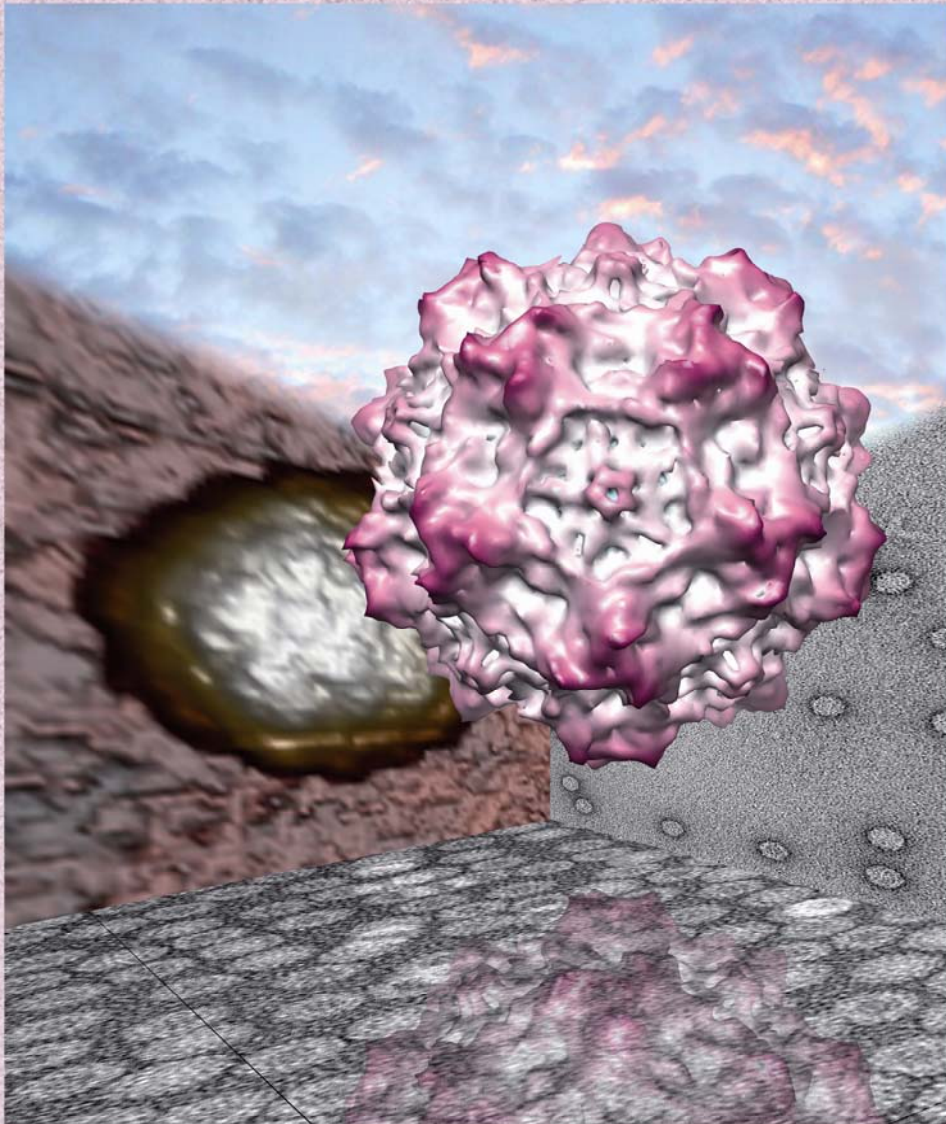


Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

***ANÁLISIS MUTACIONAL DE
PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y
MECÁNICAS DEL VIRUS DIMINUTO
DEL RATÓN, Y DE SUS
IMPLICACIONES BIOLÓGICAS***

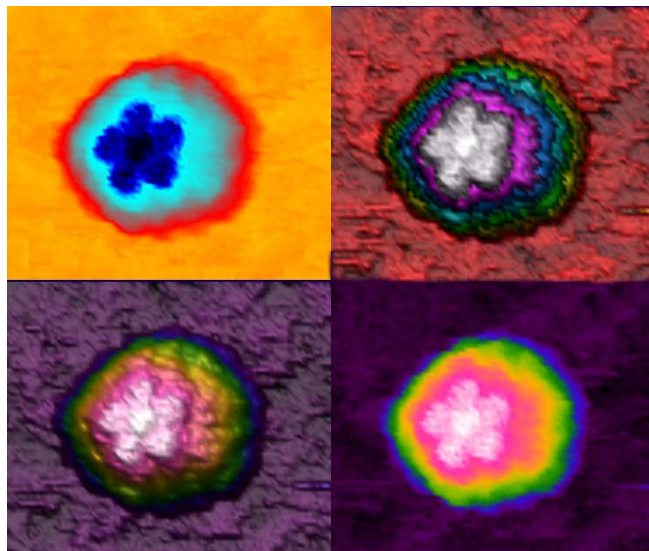


TESIS DOCTORAL

Milagros Castellanos Molina
Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

***ANÁLISIS MUTACIONAL DE PROPIEDADES
ESTRUCTURALES Y MECÁNICAS
DEL VIRUS DIMINUTO DEL RATÓN, Y DE SUS
IMPLICACIONES BIOLÓGICAS***



TESIS DOCTORAL
MILAGROS CASTELLANOS MOLINA
Madrid, 2011

Memoria presentada por Milagros Castellanos Molina para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Junio de 2011.

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” bajo la dirección del Profesor Mauricio García Mateu. Para su realización se ha contado con un contrato de Personal Investigador de Apoyo de la Comunidad de Madrid.

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no habría sido posible sin la ayuda y participación de numerosas personas, a las cuales quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a continuación.

A Mauricio García Mateu, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en tu grupo, por integrarme plenamente en tu proyecto científico, por dejar que yo explore y poder contar siempre con tu excelente ayuda y supervisión. Has confiado en mí todos estos años y me has enseñado el oficio de buen científico, en el que eres maestro. Por todo el saber hacer, el entusiasmo, el esfuerzo, la paciencia y todos los conocimientos transmitidos en tantas y tan prolíficas discusiones, por hacerme pensar y madurar: gracias.

Este trabajo es el resultado de una estrecha colaboración con varios investigadores de nuestro grupo y de otros, que han realizado contribuciones fundamentales. El profesor José María Almendral, y los Dres. Laura Riobos, Esther Grueso y Alberto López Bueno, miembros de su equipo en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, nos cedieron materiales imprescindibles, me enseñaron diferentes metodologías para el trabajo con MVM, me ayudaron en la resolución de problemas técnicos y ampliaron mis conocimientos sobre la biología de este virus. Una parte del trabajo descrito en esta memoria se ha realizado en colaboración con ellos. Pepe, muchas gracias por tu ayuda. Laura y Esther, gracias por tener siempre tiempo y ganas de aclarar mis dudas con MVM y ayudarme. Alberto, hoy por hoy seguimos discutiendo de experimentos por los pasillos del CBM. Me alegro de haberte conocido, te deseo lo mejor.

El trabajo sobre mecánica de virus, parte fundamental de esta Tesis, se ha realizado en colaboración con el Dr. Pedro de Pablo, el Prof. Julio Gómez Herrero, la Dra. Carolina Carrasco y Mercedes Hernando del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad Autónoma de Madrid. El Dr. de Pablo inició el estudio de propiedades mecánicas de virus, promovió nuestra colaboración con su equipo, y ha supervisado los aspectos físicos de este estudio. Pedro, todo un carácter y muy buen científico. Me alegro de que la vida de nuevo te sonría. Tienes el valor de perseguir tus ideas con ingenio y perseverancia. Espero que podamos seguir colaborando en el futuro. El Prof. Gómez Herrero cedió generosamente la parte mecánica del AFM que utilizamos para las medidas y ha apoyado de diversas formas este trabajo. Julio, me ayudaste en los primeros meses de contrato. Siempre has estado dispuesto a ofrecernos tus valiosos recursos e ideas. Eres un gran entusiasta. Gracias por acompañarnos en todo el estudio de la mecánica de virus, que espero continúe muchos años, contando por supuesto contigo. La Dra. Carrasco obtuvo en

colaboración con nosotros parte de los resultados que se describen en esta memoria; ella y Mercedes Hernando nos enseñaron con maestría y paciencia a utilizar el AFM. Carolina, tu participación y ayuda han sido fundamentales. Excelente física y mejor persona, agradezco haberte conocido. Me has llevado a pasear por la interfase entre la biología y la física, me has ayudado siempre, me has enseñado a utilizar el AFM y mucho más, y te estaré siempre enormemente agradecida. Buena amiga, compañera, cuenta siempre conmigo y ¡que te vaya bonito!. Merche, qué gran persona. Contigo también he aprendido muchísimo de AFM y te has dejado la piel por ayudarnos, siempre con tan buen talante y tan positiva. Gracias por todo, nos vemos por el camino.

Dentro de nuestro propio grupo, he recibido valiosas ayudas de todos y cada uno de sus miembros. Pero debo destacar muy especialmente la ayuda experimental de la Dra. Rebeca Pérez y de Alicia Rodríguez Huete. Una parte importante de los resultados conseguidos mediante AFM han sido obtenidos por un equipo estrechamente coordinado que formamos la Dra. Pérez y yo. Rebeca, aunque creo que comenzamos desde cierta distancia, lo que hemos compartido nos ha acercado y me ha enriquecido como persona y como trabajadora. Te agradezco enormemente todo lo que me has ayudado en gran parte de este trabajo. Para nosotras se queden los “penares” del AFM, y de muchas cosas más, jeje. Te deseo lo mejor en tu próxima etapa, a ser posible en Valladolid o alrededores, claro!. Alicia Rodríguez participó al principio de este trabajo en diferentes aspectos técnicos del mismo, y con su gran experiencia de laboratorio fue la persona clave en la resolución de algunos problemas difíciles con los que nos encontramos. Alicia, siempre dispuesta a brindarte su ayuda, su sonrisa, sus bizcochos de plátano... Gracias por darle al laboratorio ese punto desenfadado de la vida, que a veces se nos escapa. También por tu bondad. Me sacaste de un buen aprieto con lo del subclonaje, sin ti no podría haber comenzado este trabajo.

Al personal del laboratorio del Prof. Antonio Alcamí le agradezco su ayuda con baculovirus. Al de los laboratorios de los Profs. Esteban Domingo y Luis Menéndez, sus múltiples ayudas y las buenas amistades. Algunas de las técnicas llevadas a cabo en este trabajo han requerido de la participación de personal de diversos laboratorios y servicios del CBM: Cultivos, Microscopía Electrónica, Microscopía Óptica y Confocal, Instrumentación, Informática, Animalario, etc. Alfonso, gracias por tu simpatía, tu ayuda y tus caramelos!. A M^a Ángeles y Anuncia por trabajar duro, pendientes de nosotros. A Mercedes, por tu amistad y tu tesón. A la Dra. Maite Rejas, por enseñarme. A Milagros Guerra, por ayudarme. Al personal del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal, por estar siempre dispuestos a sacar de tu trabajo lo mejor. Al Servicio de instrumentación, por ayudarnos a salir de muchos aprietos. Cómo no, al Servicio de

Informática del centro, en especial a Carlos. Siempre dispuesto a echarnos una mano con los MACs, eres ante todo un buen amigo. Espero que pronto nos volvamos a encontrar. En definitiva, muchas gracias a todos los que me han ayudado en la realización de este trabajo.

Cuando entré en este laboratorio me sentí muy bien recibida por todos los que entonces trabajaban allí. Me apoyaron y me enseñaron muchas cosas valiosas...nos reímos bastante también!. Aura y Juan: fue breve el tiempo que compartimos, pero juntos me abristeis el camino hacia MVM y me ayudasteis en los comienzos. Eva, una chica sin igual, te deseo lo mejor. Marta y Rober, mis primeros amigos en el CBM. Todos los comienzos son algo inciertos, pero en mi caso estoy agradecida de haberlos compartido con vosotros. Vivimos momentos muy felices. He podido contar con vosotros en todos los sentidos, aquí y al otro lado del charco. Espero que pronto nos volvamos a reencontrar. Sergio, buen amigo, te espero también.

Poco a poco el laboratorio fue creciendo. Rebeca Bocanegra: cuanto te voy a echar de menos!. Tu cercanía, generosidad, compañerismo, amistad...el "*boogie-boogie*" de los viernes, y que las dos somos un poco *freaks* (no nos vamos a engañar...) nos han unido a lo largo de estos años. Eres una gran persona, cuento contigo y con David. Verónica Rincón, una chiquilla tímida que se ha ganado el corazón de todos. Gracias por tu amistad, por ser tan valiente, tan dulce y tan sabia. Me has enseñado lecciones muy valiosas, a veces sin necesidad de decir nada. Aquí tienes una amiga. Pablito, el "chico nuevo", el que no ha dudado en llamarnos "brujas" si alguna vez (rara vez...) nos lo hemos merecido. Ánimo con la tesis, que ya has visto que el AFM a partir de las 17 h funciona!... gracias por ser tan divertido, por tratar de animar siempre al personal. Espero que la ciencia y tú os tratéis bien. Cuentas con mi ayuda. Inma, aunque por poco tiempo, tu paso por el laboratorio nos ha hecho compartir muy buenos momentos. Eres honesta, cercana, buena... y con ese sentido del humor con el que tanto me río!. Gracias por mostrarme tu apoyo si has visto que he necesitado un buen consejo. Ya tienes tu tesis, la familia crece y espero estar ahí para compartir nuevos logros. Miguel Ángel, todo lo mejor.

Otras personas que me han acompañado estos años son: Fran, lo más grande de él: su corazón. Te echaremos de menos por aquí, pero espero que nos veamos algún día por Madrid o por Galicia. Te preocupaste mucho por mí, y eso lo valoro. Nos echamos unas risas también!. Un beso y mucha suerte. Alex, Álvaro, David, Santiago: gracias por todo. A Celia, Tania, Ana, Mar, Vero, Ali, Marta, Armando, Rubén... una suerte el haberos encontrado. Hemos pasado juntos algunos de los mejores años, me acogisteis en vuestra gran familia, a todos os debo algo. Desde el principio hemos compartido muchos, y siempre buenos momentos. A veces echo de menos nuestros

“juergues”, lo recuerdo y me escapa la sonrisa. Espero teneros cerca, no cambiéis nunca!.

No puedo olvidarme del grupo de Agustín Zapata, y concretamente del grupo de Luis Miguel Alonso. Fue allí en la Complutense donde por primera vez trabajé en un laboratorio. Fueron muchas ratonas gestantes las que pagaron el precio...gracias porque en esos años de facultad aprendí lo que era la ciencia, y peor aún: me enganchó!. Luis, gracias por darme la alternativa en este mundillo. Fue un placer trabajar contigo y te tengo gran estima. David, Javito y Tere, mis compañeros de aquel entonces, me lo pasé muy bien en el laboratorio con vosotros. A Iñaki, Blanca y a mi nos ayudasteis a que nuestros pasos fueran cada vez menos torpes en biología celular, y en la ciencia en general. Estoy orgullosa de mis doctores! siempre os recordaré. Al resto del personal del CAI (Amalia, Alfonso, Juanjo, Carmen...), gracias por todo.

Fuera del ámbito científico, son muchas las personas que me rodean y a las que quisiera brevemente recordar. A mis amigas de Infantes, que comparten y comprenden los orígenes de mi persona. Maribel, Mada, Sandra, Clara, Raquel, Noe, Roci...espero siempre contar con vosotras y que sigamos compartiendo las decisiones importantes en la vida y disfrutando juntas. A mis amigos de la facultad: mi familia madrileña. Porque creo que hemos vividos juntos los mejores años de nuestra (aún corta) vida, y se que estaréis conmigo siempre, algo que no es fácil de lograr y de lo que estoy muy orgullosa. A mi hermano del alma Fer, gemelo mio en tantas cosas...no se que habría sido de mi si no te hubiera conocido. Gracias por quererme, por tu entrega, por ser tan bueno, inteligente, ingenioso, divertido...y mucho más. Mir, mi mejor amiga...manchega tenías que ser!. Gracias por todo lo que no cabe decir aquí, ni se expresar con palabras, pero siempre comprendes. Te tengo un sitio principal reservado para este viaje. Lola: la más grande!. Admiro tu forma de entender y vivir la vida, tu valentía y fortaleza...y como no: tu aguante!. Buena amiga donde las haya, estés donde estés siempre estaremos cerca. Vanesa, Carmen, Irene, Bonis, Santi, Sergio, Coti, Borja, Pablo, Chino...completáis este elenco de personas maravillosas con las que tengo al suerte de compatir mi vida. No cambiéis nunca. A Elena, Vladimir, Marcos, Raky, Jorge, Liliana...madrileños y sevillanos, por integrarme como una más desde el primer momento, por ser personas tan especiales, tan generosas, tan divertidas, emprendedoras e interesantes...gracias desde el más profundo cariño.

Para el final he dejado lo más difícil de esta tesis, que es dedicársela a mi familia como se merece. A Carmen, Manolo, Paloma, Pablo, Alba y Gael, por abrirme el corazón y hacerme sentir orgullosa y agradecida de ser una más entre vosotros. Porque sois personas admirables y os quiero mucho, gracias infinitas. A mis tios, primos y abuelos. Siempre hemos sido una piña, y junto a vosotros he vivido momentos cruciales de mi vida. Gustavo, has sido un modelo de superación y valentía

del que me siento orgullosa y al que me intento acercar cada día (aunque no creo que nadie te alcance). Te deseo lo mejor en esta tu segunda (o tercera, ya no se...) vida. A mi querida madre, mis hermanos y sobrinos. Sois el centro de mi vida y os lo debo todo. Me siento muy afortunada de lo que hemos construido a lo largo de los años. No se como expresaros mi profunda gratitud y todo el amor que os profeso...sin vosotros nada en la vida tendría sentido. A Martín, mi presente y futuro. Sin duda mi más valioso descubrimiento científico. Te quiero ahora y siempre, me completas.

A mi padre, la persona más influyente de mi vida y a la que todos los días echo profundamente de menos. Para ti esta tesis y todo lo que vendrá, que os lo debo a mamá y a ti. Es tanto lo que te necesito y te admiro que expresarlo con palabras supone el reto más complejo de esta tesis. Como dijo Pedro por todos nosotros: *recogeremos el testigo de tu ejemplo, nos miraremos siempre en el espejo de tu vida, y aunque sólo podamos ser un pálido reflejo de ti, seguiremos buscando, da igual la distancia a la que te encuentres, convocar una vez más en tu rostro la sonrisa, inundar tu corazón de orgullo, volver a ser niños por un instante, y sentirnos de nuevo eternos a tu lado.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

•	Índice de Figuras y Tablas	6
•	Abreviaturas	11
•	Summary	14
•	1. Introducción	17
○	1.1. Estabilidad y dinámica conformacional de partículas víricas	17
○	1.2. Determinantes moleculares de la estabilidad y la dinámica conformacional de partículas víricas	20
▪	1.2.1. Interacciones proteína-proteína entre subunidades de la cápsida	20
▪	1.2.2. Interacciones proteína-ácido nucleico entre la cápsida y el material genético	24
▪	1.2.3. Poros en cápsidas víricas	27
▪	1.2.4. Cavidades en cápsidas víricas	29
○	1.3. Propiedades mecánicas de proteínas y virus	31
▪	1.3.1. Determinación de las propiedades mecánicas de proteínas y virus mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)	32
▪	1.3.2. Propiedades mecánicas de proteínas y complejos proteicos celulares	37
▪	1.3.3. Propiedades mecánicas de virus	38
○	1.4. Modificación de la estabilidad física de partículas víricas para aplicaciones nanobiotecnológicas	40
○	1.5. El virus diminuto del ratón	41
▪	1.5.1. Estructura de MVM	42
▪	1.5.2. Ciclo biológico de MVM	49
•	2. Objetivos	54
•	3. Materiales y Métodos	56
○	3.1. Células y virus	56
▪	3.1.1. Cepas de <i>Escherichia Coli</i> , cultivo y transformación	56
▪	3.1.2. Células de insecto y su cultivo	58
▪	3.1.3. Células de mamífero y su cultivo	59
▪	3.1.4. Baculovirus, infección y titulación	59
▪	3.1.5. Virus MVM, infección y titulación	60
○	3.2. Plásmidos recombinantes	61
▪	3.2.1. Plásmido pSVtk-VP1/2	61
▪	3.2.2. Plásmido pFB1-VP2	61
▪	3.2.3. Bámido BM-VP2	61

▪ 3.2.4. Plásmido infeccioso pTRp	63
○ 3.3. Mutagénesis dirigida y combinatorial	63
▪ 3.3.1. Procedimiento	63
▪ 3.3.2. Introducción de mutaciones en el b́acmido recombinante BM-VP2	65
▪ 3.3.3. Introducción de mutaciones racionales en el clón infeccioso pTRp	65
○ 3.4. Producción de baculovirus recombinantes y expresión de VP2 en células de insecto	67
▪ 3.4.1. Transfección de células H5 con el b́acmido BM-VP2	67
▪ 3.4.2. Amplificación de baculovirus recombinantes	68
▪ 3.4.3. Purificación de VLPs de MVM producidas en células de insecto	68
○ 3.5. Expresión de VPs y producción de cápsidas vacías y viriones de MVM en células de mamífero	69
▪ 3.5.1. Electroporación de células NB324K con los plásmidos pSVtk-VP1/2 o pTRp	69
▪ 3.5.2. Purificación a escala analítica de cápsidas vacías y viriones intra y/o extracelulares de MVM	70
▪ 3.5.3. Purificación a escala preparativa de cápsidas vacías y viriones intra y/o extracelulares de MVM	72
○ 3.6. Análisis de la expresión de VPs, ensamblaje de cápsidas y viriones y externalización del Nt de VP2 de MVM en células de mamífero, mediante inmunofluorescencia <i>in situ</i>	73
○ 3.7. Análisis mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos de transiciones conformacionales y disociación de VLPs de MVM inducidas por calor	74
○ 3.8. Análisis cinético mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos de transiciones conformacionales en VLPs de MVM inducidas por calor	75
○ 3.9. Determinación mediante proteólisis enzimática de la T_m de traslocación del segmento Nt de VP2 en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	76
○ 3.10. Inactivación térmica de MVM	77
○ 3.11. SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de proteínas	78
▪ 3.11.1. SDS-PAGE	78
▪ 3.11.2. Inmunoelectrotransferencia	78
○ 3.12. Determinación de la actividad hemaglutinante de partículas de MVM	79
○ 3.13. Inactivación mecánica de MVM	80

○ 3.14. Microscopía Electrónica	81
▪ 3.14.1. ME mediante tinción negativa	81
▪ 3.14.2. Estimación de la concentración de partículas víricas por ME	82
○ 3.15. Microscopía de Fuerzas Atómicas	82
▪ 3.15.1. Preparación del soporte de vidrio	83
▪ 3.15.2. Preparación de la muestra	83
▪ 3.15.3. Características y calibrado de las micropalanca	84
▪ 3.15.4. Obtención de imágenes en medio líquido	87
▪ 3.15.5. Determinación de la rigidez mecánica de partículas de MVM mediante experimentos de nanoindentación	90
○ 3.16. Programas de gráficos, modelado molecular, filtrado y análisis estructural	94
○ 3.17. Programas de cálculo, representación y análisis estadístico de los datos	94
• 4. Resultados	96
○ 4.1. Participación en la dinámica conformacional de MVM de residuos de glicina conservados en el segmento Nt de VP2	96
▪ 4.1.1. Diseño y construcción de partículas víricas con mutaciones en el segmento rico en glicinas	96
▪ 4.1.2. Efecto de mutaciones de G31 y G33 sobre la infectividad del virión	99
▪ 4.1.3. Efecto de mutaciones de G31 y G33 sobre el ensamblaje de la cápsida	101
▪ 4.1.4. Efecto de mutaciones de G31 y G33 sobre la externalización del segmento Nt de VP2	103
▪ 4.1.5. Efecto de mutaciones de G31 y G33 sobre la dinámica conformacional global de la cápsida	107
▪ 4.1.6. Efecto de mutaciones de G31 y G33 sobre la estabilidad de la cápsida frente a la disociación	111
○ 4.2. Papel del ácido nucleico de MVM en las propiedades mecánicas del virión	113
▪ 4.2.1. Diseño y construcción de partículas víricas con mutaciones que eliminan interacciones cápsida-ADN, para su análisis mecánico	113
▪ 4.2.2. Control de calidad de las preparaciones de cápsidas vacías y viriones no mutados y mutantes D58A, N183A y D58A/N183A	115
▪ 4.2.3. Efecto de las mutaciones D58A, N183A y D58A/N183A sobre la rigidez mecánica de las partículas víricas	117
○ 4.3. Papel de los residuos situados en la base de los poros en las	

propiedades mecánicas de la cápsida de MVM	124
▪ 4.3.1. Diseño y construcción de cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros o en regiones alejadas de la misma, para su análisis mecánico	125
▪ 4.3.2. Análisis de la infectividad de los viriones mutantes	128
▪ 4.3.3. Análisis de la dinámica conformacional de las cápsidas mutantes	129
▪ 4.3.4. Efecto de mutaciones de residuos situados en la base de los poros sobre la rigidez mecánica de la cápsida en la región situada alrededor de los poros	130
▪ 4.3.5. Efecto de mutaciones de residuos situados en la base de los poros sobre la rigidez mecánica de la cápsida en regiones alejadas de los poros	137
○ 4.4. Papel de cavidades conservadas en las propiedades mecánicas de la cápsida de MVM	142
▪ 4.4.1. Diseño y construcción de cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que flanquean cavidades, para su análisis mecánico	144
▪ 4.4.2. Efecto de mutaciones de residuos que flanquean cavidades sobre la rigidez mecánica de la cápsida	146
▪ 4.4.3. Determinación de la estabilidad frente a la inactivación térmica de viriones de MVM con mutaciones en residuos que flanquean la cavidad A	153
▪ 4.4.4. Estrategias iniciales de evolución dirigida para el incremento de la resistencia térmica y mecánica de cápsidas víricas	155
• 5. Discusión	159
○ 5.1. Determinación de la rigidez mecánica de partículas víricas mediante AFM	159
○ 5.2. Un modelo mecánico sobre la estabilidad y dinámica conformacionales en una partícula vírica	161
○ 5.3. Rigidez mecánica de un virión y estabilidad conformacional. Papel del ácido nucleico	162
○ 5.4. Flexibilidad mecánica de una cápsida vírica y dinámica conformacional. Papel de residuos alrededor de poros y cavidades y del segmento rico en glicinas	168
▪ 5.4.1. Flexibilidad mecánica en las regiones de la cápsida alrededor de cada poro. Papel de residuos en la base de los poros	168
▪ 5.4.2. Dinámica conformacional de las regiones de la cápsida	

alrededor de cada poro y papel del segmento rico en glicinas	169
▪ 5.4.3. Flexibilidad mecánica en otras regiones de la cápsida alejadas de los poros. Consecuencias de la presencia de cavidades	172
○ 5.5. Manipulación mediante ingeniería de proteínas de propiedades físicas de cápsidas víricas	174
• 6. Conclusiones	176
• 7. Bibliografía	179

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

•	Figuras	
○	Figura 1. Esquema básico del funcionamiento de un AFM	33
○	Figura 2. Explicación gráfica de una curva Fz	35
○	Figura 3. Realización de una curva Fz sobre una partícula vírica: partícula y micropalanca como un sistema de muelles en serie	37
○	Figura 4. Estructura del virión de MVM	43
○	Figura 5. Estructura de VP2 y de un trímero de subunidades en la cápsida de MVM	43
○	Figura 6. Estructura del virión de MVM orientado de modo que presente, en el centro de la imagen, un eje de simetría S2 (izquierda), S3 (centro) o S5 (derecha)	44
○	Figura 7. Poros en la cápsida de MVM	45
○	Figura 8. Cavidades en la cápsida de MVM	47
○	Figura 9. Segmentos de ADN unidos a la pared interna de la cápsida en el virión de MVM	48
○	Figura 10. Principales etapas del ciclo biológico de MVM	49
○	Figura 11. Esquema para la obtención de VLPs de MVM mediante expresión en células de insecto utilizando baculovirus recombinantes	62
○	Figura 12. Ensayo HA de cápsidas vacías y viriones de MVM	80
○	Figura 13. Micropalancas <i>Olympus</i> OMCL-RC800PSA-W	85
○	Figura 14. Calibrado de las micropalancas en aire	86
○	Figura 15. Montaje del sistema de AFM en medio líquido	87
○	Figura 16. Procesado de imágenes de AFM para identificar la orientación de partículas individuales de MVM	90
○	Figura 17. Curvas de indentación sobre la partícula de MVM	92
○	Figura 18. Localización de la secuencia de VP2 rica en glicinas en el interior de un poro en el virión de MVM, tras la externalización del Nt de VP2	98
○	Figura 19. Análisis mediante IF <i>in situ</i> del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicina sobre la síntesis de VPs y la formación de la cápsida de MVM	102
○	Figura 20. Análisis mediante IF <i>in situ</i> del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicina sobre la externalización del Nt de VP2 en la cápsida de MVM	105
○	Figura 21. Análisis mediante proteólisis enzimática del	

efecto de mutaciones G31A, G33A, G33F sobre la externalización del Nt de VP2 en el virión de MVM	106
○ Figura 22. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de las mutaciones G31A y G33F sobre la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	108
○ Figura 23. Análisis mediante proteólisis enzimática del efecto de la mutación G31A sobre la externalización del Nt de VP2 en VLPs de MVM sometidas a calentamiento moderado	109
○ Figura 24. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de las mutaciones G31A y G33F sobre la cinética de la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	110
○ Figura 25. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de las mutaciones G31A y G33F sobre la segunda transición conformacional (disociación) en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	112
○ Figura 26. Interacciones cápsida-ADN en el virión de MVM	114
○ Figura 27. Imágenes de ME de preparaciones de elevado grado de pureza de cápsidas vacías y viriones de MVM no mutados (wt) o mutantes	116
○ Figura 28. Imágenes representativas obtenidas por AFM de viriones individuales de MVM no mutados (wt) o mutantes en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN y que presentan un eje de simetría quinario (S5), ternario (S3) o binario (S2) en su parte superior	118
○ Figura 29. Comparación de las propiedades mecánicas de cápsidas vacías y viriones de MVM no mutado (wt) y mutantes D58A, N183A y D58A/N183A	119
○ Figura 30. Localización en la estructura de la cápsida de MVM de los residuos de las series P y C seleccionados para el análisis del efecto mecánico de mutaciones en la base de los poros frente al de mutaciones en otros lugares de la cápsida	127
○ Figura 31. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de algunas mutaciones en la base de los poros sobre la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	130
○ Figura 32. Imágenes representativas obtenidas por AFM de cápsidas individuales de MVM no mutados (wt) o mutantes	

de las series P y C y que presentan un eje de simetría quinario (S5), ternario (S3) o binario (S2) en su parte superior	131
○ Figura 33. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S5 entre cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C)	133
○ Figura 34. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S2 y S3 entre cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C)	138
○ Figura 35. Visualización de la cavidad A en la estructura del virión de MVM	143
○ Figura 36. Imágenes representativas obtenidas por AFM de cápsidas individuales de MVM no mutados (wt) o mutantes con sustituciones de residuos que rodean la cavidad A, y que presentan un eje de simetría quinario (S5), ternario (S3) o binario (S2) en su parte superior	146
○ Figura 37. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S5 entre cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que rodean la cavidad A	148
○ Figura 38. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S2 y S3 entre cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que rodean la cavidad A	149
○ Figura 39. Modelo mecánico de MVM: implicaciones biológicas de las propiedades elásticas de una partícula vírica	163
• Tablas	
○ Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de mutaciones en VP2 de MVMp	64
○ Tabla 2. Características generales de micropalanca <i>Olympus</i> OMCL-RC800PSA	85
○ Tabla 3. Alineamiento de secuencias de la proteína VP2 (residuos 28-38) entre distintos parvovirus	97
○ Tabla 4. Análisis mediante titulación del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicinas sobre la infectividad de MVM	100
○ Tabla 5. Análisis mediante IF <i>in situ</i> del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicinas sobre el ensamblaje de cápsidas de MVM	102

○ Tabla 6. Análisis mediante IF <i>in situ</i> del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicina sobre la externalización del Nt de VP2	104
○ Tabla 7. Valores de T_m para la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	109
○ Tabla 8. Constantes cinéticas de la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	111
○ Tabla 9. Valores de T_m para la segunda transición conformacional (disociación) en VLPs de MVM sometidas a calentamiento	112
○ Tabla 10. Reproducibilidad de los valores de k_s obtenidos para partículas de MVM	120
○ Tabla 11. Valores de k_s determinados para cápsidas vacías de MVM no mutado (wt) y mutantes en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN	122
○ Tabla 12. Valores de k_s determinados para viriones de MVM no mutado (wt) y mutantes en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN	123
○ Tabla 13. Características de mutantes con sustituciones de aminoácidos en la base de los poros (Serie P) o en regiones alejadas de la misma (Serie C) elegidos para su análisis mecánico	126
○ Tabla 14. Valores de k_s en los ejes S5 para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C)	134
○ Tabla 15. Porcentaje de reforzamiento o flexibilización mecánica para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida	136
○ Tabla 16. Valores de k_s en los ejes S2 determinados para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C)	140
○ Tabla 17. Valores k_s en los ejes S3 determinados para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C)	141
○ Tabla 18. Efecto de algunas mutaciones de residuos que rodean la cavidad A en MVM sobre el ensamblaje de VLPs y el valor de T_m para la primera transición conformacional en VLPs sometidas a calentamiento	145

- **Tabla 19.** Valores de k_s determinados para partículas de MVM no mutado (wt) y mutantes con sustituciones de residuos que rodean la cavidad A **150**
- **Tabla 20.** Porcentaje de reforzamiento o flexibilización mecánica para cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que rodean la cavidad A **152**
- **Tabla 21.** Análisis mediante titulación del efecto de mutaciones de residuos que rodean la cavidad A sobre la infectividad de MVM **154**
- **Tabla 22.** Análisis del efecto de mutaciones de residuos que rodean la cavidad A sobre la resistencia de MVM a la inactivación térmica **155**

ABREVIATURAS

Å: Ångstrom

AAV-2: virus adeno asociado (*Adeno-Associated Virus*) tipo 2

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADN cd: ácido desoxirribonucleico de cadena doble

ADN cs: ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla

AFM: microscopía de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscopy*)

ARN: ácido ribonucleico

ARN cd: ácido ribonucleico de cadena doble

ARN cs: ácido ribonucleico de cadena sencilla

ATP: adenosín trifosfato

ATPasa: enzima que hidroliza ATP

BPMV: virus del moteado de la vaina del frijol (*Bean Pod Mottle Virus*)

BSA: seroalbúmina bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CCMV: virus del moteado clorótico del caupí (*Cowpea Chlorotic Mottle Virus*)

CPV: parvovirus canino (*Canine ParvoVirus*)

CrioME: criomicroscopía electrónica

Ct: extremo carboxilo-terminal

DEAE: dietilaminoetilo

Da: dalton

DMEM: medio de cultivo Eagle, modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: dimetilsulfóxido

dpe: días post electroporación

dpi: días post infección

ecp: efecto citopático

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FHV: Virus de la cabaña (*Flock House Virus*)

FMDV: Virus de la fiebre aftosa (*Foot-and-Mouth Disease Virus*)

FPV: parvovirus felino (*Feline ParvoVirus*)

Fz: fuerza-distancia

HA: hemaglutinación

HMDS: hexametildisilazano

hpe: horas post electroporación

HSV-1: virus herpes simple (*Herpes Simplex Virus*) tipo 1

IF: inmunofluorescencia

IPTG: isopropil-1-tio-β-D-1-tiogalactopiranósido

JM: modo de salto (*Jumping Mode*)

k: constante elástica o de muelle
k_c: constante elástica de la micropalanca
k_{ef}: constante elástica efectiva
k_{off}: constante cinética de la reacción química inversa
k_{on}: constante cinética de la reacción química directa
k_s: constante elástica del objeto de estudio
LB: Luria-Bertani
mdi: multiplicidad de infección
ME: microscopía electrónica o microscopio electrónico
m/m: relación masa/masa
MVM: Virus diminuto del ratón (*Minute Virus of Mice*)
NC: nitrocelulosa
Nt: extremo amino-terminal
DO: densidad óptica
DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)
PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)
PBSc: tampón fosfato salino completo (contiene calcio y magnesio)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
PEG6000: polietilenglicol 6000
PPV: parvovirus porcino (*Porcine ParvoVirus*)
preARN: ARN precursor
rpm: revoluciones por minuto
S2, S3, S5: ejes de simetría binaria (2), ternaria (3) o quinaria (5)
SDS: dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
SF: suero fetal bovino
T: número de triangulación
t.a.: temperatura ambiente
TAE: tampón Tris-acetato-EDTA
TBS: tampón borato salino
TBS-T: tampón borato salino con detergente Tween 20
TE: tampón Tris-EDTA
T_m: temperatura media
TMV: Virus del mosaico del tabaco (*Tobacco Mosaic Virus*)
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
U: unidad
u.a.: unidades arbitrarias
ufp: unidades formadoras de paca
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VLP: partícula semejante a un virus (*Virus-Like Particle*)

VP: proteína viral (*Viral Protein*)

wt: cepa silvestre (*wild type*)

SUMMARY

This study is mainly focused on the analysis of the mechanical properties of viral particles, and their possible relationship with the conformational stability or dynamics of such particles. A fundamental goal of this work was to use mutational analysis and atomic force microscopy to provide a first experimental evidence for a biological role of the mechanical stiffness or elasticity of a viral particle. The model system chosen was the minute virus of mice (MVM), one of the structurally simplest viruses known.

In the first part of this work we have studied the functional role of evolutionarily conserved glycine residues within a glycine-rich tract located at the amino terminus (Nt) of the capsid protein subunits, and their possible implication in capsid conformation dynamics related with translocation processes through capsid pores. The results show that those glycine residues are needed for normal infectivity of the MVM virion, largely because bulkier residues at these positions would impair the externalization of the capsid protein VP2 Nt.

In the second part of this work we have studied the role of the viral nucleic acid in the mechanical properties of the MVM virion, and a possible relationship between conformational stability and mechanical stiffness of a viral particle. The results show that non-covalent interactions between the viral ADN inside the virion and equivalent regions located at the inner capsid wall are responsible for an anisotropic increase in the mechanical stiffness of the viral particle around the 2-fold (S2) and 3-fold (S3) symmetry axes, but not around the 5-fold (S5) axes, where the capsid pores are located. This increase in rigidity of the virion is associated with a higher resistance against thermal inactivation of its infectivity, while at the same time being compatible with the capsid conformational change associated with VP2 Nt translocation and required for virus infection.

In the third part of this work we have studied the role of residues surrounding capsid pores in the mechanical properties of the MVM capsid, and a possible relationship between conformational dynamics and mechanical flexibility in a viral particle. The results show that the residues located at the base of the pores contribute to preserve a high mechanical flexibility in the S5 regions around the pores. Mutational analysis using as many as 18 mutants revealed a perfect correlation between high mechanical flexibility in the S5 region, the occurrence of the conformational rearrangement of the capsid associated with translocation of the VP2 Nt through the pores, and virion infectivity.

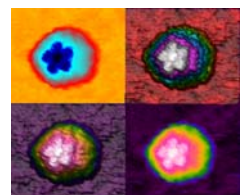
In the fourth and last part of this work we have studied the role of residues surrounding conserved cavities in the MVM capsid in the mechanical properties of the viral particle. The results indicate that the MVM capsid is kept near a maximum of mechanical flexibility. All of the mutations tested that alter the size and shape of the

capsid cavities, as well as several other mutations located in different capsid regions, did not modify the mechanical stiffness of the S5 regions, but increased the stiffness of the S2 and S3 regions.

The results of the mechanical analysis of MVM undertaken in this study have allowed us to propose a mechanical model of the MVM particle. This model contemplates that every region in the MVM virion may have acquired during evolution the degree of mechanical stiffness or flexibility required to satisfy an adequate compromise between different structural and functional constraints. On one hand, the interactions between the DNA inside the virion and equivalent regions in the inner capsid wall close to the S2 capsid regions increase the mechanical stiffness of the S2 and S3 regions in the virion, possibly impairing a non-productive conformational change and increasing the resistance of the virion against thermal inactivation of its infectivity in the extracellular environment. On the other hand, the absence of DNA segments bound close to the S5 capsid regions, and the residues found at the base of the pores located in these regions, keep the S5 regions mechanically flexible enough to allow a productive conformational change in the capsid. This structural rearrangement is associated with translocation processes through the pores and is needed for virus infectivity.

In summary, the results obtained support a biological implication for the mechanical stiffness and elasticity of a viral particle, and suggest approaches for the rational manipulation of the mechanical properties of viral particles for nanobiotechnological purposes.

Introducción



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estabilidad y dinámica conformacional de partículas víricas

Los virus constituyen un importante ejemplo del éxito biológico de estructuras supramoleculares relativamente sencillas, y son modelos especialmente relevantes para entender en profundidad las relaciones estructura-función y la estabilidad estructural y dinámica conformacional en complejos macromoleculares sujetos a múltiples presiones selectivas. Este tipo de estudios, que en un primer momento implicaron casi únicamente a virólogos moleculares y estructurales, ha evolucionado mucho en los últimos años, dando lugar a un prometedor campo de investigación muy amplio y enriquecedoramente multidisciplinar. El desarrollo de tecnologías y estrategias que permitan una adecuada manipulación química y/o genética de viriones, cápsidas víricas y partículas semejantes a virus (VLPs) es el objetivo actual de muchos investigadores con el propósito de conseguir no sólo entender en profundidad el funcionamiento fisicoquímico de los virus (ver, por ejemplo, Chiu *et al.*, 1997), sino también desarrollar nuevas aplicaciones de las partículas víricas en biomedicina, biotecnología y nanotecnología (Douglas y Young, 2006; Singh *et al.*, 2006a,b; Saini *et al.*, 2006; Fischlechner y Donath, 2007; Steinmetz y Evans, 2007; Young *et al.*, 2008; Flenniken *et al.*, 2009; Manchester y Steinmetz, 2009; Steinmetz *et al.*, 2009; Mateu, 2011).

Los virus más sencillos están generalmente constituidos por una molécula de ácido nucleico (ADN o ARN) envuelta por una cápsida proteica, y en algunos casos por una membrana lipídica. A pesar de su limitada cantidad de información genética y de esta minimalista concepción molecular, las partículas víricas han adquirido evolutivamente una gran variedad de complejas funciones que les permiten realizar las diversas etapas del ciclo vírico en que están implicadas. Para un virus animal estas etapas incluyen el reconocimiento de la célula huésped; la internalización del virión y su transporte intracelular; la desencapsidación del material genético en el compartimento apropiado; el ensamblaje de la cápsida; la internalización del genoma; la maduración del virión; el transporte y liberación de las partículas víricas formadas; y el mantenimiento de la integridad y capacidad infecciosa del virión durante la fase extracelular. La necesidad de realizar todas estas funciones impone severas restricciones en la estructura y propiedades de una partícula vírica. En especial, la partícula ha de ser lo suficientemente estable en el medio extracelular para resistir múltiples agresiones quimicofísicas, pero lo suficientemente inestable en el medio intracelular como para permitir la desencapsidación del genoma y otros procesos dinámicos necesarios para el desarrollo del ciclo viral. Estos requerimientos contradictorios (Mateu, 1995; Chiu *et al.*, 1997; Lucas y Knipe, 2002; Johnson, 2003)

suelen resolverse en muchos virus sencillos mediante el establecimiento de un balance adecuado entre sus diferentes propiedades fisicoquímicas, y también mediante cambios estructurales en la partícula vírica; este comportamiento dinámico permite la adaptación sucesiva de las características de la partícula a las diferentes demandas funcionales que van surgiendo durante el ciclo vírico.

Un ejemplo de estudios tempranos que establecieron la existencia de cambios conformacionales en virus animales fue el realizado por el Prof. J. Hogle y colaboradores (Chow *et al.*, 1985). Con el fin de analizar las propiedades antigénicas de la proteína de la cápsida VP1 en poliovirus, estos autores utilizaron múltiples fragmentos peptídicos, que en su conjunto daban cuenta del total de la secuencia de VP1, para obtener anticuerpos que neutralizasen la infección por este virus. Cuando el mismo grupo determinó la estructura tridimensional de poliovirus mediante cristalografía de rayos X (Hogle *et al.*, 1985), la mayoría de las secuencias peptídicas inmunogénicas se localizaron, tal y como se esperaba, en la superficie de la partícula viral. No obstante, una de estas secuencias, próxima al extremo amino-terminal (Nt) de VP1, resultó estar localizada en el interior del virión. Resultados posteriores mostraron que este segmento peptídico puede traslocarse entre el interior y el exterior de la partícula, dependiendo de las condiciones, lo que explicaba las primeras observaciones aparentemente contradictorias (Roivainen *et al.*, 1991 y 1993). Además, se demostró que dicha translocación y otras fluctuaciones dinámicas asociadas en el virión de poliovirus, incluyendo la liberación de la proteína VP4, eran necesarias para la infectividad, al permitir la unión del virión a la membrana celular y su internalización subsiguiente (Fricks y Hogle, 1990).

En las últimas dos o tres décadas se han descrito otros muchos ejemplos en los que las partículas víricas muestran procesos dinámicos basados en un importante grado de inestabilidad y/o metaestabilidad en sus cápsidas (algunos ejemplos en Filman *et al.*, 1989; Speir *et al.*, 1995; Casjens, 1997; Chow *et al.*, 1997; Rossmann *et al.*, 1997; Belnap *et al.*, 2000; Smyth y Martin, 2002; Hogle, 2002; Johnson, 2003 y 2010; Liepold *et al.*, 2005; Cotmore y Tattersall, 2007). Las manifestaciones dinámicas observadas en viriones y cápsidas víricas pueden dividirse de forma general en dos categorías *i)* cambios conformacionales a gran escala, por ejemplo asociados con la maduración de la partícula y *ii)* fluctuaciones a pequeña escala. El primer tipo de movimientos son en su mayoría irreversibles, y se producen en respuesta a señales como, por ejemplo, la encapsidación del genoma viral, la unión al receptor celular o la acidificación del pH (De Sena y Mandel, 1977; Fricks y Hogle, 1990; Prevelige *et al.*, 1993). Por el contrario, las transiciones a pequeña escala suelen ser reversibles, y han sido a veces englobadas bajo el término *respiración viral* (Li *et al.*, 1994, Lewis *et al.*, 1998). Ambos tipos de comportamientos dinámicos pueden resultar esenciales para el desarrollo del ciclo vírico.

El comportamiento dinámico descrito para diferentes virus radica muchas veces en el carácter metaestable de la partícula vírica, que ha adquirido evolutivamente la capacidad de presentar varios estados conformacionales. Las partículas víricas metaestables se pueden encontrar atrapadas en un estado conformacional que no corresponde al de mínima energía libre en esas condiciones. La aplicación de energía suficiente, mediante la acción de perturbaciones externas diversas, permite superar la barrera energética que existe entre el estado conformacional metaestable y el estado termodinámicamente más estable. Biológicamente esa transición conformacional de la partícula vírica puede, por ejemplo, permitir la entrada del virus en la célula, o facilitar la liberación del material genético viral dentro de la misma. La barrera energética es vencida *in vivo* mediante factores fisiológicos específicos y regulados que dependen del virus. Por ejemplo, mediante el anclaje del virus a receptores celulares, la unión o liberación de iones metálicos o de moléculas orgánicas a la cápsida, o la acidificación en los endosomas. *In vitro*, el mismo efecto puede conseguirse mediante agentes físicos o químicos, incluso no fisiológicos, como por ejemplo la aplicación de calor suficiente (algunos ejemplos en Hernando *et al.*, 2000; Carreira *et al.*, 2004; Maroto *et al.*, 2004; Reguera *et al.*, 2004 y 2005; Cotmore y Tattersall, 2007; Nelson *et al.*, 2008; Yunus *et al.*, 2010). En ambos casos, el efecto termodinámico que causa la transición conformacional es el mismo, la disminución de la barrera energética de la reacción.

La capacidad que presentan muchas partículas víricas para interconvertirse entre diferentes conformaciones no sólo puede presentar ventajas biológicas para el virus, sino también desventajas. Partículas víricas capaces de adoptar diversos estados conformacionales pueden perder su infectividad mediante la acción de agentes físicoquímicos presentes en el entorno extracelular que disminuyan la barrera energética que separa la conformación infectiva del virión de una conformación no productiva; o pueden provocar que un cambio conformacional en principio productivo ocurra en el momento o lugar inapropiado. En ambos casos, el resultado será la pérdida de infectividad del virus (ejemplos en Kozloff *et al.*, 1969; Volkin *et al.*, 1997; Roche y Gaudin, 2002; Farr y Tattersall, 2004; Reguera *et al.*, 2004; Farr *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2008).

En resumen, los estudios estructurales y funcionales de viriones y cápsidas revelan que muchas partículas víricas son entidades conformacionalmente dinámicas. La evidencia disponible es aún limitada, pero sugiere que los virus pueden haber alcanzado a lo largo de su evolución un compromiso óptimo entre estabilidad e inestabilidad, así como un grado adecuado de metaestabilidad, que dependerá tanto de su nicho ecológico como de los mecanismos moleculares subyacentes a su propio ciclo viral (Mateu, 2011).

1.2. Determinantes moleculares de la estabilidad y la dinámica conformacional de partículas víricas

La cantidad de estructuras de viriones y cápsidas determinadas a resolución atómica o casi atómica mediante cristalografía de rayos X o, a una resolución menor, mediante criome y otras técnicas de imagen, se ha ido incrementando de forma espectacular a lo largo de los últimos años (algunas revisiones en Rossmann y Johnson, 1989; Casjens, 1997; Johnson y Speir, 1999; Chapman y Liljas, 2003; Natarajan *et al.*, 2005; Rossmann *et al.*, 2005; Johnson, 2008; Zhou, 2008; Kieft, 2009; Coutard y Canard, 2010). Estos estudios han permitido un enorme avance en el conocimiento de la variada arquitectura de los virus, del reconocimiento molecular entre las subunidades proteicas que forman la cápsida y de las bases estructurales de diversas e importantes funciones virales. Además, la disponibilidad de detallados modelos estructurales experimentales, modelos teóricos simplificados (Zandi *et al.*, 2004), clones infecciosos, técnicas eficaces de mutagénesis dirigida y combinatorial, y múltiples métodos de análisis biofísico, bioquímico y virológico han permitido un avance espectacular en el conocimiento de las relaciones estructura-función en partículas víricas (Chiu *et al.*, 1997; Johnson, 2008 y 2010; Harvey *et al.*, 2009; Wimmer *et al.*, 2009; Odegard *et al.*, 2010) incluyendo la investigación de los determinantes moleculares de su estabilidad y dinámica conformacional. Algunos ejemplos de estos estudios, más relacionados con los objetivos del presente trabajo, se revisan a continuación.

1.2.1. Interacciones proteína-proteína entre subunidades de la cápsida

En general, las subunidades que conforman los grandes complejos macromoleculares son capaces de reconocerse e interactuar de manera ordenada y dirigida. El proceso de autoensamblaje de un virión es en la mayoría de los casos irreversible, y conduce a una estructura definida donde la complementariedad química y estérica (geométrica) entre subunidades constituye un elemento muy importante para su construcción. El tamaño y geometría de la partícula y su estabilidad suelen estar regulados por interacciones entre las subunidades proteicas que forman la cápsida vírica, y en ocasiones incluso por interacciones entre las proteínas de la cápsida y el ácido nucleico genómico que es encapsidado en su interior.

Muchas de las familias de virus conocidas presentan cápsidas esféricas de simetría icosaédrica. En el caso de algunos de estos virus al menos, las proteínas estructurales se ensamblan formando intermediarios más o menos estables, que se

asocian a su vez para formar partículas víricas completas. Ejemplos de ello son las cápsidas de picornavirus, como el virus de la fiebre aftosa (FMDV) que se ensamblan a partir de subunidades pentaméricas formadas por cinco protómeros, a su vez constituidos por la asociación de las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 (Racaniello, 2001); la cápsida de poliomavirus, que se ensambla igualmente a partir de pentámeros (Kosukegawa *et al.*, 1996; Sandalon *et al.*, 1997; Sandalon y Oppenheim, 1997); o la cápsida del virus de la hepatitis B, que se ensambla a partir de dímeros (Zhou y Stranding, 1992a). En el caso de parvovirus, como el virus diminuto del ratón (MVM), la cápsida se ensambla a partir de trímeros de subunidades de la cápsida (Lombardo *et al.*, 2000; Riobos *et al.*, 2006).

En ocasiones, el correcto ensamblaje depende de reordenamientos conformacionales de las proteínas de la cápsida. En muchos virus de simetría icosaédrica, el ensamblaje se produce gracias a que la misma proteína puede adoptar conformaciones que son en parte diferentes, dando lugar al bien estudiado fenómeno de cuasiequivalencia (Caspar y Klug, 1962; Casjens, 1997). Estos reordenamientos conformacionales de segmentos flexibles de proteínas de la cápsida no se dan únicamente en virus icosaédricos. Por ejemplo, en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la cápsida madura está formada por cientos de copias de la proteína CA. Dicha proteína consta de dos dominios: el Nt que forma anillos hexaméricos o pentaméricos, y el Ct, que a modo de homodímero conecta dichos anillos dando lugar a un enrejado hexagonal con algunos “defectos” pentaméricos. El ensamblaje de pentámeros y hexámeros parece requerir la adopción de una conformación diferente en las interfases entre subunidades (Pornillos *et al.*, 2011).

Muchos virus, especialmente entre los bacteriófagos, utilizan proteínas auxiliares de andamiaje para desplazar el equilibrio de asociación de subunidades hacia la formación de una partícula vírica biológicamente adecuada, promoviendo el establecimiento de interacciones entre subunidades y estabilizando los intermediarios de ensamblaje. El fago P22 consigue esto mediante dos tipos de interacciones. Por un lado, establece contactos electrostáticos entre los dominios carboxilo-terminal (Ct) y Nt de la proteína de la cápsida. Por otra parte, se observa que 10 proteínas de andamiaje de este bacteriófago interactúan con el único vértice en el eje de plegamiento 12x, siendo éste el lugar donde presumiblemente se iniciaría el ensamblaje de la cápsida, propagándose hasta dar lugar a una partícula de simetría icosaédrica $T = 7$. Según el modelo de los autores, la liberación de estas proteínas de andamiaje permite los cambios conformacionales necesarios para la encapsidación del ADN y la maduración viral (Chen *et al.*, 2011). En el caso del fago $\Phi 29$ se ha demostrado que mutaciones en el extremo Nt de la proteína de andamiaje impiden el ensamblaje debido a la pérdida de la integridad de los intermediarios diméricos (Fu *et al.*, 2007). También se ha

descrito recientemente que, en el fago HK97, la proteína de la cápsida gp5 contiene un segmento (denominado *delta*) que actúa como dominio de andamiaje, reclutando a las 420 proteínas que dan lugar a la procápsida icosaédrica T=7. El procesamiento proteolítico del dominio delta por parte de la proteasa viral gp4, da lugar a una cápsida metaestable capaz de ensamblar y desensamblar de manera reversible bajo condiciones suaves, sin posibilidad de madurar. La ausencia de dicho procesamiento proteolítico implica, por el contrario, la formación de una cápsida estable que resiste condiciones de estrés fisicoquímico sin desensamblarse (Huang *et al.*, 2011). Como otro ejemplo en este sentido, se ha descrito que la proteína no estructural NS2 del virus de la hepatitis C orquesta el ensamblaje de la cápsida mediante el reclutamiento de las proteínas que la forman hacia las zonas de ensamblaje del virus (próximas a los islotes lipídicos celulares), promoviendo el establecimiento de múltiples interacciones entre ellas. Una vez realizada su función durante el ensamblaje, las proteínas de andamiaje son disociadas de la estructura de la partícula, en un proceso de maduración estructural.

Tanto en virus que utilizan proteínas de andamiaje como en aquellos que no las requieren, el número, tipo y distribución de interacciones entre subunidades debe permitir y definir los procesos de ensamblaje y desensamblaje de la partícula vírica, así como su estabilidad y su dinámica conformacionales. A diferencia de lo generalmente observado en complejos proteicos pequeños, incluso las interacciones individuales más débiles pueden resultar importantes para estos procesos (Zlotnick, 1994). Existen cada vez más estudios experimentales que investigan en detalle los determinantes moleculares del ensamblaje y la estabilidad de cápsidas víricas y viriones. Se citan a continuación algunos ejemplos.

Diversas mutaciones de residuos que establecen interacciones no covalentes entre subunidades afectaron a la estabilidad de la cápsida del ya mencionado fago P22 (Foguel *et al.*, 1995). Lo mismo se observó con un virus muy diferente, el virus de la lengua azul (Limn *et al.*, 2000). Mutaciones en interfases entre subunidades, pero también algunas situadas en bucles expuestos o en el núcleo hidrofóbico de una subunidad de la cápsida afectaron a la estabilidad del fago MS2 (Stonehouse y Stockley, 1993; Stonehouse *et al.*, 1996a, 1996b). Algunos residuos expuestos al solvente que establecen puentes de hidrógeno entre subunidades de la cápsida del fago fr (Axblom *et al.*, 1998), o puentes disulfuro intermoleculares en la cápsida del virus de la hepatitis B (Zhou y Standring, 1992b) resultaron ser importantes para la estabilidad de la partícula.

Aunque existen muchos otros ejemplos del efecto de mutaciones en la cápsida sobre el ensamblaje y estabilidad de las partículas víricas, los estudios sistemáticos son aún escasos. En nuestro laboratorio se han venido realizando este tipo de estudios sobre el papel de diferentes residuos implicados en interacciones entre subunidades o

con el ácido nucleico genómico en el ensamblaje y la estabilidad de partículas víricas, utilizando un picornavirus, FMDV, un parvovirus, MVM, y un retrovirus, VIH, como modelos de virus que presentan cápsidas estructuralmente sencillas (del Álamo *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2003; Reguera *et al.*, 2004, 2005; del Álamo y Mateu, 2005; Pérez *et al.*, enviado a publicar; Rincón *et al.* y Bocanegra *et al.*, resultados no publicados).

El carácter estereoquímico de las interfases entre las subunidades de la cápsida de un virus puede resultar muy diferente. Por ejemplo, en FMDV la gran mayoría de residuos interfásicos presentan carácter polar, mientras que en MVM existe un número importante de residuos con cadena lateral apolar que establecen múltiples contactos hidrofóbicos entre subunidades. Estos estudios han puesto de manifiesto que para FMDV un porcentaje muy elevado de los residuos interfásicos, incluyendo aquellos implicados en puentes de hidrógeno o salinos, son importantes para la estabilidad conformacional de la partícula (Mateo *et al.*, 2003). En cambio en MVM, un número muy limitado de residuos, aquellos que participan en múltiples contactos hidrofóbicos o en puentes de hidrógeno o puentes salinos enterrados en las interfases entre subunidades, son necesarios para el ensamblaje de la cápsida; la mayoría de los demás residuos interfásicos no contribuyen individualmente de modo significativo al ensamblaje o a la estabilidad (Reguera *et al.*, 2004). Mientras las interfases entre subunidades en las cápsidas de FMDV y MVM son continuas, las diferentes interfases en la cápsida de VIH son discontinuas. Esta característica ha permitido la primera disección termodinámica de una interfase en una cápsida vírica. La interfase de homodimerización de CA presenta características estructurales y múltiples residuos energéticamente importantes para la interacción, pero incluye también residuos que contribuyen repulsiones electrostáticas y otras interacciones desfavorables entre las subunidades (del Álamo *et al.*, 2003, del Álamo y Mateu, 2005). Estos efectos pueden contribuir a la inestabilidad de la cápsida madura, que es necesaria para su desensamblaje en la célula infectada.

En resumen, los resultados obtenidos con diferentes modelos virales indican que la capacidad de autoensamblaje y la estabilidad conformacional de una partícula vírica depende en gran medida del establecimiento de una serie de interacciones (en la gran mayoría de los casos de tipo no covalente, pero en algunos casos de tipo covalente) entre las subunidades que forman la cápsida. Sin embargo, el número y tipo de residuos e interacciones implicados parece ser muy diferente en diferentes virus. En algunos casos, un número limitado de contactos hidrofóbicos y puentes de hidrógeno o salinos enterrados, establecidos entre unos pocos residuos interfásicos, contribuyen de forma crítica al ensamblaje y la estabilidad de la partícula. En otros casos, un número elevado de interacciones no covalentes débiles establecidas entre un número mucho mayor de residuos puede igualmente permitir el ensamblaje y el establecimiento de una estabilidad suficiente. La estabilidad de la cápsida no está

necesariamente relacionada con el número de interacciones fuertes entre subunidades, porque pueden existir además interacciones desfavorables para el ensamblaje, incluyendo repulsiones electrostáticas. El conjunto de interacciones entre subunidades en la cápsida de un virus parece ser el resultado de un complejo proceso evolutivo relacionado con la necesidad de mantener un balance sutil entre estabilidad e inestabilidad de la cápsida, y permitir transiciones conformacionales de la misma que son necesarias para la infectividad del virus. Las bases moleculares de estas transiciones no están aún bien definidas en la mayoría de los casos. Además de las interacciones entre subunidades de la cápsida, la presencia o ausencia de pequeñas moléculas o iones, las interacciones entre la cápsida y el ácido nucleico genómico y la organización estructural de diversas regiones en la partícula vírica pueden contribuir al ensamblaje y estabilidad conformacional del virión (ver siguientes apartados).

1.2.2. Interacciones proteína-ácido nucleico entre la cápsida y el material genético

Diferentes estudios estructurales, bioquímicos y genéticos, junto con consideraciones teóricas, revelan que el ácido nucleico genómico no solo actúa como repositorio pasivo de la información genética, sino que juega un papel estructural muy importante en la partícula vírica. El establecimiento de interacciones entre el ácido nucleico y proteínas de la cápsida puede resultar crítico para la morfogénesis y la estabilidad conformacional del virión, como indican diversos estudios teóricos y experimentales (McGhee y von Hippel, 1974; Chen *et al.*, 1989; Fisher y Johnson, 1993; Larson *et al.*, 1993a, 1993b y 2005; Valegard *et al.*, 1994; Tang *et al.* 2001; Koning *et al.*, 2003; Reguera *et al.*, 2005; Schneemann, 2006; Datta *et al.*, 2007; Hagan, 2009; Priyadarshini y Savithri, 2009; Chua *et al.*, 2010; Kivenson y Hagan, 2010; Gu y Schroeder, 2011; Zlotnick y Mukhopadhyay, 2011).

En una gran parte de los virus, el ácido nucleico genómico (ADN o ARN) contenido en el virión es de cadena sencilla (cs), aunque también hay muchos que presentan cadena doble (cd), especialmente entre los virus ADN. La encapsidación o internalización del ácido nucleico para formar el virión sigue diversas estrategias que dependen del virus, pero no necesariamente del tipo de ácido nucleico (revisiones en Chiu *et al.*, 1997; Schneemann, 2006). Aunque el proceso de encapsidación es en general poco conocido, se han encontrado tres estrategias diferentes: *i*) condensación del ácido nucleico primero, para luego ensamblar la cápsida a su alrededor (por ejemplo, en papovavirus o nodavirus); *ii*) condensación de modo coordinado de secciones de la cápsida con el ácido nucleico (por ejemplo, en virus helicoidales como el del mosaico del tabaco), que viene a constituir una variante del anterior; *iii*) construcción de cápsidas virales vacías para posteriormente introducir el ácido nucleico en su interior

(por ejemplo, algunos fagos con cola). Es preciso, para entender el papel funcional de interacciones entre la cápsida y el ácido nucleico vírico, distinguir entre los mecanismos de encapsidación basados en la condensación de la cápsida alrededor del ácido nucleico, y aquellos basados en la internalización del genoma en una cápsida preformada.

La condensación de la cápsida alrededor del ácido nucleico parece tener lugar al menos en un cierto número de virus ARN cs (Schneeman, 2006). Antes de su encapsidación, la molécula de ARN puede adoptar una conformación más o menos extendida. Por el contrario, una vez encapsidado en el virión, el ARN aparece altamente condensado, mostrando una estructura espacial definida que en ocasiones es parcialmente visible en los modelos cristalográficos. Para explicar el paso de una estructura extendida a otra compacta, se han propuesto (Schneeman, 2006) dos alternativas: en una de ellas, el ARN se plegaría espontáneamente con una estructura terciaria compatible con las dimensiones del interior de la cápsida. Esta molécula actuaría entonces como andamio alrededor del cual las proteínas se condensarían, formando la cápsida. Esta situación, no obstante, podría ser desfavorable termodinámicamente, dado que un plegamiento no asistido del ARN tendría el riesgo de la formación de numerosas estructuras compactas de energías similares, algunas de las cuales no serían compatibles con la forma de la cápsida. Alternativamente, las proteínas de la cápsida podrían funcionar como “chaperonas” para el ARN, facilitando el plegamiento de la molécula en una estructura compatible con la simetría y estructura de la cápsida, mientras que las interacciones entre las subunidades proteicas proporcionarían la estabilidad suficiente a la partícula formada. Es preciso insistir que estos modelos carecen de un claro apoyo experimental, y que la realidad puede encontrarse en algún punto intermedio entre esos dos extremos. Larson y McPherson (2001) sugieren que el ARN encapsidado se encuentra en una forma metaestable, lo que permitiría tanto su desplegamiento rápido tras la desencapsidación para desempeñar su papel metabólico, como su replegamiento. Además, el ARN podría experimentar cambios conformacionales en el interior de la cápsida viral sin desensamblarla ni afectar significativamente a la infectividad, como se ha propuesto para el virus de la cabaña (*Flock House Virus*, FHV), un nodavirus (Krishna y Schneemann, 1999).

Con respecto a los virus que internalizan el ácido nucleico en una cápsida preformada, pueden destacarse muchos bacteriófagos cuyo ácido nucleico es ADN cd, incluyendo λ , HK97, T4 y P22. Estos fagos comparten básicamente una misma estrategia de plegamiento de sus subunidades (Wikoff *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2003; Lander *et al.*, 2008). Sus cápsidas incluyen un motor molecular, basado en una estructura denominada *portal* (Müller *et al.*, 1997; Valle *et al.*, 1999; Ibarra *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2001; Guasch *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007). Esta estructura es

una máquina biológica que encapsida el ADN con gasto de ATP. Sus componentes esenciales son, por una lado la cápsida vacía (procápsida) y por otro la enzima empaquetadora del ADN (terminasa). Durante la traslocación, la terminasa permanece unida al portal internalizando el ADN, además de funcionar como ATPasa y endonucleasa (Nemecek *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007 y 2008). Durante el proceso de encapsidación, los bacteriófagos experimentan un reordenamiento conformacional a gran escala (Fuller *et al.*, 2007) de la partícula previamente formada (Valpuesta y Carrascosa, 1994; Leiman *et al.*, 2003; Agirrezabala *et al.*, 2005; Johnson, 2010). La encapsidación del ácido nucleico vírico en una cápsida preformada no está limitada a bacteriófagos, sino que también ocurre en diversos virus eucarióticos como por ejemplo Herpesvirus (Mettenleiter *et al.*, 2006), Parvovirus (Cotmore y Tattersall, 2005; Timpe *et al.*, 2005; Xing y Tikoo, 2009) o Enterovirus (Liu *et al.*, 2010a).

Las interacciones específicas entre el ácido nucleico vírico y las proteínas de la cápsida que intervienen en procesos de encapsidación, sean mediante condensación o internalización, se han investigado para algunos virus. En algunos casos, la señal de encapsidación específica está constituida por un segmento discreto del ácido nucleico vírico, y ha podido ser identificada en virus ARN cs (TMV, Sindbis, fago MS2, etc.), ADN cs (fagos Φ X174, M13), ARN cd (Φ 6) y ADN cd (fagos λ , P22, P1, T3, o adenovirus) (Hearing *et al.*, 1987; Atreya y Siegel, 1989; Russel y Model, 1989; Owen y Kuhn, 1996). Sin embargo, la encapsidación puede depender en otros casos, al menos parcialmente, de interacciones más dispersas entre diversas regiones del ácido nucleico y aminoácidos concretos de cada subunidad de la cápsida, y puede estar influida por la simetría de la cápsida, e incluso por la acción de factores celulares.

Aparte de señales de encapsidación, se han identificado en algunos virus ARN Y ADN interacciones entre la cápsida y el ácido nucleico genómico contenido en su interior. En TMV el ARN cs establece interacciones bien definidas con cada subunidad de la cápsida helicoidal, contribuyendo al ensamblaje y la estabilidad del virión, y formando parte integral de la estructura supramolecular ensamblada (Holmes, 1979; Caspar y Namba, 1990; Stubbs, 1999). En la estructura cristalográfica de diversos virus ARN icosaédricos se han podido observar segmentos del ácido nucleico bien ordenados, que establecen interacciones definidas con aminoácidos concretos en regiones geométricamente equivalentes situadas en la pared interna de la cápsida (Schneemann, 2006). En el virus del moteado de la vaina del frijol (*Bean Pod Mottle Virus*, BPMV) se observó, mediante cristalografía de rayos-X, una porción de ARN genómico viral unido a la cápsida (Chen *et al.*, 1989). Varios segmentos de la molécula de ARN se unen al interior de la cápsida cerca de los ejes de simetría ternaria de la misma, así como interaccionan con el extremo Nt de la subunidad L de la cápsida. En el caso de TMV, el 59% de la molécula de ARN es visible en la estructura, principalmente a modo de segmentos de doble hélice que interaccionan a través de la

ribosa y/o los fosfatos con residuos internos de la cápsida cerca de los ejes de simetría binarios, y más débilmente con los terciarios (Larson *et al.*, 1993a y b). Para los nodavirus virus de Pariacoto y virus de la cabaña (FHV), son también varios los segmentos de doble hélice de ARN interactúan (fundamentalmente de forma electrostática) con las regiones próximas a los ejes de simetría binaria del interior la partícula viral (Fisher y Johnson, 1993; Tang *et al.*, 2001). Estos segmentos de ARN son cruciales para el plegamiento de la cápsida de estos virus siguiendo la simetría icosaédrica T=3, ya que las interacciones concretas ARN-cápsida aportan la alternancia necesaria entre enlaces planos y curvos (Schneemann, 2006). Un último ejemplo de virus cuyo ARN está interactuando con la cápsida, estabilizando la estructura, es el virus moteado clorótico del caupí (CCMV) (Speir *et al.*, 1995).

En la estructura cristalográfica de unos pocos virus ADN cs icosaédricos también se han observado interacciones cápsida-ácido nucleico genómico. Por ejemplo, en el bacteriófago Φ X174 se observó un 12-13% del ADN genómico unido a la cápsida. Estos segmentos visibles contactan con una proteína básica interna mediante interacciones electrostáticas (McKenna *et al.*, 1992). En las estructuras del parvovirus canino (CPV) y de MVM también se observan segmentos de varios nucleótidos que interactúan con la pared interna de la cápsida (Tsao *et al.*, 1991; Wu y Rossmann, 1993; Chapman y Rosmann, 1995; Xie y Chapman, 1996; Llamas-Saiz *et al.*, 1997; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Kontou *et al.*, 2005) (ver apartado 1.5.1). En nuestro laboratorio hemos demostrado que en MVM, la mutación a alanina de varios de los residuos aminoacídicos implicados en estas uniones entre cápsida y ADN vírico, que eliminan específicamente interacciones entre ambos (sin afectar a interacciones entre residuos de la cápsida) hacen al virión menos estable frente a la inactivación térmica de su infectividad (Reguera *et al.*, 2005).

En resumen, el ácido nucleico vírico puede establecer diferentes interacciones con las proteínas que forman la cápsida. En algunos virus, se ha demostrado que estas interacciones son importantes para la encapsidación del genoma, para el ensamblaje de la cápsida, y/o para el mantenimiento de la estabilidad conformacional de la misma.

1.2.3. Poros en cápsidas víricas

Las cápsidas de muchos virus icosaédricos contienen poros que comunican el interior del virión con el exterior. Estos poros se encuentran generalmente situados en alguno(s) de los diferentes tipos de ejes de simetría (quinarios, ternarios o binarios). Algunos de estos canales los encontramos en las cápsidas de muchos géneros de virus de plantas o animales, entre los que se encuentran los bromovirus (Liepold *et al.*, 2005), picornavirus (Hogle *et al.*, 1985; Rossmann *et al.*, 1985; Acharya *et al.*, 1989), reovirus (Zhang *et al.*, 2005), etc., y también en bacteriófagos (Cingolani *et al.*, 2002;

Guasch *et al.*, 2002; Agirrezabala *et al.*, 2005). La evidencia disponible indica que los poros de las cápsidas de algunos virus están sujetos a variaciones conformacionales, incluyendo su apertura y cierre. Para varios virus se ha demostrado que la traslocación de moléculas o partes de las mismas entre el interior y el exterior de la cápsida, que en muchos casos parece ocurrir a través de estos poros en alguna etapa del ciclo vírico (o en varias) es necesaria para la infectividad del virión (Hewat *et al.*, 1992; Chapman y Rossmann, 1993; Cotmore *et al.*, 1999; Hernando *et al.*, 2000; Lombardo *et al.*, 2002; Bernal *et al.*, 2003; Maroto *et al.*, 2004; Cotmore y Tattersall, 2005 y 2007; Bleker *et al.*, 2005; Liepold *et al.*, 2005; Farr *et al.*, 2006; Mani *et al.*, 2006; Sonntag *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010b; Parrish, 2010). En otros casos, cambios conformacionales en la partícula vírica producen aberturas transitorias en regiones discretas de las interfases entre subunidades, a través de los cuales también ocurren fenómenos de traslocación de moléculas con un papel en el ciclo vírico. Este es el caso de poliovirus, donde movimientos entre subunidades proteicas adyacentes en la cápsida crean fracturas a través de las cuales presumiblemente emergen la proteína viral VP4 y el Nt de VP1. En un modelo propuesto por los autores, los componentes proteicos así externalizados formarían un canal transmembrana a través del cual el RNA viral sería liberado en el interior de la célula infectada (Belnap *et al.*, 2000). La externalización de segmentos Nt también sucede por expansión de la cápsida en virus de plantas (Harrison *et al.*, 1987), tales como el virus de la atrofia de la tomatera (Robinson y Harrison, 1982) o el CCMV (Speir *et al.*, 1995), en los que se forman huecos visibles en la estructura de la cápsida incluso a baja resolución. Del mismo modo, durante la maduración de algunos bacteriófagos (King y Casjens, 1974) y herpesvirus (Baker *et al.*, 1990), las proteínas de andamiaje internas son expulsadas, creando un espacio necesario para acomodar el ADN entrante, y diversos epítomos son traslocados entre el interior y el exterior de la cápsida (Kistler *et al.*, 1978; Steven *et al.*, 1991). En el caso de FHV y rinovirus, aparentemente suceden cambios conformacionales reversibles similares a los de poliovirus, que median la externalización de componentes moleculares internos (Bothner *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 1998).

En la estructura atómica de diversos parvovirus (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993; Wu y Rossmann, 1993; Xie y Chapman, 1996; Simpson *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002), incluyendo MVM (Llamas-Saiz *et al.*, 1997; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Kontou *et al.*, 2005) se observan poros que parecen servir para la traslocación de segmentos peptídicos, y para la entrada (y tal vez salida) de la molécula de ADN cs genómico. Estos poros constituirían una estructura esencial en procesos dinámicos que se han demostrado importantes para la infectividad de estos parvovirus (Chapman y Rossmann, 1993; Cotmore *et al.*, 1999; Hernando *et al.*, 2000; Lombardo *et al.*, 2002; Maroto *et al.*, 2004; Cotmore y Tattersall, 2005 y 2007; Mani *et al.*

al., 2006). En nuestro laboratorio hemos encontrado que residuos situados en la base de estos poros son importantes para que ocurra un cambio conformacional de la cápsida observado por fluorescencia intrínseca y asociado con la traslocación de segmentos peptídicos (Carreira *et al.*, 2004; Reguera *et al.*, 2004); trabajos del grupo del Prof. P. Tattersall también ponen de manifiesto la importancia de residuos de la base de los poros en la infectividad de MVM (Farr y Tattersall, 2004; Farr *et al.*, 2006; Cotmore y Tattersall, 2007) (para más detalles, ver apartado 1.5). Otros autores también han descrito la relación que parece existir entre la pérdida de externalización de extremos Nt en parvovirus por mutaciones en la base de los poros y sus consecuencias en detrimento de la infectividad (Bleker *et al.*, 2005; Grieger *et al.*, 2007), aunque los mecanismos subyacentes no están todavía claros en ningún caso.

1.2.4. Cavidades en cápsidas víricas

Muchas proteínas contienen cavidades internas, que pueden ser identificadas por técnicas de modelado molecular [por ejemplo, mediante los programas CAST (Dundas *et al.*, 2006), CAVER (Petrek *et al.*, 2006), SURFNET (Laskowski, 1995) y MolAxis (Yaffe *et al.*, 2008a y 2008b)]. Aunque se ha propuesto que muchas de estas cavidades son una consecuencia estructural inevitable del plegamiento de las proteínas, existe evidencia de que algunas de estas cavidades, grandes o pequeñas, han sido biológicamente seleccionadas y ejercen diversas funciones en la proteína o complejo proteico que las contiene. En algunas proteínas oligoméricas, las cavidades pueden jugar un papel importante asistiendo cambios conformacionales (Vallone y Brunori, 2004). La comparación de proteínas homólogas en termófilos y mesófilos indica que un empaquetamiento optimizado promueve la estabilización térmica a expensas de la capacidad de dinamismo conformacional. Para aquellas proteínas que interaccionan con pequeños ligandos, algunas cavidades pueden jugar un papel en el control de la unión y la catálisis (Vallone y Brunori, 2004; Morini *et al.*, 2005; Temussi, 2006; Clare *et al.*, 2008). En el caso de algunas proteínas de membrana parece ser que la presencia de cavidades rellenas de agua, entre otros factores, podría facilitar la flexibilidad conformacional requerida, manteniendo una suficiente estabilidad estructural (Hildebrand *et al.*, 2008).

De modo semejante al de otras proteínas, las cápsidas víricas también presentan pequeñas cavidades enterradas en su estructura proteica. Algunos picornavirus, como el rinovirus humano y el virus de la polio, presentan bolsillos hidrofóbicos relativamente grandes. En el medio extracelular, estas cavidades se encuentran ocupadas por un compuesto lipídico natural (denominado *pocket factor*). El relleno de la cavidad atrapa al virión en un estado metaestable y dificulta un cambio conformacional de la cápsida que, de producirse en el medio extracelular, conduciría a

la pérdida de infectividad. Durante el reconocimiento virus-receptor celular, el factor es liberado, y el vaciado de la cavidad facilita ese mismo cambio conformacional, que al ocurrir sobre partículas asociadas a la célula hospedadora, conduce no a la inactivación de la partícula, sino a la entrada del virus y desencapsidación intracelular del material genético (Smith *et al.*, 1986; Chow *et al.*, 1997; Rossmann *et al.*, 1997). La asociación/disociación del *pocket factor*, por tanto, constituye un mecanismo para permitir que el virión sea lo suficientemente estable en el medio extracelular, pero lo suficientemente inestable en el medio intracelular.

Otros trabajos con el fago P22 indican que los defectos de empaquetamiento en la procápsida metaestable de este virus podrían facilitar los importantes reordenamientos conformacionales de las subunidades que ocurren durante la maduración del virus (de Sousa *et al.*, 1999). Los estudios de dinámica molecular realizados con el dominio de unión a ADN de ciertas proteínas estructurales de papilomavirus bovino cepa 1 sugieren que dicha unión viene facilitada por la presencia de cavidades hidratadas en el interior del barril β , que le confieren suficiente flexibilidad conformacional para adaptarse y unir moléculas de ADNs inespecíficos, más o menos rígidos (Falconi *et al.*, 2007).

En la estructura tridimensional del parvovirus CPV, el Prof. M. G. Rossmann y colaboradores observaron varias regiones pobremente empaquetadas, rodeadas por aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran conservados en parvovirus evolutivamente próximos a CPV, incluyendo MVM (Chapman y Rossmann, 1993) (ver apartado 1.5.1). Esta observación llevó a estos autores a proponer, aunque sin evidencia experimental, que estas regiones pobremente empaquetadas podrían facilitar el desensamblaje de la cápsida de parvovirus, de modo análogo a lo observado para rinovirus y picornavirus. La posible función de dos de estas cavidades (denominadas A y C) ha sido analizada mediante mutagénesis dirigida en nuestro laboratorio, utilizando MVM como modelo. Estos estudios revelaron que la inserción o eliminación de hasta tres grupos metileno (o de tamaño similar) en residuos que flanquean estas cavidades, modificando en consecuencia su tamaño y forma, no impedía el ensamblaje ni afectaba a la estabilidad de la cápsida. Sin embargo, el reordenamiento conformacional de la cápsida asociado a la externalización del segmento Nt de VP2 sí que se vio alterado en alguna medida por varias de las mutaciones diseñadas para modificar el tamaño o forma de la cavidad (Carreira y Mateu, 2006).

1.3. Propiedades mecánicas de proteínas y virus

La conexión física entre las células en un tejido está en parte mediada por diversas proteínas. El citoesqueleto es una estructura supramolecular resistente y adaptable formada por el ensamblaje de proteínas especializadas. La acción de los músculos está basada en las características de ciertas proteínas. En estos y otros casos, las proteínas implicadas y sus conexiones moleculares deben resistir un importante estrés mecánico, y/o deben ser capaces de realizar determinadas acciones mecánicas basadas en sus propiedades elásticas.

Las propiedades mecánicas de supramoléculas, incluyendo las partículas víricas, se han venido estudiando desde hace poco tiempo mediante aproximaciones teóricas muy simplificadas (ejemplos en Fisher *et al.*, 2000a; Zandi y Reguera, 2005; Schatz, 2007; Oelz *et al.*, 2008; Wagenseil y Mecham, 2009; Chan *et al.*, 2010; Frolov y Zimmerberg, 2010; Galli *et al.*, 2010; Mogilner y Craig, 2010). Aún más recientemente, se han comenzado a analizar experimentalmente las propiedades mecánicas de proteínas y complejos macromoleculares.

Hasta hace no mucho tiempo, los estudios biofísicos y bioquímicos se habían llevado a cabo casi exclusivamente mediante técnicas en masa. Este tipo de aproximaciones utilizan un gran número de moléculas en cada experimento, de forma que se observan las propiedades promedio del conjunto. Recientemente se han venido desarrollando técnicas y métodos muy especializados para el control y la manipulación molecular y atómica con una gran precisión, dando lugar a la aparición de nuevas tecnologías que permiten llevar a cabo experimentos con moléculas individuales. Entre estas técnicas podemos destacar las *i*) pinzas ópticas (Ashkin y Dziedzic, 1987), que permiten atrapar moléculas individuales mediante un haz láser y medir fuerzas del orden de pN; las *ii*) pinzas magnéticas (Gosse y Croquette, 2002), cuya sensibilidad en fuerzas puede ser superior a la de las pinzas ópticas; *iii*) el microscopio de fluorescencia (Peterman *et al.*, 2004), que permite observar la dinámica en tiempo real de moléculas y partículas individuales en la célula; y *iv*) el microscopio de fuerzas atómicas o AFM (Binning *et al.*, 1986).

Actualmente, el AFM constituye una herramienta fundamental para el estudio estructural y dinámico de la topografía y propiedades mecánicas de objetos biológicos individuales, desde proteínas a virus y células, en medio líquido y condiciones semejantes a las fisiológicas (Bustamante y Keller, 1995; Kasas *et al.*, 1997; de Pablo *et al.*, 1998; Carrión-Vázquez *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2000a; Janshoff *et al.*, 2000; Frederix *et al.*, 2003; Höber y Miles, 2003; Ikai *et al.*, 2003; Ivanovska *et al.*, 2004; Santos y Castanho, 2004; Hinterdorfer y Dufrêne, 2006; Del Sol *et al.*, 2007; Greenleaf *et al.*, 2007; Kol *et al.*, 2007; Trache y Meininger, 2008; Robert *et al.*, 2007; Kirmizis y Logothetidis, 2010; Scheuring y Dufrêne, 2010; Welte *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2010;

Fung *et al.*, 2011). Además, mediante tecnologías como las pinzas ópticas o el AFM se han comenzado a aportar las primeras evidencias experimentales de una relación entre las propiedades mecánicas de diversas macromoléculas y su función biológica (ejemplos en Carrion-Vazquez *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2000 a y b; Li *et al.*, 2000; Neuman y Nagy, 2008; Hodges *et al.*, 2009; García-Manyes y Sanz, 2010; Shank *et al.*, 2010).

1.3.1. Determinación de las propiedades mecánicas de proteínas y virus mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

Un AFM permite construir una imagen topográfica de un objeto individual, incluso muy pequeño (del orden de nm, como son los virus y otros complejos macromoleculares biológicos) a partir de la medida de la fuerza de interacción existente entre una sonda con forma de punta muy afilada (con un radio en su parte final de sólo algunos nm) y la superficie del objeto. El origen de las fuerzas de interacción es muy diverso y, dependiendo de las características de la superficie y de las condiciones en las que se trabaje (aire, vacío, líquido), algunas interacciones predominan sobre otras.

Una configuración típica de un AFM se muestra en la [Figura 1](#). La muestra se coloca sobre un soporte cuyo movimiento en las tres dimensiones del espacio, a muy pequeña escala, está controlado por la dilatación o contracción de un material piezoeléctrico en respuesta a un voltaje aplicado. Sobre el soporte con la muestra se sitúa una micropalanca elástica que termina en la punta que va a interactuar con la muestra. Se hace incidir un haz láser sobre el extremo de la micropalanca de forma que dicho haz es reflejado por la superficie de ésta y alcanza un fotodiodo. Mientras no existe interacción entre punta y muestra, el haz láser que incide sobre la micropalanca no varía su posición al proyectarse sobre el fotodiodo ([Figura 1b](#)). El desplazamiento del soporte a lo largo del eje z (mediante dilatación del piezoeléctrico), permite aproximar la muestra a la punta, de modo que se llega a establecer una interacción entre ellas ([Figura 1c](#)). Si se siguen aproximando la muestra y la punta, la interacción aumentará, y la micropalanca flexible se irá deformando. Esta deformación gradual es detectada en el fotodiodo porque va produciendo una desviación cada vez mayor del haz láser, y este hecho permite, mediante un sistema de retroalimentación que controla la dilatación del piezoeléctrico a lo largo del eje z, mantener la fuerza punta-muestra constante, mientras se barre la muestra a lo largo de los ejes horizontales x e y. El movimiento en z del piezoeléctrico que es necesario para mantener constante la fuerza de interacción entre la punta y la muestra se traduce en una medida de la altura de la muestra en cada punto conforme se barre la muestra en x e y, permitiendo la construcción de una imagen topográfica del objeto.

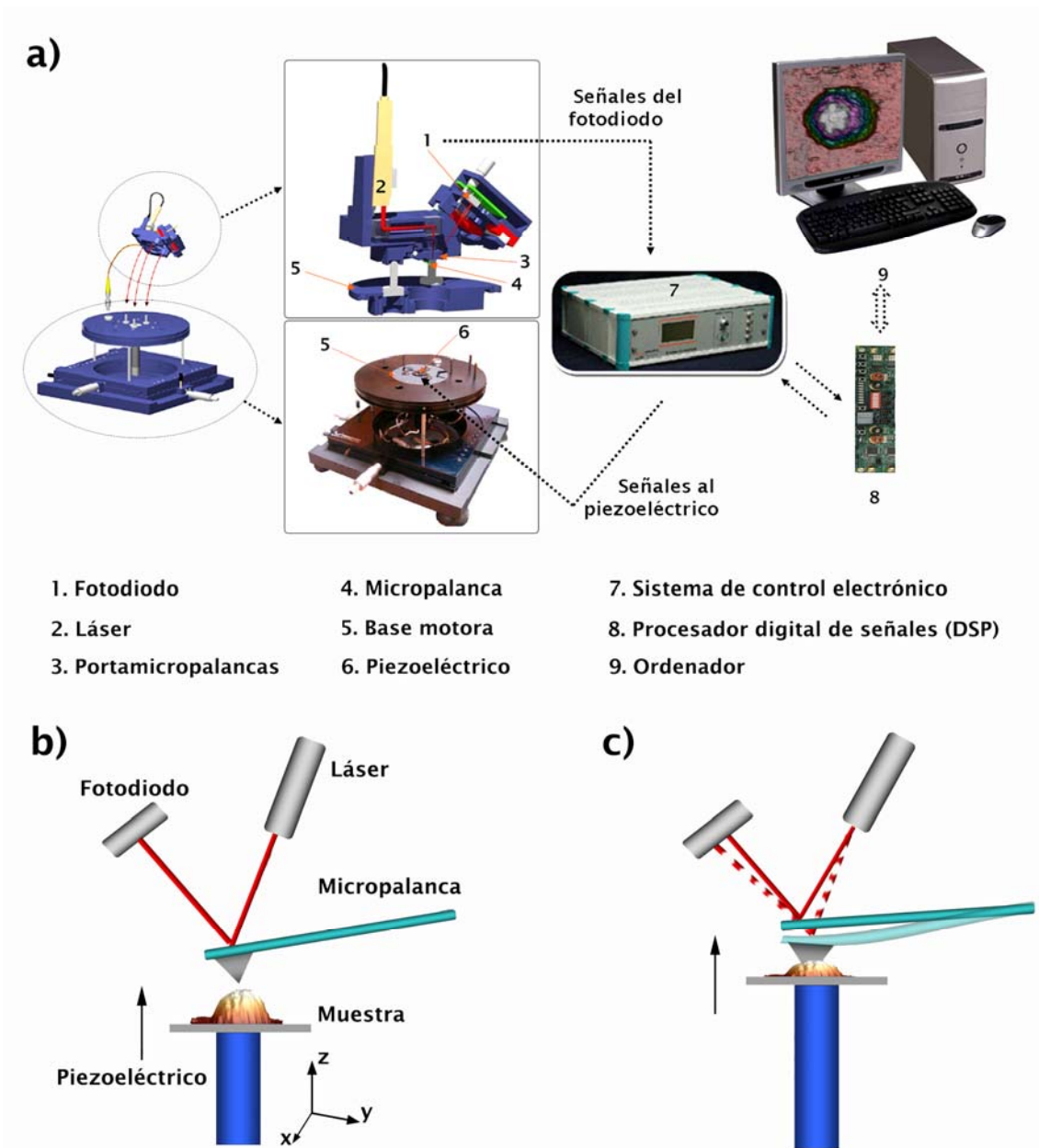


Figura 1. Esquema básico del funcionamiento de un AFM. a) Componentes básicos de un AFM. Para su descripción, ver texto (apartado 1.3.1). Imágenes adaptadas de la documentación suministrada por *Nanotec Electrónica S.L.* b), c), Operación de un AFM. b) No existe aún contacto entre punta y muestra. El haz láser que incide sobre la micropalanca se refleja sobre ella y llega al fotodiodo. c) Mediante el desplazamiento del piezoeléctrico a lo largo del eje z la muestra se aproxima a la punta situada en el extremo de la micropalanca. Cuando se establece el contacto punta-muestra y se continúa el movimiento de aproximación, la fuerza va aumentando y la micropalanca se va deformando progresivamente. La deformación de la micropalanca modifica la trayectoria del haz láser. En modo imagen, la desviación del haz sirve de guía a un sistema de retroalimentación que actúa sobre el movimiento del piezoeléctrico en z para mantener una fuerza constante predeterminada. El desplazamiento en z necesario para ello permite determinar la altura de la muestra en ese punto. La sucesión de estos eventos de contacto, que en el modo JM se realizan de modo intermitente sobre cada punto (x,y) en la

muestra, permite construir una imagen topográfica de la muestra. Esquema adaptado de Roos *et al.*, 2010.

Existen diversos modos de operación de un AFM para la obtención de imágenes, en los que intervienen diferentes tipos de fuerzas de interacción, y que presentan diferentes ventajas y desventajas según el tipo de muestra y las condiciones de medida. Uno de ellos, conocido como modo de salto o *Jumping Mode* (JM) (de Pablo *et al.*, 1998) es el normalmente utilizado para muestras biológicas (blandas), como complejos proteicos o virus, en condiciones fisiológicas (líquidos), dado que se pueden controlar y minimizar las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra, evitando así los daños irreversibles. Al no existir grandes fuerzas de adhesión en medio líquido, es posible utilizar micropalanca más blandas que preserven la integridad de la muestra. Con el método de JM es posible obtener imágenes de alta resolución (Engel y Müller, 2000; Moreno-Herrero, 2003; Moreno-Herrero *et al.*, 2004), así como determinar las propiedades mecánicas de sistemas biológicos en condiciones fisiológicas.

En el método JM se opera de modo en que el contacto punta-muestra es intermitente; es decir, se realiza un ciclo de aproximación y retracción completa entre muestra y punta en cada punto (x,y) de la muestra. El contacto intermitente punta-muestra minimiza así las fuerzas laterales de arrastre. Este ciclo de aproximación y retracción en un punto (x,y) permite, en el modo imagen, obtener una medida de la altura de la muestra en ese punto; además, mediante la realización de una indentación controlada y de la obtención de los valores experimentales de algunos parámetros, puede determinarse la elasticidad mecánica de la muestra en ese punto (ver más adelante).

La **Figura 2** muestra una curva de fuerza (denominada F_z) típica cuando se realiza un ciclo de aproximación y retracción entre muestra y punta. Se representa la señal obtenida en el aparato (voltios), que es proporcional a la fuerza, frente a la distancia en el eje z (nm) entre punta y muestra (Cappella y Dietler, 1999). Los diferentes puntos en la curva indican las variaciones en la fuerza conforme la punta se aproxima a la muestra (línea verde), entra en contacto con ella, la presiona, deformándose la micropalanca (y la muestra), y se retira (línea roja). El punto A en la curva corresponde a una situación en que punta y muestra no están aún en contacto y no existe fuerza de interacción entre ella. El punto B corresponde al momento en que punta y muestra entran en contacto, experimentando una leve fuerza atractiva que produce una ligera flexión hacia abajo de la micropalanca. Conforme la punta va presionando sobre la muestra, la fuerza de contacto va aumentando y la micropalanca experimenta una flexión creciente hacia arriba, hasta que se alcanza un valor seleccionado por el usuario (punto C). En este punto el sistema de realimentación se activa y el piezoeléctrico comienza a retraerse (línea roja). La fuerza ejercida disminuye

y la micropalanca se relaja pero, debido a las fuerzas de adhesión (F_{adh}), no se separa de la muestra al llegar a distancia límite de contacto, sino que permanece unida a ella y se flexiona en sentido contrario hasta llegar al punto D, en el que la fuerza producida por la flexión de la micropalanca es suficiente para vencer la adhesión. A partir de este momento la fuerza de interacción punta-muestra vuelve a ser nula y la palanca vuelve a su posición relajada. El piezoeléctrico continúa contrayéndose hasta que la distancia punta-muestra corresponde a la separación inicial (punto A), completando el ciclo. En la obtención de imágenes, se desplaza horizontalmente la muestra al siguiente punto (x,y), para realizar otra curva Fz .

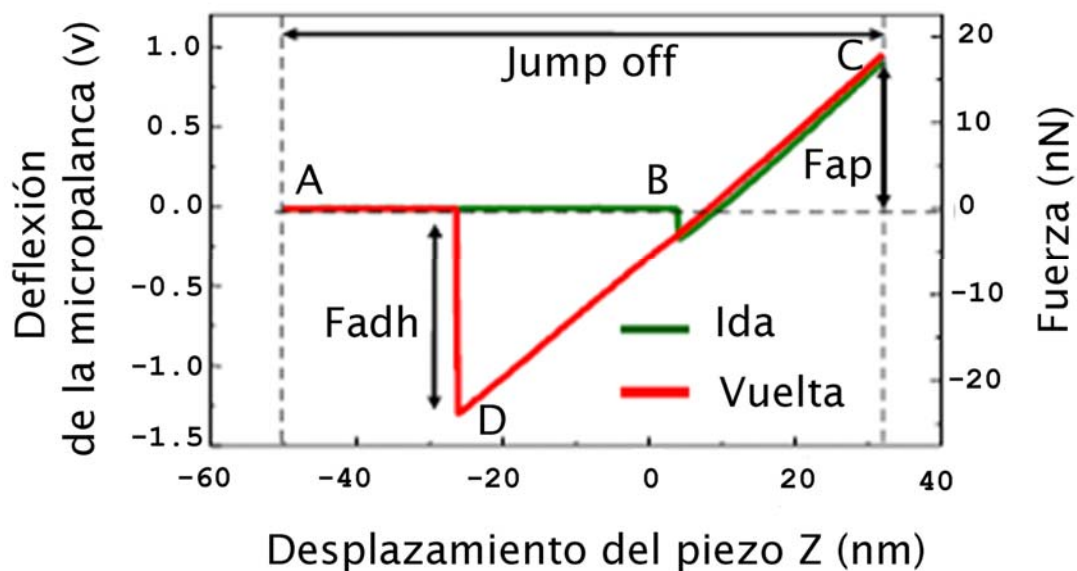


Figura 2. Explicación gráfica de una curva Fz . Para su descripción ver texto (apartado 1.3.1). Adaptado de Carrasco, 2008.

Para determinar la rigidez mecánica de un objeto (que puede ser o no biológico) mediante AFM, se utiliza en primer lugar el modo imagen para localizar el objeto, obtener una imagen topográfica del mismo, y situar la punta sobre el objeto, en la posición exacta deseada. A continuación se realiza una indentación sobre el objeto, presionando éste mecánicamente con la punta, y realizando una curva Fz (o varias) del modo que se acaba de describir, pero cuantificando los valores de fuerza y distancia. Tanto la micropalanca como cualquier muestra que no sea completamente rígida se deformarán en mayor o menor grado dependiendo de la fuerza aplicada y de su flexibilidad relativa.

Si el objeto fuera completamente rígido (por ejemplo, una superficie de vidrio utilizada como soporte para la muestra en AFM), al realizar la indentación únicamente se deformará la micropalanca, en una cantidad que dependerá de su grado de rigidez y de la fuerza aplicada. En las condiciones utilizadas en AFM, el comportamiento mecánico de la micropalanca se puede aproximar al de un muelle ideal cuya elasticidad viene dada por la ley de Hooke: $F=-kx$, donde F es la fuerza recuperadora del muelle, que equivale a la fuerza de interacción punta-muestra; k es la constante de recuperación del muelle, que equivale a la constante elástica de la micropalanca, y x es la deformación del muelle, que equivale al desplazamiento o flexión en la dirección vertical que sufre la micropalanca debido a las fuerzas de interacción. En estas condiciones, la micropalanca puede actuar como un sensor de fuerzas sencillo. Conociendo la constante elástica de la micropalanca, las fuerzas de interacción punta-muestra pueden ser determinadas a través de la medida de la flexión de la micropalanca, utilizando habitualmente para ello sistemas de detección óptica basados en la deflexión de un haz de radiación láser como se ha explicado antes (Meyer y Amer, 1988).

Si el objeto no es completamente rígido sino que presenta cierta elasticidad (por ejemplo una partícula vírica), tanto éste como la micropalanca se deformarán al aplicar la fuerza. Los estudios teóricos y experimentales realizados indican que las partículas víricas y otros objetos biológicos presentan un comportamiento mecánico que puede ser descrito mediante el modelo de cáscara elástica delgada (Landau y Lifshitz, 1986), donde se predice que la fuerza depende linealmente de la deformación hasta indentaciones del orden del espesor de la pared (Ivanovska *et al.*, 2004; Schaap *et al.*, 2006; Carrasco, 2008). En tal caso, el sistema de micropalanca y objeto (partícula vírica) en un experimento de indentación equivalen mecánicamente a un sistema de dos muelles ideales en serie (Figura 3a). En la Figura 3b se muestra un ejemplo de dos curvas Fz , una realizada sobre una superficie indeformable de vidrio y otra sobre una cápsida vírica deformable, en la que se aprecia un comportamiento lineal mientras no se supere un cierto grado de deformación. En esta situación, el experimento de indentación permite determinar directamente la constante elástica del sistema, y este dato y el valor de la constante elástica de la micropalanca (previamente determinado) permiten calcular la constante elástica del objeto, y por tanto su grado de rigidez mecánica. El procedimiento se describe en el apartado 3.15 de Métodos.

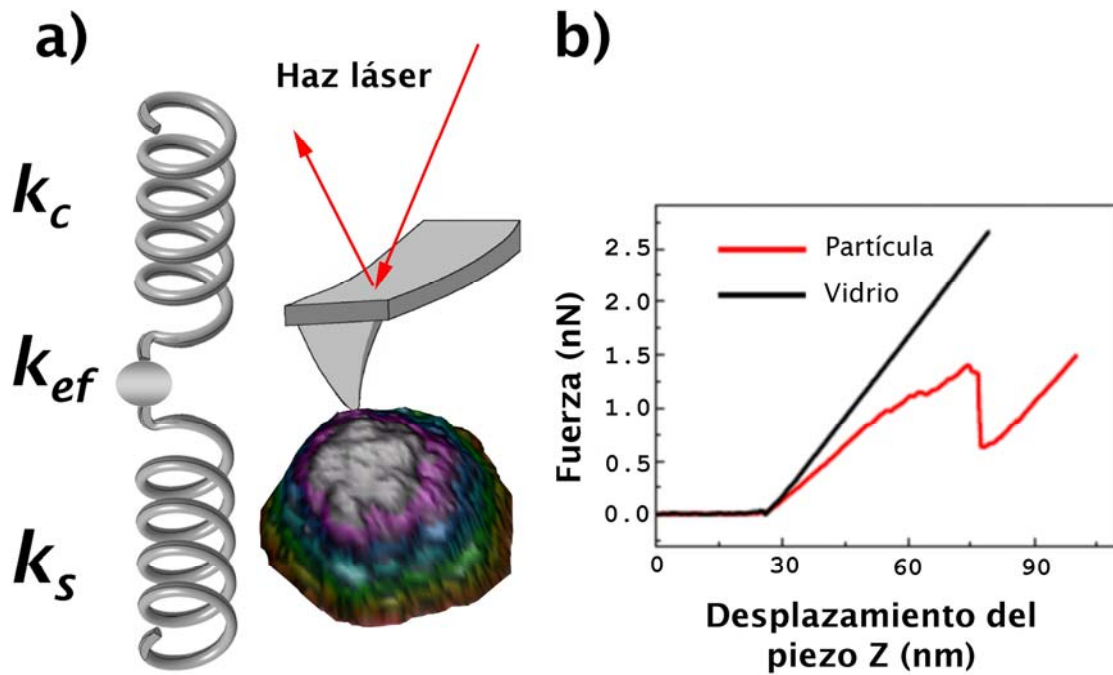


Figura 3. Realización de una curva Fz sobre una partícula vírica: partícula y micropalanca como un sistema de muelles en serie. a) La micropalanca y la partícula vírica se comportan como muelles con constantes elásticas k_c y k_s , respectivamente, y el conjunto equivale a un sistema de dos muelles en serie con una constante elástica efectiva (k_{ef}) que puede determinarse experimentalmente mediante la realización de una indentación sobre la partícula y la obtención de una curva Fz . b) Representación gráfica de dos curvas Fz , una sobre el soporte de vidrio indeformable (línea negra), y la otra sobre una partícula vírica deformable (línea roja). Para el cálculo de la constante elástica de la partícula vírica utilizando este sistema, consultar texto (apartado 3.15.5). Imagen adaptada de Carrasco, 2008.

1.3.2. Propiedades mecánicas de proteínas y complejos proteicos celulares

Una característica estructural que comparten la mayoría de las proteínas sometidas a estrés mecánico, por ejemplo proteínas implicadas en adhesión celular, es que contienen múltiples dominios con plegamiento independiente (Carrion-Vazquez *et al.*, 2000). La estabilidad mecánica de cada dominio parece estar determinada en gran parte por su patrón de puentes de hidrógeno, y correlaciona con su estabilidad cinética más que con su estabilidad termodinámica (Carrion-Vazquez *et al.*, 2000; Bischof y He, 2005). La elasticidad de estas proteínas multidominio viene determinada por el plegamiento y desplegamiento de los dominios individuales en respuesta a la aplicación de fuerzas mecánicas, provocando un importante estiramiento o contracción

de la molécula (Urry y Parker, 2002; Silva, 2005; Linke y Grützner, 2008; Frederix *et al.*, 2009).

Además de proteínas implicadas en adhesión celular, se están estudiando actualmente las propiedades mecánicas de proteínas implicadas en el movimiento muscular, microtúbulos y otros componentes del citoesqueleto (Carrasco, 2008), el huso mitótico (Mogilner y Craig, 2010), etc. Se comienza a estudiar también la mecánica molecular durante la organogénesis embrionaria (Gjorevski y Nelson, 2010) y pulmonar (Warburton *et al.*, 2010), la reorganización nuclear (Lombardi y Lammerding, 2010), o la de los sistemas bacterianos (Bolshakova *et al.*, 2004). También se están estudiando procesos de reconocimiento molecular desde el punto de vista mecánico (Allison *et al.*, 2002; Hinterdorfer y Dufrêne, 2006; Dufrêne y Hinterdorfer, 2008; Sotres *et al.*, 2008; Barrantes *et al.*, 2009). La mecánica biomolecular y celular constituye una nueva área de investigación multidisciplinar de importantes consecuencias básicas y aplicadas (Häberle *et al.*, 1992; Kuznetsov *et al.*, 2003; Fletcher y Mullins, 2010; Kirmizis y Logothetidis, 2010).

1.3.3. Propiedades mecánicas de virus

La evolución ha producido partículas víricas que son capaces de resistir, hasta cierto punto, múltiples agresiones físico-químicas en el entorno extracelular, incluyendo temperaturas elevadas, cambios de pH, irradiación desde fuentes diversas, o deshidratación parcial (ver por ejemplo, Chiu *et al.*, 1997; Moody, 1999; Hernando *et al.*, 2000; Prigent *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2009; Serena *et al.*, 2009). Algunos estudios teóricos recientes, apoyados por una evidencia experimental aún extraordinariamente escasa y poco concluyente, indican que los viriones están contruidos de manera que puedan resistir además un importante estrés mecánico, al que estarían sometidos tanto por su propia constitución como por la acción de agentes externos (Kindt *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001; Cordova *et al.*, 2003; Evilevitch *et al.*, 2003; Purohit *et al.*, 2003; Zandi *et al.*, 2004; Ivanovska *et al.*, 2004; van der Schoot y Bruinsma, 2005; Zandi y Reguera, 2005; Ivanovska *et al.*, 2007). La investigación experimental de las propiedades mecánicas de los virus y sus implicaciones biológicas se ha iniciado sólo muy recientemente, pero promete contribuir a una mejor comprensión de los virus como máquinas biológicas, y al diseño y construcción de partículas víricas o no víricas con las propiedades mecánicas adecuadas para diversos fines nanobiotecnológicos (ver más adelante).

Entre los primeros estudios experimentales relacionados con la mecánica de virus se encuentran los realizados por el grupo del Prof. C. Bustamente sobre las fuerzas que intervienen en el empaquetamiento del ADN cd en el bacteriófago $\Phi 29$ (Smith *et al.*, 2001; Hugel *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010). En este virus, la molécula de

ADN se encuentra fuertemente condensada, alcanzando casi la misma densidad que en un cristal molecular (Tao *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos mediante la tecnología de pinzas ópticas permitieron determinar la fuerza que el motor molecular del fago debe ejercer contra el gradiente de energía para permitir la encapsidación del genoma, y estimar que la presión ejercida por el ADN de dentro hacia fuera del virus debe ser muy elevada, del orden de 6 MPa (Smith *et al.*, 2001). Por tanto, la cápsida de este virus debe ser lo suficientemente robusta desde el punto de vista mecánico como para soportar la elevada presión ejercida por el ADN en su interior.

El estudio pionero sobre la rigidez mecánica de un virus fue iniciado por el Dr. P. J. de Pablo hace muy pocos años. Ivanovska, de Pablo y sus colegas en el grupo del Prof. C. Schmidt utilizaron AFM para la determinación de la constante elástica del fago $\Phi 29$ en experimentos de nanoindentación (Ivanovska *et al.*, 2004). Este estudio permitió definir por primera vez el grado de rigidez/flexibilidad de una partícula vírica, y estimar que la tensión de rotura de la cápsida sería de unos 0,33 GPa, es decir casi dos órdenes de magnitud superior a la presión interna ejercida por el ADN.

Más recientemente, diversos grupos han realizado diversos estudios mediante AFM encaminados a la determinación de propiedades mecánicas de virus muy diferentes, tanto sin envuelta como con envuelta y con cápsidas de diferentes simetrías. Los modelos virales utilizados incluyen $\Phi 29$ (Carrasco *et al.*, 2011), MVM (Carrasco *et al.*, 2006, 2008), el fago λ , (Evilevitch *et al.*, 2003; Ivanovska *et al.*, 2007; Evilevitch *et al.*, 2011), el CCMV (Michel *et al.*, 2006), el virus de la leucemia murina (MLV), el VIH (Kol *et al.*, 2006 y 2007), el virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) (Liashkovich *et al.*, 2008), el virus de la hepatitis B (HBV) (Arkhipov *et al.* 2009) y norovirus (Cuellar *et al.*, 2010) como modelos (ver revisiones en Roos *et al.*, 2007 y Roos y Wuite, 2009). Los resultados indican que las propiedades mecánicas de las partículas víricas pueden depender de factores muy variados. Por ejemplo, del grado de interacción entre subunidades de la cápsida (Arkhipov *et al.*, 2009) del entorno iónico o el pH (Cuellar *et al.*, 2010; Zink y Grubmüller, 2010). También del mecanismo de ensamblaje de la cápsida y de empaquetamiento del genoma viral (Roos *et al.*, 2007), así como del estadio de maduración de la partícula viral (Kol *et al.*, 2006).

En 2005, poco después del ya mencionado estudio pionero sobre propiedades mecánicas de virus, y poco antes del inicio del presente trabajo, se estableció una colaboración entre nuestro grupo y el Dr. de Pablo y su equipo en el grupo del Prof. Julio Gómez-Herrero del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad Autónoma de Madrid. Un objetivo principal fue tratar de relacionar algunos resultados que nuestro grupo había obtenido sobre estabilidad y dinámica conformacional del virus MVM, ya comentados brevemente en esta Introducción (final de los apartados 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 y 1.2.4) con sus propiedades mecánicas, un aspecto entonces desconocido no sólo para MVM, sino para cualquier virus (excepto el

fago $\Phi 29$). Un segundo objetivo fundamental fue determinar si existe una relación entre las propiedades mecánicas y el funcionamiento biológico de un virus.

En un primer estudio conjunto, demostramos que la presencia del ADN cs vírico rigidifica de modo anisotrópico el virión de MVM, comparado con la cápsida desprovista de ADN (Carrasco *et al.*, 2006). La cápsida vacía presenta la misma rigidez/flexibilidad cuando se presiona en cualquiera de las tres direcciones fundamentales (a lo largo de los ejes de simetría quinaria (S5), ternaria (S3) o binaria (S2)). En cambio, el virión, que presenta exactamente la misma estructura tridimensional que la cápsida, y que difiere sólo en la presencia del ADN en su interior, resultó ser un 40% y 140% más rígido cuando se presiona en las direcciones de los ejes de simetría S3 y S2 respectivamente sin que se alterara su rigidez en la dirección de los ejes S5, con respecto a la cápsida vacía (Carrasco *et al.*, 2006). Estos primeros resultados sobre propiedades mecánicas de MVM se han continuado y expandido en el presente trabajo en colaboración con el grupo del Dr. De Pablo, y se han relacionado con aspectos de estabilidad y dinámica conformacional y con el funcionamiento biológico de este virus.

1.4. Modificación de la estabilidad física de partículas víricas para aplicaciones nanobiotecnológicas

Nanociencia y nanotecnología son campos multidisciplinarios donde convergen la física, la química, la biología, la medicina, la ingeniería, la informática, la electrónica, la ciencia de materiales, etc. La nanociencia se dedica a la caracterización y comprensión de materiales y dispositivos a escala nanométrica; la nanotecnología contempla el diseño, la fabricación, modificación y manipulación de estructuras y dispositivos que presenten nuevas propiedades y funciones, mediante el control de sus propiedades a escala nanométrica. Los campos de aplicación de la nanotecnología incluyen la medicina, la biotecnología, la electrónica, la cosmética, la tecnología de las comunicaciones, la informática, el medio ambiente, la industria textil, etc.

Nanociencia y nanotecnología ofrecen a la biología conceptos provenientes de otras áreas de la ciencia y nuevas herramientas de trabajo; por ejemplo, el AFM. A su vez, la biología ofrece a la nanotecnología los conocimientos que vienen siendo adquiridos sobre complejos biomacromoleculares, entendidos como nanomáquinas naturales capaces de autoensamblarse y de realizar acciones mecanoquímicas sofisticadas. Entre estas nanomáquinas biológicas se cuentan de modo muy relevante las partículas víricas. Su utilización, una vez adecuadamente modificadas mediante ingeniería química y/o genética promete tener múltiples aplicaciones en nanobiotecnología. Sus usos potenciales incluyen el desarrollo de nuevas vacunas, vectores para terapia génica y liberación dirigida de fármacos, agentes de contraste en

técnicas de imagen en medicina, bloques de construcción para materiales nanoestructurados y dispositivos electrónicos y magnéticos, etc. (revisado en Mateu, 2011).

Para muchas de estas aplicaciones, la mejora de la estabilidad física de las partículas víricas podría resultar crítica a la hora de satisfacer de forma adecuada las demandantes condiciones fisicoquímicas que van a encontrar durante su producción, almacenamiento y/o utilización médica o industrial. Apenas existen trabajos encaminados a incrementar la estabilidad física de partículas víricas. No está clara la relación, si es que la hay, entre estabilidad térmica y estabilidad mecánica de una partícula vírica, ni entre estabilidad y dinámica conformacional y estabilidad mecánica. Los conocimientos existentes sobre los determinantes moleculares de la estabilidad y dinamismo conformacional de partículas víricas (apartado 1.2) nos han llevado a realizar mediante diseño racional y técnicas de ingeniería de proteínas viriones modificados de FMDV que presentan una mayor estabilidad frente a la disociación térmica en subunidades (Mateo *et al.*, 2008). La capacidad de alterar racionalmente la estabilidad física, térmica o mecánica, de partículas víricas con fines nanobiotecnológicos está aún esencialmente por explorar, y este es un aspecto que también hemos contemplado en el desarrollo del presente trabajo.

1.5. El virus diminuto del ratón

Los estudios que se llevan a cabo en nuestro laboratorio sobre determinantes moleculares del ensamblaje, estabilidad y dinamismo conformacional de partículas víricas utilizan tres virus modelo, FMDV, MVM y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), según el objetivo concreto planteado en cada estudio. En el presente trabajo se utiliza el parvovirus MVM como modelo para estudiar algunos aspectos estructurales y, especialmente, propiedades mecánicas de partículas víricas, y su posible relación con la estabilidad y dinámica conformacionales y función biológica de las mismas.

La elección de MVM para este estudio se debió principalmente a su simplicidad, la disponibilidad de su estructura atómica, la posibilidad de obtener cápsidas vacías y partículas semejantes a cápsidas (*Virus-Like Particle*, VLPs), y el notable conocimiento adquirido sobre su biología molecular, trabajo en el que destacan los grupos de los Profs. P. Tattersall y J. M. Almendral. Todo el trabajo que hemos venido realizando en nuestro laboratorio sobre MVM ha sido posible y se ha apoyado, en especial, en la ayuda científica y técnica suministrada por el grupo del Prof. Almendral, en una colaboración establecida entre nuestro grupo y el suyo desde hace unos 10 años. Para una revisión general de las características de MVM y del género parvovirus, consultar Almendral, 2006. En este apartado se revisan únicamente algunos aspectos de la

biología estructural y molecular de MVM más relacionados con la investigación que constituye esta Tesis Doctoral.

1.5.1. Estructura de MVM

La familia *Parvoviridae* está compuesta por virus animales pequeños, esféricos y sin envuelta cuyo genoma es una molécula de ADN cs lineal. Esta familia está formada por tres géneros: Parvovirus (parvovirus autónomos), Dependovirus (virus adenoasociados) y Densovirus (parvovirus de insectos). MVM es un parvovirus autónomo, al igual que CPV, FPV o el parvovirus humano B19. MVM posee dos estirpes serológicamente indistinguibles, que comparten un 97% de identidad de secuencia en su genoma (Astell *et al.*, 1986): la cepa prototipo (MVMp, utilizada en este trabajo) que infecta fibroblastos murinos (Crawford, 1966) y la cepa inmunosupresora (MVMi), que infecta linfocitos (Bonnard *et al.*, 1976; Engers *et al.*, 1981), precursores hematopoyéticos (Segovia *et al.*, 1991, 1995 y 1999) y varios tipos celulares del sistema nervioso central (Ramírez *et al.*, 1996).

La estructura del virión de MVM (Llamas-Saiz *et al.*, 1997; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Kontou *et al.*, 2005) es similar a la de otros parvovirus como CPV (Tsao *et al.*, 1991; Wu y Rossmann, 1993), FPV (Agbandje *et al.*, 1993), PPV (Simpson *et al.*, 2002), parvovirus humano B19 (Kaufmann *et al.*, 2004) y AAV-2 (Xie *et al.*, 2002). Las cápsidas de ambas estirpes de MVM (MVMp y MVMi) difieren únicamente en 14 aminoácidos por subunidad, por lo que la estructura del virión es extremadamente similar en ambos casos (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Kontou *et al.*, 2005).

Estructura de la cápsida de MVM. La cápsida de MVM (**Figura 4**), como la de otros parvovirus, tiene unos 25 nm de diámetro, presenta simetría icosaédrica T=1 (sin cuasiequivalencia; Caspar y Klug, 1962) y está formada por 60 subunidades proteicas a las que contribuyen tres cadenas polipeptídicas (VP1, VP2 y VP3), que difieren en la longitud de sus segmentos Nt, pero que por lo demás presentan la misma secuencia e idéntico plegamiento (**Figura 5**). La proteína VP2, de 587 aminoácidos y 64KDa, es mayoritaria y puede formar VLPs que presentan una estructura y propiedades esencialmente iguales a las de cápsidas vacías auténticas, excepto en lo relacionado con la presencia de la extensión Nt en VP1, ausente en las VLPs (Hernando *et al.*, 2000; Kontou *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). La proteína VP1 (unas 9 copias por cápsida), de 84KDa, es igual que VP2 (ambas se forman por procesamiento alternativo del mismo preARN, Cotmore y Tattersall, 1987) pero presenta una extensión Nt de 142 aminoácidos. En los viriones, un segmento Nt de unos 20 aminoácidos en algunas subunidades de VP2 es eliminado proteolíticamente durante la internalización en la célula hospedadora, generando la proteína VP3 (Paradiso, 1981; Tullis *et al.*, 1992; Cotmore y Tattersall, 2007; Cotmore *et al.*, 2010).

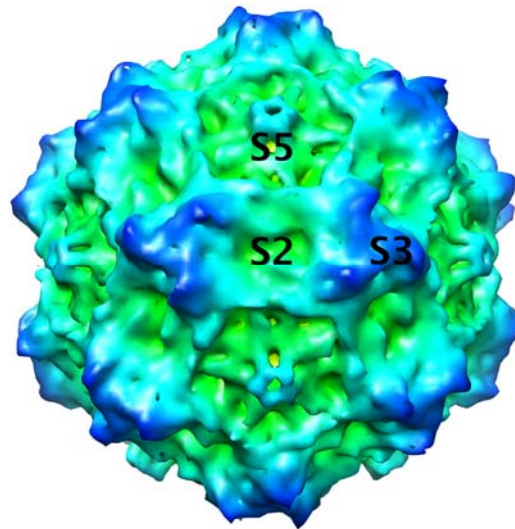


Figura 4. Estructura del virión de MVM. Modelo de superficie del virión de MVM, basado en su estructura cristalográfica (Kontou *et al.*, 2005). Se han filtrado las coordenadas 1Z1C a resolución de 9Å con el programa *EMAN pdb2mrc* (Ludtke *et al.*, 1999) y se han representado mediante el programa *Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004), con la ayuda del Dr. M. Alcorlo. S5, S3 y S2 indican la posición de un eje de simetría quinario, ternario y binario, respectivamente.

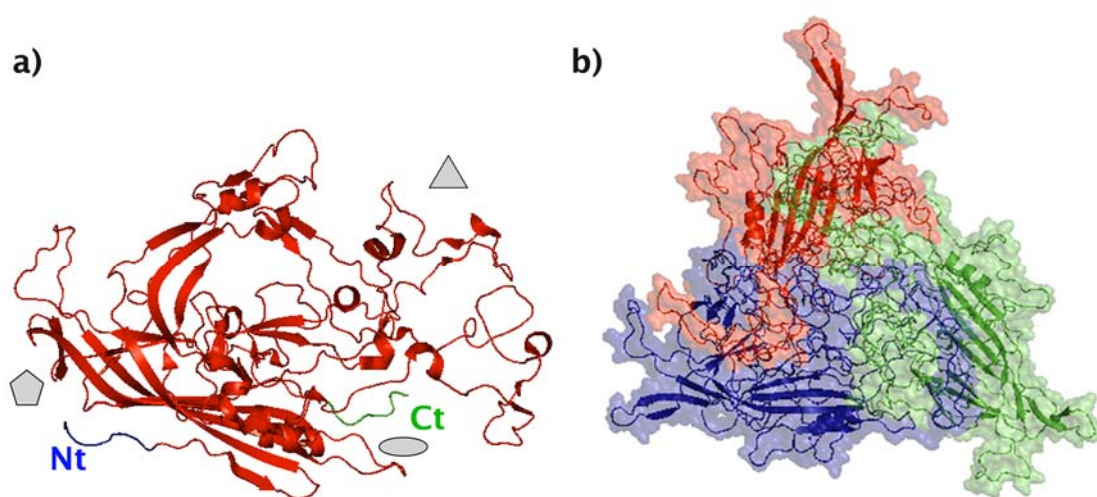


Figura 5. Estructura de VP2 y de un trímero de subunidades en la cápsida MVM. a) Estructura de VP2 representada en modelo de cintas. Se resaltan los extremos amino terminal (Nt, azul) y carboxilo terminal (Ct, verde), y la orientación de la proteína con respecto a ejes de simetría S5 (pentágono), S3 (triángulo) y S2 (elipse) en la cápsida. b) Estructura en el virión de MVM de un trímero formado por la asociación de tres VPs, que se representan en modelo de cintas y resaltan en rojo, verde y azul.

Este procesamiento puede ser imitado *in vitro* mediante digestión con varias proteasas, aunque el punto de corte no es el mismo que *in vivo* (Tattersall *et al.*, 1977).

Cada una de las 60 proteínas equivalentes de la cápsida de MVM contiene un barril β formado por ocho cadenas antiparalelas, un tipo de plegamiento presente en la mayoría de cápsidas víricas icosaédricas conocidas (Rossmann y Johnson, 1989). Sin embargo, en MVM y otros parvovirus estas cadenas β están interconectadas por bucles inusualmente largos. Algunos de estos bucles de estructura compleja, pertenecientes a subunidades vecinas, se interdigitan alrededor de los ejes de simetría ternaria, originando protuberancias denominadas *espículas*. Además de las espículas en los ejes ternarios y las estructuras cilíndricas en los quinarios, en MVM y otros parvovirus destaca la presencia de una depresión o *cañón* de 11 Å de profundidad, que rodea cada eje de simetría quinaria, y de otra depresión situada en cada eje de simetría binaria (Figura 6) (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1994; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998).

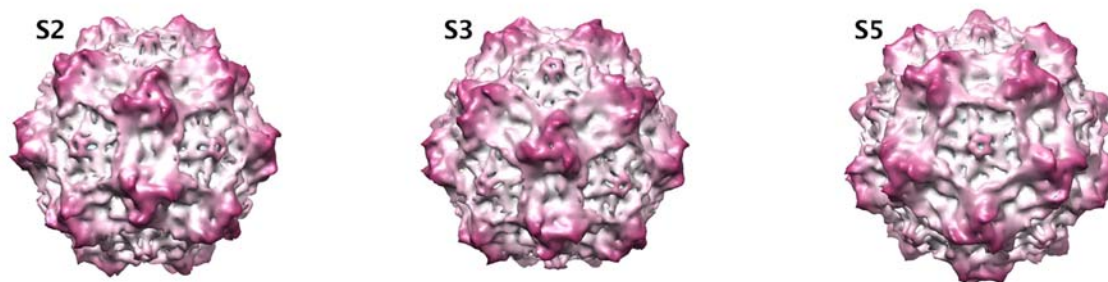


Figura 6. Estructura del virión de MVM orientado de modo que presente, en el centro de la imagen, un eje de simetría S2 (izquierda), S3 (centro) o S5 (derecha). Las imágenes se obtuvieron como se indica en la leyenda de la Figura 4.

Estructura de poros y segmentos ricos en glicina en la cápsida de MVM. En VPs de MVM y otros parvovirus, la inserción presente entre las cadenas β D y E forma una horquilla β antiparalela que, junto con las correspondientes a otros cuatro polipéptidos vecinos, crea una estructura cilíndrica que rodea cada eje de simetría quinario (Figura 7). Dicha estructura se encuentra atravesada por un canal o poro, de 8 Å de diámetro en su parte más estrecha, que comunica el interior de la cápsida con el exterior. Los segmentos correspondientes a los primeros 37 residuos de VP2, o a los primeros 179 residuos de VP1, no son visibles en la estructura cristalográfica de MVM. Sin embargo, el mapa de densidad electrónica del virión muestra la presencia de densidad difusa en los poros, que parece corresponder con un segmento rico en glicinas presente en los

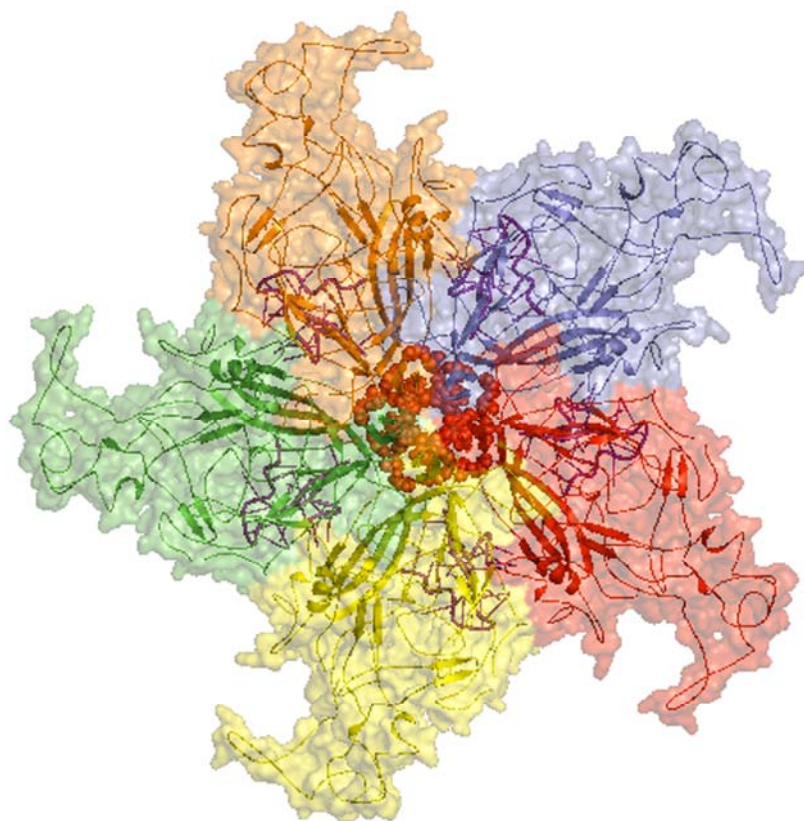


Figura 7. Poros en la cápsida de MVM. Modelo de superficie y cintas de 5 VPs (en diferentes colores) rodeando un eje S5 en el virión de MVM, basado en la estructura cristalográfica de éste (Kontou *et al.*, 2005). En modelo de esferas y color rojo se resaltan los residuos que rodean la base de un poro de la cápsida (centro de la imagen).

Nt de VP2 y VP1 (residuos 28-38 en VP2) (Wu *et al.*, 1993; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998), muy conservado en el género parvovirus (Tsao *et al.*, 1991; Chapman y Rossmann, 1993). Estas observaciones estructurales son muy similares a las realizadas con el parvovirus CPV (Tsao *et al.*, 1991); en cambio, el poro aparece cerrado en la estructura del parvovirus humano B19, (Agbandje *et al.*, 1994; Chipman *et al.*, 1996), evolutivamente más distante. En viriones MVM purificados, la accesibilidad del Nt de VP2 a anticuerpos específicos contra este segmento y la no accesibilidad de funciones localizadas en el Nt de VP1, entre otras evidencias, indican que en el virión extracelular el segmento Nt la proteína que ocupa el poro es el de VP2 (Farr y Tattersall, 2004).

La externalización sucesiva de los segmentos Nt de VP2 y Nt de VP1 en el virión de MVM es necesaria para la realización de diferentes etapas del ciclo vírico (ver apartado 1.5.2). Estos procesos de traslocación parecen ocurrir precisamente a través de los poros situados en los ejes S5. Además de la evidencia estructural mencionada más arriba, la implicación del poro en la externalización de VP2 viene apoyada por nuestro

análisis mutacional, ya mencionado (apartado 1.2.3) de residuos situados en la base del poro. La mutación a alanina de estos residuos, pero no de otros localizados igualmente en las interfases entre subunidades trimericas pero alejados de la base del poro, impiden un cambio conformacional de la cápsida de MVM asociado con la externalización de VP2 y eliminan la infectividad del virión (Reguera *et al.*, 2004). La mutación de L172 situada también en la base del poro produjo igualmente efectos desfavorables sobre la externalización de Nts y sobre la infectividad (Farr y Tattersall, 2004; Farr *et al.*, 2006; Plevka *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que la correcta traslocación de los Nt de VPs en MVM y otros parvovirus relacionados puede depender de la presencia de los segmentos ricos en glicina (Wu *et al.*, 1993). Según un modelo hipotético (Cotmore y Tattersall, 2005), el poro debería abrirse para permitir el paso de los aminoácidos de cadena lateral voluminosa situados en el extremo Nt de VP2 y VP1. Tras la salida del Nt por el poro, al introducirse en el canal el segmento rico en glicinas que viene a continuación, la ausencia de cadenas laterales permitiría que el poro se cerrara de nuevo. No obstante, hasta la fecha no existía evidencia experimental en apoyo de un papel del segmento rico en glicinas en el ciclo viral.

La encapsidación del ADN genómico de MVM, y quizá su desencapsidación, podrían ocurrir igualmente a través del poro situado en uno de los ejes quaternarios. Algunas evidencias a este respecto para el caso de MVM surgen del estudio de la parte más estrecha del poro, delimitada por el residuo L172 de las 5 subunidades VP2 implicadas. Dicho residuo está conservado en parvovirus, y su mutación a triptófano da lugar a partículas incapaces de encapsidar el ADN (Farr y Tattersall, 2004). La reciente caracterización estructural de este mutante mediante cristalografía de rayos X muestra tanto un desplazamiento respecto al wt del Nt de VP2 como una disminución en el diámetro del poro, que podría explicar las dificultades para la encapsidación (Plevka *et al.*, 2011). Otra evidencia que apoya la implicación de estos poros en la entrada del ADN en la cápsida de un parvovirus proviene de un estudio con el virus adeno asociado de tipo 2 (AAV-2), en el que se describen mutaciones en aminoácidos próximos al poro que causan una disminución de la interacción de la cápsida con las proteínas Rep, lo que produce un defecto en el empaquetamiento del genoma (Bleker *et al.*, 2006).

Estructura de cavidades en la cápsida de MVM. Además de los poros, se han observado otras estructuras huecas en la cápsida de parvovirus, en forma de regiones pobremente empaquetadas localizadas en el interior del núcleo hidrofóbico de cada subunidad (Figura 8). Las mayores de estas cavidades presentan forma irregular, un tamaño suficiente para albergar varias moléculas de agua y están, en general, rodeadas por aminoácidos muy conservados (Chapman y Rossmann, 1993). Nuestro análisis mutacional de las mayores cavidades en MVM, ya mencionado (apartado 1.2.4)

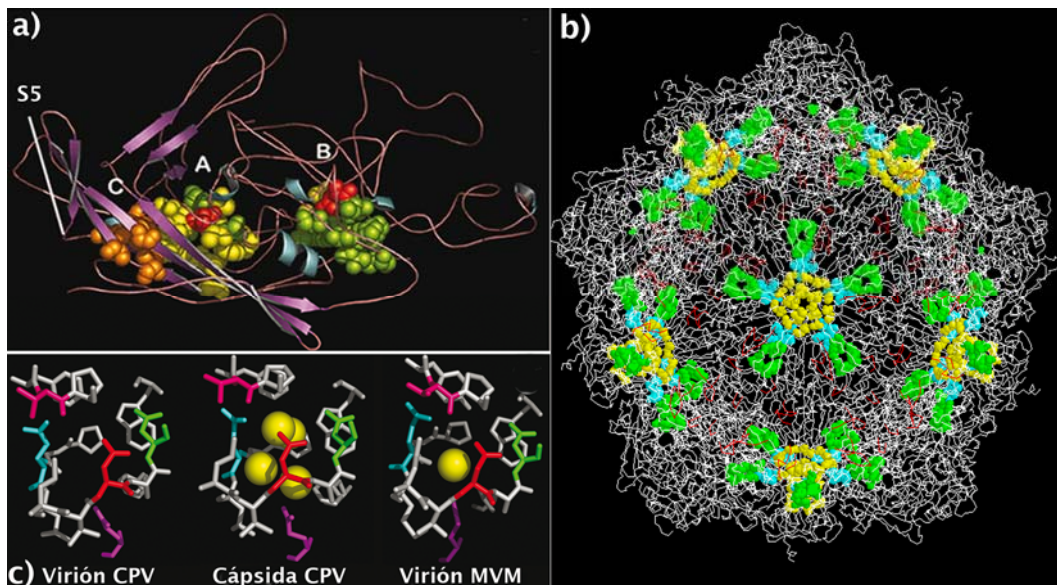


Figura 8. Cavidades en la cápsida de MVM. a) Localización de diferentes cavidades en la estructura de una subunidad de la cápsida. VP2 se representa en modelo de cintas. Los bucles localizados en la parte superior forman la mayor parte de la superficie externa de la cápsida. La barra blanca indica un eje S5 en el virión. Los aminoácidos que delimitan las cavidades A, B o C se muestran en modelo de esferas y con el siguiente código de colores: Cavidades A y B: amarillo, verde, rojo, residuos cuya cadena lateral es principalmente hidrofóbica, o neutra, o polar, respectivamente; naranja, residuos de la cavidad C (todos hidrofóbicos). b) Modelo de armazón del virión de MVM. Los aminoácidos que delimitan las cavidades A o C, o los que se sitúan en la base de los poros, se muestran en modelo de esferas y colores verde, azul y amarillo, respectivamente. c) Comparación de la cavidad A en el virión y la cápsida vacía de CPV y en el virión de MVM. Los residuos con cadenas laterales fundamentalmente hidrofóbicas se muestran en gris; los residuos con cadenas polares se han coloreado, haciéndolos coincidir en cada caso con el residuo equivalente en las otras dos estructuras. Las moléculas de agua en la cavidad A se representan como esferas amarillas. Figura adaptada de Carreira y Mateu, 2006.

indica que la conservación de la forma y tamaño de estas cavidades puede ser necesaria para adecuada realización de un cambio conformacional de la cápsida relacionado con la correcta externalización del Nt de VPs (Carreira y Mateu, 2006).

Interacciones cápsida-ácido nucleico en el virión de MVM. Aunque la mayoría de la molécula de ADN viral es invisible en la estructura cristalográfica del virión de MVM, algunos segmentos (que dan cuenta de un 34% del genoma) se disponen siguiendo la misma simetría que la cápsida, siendo de este modo visibles en el modelo cristalográfico (Figura 9). Cada uno de los segmentos de ADN adopta una conformación plegada a modo de cuña, que se introduce parcialmente en un bolsillo de la pared interna de la cápsida e interacciona, principalmente mediante el

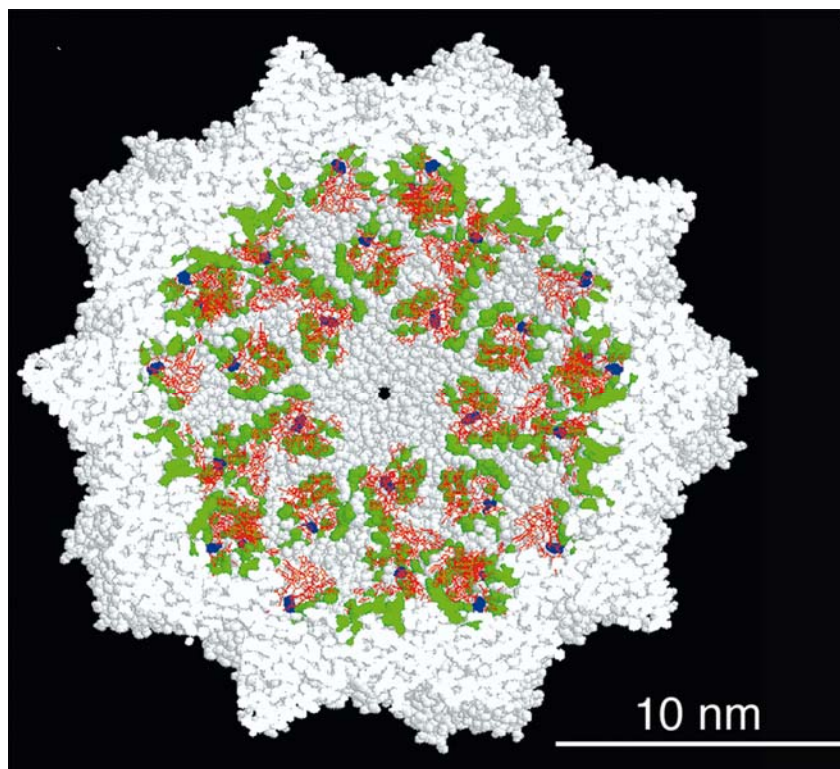


Figura 9. Segmentos de ADN unidos a la pared interna de la cápsida en el virión de MVM. Se muestra un corte transversal de un modelo de van der Waals de la estructura del virión de MVM (Kontou *et al.*, 2005). Los segmentos visibles de ADN (en rojo) están unidos a residuos de aminoácidos (en verde y azul) situados en posiciones geométricamente equivalentes en la pared interna de la cápsida. El resto de la molécula de ADN es cristalográficamente invisible. Se ha situado uno de los ejes S5 en el centro (punto negro) del modelo. De este modo puede apreciarse la ausencia de segmentos de ADN unidos a la cápsida cerca de los ejes S5.

establecimiento de puentes de hidrógeno y contactos de van der Waals, con los aminoácidos que rodean ese bolsillo (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Kontou *et al.*, 2005). Una situación similar ocurre en el parvovirus CPV (Tsao *et al.*, 1991; Wu y Rossmann, 1993; Chapman y Rossmann, 1995; Xie y Chapman, 1996). La conformación de los segmentos de ADN visibles y el modo de interacción con la pared de la cápsida es muy similar en ambos casos. Nuestro análisis mutacional de las interacciones cápsida-ácido nucleico, ya mencionado, (apartado 1.2.2) indica que estas interacciones contribuyen a incrementar la resistencia del virión frente a la inactivación térmica de su infectividad (Reguera *et al.*, 2005).

1.5.2. Ciclo biológico de MVM

Algunas de las etapas más importantes del ciclo biológico de MVM se esquematizan en la **Figura 10** (Agbandje-Mckenna y Chapman, 2006; Almendral, 2006; Grueso, 2006; Riolobos *et al.*, 2006; Valle *et al.*, 2006; Cotmore y Tattersall, 2007).

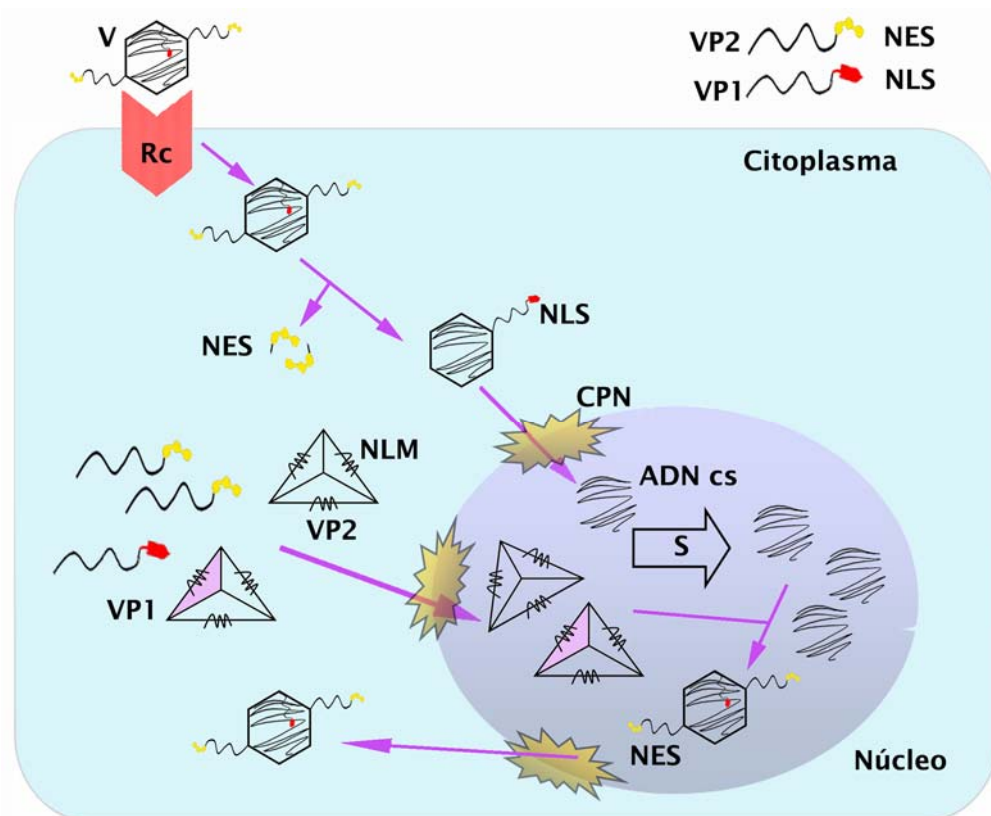


Figura 10. Principales etapas del ciclo biológico de MVM. En el esquema se simbolizan la entrada del virión en la célula, replicación del genoma, ensamblaje de la cápsida, encapsidación del ADN y salida del virión. Para una descripción, ver texto (apartado 1.5.2). V: virus; Rc: receptor; NES: señal de salida nuclear (*Nuclear Export Signal*); NLS: señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*); NLM: motivo de localización nuclear (*Nuclear Localization Motif*); CPN: complejo del poro nuclear; S: fase S de división celular. Adaptado de Valle *et al.*, 2006, Riolobos *et al.*, 2006 y Grueso, 2006.

La infección por MVM comienza con la adsorción del virus a receptores específicos de la superficie celular, entre ellos una sialoglicoproteína (Cotmore y Tattersall, 1987; López-Bueno, 2002; López-Bueno *et al.*, 2006). La región de la cápsida implicada en la unión al receptor celular se ha localizado en la depresión

situada en cada eje de simetría binaria (López-Bueno, 2002), al igual que sucede en CPV (Tresnan *et al.*, 1995).

Las partículas de MVM entran en la célula por endocitosis, formándose vacuolas recubiertas por clatrina (Linser *et al.*, 1997) de las que los viriones salen de manera dependiente de pH (Ros *et al.*, 2002). En la ruta endocítica parecen ocurrir cambios conformacionales en el virión que pueden ser bloqueados al incrementar el pH endosomal (Mani *et al.*, 2006), y los segmentos Nt de VP2 que se encuentran expuestos en el exterior de la partícula son proteolizados, generándose VP3 (Santarén *et al.*, 1993; Ros y Kempf, 2004; Mani *et al.*, 2006). Este proceso constituye un requisito previo para la posterior externalización de los segmentos Nt de VP1. La cápsida en este entorno ácido y con VP2 proteolizado, permanece estable, protegiendo tanto el ADN como los extremos Nt de VP1 que aún se encuentran en su interior, y que no van a ser expuestos hasta alcanzar un ambiente vacuolar más favorable (Cotmore y Tattersall, 2007; Cotmore *et al.*, 2010). El Nt de VP1 presenta actividad fosfolipasa A2, y su externalización permite la salida de la partícula de los endosomas al citosol (Zadori *et al.*, 2001; Tijssen *et al.*, 2006; Cotmore y Tattersall, 2007).

A continuación, la partícula vírica es transportada al núcleo. Este transporte está mediado por una señal de localización nuclear situada en el Nt de VP1 (Lombardo *et al.*, 2000) que había sido previamente externalizado. El virión interactúa con el poro nuclear, y el poro es lo suficientemente ancho como para permitir la entrada de la partícula completa al núcleo (Lombardo *et al.*, 2002). Sin embargo, no está totalmente establecido que la partícula llegue a penetrar completamente en el núcleo. Para este proceso es necesaria la actividad quimiotróptica (corte peptídico en residuos hidrofóbicos) del proteasoma. Se ha visto que inhibidores del proteasoma en general, y de su actividad quimiotróptica en particular, bloquean la infección por MVM. Los viriones se acumulan en el entorno perinuclear sin aparentes signos de degradación, pero sin poder acceder al núcleo. Este bloqueo es reversible al retirar el agente causal del medio (Ros *et al.*, 2002; Ros y Kempf, 2004).

Bien en la región del poro nuclear, o ya dentro del núcleo, ocurre la desencapsidación del ADN, probablemente sin un desensamblaje previo de la cápsida (Ros *et al.*, 2006). En el núcleo tiene lugar la transcripción y la replicación. Existen evidencias de que la cápsida protegería el ADN hasta el momento en que la célula entra en fase S de división celular, en la que ocurre la replicación del ADN vírico (Ros *et al.*, 2006).

La traducción se lleva a cabo en el citoplasma celular, donde las VPs recién sintetizadas se ensamblan en intermediarios triméricos compuestos sólo por VP2 o por una mezcla de VP1 y VP2. Estos trímeros no son competentes para el ensamblaje en el citoplasma, pero contienen motivos de localización nuclear que se forman al ensamblarse el trímero, y que permiten su transporte al núcleo como parte de un

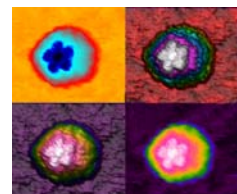
proceso de morfogénesis controlada (Lombardo *et al.*, 2000; Lombardo *et al.*, 2002; Riobos *et al.*, 2006). En el núcleo, los trímeros adquieren competencia para ensamblarse en cápsidas (Riobos *et al.*, 2006). La encapsidación del ADN genómico en las cápsidas preformadas probablemente ocurre a través del poro en uno de los ejes S5 (Farr y Tattersall, 2004; Plevka *et al.*, 2011). Se ha sugerido que la internalización del ADN genómico en MVM sucede con la ayuda de la proteína no estructural NS1, que funcionaría como un motor molecular. Esta proteína desempeña dos funciones enzimáticas: actividad nucleasa a través de su extremo Nt (Koonin y Ilyina, 1993; Nuesch *et al.*, 1995; Mouw y Pintel, 1998; Hickman *et al.*, 2004) y actividad helicasa a través del Ct (Gorbalenya *et al.*, 1990; Christensen y Tattersall, 2002; James *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2004); se ha sugerido también que esta última actividad es la que permitiría la encapsidación del ADN genómico de MVM en sentido 3'-5' (King *et al.*, 2001; Yoon-Robarts *et al.*, 2004; Cotmore y Tattersall, 2005).

A continuación el virión formado debe salir del núcleo. Los estudios realizados por los grupos de los Profs. Tattersall y Almendral indican que, durante la morfogénesis de la partícula de MVM, se produce la externalización irreversible del Nt de VP2 en respuesta a la entrada del ADN vírico en la cápsida (Tattersall y Cotmore, 1988; Maroto *et al.*, 2004; Almendral, 2006); y también revelan que este proceso de externalización es necesario para la infectividad del virión, porque la exposición del Nt de VP2 correctamente fosforilado permite la salida del núcleo celular de los viriones formados (Maroto *et al.*, 2004). En estudios realizados con VLPs de MVM *in vitro*, un estímulo energético mediante calentamiento moderado (que podría vencer la misma barrera energética que *in vivo* produciría la entrada del ADN en la cápsida) produjo dos efectos estructurales: la externalización del extremo Nt de VP2 (Hernando *et al.*, 2000), y un cambio sutil en la exposición al solvente de triptófanos de la cápsida (Carreira *et al.*, 2004). Ambos efectos, cuando se compararon en un cuidadoso análisis paralelo, cursaron como procesos cooperativos absolutamente solapantes y con la misma temperatura de transición (Carreira *et al.*, 2004). Por tanto, estos procesos parecen ser dos manifestaciones diferentes de un mismo reordenamiento conformacional de la cápsida. Como ya se ha mencionado, mutaciones de diferentes residuos de la cápsida, todos ellos situados en la base de los poros, causan la desaparición de este cambio conformacional y una disminución drástica de infectividad (Reguera *et al.*, 2004). Mutaciones del residuo L172, también situado en la base de los poros, ocasionan un bloqueo en la propagación de los viriones en cultivo. De acuerdo a los resultados bioquímicos obtenidos por el grupo del Prof. Tattersall, tanto estas mutaciones en L172, como las mutaciones letales que nosotros realizamos en la base de los poros, parecen mantener estables los viriones hasta que tiene lugar la proteólisis de los Nt de VP2, momento tras el cual la partícula se tornaría más inestable, permitiendo la salida prematura del Nt de VP1 y eventualmente la desencapsidación temprana y a destiempo

del ADN viral (Farr y Tattersall, 2004; Farr *et al.*, 2006; Cotmore y Tattersall, 2007). La evidencia disponible, en resumen, pone de manifiesto la existencia de un cambio conformacional de la cápsida centrado en, pero no limitado a los poros de la cápsida, asociado a la traslocación de Nt de VP2 y necesario para la infectividad de MVM.

Una vez fuera del núcleo, la liberación de los viriones de MVM al medio extracelular parece llevarse a cabo mediante lisis de la célula infectada (Richards *et al.*, 1977), aunque no pueden descartarse otros mecanismos (Whittaker y Helenius, 1998).

Objetivos

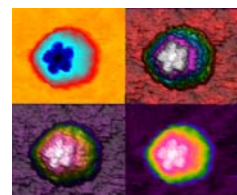


2. OBJETIVOS

En base a los antecedentes presentados en la Introducción, nos planteamos como objetivo general de este trabajo el estudio de algunos aspectos estructurales relacionados con la dinámica conformacional de partículas víricas, y su posible relación con las propiedades mecánicas de estas partículas. Un aspecto fundamental de este estudio ha sido el tratar de aportar una primera evidencia experimental en favor de un papel biológico para la rigidez/ elasticidad mecánica de una partícula vírica. El modelo utilizado ha sido el parvovirus MVM, y los objetivos concretos se relacionan a continuación:

- I. Estudio de la participación de residuos de glicina conservados en el Nt de la proteína de la cápsida VP2 de MVM en procesos de dinámica conformacional relacionados con los poros de la cápsida.
- II. Estudio del papel del ADN genómico en las propiedades mecánicas del virión de MVM, y de la posible relación entre estabilidad conformacional y rigidez mecánica en una partícula vírica.
- III. Estudio del papel de residuos aminoacídicos que rodean los poros de la cápsida de MVM en las propiedades mecánicas de la partícula, y de la posible relación entre dinámica conformacional y flexibilidad mecánica en una partícula vírica.
- IV. Estudio del papel de residuos aminoacídicos que rodean cavidades conservadas en la cápsida de MVM en las propiedades mecánicas de una partícula vírica.

Materialles y Métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Células y virus

3.1.1. Cepas de *Escherichia Coli*, cultivo y transformación

XL1-Blue: genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac1^q ZΔM15 Tn10* (Tet^r)]. Las células termocompetentes son de la casa *Stratagene*.

DH10Bac: genotipo F- *mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 (ara, leu) 7697 galU galK λ- rpsL nupG /pMON14272 / pMON7124*, proveniente de la cepa DH10B, la cual contiene un b́acmido derivado de baculovirus (ver apartado 3.2.3) y un plásmido auxiliar con el gen de la transposasa bacteriana Tn7. Las células, proporcionadas por el Dr. J. Reguera, se hicieron electrocompetentes siguiendo el protocolo *Electrocompetent Cell Production (Invitrogen)*. Brevemente, se partió de 2 l de cultivo en medio LB de DH10Bac en fase de crecimiento exponencial. Cuando la densidad óptica (OD) a 600 nm (OD_{600}) alcanzó un valor de 0,6 se detuvo el crecimiento mediante enfriamiento a 0°C y se realizaron 4 lavados sucesivos con agua estéril fría utilizando, en relación al volumen de cultivo de partida, volúmenes de 1x, 0,5x, 0,1x y 0,02x, respectivamente, y sedimentando cada vez las células por centrifugación a 4.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min a 4°C. El sedimento final de células se resuspendió en 4 ml de una solución acuosa de glicerol al 10% estéril frío. Alícuotas de la suspensión se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -70°C.

JC8111: carece de las proteínas codificadas por los genes *recB*, *recC*, *recF* y *sbcB* (exonucleasas V y I), implicadas en la modificación de secuencias palindrómicas terminales (Boissy y Astell, 1985). Esta cepa permite la amplificación del plásmido infeccioso de MVMP sin producir alteraciones en el genoma viral, y fue proporcionada por la Dra. E. Grueso y el Prof. J. M. Almendral. Para la preparación de células JC8111 electrocompetentes se siguió esencialmente el mismo protocolo que para las DH10Bac, pero con ligeras modificaciones (introducidas por la Lda. A. Rodríguez en nuestro laboratorio). Brevemente, partiendo de una colonia aislada se llegó a obtener 1 l de cultivo (en medio LB) en fase de crecimiento exponencial, que se detuvo mediante enfriamiento a 0°C durante 30 min cuando la OD_{600} alcanzó un valor de 0,6. Se realizaron dos lavados sucesivos con agua estéril fría utilizando, en relación al volumen de cultivo de partida, volúmenes de 0,6x y 0,3x, y sedimentando las células cada vez por centrifugación a 3.500 rpm durante 15 min a 4°C. La resuspensión de las células en todos los casos se llevó cabo mediante movimientos giratorios suaves.

Finalmente, el sedimento así obtenido se resuspendió en 20 ml de glicerol al 10% estéril frío, se centrifugó a 5.800 rpm durante 15 min a 4°C y se resuspendió en 2 ml de glicerol al 10% estéril frío. La suspensión se congeló y almacenó como se ha indicado para las células DH10Bac. Tanto al principio como al final de la producción de células JC811 electrocompetentes se comprobó que éstas no crecían en presencia de ampicilina.

ElectroTen-Blue: cepa derivada de células XL1-Blue (*Stratagene*), con las que comparte genotipo, además de mostrar deficiencias en todos los sistemas de restricción conocidos [$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMRmrr)173$]. Las bacterias electrocompetentes se compraron a la casa *Stratagene*.

XL10-Gold: cepa derivada de células XL2-Blue MRF' (*Stratagene*) que posee el fenotipo Hte, el cual incrementa la eficiencia de transformación de DNA ligado (Jerpseth *et al.*, 1997). Estas células son deficientes en endonucleasa (*endA1*), lo que mejora la calidad del ADN obtenido por miniprep (Wnendt, 1994), y en recombinación (*recA*). Además, carecen de los sistemas McrA, McrCB, McrF, Mrr y HsdR. Finalmente, para permitir la selección de colonias azules, estas células contienen el gen *lacIq Δ M15* en el episoma F'. Las bacterias electrocompetentes se compraron a la casa *Stratagene*.

Cultivo: Todas las cepas de *E. coli* se crecieron en medio líquido LB o SOC y en medio sólido LB con agar bacteriológico "Europeo" (*Pronadisa*) al 1,5%, suplementados en su caso con el antibiótico de selección apropiado para el plásmido introducido. Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron los protocolos descritos en Sambrook y Russell, (2001). Para su conservación, las suspensiones bacterianas se suplementaron con glicerol a una concentración final del 15%, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -70°C.

Transformación: la transformación de *E.coli* XL1-Blue y XL10-Gold se llevó a cabo por choque térmico como sigue: para XL1-Blue, se descongelaron en hielo las células, y para cada reacción de transformación se utilizaron 50 μ l de bacterias a las cuales se añadió 1 μ l de solución de ADN a la concentración adecuada. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min, a 42°C durante 45 s y finalmente en hielo durante 2 min. Se añadieron 0,5 ml de medio LB precalentado, se incubó la muestra a 37°C durante 1 h con agitación (225-250 rpm), se concentraron las células por centrifugación a máxima velocidad en microfuga durante 1 min y, tras resuspender en un volumen final de 100 μ l de LB, se extendieron sobre placas Petri con medio LB sólido con ampicilina (100 μ g/ml), incubando a 37°C durante toda una noche.

Para XL10-Gold, se descongelaron en hielo las células, y para cada reacción de transformación se utilizaron 50 μ l de bacterias a las cuales se añadió 2 μ l de β -mercaptoetanol (*Stratagene*), mezclando suavemente siempre en hielo y cada 2 min, hasta un total de 10 min de incubación. A continuación, se añadieron 1,5 μ l de

solución de ADN a la concentración adecuada, se mezcló e incubó en hielo otros 10 min. La suspensión se calentó a 42°C durante 30 s y finalmente se mantuvo en hielo durante 2 min más. Se añadieron 0,45 ml de medio LB precalentado, se incubó la muestra a 37°C durante 1 h con agitación (225-250 rpm), se concentraron las células por centrifugación a máxima velocidad en microfuga durante 1 min y, tras resuspender en un volumen final de 100 µl de LB, se extendieron sobre placas Petri con medio LB sólido con ampicilina (100 µg/ml), incubando a 37°C durante toda una noche.

La transformación de *E.coli* DH10Bac, JC8111 y ElectroTen-Blue se realizó mediante electroporación de 40 µl u 80 µl de las bacterias competentes con 1 µl o 5 µl respectivamente de suspensión de ADN a la concentración adecuada o mezcla de ligación, en cubetas de 0,2 cm (DH10Bac y JC8111) o de 0,1 cm (ElectroTen-Blue) de separación entre electrodos (*Bio-Rad*). Se realizó un único pulso de 1,5 Kv, 25 µF y 200 Ω (DH10Bac), de 2,5 Kv, 25 µF y 200 Ω (JC8111) o de 2,2 Kv, 25 µF y 200 Ω (ElectroTen-Blue) utilizando un electroporador *Gene Pulser* (*Bio-Rad*). Inmediatamente después se resuspendieron en 1 ml de LB (JC8111) o de SOC (DH10Bac y ElectroTen-Blue), se incubó la muestra a 37°C durante 4 horas con agitación de 100 rpm (DH10Bac) o 1 h a 225-250 rpm (JC8111 y ElectroTen-Blue). En el caso de JC8111, se concentraron, plaquearon e incubaron las células transformadas como se ha indicado antes para XL1-Blue, en presencia de los antibióticos adecuados. En el caso de DH10Bac, no se concentraron sino que se plaquearon directamente 0,01x y 0,1x del volumen original de las células transformadas, en presencia de los antibióticos adecuados. En el caso de las células ElectroTen-Blue, el cultivo no se extendió en placa, sino que se amplificó mediante inoculación en 30 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml), incubando a 37°C durante toda una noche.

3.1.2. Células de insecto y su cultivo

Células Sf9, derivadas de la línea parental IPLB-SF 21 AE obtenida a partir de tejido de ovario de la especie *Spodoptera frugiperda* del ATCC (Manassas, VA).

Células High-five (H5), línea celular (BTI-Tn-5B1-4) obtenida a partir de la línea parental de *Trichoplusia ni*, suministradas originariamente por los Dres. J. Rodríguez y J. Reguera.

Cultivo: El complemento en el suero fetal bovino (SF) para el cultivo de cualquier tipo celular utilizado fue inactivado mediante calentamiento a 56°C durante 30 min. Ambos tipos celulares (Sf9 y H5) se cultivaron en medio TC-100 (*Gibco*) suplementado SF [al 5% para las células H5 o al 10% para las Sf9] más estreptomycin sulfato 100 µg/ml, penicilina G 100 U/ml, gentamicina 50 µg/ml, aminoácidos no esenciales (L-Ala, L-Asn, L-Asp, L-Glu y L-Pro) 0,44 mM y L-Gln 2mM. En ambos casos, las células se incubaron a 27°C (Carrascosa, 1994; Carrascosa *et al.*, 1995). Una vez

crecida la monocapa se recogieron mediante pipeteo en el propio medio de cultivo. Para su conservación, las células se congelaron a una concentración de aproximadamente $1,7 \times 10^6$ células/ml en medio TC-100 suplementado con 20% SF y 7,5% dimetilsulfóxido (DMSO; *Merck*) (*Doyle et al.*, 1988), y se almacenaron en nitrógeno líquido.

3.1.3. Células de mamífero y su cultivo

La línea celular **NB324K**, derivada de fibroblastos de riñón de recién nacido humano transformados con el antígeno T grande de SV40, fue proporcionada originariamente por el Prof. J. M. Almendral.

Cultivo: Las células NB324K se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Gibco*) suplementado con sulfato de estreptomina a 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina G a 100 U/ml, L-Gln 4mM y SF al 5% o al 10%. Las incubaciones se realizaron a 37°C en estufa de cultivo en una atmósfera que contenía un 7% CO_2 y al 95% de humedad relativa. Las células, crecidas en monocapa, se recogieron mediante la acción de una solución que contenía un 0,5% de tripsina (*Sigma*, 1,5 U/mg) y 0,02% de la sal disódica del ácido etiléndiaminotetracético (EDTA) en tampón fosfato salino (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM KH_2PO_4 y 1,5 mM NaH_2PO_4 , pH 7,3). Para su conservación, las células se prepararon mediante criogenización según se describe en *Doyle et al.* (1988), y se almacenaron en nitrógeno líquido.

3.1.4. Baculovirus, infección y titulación

Los baculovirus utilizados derivan del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Para obtener baculovirus recombinantes se transfectaron células H5 con el báculo BM-VP2, tal y como se describe en el apartado 3.4.1 de esta memoria.

Infecciones: Las infecciones en medio líquido se llevaron a cabo en células H5 (generalmente sembradas 24 h antes, subconfluentes y mantenidas a 27°C) por adición directa del virus al medio de cultivo a multiplicidad de infección (mdi) de 0,01 a 2 (según la finalidad del experimento). Una vez alcanzado un efecto citopático (ecp) completo a los 3 días post infección (dpi), se recogieron los virus en el sobrenadante de cultivo, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C.

Titulación: La titulación de suspensiones de baculovirus recombinantes se realizó esencialmente como se ha descrito previamente (*Carrascosa*, 1994). Se sembraron 10^6 células Sf9 en 2 ml de medio TC-100 suplementado con 10% de SF por cada pocillo de placa multipocillo M6, y se incubaron a 27°C durante 1-2 h, hasta que la confluencia de la monocapa fue de aproximadamente un 40%. Se retiró el medio y

se añadieron 0,4 ml por pocillo de la suspensión de baculovirus convenientemente diluida en medio TC-100, incubando a 27°C durante 1 h, balanceando la placa cada 10 min. Sin retirar el inóculo, se añadieron 4 ml de medio de plaqueo recién preparado y atemperado a 37°C en cada pocillo, y se dejó solidificar. El medio de plaqueo se obtuvo mezclando 1 volumen de agarosa de bajo punto de fusión (*Sea Plaque GTG agarose, BMA*) al 3% fundida y mantenida a 45°C, y un volumen de medio TC-100 concentrado 2x y suplementado con 20% SF inactivado más 0,1 mg/ml de DEAE-dextrano. Las células se incubaron durante 6 días hasta alcanzar un ecp completo, se fijaron con 2 ml/pocillo de formaldehído al 2% durante 2 h y se tiñeron con cristal violeta al 1% en formaldehído al 5% durante 4 h. Se retiró la agarosa y se contaron las placas de lisis (unidades formadoras de placa, ufp). Las titulaciones se llevaron a cabo por duplicado.

3.1.5. Virus MVM, infección y titulación

La cepa de MVM utilizada para éste trabajo es la cepa fibrotrópica prototipo (p), suministrada originalmente por el Prof. J. M. Almendral.

Infección: La amplificación de virus MVM se realizó mediante infección de células NB324K, siguiendo el protocolo utilizado en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Segovia *et al.*, 1991; Rubio *et al.*, 2001), con algunas modificaciones. Brevemente, la infección en medio líquido se realizó inoculando viriones (apartado 3.5.1) en monocapas subconfluentes de $2,5 \times 10^6$ células NB324K en placas P100 con MVM a una mdi de 7×10^{-3} . Los sobrenadantes de infección fueron recogidos una vez alcanzado un ecp completo (al cabo de 4 días) y almacenados a -70°C o procesados, según el caso.

Titulación: Para la titulación de MVM se siguió un procedimiento previamente descrito (Tattersall y Bratton, 1983) y modificado en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Segovia *et al.*, 1991), en el que se introdujeron algunas pequeñas modificaciones. Se sembraron placas P60 con $2,2 \times 10^5$ células NB324K 24 h antes del ensayo. Al día siguiente las monocapas se lavaron con PBS completo (conteniendo iones Ca^{2+} y Mg^{2+}) (PBSc), y a continuación se añadieron 0,45 ml/P60 de diluciones seriadas de MVM en PBSc suplementado con 0,1% SF. Las fuentes de MVM fueron, según el caso *i*) sobrenadantes de cultivo de 4 días post electroporación (dpe) (viriones extracelulares) o *ii*) extractos celulares de 2 dpe (viriones intracelulares). Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación cada 10 min, retirando a continuación el inóculo. En éste momento se añadieron 6 ml/P60 de medio de plaqueo mantenido a 37°C, preparado mezclando *i*) 45 ml de medio de cultivo DMEM concentrado 2x y suplementado con 20% de SF, 2,8 mM L-Gln, 0,88mM aminoácidos no esenciales (L-Ala, L-Asn, L-Asp, L-Glu y L-Pro) y mezcla de antibióticos (sulfato de estreptomina 200

µg/ml y penicilina G 200 U/ml) con *ii*) 43 ml de una preparación de agarosa de bajo punto de fusión (*Sea Plaque GTG agarose, BMA*) al 1,4% en agua estéril, recién fundida y mantenida a 45°C. Una vez solidificado el medio, se incubaron las placas a 37°C durante 6 días, momento en el cual se fijaron las células con 3 ml/P60 de una solución acuosa de formaldehído al 10% durante 30 min. Tras retirar el medio y la agarosa, las placas se tiñeron con una solución acuosa de cristal violeta al 1%, y formaldehído al 5% durante otros 30 min. Los títulos se determinaron por duplicado y se refirieron al control no mutado (wt) del mismo experimento. Cuando fue necesario dar valores de título más precisos, se normalizaron los valores de ufp/ml en función de la cantidad de proteína expresada por el virus en cuestión, determinada por inmunoelectrotransferencia (*Western Blot*) y densitometrado de la banda correspondiente, siguiendo el protocolo desarrollado por el grupo del Prof. J. M. Almendral (Grueso, 2006; Ventoso *et al.*, 2010) (ver apartado 3.1.1).

3.2. Plásmidos recombinantes

3.2.1. Plásmido pSVtk-VP1/2. El plásmido pSVtk-VP1/2 de 5,8 Kb contiene el gen que codifica para las proteínas VP1 y VP2 de MVMp, y fue obtenido en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Ramírez *et al.*, 1995). Confiere resistencia a ampicilina.

3.2.2. Plásmido pFB1-VP2. El plásmido pFB1-VP2 (5,8 Kb) contiene el segmento de ADN del genoma de MVMp que codifica para VP2 de MVMp, y fue obtenido a partir del plásmido pSVtk-VP1/2 como se describe en Reguera, 2004. Confiere resistencia a gentamicina.

3.2.3. Bácmido BM-VP2. El plásmido pFB1-VP2 se utilizó como donador para construir un bácmido que contuviera el gen de VP2 de MVMp (BM-VP2). Este bácmido recombinante se obtuvo utilizando el procedimiento *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen)* y confiere resistencia a kanamicina. Dicho método se basa en la transposición de un gen insertado en un plásmido pFastBac1 al bácmido vector, a través de las regiones que dirigen la transposición en ambas moléculas (**Figura 11**). Este bácmido (bMON14272) está presente en las bacterias DH10Bac, que además contienen un plásmido *helper* (pMON7124) a partir del cual se expresa una ADN transposasa (Luckow *et al.*, 1993) y que confiere resistencia a tetraciclina. Se siguieron las instrucciones del fabricante, introduciendo ligeras modificaciones como se indica en Reguera, 2004. Se añadió 1 µl de pFB-VP2 (150-200 ng) a 40 µl de células DH10Bac electrocompetentes recién descongeladas, que se electroporaron tal y como se ha descrito en el apartado 3.1.1. A continuación, se extendieron 10 µl y/o 100 µl de la suspensión en placas Petri que contenían medio LB sólido con 50 µg/ml de

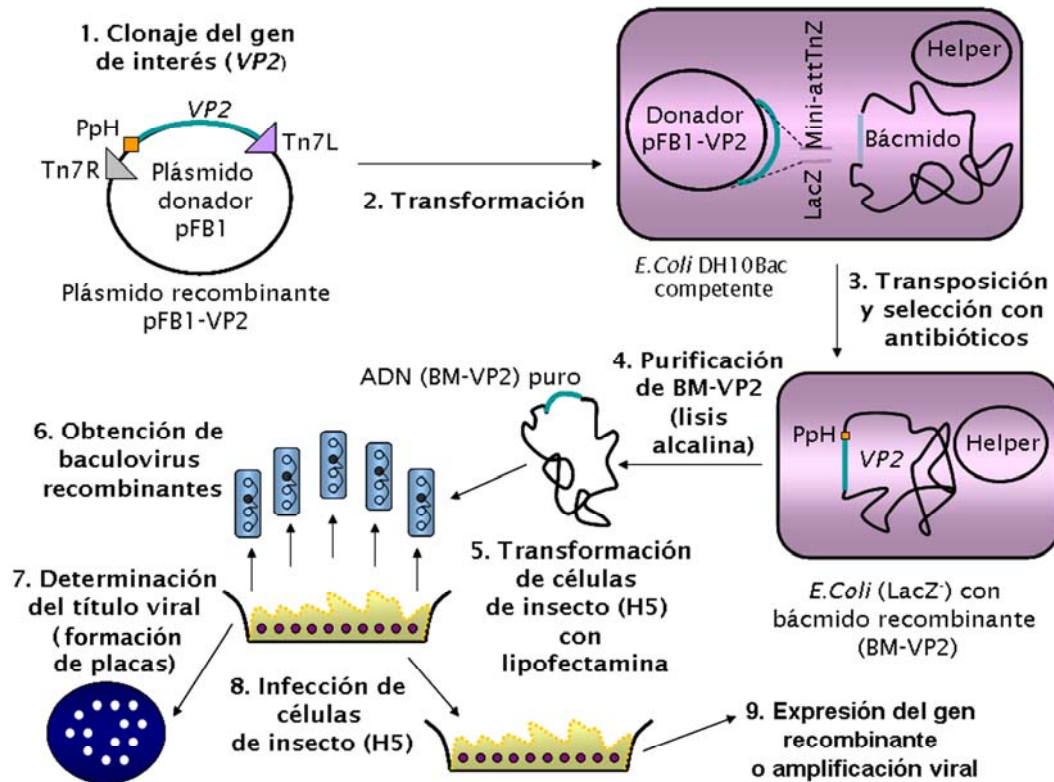


Figura 11. Esquema para la obtención de VLPs de MVM mediante expresión en células de insecto utilizando baculovirus recombinantes. Tras clonar el gen de VP2 en el plásmido donador pFB1, se lleva a cabo la transposición al bácmido presente en el interior de células DH10Bac. El bácmido recombinante purificado (BM-VP2), se transforma en células de insecto (H5) para obtener así los baculovirus recombinantes que expresan VP2. Finalmente, y tras varias rondas de infección, se obtienen VLPs de MVM (autoensambladas en la célula). Esquema adaptado del manual del Kit *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System* (Invitrogen).

kanamicina, 7 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, 100 $\mu\text{g/ml}$ del indicador *BluoGal* (Gibco) y 40 $\mu\text{g/ml}$ de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma), y las placas se incubaron a 37°C durante unas 18-20 h. Se seleccionaron varias colonias positivas (color blanco), que se aislaron directamente mediante extensión en zig-zag en otra placa selectiva de las mismas características, incubándose del mismo modo para confirmar el color de las colonias elegidas. Se seleccionaron colonias blancas en 2 zig-zags diferentes, con las que se inocularon 10 ml de medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 12 h con agitación a 250 rpm. Tras hacer el correspondiente glicerol con una parte de cultivo, unos 4,5 ml se utilizaron para obtener el bácmido (haciendo tres aislamientos por separado, pero simultáneos, de 1,5 ml cada uno) mediante un procedimiento de lisis alcalina cuyas

instrucciones se incluyen en el sistema *Bac-to-Bac*. El ADN obtenido se disolvió en un total de 120 µl de agua estéril, se analizó por gel de agarosa (*Gibco o Pronadisa*) al 0,5% en tampón TAE 1x a 20 v durante toda una noche, o bien por restricción con la enzima ApaL I (*NEB*) en gel de agarosa al 1% en TAE 1x a 80 v hasta que el marcador del frente llegó al final del gel, y se almacenó a 4°C o a -20°C en alícuotas.

3.2.4. Plásmido infeccioso pTRp. El plásmido infeccioso pTRp (8,7 Kb) contiene la secuencia de ADN correspondiente al genoma completo de MVMp. Fue obtenido en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (*Ramirez et al.*, 1995) como una modificación del clon infeccioso de MVMp, pMM984 (*Merchinsky et al.*, 1983; *Gardiner y Tattersall*, 1988), originariamente suministrado por el Dr. P. Tattersall (Yale University). Confiere resistencia a ampicilina.

3.3. Mutagénesis dirigida y combinatorial

3.3.1. Procedimiento

La **mutagénesis dirigida** del gen que codifica para la VP2 de MVMp se realizó sobre el plásmido pSVtk-VP1/2 mediante el método de PCR inversa, utilizando el kit *QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*. Para la introducción de mutaciones puntuales se utilizaron parejas de oligonucleótidos portadores de la mutación, de longitud comprendida entre 25 y 38 nucleótidos (*Invitrogen*) (**Tabla 1**). Se siguieron esencialmente las instrucciones del fabricante. La presencia de las mutaciones deseadas se confirmó en todos los casos por secuenciación de segmentos de al menos 900 pares de nucleótidos alrededor del codón mutagenizado.

Para la **mutagénesis combinatorial, mediante PCR inversa**, del gen codificante de la proteína VP2 de MVMp se utilizó el plásmido pSVtk-VP1/2 en un proceso de PCR inversa llevado a cabo con el Kit *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*. Se siguieron esencialmente las instrucciones del fabricante. La presencia de las mutaciones combinatoriales en las posiciones deseadas se confirmó en todos los casos por secuenciación de segmentos de 900 pares de nucleótidos alrededor del codón mutagenizado, en ambas hebras del plásmido. De este modo se consiguió mutagenizar simultáneamente hasta cinco posiciones, mediante el uso de oligonucleótidos con codones degenerados *DKS* (D: Guanina+Timina+Adenina; K: Guanina+Timina; S: Guanina+Citosina) en las posiciones seleccionadas, y una longitud entre 36 y 43 nucleótidos (*Sigma*) (**Tabla 1**).

Para la **mutagénesis combinatorial, mediante PCR propensa a error**, del gen codificante de la proteína VP2 (región diana comprendida entre los codones que codifican para los aminoácidos 111 y 191 en el gen de la VP2) de MVMp se utilizó el

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de mutaciones en VP2 de MVMp.

Oligonucleótido ^a	Secuencia ^b
	Para mutagénesis dirigida
G31A	5'-CCTGGAGGCTCTGCAGGTGGGGGCTC-3'
G31F	5'-CCTGGAGGCTCTTTCGGTGGGGGCTC-3'
G31V	5'-CCTGGAGGCTCTGTTGGTGGGGGCTC-3'
G31L	5'-CCTGGAGGCTCTCTGGGTGGGGGCTC-3'
G33A	5'-GCTCTGGGGGTGCAGGCTCTGGCGG-3'
G33F	5'-GCTCTGGGGGTTTCGGCTCTGGCGG-3'
G33V	5'-GCTCTGGGGGTGTTGGCTCTGGCGG-3'
G33L	5'-GCTCTGGGGGTCTGGGCTCTGGCGG-3'
G31F/G33F	5'-GCTCTTTCGGTTTCGGCTCTGGCGG-3'
D58A	5'-GATTCTTGGGTGCCGGCTGGGTAG-3'
N183A	5'-GGTTCAGTAGACTCAGCCAACATTTTGCCATAC-3'
D58A/N183A	5'-GGTTCAGTAGACTCAGCCAACATTTTGCCATAC-3'
L143A	5'-GCCAGCTTAACTTGGTATCAGCTGATCAAGAAATATTC-3'
L143V	5'-GCTTAACTTGGTATCAGTTGATCAAGAAATATTC-3'
L172A	5'-CAACAATGACGCTACAGCTTGCATGATGG-3'
Y188L	5'-CAACATTTTGCCACTCACACCTGCAGC-3'
	Para mutagénesis combinatorial mediante PCR inversa
L113d	5'-GGACACCATGGAGC DK SGTGGATGCTAATGCTTGGG-3'
L143d	5'-GCCAGCTTAACTTGGTATCA DK SGATCAAGAAATATTCAATG-3'
Y188d	5'-GACTCAAACAACATTTTGCC DK SACACCTGCAGCAAATC-3'
W469d	5'-GTATACCCTCAAGGACAAATA DK SGACAAAGAACTAGATCTTG-3'
Q496d	5'-GTAAAAACAATGCACCTGG DK SATGTTGGTTAGATTAGGACC-3'
	Para mutagénesis combinatorial mediante PCR propensa a error
EP-PCR-F	5'-GCTCATGAGCAAATTTGGACACC-3'
EP-PCR-R	5'-CCAAGTGTTCATTGAGTTTGC-3'

^a El nombre del oligonucleótido indica el cambio de aminoácido introducido. d indica que se introducen múltiples cambios. EP-PCR-F y EP-PCR-R son oligonucleótidos utilizados para la amplificación del plásmido infeccioso pTRp en condiciones de baja fidelidad de copia mediante PCR propensa a error.

^b En negrita se señala el codón mutagenizado en cada caso. Cuando se construyeron dobles mutantes se utilizó el ADN molde que contenía ya una de las mutaciones, y sobre este se introdujo la segunda mutación. Los oligonucleótidos utilizados para mutagénesis combinatorial mediante PCR inversa portan la degeneración *DKS* (*D*, primera base: G+T+A; *K*, segunda base: G+T; *S*, tercera base: G+C). G, guanina; T, timina; A, adenina; C, citosina.

plásmido pTRp en un proceso de PCR propensa a error llevado a cabo con el Kit *GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis (Stratagene)*. Se siguieron esencialmente las instrucciones del fabricante, escogiendo frecuencias medias (4,5 a 9 mutaciones/Kb diana) y altas (9 a 16 mutaciones/kb diana) de mutación, utilizando los oligonucleótidos referidos en la [Tabla 1](#). La presencia de las mutaciones combinatoriales en la región deseada se confirmó en todos los casos por secuenciación de dicha región completa, más los extremos flanqueantes (unos 900 nucleótidos totales leídos en cada caso). De este modo se consiguieron obtener poblaciones con alrededor de 10^4 variantes, siendo un 67% de los clones mutantes con un mínimo de 1 mutación y un máximo de 8 mutaciones. Para comprobar que el proceso de mutagénesis no afectaba a la capacidad infecciosa del plásmido pTRp, se llevó a cabo un ensayo de titulación (apartado 3.1.5) en paralelo tanto de un pTRp no mutado como de uno de los clones combinatoriales que portaba 3 mutaciones silenciosas generadas tras el proceso de PCR propensa a error, esperándose un valor de título similar en ambos casos.

3.3.2. Introducción de mutaciones en el b́acmido recombinante BM-VP2

Los plásmidos pFB-VP2 mutantes (obtenidos por mutagénesis dirigida al igual que se explica para el plásmido pSVtk-VP1/2 en el apartado 3.3.1) se utilizaron para construir los b́acmidos recombinantes BM-VP2 mutantes siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.2.

3.3.3. Introducción de mutaciones racionales en el clon infeccioso pTRp

Los segmentos de los plásmidos pSVtk-VP1/2 que contenían las mutaciones puntuales se subclonaron en el plásmido infeccioso pTRp. Para éste fin se utilizaron

los sitios *XhoI* y *XbaI* que delimitan la mayor parte de la secuencia completa del gen de la VP2 (posiciones 2071-4342). Para resolver problemas técnicos en el procedimiento del subclonaje en pTRp se contó con la ayuda experimental de la Lda. A. Rodríguez de nuestro laboratorio y el asesoramiento técnico del Prof. J. M. Almendral y miembros de su grupo.

Por una parte se digirieron 5 µg de plásmido pTRp en un volumen total de 30 µl, utilizando 20 U de *XbaI* (Roche) y 40 U de *XhoI* (Roche) e incubando a 37°C durante una noche. Los fragmentos de ADN obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Gibco) al 1% en tampón TAE 1x. Las bandas obtenidas tras digerir con *XbaI* y *XhoI* fueron de aproximadamente 6,5 Kb y 2,3 Kb. El fragmento correctamente cortado y carente del inserto a sustituir (6,5 Kb) se purificó mediante el kit *PCR Prep* (Promega). A continuación se defosforiló el vector con 2 U de fosfatasa alcalina de gamba (SAP, *usb*) en un volumen de 99 µl a 37°C durante 30 min, tras los cuales se añadió 1 U más de fosfatasa, y la mezcla se incubó a 37°C durante otros 15 min. La enzima se inactivó a 65°C durante 15 min. El vector defosforilado fue limpiado con el kit *PCR Prep* (Promega), y concentrado mediante evaporación a vacío para tener como mínimo 70-100 ng/µl.

Para la obtención del segmento de VP2 mutante a introducir en pTRp se digirieron, en un volumen total de 30 µl, 2 µg de plásmido pSVtk-VP1/2 con 20 U de *XbaI* (Roche) y 40 U de *XhoI* (Roche) e incubando a 37°C desde 2 h hasta toda la noche, según el caso. Los fragmentos de ADN obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Gibco) al 1% en tampón TAE 1x. Las bandas obtenidas tras digerir con *XbaI* y *XhoI* fueron de aproximadamente 3,5 Kb y 2,3 Kb. El fragmento que contenía el segmento mutado a reemplazar en pTRp (2,3 Kb) se purificó mediante el kit *PCR Prep* (Promega) y fué concentrado mediante evaporación a vacío para tener una concentración mínima de 100-150 ng/µl.

A continuación se comprobó mediante gel de agarosa (Gibco) al 1% en tampón TAE 1x que los fragmentos de vector e inserto preparados tal y como acabamos de describir estaban correctamente purificados y cuantificados. Posteriormente se ligaron vector e inserto, mezclando, en un volumen final de 5-10 µl entre 150-200 ng de vector y entre 400-600 ng de inserto (relación molar vector:inserto de 1:10), con 1 U de ADN ligasa de T4 (Roche o Fermentas), e incubando a 16°C durante toda la noche. Se electroporaron células *E. coli* JC8111 electrocompetentes tal y como se describe en el apartado 3.1.1 y se seleccionaron varias colonias que se crecieron en 10 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C y 250 rpm durante una noche. Se preparó una suspensión en glicerol para su conservación, y a partir del resto de cultivo (unos 8 ml) se obtuvo el ADN plasmídico utilizando el Kit *Wizard minipreps* (Promega). El plásmido obtenido se identificó como pTRp mediante análisis de restricción con *XhoI* y *XbaI*. La presencia de las mutaciones introducidas en todos los casos se confirmó mediante

secuenciación de segmentos de al menos 900 pares de nucleótidos alrededor del codón mutagenizado.

3.4. Producción de baculovirus recombinantes y expresión de VP2 en células de insecto

3.4.1. Transfección de células H5 con el bÁcmido BM-VP2

El medio de transfección se preparó como sigue: por un lado se mezclaron 1,5 µg de la preparación de bÁcmido BM-VP2 purificado por lisis alcalina (a partir de 4,5 ml de cultivo) con 6 µl de *Plus-Reagent (Invitrogen)* y medio TC-100 (*Gibco*) sin suero hasta un volumen final de 100 µl, y se incubó la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente (t.a.). Por otro lado, se diluyeron 6 µl de *Lipofectamine Transfection Reagent (Invitrogen)* en 94 µl de medio TC-100 sin suero. Ambas mezclas se juntaron e incubaron otros 15 min a t.a., antes de añadir 0,8 ml de medio TC-100 sin suero, para obtener la mezcla de transfección completa (1 ml).

Para la transfección se utilizaron células H5 procedentes de monocapas subconfluentes con una viabilidad superior al 95%. Se sembraron 3×10^5 células en 2 ml de medio TC-100, suplementado tal y como se describe en el apartado 3.1.2, en placas M6, que se incubaron durante 1 h a 27°C, quedando una confluencia aproximada del 40%. El medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con 2 ml de medio TC-100 sin suero y a continuación se añadió toda la mezcla de transfección (1 ml). En paralelo se llevó un pocillo de células inoculadas únicamente con 1 ml de TC-100 sin suero, como control negativo del experimento. Las células se incubaron a 27°C durante 5 h. A continuación se retiró el medio, se añadieron 2 ml de TC-100 suplementado y se incubó a 27°C hasta alcanzar un ecp completo (aproximadamente 6 días). La suspensión de células se recogió en el propio medio de cultivo y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. De ésta centrifugación se obtuvo *i)* el sobrenadante (denominado *pase 0*), fuente de baculovirus recombinantes, que se tituló si fue necesario tal y como se describe en el apartado 3.1.4 (obteniéndose generalmente títulos de entre 10^6 y 10^7 ufp/ml) y se guardó a -70°C, y *ii)* las células, que volvieron a centrifugarse en PBS en las mismas condiciones anteriores, siendo el sedimento de ésta segunda centrifugación convenientemente resuspendido en 100 µl de PBS para el posterior análisis de la expresión de la proteína VP2 mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) seguida de inmunoensayo (ver apartado 3.11) tras extraer las proteínas intracelulares mediante 3 ciclos sucesivos de congelación (-20°C) y descongelación (37°C), y posterior centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. En la **Figura 11** se muestra un esquema del procedimiento.

3.4.2. Amplificación de baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes de *pase 0* obtenidos como se acaba de indicar (apartado 3.4.1), se utilizaron para transfectar células H5 crecidas en botellas B175 o placas P150, hasta aproximadamente un 70%-80% de confluencia. La mdi fue de 0,01. Las células se incubaron a 27°C durante 3 días, se recogieron en el sobrenadante de cultivo y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sedimento celular se procesó como se indica en el apartado 3.4.1. El sobrenadante que contenía los baculovirus recombinantes del *pase 1* se tituló si fue necesario (obteniéndose generalmente títulos del orden de 10^7 ufp/ml) y almacenó a -70°C. Cuando necesitamos incrementar el título de baculovirus en el sobrenadante, se realizaron ampliaciones sucesivas del mismo modo que hemos descrito (Figura 11).

3.4.3. Purificación de VLPs de MVM producidas en células de insecto

Se siguió un procedimiento previamente descrito por el grupo del Prof. J. M. Almendral (Hernando *et al.*, 2000), en el que se introdujeron algunas modificaciones. Los baculovirus recombinantes de *pase 1* o sucesivos, obtenidos como se acaba de indicar (apartado 3.4.2), se utilizaron para infectar células H5 crecidas en botellas B175 (6) o placas P150 (8), hasta aproximadamente un 80% de confluencia. La mdi fue de 2 como máximo, añadiendo el virus directamente al cultivo celular tras ser convenientemente diluido en medio fresco. Las células se incubaron a 27°C durante 3 días, momento en el cual mostraron un claro ecp y la máxima eficiencia en la síntesis de VP2. Las células se recogieron en su propio medio de cultivo con raspador (*Cell Lifter, Costar*) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se guardó como fuente de baculovirus recombinantes tal y como se menciona en el apartado 3.4.2. El sedimento celular se resuspendió en un volumen de PBS similar al original y se repitió la centrifugación anterior. El nuevo pellet se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,2% Tritón X-100, 0,5 mM EDTA) y a continuación se lisaron las células utilizando un sonicador (MK2, MSE) con punta cónica de unos 4 mm de diámetro, realizando 6 pulsos de 16-18 μ m de amplitud y 15 s de duración, separados entre sí por intervalos de 30 s, con la muestra sumergida en hielo.

A continuación, el extracto sonicado se centrifugó en rotor JA 25.50 (*Beckman*) a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue depositado en un colchón de sacarosa al 20% en PBS (2 ml de colchón por cada 10 ml de muestra) y se centrifugó en rotor SW40 (*Beckman*) a 16.000 rpm durante 21,5 h a 10°C. El sedimento obtenido fue

resuspendido exhaustivamente en 0,5 ml de PBS. Tras esto, la muestra se depositó en un gradiente de sacarosa del 10% al 40% en PBS (12 ml), y se centrifugó a 30.000 rpm durante 5,5 h a 10°C. Los gradientes se fraccionaron de arriba hacia abajo tomando alícuotas de 0,5 ml, y las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE tal y como se describe en el apartado 3.11. Las fracciones que contenían VLPs libres de contaminantes fueron mezcladas y dializadas exhaustivamente frente a PBS a 4°C, alícuotadas y guardadas a 4°C o almacenadas a -70°C según el caso. Cuando fue necesario concentrar las VLPs, se hizo con *Amicón Ultra-4 centrifugal filter 100 NMWL (Millipore)*, siguiendo esencialmente las recomendaciones del fabricante. La pureza y concentración de las VLPs purificadas se determinaron mediante SDS-PAGE, utilizando cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) para construir una curva patrón previa a la cuantificación. Cuando fue necesario, se analizaron las preparaciones de VLPs al microscopio electrónico (ME) por tinción negativa, tal y como se describe en el apartado 3.14.

3.5. Expresión de VPs y producción de cápsidas vacías y viriones de MVM en células de mamífero

3.5.1. Electroporación de células NB324K con los plásmidos pSVtk-VP1/2 o pTRp

Se siguió esencialmente el procedimiento utilizado en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Lombardo *et al.*, 2000 y 2002) con ligeras modificaciones. Células NB324K obtenidas de monocapas $\approx 80\%$ confluentes, tripsinizadas y sedimentadas en centrífuga de mesa a 1.500 rpm durante 5 min, se resuspendieron a una concentración de 2×10^7 células/ml ó 4×10^6 células/ml (si el objetivo era realizar un ensayo de inmunofluorescencia [IF] indirecta con el plásmido pSVtk-VP1/2) en DMEM al 5% SF frío. Tras 30 min en hielo, se mezclaron en tubos *ependorf* de 1,5 ml, 2 μg (en el caso de pSVtk-VP1/2 para IF indirecta) ó 10 μg (en el caso de pTRp o pSVtk-VP2/1 para producción de cápsidas) de plásmido a electroporar, con 20 μg de ADN de esperma de gamba (*Roche*) y DMEM al 5% SF frío en un volumen total del 40 μl . A continuación se añadieron 150 μl de la suspensión de células NB324K (3×10^6 células en el caso de querer producir partículas, ó $0,6 \times 10^6$ células en el caso de IFs con pSVtk-VP1/2) y 10 μl de solución 1,5 M NaCl. Los componentes se mezclaron rápidamente a t.a. con pipeta automática y se pasaron a una cubeta de electroporación de 0,4 cm de separación entre electrodos (*Bio-Rad*) también a t.a. Se realizó un pulso de 250 v, 450 μF en el modo “*Low voltage/High value capacitor*” en un electroporador *Gene Pulser II* de *Bio-Rad*. Los tiempos de electroporación obtenidos fueron alrededor de 20 ms (con

0,6 x 10⁶ células) y de unos 10 ms (en el caso de usar 3 x 10⁶ células). La suspensión de células electroporadas se diluyó rápidamente en *i*) 10 ml de DMEM 10% SF a 37°C, sembrándose en una placa P100 (para electroporaciones de 10 µg de plásmido) ó bien *ii*) en 2 ml de DMEM 10% SF a 37°C, sembrándose en un pocillo de placa M24 que contenía cubreobjetos de 12 mm de diámetro (*Menzel-Gläser*) esterilizados previamente durante 1 h con etanol absoluto (*Merk*) y posteriormente secados en campana de flujo laminar (para electroporaciones de 2 µg de plásmido así como para controles de eficiencia de transformación por IF cuando fueron necesarios). Se incubó a 37°C durante 24 h. Transcurrido éste tiempo, se retiró el medio de cultivo mediante aspiración, añadiendo después DMEM con 5% SF. Las células de las M24 se incubaron a 37°C y se fijaron a las 42-46 horas post electroporación (hpe) para proceder a los ensayos de IF. Las P100s se incubaron a 37°C durante un total de 48 hpe (si lo que se deseaba era recuperar viriones intracelulares), o 72 hpe (si se trataba de obtener cápsidas vacías por expresión del plásmido pSVtk-VP2/1) o un total de 96 hpe (para obtener sobrenadantes de infección con virus extracelular).

Para la comparación de la viabilidad de viriones mutantes con respecto al no mutado se realizaron las transfecciones exactamente como se ha descrito y se determinó el título de viriones producidos a las 48 hpe y/o las 96 hpe como se describe en el apartado 3.1.5. Se utilizó la misma cantidad de ADN purificado para cada mutante y para el control no mutado, determinada mediante electroforesis en geles de agarosa. En cada experimento de transfección se llevó a cabo un control positivo interno con DNA infeccioso no mutado para eliminar el efecto de la variabilidad en la eficiencia de transfección.

3.5.2. Purificación a escala analítica de cápsidas vacías y viriones intra y/o extracelulares de MVM

La producción de cápsidas vacías y viriones de MVMp, tanto a escala analítica (este apartado) como preparativa (apartado 3.5.3) se realizó siguiendo esencialmente protocolos del grupo del Prof. J. M. Almendral (*Segovia et al.*, 1991), en los que se introdujeron algunas modificaciones menores. Para la obtención a escala analítica, se realizó una electroporación (tal y como se describe en el apartado 3.5.1) partiendo de un mínimo de 12 x 10⁶ células provenientes de monocapas subconfluentes, o de cantidades escaladas a partir de esta.

Si lo que se pretendía era obtener viriones intracelulares (a partir de pTRp electroporado) o cápsidas vacías (a partir de pSVtk-VP2/1 electroporado) lo que se procesaron fueron las células transformadas (no el sobrenadante de cultivo), del siguiente modo. Tras lavar las monocapas celulares con PBS a 4°C, todas las células fueron recogidas con raspador (*Cell Lifter, Costar*) en PBS y centrifugadas a 1.500 rpm

durante 5 min a 4°C. Se tomó el sedimento que se congeló a -20°C (sin resuspender) hasta su uso, o bien se resuspendió inmediatamente el mismo en 5 ml de tampón TE (Tris 50 mM pH8; EDTA 0,5 mM, pH8) + 0,2% SDS a 4°C, se incubó durante 5 min a t.a. y se lisaron las células mediante 3 ciclos sucesivos de congelación (-20°C) y descongelación (37°C), para extraer las partículas víricas intracelulares. A continuación, dicho lisado fue sonicado (sonicador MK2, MSE) con una punta cónica de unos 4 mm de diámetro, realizando 6 pulsos de 16-18 μ m de amplitud y 15 s de duración, separados entre sí por intervalos de 30 s, con la muestra sumergida en hielo. Tras esto, se centrifugó el extracto sonicado en rotor JA 25.50 (*Beckman*) a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante (uno 5 ml) fue depositado sobre 3-4 ml de colchón de sacarosa al 20% (20% Sacarosa, 50 mM Tris pH8, 20% sacarosa, 1 mM EDTA (pH8), 0,1 M NaCl) y se centrifugó a 15°C en el rotor SW40 (*Beckman*) durante 5,5 h a 35.000 rpm. Al sedimento se le añadió 1 ml de TE conteniendo 0,2% Sarkosyl (*Sigma*) y pasadas 2 h (o incluso toda una noche) a 4°C, se resuspendió con aguja de 22 G. A continuación, la mezcla se depositó sobre un gradiente de cloruro de cesio preparado a partir de una solución de índice de refracción ajustado a 1,380 g/ml, en un volumen total de 10 ml. Se centrifugó en rotor TFT. 75.13 o TST.80.13 (*Beckman*) a 50.000 rpm durante 24 h a 15°C. Las fracciones de 0,5 ml con la densidad adecuada a cápsidas o viriones se recogieron y analizaron por hemaglutinación (HA) (ver apartado 3.12). Los viriones bandean a una densidad de 1,373 g/ml mientras que las cápsidas lo hacen a 1,363 g/ml. Las fracciones que contenían viriones o cápsidas se dializaron exhaustivamente frente a PBS, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a 4°C, o a -70°C para una conservación más prolongada. Para excluir completamente la presencia de cápsidas vacías en los viriones purificados, estos se sometieron a un segundo gradiente de CsCl siempre que se consideró necesario. Del mismo modo, para excluir la presencia de viriones en las preparaciones de cápsidas vacías, estas se sometieron a un ensayo de titulación altamente sensible, tal y como se describe en el apartado 3.1.5.

Cuando lo que se pretendía era obtener viriones a partir de sobrenadante de cultivo recogido a las 96 hpe (partiendo del plásmido pTRp) se hizo lo siguiente. Una vez recogido el sobrenadante, se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min a 4°C, para descartar los restos celulares. Al sobrenadante (que contenía virus en suspensión) se le añadió NaCl hasta una concentración final de 0,5 M y PEG6000 hasta una concentración final del 3,4%, dejando actuar la mezcla a 4°C toda una noche en recipiente de vidrio, antes de volver a centrifugar en el rotor JA 25.50 (*Beckman*) a 5.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sedimento de esta última centrifugación se resuspendió en 5 ml de tampón TE a 4°C (Tris 50 mM pH8; EDTA 0,5 mM, pH8). A continuación, la mezcla fue procesada tal y como se ha descrito anteriormente para los extractos celulares, a partir del colchón de sacarosa al 20% en adelante.

Tanto en el caso de las cápsidas como en el de los viriones, si fue necesaria su concentración, esta fue llevada a cabo mediante el uso de *Amicón Ultra-4 centrifugal filter 100 NMWL (Millipore)*, siguiendo esencialmente las recomendaciones del fabricante. Cuando resultó conveniente, las partículas purificadas se analizaron y cuantificaron al ME mediante tinción negativa tal y como se describe en el apartado 3.14.

3.5.3. Purificación a escala preparativa de cápsidas vacías y viriones intra y/o extracelulares de MVM

La producción a gran escala de cápsidas vacías y viriones MVMp se inició mediante infección de $7,5 \times 10^6$ células NB324K (3 P100s, células 80% confluentes), tal y como se describe en el apartado 3.1.5, con ligeras modificaciones. Tras lavar las monocapas celulares con PBSc a 37°C, se añadió el inóculo viral diluido en PBSc suplementado con 0,1% de SF para alcanzar una mdi de 7×10^{-3} , y se incubó a 37°C durante 1 h en agitación. En el ensayo se incluyó una P100 control sin infectar como control negativo. Transcurrido éste tiempo se retiró el inóculo, se añadieron 10 ml de DMEM al 5% de SF a cada P100 y se incubaron las células durante 5 h más. Pasado este tiempo descartamos el sobrenadante de cultivo y se recogieron las células infectadas mediante tripsinización. Con ellas se llevo a cabo un subcultivo a 20 P100s, que se incubaron hasta alcanzar ecp completo (a los 4-5 dpi). Tras esto, todas las células infectadas fueron recogidas con raspador (*Cell Lifter, Costar*) en el propio medio de cultivo, y centrifugadas a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C en rotor GS-A o GS-3 (*Sorvall*). De ésta centrifugación se obtuvo *i)* el sobrenadante (que contenía virus en suspensión) al que se añadió NaCl hasta una concentración final de 0,5 M y PEG6000 hasta una concentración final del 3,4%, dejando actuar la mezcla a 4°C toda una noche, antes de volver a centrifugar en el mismo rotor a 5.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sedimento de esta última centrifugación se resuspendió en 5 ml de tampón TE a 4°C (Tris 50 mM pH8; EDTA 0,5 mM, pH8); *ii)* el sedimento celular, que fue resuspendido en 15 ml de tampón TE + 0,2% SDS, mantenido durante 5 min a t.a. y posteriormente lisado mediante 3 ciclos sucesivos de congelación (-70 o -20°C) y descongelación (37°C), para extraer los virus intracelulares. A continuación, el lisado fue centrifugado en rotor HB-4 o SS-34, (*Sorvall*) a 8.000 rpm durante 10 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante.

Las suspensiones virales obtenidas de los pasos *i)* y *ii)* se mezclaron, se añadió SDS hasta una concentración final del 0,5% y se depositó la mezcla sobre 3,5 ml de colchón de sacarosa al 20% (20% Sacarosa, 50 mM Tris pH8, 20% sacarosa, 1 mM EDTA pH8, 0,1 M NaCl). La preparación se centrifugó a 10°C en un rotor SW40 (*Beckman*) durante 5,5 h a 35.000 rpm. Al sedimento se le añadió 1 ml de TE conteniendo 0,2% Sarkosyl (*Sigma*), y pasadas 2 h se resuspendió con jeringa y aguja de 22 G, dejándolo

luego generalmente a 4°C toda una noche. A continuación, la mezcla se depositó sobre un gradiente de cloruro de cesio obtenido de una solución de índice de refracción 1,380 g/ml, en un volumen total de 10 ml. Se centrifugó en rotor TFT. 75.13 o TST.80.13 (*Beckman*) a 50.000 rpm durante 24 h a 15°C. Las fracciones de 0,5 ml con la densidad adecuada a cápsidas o viriones se recogieron y analizaron por HA (ver apartado 3.12). Las fracciones que contenían viriones o cápsidas se dializaron exhaustivamente frente a PBS, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a 4°C, o a -70°C para una conservación más prolongada. Para excluir completamente la presencia de cápsidas vacías en los viriones purificados, estos se sometieron a un segundo gradiente de CsCl siempre y cuando se consideró necesario. Del mismo modo, para excluir la presencia de viriones en las preparaciones de cápsidas vacías, estas se sometieron a un ensayo de titulación altamente sensible, tal y como se describe en el apartado 3.1.5.

Si fue necesario concentrar, utilizamos *Amicón Ultra-4 centrifugal filter 100 NMWL* (*Millipore*), siguiendo esencialmente las recomendaciones del fabricante. Cuando resultó conveniente, las preparaciones purificadas se analizaron y en su caso cuantificaron al ME tal y como se describe en el apartado 3.14.

3.6. Análisis de la expresión de VPs, ensamblaje de cápsidas y viriones y externalización del Nt de VP2 de MVM en células de mamífero, mediante inmunofluorescencia in situ

El análisis de la expresión de VP1/VP2, la formación de cápsidas (y en su caso viriones) de MVM y la externalización del extremo Nt-VP2 se llevó a cabo en células NB324K transformadas con pSVtk-VP1/2 o transfectadas con pTRp (apartado 3.5.1), mediante IF *in situ* siguiendo los protocolos utilizados en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (*Lombardo et al.*, 2000 y 2002), con ligeras modificaciones. Las placas multipocillo M24 o M6 con los cubreobjetos sobre los que se habían adherido las células electroporadas se lavaron con PBSc tres veces durante 10 min antes de fijar las células añadiendo 1 ml de mezcla metanol:acetona (*Merck*) en proporción 1:1, enfriada a -20°C, e incubando a -20°C durante 7 min. A continuación se retiró el líquido y las células se rehidrataron con PBSc dentro de los pocillos dos veces durante 10 min, bloqueando a continuación con PBSc con 20% SF a t.a. durante 1 h. Tras esto se realizaron dos lavados con PBSc durante 10 min cada vez. Los cubres se depositaron sobre una gota de 40 µl de solución de anticuerpos primarios en PBSc suplementado con 5% de SF, pipeteados encima de un papel *parafilm* dentro de una cámara húmeda de plástico, y se incubaron en estufa de 37°C durante 50 min. Como anticuerpos primarios se utilizaron: *i*) un suero policlonal de conejo obtenido frente al segmento

Nt-VP2 de MVM (*anti-Nt VP2*) que lo reconoce específicamente, diluido 1/400. *ii*) Un suero policlonal de conejo que reconoce proteínas de la cápsida de MVM independientemente de su estado de asociación (*anti-VPs desnaturalizadas*), diluido 1/400. Ambos sueros fueron suministrados por el laboratorio del Prof. Almendral. *iii*) Un anticuerpo monoclonal (*B7A*) de ratón, suministrado por el Prof. J.M. Almendral y originalmente cedido por el Dr. C. Parrish (Cormell University). *B7A* reconoce específicamente partículas de MVMp ensambladas (viriones, cápsidas vacías y VLPs) (Lopez-Bueno *et al.*, 2003) y se utilizó diluido 1/400. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBSc durante 10 min en placas M24 o M6, se volvieron a depositar en la cámara húmeda y se incubaron con una solución de anticuerpos secundarios como se hizo para los anticuerpos primarios. Como anticuerpos secundarios se utilizaron: *Alexa 647*, *Alexa 594* y *Alexa 488* (*Invitrogen*), diluidos 1/1000 en PBSc con 5% SF. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron tres veces más con PBSc durante 5 min y se enjuagaron con agua y etanol absoluto, se dejaron secar brevemente y se montaron sobre portaobjetos, utilizando 7 μ l de Mowiol (*Polysciences*) e incubando en estufa a 37°C durante 1 h. Los portaobjetos montados se almacenaron a 4°C, protegidos de la luz. Las preparaciones se visualizaron en microscopio vertical de fluorescencia *Axioskop* (*Zeiss*) acoplado a una cámara ccd-color *coolsnap FX color* (*Roper Scientific*) y se visualizaron y procesaron utilizando el programa *Metavue 5.07* (*Universal Imaging Corporation*).

3.7. Análisis mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos de transiciones conformacionales y disociación de VLPs de MVM inducidas por calor.

Para llevar a cabo estos análisis se utilizaron VLPs obtenidas según lo descrito en el apartado 3.4.3. Se siguieron básicamente los protocolos descritos en *Carreira et al.*, 2004 y *Reguera et al.*, 2004. El espectrofluorímetro utilizado fue un *Cary Eclipse* (*Varian*), equipado con una unidad de control de temperatura tipo Peltier. La cubeta de fluorescencia presentaba trayectorias ópticas de excitación y emisión de 2 mm y 10 mm respectivamente. El volumen de muestra utilizado fue de 0,3 ml, a una concentración de proteína de 0,5 μ M. Dicha muestra (y todas las utilizadas en experimentos de fluorescencia de este tipo) se desgasificó previamente en un desecador para evitar posibles artefactos en la fluorescencia emitida ocasionados por la presencia de burbujas. Lo mismo se hizo con el tampón de dilución y que también utilizamos para hacer el blanco, PBS. Los parámetros de medida se fijaron en el programa de control (*Cary Eclipse, Thermal Scan*), como se describe a continuación: longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 295 nm, longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 330 nm. El gradiente térmico se realizó desde 25°C a 85°C-100°C, a una velocidad de

1°C/min, con un tiempo de medida de 1 s e intervalos de 1 min entre mediciones. La temperatura durante la medida fue determinada directamente sobre el bloque que soportaba la muestra. Para corregir la pequeña diferencia entre dicha temperatura (bloque), y la temperatura real de la muestra en el interior de la cubeta, se aplicó un factor de corrección de 0,9705 al valor de la temperatura (este factor fue determinado experimentalmente con anterioridad; Carreira *et al.* 2004). Los datos obtenidos (intensidad de fluorescencia a 330 nm, IntFlu₃₃₀) en unidades arbitrarias (u.a.) para cada temperatura (°C) se ajustaron a una transición sigmoïdal cooperativa (**Ecuación 1**) mediante el programa *KaleidaGraph* (Abelbeck Software). De este modo se obtuvo el valor de la temperatura media (T_m) de transición en °C.

$$I = \frac{(I_A + m_A T) + (I_B + m_B T) \exp\left(-\left(\Delta H^{T_m} \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p (T - T_m - T \ln(T/T_m))\right) / (RT_m)\right)}{1 + \exp\left(-\left(\Delta H^{T_m} \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p (T - T_m - T \ln(T/T_m))\right) / (RT_m)\right)}$$

(Ecuación 1)

I es el valor de intensidad de fluorescencia a cualquier temperatura absoluta T ; I_A e I_B son, respectivamente, los valores de intensidad de fluorescencia del estado inicial o final extrapolado a $T = 0^\circ\text{C}$; m_A y m_B son las pendientes de las líneas de base que preceden o suceden a la región de transición; T_m es la temperatura de transición; ΔH^{T_m} es el cambio de entalpía a la T_m ; ΔC_p es el cambio en la capacidad calorífica; R es la constante de los gases.

3.8 Análisis cinético mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos de transiciones conformacionales en VLPs de MVM inducidas por calor

Para estos análisis se utilizaron VLPs obtenidas según lo descrito en el apartado 3.4.3, diluidas en PBS a una concentración de monómero de 0,5 μM , en un volumen final de 0,3 ml. El espectrofluorímetro y cubeta utilizados fueron los mismos que en el apartado 3.7. El procedimiento experimental, fue similar al descrito en dicho apartado, pero incluyó las siguientes modificaciones. Los parámetros de medida se fijaron en el programa de control (*Cary Eclipse, Kinetics*): λ_{exc} 295 nm (para triptófanos); λ_{em} 330 nm; la recogida de los datos se llevó a cabo durante 1 s, a intervalos de 2 s durante un total de 600 s (tiempo total de medida).

Para estudiar la reacción directa del cambio conformacional, las VLPs se mantuvieron en un baño durante 10 min a 40°C (temperatura ligeramente inferior a aquellas en que ocurre el cambio conformacional en VLPs, Carreira *et al.* 2004), antes de disparar dicho reordenamiento mediante un rápido calentamiento (segundos) de las partículas a 50°C (temperatura a la cual el cambio conformacional ya ha tenido lugar, Carreira *et al.* 2004) en el bloque del espectrofluorímetro. La adquisición de datos (IntFluo₃₀₀ (u.a.) en función del tiempo (s)) se inició en el momento de transferir la muestra de 40°C a 50°C.

Para estudiar la reacción inversa, las VLPs se mantuvieron en un baño durante 10min a 50°C, y se pasaron rápidamente a 40°C en el bloque del espectrofluorímetro. La adquisición de datos se inició en el momento de transferir la muestra de 50°C a 40°C.

Los datos así obtenidos se ajustaron a la ecuación de una exponencial simple de primer orden decreciente (reacción directa) (Ecuación 2) o creciente (reacción inversa) (Ecuación 3) utilizando el programa *KaleidaGraph* (Abelbeck Software). De este modo se obtuvo el valor de las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} para las reacciones directa e inversa respectivamente.

$$I = I_0^{(-kt)} + I_f \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$I = I_0^{(-kt)} - I_f \quad \text{(Ecuación 3)}$$

I es la intensidad de fluorescencia a tiempo t ; I_0 es la intensidad de fluorescencia a $t = 0$; k es la constante cinética de velocidad; I_f es la intensidad de fluorescencia a tiempo infinito.

3.9. Determinación mediante proteólisis enzimática de la T_m de traslocación del segmento Nt de VP2 en VLPs de MVM sometidas a calentamiento

Se siguió un procedimiento cuyo fundamento fue establecido en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Hernando *et al.*, 2000), pero en un ensayo modificado para poder realizar una cinética precisa del proceso (Carreira *et al.*, 2004). Las VLPs diluidas en PBS a concentración final 1,5 μM y obtenidas según lo descrito en el apartado 3.4.3

de esta memoria, se mezclaron con una solución ácida de tripsina (Sequencing grade, Roche) preparada en 1 mM HCl, hasta alcanzar un volumen final de 200 μ l y una relación de tripsina:monómero de VP2 de 1:5 (m:m). Para realizar un gradiente térmico preciso e idéntico al descrito en el apartado 3.7 se utilizó la unidad Peltier del mismo espectrofluorímetro. Los parámetros de medida se determinaron en el programa de control (*Cary Eclipse, Thermal Scan*) realizando un gradiente entre 25°C y 65°C. La velocidad de incremento de temperatura fue de 6°C/h, recogándose alícuotas de 10 μ l a las siguientes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 43, 45, 47, 50, 55, 60 y 65 (°C). El exceso de tripsina en el experimento evitó tener que correlacionar la pérdida de actividad de la enzima hasta temperaturas próximas a los 60°C (Carreira *et al.*, 2004). La temperatura real de la muestra se determinó como se ha indicado en el apartado 3.7. Las alícuotas recogidas se analizaron mediante SDS-PAGE (ver apartado 3.11) seguido de densitometrado con scanner *GS-800 (Bio-Rad)* y programa de análisis *Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad)* para determinar el porcentaje de proteína VP3 resultante de la proteólisis mediada por tripsina, relativo al total de proteína VP2 no digerida a cada temperatura. Los datos se ajustaron a la ecuación 1 utilizando el programa *KaleidaGraph*. En este caso I representa la fracción de VP2 digerida a cualquier temperatura absoluta T , e I_A e I_B son, respectivamente, las fracciones de VP2 digerida en el estado inicial o final extrapolado a $T = 0^\circ\text{C}$. De este modo se obtuvo el valor de T_m para la cual la mitad de la proteína VP2 había sido proteolizada a VP3.

3.10. Inactivación térmica de MVM

Las suspensiones de virones (sobrenadante de cultivos de células infectadas, obtenidos a 4 dpe), diluidas convenientemente en medio PBSc + 0,2% SF, fueron calentadas en termobloque a 70°C u 80°C (dependiendo del experimento), durante tiempos variables entre 0 y 120 min, y puestas en hielo al finalizar su período de calentamiento. Los viriones infecciosos remanentes tras el calentamiento se titularon tal y como se ha descrito en el apartado 3.1.5. Cada experimento incluyó el virus no mutado como control positivo, así como un control sin ADN, siendo un mínimo de 2 los experimentos independientes realizados a cada temperatura. Los valores se normalizaron respecto a la cantidad de proteína VP2 sintetizada, (apartado 3.11) y al título obtenido para el virus wt. Las cinéticas de inactivación térmica así obtenidas se ajustaron a una curva de decaimiento exponencial (Ecuación 3) mediante el programa *Kaleidagraph*. En este caso I es el título viral a tiempo t ; I_0 es el título viral a $t = 0$, e I_f es el título viral a tiempo infinito. Como una medida adecuada de la resistencia a la inactivación térmica, se determinó mediante interpolación el tiempo al cual la infectividad del virus se redujo en un 60%, 70% u 80% (t_{60} , t_{70} y t_{80} , respectivamente) según se indica en las correspondientes secciones de Resultados.

3.11. SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de proteínas

3.11.1 SDS-PAGE

El análisis de la pureza de preparaciones de partículas de MVM, la localización de las fracciones procedentes de gradientes de CsCl que contenían VLPs ensambladas, el resultado de la proteólisis enzimática de VLPs y la estimación de la concentración de proteínas virales se realizaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La muestra se mezcló en proporción 1:1 con tampón de ruptura 2x (Tris-HCl pH 6,8 0,1 M, glicerol 8,3% v/v, SDS 3,3%, β -mercaptoetanol 4%, azul de bromofenol 0,16 mg/ml), se incubó a 100°C durante 5 min y se aplicó a geles con un porcentaje de acrilamida del 8-10%. La electroforesis se realizó a 35 mA (por gel). Posteriormente los geles se tuvieron 1 h en solución de tinte [2% de azul Coomassie (*Bio-Rad*), 24% etanol (*Merck*), 10% ácido acético glacial (*Merck*) y agua destilada], luego 30 min en solución de destintado [24% etanol (*Merck*), 10% ácido acético glacial (*Merck*) y agua destilada] y finalmente se conservaron en solución de fijado [10% ácido acético glacial (*Merck*) en agua destilada].

3.11.2. Inmunoelectrotransferencia

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) (*Bio-Rad*) utilizando un sistema de semihúmedo (*Bio-Rad*) durante 1 h a 200 mA con agitación y a 4°C. La NC se incubó con leche desnatada en polvo (*Nestlé*) al 5% en TBS-T [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0,2% Tween-20 (*Sigma*)] durante 1 h a t.a. en agitación. Para la identificación y en su caso cuantificación de las proteínas de la cápsida de MVM se siguió un procedimiento de inmunodetección cuantitativa establecido en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral, utilizando un suero policlonal de conejo que reconoce las proteínas de la cápsida de MVM, independientemente de su estado de asociación (suero *anti-VPs*) (Grueso, 2006; Ventoso *et al.*, 2010). La NC se incubó durante 50 min a t.a. con el suero anti VPs, diluido 1/2.500 en TBS-T conteniendo leche al 1%. A continuación se lavó la NC 3 veces durante 10 min con tampón de lavado TBS-T. Seguidamente, se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1/5.000 en TBS-T conteniendo leche al 1%, y se incubó a t.a. durante 50 min. Se lavó de nuevo 3 veces durante 10 min con tampón de lavado, se enjuagó brevemente con tampón TBS (sin Tween-20) y se reveló con el kit ECL (*GE Healthcare*). Para ello, se mezclaron los reactivos de revelado en relación 1:1 y se añadieron a la membrana de NC, incubando 1,5 min en oscuridad. A continuación se retiró el exceso de líquido sobre un papel de

filtro, se cubrió la NC con plástico transparente y se realizaron autorradiografías con distintos tiempos de exposición (de segundos a minutos).

Finalmente, cuando fue necesario cuantificar la intensidad de las bandas tanto en geles de SDS-PAGE como en autorradiografías, se llevó a cabo un densitometrado de las mismas con un densitómetro *GS-800 (Bio-Rad)* y el programa de análisis *Quantity One 1-D Análisis (Bio-Rad)*.

3.12. Determinación de la actividad hemaglutinante de partículas de MVM

Los virones, cápsidas vacías y VLPs de MVM son capaces de interactuar con proteínas de superficie de eritrocitos (Spalholz y Tattersall, 1983) provocando la aglutinación de estos. Para detectar la presencia de partículas de MVM en diferentes muestras se realizaron ensayos de hemaglutinación (HA) siguiendo el protocolo descrito por el grupo del Prof. J. M. Almendral (Hernando *et al.*, 2000).

Se utilizó 1 ml de eritrocitos frescos con 1% de heparina procedentes de ratón adulto (cepa *Swiss*), que se lavaron 2 veces con 45 ml de PBS, recogiendo cada vez las células mediante centrifugación a 4°C en centrífuga de mesa durante 8 min a 2.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, y las células se diluyeron en un volumen de PBS igual al volumen del sedimento. Los eritrocitos lavados se utilizaron inmediatamente o bien se mantuvieron un máximo de 3 h a 4°C y protegidos de la luz antes de ser utilizados. Justo antes del ensayo, la preparación de eritrocitos se diluyó en PBS hasta dejar mezcla a una concentración del 2%. El ensayo de HA se llevó a cabo en placas multipocillo M96 de perfil en U (*Nunc*). Se aplicaron 2-50 µl de las muestras en la primera fila, utilizando a continuación para cada muestra diluciones seriadas 1:2 en columna. A cada pocillo se añadieron 50 µl de la mezcla de eritrocitos al 2%. Las placas se agitaron suavemente y se mantuvieron a 4°C en oscuridad durante un mínimo de 2 h, al cabo de los cuales se determinó la dilución límite para HA positiva (**Figura 12**).

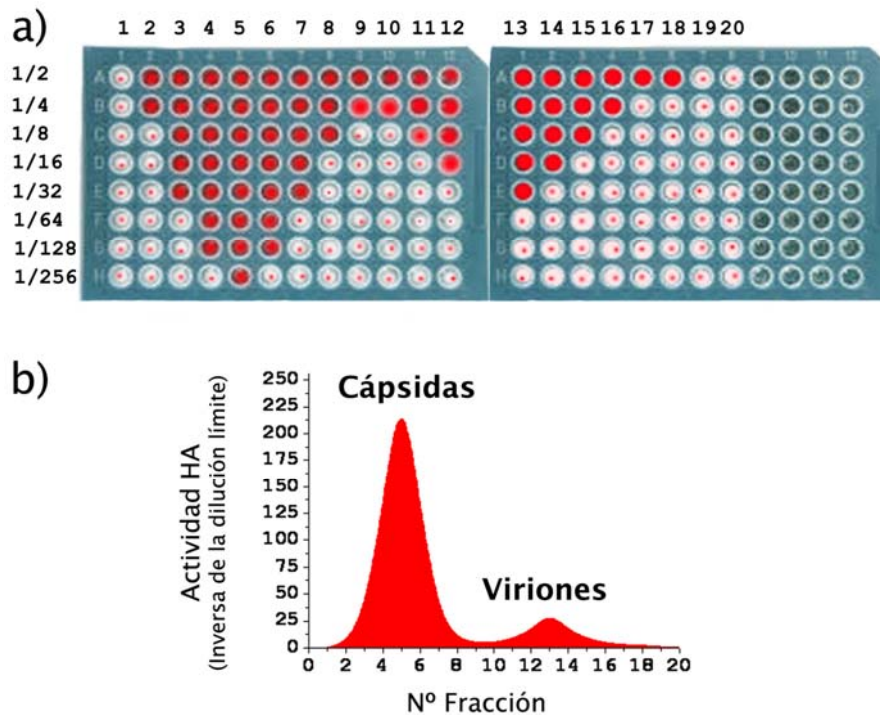


Figura 12. Ensayo HA de cápsidas vacías y viriones de MVM. a) Se muestra el resultado del ensayo mediante HA de fracciones obtenidas en un gradiente de sedimentación en cloruro de cesio de una preparación de cápsidas y virines de MVM en un proceso de purificación típico. En las placas multipocillo M96 se muestra el número de fracción ensayada (filas) respecto al factor de dilución de la muestra aplicado (columnas). Un color rojo homogéneo en el pocillo indica actividad hemaglutinante positiva (eritrocitos formando monocapa); un punto rojo en el fondo del pocillo indica ausencia de actividad hemaglutinante (eritrocitos sedimentados); b) Representación a partir de los resultados mostrados en a) de la actividad hemaglutinante (inversa de la dilución) frente al número de fracción.

3.13. Inactivación mecánica de MVM

La inactivación de viriones de MVM mediante estrés mecánico se realizó mediante sonicación, y la integridad e infectividad de las partículas tras el tratamiento se ensayaron respectivamente mediante HA (apartado 3.12) y titulación (apartado 3.1.5). Se llevaron a cabo diversas versiones del ensayo, que se resumen a continuación. i) Sobrenadante de cultivo de 96 hpe de células NB324K transformadas con el plásmido infeccioso no mutado (obtenidos como se explica en el apartado 3.5.1), y cuyo título estimado era de $0,5 \times 10^6$ ufp/ml, fue repartido en alícuotas homogéneas (vortex) de 0,5 ml y sonicadas en un sonicador *Bioruptor UCD-400* (*Diagenode*) a una frecuencia de 20 KHz, 320 W de potencia y 25°C durante tiempos

comprendidos entre los 0 y los 32 min. Las muestras recién sonicadas fueron puestas en hielo y divididas en nuevas alícuotas para llevar a cabo ensayos de HA y titulación *ii*) Sobrenadante de cultivo de 96 hpe cuyo título estimado era de $0,5 \times 10^6$ ufp/ml, fue repartido en alícuotas homogéneas (vortex) y mezclado con nanopartículas de oro (GNPs) de 10 nm de diámetro y $5,7 \times 10^{12}$ GNP/ml (*BBInternational*), amablemente suministradas por el Dr. Antonio Romero, a través del Prof. Julio Gómez-Herrero. Las GNPs se prepararon para su utilización en experimentos biológicos como sigue: en condiciones de esterilidad, se tomaron alícuotas de 0,5 ml de GNPs que se centrifugaron a 9.500 rpm durante 30 min a t.a. El sobrenadante fue descartado por pipeteo y cuidadosamente, hasta dejar 100 μ l para resuspender de nuevo el sedimento mediante vortex, y vigilando la posible agregación (seguida por cambio de color de rojo a morado intenso en la solución). A continuación, se añadieron 0,9 ml de medio DMEM 5% SF y se repitió la centrifugación anterior. El sobrenadante fue descartado de nuevo mediante pipeteo secuencial hasta dejar 100 μ l para resuspender en ellos las GNPs. A continuación, las GNPs limpias ($2,85 \times 10^{12}$) se mezclaron con los viriones de MVM no mutado ($0,5 \times 10^6$) en un volumen final de 1 ml, puestos en hielo y sonicados en un sonicador (MK2, *MSE*) con punta cónica de unos 4 mm de diámetro, realizando pulsos de 30 μ m de amplitud, durante tiempos comprendidos entre los 0 y los 40 min. Las muestras recién sonicadas fueron puestas en hielo y centrifugadas a 9.500 rpm durante 30 min a 4°C, para separar las GNPs de los viriones. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante titulación, incluyendo en el ensayo controles con viriones no sonicados, tanto en presencia como en ausencia de GNPs.

3.14. Microscopía electrónica

3.14.1. ME mediante tinción negativa

Las VLPs, cápsidas o viriones de MVM purificados según se detalla en los apartados 3.4.3, 3.5.2 y 3.5.3 se fijaron por deposición durante 4 min sobre rejillas de cobre de 200-300 huecos por pulgada, recubiertas de colodión y carbono e ionizadas. Las rejillas, después de 3 lavados sucesivos en agua destilada, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (*Fluka*) durante 45 s. Las muestras fijadas se observaron al microscopio electrónico de transmisión (*JEOL, JEM-1010*) en el Servicio de Microscopía Electrónica del CBMSO, con la ayuda de la Dra. M. T. Rojas y la técnico M. Guerra. Se tomaron fotografías desde 40.000 hasta 100.000 aumentos (en general) utilizando las cámaras *Bioscan 792 (Gatan)* y *TemCam-F416 (TVips)* acopladas al microscopio, y los programas *Digital Micrograph (Gatan)* y *ME-MENU4 (TVips)*, respectivamente.

3.14.2. Estimación de la concentración de partículas víricas por ME

Los experimentos para a puesta a punto de este sistema con partículas de MVM se hicieron con la ayuda de la Dra. M. T. Rejas en el servicio de microscopía electrónica del CBMSO. Se escogieron bolas de látex S 130-1 (*BAL-TEC*), de 112 nm de diámetro y una concentración de $1,29 \times 10^{12}$ bolas/ml. Antes de utilizarlas, se desagregaron las bolas mediante sonicación en un baño (*P. Selecta Ultrasons*) durante 30 min. Una vez preparadas, se mezclaron en distintas relaciones las partículas víricas a cuantificar con las bolas de látex en un volumen final de 10 μ l. La muestra se sometió a tinción negativa, se visualizó al ME y se tomaron imágenes de 50.000 de aumentos (apartado 3.14.1). La relación entre la cantidad de partículas virales y bolas se promedió contando un número suficiente de campos, y esta relación se multiplicó por la concentración de bolas para estimar la concentración de las partículas virales.

3.15. Microscopía de Fuerzas Atómicas

Un aspecto técnico muy importante para el desarrollo de este trabajo ha consistido en el aprendizaje y puesta a punto en el laboratorio, por la autora de esta memoria y la Dra. Rebeca Pérez, de la técnica de AFM aplicada a la visualización y determinación de propiedades mecánicas de partículas víricas. Este aprendizaje se realizó bajo la supervisión de la Dra. C. Carrasco, la Lda. M. Hernando y el Dr. P. J. de Pablo (Depto. de Física de la Materia Condensada, UAM). Los estudios de las propiedades mecánicas de MVM utilizando AFM que se presentan en esta memoria han sido diseñados, realizados, analizados e interpretados en estrecha colaboración entre nuestro grupo y el equipo del Dr. P. J. de Pablo. Las imágenes de AFM y las series de valores para la rigidez mecánica de las diferentes partículas víricas control y mutantes fueron obtenidos por la Dra. C. Carrasco del equipo del Dr. De Pablo o por la autora de esta memoria y por la Dra. R. Pérez de nuestro grupo, trabajando en estrecha colaboración, como se especifica en las correspondientes secciones de Resultados. El procedimiento seguido para MVM fue originalmente puesto a punto por el Dr. P. J. de Pablo, la Dra. C. Carrasco y sus colaboradores en el grupo del Prof. J. Gómez-Herrero, y se menciona brevemente en dos trabajos conjuntos de nuestros grupos (*Carrasco et al.*, 2006 y 2008). Debido a la novedad de esta metodología en el campo de la bioquímica y la virología, y a las particularidades del procedimiento para MVM, consideramos conveniente describir en detalle en esta memoria el procedimiento experimental seguido en este trabajo (a continuación). La parte mecánica del AFM utilizada fue cedida generosamente por el Prof. J. Gómez-Herrero. La electrónica de control (*Dulcinea*) se compró a la casa *Nanotec Electrónica, S.L.*

3.15.1. Preparación del soporte de vidrio

Para inmovilizar las partículas de MVM se utilizaron superficies de vidrio [cubreobjetos *Menzel-Gläser* (22x22 mm) o *Dismadel* (22 mm de diámetro)] previamente limpiadas y silanizadas tal y como se describe a continuación. Para la limpieza de los soportes, se preparó una disolución de 18 g de KOH (*Merck*) en 35 ml de agua destilada y a continuación se añadieron a la mezcla 300 ml de etanol absoluto (*Merck*). Los vidrios, colocados en un portavidrios especial (diseñado por la Dra. C. Carrasco y fabricado por *Segainvex*, UAM), se sumergieron en una cubeta de vidrio limpia (*Dismadel*) que contenía la disolución anterior y se sonicaron en baño de ultrasonidos (*P. Selecta Ultrasons*) durante 10 min. A continuación se retiró la disolución de KOH y se sustituyó por agua destilada, sonicando de nuevo durante 5 min. Este proceso se repitió 3 veces, renovando el agua tras cada lavado. Después el portavidrios se sacó de la cubeta y se colocó encima de un papel absorbente para eliminar toda la cantidad de agua remanente, con cuidado de no ensuciar los vidrios en el proceso. Por último, el portavidrios con los vidrios se introdujo en una estufa (*Heraeus*) a 110°C durante 20-30 min para que éstos se secan completamente.

Para permitir la adsorción de las partículas víricas la superficie del soporte se transforma en hidrófoba mediante silanización en campana de extracción de gases. Para ello, los vidrios limpios en su portavidrios se colocaron en una cubeta limpia (*Dismadel*), que contenía 3 o 4 ml de hexametildisilazano (HMDS; *Sigma-Aldrich*), cubriendo sólo la base de la cubeta y formando una capa de espesor ~1 mm. Se evitó el contacto entre el líquido y los vidrios mediante una base conveniente (portabjetos apilados). La cubeta se tapó (pero no herméticamente) y el vapor de HMDS se dejó actuar unas 12 h dentro de la campana de extracción de gases. Después de este tiempo, el portavidrios se sacó de la cubeta y se dejó unos minutos fuera para que los vidrios se secan al aire. Los vidrios preparados se guardaron en una placa Petri.

3.15.2. Preparación de la muestra

Las cápsidas vacías y viriones, tanto no mutados como mutantes, fueron producidos y purificados tal como se describe en los apartados 3.5.2 y 3.5.3. Se llevaron a cabo los controles de calidad necesarios para excluir cualquier posibilidad de contaminación entre cápsidas y viriones, como se ha mencionado en dichos apartados. La pureza, integridad y concentración de las partículas fue comprobada cuando procedió mediante imágenes de ME (apartado 3.14).

Para los experimentos de AFM, las preparaciones originales de cápsidas vacías o viriones fueron diluidas en PBS pH 7,3 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM NaH₂PO₄,

8,1 mM KH_2PO_4). La dilución adecuada para medir una muestra se fijó en cada caso de manera empírica la primera vez que se utilizó dicha muestra.

Para preparar la muestra a medir, se utilizaron pinzas curvadas (DUMOXEL non-magnetic 9, *Adumont&Fils*) para manipular un vidrio preparado y pegarlo al soporte adecuado para uso de muestras líquidas (denominado *piscina*) con un poco de grasa de alto vacío (*Dow Corning Corporation*). A continuación se depositó la muestra convenientemente diluida por pipeteo sobre la parte central del vidrio. La muestra se protegió del polvo mediante una tapa adecuada y se incubó durante 30 min a t.a. Trascurrido este tiempo, se hicieron 3 lavados de la muestra mediante adición y eliminación de líquido por pipeteo, usando 20 μl de PBS por lavado y actuando sobre la superficie de la muestra sin tocar el vidrio, secar la muestra o distorsionar la gota. El volumen final de muestra antes de empezar las medidas fue de unos 40 μl . Cuando fue necesario reponer el volumen de líquido parcialmente evaporado durante el proceso de medida, se utilizó agua destilada, con el fin de no incrementar la concentración de sales en solución.

3.15.3. Características y calibrado de las micropalanca

Las micropalanca utilizadas en este trabajo son de la casa comercial *Olympus OMCL-RC800PSA-W*:

(<http://probe.olympus-global.com/en/en/outlineproductE.html>).

Estas micropalanca vienen en un chip que contiene cuatro tipos con diferentes constantes elásticas k_c nominales (0,05 N/m; 0,1 N/m; 0,39 N/m; 0,76 N/m). En este trabajo se han utilizado las micropalanca de $k_c = 0,05$ N/m y $k_c = 0,1$ N/m (**Tabla 2 y Figura 13**).

Antes de realizar el experimento de AFM es preciso determinar la k_c real de la micropalanca, que puede diferir hasta en un 20% de la k_c nominal dada por el fabricante. La calibración de la micropalanca se realizó por el método de Sader (*Sader et al.*, 1999; *Carrasco et al.*, 2006 y 2008). Brevemente, la micropalanca seleccionada se colocó sobre el soporte adecuado (conocido como *avioncito*) (**Figura 14**) y se hizo oscilar en el AFM hasta una determinada amplitud (no inferior a 2 v) en respuesta a un voltaje aplicado mediante el uso del modo dinámico implícito en el programa de medida del microscopio, *WSxM* (*Nanotec Electronica S.L.*, *Horcas et al.*, 2007), para así obtener su curva de frecuencia de resonancia particular.

Tabla 2. Características generales de micropalancas *Olympus OMCL-RC800PSA*.

Denominación	Características de las micropalancas					Punta	
	Grosor (nm)	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Constante elástica (N/m)	Frecuencia de resonancia (KHz)	Altura (μm)	Radio (nm)
OMCL-RC800PSA	800	100	20	0,38	68	2,9	20
		100	40	0,73	71		
		200	20	0,05	18		
		200	40	0,10	19		

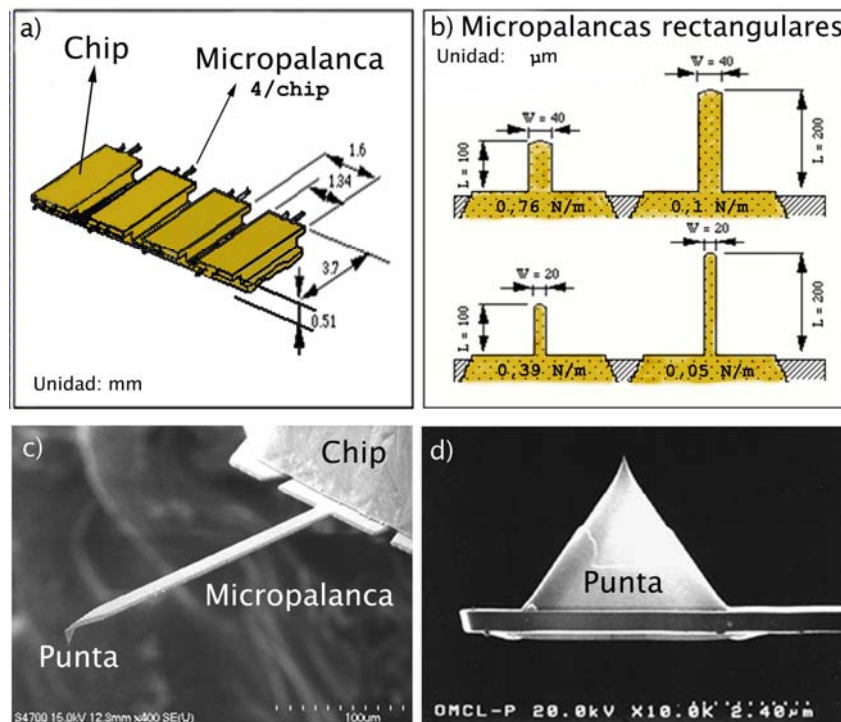


Figura 13. Micropalancas *Olympus OMCL-RC800PSA-W*. a) Esquema de una tira de chips, cada uno de los cuales porta 4 micropalancas rectangulares con valores de k_c diferentes. Tanto los chips como las micropalancas están recubiertos por una película de oro y cromo para así poder reflejar la luz láser del sistema de detección en el AFM; b) dimensiones de las micropalancas y constantes elásticas nominales asociadas; c y d) localización de la punta en la micropalanca. En este caso las puntas son piramidales (altura 2,9 μm, radio final menor de 20 nm, ángulo de 25-45°). Para más información consultar: <http://probe.olympus-global.com/en/en/specnitrideE.html>.

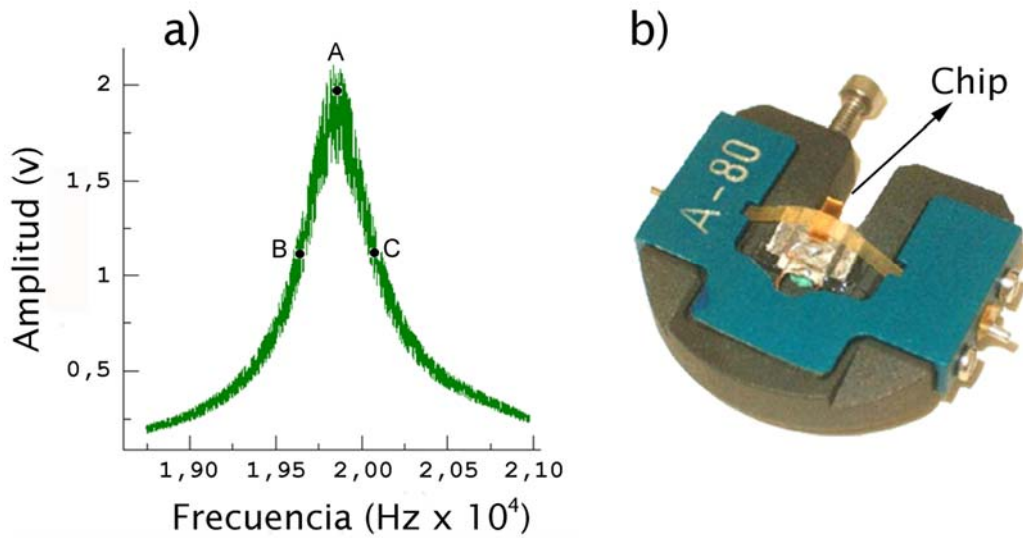


Figura 14. Calibrado de las micropalancas en aire. a) Curva de resonancia característica de una micropalanca de constante elástica nominal 0,1 N/m, obtenida tras un escaneado en frecuencias mediante el uso del programa *WSxM* (Nanotec Electronica S.L.) (Horcas *et al.*, 2007) y finalmente representada en *Origin Pro 8* (*OriginLab Corporation*); b) imagen de un porta *chips* utilizado para el calibrado de la punta al aire.

Para ello, se fijaron los siguientes parámetros que controlan el modo dinámico: amplitud (voltaje que recibe el soporte y que este transmite a la micropalanca) superior a 0,5 v (normalmente de 2-4 v); frecuencia mínima de resonancia de 15.000 Hz, frecuencia máxima de resonancia de 25.000 Hz y retardo de 100 u.a.

La curva de resonancia obtenida de este modo se ajustó a una distribución lorentziana mediante el programa de cálculo *OriginPro 8* (*OriginLab Corporation*, apartado 3.17) (Figura 14). Una vez realizado el ajuste de la curva de resonancia en el programa de cálculo, se obtienen una serie de parámetros necesarios para determinar el valor de k . *i)* El punto A en la curva de resonancia de la Figura 14 equivale a la *frecuencia de resonancia promedio* (Hz) obtenida tras el ajuste; *ii)* la *anchura* de la curva de resonancia (denominada W) es el resultado de la operación $C-B$ (Hz), siendo C y B las coordenadas x,y de la curva de resonancia a las cuales es correcto calcular el ancho de una distribución lorentziana. Estos puntos C y B se ilustran en la Figura 14, y para determinarlos se utiliza la siguiente ecuación:

$$B(v)= C(v) = A(v) \times \left(1 \div \sqrt{2}\right) \text{ (Ecuación 4)}$$

iii) el *factor de calidad* de la micropalanca (denominado Q), que es el cociente entre la *frecuencia de resonancia promedio* (Hz) (punto A de la curva ajustada) y el *ancho* de la

curva (Hz) (parámetro W). Conociendo la *frecuencia de resonancia promedio* (Hz), el *factor de calidad* de nuestra micropalanca, sus dimensiones (200 μm x 20 μm para puntas de k 0,05 N/m nominal o 200 μm x 40 μm para las de k 0,1 N/m nominal) y la densidad y viscosidad del fluido donde se ha hecho oscilar (en este caso el aire, densidad = 1,18 kg/m^3 y viscosidad = $1,86 \times 10^{-5}$ $\text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$) y haciendo uso de la fórmula adecuada, proporcionada en:

<http://www.ampc.ms.unimelb.edu.au/afm/calibration.html#normal>, se obtiene el valor real de k_c para la micropalanca.

3.15.4. Obtención de imágenes en medio líquido

La obtención de imágenes de partículas de MVM en medio líquido así como la determinación de su rigidez mecánica se llevó a cabo mediante AFM utilizando el método JM, cuyo fundamento se ha descrito en la Introducción (apartado 1.3.1).

Una vez calibrada la micropalanca (apartado 3.15.3) ésta se colocó en el soporte adecuado para la medida en medio líquido (denominado *celda líquida*) con la ayuda de unas pinzas. La micropalanca se fijó sobre la ventana de cuarzo limpia del soporte mediante una mínima cantidad de grasa de alto vacío. El soporte de la micropalanca se encajó entonces en la posición adecuada en la cabeza del microscopio y ésta se ajustó de modo que la micropalanca y el vidrio que va a soportar la muestra se encontraron paralelos. Por otro lado, se colocó el soporte de vidrio con la muestra ya preparada (apartado 3.15.2) en el lugar adaptado para tal efecto sobre el piezoeléctrico. A continuación se añadieron 20 μl de tampón PBS o agua destilada (según el caso) con pipeta automática cuidadosamente hasta embeber la micropalanca. De éste modo se formó un menisco líquido entre la punta y la superficie de la muestra (Figura 15).

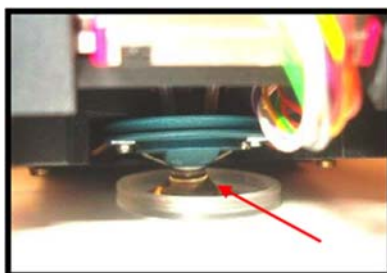


Figura 15. Montaje del sistema de AFM en medio líquido. En la imagen se muestra el soporte para la micropalanca (*celda líquida*) de color azul sobre la muestra que está justo debajo, situada en un porta muestras adecuado para la medición en medio líquido. La flecha roja señala el menisco líquido que se forma cuando la gota que embebe a la micropalanca y la muestra entran en contacto. Imagen tomada de la documentación suministrada por *Nanotec Electrónica S.L.*

A continuación se focalizó el haz láser sobre el extremo de la micropalanca y centró el haz reflejado por la micropalanca sobre el fotodiodo de cuatro sectores. Las medidas comenzaron con valores de fuerza normal y lateral = 0 y de sensibilidad óptica = 10 en el fotodiodo. Una vez focalizado el láser, mediante extensión del piezoeléctrico en el eje z se acercó el soporte de vidrio con la muestra a la punta hasta que vidrio y punta entraron en contacto. Este acercamiento se realizó operando el AFM en modo contacto, y fue monitorizado a través de un osciloscopio ajustado para corriente continua. Los parámetros utilizados en el programa del AFM para entrar en contacto fueron los siguientes: *i*) área de barrido (*size*), 0 nm; *ii*) ángulo de barrido (*angle*), 0°; *iii*) posición en los ejes x, y, z (*x,y,z off*), 0 nm; *iv*) deflexión máxima de la micropalanca (*set point*), aproximadamente 0,2 v; *v*) valores de retroalimentación de la señal (*P e I*), $P < 50$, $I = P/2$; *vi*) sesgo (*bias*) = 1 mv; *vii*) ganancia de señal en eje z (*Z gain*) = 15. El motor que hace avanzar al piezoeléctrico hacia la muestra en el sentido del eje z se movió de forma continua hasta que la punta contactó con el vidrio y se deflexionó hasta el límite marcado (*set point*).

A continuación, se cambió la operación del AFM de modo contacto a JM como sigue. El osciloscopio se reajustó para corriente alterna, y en el programa de control del AFM se modificaron los siguientes parámetros respecto a la situación previa: *i*) deflexión máxima de la micropalanca (*set point*) unas diez veces menor que en el modo contacto; *ii*) valores de retroalimentación de la señal (*P e I*), $300 > P > 80$, $I = P/2$; *iii*) ganancia de señal en eje z (*Z gain*) = 10; *iv*) separación máxima entre punta y muestra (*jump off*) no inferior a la altura de la partícula a medir (en el caso de MVM, unos 25 nm); *v*) tiempo que se mantiene activado el sistema de realimentación (control cycles), 7 ms; *vi*) número de puntos que constituyen la *Fz* (ver más adelante) o *Jump sample*, doble que el valor de *Jump off*. Una vez modificados estos parámetros, se fijó un área de barrido adecuada (nm) y la cantidad de puntos que constituirían la imagen, y se inició la obtención de imágenes mediante la generación de una curva *Fz* (Figura 2) en cada uno de los puntos de un área adecuada de la muestra.

La fuerza total (*Ftotal*) ejercida sobre la muestra es la suma de la fuerza aplicada (*Fap*) más la fuerza de adhesión (*Fadh*):

$$F_{total} = F_{ap} + F_{adh} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

La fuerza aplicada (*Fap*) o fuerza normal es controlada por el usuario y surge de la interacción compresiva perpendicular de la punta sobre la muestra; la fuerza de adhesión (*Fadh*) depende de las condiciones experimentales y de las propiedades de la muestra y la punta, y hace referencia a la fuerza necesaria para separar la punta de la muestra cuando estas han quedado adheridas entre sí. Al realizar cada curva *Fz*, los datos registrados fueron la deflexión de la micropalanca (en voltios, v) en función del

desplazamiento del piezoeléctrico en la dirección z (en nm). La deflexión se convirtió a fuerza haciendo uso de la ley de Hooke:

$$F = -k x \quad \text{(Ecuación 6)}$$

donde F es la fuerza de interacción, k es la constante elástica, y x es la deflexión.

La sensibilidad de las medidas en cada experimento (es decir, la relación entre los nanómetros que la micropalanca se deflexiona y el voltaje medido por el fotodiodo), así como la fuerza ejercida sobre la muestra se determinó como sigue. Se realizó una curva Fz sobre una el soporte indeformable (vidrio). En este caso, la deflexión en la región de contacto (zona C-D en la [Figura 2](#)) coincide con el desplazamiento z del piezoeléctrico, y la pendiente de esta curva proporciona el factor de sensibilidad (nm/v). Multiplicando los valores de deflexión (v) por el factor de sensibilidad (nm/v) se obtiene el desplazamiento de la micropalanca (nm). Finalmente, multiplicando el desplazamiento por la constante elástica de la micropalanca (k_c , calculada como se explica en el apartado 3.15.3), se realiza la conversión a fuerza [\(Ecuación 7\)](#):

$$F(nN) = k_c (nN/nm) \times deflexión(v) \times sensibilidad(nm/v) \quad \text{(Ecuación 7)}$$

A partir del voltaje aplicado al piezoeléctrico que dirige el movimiento en el eje z para que la micropalanca alcance una cierta deflexión y del voltaje necesario para vencer la fuerza de adhesión, fué posible obtener en tiempo real la imagen topográfica de la superficie del soporte de vidrio y de las partículas virales depositadas sobre la misma (de Pablo *et al.*, 1999). La calidad de la imagen, con el fin de discernir claramente las simetrías de las partículas, pudo ajustarse principalmente modificando de manera empírica los parámetros de deflexión máxima de la micropalanca, puntos de la imagen y control del sistema de retroalimentación durante el escaneo de la superficie.

Para el tratamiento de las imágenes de AFM y la identificación de las características topográficas de cada uno de los ejes de simetría de las partículas, se utilizaron las herramientas diseñadas a tal efecto y proporcionadas por el propio programa de medida del AFM. En términos generales, se procedió como sigue. La imagen se abrió con el programa del AFM sin aplicar ningún filtro. En este punto se midió la altura de la partícula, haciendo un perfil sobre la imagen. A continuación, se igualaron las alturas en el vidrio eliminando un plano global o varios planos locales (sin incluir la partícula) de la imagen. Si procedía, se homogeneizó el fondo (*flatten*)

para destacar más las diferencias de altura en la topografía de la partícula. Finalmente, se representó la imagen en 3D y/o en modo negativo (resaltando en tonos más oscuros las partes más altas). Un ejemplo de procesado de imagen de una partícula de MVM se muestra en la **Figura 16**.

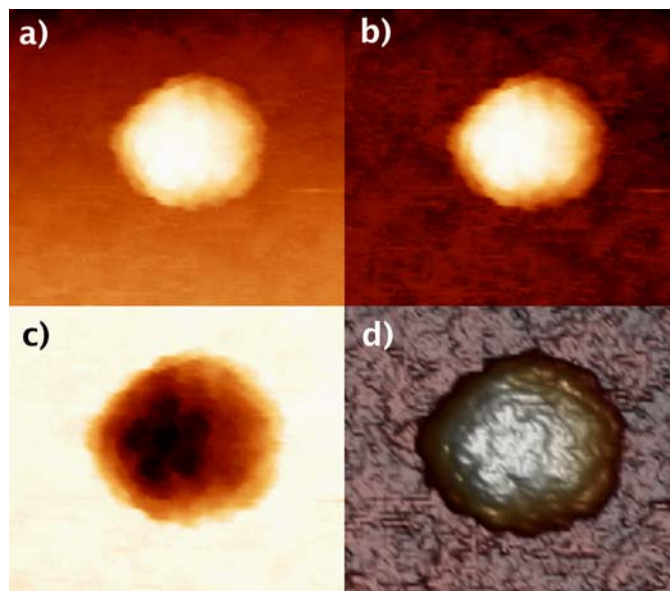


Figura 16. Procesado de imágenes de AFM para identificar la orientación de partículas individuales de MVM. a) Imagen topográfica típica de una partícula de MVM, obtenida con el AFM en modo JM. Las partes más altas de la imagen se muestran en tonos más claros, y las más bajas en tonos más oscuros; b) la misma imagen que en a) tras restarle un plano global (apartado 3.15.4); c) la misma imagen que en b) en representación negativa, con diferente tono de color en función de la altura; d) la misma imagen que en b) tras representarla en 3D. En esta partícula concreta se puede observar un eje S5 en la parte superior (la que se enfrenta a la punta del AFM; centro de la imagen).

3.15.5. Determinación de la rigidez mecánica de partículas de MVM mediante experimentos de nanoindentación

Para determinar la constante elástica k de partículas de MVM, como una medida de su rigidez mecánica, se realizaron imágenes de 128 puntos en un área de barrido comprendida entre los 80 y los 150 nm, tal y como se ha explicado en el apartado 3.15.4. Cada vez que se identificó una partícula de MVM aparentemente intacta, con la altura correcta y en una orientación adecuada (presentando un eje de simetría

claramente identificado en la parte superior), se realizaron una serie de nanoindentaciones sobre sobre la parte central y más alta de la partícula en cuestión.

El procedimiento de indentación se inició situando la partícula elegida en el centro del campo visualizado e interrumpiendo el desplazamiento horizontal de la muestra en la dirección lenta de barrido (eje y), de tal forma que el barrido se realiza ahora únicamente sobre el eje x . En esta situación se procedió a ejecutar la primera nanoindentación. Para ello, se detuvo también el movimiento de barrido a lo largo del eje x , y se aplicó un voltaje al piezoeléctrico en la dirección z desde una distancia de unos 10-15 nm sobre la partícula, y a una velocidad de unos 60 nm/v. Al entrar en contacto punta y muestra, la fuerza de compresión sobre la partícula se incrementó (por medio del desplazamiento en nm del piezoeléctrico en el eje z , fijado empíricamente, y que aproxima la muestra a la punta) hasta una deflexión de la micropalanca (v) que diera cuenta de una deformación inferior a 2 nm (espesor promedio de la cápsida de MVM) y una fuerza aplicada promedio de 100 pN, en ningún caso superior a 150 pN. Para cada partícula vírica analizada se llevaron a cabo varias tandas de nanoindentaciones. Cada indentación permitió obtener una curva Fz .

En general, la secuencia de toma de datos para cada partícula individual fue la siguiente: primero se realizaron 2 indentaciones sobre el soporte de vidrio para conocer la sensibilidad del sistema (apartado 3.15.4) en ese momento. A continuación se efectuaron sobre la partícula unas 4 tandas de indentaciones, realizando 5 indentaciones seguidas por tanda. Al terminar cada tanda se comprobó mediante imagen si la partícula seguía centrada y en la misma orientación, y si conservaba su forma y altura originales. En caso que no fuera así, se descartaron las mediciones realizadas sobre esa partícula. Tras concluir las tandas de indentaciones sobre la partícula se realizaron otras 2 indentaciones sobre vidrio. Finalmente se comprobó una última vez mediante imagen si la partícula seguía centrada y en la misma orientación y conservaba su forma y altura originales. Esta secuencia se repitió una serie de veces hasta un máximo, siempre y cuando la partícula mantuviera intacta su integridad. Observamos que la curva Fz realizada sobre la superficie de vidrio corresponde a un comportamiento elástico lineal, y que la curva Fz sobre la partícula vírica corresponde igualmente a un comportamiento elástico lineal hasta que se alcanzaba una fuerza de aproximadamente 1 nN (Carrasco, 2008). Por encima de 1 nN se observó un comportamiento no lineal, seguido de la ruptura total de la cápsida. El comportamiento lineal también se perdía (aunque no necesariamente por ruptura de la partícula) cuando la deformación de la cápsida superaba el grosor de su pared, unos 2 nm. La ausencia de linealidad por cualquiera de estos motivos supuso el descarte automático de las curvas Fz obtenidas en esas condiciones. Sólo se consideraron válidas aquellas curvas Fz que se realizaron sobre la partícula sin ocasionar daños en la misma ni cambios apreciables en su altura, posición u orientación, y siempre y

cuando la curva Fz presentara una región lineal de pendiente única, cuya longitud correspondiera a una deformación lineal de la partícula producida por una indentación comprendida entre 0,5 nm y 2 nm (Figura 17).

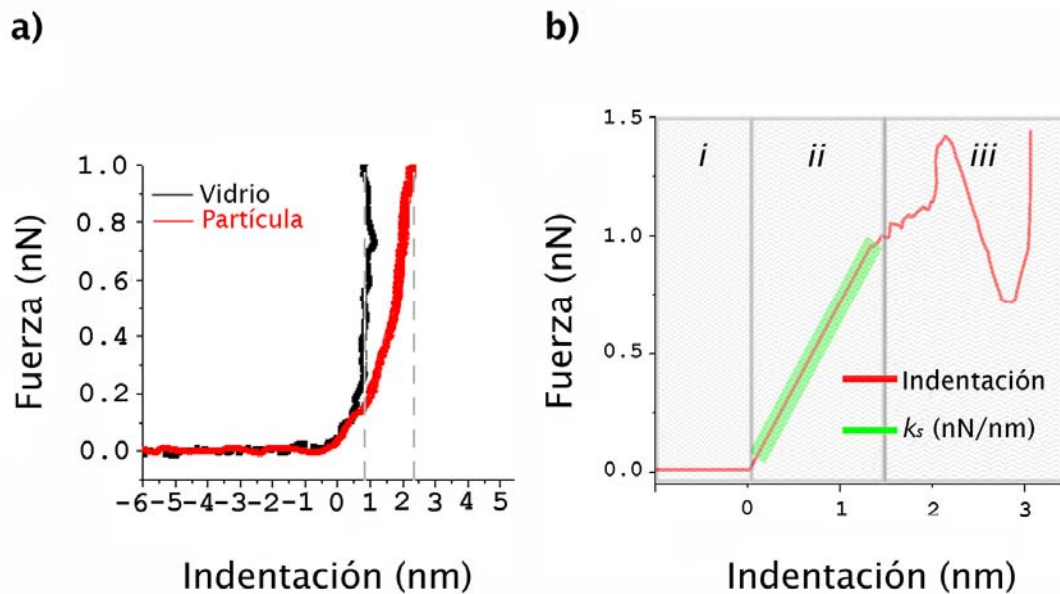


Figura 17. Curvas de indentación sobre la partícula de MVM. Se representa la fuerza en función de la indentación realizada. a) Curva de indentación característica cuando se consigue deformar la cápsida. Las pendientes de la curva sobre vidrio (negra) y sobre la partícula (roja) son diferentes. En este caso la cápsida ha sufrido una deformación de aproximadamente 1,5 nm. b) Indentación de una cápsida durante la aplicación de fuerza, hasta el punto de ruptura de la misma. La curva puede dividirse en tres partes: *i*) no hay indentación, $F = 0$ nN; *ii*) comienza la indentación, que no supera el valor de 1,5 nm; $F < 1$ nN. La pendiente de la curva es proporcional a k_s ; *iii*) la indentación supera el valor de 1,5 nm, $F > 1$ nN. La relación fuerza-indentación deja de ser lineal, y puede llegar a producir la ruptura de la partícula vírica.

Para averiguar la indentación de la cápsida en cada Fz realizada se procedió del siguiente modo. Primero se representó la fuerza (nN) que estábamos aplicando a la partícula (calculada tal y como se explica en la Ecuación 7, apartado 3.15.4) frente a la distancia (nm) que la punta penetraba en la cápsida durante la aplicación de dicha fuerza. A continuación, se aplicó la Ecuación 8:

$$\text{Indentación}(nm) = X_s(nm) - [F_s(v) \times \text{Sensibilidad}(nm/v)] \quad \text{(Ecuación 8)}$$

donde X_s son los nm de movimiento del piezo durante la Fz sobre la partícula, F_s es la deflexión (medida en v) que experimenta la palanca durante la Fz sobre la partícula y la Sensibilidad es la relación entre los nanómetros que la micropalanca se flexiona y el voltaje medido por el fotodiodo cuando se realiza una Fz sobre el vidrio (apartado 3.15.4).

Una vez seleccionadas las Fz válidas según los criterios anteriormente descritos, se analizó el tramo lineal de cada curva Fz realizada sobre la partícula; la pendiente proporcionó una medida de la constante elástica efectiva (k_{ef}) del sistema. Los valores obtenidos experimentalmente para k_{ef} y para la constante elástica de la micropalanca (k_c) permitieron determinar la constante elástica de la muestra (k_s) a lo largo de la dirección de la fuerza aplicada aplicando la ecuación correspondiente a un sistema de dos muelles en serie (Ecuación 9):

$$1/k_{ef} = (1/k_c) + (1/k_s) \Rightarrow k_s = (k_c \times k_{ef}) / (k_c - k_{ef}) \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Para cada tipo de partícula y orientación (eje S2, S3 o S5) se promediaron como mínimo 50 valores individuales de k_s obtenidos a partir de al menos 5 partículas individuales distintas. Estos valores se promediaron de dos modos diferentes: *i*) se calculó el promedio y la desviación estándar del valor de k_s a partir del conjunto de todas las Fz independientes realizadas sobre todas las partículas de un mismo tipo analizadas y una clase de eje de simetría; *ii*) se calculó el promedio y la desviación estándar para el valor de k_s de cada partícula individual analizadas y una clase de eje de simetría, y finalmente se obtuvo el promedio y la desviación estándar para el valor de k_s del conjunto de las partículas analizadas en cada eje de simetría. Ambas aproximaciones rindieron valores muy similares y permitieron obtener las mismas conclusiones.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la aplicación del test t de Student (Gosset, 1908). Los valores promedio de k_s obtenidos para dos tipos de partículas diferentes se consideraron significativamente distintos cuando el valor del estadístico (T) resultó inferior a 0,05. El nivel de confianza del análisis fue del 99%. Tanto los cálculos como los ajustes matemáticos y el análisis estadístico efectuaron con el programa *OriginPro 8* (OriginLab Corporation).

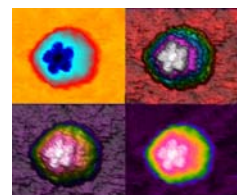
3.16. Programas de gráficos, modelado molecular y análisis estructural

Se utilizaron programas de visualización, modelado, filtrado y cálculo moleculares *WHATIF* (Vriend, 1990), *RasMol* (Sayle y Milner-White, 1995), *CAST* (Liang *et al.*, 1998), *Pymol* (DeLano, 2002), *Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004) y *EMAN pdb2mrc* (Ludtke *et al.*, 1999) y las coordenadas cristalográficas obtenidas para el virión de MVMi (1MVM, 1Z1C) (Llamas-Saiz *et al.*, 1997; Kontou *et al.*, 2005) y la cápsida vacía de MVMp (1Z14) (Kontou *et al.*, 2005). En particular, los cálculos de accesibilidad al solvente y del número y naturaleza de los contactos intra o intersubunidades se realizó mediante *WHATIF*, el análisis de cavidades se realizó mediante *CAST*, *WHATIF* o *Pymol*, la mutagénesis virtual se realizó mediante *Pymol*, la inspección visual de las estructuras, interacciones, mutaciones virtuales, filtrado, etc, se realizó mediante *Pymol*, *Chimera*, *EMAN pdb2mrc* o *RasMol*. Las representaciones gráficas se realizaron con *Pymol*, *Chimera* o *RasMol*.

3.17. Programas de cálculo, representación y análisis estadístico de datos

Se utilizaron los programas *KaleidaGraph* (Abelbeck Software) tanto para diversas representaciones gráficas como para ajustes de datos numéricos, *Excel* (Microsoft Corporation) para el cálculo de constantes elásticas, promedios y desviaciones estandard en experimentos de AFM, y *OriginPro 8* (OriginLab Corporation) para los ajustes lineales de pendientes, ajustes Gaussianos y Lorencianos, cálculos de indentación, análisis estadísticos y representaciones gráficas en experimentos de AFM.

Resultados



4. RESULTADOS

4.1. Participación en la dinámica conformacional de MVM de residuos de glicina conservados en el segmento Nt de VP2

La inspección de la estructura de CPV llevó a Rossmann y colaboradores a sugerir que las glicinas situadas entre los aminoácidos 28 a 38 en VP2 podrían ser necesarias para facilitar la translocación de los Nt de las proteínas de la cápsida a través de los poros de ésta (Wu *et al.* 1993, Simpson *et al.*, 1998; apartado 1.2.3). Sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido, esta posibilidad no se había explorado experimentalmente. Como parte de nuestros estudios sobre estabilidad y dinámica conformacionales en cápsidas víricas, elegimos investigar esta propuesta. Para ello diseñamos un estrategia que consistía en: *i)* sustituir individualmente algunos de esos residuos de glicina por otros residuos elegidos racionalmente; y *ii)* analizar el efecto de cada mutación sobre la infectividad del virus y en procesos de dinámica conformacional de la cápsida relacionados con la región situada alrededor de los poros de la misma.

4.1.1. Diseño y construcción de partículas víricas con mutaciones en el segmento rico en glicinas

La selección de los residuos de glicina para un análisis mutacional se realizó atendiendo a una serie de consideraciones: *i)* su grado de conservación. Se eligieron algunas de aquellas glicinas absolutamente conservadas en el género parvovirus (Tabla 3; Chapman y Rossmann, 1993) confiando en que dicha conservación se debiese a una posible relevancia funcional; *ii)* la necesidad de mantener el procesamiento proteolítico del extremo Nt de VP2 para dar VP3. Este procesamiento ocurre *in vivo* entre los residuos 22 y 25 de la VP2 (Tullis *et al.*, 1992, Cotmore y Tattersall, 2007), y en cualquier caso no debe implicar a residuos más allá de G28, que ocupa la parte más externa del poro; *iii)* la posición aproximada del residuo dentro del poro en la estructura tridimensional del virión (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Figura 18). Razonamos que si la presencia de glicinas en este tramo estaba relacionada con la estrechez del poro, aquellas confinadas en la parte central de dicho canal, podrían tener una importancia mayor, o al menos igual, que otras glicinas situadas más hacia los extremos; *iv)* su posición exterior con respecto a la zona más estrecha del poro en la estructura del virión. Esta constricción se encuentra en la base del poro y está formada en MVM por la confluencia de cinco residuos de leucina (L172), uno por cada monómero de VP2 que lo forman (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998, Farr y Tattersall,

2004). Un residuo voluminoso en vez de una de estas glicinas podría tener más dificultades para atravesar ese estrechamiento y ser seleccionado en contra.

Tabla 3. Alineamiento de secuencias de VP2 (residuos 28-38) entre distintos parvovirus.

Nº del residuo en VP2 de MVM	Parvovirus ^a									
	MVM	AMDV	PPV	CPV-D	FPV	RPV	PAVH-H1	BPV	B19	AAV-2
28	G	G	G	G	G	G	G	G	V	A
29	G	G	G	S	S	S	S	S	N	P
30	S	S	G	G	G	G	S	V	S	M
31	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A
32	G	G	G	G	G	G	G	G	E	D
33	G	G	G	G	G	G	G	G	A	N
34	G	G	G	G	G	G	G	G	S	N
35	S	G	R	G	G	G	S	R	T	E
36	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
37	G	G	A	S	S	S	G	G	A	A
38	G	G	G	G	G	G	G	S	G	D

^a Género Parvovirus: MVM (Virus Diminuto del Ratón), AMDV (Virus de la enfermedad Aleutiana del Visón), PPV (Parvovirus Porcino), CPV-D (Parvovirus Canino, variante D), FPV (Virus de la Panleucopenia Felina), RPV (Parvovirus del Mapache), PAVH-H1 (Parvovirus H1 del Hamster), BPV (Parvovirus Bovino); género Eritrovirus: B19 (Parvovirus Humano B19); género Dependovirus: AAV-2 (Virus Adenoasociado serotipo 2). En negrita se indica el aminoácido presente en las posiciones del segmento elegidas para el análisis mutacional realizado en este trabajo para su mutación. (Datos tomados de Chapman y Rossmann, 1993).

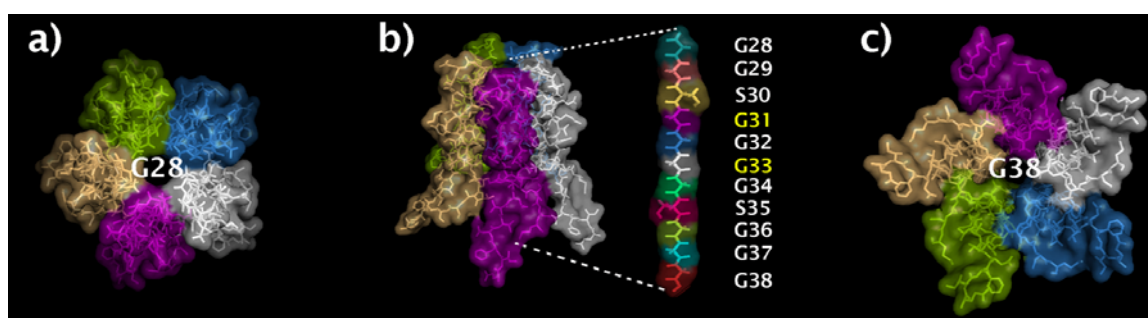


Figura 18. Localización de la secuencia de VP2 rica en glicinas en el interior de un poro en el virión de MVM, tras la externalización del extremo Nt de VP2. Modelo de la estructura cilíndrica que rodea el poro en un eje S5 en el virión de MVM, representada en modelo combinado de superficie y varillas, y basado en la estructura cristalográfica del virión (Kontou *et al.*, 2005). Las 5 horquillas beta que forman la estructura, pertenecientes cada una a una subunidad diferente de la cápsida, se representan en colores. a) Vista frontal desde el exterior de la partícula; b) vista lateral; c) vista frontal desde el interior de la partícula. En b) se indican, a la derecha, la posición aproximada que ocuparían en el interior del poro los residuos 28 a 35 de VP2, siendo la glicina 28 la más próxima al exterior. Los residuos 36-38 se encuentran en la base del poro. Las glicinas 31 y 33 ocupan la parte central interna del poro.

Cuatro glicinas situadas en posiciones 31 a 34 de VP3, que en la estructura del virión estarían localizadas en la parte central del poro, reunían todas las condiciones anteriormente citadas. Era preciso analizar el efecto de más de una glicina situada en posiciones suficientemente diferentes dentro del poro, ya que la participación en el ciclo viral de diferentes glicinas de este segmento rico en ellas podría no ser la misma. Por todos estos motivos, elegimos para su mutación las glicinas G31 y G33 (Figura 18).

Partiendo del supuesto de que las glicinas son necesarias debido a su pequeño tamaño, derivado de la ausencia de cadena lateral, se decidió sustituir individualmente G31 y G33 por una serie de residuos aminoacídicos de cadena lateral apolar (para mantener el carácter hidrófobo del metileno en G) pero de volumen creciente (A, V, L y F). Se construyó además un doble mutante que incluyese el residuo más voluminoso probado (F) en ambas posiciones (G31 y G33), para ver si la doble sustitución potenciaba los efectos que pudieran causar las mutaciones sencillas introducidas.

En base al diseño mencionado, se construyeron un total de 9 mutantes: G31A, G31V, G31L, G31F, G33A, G33V, G33L, G33F y G31F/G33F. Las mutaciones se realizaron sobre el plásmido pSVtk-VP1/2 que contiene la región codificante para las proteínas de la cápsida de MVMp (apartados 3.2.1 y 3.3.1). El segmento que contenía la mutación se subclonó a su vez sobre el plásmido infeccioso pTRp, que contiene el ADN infeccioso de MVMp (apartados 3.2.4 y 3.3.3). En los casos en los cuales fue

necesaria la obtención de cápsidas vacías (VLPs) en el sistema de baculovirus (apartado 3.4), las mutaciones se efectuaron sobre el plásmido pFB1-VP2 que contiene la región codificante para VP2 de MVMp (apartados 3.2.2 y 3.3.1) y posteriormente fueron trasladadas al bácmido BM-VP2 (apartado 3.2.3 y 3.3.2).

4.1.2. Efecto de mutaciones de G31 o G33 sobre la infectividad del virión

Con el objeto de probar si G31 y/o G33 eran necesarias de algún modo para el correcto desarrollo del ciclo viral se analizó el efecto de las mutaciones introducidas sobre la infectividad del virus en células susceptibles (NB324K) en cultivo. Para ello, se realizó en paralelo la transfección con la misma cantidad de plásmidos pTRp mutantes y no mutado como control positivo, incluyendo un control negativo sin ADN, y se determinaron los títulos de virus progenie a dos tiempos diferentes tras la transfección, 48 hpe (virus intracelular) y 96 hpe (virus extracelular) (**Tabla 4**).

Los títulos obtenidos a partir de viriones intracelulares a 48 hpe se normalizaron frente a la cantidad de proteína VP2 total producida en cada caso (apartado 3.11). Los resultados tras la normalización no se modificaron apreciablemente, ya que para los diferentes mutantes las mayores diferencias de expresión no superaron un factor de 2x por encima o por debajo del valor obtenido para el virus control (no mutado) en cada experimento. Los resultados de experimentos repetidos mostraron claramente que cada una de las 9 sustituciones de G31 o G33 afectan negativamente a la infectividad del virión. A 48 h, cuando aún no se habría completado un ciclo de infección, el título normalizado para la progenie de todos los mutantes excepto dos (G31A y G31V) se redujo sustancialmente, a un valor de aproximadamente 0,01% -10% con respecto al obtenido para el control no mutado. A las 96 h, un tiempo suficiente para que ocurra más de un ciclo de infección, la progenie viral se redujo en todos los mutantes a un valor de aproximadamente 0,001% - 1% con respecto al obtenido para el control no mutado.

Sin embargo, pese a la repetición de experimentos y a la normalización de títulos, no se encontró de ningún modo una correlación entre la reducción de la infectividad de cada mutante con respecto al control y el tamaño de la cadena lateral introducida, ni para la posición 31 ni para la 33 (**Tabla 4**).

Estos resultados constituyen la primera evidencia experimental directa de un papel en el ciclo viral para las glicinas 31 y 33 dentro de una región enriquecida en las mismas situada los Nt de las proteínas de la cápsida de parvovirus. Además, dichos resultados muestran que la magnitud del efecto sobre la producción viral de sustituciones de estas glicinas por otros aminoácidos no depende exclusivamente del

tamaño de la cadena lateral introducida. En los siguientes apartados se describen los experimentos realizados para tratar de identificar alguna etapa concreta del ciclo viral en el que las glicinas del Nt pudieran estar implicadas.

Tabla 4. Análisis mediante titulación del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicinas sobre la infectividad de MVM.

Mutación en VP2	Relación de infectividad	
	Viriones intracelulares (48 hpe) ^a	Viriones extracelulares (96 hpe) ^a
no mutado (wt)	1,00	1,00
G31A	0,57 ± 0,40	0,03 ± 0,02
G31V	0,51 ± 0,70	0,014 ± 0,003
G31L	0,002 ± 0,001	0,00003 ± 0,000007
G31F	0,08 ± 0,01	0,0018 ± 0,0083
G33A	0,009 ± 0,01	0,0014 ± 0,0013
G33V	0,18 ± 0,18	0,06 ± 0,01
G33L	0,006 ± 0,006	0,007 ± 0,01
G33F	0,0005 ± 0,0002	0,0015 ± 0,0017
G31A/G33F	0,003 ± 0,003	ND

^a Los valores de infectividad fueron obtenidos por duplicado en cada experimento, en un mínimo de dos experimentos independientes por cada mutante. La relación de infectividad expresa el cociente entre el título obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el control no mutado (wt) del mismo experimento. Se indica en cada caso el valor medio y la desviación estandar. Los títulos obtenidos a 48 hpe fueron normalizados en función de la cantidad de proteína sintetizada en cada caso, como se describe en los apartados 3.1.5 y 3.11.

4.1.3. Efecto de mutaciones de G31 o G33 sobre el ensamblaje de la cápsida

En la estructura del virión de MVM la región rica en glicina ocupa el interior de los poros y, por tanto, forma parte de las interfaces entre los intermediarios triméricos del ensamblaje de la partícula. En las cápsidas vacías, la parte final de la región rica en glicinas (residuo G36 y anteriores en la secuencia, [Figura 18](#)) se encuentra muy próxima a la base de los poros (Kontou *et al.*, 2005). Por tanto, el segmento rico en glicinas podría tener un papel en el ensamblaje de la cápsida, y el efecto negativo sobre la infectividad de las sustituciones de G31 y G33 podría deberse a un defecto en el proceso de ensamblaje.

Para determinar si las mutaciones introducidas en posiciones 31 y 33 tenían algún efecto apreciable sobre el ensamblaje de la cápsida, se transfectaron células NB324K con el plásmido pSVtk-VP1/2 no mutado y los diferentes mutantes construidos, y se llevaron a cabo ensayos de IF *in situ* tal y como se describe en el apartado 3.6. Se utilizaron anticuerpos que reconocen las VPs, independientemente de su estado de plegamiento o ensamblaje (Grueso, 2006), y un anticuerpo monoclonal (B7A) que reconoce exclusivamente las partículas de MVM ensambladas (López-Bueno *et al.*, 2003).

Los resultados ([Figura 19](#)) mostraron que los 9 mutantes de glicina ensayados son capaces de sintetizar VPs y ensamblarlas en cápsidas de manera comparable a la del control no mutado. La relación entre la señal obtenida con el anticuerpo anti-cápsida (B7A) y la obtenida con el anticuerpo *anti-VPs* fue similar en todos los casos ([Tabla 5](#)).

Por tanto, G31 y G33 no parecen ser necesarias para el correcto plegamiento de las proteínas virales ni para el adecuado ensamblaje de dichas proteínas en cápsidas completas.

Tabla 5. Análisis mediante IF *in situ* del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicinas sobre el ensamblaje de cápsidas de MVM.

Mutación en VP2	Relación de ensamblaje ^a	Mutación en VP2	Relación de ensamblaje ^a
no mutado (wt)	1,00	G33A	0,93
G31A	0,91	G33V	0,98
G31V	1,00	G33L	0,91
G31L	0,80	G33F	0,92
G31F	0,95	G31F/G33F	0,90

^a La relación de ensamblaje constituye una indicación de la eficiencia de ensamblaje para cada cápsida mutante con respecto a la cápsida control no mutada (wt), y se obtuvo como se describe en el apartado 4.1.3.

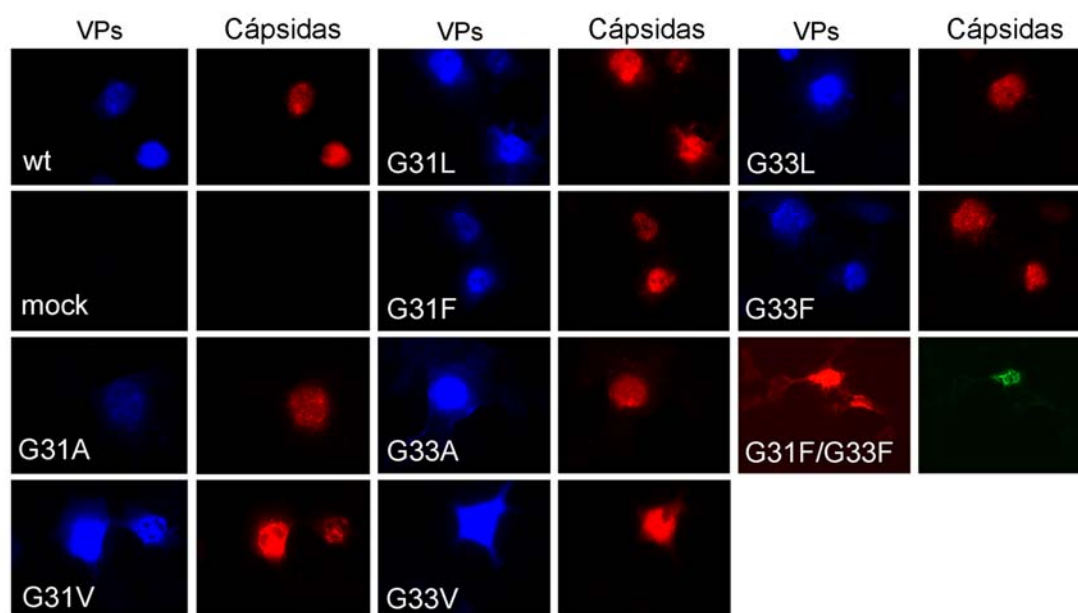


Figura 19. Análisis mediante IF *in situ* del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicina sobre la síntesis de VPs y la formación de la cápsida de MVM. Células NB324K transfectadas con el plásmido pSVtk-VP1/2 que expresa las proteínas VPs no mutadas (wt) o mutantes, se fijaron a las 42-48 hpe y se analizaron con anticuerpos que reconocen proteínas estructurales (*anti-VPs*; marcaje azul para todos excepto G31F/G33F, y rojo para G31F/G33F) ó las cápsidas ensambladas (monoclonal *anti-cápsida B7A*; marcaje rojo para

todos excepto G31F/G33F, y verde para G31F/G33F). En paralelo se llevó un control negativo de células sin transfectar (mock). Para cada caso se muestran imágenes representativas.

4.1.4. Efecto de mutaciones de G31 o G33 sobre la externalización del segmento Nt de VP2

A continuación analizamos si el proceso de externalización del Nt de VP2 durante la morfogénesis viral en el núcleo resultaba afectado por alguna de las mutaciones introducidas.

Para ello, en una primera serie de experimentos, se transfectaron células NB324K con el plásmido pTRp no mutado y los diferentes mutantes construidos, y se llevaron a cabo ensayos de IF *in situ*, utilizando el anticuerpos B7A para detectar partículas víricas ensambladas, y un anticuerpo policlonal *anti-Nt-VP2* para detectar el segmento Nt de VP2 en caso que este hubiera sido externalizado (Maroto *et al.*, 2004; apartado 3.6). Para cada mutante se llevaron a cabo entre 2 y 5 experimentos similares, en cada uno de los cuales se incluyó el control no mutado.

Para conocer la eficiencia de externalización del Nt de VP2, se determinó el porcentaje de células que mostraba una señal positiva para Nt en el núcleo celular, y se normalizó con respecto a la cantidad de células que dieron una señal nuclear positiva con el anticuerpo B7A.

Los resultados (Figura 20 y Tabla 6) fueron reproducibles y significativos. Se encontró que todos los mutantes analizados, excepto G31A y G33A, mostraban una eficiencia de externalización del Nt de VP2 claramente reducida. Esta reducción en la eficiencia correlacionó con el tamaño de la cadena lateral introducida en ambas posiciones (G31 y G33), desde el metilo de las alaninas (sin efecto) hasta el grupo fenilo de las fenilalaninas (efecto máximo), pasando por los grupos alifáticos de tamaño intermedio de valinas y leucinas (efecto intermedio).

Los efectos sobre la externalización del Nt de VP2 de las mutaciones glicina-alanina, y de una mutación glicina-fenilalanina (como casos extremos) fueron analizados también mediante una segunda aproximación experimental, utilizando los mutantes G31A, G33A y G33F, junto al control no mutado. Estos experimentos fueron realizados por el Prof. J. M. Almendral y la Dra. E. Grueso en colaboración con nosotros.

Tabla 6. Análisis mediante IF *in situ* del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicina sobre la externalización del Nt de VP2.

Mutación en VP2	Eficiencia de externalización del Nt VP2^a	Mutación en VP2	Eficiencia de externalización del Nt VP2^a
no mutado (wt)	1,00 ± 0,17	G33A	0,89 ± 0,13
G31A	0,91 ± 0,17	G33V	0,60 ± 0,09
G31V	0,58 ± 0,09	G33L	0,62 ± 0,16
G31L	0,44 ± 0,13	G33F	0,28 ± 0,11
G31F	0,35 ± 0,11	G31F/G33F	0,37 ± 0,10

^a Para cada mutante y el control no mutado (wt) se calculó el porcentaje de las células que mostraron fluorescencia positiva en el marcaje con anticuerpo que reconoce las cápsidas ensambladas (B7A). La eficiencia de externalización del Nt de VP2 expresa el cociente entre el porcentaje de células con señal positiva para el anticuerpo que reconoce el Nt de VP2 (*anti-NtVP2*) en cada caso frente al porcentaje obtenido del mismo modo para el control no mutado (wt). En cada caso se indica el valor medio y la desviación estándar.

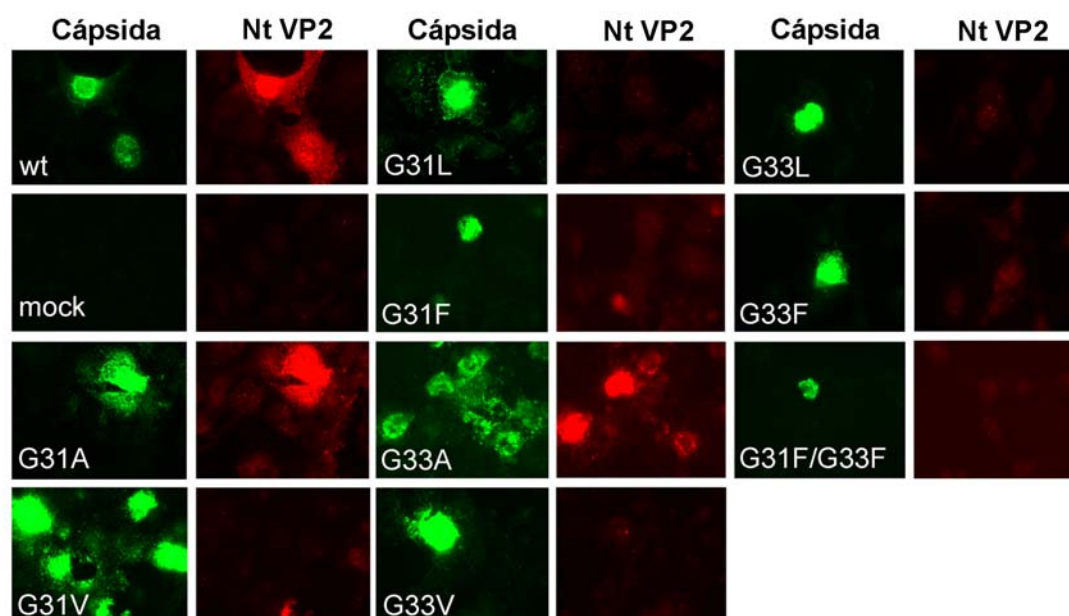


Figura 20. Análisis mediante IF *in situ* del efecto de mutaciones en la secuencia rica en glicina sobre la externalización del Nt de VP2 en la cápsida de MVM. Células NB324K transfectadas con el plásmido infeccioso pTRp no mutado (wt) o mutantes, se fijaron a las 42-46 hpe y se analizaron con anticuerpos que reconocen las cápsidas ensambladas (monoclonal anti-cápsida B7A; marcaje verde) o el segmento Nt-VP2 de MVM (*anti-Nt-VP2*; marcaje rojo). En paralelo se llevó un control negativo de células sin transfectar (mock). Para cada caso se muestran imágenes representativas.

Los viriones mutantes seleccionados y el control no mutado fueron purificados en paralelo, y la cantidad de Nt de VP2 externalizado en cada caso se determinó mediante ensayos de tripsinización del Nt expuesto, seguida de SDS-PAGE y determinación de la cantidad de VP3 generada (Maroto *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos (Figura 21) revelan, como se esperaba por los resultados obtenidos mediante IF *in situ*, la falta de efecto sobre la externalización del Nt de VP2 de la mutación G31A, y la inhibición de dicho proceso mediante la mutación G33F. De modo notable, resultados que están pendientes aún de confirmación indican que la mutación G33A, aunque no afecta visiblemente a la externalización del Nt en experimentos de IF, reduce apreciablemente (aunque no tanto como G33F) la susceptibilidad a proteólisis del Nt. Esta observación utilizando un método más cuantitativo que IF sugiere que la externalización del Nt está algo reducida/dificultada en este mutante. Una posibilidad es que esta mutación no impida la salida de la primera parte del Nt, pero sí de la región donde se encuentra el punto de procesamiento proteolítico, alrededor del residuo 22 de VP2.

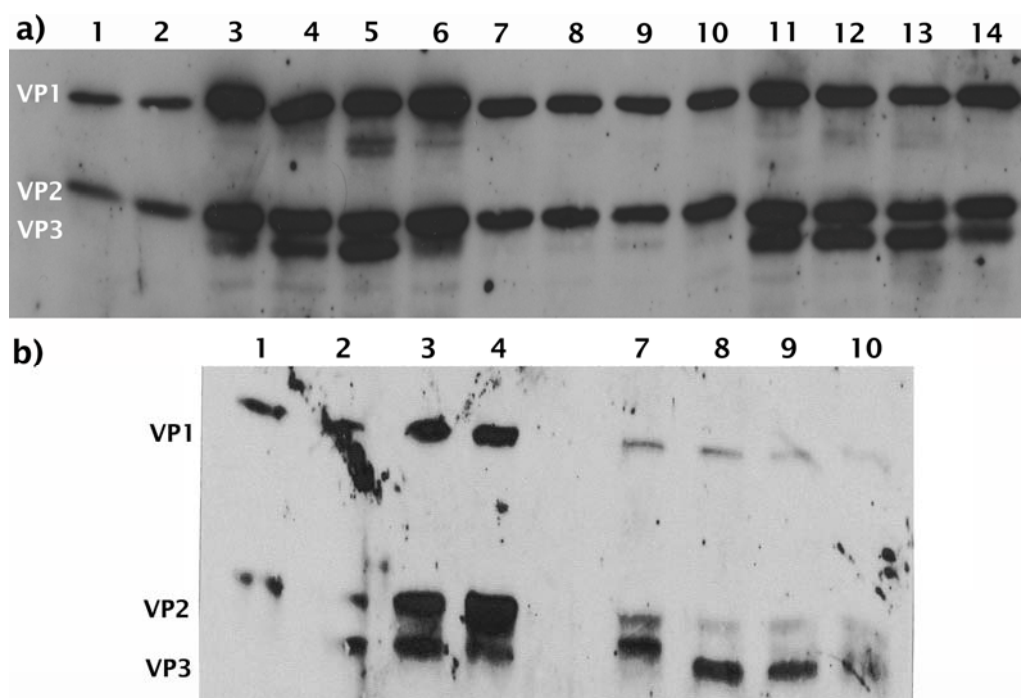


Figura 21. Análisis mediante proteólisis enzimática del efecto de mutaciones G31A, G33A, G33F sobre la externalización del Nt de VP2 en el virión de MVM. Estos experimentos fueron realizados por el Prof. J. M. Almendral del modo descrito en Maroto *et al.*, 2000. VP1, VP2 y VP3 señalan la altura a la que han migrado las bandas de las distintas proteínas en el gel. a) Análisis de viriones mutantes G31A, G33F y el control no mutado. 1 y 2, cápsida del mutante G33F en presencia o ausencia de tripsina, respectivamente; 3-6, virión del mutante G31A en presencia de concentraciones crecientes de tripsina (3-5), o en su ausencia (6); 7-10, virión del mutante G33F en presencia de concentraciones crecientes de tripsina (7-9), o en su ausencia (10); 11-14, virión no mutado en presencia de concentraciones crecientes de tripsina (11-13), o en su ausencia (14). b) Análisis de viriones mutantes G33A y el control no mutado. 1-4, virión del mutante G33A en presencia de concentraciones crecientes de tripsina (2-4), o en su ausencia (1); 7-10, virión no mutado en presencia de concentraciones crecientes de tripsina (8-10), o en su ausencia (7).

Los resultados de estos dos tipos de experimentos, tomados en conjunto, revelan que la externalización del Nt de VP2 a través de los poros de la cápsida de MVM tendrá lugar con la máxima eficacia sólo si, dentro del tracto rico en glicinas, en posición 31 aparece un residuo muy pequeño (glicina o alanina), y si en posición 33 se encuentra una glicina y no cualquier otro residuo. Además, la correlación inversa encontrada entre el tamaño de la cadena lateral introducida y la eficiencia de externalización del Nt-VP2 sugiere que existencia de un residuo con una cadena lateral

poco voluminosa en esas posiciones puede estar relacionada con la necesidad de evitar impedimentos estéricos durante el proceso dinámico de externalización del segmento Nt durante el ciclo viral.

4.1.5. Efecto de mutaciones de G31 o G33 sobre la dinámica conformacional global de la cápsida

Para obtener evidencias más cuantitativas sobre la relación entre el tamaño de la cadena lateral en posiciones 31 y 33 y la externalización del Nt de VP2, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* con cápsidas de MVM formadas tan solo por la proteína VP2, obtenidas como VLPs recombinantes producidas en células de insecto (apartado 3.4). Las VLPs de MVM producidas en este sistema son estructural y funcionalmente idénticas a las cápsidas nativas de MVM formadas por VP1 y VP2, excepto por la ausencia de los extremos Nt de VP1, que se encuentran desordenados en el interior (Hernando *et al.*, 2000, Kontou *et al.*, 2005).

El calentamiento de VLPs *in vitro* proporciona la energía necesaria para que se produzca la externalización de los Nt de VP2 (Hernando *et al.*, 2000, Carreira *et al.*, 2004). Este proceso de translocación está asociado con un cambio conformacional más global en la cápsida que, si bien es sutil, también es altamente reproducible y claramente detectable mediante la variación que produce en la fluorescencia intrínseca de triptófanos de la cápsida a causa de cambios en su exposición al solvente (Carreira *et al.*, 2004, Reguera *et al.*, 2005). Es importante resaltar que no existen residuos de triptófano cerca de los poros de la cápsida por donde los Nt de las proteínas de la cápsida son externalizados. Por tanto, este cambio conformacional no se limita estrictamente a la vecindad del poro. El cambio conformacional inducido por calor y seguido mediante fluorescencia es reversible en el caso que la temperatura se haya elevado lo justo para producir la transición (hasta unos 50°C), y sólo por un corto período de tiempo. Este hecho permitió llevar a cabo un análisis en equilibrio de esta transición (Carreira *et al.*, 2004). La externalización del Nt de VP2, seguida mediante calentamiento intenso y prolongado no es reversible (Maroto *et al.*, 2004; ver Discusión).

Análisis termodinámico. Se obtuvieron VLPs de MVM que contenían las mutaciones representativas G31A y G33F (apartados 3.3.1, 3.3.2 y 3.4) y se compararon con el control no mutado en su respuesta conformacional a la aplicación de un gradiente térmico, seguida por fluorescencia de triptófanos. Para cada mutante y el control no mutado se realizaron un mínimo de 3 experimentos. Se observó que la primera transición sigmoideal cooperativa (la asociada con la externalización del extremo Nt de VP2) ocurrió en todos los casos. No obstante, mientras que la T_m obtenida para el mutante a alanina fue estadísticamente indistinguible de la del control

no mutado, la T_m en el caso del mutante a fenilalanina resultó significativamente más elevada (Figura 22 y Tabla 7).

Los resultados de estos experimentos termodinámicos *in vitro* son consistentes con los observados en los ensayos de inmunofluorescencia *in situ*, e indican que una cadena lateral apolar voluminosa (fenilalanina), pero no una pequeña (alanina) en posiciones altamente conservadas dentro de la región enriquecida en glicinas, dificulta en cierta medida un cambio conformacional en la cápsida de MVM asociado con la externalización del Nt de VP2.

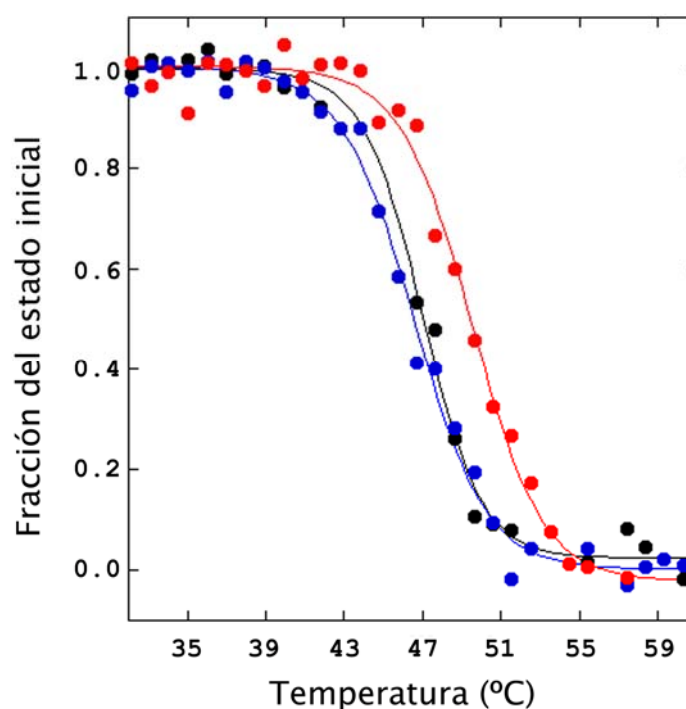


Figura 22. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de las mutaciones G31A y G33F sobre la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento. Se indica la fracción de partículas en el estado conformacional inicial en función de la temperatura. Control no mutado (negro), mutante G31A (azul) y mutante G33F (rojo). Para cada caso se muestra un experimento representativo.

Tabla 7. Valores de T_m para la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento.

Mutación en VP2	T_m (°C) ^a
no mutado (wt)	45,3 ± 1,3
G31A	46,4 ± 0,5
G33F	48,2 ± 0,9

^a En cada caso se indica el valor medio y la desviación estándar.

A continuación, comparamos directamente mediante ensayos de tripsinización en VLPs (apartado 3.9) la externalización del extremo Nt de VP2 de un mutante a alanina (G31A) respecto al control no mutado. De forma consistente con los ensayos bioquímicos de tripsinización llevados a cabo con viriones (apartado 4.1.4), no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje final de Nt externalizado entre el mutante y el control ([Figura 23](#)).

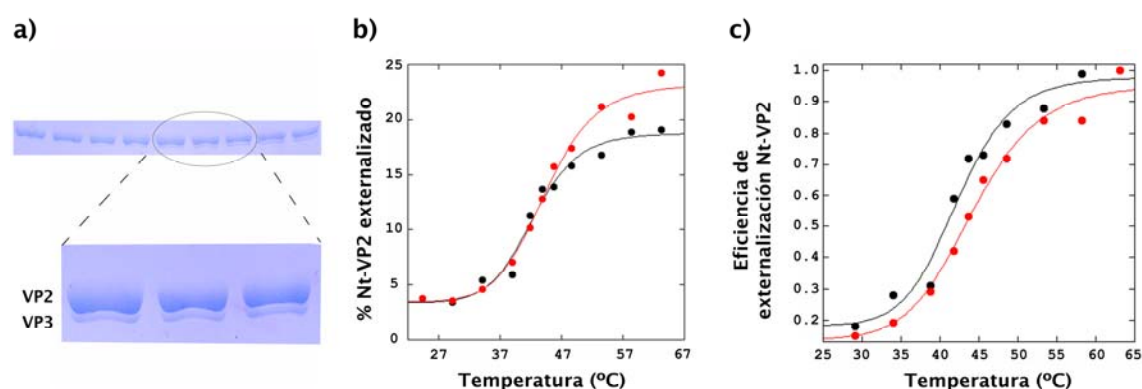


Figura 23. Análisis mediante proteólisis enzimática del efecto de la mutación G31A sobre la externalización del Nt de VP2 en VLPs de MVM sometidas a calentamiento moderado. Los experimentos se realizaron como se describe en el apartado 3.9. a) Resultado típico obtenido por PAGE-SDS a partir de alícuotas extraídas a diferentes temperaturas durante el análisis, para su posterior densitometrado y cuantificación de VP2 sin proteolizar (64KDa) y VP3 resultado del procesamiento (60KDa); b) porcentaje del Nt de VP2 externalizado en función de la temperatura. Dicho porcentaje se obtuvo como el cociente de la cantidad de VP3 y la cantidad de proteína total (VP2 + VP3) a cada temperatura; c) Eficiencia de externalización del Nt de VP2 en función de la temperatura. Dicha eficiencia se obtuvo normalizando el porcentaje total de Nt-VP2 externalizado mostrado en el panel a). En ambos casos (b y c) se muestran gráficas representativas. Control no mutado (rojo) y mutante G31A (negro).

Análisis cinético. Para obtener más información sobre el papel de las glicinas conservadas en el cambio conformacional inducido por calor en las VLPs de MVM, estudiamos la cinética de las reacciones directa e inversa en los mutantes de alanina y fenilalanina y las comparamos con las del control no mutado (apartado 3.8). La constante cinética de la reacción directa (k_{on}) fue estadísticamente indistinguible de la obtenida para el control en el caso del mutante a alanina (G31A), pero significativamente menor en el caso del mutante a fenilalanina (G33F) (Figura 24 y Tabla 8). En cambio, la constante cinética para la reacción inversa (k_{off}) fue estadísticamente indistinguible en los tres casos (Figura 24 y Tabla 8).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los experimentos de equilibrio, e indican además que un residuo voluminoso (fenilalanina), al menos en la posición 33 de la región rica en glicinas, dificulta el rearrreglo conformacional de la cápsida asociado a la salida del Nt de VP2, pero no idificulta el relajamiento de la estructura de la cápsida a su conformación inicial estable.

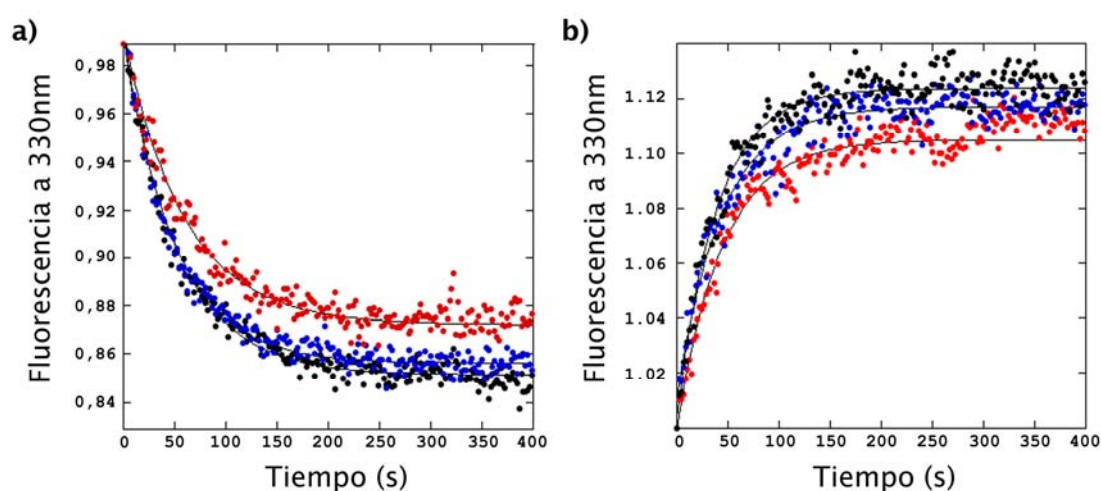


Figura 24. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de las mutaciones G31A y G33F sobre la cinética de la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento. a) Reacción directa; b) reacción inversa. Control no mutado (negro), mutante G31A (azul); mutante G33F (rojo). En cada caso se muestra el resultado de un experimento representativo.

Tabla 8. Constantes cinéticas de la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento.

Mutación en VP2	$k_{on} (s^{-1})^a$	$k_{off} (s^{-1})^b$
no mutado (wt)	0,020 ± 0,0010	0,024 ± 0,0012
G31A	0,020 ± 0,0003	0,022 ± 0,0002
G33F	0,017 ± 0,0006	0,023 ± 0,0010

^a k_{on} : constante de velocidad de la reacción directa. Se indica el valor y la desviación estándar.

^b k_{off} : constante de velocidad de la reacción inversa. Se indica el valor y la desviación estándar.

4.1.6. Efecto de mutaciones de G31 o G33 sobre la estabilidad de la cápsida frente a la disociación

Ya se ha mencionado que el segmento rico en glicinas se encuentra en o cerca de las interfases entre subunidades triméricas de la cápsida. Por tanto, aunque ninguna de las mutaciones analizadas tuvo un efecto apreciable sobre el ensamblaje, existía la posibilidad de que las glicinas G31 y G33 contribuyeran a la estabilidad de la cápsida, una vez formada, frente a la disociación en subunidades triméricas. Para analizar esta posibilidad se eligieron una vez más los mutantes G31A y G33F como representativos. La disociación de la cápsida sometida a un gradiente térmico se analizó mediante el seguimiento de la fluorescencia intrínseca de triptófanos a elevada temperatura, una vez la primera transición (el cambio conformacional asociado a la externalización de Nt) ya ha ocurrido (Hernando *et al.*, 2000, Carreira *et al.*, 2004). La T_m obtenida para la segunda transición, correspondiente a la disociación de la cápsida, fue estadísticamente indistinguible para los mutantes G31A y G33F y el control no mutado (Figura 25 y Tabla 9). Por tanto, ninguna de estas mutaciones parece ejercer un efecto apreciable sobre la estabilidad de la cápsida frente a su disociación térmica en subunidades.

En resumen, los resultados revelan que para el correcto desarrollo del ciclo infeccioso de MVM se requiere la presencia en un tramo del segmento Nt de VP2 de residuos aminoacídicos muy pequeños (glicina casi con exclusividad) para permitir la traslocación eficiente de este segmento a través de poros en la cápsida. Además, los

resultados sugieren que el papel biológico de las glicinas conservadas en estas posiciones podría no limitarse exclusivamente a facilitar este proceso de traslocación.

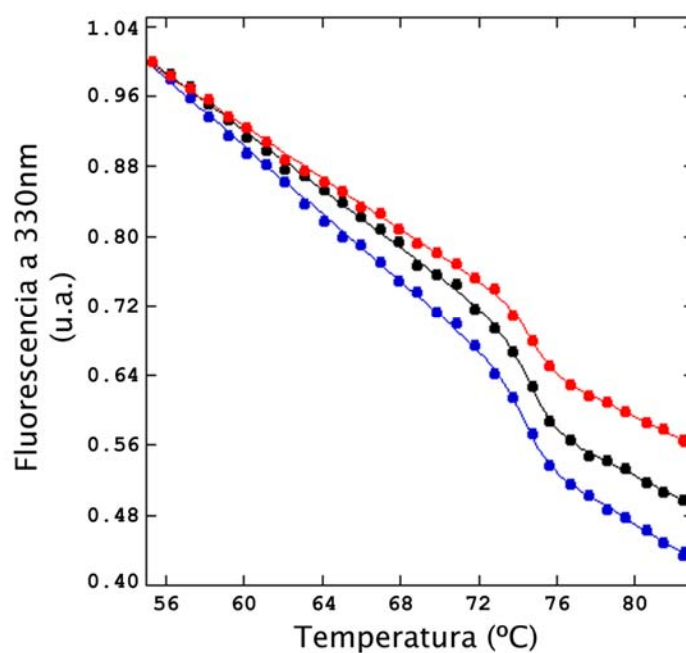


Figura 25. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de las mutaciones G31A y G33F sobre la segunda transición conformacional (disociación) en VLPs de MVM sometidas a calentamiento. Control no mutado (negro), mutante G31A (azul) y mutante G33F (rojo). En cada caso se muestra el resultado de un experimento representativo.

Tabla 9. Valores de T_m para la segunda transición conformacional (disociación) en VLPs de MVM sometidas a calentamiento.

Mutación en VP2	T_m (°C) ^a
no mutado (wt)	74,9 ± 0,4
G31A	73,9 ± 0,4
G33F	74,5 ± 0,3

^a Se indica el valor y la desviación estándar.

4.2. Papel del ácido nucleico de MVM en las propiedades mecánicas del virión

Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado que las interacciones entre el ADN vírico y la pared interna de la cápsida contribuyen a mantener la resistencia del virión de MVM frente a la inactivación térmica de su infectividad (Reguera *et al.*, 2005; apartado 1.2.2). El proceso de inactivación térmica ocurre sin pérdida de integridad de la cápsida, por lo que propusimos que es originado por un cambio estructural de la partícula a una conformación no infectiva.

Nos planteamos entonces la posibilidad de que las interacciones ADN-cápsida pudieran hacer a la partícula conformacionalmente más estable, lo que podría implicar un aumento de su rigidez mecánica. Los resultados experimentales que obtuvieron los Dres. C. Carrasco y Pedro J. de Pablo mediante el uso de AFM, en colaboración con nosotros, demostraron que la presencia del ADN rigidifica mecánicamente la partícula, como habíamos predicho (Carrasco *et al.*, 2006). Además, la realización de un modelo teórico simplificado de elementos finitos por el Dr. Iwan Schaap predijo que el reforzamiento mecánico observado se debería no al relleno de la cápsida por la molécula de ADN, sino específicamente a un refuerzo local ocasionado por la interacción observada cristalográficamente entre los segmentos de ADN y regiones discretas en la pared interna de la cápsida (Carrasco *et al.*, 2006; apartado 1.2.2). Si este fuera el caso, estas interacciones ácido nucleico-proteína reforzarían no sólo térmicamente, sino mecánicamente la estructura del virión.

Como parte del estudio de las propiedades mecánicas del virus MVM que venimos realizando en colaboración con el equipo de los Dres. Pedro J. de Pablo y J. Gómez-Herrero, y para comprobar la hipótesis que se acaba de mencionar, hemos analizado experimentalmente mediante AFM el efecto de las interacciones ADN-cápsida sobre la rigidez mecánica de las partículas víricas.

4.2.1. Diseño y construcción de partículas víricas con mutaciones que eliminan interacciones cápsida-ADN, para su análisis mecánico

La aproximación que seguimos consistió en la eliminación mediante mutagénesis dirigida de algunas interacciones ADN-cápsida cuidadosamente elegidas, y el análisis mecánico comparativo de las partículas mutantes y de la partícula control no mutada.

En concreto, decidimos analizar los efectos mecánicos de las mutaciones sencillas D58A y N183A, así como la doble mutación D58A/N183A (Figura 26) por los

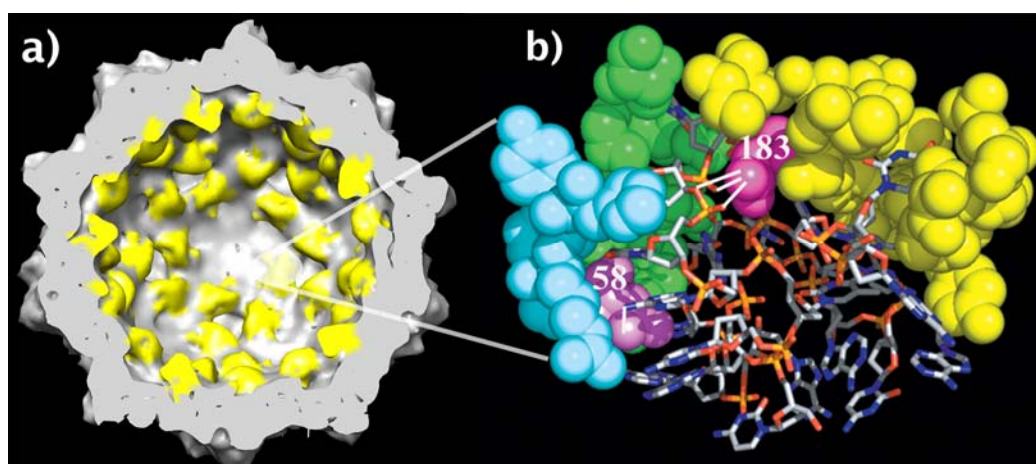


Figura 26. Interacciones cápsida-ADN en el virión de MVM. a) Modelo de superficie del virión de MVM, basado en su estructura cristalográfica (Kontou *et al.*, 2005) y procesado como se indica en la leyenda de la Figura 4. Se muestra un corte transversal del virión orientado de modo que queda un eje S5 en el centro. La cápsida se representa en gris y los segmentos de ADN unidos a la cápsida, en amarillo. b) Primer plano de una de las interfaces ADN-cápsida. Los dos segmentos de ADN monocatenario que participan en la interacción se representan en modelo de varillas. Los aminoácidos de la cápsida que participan en la interacción se representan en modelo de van der Waals en colores azul, verde o amarillo, en función de la subunidad proteica implicada. Los dos residuos aminoácidos mutados se muestran en violeta (D58) y magenta (N183), con los puentes de hidrógeno que establecen con el ADN representados con líneas blancas. Imagen b) tomada de Carrasco *et al.*, 2008.

siguientes motivos: *i)* datos previos (Reguera *et al.*, 2005) indicaban que los dos mutantes sencillos elegidos son capaces de ensamblarse y empaquetar ADN; *ii)* ambos mutantes sencillos presentan una infectividad sólo moderadamente reducida en condiciones normales (título del orden de 10% del control), lo que permitiría obtener y purificar los viriones mutantes en cantidades suficientes; *iii)* las cadenas laterales de D58 y N183 establecen interacciones con el ADN que pueden considerarse energéticamente importantes (varios puentes de hidrógeno y hasta 5 interacciones de van der Waals para D58 y varios puentes de hidrógeno y más de 10 interacciones de van der Waals para N183); *iv)* estas cadenas laterales carecen de interacciones con otros residuos de la cápsida. Por tanto, el efecto de su truncamiento podría adscribirse específicamente a la pérdida de interacciones con el ADN, no con otros residuos de la cápsida; *v)* estas interacciones están evolutivamente conservadas: en la cápsida de un parvovirus homólogo, CPV, se han observado interacciones similares entre el ADN genómico y los residuos de la cápsida estructuralmente equivalentes (N180 y N56) (Tsao *et al.*, 1991; Chapman y Rossmann, 1995; Reguera *et al.*, 2005), lo que sugiere una importancia biológica de dichas interacciones; *vi)* las mutaciones a alanina

producen únicamente la eliminación de un grupo funcional sencillo y pequeño (la amida de N183 o el carboxilato D58), sin introducir nuevos átomos ni interacciones, y minimizando la probabilidad de alteraciones conformacionales del esqueleto polipeptídico (Cunningham y Wells, 1989; Lau y Fersht, 1989); y *vii*) nuestros estudios previos (Reguera *et al.*, 2005) mostraron que los viriones mutantes D58A y N183A son significativamente menos estables que el virión no mutado frente a la inactivación térmica, sin que este efecto fuera consecuencia de una disociación prematura de la cápsida. Este hecho permitiría evaluar una posible correlación entre resistencia térmica y rigidez mecánica.

Con respecto a los mutantes sencillos, la mutación doble D58A/N183A debería producir un efecto al menos igual y puede que superior sobre las propiedades mecánicas (por tanto más claramente observable). Además, permitiría comprobar si los efectos sobre las propiedades mecánicas de la pérdida de interacciones entre residuos individuales y el ADN son o no aditivos.

La mutagénesis dirigida se realizó como se indica en Métodos (apartados 3.2.1 y 3.3.1), construyendo el doble mutante mediante la introducción de la mutación N183 en el plásmido pSVtk-VP1/2 que ya contenía la mutación D58A. A continuación se llevó a cabo el subclonaje del inserto extraído de pSVtk-VP1/2 sobre el plásmido infeccioso pTRp (apartados 3.2.4 y 3.3.3).

4.2.2. Control de calidad de las preparaciones de cápsidas vacías y viriones no mutados y mutantes D58A, N183A y D58A/N183A

Los plásmidos infecciosos mutantes y el control no mutado se utilizaron para transfectar células NB324K, y se obtuvieron partículas víricas como se describe en los apartados 3.5.1 y 3.5.3. Las cápsidas vacías y los viriones obtenidos en el proceso de infección se purificaron y se separaron unas de otros como se describe en el apartado 3.5.3, realizando todo el procedimiento en paralelo, y poniendo especial cuidado en mantener las mismas condiciones del proceso para los mutantes y el control no mutado. Una vez separadas las cápsidas vacías de los viriones, se llevaron a cabo una serie de controles de calidad para asegurar la ausencia de contaminación cruzada entre ambos tipos de partículas.

El análisis de hemaglutinación de las fracciones obtenidas mediante centrifugación en gradientes de densidad (apartado 3.12) mostró que los picos de cápsidas y de viriones se encontraban suficientemente separados. Para comprobar la ausencia de viriones en las muestras que contenían cápsidas vacías, éstas se analizaron mediante ensayos de titulación viral de elevada sensibilidad (mínimo detectable: 20 ufp/ml). Los resultados (no mostrados) permitieron comprobar la

completa ausencia de viriones en las preparaciones de cápsidas vacías utilizadas para los experimentos de AFM.

De modo recíproco, para comprobar la ausencia de cápsidas vacías en las muestras que contenían viriones, estas muestras se re-centrifugaron en un nuevo gradiente de densidad, y las nuevas fracciones obtenidas se analizaron mediante HA. De este modo se comprobó que sólo quedaba una pequeña proporción de cápsidas vacías en las preparaciones de viriones obtenidas tras el primer gradiente, que fueron fácilmente eliminadas tras este segundo gradiente, debido a la baja cantidad de cápsidas vacías contaminantes tras el primer gradiente, y a la total ausencia de solapamiento entre los picos de cápsidas y viriones tras el segundo gradiente (resultados no mostrados).

Finalmente, se analizaron las partículas víricas obtenidas (cápsidas y viriones) mediante microscopía electrónica (apartado 3.14), para estimar la concentración e integridad estructural de las partículas víricas y la pureza de la preparación. Las partículas mostraron al ME las dimensiones y forma correctas. Un resultado representativo se muestra en la [Figura 27](#).

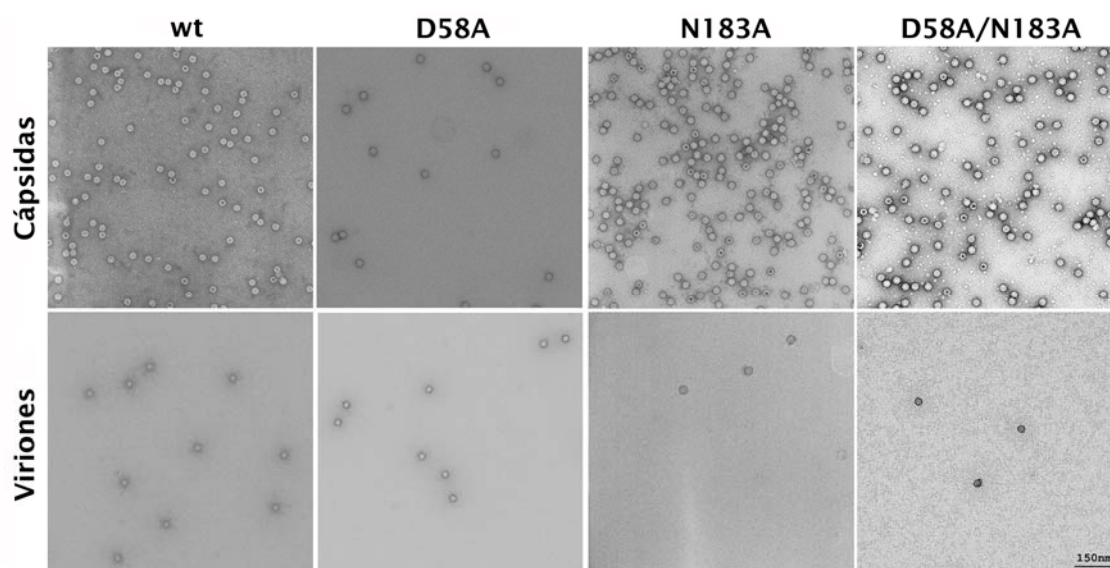


Figura 27. Imágenes de ME de preparaciones de elevado grado de pureza de cápsidas vacías y viriones de MVM no mutados (wt) o mutantes. La mutación introducida en cada caso se indica en la parte superior.

4.2.3. Efecto de las mutaciones D58A, N183A y D58A/N183A sobre la rigidez mecánica de las partículas víricas

Para determinar la rigidez mecánica de las cápsidas vacías y viriones con mutaciones que eliminan interacciones cápsida-ADN, y compararla con la rigidez de las cápsidas y viriones no mutados, se determinaron las constantes elásticas k_s de todas estas partículas mediante AFM (apartado 3.15).

Las medidas de AFM realizadas con los mutantes sencillos D58A y N183A fueron obtenidas por la Dra. C. Carrasco en colaboración con nosotros; las medidas de AFM realizadas con el mutante doble D58A/N183A fueron realizadas por la autora de esta memoria en nuestro laboratorio, tras un período de aprendizaje desarrollado bajo la supervisión de la Dra. C. Carrasco, la Lda. M. Hernando, el Dr. P. J. de Pablo y el Prof. J. Gómez-Herrero.

Identificación de la orientación de partículas víricas individuales. Las imágenes de partículas individuales de MVM, tanto cápsidas vacías como viriones, mostraron claramente sus características topográficas. En particular, se pudo observar la protuberancia (*spike*) centrada sobre cada eje de simetría ternario (S3), la hendidura localizada alrededor de cada eje de simetría binario (S2), y la prominencia cilíndrica centrada sobre cada eje de simetría quinaria (S5) (Figura 28). Estas características sirvieron para identificar la orientación de partículas víricas individuales y elegir para el análisis mecánico aquellas que presentaban un eje S5, S3 o S2 en la parte superior.

Análisis de la rigidez mecánica de partículas víricas mediante AFM, y estudio de la reproducibilidad de los valores de k_s obtenidos. Para determinar cuantitativamente la rigidez mecánica de las partículas de MVM se llevaron a cabo nanoindentaciones en partículas individuales intactas sumergidas en medio líquido (tampón fisiológico, PBS), aplicando la fuerza a lo largo de un eje S5, S3 ó S2 situado en la parte superior de la partícula individual analizada (Carrasco *et al.*, 2006 y 2008; Carrasco, 2008; apartado 3.15.5). Los valores de k_s obtenidos para cada partícula individual de un tipo determinado, en una misma orientación se representaron en un histograma. El ajuste Gausiano de dicho histograma rindió el valor de k_s promedio, que constituye una medida de la resistencia frente a la deformación mecánica de la partícula vírica analizada cuando se aplica una fuerza en la dirección considerada (Figura 29).

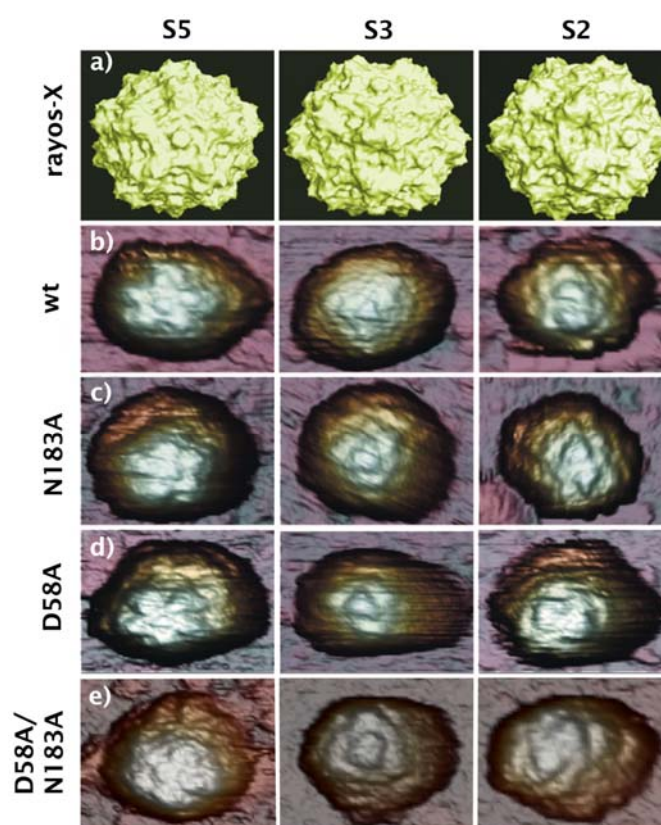


Figura 28. Imágenes representativas obtenidas por AFM de viriones individuales de MVM no mutados (wt) o mutantes en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN y que presentan un eje de simetría quinario (S5), ternario (S3) o binario (S2) en su parte superior. a) Modelo de superficie del virión de MVM basado en su estructura cristalográfica. (b-e) Imágenes de AFM correspondientes a un virión wt (b), mutante N183A (c), mutante D58A (d) y doble mutante D58A/N183A (e). En las imágenes de AFM la topografía de la partícula aparece expandida lateralmente por los usuales efectos de dilatación entre la punta y la muestra.

Para confirmar la reproducibilidad de los valores de k_s originalmente obtenidos para partículas de MVM (Carrasco *et al.*, 2006) se realizaron independientemente nuevas series de medidas para cápsidas y viriones no mutados (una serie adicional para viriones y tres series adicionales para cápsidas vacías; ver apartado 4.3.4 para algunos detalles). Los resultados obtenidos en las series repetidas, tanto con las cápsidas vacías como con los viriones, y para cada tipo de eje de simetría (S3, S2 y S5) fueron estadísticamente indistinguibles en cada caso (Tabla 10). Esto permitió confirmar la absoluta reproducibilidad de la técnica, incluso cuando se utilizaron preparaciones diferentes obtenidas por procedimientos no idénticos. Asimismo, permitió confirmar cualitativa y cuantitativamente el reforzamiento mecánico anisotrópico de la partícula de MVM mediado por la presencia del ADN en el virión.

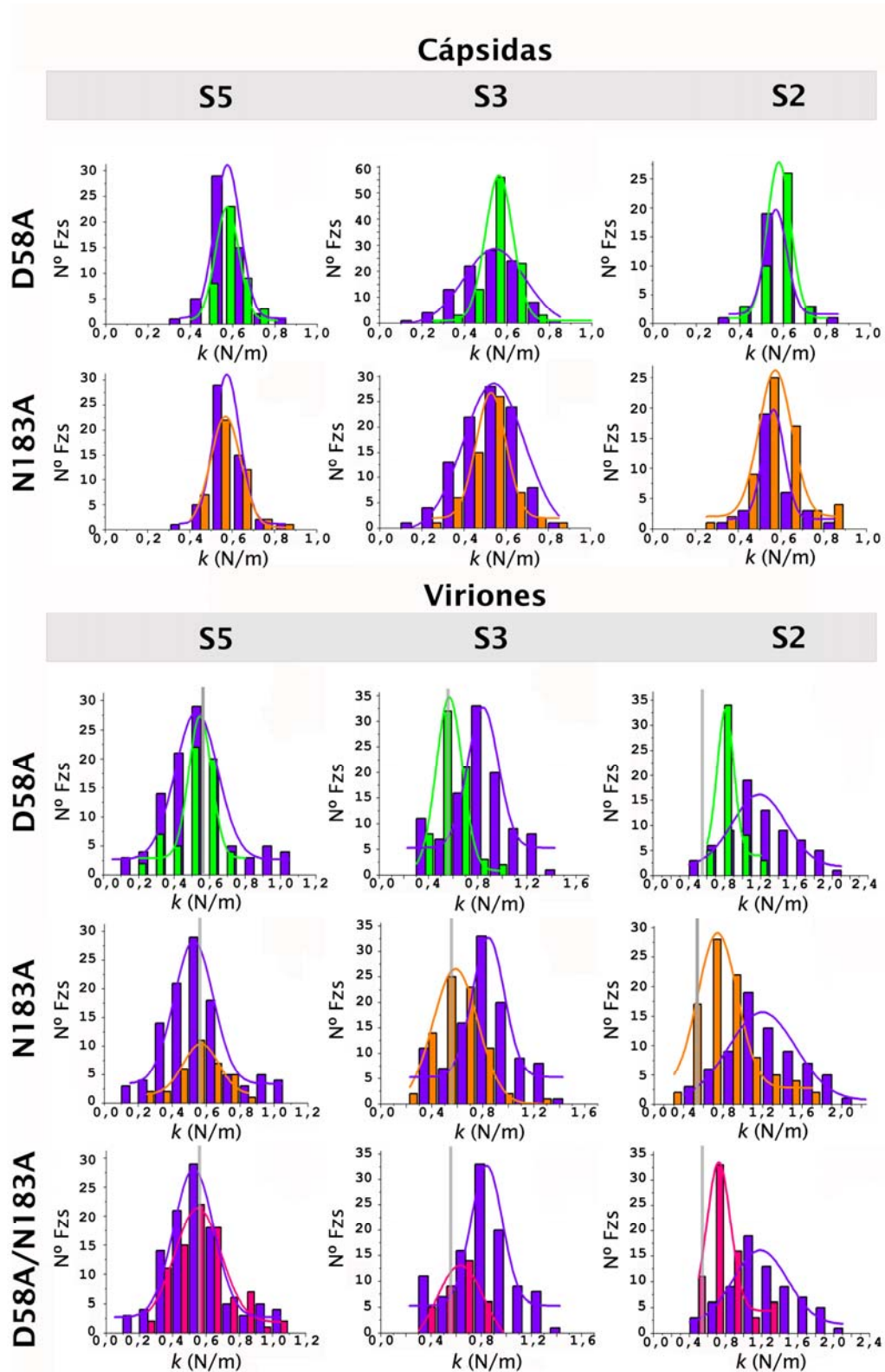


Figura 29. Comparación de las propiedades mecánicas de cápsidas vacías y viriones de MVM no mutado (wt) y mutantes D58A, N183A y D58A/N183A. Cada panel representa dos histogramas, uno para las partículas no mutadas (color violeta) y otro para las partículas de un determinado mutante, que se indica a la izquierda. Los histogramas representan la distribución del valor de k_s obtenido en cada caso. Los tres paneles de cada fila

corresponden a la comparación de las distribuciones de k_s entre la partícula wt y un mutante cuando las partículas se indentan a lo largo de un eje de simetría S5, S3 o S2. Los seis paneles superiores corresponden a cápsidas vacías; los nueve paneles inferiores corresponden a viriones. En estos nueve paneles, una barra vertical gris indica el valor medio de k_s obtenido para la cápsida no mutada, y se ha incluido para facilitar la comparación entre viriones y cápsidas vacías. Los valores para los mutantes D58A y N183A fueron determinados por la Dra. C. Carrasco. Los valores para el doble mutante D58A/N183A fueron determinados por la autora de esta memoria. Código de colores: violeta, partículas wt; verde, mutante D58A; naranja, mutante N183A; rosa, mutante doble D58A/N183A.

Tabla 10. Reproducibilidad de los valores de k_s obtenidos para partículas de MVM.

k_s (N/m) cápsidas no mutadas^a		
	Punta 0,05(N/m)	Punta 0,1(N/m)
S2	0,58 ± 0,10 0,56 ± 0,05	0,55 ± 0,14
S3	0,56 ± 0,15 0,54 ± 0,15	0,54 ± 0,14
S5	0,58 ± 0,13 0,57 ± 0,06	0,59 ± 0,11
k_s (N/m) viriones no mutados^a		
	Punta 0,05(N/m)	Punta 0,05(N/m)
S2	1,40 ± 0,50	1,19 ± 0,34
S3	0,80 ± 0,40	0,84 ± 0,12
S5	0,60 ± 0,20	0,53 ± 0,12

^a Se indican el valor promedio y la desviación estándar obtenidos para la k_s a lo largo de los ejes S2, S3 o S5 de cápsidas vacías (parte superior de la tabla) o viriones (parte inferior). Las columnas izquierda y derecha muestran los resultados de dos experimentos completamente independientes. En el caso de las cápsidas, las micropalanca utilizadas fueron de rigidez diferente (0,05N/m y 0,1N/m), sin que esto tuviera tampoco ningún efecto en los valores obtenidos (ver texto).

Estos resultados permitieron asegurar que cualquier diferencia estadísticamente significativa que obtuviéramos al comparar la flexibilidad de los viriones o cápsidas mutantes con los controles no mutados estaría plenamente validada.

Rigidez mecánica de las cápsidas vacías. Para confirmar que las mutaciones elegidas no tenían ningún efecto sobre la rigidez mecánica de la cápsida en ausencia del ADN vírico, se comparó la k_s de las cápsidas vacías mutantes con la de la cápsida no mutada. La cápsida vacía de MVM y el virión son estructuralmente casi indistinguibles, incluso a resolución atómica (Kontou *et al.*, 2005). Por tanto, si una mutación afectase a la flexibilidad del virión porque se alterasen las interacciones intracápsida, la flexibilidad de la cápsida vacía debería también verse afectada. Si el efecto fuera causado por la pérdida de interacciones cápsida-ADN, la flexibilidad de la cápsida vacía no debería verse afectada, únicamente la del virión. Como se esperaba, los valores de k_s obtenidos con las cápsidas vacías mutantes D58A y N183A a lo largo de los tres ejes fueron estadísticamente indistinguibles de los valores obtenidos para la cápsida vacía no mutada (aproximadamente 0,56 N/m) (Figura 29, paneles en la parte superior).

Dado que no hubo diferencias significativas en la rigidez de la cápsida vacía por causa de las dos mutaciones individualmente introducidas, tampoco debería haberla en el caso de la cápsida vacía con la doble mutación D58A/N183A. No obstante, realizamos algunas determinaciones de k_s para la cápsida doble mutante a lo largo de los ejes de simetría S2 y S3. No se determinó k_s a lo largo del eje S5 por ser irrelevante, ya que la presencia de ADN en el virión (no mutado o mutantes sencillos) no altera la rigidez de la partícula en S5 (ver a continuación). Los valores medios obtenidos para la cápsida doble mutante para S2 y S3 fueron $k_s = 0,51 \pm 0,09$ N/m y $k_s = 0,50 \pm 0,09$ N/m respectivamente. Estos valores son, como se esperaba, estadísticamente indistinguibles de los valores obtenidos para las cápsidas vacías sin mutaciones o con mutaciones sencillas D58A o N183A.

En conclusión, los controles realizados con las cápsidas vacías no mutada, D58A, N183A y D58A/N183A permiten afirmar que cualquier efecto de estas mutaciones en la rigidez del virión de MVM no se deberá a la pérdida de interacciones entre residuos de la cápsida, sino a la pérdida de interacciones entre la cápsida y el ADN.

Rigidez mecánica de los viriones. Una vez realizados los controles anteriores, se comparó la rigidez mecánica de los viriones mutantes D58A, N183A o D58A/N183A con la del virión no mutado. Se observó para todos los mutantes una reducción sustancial en la diferencia de rigidez entre el virión y la cápsida vacía (Figura 29, paneles en la parte inferior). En concreto, en el caso del virus no mutado la presencia del ADN en la partícula no incrementó de modo significativo la rigidez mecánica de la

Tabla 11. Valores de k_s determinados para cápsidas vacías de MVM no mutado (wt) y mutantes en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN.

Eje S5	k (N/m)^a	n° Fzs^b	n° partículas^c	T^d
wt	0,57 ± 0,06	53	9	-
D58A	0,57 ± 0,05	44	5	0,76
N183A	0,57 ± 0,07	44	5	0,95
D58A/N183A	-	-	-	-
Eje S3				
wt	0,54 ± 0,15	100	17	-
D58A	0,56 ± 0,06	100	12	0,08
N183A	0,53 ± 0,07	59	7	0,73
D58A/N183A	0,51 ± 0,09	4	1	0,94
Eje S2				
wt	0,56 ± 0,05	34	7	-
D58A	0,58 ± 0,05	42	5	0,58
N183A	0,57 ± 0,07	63	6	0,97
D58A/N183A	0,50 ± 0,09	31	3	0,001

^a Para el cálculo del valor de k_s se promediaron el conjunto de todos los valores obtenidos a partir de Fzs individuales realizadas sobre diversas partículas a lo largo de ejes S5, S3 o S2; se indica en cada caso el valor medio y la desviación estándar.

^b n° Fzs: número total de Fzs a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^c n° partículas: número de partículas individuales a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^d T : valor del parámetro t obtenido tras la realización de un Test t de Student (ver apartado 3.16) con un nivel de confianza del 99% y significación de 0,05, asumiendo que existe una diferencia de varianza entre las poblaciones comparadas. Se consideran medias significativamente iguales o diferentes aquellas cuyo valor T sea superior o inferior a 0,05, respectivamente.

partícula a lo largo de los ejes S5, pero incrementó la rigidez mecánica en aproximadamente un 60% o un 110% a lo largo de los ejes S3 y S2, respectivamente (Tablas 10, 11 y 12), como ya habíamos descrito (Carrasco *et al.*, 2006).

Tabla 12. Valores de k_s determinados para viriones de MVM no mutado (wt) y mutantes en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN.

Eje S5	k (N/m) ^a	nº Fzs ^b	nº partículas ^c	T ^d
wt	0,53 ± 0,12	100	14	-
D58A	0,55 ± 0,06	64	6	0,05
N183A	0,57 ± 0,10	34	8	0,80
D58A/N183A	0,58 ± 0,18	84	5	0,40
Eje S3				
wt	0,84 ± 0,12	110	22	-
D58A	0,57 ± 0,10	66	7	1,2x10 ⁻¹⁴
N183A	0,58 ± 0,15	79	15	1,2x10 ⁻¹¹
D58A/N183A	0,62 ± 0,13	34	5	1,8x10 ⁻⁰⁸
Eje S2				
wt	1,19 ± 0,34	90	11	-
D58A	0,82 ± 0,10	46	5	9,9x10 ⁻¹³
N183A	0,74 ± 0,19	88	12	2,0x10 ⁻¹¹
D58A/N183A	0,79 ± 0,22	69	9	2,3x10 ⁻¹⁴

^a Para el cálculo del valor de k_s se promediaron el conjunto de todos los valores obtenidos a partir de Fzs individuales realizadas sobre diversas partículas a lo largo de ejes S5, S3 o S2; se indica en cada caso el valor medio y la desviación estándar.

^b nº Fzs: número total de Fzs a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^c nº partículas: número de partículas individuales a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^d T : valor del parámetro t obtenido tras la realización de un Test t de Student (ver apartado 3.16 y nota al pie de la Tabla 11).

La presencia de las mutaciones D58A, N183A y D58A/N183A no tuvo efecto sobre la rigidez de la partícula a lo largo de los ejes S5, pero redujo el incremento de rigidez del virión respecto a la cápsida vacía de un 60% a sólo un 30% (D58A), 30% (N183A) o 25% (doble mutación) a lo largo de los ejes S3, o de un 110% a un 30% (D58A) 40% (N183A) o 35% (doble mutación) a lo largo de los ejes S2 (Figura 29, paneles en la parte inferior y Tablas 11 y 12).

El test t de Student (apartado 3.17) reveló que los valores de k_s obtenidos a lo largo de los ejes S3 y S2 son significativamente diferentes (con un 99% de confianza) cuando se comparan los viriones mutantes con el no mutado. La reducción observada en los valores de k_s no puede deberse a cambios en la electrostática de la superficie de la partícula, porque las mutaciones no afectan a los grupos cargados del ADN, N183A no implica cambio de carga, y los dos grupos eliminados se encuentran situados en el interior de la cápsida, a gran distancia de la superficie externa de la partícula. La distribución superficial de carga en la superficie exterior de la cápsida en contacto con la punta no se modifica en absoluto.

El efecto de la doble mutación fue comparable en magnitud al observado con las mutaciones sencillas (Figura 29, paneles en la parte inferior y Tablas 11 y 12). Este resultado, además de confirmar el obtenido con los mutantes sencillos, permite afirmar que el efecto de estas dos mutaciones sobre la rigidez mecánica del virión no es aditivo (ver Discusión).

En conclusión, los resultados descritos en este apartado revelan que el refuerzo mecánico anisótropo de la partícula de MVM mediado por el ADN genómico contenido en su interior se debe específicamente al establecimiento de interacciones no covalentes entre segmentos del ADN y regiones discretas situadas en posiciones equivalentes en la pared interna de la cápsida.

4.3. Papel de los residuos situados en la base de los poros en las propiedades mecánicas de la cápsida de MVM

El análisis mutacional sistemático de las interfases entre subunidades triméricas de la cápsida de MVM reveló, entre otras cosas, que los residuos situados alrededor de la base de los poros en los ejes S5 son necesarios para la dinámica conformacional de la cápsida (inducida *in vitro* mediante calentamiento y seguida por variaciones en la fluorescencia de triptófanos) y para la infectividad del virión (Reguera *et al.*, 2004; apartado 1.2.3). En cambio, ninguno de los demás residuos en las interfases intertriméricas, más alejados de la base de los poros (ni tampoco un residuo situado cerca del poro pero no en su base), son necesarios para que ocurra el cambio conformacional detectado.

Esta observación nos ha llevado a proponer la siguiente hipótesis: los residuos situados en la base de los poros serían necesarios para permitir la suficiente flexibilidad estructural en la región situada alrededor de los poros; esta flexibilidad estructural permitiría que el cambio conformacional ocurriera con un aporte de energía moderado, y este cambio conformacional de la cápsida, al facilitar procesos de traslocación a través de los poros, hace posible la infectividad del virión. Esta hipótesis es experimentalmente verificable porque predice que mutaciones de residuos en la base de los poros que impiden el cambio conformacional eliminan la infectividad, deberían provocar un aumento de la rigidez estructural en la región situada alrededor de los poros. Este incremento en la rigidez estructural de la cápsida podría detectarse mediante AFM, como un incremento en la resistencia de la cápsida frente a la deformación mecánica.

Como parte del estudio de las propiedades mecánicas del virus MVM realizado en colaboración con los Dres. P. J. de Pablo y J. Gómez-Herrero, y para comprobar la hipótesis que se acaba de mencionar, hemos analizado experimentalmente mediante AFM el efecto de mutaciones racionalmente elegidas sobre la rigidez mecánica de las partículas víricas. Este estudio (tanto los aspectos bioquímicos como las determinaciones de propiedades mecánicas mediante AFM y su análisis) se ha realizado en estrecha colaboración entre la autora de esta memoria y la Dra. R. Pérez de nuestro laboratorio.

4.3.1. Diseño y construcción de cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros o en regiones alejadas de la misma, para su análisis mecánico

Para probar experimentalmente la predicción de una relación entre flexibilidad mecánica en la región de la cápsida alrededor de cada poro y la dinámica conformacional asociada a la infectividad, elegimos para su análisis mecánico dos series de mutantes (**Tabla 13**).

La primera serie (serie P, *poro*) incluyó 6 mutantes, en todos los cuales la mutación a alanina de un residuo situado en la base de los poros impedía el cambio conformacional de la cápsida y la infectividad del virión. Si nuestra hipótesis era correcta, todas estas mutaciones sin excepción deberían incrementar la rigidez mecánica de la cápsida alrededor de los ejes S5 donde se encuentran los poros.

En concreto, para esta serie P se eligieron las siguientes mutaciones (**Figura 30 y Tabla 13**): *i*) V40A, S43A, N149A, N170A y D263A, para los que experimentos previos habían mostrado que cumplían todas las características requeridas; y *ii*) L172A, debido a que esta mutación, analizada bioquímicamente y virológicamente por el grupo del Prof. P. Tattersall, es igualmente letal y se encuentra asimismo cerca de la base del

Tabla 13. Características de mutantes con sustituciones de aminoácidos en la base de los poros (Serie P) o en regiones alejadas de la misma (Serie C) elegidos para su análisis mecánico.

Partículas	Relación de infectividad ^a	Primera transición conformacional tras calentamiento ^b
no mutado	1	Si
Mutaciones en la base de los poros (Serie P)		
V40A	$1,2 \times 10^{-4}$	No
S43A	$<4,0 \times 10^{-5}$	No
N149A	$<8,0 \times 10^{-7}$	No
N170A	$<5,0 \times 10^{-6}$	No
L172A	N.D.	No
D263A	$<8,0 \times 10^{-6}$	No
Mutaciones fuera de la base de los poros (Serie C)		
D58A	$1,4 \times 10^{-1}$	Si
N74A	$9,3 \times 10^{-1}$	Si
I167A	$7,0 \times 10^{-2}$	Si
N183A	$7,0 \times 10^{-2}$	Si
Y188W	$5,6 \times 10^{-1}$	Si

^a La relación de infectividad expresa el cociente entre el título medio obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el control no mutado (wt). Los valores de infectividad para todos los mutantes (excepto Y188W) fueron obtenidos por el Dr. J. Reguera, tal y como se describe en Reguera *et al.*, 2004 y 2005. En el caso de Y188W, los valores fueron obtenidos por la autora de esta memoria en colaboración con la Dra. R. Pérez en un mínimo de cuatro experimentos independientes, con duplicados en cada experimento. El título obtenido para Y188W fue normalizado en función de la cantidad de proteína sintetizada, como se describe en los apartados 3.1.5 y 3.11. N.D., no determinado. No obstante, esta mutación condujo a una pérdida de infectividad comparable al resto de las mutaciones de la Serie P, basándose en resultados de cuantificación de la expresión de la proteína NS1 de MVM (Farr y Tattersall, 2004).

^b Experimentos llevados a cabo tal y como se describe en el apartado 3.7.

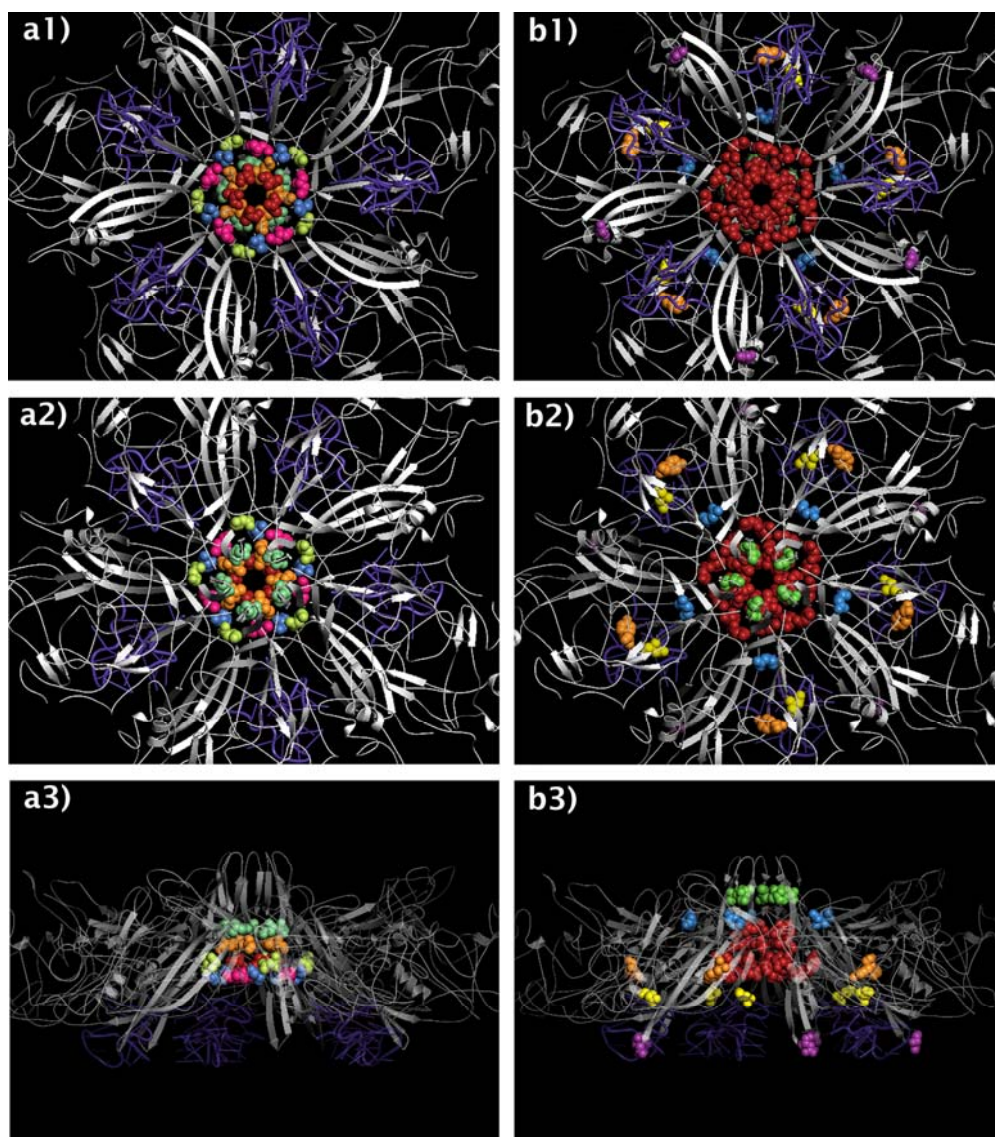


Figura 30. Localización en la estructura de la cápsida de MVM de los residuos de las series P y C seleccionados para el análisis del efecto mecánico de mutaciones en la base de los poros, frente al de mutaciones en otros lugares de la cápsida. a) Localización en la base de un poro de los residuos cuya mutación a alanina conduce a la pérdida de infectividad del virión. V40 (rojo), S43 (azul), N149 (amarillo), N170 (verde), L172 (naranja), D263 (rosa); a1): vista desde el interior de la cápsida; a2): vista desde el exterior de la cápsida; a3): vista lateral de la región del poro. b) Localización de residuos control cuya mutación no conduce a la pérdida de infectividad del virión. Los residuos de la base de los poros indicados en los paneles a) se muestran todos en rojo en los paneles b). N74 (azul), I167 (verde), D58 (violeta), N183 (amarillo), Y188 (naranja), b1): vista desde el interior de la cápsida; b2): vista desde el exterior de la cápsida; b3): vista lateral de la región del poro. Los segmentos de ADN unidos a regiones de la cápsida se representan en color púrpura. Las imágenes han sido realizadas con el programa *PyMol*, utilizando las coordenadas PDB 1Z1C correspondientes al virión de MVM (Kontou *et al.*, 2005).

poro, en la parte más estrecha del mismo. Esperábamos que L172A afectara también al cambio conformacional de la cápsida detectado por fluorescencia, lo que hemos confirmado experimentalmente (ver más adelante).

La segunda serie (serie C, *control*) incluyó inicialmente 5 mutantes con sustituciones en residuos dispersos por diversas regiones de la cápsida, pero no localizadas en ningún caso en la base de los poros, que no afectaran al cambio conformacional de la cápsida ni tuvieran un efecto notable sobre la infectividad del virión. Debido a las características elegidas, si nuestra hipótesis era correcta ninguna de estas mutaciones debería incrementar la rigidez mecánica de la cápsida alrededor de los ejes S5 donde se encuentran los poros.

Para esta serie C seleccionamos inicialmente las siguientes mutaciones (**Figura 30 y Tabla 13**): *i*) I167A, situada en la interfase entre trímeros, en la pared del poro pero no en la base, sino en su parte más externa; *ii*) N74A, una mutación cercana al poro pero no localizada en la base del mismo; *iii*) N183A y D58A, situados cerca de los ejes S2 y lejos de los poros, en la región de contacto entre la pared interna de la cápsida y el ADN (apartado 4.2); *iv*) Y188W, localizado en la pared de una cavidad de cierto tamaño en la cápsida de MVM, situada no lejos de los poros (apartado 4.4). Varios de estos mutantes ya habían sido caracterizados bioquímicamente o virológicamente (Reguera *et al.*, 2004; Carreira y Mateu, 2006), y para alguno de ellos ya se estaban realizando medidas mecánicas con otros objetivos (apartado 4.2). El resto fueron analizados como se describe en los siguientes apartados, para asegurar que cumplían con todas las características requeridas para formar parte de esta serie C de control.

4.3.2. Análisis de la infectividad de los viriones mutantes

Resultados previos mostraron que las mutaciones elegidas para la serie P, situadas en la base de los poros, V40A, S43A, N149A, N170A y D263A (Reguera *et al.*, 2004) y L172A (Farr y Tattersall, 2004), resultaban letales o reducían drásticamente (en varios ordenes de magnitud) la infectividad del virus (**Tabla 13**). Cuatro de las mutaciones elegidas para la serie C, situadas fuera de la base de los poros, N74A, I167A (Reguera *et al.*, 2004), D58A y N183A (Reguera *et al.*, 2005) no afectaron a la infectividad, o lo hicieron sólo ligeramente (máximo un orden de magnitud) (**Tabla 13**).

Nosotros hemos analizado la infectividad del mutante restante de la serie C, Y188W, mediante la determinación del título de la progenie producida, normalizado frente a la producción de proteína viral (apartados 3.1.5 y 3.11). El mutante Y188W presentó un título correspondiente al 63% del título del control no mutado llevado en

paralelo. Por tanto, este mutante no muestra una reducción significativa de la infectividad (Tabla 13).

En resumen, entre las mutaciones analizadas en este estudio, todas las situadas en regiones diferentes de la base de los poros (serie C) tienen un efecto muy ligero o despreciable sobre la infectividad; por el contrario, todas las situadas en la base de los poros de la cápsida (serie P) reducen drásticamente o eliminan la infectividad del virión (Tabla 13).

4.3.3. Análisis de la dinámica conformacional de las cápsidas mutantes

Resultados previos de nuestro laboratorio (Reguera *et al.*, 2004) mostraron que cinco de las mutaciones elegidas para la serie P, situadas en la base de los poros (V40A, S43A, N149A, N170A y D263A), impedían el reordenamiento conformacional inducido por calor en cápsidas (VLPs) no mutadas, detectado mediante variación de la fluorescencia intrínseca de triptófanos, y asociado a la externalización del segmento Nt de VP2 (Hernando *et al.*, 2000, Carreira *et al.*, 2004). Tres de las mutaciones elegidas para la serie C, situadas fuera de la base de los poros (N74A, I167A (Reguera *et al.*, 2004) y Y188W (Carreira y Mateu, 2006) no impidieron que ocurriera ese reordenamiento conformacional. La T_m de la transición para los dos primeros mutantes fue asimismo indistinguible de la obtenida para la cápsida no mutada, mientras que la del último mutante resultó ligeramente incrementada con respecto a la del control no mutado ($48,8^\circ\text{C} \pm 2,2^\circ\text{C}$ frente a $46,3^\circ\text{C} \pm 0,9^\circ\text{C}$; Carreira y Mateu, 2006).

Nosotros hemos determinado si este reordenamiento conformacional ocurre en las tres VLPs mutantes elegidas restantes, L172A de la serie P y D58A y N183A de la serie C. Las VLPs recombinantes se obtuvieron mediante expresión con el sistema de baculovirus y autoensamblaje en células de insecto (apartado 3.4). Las VLPs se purificaron y sometieron a análisis conformacional mediante seguimiento de la variación en la fluorescencia de triptófanos, del modo que se describió en el apartado 4.1.5. Se realizaron un mínimo de 2 experimentos en todos los casos. Como se esperaba, para la VLP con la mutación L172A la transición no tuvo lugar (Figura 31), al igual que sucedía para el resto de VLPs con mutaciones en la base de los poros (Reguera *et al.*, 2004). Por el contrario, para las VLPs con mutaciones fuera de la base de los poros la transición sí tuvo lugar (Figura 31). La T_m de esta transición para el mutante N183A ($T_m = 45,07^\circ\text{C} \pm 0,42^\circ\text{C}$) fue estadísticamente indistinguible de la del control no mutado ($T_m = 46,13^\circ\text{C} \pm 0,78^\circ\text{C}$); la del mutante D58A ($T_m = 44,16^\circ\text{C} \pm 0,53^\circ\text{C}$) resultó ligeramente inferior.

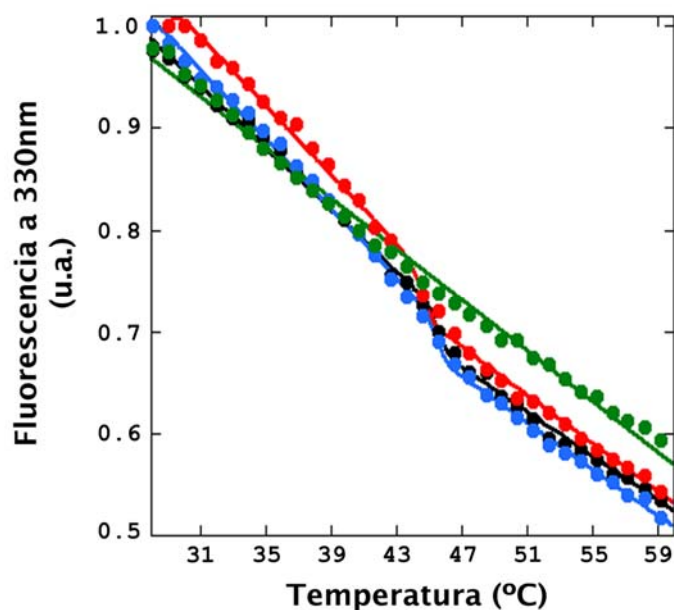


Figura 31. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de algunas mutaciones en la base de los poros sobre la primera transición conformacional en VLPs de MVM sometidas a calentamiento. Control no mutado (negro); mutante D58A (rojo); mutante N183A (azul); mutante L172A (verde). En cada caso se indica el resultado de un experimento representativo.

En resumen, entre las mutaciones analizadas en este estudio, ninguna de las situadas en regiones diferentes de la base de los poros (serie C) impide el reordenamiento conformacional de la cápsida inducido por calor y asociado a la externalización del Nt de VP2; por el contrario, todas las situadas en la base de los poros de la cápsida (serie P) impiden este reordenamiento conformacional.

4.3.4. Efecto de mutaciones de residuos situados en la base de los poros sobre la rigidez mecánica de la cápsida en la región situada alrededor de los poros

Una vez completada la caracterización bioquímica y virológica de todos los mutantes de cada una de las dos series C y P, se obtuvieron mediante transfección de células NB324K con el plásmido pSVtk-VP1/2 no mutado o mutantes (apartados 3.2.1 y 3.5.1) cápsidas vacías de los 11 mutantes seleccionados así como del control no mutado, que se purificaron tal y como se explica en el apartado 3.5.2. El

procedimiento seguido garantiza que las preparaciones únicamente contienen cápsidas puras. Se puso especial cuidado en mantener las mismas condiciones del proceso para todas las cápsidas mutantes y el control no mutado.

Identificación de la orientación de cápsidas individuales. Utilizando las nuevas micropalanca ($k_c = 0,1$ N/m) en AFM, las imágenes obtenidas para partículas individuales de los 11 mutantes elegidos para este estudio resultaron de calidad similar a las obtenidas para las partículas analizadas en el estudio descrito en el apartado 4.2. Las características topográficas se observaron con claridad, incluyendo la protuberancia en los ejes S3, la hendidura en los ejes S2 y la prominencia cilíndrica en los ejes S5. Como en el apartado 4.2, estas características sirvieron para identificar sin ambigüedad la orientación de varias partículas víricas individuales de cada mutante y elegir para su análisis aquellas que presentaban el eje de simetría deseado (S5, S3 o S2) en la parte superior (**Figura 32**).

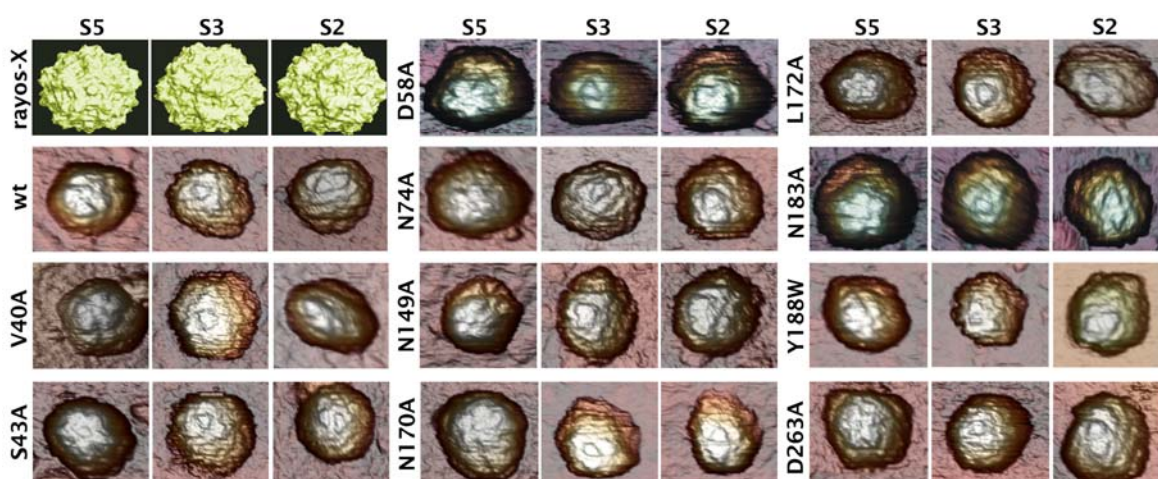


Figura 32. Imágenes representativas obtenidas por AFM de cápsidas individuales de MVM no mutados (wt) o mutantes de las series P y C y que presentan un eje de simetría quinario (S5), ternario (S3) o binario (S2) en su parte superior. El panel superior izquierdo muestra un modelo de superficie del virión de MVM basado en su estructura cristalográfica. El resto de paneles muestra imágenes correspondientes al virión wt y a los distintos mutantes, cada uno de los cuales aparece nombrado en el lateral izquierdo del panel correspondiente. La topografía de MVM aparece expandida lateralmente por los usuales efectos de dilatación entre la punta y la muestra.

Reproducibilidad en las determinaciones de la rigidez mecánica de partículas de MVM mediante AFM utilizando micropalanca de diferente constante elástica. La rigidez mecánica de cada una de las 11 cápsidas mutantes cuando se aplica una fuerza a lo largo de un eje S5 se analizó en medio líquido (tampón fisiológico PBS) mediante AFM, utilizando en paralelo la cápsida no mutada, como se ha descrito en los apartados 3.15 y 4.2.3 (Carrasco *et al.*, 2006 y 2008; Carrasco, 2008). La única diferencia metodológica respecto al estudio descrito en el apartado 4.2.3 es que, en el caso presente, utilizamos micropalanca con una k_c nominal de 0,1 N/m en vez de 0,05 N/m. Ya se había demostrado previamente que los valores de k_s para partículas de MVM obtenidos con puntas de 0,05 N/m son válidos y estadísticamente significativos (Carrasco *et al.*, 2006 y 2008; Carrasco, 2008). Sin embargo, el uso de micropalanca de una rigidez más aproximada a la de las partículas medidas podría permitir una mayor sensibilidad en las determinaciones mecánicas. No se utilizaron micropalanca aún más rígidas (por ejemplo de 0,3 N/m), porque éstas pueden provocar más fácilmente el movimiento indeseado de las partículas adsorbidas sobre el soporte, así como ocasionar daños irreversibles en la estructura de las mismas (Carrasco, 2008).

Como control para asegurar que el valor de la k_s obtenida es independiente del uso de micropalanca de 0,1 N/m o de 0,05 N/m, y para tener un control apropiado de las mediciones realizadas con las series C y P de mutantes, se realizó una nueva determinación de la k_s para cápsidas vacías de MVM no mutadas, observándose para los tres ejes S2, S3 y S5 valores estadísticamente indistinguibles entre sí y de los obtenidos anteriormente utilizando micropalanca de 0,05N/m (Tabla 10).

Rigidez mecánica de la región del poro en cápsidas con mutaciones no situadas en la base de los poros (serie C). Para cada uno de los 5 mutantes de la serie C cuya cápsida presentaba el cambio conformacional inducido por calor y cuyo virión presentaba una infectividad similar al control no mutado, se realizaron indentaciones repetidas sobre un eje de simetría S5 de un número suficiente de cápsidas vacías individuales. Las k_s obtenidas se representaron en un histograma, y el ajuste Gausiano de dicho histograma rindió el valor promedio de k_s para cada mutante (Figura 33, paneles en la parte superior). En todos los casos, el valor de k_s fue estadísticamente indistinguible del obtenido para el control no mutado, de acuerdo con el test t de Student (Figura 33 y Tabla 14).

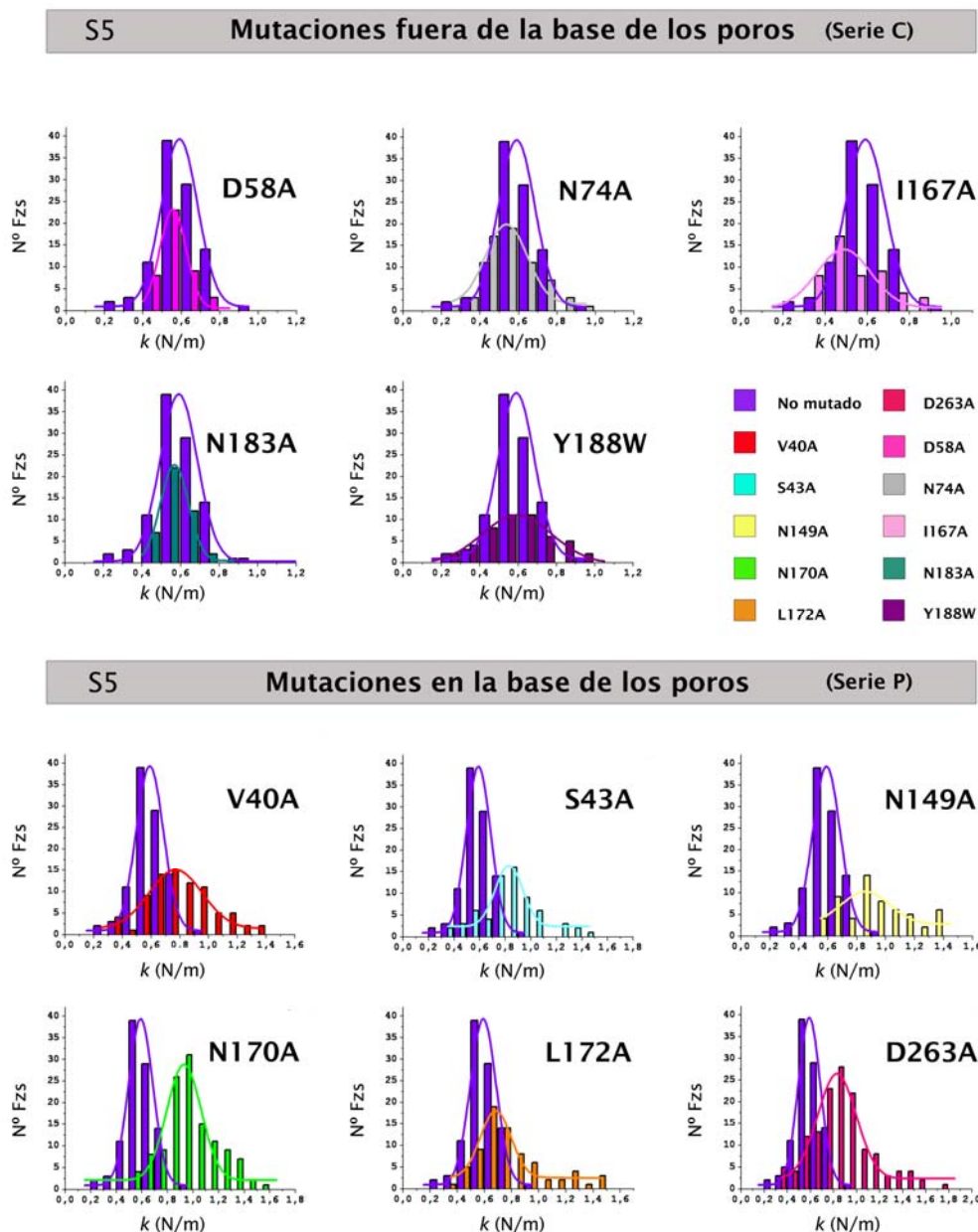


Figura 33. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S5 entre cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C). Cada panel representa dos histogramas, uno para las partículas no mutadas (color violeta) y otro para las partículas de un determinado mutante, que se indica a la derecha. Los histogramas representan la distribución del valor de k_s obtenido para las cápsidas vacías cuando estas se indentan a lo largo de un eje S5. Los valores para los mutantes D58A y N183A fueron obtenidos por la Dra. C. Carrasco. El resto de valores fueron obtenidos en colaboración entre la autora de esta memoria y la Dra. R. Pérez de nuestro laboratorio. Código de colores: violeta, no mutado (wt); rojo, mutante V40A; azul, mutante S43A; amarillo, mutante N149A; verde, mutante N170A; naranja, mutante L172A; magenta, mutante D263A; rosa, mutante D58A; gris, mutante N74A; malva, mutante I167A; verde agua, mutante N183A; púrpura, mutante Y188W .

Tabla 14. Valores de k_s en los ejes S5 para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C).

Cápsidas	k_s (N/m) ^a	nº Fzs ^b	nº partículas ^c	T^d
no mutado	0,59 ± 0,11	99	6	-
Mutaciones en la base de los poros (Serie P)				
V40A	0,81 ± 0,23	80	7	6,0x10 ⁻¹²
S43A	0,83 ± 0,23	66	6	1,2x10 ⁻¹¹
N149A	0,93 ± 0,24	58	6	1,7x10 ⁻¹⁵
N170A	0,98 ± 0,21	123	5	3,4x10 ⁻⁴²
L172A	0,79 ± 0,27	74	7	6,1x10 ⁻⁰⁸
D263A	0,87 ± 0,27	138	6	2,4x10 ⁻²¹
Mutaciones fuera de la base de los poros (Serie C)				
D58A	0,57 ± 0,05	44	5	0,76
N74A	0,57 ± 0,15	62	7	0,34
I167A	0,53 ± 0,15	49	7	0,01
N183A	0,57 ± 0,07	44	5	0,95
Y188W	0,60 ± 0,18	49	6	0,64

^a Para el cálculo del valor de k_s se promediaron el conjunto de todos los valores obtenidos a partir de Fzs individuales realizadas sobre diversas partículas a lo largo de ejes S5; se indica en cada caso el valor medio y la desviación estándar.

^b nº Fzs: número total de Fzs a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^c nº partículas: número de partículas individuales a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^d T : valor del parámetro t obtenido tras la realización de un Test t de Student (ver apartado 3.16 y nota al pie de la Tabla 11).

Rigidez mecánica de la región del poro en cápsidas con mutaciones en la base de los poros (serie P). Para cada uno de los 6 mutantes de la serie P con sustituciones que impedían el cambio conformacional inducido por calor y disminuían drásticamente la infectividad, se realizaron indentaciones repetidas sobre un eje de simetría S5 de un número suficiente de cápsidas vacías individuales.

Las mediciones de resultados se realizaron del mismo modo que se acaba de describir para los mutantes de la serie C y en paralelo con ellos. Las k_s obtenidas se analizaron del mismo modo (**Figura 33**, paneles en la parte inferior). En todos estos mutantes, el valor de k_s fue sustancialmente más elevado que el obtenido para el control no mutado y las cápsidas de la serie C. El incremento de k_s varió entre un 34% y un 70% con respecto al control (**Tabla 15**), y la aplicación del test t de Student mostró para los 6 mutantes de la serie P analizados que este incremento era estadísticamente significativo (**Figura 33 y Tabla 14**).

En resumen, las 5 cápsidas mutantes analizadas que incluyen sustituciones de aminoácido fuera de la base de los poros, que no afectan al cambio conformacional de la cápsida ni a la infectividad del virus, presentan una región alrededor de los poros que es mecánicamente tan flexible como la de la cápsida no mutada. En completo contraste, las 6 cápsidas mutantes que incluyen sustituciones en la base de los poros que impiden el cambio conformacional de la cápsida y reducen drásticamente la infectividad del virus, presentan una región alrededor de los poros que es mecánicamente más rígida que la de la cápsida no mutada.

Estos resultados son enteramente consistentes con la hipótesis que formulamos acerca de una correlación entre infectividad de MVM, y flexibilidad estructural/deformabilidad mecánica de la región de la cápsida alrededor de cada poro de la misma.

Tabla 15. Porcentaje de reforzamiento o flexibilización mecánica para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida.

Cápsidas	% refuerzo en S5 ^a	% refuerzo en S3 ^a	% refuerzo en S2 ^a
no mutado	-	-	-
Mutaciones en la base de los poros (Serie P)			
V40A	37	139	42
S43A	41	83	62
N149A	58	72	55
N170A	66	63	82
L172A	34	65	80
D263A	47	115	22
Mutaciones fuera de la base de los poros (Serie C)			
D58A	0	4	4
N74A	-3	9	-5
I167A	-10	70	22
N183A	0	-2	2
Y188W	2	70	62

^a Se muestra en porcentaje respecto al control no mutado (wt) el grado de rigidificación (signo positivo) o flexibilización (signo negativo) que experimentan las cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida, a lo largo de ejes S5, S3 o S2. Los valores bajos de rigidificación o flexibilización no resultaron significativos.

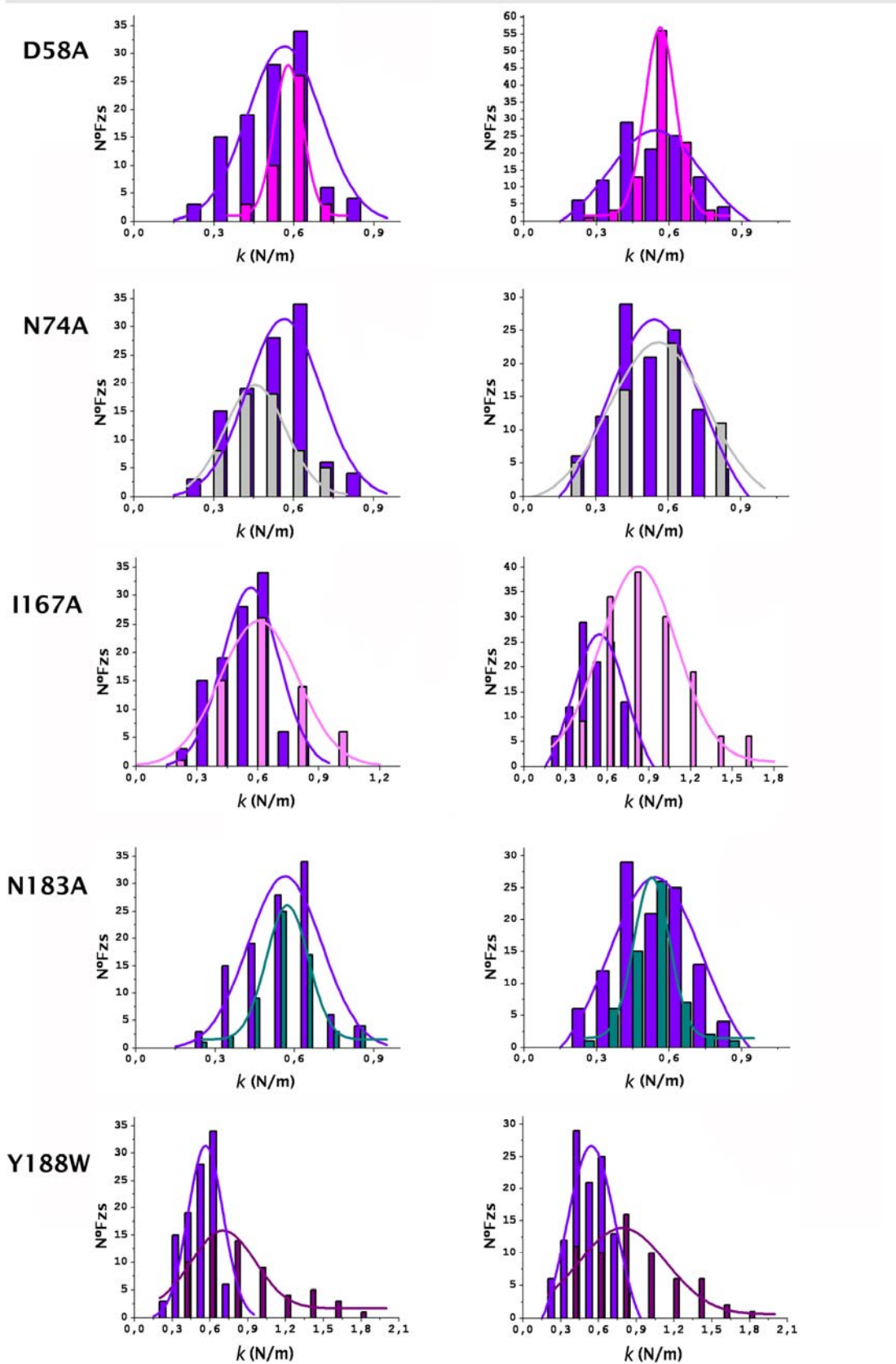
4.3.5. Efecto de mutaciones de residuos situados en la base de los poros sobre la rigidez mecánica de la cápsida en regiones alejadas de los poros

Nuestra hipótesis de una correlación infectividad-flexibilidad mecánica en la región de los poros no implicaba en absoluto que la misma correlación se mantuviera para otras regiones de la cápsida alejadas de los poros. Por el contrario, una correlación infectividad-flexibilidad que resultara cierta para cualquier región de la cápsida, y no sólo para la región alrededor de cada poro, podría debilitar el modelo mecánico que habíamos propuesto.

Para investigar este punto, para cada uno de los 5 mutantes de la serie C y de los 6 mutantes de la serie P se realizaron indentaciones repetidas sobre un eje S2 o S3 de un número suficiente de cápsidas vacías individuales. Las mediciones se realizaron del mismo modo que se acaba de describir en el apartado 4.3.4 para el análisis de la rigidez en el eje S5, en paralelo y en las mismas condiciones. Las k_s obtenidas se analizaron del mismo modo (Figura 34). Los resultados mostraron que 2 de las 5 mutaciones de la serie C (I167A y Y188W) y las 6 mutaciones de la serie P aumentan la k_s de la cápsida de modo estadísticamente significativo (de acuerdo al test t de Student) tanto en el eje S2 (incrementos de entre el 20 y el 80%) como en el eje S3 (incrementos de entre el 60% y el 140%) (Figura 34 y Tablas 15, 16 y 17). No obstante, estos incrementos de rigidez mecánica de la cápsida en regiones alejadas de los poros, a diferencia de los incrementos de rigidez mecánica en la región alrededor de cada poro (apartado 4.3.4), no correlacionaron con la pérdida de infectividad observada para los virus mutantes correspondientes (Tablas 13 y 16).

Esta observación refuerza nuestra hipótesis de una correlación entre infectividad y flexibilidad mecánica *local*, referida a la de la región alrededor de cada poro (S5) y relacionada con procesos dinámicos de traslocación a través de estos poros (ver Discusión).

Mutaciones fuera de la base de los poros



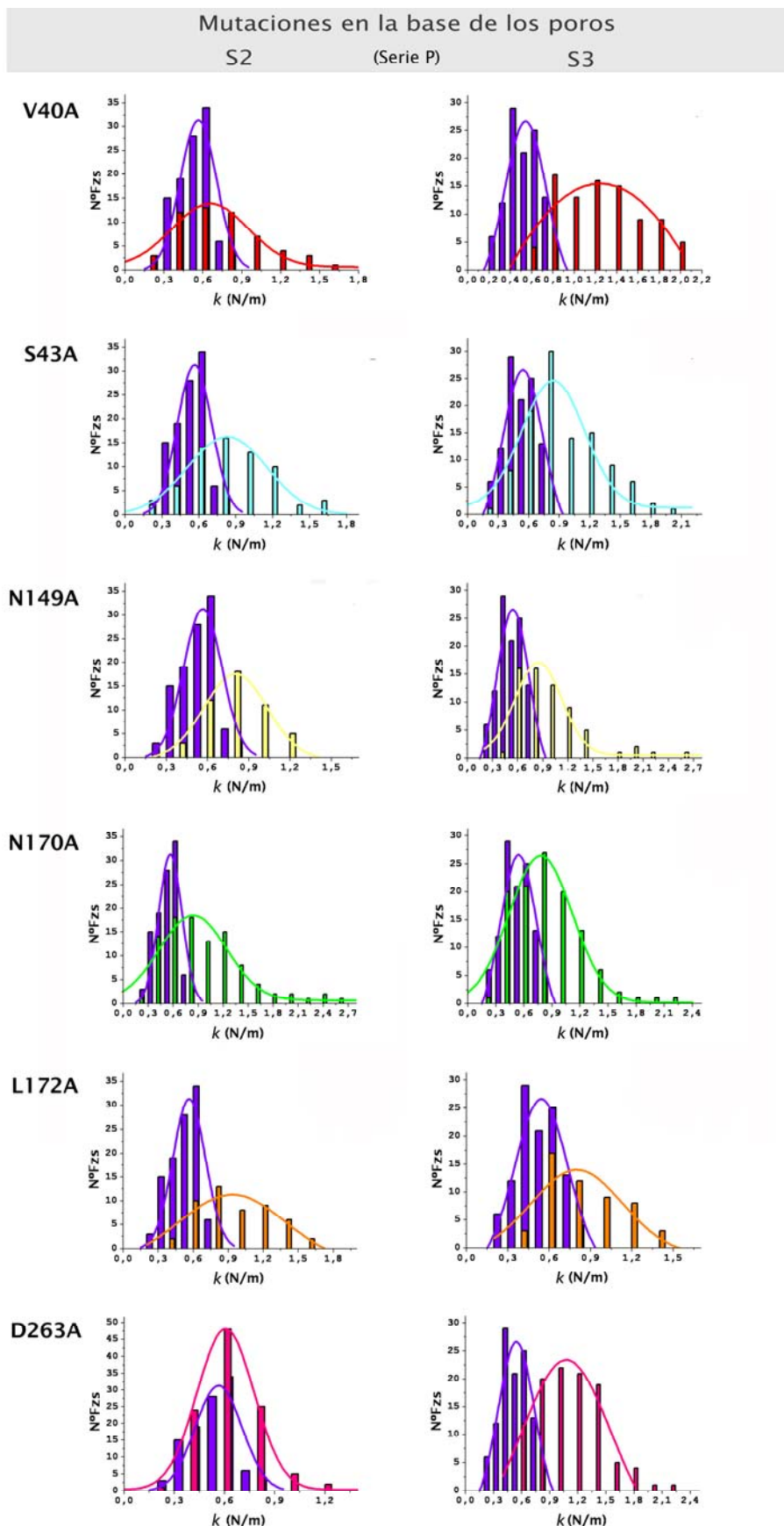


Figura 34. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S2 y S3 entre cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C). Cada panel representa dos histogramas, uno para las partículas no mutadas (color violeta) y otro para las partículas de un determinado mutante, que se indica a la izquierda. Los histogramas representan la distribución del valor de k_s obtenido para las cápsidas vacías cuando estas se indentan a lo largo de un eje S2 o S3. Código de colores: violeta, no mutado (wt); rojo, mutante V40A; azul, mutante S43A; amarillo, mutante N149A; verde, mutante N170A; naranja, mutante L172A; magenta, mutante D263A; rosa, mutante D58A; gris, mutante N74A; malva, mutante I167A; verde agua, mutante N183A; púrpura, mutante Y188W.

Tabla 16. Valores de k_s en los ejes S2 determinados para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C).

Cápsidas	k_s (N/m) ^a	nº Fzs ^b	nº partículas ^c	T^d
no mutado	0,55 ± 0,14	109	14	-
Mutaciones en la base de los poros (Serie P, S2)				
V40A	0,78 ± 0,33	55	6	$8,4 \times 10^{-06}$
S43A	0,89 ± 0,31	66	6	$2,4 \times 10^{-12}$
N149A	0,85 ± 0,21	52	5	$5,7 \times 10^{-14}$
N170A	1,00 ± 0,48	99	12	$1,9 \times 10^{-15}$
L172A	0,99 ± 0,32	50	10	$2,6 \times 10^{-13}$
D263A	0,67 ± 0,17	104	8	$9,7 \times 10^{-08}$
Mutaciones fuera de la base de los poros (Serie C, S2)				
D58A	0,58 ± 0,05	42	5	0,58
N74A	0,52 ± 0,11	57	10	0,09
I167A	0,67 ± 0,18	62	6	$2,5 \times 10^{-05}$
N183A	0,57 ± 0,07	63	6	0,97
Y188W	0,89 ± 0,35	61	5	$3,3 \times 10^{-10}$

^a Para el cálculo del valor de k_s se promediaron el conjunto de todos los valores obtenidos a partir de Fzs individuales realizadas sobre diversas partículas a lo largo de ejes S2; se indica en cada caso el valor medio y la desviación estándar.

^b nº Fzs: número total de Fzs a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^c nº partículas: número de partículas individuales a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^d T : valor del parámetro t obtenido tras la realización de un Test t de Student (ver apartado 3.16 y nota al pie de la Tabla 11).

Tabla 17. Valores k_s en los ejes S3 determinados para cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros (Serie P) y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida (Serie C).

Cápsidas	k_s (N/m) ^a	nº Fzs ^b	nº partículas ^c	T^d
no mutado	0,54 ± 0,14	110	16	-
Mutaciones en la base de los poros (Serie P, S3)				
V40A	1,29 ± 0,39	88	11	2,1x10 ⁻³²
S43A	0,99 ± 0,36	106	15	6,1x10 ⁻²³
N149A	0,93 ± 0,25	60	9	9,3x10 ⁻¹⁸
N170A	0,88 ± 0,35	113	20	5,4x10 ⁻¹⁷
L172A	0,89 ± 0,26	52	11	8,2x10 ⁻¹³
D263A	1,16 ± 0,35	103	12	6,7x10 ⁻³⁴
Mutaciones fuera de la base de los poros (Serie C, S3)				
D58A	0,56 ± 0,03	100	12	0,08
N74A	0,59 ± 0,17	55	9	0,07
I167A	0,92 ± 0,28	143	17	4,8x10 ⁻³²
N183A	0,53 ± 0,07	59	7	0,73
Y188W	0,92 ± 0,35	62	9	1,1x10 ⁻¹¹

^a Para el cálculo del valor de k_s se promediaron el conjunto de todos los valores obtenidos a partir de Fzs individuales realizadas sobre diversas partículas a lo largo de ejes S3; se indica en cada caso el valor medio y la desviación estándar.

^b nº Fzs: número total de Fzs a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^c nº partículas: número de partículas individuales a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^d T : valor del parámetro t obtenido tras la realización de un Test t de Student (ver apartado 3.16 y nota al pie de la Tabla 11)

4.4. Papel de cavidades conservadas en las propiedades mecánicas de la cápsida de MVM

Nuestros resultados descritos en los apartados 4.2 y 4.3 habían mostrado, respectivamente, la participación del ADN en la estabilidad estructural/mecánica del virión, y de los residuos situados en la base de los poros en la flexibilidad conformacional/mecánica de la cápsida. Pero además, habían demostrado la posibilidad de manipular racionalmente, utilizando el método hipotético-deductivo y la ingeniería de proteínas, la rigidez/flexibilidad mecánica de una nanopartícula vírica, lo que presenta un interesante potencial nanobiotecnológico.

En este mismo sentido, y al igual que las cavidades en una esponja son críticas para la flexibilidad mecánica de ésta, razonamos que la localización, forma y tamaño de las cavidades conservadas en la cápsida de MVM y otros parvovirus relacionados (apartado 1.2.4) podrían influir en las propiedades mecánicas de la partícula vírica. Una adecuada disminución de volumen de la cavidad (“rellenado”) podría conducir a un incremento (local o global) de la rigidez mecánica de la partícula vírica; a su vez, un adecuado incremento de volumen de la cavidad (“vaciado”) podría conducir a un incremento (local o global) de la flexibilidad mecánica de dicha partícula. De ser así, la manipulación de la forma y tamaño de cavidades en las cápsidas de diferentes virus podría suministrar una estrategia para modificar las propiedades mecánicas de partículas víricas con fines nanobiotecnológicos. Esta estrategia podría sumarse a la manipulación de las interacciones cápsida-ácido nucleico, o de la estructura de otras regiones flexibles de la cápsida (regiones cercanas a los poros en el caso de MVM) que hemos descrito en los apartados anteriores.

Además, si la mutación de residuos conservados que flanquean estas cavidades en MVM alterasen las propiedades mecánicas de la cápsida, no nos pareció irrazonable suponer que estas cavidades conservadas en parvovirus podrían tener algún papel en procesos de dinámica conformacional de la cápsida que confirieran al virión una mayor eficacia biológica.

En parte por las razones que se acaban de exponer, iniciamos un estudio mutacional de la relación entre forma y tamaño de la cavidad A en la cápsida de MVM (**Figura 35**) y las propiedades mecánicas de dicha cápsida.

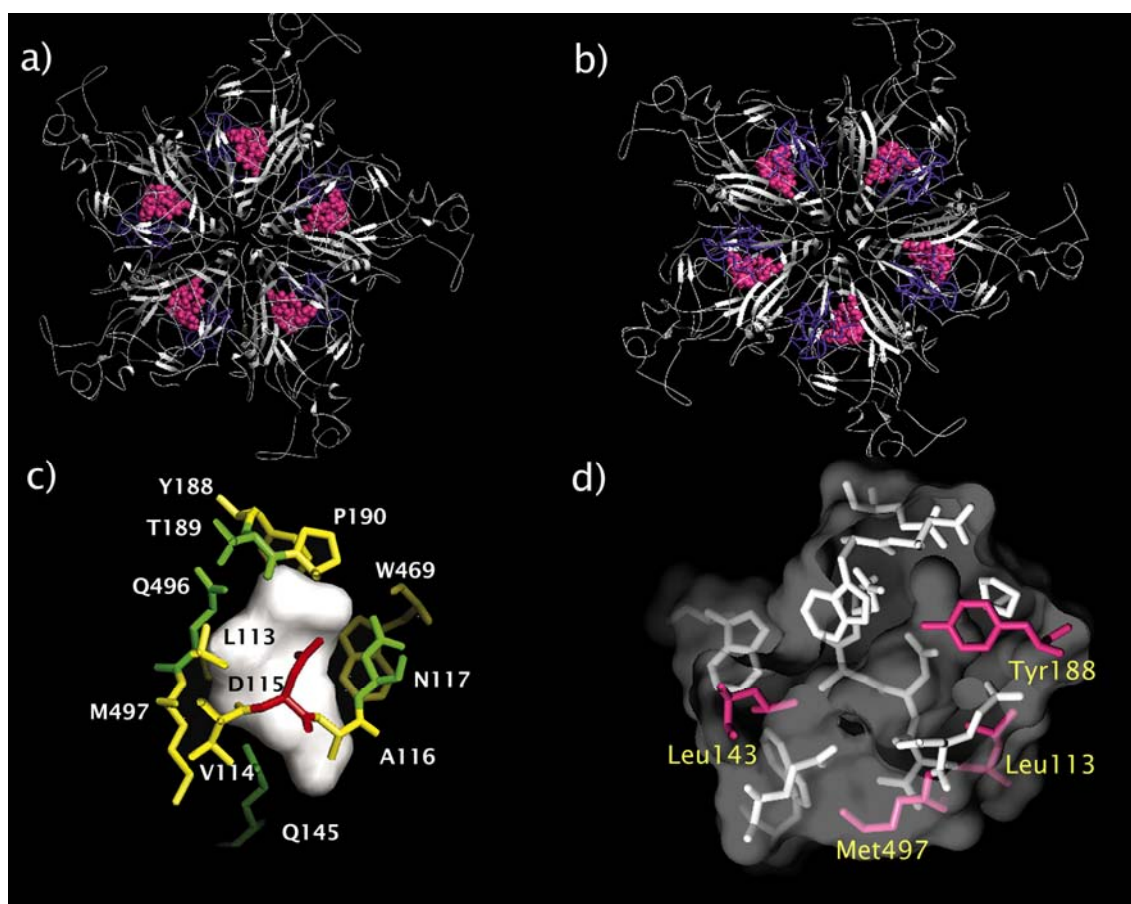


Figura 35. Visualización de la cavidad A en la estructura del virión de MVM. a), b), modelo de cintas de 5 VPs rodeando un eje S5 en el virión de MVM, basado en la estructura cristalográfica de éste (Kontou *et al.*, 2005), y visto desde el exterior (a) o desde el interior (b) de la partícula. Los residuos que rodean la cavidad A se indican en color rosa. Los segmentos de ADN unidos al interior de la cápsida se indican en color violeta; c) primer plano de la región de la cavidad A. La superficie de la cavidad se indica en color blanco. Los residuos que flanquean la cavidad se representan en modelo de varillas. Código de colores: amarillo, verde y rojo, residuos cuya cadena lateral es principalmente hidrofóbica, neutra o polar, respectivamente; d) otra representación de la región de la cavidad A y de los aminoácidos que la delimitan. En rosa se resaltan los residuos seleccionados para el análisis mutacional descrito en el apartado 4.4. La imagen del panel c) ha sido tomada de Carreira y Mateu, 2006.

4.4.1. Diseño y construcción de cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que flanquean cavidades, para su análisis mecánico

Basándonos en parte en un trabajo previo de nuestro laboratorio sobre la relación estructura-función de las mayores cavidades en la cápsida de MVM (Carreira y Mateu, 2006), seleccionamos, para su análisis mecánico mediante AFM, 9 cápsidas con mutaciones individuales en residuos que flanquean la cavidad A. El razonamiento seguido para elegir las mutaciones fue el siguiente: *i)* sustituir residuos hidrofóbicos conservados entre parvovirus evolutivamente próximos a MVM, y por tanto con una posible función biológica; *ii)* mantener el carácter hidrofóbico del residuo mutado; *iii)* seleccionar dos mutaciones para el mismo residuo, una que disminuya el tamaño de la cavidad y otra que lo aumente; *iv)* no modificar excesivamente el tamaño del residuo, dado que nuestros datos previos revelaron que cambios importantes en el volumen de la cavidad impiden el ensamblaje de la cápsida (Carreira y Mateu, 2006); *v)* elegir mutaciones que causen los efectos generalmente encontrados en nuestro análisis mutacional previo de la cavidad A. Es decir, mutaciones que no impidan el cambio conformacional de la cápsida inducido por calor, ni afecten de modo sustancial a la infectividad. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se seleccionaron los siguientes mutantes: L113A, L143A, L143V, Y188F, Y188L (mutantes de “vaciado” que aumentan el volumen de la cavidad), L113F, L143F, Y188W (mutantes de “rellenado” que disminuyen el volumen de la cavidad) y M497L (mutante que no altera el volumen de la cavidad, pero sí su forma). Todos estos mutantes, excepto L143A, L143V e Y188L ya se habían preparado previamente en el laboratorio, y las propiedades mecánicas de la cápsida mutante Y188W ya habían sido analizadas en el estudio descrito en el apartado 4.3, donde este mutante se utilizó como uno de los controles de la serie C.

Las mutaciones restantes, L143A, L143V e Y188L se introdujeron en el plásmido pSVtk-VP1/VP2 siguiendo el mismo procedimiento que para las demás (apartados 3.2.1 y 3.3.1). Se comprobó que el L143V resultó ser el único de estos tres mutantes cuya cápsida fue capaz de ensamblarse. En los otros dos casos (L143A e Y188L), los ensayos de IF *in situ*, llevados a cabo tal y como se describe en el apartado 3.6 mostraron que, si bien los mutantes eran capaces de expresar proteínas virales en cantidades comparables a las del control no mutado, no ensamblaban cápsidas en absoluto (datos no mostrados). Esto está de acuerdo con la observación previa de que cambios importantes en el volumen de estas cavidades de MVM impiden el ensamblaje de la cápsida (Carreira y Mateu, 2006).

Por tanto se obtuvieron y purificaron cápsidas vacías de 7 de los mutantes elegidos. La localización de los 7 residuos mutagenizados alrededor de la cavidad A se

muestra en la [Figura 35](#); las características de estos 7 mutantes (comparadas con las del control no mutado) se recogen en la [Tabla 18](#).

Tabla 18. Efecto de algunas mutaciones de residuos que rodean la cavidad A en MVM sobre el ensamblaje de VLPs y el valor de T_m para la primera transición conformacional en VLPs sometidas a calentamiento.

Mutación	Número de átomos distintos a Hidrógeno ^a	Ensamblaje de cápsidas ^b	T_m (°C) ^c
no mutado (wt)	0	++	46,3 ± 0,9
L113A	-3	++	44,6 ± 0,3
L113F	+3	++	43,3 ± 0,5
L143A	-3	-	ND
L143V	-1	++	ND
L143F	+3	++	49,5 ± 0,9
Y188F	-1	++	48,2 ± 0,5
Y188L	-4	-	ND
Y188W	+2	++	48,8 ± 2,2
M497L	0	++	48,9 ± 1,2

^a Los signos + y - indican, respectivamente, que la mutación implica ganancia o pérdida de átomos respecto al residuo original en esa posición.

^b Determinado mediante IF *in situ*. ++, reactividad similar al control no mutado; -, reactividad indetectable.

^c En cada caso se indica el valor medio y el error de ajuste (datos tomados del trabajo de Carreira y Mateu, 2006).

4.4.2. Efecto de mutaciones de residuos que flanquean cavidades sobre la rigidez mecánica de la cápsida

El análisis mediante AFM de las propiedades mecánicas de las 7 cápsidas con mutaciones que modifican el volumen o forma de la cavidad A se realizó por la autora de esta memoria en colaboración con la Dra. R. Pérez de nuestro laboratorio, siguiendo exactamente el mismo procedimiento de determinación experimental y análisis de datos descrito en los apartados 4.3.4 y 4.3.5 para otros mutantes.

De nuevo, las imágenes de partículas individuales mostraron claramente las características topográficas esperadas, que sirvieron para identificar la orientación de las cápsidas individuales que presentaban un eje de simetría S5, S3 o S2 en la parte superior (**Figura 36**).

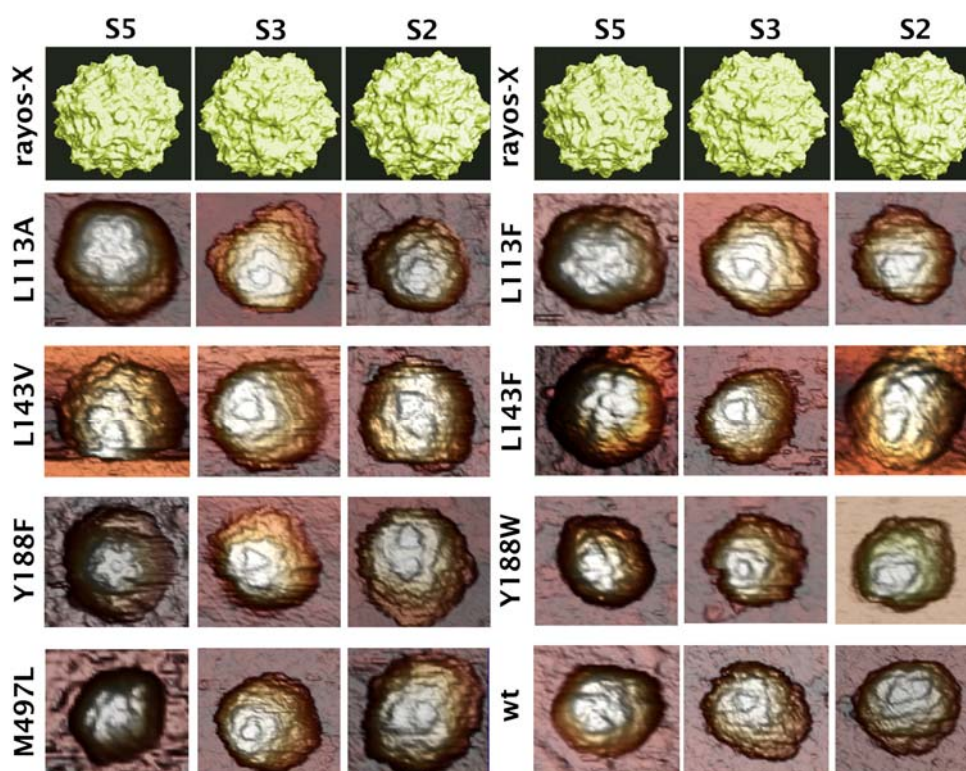


Figura 36. Imágenes representativas obtenidas por AFM de cápsidas individuales de MVM no mutados (wt) o mutantes con sustituciones de residuos que rodean la cavidad A, y que presentan un eje de simetría quinario (S5), ternario (S3) o binario (S2) en su parte superior. En la fila superior se muestra un modelo de superficie del virión de MVM basado en su estructura cristalográfica. Las demás son imágenes de AFM correspondientes a la cápsida wt y a los distintos mutantes (cada uno nombrado en el lateral izquierdo). La topografía de MVM aparece expandida lateralmente por los usuales efectos de dilatación entre la punta y la muestra.

La representación en histogramas de la k_s de partículas individuales para cada mutante y eje de simetría y el ajuste Gaussiano de dicho histograma que rindió el valor promedio de k_s en cada caso se muestran en las **Figuras 37 y 38**.

Cuando se comparó la rigidez mecánica en el eje de simetría S5 de las 7 cápsidas con mutaciones alrededor de la cavidad A se observó que el valor de la k_s en cada caso era estadísticamente indistinguible del obtenido para el control no mutado (**Figura 37 y Tabla 19**). Este era el resultado que esperábamos en base a nuestra hipótesis de la relación infectividad-flexibilidad mecánica en la región de la cápsida alrededor de cada poro, puesto que estos 7 mutantes presentan el cambio conformacional inducido por calor y los correspondientes viriones son infecciosos. Incidentalmente, este resultado apoya el estudio descrito en el apartado 4.3 y la correlación infectividad-flexibilidad mecánica local, al elevar de 5 a 11 los mutantes control (serie C), y a 17 los mutantes totales analizados para establecer esa correlación, sin que hayamos encontrado una sola excepción a la misma.

Cuando se comparó la rigidez mecánica en los ejes de simetría S2 o S3 de las 7 cápsidas con mutaciones alrededor de la cavidad A se observó en todos los casos un incremento estadísticamente significativo en la k_s con respecto a la cápsida no mutada (**Figura 38 y Tabla 19**). Este incremento sustancial en la rigidez mecánica fue entre un 25% y un 116% para el eje S2 y entre un 43% y un 111% para S3, según el mutante considerado. El porcentaje de refuerzo en función del eje de simetría ensayado para cada una de las partículas no mutada y mutantes se muestra en la **Tabla 20**. Esta rigidificación mecánica generalizada nos resultó sorprendente. Basándonos en consideraciones simplistas, esperábamos que el relleno de la cavidad incrementara la rigidez mecánica (como así ocurrió), pero que el vaciado de la cavidad disminuyera la rigidez mecánica (que es lo contrario a lo observado experimentalmente). El cambio de forma de la cavidad sin cambio apreciable de tamaño también incrementó sustancialmente la dureza de la cápsida en las regiones S2 y S3.

En resumen, parece que el tamaño y forma de la cavidad A en la cápsida no mutada de MVM mantiene a ésta cerca de un máximo de flexibilidad mecánica. Cualquier mutación analizada que disminuye o aumenta el volumen o cambia la forma de la cavidad aumenta la rigidez mecánica de las regiones cercanas a S2 y S3, sin afectar a la rigidez mecánica de la región alrededor de S5 y de cada poro. Estas observaciones están en pleno acuerdo con la hipótesis infectividad-flexibilidad local (de la región de los poros), que formulamos y sometimos a prueba experimental como hemos descrito en el apartado 4.3.

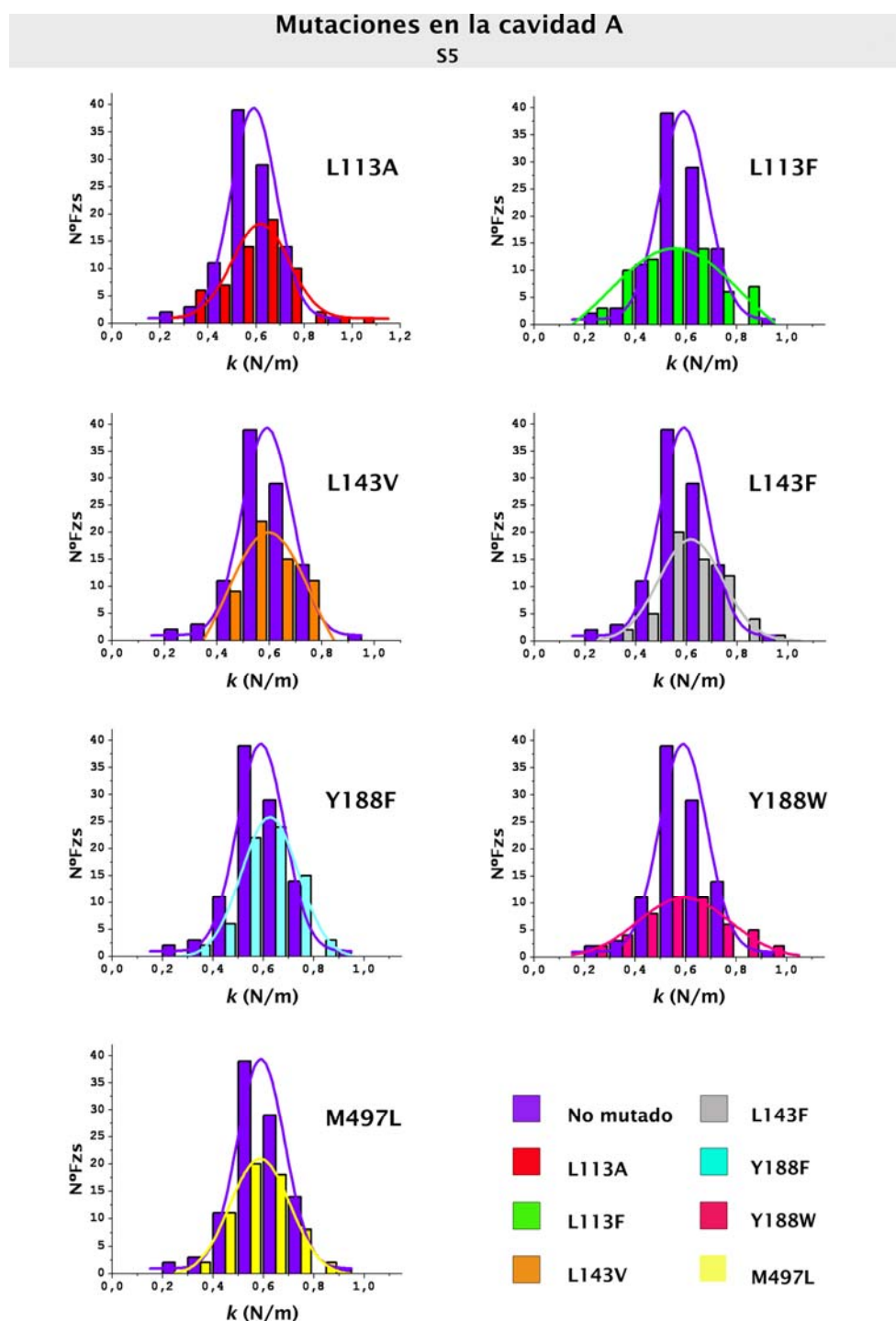


Figura 37. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S5 entre cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que rodean la cavidad A. Cada panel representa dos histogramas, uno para las partículas no mutadas (color violeta) y otro para las partículas de un determinado mutante, que se indica a la derecha. Los histogramas representan la distribución del valor de k_s obtenido para las cápsidas vacías cuando estas se indentan a lo largo de un eje S5. Los valores fueron obtenidos en colaboración entre la autora de esta memoria y la Dra. R. Pérez de nuestro laboratorio. Código de colores: violeta, no mutado (wt); rojo, mutante L113A; verde, mutante L113F; naranja, mutante L143V; gris, mutante L143F; azul, mutante Y188F; rosa, mutante Y188W; amarillo, mutante M497L.

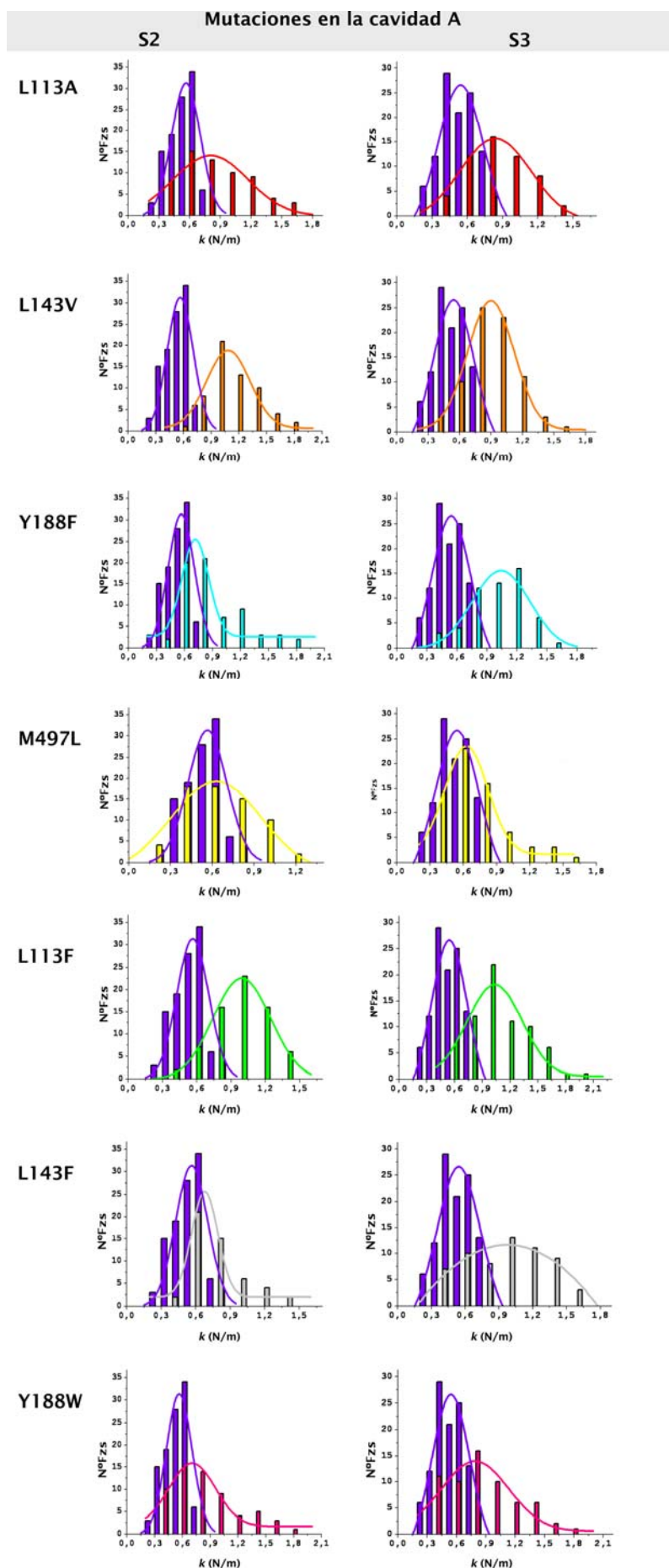


Figura 38. Comparación de las propiedades mecánicas en los ejes S2 y S3 entre cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que rodean la cavidad A. Cada panel representa dos histogramas, uno para las partículas no mutadas (color violeta) y otro para las partículas de un determinado mutante, que se indica a la izquierda. Los histogramas representan la distribución del valor de k_s obtenido para las cápsidas vacías cuando estas se indentan a lo largo de un eje S2 o S3. Los valores fueron obtenidos en colaboración entre la autora de esta memoria y la Dra. R. Pérez de nuestro laboratorio. Código de colores: violeta, no mutado (wt); rojo, mutante L113A; verde, mutante L113F; naranja, mutante L143V; gris, mutante L143F; azul, mutante Y188F; rosa, mutante Y188W; amarillo, mutante M497L.

Tabla 19. Valores de k_s determinados para partículas de MVM no mutado (wt) y mutantes con sustituciones de residuos que rodean la cavidad A.

Mutaciones en la cavidad A				
Cápsidas	k (N/m) S5 ^a	n° Fzs ^b	n° partículas ^c	T^d
wt	0,59 ± 0,11	99	6	-
L113A	0,60 ± 0,15	59	5	0,66
L113F	0,57 ± 0,17	66	5	0,30
L143V	0,59 ± 0,10	57	6	0,84
L143F	0,62 ± 0,13	59	6	0,14
Y188F	0,63 ± 0,10	72	5	0,04
Y188W	0,60 ± 0,18	49	6	0,64
M497L	0,59 ± 0,11	61	5	0,78
Cápsidas	k (N/m) S3 ^a	n° Fzs ^b	n° partículas ^c	T^d
wt	0,54 ± 0,14	110	16	-
L113A	0,89 ± 0,25	53	10	$6,2 \times 10^{-14}$
L113F	1,14 ± 0,31	70	8	$2,3 \times 10^{-26}$
L143V	0,96 ± 0,23	76	10	$6,6 \times 10^{-27}$
L143F	1,02 ± 0,36	61	10	$4,2 \times 10^{-15}$
Y188F	1,06 ± 0,28	55	9	$4,0 \times 10^{-20}$
Y188W	0,92 ± 0,35	62	9	$1,1 \times 10^{-11}$
M497L	0,77 ± 0,29	66	12	$3,8 \times 10^{-08}$

Cápsidas	k (N/m) S2 ^a	nº Fzs ^b	nº partículas ^c	T^d
wt	0,55 ± 0,14	109	14	-
L113A	0,91 ± 0,33	61	9	1,0X10 ⁻¹¹
L113F	1,05 ± 0,24	71	6	1,5X10 ⁻²⁸
L143V	1,19 ± 0,27	59	6	3,0X10 ⁻²⁷
L143F	0,83 ± 0,24	50	5	1,1X10 ⁻¹⁰
Y188F	0,95 ± 0,33	67	9	2,3X10 ⁻¹⁴
Y188W	0,89 ± 0,35	61	5	3,3X10 ⁻¹⁰
M497L	0,69 ± 0,24	67	8	3,8X10 ⁻⁰⁵

^a Para el cálculo del valor de k_s se promediaron el conjunto de todos los valores obtenidos a partir de Fzs individuales realizadas sobre diversas partículas a lo largo de ejes S5, S3 o S2; se indica en cada caso el valor medio y la desviación estándar.

^b nº Fzs: número total de Fzs a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^c nº partículas: número de partículas individuales a partir de las cuales se ha obtenido el valor medio de k_s .

^d T : valor del parámetro t obtenido tras la realización de un Test t de Student (ver apartado 3.16 y nota al pie de la Tabla 11).

Tabla 20. Porcentaje de reforzamiento o flexibilización mecánica para cápsidas de MVM con mutaciones en residuos que rodean la cavidad A.

Mutaciones en la cavidad A			
Cápsidas	% refuerzo en S5^a	% refuerzo en S3^a	% refuerzo en S2^a
no mutado	-	-	-
L113A	2	65	65
L113F	-3	111	90
L143V	0	78	116
L143F	5	89	51
Y188F	7	96	73
Y188W	2	70	62
M497L	0	43	25

^a Se muestra en porcentaje respecto al control no mutado (wt) el grado de rigidificación (signo positivo) o flexibilización (signo negativo) que experimentan las cápsidas de MVM con mutaciones en la base de los poros y otras con mutaciones en otros lugares de la cápsida, a lo largo de ejes S5, S3 o S2. Los valores bajos de rigidificación o flexibilización no resultaron significativos.

4.4.3. Determinación de la estabilidad frente a la inactivación térmica de viriones de MVM con mutaciones en residuos que flanquean la cavidad A

Parte de los resultados descritos en los apartados 4.3.5 y 4.4.2 han revelado que mutaciones localizadas en regiones muy diversas de la cápsida provocan un cambio en la rigidez mecánica de la partícula vírica (cápsida o virión) localizado en regiones cercanas a los ejes S2 y S3. Estas mutaciones se encuentran en la base de los poros, en la parte superior de los poros, en la pared interna de la cápsida en zonas de contacto con el ADN viral, o alrededor de cavidades de cierto tamaño situadas dentro de la pared de la cápsida.

Es importante recordar en este contexto que la eliminación de interacciones cápsida-ADN en el virión mediante las mutaciones D58A o N183A produjo una cierta reducción de la infectividad del virus en condiciones normales, y además una reducción en la resistencia del virión frente a la inactivación térmica de su infectividad (Reguera *et al.*, 2005); estos efectos correlacionaron con una disminución de rigidez mecánica en las regiones S2 y S3 *del virión* a causa de estas mismas mutaciones (apartado 4.2.3). Un razonamiento análogo nos ha llevado a analizar experimentalmente la posibilidad de que mutaciones que alteran el tamaño o la forma de la cavidad A y refuerzan mecánicamente de las regiones S2 y S3 en la cápsida vacía (apartado 4.4.2) pudieran aumentar la resistencia del virión de MVM frente a la inactivación térmica.

Para comparar la infectividad de estos mutantes se utilizaron clones infecciosos que contenían individualmente 6 de las 7 mutaciones de residuos que flanquean la cavidad A (L113A, L113F, L143F, Y188F, Y188W y M497L). Se comparó para cada mutante el título de la progenie producida a 96h hpt con la del clon infeccioso no mutado llevado en paralelo. Los títulos fueron normalizados frente a la cantidad de proteína viral producida en cada caso y al título obtenido para el control no mutado en el mismo experimento (apartados 3.1.5, 3.5.1 y 3.11). No se observaron diferencias significativas de título para ninguno de los 6 mutantes con respecto al control no mutado (**Tabla 21**).

Para comparar la resistencia de los 6 mutantes anteriores frente a la inactivación térmica se calentaron los viriones mutantes y no mutado a 70°C o a 80°C (dependiendo del experimento) durante diferentes tiempos (Reguera *et al.*, 2005; apartado 3.10). Los resultados obtenidos en varios experimentos (**Tabla 22**) revelan en conjunto que, si bien podría existir una tendencia hacia una inactivación algo más rápida de los distintos viriones mutantes analizados respecto al no mutado

Tabla 21. Análisis mediante titulación del efecto de mutaciones de residuos que rodean la cavidad A sobre la infectividad de MVM.

Mutación en VP2	Infectividad (ufp/ml) viriones extracelulares^a	Relación de infectividad^b
no mutado	$4,28 \times 10^6 \pm 1,26 \times 10^6$	1,00
L113A	$9,29 \times 10^6 \pm 6,87 \times 10^6$	2,17
L113F	$3,75 \times 10^6 \pm 1,87 \times 10^6$	0,88
L143V	ND	ND
L143F	$4,25 \times 10^6 \pm 1,74 \times 10^6$	0,99
Y188F	$4,57 \times 10^6 \pm 2,52 \times 10^6$	1,07
Y188W	$2,38 \times 10^6 \pm 8,85 \times 10^5$	0,56
M497L	$4,50 \times 10^6 \pm 1,73 \times 10^6$	1,05

^a Los valores de infectividad fueron obtenidos por duplicado en cada experimento, en un mínimo de cuatro experimentos independientes por cada mutante y siete para el control no mutado (wt). Se indica en cada caso el valor medio y la desviación estándar. Los títulos obtenidos fueron normalizados en función de la cantidad de proteína sintetizada en cada caso, como se describe en los apartados 3.1.5 y 3.11.

^b La relación de infectividad expresa el cociente entre el título medio obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el control no mutado (wt). ND, no determinado.

(especialmente para el caso de Y188W cuando se ensayó a una temperatura más elevada), dicha tendencia es muy sutil y difícil de sustentar estadísticamente.

En resumen, el incremento local de rigidez mecánica de la cápsida de MVM en la región de cada poro (S5) por mutaciones de residuos en la base del poro correlaciona absolutamente con la disminución drástica de la infectividad del virus; la disminución de rigidez mecánica del virión en las regiones S3 y S2 por pérdida de interacciones cápsida-ADN se relaciona con una disminución de la resistencia del virión frente a la inactivación térmica; y, finalmente, los resultados de este apartado revelan que el aumento de rigidez mecánica de la cápsida en las regiones S2 y S3 por mutaciones de residuos que flanquean la cavidad A no tiene un efecto apreciable ni sobre la infectividad ni sobre la resistencia del virión frente a la inactivación térmica.

Tabla 22. Análisis del efecto de mutaciones de residuos que rodean la cavidad A sobre la resistencia de MVM a la inactivación térmica.

Mutación en VP2	Relación t_{70}^a	
	a 70°C ^b	a 80°C ^b
no mutado	1	1
L113A	0,94	0,83
L113F	1,09	0,87
L143V	ND	ND
L143F	0,73	0,85
Y188F	0,87	0,79
Y188W	0,67	0,40
M497L	0,82	0,53

^a Los valores de infectividad fueron obtenidos por duplicado en cada experimento, en un mínimo de dos experimentos independientes por cada mutante y cuatro para el control no mutado (wt). La relación t_{70} indicada para cada mutación representa el cociente entre el tiempo necesario para que el virus mutante pierda el 70% de su título original (a tiempo 0), y el tiempo necesario para que el virus no mutado pierda el 70% de su título original.

^b Temperatura a la cual se han llevado a cabo los experimentos de inactivación. ND, no determinado.

4.4.4. Estrategias iniciales de evolución dirigida para el incremento de la resistencia térmica y mecánica de cápsidas víricas

Durante la fase final de esta Tesis se ha comenzado a realizar otro proyecto basado en una parte de lo descrito en los apartados anteriores, y que se pretende continuar en el laboratorio. El proyecto consiste en esencia en la obtención mediante evolución dirigida de viriones de MVM que presenten una mayor resistencia a la inactivación mediante estrés mecánico y/o térmico, y la identificación de las bases moleculares de esta resistencia. Las razones por las que consideramos interesante este proyecto son, de nuevo, tanto de tipo básico como aplicado.

Desde el punto de vista aplicado, esta aproximación podría complementar y expandir las aproximaciones racionales seguidas por nosotros en este trabajo para obtener cápsidas o viriones de MVM de mayor estabilidad mecánica y/o térmica. Aunque los viriones de MVM son notablemente resistentes a la disociación en subunidades por acción del calor, su resistencia a la inactivación de su infectividad es sólo moderada. En cuanto a resistencia mecánica, las cápsidas y viriones de MVM son considerablemente rígidos desde el punto de vista mecánico comparados con otras de las (muy pocas) partículas víricas cuyas propiedades mecánicas se han analizado hasta el momento. No obstante, una elevada rigidez mecánica podría no implicar una mayor resistencia a estrés mecánico. Incluso podría resultar al contrario, como ocurre con materiales duros pero frágiles.

Desde el punto de vista básico, nos parece sumamente interesante y novedoso tratar de relacionar las propiedades mecánicas de partículas víricas con su biología, como hemos comenzado a hacer en los estudios que se describen en los apartados 4.2, 4.3 y 4.4. La obtención mediante evolución dirigida de viriones de MVM más resistentes a estrés mecánico y/o térmico permitiría ayudar a establecer por ejemplo, si es la rigidez o la flexibilidad mecánica lo que hace a una partícula vírica esférica más resistente a estrés mecánico; o si, como algunos de nuestros datos sugieren, puede haber una relación entre un incremento de la rigidez mecánica de ciertas regiones de la cápsida y la estabilidad térmica de la conformación infecciosa del virión (ver Discusión).

Las mutaciones elegidas en residuos que flanquean la cavidad A produjeron un incremento en la rigidez mecánica en S2 y S3 aunque no en S5. Por tanto, como punto de partida para un intento de evolución dirigida semi-racional, elegimos 5 residuos que delimitan la cavidad A, y cuyas cadenas laterales están orientadas hacia el interior de la cavidad: L113, L143, Y188, W469 y Q496. El objetivo era conseguir modificar la geometría de la cavidad de modos muy diferentes preservando en la medida de lo posible el carácter hidrofóbico de la misma. Para esto se pensó en mutar de modo combinatorial estos 5 residuos mediante mutagénesis dirigida múltiple por PCR inversa, utilizando oligonucleótidos degenerados (apartado 3.3.1) (**Tabla 1**). De este modo, en cada una de las cinco posiciones se podría tener el residuo no mutado, o sustituciones por cualquiera de los aminoácidos G, V, L, I, M, F, W, K, R o S. El proceso de mutagénesis pudo llevarse a cabo, consiguiéndose mutantes múltiples en todas las posiciones. Pero por dificultades técnicas no fue posible la introducción de las mutaciones en el plásmido infeccioso pTRp (apartados 3.2.4 y 3.3.3).

Por tanto, iniciamos un segundo abordaje combinatorial mediante un proceso de PCR propensa a error, tal y como se describe en el apartado 3.3.1. Como nuestro objetivo seguía siendo el cambio de geometría de las cavidades, escogimos una región de VP2 (aminoácidos 112 a 190) que contuviera en buena medida residuos que

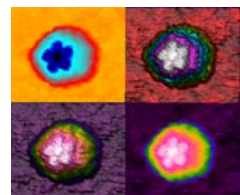
delimitan cavidades, sin poder evitar implicar a algunos otros residuos de la cápsida, incluyendo algunos que contactan con el ADN o forman parte de las interfases intertrímeros. Aunque este hecho, por un lado, podría dificultar el adscribir al cambio de forma o tamaño de la cavidad cualquier variación que encontráramos en las propiedades físicas de la cápsida, por otra parte podría facilitar encontrar mutantes que presentaran estas propiedades alteradas. Obtuvimos de este modo una librería de 10^4 variantes combinatoriales, con aproximadamente un 70% de mutantes simples y múltiples, únicamente en la región elegida de VP2.

Realizamos entonces un control para determinar si uno de los mutanes combinatoriales obtenidos de este modo, y que no presentara sustituciones de aminoácido en la región de VP2 sometida a mutagénesis combinatorial, mantenía como se esperaba la misma infectividad que el virión no mutado. De las variantes combinatoriales aisladas y secuenciadas se eligió una que contenía 3 mutaciones silenciosas en la región de VP2 combinatorializada (por tanto, eran cambios que preservaban el residuo original en la posición afectada), se transfectó junto con un plásmido infeccioso no mutado (como se describe en el apartado 3.5.1) y se recogieron las células a 48 hpe. Dichas células se lisaron como se describe en el apartado 3.5.2, y se tituló el extracto obtenido (apartado 3.1.5). El triple mutante silencioso y el control no mutado rindieron un mismo título dentro del error experimental.

A continuación, tratamos de establecer unas condiciones de selección de viriones basados en su resistencia mecánica. Este tema está absolutamente inexplorado, y no está claro en absoluto qué tipo de condiciones favorecerán a los viriones que sean mecánicamente más rígidos o más flexibles. Para empezar, pensamos en seleccionar aquellos viriones que fueran más resistentes a la sonicación, como un ejemplo de selección mecánica (apartado 3.13). Para poner a punto el método se utilizó el virus no mutado. Quizá de modo sorprendente, encontramos que el propio virión no mutado posee una gran resistencia a la inactivación de su infectividad por el estrés mecánico ejercido mediante sonicación. Incluso en las condiciones más extremas de sonicación, la infectividad del virión se redujo únicamente en aproximadamente un orden de magnitud, que consideramos insuficiente para un método de selección rápida. Se están actualmente considerando otros métodos de selección basados en resistencia mecánica.

Por este motivo, decidimos continuar mediante la aplicación de un método de selección de viriones basado en su resistencia a estrés térmico. Creemos que si existe una correlación entre resistencia frente a la inactivación térmica de la infectividad y resistencia mecánica como sospechamos, este tipo de selección podría ponerla de manifiesto. Actualmente se están llevando a cabo estos experimentos.

Discusión



5. DISCUSIÓN

5.1. Determinación de la rigidez mecánica de partículas víricas mediante AFM

La determinación en este estudio de las propiedades mecánicas de partículas de MVM, en particular de su rigidez o flexibilidad, ha sido posible mediante la utilización del AFM y el establecimiento de condiciones adecuadas de medida. Las primeras determinaciones de la rigidez mecánica de un virus (el fago ϕ 29) se realizaron por el Dr. P. de Pablo y colaboradores hace sólo 7 años (Ivanovska *et al.*, 2004). Desde entonces, se han estudiado las propiedades mecánicas de un número muy limitado de virus (apartado 1.3.3), y puede decirse que hasta el momento no se había aportado evidencia experimental sustancial sobre una posible implicación biológica de la dureza o flexibilidad mecánica de una partícula vírica. Resulta pertinente, por tanto, discutir primero hasta qué punto las determinaciones realizadas en este trabajo con MVM y en otros trabajos paralelos con otros virus constituyen una medida válida de la rigidez/flexibilidad mecánica de un virus en condiciones fisiológicas.

Desde el punto de vista de la aproximación experimental, pueden comentarse varios puntos. En primer lugar, el modo de operación JM (Moreno-Herrero *et al.*, 2003; Schaap *et al.*, 2004) que hemos utilizado para la adquisición de imágenes y para la determinación de las propiedades elásticas de partículas víricas es uno de los métodos de elección cuando se trabaja con muestras biológicas (“blandas”). De este modo se evitan daños irreversibles en la muestra y otros efectos indeseados (apartado 1.3.1) (Baclayon *et al.*, 2010). Otros modos adecuados podrían incluir el denominado *Tapping Mode* (Ando *et al.*, 2003) o el modo de modulación en frecuencia (*Frequency Modulation*) (Martínez-Martín *et al.*, enviado a publicar). En segundo lugar, todos los estudios mecánicos con partículas víricas en este trabajo se han llevado a cabo en medio líquido (tampón PBS), manteniendo una temperatura constante (ambiente) y las condiciones de pH y fuerza iónica aproximadas a las fisiológicas (apartado 3.15.4). En tercer lugar, la resolución alcanzada ha permitido distinguir claramente en las imágenes de AFM las características topográficas que las partículas de MVM presentan en cada uno de sus ejes de simetría; la estrategia seguida permite asegurar en cada partícula individual analizada que la indentación se ha realizado en la región alrededor de una de las clases de ejes de simetría (S2, S3 o S5), algo que ha sido fundamental a la hora de obtener los resultados e interpretarlos en términos estructurales y biológicos. Un último punto experimental se refiere a la reproducibilidad de los resultados. En distintos trabajos de nuestro estudio conjunto (Carrasco *et al.*, 2006 y 2008) se obtuvieron de manera independiente valores promedio de la constante

elástica para los tres ejes de simetría en partículas no mutadas de MVM. Los promedios obtenidos en ambos trabajos mostraron un excelente acuerdo, siendo estadísticamente indistinguibles. Y ello a pesar de que las preparaciones de cápsidas y viriones MVM utilizadas fueron diferentes, siguiendo procedimientos de obtención y purificación no estrictamente idénticos. Esta excelente reproducibilidad se observó también en aquellos casos que presentan una distribución Gausiana más ancha, y por tanto válida de forma experimental cualquier diferencia estadísticamente significativa que pudiera obtenerse cuando se compara la dureza de diferentes partículas bajo las mismas condiciones experimentales (apartado 3.15.5).

Desde el punto de vista de análisis de los datos, pueden igualmente comentarse varios aspectos. El primero de ellos es el modelo de cáscara elástica delgada que se ha seguido (Landau y Lifshitz, 1986; apartado 1.3.1). Otros grupos que han estudiado con anterioridad la rigidez mecánica de diversas nanopartículas han visto que los resultados pueden explicarse bien mediante este modelo. En el caso de los nanotubos de carbono (Gómez-Navarro *et al.*, 2004) o de ensamblados biológicos, como por ejemplo los microtúbulos (de Pablo *et al.*, 2003; Hunyadi *et al.*, 2005; Schaap *et al.*, 2006), los experimentos de nanoindentación llevados a cabo en condiciones similares a las de nuestros ensayos, han confirmado y validado la condición de *cáscara delgada* para este y otros sistemas relacionados. En el caso de las partículas víricas, los resultados experimentales disponibles hasta el momento, tanto de otros grupos con otros virus, como los que nosotros hemos obtenido para MVM, se ajustan bien a este modelo (Ivanovska *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2006 y 2008; Ivanovska *et al.*, 2007; Roos *et al.*, 2007; Ahadi *et al.*, 2009). En cualquier caso, aunque ligeras diferencias entre el comportamiento ideal y real de las partículas víricas pudiera influir en alguna pequeña medida en los valores absolutos de la constante elástica, en este trabajo se comparan valores de constantes elásticas obtenidos en las mismas condiciones en todos los casos, por lo que las conclusiones, que dependen de las diferencias de constante elástica y no de sus valores absolutos, resultan plenamente válidas. Es preciso resaltar que la deformación de la partícula solo resulta lineal y reversible cuando las indentaciones no superan el grosor promedio de la pared de la misma, pero esto lo hemos tenido en cuenta a la hora de llevar a cabo las determinaciones, descartando aquellos casos en que la indentación era excesiva y podría provocar una deformación irreversible de la partícula, o incluso el colapso de la misma.

Otro aspecto del análisis de datos a comentar está relacionado con la rigidez de las micropalanca utilizadas. Debido a que la sensibilidad de las medidas mecánicas es menor cuando la micropalanca es apreciablemente más blanda que la muestra, los errores experimentales podrían tal vez reducirse utilizando micropalanca más duras. Por ello, para la segunda y tercera parte del estudio mecánico (poros y cavidades) utilizamos micropalanca de constante elástica nominal 0,1N/m, en lugar de las de

0,05N/m utilizadas en la primera parte del estudio (Carrasco *et al.*, 2006 y 2008). En cualquier caso, la reproducibilidad de las medidas y las diferencias significativas de rigidez encontradas para las diferentes partículas víricas analizadas en las tres partes del estudio demuestran que la rigidez de las micropalancas utilizadas es adecuada para estos estudios, y los resultados obtenidos absolutamente válidos. Palancas de mayor rigidez (0,3 e incluso 0,6 N/m) no pudieron utilizarse ya que provocan fácilmente un daño irreversible de las partículas y/o su desplazamiento lateral sobre la superficie (Carrasco, 2008).

Para confirmar si el número de partículas individuales y medidas realizadas para cada tipo de cápsida o virión y clase de eje de simetría era adecuado, en algunos casos se llevaron a cabo un número mucho mayor de indentaciones que el normalmente realizado, utilizando un gran número de cápsidas. A pesar del gran incremento de datos, no se encontraron diferencias apreciables en el valor promedio de k_s proporcionado por el ajuste Gausiano del histograma, o en la distribución de las mediadas individuales. Comprobamos además que el cálculo del valor promedio de k_s utilizando dos estrategias alternativas (apartado 3.15.5) rindió resultados muy similares en ambos casos, llegándose a las mismas conclusiones con cualquiera de los dos métodos de promediado.

En conclusión, en base al conocimiento existente y a los controles realizados, consideramos que la determinaciones realizadas en este trabajo con cápsidas y viriones de MVM constituyen una medida válida de su rigidez/flexibilidad mecánica de en condiciones semejantes a las fisiológicas, especialmente en términos comparativos entre los diferentes variantes analizados, o con otros tipos de partículas víricas.

5.2. Un modelo mecánico sobre la estabilidad y dinámica conformacionales en una partícula vírica

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo apoyan claramente nuestra hipótesis de que la rigidez y elasticidad mecánica de un virus pueden haber sido evolutivamente seleccionadas, y contribuyen de diferentes maneras a establecer y preservar el carácter infeccioso del virión.

Proponemos a continuación un modelo detallado que trata de relacionar las propiedades mecánicas de MVM, como ejemplo de virus estructuralmente sencillo, con algunos aspectos de la estabilidad y dinámica conformacionales de la partícula vírica necesarios para la multiplicación y propagación del virus. Este modelo está basado en el conocimiento que sobre la estructura y función de MVM y otros parvovirus obtuvieron previamente diversos grupos de investigación (de modo más directo los de los Profs. M. G. Rossmann, P. Tattersall, y J. M. Almendral), en resultados previos de nuestro grupo en colaboración con otros, y en los que nosotros hemos obtenido en

este trabajo, igualmente en colaboración, sobre las propiedades mecánicas de este virus.

Nuestro modelo mecánico contempla en esencia que cada región en la partícula vírica de MVM (y por extensión, quizá de otros parvovirus) ha adquirido durante la evolución el grado de rigidez o flexibilidad mecánica necesario para satisfacer un compromiso adecuado entre requisitos estructurales y funcionales aparentemente contradictorios. Por una parte, las interacciones entre el ADN genómico contenido en el interior del virión y regiones equivalentes en la pared interna de la cápsida rigidifican mecánicamente las regiones S2 y S3 de la partícula, dificultando un cambio conformacional no productivo, y haciendo al virión más resistente frente a la inactivación térmica de su infectividad en el medio extracelular. Por otra parte, la ausencia de segmentos de ADN unidos a las regiones S5 de la cápsida, y la presencia de residuos concretos en la base de los poros situados en dichas regiones, permiten que estas zonas posean la flexibilidad mecánica suficiente para permitir un cambio conformacional productivo en la cápsida. Este cambio conformacional es necesario para la infectividad del virión y está asociado a procesos de traslocación molecular a través de los poros (Figura 39).

En el apartado 5.3 desarrollamos y justificamos este modelo en cuanto a la influencia de las propiedades mecánicas del virión de MVM sobre el mantenimiento de la conformación infecciosa. En el apartado 5.4 desarrollamos y justificamos el modelo en lo que respecta a la influencia de las propiedades mecánicas de la cápsida de MVM sobre cambios conformacionales de la partícula vírica que son necesarios para el proceso de infección.

5.3. Rigidez mecánica de un virión y estabilidad conformacional. Papel del ácido nucleico

A priori, una posibilidad sencilla para explicar el refuerzo mecánico del virión de MVM mediado por el ADN, es que el ácido nucleico ejerciera cierta presión sobre las paredes internas de la cápsida. Es decir, la rigidificación del virión respecto a la cápsida vacía ocurriría de modo no muy diferente a cómo las moléculas de gas a presión contenido en el interior de un balón de fútbol rigidifican el balón hinchado respecto al balón deshinchado. En MVM la molécula hidratada de ADN de cadena sencilla está muy densamente empaquetada en su interior, alcanzando densidades cristalinas (Carrasco *et al.*, 2008). Es posible, además, que la carga negativa de algunos fosfatos no se encuentre neutralizada de forma natural en el virión, generando una repulsión electrostática en la compactada molécula de ADN, que tendería a expandirse. Finalmente, la presencia del ADN como soluto en el interior de la partícula podría generar una cierta presión osmótica debido a la entrada de agua en la partícula

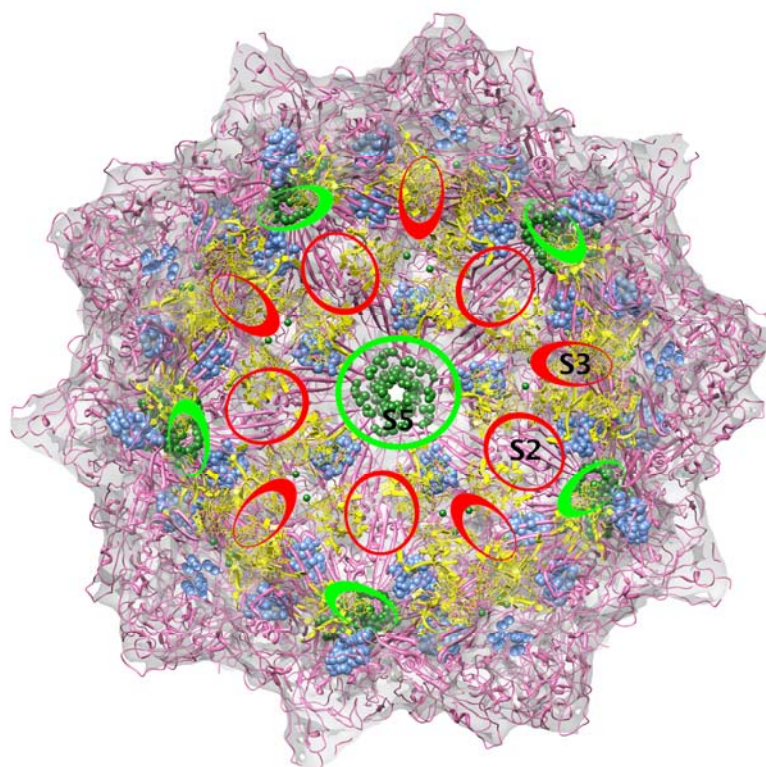


Figura 39. Modelo mecánico de MVM: implicaciones biológicas de las propiedades elásticas de una partícula vírica. Modelo combinado de superficie y cintas del virión de MVM, basado en su estructura cristalográfica (Kontou *et al.*, 2005). El método de representación superficial es igual que el utilizado la Figura 4, y se ha obtenido con la ayuda del Dr. M. Alcorlo. Los residuos que forman la base de los poros en los ejes S5 se representan en modelo de van der Waals y color verde. Los residuos que delimitan cavidades A en la cápsida se representan en modelo de van der Waals y color azul. Los segmentos de ADN unidos a regiones de la cápsida cercanas a los ejes S2 se representan en modelo de cintas y color amarillo. En el virión no mutado, cada círculo rojo indica una región mecánicamente más rígida, y cada círculo verde indica una región mecánicamente más flexible. Estos elementos estructurales y características mecánicas locales se relacionan en el modelo mecánico que se describe y discute en el texto (ver apartados 5.2, 5.3 y 5.4).

(Ivanovska *et al.*, 2007; Jeembaeva *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Evilevitch *et al.*, 2011). Todos estos fenómenos podrían, en principio, generar una presión interna en la partícula, pero aún no se ha establecido experimentalmente si esta presión existe o no en el virión de MVM. Sí se ha propuesto, y en algunos casos demostrado, la existencia de una elevada presión interna en bacteriófagos como $\phi 29$ (Smith *et al.*, 2001; Ivanovska *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2011), y λ (Ivanovska *et al.*, 2007), cuyo genoma es ADN cd. El ADN cd tiene una longitud de persistencia mucho mayor que un ADN cs como el de MVM, en parte debido a su estructura lineal relativamente rígida y

la ausencia de un plegamiento globular, y esta elevada resistencia al doblamiento constituye un factor adicional muy importante para explicar la presurización observada en bacteriófagos (Purohit *et al.*, 2005; Grayson *et al.*, 2006; Evilevitch *et al.*, 2008).

En el caso del fago $\phi 29$ los experimentos mecánicos de empaquetamiento del ADN cd seguido mediante pinzas ópticas (Smith *et al.*, 2001) indican que en el virión existe una presión interna de unos 6 Mpa (60 atm). Las determinaciones de propiedades mecánicas de fagos mediante AFM son consistentes con este dato. La utilización de policationes en experimentos de AFM indica que esta presión interna realmente puede contribuir a la rigidificación de la partícula vírica en algunos fagos. En presencia de policationes, las repulsiones remanentes entre fosfatos no neutralizados de otro modo en el ADN serían reducidas o eliminadas, causando posiblemente una disminución de la presión interna. Otra opción propuesta por otros autores es que la presencia de policationes unidos al ADN reconfiguren la disposición de las moléculas de agua entre las superficies macromoleculares, creándose nuevas fuerzas de hidratación atractivas de largo alcance (Rau y Parsegian, 1992). De acuerdo con estas posibilidades, recientemente se ha encontrado que la fuerza necesaria para la ruptura del fago λ maduro es menor en presencia de un polication (espermina) que en su ausencia, haciéndola semejante a la necesaria para romper la cápsida inmadura (Ivanosvka *et al.*, 2007). En el caso del fago $\Phi 29$, el grupo del Dr. P. J. de Pablo ha demostrado muy recientemente una reducción (en aproximadamente un 30%) del valor de la constante elástica para los viriones en presencia de espermidina. Esta disminución en el valor de k_s es reversible si se retira del medio la espermidina, y apoya la idea de que la molécula de ADN genómico ejerce una presión interna en el virión de este fago y participa en su reforzamiento mecánico (Hernando *et al.*, resultados enviados a publicar).

Por el contrario, en lo que respecta a MVM una primera evidencia experimental en contra de la posibilidad de que la rigidificación del virión mediada por ADN sea debida a presión interna es que el refuerzo mecánico observado es anisótropo. Podría contra-argumentarse que la cápsida podría ser más flexible en unas zonas que en otras, y que la rigidificación mediada por la presión ejercida por el ADN podría no ser apreciable en las regiones de la cápsida ya intrínsecamente más rígidas. Sin embargo, éste no parece ser un argumento válido para MVM, ya que nuestras determinaciones experimentales demuestran que la cápsida vacía de este virus es mecánicamente isotrópica; no hay unas regiones más rígidas que otras. No resulta fácil proponer un modelo sencillo que explique un incremento anisótropo de rigidez de una partícula vírica isotrópica mediante el establecimiento de una presión interna ejercida por la molécula de ADN contenida en su interior.

En cualquier caso, los datos experimentales obtenidos mediante AFM y descritos en el apartado 4.2 demuestran que el incremento de rigidez mecánica de la partícula

de MVM mediado por ADN se debe no a una posible presión interna, sino a los segmentos de la molécula de ADN que establecen de forma natural interacciones con regiones de la pared interna de la cápsida cercanas a los ejes S2 y no lejos de los ejes S3. Las mutaciones sencillas realizadas, que sólo eliminan algunas de las interacciones cápsida-ADN, fueron suficientes para reducir en gran medida el incremento de rigidez mecánica del virión respecto de la cápsida vacía. Sin embargo, los viriones mutantes, casi tan flexibles como la cápsida vacía, aún contienen el ADN completo, como el virión no mutado que es mucho más rígido, y por tanto deben mantener la misma presión interna que éste.

Las mutaciones analizadas eliminan sólo algunas de las interacciones cápsida-ADN, ya que implican únicamente a uno o dos de los 7 o más residuos aminoacídicos que se encuentran formando parte de cada interfase cápsida-ADN. Por tanto, aunque se eliminaron interacciones energéticamente importantes, no se esperaba anular completamente el efecto reforzante del ADN, de acuerdo con lo que realmente ocurrió. Además, la doble mutación no redujo el efecto rigidificante del ADN en mayor medida que las mutaciones sencillas. Esta observación es también fácilmente explicable, dado que los dos residuos mutados se encuentran muy cerca en la estructura de la cápsida, y por tanto no son de esperar efectos aditivos. No obstante, estas observaciones podrían también interpretarse proponiendo que la pequeña diferencia residual de rigidez entre el virión y la cápsida en los mutantes podría, ésta sí, ser debida a una presión interna ejercida por el ADN. Este argumento no parece ser válido. Por un lado, no hay diferencia significativa de rigidez entre el virión y la cápsida en S5, ni en los viriones mutantes ni en el no mutado. Por otra parte, en experimentos preliminares realizados por la autora de esta memoria con el virión doble mutante D58A/N183A, se encontró que la rigidez mecánica del virión es similar en ausencia o presencia del policatió espermidina (datos no mostrados), a diferencia de lo encontrado en fagos (ver antes). Por tanto, en el hipotético caso de que el ADN provoque cierta presión interna en el virión de MVM, ésta no parece contribuir ni siquiera en menor medida al incremento en la dureza mecánica de la partícula.

El razonamiento anterior no descarta que en el interior del virión de MVM pueda existir una cierta presión interna ejercida por el ADN. Para hacer compatible esa posibilidad con los datos experimentales disponibles, bastaría con proponer que la cápsida vacía de MVM es lo bastante rígida como para que la presión ejercida por el ADN sea insuficiente para incrementar de modo apreciable su rigidez; del mismo modo que las moléculas de gas a presión contenido en el interior de una olla *express* no aumentan la rigidez de ésta. En este sentido, es interesante destacar que la rigidez mecánica de la cápsida vacía de MVM, y aún más la del virión, es considerablemente superior a la de las cápsidas y viriones de otros virus analizados, incluyendo

bacteriófagos como $\Phi 29$ (Ivanovska *et al.*, 2004), el retrovirus de la leucemia murina (Kol *et al.*, 2006) y un virus de plantas, CCMV (Michel *et al.*, 2006).

En conclusión, la rigidificación anisotrópica del virión mediada por el ADN es debida a un efecto de refuerzo estructural local mediado por segmentos específicos de ADN. La observación cristalográfica revela que cada uno de estos segmentos se encuentra plegado en forma de una “cuña” que penetra en una concavidad de la pared de la cápsida, estableciendo múltiples interacciones con residuos de las 3 subunidades vecinas implicadas. Por tanto, estos segmentos de ADN parecen actuar como “contrafuertes” moleculares, que refuerzan mecánicamente las regiones de la cápsida situadas en su proximidad (ejes S2 y en menor medida S3), pero no disminuyen la flexibilidad mecánica de las regiones más alejadas (ejes S5). En los mutantes analizados, la ausencia de algunas de las interacciones presumiblemente más importantes entre la pared interna de la cápsida y estos segmentos de ADN provocaría que la unión fuera más laxa, permitiendo una mayor movilidad relativa de las “cuñas” de ADN y reduciendo su efecto de “contrafuerte” molecular.

Como se ha mencionado en la Introducción, previamente habíamos descubierto en nuestro laboratorio que las interacciones con el ADN, incluyendo D58 y N183, contribuyen a preservar la conformación infectiva del virión frente a la acción del calor, ya que la eliminación de parte de estas interacciones mediante mutación, incluyendo la de D58 o N183, reduce significativamente la resistencia del virión frente a la inactivación térmica (Reguera *et al.*, 2005). Por tanto, la rigidificación mecánica del virión mediada por el ácido nucleico se asocia con un incremento de resistencia frente a la inactivación térmica. Proponemos que este refuerzo mecánico y térmico sin pérdida de integridad de la partícula se debe a una misma causa estructural subyacente: la existencia de interacciones ADN-cápsida sería una estrategia evolutiva que elevaría la barrera energética entre la conformación infecciosa del virión y la(s) conformacion(es) no infecciosa(s) de la partícula vírica, ayudando a los viriones a mantener su infectividad en el medio extracelular hasta alcanzar otra célula hospedadora, y/o evitando reordenamientos conformacionales improductivos en alguna otra etapa del ciclo vírico.

Resultados recientes del grupo del Prof. Tattersall (Cotmore *et al.*, 2010) son asimismo consistentes con este modelo. Estos autores han encontrado que, en MVM, la depleción catiónica mediada por EDTA provoca un rearrreglo conformacional acusado de la partícula que conduce a la inactivación de su infectividad, como consecuencia de una desencapsidación precoz del ADN incluso a temperaturas fisiológicas. Dado que en la estructura cristalográfica del virión de MVM se han modelado 2 fosfatos quelados por Mg^{2+} en cada interfase cápsida-ADN (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998), es en principio posible que la depleción catiónica provoque, entre otros efectos, la reorganización de la conformación de estos segmentos del ADN, y la pérdida de

algunas interacciones con la cápsida, lo que podría explicar el cambio conformacional improductivo observado para el virión.

Una situación parecida a la que hemos encontrado para MVM podría ocurrir en BPMV, donde existen evidencias biofísicas que sugieren que la cápsida vacía de este virus posee un gran dinamismo estructural, al contrario de lo que le ocurre al virión, el cual contiene un ARN cs que establece interacciones con la pared interna de la cápsida. Se ha comprobado además que la presencia del ácido nucleico en BPMV estabiliza la cápsida frente a la desnaturalización térmica (Li *et al.*, 1992; Da Poian *et al.*, 2002).

Con posterioridad a nuestros resultados, otros autores han encontrado en algún virus no relacionado con MVM que la presencia de la molécula de ácido nucleico podría reforzar mecánicamente la partícula vírica. Por ejemplo, en HSV-1 (Liashkovich *et al.*, 2008). Sin embargo, la complejidad estructural y la existencia de conformaciones distintas de la cápsida cuando se comparan las partículas vacías y las llenas de ácido nucleico no ha permitido descartar que las modificaciones mecánicas observadas sean debidas, en parte o totalmente, no al ácido nucleico sino a otras diferencias estructurales entre ambos tipos de partículas.

Una observación experimental clave para nuestro modelo sobre la importancia biológica de las propiedades mecánicas de MVM es que las interacciones cápsida-ADN no incrementan la rigidez mecánica de la partícula alrededor de los ejes S5, donde se encuentran los poros. Si existe como proponemos una asociación entre la facilidad para que ocurra un cambio conformacional en la partícula vírica y la flexibilidad mecánica de ésta, resulta tentador sugerir la existencia de una presión selectiva sobre MVM que ha mantenido las regiones de la cápsida próximas a los poros libres de interacciones con el ADN. Esto permitiría que estas regiones sigan siendo en el virión (como lo son en la cápsida) lo suficientemente flexibles para permitir cambios conformacionales locales necesarios para los procesos de traslocación a través de los poros, y por tanto para la infectividad del virus.

En resumen, en MVM las interacciones cápsida-ADN podrían ayudar a mantener a la partícula vírica en una conformación relativamente estable, reflejada en una mayor resistencia frente a la inactivación térmica y una mayor rigidez mecánica en las regiones S2 y S3. Esta rigidificación mecánica anisótropa podría haber sido evolutivamente seleccionada para evitar cambios conformacionales improductivos durante el ciclo viral, pero manteniendo la flexibilidad de las regiones S5, necesaria para que se den otros cambios conformacionales, asociados a procesos de traslocación y necesarios para la infectividad del virión.

5.4. Flexibilidad mecánica de una cápsida vírica y dinámica conformacional. Papel de residuos alrededor de poros y cavidades y del segmento rico en glicinas

5.4.1. Flexibilidad mecánica en las regiones de la cápsida alrededor de cada poro. Papel de residuos en la base de los poros

De acuerdo con la hipótesis que proponemos, el virión de MVM necesita mantener una flexibilidad mecánica suficiente alrededor de los poros, para permitir cambios conformacionales de la cápsida necesarios para la infectividad. Si este modelo es correcto, la inhibición del cambio conformacional de la cápsida seguido por fluorescencia y asociado a externalización del Nt de VP2, y la pérdida de la infectividad del virión por mutaciones de residuos situados en la base de cada poro, se deberían a una rigidificación mecánica de las regiones S5 de la cápsida (alrededor de los poros). La hipótesis enunciada realiza, por tanto, una predicción clave que era comprobable experimentalmente: cada mutación en la base del poro que impide el cambio conformacional de la cápsida y la infectividad del virión deberá aumentar la constante elástica de las regiones S5 de la cápsida. Por el contrario, cada mutación en otras regiones de la cápsida que no impida el cambio conformacional y la pérdida de infectividad, no aumentará la constante elástica de las regiones S5. Los resultados experimentales obtenidos mediante AFM y descritos en los apartados 4.3. y 4.4 confirmaron esta predicción.

En total, se llegaron a analizar 12 mutaciones control, que no impedían el cambio conformacional ni influían sustancialmente en la infectividad. La gran mayoría de estas mutaciones se encuentran en regiones de la cápsida que serían particularmente sensibles desde el punto de vista mecánico: zonas de interacción cápsida-ADN, cavidades internas, y la misma pared de los poros en S5 (pero no en su base). El conjunto de estas mutaciones, tanto por su localización como por su número, resulta un exigente control: si la rigidez de las regiones S5 no está evolutivamente restringida de modo que permita el cambio conformacional y la infectividad, alguna al menos de estas 12 mutaciones control podría fortuitamente rigidificar las regiones S5. Es, por tanto, muy revelador que ni una sola de ellas modificara la rigidez de S5. En cambio, tal restricción no se tendría por qué dar sobre otras regiones de la cápsida, como S2 y S3, no relacionadas con este cambio conformacional asociado con los poros en S5; en efecto, varias de estas mutaciones control alteraron la rigidez de S2 y S3.

Además de las 12 mutaciones control, se analizaron mutaciones en *todos* los residuos de la base de los poros que impedían el cambio conformacional y la infectividad. Si el efecto biológicamente desfavorable de estas mutaciones no

estuviera relacionado con el incremento de la rigidez en las regiones S5 (que impediría el reordenamiento estructural asociado a infectividad), era de esperar que al menos alguna de estas mutaciones no rigidificara S5. Pues bien, absolutamente todas ellas produjeron la predicha rigidificación de S5, a diferencia de cualquiera de las mutaciones control.

La perfecta correlación experimental encontrada entre flexibilidad mecánica alrededor de los poros y cambio conformacional de la cápsida e infectividad del virión apoya fuertemente nuestro modelo mecánico del virión de MVM. En nuestro conocimiento, estos resultados aportan la primera evidencia experimental sustancial de una correlación existente entre las propiedades elásticas de la cápsida de un virus y su infectividad, y apoyan decididamente un papel biológico para el balance entre rigidez y flexibilidad mecánicas observado en este virus.

Las razones estructurales por las que las mutaciones de residuos en la base de los poros rigidifican mecánicamente la estructura de la cápsida alrededor de los mismos queda por investigar. Las mutaciones de estos residuos (V40, S43, N149, N170, L172 y D263) a alanina, implican en cada caso una reducción del volumen de la cadena lateral. Por tanto cada mutación, que implica a 5 residuos (uno por subunidad) por poro, puede en principio dejar 5 huecos alrededor de cada poro. Intuitivamente, es razonable imaginar que la presencia de estos huecos podría facilitar el movimiento relativo de residuos de la cápsida en la región y, por tanto, un reordenamiento en su conformación, que es lo contrario de lo que se observa. Sin embargo, también resulta razonable imaginar que este posible movimiento relativo de residuos alrededor del poro podría rellenar los huecos producidos por el truncamiento de las cadenas laterales y al mismo tiempo eliminar una barrera energética, llevando esta región de la cápsida a una conformación más compacta, estable y mecánicamente rígida, de acuerdo con los resultados obtenidos.

En el grupo de la Prof. Nuria Verdaguer en colaboración con nosotros va a intentar resolver la estructura tridimensional de una de estas cápsidas con mutaciones en la base de los poros y mecánicamente más rígidas, para tratar de aportar información estructural que ayude a entender la base molecular de la rigidificación y la pérdida del reordenamiento conformacional de la cápsida inducido por calor y asociado a la externalización del Nt de VP2.

5.4.2. Dinámica conformacional de las regiones de la cápsida alrededor de cada poro y papel del segmento rico en glicinas

Como ya se ha mencionado en la Introducción, el proceso de externalización del Nt de VP2 parece ocurrir a través de los poros de la cápsida situados en los ejes S5. Sin embargo, estos estudios no revelan otras características estructurales de los procesos

de dinámica conformacional asociados a éste y otros eventos de traslocación durante el ciclo biológico de MVM, incluyendo la salida de los extremos Nt de VP1 durante el proceso de entrada al núcleo celular, y los procesos de salida y entrada del ADN vírico en la partícula (ver apartado 1.5.2).

Puesto que los residuos situados en el Nt de VP2 (con la excepción de las glicinas) son demasiado voluminosos para pasar por un poro con el diámetro que presenta en la conformación “basal” estable del virión o de la cápsida vacía (la observada mediante cristalografía, Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Kontou *et al.*, 2005), se ha propuesto que el poro debe abrirse para permitir la salida de estos residuos (Cotmore y Tattersall, 2005). Los datos que obtuvimos mediante fluorescencia de triptófanos indican que esta apertura del poro parece ocurrir mediante un reordenamiento de una región amplia alrededor del poro, propagándose hasta alcanzar al menos algunos de los triptófanos de la cápsida, a una distancia considerable de los poros. De acuerdo a los resultados del análisis termodinámico realizado mediante calorimetría diferencial de barrido, el reordenamiento conformacional puede ser estructural y energéticamente sutil, y llegaría muy atenuado a los triptófanos, de modo consistente con el débil cambio de exposición al solvente que éstos experimentan (Carreira *et al.*, 2004).

Cabe preguntarse si, una vez externalizado el Nt de VP2, la partícula mantiene la nueva conformación y el poro abierto (estado “excitado”). El proceso de externalización del Nt de VP2, al menos en las condiciones experimentales utilizadas, no es reversible (Maroto *et al.*, 2004). Sin embargo, el reordenamiento conformacional de la cápsida seguido mediante fluorescencia de triptófanos sí que es reversible, siempre que el aporte de calor se limite a la temperatura (45-50°C) y tiempo (unos minutos) mínimos para producir la transición, y se enfríe el sistema inmediatamente después. Por tanto, parece razonable asumir que, una vez externalizado el Nt, este queda en el exterior pero el poro se cierra, devolviendo la región de la cápsida alrededor del mismo a la conformación que tenía originalmente (estado “basal”).

Los resultados de una parte del presente estudio, realizada en colaboración con el Prof. Almendral y su grupo, han demostrado que al menos las glicinas G31 y G33 dentro del segmento rico en este aminoácido en el Nt de las proteínas de la cápsida son necesarias para la normal infectividad de MVM. También han revelado que se requiere un residuo muy pequeño (glicina o alanina) en estas posiciones para que el Nt se externalice normalmente. Al menos en el caso de la posición 33, el residuo debe ser específicamente glicina, porque incluso la presencia de alanina en esta posición dificultaría en alguna medida la externalización del Nt y la salida del núcleo y/o el procesamiento proteolítico posterior del Nt de VP2 durante las etapas tempranas de la infección de una nueva célula; este procesamiento es necesario para la salida del Nt de VP1 y la entrada del virión en el núcleo celular (Maroto *et al.*, 2004, y referencias

incluidas en este trabajo). La sustitución de estas glicinas por residuos más voluminosos como valina, leucina o fenilalanina dificulta la salida del Nt de VP2, en mayor medida cuanto más voluminoso es el residuo introducido, como se desprende de los resultados que obtuvimos mediante IF. Estas mutaciones dificultan asimismo el cambio conformacional de la cápsida asociado a la apertura del poro (pero no el retorno a la conformación basal al cerrarse el poro, una vez externalizado el Nt). Este hecho hace necesario un mayor aporte energético para que este cambio conformacional tenga lugar (más calor en los experimentos *in vitro*), como se desprende de los resultados termodinámicos y cinéticos mediante fluorescencia de triptófanos con el mutante G33F.

Las observaciones experimentales que se acaban de resumir apoyan el siguiente modelo hipotético: la presencia del segmento de glicinas en el Nt permitiría el cierre del poro una vez externalizado el Nt de VP2 anterior al tracto de glicinas. El estrangulamiento del canal dificultaría el replegamiento del Nt externalizado hacia dentro de la cápsida, aumentando el tiempo de residencia del Nt en el exterior de la partícula, y favoreciendo el reconocimiento de la señal de exportación nuclear. En este escenario, la presencia de residuos voluminosos en lugar de glicinas en las posiciones 31 y 33 dificultaría el estrechamiento del poro alrededor de la secuencia rica en glicinas, facilitando un estado más dinámico en el que los segmentos Nt podrían fácilmente externalizarse, pero también internalizarse de nuevo, deslizándose de dentro a fuera y de fuera a dentro, disminuyendo el tiempo de residencia del Nt en el exterior, y dificultando la salida del virión fuera del núcleo celular.

El análisis mecánico que hemos realizado indica que este probable proceso dinámico de apertura y cierre del poro en cada eje S5, facilitado por la reorganización estructural reversible de una región relativamente amplia alrededor del poro, requiere una suficiente flexibilidad (elasticidad) mecánica en esta región de la cápsida. Esta elasticidad mecánica local, un proceso igualmente reversible, se ha observado experimentalmente y ha sido discutida en el apartado anterior. Las mutaciones de los residuos situados en la base del poro actuarían reduciendo esta elasticidad local, ralentizando la apertura y/o el cierre de los poros de la cápsida, dificultando (aunque no llegaran a impedir, como parece ser el caso) la salida de los extremos Nt, disminuyendo el tiempo de residencia de los segmentos Nt en el exterior del virión y reduciendo, por tanto, la infectividad del virus.

Finalmente, es preciso considerar que, como ya se ha mencionado, la externalización del Nt de VP2 no es el único proceso de traslocación observado en viriones de MVM durante el ciclo biológico. Es posible que, además de los efectos descritos, algunas de las mutaciones en la base de los poros o en los segmentos ricos en glicina que hemos analizado produzcan efectos adicionales sobre algunos de estos otros procesos de traslocación: la externalización del Nt de VP1, la desencapsidación

del ADN vírico o la internalización del mismo en la cápsida ensamblada. La evidencia disponible, sin embargo, no permite establecer conclusiones en este sentido.

5.4.3. Flexibilidad mecánica en otras regiones de la cápsida alejadas de los poros. Consecuencias de la presencia de cavidades

Según nuestra hipótesis mecánica, basada en los resultados discutidos en los apartados anteriores, existe en MVM una presión selectiva para mantener suficientemente flexibles las regiones S5 alrededor de los poros, pero no otras regiones de la cápsida. El mantenimiento de esta flexibilidad local se habría conseguido en la naturaleza mediante la selección de los residuos adecuados en la base de los poros. Además, siempre según nuestra hipótesis, existe una presión selectiva para hacer más rígidas otras partes del virión, de modo que se dificulten cambios conformacionales improductivos; esta rigidificación anisótropa se habría conseguido en la naturaleza mediante el establecimiento de interacciones cápsida-ADN cerca de las regiones S2 y S3, pero no de S5, donde la rigidificación es biológicamente contraproducente.

Parecería pues que en MVM la fórmula mecánica para un balance biológicamente adecuado entre dinamismo conformacional para permitir la infección y estabilidad conformacional para evitar la inactivación, consiste en mantener una cierta flexibilidad de la partícula en S5 y aumentar la rigidez en S2 y S3. Sin embargo, algunos resultados indican que la fórmula puede ser algo más compleja: la mayoría de las mutaciones de residuos de la cápsida que analizamos mediante AFM, independientemente de su localización o de que tengan o no efecto sobre cambios conformacionales de la cápsida o sobre la infectividad del virión, produjeron una rigidificación de las regiones de la cápsida alrededor de los ejes S2 y S3. En particular, todas las mutaciones analizadas que modifican el tamaño y forma de la cavidad A (incluso las mutaciones “de vaciado”), aumentan la rigidez mecánica de la cápsida en estas regiones.

Es importante enfatizar que la rigidificación mecánica de las regiones S2 y S3, a diferencia de la rigidificación de las regiones S5 alrededor de los poros, no correlacionó en modo alguno con la pérdida del cambio conformacional asociado a traslocación por los poros ni con la pérdida de infectividad del virión. Por tanto, no contradice en absoluto, sino que refuerza, la hipótesis mecánica que hemos formulado, como hemos discutido en el apartado 5.4.2. Pero, independientemente de este hecho, los resultados del análisis mecánico también sugieren que la cápsida vacía de MVM se encuentra intrínsecamente cerca de un mínimo de rigidez mecánica global, al que contribuye de forma destacable (pero no exclusiva), la presencia de cavidades conservadas en la cápsida de parvovirus. La razón biológica para este mínimo de

rigidez mecánica y la presencia de cavidades, si es que existe, queda por establecer. No obstante, se apuntan a continuación algunas posibilidades.

Existen evidencias de que estas cavidades participan de algún modo en el ciclo viral (Carreira y Mateu, 2006): *i)* las cavidades se encuentran evolutivamente conservadas en parvovirus relacionados con MVM, y el grado de conservación de los residuos que las flanquean y que, por tanto, definen su forma y tamaño, es elevado; *ii)* mutaciones químicamente conservadoras que alteran de modo muy apreciable el tamaño (y forma) de la cavidad impiden el ensamblaje de la cápsida; *iii)* alguna de las mutaciones químicamente conservadoras que alteran en una medida menor el tamaño de la cavidad modifican apreciablemente la T_m del reordenamiento conformacional de la cápsida asociado a traslocación del Nt de VP2; y *iv)* algunas de estas mutaciones que alteran en menor medida el tamaño de la cavidad reducen la infectividad del virión en diferente grado.

A pesar de estas observaciones, no hemos encontrado una correlación entre las pérdidas de infectividad, las variaciones de T_m del reordenamiento conformacional, y los incrementos de rigidez mecánica de la cápsida que estos cambios de tamaño y forma de la cavidad ocasionan. Es importante resaltar que esta rigidificación intrínseca de la cápsida vacía en S2 y S3 se produce incluso por mutaciones que no tienen efecto sustancial sobre la producción de partículas víricas o sobre la resistencia del virión a la inactivación térmica de su infectividad. Sin embargo, ello no descarta un posible papel biológico. Por ejemplo, estas mutaciones podrían afectar a la eficacia biológica del virus, o a alguna propiedad o aspecto del proceso de infección relevante en el animal, pero no en las condiciones *ex vivo* o *in vitro* utilizadas en nuestros experimentos.

Una cuestión interesante es por qué la rigidificación del virión en S2 y S3 mediada por el ADN conlleva un incremento en su resistencia frente a la inactivación térmica, mientras que mutaciones en la cápsida que rigidifican S2 y S3 en la cápsida vacía, cuando se introducen en el virión, no aumentan su resistencia a la inactivación térmica. Quizá la interpretación más sencilla de este hecho es que los efectos de estas mutaciones y de las interacciones cápsida-ADN no sean aditivos. Las mismas mutaciones que incrementan la rigidez de la cápsida vacía en S2 y S3 podrían no incrementar la rigidez del virión en estas regiones, que ya se han hecho más rígidas debido a las interacciones establecidas con el ADN. Este punto va a ser analizado experimentalmente. Alternativamente, es posible que el proceso de rigidificación tenga un carácter vectorial. El efecto biológico producido podría depender de la dirección en la que predominantemente se produjera el refuerzo (o debilitamiento) mecánico. El reforzamiento mecánico de S2 y S3 ocasionado por mutaciones en la cápsida podría no impedir un reordenamiento local improductivo, que sí impediría el establecimiento de interacciones entre la cápsida y el ADN. El posible carácter vectorial del refuerzo mecánico es un aspecto más difícil de estudiar experimentalmente, pero puede ser

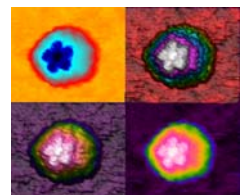
atacable mediante estudios teóricos simplificados de las propiedades mecánicas de partículas víricas.

5.5. Manipulación mediante ingeniería de proteínas de propiedades físicas de cápsidas víricas

La aún escasa evidencia disponible, en parte obtenida en este estudio, sugiere que una partícula viral mecánicamente más robusta podría mostrar una mayor resistencia no sólo al estrés mecánico, sino a otros agentes fisicoquímicos que actuarían venciendo la barrera energética que lleva a las partículas a conformaciones inadecuadas para el uso deseado, o incluso a su disociación en subunidades. Por tanto, desde un punto de vista de la nanobiotecnología, resulta interesante adquirir la capacidad de manipular las propiedades mecánicas de partículas víricas (Mateu, 2011).

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo no sólo apoyan claramente nuestra hipótesis sobre un papel biológico de las propiedades mecánicas en partículas víricas, sino que además demuestran que es posible manipular de modo racional las propiedades mecánicas de estas partículas. Por una parte, la eliminación de interacciones cápsida-ácido nucleico permitió obtener viriones mecánicamente más elásticos. Por otra parte, la mutación de residuos en la base de los poros permitió obtener cápsidas mecánicamente más rígidas. Finalmente, la mutación de residuos que rodean cavidades en la cápsida permitió también obtener cápsidas más rígidas. En la mayor parte de los casos fuimos capaces de predecir cualitativamente el efecto mecánico que luego encontramos experimentalmente. No obstante, en el caso de las mutaciones que alteran el tamaño de la cavidad, esperábamos que las de *rellenado* aumentaran la rigidez mecánica y las de *vaciado* disminuyeran esa rigidez, cuando lo que observamos en realidad es que todas ellas aumentan la rigidez de la cápsida. Nos encontramos aún lejos de poder controlar de manera enteramente racional las propiedades mecánicas de los virus. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido junto a nuestros colaboradores constituyen la primera indicación de que empezamos a entender las relaciones entre estabilidad/dinámica conformacional y rigidez/flexibilidad mecánica en una partícula vírica.

Conclusiones



6. CONCLUSIONES

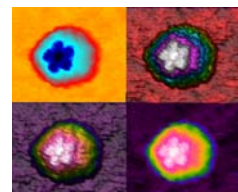
1. Residuos conservados de glicina, localizados en una región muy enriquecida en este aminoácido en el segmento Nt de las proteínas de la cápsida de MVM, son necesarios para la infectividad del virión, en buena parte porque residuos más voluminosos en estas posiciones impiden la correcta externalización del Nt de VP2.
2. Las interacciones no covalentes entre la molécula de ADN vírico en el interior del virión de MVM y regiones equivalentes en la pared interna de la cápsida causan un incremento anisótropo en la rigidez mecánica de la partícula vírica alrededor de las regiones S2 y S3, donde ocurren estas interacciones, pero no en las regiones S5, donde se localizan los poros.
3. Este incremento anisótropo en la rigidez mecánica del virión está asociado con un incremento en su resistencia frente a la inactivación térmica de su infectividad, y es compatible con la existencia de un cambio conformacional de la cápsida asociado con la traslocación del Nt de VP2 y requerido para la infectividad del virión.
4. Los residuos situados en la base de los poros de la cápsida de MVM contribuyen a preservar una elevada flexibilidad mecánica en las regiones S5 alrededor de los poros. El análisis mutacional utilizando un número muy considerable de cápsidas mutantes reveló una correlación perfecta entre una elevada flexibilidad mecánica de las regiones S5, la ocurrencia del cambio conformacional de la cápsida asociado con la traslocación del Nt de VP2 a través de los poros, y la infectividad del virión.
5. Estos resultados apoyan fuertemente un modelo mecánico de MVM. Por una parte, las interacciones entre el ADN y la cápsida incrementan la rigidez de las regiones S2 y S3, impidiendo posiblemente un cambio conformacional no productivo e incrementando la resistencia del virión frente a su inactivación. Por otra parte, la ausencia de segmentos de ADN unidos cerca de las regiones S5, y los residuos localizados en la base de los poros, mantienen estas regiones lo suficientemente flexibles mecánicamente como para permitir un cambio conformacional productivo que es necesario para procesos de traslocación a través de los poros y para la infectividad del virión.

6. La cápsida de MVM parece encontrarse en un mínimo de rigidez mecánica. Cada una de las mutaciones analizadas que alteran el tamaño y forma de la cavidad A producen un incremento en la rigidez mecánica en las regiones S2 y S3.

7. Las propiedades mecánicas de un complejo supramolecular, como lo es una partícula vírica, pueden ser racionalmente manipuladas mediante ingeniería de proteínas. En la partícula de MVM, la eliminación de interacciones cápsida-ácido nucleico permiten hacer a la partícula mecánicamente más flexible; la alteración de la estructura que rodea regiones huecas de la cápsida (poros y cavidades) permiten hacer a la partícula mecánicamente más rígida.

8. Como conclusión general, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de una implicación biológica de la rigidez y la flexibilidad mecánicas de una partícula vírica, y sugieren aproximaciones racionales para la manipulación de propiedades mecánicas de partículas víricas con fines nanobiotecnológicos.

Bibliografía



7. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. y Brown, F. (1989) The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, **337**, 709-716.
- Agbandje-McKenna, M. y Chapman, M.S. (2006) Correlating structure with function in the viral capsid. En *Parvoviruses*, (J.R. Kerr, S.F. Cotmore, M.E. Bloom, R.M. Linden, C.R Parrish eds). pp. 107-123. Arnold, New York.
- Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P. y Rossmann, M.G. (1998) Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure*, **6**, 1369-1381.
- Agbandje, M., Kajigaya, S., McKenna, R., Young, N.S. y Rossmann, M.G. (1994) The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology*, **203**, 106-115.
- Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M.G., Strassheim, M.L. y Parrish, C.R. (1993) Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins*, **16**, 155-171.
- Agirrezabala, X., Martin-Benito, J., Caston, J. R., Miranda, R., Valpuesta, J. M. y Carrascosa, J. L. (2005) Maturation of phage T7 involves structural modification of both shell and inner core components. *EMBO J.*, **4**, 3820-3829.
- Ahadi, A., Colomo, J. y Evilevitch, A. (2009) Three-dimensional simulation of nanoindentation response of viral capsids. Shape and size effects. *J. Phys. Chem. B.*, **113**, 3370-3378.
- Allison, D.P., Hinterdorfer, P. y Han, W. (2002) Biomolecular force measurements and the atomic force microscope. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 47-51.
- Almendral, J.M. (2006). Parvoviridae. En: *Virus Patógenos*, (L. Carrasco y J.M. Almendral eds.). pp. 165-184. Hélice, Madrid.
- Ando, T., Kodera, N., Naito, Y., Kinoshita, T., Furuta, K. y Toyoshima, Y.Y. (2003) A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *Chemphyschem.*, **4**, 1196-1202.
- Arkhipov, A., Roos, W.H., Wuite, G.J. y Schulten, K. (2009) Elucidating the mechanism behind irreversible deformation of viral capsids. *Biophys. J.*, **97**, 2061-2069.
- Ashkin, A. y Dziedzic, J.M. (1987) Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, **235**, 1517-1520.
- Astell, C.R., Gardiner, E.M. y Tattersall, P. (1986) DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.*, **57**, 656-669.
- Atreya, C.D. y Siegel, A. (1989) Localization of multiple TMV encapsidation initiation sites on rbcl gene transcripts. *Virology*, **168**, 388-392.

- Axblom, C., Tars, K., Fridborg, K., Orna, L., Bundule, M. y Liljas, L. (1998) Structure of phage fr capsids with a deletion in the FG loop: implications for viral assembly. *Virology*, **249**, 80-88.
- Baclayon, M., Roos, W.H. y Wuite, G.J. (2010) Sampling protein form and function with the atomic force microscope. *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 1678-1688.
- Baker, T.S., Newcomb, W.W., Booy, F.P., Brown, J.C. y Steven, A.C. (1990) Three-dimensional structures of maturable and abortive capsids of equine herpesvirus 1 from cryoelectron microscopy. *J. Virol.*, **64**, 563-573.
- Barrantes, A., Sotres, J., Hernando-Perez, M., Benitez, M.J., de Pablo, P.J., Baro, A.M., Avila, J. y Jimenez, J.S. (2009) Tau aggregation followed by atomic force microscopy and surface plasmon resonance, and single molecule tau-tau interaction probed by atomic force spectroscopy. *J. Alzheimers. Dis.*, **18**, 141-151.
- Belnap, D.M., Filman, D.J., Trus, B.L., Cheng, N., Booy, F.P., Conway, J.F., Curry, S., Hiremath, C.N., Tsang, S.K., Steven, A.S. y Hogle, J.M. (2000) Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J. Virol.*, **74**, 1342-1354.
- Bernal, R.A., Hafenstein, S., Olson, N.H., Bowman, V.D., Chipman, P.R., Baker, T.S., Fane, B.A. y Rossmann, M.G. (2003) Structural studies of bacteriophage alpha3 assembly. *J. Mol. Biol.*, **325**, 11-24.
- Binning, G., Quate, C.F., y Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930-933.
- Bischof, J.C. y He, X. (2005) Thermal stability of proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1066**, 12-33.
- Bleker, S., Pawlita, M. y Kleinschmidt, J.A. (2006) Impact of capsid conformation and Rep-capsid interactions on adeno-associated virus type 2 genome packaging. *J. Virol.*, **80**, 810-820.
- Bleker, S., Sonntag, F. y Kleinschmidt, J.A. (2005) Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J. Virol.*, **79**, 2528-2540.
- Boissy, R. y Astell, C.R. (1985) An Escherichia coli recBCsbcBrecF host permits the deletion-resistant propagation of plasmid clones containing the 5'-terminal palindrome of minute virus of mice. *Gene*, **35**, 179-185.
- Bolshakova, A.V., Kiselyova, O.I. y Yaminsky, I.V. (2004) Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy. *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1615-1622.
- Bonnard, G.D., Manders, E.K., Campbell, D.A.Jr., Herberman, R.B. y Collins, M.J.Jr. (1976) Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma.

- Evidence for minute virus of mice causing the inhibition. *J. Exp. Med.*, **143**, 187-205.
- Bothner, B., Dong, X.F., Bibbs, L., Johnson, J.E. y Siuzdak, G. (1998) Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **273**, 673-676.
- Bustamante, C. y Keller, D. (1995) Scanning force microscopy in biology. *Physics Today*, **48**, 32-38.
- Cappella, B. y Dietler, G. (1999) Force-distance curve by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Reports*, **34**, 1-104.
- Carrasco, C. (2008) Caracterización estructural y mecánica de nanosistemas biológicos mediante microscopía de fuerzas atómicas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Carrasco, C., Carreira, A., Schaap, I.A., Serena, P.A., Gomez-Herrero, J., Mateu, M.G. y de Pablo, P.J. (2006) DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **103**, 13706-13711.
- Carrasco, C., Castellanos, M., de Pablo, P.J. y Mateu, M.G. (2008) Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **105**, 4150-4155.
- Carrasco, C., Douas, M., Miranda, R., Castellanos, M., Serena, P.A., Carrascosa, J.L., Mateu, M.G., Marqués, M.I. y de Pablo, P.J. (2009) The capillarity of nanometric water menisci confined inside closed-geometry viral cages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**, 5475-5480.
- Carrasco, C., Luque, A., Hernando-Perez, M., Miranda, R., Carrascosa, J.L., Serena, P.A., de Ridder, M., Raman, A., Gomez-Herrero, J., Schaap, I.A., Reguera, D. y de Pablo, P.J. (2011) Built-in mechanical stress in viral shells. *Biophys. J.*, **100**, 1100-1108.
- Carrascosa, A.L. (1994) Enhancement of baculovirus plaque assay in insect cell monolayers by DEAE-dextran. *Biotechniques*, **16**, 1078-1081, 1083-1075.
- Carrascosa, A.L., Sastre, I. y Viñuela, E. (1995) Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12. *J. Biotechnol.*, **40**, 73-86.
- Carreira, A. y Mateu, M.G. (2006) Structural tolerance versus functional intolerance to mutation of hydrophobic core residues surrounding cavities in a parvovirus capsid. *J. Mol. Biol.*, **360**, 1081-1093.
- Carreira, A., Menendez, M., Reguera, J., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. (2004) In vitro disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6517-6525.

- Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Fisher, T.E., Marszalek, P.E., Li, H. y Fernandez, J. (2000) Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **74**, 63-91.
- Casjens, S. (1997) Principles of virus structure, function and assembly. En *Structural Biology of Viruses*, (Chiu, W., Burnett, R. M., y Garcea, R.L. eds.). pp. 3-37. Oxford University Press, Oxford.
- Caspar, D.L. y Klug, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1-24.
- Caspar, D. L. y Namba, K. (1990) Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus. *Adv. Biophys.*, **26**, 157-185.
- Chan, M.W., Hinz, B. y McCulloch, C.A. (2010) Mechanical induction of gene expression in connective tissue cells. *Methods. Cell. Biol.*, **98**, 178-205.
- Chang, J. T., Schmid, M. F., Haase-Pettingell, C., Weigele, P. R., King, J. A. y Chiu, W. (2010) Visualizing the structural changes of bacteriophage Epsilon15 and its Salmonella host during infection. *J. Mol. Biol.*, **402**, 731-740.
- Chapman, M.S. y Liljas, L. (2003) Structural folds of viral proteins. *Adv. Protein. Chem.*, **64**, 125-196.
- Chapman, M.S. y Rossmann, M.G. (1993) Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology*, **194**, 491-508.
- Chapman, M.S. y Rossmann, M.G. (1995) Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus. *Structure*, **3**, 151-162.
- Chen, D.H., Baker, M.L., Hryc, C.F., DiMaio, F., Jakana, J., Wu, W., Dougherty, M., Haase-Pettingell, C., Schmid, M.F., Jiang, W., Baker, D., King, J.A. y Chiu, W. (2011) Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **108**, 1355-1360.
- Chen, C., Daniel, M.C., Quinkert, Z.T., De, M., Stein, B., Bowman, V.D., Chipman, P.R., Rotello, V.M., Kao, C.C. y Dragnea, B. (2006) Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. *Nano. Lett.*, **6**, 611-615.
- Chen, Z.G., Stauffacher, C., Li, Y., Schmidt, T., Bomu, W., Kamer, G., Shanks, M., Lomonosoff, G. y Johnson, J.E. (1989) Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science*, **245**, 154-159.
- Chipman, P.R., Agbandje-McKenna, M., Kajigaya, S., Brown, K.E., Young, N.S., Baker, T.S. y Rossmann, M.G. (1996) Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **93**, 7502-7506.
- Chiu, W., Burnett, R.M. y Garcea, R.L. (1997) *Structural Biology of Viruses*, (Chiu, W., Garcea, R. y Burnette, R., eds.). pp. 157-186. Oxford University Press, Oxford.

- Chow, M., Yabrov, R., Bittle, J., Hogle, J. y Baltimore, D. (1985) Synthetic peptides from four separate regions of the poliovirus type 1 capsid protein VP1 induce neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **82**, 910-914.
- Chow, M., Basavappa, R. y Hogles, J.M. (1997) The role of conformational transitions in poliovirus pathogenesis. In *Structural Biology of Viruses* (W. Chiu, R. Garcea y R. Burnette, eds.). pp. 157-186. Oxford University Press, Oxford.
- Christensen, J. y Tattersall, P. (2002) Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *J. Virol.*, **76**, 6518-6531.
- Chua, P.K., Tang, F.M., Huang, J.Y., Suen, C.S. y Shih, C. (2010) Testing the balanced electrostatic interaction hypothesis of hepatitis B virus DNA synthesis by using an in vivo charge rebalance approach. *J. Virol.*, **84**, 2340-2351.
- Cingolani, G., Moore, S.D., Prevelige, P.E.Jr. y Johnson, J.E. (2002) Preliminary crystallographic analysis of the bacteriophage P22 portal protein. *J. Struct. Biol.*, **139**, 46-54.
- Clare, D.K., Stagg, S., Quispe, J., Farr, G.W., Horwich, A.L. y Saibil, H.R. (2008) Multiple states of a nucleotide-bound group 2 chaperonin. *Structure*, **16**, 528-534.
- Cordova, A., Deserno, M., Gelbart, W.M. y Ben-Shaul, A. (2003) Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophys. J.*, **85**, 70-74.
- Cotmore, S.F., D'Abramo A.M.Jr., Ticknor, C.M. y Tattersall, P. (1999) Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology*, **254**, 169-181.
- Cotmore, S.F., Hafenstein, S. y Tattersall, P. (2010) Depletion of virion-associated divalent cations induces parvovirus minute virus of mice to eject its genome in a 3'-to-5' direction from an otherwise intact viral particle. *J. Virol.*, **84**, 1945-1956.
- Cotmore, S.F. y Tattersall, P. (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus. Res.*, **33**, 91-174.
- Cotmore, S.F. y Tattersall, P. (2005) Encapsidation of minute virus of mice DNA: aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes. *Virology*, **336**, 100-112.
- Cotmore, S.F. y Tattersall, P. (2007) Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv. Virus. Res.*, **70**, 183-232.
- Coutard, B. y Canard, B. (2010) The VIZIER project: overview, expectations, and achievements. *Antiviral. Res.*, **87**, 85-94.
- Cuellar, J.L., Meinhoevel, F., Hoehne, M. y Donath, E. (2010) Size and mechanical stability of norovirus capsids depend on pH: a nanoindentation study. *J. Gen.Virol.*, **91**, 2449-2456.

- Cunningham, B.C. y Wells, J.A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, **244**, 1081-1085.
- Crawford, L.V. (1966) A minute virus of mice. *Virology*, **29**, 605-612.
- Da Poian, A.T., Johnson, J.E. y Silva, J.L. (2002) Protein-RNA interactions and virus stability as probed by the dynamics of tryptophan side chains. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47596-47602.
- Datta, S.A., Curtis, J.E., Ratcliff, W., Clark, P.K., Crist, R.M., Lebowitz, J., Krueger, S. y Rein, A. (2007). Conformation of the HIV-1 Gag protein in solution. *J. Mol. Biol.*, **365**, 812-824.
- De Pablo, P.J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. y Baró, A.M. (1998) Jumping mode scanning force microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, **73**, 3300-3302.
- De Pablo, P.J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baró, A.M., Schaefer, D.M., Howell, S. Walsh, B. y Reifengerger, R. (1999) Adhesion maps using scanning force microscopy techniques. *J. Adhesion*, **71**, 339-356.
- De Pablo, P.J., Schaap, I.A., MacKintosh, F.C. y Schmidt, C.F. (2003) Deformation and collapse of microtubules on the nanometer scale. *Phys. Rev. Lett.*, **91**, 098101.
- De Sena, J. y Mandel., B. (1977) Studies on the in vitro uncoating of poliovirus. II. Characteristics of the membrane-modified particle. *Virology*, **78**, 554-566.
- De Sousa, P.C.Jr., Tuma, R., Prevelige, P.E.Jr., Silva, J.L. y Foguel, D. (1999) Cavity defects in the procapsid of bacteriophage P22 and the mechanism of capsid maturation. *J. Mol. Biol.*, **287**, 527-538.
- Del Álamo, M. y Mateu, M.G. (2005) Electrostatic repulsion, compensatory mutations, and long-range non-additive effects at the dimerization interface of the HIV capsid protein. *J. Mol. Biol.*, **354**, 893-906.
- Del Álamo, M., Neira, J.L y Mateu, M.G. (2003) Thermodynamic dissection of a low affinity protein-protein interface involved in human immunodeficiency virus assembly. *J. Biol. Chem.*, **278**, 27923-2799.
- Del Sol, R., Armstrong, I., Wright, C. y Dyson, P. (2007) Characterization of changes to the cell surface during the life cycle of *Streptomyces coelicolor*: atomic force microscopy of living cells. *J. Bacteriol.*, **189**, 2219-2225.
- DeLano. (2002) The Pymol Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA.
- Douglas, T. y Young, M. (2006) Viruses: making friends with old foes. *Science*, **312**, 873-875.
- Doyle, A., Morris, C.B. y Armitage, W.J. (1988) Cryopreservation of animal cells. *Adv. Biotechnol. Processes*, **7**, 1-17.
- Dufrêne, Y.F. y Hinterdorfer, P. (2008) Recent progress in AFM molecular recognition studies. *Pflugers Arch.*, **456**, 237-245.

- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y. y Liang, J. (2006) CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic. Acids. Res.*, **34**, 116-118.
- Engel, A. y Muller, D.J. (2000) Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 715-718.
- Engers, H.D., Louis, J.A., Zubler, R.H. y Hirt, B. (1981) Inhibition of T cell-mediated functions by MVM(i), a parvovirus closely related to minute virus of mice. *J. Immunol.*, **127**, 2280-2285.
- Evilevitch, A., Fang, L.T., Yoffe, A.M., Castelnovo, M., Rau, D.C., Parsegian, V.A., Gelbart, W.M. y Knobler, C.M. (2008) Effects of salt concentrations and bending energy on the extent of ejection of phage genomes. *Biophys. J.*, **94**, 1110-1120.
- Evilevitch, A., Lavelle, L., Knobler, C.M., Raspaud, E. y Gelbart, W.M. (2003) Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 9292-9295.
- Evilevitch, A., Roos, W.H., Ivanovska, I.L., Jeembaeva, M., Jönsson, B. y Wuite, G.J.L. (2011) Effects of salts on internal DNA pressure and mechanical properties of phage capsids. *J. Mol. Biol.*, **405**, 18-23.
- Falconi, M., Santolamazza, A., Eliseo, T., de Prat-Gay, G., Cicero, D.O. y Desideri, A. (2007) Molecular dynamics of the DNA-binding domain of the papillomavirus E2 transcriptional regulator uncover differential properties for DNA target accommodation. *FEBS J.*, **274**, 2385-2395.
- Farr, G.A., Cotmore, S.F. y Tattersall, P. (2006) VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice. *J. Virol.*, **80**, 161-171.
- Farr, G.A. y Tattersall, P. (2004) A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection. *Virology*, **323**, 243-256.
- Filman, D.J., Syed, R., Chow, M., Macadam, A.J., Minor, P.D. y Hogle, J.M. (1989) Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.*, **8**, 1567-1579.
- Fischlechner, M. y Donath, E. (2007) Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 3184-3193.
- Fisher, T.E., Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F. , Li, H., Marszalek, P.E. y Fernandez, J. (2000b) Single molecule force spectroscopy of modular proteins in the nervous system. *Neuron*, **27**, 435-446.
- Fisher, A.J. y Johnson, J.E. (1993) Ordered duplex RNA controls capsid architecture in an icosahedral animal virus. *Nature*, **361**, 176-179.

- Fisher, T.E., Marszalek, P.E. y Fernandez, J. M. (2000a) Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 719-724.
- Flenniken, M.L., Uchida, M., Liepold, L.O., Kang, S., Young, M.J. y Douglas, T. (2009) A library of protein cage architectures as nanomaterials. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **327**, 71-93.
- Fletcher, D.A. y Mullins, R.D. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, **463**, 485-492.
- Foguel, D., Teschke, C.M., Prevelige, P.E.Jr. y Silva, J.L. (1995) Role of entropic interactions in viral capsids: single amino acid substitutions in P22 bacteriophage coat protein resulting in loss of capsid stability. *Biochemistry*, **34**, 1120-1126.
- Frederix, P.L., Akiyama, T., Staufer, U., Gerber, C., Fotiadis, D., Muller, D.J. y Engel, A. (2003) Atomic force bio-analytics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 641-647.
- Frederix, P.L., Bosshart, P.D. y Engel, A. (2009) Atomic force microscopy of biological membranes. *Biophys. J.*, **96**, 329-338.
- Fricks, C.E. y Hogle, J.M. (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.*, **64**, 1934-1945.
- Frolov, V.A. y Zimmerberg, J. (2010) Cooperative elastic stresses, the hydrophobic effect, and lipid tilt in membrane remodeling. *FEBS Lett.*, **584**, 1824-1829.
- Fu, C.Y., Morais, M.C., Battisti, A.J., Rossmann, M.G. y Prevelige, P.E.Jr. (2007) Molecular dissection of Φ 29 scaffolding protein function in an in vitro assembly system. *J. Mol. Biol.*, **366**, 1161-1173.
- Fuller, D.N., Raymer, D.M., Rickgauer, J.P., Robertson, R.M., Catalano, C.E., Anderson, D.L., Grimes, S. y Smith, D.E. (2007) Measurements of single DNA molecule packaging dynamics in bacteriophage lambda reveal high forces, high motor processivity, and capsid transformations. *J. Mol. Biol.*, **373**, 1113-1122.
- Fung, C., Xi, N., Yang, R., Seiffert-Sinha, K., Lai, K. y Sinha, A. (2011) Quantitative Analysis of Human Keratinocyte Cell Elasticity Using Atomic Force Microscopy (AFM). *IEEE Trans. Nanobioscience*, PMID: 21349797.
- Galli, C., Passeri, G. y Macaluso, G.M. (2010) Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J. Dent. Res.*, **89**, 331-343.
- García-Manyes, S. y Sanz, F. (2010) Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: a perspective. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1798**, 741-9.
- Gardiner, E.M. y Tattersall, P. (1988) Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.*, **62**, 2605-2613.

- Gjorevski, N. y Nelson, C.M. (2010) The mechanics of development: models and methods for tissue morphogenesis. *Birth. Defects. Res. C. Embryo. Today.*, **90**, 193-202.
- Gómez-Navarro, C., de Pablo, P.J., y Gómez-Herrero, J. (2004) Radial electromechanical properties of carbon nanotubes. *Adv. Mater.*, **16**, 6.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V. y Wolf, Y.I. (1990) A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett.*, **262**, 145-148.
- Gosset, W.S (1908) The probable error of a mean. *Biometrika*, **6**, 1-25
- Gosse, C. y Croquette, V. (2002) Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.*, **82**, 3314-3329.
- Grayson, P., Evilevitch, A., Inamdar, M.M., Purohit, P.K., Gelbart, W.M., Knobler, C.M. y Phillips, R. (2006) The effect of genome length on ejection forces in bacteriophage lambda. *Virology*, **348**, 430-436.
- Greenleaf, W.J., Woodside, M.T. y Block, S.M. (2007) High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **36**, 171-190.
- Grieger, J.C., Johnson, J.S., Gurda-Whitaker, B., Agbandje-McKenna, M. y Samulski, R.J. (2007) Surface-exposed adeno-associated virus Vp1-NLS capsid fusion protein rescues infectivity of noninfectious wild-type Vp2/Vp3 and Vp3-only capsids but not that of fivefold pore mutant virions. *J. Virol.*, **81**, 7833-7843.
- Grueso, E. (2006) Modificaciones en dominios funcionales de la cápsida del parvovirus MVM con péptidos heterólogos: efectos en oncotropismo y ciclo viral. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Gu, X. y Schroeder, S.J. (2011) Different sequences show similar quaternary interaction stabilities in prohead viral RNA self-assembly. *J. Biol. Chem.*, PMID: 21349846.
- Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Rüth, F.X., Valpuesta, J.M., Sousa, N., Carrascosa, J.L. y Coll, M. (2002) Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. *J. Mol. Biol.*, **315**, 663-676.
- Häberle, W., Hörber, J.K., Ohnesorge, F., Smith, D.P. y Binning, G. (1992) In situ investigations of single living cells infected by viruses. *Ultramicroscopy*, **42-44**, 1161-1167.
- Hagan, M.F. (2009) A theory for viral capsid assembly around electrostatic cores. *J. Chem. Phys.*, **130**, 114902.
- Harrison, S.C., Sorger, P.K., Stockley, P.G., Hogle, J., Altman, R. y Strong, R.K. (1987) Mechanism of RNA virus assembly and disassembly. En *Positive strand RNA viruses*, (Brinton M.A. y Rueckert R.R., eds.). pp. 379-395. N.Y: Alan R. Liss, Inc., New York.

- Harvey, S.C., Petrov, A.S., Devkota, B. y Boz, M.B. (2009) Viral assembly: a molecular modeling perspective. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**, 10553-10564.
- Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L. y Shenk, T. (1987) Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J. Virol.*, **61**, 2555-2558.
- Hernando, E., Llamas-Saiz, A.L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J.M. (2000) Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles. *Virology*, **267**, 299-309.
- Hewat, E.A., Booth, T.F., Loudon, P.T. y Roy, P. (1992) Three-dimensional reconstruction of baculovirus expressed bluetongue virus core-like particles by cryo-electron microscopy. *Virology*, **189**, 10-20.
- Hickman, A.B., Ronning, D.R., Perez, Z.N., Kotin, R.M. y Dyda, F. (2004) The nuclease domain of adeno-associated virus rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces. *Mol. Cell*, **13**, 403-414.
- Hildebrand, P.W., Gunther, S., Goede, A., Forrest, L., Frommel, C. y Preissner, R. (2008) Hydrogen-bonding and packing features of membrane proteins: functional implications. *Biophys. J.*, **94**, 1945-1953.
- Hinterdorfer P, Dufrêne, Y.F. (2006) Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat. Methods*, **3**, 347-355.
- Höber, J.K.H. y Miles, M.J. (2003) Scanning probe evolution in biology. *Science*, **302**, 1002-1005.
- Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M. y Bustamante, C. (2009) Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science*, **325**, 626-628.
- Hogle, J.M., Chow, M. y Filman, D.J. (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, **229**, 1358-1365.
- Hogle, J.M. (2002) Poliovirus Cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**, 677-702.
- Holmes, K.C. (1979) Protein-RNA interactions during TMV assembly. *J. Supramol. Struct.*, **12**, 305-320.
- Horcas, I., Fernandez, R., Gomez-Rodriguez, J.M., Colchero, J., Gomez-Herrero, J. y Baro, A.M. (2007) WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.*, **78**, 013705.
- Huang, R.K., Khayat, R., Lee, W.W., Gertsman, I., Duda, R.L., Hendrix, R.W. y Johnson, J.E. (2011) The prohead-I structure of bacteriophage HK97: implications for scaffolding-mediated control of particle assembly and maturation. *J. Mol. Biol.* PMID: 21276801.
- Hugel, T., Michaelis, J., Hetherington, C.L., Jardine, P.J., Grimes, S., Walter, J.M., Falk, W., Anderson, D.L. y Bustamante, C. (2007) Experimental test of connector

- rotation during DNA packaging into bacteriophage phi29 capsids. *PLoS Biol.*, **5**, e59.
- Hunyadi, V., Chretien, D. y Janosi, I.M. (2005) Mechanical stress induced mechanism of microtubule catastrophes. *J. Mol. Biol.*, **348**, 927-938.
- Ibarra, B., Castón, J.R., Llorca, O., Valle, M., Valpuesta, J.M. y Carrascosa, J.L. (2000) Topology of the components of the DNA packaging machinery in the phage phi29 prohead. *J. Mol. Biol.*, **298**, 807-815.
- Ikai, A., Afrin, R., Sekiguchi, H., Okajima, T., Alam, M.T. y Nishida, S. (2003) Nano-mechanical methods in biochemistry using atomic force microscopy. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **4**, 181-193.
- Ivanovska, I., Wuite, G., Jonsson, B. y Evilevitch, A. (2007) Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **104**, 9603-9608.
- Ivanovska, I.L., de Pablo, P.J., Ibarra, B., Sgalari, G., MacKintosh, F.C., Carrascosa, J.L., Schmidt, C.F. y Wuite, G.J. (2004) Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 7600-7605.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V. y Aravind, L. (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* **146**, 11-31.
- James, J.A., Escalante, C.R., Yoon-Robarts, M., Edwards, T.A., Linden, R.M. y Aggarwal, A.K. (2003) Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure*, **11**, 1025-1035.
- Janshoff, A., Neitzert, M., Obersörfer, Y. y Funchs, H. (2000) Force spectroscopy of molecular system-single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3212-3237.
- Jeembaeva, M., Castelnovo, M., Larsson, F. y Evilevitch, A. (2008) Osmotic pressure: resisting or promoting DNA ejection from phage? *J. Mol. Biol.*, **381**, 310-323.
- Jerpseth, B., Callahan, M. y Greener, A. (1997). New competent cells for highest transformation efficiencies. *Strategies*, **10**: 37-38.
- Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M.L., Prevelige, P.E.Jr y Chiu, W. (2003) Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 131-135.
- Johnson, J.E. (2003) Virus particle dynamics. *Adv. Protein. Chem.*, **64**, 197-218.
- Johnson, J.E. (2008) Multidisciplinary studies of viruses: the role of structure in shaping the questions and answers. *J. Struct. Biol.*, **163**, 246-253.
- Johnson, J.E. (2010) Virus particle maturation: insights into elegantly programmed nanomachines. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **20**, 210-216.
- Johnson, J.E. y Speir, J.A. (1999) Principles of Virus Structure. En *Encyclopedia of Virology*, (Granoff, A. y Webster, R., eds.). pp.1946-1956. Academic Press, London.

- Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, P.K., Miklossy, J. y Hansma, H. (1997) Biological applications of the AFM: from single molecules to organs. *Int. J. Imaging Syst. Technol.*, **8**, 151-161.
- Kaufmann, B., Simpson, A.A. y Rossmann, M.G. (2004) The structure of human parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 11628-11633.
- Kieft, J.S. (2009) Comparing the three-dimensional structures of Dicroviridae IGR IRES RNAs with other viral RNA structures. *Virus Res.*, **139**, 148-156.
- Kindt, J., Tzliil, S., Ben-Shaul, A. y Gelbart, W.M. (2001) DNA packaging and ejection forces in bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **98**, 13671-13674.
- King, J. y Casjens, S. (1974) Catalytic head assembling protein in virus morphogenesis. *Nature*, **251**, 112-119.
- King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D. y Kleinschmidt, J.A. (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.*, **20**, 3282-3291.
- Kirmizis, D. y Logothetidis, S. (2010) Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int. J. Nanomedicine*, **5**, 137-145.
- Kistler, J., Aebi, U., Onorato, L., ten Heggeler, B. y Showe, M.K. (1978) Structural changes during the transformation of bacteriophage T4 polyheads: characterization of the initial and final states by freeze-drying and shadowing Fab-fragment-labelled preparations. *J. Mol. Biol.*, **126**, 571-589.
- Kivenson, A. y Hagan, M.F. (2010) Mechanisms of capsid assembly around a polymer. *Biophys. J.*, **99**, 619-628.
- Kol, N., Gladnikoff, M., Barlam, D., Shneck, R.Z., Rein, A. y Rousso, I. (2006) Mechanical properties of murine leukemia virus particles: effect of maturation. *Biophys. J.*, **91**, 767-774.
- Kol, N., Shi, Y., Tsvitov, M., Barlam, D., Shneck, R.Z., Kay, M.S. y Rousso, I. (2007) A stiffness switch in human immunodeficiency virus. *Biophys. J.*, **92**, 1777-1783.
- Koning, R., van den Wor, S., Plaisier, J.R., van Duin, J., Pieter Abrahams, J. y Koerten, H. (2003) Visualization by cryo-electron microscopy of genomic RNA that binds to the protein capsid inside bacteriophage MS2. *J. Mol. Biol.*, **332**, 415-422.
- Kontou, M., Govindasamy, L., Nam, H.J., Bryant, N., Llamas-Saiz, A.L., Foces-Foces, C., Hernando, E., Rubio, M.P., McKenna, R., Almendral, J.M. y Agbandje-McKenna, M. (2005) Structural determinants of tissue tropism and in vivo pathogenicity for the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.*, **79**, 10931-10943.
- Koonin, E.V. y Ilyina, T.V. (1993) Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems*, **30**, 241-268.
- Kosukegawa, A., Arisaka, F., Takayama, M., Yajima, H., Kaidow, A. y Handa, H. (1996) Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced

- by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1290**, 37-45.
- Kozloff, L. M., Lute, M., Crosby, L. K., Wong, R. y Stern, B. (1969) Critical arginine residue for maintaining the bacteriophage tail structure. *J. Virol.*, **3**, 217-227.
- Krishna, N.K. y Schneemann, A. (1999) Formation of an RNA heterodimer upon heating of nodavirus particles. *J. Virol.*, **73**, 1699-1703.
- Kistler, J., Aebi, U., Onorato, L., ten Heggeler, B. y Showe, M.K. (1978) Structural changes during the transformation of bacteriophage T4 polyheads: characterization of the initial and final states by freeze-drying and shadowing Fab-fragment-labelled preparations. *J. Mol. Biol.*, **126**, 571-590.
- Kuznetsov, Y.G., Victoria, J.G., Robinson, W.E.Jr, y McPherson, A. (2003) Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes. *J. Virol.*, **77**, 11896-11909.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landau, L.D. y Lifshitz, E.M. (1986) Theory of elasticity. Vol. 7 of Course of Theoretical Physics, 3rd ed. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Lander, G.C., Evilevitch, A., Jeembaeva, M., Potter, C.S., Carragher, B. y Johnson, J.E. (2008) Bacteriophage lambda stabilization by auxiliary protein gpD: timing, location, an mechanism of attachment determined by Cryo-EM. *Structure*, **16** 1399-1406.
- Larson, S. B., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A., Dodds, J. A. y McPherson, A. (1993a) Three-dimensional structure of satellite tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **231**, 375-391.
- Larson, S.B., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A., Dodds, J.A. y McPherson, A. (1993b) Double-helical RNA in satellite tobacco mosaic virus. *Nature*, **361**, 179-182.
- Larson, S.B., Lucas, R.W., Greenwood, A. y McPherson, A. (2005) The RNA of turnip yellow mosaic virus exhibits icosahedral order. *Virology*, **334**, 245-254.
- Larson, S.B. y McPherson, A. (2001) Satellite tobacco mosaic virus RNA: structure and implications for assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 59-65.
- Laskowski, R.A. (1995) SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. *J. Mol. Graph.*, **13**, 323-330, 307-328.
- Lau, F.T. y Fersht, A.R. (1989) Dissection of the effector-binding site and complementation studies of Escherichia coli phosphofructokinase using site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **28**, 6841-6847.
- Leiman, P.G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F. y Rossmann, M.G. (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **60**, 2356-2370.

- Lewis, J.K., Bothner, B., Smith, T.J. y Siuzdak, G. (1998) Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **95**, 6774-6778.
- Li, T., Chen, Z., Johnson, J.E. y Thomas, G.J.Jr. (1992) Conformations, interactions, and thermostabilities of RNA and proteins in bean pod mottle virus: investigation of solution and crystal structures by laser Raman spectroscopy. *Biochemistry*, **31**, 6673-6682.
- Li, Z., Wu, J. y Wang, Z.G. (2008) Osmotic pressure and packaging structure of caged DNA. *Biophys. J.*, **94**, 737-746.
- Li, Q., Yafal., A.G., Lee, Y.M., Hogle, J. y Chow, M. (1994) Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. *J. Virol.*, **68**, 3965-3970.
- Liang, J., Edelsbrunner, H. y Woodward, C. (1998) Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Sci.*, **7**, 1884-1897.
- Liashkovich, I., Hafezi, W., Kühn, J.E., Oberleithner, H., Kramer, A. y Shahin, V. (2008) Exceptional mechanical and structural stability of HSV-1 unveiled with fluid atomic force microscopy. *J. Cell. Sci.*, **121**, 2287-2292.
- Liepold, L.O., Jennifer, R., Allen, M., Oltrogge, L., Young, M. y Douglas, T. (2005) Structural transitions in Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV). *Phys. Biol.*, **2**, S166-S172.
- Limn, C.K., Staeuber, N., Monastyrskaya, K., Gouet, P. y Roy, P. (2000) Functional dissection of the major structural protein of bluetongue virus: identification of key residues within VP7 essential for capsid assembly. *J. Virol.*, **74**, 8658-8669.
- Linke, W.A. y Grutzner, A. (2008) Pulling single molecules of titin by AFM--recent advances and physiological implications. *Pflugers. Arch.*, **456**, 101-115.
- Linser, P.J., Trapido-Rosenthal, H.G. y Orona, E. (1997) Glutamine synthetase is a glial-specific marker in the olfactory regions of the lobster (*Panulirus argus*) nervous system. *Glia*, **20**, 275-283.
- Liu, Y., Wang, C., Mueller, S., Paul, A. V., Wimmer, E. y Jiang, P. (2010a) Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog.*, **6**, e1001066.
- Liu, X., Zhang, Q., Murata, K., Baker, M. L., Sullivan, M. B., Fu, C., Dougherty, M. T., Schmid, M. F., Osburne, M. S., Chisholm, S. W. y Chiu, W. (2010b) Structural changes in a marine podovirus associated with release of its genome into *Prochlorococcus*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 830-836.
- Lombardi, M.L. y Lammerding, J. (2010) Altered mechanical properties of the nucleus in disease. *Methods. Cell. Biol.*, **98**, 121-141.

- Lombardo, E., Ramirez, J.C., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J.M. (2000) A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J. Virol.*, **74**, 3804-3814.
- Lombardo, E., Ramirez, J.C., Garcia, J. y Almendral, J.M. (2002) Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J. Virol.*, **76**, 7049-7059.
- López-Bueno, A. (2002) Cambios de aminoácidos en la superficie de la cápsida del parvovirus MVM determinan la adaptación, el tropismo y el escape a anticuerpos neutralizantes, en un hospedador inmunodeficiente. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- López-Bueno, A., Mateu, M.G. y Almendral, J.M. (2003) High mutant frequency in populations of a DNA virus allows evasion from antibody therapy in an immunodeficient host. *J. Virol.*, **77**, 2701-2708.
- López-Bueno, A., Rubio, M.P., Bryant, N., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J.M. (2006) Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J. Virol.*, **80**, 1563-1573.
- Lucas, W. y Knipe, D.M. (2002) Viral Capsids and Envelopes: Structure and Function. En *Enciclopedia of life sciences*. pp. 1-7. Nature, London.
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F. y Olins, P.O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.*, **67**, 4566-4579.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R. y Chiu, W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.*, **128**, 82-97.
- Llamas-Saiz, A.L., Agbandje-McKenna, M., Wikoff, W.R., Bratton, J., Tattersall, P. y Rossmann, M.G. (1997) Structure determination of minute virus of mice. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **53**, 93-102.
- Manchester, M. y Steinmetz, N.F. (2009) Viruses and nanotechnology. Preface. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **327**, v-vi.
- Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J.M., Kempf, C. y Ros, C. (2006) Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J. Virol.*, **80**, 1015-1024.
- Maroto, B., Ramirez, J.C. y Almendral, J.M. (2000) Phosphorylation status of the parvovirus minute virus of mice particle: mapping and biological relevance of the major phosphorylation sites. *J. Virol.*, **74**, 10892-10902.

- Maroto, B., Valle, N., Saffrich, R. y Almendral, J.M. (2004) Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface. *J. Virol.*, **78**, 10685-10694.
- Mateo, R., Diaz, A., Baranowski, E. y Mateu, M.G. (2003) Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in a foot-and-mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function. *J. Biol. Chem.*, **278**, 41019-41027.
- Mateo, R., Luna, E., Rincon, V. y Mateu, M.G. (2008) Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines. *J. Virol.*, **82**, 12232-12240.
- Mateu, M.G. (1995) Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.*, **38**, 1-24.
- Mateu, M. G. (2011) Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 53-63.
- McGhee, J. D. y von Hippel, P. H. (1974) Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.*, **86**, 469-489.
- McKenna, R., Xia, D., Willingmann, P., Ilag, L.L., Krishnaswamy, S., Rossmann, M.G., Olson, N.H., Baker, T.S. y Incardona, N.L. (1992) Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage phi X174 and its functional implications. *Nature*, **355**, 137-143.
- Merchinsky, M.J., Tattersall, P.J., Leary, J.J., Cotmore, S.F., Gardiner, E.M. y Ward, D.C. (1983) Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.*, **47**, 227-232.
- Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G. y Granzow, H. (2006) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**, 423-429.
- Meyer, G. y Amer, N.M. (1988) Novel approach to atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, **53**, 1045-1047.
- Michel, J.P., Ivanovska, I.L., Gibbons, M.M., Klug, W.S., Knobler, C.M., Wuite, G.J. y Schmidt, C.F. (2006) Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **103**, 6184-6189.
- Mogilner, A. y Craig, E. (2010) Towards a quantitative understanding of mitotic spindle assembly and mechanics. *J. Cell. Sci.*, **123**, 3435-3445.
- Moody, M.F. (1999) Geometry of phage head construction. *J. Mol. Biol.*, **293**, 401-433.
- Moreno-Herrero, F. (2003) Aplicaciones de la microscopía de fuerzas al estudio de sistemas de moléculas biológicas individuales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

- Moreno-Herrero, F., Colchero, J. y Baro, A.M. (2003) DNA height in scanning force microscopy. *Ultramicroscopy*, **96**, 167-174.
- Moreno-Herrero, F., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. y Baró, A.M. (2004) Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids. *Phys. Rev. E*, **69**, 031915-031919.
- Morini, G., Bassoli, A. y Temussi, P.A. (2005) From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *J. Med. Chem.*, **48**, 5520-5529.
- Mouw, M. y Pintel, D.J. (1998) Amino acids 16-275 of minute virus of mice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)₂₋₃-containing DNA. *Virology*, **251**, 123-131.
- Müller, D.J., Engel, A., Carrascosa, J.L. y Vélez, M. (1997) The bacteriophage phi29 head-tail connector imaged at high resolution with the atomic force microscope in buffer solution. *EMBO J.*, **16**, 2547-2553.
- Natarajan, P., Lander, G.C., Shepherd, C.M., Reddy, V.S., Brooks, C.L., 3rd y Johnson, J.E. (2005) Exploring icosahedral virus structures with VIPER. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 809-817.
- Nelson, C. D., Minkinen, E., Bergkvist, M., Hoelzer, K., Fisher, M., Bothner, B. y Parrish, C. R. (2008) Detecting small changes and additional peptides in the canine parvovirus capsid structure. *J. Virol.*, **82**, 10397-10407.
- Nemecek, D., Lander, G.C., Johnson, J.E., Casjens, S.R. y Thomas, G.J.Jr. (2008) Assembly architecture and DNA binding of the bacteriophage P22 terminase small subunit. *J. Mol. Biol.*, **383**, 494-501.
- Neuman, K.C. y Nagy, A. (2008) Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods*, **5**, 491-505.
- Nuesch, J.P., Cotmore, S.F. y Tattersall, P. (1995) Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology*, **209**, 122-135.
- Odegard, A., Banerjee, M. y Johnson, J. E. (2010) Flock house virus: a model system for understanding non-enveloped virus entry and membrane penetration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **343**, 1-22.
- Oelz, D., Schmeiser, C. y Small, J.V. (2008) Modeling of the actin-cytoskeleton in symmetric lamellipodial fragments. *Cell. Adh. Migr.*, **2**, 117-126.
- Owen, K.E. y Kuhn, R.J. (1996) Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. *J. Virol.*, **70**, 2757-2763.
- Paradiso, P.R. (1981) Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *J. Virol.*, **39**, 800-807.

- Parrish, C.R. (2010) Structures and functions of parvovirus capsids and the process of cell infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **343**, 149-176.
- Peterman, E.J.G., Sosa, H. y Moerner, W.E. (2004) Single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy of molecular motors. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **55**, 79-96.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. y Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612.
- Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J. y Damborsky, J. (2006) CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics*, **7**, 316.
- Plevka, P., Hafenstein, S., Li, L., D'Abramo, A.Jr., Cotmore, S.F., Rossmann, M.G. y Tattersall, P. (2011) Structure of a packaging defective mutant of Minute Virus of Mice indicates that the genome is packaged via a pore at a fivefold axis. *J. Virol.*, PMID: 21367911.
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K. y Yeager, M. (2011) Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature*, **469**, 424-427.
- Prevelige, P.E.Jr., Thomas, D., Aubrey, K.L., Towse, S.A. y Thomas, G.J.Jr. (1993) Subunit conformational changes accompanying bacteriophage P22 capsid maturation. *Biochemistry*, **32**, 537-543.
- Prigent, M., Leroy, M., Confalonieri, F., Dutertre, M. y DuBow, M.S. (2005) A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. *Extremophiles*, **9**, 289-296.
- Priyadarshini, P. C. y Savithri, H. S. (2009) Kinetics of interaction of Cotton Leaf Curl Kokhran Virus-Dabawali (CLCuKV-Dab) coat protein and its mutants with ssDNA. *Virology*, **386**, 427-437.
- Purohit, P.K., Inamdar, M.M., Grayson, P.D., Squires, T.M., Kondev, J. y Phillips, R. (2005) Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. *Biophys. J.*, **88**, 851-866.
- Purohit, P.K., Kondev, J. y Phillips, R. (2003) Mechanics of DNA packaging in viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 3173-3178.
- Racaniello, V.R. (2001) Picornaviridae: The Viruses and their Replication. En *Virology*, (S.B. Fields, D. M. Kniple, P. M. Howley eds.). pp. 685-723. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia.
- Ramirez, J.C., Fairen, A. y Almendral, J.M. (1996) Parvovirus minute virus of mice strain i multiplication and pathogenesis in the newborn mouse brain are restricted to proliferative areas and to migratory cerebellar young neurons. *J. Virol.*, **70**, 8109-8116.

- Ramirez, J.C., Santarén, J.F. y Almendral, J.M. (1995) Transcriptional inhibition of the parvovirus minute virus of mice by constitutive expression of an antisense RNA targeted against the NS-1 transactivator protein. *Virology*, **206**, 57-68.
- Rau, D.C. y Parsegian, V.A. (1992) Direct measurement of the intermolecular forces between counterion-condensed DNA double helices. Evidence for long range attractive hydration forces. *Biophys. J.*, **61**, 246-259.
- Ray, K., Oram, M., Ma, J. y Black, L.W. (2009) Portal control of viral prohead expansion and DNA packaging. *Virology*, **391**, 44-50.
- Reguera, J. (2004) Análisis estructura-función de interfases proteína-proteína y ácido nucleico-proteína en un virus esférico, el virus diminuto del ratón. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Reguera, J., Carreira, A., Riobos, L., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. (2004) Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 2724-2729.
- Reguera, J., Grueso, E., Carreira, A., Sanchez-Martinez, C., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. (2005) Functional relevance of amino acid residues involved in interactions with ordered nucleic acid in a spherical virus. *J. Biol. Chem.*, **280**, 17969-17977.
- Richards, R., Linser, P. y Armentrout, R.W. (1977) Kinetics of assembly of a parvovirus, minute virus of mice, in synchronized rat brain cells. *J. Virol.*, **22**, 778-793.
- Riobos, L., Reguera, J., Mateu, M.G. y Almendral, J.M. (2006) Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J. Mol. Biol.*, **357**, 1026-1038.
- Robert, P., Benoliel, A.M., Pierres, A. y Bongrand, P. (2007) What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies? *J. Mol. Recognit.*, **20**, 432-447.
- Robinson, I.K. y Harrison, S.C. (1982) Structure of the expanded state of tomato bushy stunt virus. *Nature*, **297**, 563-568.
- Roche, S. y Gaudin, Y. (2002) Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology*, **297**, 128-135.
- Roivainen, M., Närvänen, A., Korkkolainen, M., Huhtala, M.L. y Hovit, T. (1991) Antigenic regions of poliovirus type 3/Sabin capsid proteins recognized by human sera in the peptide scanning technique. *Virology*, **180**, 99-107.
- Roivainen, M., Piirainen, L., Rysä, T., Närvänen, A., y Hovit, T. (1993) An immunodominant N-terminal region of VP1 protein of poliovirion that is buried in crystal structure can be exposed in solution. *Virology*, **195**, 762-765.
- Roos, W.H., Gibbons, M.M., Arkhipov, A., Uetrecht, C., Watts, N.R., Wingfield, P.T., Steven, A.C., Heck, A.J.R., Schulten, K., Klug, W.S. y Wuite G.J.L. (2010). Squeezing Protein Shells: How Continuum Elastic Models, Molecular Dynamics

- Simulations, and Experiments Coalesce at the Nanoscale. *Biophys. J.*, **99**, 1175-1181.
- Roos, W.H., Ivanovska, I.L., Evilevitch, A. y Wuite, G.J.L. (2007) Viral capsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1484 - 1497.
- Roos, W.H., y Wuite, G.J.L. (2009) Nanoindentation studies reveal material properties of viruses. *Adv. Mat.*, **21**, 1187-1192.
- Ros, C., Baltzer, C., Mani, B. y Kempf, C. (2006) Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology*, **345**, 137-147.
- Ros, C., Burckhardt, C.J. y Kempf, C. (2002) Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J. Virol.*, **76**, 12634-12645.
- Ros, C. y Kempf, C. (2004) The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology*, **324**, 350-360.
- 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. y et al. (1985) Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, **317**, 145-153.
- Rossmann, M.G., Greve, J.M., Kolatkar, P.R., Olson, N.H., Smith, T.J., McKinlay, M.A. y Rueckert, R.R. (1997) Rhinovirus attachment and cell entry. En *Structural Biology of Viruses* (W. Chiu, R. Garcea, R. Burnette eds.). pp. 105-133. Oxford University Press, Oxford.
- Rossmann, M.G. y Johnson, J.E. (1989) Icosahedral RNA virus structure. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 533-573.
- Rossmann, M.G., Morais, M.C., Leiman, P.G. y Zhang, W. (2005) Combining x-ray crystallography and electron microscopy. *Structure*, **13**, 355-362.
- Rubio, M.P., Guerra, S. y Almendral, J.M. (2001) Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. *J. Virol.*, **75**, 11573-11582.
- Russel, M. y Model, P. (1989) Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *J. Virol.*, **63**, 3284-3295.
- Sader, J.E., Chon, J.W.M. y Mulvaney, P. (1999) Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.*, **70**, 3967-3969.
- Saini, V., Zharov, V., Brazel, C.S., Nikles, D.E., Johnson, D.T. y Everts, M. (2006) Combination of viral biology and nanotechnology: new applications in nanomedicine. *Nanomedicine*, **2**, 200-2006.

- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*. Cold Spring Harbour, NY.
- Sandalon, Z., Dalyot-Herman, N., Oppenheim, A.B. y Oppenheim, A. (1997) In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, **8**, 843-849.
- Sandalon, Z. y Oppenheim, A. (1997) Self-assembly and protein-protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology*, **237**, 414-421.
- Santarén, J.F., Ramírez, J.C. y Almendral, J.M. (1993) Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J. Virol.* **67**, 5126-5138.
- Santos, N.C. y Castanho, M.A. (2004) An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophys. Chem.*, **107**, 133-149.
- Sayle, R.A. y Milner-White, E.J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 374.
- Schaap, I.A., Carrasco, C., de Pablo, P.J., MacKintosh, F.C. y Schmidt, C.F. (2006) Elastic response, buckling, and instability of microtubules under radial indentation. *Biophys. J.*, **91**, 1521-1531.
- Schaap, I.A., de Pablo, P.J. y Schmidt, C.F. (2004) Resolving the molecular structure of microtubules under physiological conditions with scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.*, **33**, 462-467.
- Schatz, G.C. (2007) Using theory and computation to model nanoscale properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **104**, 6885-6892.
- Scheuring, S. y Dufrene, Y.F. (2010) Atomic force microscopy: probing the spatial organization, interactions and elasticity of microbial cell envelopes at molecular resolution. *Mol. Microbiol.*, **75**, 1327-1336.
- Schneemann, A. (2006) The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu. Rev. Microbiol.*, **60**, 51-67.
- Segovia, J.C., Bueren, J.A. y Almendral, J.M. (1995) Myeloid depression follows infection of susceptible newborn mice with the parvovirus minute virus of mice (strain i). *J. Virol.*, **69**, 3229-3232.
- Segovia, J.C., Gallego, J.M., Bueren, J.A. y Almendral, J.M. (1999) Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.*, **73**, 1774-1784.
- Segovia, J.C., Real, A., Bueren, J.A. y Almendral, J.M. (1991) In vitro myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) on hematopoietic stem and committed progenitor cells. *Blood*, **77**, 980-988.
- Serena, P.A., Douas, M., Marqués, M.I., Carrasco, C., de Pablo, P.J., Miranda, R., Carrascosa, J.L., Castellanos, M. y Mateu, M.G. (2009) MC simulations of water

- meniscus in nanocontainers: explaining the collapse of viral particles due to capillary forces. *Phys. Status Solidi*, **6**, 2128-2132.
- Shank, E.A., Cecconi, C., Dill, J.W., Marqusee, S. y Bustamante, C. (2010) The folding cooperativity of a protein is controlled by its chain topology. *Nature*, **465**, 637-640.
- Silva, L.P. (2005) Imaging proteins with atomic force microscopy: an overview. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **6**, 387-395.
- Simpson, A.A., Chandrasekar, V., Hebert, B., Sullivan, G.M., Rossmann, M.G. y Parrish, C.R. (2000) Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. *J. Mol. Biol.*, **300**, 597-610.
- Simpson, A.A., Chipman, P.R., Baker, T.S., Tijssen, P. y Rossmann, M.G. (1998) The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. *Structure*, **6**, 1355-1367.
- Simpson, A.A., Hebert, B., Sullivan, G.M., Parrish, C.R., Zadori, Z., Tijssen, P. y Rossmann, M.G. (2002) The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J. Mol. Biol.*, **315**, 1189-1198.
- Simpson, A.A., Leiman, P.G., Tao, Y., He, Y., Badasso, M.O., Jardine, P.J., Anderson, D.L. y Rossmann, M.G. (2001) Structure determination of the head-tail connector of bacteriophage phi29. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **57**, 1260-1269.
- Singh, P., Gonzalez, M.J. y Manchester, M. (2006a) Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Dev. Res.*, **67**, 23-41
- Singh, P., Destito, G., Schneemann, A. y Manchester, M. (2006b) Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J. Nanobiotechnol.*, **4**, 2.
- Smith, D.E., Tans, S.J., Smith, S.B., Grimes, S., Anderson, D.L. y Bustamante, C. (2001) The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, **413**, 748-752.
- Smith, T.J., Kremer, M.J., Luo, M., Vriend, G., Arnold, E., Kamer, G., Rossmann, M.G., McKinlay, M.A., Diana, G.D. y Otto, M.J. (1986) The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science*, **233**, 1286-1293.
- Smyth, M.S. y Martin, J.H. (2002) Picornavirus uncoating. *J. Clin. Pathol.*, **55**, 214-219.
- Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. y Kleinschmidt, J.A. (2006) Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J. Virol.*, **80**, 11040-11054.
- Sotres, J., Lostao, A., Wildling, L., Ebner, A., Gómez-Moreno, C., Gruber, H.J., Hinterdorfer, P. y Baró, A.M. (2008) Unbinding molecular recognition force maps of localized single receptor molecules by atomic force microscopy. *Chemphyschem.*, **9**, 590-599.

- Spalholz, B.A. y Tattersall, P. (1983) Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J. Virol.*, **46**, 937-943.
- Speir J.A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T.S. y Johnson, J.E. (1995) Structure of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by x-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*, **3**, 63-78.
- Steinmetz, N.F. y Evans, D.J. (2007) Utilisation of plant viruses in bionanotechnology. *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2891-2902.
- Steinmetz, N.F., Lin, T., Lomonosoff, G.P. y Johnson, J.E. (2009) Structure-based engineering of an icosahedral virus for nanomedicine and nanotechnology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **327**, 23-58.
- Steven, A.C., Bauer, A.C., Bisher, M.E., Robey, F.A. y Black, L.W. (1991) The maturation-dependent conformational change of phage T4 capsid involves the translocation of specific epitopes between the inner and the outer capsid surfaces. *J. Struct. Biol.*, **106**, 221-236.
- Stonehouse, N.J., Scott, D.J., Fonseca, S., Murray, J., Adams, C., Clarke, A.R., Valegard, K., Golmohammadi, R., van den Worm, S., Liljas, L. y Stockley, P.G. (1996a) Molecular interactions in the RNA bacteriophage MS2. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 412S.
- Stonehouse, N.J. y Stockley, P.G. (1993) Effects of amino acid substitution on the thermal stability of MS2 capsids lacking genomic RNA. *FEBS Lett.*, **334**, 355-359.
- Stonehouse, N.J., Valegard, K., Golmohammadi, R., van den Worm, S., Walton, C., Stockley, P.G. y Liljas, L. (1996b) Crystal structures of MS2 capsids with mutations in the subunit FG loop. *J. Mol. Biol.*, **256**, 330-339.
- Stubbs, G. (1999) Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **354**, 551-557.
- Sun, S., kondabagil, K., Draper, B., Alam, T.I., Bowman, V.D., Zhang, Z., Hegde, S., Forkina, A., Rossmann, M.G. y Rao, V.B. (2008) The structure of the phage T4 DNA packaging motor suggests a mechanism dependent on electrostatics forces. *Cell*, **135**, 1251-1262.
- Sun, S., kondabagil, K., Gentz, P.M., Rossmann, M.G. y Rao, V.B. (2007) The structure of the ATPase that powers DNA packaging into bacteriophage T4 procapsid. *Mol. Cell.*, **25**, 943-949.
- Tang, L., Johnson, K.N., Ball, L.A., Lin, T., Yeager, M. y Johnson, J.E. (2001) The structure of pariacoto virus reveals a dodecahedral cage of duplex RNA. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 77-83.

- Tao, Y.Z., Olson, N.H., Xu, W., Anderson, D.L., Rossmann, M.G. y Baker, T.S., (1998) Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. *Cell*, **95**, 431-437.
- Tattersall, P. y Bratton, J. (1983) Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.*, **46**, 944-955.
- Tattersall, P. y Cotmore, S.F. (1988) The Nature of Parvoviruses. En *Parvoviruses and Human Disease*, (John R. Pattison, ed.). pp. 5-42. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Tattersall, P., Shatkin, A.J. y Ward, D.C. (1977) Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J. Mol. Biol.*, **111**, 375-394.
- Temussi, P.A. (2006) Natural sweet macromolecules: how sweet proteins work. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 1876-1888.
- Tijssen, P., Szelei, J., y Zadori, Z. (2006). Phospholipase A2 domains in structural proteins of parvoviruses. En *The Parvoviruses*, (J. Kerr, S.F. Cotmore, M.E. Bloom, R.M. Linden, C.R. Parrish, eds.). pp. 95-105. Hodder Arnold, London.
- Timpe, J., Bevington, J., Casper, J., Dignam, J. D. y Trempe, J. P. (2005) Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr. Gene. Ther.*, **5**, 273-284.
- Trache, A. y Meininger, G.A. (2008) Atomic force microscopy (AFM). *Curr. Protoc. Microbiol.*, Chapter 2, Unit 2C 2.
- Tresnan, D.B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J.Y. y Parrish, C.R. (1995) Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. *Virology*, **211**, 123-132.
- Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W. y *et al.* (1991) The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*, **251**, 1456-1464.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. y Rice, C. M. (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J. Virol.*, **80**, 1734-1741.
- Tullis, G.E., Burger, L.R. y Pintel, D.J. (1992) The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo. *Virology*, **191**, 846-857.
- Urry, D.W. y Parker, T.M. (2002) Mechanics of elastin: molecular mechanism of biological elasticity and its relationship to contraction. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.*, **23**, 543-559.

- Valegard, K., Murray, J.B., Stockley, P.G., Stonehouse, N.J. y Liljas, L. (1994) Crystal structure of an RNA bacteriophage coat protein-operator complex. *Nature*, **371**, 623-626.
- Valle, M., Kremer, L., Martínez, A. C., Roncal, F., Valpuesta, J.M., Albar, J.P. y Carrascosa, J.L. (1999) Domain architecture of the bacteriophage phi29 connector protein. *J. Mol. Biol.*, **288**, 899-909.
- Valle, N., Riobos, L. y Almendral, J.M. (2006) Synthesis, post-translational modification and trafficking of the parvovirus structural polypeptides. In *Parvoviruses*. Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M. y Parrish, C.R., eds. pp. 291-304. Edward Arnold, Ltd., London.
- Vallone, B. y Brunori, M. (2004) Roles for holes: are cavities in proteins mere packing defects? *Ital. J. Biochem.*, **53**, 46-52.
- Valpuesta, J. M. y Carrascosa, J.L. (1994) Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. *Q. Rev. Biophys.*, **27**, 107-155.
- van der Schoot, P. y Bruinsma, R. (2005) Electrostatics and the assembly of an RNA virus. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.*, **71**, 061928.
- Ventoso, I., Berlanga, J.J. y Almendral, J.M. (2010) Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J. Virol.*, **84**, 5043-5051.
- Volkin, D. B., Burke, C. J., Marfia, K. E., Oswald, C. B., Wolanski, B. y Middaugh, C. R. (1997) Size and conformational stability of the hepatitis A virus used to prepare VAQTA, a highly purified inactivated vaccine. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 666-673.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, **8**, 52-56.
- Wagenseil, J.E. y Mecham, R.P. (2009) Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol. Rev.*, **89**, 957-989.
- Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., De Langhe, S., Kemp, P.J., Riccardi, D., Tordy, J., Bellusci, S., Shi, W., Lubkin, S.R. y Jesudason, E. (2010) Lung organogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **90**, 73-158.
- Welte, L., Calzolari, A., Di Felice, R., Zamora, F. y Gomez-Herrero, J. (2010) Highly conductive self-assembled nanoribbons of coordination polymers. *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 110-115.
- Whittaker, G.R. y Helenius, A. (1998) Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology*, **246**, 1-23.
- Wikoff, W.R., Liljas, L., Duda, R.L., Tsuruta, H., Hendrix, R.W. y Johnson, J.E. (2000) Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid. *Science*, **289**, 2129-2133.

- Wimmer, E., Mueller, S., Tumpey, T.M. y Taubenberger, J.K. (2009) Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat. Biotechnol.*, **27**, 1163-1172.
- Wnendt, S. (1994) Analysis of the endA mutation of Escherichia coli K12 strains: JM103 behaves like endA+ wild-type strains. *Biotechnique*, **17**, 270-272.
- Wright, C.J., Shah, M.K., Powell, L.C. y Armstrong, I. (2010) Application of AFM from microbial cell to biofilm. *Scanning*, **32**, 134-149.
- Wu, H., Keller, W. y Rossmann, M.G. (1993) Determination and refinement of the canine parvovirus empty-capsid structure. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **49**, 572-579.
- Wu, H. y Rossmann, M.G. (1993) The canine parvovirus empty capsid structure. *J. Mol. Biol.*, **233**, 231-244.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A. y Chapman, M.S. (2002) The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **99**, 10405-10410.
- Xie, Q. y Chapman, M.S. (1996) Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **264**, 497-520.
- Xing, L. y Tikoo, S. K. (2009) Packaging of viral RNAs in virions of adenoviruses. *Virology*, **6**, 16.
- Yaffe, E., Fishelovitch, D., Wolfson, H.J., Halperin, D. y Nussinov, R. (2008a) MolAxis: a server for identification of channels in macromolecules. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 210-215.
- Yaffe, E., Fishelovitch, D., Wolfson, H.J., Halperin, D. y Nussinov, R. (2008b) MolAxis: Efficient and accurate identification of channels in macromolecules. *Proteins*, **73**, 72-86.
- Yoon-Robarts, M., Blouin, A.G., Bleker, S., Kleinschmidt, J.A., Aggarwal, A.K., Escalante, C.R. y Linden, R.M. (2004) Residues within the B' motif are critical for DNA binding by the superfamily 3 helicase Rep40 of adeno-associated virus type 2. *J. Biol. Chem.*, **279**, 50472-50481.
- Young, M., Willits, D., Uchida, M. y Douglas, T. (2008) Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **46**, 361-384.
- Yu, J., Moffitt, J., Hetherington, C.L., Bustamante, C. y Oster, G. (2010) Mechanochemistry of a viral DNA packaging motor. *J. Mol. Biol.*, **400**, 186-203.
- Yunus, A.S., Jackson, T.P., Crisafi, K., Burimski, I., Kilgore, N.R., Zoumplis, D., Allaway, G.P., Wild, C.T. y Salzwedel, K. (2010) Elevated temperature triggers human respiratory syncytial virus F protein six-helix bundle formation. *Virology*, **396**, 226-237.

- Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariepy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R. y Tijssen, P. (2001) A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell.*, **1**, 291-302.
- Zandi, R. y Reguera, D. (2005) Mechanical properties of viral capsids. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.*, **72**, 021917.
- Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R.F., Gelbart, W.M. y Rudnick, J. (2004) Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 15556-15560.
- Zhang, X., Ji, Y., Zhang, L., Harrison, S.C., Marinescu, D.C., Nibert, M.L. y Baker, T.S. (2005) Features of reovirus outer capsid protein $\mu 1$ revealed by electron cryomicroscopy and image reconstruction of the virion at 7.0 Angstrom resolution. *Structure*, **13**, 1545-1557.
- Zhou, S. y Standring, D.N. (1992a) Cys residues of the hepatitis B virus capsid protein are not essential for the assembly of viral core particles but can influence their stability. *J. Virol.*, **66**, 5393-5398.
- Zhou, S. y Standring, D.N. (1992b) Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **89**, 10046-10050.
- Zhou, Z.H. (2008) Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **18**, 218-228.
- Zink, M. y Grubmüller, H. (2010) Primary changes of the mechanical properties of southern bean mosaic virus upon calcium removal. *Biophys. J.*, **98**, 2010 687-695.
- Zlotnick, A. (1994) To build a virus capsid. An equilibrium model of the self assembly of polyhedral protein complexes. *J. Mol. Biol.*, **241**, 59-67.
- Zlotnick, A. y Mukhopadhyay, S. (2011) Virus assembly, allostery and antivirals. *Trends Microbiol.*, **19**, 14-23.

