 al GPC-N114. No obstant, menys de 5 passis de cultius infectats amb EMCV foren suficients per l'aparició de soques resistents al compost. Les mutacions, situades a la 3D^{pol}, consisteixen en una transversió d'adenina a guanina que determina, en un cas, el canvi de metionina a valina al residu 300 i, en l'altre, el canvi de isoleucina a valina al residu 304. Aquestes determinen que l'activitat antiviral del GPC-N114 dirigida a la 3D^{pol} decaigui fins a nivells pràcticament imperceptibles.

L'obtenció de l'estructura tridimensional de la 3D^{pol} d'EMCV i dels dos mutants, M300V i I304V ha permès analitzar l'entorn de les mutacions de resistència per inferir un possible mecanisme molecular de resistència. Els dos residus mutats formen part del motiu B conservat, que participa en la unió del motlle d'ARN i del mecanisme de translocació durant la síntesi (Ferrer-Orta et al., 2007; Gong and Peersen, 2010). Aquest motiu, per comparació de les estructures cristal·logràfiques conegudes de 3D^{pol}, s'ha descrit com a flexible (Garriga et al., 2007; Högbom et al., 2009; Ng et al., 2004; Wu et al., 2010) i, per tant, les mutacions situades en aquesta regió poden distorsionar aquesta propietat implicant una modificació de l'activitat o de l'efecte de reguladors externs com pot ser el GPC-N114: mantenint l'habilitat d'interacció amb el motlle-encebador malgrat la presència de l'inhibidor o afectant al seu lloc d'unió, respectivament.

DISCUSSIÓ

La comparació de les tres estructures de les 3D^{pol} d'EMCV resoltes en aquest treball fa evident la semblança entre elles, inclús de la regió del motiu B. Tot i així, hi ha petits canvis destacables que podrien afectar a la unió de l'inhibidor. La superposició del núvol de densitat ocupada pel GPC-N114 en l'estructura del complex amb la 3D^{pol} de CVB3 a la de EMCV mostra que, en el cas de la WT, el *loop* del motiu B hauria de desplaçar-se per deixar entrar l'inhibidor, si és que conserva el lloc d'unió. En el cas dels mutants la situació s'accentua ja que el *loop* envaeix més el lloc que teòricament hauria d'ocupar el GPC-N114.

En el model d'unió a partir de l'estructura de CVB3, només el residu M300 podria establir un contacte directe amb el GPC-N114 (distància de 3.5Å, per homologia a la I296 en CVB3) i la I304 no hi intervindria en interaccions directes. Així, com a mínim una de les mutacions no tindrien cap efecte directe en la unió de l'inhibidor. No obstant, un anàlisi acurat de la zona ens mostra que les cadenes laterals mutades sí que presenten diferències destacables entre les estructures ja que la de la valina és més curta que la de la metionina i la isoleucina. L'anàlisi detingut de l'entorn de les mutacions i, sobretot, de l'hèlix que les conté revelà la pèrdua de gran part de les interaccions hidrofòbiques que s'estableixen en la WT i, per tant, deixa lloc a una major flexibilitat de l'hèlix i, probablement en conseqüència, del *loop* B. A més, el desplaçament del residu Ala297 en els mutants també elimina l'última volta d'hèlix afegint-se també a les possibles causes d'un augment de flexibilitat.

En el cas de la 3D^{pol} WT d'EMCV probablement el GPC-N114 adopti una conformació lleugerament diferent a la de CVB3 i s'acobli a la conformació que presenta el *loop* B de la 3D^{pol} d'aquest virus. No obstant, el possible augment de flexibilitat de la hèlix i el *loop* del motiu B, conferida per les mutacions als residus 300 i 304, pot ser una raó de pes per evitar la unió de l'inhibidor, donat que les possibles interaccions serien menys estables, i, per tant, un mecanisme de resistència.

4.2.5 La resistència a amilorida de la 3D^{pol} S299T de CVB3

La resistència a fàrmacs mitjançant mutacions puntuals a la 3D^{pol} és bastant comú i s'ha observat en casos anteriorment. En aquest treball s'ha pretès estudiar l'efecte de la mutació S299T de la 3D^{pol} de CVB3 davant del tractament amb amilorida (Harrison et al., 2008). Aquest residu, com els anteriors de la 3D^{pol} d'EMCV, es troba a l'hèlix alfa del motiu B i en les 3D^{pol} de picornavirus presenta una serina o una treonina.

L'estructura tridimensional de la 3D^{pol} S299T de CVB3 només revelà diferències en l'orientació del grup hidroxil de la cadena lateral de la treonina respecte la del de la serina. A nivell estructural no se n'han pogut derivar les conseqüències, però sí s'observa la pèrdua del pont d'hidrogen que s'establia entre el residu 299 i la cadena principal de la glicina del centre actiu, al motiu C, aconseguint segurament major flexibilitat de la zona.

Les implicacions funcionals d'aquesta mutació són: la resistència a la inhibició de la síntesi d'ARN i l'activitat mutagènica provocades per l'amilorida; la resistència a l'activitat mutagènica per la presència d'altres concentracions de Mg²⁺ i Mn²⁺ i la baixa fidelitat en la replicació de l'ARN. La 3D^{pol} S299T presenta un fenotip termostable i és capaç de replicar a 39°C, temperatura a la qual la proteïna WT és inactiva. La S299A, analitzada amb l'objectiu de veure si realment la cadena lateral del residu 299 és determinant per a l'activitat, presentà activitat a 32°C, però no a 36°C a diferència de la S299T.

Així, tot i que l'estructura obtinguda del mutant no ens dóna informació del mecanisme, la cadena lateral del residu 299 és crucial per la correcta activitat de la 3D^{pol}. L'estructura de la 3D^{pol} mutant S298T de PV, equivalent al S299T de CVB3 i que presenta la mateixa activitat que la WT rebel·là que la mateixa orientació del grup hidroxil de la cadena lateral que la WT. De manera que, es podria determinar que la interacció que estableix la cadena lateral del residu 299 és clau per l'activitat de la polimerasa, la qual cosa està en acord amb el fet de que l'orientació d'aquesta es mantingui en totes les estructures conegudes de 3D^{pol} de picornavirus.

5 CONCLUSIONS

1. La similitud estructural i de seqüència observada entre els dominis N-terminal de 2B^{sol} d'hepatovirus i C-terminal de 2A^{pro} d'enterovirus suggereix que la regió 2AB del genoma d'aquest dos gèneres de picornavirus provindria d'un mateix ancestre.
2. La disposició del domini 2B^{sol} a l'empaquetament cristal·lí en forma de fibra helicoidal al llarg de l'eix C i la presència d'una putativa hèlix transmembrana a la regió C-terminal de la proteïna 2B permeten inferir en el mecanisme que fa servir el virus de l'hepatitis A per la reorganització de membranes internes de la cèl·lula hoste.
3. El mecanisme d'inhibició de la 3D^{pol} de CVB3 pel GPC-N114 radica en el solapament dels llocs d'unió de l'inhibidor amb la posició del nucleòtid acceptor de la cadena motlle i suggereix que la presència del GPC-N114 interferiria amb el correcte posicionament de l'ARN motlle al centre actiu de l'enzim.
4. La conformació alterada el *loop* del motiu A en la 3D^{pol} d'EMCV determina una conformació inactiva i podria tenir un paper en l'autoregulació de l'activitat de la polimerasa. La conservació dels residus implicats en el desplaçament suggereix un mecanisme extrapolable a la resta de polimerases de picornavirus.
5. Els residus mutats de les 3D^{pol} d'EMCV de les soques resistents a GPC-N114, M300V i I304V, determinen una augment de flexibilitat del motiu B. Aquesta flexibilitat i el desplaçament del *loop* β 10- α 10 en direcció al lloc d'unió de l'inhibidor descrit a la 3D^{pol} de CVB3 semblen estar relacionats amb el mecanisme de resistència.
6. L'orientació de la cadena lateral del residu 299 de la 3D^{pol} de CVB3 és determinant per la seva activitat afectant la fidelitat i la termoestabilitat de l'enzim i permetent la resistència a l'amilorida.

6 MATERIALS I MÈTODES

6.1 MATERIALS

6.1.1 Plàsmids

- **pDest14-CBV3-3D^{WT}** i **pDest14-CBV3-3D^{S299T}**: el grup col·laborador del Dr. Bruno Canard (AFMB-UMR, Marsella, França) ens proporcionà el plàsmid que conté la 3D^{pol} de Coxsackievirus B3 salvatge (WT) i mutant al residu 299 (S299T). El vector **pDest14** (Invitrogen) és un plàsmid d'expressió de gens heteròlegs en *Escherichia coli*; aquesta està regulada pel promotor de la polimerasa del bacteriòfag T7 i conté el gen de resistència a ampicil·lina per poder seleccionar les colònies correctament transfectades. Presenta *His-Tag 6X* al C-terminal, per això la seqüència de les dues proteïnes presenta una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal.
- **pET26Ub-PV-3D^{S298T/L446D/R455D}**: el laboratori del Dr. Frank M. van Kuppeveld (Universitat Utrecht, Utrecht, Holanda) proporcionà el plàsmid que conté la 3D^{pol} de Poliovirus salvatge mutant pel residu 298 (S298T), 466 (L446D) i 455 (R455D). Aquestes dues últimes mutacions incrementen la solubilitat de la proteïna i permeten un bon empaquetament cristal·lí per resoldre l'estructura completa de la polimerasa (Thompson and Peersen, 2004). El vector **pET26Ub** augmenta el rendiment d'expressió de la proteïna mitjançant la fusió d'Ubiquitina a l'extrem N-terminal. Conté un gen de resistència a cloramfenicol per poder seleccionar les colònies correctament transfectades.
- **pCG1**: el laboratori de F. M. van Kuppeveld proporcionà aquest plàsmid que codifica per una proteasa específica del C-terminal de la Ubiquitina, de manera que permetrà obtenir la polimerasa de poliovirus sense elements de fusió.
- **pTYB1-2AB**: el vector pTYB1 (*New England Biolabs*) permet fusionar la inteïna a l'extrem C-terminal de la proteïna recombinant. Utilitzen el promotor T7 i seguidament codifiquen pel gen *lac I* que permet evitar la síntesi de la proteïna en absència d'IPTG. A més, abans del promotor presenta quatre còpies del

terminador de transcripció d'*E. coli* per minimitzar transcripcions inespecífiques. Conté gen de resistència a Ampicil·lina.

- **pETG20A-EMCV3D^{WT}**, **pETG20A-EMCV3D^{M300V}** i **pETG20A-EMCV3D^{I304V}** : el vector codificant per la 3D^{pol} salvatge d'EMCV va ser facilitat pel laboratori del Dr. Bruno Canard (AFMB-UMR, Marsella, França). La 3D^{pol} d'EMCV derivada de la soca infecciosa pM16.1 va ser clonada al pETG20A Gateway (*Invitrogen*), vector d'expressió per *E. coli* que permet fusionar una cua 6xHis a l'extrem C-terminal de la proteïna recombinant. Utilitza el promotor T7 condicionat al gen *lac I*. Conté el gen de resistència a Ampicil·lina.

6.1.2 Soques *Escherichia coli*

- **BL21 (DE3)**: soca derivada de la soca B d'*Escherichia coli* que permet un alt nivell d'expressió de proteïnes recombinants basada en el promotor de bacteriòfag T7. Aquesta soca té la ARN polimerasa T7 sota el promotor induïble per IPTG *lacUV5* de manera que es suprimeix l'expressió basal de proteïnes recombinants que puguin afectar el creixement i la viabilitat cel·lular (DE3). Tot i així, no és tan eficient en aquesta inhibició com les soques BL21(DE3)pLysS o BL21(DE3)pLysE.
- **Rosseta (DE3) pLys**: soca derivada de les BL21 dissenyades per a l'expressió de proteïnes eucariòtiques que contenen codons rars per *E. coli*. Aquesta soca conté un plàsmid resistent a cloramfenicol que aporta ARNs de transferència pels codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA l'expressió dels quals està controlada pels seus promotors nadius. Aquesta soca té la ARN polimerasa T7 sota el promotor induïble per IPTG *lacUV5* de manera que es suprimeix l'expressió basal de proteïnes recombinants que puguin afectar el creixement i la viabilitat cel·lular (DE3).
- **B834 (DE3)**: soca parental de les BL21, deficientes en proteases i auxòtrofs per metionina. Permeten una alta activitat en el marcatge de proteïnes amb ³⁵S-metionina i selenometionina. També presenten la característica DE3.

- **Origami2:** soca derivada de les K-12 que presenta mutacions als gens de la reductasa de tioredoxina i la reductasa de glutatió els quals propicien la formació de ponts disulfur. Són resistents a tetraciclina.

6.2 MÈTODES: LA CRISTAL·LOGRAFIA DE PROTEÏNES

La cristal·lografia de proteïnes permet determinar l'estructura tridimensional d'una macromolècula a nivell atòmic. Els àtoms units covalentment estan separats 1-2 Å, per això es necessita llum d'una longitud d'ona al voltant d'1 Å per a obtenir dades amb prou resolució per poder diferenciar dos àtoms propers. Les ones electromagnètiques en aquest rang de longitud d'ona són els rajos X.

La difracció de rajos X d'una molècula és massa dèbil per ser detectada, en part degut al dany per radiació que pateix quan els fotons hi interactuen. Els cristalls són una solució a aquest problema: presenten un nombre elevat de molècules ordenades tridimensionalment en unitats repetitives formant xarxes cristal·lines d'una simetria determinada. Així, la senyal de dispersió dels rajos X s'intensifica fins a un nivell perceptible.

La formació dels cristalls requereix una solució concentrada de proteïna pura i unes condicions que permetin arribar a una solució sobresaturada en la que les molècules s'ordenin de manera periòdica permetent el creixement cristal·lí.

6.2.1 Obtenció de proteïna pura

L'objectiu d'aquest pas és aconseguir una mostra homogènia i concentrada de proteïna, ja sigui a partir de mostres biològiques o d'expressió recombinant.

És necessari trobar un bon sistema per obtenir grans quantitats de proteïna, com per exemple la sobreexpressió heteròloga recombinant en bacteris. En aquest cas, es clona la proteïna d'estudi en un vector d'expressió heteròloga sota un promotor concret que és introduït, mitjançant una transformació, a una soca d'*Escherichia coli*. Els vectors inclouen gens de resistència a antibiòtics, de manera que s'utilitza el tractament amb antibiòtic per seleccionar les colònies d'*E. coli* que s'han transformat correctament. Es creix un cultiu bacterià de la soca recombinant i s'indueix l'expressió de la proteïna sota

unes condicions determinades de temperatura, temps i agitació que permetin l'obtenció d'aquesta en la fracció soluble resultant de la lisi.

Un cop s'ha obtingut la proteïna en la fracció soluble cal dur a terme la purificació per obtenir la mostra homogènia. Existeixen moltes tècniques per aïllar proteïnes, però totes es basen en aspectes diferencials que pot tenir la proteïna respecte la resta d'elements de la fracció soluble. A continuació es detallen les tècniques utilitzades en aquest treball.

6.2.1.1 Precipitació per Sulfat Amònic

Les proteïnes són solubles en medi aquós perquè tenen aminoàcids amb cadenes laterals hidrofíliques que poden interaccionar amb l'aigua. El sulfat amònic (SA) és una sal i, en conseqüència, segresta les interaccions hidrofíliques disponibles en una solució de manera que les proteïnes agreguen i precipiten. Com més hidròfila sigui una proteïna, més concentració de SA caldrà per precipitar-la. En el cas de la 3D^{pol} de Poliovirus calgué un 40% de SA. Després de la precipitació, es realitza una diàlisi per tal d'eliminar el SA.

6.2.1.2 Cromatografia d'afinitat

Les proteïnes recombinants presenten la possibilitat de fusionar elements amb una afinitat determinada que facilita la seva purificació.

- **Afinitat a metalls quelants: la cua d'histidines**

Als extrems N- o C-terminal de la proteïna s'hi poden afegir unes quantes histidines (*His-Tag* en anglès), aminoàcid que s'uneix de forma no covalent a ions metàl·lics de transició com el Ni²⁺. Les columnes de Ni²⁺ tenen aquest ió associat a una matriu i uneixen fortament les proteïnes amb cua d'histidines (*HisTrap HP, GE Healthcare*). L'elució es duu a terme mitjançant un tampó amb altes concentracions d'imidazol que competeix pels punts d'unió i allibera la proteïna.

- **Afinitat a quitina: IMPACT system (*New England Biolabs*)**

Aquest sistema de columnes de quitina permet la purificació de proteïnes fusionades a inteïna. La inteïna és afí a la quitina i conté activitat auto-proteolítica que permet separar-la de la proteïna d'interès en presència de tiols (com el DTT). D'aquesta manera s'evita l'ús de proteases per eliminar la proteïna de fusió.

6.2.1.3 Cromatografia de bescanvi iònic

La composició aminoacídica de cada proteïna en determina una càrrega elèctrica. Així, en sotmetre la mostra a una resina carregada, obtindrem una elució diferencial en funció de la càrrega.

- **Bescanvi catiònic:** *Sepharose SP HP (GE Healthcare)*

La resina conté grups $-\text{SO}_3^-$ que determinen una càrrega negativa a pH neutre de manera que les proteïnes carregades positivament queden adherides a la resina. Un tampó amb concentració elevada de clorur de sodi elueix les proteïnes segons la quantitat de càrrega positiva per competició del ió Na^+ .

- **Bescanvi aniònic:** *Sepharose Q HP (GE Healthcare)*

La resina conté grups $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ que determinen una càrrega positiva a pH neutre de manera que les proteïnes carregades negativament queden adherides a la resina. Un tampó amb concentració elevada de clorur de sodi elueix les proteïnes segons la quantitat de càrrega negativa per competició del ió Cl^- .

En el cas de la 3D^{pol} de Poliovirus s'utilitzaren les dues columnes seqüencialment per optimitzar la puresa de la mostra.

6.2.1.4 Cromatografia per exclusió molecular

Aquest tipus de cromatografia permet separar les proteïnes d'una mescla segons el seu pes molecular. Consisteix en una fase sòlida composta per polímers, agarosa i dextrà (*Superdex 200, GE Healthcare*), que formen una xarxa de canals i coves sense sortida a nivell microscòpic. La fase líquida que conté la mescla proteica transcorre per la columna de manera que les proteïnes més petites recorren més espais que les grans. Així,

el temps de retenció a la columna és inversament proporcional a la mida de la proteïna. D'aquesta manera, a part de separar les proteïnes, aquesta cromatografia permet també saber el pes molecular la proteïna eluïda.

Durant la purificació és important assegurar qualitativament la presència i puresa de la proteïna en la mostra. Per això s'utilitza:

6.2.1.5 Anàlisi electroforètic en condicions desnaturalitzants

La tècnica d'electroforesi en gels desnaturalitzats d'acrilamida (SDS-PAGE) permet separar proteïnes segons el seu pes molecular mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric (Laemmli, 1970). Les proteïnes es mesclen amb un tampó desnaturalitzant (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS (w/v), 0.025% (w/v) de blau de bromotimol, 25% (w/v) glicerol i 10mM DTT) i s'escalfen a 95°C durant 5 minuts abans de ser carregades al gel d'acrilamida. S'utilitza el marcador de pes molecular *SeeBlue Prestained Protein* (Invitrogen). Els gels es tenyeixen amb una solució de blau de Coomassie al 0.25% en 10% isopropanol i 10% àcid acètic.

A continuació s'especificaran breument els protocols seguits per al clonatge i l'expressió de cada proteïna del treball. Els detalls concrets de cada clonatge i purificació es troben a les taules de protocols específics de l'apartat 6.4.

6.2.2 Obtenció de les proteïnes de la tesi

6.2.2.1 La poliproteïna 2AB

El gen de la poliproteïna 2AB es dissenyà amb els codons optimitzats per la sobreexpressió en *E. coli*. Mitjançant PCR, es construí a partir d'un grup de 34 oligonucleòtids (de 32 a 47 bases de llargada) generats pel programa *DNAWorks* (Hoover and Lubkowski, 2002; Stemmer et al., 1995).

fwd 1	5'-GGTGGTCATATGTCCATGATGTCTCGTATCGCGCGGGTGAC-3'	rev 1	5'-GGTGGTTGCTCTCCGACGCCCTGTTCTTTGA-3'
fwd 2	5'-CTGGAATCTTCTGTTGACGACCCGCGTTCTGAAGAAGACA-3'	rev 2	5'-TTTCCTGAACACCAGACAGACCCAGCATACGGTCCGC-3'
fwd 3	5'-AACGTTTCGAATCTCACATCGAATGCCGTAAACCGTACAAA-3'	rev 3	5'-CAGGTTGATTTTTTCGGGTTCCAGCAGTGCAGCAGGA-3'
fwd 4	5'-GAACTGCGTCTGGAAGTTGGTAAACAGCGTCTGAAATACGCG-3'	rev 4	5'-AGCACAGGTCGGTTTCAGACATGTTCCGGGAAGTCTTAGAGTT-3'
fwd 5	5'-CAGGAAGAAGTCTAACGAAGTCTGCCGCCGCC-3'	rev 5	5'-CGCCGCGATTCTCCAGGTCCAGCATGCCGTGCG-3'
fwd 6	5'-GCGTAAAATGAAAGGTCTGTTCTCTCAGGCGAAAATCTCCCTG-3'	rev 6	5'-GGAAGTTAACTTTGCTCCAGTATTTGTTGCTGGTGAATTTTCGATC-3'
fwd 7	5'-TTTTACCCGAAGAACACGAAATTATGAAATCTCTTGGCGT-3'	rev 7	5'-AGAGAAACGATTTTGTCTCTTTCATTTCCGGTCCATTTTTCAT-3'
fwd 8	5'-GGTGTACCGCGGACACCCGTGCGCTGCGTCG-3'	rev 8	5'-CGTTCAGACGGATCAGACGACCGGTCAGAACCACCG-3'
fwd 9	5'-TTTCGGTTTCTCTCTGGCGGCGGGTCTGTTGTTG-3'	rev 9	5'-CGTCCATTTCCAGGGTCAAACAGAACGACCCGC-3'
fwd 10	5'-GACCTGGAAATGGACGCGGGTGTCTGACCGG-3'	rev 10	5'-CGCCAGAGAGAAACCGAAACGACGACGCGCACG-3'
fwd 11	5'-TCGTCTGATCCGTCTGAACGATGAAAATGGACCGAAAT-3'	rev 11	5'-GGTGTCCGCGGTAACACCACGCAAGAGAATTTTCATAA-3'
fwd 12	5'-GAAAGACGACAAAATCGTTTCTCTGATCGAAAATTCACCAGCA-3'	rev 12	5'-TTTCGTGTTCTTCGGTGTAAAACAGGGAGATTTTCGCTGAGAG-3'
fwd 13	5'-ACAAATACTGGAGCAAAGTTAACTTCCCGCACGGCATCTGGACCTG-3'	rev 13	5'-AACAGACCTTTTCATTTTACGCGGCGGCGGCGAGA-3'
fwd 14	5'-GAAGAAATCGCGGCAACTCTAAAGACTTCCCGAACAT-3'	rev 14	5'-ACTTCGTTAGACAGTTCTCTGCGCGTATTTAGACGCTGTTTA-3'
fwd 15	5'-GTCTGAAACCGACCTGTGCTTCTGCTGCACTGGTGAA-3'	rev 15	5'-CCAACTTCAGACGCAGTTCTTTGTACGGTTTACGGCATT-3'
fwd 16	5'-CCCGAAAAAATCAACTGGCGGACCGTATGCTGG-3'	rev 16	5'-CGATGTGAGATTCGAAACGTTTGTCTTCTTCAGAACGCGG-3'
fwd 17	5'-GTCTGTCTGGTTCAGGAAATCAAAGAACAGGGCTGCGG-3'	rev 17	5'-GTCGTCAACAGAAGATTCCAGGTCACCCGCCGCGAT-3'

Taula 11. Relació d'oligonucleòtids utilitzats per sintetitzar el gen de la poliproteïna 2A-2B per la cadena 5'-3' (fwd) i la 3'-5' (rev).

La seqüència nucleotídica que codifica per la poliproteïna de 217 residus (71 residus de la proteïna 2A i 146 residus del domini soluble de la 2B) va ser clonada al vector pTYB1 (*New England Biolabs*), que permetia la fusió de la proteïna inteïna a l'extrem C-terminal de la 2AB (Figura 53a).

Les proves d'expressió de la poliproteïna 2AB foren molt exhaustives. Es testaren diferents tipus cel·lulars (BL21, Rosetta, Rosetta pLysS i Origami2), temperatures d'inducció (15, 20, 30 i 37°C), medis de cultiu (TB, SB i LB), temps d'inducció (5h i 20h), vectors d'expressió i constructes (variant la proteïna de fusió: inteïna, MBP, *HisTag*, GST) en una combinatòria per generar aproximadament tots els possibles escenaris a partir de totes les variables. Cap d'aquestes sobreexpressions funcionà ja que la poliproteïna quedava en la fracció insoluble del cultiu.

Finalment, les condicions d'inducció foren en BL21 (DE3), en medi LB complementat amb 100 µg/µl d'ampicil·lina, amb una concentració de 0.3mM IPTG durant 17 hores a 12°C.

L'expressió de la proteïna derivada amb selenometionina es va fer en cèl·lules B834 (DE3) transformades amb el plàsmid i crescudes durant 17 hores en un 100ml de medi mínim (SelenoMet, *Molecular Dimensions*) complementat amb 4mg/L de L-metionina. Abans de la inducció, les cèl·lules van ser rentades i utilitzades com a inòcul d'un cultiu de 2L preparat amb medi mínim i 1X L-SeMet (segons indicació del fabricant *Molecular Dimensions*). Les condicions d'inducció van ser equivalents a la proteïna nativa.

Les purificacions tan de la proteïna nativa com de la proteïna amb selenometionina segueixen el mateix procés. La cua d'inteïna fusionada a l'extrem C-terminal de la poliproteïna permeté la purificació mitjançant una columna d'afinitat de quitina (IMPACT system, *New England Biolabs*) (Chong et al., 1998). La 2AB unida a la columna fou eluïda mitjançant l'addició de 50mM de DTT al tampó de càrrega. Seguidament, la proteïna eluïda, va ser acabada de purificar per cromatografia d'exclusió molecular (*HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR column, GE Healthcare*) (Figura 53b).

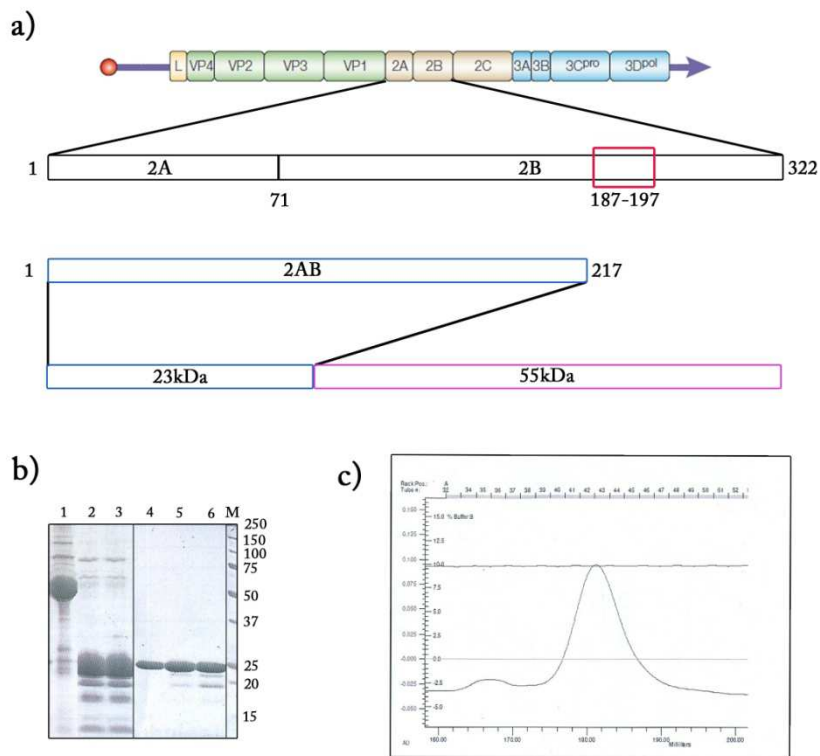


Figura 53. Clonatge i purificació de la poliproteïna 2AB. (a) Esquema de la regió clonada del genoma: poliproteïna 2AB (blau) exceptuant la regió C-terminal de la 2B a partir del segment transmembrana predit (vermell) unida a la inteïna (rosa). (b) SDS-PAGE de la purificació de la poliproteïna: la fracció ancorada a la columna després de l'elució amb DTT conté la inteïna (1), fraccions de l'elució amb contaminants (2,3) i fraccions del pic de la cromatografia d'exclusió molecular amb certes traces de contaminació, probablement degudes a degradació (4-6). (c) Pic d'elució de la columna *Sephacryl S-100 HR*.

6.2.2.2 La 3D^{pol} de CVB3

Les proves d'expressió en diferents soques d'*Escherichia coli*, temperatures i temps indicaren que les millors condicions per a l'expressió d'aquesta proteïna eren en Rosseta pLyS (DE3) a 20°C durant 15 hores.

El pas inicial de la purificació consistí en una columna d'afinitat de níquel. L'anàlisi mitjançant un gel SDS-PAGE indicà que el producte eluït contenia la proteïna desitjada, en un pes de 52kDa, i alguns contaminants de menor pes molecular. S'utilitzà

una columna d'exclusió molecular (*Superdex 200*) per acabar de purificar la mostra. Finalment, s'obtingué un rendiment mitjà de 10mg per litre de cultiu (Figura 54).

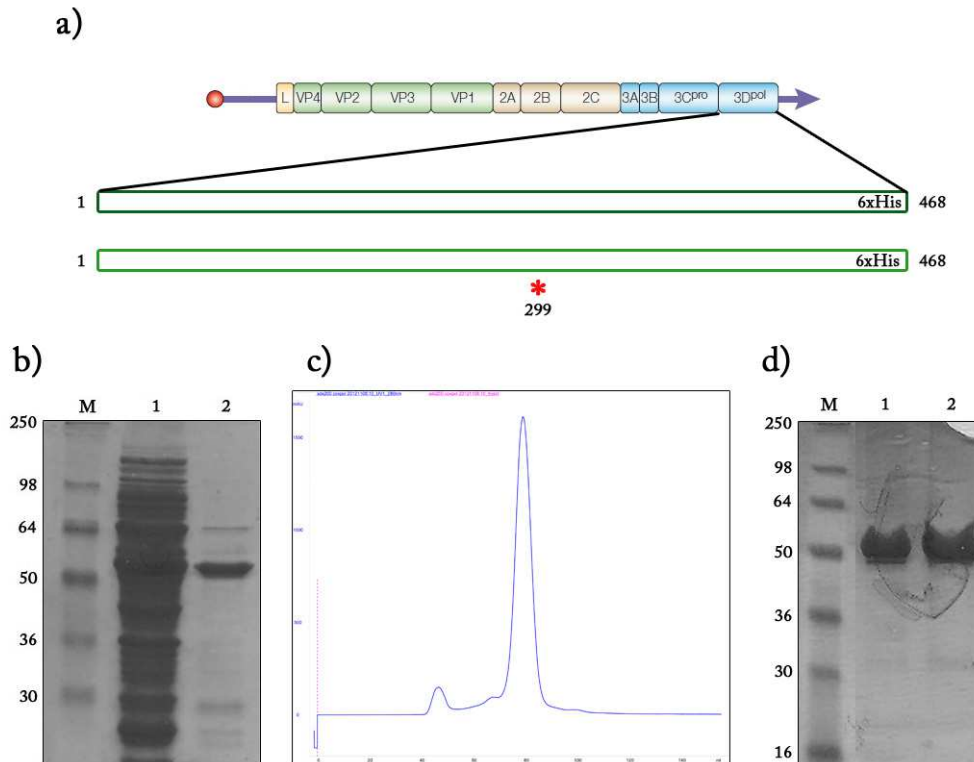


Figura 54. Clonatge de la 3D^{pol} de CVB3 i el mutant S299T i purificació de la 3D^{pol} WT.

(a) Esquema de les proteïnes expressades en *E. coli*, indicant el fragment que ocupa la seqüència en el genoma i la situació de la mutació del residu 299 (estrella vermella) a la 3D^{pol} mutant (verd clar) respecte la 3D^{pol} WT (verd fosc). (b) SDS-PAGE corresponent a la fracció soluble abans del pas per la columna HiTrap (1) i el producte eluït (2). (c) Cromatograma de la purificació per Superdex 200. (d) SDS-PAGE de dues fraccions corresponents al pic del cromatograma anterior (1,2).

6.2.2.3 La 3D^{pol} d'EMCV

L'expressió es dugué a terme en la soca d'*E. coli* Rosseta (DE3) pLyS en medi *Turbo Broth* (AthenaES), complementat amb 100µg/ml d'ampicilina i 34µg/ml de cloramfenicol, induïnt amb 500µM d'IPTG durant 16 hores a 20°C.

En la purificació, la fracció soluble obtinguda de la lisi, mitjançant la ressuspenió en tampó de lisi i sonicació, es va filtrar i carregar en una columna d'afinitat HiTrap™ HP de 5 ml (*GE Healthcare*). L'elució es realitzà amb un gradient de 10 a 500 mM d'imidazol. Posteriorment es realitzà una diàlisi per eliminar la presència d'imidazol i disminuir la concentració de clorur de sodi fins a 300mM per permetre la digestió per tallar la cua d'histidines mitjançant la proteasa TEV. La digestió es dugué a terme durant 16 hores a 20°C i la relació proteïna:TEV òptima fou 10:1. La cua d'histidines i la 3D^{pol} van ser separades mitjançant una altra columna HiTrap™, les fraccions continents de la proteïna de la qual van acabar-se de purificar mitjançant cromatografia d'exclusió molecular (*Superdex 200, GE Healthcare*). La concentració de la proteïna va requerir l'equilibrat de la membrana del concentrador (*Amicon Ultra 10000MWCO, MILLIPORE*) amb 50mM d'arginina i 50mM de glutamina per evitar la seva adhesió a la membrana. Es va concentrar fins a 10mg/ml i se n'analitzà la puresa mitjançant SDS-PAGE (Figura 55).

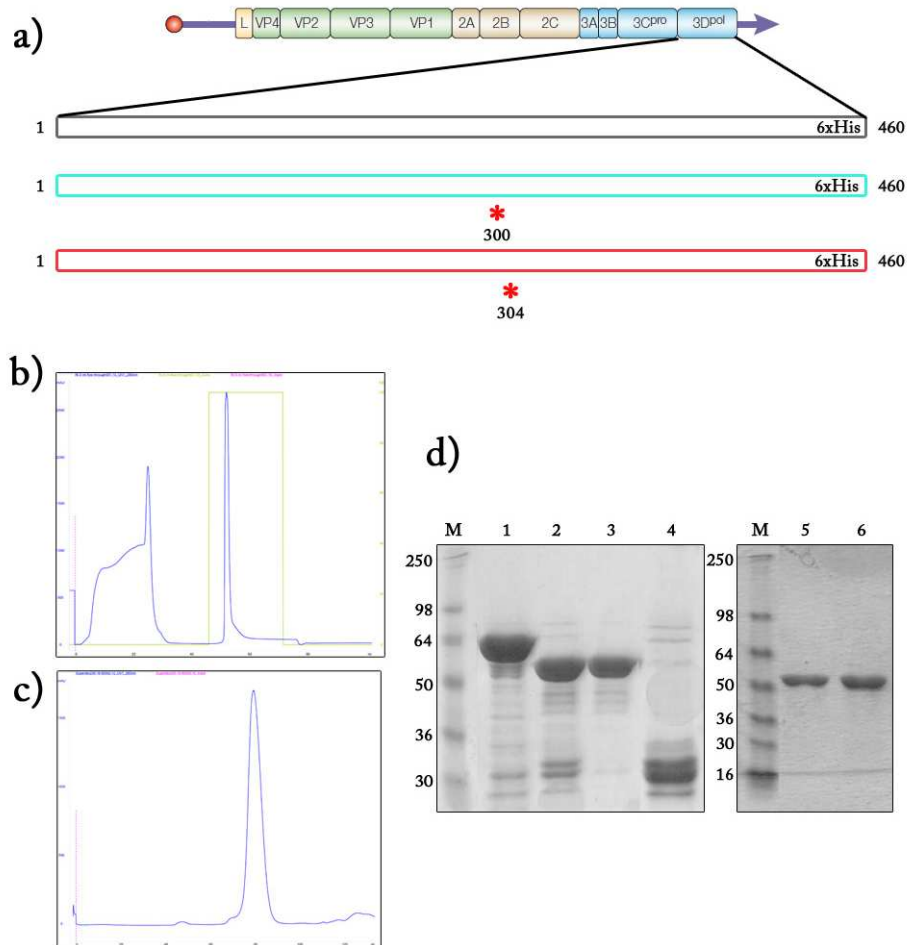


Figura 55. Clonatge i purificació de les 3D^{pol} d'EMCV WT i mutants M300V i I304V. (a) Esquema dels clons WT (gris), M300V (turquesa) i I304V (vermell) amb les posicions mutades marcades amb una estrella vermella. (b) Cromatograma de la segona HiTrap i de (c) la Superdex200. (d) SDS-PAGE on es poden observar fraccions del pic de la HiTrap (2,3) i l'eluit amb la TEV (4). Els carrils 5 i 6 contenen fraccions del pic de la Superdex200 (c).

6.2.2.4 Les 3D^{pol} M300V i I304V d'EMCV

Els vectors dels mutants M300V i I304V s'obtingueren mitjançant mutagènesi puntual dirigida a partir del vector amb la 3D^{pol} WT clonada al laboratori del Dr. Frank M. van Kuppeveld (Universitat Utrech, Utrech, Holanda). La purificació de 3D^{pol} mutants segueix exactament el mateix procés que la WT (Figura 55a).

6.2.2.5 La 3D^{pol} S299T de CVB3

El constructe de la proteïna S299T va ser obtinguda mitjançant la mutació puntual del constructe de la proteïna WT al laboratori del Dr. Bruno Canard (AFMB-UMR, Marsella, França) (Figura 54a). Les proves d'expressió en diferents soques d'*Escherichia coli*, temperatures i temps indicaren que les millors condicions per a l'expressió d'aquesta proteïna eren en Rosseta pLyS (DE3) a 20°C durant 15 hores.

La purificació del mutant S299T és equivalent a la WT, però en aquest cas fou impossible eliminar els contaminants de la mostra, veure figura 56. Es repetí la columna d'exclusió molecular al final de la purificació obtenint el mateix resultat. La proporció de proteïna a 52kDa respecte els contaminants, observada en anàlisi per SDS-PAGE, és molt alta de manera que es decidí provar la cristal·lització malgrat la seva presència.

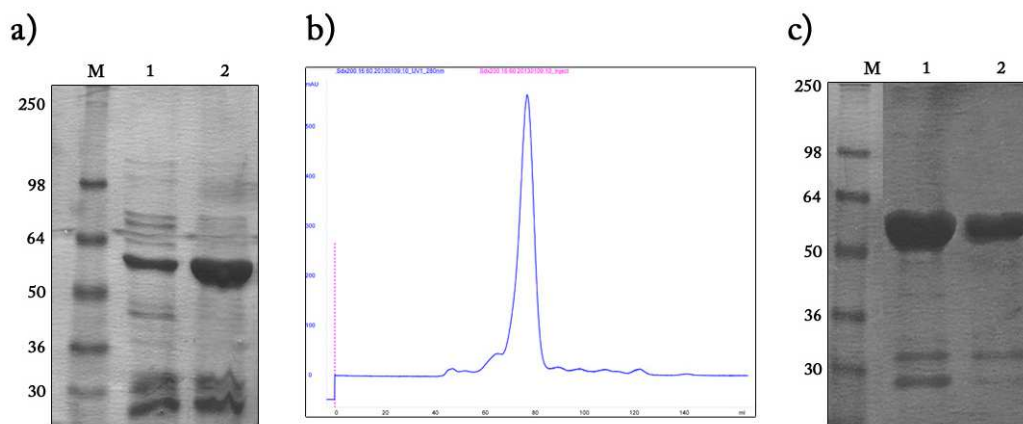


Figura 56. Purificació de la 3D^{pol} S299T. (a) SDS-PAGE corresponent a dues fraccions corresponents al pic eluït de la HiTrap (1,2). (b) Cromatograma de la *Superdex200* on s'observa el pic eluït corresponent a la proteïna. (c) SDS-PAGE de dues fraccions del pic de la *Superdex200* on es pot observar la presència de residus de pes molecular més baix.

6.2.2.6 La 3D^{pol} S298T de PV

Les proves d'expressió d'aquest plàsmid en la soca BL21 (DE3) a 24°C per diferents temps d'expressió indicaren que el més òptim eren 15 hores. La purificació de la proteïna inclou una precipitació en sulfat amònic al 40% i dues columnes d'intercanvi iònic: en primer lloc catiònic (SP HP Sepharose) i en segon aniònic (Q HP Sepharose),

que serveix per acabar d'eliminar les poques impureses presents en l'eluent de la primera. En ambdós casos el pic de proteïna s'elueix al voltant d'una concentració de 0,26M de NaCl i, en anàlisi per SDS-PAGE, es pot veure que té un pes molecular de 52kDa. S'obtenen 4mg per litre de cultiu de rendiment.

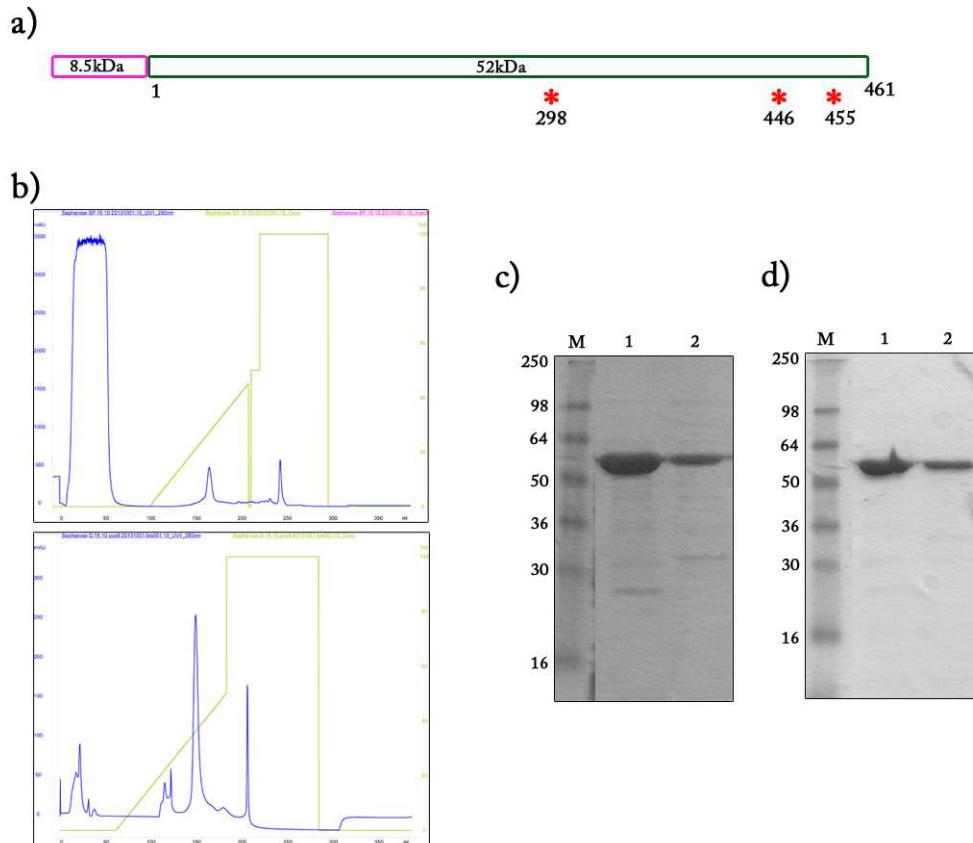


Figura 57. Clonatge i purificació de la 3D^{pol} S298T de PV. (a) Esquema del clon de la 3D^{pol} (verd fosc) amb la inteïna (fúcsia) i les posicions mutades marcades amb una estrella vermella. (b) Cromatograma de les *SP HP Sepharose* (a dalt) i *Q HP Sepharose* (a baix). (c) SDS-PAGE on es poden observar fraccions del pic de la *SP HP Sepharose* i (d) de la *Q HP Sepharose*.

6.2.3 Cristal·lització de la proteïna

La concentració de la proteïna és un element crític en el procés de cristal·lització. En general serà necessari concentrar la solució de proteïna obtinguda de la purificació

utilitzant concentradors de centrífuga amb una mida de porus en funció del pes molecular de la proteïna en estudi.

Per cristal·litzar una macromolècula és necessària la formació de nuclis cristal·lins a partir d'una solució sobresaturada; aquest fenomen només succeeix en la fase de nucleació (Figura 58). Actualment existeixen diverses tècniques que permeten explorar les condicions òptimes de cristal·lització.

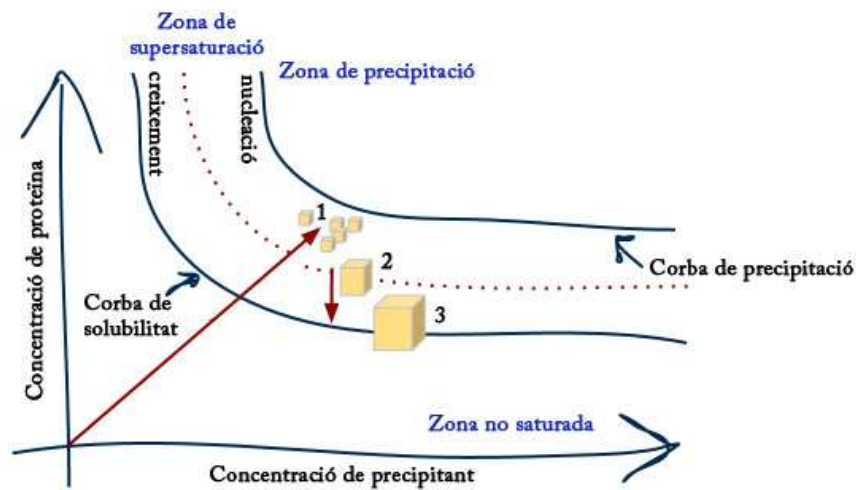


Figura 58. Diagrama de fases dels diferents estats de saturació d'una solució proteica en funció de les concentracions de proteïna i de precipitants. La fletxa vermella indica el recorregut que realitza la solució de la gota de cristal·lització.

La cristal·lització de totes les proteïnes d'aquest treball s'ha dut a terme mitjançant el mètode de difusió de vapor en gota assegurada. Aquest mètode consisteix en posar una gota de solució proteica mesclada amb igual o similar volum de solució de cristal·lització (generalment composta de tampó, sal i agent precipitant) d'entre 0.1-2µl en un pou segellat on hi ha un dipòsit de solució de cristal·lització d'1ml (Figura 59).



Figura 59. Esquema de la gota assegurada en el mètode de difusió de vapor.

La concentració de sals i precipitants a la gota serà la meitat que la del reservori de manera que, per adoptar un nou equilibri, el solvent de la gota s'anirà evaporant. Aquesta evaporació augmentarà progressivament la concentració de proteïna de manera que, teòricament, s'exploraran diferents fases del diagrama amb l'objectiu d'arribar a la fase de nucleació on es puguin formar els nuclis cristal·lins. És molt important controlar tots els paràmetres que afecten a la difusió: l'aparició de massa nuclis implica la formació de molts cristalls petits ja que competeixen entre ells per la proteïna soluble disponible; si no es formen nuclis, no creixen cristalls.

La mida de la gota, la solució de cristal·lització, la concentració de proteïna i la temperatura són paràmetres que afecten a la difusió. Determinen la velocitat d'equilibri, el temps requerit per l'aparició de cristalls, que pot oscil·lar entre hores i mesos. La solució de cristal·lització pot contenir diferents tipus de sals i precipitants a una concentració determinada que promouen la formació de nuclis. La concentració de proteïna determina la quantitat de macromolècules disponibles, de manera que a més concentració més nuclis.

El pH, controlat per un tampó present a la solució de cristal·lització, i la temperatura també afecten la nucleació. Per això, les plaques que contenen els pous segellats són emmagatzemades a sales amb temperatura constant, 20, 16 o 4°C, de manera que tots els elements participants de la difusió resten a la mateixa temperatura durant tot el procés. La forma de la gota també és important. Per això, la superfície on es disposa la gota és hidrofòbica de manera que impedeix deformacions i desplaçaments de la gota,

controlant un factor més de la difusió. S'han d'evitar canvis bruscs en la temperatura i vibracions, ja que poden ser determinants en l'aparició de cristalls.

L'equilibri de tots els factors per afavorir el procés és absolutament necessari, qualsevol excés o manca pot determinar l'aparició de precipitat irreversible o l'absència de nuclis restant la gota transparent. Per trobar les condicions idònies per cada proteïna es realitzen cribatges que exploren múltiples combinacions de precipitants, com ara sals (sulfats, fosfats, citrats...), precipitants (glicerol, polietilenglicol (PEG),...), alcohols (isopropanol, metilpentendiol,...), i tampons (Tris, HEPES,...) que permeten ajustar el pH. Aquest procés de cribatge es realitza en plaques de 96 pous amb volums de gotes de 100-200nl i 90µl de reservori. La preparació dels reservoris de les plaques i la disposició de gotes ho realitza un robot (*TECAN: Freedom EVO 100* i *Cartesian Microsys 4000 XL*) que manté unes condicions d'humitat per evitar l'evaporació de les gotes abans de segellar els pous.

Un cop una o varies condicions determinen l'aparició dels primers cristalls es procedeix a la optimització: variacions lleugeres de concentracions al voltant de la condició de cristal·lització inicial. L'objectiu de l'optimització és obtenir cristalls de major qualitat. El següent pas consisteix en escalar les condicions a gotes més grans (1-2µl) en plaques de 24 pous per tal d'augmentar la mida dels cristalls.

És possible que la proteïna no cristal·litzi sota cap condició testada. Pot ser degut a la presència d'impureses a la gota (de la mostra o les solucions de cristal·lització) que interfereixen en el correcte posicionament de les molècules, necessari per formar el cristall, o a les característiques conformacionals i moleculars de la proteïna.

6.2.4 Muntatge de cristalls i congelació

Per poder difractar els cristalls s'extreuen de la placa mitjançant un "loop", barreta metàl·lica acabada en un llaç de niló suportada per un element imantat ("cap"), que serveix també de suport per fixar el cristall en el goniòmetre davant del feix de raigs X (Figura 60).

L'energia dels raigs X és molt perjudicial per a l'estabilitat del cristall de manera que, quan hi incideixen, trenquen enllaços químics i ionitzen els àtoms. Això afecta, sobretot, a les dades a alta resolució que decauen ràpidament durant la difracció. Per reduir els danys per radiació s'utilitzen tècniques de crio-cristal·lografia. La recollida de dades es duu a terme a 100°K (-173°C) la qual cosa, però, pot comportar la formació de gel per la congelació del solvent que interfereix en la senyal obtinguda de difracció (Jeruzalmi, 2007). Per evitar aquest fenomen es submergeixen els cristalls en una solució crioprotectora que consisteix en la solució de cristal·lització complementada amb un agent crioprotector com el glicerol, l'etilenglicol o altres alcohols de baix pes molecular (Helliwell, 2005).



Figura 60. Cristall de la 2B de HAV congelat en un *loop* de $0.025\mu\text{m}$. Les irregularitats que es poden observar en aquest cas són degudes a la presència d'un tel important a la gota de la que es va pescar el cristall.

6.2.5 Difracció de raigs X

La cristal·lografia de proteïnes requereix raigs X d'alta energia per a obtenir resolució a nivell atòmic. Per dur a terme els experiments de difracció dels cristalls d'aquesta tesi s'ha usat la radiació sincrotró. S'han recollit dades a diferents sincrotrons europeus: *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble), *Alba Synchrotron Light Facility* (ALBA-CELLS, Barcelona) i *Swiss Lightsource* (SLS, Zurich) (Figura 61).



Figura 61. Imatges dels sincrotrons utilitzats per les recollides de dades d'aquests projectes. (a) ESRF, Grenoble, (b) ALBA-CELLS, Barcelona i (c) SLS, Zurich.

En les fonts de llum sincrotró, la desviació de la trajectòria d'uns electrons accelerats fins a energies elevades mitjançant imans genera una descàrrega d'energia en direcció tangencial al gir: els raigs X. A més, mitjançant un sistema òptic complex, s'aconsegueix un feix monocromàtic (una única longitud d'ona) i col·limat (amb totes les ones paral·leles, en fase).

Per recollir les dades de difracció tridimensionals, el cristall ha de poder ser difractat en moltes direccions diferents. L'adaptació, mitjançant l'iman del “cap”, del *loop* a un goniòmetre permet col·locar el cristall centrat al feix de radiació i rotar mantenint-lo sempre en l'àrea irradiada pel feix.

La dispersió es produeix quan els raigs X són desviats de la seva trajectòria pel xoc amb els àtoms. No obstant, només es produeix difracció quan els rajos dispersats tenen la mateixa direcció i mateixa fase, de manera que es combinen i es reforcen (reflexió de Bragg, figura 62). Així, en cada direcció, s'obté informació de la disposició dels àtoms que dispersen en fase. La rotació del cristall permet obtenir dades de tots els àtoms de la macromolècula en el cristall, segons la simetria que presenti la xarxa cristal·lina caldran més o menys graus de rotació durant la recollida de dades.

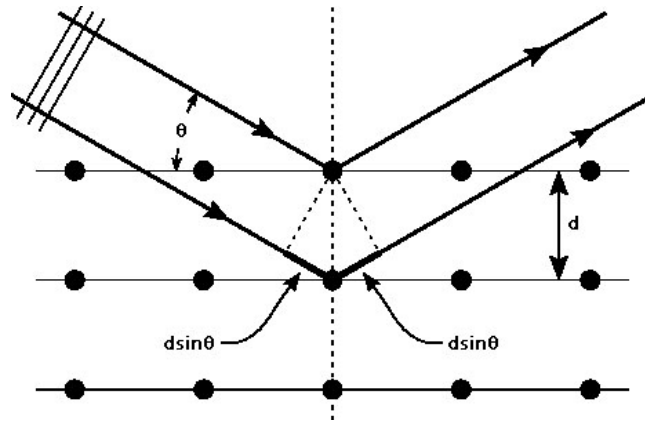


Figura 62. Llei de Bragg. En una condició tal que dos raigs incidents amb un angle θ en una xarxa cristal·lina siguin difractats per dos plans paral·lels a una distància $2d \sin \theta$ múltiple de la longitud d'ona (λ), les ones interferiran constructivament i la senyal mesurada es reforçarà (Extreta de *Center for Materials and Devices for Information Technology Research*, EEUU).

6.2.6 Recollida i processat de dades

Les difraccions del cristall es recullen mitjançant detectors que digitalitzen la intensitat i localització de cada una d'elles en imatges anomenades difractogrames (Figura 63). Entre el cristall i el detector es col·loca una vareta, anomenada *beamstop*, per evitar que totes les reflexions que han travessat el cristall sense patir dispersió impactin amb el detector (Figura 63b).

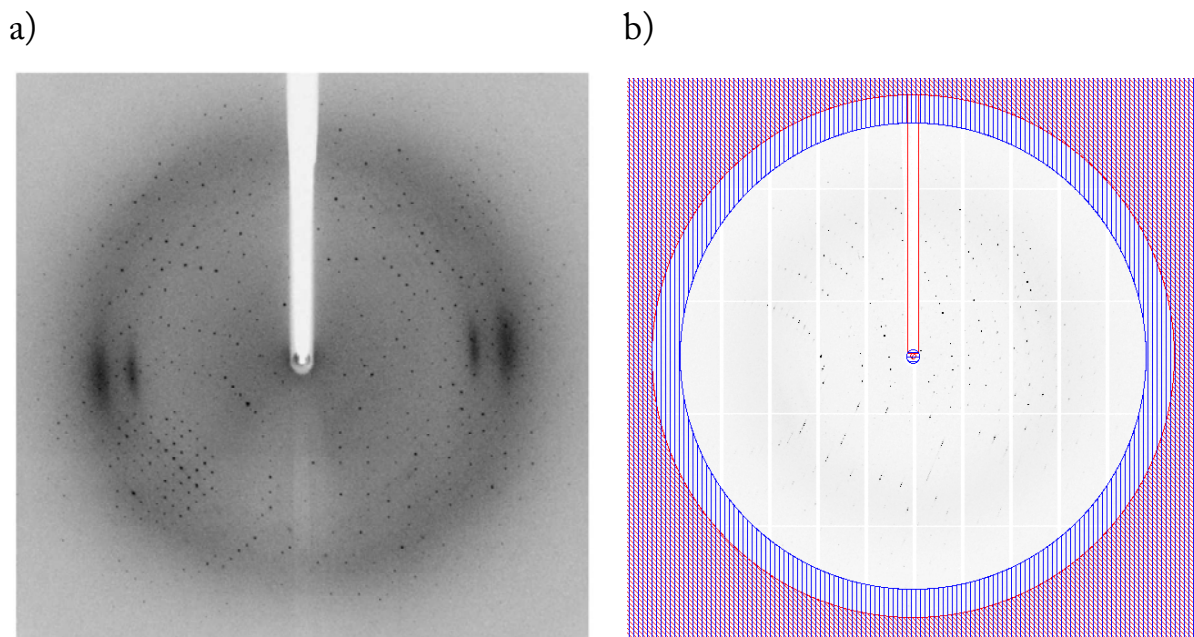


Figura 63. Difractograms de (a) 2B de HAV i (b) 3D^{pol} de CBV3. En els difractograms, els punts d'intensitat propers al centre corresponen a la baixa resolució i els externs a l'alta resolució. La banda blanca en (a) i la banda enquadada en vermell en (b) corresponen a l'ombra del *beamstop* que evita l'arribada dels raigs no difractats al detector. En (b) s'hi representa la màscara de processament (vermell) del programa MOSFLM i la màscara de resolució a 2.9Å (blau).

El processament de les dades, que inclou l'indexat i l'escalat, permet determinar els paràmetres de la cel·la unitat i la simetria del cristall i obtenir, per combinació de totes les imatges, la intensitat i coordenades de cada reflexió (I_{hkl} , h , k i l). Hi ha diversos programes que permeten fer aquests càlculs, en aquest cas l'indexat s'ha dut a terme mitjançant el programa XDS (Kabsch, 2010) o iMOSFLM (Leslie and Powell, 2007) i l'escalat amb Scala (Evans, 2006; Leslie and Powell, 2007; "The CCP4 suite: programs for protein crystallography.," 1994). Per avaluar la qualitat de les dades s'utilitzen diferents paràmetres estadístics com: R_{merge} , R_{sym} , R_{meas} , I/σ , multiplicitat i completesa. A continuació s'especifica la definició del paràmetre R estadístic utilitzat en aquest treball i mostrat a la taula específica de cada proteïna.

$$R_{meas} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n}{n-1}} \sum_{j=1}^n |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl,j}}$$

Figura 64. Fórmula de R_{meas} . On la I és la intensitat observada i la $\langle I \rangle$ la intensitat mitjana de totes les observacions de reflexions relacionades per simetria. La multiplicitat es representa per n , de manera que aquest valor de R és independent de la redundància del grup de dades.

6.2.7 Resolució de l'estructura tridimensional

Arribats a aquest punt, cal extreure de les intensitats obtingudes als difractogrames (espai recíproc) una densitat electrònica per cada coordenada (ρ_{xyz} , espai real) mitjançant la Transformada de Fourier.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{\substack{hkl \\ -\infty \\ +\infty}} |F(hkl)| e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\phi(hkl)]}$$

Figura 65. Transformada de Fourier. Funció que relaciona la densitat electrònica en un punt determinat (x,y,z), espai real, amb el seus factors d'estructura ($F(hkl)$) i les seves fases ($\theta(hkl)$), espai recíproc.

Les fases corresponents als factors d'estructura no es poden mesurar experimentalment. Per la resolució del problema de la fase s'utilitzen diversos mètodes, segons les dades de què es disposi, que permetran obtenir aquesta informació i, finalment, definir la densitat electrònica per a resoldre l'estructura tridimensional.

En aquest treball s'han utilitzat dues metodologies diferents per obtenir la densitat electrònica: el reemplaçament molecular i la dispersió anòmala simple.

6.2.7.1 Reemplaçament molecular

El mètode de reemplaçament molecular (RM) s'ha utilitzat en el cas de les 3D^{pol} de CVB3, EMCV i PV. En disposar d'una estructura tridimensional semblant a la problema podem assignar les seves fases com a fases inicials a la nostra proteïna. En

primer lloc es posiciona la proteïna model a la cel·la unitat del cristall mitjançant operacions de rotació i translació, seguidament, s'extrapolen les fases.

En el cas de la 3D^{pol} d'EMCV, s'utilitzà com a model un model d'homologia, creat mitjançant *Swiss Model Server* (Arnold et al., 2006; Peitsch, 1995), basat en l'estructura de la polimerasa de FMDV, ja que tenen la màxima similitud de seqüència. Pel RM s'utilitzà el programa Phaser (McCoy et al., 2007). Per les estructures de les 3D^{pol} de CVB3, PV i els mutants M300V i I304V, com que les cel·les problema era gairebé idèntiques a les dels models, un afinament de cos rígid amb Refmac5 va ser suficient per trobar la solució correcta (Murshudov et al., 1997). En aquest mètode específic de RM, les operacions de rotació i/o translació de tots els àtoms que el formen es fa en bloc, però en un espai més reduït que en el cas de Phaser.

6.2.7.2 Dispersió anòmala simple.

En el cas de no tenir cap model similar a la proteïna problema, cal utilitzar altres mètodes que intenten deduir l'estructura a partir d'un nombre petit d'àtoms i afrontar la determinació de fases per mètodes directes o de Patterson. S'utilitzen àtoms pesats que tenen una dispersió anòmala quan la longitud d'ona del raig es correspon a un dels seus pics d'absorció.

En el cas de la dispersió anòmala simple, a partir d'un sol cristall, es recullen dades a la longitud d'ona corresponent a l'absorció de l'àtom pesant, la qual cosa implica una modificació de la fase (Figura 66). L'efecte de la dispersió anòmala es veu reflectit en el patró de difracció ja que es trenquen les parelles de Friedel. Les diferències en les reflexions entre els difractogrames ens donaran informació de les intensitats degudes als àtom pesats i, aplicant la funció de Patterson, en podrem obtenir les posicions i les fases d'aquests. D'aquí es podran extrapolar les fases de la proteïna.

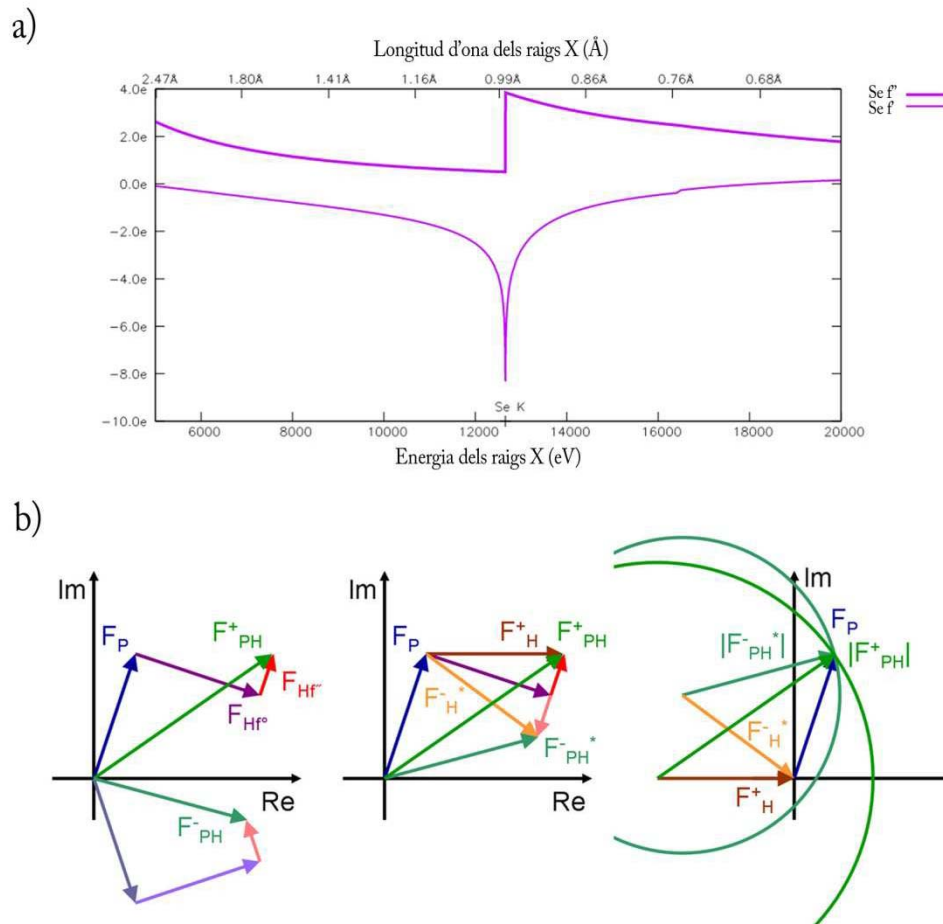


Figura 66. El mètode de la dispersió anòmala simple. (a) Espectre d'absorció del Seleni.

(b) Il·lustració d'un experiment de SAD mitjançant un diagrama d'Argand i una construcció de Harker. S'assenyalen amb vectors els factors d'estructura dels àtoms lleugers (F_P) i d'aquests amb els dels àtoms pesats (F_{PH}), la contribució dels quals es descompon en la component normal (F_{Hf^o}) i l'anòmala, sempre perpendicular a l'anterior i positiva (F_{Hf^+}). La fase reversa de la parella de Friedel de F_{PH} (F_{PH}^*) permet extreure les dues contribucions anòmales de l'àtom pesat (F_H^+ , F_H^-). Els factors d'estructura generats tenint en compte la parella de Friedel anòmala (F_{PH}^+ , F_{PH}^-) permet dibuixar els cercles i determinar la fase dels factors d'estructura (*Protein Crystallography Course, Randy Read, University of Cambridge*).

En el cas de la proteïna 2B es va utilitzar el SAD per a resoldre la estructura ja que no hi havia cap model disponible. En un principi s'intentà fer MR amb fragments de la proteasa 2A de Rhinovirus (2HRV): el barril i la fulla beta. No obstant, els factor Z de rotació i translació calculats amb el programa Phaser no eren acceptables en cap de les

proves realitzades (McCoy et al., 2007). Com que no va funcionar, es van difractar cristalls nadius i derivats amb selenometionina. La longitud d'ona utilitzada per recollir les dades dels derivats de SeMet va ser de 0.97Å que coincideix amb la longitud d'ona d'absorció del seleni.

Per trobar les fases mitjançant el mètode de dispersió anòmala simple es va utilitzar l'autoSharp (Vonrhein et al., 2007). Inicialment es trobaren sis àtoms de seleni la localització dels quals fou refinada i utilitzada per estimar les fases experimentals. La figura de mèrit (FOM) permet avaluar la qualitat de les fases obtingudes mitjançant SAD i el seu valor va de 0 a 1, sent a partir de 0.4 un valor acceptable. En el cas de 2B s'obtingué una FOM de 0.4 per les reflexions acèntriques i 0.2 per les cèntriques.

6.2.8 Modelat, refinament i validació de l'estructura

A partir del mapa obtingut de les fases inicials s'inicia el traçat de la cadena polipeptídica. Per la proteïna 2B, inicialment es va situar una cadena de poli-alanines mitjançant ARP/wARP (Vonrhein et al., 2007). En el cas de les 3D^{pol} de CVB3, PV i EMCV, el refinament a partir de models existents de la polimerasa mitjançant Refmac5 (Murshudov et al., 1997) situà la cadena polipeptídica.

Posteriorment, cal ajustar manualment l'estructura de tots els aminoàcids de la proteïna als mapes de densitat electrònica obtinguts. Això es duu a terme mitjançant programes gràfics com Coot (Emsley and Cowtan, 2004). En el cas de la 2B, a partir de l'assignació de les selenometionines, reconstruir la seqüència aminoacídica sobre la cadena de poli-alanines. Per les mutacions puntuals, caldrà substituir per alanina el residu que s'ha mutat per poder veure sense biaix la densitat resultant de les noves fases experimentals.

Seguidament, es procedeix a fer diversos cicles de refinament automàtic mitjançant programes com Refmac5 (Murshudov et al., 1997) o Phenix (McCoy et al., 2007), intercalats amb ajusts manuals amb el programa gràfic Coot fins que el model s'ajusta de la millor manera a la densitat electrònica.

En el cas d'haver cristal·litzat complexos de la proteïna amb lligands, com és el cas de la 3D^{pol} de CVB3 amb GPC-N114, s'intentaran localitzar densitats electròniques no justificades per la disposició atòmica de la proteïna. En primer lloc, es realitza una cerca automàtica del lligand mitjançant Coot (Emsley and Cowtan, 2004) i es seleccionen possibles llocs d'unió. Tot seguit, es realitzen cicles de refinament per veure com respon el mapa a la densitat electrònica assignada. Es poden realitzar mapes d'omissió (*Omit maps*) en què s'elimina la presència de la molècula per intentar definir millor el seu posicionament.

El procés de refinament també conta amb paràmetres estadístics que informen de com el model s'ajusta a les dades experimentals i que normalment van millorant a mesura que s'avança en el procés de refinat: R_{work} i R_{free} .

$$R_{work} = \frac{\sum_{hkl} |F_{hkl}^{obs} - F_{hkl}^{calc}|}{\sum_{hkl} F_{hkl}^{obs}}$$

Figura 67. Fórmula de R_{work} . On les F^{obs} i F^{calc} són els factors d'estructura deduïts de les intensitats mesurades i calculats del model, respectivament. L' R_{free} és igual a R_{work} però calculat amb un 5% de reflexions escollides aleatòriament i no utilitzades pel refinament.

L'últim pas consisteix en fer una validació del model segons diferents paràmetres estereoquímics (distàncies atòmiques i angles d'enllaç) i vibracionals (factors tèrmics atòmics) que han d'estar dins un rang de valors acceptable. Aquesta validació s'ha dut a terme mitjançant el programa Molprobity (Chen et al., 2010).

6.3 MÈTODES COMPLEMENTARIS

6.3.1 Predicció d'hèlixs transmembrana

En el cas de la poliproteïna 2AB s'introduí la seqüència completa del fragment en diferents servidors de predicció: TMHMM v2.0 (Krogh et al., 2001), TMPred (Hofmann and Stoffel, 1993) i SOSUI (Hirokawa et al., 1998). La comparació dels

resultats revelà que no eren completament coincidents, de manera que es procedí a un anàlisi comparatiu per extreure la conclusió basada en la coincidència de predicció dels diferents servidors.

6.3.2 Alineament estructural de proteïnes

Sovint és d'interès fer una comparació de dues proteïnes segons l'estructura secundària i terciària en comptes de basar-la en la seqüència nucleotídica o aminoacídica. Per aquesta finalitat, en aquest treball s'han utilitzat el programa SHP (Rossmann and Argos, 1975; Stuart et al., 1979) i les eines *SSM Superpose* i *SHM Superpose* de COOT (Emsley and Cowtan, 2004).

6.3.3 Assajos d'activitat de les 3Dpol i del GPC-N114

Els assajos d'activitat de les polimerases i els assajos d'activitat antiviral del compost GPC-N114 es dugueren a terme als laboratoris del Dr. Bruno Canard (AFMB-UMR, Marsella, França) i del Dr. Frank M. van Kuppeveld (Universitat Utrech, Utrech, Holanda)

6.4 TAULES DE PROTOCOLS ESPECÍFICS

Proteïna	Vector expressió	Soca bacteriana	Temps d'inducció (hores)	Temperatura d'inducció (°C)
2B HAV	pTYB1 (<i>New England Biolabs</i>)	BL21 (DE3)	17	12
3D ^{pol} CBV3	pDest14 (<i>Invitrogen</i>)	Rosetta (DE3) pLysS	15	20
3D ^{pol} CBV3 S299T	pDest14 (<i>Invitrogen</i>)	Rosetta (DE3) pLysS	15	20
3D ^{pol} PV S298T	pET26Ub	BL21 (DE3)	15	20
3D ^{pol} EMCV	pETG-20A (<i>Invitrogen</i>)	Rosetta (DE3) pLysS	16	20
3D ^{pol} EMCV M300V	pETG-20A (<i>Invitrogen</i>)	Rosetta (DE3) pLysS	16	20
3D ^{pol} EMCV WI304V	pETG-20A (<i>Invitrogen</i>)	Rosetta (DE3) pLysS	16	20

Taula 12. Condicions òptimes d'expressió de les proteïnes incloses en aquest treball.

MATERIALS I MÈTODES

Proteïna	Pas 1	Pas 2	Pas 3	Pas 4	Rendiment			
3D ^{pol} CBV3 WT	CR afinitat Ni ²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 300mM NaCl, 10mM Imidazol B:50mM Tris pH8, 300mM NaCl, 500mM Imidazol	Diàlisi 20mM Tris pH8, 600mM NaCl, 15% Glicerol, 0.5mM TCEP	CR Exclusió Molecular (Superdex200)	20mM Tris pH8, 600mM NaCl, 15% Glicerol, 0.5mM TCEP	10mg/L		
	3D ^{pol} CBV3 S299T	CR afinitat Ni ²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 300mM NaCl, 10mM Imidazol B:50mM Tris pH8, 300mM NaCl, 500mM Imidazol	Diàlisi 20mM Tris pH8, 600mM NaCl, 15% Glicerol, 0.5mM TCEP	CR Exclusió Molecular (Superdex200)	20mM Tris pH8, 600mM NaCl, 15% Glicerol, 0.5mM TCEP	10mg/L	
3D ^{pol} PV S298T	Precipitació Sulfat Amònic	40% Sulfat Amònic	CR bescanvi catiònic (SP HP Sephacrose)	A: 25mM HEPES pH8.5, 0,01M NaCl, 15% glicerol, 0.1mM EDTA, 2mM DTT B: 25mM HEPES pH8.5, 1M NaCl, 15% glicerol, 0.1mM EDTA, 2mM DTT	CR bescanvi aniònic (QHP Sephacrose)	A: 25mM HEPES pH8.5, 0,01M NaCl, 15% glicerol, 0.1mM EDTA, 2mM DTT B: 25mM HEPES pH8.5, 1M NaCl, 15% glicerol, 0.1mM EDTA, 2mM DTT	4mg/L	
3D ^{pol} EMCV WT	CR afinitat Ni ²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT B:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 500mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT	Digestió 1mg TEV/10 mg proteïna (diàlisi per baixar la concentració de NaCl a 300mM)	CR afinitat Ni ²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT B:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 500mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT	CR Exclusió Molecular (Superdex200)	50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT, 50mM Arginina, 50mM Glutamina	18mg/L

3D^{pol} EMCV M300V	CR afinitat Ni²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT B:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 500mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT	Digestió	1mg TEV/10 mg proteïna (diàlisi per baixar la concentració de NaCl a 300mM)	CR afinitat Ni²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT B:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 500mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT	CR Exclusió Molecular (Superdex200)	50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT, 50mM Arginina, 50mM Glutamina	15mg/L
3D^{pol} EMCV WI304V	CR afinitat Ni²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT B:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 500mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT	Digestió	1mg TEV/10 mg proteïna (diàlisi per baixar la concentració de NaCl a 300mM)	CR afinitat Ni²⁺ (HisTrap HP)	A:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT B:50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 500mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT	CR Exclusió Molecular (Superdex200)	50mM Tris pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 10% glicerol, 1mM DTT, 50mM Arginina, 50mM Glutamina	18mg/L
2B HAV	Afinitat: resina de quitina	A:20mM HEPES pH8.5, 500mM NaCl, 1mM EDTA B:20mM HEPES pH8.5, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM DTT	CR Exclusió Molecular (HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR)	20mM HEPES pH8.5, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT					

Taula 13. Protocols de purificació de les proteïnes incloses en aquest treball. CR: cromatografia d'afinitat.

Condicions de cristal·lització				
Proteïna	Tampó	Sal	Precipitant	Temperatura (°C)
3D ^{pol} CBV3 WT	50mM Tris pH7.5	1.29M sulfat amònic	24.5% (w/v) glicerol	20
3D ^{pol} CBV3 S299T	50mM Tris pH7.5	1.29M sulfat amònic	24.5% (w/v) glicerol	20
3D ^{pol} PV S298T	100mM Cacodilat pH7.1	2.2M d'acetat sòdic	2mM DTT	20
3D ^{pol} EMCV WT	50mM Tris pH8.0	2M NaCl	10% PEG 6K	4
	100mM acetat de sodi pH 4.6	4M acetat d'amoni		20
3D ^{pol} EMCV M300V	50mM Tris pH8.0	2M NaCl	10% PEG 6K	4
3D ^{pol} EMCV I304V	100mM acetat de sodi pH 4.6	4M acetat d'amoni		20
2B HAV	100mM MES pH6.0	1.26M sulfat d'amoni		20

Taula 14. Condicions de cristal·lització de les proteïnes incloses en aquest treball

7 ANNEX: PUBLICACIONES

Damià Garriga,^{a,‡} Laia Vives-Adrián,^{a,‡} Mònica Buxaderas,^a Frederico Ferreira-da-Silva,^b Bruno Almeida,^b Sandra Macedo-Ribeiro,^b Pedro José Barbosa Pereira^b and Núria Verdaguer^{a,*}

^aInstitut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Baldiri i Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain, and ^bIBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, 4150-180 Porto, Portugal

‡ These authors contributed equally to this work.

§ Present address: Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, 28049 Madrid, Spain.

Correspondence e-mail: nvmcri@ibmc.csic.es

Received 17 May 2011
Accepted 1 July 2011



© 2011 International Union of Crystallography
All rights reserved

Cloning, purification and preliminary crystallographic studies of the 2AB protein from hepatitis A virus

The *Picornaviridae* family contains a large number of human pathogens such as rhinovirus, poliovirus and hepatitis A virus (HAV). Hepatitis A is an infectious disease that causes liver inflammation. It is highly endemic in developing countries with poor sanitation, where infections often occur in children. As in other picornaviruses, the genome of HAV contains one open reading frame encoding a single polyprotein that is subsequently processed by viral proteinases to originate mature viral proteins during and after the translation process. In the polyprotein, the N-terminal P1 region generates the four capsid proteins, while the C-terminal P2 and P3 regions contain the enzymes, precursors and accessory proteins essential for polyprotein processing and virus replication. Here, the first crystals of protein 2AB of HAV are reported. The crystals belonged to space group $P4_1$ or $P4_3$, with unit-cell parameters $a = b = 90.42$, $c = 73.43$ Å, and contained two molecules in the asymmetric unit. Native and selenomethionine-derivative crystals diffracted to 2.7 and 3.2 Å resolution, respectively.

1. Introduction

Hepatitis A virus (HAV), transmitted by the faecal–oral route, is a common cause of acute hepatitis worldwide. As a member of the *Picornaviridae* family, HAV possesses a nonenveloped icosahedral capsid of 30 nm in diameter which encapsidates a positive-sense single-stranded RNA genome of approximately 7.5 kb covalently linked to a VPg peptide (Weitz *et al.*, 1986). Nevertheless, HAV is biologically distinct from other picornaviruses as the infections that it causes are characterized by slow viral replication and the absence of induced cellular lysis. Another distinct feature of HAV is that it has developed a highly deoptimized codon usage. This strategy is thought to play a role in escaping the host-cell defences, allowing the virus to grow in a quiescent way (Pintó *et al.*, 2007). Thus, HAV presents very low translation and RNA-replication activity (Harmon *et al.*, 1989; Wheeler *et al.*, 1986).

The HAV genome codes for a single polyprotein, which is cleaved into mature proteins by the viral proteinase 3C^{pro} and host proteases (Schultheiss *et al.*, 1994). This polyprotein precursor is organized into three regions named P1, P2 and P3. The P2 region comprises proteins 2A, 2B and 2C. HAV 2A (71 amino acids in length) has no sequence similarity to any other picornaviral protein and lacks proteolytic activity (Hollinger & Emerson, 2007). The 2A region within the precursor VP1-2A plays an essential role in early particle assembly as it is required for the formation of the pentamer intermediates (Cohen *et al.*, 2002; Morace *et al.*, 2008). Typical picornavirus 2B proteins (~28 kDa) are membrane-associated proteins with a hydrophobic region containing a conserved putative amphiphatic α -helix at their C-terminus (de Jong *et al.*, 2008; van Kuppeveld *et al.*, 1996). The HAV 2B protein is approximately 100 amino acids longer than those of other picornaviruses and also appears to be involved in membrane rearrangements during HAV infection (Gosert *et al.*, 2000; Jecht *et al.*, 1998). No structural information is available for any picornaviral 2B protein. In this paper, we report the cloning, expression, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of the nonstructural region 2AB of HAV. Native and selenomethionine-derivative crystals diffracted to 2.7 and 3.2 Å resolution, respectively, and were suitable for three-dimensional structure determination.

Table 1

Data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the outermost resolution shell.

	Native	Selenomethionine derivative		
		1	2	1 and 2 combined
Wavelength (Å)	0.873	0.873	0.873	0.873
Temperature (K)	100	100	100	100
Space group	$P4_3$	$P4_3$	$P4_3$	$P4_3$
Unit-cell parameters (Å)				
<i>a</i> = <i>b</i>	90.4	90.2	90.4	90.3
<i>c</i>	73.4	73.2	73.2	73.2
Resolution range (Å)	57.0–2.70 (2.85–2.70)	63.0–3.30 (3.48–3.30)	56.7–3.20 (3.37–3.20)	63.9–3.20 (3.37–3.20)
Molecules in asymmetric unit	2	2	2	2
Solvent content (%)	59.0	58.7	58.9	58.8
Matthews coefficient (Å ³ Da ⁻¹)	3.00	2.98	2.99	2.98
Δφ (°)	1	3	3	3
No. of collected frames	100	300	300	600
Reflections (observed/unique)	54920/13343	609356/11920	436072/11963	1045428/11920
Completeness (%)	81.0 (62.9)	100 (100)	99.9 (100)	100 (100)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>)	4.1 (2.3)	3.9 (1.6)	4.7 (1.8)	3.8 (1.6)
Mean <i>I</i> /σ(<i>I</i>)	8.9 (2.0)	14.9 (3.0)	19.2 (6.3)	27.3 (6.7)
Multiplicity	2.4 (1.3)	18.3 (5.4)	20.7 (13.1)	38.9 (18.6)
<i>R</i> _{merge} [†]	0.10 (0.27)	0.17 (0.47)	0.14 (0.41)	0.17 (0.45)
<i>R</i> _{p.i.m.} [‡]	0.07 (0.27)	0.06 (0.35)	0.04 (0.16)	0.04 (0.15)
Anomalous completeness (%)	—	100 (99.7)	99.7 (98.7)	100 (100)
Anomalous multiplicity	—	9.3 (2.7)	10.6 (6.6)	19.9 (9.4)

[†] $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the observed intensity and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity of multiple observations of symmetry-related reflections. [‡] $R_{\text{p.i.m.}} = \sum_{hkl} [1/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the observed intensity and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity of multiple observations of symmetry-related reflections.

2. Materials and methods

2.1. Transmembrane-helix prediction

The described interaction of HAV 2B protein with cellular membranes makes its heterologous expression, purification and crystallization considerably more difficult. In order to localize the region(s) responsible for this interaction, the 2B amino-acid sequence was analyzed using different servers for the prediction of transmembrane helices [TMHMM v2.0 (Krogh *et al.*, 2001), *TMpred* (Hofmann & Stoffel, 1993) and *SOSUI* (Hirokawa *et al.*, 1998)]. These servers predicted the existence of a transmembrane helix approximately spanning residues 1012–1031. This information was taken into account in the experimental design, avoiding the inclusion of this putative transmembrane region in the cloned sequence.

2.2. Cloning

HAV codon usage is not appropriate for the heterologous over-expression of its proteins in *Escherichia coli*. To override this problem, a synthetic gene covering 217 residues (23 kDa) of the HAV polyprotein (residues 765–981 from GenBank accession No. M14707.1; Cohen *et al.*, 1987) and including flanking sequences that provide 5' *NdeI* and 3' *SapI* restriction sites was generated. The coding sequence corresponds to the full-length 2A protein (71 residues) and the N-terminal domain of the 2B protein (146 residues; the soluble portion). To this end, 34 DNA oligonucleotides (of between 32 and 47 nucleotides in length) were designed with the program *DNAWorks* (Hoover & Lubkowski, 2002; Supplementary Table 1¹) and were used in PCR-based gene assembly using *Pfu* polymerase (Promega) essentially according to Stemmer *et al.* (1995). In brief, the oligonucleotide mixture (2 mM each) was used in an assembly PCR reaction (heating at 368 K for 3 min prior to 45 cycles of 1 min at 368 K, 1 min at 330 K and 1 min at 345 K) followed by an amplification reaction (30 cycles of 1 min at 368 K, 1 min at 338 K and 1 min

at 345 K) using the two outermost oligonucleotides as primers. The resulting PCR product (approximately 680 bp) was cloned into pGEM-T Easy (Promega), sequenced and subcloned into the *NdeI* and *SapI* sites of expression vector pTYB1 (New England Biolabs), leading to an ORF coding for HAV 2AB with a C-terminal intein tag (55 kDa) which allows its purification by affinity chromatography (IMPACT system; Chong *et al.*, 1998).

2.3. Expression and purification

E. coli BL21 (DE3) cells were transformed with the expression plasmid and cultures were grown in Luria–Bertani medium supplemented with 100 μg ml⁻¹ ampicillin at 303 K until the OD₆₀₀ reached ~0.3 and then cooled to 285 K. At an OD₆₀₀ of 0.5 the cultures were induced with 0.3 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and incubated for a further 17 h at 285 K, after which the cells were harvested by centrifugation. The pelleted cells were resuspended in cold lysis buffer (20 mM Na HEPES pH 8.5, 500 mM NaCl, 1 mM

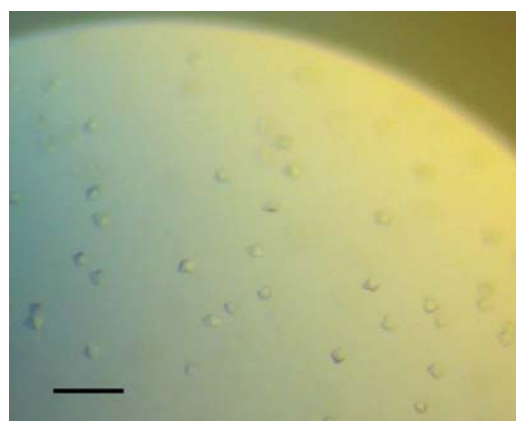


Figure 1
Crystals of HAV 2AB protein. Scale bar: 100 μm.

¹ Supplementary material has been deposited in the IUCr electronic archive (Reference: PU5340).

EDTA, 1 mM PMSF, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DNase I) and lysed by sonication on ice. The soluble fraction was then obtained by centrifugation and loaded onto a 5 ml column packed with Chitin Beads (New England Biolabs). After extensive washing with buffer A (20 mM Na HEPES pH 8.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA), the 2AB protein was eluted from the column with buffer A supplemented with 50 mM DTT. The eluted protein was further purified by size-exclusion chromatography on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR column (GE Healthcare) equilibrated in buffer A containing 5 mM DTT. Pure 2AB protein was then concentrated to 6.5 mg ml^{-1} using a Vivaspin concentrator (10 000 MWCO PES, Sartorius Stedim Biotech).

To produce selenomethionine-containing 2AB, *E. coli* B834 (DE3) cells were transformed with the expression plasmid and grown overnight in 100 ml minimal medium (SelenoMet, Molecular Dimensions) supplemented with 4 mg l^{-1} L-methionine. Prior to induction, the cells were harvested and washed three times in 100 ml sterile water. The cell pellet was then resuspended in 1 ml sterile water and used to inoculate 2 l prewarmed (285 K) minimal medium containing 1 \times L-SeMet (prepared according to the manufacturer's instructions from 250 \times SelenoMethionine Solution, Molecular Dimensions). All other procedures were as described for the nonlabelled protein.

2.4. Crystallization

Preliminary crystallization conditions were explored using the sitting-drop vapour-diffusion method at both 277 and 293 K in 96-well plates (MRC, Swissci AG) using an automated drop dispenser (Phoenix/RE, Rigaku) to mix 150 nl protein solution (6.5 mg ml^{-1}) with an equal volume of reservoir solution. Small crystals of HAV 2AB were observed with reservoir conditions consisting of 0.1 M MES pH 6 and 1.26 M ammonium sulfate at 293 K.

This condition was refined and crystals were finally grown at 277 K in 24-well VDX plates (Hampton Research) in drops obtained by mixing identical volumes (0.5 or 0.75 μl) protein solution

(6.5 mg ml^{-1}) and reservoir solution (0.1 M MES pH 5.2–5.8, 1.26 M ammonium sulfate, 5 mM DTT) and equilibrated against a 750 μl reservoir. Small tetragonal crystals (0.02 mm per edge) were obtained within between one and four weeks (Fig. 1). Selenomethionine-substituted protein crystals were grown using the same conditions as for the native protein.

2.5. X-ray diffraction analysis

Crystals were harvested in CryoLoops (Hampton Research) and soaked for 1 min in the crystallization solution supplemented with 20% (v/v) glycerol. Mounted crystals were flash-cooled by immersion in liquid nitrogen. X-ray diffraction data sets were collected from both native and selenomethionine-substituted crystals with an ADSC Q315R detector on beamline ID23-EH2 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF; Grenoble, France) using a 14.20 keV ($\lambda = 0.873 \text{ \AA}$) beam focused to 10 μm . A total of 100 frames were recorded at 100 K using an oscillation angle of 1° , 1 s exposure time per frame and a crystal-to-detector distance of 334.07 mm (Fig. 2). Data sets were indexed and integrated using *MOSFLM* (Leslie, 1991) and scaled, merged and reduced with *SCALA* (from *CCP4*; Winn *et al.*, 2011). Although the data sets obtained from selenomethionine-substituted crystals were sufficiently complete, the two best data sets were merged using *CAD* (from *CCP4*; Winn *et al.*, 2011) and scaled together in order to increase the anomalous signal multiplicity at high resolution (Table 1).

3. Results and discussion

The overexpression of HAV 2AB protein for crystallization purposes presented two major complications. Firstly, the HAV 2B protein has been reported to associate with cellular membranes (Gosert *et al.*, 2000; Jecht *et al.*, 1998). Moreover, HAV genes have an unusually high frequency of rare codons, leading to low rates of protein synthesis (Pintó *et al.*, 2007). Sequence analysis allowed the identification of a putative transmembrane helix at the C-terminus of 2B (residues 1012–1031). This region was omitted from the expression construct to avoid the complications associated with the expression and purification of membrane proteins. Furthermore, to overcome the problems derived from HAV codon usage, a synthetic gene was generated. This new sequence codes for the same polypeptide as the region of interest of the HAV genome (residues 765–981 of the P2 polyprotein region) but displays *E. coli* codon usage. Decreasing the *E. coli* growth temperature to 285 K during protein expression was crucial for obtaining soluble recombinant HAV 2AB and ultimately for obtaining crystals (Fig. 1).

Despite the small size of the crystals ($\sim 20 \mu\text{m}$ per edge), a complete data set was collected to 2.7 \AA resolution from a single native crystal using synchrotron radiation on the microfocus beamline ID23-EH2 of the ESRF. The final data-collection and processing statistics are summarized in Table 1. Analysis of systematic absences indicated that the crystal belonged to space group $P4_1$ or $P4_3$. Phase determination (see below) allowed the identification of $P4_3$ as the correct space group. The volume of the crystal asymmetric unit is compatible with the presence of two 2AB molecules, with a Matthews coefficient of 3.0 $\text{\AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ and a calculated solvent content of 59.0% (Matthews, 1968).

Phase determination by molecular-replacement methods was initially attempted using the available structures of rhinovirus and enterovirus 2A proteins as starting models (PDB entries 2hrv and 1z8r; Petersen *et al.*, 1999; Baxter *et al.*, 2006). This approach was unsuccessful, probably owing to the lack of homology between the

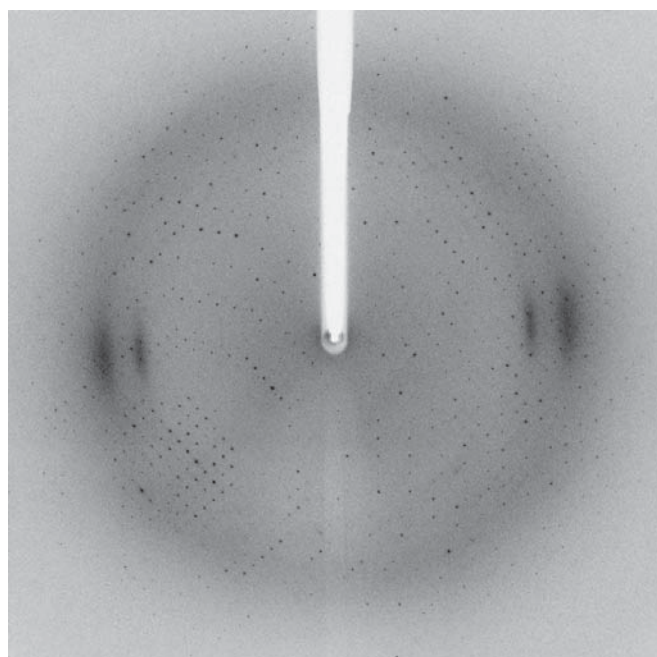


Figure 2
X-ray diffraction pattern of the HAV 2AB crystals. The detector was set to an edge resolution of 2.70 \AA (the resolution at the corner was 1.98 \AA). Diffraction spots were observed to 2.25 \AA resolution.

2A region of HAV and the available picornaviral 2A proteinases (Hollinger & Emerson, 2007).

Using the SAD data (Table 1), we have determined the positions of all Se atoms (12, in the asymmetric unit). Model building is ongoing.

References

- Baxter, N. J., Roetzer, A., Liebig, H. D., Sedelnikova, S. E., Hounslow, A. M., Skern, T. & Waltho, J. P. (2006). *J. Virol.* **80**, 1451–1462.
- Chong, S., Montello, G. E., Zhang, A., Cantor, E. J., Liao, W., Xu, M.-Q. & Benner, J. (1998). *Nucleic Acids Res.* **26**, 5109–5115.
- Cohen, J. I., Ticehurst, J. R., Purcell, R. H., Buckler-White, A. & Baroudy, B. M. (1987). *J. Virol.* **61**, 50–59.
- Cohen, L., Bénichou, D. & Martin, A. (2002). *J. Virol.* **76**, 7495–7505.
- Gosert, R., Egger, D. & Bienz, K. (2000). *Virology*, **266**, 157–169.
- Harmon, S. A., Summers, D. F. & Ehrenfeld, E. (1989). *Virus Res.* **12**, 361–369.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. & Mitaku, S. (1998). *Bioinformatics*, **14**, 378–379.
- Hofmann, K. & Stoffel, W. (1993). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **374**, 166.
- Hollinger, F. B. & Emerson, S. U. (2007). *Fields' Virology*, edited by D. M. Knipe & P. M. Howley, pp. 911–947. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Hoover, D. M. & Lubkowski, J. (2002). *Nucleic Acids Res.* **30**, e43.
- Jecht, M., Probst, C. & Gauss-Müller, V. (1998). *Virology*, **252**, 218–227.
- Jong, A. S. de, de Mattia, F., Van Dommelen, M. M., Lanke, K., Melchers, W. J., Willems, P. H. & van Kuppeveld, F. J. (2008). *J. Virol.* **82**, 3782–3790.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001). *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580.
- Kuppeveld, F. J. van, Galama, J. M., Zoll, J., van den Hurk, P. J. & Melchers, W. J. (1996). *J. Virol.* **70**, 3876–3886.
- Leslie, A. G. W. (1991). *Crystallographic Computing 5: From Chemistry to Biology*, edited by D. Moras, A. D. Podjarny & J. C. Thierry, pp. 27–38. Oxford University Press.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 499–501.
- Morace, G., Kusov, Y., Dzagurov, G., Beneduce, F. & Gauss-Müller, V. (2008). *BMB Rep.* **41**, 678–683.
- Petersen, J. F., Cherney, M. M., Liebig, H. D., Skern, T., Kuechler, E. & James, M. N. (1999). *EMBO J.* **18**, 5463–5475.
- Pintó, R. M., Aragonès, L., Costafreda, M. I., Ribes, E. & Bosch, A. (2007). *Virus Res.* **127**, 158–163.
- Schultheiss, T., Kusov, Y. Y. & Gauss-Müller, V. (1994). *Virology*, **198**, 275–281.
- Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. & Heyneker, H. L. (1995). *Gene*, **164**, 49–53.
- Weitz, M., Baroudy, B. M., Maloy, W. L., Ticehurst, J. R. & Purcell, R. H. (1986). *J. Virol.* **60**, 124–130.
- Wheeler, C. M., Fields, H. A., Schable, C. A., Meinke, W. J. & Maynard, J. E. (1986). *J. Clin. Microbiol.* **23**, 434–440.
- Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.

Uncoating of common cold virus is preceded by RNA switching as determined by X-ray and cryo-EM analyses of the subviral A-particle

Angela Pickl-Herk^{a,1,2}, Daniel Luque^{b,c,1}, Laia Vives-Adrián^d, Jordi Querol-Audi^d, Damià Garriga^{e,3}, Benes L. Trus^f, Nuria Verdagué^{d,4}, Dieter Blaas^{a,4}, and José R. Castón^{b,4}

^aMax F. Perutz Laboratories, Department of Medical Biochemistry, Medical University of Vienna, A-1030 Vienna, Austria; ^bDepartment of Structure of Macromolecules and ^cDepartment of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28049 Madrid, Spain; ^dCentro Nacional de Microbiología/Instituto de Salud Carlos III, 28220 Madrid, Spain; ^eInstitut de Biologia Molecular de Barcelona/CSIC, Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; and ^fImaging Sciences Laboratory, Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-5624

Edited by Peter Palese, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, and approved November 4, 2013 (received for review June 26, 2013)

During infection, viruses undergo conformational changes that lead to delivery of their genome into host cytosol. In human rhinovirus A2, this conversion is triggered by exposure to acid pH in the endosome. The first subviral intermediate, the A-particle, is expanded and has lost the internal viral protein 4 (VP4), but retains its RNA genome. The nucleic acid is subsequently released, presumably through one of the large pores that open at the icosahedral twofold axes, and is transferred along a conduit in the endosomal membrane; the remaining empty capsids, termed B-particles, are shuttled to lysosomes for degradation. Previous structural analyses revealed important differences between the native protein shell and the empty capsid. Nonetheless, little is known of A-particle architecture or conformation of the RNA core. Using 3D cryo-electron microscopy and X-ray crystallography, we found notable changes in RNA-protein contacts during conversion of native virus into the A-particle uncoating intermediate. In the native virion, we confirmed interaction of nucleotide(s) with Trp³⁸ of VP2 and identified additional contacts with the VP1 N terminus. Study of A-particle structure showed that the VP2 contact is maintained, that VP1 interactions are lost after exit of the VP1 N-terminal extension, and that the RNA also interacts with residues of the VP3 N terminus at the fivefold axis. These associations lead to formation of a well-ordered RNA layer beneath the protein shell, suggesting that these interactions guide ordered RNA egress.

genome uncoating | X-ray analysis | 3D cryo-EM | picornavirus

Human rhinoviruses (HRVs) cause the common cold. Although seldom severe, this disease is widespread and frequent in man; HRVs thus have considerable economic impact due to expenditure on medication and lost working days. More than 150 serotypes belong to the genus *Enterovirus* (EVs) of the *Picornaviridae* family, which includes serious human and animal pathogens. In addition to phylogenetic classification into species A, -B, and -C, HRVs are divided into a minor receptor group (12 HRV-A) that bind low-density lipoprotein receptors (LDLRs), and a major receptor group (more than 89 HRV-A and -B serotypes) that use intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) for cell entry (1). HRV-C binds an unknown receptor (2).

The EV icosahedral shell is built from four viral proteins (VP1–4) that encase a single-stranded (+)-sense RNA genome. Sixty copies each of these four polypeptides assemble on a T = 1 (pseudo T = 3) lattice, ~30 nm in diameter. VP1, VP2, and VP3 are surface-exposed; the small myristoylated VP4 is internal. In the mature virion, the N-terminal extensions of VP1, VP2, and VP3, together with the entire VP4, interact in an intricate network beneath the shell (Fig. S1) (3, 4).

In the cytosol, the viral RNA is translated into a ~250 kDa precursor polyprotein that is processed by viral proteinases. Assembly of the viral shell involves immature pentamers built

from VP0, VP1, and VP3. VP2 and VP4 arise late in infection through VP0 cleavage, concomitant with RNA encapsidation. In addition to mature virions, native empty capsids (NECs) of HRV2, HRV14, and equine rhinovirus (5), and presumably of other EVs, are assembled in the infected cell. They might be direct precursors of native virions, a capsid protein reservoir (6), and/or the end-product of an abortive assembly process (7). NECs attach to the receptor and undergo conformational changes similar to those of the native virus, except that they retain VP4, as it remains connected to VP2 (3, 8).

All EVs are thought to undergo a similar sequence of events leading to infection. After binding their respective receptors, they are endocytosed. In poliovirus (PV), receptor attachment catalyzes uncoating, but in some HRVs the acidic pH in endosomes is an

Significance

Human rhinoviruses (HRVs) cause the common cold and exacerbate chronic pulmonary diseases. Their single-stranded RNA genome is protected by an icosahedral capsid and must be released into the host cell cytosol for translation and replication. Using X-ray and cryo-EM analyses, we identified structural alterations that take place in the virus architecture during infection. In acidic endosomes *in vivo* and in our experimental conditions, the native virion is converted into the expanded, porous uncoating intermediate A-particle. This is accompanied by altered RNA-protein contacts at the inner capsid wall, leading to major changes in RNA conformation that result in a well-organized RNA layer. These rearrangements suggest that the RNA-protein interactions prepare RNA and facilitate its subsequent egress via a well-ordered mechanism.

Author contributions: N.V., D.B., and J.R.C. designed research; A.P.-H., D.L., L.V.-A., J.Q.-A., D.G., N.V., D.B., and J.R.C. performed research; B.L.T. contributed new reagents/analytic tools; A.P.-H., D.L., L.V.-A., J.Q.-A., D.G., B.L.T., N.V., D.B., and J.R.C. analyzed data; and N.V., D.B., and J.R.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The 3D reconstructions have been deposited in the Electron Microscopy Data Bank, www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb [accession nos. EMD-2106 (native empty capsids), EMD-2107 (native human rhinovirus 2; HRV2), EMD-2109 (A-particle), and EMD-2108 (B-particle)]. The X-ray coordinates and structure factors for the HRV2 A-particles have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID code 4L3B).

¹A.P.-H. and D.L. contributed equally to this work.

²Present address: Baxter Innovations GmbH, A-2304 Orth an der Donau, Austria.

³Present address: School of Biomedical Sciences, Monash University, Clayton, VIC 3800, Australia.

⁴To whom correspondence may be addressed. E-mail: jrcaston@cnb.csic.es, dieter.blaas@medunivie.ac.at, or nvmcri@ibmb.csic.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1312128110/-DCSupplemental.

additional trigger for the structural changes needed for RNA exit (9, 10). In minor group HRVs, low pH alone induces these changes (11). As shown for HRV2 (12), the acid-triggered beta-propeller switch of the LDLR assists rhinovirus infection. Once the virion is in the late endosomal compartment, it dissociates from its receptor and is simultaneously transformed into the A-particle, which has an expanded shell, lacks VP4, and is more hydrophobic than native virus and NEC due to surface exposure of the amphipathic VP1 N-terminal extension (13). The A-particle can bind directly to the endosomal membrane for RNA translocation (14), leaving behind the empty B-particle.

Recent work on PV caught in the act of releasing its genome shows the RNA exiting through channels near the twofold axes (15). The X-ray structure of the HRV2 B-particle showed the details of the structural rearrangements that lead to the end-product of uncoating (16). A hinge movement around the hydrophobic pocket in VP1 induces a coordinated displacement of VP2 and VP3, resulting in capsid expansion and the opening of channels in the shell. Similar alterations were observed in EV-71 when the X-ray structures of native virus and expanded NECs were compared (17).

By solving the 3D cryo-electron microscopy (3D cryo-EM) structures of native HRV2 and its A-particle (the intermediate between native virus and empty capsid) produced by incubation in acidic buffer that mimics the endosomal environment, we identified important changes in the interactions between RNA and the protein shell. We confirm these RNA-protein contacts in the A-particle in our 6.4 Å X-ray structure. The well-ordered RNA layer close to the inner capsid face is stabilized by numerous contacts; this framework might facilitate exit of the genome in a highly ordered, coordinated manner.

Results

Cryo-EM Structures of HRV2 Native and Subviral Particles. A-particles were prepared from purified HRV2 by incubation at pH 5, applied to holey carbon grids, vitrified, and visualized in the electron microscope. The sample before (Fig. 1A) and after acidification (Fig. 1B) contained similar proportions of empty particles. Negative stain EM and capillary electrophoresis (18) confirmed that

no native virus remained in the acidified sample. The four types of particles (full and empty without and with acidification) were selected manually and a 3D reconstruction (3DR) was obtained for each set (Fig. 1C–F).

Based on a 0.5 Fourier shell correlation (FSC) threshold, the resolution was 8.2 Å for native HRV2 and 10.9 Å for NEC. For full (A-) and empty (B-) particles in the acidified sample, we obtained a resolution of 8.8 and 9.9 Å, respectively (Fig. S2). Diameter was determined from spherically averaged radial density plots of the 3DR (Fig. S3); it was identical for native HRV2 and NEC (304 Å; Fig. S3A). This finding and the SDS/PAGE detection of varying amounts of VP0 in our HRV2 preparations (not shown) confirmed the empty capsids as NECs (5, 17). A- and B-particles in the acidified sample were 316 Å in diameter (Fig. S3B). This ~4% size increase relative to native virions and NECs concurs with X-ray and cryo-EM studies of empty shells from HRV2 and other EVs as obtained after incubation at 50 °C to 56 °C (19–21).

To assess RNA content, the datasets were analyzed for internal density of individual particles within a radius of 113 Å and 120 Å for native and acidified samples, respectively. The bimodal Gaussian distribution was almost identical in both cases. This suggests that the (expanded) empty and full particles generated by acid pH derived mainly from NEC and native HRV2, respectively (Fig. S4). These results indicate that low pH alone is insufficient to trigger conversion of A- into B-particles.

The capsids of the four particle types shared the typical topological features of EVs; the star-shaped “mesas” at the fivefold axes, the canyons surrounding these mesas, and the three-bladed propellers at the threefold axes (Fig. 1). Most evident were the similarities between native virus and NEC, on the one hand (Fig. 1C and D), and the A- and B-particles, on the other (Fig. 1E and F). The A- and B-particles were highly porous compared with the native virion. The largest pores were found at the twofold axes between two VP2 molecules (pores I), which were also observed in the X-ray structure of B-particles produced by heating (16); additional pores were observed at the canyon floor at the quasithreefold axis (II) and at the base of the mesa (III) (Fig. S5A). Pores II were partially occluded by a conspicuous

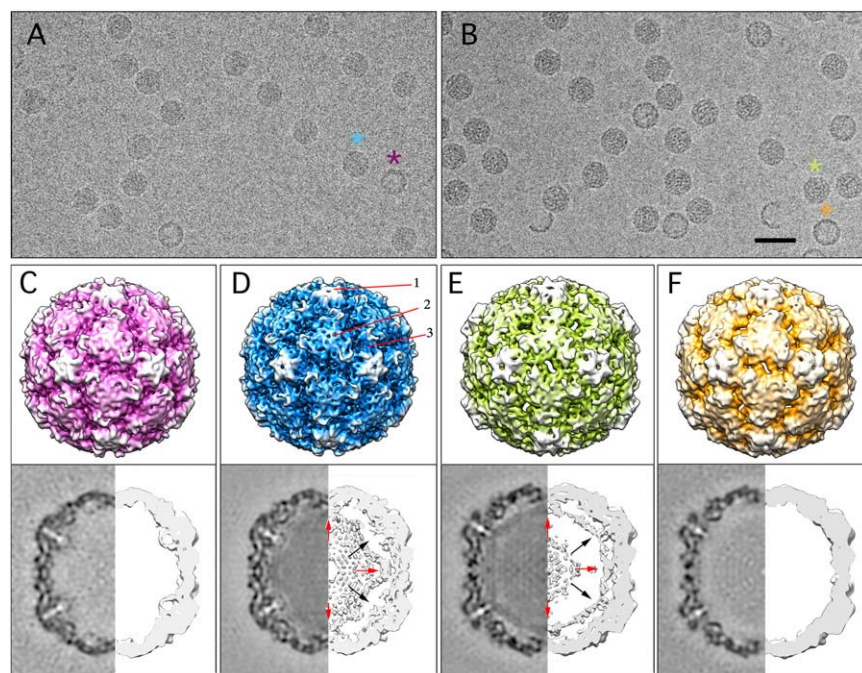


Fig. 1. Cryo-EM images and 3DR of HRV2 and subviral particles. (A) Cryo-electron micrograph of a representative preparation of purified HRV2 (2.1 μm underfocus; first zero of the contrast transfer function (CTF) at 20.5 Å). The blue asterisk indicates a native (full) virus and the pink asterisk a NEC. (B) Cryo-electron micrograph of the sample in A after exposure to pH 5 (2.7 μm underfocus; first zero of the CTF at 23 Å). The green asterisk indicates a (full) A-particle and the orange asterisk an (empty) B-particle. Some broken virions are also observed. (Scale bar, 50 nm.) (C) 3DR of NEC, (D) native HRV2, (E) A-particle, and (F) B-particle. Upper row, the radially color-coded outer surfaces viewed along a twofold axis of symmetry contoured at 2.5 σ above the mean density; lower row, central sections from the 3DR (left half) and 25 Å-thick slabs (right half) contoured at 1 σ above the mean density to highlight the RNA density locations. Darker shading indicates higher density. In D (Upper), the prominent structural features on the capsid exterior are indicated: (i) the star-shaped mesa at the fivefold axis, (ii) the three-bladed propeller at the threefold axis, and (iii) the canyon surrounding the mesa. In D and E, red and black arrows indicate the two- and fivefold axes (lower, right half), respectively. Note the oval pores at the twofold axes in the acid-exposed particles (E and F) and the differences in RNA conformation in native virus (D) and the A-particle (E).

density on the outer surface of the A-particle capsid, not observed on the B-particle capsid. This well-defined density constituted the major difference after subtraction of the B-particle map from the A-particle map (Fig. S5 B, green, C, and D). In light of previous studies of the related PV (22) and Coxsackievirus A 16 (CAV16) (23), this density at the quasithreefold axis probably corresponds to the externalized VP1 N terminus.

The transverse central sections of the 3D maps emphasize the internal differences, drawing attention to the density corresponding to the genomic RNA (Fig. 1 C–F, Lower) involved in visible contacts with the protein shell (Fig. 1 D and E, Lower). As predicted, RNA was absent from NECs (Fig. 1C) and from B-particles in the acidified sample (Fig. 1F). In native virions, RNA–protein interactions were limited to the twofold axes (Fig. 1D, red arrows). In the A-particle, these were maintained and new ones formed at the fivefold axes (Fig. 1E, black arrows). The rearrangements approximate the RNA layer and the inner wall of the shell (Movie S1).

X-Ray Structure of the HRV2 A-Particle. We prepared crystals from virus incubated at pH 5. Diffraction data were collected up to 6.4 Å, and the structure was solved by molecular replacement, starting with the phases that correspond to the HRV2 B-particle structure (16) [retrieved from Protein Data Bank (PDB) ID code 3TN9] (Table S1). After density modification using 15-fold non-crystallographic symmetry averaging and solvent flattening, the averaged maps showed that A- and B-particles were almost identical, in accordance with the cryo-EM results; the only notable differences were found at the VP2 N terminus (residues 46–55) and the VP3 F–G loop (residues 149–162) (Fig. S6). Again concurring with the cryo-EM data, the X-ray map showed extra density corresponding to partially ordered RNA and RNA–protein contacts at the two- and fivefold axes (see next section).

Switch of RNA–Capsid Contacts After Conversion of Native HRV2 into the A-Particle. Comparison of cryo-EM 3DR of native HRV2 with the cryo-EM and X-ray structures of the A-particle highlighted the distinct interactions of capsid proteins with packaged RNA (Fig. 1 D and E and Fig. 2 A–C). In native HRV2, contacts

occurred only at the twofold axes (Fig. 2A). Consistent with X-ray data of native HRV2 (4), VP2 Trp³⁸ contacted RNA nucleotide(s) (Fig. 2D, green arrow); this residue is strictly conserved in all HRVs (1) and in various EVs (24). In addition, we identified previously unreported RNA interactions near the twofold axes, mediated by the VP1 N-terminal region (Fig. 2D, blue arrow). No protein–RNA interactions were seen at the fivefold axes (Fig. 2E), and VP4 appeared to act as a “repellent surface”.

Both cryo-EM 3DR and the X-ray structure of the A-particle (Fig. 2 B and C) showed that the VP2 Trp³⁸-mediated interactions at the twofold axes were maintained, although slightly displaced relative to their original position in native HRV2 (Fig. 2 F and H, green arrows). In addition, VP2 Ser⁴⁴ contacted the RNA in the X-ray A-particle map (Fig. 2H, open green arrow). Because the VP1 N-terminal extension was externalized, VP1-mediated interactions were absent in the A-particle (Fig. 2 F and H).

The VP3 β-annulus, which was essentially identical in native virus and A-particle (compare Fig. 2E with Fig. 2 G and I), was exposed at the inner capsid surface after loss of VP4. It now contacted the RNA (Fig. 2 G and I, red arrows). Direct interactions with Gly¹ and Gln²⁰ were observed in the crystal structure (Fig. 2I). The Gly¹–Leu²–Pro³ segment is strictly conserved in all HRVs (1). All RNA–protein interactions in the A-particle gave rise to a well-structured RNA layer near the inner capsid surface (Fig. 2 B and C). The VP3-mediated RNA contacts at the fivefold axes have not been defined in other EV uncoating intermediates, presumably because of experimental differences; here we used near-physiological conditions to trigger formation of A-particles.

Interactions Mediated by N-Terminal VP1 Sequences. Comparison of radial density profiles of native HRV2 and NECs showed that the protein shell (radius ~110–152 Å) had a peak of extra density for the native virus, within the 115–126 Å radius (Fig. S3A, arrow). Calculation of a difference map located this major structural difference to the inner capsid surface close to the twofold axes (Fig. 3 A, blue and B–D). Fitting the X-ray coordinates of

Fig. 2. RNA–protein contacts in native HRV2 and A-particles. (A and B) Slabs 23 Å thick of (A) native HRV2 and (B) A-particle viewed along an icosahedral twofold axis, with the respective docked X-ray coordinates of native HRV2 and of the B-particle X-ray structures. (C) The 6.5 Å X-ray structure of the A-particle oriented as in A and B. Close-ups of insets D–I are shown. (D and E) Slabs 23 Å thick (parallel to but displaced ~11 Å from the central section) of native HRV2 including the (D) two- and (E) fivefold axes (the outer surface of the capsid faces upward). Envelopes of protein shell and RNA density are depicted as gray and red mesh, respectively. Note the contacts at the twofold axis between the inner capsid surface and the RNA layer outer surface, mediated by VP2 (Trp³⁸, green arrow) and VP1 (Asn²¹ and Ser²², blue arrow), displayed as stick models. VP3 (red) and VP4 (yellow) are shown. (F and G) Similar ~20 Å-thick slabs of the A-particle at the (F) two- and (G) fivefold axes. Contacts mediated by VP2 Trp³⁸ are maintained, although slightly displaced (green arrow); at the fivefold axis, N-terminal VP3 residues interacting with RNA are indicated (red arrows). (H and I) Similar slabs of the A-particle X-ray structure. In addition to the VP2 Trp³⁸-mediated contact (green arrow), Ser⁴⁴ is involved in direct contacts with RNA density (open green arrow); at the fivefold axis, VP3 Gly¹ and Gln²⁰ contact the RNA density.

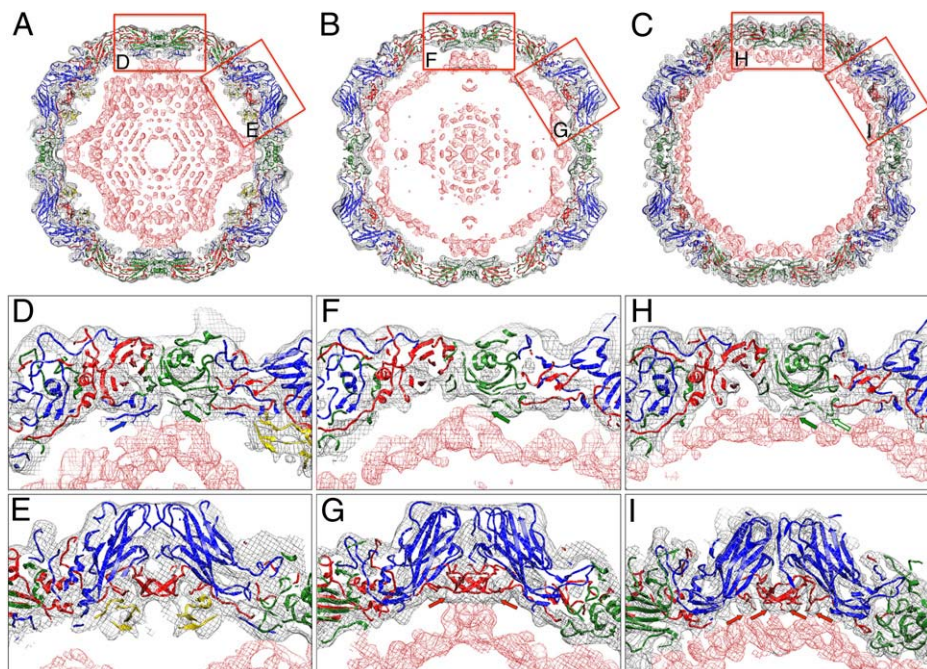
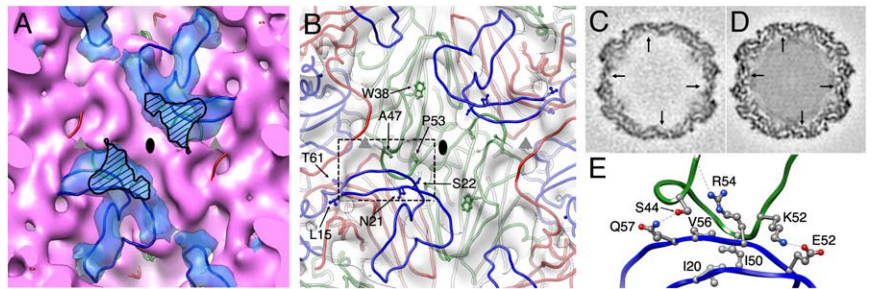


Fig. 3. Structural comparison of native HRV2 and NEC. (A) Difference map calculated by subtracting NEC from the native HRV2 protein shell. The resulting difference map (blue) is superimposed onto the corresponding region of the NEC inner surface (pink), viewed along an icosahedral twofold axis (black oval). Note that the VP1 N-terminal segment and an adjacent VP2 loop match well the difference density. The contact surface between VP1 N-terminal extensions and RNA is depicted as striped area; minor differences [for example, some VP3 (red) and VP2 (green) loops that do not match the cryo-EM density] were ignored. Two quasithreefold axes are indicated (gray triangles). (B) Region equivalent to A, showing the interior of the NEC cryo-EM map (white surface) with the native HRV2 X-ray structure fitted: VP1 (blue), VP2 (green), and VP3 (red). The VP1 N-terminal segment (Leu¹⁵–Thr⁶¹) and the adjacent VP2 loop (Ala⁴⁷–Pro⁵³) are indicated and are clearly not included within the density map of NEC (white surface). (C and D) Transverse sections, 1.89 Å thick, from the 3D maps of NEC (C) and native HRV2 (D), parallel to but displaced by 13.2 Å from the central section, viewed along a twofold axis (darker, denser). The regions corresponding to the densities of the VP1 N terminus and the adjacent VP2 segment are indicated (arrows). For the map of native HRV2 (D), the relative density of this region was ~73% of the total capsid density and for the NEC map (C) ~9%, indicating the absence of protein and RNA. (E) Close-up of the VP1 N-terminal segment interacting with the adjacent VP2 loop (from ref. 4), corresponding to the region outlined in B. Residues mentioned in the text are displayed as sticks. VP1 Gln⁵⁷ and Glu⁵² form a hydrogen bond and a salt bridge with VP2 Ser⁴⁴ and Lys⁵², respectively, and VP1 Ile²⁰ and Val¹⁵⁶ make up a hydrophobic cluster including VP2 Ile⁵⁰; finally, VP1 Arg⁵⁴ is hydrogen bonded with the VP2 main chain (Leu⁴²).



native HRV2 (PDB ID code 1FPN) into native and NEC cryo-EM maps identified most of the density lacking in the NEC map to the VP1 N-terminal region and the adjacent VP2 loop Ala⁴⁷–Pro⁵³ (Fig. 3A and B). The disorder of these regions in NECs is consistent with their ordering in native HRV2 (4), where the VP1 Glu⁵²–Gln⁵⁷ segment interacts with the VP2 Leu⁴²–Lys⁵² region (Fig. 3E, C, and D). Their ordered state appeared to correlate with encapsidated RNA that interacts with the VP1 N terminus (Fig. 3A, striped areas).

Native HRV2 showed previously unreported interactions with RNA near the twofold axis mediated by the VP1 N terminus. Fitting of the native X-ray coordinates suggested that this region corresponds to the Asn²¹–Ser²² tract (Fig. 2D, blue arrow). The cross-section of interacting areas in these VP1-mediated contacts was larger than those mediated by VP2. As for the X-ray structure of native HRV2, the VP1 N-terminal extension is folded as a long arm that bends back over itself, resulting in roughly antiparallel strands (Fig. 3B); Asn²¹–Ser²² (which interact with RNA) and Glu⁵²–Gln⁵⁷ (which interact with the VP2 loop) are thus positioned almost in front of each other, forming a ternary network (Fig. 3).

Discussion

Members of the genus *EV*, such as HRV, assemble from protein precursors into a robust (but dynamic) capsid stabilized by an internal network of interactions of the N-terminal extensions of the major capsid proteins VP1–VP3 (Fig. S1) (4). In addition to native virions, NECs are assembled from VP1, VP0 (the precursor of VP2 and VP4), and VP3. Their structural analysis has been valuable for understanding viral assembly and uncoating processes (3, 25).

Our cryo-EM data for native HRV2 indicate that the VP1 N-terminal segment is directly involved in interactions with RNA; the Asn²¹–Ser²² tract, positioned in front of the Glu⁵²–Gln⁵⁷ segment, interacts with the encapsidated RNA (Figs. 2D and 3A). These previously unidentified RNA–VP1 contacts (4) suggest that during HRV2 capsid assembly, the packaged RNA acts as a scaffold that promotes ordering of N-terminal extensions (not only for VP1) and increases virion stability. Whereas the VP2 Trp³⁸-mediated interaction with RNA is conserved in all *EVs* analyzed so far (4, 17), interactions with VP1 (and other capsid proteins) vary in other *EVs*; for example, in EV71, VP1 Gln³⁰ and VP3 Gln⁴⁸ interact with nucleotides.

Our preparation of purified HRV2 contained almost 20% NEC, allowing their direct structural comparison with native virus. The major NEC fraction has identical antigenic makeup and receptor binding as full virions (5, 26) and the same size (Fig.

S3). Nonetheless, the inner surfaces vary, and difference mapping showed clear conformational disparities (Fig. 3). Whereas VP1 N-terminal sequences (residues Leu¹⁵–Thr⁶¹) and the VP2 loop Ala⁴⁷–Pro⁵³ are well ordered in the native virion, both are disordered in NEC; this leads to an overall loss of contacts and suggests that the protein network is maintained only in the presence of the RNA. The X-ray structure of empty PV shows similar disorder in capsid-internal regions (27). The disorder of the VP1 N-terminal segment and the VP2 loop is not associated with capsid expansion in HRV2 (there must be additional disordered segments in NEC capsid proteins not apparent in our analysis, including all of VP4). EV71 can expand spontaneously (17), indicating differences among *EVs*.

In contrast to the *EV* species A–D, the three HRV species are acid labile; after entry into late endosomes, HRV2 undergoes conformational modifications and gives rise to A-particles. These intermediates are expanded, lack VP4, and have channels that cross the protein shell and surface-exposed amphipathic VP1 N-terminal extensions. Extrusion of the genomic RNA into the host cytoplasm converts them into (empty) B-particles. Our X-ray and cryo-EM 3D structures of A-particles are probably a faithful representation of the uncoating intermediate generated during infection, as they were obtained by acidification, as occurs in the endosome, rather than by heating. Comparison of the X-ray structures shows that except for minor differences in the VP2 N-terminal region (residues 46–55) and in the VP3 F–G loop (residues 149–162), A- and B-particle shells are identical. This indicates that the presence of the RNA in the expanded particle induces neither positive nor negative strain. In the native virion, however, it participates in the maintenance of the N-terminal capsid protein network through interaction with the VP1 N-terminal segment and the VP2 loop (see *Interactions Mediated by N-Terminal VP1 Sequences*). This important structural role is observed in many other RNA viruses (28). The acid-triggered conversion into the A-particle not only breaks these connections, but also results in a major restructuring of the RNA; whereas its contacts with Trp³⁸ are maintained, new contacts are established with the now-accessible β -tubes built of the five intertwined copies of VP3 at the fivefold axes. As a consequence, before its release into host cytosol, the RNA constitutes a well-ordered layer, closely associated with the capsid inner surface through interactions with VP2 and VP3 in the A-particle state. The recently described structure of the CAV16 A-particle (23) shows that RNA–protein contacts are roughly conserved at the two- and fivefold axes, although the interacting residues cannot be discerned precisely from these ~6 Å X-ray maps (Fig. S7). In

both structures, the gap between the RNA outer layer and the capsid inner surface is ~ 15 Å.

Conformational changes associated with HRV2 uncoating were described in detail from near-atomic resolution X-ray analysis of B-particles obtained by heating (16); the acid environment in late endosomes must trigger release of the pocket factor to allow the hinge movement in VP1. This movement induces the concerted displacement of VP2 and VP3, forcing reorganization of the protomer interfaces that lead to capsid expansion and irreversible formation of channels that act as gateways for externalization of protein segments (VP4 and VP1 N termini) and viral RNA (16). These conformational changes appear to be similar to those described for EV71 and PV (17, 29). We found that incubation of a mixture of $\sim 80\%$ native HRV2 and 20% NEC at acid pH resulted in a similar ratio of (now expanded) full and empty particles (Fig. 1). The bimodal Gaussian distributions of RNA content of the individual particles were also similar (Fig. S4). This suggests that acidification transformed native HRV2 into the A-particle stage and NEC into B-particles. Conversion of A- (and native HRV2) into B-particles at low pH is thus very inefficient *in vitro*, indicating that low pH does not suffice for productive uncoating (18). This process might be catalyzed *in vivo* by insertion of the amphipathic exposed N-terminal VP1 helices into membranes and/or by a specific ionic milieu (30, 31) (Fig. 4).

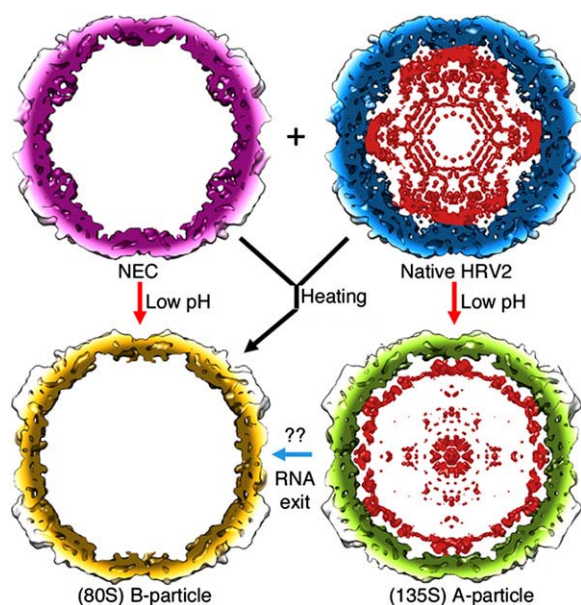


Fig. 4. Relationship between HRV2 expansion/uncoating and low pH/heat-induced changes. HRV2 capsids are represented as 25 Å slabs, colored as in Fig. 1, viewed along an icosahedral twofold axis. Virions were purified as a mixture of empty (NEC) and full (native HRV2) particles; their simultaneous coexistence indicates that ordering of the VP1 N-terminal segment is promoted by ordered RNA segments that participate in the internal network. RNA helps to stabilize the triple RNA–VP1–VP2 sandwich, in which RNA and the VP2 segment (residues ~ 40 –50) form a clamp around the VP1 N terminus. When the pH is lowered to 5.0 for 15 min (red arrows), NECs expand to the B-particle conformation and the native HRV2 to A-particles; direct conversion of native HRV2 into B-particles (or through the A-particle stage) is minor. Major morphological changes include reduction in capsid wall thickness, pore formation, and VP4 and VP1 N terminus externalization. These conformational changes indicate that capsid expansion depends on low pH and that the genome has no role in this process. After heating to 56 °C for 10–12 min (black arrow), NEC and native HRV2 are transformed into B-particles (16). RNA exit [i.e., conversion of A- into B-particles (blue arrow)] might require lipid bilayers and/or specific ion gradients; indicated as “??”.

These and previous findings (32) imply that heating and acidification should no longer be considered equivalent triggers for HRV2 uncoating (Fig. 4); whereas heating of native HRV2 results in B-particles (expansion plus uncoating), simple acidification gives rise to A-particles (expansion only). Our present structural data also strongly suggest that the transition of the VP2 segment (including residues ~ 40 –50) from ordered to disordered conformation is implicated in expansion and/or uncoating. The VP2 segment participates in 60 triple RNA–VP1–VP2 interactions critical for the correct positioning of the VP1 N terminus in the native HRV2 capsid, relieving stress on the VP1 N terminus and allowing its externalization through one of the newly formed pores. Externalization of VP4 and the VP1 N terminus, together with capsid expansion, implies more space and thus less strain on the RNA. The VP3-interacting regions might control the more relaxed state of the RNA molecule—for example, to avoid tangling and provide a 3D framework for ordered RNA exit. In this model, the contacts with the inner capsid surface would be dynamic, acting like rails that conduct the RNA strands toward the release channel.

Materials and Methods

Production of Native Virus and Subviral Particles. HRV2 was produced and purified as described (33), and the virus pellet was dispersed in 50 mM Na borate buffer (pH 7.4). To generate A-particles, HRV2 (5–7 mg/mL) in the same buffer was brought to pH 5 with 1.4 vol 50 mM Na acetate, pH 5 [15 min, room temperature (RT)], reneutralized with 1.2 vol 100 mM Na borate buffer, pH 8.3, and incubated (1 h, RT).

Cryo-EM. Samples (4 μ L) were applied to Quantifoil glow-discharged grids in a humidified chamber, blotted, and plunged into liquid ethane following standard procedures (34). Micrographs were recorded in low-dose conditions (~ 20 e $^{-}/\text{Å}^2$) in a FEI Tecnai F30 Polara cryo-electron microscope (300 kV) with C2 and objective aperture of 70 and 100 μ m. Images were acquired between 0.8 and 3.5 μ m underfocus with a Gatan Ultrascan 4000 4k CCD camera, using Legicon automatic image acquisition software (35). CCD frames were recorded at detector magnification of 79,372x (1.89 Å/pixel sampling rate).

Image Processing. Images were processed using Xmipp (36). Automatic particle picking was used to select individual images for NEC, native HRV2, and A- and B-particles. Defocus was determined with CTFind (37). Particle origin and orientation determined with Xmipp via iterative projection matching using the HRV2 X-ray structure (4) low pass-filtered to 30 Å as the starting map. For the slightly larger A-particles, we used a size-scaled low-resolution HRV2 map. Resolution was assessed by FSC between independent half-dataset maps, applying a correlation limit of 0.5. After the independent refinements, 2,223, 7,946, 15,170, and 2,976 particles were included in the respective NEC, native HRV2, and A- and B-particle 3DRs. Amplitude decay was calculated using spatial frequency components from cryo-EM maps and the HRV2 X-ray map (PDB ID code 1FPN) for NEC, native HRV2, and the 80S HRV2 X-ray map (PDB ID code 3TN9) for A- and B-particles. The decay profile of the cryo-EM maps was adjusted to match the profile of the X-ray maps, the fitted function was applied to the cryo-EM maps in the frequency range from 230 Å to the maximum resolution achieved, and a soft low-pass filter was applied.

For difference map calculations, spherically averaged radial density profiles were calculated, normalized, and scaled to match the fit between the profiles of cryo-EM maps and atomic models. The two 3DRs were subtracted and rendered at 3 σ above the mean density; at that contour level, the difference density is rendered similarly on the parental 3D model. Statistical significance of the difference densities was evaluated by measurement of the average density centered on designated spots in the two (raw) 3D maps used in the subtraction. These spots corresponded to the major differences shown in Fig. 3A (densities in blue). Average densities computed from cubes (with a side dimension of 7.6–11.4 Å) are referred to as an estimation of occupancy relative to capsid density (in which maximum occupancy is given).

Crystallization and Data Collection. Crystals were obtained by the vapor diffusion method in hanging drops at 20 °C by mixing equal volumes of 135S particles (2 mg/mL) and a reservoir solution containing 0.5–0.7 M Na acetate in Na phosphate buffer with pH ranging from 7.5 to 9.0, containing 5% glycerol (vol/vol). Crystals were transferred to a cryoprotective solution with 20% (vol/vol) glycerol in the crystallization buffer, and flash-cooled in liquid

nitrogen. A dataset up to 6.5 Å resolution was collected using synchrotron radiation at the Swiss Light Source (SLS), Villigen, Switzerland (beamline PX1) using a Pilatus 6M detector. Diffraction images were processed with XDS and internally scaled with SCALA (Table S1).

Structure Determination and Refinement. Crystals of HRV2 1355 particles belong to space group I222 and have unit cell parameters of $a = 311.9$ Å, $b = 357.8$ Å, $c = 386.7$ Å. The crystal asymmetric unit has 15 protomers. Initial phases were obtained after a rigid body refinement using the coordinates of the HRV2 80S particle structure (PDB ID code 3TN9) with Refmac5 (38). After 10 cycles of rigid body refinement, the R factor was 36% for data in the 121–6.5 Å resolution shell. Cycles of 15-fold non-crystallographic averaging and solvent flattening with the DM program (39) were used to improve map quality. Averaging and solvent masks were created using NcsMask around an expanded model of the 80S capsid to cover the region where the RNA contacts the viral shell. Model rebuilding was initiated using Coot (40), followed by refinement with Refmac5 using data in the resolution shell 121–6.5 Å. Graphics and movies were produced using University of California–San Francisco Chimera and Pymol (41).

Structural Analysis. Uro fitting (42) was carried out on entire NEC, native HRV2, and A- and B-particle cryo-EM maps with X-ray structures of native HRV2 (4) and the B-particle (16) asymmetric units. VP1, VP2, and VP3 were initially treated as a single rigid body and the initial docking coordinates were refined, treating each subunit as an independent rigid body. As VP4 is

near VP1 in the native HRV2 capsid, VP1 movements during docking were imposed on VP4. Correlation coefficients between the native HRV2 X-ray map and the cryo-EM density map were 83.4% and 89.1% for native HRV2 and NEC, respectively. Similar calculations for the B-particle X-ray map and the cryo-EM density maps of A- and B-particle capsids gave correlation coefficients of 91.6% and 94.6%.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank I. Gössler for preparing the virus, T. Marlovits for advice, G. Resch for help with the Polara microscope, H. Kowalski for critical reading of the manuscript and helpful comments, and C. Mark for editorial assistance. D.B. and A.P.-H. are particularly thankful to S. Hafenstein and R. S. Sinkovic for help and advice in the early phase of the project, and K. Djinic-Carugo in the initial crystallization trials. Part of the data processing was performed on the Vienna Scientific Cluster (Project 70172 to D.B.), and X-ray data were obtained at the SLS (beamline PX1) Villigen, Switzerland (BioStruct Project 2669). L.V.-A. is the recipient of a Formació de Investigadors (FI) fellowship from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR). This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BIO2011-24333 to N.V. and BFU2011-25902 to J.R.C.), the National Institutes of Health Intramural Research Program and the Center for Information Technology (to B.L.T.), and the Austrian Science Foundation Project 18693-B09. Short stays in Madrid were made possible by funding through "Acciones Integradas" (ES 03/2010 to D.B. and AT2009-0041 to N.V.) awarded by the Austrian Exchange Service [Österreichischer Austauschdienst (OeAD)].

- Palmenberg AC, et al. (2009) Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science* 324(5923):55–59.
- Lau SK, et al. (2007) Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J Clin Microbiol* 45(11):3655–3664.
- Basavappa R, Gómez-Yafal A, Hogle JM (1998) The poliovirus empty capsid specifically recognizes the poliovirus receptor and undergoes some, but not all, of the transitions associated with cell entry. *J Virol* 72(9):7551–7556.
- Verdaguer N, Blaas D, Fita I (2000) Structure of human rhinovirus serotype 2 (HRV2). *Mol Biol* 300(5):1179–1194.
- Korant BD, Lonberg-Holm K, Noble J, Stasny JT (1972) Naturally occurring and artificially produced components of three rhinoviruses. *Virology* 48(1):71–86.
- Ansardi DC, Morrow CD (1995) Amino acid substitutions in the poliovirus maturation cleavage site affect assembly and result in accumulation of provirions. *J Virol* 69(3):1540–1547.
- Nugent CI, Johnson KL, Sarnow P, Kirkegaard K (1999) Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J Virol* 73(1):427–435.
- Lonberg-Holm K, Noble-Harvey J (1973) Comparison of in vitro and cell-mediated alteration of a human Rhinovirus and its inhibition by sodium dodecyl sulfate. *J Virol* 12(4):819–826.
- Bayer N, Prchla E, Schwab M, Blaas D, Fuchs R (1999) Human rhinovirus HRV14 uncoats from early endosomes in the presence of bafilomycin. *FEBS Lett* 463(1-2):175–178.
- Nurani G, Lindqvist B, Casasnovas JM (2003) Receptor priming of major group human rhinoviruses for uncoating and entry at mild low-pH environments. *J Virol* 77(22):11985–11991.
- Neubauer C, Frasel L, Kuechler E, Blaas D (1987) Mechanism of entry of human rhinovirus 2 into HeLa cells. *Virology* 158(1):255–258.
- Konecni T, et al. (2009) Low pH-triggered beta-propeller switch of the low-density lipoprotein receptor assists rhinovirus infection. *J Virol* 83(21):10922–10930.
- Fricks CE, Hogle JM (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: Externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 64(5):1934–1945.
- Bilek G, et al. (2011) Liposomal nanocontainers as models for viral infection: Monitoring viral genomic RNA transfer through lipid membranes. *J Virol* 85(16):8368–8375.
- Levy HC, Bostina M, Filman DJ, Hogle JM (2010) Catching a virus in the act of RNA release: A novel poliovirus uncoating intermediate characterized by cryo-electron microscopy. *J Virol* 84(9):4426–4441.
- Garriga D, et al. (2012) Insights into minor group rhinovirus uncoating: The X-ray structure of the HRV2 empty capsid. *PLoS Pathog* 8(1):e1002473.
- Wang X, et al. (2012) A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat Struct Mol Biol* 19(4):424–429.
- Weiss VU, et al. (2012) Characterization of rhinovirus subviral A particles via capillary electrophoresis, electron microscopy and gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis: Part I. *Electrophoresis* 33(12):1833–1841.
- Xing L, Casasnovas JM, Cheng RH (2003) Structural analysis of human rhinovirus complexed with ICAM-1 reveals the dynamics of receptor-mediated virus uncoating. *J Virol* 77(11):6101–6107.
- Hewat EA, Blaas D (2004) Cryoelectron microscopy analysis of the structural changes associated with human rhinovirus type 14 uncoating. *J Virol* 78(6):2935–2942.
- Belnap DM, et al. (2000) Molecular tectonic model of virus structural transitions: The putative cell entry states of poliovirus. *J Virol* 74(3):1342–1354.
- Lin J, et al. (2011) An externalized polypeptide partitions between two distinct sites on genome-released poliovirus particles. *J Virol* 85(19):9974–9983.
- Ren J, et al. (2013) Picornavirus uncoating intermediate captured in atomic detail. *Nat Commun* 4:1929.
- Hadfield AT, et al. (1997) The refined structure of human rhinovirus 16 at 2.15 Å resolution: Implications for the viral life cycle. *Structure* 5(3):427–441.
- Curry S, et al. (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: The structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 71(12):9743–9752.
- Korant BD, Lonberg-Holm K, Yin FH, Noble-Harvey J (1975) Fractionation of biologically active and inactive populations of human rhinovirus type 2. *Virology* 63(2):384–394.
- Basavappa R, et al. (1994) Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci* 3(10):1651–1669.
- Schneemann A (2006) The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu Rev Microbiol* 60:51–67.
- Hogle JM (2012) A 3D framework for understanding enterovirus 71. *Nat Struct Mol Biol* 19(4):367–368.
- Bostina M, et al. (2007) Single particle cryoelectron tomography characterization of the structure and structural variability of poliovirus-receptor-membrane complex at 30 Å resolution. *J Struct Biol* 160(2):200–210.
- Bubeck D, Filman DJ, Hogle JM (2005) Cryo-electron microscopy reconstruction of a poliovirus-receptor-membrane complex. *Nat Struct Mol Biol* 12(7):615–618.
- Harutyunyan S, et al. (2013) Viral uncoating is directional: Exit of the genomic RNA in a common cold virus starts with the poly-(A) tail at the 3'-end. *PLoS Pathog* 9(4):e1003270.
- Neumann E, Moser R, Snyers L, Blaas D, Hewat EA (2003) A cellular receptor of human rhinovirus type 2, the very-low-density lipoprotein receptor, binds to two neighboring proteins of the viral capsid. *J Virol* 77(15):8504–8511.
- Luque D, et al. (2007) Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol* 81(13):6869–6878.
- Carragher B, et al. (2000) Legion: An automated system for acquisition of images from vitreous ice specimens. *J Struct Biol* 132(1):33–45.
- Scheres SH, Núñez-Ramírez R, Sorzano CO, Carazo JM, Marabini R (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat Protoc* 3(6):977–990.
- Mindell JA, Grigorieff N (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol* 142(3):334–347.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53(Pt 3):240–255.
- Cowan K, Main P (1998) Miscellaneous algorithms for density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 4):487–493.
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132.
- Pettersen EF, et al. (2004) UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605–1612.
- Siebert X, Navaza J (2009) UROX 2.0: An interactive tool for fitting atomic models into electron-microscopy reconstructions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65(Pt 7):651–658.
- Lin J, et al. (2012) Structure of the Fab-labeled breathing state of native poliovirus. *J Virol* 86(10):5959–5962.

8 REFERÈNCIES

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* 337, 709–16.
- Adams, M.J., King, A.M.Q., Carstens, E.B., 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch. Virol.* 158, 2023–30.
- Adams, P., Kandiah, E., Effantin, G., Steven, A.C., Ehrenfeld, E., 2009. Poliovirus 2C protein forms homo-oligomeric structures required for ATPase activity. *J Biol Chem* 284, 22012–22021.
- Agirre, A., Barco, A., Carrasco, L., Nieva, J.L., 2002. Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J. Biol. Chem.* 277, 40434–41.
- Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., Miyano, M., 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* 7, 1417–26.
- Agol, V.I., 2010. Picornavirus as a model for studying the nature of RNA recombination, in: Ehrenfeld, E., Domingo, E., Roos, R.P. (Eds.), *The Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 339–252.
- Agol, V.I., Gmyl, A.P., 2010. Viral security proteins: counteracting host defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 867–78.
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menéndez-Arias, L., Domingo, E., 2003. Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* 311, 339–49.
- Aldabe, R., Barco, A., Carrasco, L., 1996. Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. *J. Biol. Chem.* 271, 23134–7.
- Aldabe, R., Irurzun, A., Carrasco, L., 1997. Poliovirus protein 2BC increases cytosolic free calcium concentrations. *J. Virol.* 71, 6214–7.
- Al-Sunaidi, M., Williams, C.H., Hughes, P.J., Schnurr, D.P., Stanway, G., 2007. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 81, 1013–1021.
- Aminev, A.G., Amineva, S.P., Palmenberg, A.C., 2003. Encephalomyocarditis viral protein 2A localizes to nucleoli and inhibits cap-dependent mRNA translation. *Virus Res.* 95, 45–57.

- An, D.-J., Jeong, W., Jeoung, H.-Y., Yoon, S.H., Kim, H.-J., Choi, C.-U., Park, B.-K., 2009. Encephalomyocarditis in Korea: serological survey in pigs and phylogenetic analysis of two historical isolates. *Vet. Microbiol.* 137, 37–44.
- Appleby, T.C., Luecke, H., Shim, J.H., Wu, J.Z., Cheney, I.W., Zhong, W., Vogeley, L., Hong, Z., Yao, N., 2005. Crystal structure of complete rhinovirus RNA polymerase suggests front loading of protein primer. *J. Virol.* 79, 277–88.
- Aragonès, L., Bosch, A., Pintó, R.M., 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J. Virol.* 82, 1688–700.
- Aragonès, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., Pintó, R.M., 2010. Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathog.* 6, e1000797.
- Arnold, J.J., Vignuzzi, M., Stone, J.K., Andino, R., Cameron, C.E., 2005. Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 280, 25706–16.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195–201.
- Badger, J., Minor, I., Kremer, M.J., Oliveira, M.A., Smith, T.J., Griffith, J.P., Guerin, D.M., Krishnaswamy, S., Luo, M., Rossmann, M.G., 1988. Structural analysis of a series of antiviral agents complexed with human rhinovirus 14. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 3304–8.
- Baltimore, D., 1968. Structure of the poliovirus replicative intermediate RNA. *J Mol Biol* 32, 359–368.
- Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35, 235–41.
- Baxter, N.J., Roetzer, A., Liebig, H.-D., Sedelnikova, S.E., Hounslow, A.M., Skern, T., Waltho, J.P., 2006. Structure and dynamics of coxsackievirus B4 2A proteinase, an enzyme involved in the etiology of heart disease. *J. Virol.* 80, 1451–62.
- Beese, L.S., 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.
- Belsham, G.J., 2009. Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res* 139, 183–192.

- Bienz, K., Egger, D., Pasamontes, L., 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160, 220–6.
- Biswal, B.K., Cherney, M.M., Wang, M., Chan, L., Yannopoulos, C.G., Bilimoria, D., Nicolas, O., Bedard, J., James, M.N.G., 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, 18202–10.
- Biswal, B.K., Wang, M., Cherney, M.M., Chan, L., Yannopoulos, C.G., Bilimoria, D., Bedard, J., James, M.N.G., 2006. Non-nucleoside inhibitors binding to hepatitis C virus NS5B polymerase reveal a novel mechanism of inhibition. *J. Mol. Biol.* 361, 33–45.
- Blank, C.A., Anderson, D.A., Beard, M., Lemon, S.M., 2000. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J. Virol.* 74, 6476–84.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T., Snyder, S.H., 2003. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 1051–61.
- Brautigam, C.A., 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.
- Bråve, A., Ljungberg, K., Wahren, B., Liu, M.A., 2007. Vaccine delivery methods using viral vectors. *Mol. Pharm.* 4, 18–32.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A., De Francesco, R., 2002. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J. Virol.* 76, 3482–92.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., Rey, F.A., 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13034–9.
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O., Vonrhein, C., Womack, T., 2010. BUSTER.

BIBLIOGRAFIA

- Brown, E.A., Day, S.P., Jansen, R.W., Lemon, S.M., 1991. The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol* 65, 5828–5838.
- Bruenn, J.A., 2003. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 31, 1821–1829.
- Butcher, S.J., Grimes, J.M., Makeyev, E. V, Bamford, D.H., Stuart, D.I., 2001. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410, 235–40.
- Campagnola, G., Weygandt, M., Scoggin, K., Peersen, O., 2008. Crystal structure of coxsackievirus B3 3Dpol highlights the functional importance of residue 5 in picornavirus polymerases. *J. Virol.* 82, 9458–64.
- Carfi', M., Gennari, A., Malerba, I., Corsini, E., Pallardy, M., Pieters, R., Van Loveren, H., Vohr, H.W., Hartung, T., Gribaldo, L., 2007. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology* 229, 11–22.
- Carocci, M., Bakkali-Kassimi, L., 2012. The encephalomyocarditis virus. *Virulence* 3, 351–67.
- Castro, C., Arnold, J.J., Cameron, C.E., 2005. Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Res.* 107, 141–9.
- Castro, C., Smidansky, E.D., Arnold, J.J., Maksimchuk, K.R., Moustafa, I., Uchida, A., Götte, M., Konigsberg, W., Cameron, C.E., 2009. Nucleic acid polymerases use a general acid for nucleotidyl transfer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 212–8.
- Chan, D.C., 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79–99.
- Chen, C., Wang, Y., Shan, C., Sun, Y., Xu, P., Zhou, H., Yang, C., Shi, P.-Y., Rao, Z., Zhang, B., Lou, Z., 2013. Crystal structure of enterovirus 71 RNA-dependent RNA polymerase complexed with its protein primer VPg: implication for a trans mechanism of VPg uridylylation. *J. Virol.* 87, 5755–68.
- Chen, D., Patton, J.T., 2000. De novo synthesis of minus strand RNA by the rotavirus RNA polymerase in a cell-free system involves a novel mechanism of initiation. *RNA* 6, 1455–67.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2010. MolProbity: all-atom

- structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 12–21.
- Cho, M.W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K., Ehrenfeld, E., 1994. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202, 129–145.
- Choe, S.S., Dodd, D.A., Kirkegaard, K., 2005. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* 337, 18–29.
- Choi, K.H., Groarke, J.M., Young, D.C., Kuhn, R.J., Smith, J.L., Pevear, D.C., Rossmann, M.G., 2004. The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4425–30.
- Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, E.J., Liao, W., Xu, M.Q., Benner, J., 1998. Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Res.* 26, 5109–15.
- Cockayne, E., 1914. EPIDEMIC CATARRHAL JAUNDICE. *Lancet* 184, 218–220.
- Cohen, J.I., Ticehurst, J.R., Purcell, R.H., Buckler-White, A., Baroudy, B.M., 1987. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J. Virol.* 61, 50–9.
- Conchillo-Solé, O., de Groot, N.S., Avilés, F.X., Vendrell, J., Daura, X., Ventura, S., 2007. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* 8, 65.
- Contreras, A.M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E. V, Chung, R.T., 2002. Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J. Virol.* 76, 8505–17.
- Crawford, N.M., Baltimore, D., 1983. Genome-linked protein VPg of poliovirus is present as free VPg and VPg-pUpU in poliovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 7452–7455.
- Cristina, J., Costa-Mattioli, M., 2007. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res.* 127, 151–7.

- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J.J., Zhong, W., Lau, J.Y., Hong, Z., Andino, R., Cameron, C.E., 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* 6, 1375–9.
- Crowell, R.L., Landau, B.J., 1997. A short history and introductory background on the coxsackieviruses of group B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 223, 1–11.
- Cuconati, A., Xiang, W., Lahser, F., Pfister, T., Wimmer, E., 1998. A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of poliovirus. *J. Virol.* 72, 1297–307.
- Czechowicz, J., Huaman, J.L., Forshey, B.M., Morrison, A.C., Castillo, R., Huaman, A., Caceda, R., Eza, D., Rocha, C., Blair, P.J., Olson, J.G., Kochel, T.J., 2011. Prevalence and risk factors for encephalomyocarditis virus infection in Peru. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 367–74.
- De Clercq, E., Neyts, J., 2009. Antiviral agents acting as DNA or RNA chain terminators. *Handb. Exp. Pharmacol.* 53–84.
- De Francesco, R., Tomei, L., Altamura, S., Summa, V., Migliaccio, G., 2003. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 58, 1–16.
- De Jong, A.S., de Mattia, F., Van Dommelen, M.M., Lanke, K., Melchers, W.J.G., Willems, P.H.G.M., van Kuppeveld, F.J.M., 2008. Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J. Virol.* 82, 3782–90.
- De Jong, A.S., Schrama, I.W.J., Willems, P.H.G.M., Galama, J.M.D., Melchers, W.J.G., van Kuppeveld, F.J.M., 2002. Multimerization reactions of coxsackievirus proteins 2B, 2C and 2BC: a mammalian two-hybrid analysis. *J. Gen. Virol.* 83, 783–93.
- De Jong, A.S., Wessels, E., Dijkman, H.B.P.M., Galama, J.M.D., Melchers, W.J.G., Willems, P.H.G.M., van Kuppeveld, F.J.M., 2003. Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle. *J. Biol. Chem.* 278, 1012–21.
- Dea, S., Bilodeau, R., Sauvageau, R., Martineau, G.P., 1991. Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 275–82.

- Dmitrieva, T.M., Alexeevski, A. V, Shatskaya, G.S., Tolskaya, E.A., Gmyl, A.P., Khitrina, E. V, Agol, V.I., 2007. Significance of the C-terminal amino acid residue in mengovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 365, 79–91.
- Domingo, E., 1997. Rapid evolution of viral RNA genomes. *J. Nutr.* 127, 958S–961S.
- Domingo, E., 2000. Viruses at the edge of adaptation. *Virology* 270, 251–3.
- Domingo, E., 2005. Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res* 107, 115–228.
- Domingo, E., 2007. Virus evolution, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strauss, S.E. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 389–421.
- Domingo, E., Baranowski, E., Nuñez, J.I., Ruiz-Jarabo, C.M., Sierra, S., Molina, N., Sobrino, F., 2000. [Quasispecies and molecular evolution of viruses]. *Rev. Sci. Tech.* 19, 55–63.
- Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Martín-Hernández, A.M., Sáiz, J.C., Escarmís, C., 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 521–7.
- Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E., Manrubia, S.C., 2005. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res.* 107, 129–39.
- Domingo, E., Holland, J.J., 1994. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses, in: Morse, S.S. (Ed.), *The Evolutionary Biology of Viruses*. Raven Press, New York, pp. 191–184.
- Donnelly, M.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D., Ryan, M.D., 2001. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein “cleavage” mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal “skip”. *J Gen Virol* 82, 1013–1025.
- Doublíé, S., Sawaya, M.R., Ellenberger, T., 1999. An open and closed case for all polymerases. *Structure* 7, R31–5.
- Drake, J.W., 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4171–5.
- Duke, G.M., Hoffman, M.A., Palmenberg, A.C., 1992. Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. *J Virol* 66, 1602–1609.

- Dvorak, C.M., Hall, D.J., Hill, M., Riddle, M., Pranter, A., Dillman, J., Deibel, M., Palmenberg, A.C., 2001. Leader protein of encephalomyocarditis virus binds zinc, is phosphorylated during viral infection, and affects the efficiency of genome translation. *Virology* 290, 261–71.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76, 5974–84.
- Eigen, M., 2002. Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13374–6.
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 2126–32.
- Esfandiarei, M., McManus, B.M., 2008. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 127–55.
- Evans, P., 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62, 72–82.
- Fechner, H., Pinkert, S., Geisler, A., Poller, W., Kurreck, J., 2011. Pharmacological and biological antiviral therapeutics for cardiac coxsackievirus infections. *Molecules* 16, 8475–503.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purceli, R.H., 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 182, 1026–8.
- Ferrer-Orta, C., Agudo, R., Domingo, E., Verdaguier, N., 2009. Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 752–8.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., Verdaguier, N., 2006a. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J.* 25, 880–8.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmís, C., Verdaguier, 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., Escarmís, C., Domingo, E., Verdaguier, N., 2004. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* 279, 47212–21.

- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., Verdaguer, N., 2007. Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9463–8.
- Feuer, R., Mena, I., Pagarigan, R.R., Harkins, S., Hassett, D.E., Whitton, J.L., 2003. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am. J. Pathol.* 163, 1379–93.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., Maniatis, T., 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491–6.
- Flanegan, J.B., Petterson, R.F., Ambros, V., Hewlett, N.J., Baltimore, D., 1977. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 961–965.
- Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson, M.R., Steitz, T.A., 1988. Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8924–8.
- Freistadt, M.S., Vaccaro, J.A., Eberle, K.E., 2007. Biochemical characterization of the fidelity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Viol. J.* 4, 44.
- Fry, E., Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N.R., Rowlands, D., King, A., Stuart, D., 1991. Molecular studies on the structure of foot and mouth disease virus, in: Goodenough, P. (Ed.), *Protein Engineering*. CPL Press, Berkshire, United Kingdom, pp. 71–80.
- Fry, E.E., Knowles, N.J., Newman, J.W.I., Wilsden, G., Rao, Z., King, A.M.Q., Stuart, D.I., 2003. Crystal structure of Swine vesicular disease virus and implications for host adaptation. *J. Virol.* 77, 5475–86.
- Fullerton, S.W.B., Blaschke, M., Coutard, B., Gebhardt, J., Gorbalenya, A., Canard, B., Tucker, P.A., Rohayem, J., 2007. Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 81, 1858–71.
- Gainer, J.H., 1967. Encephalomyocarditis virus infections in Florida, 1960-1966. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 151, 421–5.

- Garbuzynskiy, S.O., Lobanov, M.Y., Galzitskaya, O. V, 2010. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics* 26, 326–32.
- Garcin, D., Kolakofsky, D., 1990. A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication. *J. Virol.* 64, 6196–6203.
- Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R., Schmaljohn, C., Kang, C., Kolakofsky, D., 1995. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *J. Virol.* 69, 5754–5762.
- Garriga, D., Ferrer-Orta, C., Querol-Audí, J., Oliva, B., Verdaguer, N., 2013. Role of motif B loop in allosteric regulation of RNA-dependent RNA polymerization activity. *J. Mol. Biol.* 425, 2279–87.
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Rodríguez, J.F., Verdaguer, N., 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20540–5.
- Garriga, D., Vives-Adrián, L., Buxaderas, M., Ferreira-da-Silva, F., Almeida, B., Macedo-Ribeiro, S., Pereira, P.J.B., Verdaguer, N., 2011. Cloning, purification and preliminary crystallographic studies of the 2AB protein from hepatitis A virus. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 1224–7.
- Gazina, E. V, Smidansky, E.D., Holien, J.K., Harrison, D.N., Cromer, B.A., Arnold, J.J., Parker, M.W., Cameron, C.E., Petrou, S., 2011. Amiloride is a competitive inhibitor of coxsackievirus B3 RNA polymerase. *J. Virol.* 85, 10364–74.
- Ge, X., Zhao, D., Liu, C., Wang, F., Guo, X., Yang, H., 2010. Seroprevalence of encephalomyocarditis virus in intensive pig farms in China. *Vet. Rec.* 166, 145–6.
- Gerber, K., Wimmer, E., Paul, A. V, 2001. Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A(pro). *J Virol* 75, 10979–10990.
- Ghazi, F., Hughes, P.J., Hyypia, T., Stanway, G., 1998. Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). *J Gen Virol* 79 (Pt 11, 2641–2650.
- Gong, P., Kortus, M.G., Nix, J.C., Davis, R.E., Peersen, O.B., 2013. Structures of coxsackievirus, rhinovirus, and poliovirus polymerase elongation complexes solved by engineering RNA mediated crystal contacts. *PLoS One* 8, e60272.
- Gong, P., Peersen, O.B., 2010. Structural basis for active site closure by the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22505–10.

- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Richardson, A., Meredith, J., Almond, J.W., Barclay, W., Evans, D.J., 2000. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol* 74, 4590–4600.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E. V, Lai, M.M., 1991. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett.* 288, 201–5.
- Gosert, R., Cassinotti, P., Siegl, G., Weitz, M., 1996. Identification of hepatitis A virus non-structural protein 2B and its release by the major virus protease 3C. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 2 , 247–55.
- Gosert, R., Egger, D., Bienz, K., 2000. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* 266, 157–69.
- Graham, S.C., Sarin, L.P., Bahar, M.W., Myers, R.A., Stuart, D.I., Bamford, D.H., Grimes, J.M., 2011. The N-terminus of the RNA polymerase from infectious pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment. *PLoS Pathog.* 7, e1002085.
- Groppo, R., Palmenberg, A.C., 2007. Cardiovirus 2A protein associates with 40S but not 80S ribosome subunits during infection. *J. Virol.* 81, 13067–74.
- Gruez, A., Selisko, B., Roberts, M., Bricogne, G., Bussetta, C., Jabafi, I., Coutard, B., De Palma, A.M., Neyts, J., Canard, B., 2008. The crystal structure of coxsackievirus B3 RNA-dependent RNA polymerase in complex with its protein primer VPg confirms the existence of a second VPg binding site on Picornaviridae polymerases. *J. Virol.* 82, 9577–90.
- Guarné, A., Tormo, J., Kirchweger, R., Pfistermueller, D., Fita, I., Skern, T., 1998. Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *EMBO J.* 17, 7469–79.
- Hambidge, S.J., Sarnow, P., 1992. Translational enhancement of the poliovirus 5' noncoding region mediated by virus-encoded polypeptide 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10272–6.
- Hansen, J.L., Long, A.M., Schultz, S.C., 1997. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* 5, 1109–22.

- Harmon, S.A., Updike, W., Jia, X.Y., Summers, D.F., Ehrenfeld, E., 1992. Polyprotein processing in cis and in trans by hepatitis A virus 3C protease cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 66, 5242–7.
- Harrison, D.N., Gazina, E. V, Purcell, D.F., Anderson, D.A., Petrou, S., 2008. Amiloride derivatives inhibit coxsackievirus B3 RNA replication. *J. Virol.* 82, 1465–73.
- Hato, S. V, Ricour, C., Schulte, B.M., Lanke, K.H.W., de Bruijni, M., Zoll, J., Melchers, W.J.G., Michiels, T., van Kuppeveld, F.J.M., 2007. The mengovirus leader protein blocks interferon-alpha/beta gene transcription and inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Cell. Microbiol.* 9, 2921–30.
- Havens, W.P., 1945. Experiment in cross immunity between infectious Hepatitis and homologous serum jaundice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 59, 148–150.
- Helliwell, J.R., 2005. Protein crystal perfection and its application. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 61, 793–8.
- Helwig, F.C., Schmidt, C.H., 1945. A FILTER-PASSING AGENT PRODUCING INTERSTITIAL MYOCARDITIS IN ANTHROPOID APES AND SMALL ANIMALS. *Science* 102, 31–3.
- Henke, A., Jarasch, N., Wutzler, P., 2003. Vaccination procedures against Coxsackievirus-induced heart disease. *Expert Rev. Vaccines* 2, 805–15.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., Mitaku, S., 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, 378–9.
- Hirst, G.K., 1962. Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 303–9.
- Hobson, S.D., Rosenblum, E.S., Richards, O.C., Richmond, K., Kirkegaard, K., Schultz, S.C., 2001. Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J.* 20, 1153–63.
- Hofmann, K., Stoffel, W., 1993. TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem.* 374, 166.
- Högbom, M., Jäger, K., Robel, I., Unge, T., Rohayem, J., 2009. The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J. Gen. Virol.* 90, 281–91.
- Hogle, J.M., Chow, M., Filman, D.J., 1985. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229, 1358–65.

- Hoover, D.M., Lubkowski, J., 2002. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res.* 30, e43.
- Hyypiä, T., Horsnell, C., Maaronen, M., Khan, M., Kalkkinen, N., Auvinen, P., Kinnunen, L., Stanway, G., 1992. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8847–51.
- Ishida, T., Kinoshita, K., 2007. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* 35, W460–4.
- Jeruzalmi, D., 2007. First analysis of macromolecular crystals: biochemistry and x-ray diffraction. *Methods Mol. Biol.* 364, 43–62.
- Jia, X.Y., Summers, D.F., Ehrenfeld, E., 1993. Primary cleavage of the HAV capsid protein precursor in the middle of the proposed 2A coding region. *Virology* 193, 515–9.
- Johansson, S., Niklasson, B., Maizel, J., Gorbalenya, A.E., Lindberg, A.M., 2002. Molecular analysis of three Ljungan virus isolates reveals a new, close-to-root lineage of the Picornaviridae with a cluster of two unrelated 2A proteins. *J. Virol.* 76, 8920–30.
- Joyce, C.M., Steitz, T.A., 1995. Polymerase structures and function: variations on a theme? *J. Bacteriol.* 177, 6321–9.
- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 125–32.
- Kao, C.C., Singh, P., Ecker, D.J., 2001. De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology* 287, 251–60.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., Akira, S., 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6, 981–8.
- Kim, D.-S., Nam, J.-H., 2011. Application of attenuated coxsackievirus B3 as a viral vector system for vaccines and gene therapy. *Hum. Vaccin.* 7, 410–6.
- Kim, K.-S., Tracy, S., Tapprich, W., Bailey, J., Lee, C.-K., Kim, K., Barry, W.H., Chapman, N.M., 2005. 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J. Virol.* 79, 7024–41.
- Kim, Y., Eom, S.H., Wang, J., Lee, D.S., Suh, S.W., Steitz, T.A., 1995. Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nature* 376, 612–6.

BIBLIOGRAFIA

- Kleyman, T.R., Cragoe, E.J., 1988. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.* 105, 1–21.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., Steitz, T.A., 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783–90.
- Kong, W.P., Ghadge, G.D., Roos, R.P., 1994. Involvement of cardiovirus leader in host cell-restricted virus expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1796–800.
- Koonin, E. V, 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.
- Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Toyoda, H., Etchison, D., Wimmer, E., 1987. Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* 61, 2711–8.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–80.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- 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.
- Lama, J., Paul, A. V, Harris, K.S., Wimmer, E., 1994. Properties of purified recombinant poliovirus protein 3aB as substrate for viral proteinases and as co-factor for RNA polymerase 3Dpol. *J. Biol. Chem.* 269, 66–70.
- Larsen, G.R., Semler, B.L., Wimmer, E., 1981. Stable hairpin structure within the 5'-terminal 85 nucleotides of poliovirus RNA. *J Virol* 37, 328–335.
- Le, S.Y., Chen, J.H., Sonenberg, N., Maizel Jr., J. V, 1993. Conserved tertiary structural elements in the 5' nontranslated region of cardiovirus, aphthovirus and hepatitis A virus RNAs. *Nucleic Acids Res* 21, 2445–2451.
- Lea, S., Hernández, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., 1994. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* 2, 123–39.

- Lee, J.-H., Alam, I., Han, K.R., Cho, S., Shin, S., Kang, S., Yang, J.M., Kim, K.H., 2011. Crystal structures of murine norovirus-1 RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 92, 1607–16.
- Lee, Y.F., Nomoto, A., Detjen, B.M., Wimmer, E., 1977. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 59–63.
- Lemon, S.M., 1985. Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. *N. Engl. J. Med.* 313, 1059–67.
- Lescar, J., Canard, B., 2009. RNA-dependent RNA polymerases from flaviviruses and Picornaviridae. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 759–67.
- Leslie, A.G.W., Powell, H.R., 2007. Processing Diffraction Data with Mosflm. *Evol. Methods Macromol. Crystallogr.* 245, 41.
- Levi, L.I., Gnädig, N.F., Beaucourt, S., McPherson, M.J., Baron, B., Arnold, J.J., Vignuzzi, M., 2010. Fidelity variants of RNA dependent RNA polymerases uncover an indirect, mutagenic activity of amiloride compounds. *PLoS Pathog.* 6, e1001163.
- Liebig, H.D., Ziegler, E., Yan, R., Hartmuth, K., Klump, H., Kowalski, H., Blaas, D., Sommergruber, W., Frasel, L., Lamphear, B., 1993. Purification of two picornaviral 2A proteinases: interaction with eIF-4 gamma and influence on in vitro translation. *Biochemistry* 32, 7581–8.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., Russell, R.B., 2003. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* 11, 1453–9.
- Lobert, P.E., Escriou, N., Ruelle, J., Michiels, T., 1999. A coding RNA sequence acts as a replication signal in cardioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11560–11565.
- Love, R.A., Maegley, K.A., Yu, X., Ferre, R.A., Lingardo, L.K., Diehl, W., Parge, H.E., Dragovich, P.S., 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, 1533–44.
- Lu, X., McDonald, S.M., Tortorici, M.A., Tao, Y.J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M.L., Patton, J.T., Harrison, S.C., 2008. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* 16, 1678–88.
- Luo, G., Hamatake, R.K., Mathis, D.M., Racela, J., Rigat, K.L., Lemm, J., Colonno, R.J., 2000. De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* 74, 851–63.

BIBLIOGRAFIA

- Luo, M., Vriend, G., Kamer, G., Minor, I., Arnold, E., Rossmann, M.G., Boege, U., Scraba, D.G., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., 1987. The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. *Science* 235, 182–91.
- Malcolm, B.A., 1995. The picornaviral 3C proteinases: cysteine nucleophiles in serine proteinase folds. *Protein Sci.* 4, 1439–45.
- Malet, H., Egloff, M.-P., Selisko, B., Butcher, R.E., Wright, P.J., Roberts, M., Gruez, A., Sulzenbacher, G., Vonnrhein, C., Bricogne, G., Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Davidson, A.D., Canard, B., 2007. Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J. Biol. Chem.* 282, 10678–89.
- Marcotte, L.L., Wass, A.B., Gohara, D.W., Pathak, H.B., Arnold, J.J., Filman, D.J., Cameron, C.E., Hogle, J.M., 2007. Crystal structure of poliovirus 3CD protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 81, 3583–96.
- Martin, A., Escriou, N., Chao, S.-F., Girard, M., Lemon, S.M., Wychowski, C., 1995. Identification and Site-Directed Mutagenesis of the Primary (2A/2B) Cleavage Site of the Hepatitis A Virus Polyprotein: Functional Impact on the Infectivity of HAV RNA Transcripts. *Virology* 213, 213–222.
- Martin, L.R., Palmenberg, A.C., 1996. Tandem mengovirus 5' pseudoknots are linked to viral RNA synthesis, not poly(C)-mediated virulence. *J Virol* 70, 8182–8186.
- Mason, P.W., Bezborodova, S. V, Henry, T.M., 2002. Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 76, 9686–9694.
- Mason, P.W., Rieder, E., Baxt, B., 1994. RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1932–6.
- Mateu, M.G., Hernández, J., Martínez, M.A., Feigelstock, D., Lea, S., Pérez, J.J., Giralt, E., Stuart, D., Palma, E.L., Domingo, E., 1994. Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J. Virol.* 68, 1407–17.
- Matthews, B.W., 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491–7.

- Maurice, H., Nielen, M., Brocchi, E., Nowotny, N., Kassimi, L.B., Billinis, C., Loukaides, P., O'Hara, R.S., Koenen, F., 2005. The occurrence of encephalomyocarditis virus (EMCV) in European pigs from 1990 to 2001. *Epidemiol. Infect.* 133, 547–57.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.
- McKnight, K.L., Lemon, S.M., 1996. Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA. *J. Virol.* 70, 1941–52.
- McKnight, K.L., Lemon, S.M., 1998. The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA* 4, 1569–84.
- Mena, I., Fischer, C., Gebhard, J.R., Perry, C.M., Harkins, S., Whitton, J.L., 2000. Coxsackievirus infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology. *Virology* 271, 276–88.
- Mirzayan, C., Wimmer, E., 1994. Biochemical studies on poliovirus polypeptide 2C: evidence for ATPase activity. *Virology* 199, 176–87.
- Molla, A., Harris, K.S., Paul, A. V, Shin, S.H., Mugavero, J., Wimmer, E., 1994. Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J. Biol. Chem.* 269, 27015–20.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J. Gen. Virol.* 85, 933–46.
- Mosley, R.T., Edwards, T.E., Murakami, E., Lam, A.M., Grice, R.L., Du, J., Sofia, M.J., Furman, P.A., Otto, M.J., 2012. Structure of hepatitis C virus polymerase in complex with primer-template RNA. *J. Virol.* 86, 6503–11.
- Moustafa, I.M., Shen, H., Morton, B., Colina, C.M., Cameron, C.E., 2011. Molecular dynamics simulations of viral RNA polymerases link conserved and correlated motions of functional elements to fidelity. *J. Mol. Biol.* 410, 159–81.
- Mu, Z., Wang, B., Zhang, X., Gao, X., Qin, B., Zhao, Z., Cui, S., 2013. Crystal Structure of 2A Proteinase from Hand, Foot and Mouth Disease Virus. *J. Mol. Biol.* 425, 4530–4543.

BIBLIOGRAFIA

- Murray, K.E., Barton, D.J., 2003. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77, 4739–50.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53, 240–55.
- Nakamura, T., Zhao, Y., Yamagata, Y., Hua, Y., Yang, W., 2012. Watching DNA polymerase η make a phosphodiester bond. *Nature* 487, 196–201.
- Ng, K.K.S., Cherney, M.M., Vazquez, A.L., Machin, A., Alonso, J.M.M., Parra, F., James, M.N.G., 2002. Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 277, 1381–7.
- Ng, K.K.-S., Pendás-Franco, N., Rojo, J., Boga, J.A., Machín, A., Alonso, J.M.M., Parra, F., 2004. Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J. Biol. Chem.* 279, 16638–45.
- Niyomrattanakit, P., Chen, Y.-L., Dong, H., Yin, Z., Qing, M., Glickman, J.F., Lin, K., Mueller, D., Voshol, H., Lim, J.Y.H., Nilar, S., Keller, T.H., Shi, P.-Y., 2010. Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel. *J. Virol.* 84, 5678–86.
- O'Connell, J.B., Costanzo-Nordin, M.R., Subramanian, R., Robinson, J.A., 1986. Dilated cardiomyopathy: emerging role of endomyocardial biopsy. *Curr. Probl. Cardiol.* 11, 445–507.
- O'Farrell, D., Trowbridge, R., Rowlands, D., Jäger, 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, 1025–35.
- Oberste, M.S., Gotuzzo, E., Blair, P., Nix, W.A., Ksiazek, T.G., Comer, J.A., Rollin, P., Goldsmith, C.S., Olson, J., Kochel, T.J., 2009. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 640–6.
- Oliveira, M.A., Zhao, R., Lee, W.M., Kremer, M.J., Minor, I., Rueckert, R.R., Diana, G.D., Pevear, D.C., Dutko, F.J., McKinlay, M.A., 1993. The structure of human rhinovirus 16. *Structure* 1, 51–68.
- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G., Steitz, T.A., 1985. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313, 762–6.

- Palmenberg, A.C., Kirby, E.M., Janda, M.R., Drake, N.L., Duke, G.M., Potratz, K.F., Collett, M.S., 1984. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the encephalomyocarditis viral polyprotein coding region. *Nucleic Acids Res.* 12, 2969–85.
- Parks, G.D., Baker, J.C., Palmenberg, A.C., 1989. Proteolytic cleavage of encephalomyocarditis virus capsid region substrates by precursors to the 3C enzyme. *J. Virol.* 63, 1054–8.
- Pathak, H.B., Oh, H.S., Goodfellow, I.G., Arnold, J.J., Cameron, C.E., 2008. Picornavirus genome replication: roles of precursor proteins and rate-limiting steps in oriI-dependent VPg uridylylation. *J. Biol. Chem.* 283, 30677–88.
- Paul, S., Michiels, T., 2006. Cardiovirus leader proteins are functionally interchangeable and have evolved to adapt to virus replication fitness. *J. Gen. Virol.* 87, 1237–46.
- Paul, A. V, Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J.H., Wimmer, E., 2003. Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* 77, 891–904.
- Paul, A. V, Rieder, E., Kim, D.W., van Boom, J.H., Wimmer, E., 2000. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 74, 10359–10370.
- Paul, A. V, van Boom, J.H., Filippov, D., Wimmer, E., 1998. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393, 280–4.
- Paulmann, D., Magulski, T., Schwarz, R., Heitmann, L., Flehmig, B., Vallbracht, A., Dotzauer, A., 2008. Hepatitis A virus protein 2B suppresses beta interferon (IFN) gene transcription by interfering with IFN regulatory factor 3 activation. *J. Gen. Virol.* 89, 1593–604.
- Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N., Snijder, E.J., 1999. Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J. Virol.* 73, 2016–26.
- Peitsch, M.C., 1995. Protein Modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13, 658–660.
- Petersen, J.F., Cherney, M.M., Liebig, H.D., Skern, T., Kuechler, E., James, M.N., 1999. The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: a proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *EMBO J.* 18, 5463–75.

BIBLIOGRAFIA

- Piccone, M.E., Rieder, E., Mason, P.W., Grubman, M.J., 1995. The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J. Virol.* 69, 5376–82.
- Pintó, R.M., Aragonès, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A., 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 127, 158–63.
- Porter, F.W., Palmenberg, A.C., 2009. Leader-induced phosphorylation of nucleoporins correlates with nuclear trafficking inhibition by coronaviruses. *J. Virol.* 83, 1941–51.
- Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H., Man, O., Beckmann, J.S., Silman, I., Sussman, J.L., 2005. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* 21, 3435–8.
- Pürstinger, G., De Palma, A.M., Zimmerhofer, G., Huber, S., Ladurner, S., Neyts, J., 2008. Synthesis and anti-CVB 3 evaluation of substituted 5-nitro-2-phenoxybenzonnitriles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
- Putnak, J.R., Phillips, B.A., 1981. Picornaviral structure and assembly. *Microbiol Rev* 45, 287–315.
- Reddacliff, L.A., Kirkland, P.D., Hartley, W.J., Reece, R.L., 1997. Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. *J. Zoo Wildl. Med.* 28, 153–7.
- Reuter, G., Boros, A., Pankovics, P., 2011. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev. Med. Virol.* 21, 32–41.
- Rieder, E., Paul, A. V., Kim, D.W., van Boom, J.H., Wimmer, E., 2000. Genetic and Biochemical Studies of Poliovirus cis-Acting Replication Element cre in Relation to VPg Uridylylation. *J. Virol.* 74, 10371–10380.
- Rodgers, D.W., Gamblin, S.J., Harris, B.A., Ray, S., Culp, J.S., Hellmig, B., Woolf, D.J., Debouck, C., Harrison, S.C., 1995. The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1222–6.
- Rodriguez, P.L., Carrasco, L., 1995. Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity. *J Biol Chem* 270, 10105–10112.
- Rolph, M.S., Ramshaw, I.A., 1997. Recombinant viruses as vaccines and immunological tools. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 517–24.

- Romanova, L.I., Tolskaya, E.A., Kolesnikova, M.S., Agol, V.I., 1980. Biochemical evidence for intertypic genetic recombination of polioviruses. *FEBS Lett.* 118, 109–12.
- Rossmann, M.G., Argos, P., 1975. A comparison of the heme binding pocket in globins and cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* 250, 7525–32.
- Rossmann, M.G., Arnold, E., Erickson, J.W., Frankenberger, E.A., Griffith, J.P., Hecht, H.J., Johnson, J.E., Kamer, G., Luo, M., Mosser, A.G., 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* 317, 145–53.
- Rothstein, M.A., Richards, O.C., Amin, C., Ehrenfeld, E., 1988. Enzymatic activity of poliovirus RNA polymerase synthesized in *Escherichia coli* from viral cDNA. *Virology* 164, 301–8.
- Salgado, P.S., Makeyev, E. V, Butcher, S.J., Bamford, D.H., Stuart, D.I., Grimes, J.M., 2004. The structural basis for RNA specificity and Ca²⁺ inhibition of an RNA-dependent RNA polymerase. *Structure* 12, 307–16.
- Sanchez, G., Bosch, A., Pinto, R.M., 2003. Genome Variability and Capsid Structural Constraints of Hepatitis A Virus. *J. Virol.* 77, 452–459.
- Schlick, P., Kronovetr, J., Hampoelz, B., Skern, T., 2002. Modulation of the electrostatic charge at the active site of foot-and-mouth-disease-virus leader proteinase, an unusual papain-like enzyme. *Biochem. J.* 363, 493–501.
- Schultheiss, T., Kusov, Y.Y., Gauss-Müller, V., 1994. Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology* 198, 275–81.
- Schwartz, M., Chen, J., Lee, W.-M., Janda, M., Ahlquist, P., 2004. Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11263–8.
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., Chen, Z.J., 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669–82.
- Severson, W.E., Schmaljohn, C.S., Javadian, A., Jonsson, C.B., 2003. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J. Virol.* 77, 481–8.

- Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.-P., Lin, R., Hiscott, J., 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300, 1148–51.
- Shen, H., Moustafa, I.M., Cameron, C.E., Colina, C.M., 2012. Exploring the dynamics of four RNA-dependent RNA polymerases by a coarse-grained model. *J. Phys. Chem. B* 116, 14515–24.
- Shepard, D.A., Heinz, B.A., Rueckert, R.R., 1993. WIN 52035-2 inhibits both attachment and eclipse of human rhinovirus 14. *J. Virol.* 67, 2245–54.
- Shewmaker, F., McGlinchey, R.P., Wickner, R.B., 2011. Structural insights into functional and pathological amyloid. *J. Biol. Chem.* 286, 16533–40.
- Sippl, M.J., 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17, 355–62.
- Smith, T.J., Kremer, M.J., Luo, M., Vriend, G., Arnold, E., Kamer, G., Rossmann, M.G., McKinlay, M.A., Diana, G.D., Otto, M.J., 1986. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science* 233, 1286–93.
- Smith, T.J., Olson, N.H., Cheng, R.H., Liu, H., Chase, E.S., Lee, W.M., Leippe, D.M., Mosser, A.G., Rueckert, R.R., Baker, T.S., 1993. Structure of human rhinovirus complexed with Fab fragments from a neutralizing antibody. *J. Virol.* 67, 1148–58.
- Snooks, M.J., Bhat, P., Mackenzie, J., Counihan, N.A., Vaughan, N., Anderson, D.A., 2008. Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J. Virol.* 82, 8733–42.
- Sousa, R., Chung, Y.J., Rose, J.P., Wang, B.C., 1993. Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature* 364, 593–9.
- Spyrou, V., Maurice, H., Billinis, C., Papanastassopoulou, M., Psalla, D., Nielen, M., Koenen, F., Papadopoulos, O., 2004. Transmission and pathogenicity of encephalomyocarditis virus (EMCV) among rats. *Vet. Res.* 35, 113–22.
- Stanway, G., Kalkkinen, N., Roivainen, M., Ghazi, F., Khan, M., Smyth, M., Meurman, O., Hyypiä, T., 1994. Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J. Virol.* 68, 8232–8.
- Steil, B.P., Barton, D.J., 2009. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res* 139, 240–252.

- Steitz, T.A., Steitz, J.A., 1993. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6498–502.
- Stemmer, W.P., Cramer, A., Ha, K.D., Brennan, T.M., Heyneker, H.L., 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 164, 49–53.
- Strebel, K., Beck, E., 1986. A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 58, 893–899.
- Stuart, D.I., Levine, M., Muirhead, H., Stammers, D.K., 1979. Crystal structure of cat muscle pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å. *J. Mol. Biol.* 134, 109–42.
- Stuger, R., Timmers, A.C.J., Raue, H.A., van't Riet, J., 2000. Nuclear import of ribosomal proteins: evidence for a novel type of nucleolar localization signal, in: Garret, R.A., R, D.S., A, L., T, M.A., B, M.P., F, N.H. (Eds.), *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. Washington, DC, pp. 205–217.
- Svitkin, Y. V., Gradi, A., Imataka, H., Morino, S., Sonenberg, N., 1999. Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection. *J. Virol.* 73, 3467–72.
- Tao, Y., Farsetta, D.L., Nibert, M.L., Harrison, S.C., 2002. RNA synthesis in a cage--structural studies of reovirus polymerase lambda3. *Cell* 111, 733–45.
- Tellez, A.B., Crowder, S., Spagnolo, J.F., Thompson, A.A., Peersen, O.B., Brutlag, D.L., Kirkegaard, K., 2006. Nucleotide channel of RNA-dependent RNA polymerase used for intermolecular uridylylation of protein primer. *J. Mol. Biol.* 357, 665–75.
- Tesh, R.B., 1978. The prevalence of encephalomyocarditis virus neutralizing antibodies among various human populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 144–9.
- Teterina, N., Bienz, K., Egger, D., 1997. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* 77, 66–77.
- Teterina, N.L., Bienz, K., Egger, D., Gorbalenya, A.E., Ehrenfeld, E., 1997. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* 237, 66–77.
- The CCP4 suite: programs for protein crystallography., 1994. . *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 50, 760–3.

- Thompson, A.A., Albertini, R.A., Peersen, O.B., 2007. Stabilization of poliovirus polymerase by NTP binding and fingers-thumb interactions. *J. Mol. Biol.* 366, 1459–74.
- Thompson, A.A., Peersen, O.B., 2004. Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *EMBO J.* 23, 3462–71.
- Towner, J.S., Ho, T. V, Semler, B.L., 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* 271, 26810–8.
- Toyoda, H., Franco, D., Fujita, K., Paul, A. V, Wimmer, E., 2007. Replication of poliovirus requires binding of the poly(rC) binding protein to the cloverleaf as well as to the adjacent C-rich spacer sequence between the cloverleaf and the internal ribosomal entry site. *J Virol* 81, 10017–10028.
- Van Dijk, A.A., Frilander, M., 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, 320–3.
- Van Dijk, A.A., Makeyev, E. V, Bamford, D.H., 2004. Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J. Gen. Virol.* 85, 1077–93.
- Van Kuppeveld, F.J., Galama, J.M., Zoll, J., van den Hurk, P.J., Melchers, W.J., 1996. Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. *J. Virol.* 70, 3876–86.
- Van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M., Melchers, W.J., 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J.* 16, 3519–32.
- Van Kuppeveld, F.J.M., Melchers, W.J.G., Willems, P.H.G.M., Gadella, T.W.J., 2002. Homomultimerization of the coxsackievirus 2B protein in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J. Virol.* 76, 9446–56.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Andino, R., 2005. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res.* 107, 173–181.
- Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., Bricogne, G., 2007. Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol. Biol.* 364, 215–30.

- Vucetic, S., Obradovic, Z., Vacic, V., Radivojac, P., Peng, K., Iakoucheva, L.M., Cortese, M.S., Lawson, J.D., Brown, C.J., Sikes, J.G., Newton, C.D., Dunker, A.K., 2005. DisProt: a database of protein disorder. *Bioinformatics* 21, 137–40.
- Walter, B.L., Parsley, T.B., Ehrenfeld, E., Semler, B.L., 2002. Distinct poly(rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication. *J. Virol.* 76, 12008–22.
- Wessels, E., Notebaart, R.A., Duijsings, D., Lanke, K., Vergeer, B., Melchers, W.J.G., van Kuppeveld, F.J.M., 2006. Structure-function analysis of the coxsackievirus protein 3A: identification of residues important for dimerization, viral rna replication, and transport inhibition. *J. Biol. Chem.* 281, 28232–43.
- Wessely, R., Klingel, K., Knowlton, K.U., Kandolf, R., 2001. Cardioselective infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation* 103, 756–61.
- Whetter, L.E., Day, S.P., Elroy-Stein, O., Brown, E.A., Lemon, S.M., 1994. Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J. Virol.* 68, 5253–63.
- Whitton, J.L., Cornell, C.T., Feuer, R., 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 765–76.
- Wiederstein, M., Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, W407–10.
- Wu, Y., Lou, Z., Miao, Y., Yu, Y., Dong, H., Peng, W., Bartlam, M., Li, X., Rao, Z., 2010. Structures of EV71 RNA-dependent RNA polymerase in complex with substrate and analogue provide a drug target against the hand-foot-and-mouth disease pandemic in China. *Protein Cell* 1, 491–500.
- Yamakawa, M., Furuichi, Y., Nakashima, K., LaFiandra, A.J., Shatkin, A.J., 1981. Excess synthesis of viral mRNA 5-terminal oligonucleotides by reovirus transcriptase. *J. Biol. Chem.* 256, 6507–14.
- Yang, X., Smidansky, E.D., Maksimchuk, K.R., Lum, D., Welch, J.L., Arnold, J.J., Cameron, C.E., Boehr, D.D., 2012. Motif D of viral RNA-dependent RNA polymerases determines efficiency and fidelity of nucleotide addition. *Structure* 20, 1519–27.

BIBLIOGRAFIA

- Yang, Y., Yi, M., Evans, D.J., Simmonds, P., Lemon, S.M., 2008. Identification of a conserved RNA replication element (cre) within the 3Dpol-coding sequence of hepatoviruses. *J Virol* 82, 10118–10128.
- Yap, T.L., Xu, T., Chen, Y.-L., Malet, H., Egloff, M.-P., Canard, B., Vasudevan, S.G., Lescar, J., 2007. Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. *J. Virol.* 81, 4753–4765.
- Zamyatkin, D.F., Parra, F., Alonso, J.M.M., Harki, D.A., Peterson, B.R., Grochulski, P., Ng, K.K.-S., 2008. Structural insights into mechanisms of catalysis and inhibition in Norwalk virus polymerase. *J. Biol. Chem.* 283, 7705–12.
- Zhu, S., Ge, X., Gong, X., Guo, X., Chen, Y., Yang, H., 2011. Alteration of encephalomyocarditis virus pathogenicity due to a mutation at position 100 of VP1. *Sci. China. Life Sci.* 54, 535–43.
- Zoll, J., Heus, H.A., van Kuppeveld, F.J., Melchers, W.J., 2009. The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Res* 139, 209–216.
- Zoll, J., Melchers, W.J.G., Galama, J.M.D., van Kuppeveld, F.J.M., 2002. The mengovirus leader protein suppresses alpha/beta interferon production by inhibition of the iron/ferritin-mediated activation of NF-kappa B. *J. Virol.* 76, 9664–72.

GLOSSARI

3D ^{pol}	Polimerasa 3D
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
ATP	Adenosina 5' trifosfat
BGM	Cèl·lules de ronyó de <i>Chlorocebus sabaesus</i>
BVDV	Virus de la diarrea bovina
C-terminal	Carboxil terminal
CRE	Element en <i>cis</i> de la replicació
CVB3	Virus Coxsackie B3
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat
DdDP	ADN polimerasa dependent d'ADN
DdRP	ARN polimerasa dependent d'ADN
DTT	Ditiotretiol
EDTA	Etilè di-amina tetracetat
eIF4G	Factor d'iniciació de la transcripció eucariòtica 4G
EMCV	Virus de l'encefalomiocarditis
EV71	Enterovirus 71
FMDV	Virus de la febre aftosa
FRET	Transferència d'energia de ressonància Förster/Fluorescència
FrhK-4	Cèl·lules de ronyó de fetus de <i>Macaca mulatta</i>
GuaHCl	Clorur de guanidini
HAV	Virus de l'hepatitis A
HCV	Virus de l'hepatitis C
HEV-C	Enterovirus humà C
HR	Regió hidrofòbica
HRV _x	Rhinovirus humà de serotip x
IFN-β	Interferó beta
IRF-3	Factor regulador 3 d'interferó
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosid
IRES	Lloc intern d'entrada del ribosoma
MAVS	Proteïna de senyalització antiviral del mitocondri
MDA-5	Gen 5 associat a la diferenciació de melanoma
MES	Àcid 2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfònic
MOI	Multiplicitat d'infecció

BIBLIOGRAFIA

NNI	Inhibidor no anàleg a nucleòsid
N- terminal	Amino terminal
NTP	Nucleòtid trifosfat
ORF	Pauta de lectura oberta
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDB	Base de dades de proteïnes
PV	Poliovirus
PEG	Polietilenglicol
RHDV	Virus de la malaltia hemorràgica dels conills
rNTP	Ribonucleòtid trifosfat
RIG-I	Gen induïble 1 de l'àcid retinoïc
RdDP	Polimerasa d'ADN dependent d'ARN
RdRP	Polimerasa d'ARN dependent d'ARN
SA	Sulfat amònic
SAFV	Virus Saffold
SDS	Dodecilsulfat
SeMet	Seleni-metionines
TBK1	Quinasa d'unió a <i>Tank</i>
TEV	Proteasa del virus jaspejat del Tabac
UTP	Uridina 5' trifosfat
UTR	Regió no traduïda
VPg	Proteïna del genoma víric

NOMENCLATURA AMINOÀCIDS

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