

ESTRUCTURA DE GRANS AGREGATS MOLECULARS: ESTUDIS COMBINATS DE CRISTAL·LOGRAFIA DE RAIGS X I MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

NÚRIA VERDAGUER¹, WENDY F. OCHOA¹, DIEFER BLAAS² I IGNACIO FITA¹

¹*Institut de Biologia Molecular de Barcelona (CSIC).*

²*Institut de Bioquímica. Facultat de Medicina. Universitat de Viena*

Adreça per a la correspondència: Ignacio Fita. Institut de Biologia Molecular de Barcelona (CSIC). Carrer de Jordi Girona Salgado, 18-26. 08034 Barcelona. Adreça electrònica: ifrcr@cid.csic.es.

RESUM

Els mapes de baixa resolució, obtinguts de les reconstruccions tridimensionals de les imatges de criomicroscòpia electrònica (crio-EM) dels grans agregats moleculars, poden combinar-se amb les estructures atòmiques dels seus components individuals, determinades per difracció de raigs X. La relació que hi ha entre les dues tècniques ha resultat ser una de les eines més poderoses de què disposem actualment per a interpretar imatges d'aquestes maquinàries macromoleculares en el context d'estructures d'alta resolució.

El modelatge dels complexos entre el rinovirus humà serotip 2 (HRV2) i els fragments Fab de dos anticossos neutralitzants, 8F5 i 3B10, en els mapes derivats de la microscòpia electrònica, ha permès d'establir els diferents patrons d'interacció que caracteritzen el reconeixement d'epítops lineals i conformacionals per a anticossos dirigits contra el lloc antigènic B del virus.

ABSTRACT

The low resolution cryo-electron microscopy (crio-EM) maps of large macromolecular assemblies can be combined with the atomic structures of their isolated components determined by x-ray crystallography. The interplay between both techniques results in one of the most powerful tools, actually available, to interpret low resolution snapshots of complex macromolecular machines in the context of high resolution structures.

The fitting of the complexes between human rhinovirus 2 (HRV2) and the Fab fragments

of the neutralising antibodies 3B10 and 8F5, in the crio-EM reconstructed density, allowed to define the different pattern of interactions which characterise the recognitions mechanisms of lineal and conformational epitopes by antibodies directed against the virus antigenic site B.

INTRODUCCIÓ

El desenvolupament de la virologia estructural ha estat espectacular en els darrers cinc anys. Això es deu principalment a dos fets: a) l'increment en l'ús de diverses aproximacions a l'estudi de grans estructures, especialment pel que fa a la interrelació entre la difracció de raigs X, i la microscòpia electrònica, i b) l'augment del nombre d'estudis enfocats a provar com funcionen aquests complexos macromoleculars a partir de correlacionar els diferents estudis bioquímics i biofísics. Aquest desenvolupament s'ha concretat en la determinació a nivell atòmic d'estructures de virus i pseudopartícules víriques no infectives cada cop més grans i complexes. Les estructures de càpsides de virus resoltes darrerament a alta resolució amb cristallografia de raigs X ens han mostrat nous tipus de plegaments per a les proteïnes de les càpsides, que difereixen completament del clàssic motiu en β -sandwich. Aquests nous tipus de plegament s'han trobat a les estructures recents, ja sigui com a subunitats independents, com el plegament α -helicoidal de les subunitats que formen el *core* del virus de l'hepatitis B o l'estructura de la capa interna del *core* del virus de la «llengua blava» (Grimes *et al.*, 1998), o com un domini fusionat al β -sandwich clàssic, tal com s'ha trobat a l'estructura del virus Norwalk (Prasad *et al.*, 1999). Són importants, també, els avenços assolits en la determinació d'estructures que mostren una part important del material genòmic ordenat a l'interior dels virions (Gouet *et al.*, 1999). Finalment, l'ús de les tècniques de criomicroscòpia electrònica (crio-EM) i re-

construcció tridimensional d'imatges de partícules aïllades, obre un nou camí per a respondre problemes biològics amb un detall estructural raonable per a l'estudi de partícules que no poden ser cristallitzades. Un dels aspectes més remarcables del desenvolupament de la crio-EM és la consistència entre els mapes que provenen de les reconstruccions 3D i les estructures de raigs X. La reconstrucció tridimensional d'objectes no cristallins immersos en una solució vitrificada permet obtenir mapes 3D compatibles amb els mapes derivats de les estructures que provenen de la difracció de raigs X. La resolució d'aquests mapes és encara limitada (15-30 Å, a causa de l'elevat grau de subenfocament necessari per a obtenir un contrast adient en les imatges) però és suficient per a posicionar les estructures atòmiques dels diferents dominis i subunitats. El desenvolupament de programari per a fer les superposicions de les estructures atòmiques en els mapes crio-EM és una àrea d'estudi que actualment es troba en plena activitat (Rossmann, 2000; Saibil, 2000).

L'estratègia d'aïllar, cristallitzar i determinar l'estructura dels diferents components d'un complex macromolecular, i combinar després les estructures per a formar un model del complex d'acord amb els mapes 3D obtinguts de les reconstruccions de crio-EM s'ha aplicat amb gran èxit a la resolució de les estructures de diferents partícules víriques en complex amb receptors i anticossos neutralitzants. La visualització dels receptors cel·lulars en complex amb rhinovirus del grup major (Kolatkar *et al.*, 1999), poliovirus (He *et al.*, 2000; Xing *et al.*, 2000) i coxsackievirus (He *et al.*, 2001) ha revelat

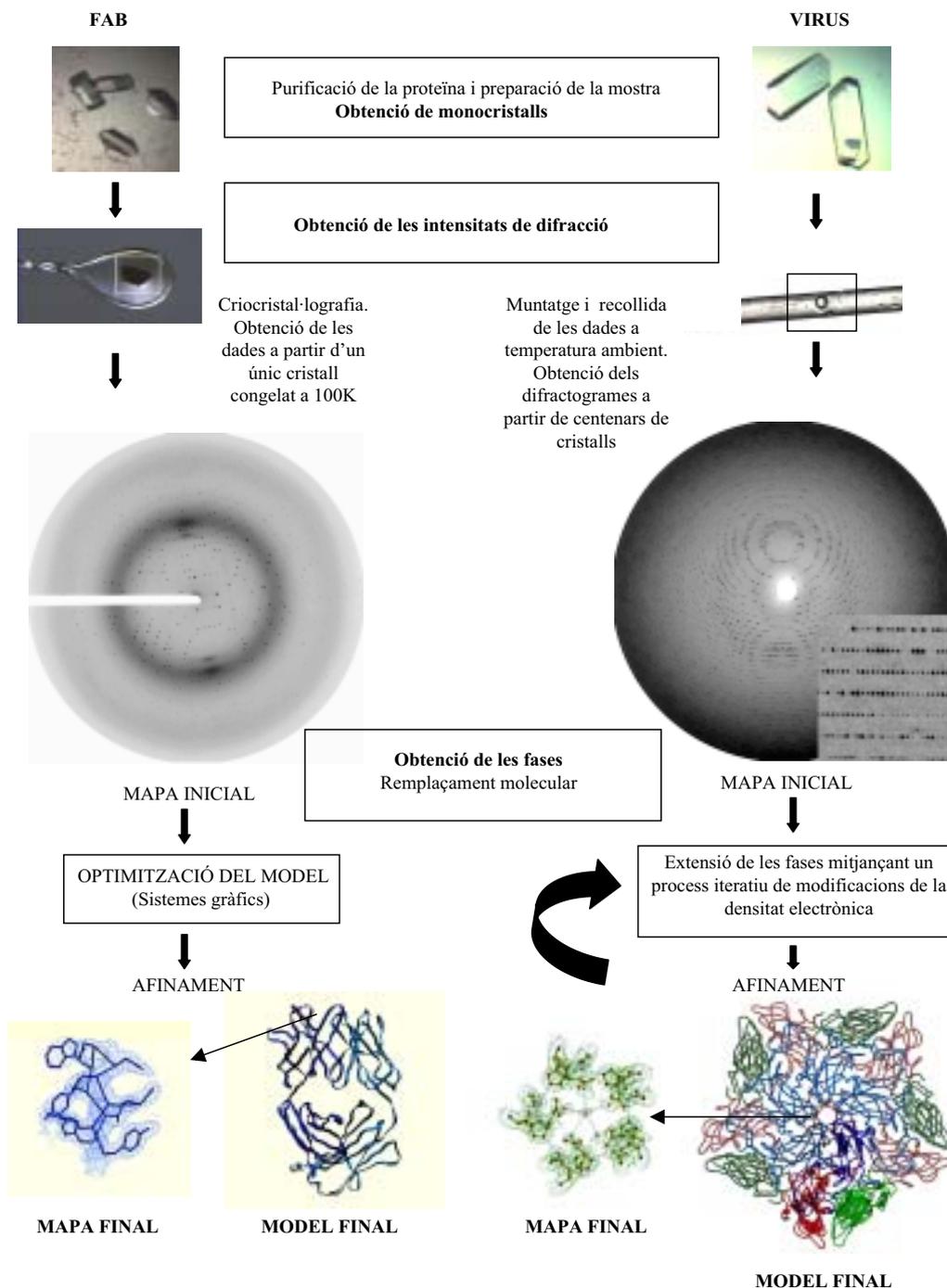


FIGURA 1. Diagrama del procediment que cal seguir per a la determinació d'una estructura cristal·logràfica.

com receptors diferents s' uneixen de manera diferent en depressions semblants a la superfície de les partícules i, excepcionalment, com un receptor s' uneix a una regió completament exposada a la superfície d' un rhinovirus de grup menor (Hewat *et al.*, 2000). A més, la resolució de diferents estructures de complexos virus-anticossos ha permès localitzar els epítops, definir les diferents propietats de neutralització sobre la base de les orientacions relatives dels fragments Fab units a les càpsides, i també identificar els residus involucrats en contacte entre les dues molècules (Smith *et al.*, 1993; Hewat *et al.*, 1996, 1997, 1998; Verdaguer *et al.*, 1999).

En aquesta comunicació es presentarà esquemàticament la metodologia emprada per a l'obtenció de models estructurals d'aquests grans agregats moleculars per combinació de Crio-EM i cristal·lografia de raigs X, fent servir com a exemple la determinació de l'estructura del virus del refredat comú de tipus 2 (HRV2) en complex amb dos anticossos monoclonals, 8F5 i 3B10, dirigits contra el lloc antigènic B del virus (Verdaguer *et al.*, 2000), i que presenten diferents propietats de neutralització. L'anticòs 8F5 reconeix un epítoc continu que es localitza en el llaç antigènic E-F de la proteïna VP2 del virus. L'anticòs s' uneix de manera bivalent a la superfície de HRV2 a través dels eixos binaris de la partícula, fet que suggereix un mecanisme de neutralització basat a impedir el desacoblament del virus (Tormo *et al.*, 1994; Hewat & Blaas, 1996). L'anticòs 3B10, en canvi, reconeix un epítoc conformacional que inclou residus de les proteïnes víriques VP1 i VP2. A banda, 3B10 s' uneix a la superfície de HRV2 en una orientació que només és compatible amb la unió monovalent de l'anticòs. Aquesta observació dona suport a les anàlisis bioquímiques que mostren que 3B10 neutralitza la infectivitat de HRV2 per agregació de les partícules víriques (Hewat *et al.*, 1998).

DETERMINACIÓ DE L'ESTRUCTURA DELS COMPLEXOS HRV2-8F5 I HRV2-3B10

Per a abordar l'estudi dels complexos HRV2-8F5 i HRV2-3B10 combinant les tècniques de difracció de raigs X i crio-EM és necessari: *a)* resoldre les estructures cristal·logràfiques dels diferents components aïllats –el virus HRV2 i els fragments Fab dels anticossos 8F5 i 3B10–, i *b)* obtenir la reconstrucció tridimensional dels complexos virus-Fab o virus-anticòs fent servir crio-EM (figures 1-3).

a) Determinació de les estructures cristal·logràfiques

L'obtenció de cristalls tridimensionals adients per a la difracció és un pas clau en la cristal·lografia. Per a aconseguir-ho és necessari obtenir les proteïnes amb un alt grau de puresa. Els fragments Fab es van obtenir a partir de líquid ascític de ratolí i es van purificar mitjançant diferents passos cromatogràfics (Tormo *et al.*, 1994 ; Ochoa *et al.*, en preparació); i el virus es va obtenir a partir de cultius cel·lulars infectats i es va purificar per ultracentrifugació en gradients de sacarina (Verdaguer *et al.*, 1999).

Un cop obtinguts els cristalls, s'ha de procedir a la recollida de les intensitats de difracció. La possibilitat de congelar els cristalls de 8F5 i 3B10 a temperatures de nitrogen líquid i la utilització de radiació de sincrotró va permetre obtenir dades completes a partir d'un sol cristall de cada anticòs. En el virus, en canvi, no es van poder aplicar les tècniques de criocristal·lografia i les dades de difracció es van obtenir a partir de quasi un centenar de cristalls, muntats en capil·lars, i irradiats a temperatura ambient (figura 1).

La determinació de les estructures, tant del virus com dels fragments Fab, s'ha fet per reemplaçament molecular d'un model

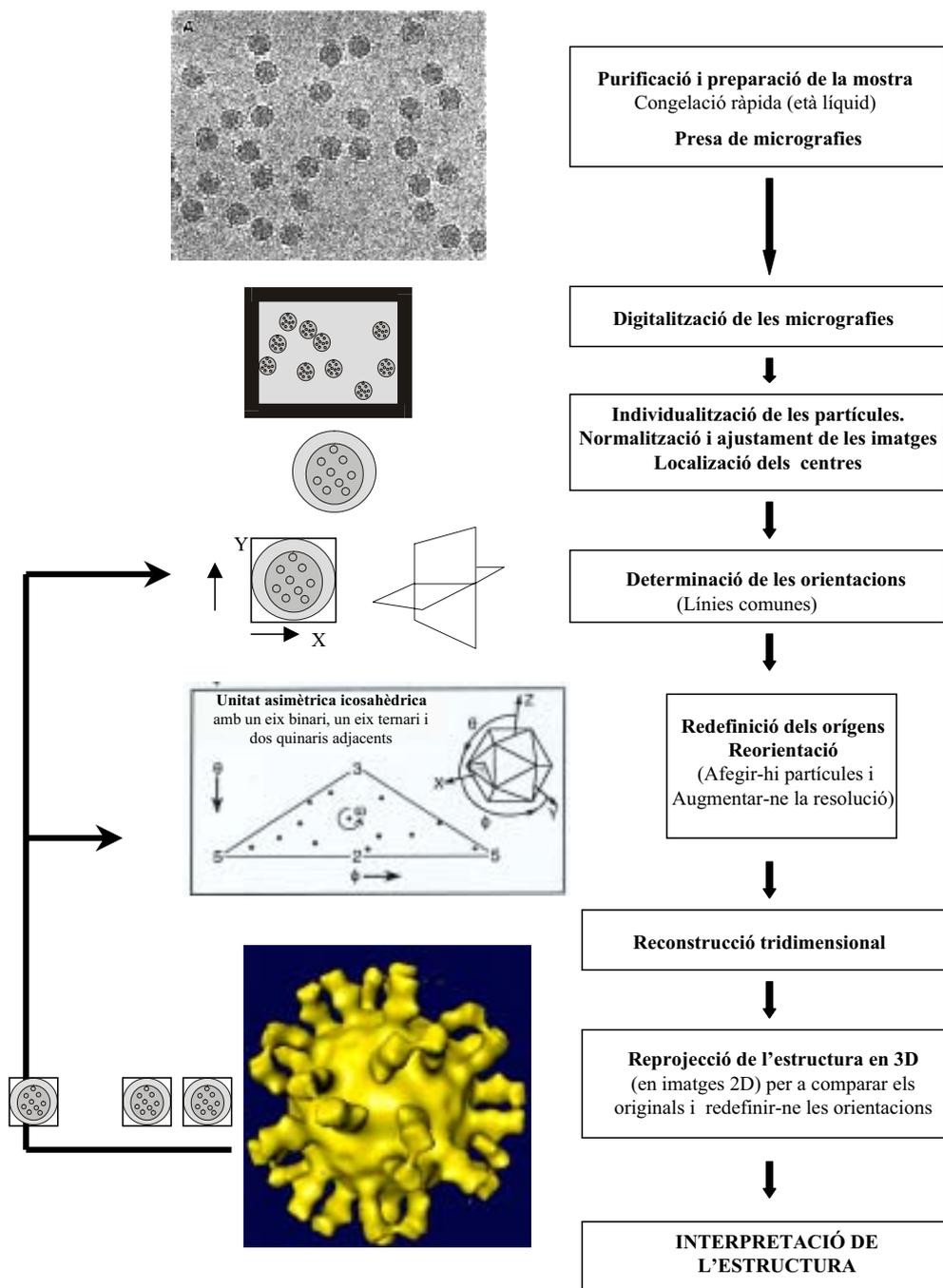


FIGURA 2. Diagrama del procediment que se segueix en la reconstrucció tridimensional de partícules icosaèdriques a partir d'imatges de crioelectromicroscòpia.

d'estructura coneguda (Tormo *et al.*, 1994; Verdaguer *et al.*, 2000; Ochoa *et al.*, en preparació). La resolució del virus HRV2 presentava algunes peculiaritats: les fases inicials a baixa resolució (5 Å) es van calcular a partir del posicionament de les coordenades d'un altre rinovirus, HRV1A (Kim *et al.*, 1989), a la cella de HRV2 que presentava la simetria del grup espacial I222, on la partícula icosaèdrica s'orientava seguint els eixos binaris cristal·logràfics. L'afinament i extensió de fases es va fer amb un procés iteratiu de modificació de la densitat electrònica per aplanament del solvent desordenat i aplicant les restriccions de la simetria icosaèdrica del virus (figura 1). Els mapes de densitat electrònica obtinguts mitjançant aquest procés van permetre de reconstruir l'estructura sencera de HRV2.

Els models finals s'obtenen a partir de cicles d'afinament per minimització d'energia que s'alternen amb processos de reconstrucció manual de parts de l'estructures que s'han de retocar per a ajustar-les a la densitat electrònica experimental.

b) Obtenció i reconstrucció d'imatges de criomicroscòpia electrònica

La preparació de la mostra és força més senzilla que en el cas de la cristal·lografia, ja que no és necessari obtenir cristalls; malgrat tot, també es requereix un alt grau de puresa de les mostres. Per a formar el complex s'incuba el virus amb l'anticòs en excés, durant una hora, per a assegurar la saturació dels llocs antigènics. Posteriorment s'elimina l'excés d'anticòs amb una cromatografia d'exclusió molecular. Es col·loca la solució en una reixeta del microscopi recoberta de carbó i es congela ràpidament en età líquid. amb aquest procés s'aconsegueix la vitrificació de la mostra, i així se'n manté l'estat natiu hidratat i, a la vegada, es prevenen els danys per irradiació del feix d'electrons. Durant tot

l'experiment la mostra es mantindrà a temperatura de nitrogen líquid (100 K) i en condicions de buit dins del microscopi.

La base de la formació de la imatge en microscòpia electrònica és la interacció dels electrons amb l'objecte. Les lents electromagnètiques realitzen la funció de les lents òptiques del microscopi convencional, encara que presenten diverses aberracions esfèriques i cromàtiques: l'astigmatisme, coherència posicional, etc., que obliguen a treballar amb obertures petites. Això limita la resolució del microscopi electrònic a 1-2 Å, tot i que es treballa a longituds d'ona de 0,025 Å. La mida petita de l'obertura té conseqüències importants a l'hora de determinar les estructures tridimensionals, i això dóna lloc a una gran profunditat de camp, que fa que totes les parts d'una mostra estiguin en el mateix focus. Això significa que la imatge d'una preparació biològica prima, és una projecció bidimensional, i no una secció òptica. La densitat tridimensional completa s'obté a partir d'un gran nombre de projeccions que corresponen a les diferents vistes de l'objecte.

Un cop preses les imatges, les micrografies es digitalitzen i s'analitzen amb mètodes informàtics. El procés de reconstrucció requereix, en primer lloc, la determinació de les diferents orientacions de les molècules individuals que s'inclouran a l'anàlisi (figura 2). El mètode de les línies comunes permet de determinar les orientacions relatives a partir de les línies comunes que presenten necessàriament els plànols corresponents a les transformades de Fourier de les diferents projeccions. En partícules icosaèdriques, la simetria de la mateixa partícula redueix considerablement el nombre de projeccions necessàries per a la reconstrucció tridimensional a una determinada resolució.

Un altre aspecte important en la crio-EM és el contrast, especialment crític en l'anàlisi

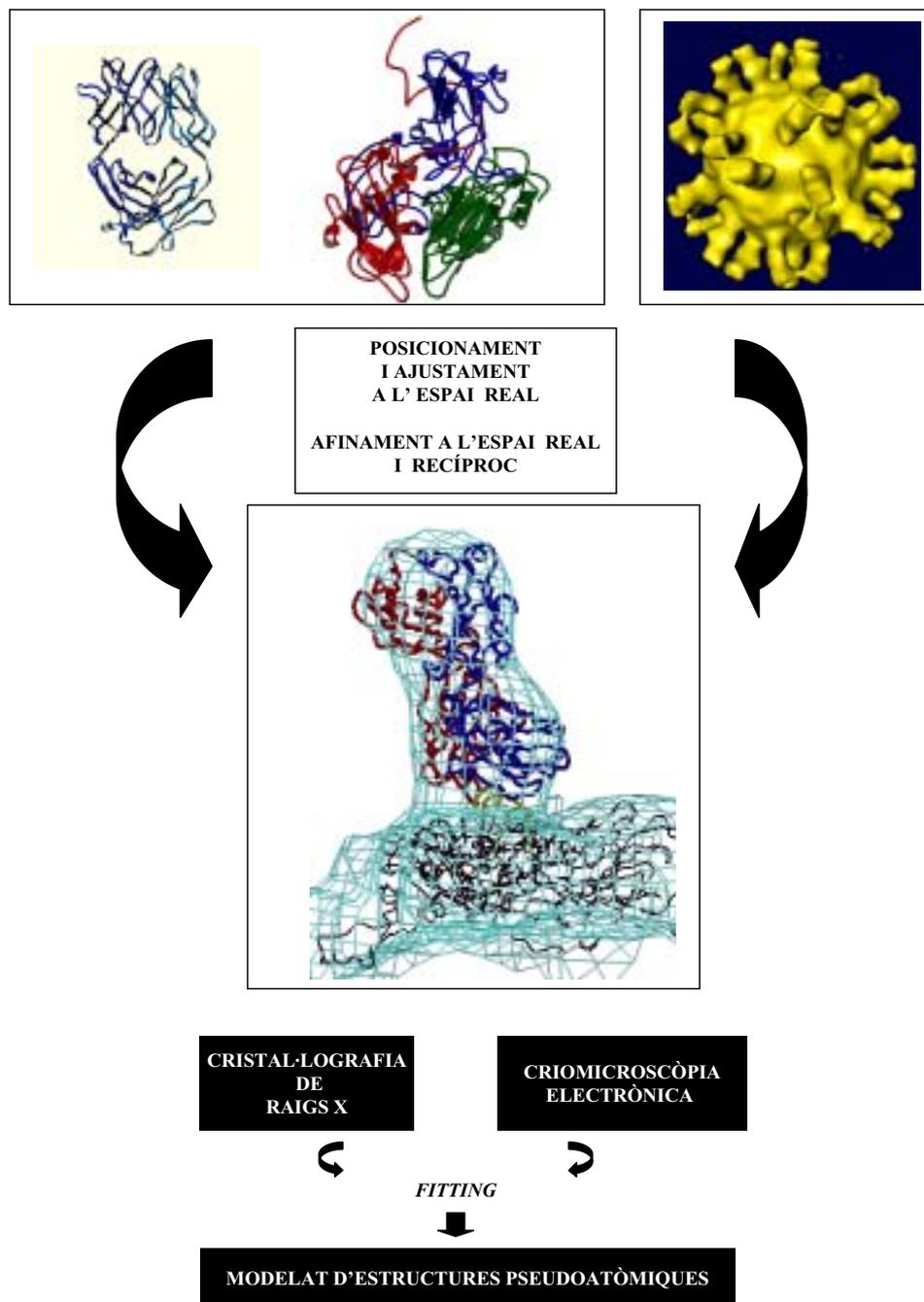


FIGURA 3. Diagrama del procediment que cal seguir per a modelar les estructures de complexos virus-Fab partint dels mapes obtinguts a partir de les coordenades cristal·logràfiques dels diferents components (virus i Fab) en els mapes tridimensionals de la microscòpia.

de partícules aïllades on hi hagi molt poca diferència de dispersió entre les macromolècules i el gel. Amb la finalitat d'augmentar-ne el contrast i poder visualitzar l'objecte d'estudi és necessari obtenir les imatges fora de focus. Treballar fora de focus permet també alterar la funció de contrast de transferència (CTF), que ha de ser corregida en les anàlisis de mitjana i alta resolució. La pèrdua d'informació a conseqüència d'aquesta correcció es resol a força de recollir diferents conjunts d'imatges a diferents valors de focus i de combinar la informació obtinguda. La utilització de microscopis cada cop més potents i coherents, com el Field Emission Gun (FEG), suposen un avenç important, encara que car, en l'augment de la resolució de la microscòpia electrònica.

Un cop coneguts els paràmetres d'orientació de les partícules, les imatges es combinen per a obtenir un mapa de densitat electrònica tridimensional que es refina amb la comparació i la combinació amb noves imatges. Cada una es compara un altre cop amb el mapa, i això dóna lloc a un procés iteratiu d'afinament que optimitza els paràmetres i millora el mapa de densitat (figura 2).

Finalment, les estructures a alta resolució dels components del complex, virus i Fab, obtinguts per cristal·lografia (figura 1), s'ajustaran als mapes de baixa resolució obtinguts del complex amb crio-EM (figura 2). L'ajustament inicial es fa a l'espai real mitjançant programes gràfics, i encaixant manualment els diferents components dins del mapa. Aquest primer model després s'optimitzarà amb un procés d'afinament de cos rígid a l'espai real o recíproc (figura 3; Rossmann *et al.*, 2000).

CONCLUSIONS

La combinació de les tècniques de crio-microscòpia electrònica i cristal·lografia de raigs X, permet obtenir informació estructu-

ral a resolució quasi atòmica de grans agregats moleculars difícilment cristallitzables.

L'aplicació d'aquestes tècniques al nostre laboratori ha permès la determinació de l'estructura de complexos entre el virus del refredat comú, HRV2, i dos anticossos amb diferents propietats neutralitzants, que reconeixen dos tipus diferents d'epítops: el 3B10 s'uneix a un epítop estructural, i el 8F5 reconeix un epítop lineal, dintre del mateix lloc antigènic B del virus. El modelatge d'ambdós complexos amb la utilització de mapes crio-EM ha permès de definir les interaccions que caracteritzen els dos tipus de reconeixement:

a) La unió de l'anticòs 3B10 a la càpsida de HRV2 es dóna per mitjà de contactes amb cadenes laterals d'aminoàcids que es localitzen en diferents llaços de les proteïnes VP1 i, majoritàriament, dins de VP2 al virus (figura 4a i 4b). Aquest reconeixement pot donar-se sense que hi hagi cap canvi conformacional important a la superfície de HRV2.

b) El reconeixement de HRV2 fet per l'anticòs 8F5 es dóna exclusivament per contactes directes amb el llaç E-F de VP2. En el complex 8F5-HRV2, el llaç E-F, presenta una conformació i disposició espacial completament diferents de la que es va determinar a l'estructura nativa del virus (figura 4c i 4d).

AGRAÏMENTS

Les dades de difracció del virus HRV2 i de l'anticòs 3B10 s'han recollit a l'ESRF (Grenoble)

Agraïm a Elizabeth Hewat els mapes de crio-EM dels complexos HRV2-8F5 i HRV2-3B10.

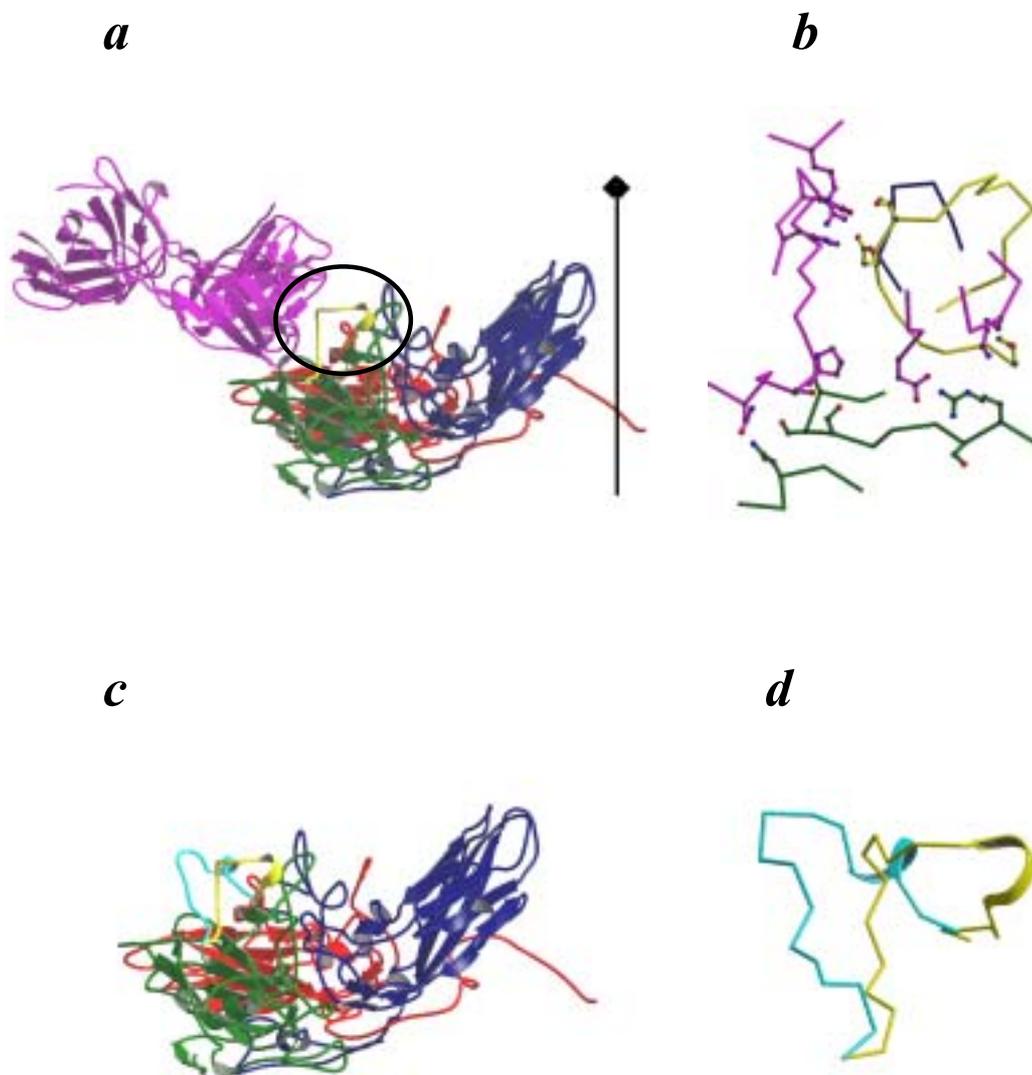


FIGURA 4. *a*) Estructura dels complexos HRV2-3B10. Les tres proteïnes del virus es mostren en el codi de colors estàndard: VP1 (blau), VP2 (verd) i VP3 (vermell). 3B10 (rosa) interactua amb HRV2 mitjançant contactes que es donen amb residus de diferents llaços de VP2 i VP1. *b*) Ampliació de la zona de contacte, on es mostra el detall de les interaccions. *c*) Diferents posicions del llaç E-F de VP2 en l'estructura del virus natiu (groc) i quan és reconegut per l'anticòs 8F5 (blau cel). *d*) Detall de la superposició dels dos llaços E-F.

BIBLIOGRAFIA

GOUET, P.; J. M. DIPROSE; J. M. GRIMES; J. N. BURROUGHS; S. ZIENTARA; D. I. STUAT; P. P. MERTENS (1999). «The

highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography». *Cell*, núm. 97, pàg. 481-490.
GRIMES, J. M.; J. N. BURROUGHS; P. GOUET; J. M. DIPROSE; R. MALBY; S. ZIENTARA; P. P. MERTENS; D. I. STUAT (1998).

- «The atomic structure of the bluetongue virus core». *Nature*, núm. 395, pàg. 470-478.
- HE, Y.; B. D. BOWMAN; S. MUELLER; C. M. BATOR; J. BELLA; X. PENG; T. BAKER; E. WIMMER; R. J. KUHN; M. G. ROSSMANN (2000). «Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 97, pàg. 79-84.
- HE, Y.; P. R. CHIPMAN; J. HOWITT; C. M. BATOR; M. A. WHITT; T. S. BAKET; R. J. KUHN; C. W. ANDERSON; P. FREIMUTH; M. G. ROSSMANN (2001). «Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor». *Nature Struc. Biol.*, núm. 8, pàg. 874-878.
- HEWAT, E. A.; D. BLAAS (1996). «Structure of a neutralising antibody bound bivalently to human rhinovirus 2». *EMBO J.*, núm. 15, pàg. 1515-1523.
- HEWAT, E. A.; N. VERDAGUER; I. FITA; W. BLAKEMORE; S. BROOKES; A. KING; J. NEWMAN; E. DOMINGO; M. G. MATEU; D. STUART (1997). «Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop». *EMBO J.*, núm. 16, pàg. 1492-1500.
- HEWAT, E. A.; T. C. MARLOVITS; D. BLAAS (1998). «Structure of a neutralizing antibody bound monovalently to human rhinovirus 2». *J. Virol.*, núm. 72, pàg. 4396-4402.
- HEWAT, E. A.; E. NEWMANN; J. F. CONWAY; R. MOSER; T. C. MARLOVITS; D. BLAAS (2000). «The cellular receptor to human rhinovirus 2 bonds around the 5-fold axis and not in the canyon : a structural view». *EMBO J.*, núm. 19, pàg. 6317-6325.
- KIM, S.; M. A. MCKINLAY (1989). «Crystal structure of human rhinovirus serotype-1A (HRV1A)». *J. Mol. Biol.*, núm. 210, pàg. 91-111.
- KOLATKAR, P. R.; J. BELLA; N. H. OLSON; C. M. BATOR; T. S. BAKER; M. G. ROSSMANN (1999). «Structure of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor». *EMBO J.*, núm. 18, pàg. 6249-6259.
- PRASAD, B. V.; M. E. HARDY; T. DOKLAND; J. BELLA; M. G. ROSSMANN; M. K. ESTES (1999). «X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid». *Science*, núm. 286, pàg. 287-290.
- ROSSMANN, M. G. (2000). «Fitting atomic models into electron-microscopy maps». *Acta Crystallogr. D.*, núm. 56, pàg. 1341-1349.
- SAIBIL, H. R. (2000). «Conformational changes studied by cryo-electron microscopy». *Nature Struc. Biol.*, núm. 7, pàg. 711-714.
- SMITH, T. J.; N. H. OLSON; R. H. CHENG; E. S. CHASE; T. S. BAKER (1993). «Structure of a human rhinovirus-bivalently bound antibody complex: Implications for viral neutralisation and antibody flexibility». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 7015-7018.
- TORMO, J.; D. BLAAS; N. R. PARRY; D. ROWLANDS; D. STUART; I. FITA (1994). «Crystal structure of a human rhinovirus neutralising antibody complexed with a peptide derived from viral capsid protein VP2». *EMBO J.*, núm. 13, pàg. 2247-2256.
- VERDAGUER, N.; G. SCHOEHN; W. F. OCHOA; I. FITA; S. BROOKES; A. KING; E. DOMINGO; M. G. MATEU; D. STUART, D.; A. HEWAT (1999a). «Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to an Fab fragment of a neutralising antibody: Structure and Neutralisation». *Virology*, núm. 255, pàg. 260-268.
- VERDAGUER, N.; T. C. MARLOVITS; J. BRAVO; D. I. STUART; D. BLAAS; I. FITA (1999b). «Crystallisation and preliminary X-ray analysis of human rhinovirus serotype 2 (HRV2)». *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, núm. 55, pàg. 1459-1461.
- VERDAGUER, N.; D. BLAAS; I. FITA (2000). «Structure of Human Rhinovirus serotype 2 (HRV2)». *J. Mol. Biol.*, núm. 300, pàg. 1179-1194.
- XING, L.; K. TJARLUND; B. LINDQVIST; G. G. KAPLAN; D. FEIGELSTOCK; R. H. CHENG; J. M. CASASNOVAS (2000). «Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses». *EMBO J.*, núm. 19, pàg. 1207-1216.