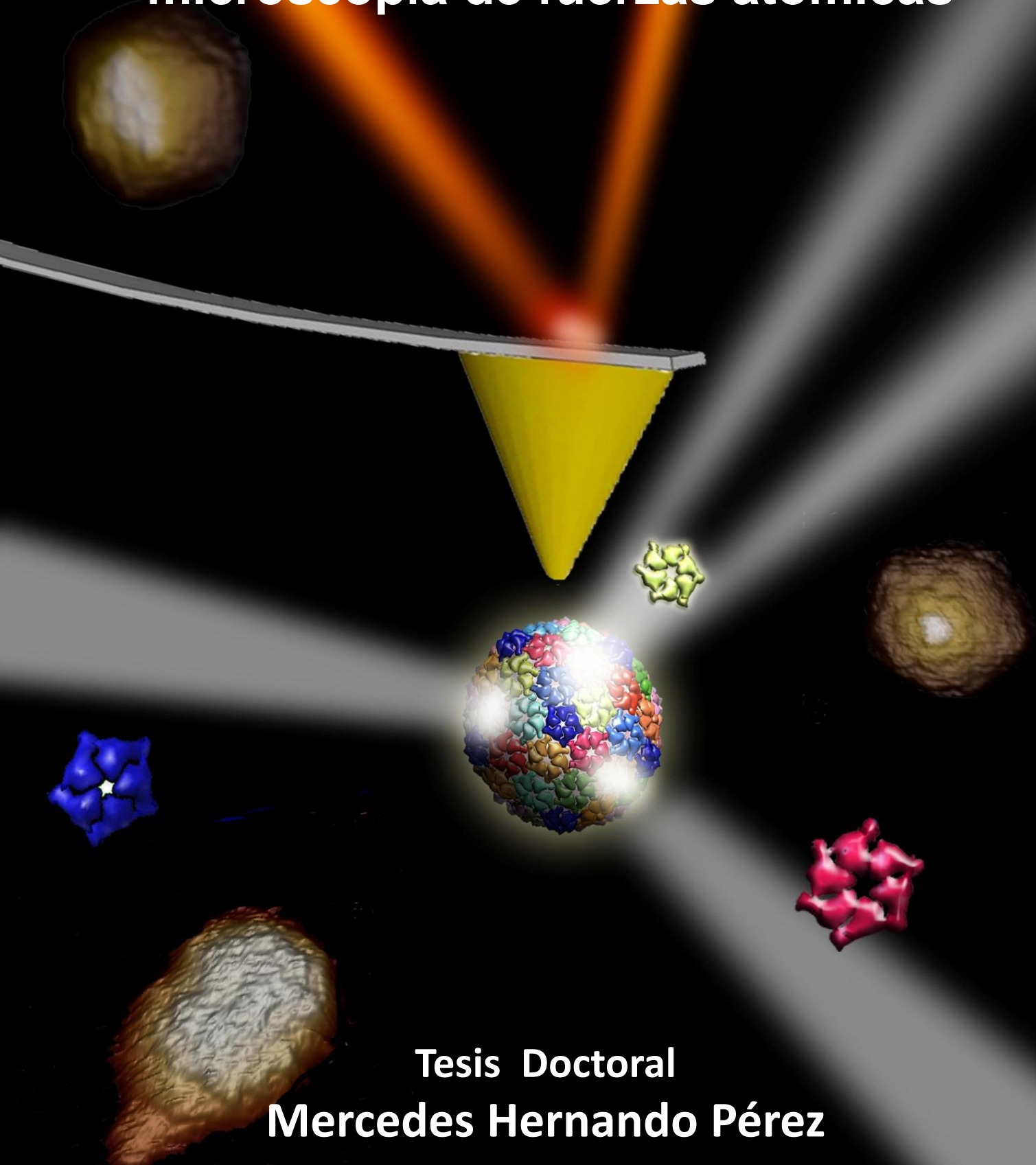


Caracterización de las propiedades mecánicas de bacteriófagos mediante microscopía de fuerzas atómicas



Tesis Doctoral
Mercedes Hernando Pérez

Departamento de Física de la Materia Condensada
Universidad Autónoma de Madrid
Madrid 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Física de la Materia Condensada



**Caracterización de las propiedades
mecánicas de bacteriófagos mediante
microscopía de fuerzas atómicas**

**Memoria presentada por Mercedes Hernando Pérez para optar al
grado de Doctora en Físicas**

Director de Tesis

Dr. Pedro José de Pablo Gómez

Madrid 2014

*La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano,
siempre se aplican.*

Severo Ochoa (1905-1993)

A mis padres, Gerardo y Mercedes

RESUMEN

La presente tesis ha sido realizada en el Grupo Nanoforces del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta tesis se centra en la caracterización de propiedades mecánicas de bacteriófagos mediante microscopía de fuerzas atómicas en medio líquido. En particular, se han estudiado los cambios en la morfología, elasticidad, fragilidad y estabilidad que se producen en las cápsidas víricas durante el ciclo viral.

Los trabajos aquí presentados han sido realizados en colaboración con diferentes grupos de investigación de biólogos y teóricos: Profesor José López Carrascosa (Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Madrid), Profesor Carlos Enrique Catalano (University of Washington, USA), Profesor David Reguera (Dept. de Física Fundamental, Universidad de Barcelona, Barcelona) y Profesor Arvind Raman (School of Mechanical Engineering Purdue University, Indiana, USA).

Aunque esta tesis tiene un carácter experimental, en ella se incluyen parte de los modelos teóricos y las simulaciones que han permitido interpretar los diferentes resultados experimentales obtenidos.

La memoria se organiza en 6 capítulos y un apéndice. Para una mejor comprensión se ha introducido un glosario de abreviaturas y definiciones que aparecen al final del documento.

La tesis está dividida en tres partes. La primera parte correspondiente al Capítulo 1 en el que se introduce la nanociencia, marco en el cual se sitúa esta tesis dada la escala nanométrica de los sistemas estudiados. Debido al carácter multidisciplinar de los experimentos y a la naturaleza biológica de los sistemas de estudio se han dedicado unas páginas a introducir la biofísica. Además, se han descrito de manera detallada tanto los

sistemas biológicos estudiados (virus) como la herramienta principal utilizada (el Microscopio de Fuerzas Atómicas), junto con sus aplicaciones para los estudios de sistemas biológicos.

La segunda parte comprende los Capítulos 2, 3 y 4. En ellos se hace referencia a la caracterización de las propiedades mecánicas de tres sistemas bacteriófagos: $\phi 29$, T7 y λ . El objetivo principal de esta parte es el estudio de los cambios en las propiedades mecánicas que se producen en las estructuras de las partículas víricas durante el ciclo biológico de estos fagos. Mediante microscopía de fuerzas atómicas se ha obtenido información acerca de la morfología, presión interna y propiedades mecánicas de sus cubiertas proteicas. En cuanto a las propiedades mecánicas, se ha prestado especial atención a la respuesta elástica, la fragilidad y la estabilidad. Los tres bacteriófagos estudiados, $\phi 29$, T7 y λ , se caracterizan por seguir una ruta de maduración muy similar: formación de la precabeza, expansión, estabilización y empaquetamiento del material genético. La diferencia que existe entre ellos es el mecanismo utilizado para estabilizar la cápsida. Hemos de tener en cuenta que estos bacteriófagos son capaces de empaquetar material genético de micras de longitud en estructuras proteicas con diámetros de sólo unas decenas de nanómetros. El proceso de maduración no sólo garantiza el correcto desarrollo la estructura proteica, sino que también le proporciona la estabilidad química y mecánica suficiente, por un lado, para proteger el material genético durante la etapa extracelular del ciclo biológico y por otro, para resistir a las altas presiones que se producen por el ADN empaquetado en el interior del virus.

El Capítulo 2 está dedicado al bacteriófago $\phi 29$. Las precabezas de este fago con forma de esfero-cilindro exhiben estrés residual en la estructura, cuyo origen se encuentra en el ensamblaje de las proteínas que la componen. Además, el virión presenta una constante elástica mayor que las precabezas como consecuencia de la presión interna generada por el material genético empaquetado. Los resultados de elasticidad extraídos de los experimentos han sido comparados con las predicciones que se obtienen de simulaciones basadas en el método de elementos finitos (*Finite Element Method; FEM*) y basadas en el modelo de grano grueso (*Coarse-Grained Model; CGM*) así como con los resultados que predice la teoría de la elasticidad de medios continuos. A partir de las

propiedades mecánicas de la cápsida se ha estimado la presión interna en el interior del bacteriófago.

En el Capítulo 3 se han estudiado los cambios de estabilidad química y mecánica en la cápsida del bacteriófago T7 la cual se caracteriza por presentar la ruta de maduración más simple. Ha sido sugerido que esta simplicidad se debe a que este fago apareció en etapas muy tempranas de la evolución de los virus. Los resultados experimentales muestran la existencia de anisotropía en la respuesta elástica de las estructuras de las partículas víricas. Para interpretar la anisotropía observada, el grupo del Profesor David Reguera ha realizado simulaciones de nanoindentaciones con un AFM virtual. Para ello, la cápsida del fago ha sido modelada usando la aproximación del modelo de grano grueso. De esta forma se tiene en cuenta la naturaleza discreta de la misma. Puesto que los cambios estructurales que se producen durante la maduración en la cubierta proteica de este virus no se reflejan en la constante elástica, se ha caracterizado la estabilidad de la precabeza y la cápsida madura mediante experimentos de fatiga mecánica con el AFM.

El Capítulo 4 está dedicado al estudio de las propiedades mecánicas del bacteriófago λ . La cápsida de este fago necesita incluir una proteína adicional en la parte externa de la estructura para poder empaquetar el material genético. Por este motivo, se han caracterizado las tres partículas víricas implicadas en su proceso de maduración: procápsida, cápsida expandida y cápsida decorada con proteína gpD. Se han investigado los cambios que se producen tanto en la respuesta elástica como en la estabilidad durante la maduración de esta cápsida.

La tercera parte de esta tesis corresponde al Capítulo 5. En este capítulo se presenta la teoría de Multi-armónico 0+1+2 como una nueva herramienta para obtener información acerca de las propiedades físicas de los materiales usando el modo dinámico AM-AFM (Amplitude Modulation Dynamic Atomic Force Microscopy o Modo Dinámico de Modulación en Amplitud). Usando esta teoría se han estudiado las propiedades físicas del bacteriófago $\phi 29$. Los resultados obtenidos han sido comparados con los resultados de experimentos de nanoindentaciones expuestos en el capítulo 2.

En el Capítulo 6 se reúnen las principales conclusiones extraídas a lo largo de esta tesis.

El Apéndice I recoge los protocolos empleados para la preparación de muestras y superficies utilizadas para la realización de los experimentos con el AFM.

ÍNDICE

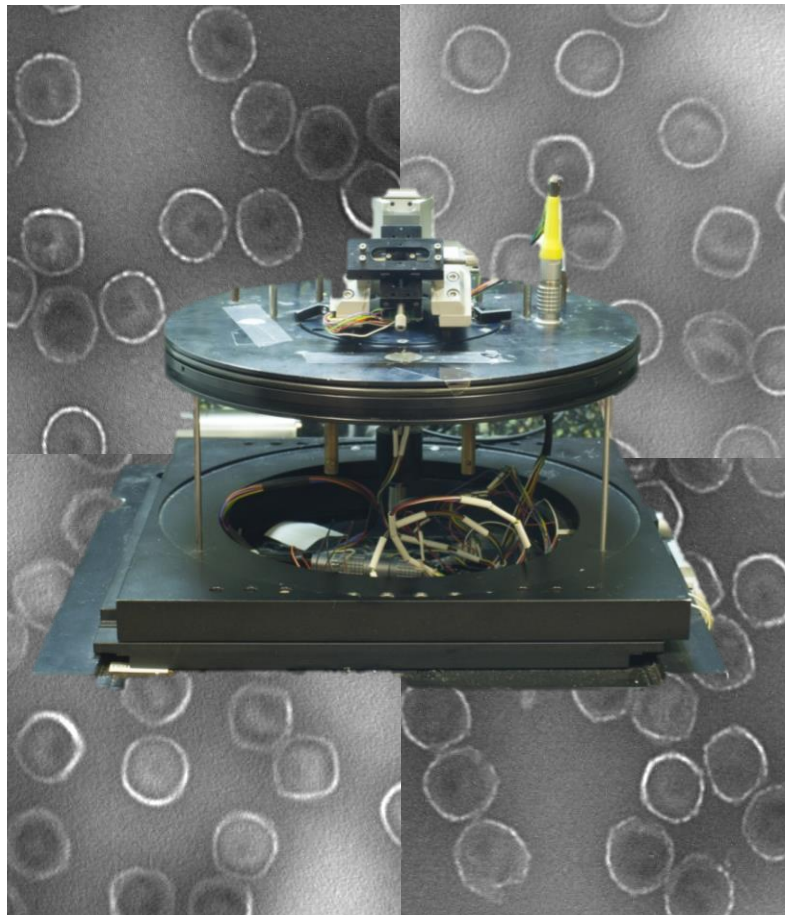
1. LOS VIRUS Y EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS	19
1.1. Introducción	21
1.1.1 Biofísica.	24
1.2. Los virus.	26
1.2.1. Estructuras de los virus.	28
1.2.2. Ciclo viral.	35
1.3. La microscopía de proximidad.	37
1.3.1. Fundamentos de la microscopía de fuerzas atómicas.	39
1.3.2. El microscopio de fuerzas atómicas y sus aplicaciones a sistemas biológicos.	45
1.3.3. Modos de operación.	47
1.3.4. Caracterización de propiedades mecánicas mediante el AFM	56
1.4. Motivación.	61
1.5. Referencias.	63
2. BACTERIÓFAGO Φ29: PRE-STRESS Y PRESIÓN INTERNA	69
2.1. Introducción.	71
2.1.1. El bacteriófago ϕ 29.	72
2.2. Estudio de la respuesta mecánica de las precabezas del bacteriófago ϕ 29.	78
2.2.1. Análisis mediante simulación de elementos finitos.	75
2.2.2. Fórmula de Laplace y simulación de grano grueso: <i>pre stress</i> .	82
2.2.3. Experimento con gluteraldehído.	85
2.3. Estudio de la presión interna en el bacteriófago ϕ 29.	87
2.3.1. Caracterización de las propiedades mecánicas las partículas víricas del bacteriófago ϕ 29.	88
2.3.2. Evidencias de presión interna.	92
2.4. Modelo teórico de Purohit.	95
2.5. Modelo mecánico cápsida presurizada.	99
2.6. Resumen y conclusiones.	102
2.7. Referencias.	104
3. BACTERIÓFAGO T7: ESTABILIDAD QUÍMICA Y ESTRUCTURAL.	109
3.1. Introducción.	111
3.1.1. El bacteriófago T7	113
3.2. Estabilidad química durante la maduración.	115
3.3. Caracterización mecánica del bacteriófago T7.	116
3.4. Estudio de la estabilidad mecánica durante la maduración.	122

3.4.1. Fracturas en precabezas y cápsidas.	127
3.5. Interpretación de la respuesta elástica de la cápsida del bacteriófago T7.	131
3.5.1 Simulaciones de elementos finitos.	132
3.5.2 AFM Virtual: cápsida madura del fago T7.	134
3.6. Resumen y conclusiones.	138
3.7. Referencias.	140
4. BACTERIÓFAGO λ: LA PROTEÍNA gpD COMO MECANISMO DE ESTABILIZACIÓN.	143
4.1. Introducción.	145
4.1.1. El bacteriófago λ .	147
4.2. Caracterización de las propiedades mecánicas del bacteriófago λ .	149
4.2.1. Caracterización de la respuesta elástica.	150
4.2.2. Experimentos de fatiga mecánica.	155
4.3. Resumen y conclusiones	161
4.5. Referencias.	163
5. MAPAS DE PROPIEDADES FÍSICAS DEL BACTERIÓFAGO ϕ29: Multi-armónicos 0+1+2.	167
5.1. Espectroscopia e imagen mediante el AFM.	169
5.2. Teoría de Multi-armónicos 0+1+2.	173
5.2.1. Obtención de mapas de fuerzas y propiedades físicas.	179
5.3. Comparación entre el método multi-armónico 0+1+2 y método estático.	186
5.4. Rupturas de la cápsida del bacteriófago ϕ 29.	191
5.5. Resumen y conclusiones.	197
5.6. Referencias.	198
6. CONCLUSIONES.	201
APENDICE I .PREPARACION DE MUESTRAS Y SUPERFICIES.	209
A.I.1. Preparación de superficies.	211
A.I.1.1 Superficies:	212
A.I.1.1.1. Superficie de Mica.	212
A.I.1.1.2. Superficie de Vidrio.	213
A.I.1.1.3. Superficie de Grafito.	213
A.I.1.2. Funcionalización de las superficies.	214
A.I.1.2.1. Superficies tratadas con hexamethyldisilazane (HMDS).	214
A.I.1.2.2. Superficies tratadas con 3-aminopropyl-triehoxylane (APTS).	215

A.I.1.2.3. Superficies tratadas coniones divalentes: NiCl ₂ , MgCl ₂ o CaCl ₂ .	215
A.I.2. Preparación de Muestras.	216
A.I.2.1. Preparación de muestras para AFM.	217
A.I.3. Elección de las superficies.	218
A.I.4. Referencias.	223
ABREVIATURAS.	225
PUBLICACIONES.	229
AGRADECIMIENTOS.	231

CAPÍTULO 1:

LOS VIRUS Y EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS



1. LOS VIRUS Y EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS

1.1. Introducción

Hace ya más de medio siglo que el físico norteamericano Richard Feynman (1959) presentó su reconocida charla titulada *“There’s Plenty of Room at the Bottom”* o “Hay mucho sitio al fondo”, en una reunión de la *American Physical Society* [1]. Con ella invitó a la comunidad científica a dar sus primeros pasos hacia el desarrollo de aspectos fundamentales que constituyen hoy en día la base de la nanociencia. Feynman imaginaba una nueva disciplina basada en la manipulación de átomos y moléculas e invitó a los investigadores, que provenían de diferentes áreas, al desarrollo de la misma. Aunque en aquella época la idea podía parecer ciencia ficción, la realidad es que en la época actual muchos científicos en todo el mundo están desarrollando este nuevo campo que promete no sólo con cambiar la forma en la que entendemos la ciencia, la medicina, la tecnología, etc, sino en último término nuestras propias vidas.

La nanociencia se caracteriza por ser un campo esencial y necesariamente multidisciplinar. Física, química, biología, ingeniería, etc, se unen para el estudio y desarrollo de estructuras, sistemas y dispositivos (en muchos casos de origen biológico) que presenten al menos una de sus dimensiones de tamaño de entre los 0.1 y los 100 nm. Dentro de este rango de tamaño se incluyen las escalas atómica, molecular y macromolecular.

Como término derivado la nanociencia podríamos incluir el término la nanotecnología el cual fue por primera vez definido por Norio Taniguchi en 1974 [2]. Aunque hoy en día son utilizados de manera indistinta, hemos de tener en cuenta que, mientras la nanociencia se dedica a la caracterización de estructuras y materiales de múltiples naturalezas dentro de la escala nanométrica, la nanotecnología se dedica al

diseño, síntesis, manipulación y fabricación de dispositivos y sistemas que presenten propiedades específicas derivadas de sus dimensiones, a partir del control de su tamaño y forma. Por este motivo la nanotecnología puede aplicarse en una gran variedad de campos de investigación, como son la informática, electrónica, medicina, cosmética, etc.

Existen dos estrategias para el control de la materia a escala nanométrica; la denominada descendente o *top-down* y la ascendente o *bottom-up*.

Las técnicas *top-down*, consisten en disminuir el tamaño de las estructuras. A partir de los métodos descendentes como la litografía por haz de electrones o más avanzadas que utilizan radiación UV o bien Rayos X, se pueden crear estructuras de un tamaño menor a los 100 nm. Sin embargo, estas técnicas presentan limitaciones, derivadas fundamentalmente de los costes que conlleva la fabricación de los equipos, así como las condiciones en las que operan. Esto es un inconveniente importante visto desde el punto de vista industrial.

Por ello existe la alternativa de la aproximación mediante las técnicas de *bottom-up* que consiste en crear nanomateriales a partir de bloques de construcción funcionales, es decir: a partir del ensamblaje de átomos y moléculas. El crecimiento auto-organizado y el auto-ensamblaje resultan ser más eficientes y menos costoso para la fabricación de estructuras a nivel nanométrico.

En el campo de la biología existen muchos ejemplos naturales en los que podemos basar el diseño nanotecnológico. En la mayoría de los fenómenos biológicos participan múltiples clases de sofisticadas nanoestructuras y/o nanomáquinas de las que dependen funciones tales como, transformar energía, aplicar fuerzas, transportar, almacenar y leer información, etc. Los virus son un claro ejemplo de nanomáquina, *a priori* molecularmente sencilla, compuesta por un limitado número de componentes. Estos macroensamblados nucleoproteicos de tamaño nanométrico son capaces de llevar a cabo funciones complejas durante el ciclo viral. Algunas de estas funciones son la replicación del material genético aprovechando la maquinaria celular, el autoensamblaje de nuevas partículas virales, el transporte y protección del material genético, etc. Las cápsidas víricas (nanocontenedores proteicos o glicoproteicos) son las encargadas de proteger el material

genético del virus. Durante una etapa de su ciclo viral denominada *maduración*, las cápsidas sufren cambios estructurales más o menos pronunciados, que implican la modificación o la reorganización de las proteínas que las conforman. Estos cambios, que se reflejan en las propiedades mecánicas y electrostáticas, por un lado les proporcionan la estabilidad necesaria para proteger su material genético y, por otro, les confiere alta resistencia a condiciones extremas, como cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, de presión, deshidratación, etc; del medio fisiológico en el cual se encuentran [3, 4].

Por esta razón las cápsidas víricas son modelos muy atractivos para el estudio y el diseño de nanoestructuras. Dada la biocompatibilidad que presentan, múltiples estudios proponen a las cápsidas para aplicaciones en nanotecnología, biomedicina y biotecnología, siendo una de las más directas la síntesis de nuevos materiales o la fabricación de pequeños contenedores para encapsular y distribuir fármacos de manera dirigida, o como vectores en terapias génicas.

Hace ya algunos años que grupos de virólogos y biotecnólogos vienen sintetizando *in vitro*, estructuras similares a las cápsidas víricas, conocidas como VLPs, (en inglés *Virus-Like Particles*). Estas partículas, de naturaleza exclusivamente protéica, presentan las ventajas de una cápsida vírica, pero al mismo tiempo ofrecen la posibilidad de obtener un nanocontenedor cuyo tamaño, morfología, composición y cargo interno pueden ser predeterminados en muchos casos mediante conocimientos bionanotecnológicos [5-7].

1.1.1. Biofísica

Como hemos mencionado anteriormente, en las últimas décadas la investigación ha alcanzado un nivel multidisciplinar. La unión de los conocimientos de las diferentes ramas de la ciencia, no sólo ha permitido el diseño de nuevos materiales con aplicaciones en diferentes áreas, sino también, abordar la descripción y el análisis de un fenómeno determinado desde diferentes puntos de vista, ofreciendo así, una interpretación más completa y enriquecedora del mismo. De entre estas uniones podríamos destacar la Biofísica como una de las ramas interdisciplinarias que ha alcanzado un alto nivel de desarrollo.

Biofísica es la rama de ciencia que estudia los sistemas biológicos utilizando métodos y principios físicos. Este término fue utilizado por primera vez en 1892 por K.Pearson [8]. *“Un problema biológico desde el punto de vista físico conlleva desde una simplificación del sistema objeto hasta una descripción del mismo con leyes físicas”*.

Dentro de los sistemas estudiados en el campo de la biofísica toman interés los sistemas sencillos debido a que, desde su simplicidad, aportan información relevante para el entendimiento de otros más complejos. Por eso la gran mayoría de los trabajos realizados en biofísica se han centrado en el estudio detallado de biomoléculas o autoensamblados de las mismas que permiten después entender sistemas más complejos. Los análisis biofísicos de sistemas biológicos pueden llevarse a cabo mediante técnicas de volumen o en *“bulk”*. Este tipo de técnicas, como por ejemplo la Microscopía Óptica, Difracción de Rayos X o la Calorimetría, utilizan un gran número de moléculas (en disolución o en forma cristalina) y proporcionan información promediada a cerca de la estructura, la densidad de carga superficial o la estabilidad estructural. A partir de la información obtenida por estas técnicas se puede deducir o bien plantear nuevos ensayos que demuestren la relación que existe con su función biológica.

Gracias a los avances alcanzados en tecnología en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas y métodos de medida que complementan a las técnicas de volumen como son las denominadas técnicas de molécula única que, como indica su nombre, permiten estudiar propiedades físicas a nivel de molécula individual como por ejemplo la estabilidad térmica, dureza, fragilidad, estabilidad mecánica y carga

electrostática, en condiciones fisiológicas. Dentro de este grupo técnicas cabe destacar las Pinzas Ópticas, las Pinzas Magnéticas, la Microscopía de Fluorescencia, y el Microscopio de Fuerzas Atómicas. Las Pinzas Ópticas y Magnéticas, que aplican fuerzas unos pocos (pN), permiten estudiar por ejemplo, la fuerza ejercida por un motor molecular [9], o la interacción entre una proteína y la molécula de DNA [10-12]. El Microscopio de Fluorescencia nos permite, entre otros, observar procesos dinámicos en tiempo real que ocurren en el citoesqueleto de las células [13]. Y el Microscopio de Fuerzas Atómicas que aplica fuerzas cercanas al centenar de pN, nos permite realizar espectroscopia de fuerzas [14], estudiar procesos dinámicos como son el ensamblado de filamentos de proteínas [15, 16], el desensamblaje de las cápsidas víricas [17], y realizar experimentos de indentación para obtener información de propiedades físicas como es el módulo de Young en células [18, 19], la constante elástica en cápsidas virales [20], o la constante dieléctrica de estructuras proteicas [21].

En los últimos años, muchos de los trabajos más importantes dentro del campo de la biofísica, han utilizado este tipo de técnicas. Determinar las propiedades físicas y el funcionamiento de estas estructuras biomoleculares sigue siendo uno de los grandes retos.

Los virus son ensamblados de proteínas y material genético. Estas entidades biológicas, de apariencia sencilla, son la admiración de microbiólogos como de científicos especializados en la nano-bio-tecnología. El ciclo biológico de los virus es extremadamente preciso, y se desarrolla casi de forma automática. Entender la relación que existe entre las propiedades físicas (rigidez, fragilidad, estabilidad, densidad de carga, etc), su estructura (subunidades proteicas, genoma, receptores de la superficie, apéndices) y las funciones que realiza (auto-ensamblaje, encapsidación y protección de material genético, replicación, infección.) es importante en virología y en nanomedicina en general, por su potencial uso como nanocontenedores, así como para el diseño de nuevas estrategias antivirales.

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de las propiedades mecánicas y la estabilidad estructural de diferentes virus, particularmente en virus procarionta: los bacteriófagos. Este estudio se ha llevado a cabo mediante el uso del Microscopio de Fuerzas Atómicas (*Atomic Force Microscopy*, AFM) en condiciones fisiológicas. Para esto,

las partículas víricas fueron sometidas a deformaciones reversibles e irreversibles, para de este modo analizar y caracterizar la respuesta obtenida, describir sus propiedades y conocer las implicaciones de dichas características en el contexto natural

1.2. Los virus

Un virus, del latín *toxina o veneno*, es una partícula microscópica de un tamaño de entre 10-300 nm que infecta células animales, vegetales o bacterianas. Fueron descubiertos en 1892 por el biólogo ruso Dimitri Ivanovski tras utilizar en sus experimentos unas partículas microscópicas que hoy se conocen como Virus del Mosaico del Tabaco (TMV). Este virus fue uno de los primeros en ser cristalizados. Gracias a la invención de la Microscopía Electrónica en 1931, el bioquímico y virólogo Wendell Stanley consigue en 1935 examinar este virus y comprobar que estaba fundamentalmente compuesto por proteína [22]. La década de los 50 puede ser considerada como la edad dorada de los virus, ya que la mayoría de las 2000 especies reconocidas actualmente de virus animales, plantas y bacterias fueron descubiertas durante estos años. Actualmente se han descrito más de 5000 virus y algunos autores consideran la existencia de millones de tipos diferentes [23].

Independientemente del tipo de célula a la que infectan, los virus están compuestos esencialmente por dos ingredientes: material genético y un ensamblado macromolecular de proteínas, llamado cápsida.

La clasificación de los virus puede hacerse atendiendo a diversas características, tales como célula a la que infectan, tipo de ácido nucleico que empaqueta (ADN o ARN), el mecanismo de replicación, características morfológicas, etc.

Fijándonos en el tipo celular al que infecta podríamos distinguir entre virus que infectan eucariotas (con núcleo definido) o procariotas (sin núcleo definido, las bacterias).

Basándonos en el modo de replicación y el ácido nucleico que empaquetan se establece el sistema de clasificación de Baltimore [24] en los siguientes grupos:

- Grupo I: Virus dsDNA: virus cuyo material genético está compuesto por una cadena doble de ADN (ej. Adenovirus, Herpesvirus, Poxvirus).
- Grupo II: Virus ssDNA: virus cuyo material genético está compuesto por una cadena sencilla de ADN (ej. Parvovirus).
- Grupo III: Virus dsRNA: virus cuyo material genético está compuesto por cadena doble de RNA (ej. Reovirus).
- Grupo IV: Virus (+) ssRNA virus cuyo material genético está compuesto por cadena sencilla de ARN sentido positivo (ej. Picornavirus, Toqavirus).
- Grupo V: Virus (-) ssRNA virus cuyo material genético está compuesto por cadena sencilla de ARN sentido negativo (ej. Ortomixovirus, Rabdovirus).
- Grupo VI: Virus ssRNA-RT cuyo material genético está compuesto por una cadena simple de ARN intermedio (ej. Retrovirus).
- Grupo VII: Virus dsDNA-RT cuyo material genético está compuesto por una cadena doble de ADN intermedio (ej. Hepadnaviridae).

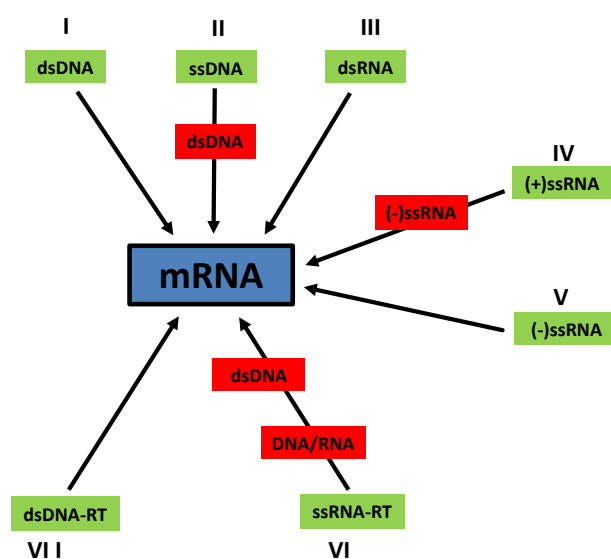


Figura 1.1: Diagrama de clasificación de virus. Clasificación de Baltimore.

El sistema de clasificación actual de los virus está basado en un ordenamiento por jerarquía de taxones. Esta clasificación fue desarrollada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). De esta forma los virus se clasifica siguiendo: orden, familia, subfamilia, género y especie.

1.2.1. Estructura de los Virus

En un virus de forma más genérica se pueden distinguir las siguientes partes.

- Cápsida: autoensamblado macromolecular de proteínas y que en ocasiones puede estar rodeada a su vez por una cubierta lipídica.
- Material genético: ADN o ARN que pueden ser de cadena simple o doble.
- Espículas: fibras de proteínas que intervienen en el reconocimiento de la membrana celular.
- Proteínas en el interior de la cápsida que cumplen funciones no estructurales.

Los Bacteriófagos además presentan dos estructuras adicionales, el conector y la cola, siendo esta última necesaria para la translocación del material genético al interior de la célula.

- Conector o collar: estructura proteica que une la cápsida con la cola.
- Cola: estructura proteica a modo de canal por el cual el material genético es introducido dentro de la célula huésped (bacteriófagos).

La figura 1.2 se muestra la estructura de un bacteriófago.

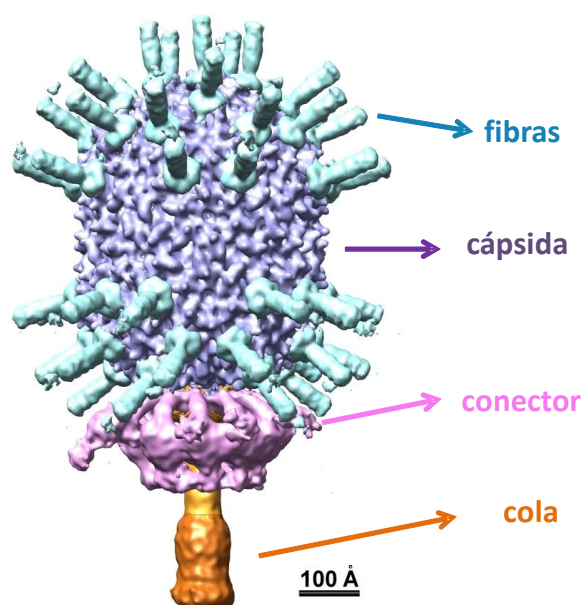


Figura 1.2: 3D cryo-EM del bacteriófago $\phi 29$. La imagen muestra la estructura externa del virus donde se diferencia, la cápsida, las fibras, el conector y la cola [25].

Las cápsidas virales están destinadas a la protección del material genético (ADN o ARN) que bien puede ser de cadena simple o doble. En cuanto al tipo de biomoléculas que componen la cápsida, podemos decir que existen desde estructuras complejas formadas por lípidos y azúcares unidos a proteínas, hasta estructuras más simples compuestas únicamente de proteínas. Las proteínas están unidas entre sí por diferentes interacciones químicas (iónicas, covalentes, puentes de hidrógeno, etc.) y van a determinar tanto la estabilidad como la forma final que adopta la cápsida: poliédricas (esféricas o icosaédricas), y helicoidales, tal y como se ve en la figura 1.3.

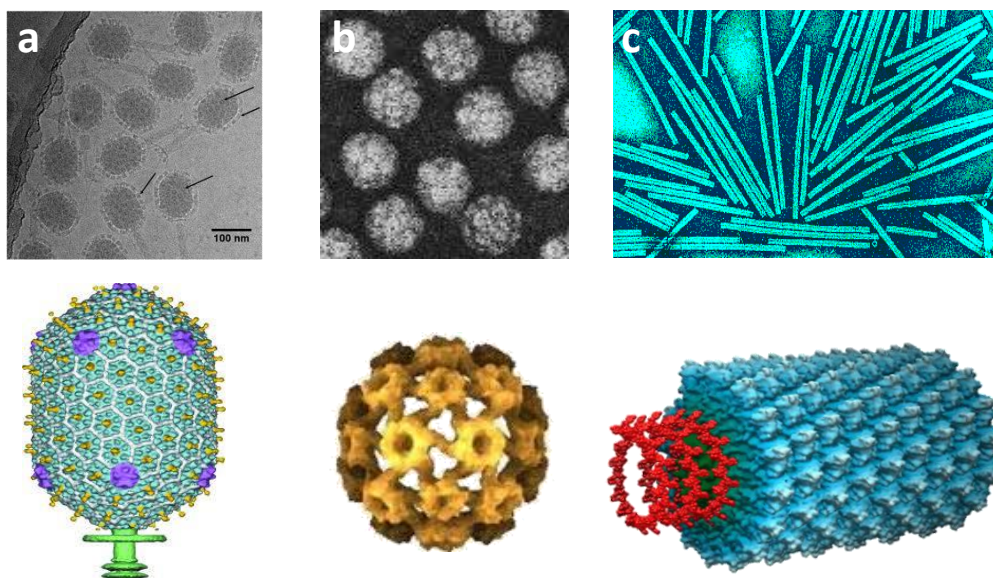


Figura 1.3: Virus. Ejemplo de las diferentes formas que pueden adoptar las cápsidas virales. En la parte superior de la figura se muestran imágenes de Microscopías Electrónicas de Transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) y en la inferior sus correspondientes reconstrucciones realizadas mediante cryo-EM. a) Virus T4 como cápsida icosaédrica [26]. b) Virus TYMV como cápsida esférica [27] y c) Virus del mosaico de tabaco (TMV) como cápsida helicoidal [28].

El tamaño y forma que alcanzan las cápsidas víricas es variable y será predeterminado durante el proceso de ensamblaje y si procede, durante la maduración posterior. El proceso de maduración de un virus se define como la evolución estructural y molecular desde el primer autoensamblado de proteínas (la *precabeza* o *procápsida*) hasta el empaquetamiento final del material genético para dar lugar a una partícula con capacidad de infección (el virión). Durante la maduración de la cápsida las interacciones químicas que unen las proteínas que la forman pueden modificarse y junto con los cambios conformacionales, pueden provocar cambios en su tamaño y forma. Existen virus que a lo largo de su maduración, aumentan el diámetro de la cápsida y pierden esfericidad acentuando su forma icosaédrica. Las cápsidas víricas maduras con una estructura icosaédrica son las que predominan en la naturaleza. ¿Por qué icosaédricas?. Una posible explicación a esta pregunta podría encontrarse en que los icosaedros presentan el volumen más parecido a una esfera, por lo que tienen máximo volumen y mínima superficie. En el caso de los virus, en los cuales toda su estructura ha sido optimizada durante la evolución, les permitirá encerrar el genoma exponiendo la mínima superficie frente a posibles agresiones fisicoquímicas. En algunos casos, los virus son

capaces de empaquetar cantidades de material genético de micras de longitud en cápsidas de sólo unas pocas decenas de nanómetros en diámetro.

Un icosaedro es un poliedro de 20 caras, 12 vértices y 30 aristas; siendo *regular* si las veinte caras son triángulos equiláteros. En una cápsida icosaédrica se pueden definir tres ejes de simetría rotación: de orden 5, 3 y 2 como se muestra en la figura 1.4. Los ejes de simetría de orden 5 conectan con el centro de la cápsida con cada uno de los 12 vértices del icosaedro; los ejes de simetría de orden 3 atraviesan los centros de cada cara del icosaedro y los ejes de simetría de orden 2 pasan por el centro de cada una de las 30 aristas del icosaedro.

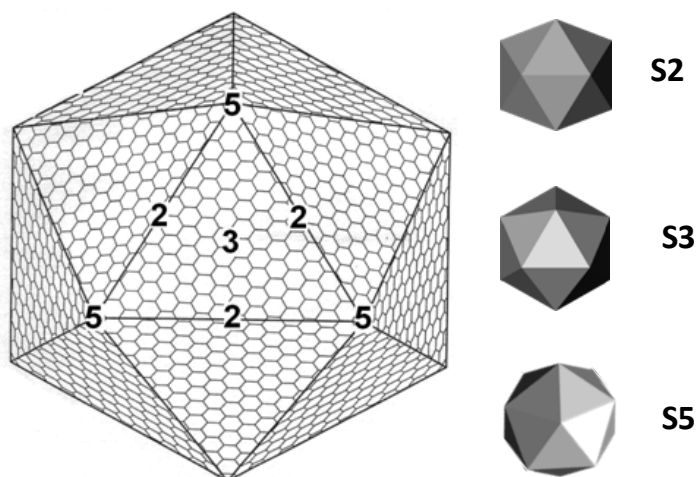


Figura 1.4: Orientaciones del icosaedro. Dibujo esquemático de los diferentes ejes de simetría rotacionales de un icosaedro. Orden 2 (S2), orden 3 (S3) y orden 5 (S5).

Las cápsidas se forman por asociación de subunidades o monómeros de proteína, por lo que una cápsida icosaédrica con 12 vértices pentagonales, en el caso más sencillo, sólo podrá estar formada por 60 de estas subunidades (en ocasiones denominadas *protómeros*).

En 1956 Watson y Crick [29], teniendo en cuenta consideraciones teóricas, desarrollaron una teoría sobre la construcción de las cápsidas víricas. Básicamente se explicaba que para formar estas estructuras sólo se requieren unidades idénticas. Tras el descubrimiento de nuevos virus, se observó que para la formación de algunas estructuras

se requerían más de 60 unidades. En 1962 Caspar y Klug [30] exponen la *Teoría de Cuasiequivalencia* que, básicamente muestra que en un icosaedro no todas las interacciones son idénticas, por lo que las subunidades no tienen por qué ser iguales. Es decir, se puede considerar que las subunidades idénticas formen hexámeros, situados en las caras y aristas del icosaedro, y pentámeros, situados en los vértices del mismo. Pero, ¿cuántas proteínas componen una cápsida vírica y como se organizan?

Esta teoría define una red de hexágonos a partir de la cual se crean sistemas con estructura icosaédrica (Figura 1.5 a y b). Usando esta red existe un número limitado de caminos para formar una estructura cerrada, ya que algunos de los hexámeros deben convertirse en pentámeros.

Este principio de la cuasi equivalencia, combinado con el concepto de *número de triangulación (T)*, nos proporciona una nomenclatura sistemática para describir la estructura así como las interacciones implicadas. El *número de triangulación* define el número de triángulos en el cual está subdividida la cara fundamental del icosaedro.

Consideramos una red hexagonal definida por un sistema de vectores h y k , siendo estos los que definen los vectores de una celda unidad. La longitud de estos vectores viene determinada por el número de pasos que hay que dar para moverse desde un vértice a otro del icosaedro. Se puede demostrar geoméricamente que:

$$T = k^2 + h^2 + kh \quad (1.1)$$

Donde h y k toman valores mayores o iguales a cero y T toma valores $T = 1, 3, 4, 7, 9, 12, \dots$

T nos proporciona el número de capsómeros y, por tanto, el número de subunidades. Sea cual sea T siempre hay 12 pentámeros, mientras que el número de hexámeros dependerá del número de subdivisiones. Así:

$$\text{Número de pentámeros} = 12$$

$$\text{Número de hexámeros} = 10(T-1)$$

$$\text{Número de subunidades totales} = n^{\circ} \text{ pentámeros} \times 5 + n^{\circ} \text{ hexámeros} \times 6 = 60T$$

El número de triangulación no sólo nos describe la geometría del virus sino también el número de conformaciones distintas.

El ejemplo más sencillo lo encontramos cuando los parámetros de red de proteínas son $h=0$ y $k=1$ ó $h=1$ y $k=0$. Esto implicaría que el número de triangulación es $T=1$ y que la cápsida está formada por 60 subunidades organizadas en 20 triángulos y 12 pentámeros, como es el caso del Virus Diminuto del Ratón (MVM) [31]. Si $h=1$ y $k=1$, entonces $T=3$ y la cápsida estaría formada por 180 subunidades proteicas, como el Bacteriófago T3 [32], como se indica en la figura 1.5c

La figura 1.5d muestra como ejemplo una cápsida en la cual se pueden definir como parámetros de red $h=2$ y $k=1$. Esto implicaría que el número de triangulación es $T=7$ y que el número de subunidades totales es 420. Estas subunidades, además, pueden estar colocadas de diferentes maneras:

- 140 trímeros (140 unidades morfológicas).
- 12 pentámeros y 60 hexámeros (72 unidades morfológicas).

Esta forma de organización proporciona una manera de incrementar los contactos entre subunidades, como se observó en el caso del Bacteriófago T7 [33].

No todas las cápsidas icosaédricas cumplen el principio de cuasiequivalencia. Muchos virus como herpes, adenovirus o fagos de ADN de cadena doble, sitúan sus proteínas en posiciones cuasiequivalentes. Desde un punto de vista estructural se habla del pseudo número de triangulación P en vez de T para indicar que las que las posiciones cuasiequivalentes no están ocupadas por la misma unidad estructural [34].

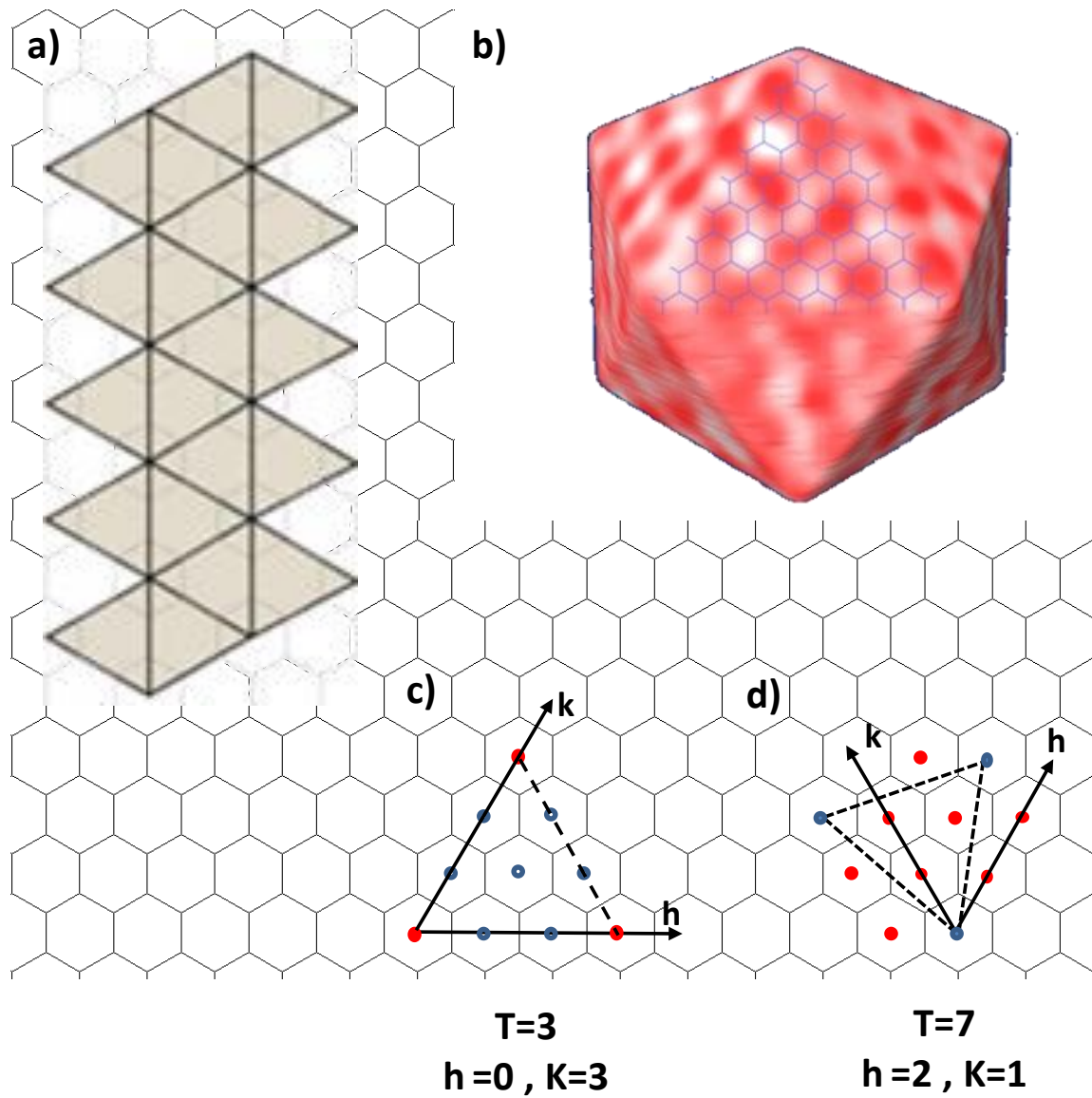


Figura 1.5: Numero de Triangulación. a) Caras fundamentales de un icosaedro sobre malla hexagonal. b) Reconstrucción tridimensional de un icosaedro. c) y d) Ejemplos de las caras fundamentales de cápsidas con número de triangulación $T=3$ ($h=0, k=1$) y $T=7$ ($h=2, k=1$), respectivamente.

1.2.2. Ciclo viral

Los virus se encuentran en el límite de lo que conocemos como organismos vivos, dado que fuera de la célula son inertes (carentes de metabolismo), pero tienen la capacidad para, una vez dentro de la célula, activar su metabolismo y utilizar la maquinaria de ésta para replicarse y producir sus proteínas virales. Son parásitos intracelulares obligados que, para poder reproducirse, necesitan de los mecanismos de replicación de una célula huésped.

En el ciclo biológico de un virus se pueden distinguir tres etapas importantes:

- *Fijación y penetración:* en la cual el virus se adhiere a la membrana de la célula huésped mediante un proceso de reconocimiento específico, en la mayoría de los casos a través de un receptor celular concreto. El objetivo final es introducir el material genético dentro de la célula.
- *Replicación:* Una vez depositado el material genético dentro de la célula se utiliza la maquinaria de replicación del huésped para obtener múltiples copias de los componentes virales: material genético y proteínas estructurales. Después estas componentes se autoensamblan y mediante un proceso de maduración dan lugar a nuevas partículas infecciosas, un virión.
- *Liberación:* salida hacia el exterior celular por un mecanismo de gemación o bien mediante un proceso de lisis celular. De este modo, las nuevas partículas virales reanudan el ciclo en busca de nuevas células a las que infectar.

La manera en la que estas etapas se desarrollan varía de un grupo a otro de virus. Por ejemplo, la etapa de fijación y penetración es diferente en virus eucariotas (infectan células con núcleo) que en virus procariotas (infectan células sin núcleo), como se describe de forma esquemática en la figura 1.6. En virus eucariotas la penetración del virus se produce vía endocitosis. Una vez dentro, comienza un proceso de desensamblaje de la cápsida para la liberación del material genético. Por el contrario, los virus procariotas, una vez que están adheridos a la membrana celular, crean una apertura o canal en la misma. Después, mediante un proceso de eyección y con la ayuda de proteínas

motoras, introducen todo el material genético dentro de la célula abandonando la cápsida vacía fuera de la misma.

En el caso de los bacteriófagos, a lo largo de su ciclo viral, podemos distinguir diferentes tipos de partículas víricas: *virión*, partícula completa con capacidad infectiva; *cápsida*, cubierta proteica; y *precabeza* o *procápsida*, primer ensamblado de proteínas tras la replicación (figura1.6).

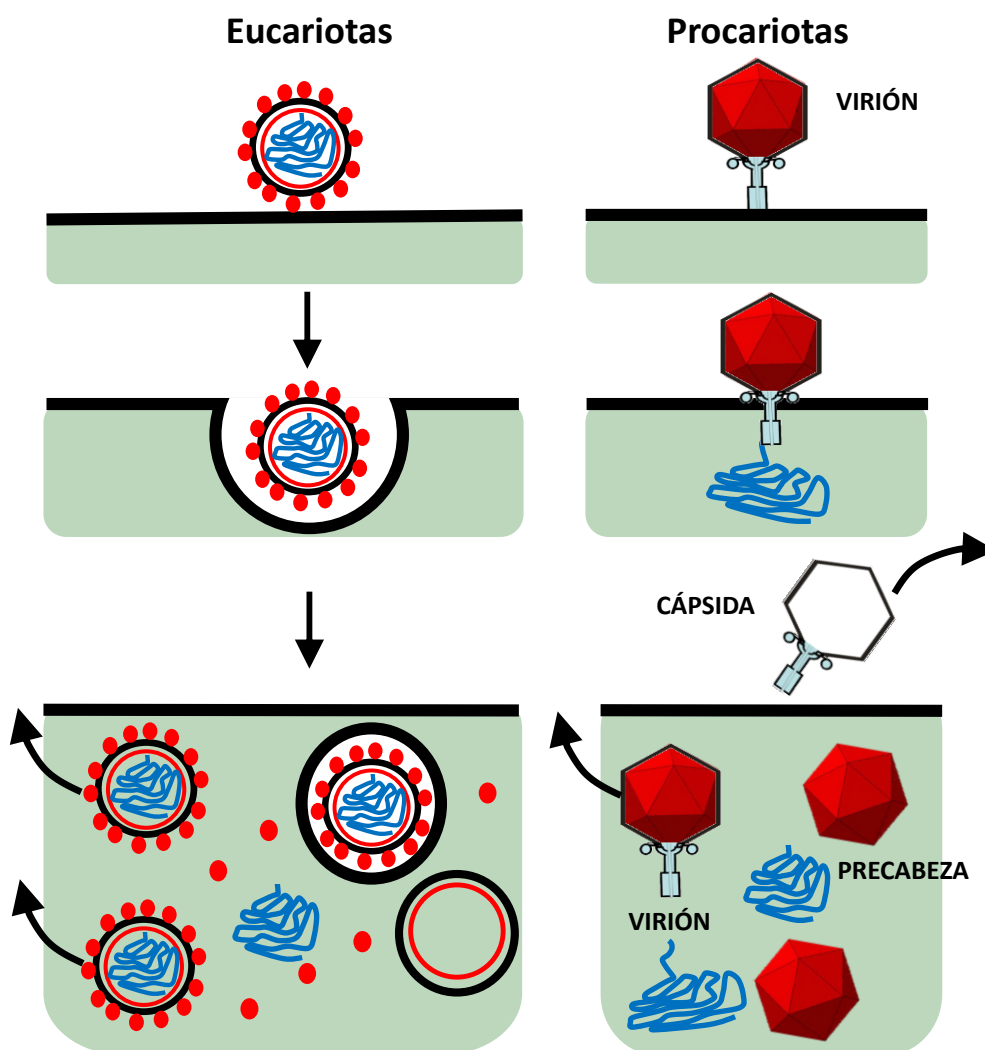


Figura 1.6: Ciclo viral. Ciclos de infección de virus eucariotas (izquierda) y procariontes (derecha). Los virus eucariotas se introducen dentro de la célula huésped vía endocitosis para poder replicar su material genético. Por el contrario los virus procariontes inyectan el ADN desde el exterior a través de una brecha formada en la membrana celular.

1.3. La Microscopía de proximidad

Los microscopios de proximidad (en inglés *Scanning Probe Microscopy*; SPM), tienen su origen en el perfilómetro de contacto, inventado en 1929 por Gustav Smachlz [35]. Este instrumento reconocía, mediante una sonda afilada al final de una microcaplana, los cambios de altura entre dos puntos de una superficie, -al igual que el bastón de una persona incapacitada de visibilidad detecta cambios de altura en una superficie-, y los registraba en un papel.

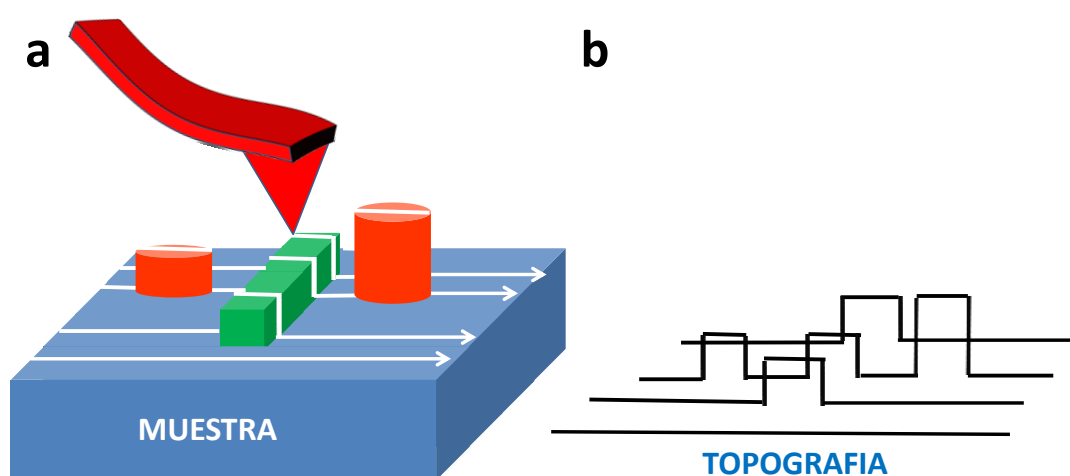


Figura 1.7: Microscopio de proximidad. a) Visualización de la forma de operación de un microscopio de proximidad que barre una superficie a lo largo de líneas paralelas dando como resultado una imagen tridimensional de la topografía de la superficie como se observa en b).

Unos años después, en 1972 R. Young [36] mejora el perfilómetro introduciendo el uso de cerámicas piezoeléctricas como soporte de las muestras y poder rastrear su superficie en las direcciones X, Y y Z. De esta forma, consiguió imágenes tridimensionales de la muestra con una resolución en la dirección perpendicular a la superficie de unos pocos nanómetros (3nm) (figura 1.7).

En 1981, basándose en el funcionamiento de este tipo de dispositivo, Gerd Binnig y Heinrich Rohrer, que en aquella época estaban trabajando para IBM (Zurich, Suiza), desarrollan el Microscopio de Efecto Túnel (en inglés *Scanning Tunneling Microscope*;

STM); por el cual, junto a E. Ruska, obtuvieron en 1986 el Premio Nobel de Física. Esta técnica se basa en establecer una corriente túnel entre una punta y una muestra.

Un sistema de realimentación varía la distancia entre la punta y la muestra para mantener constante la corriente túnel entre ambas, proporcionando la correspondiente imagen de topografía. Gracias a este dispositivo, se obtuvieron por primera vez imágenes de superficies con resolución atómica [37]. Dos años después y gracias a los conocimientos del Profesor Arturo. M Baró, se observó por primera vez utilizando STM, la topografía de una muestra biológica; el bacteriófago $\phi 29$ [38].

Dado que el STM exigía como condiciones de trabajo que la muestra y la punta fuesen de material conductor o semiconductor, hubo un gran interés por el desarrollo de otro microscopio de proximidad en el cual estas condiciones no fuesen requeridas. Así, en 1986 aparece el primer Microscopio de Fuerzas Atómicas, (en inglés *Atomic Force Microscope*; AFM) [39]. Este microscopio presentaba además una ventaja adicional frente al STM, dado que permitía observar muestras en medio líquido, es decir, en estado fisiológico para las muestras biológicas. La manera de operar de este microscopio está basada en las fuerzas de interacción que existen entre la punta, situada en el extremo de una micropalanca, y la muestra.

1.3.1. Fundamentos de la microscopía de fuerzas atómicas

Como se ha mencionado, el AFM basa su funcionamiento en las fuerzas de interacción existentes entre una punta y una muestra a estudiar. Cuando la punta se acerca a la muestra experimenta fuerzas de interacción que producen la deflexión de la micropalanca (en inglés *cantilever*) en cuyo extremo está situada la punta. Esta deflexión o señal de fuerza, es utilizada como señal de realimentación. Se fija un valor de deflexión que se mantiene constante, para lo cual el sistema de realimentación varía la distancia entre la punta y la muestra, moviendo el piezo Z para mantener esta fuerza constante. Estos cambios en la distancia dan lugar a la construcción de una imagen de topografía de la superficie. Dado que la realimentación se realiza sobre la señal de deflexión, el AFM se puede utilizar en vacío, aire o medios líquidos. El tipo de fuerzas de interacción varía según el medio en el cual estemos trabajando y de la naturaleza de la punta y la muestra.

Las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra se pueden describir mediante un potencial intermolecular de tipo Lennard-Jones $W(r)$. Este potencial está constituido por interacciones atractivas y repulsivas y depende de la distancia de separación r entre ambas (figura 1.8). Las fuerzas de largo alcance atractivas son: las fuerzas de van der Waals (vdW) (siempre presentes), fuerzas electrostáticas de Coulomb o fuerzas capilares. Las fuerzas de corto alcance repulsivas son: las fuerzas de interacción química y fuerzas de contacto.

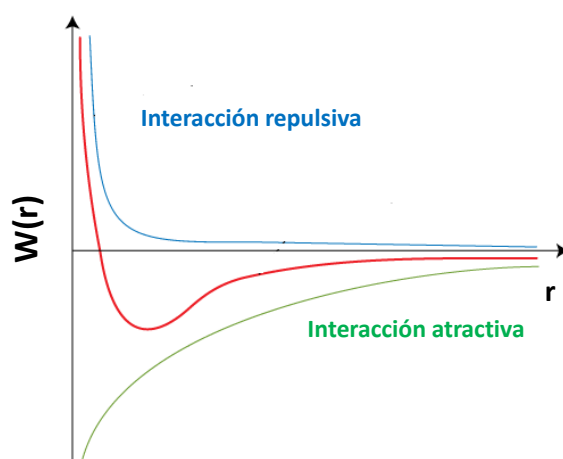
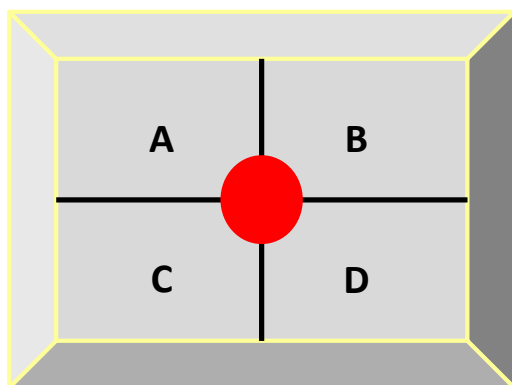


Figura 1.8. Potencial de interacción punta-muestra. Interacciones repulsivas (línea azul) y atractivas (línea verde). Potencial de interacción intermolecular resultante $W(r)$ como función de la distancia entre la punta y la muestra r (línea roja).

Para detectar la deflexión producida en la micropalanca (en inglés, *cantilever*), ésta se focaliza con un haz de luz que proviene de una fuente láser. El haz incidente se refleja en la parte superior y extrema de la micropalanca, e incide sobre un fotodetector. El fotodetector, o fotodiodo, está segmentado en cuatro sectores (A, B, C y D) como se muestra en la figura 1.9. El valor de la deflexión en las direcciones normal y lateral se se obtiene mediante las expresiones dadas en la figura 1.9.



$$F_{\text{Normal}}=(A+B)-(C+D)$$

$$F_{\text{Lateral}}=(A+C)-(B+D)$$

Figura 1.9: Fotodetector. Fotodiodo de cuatro sectores.

Los valores de fuerza normal y lateral normalmente son registrados en unidades de voltaje (V). Para obtenerlos y convertirlos a unidades de fuerza, Newtons (N), necesitamos conocer la sensibilidad del fotodiodo y la constante elástica de la micropalanca: en nm/V y nN/nm, respectivamente. El valor de la sensibilidad viene dada por la relación que existe entre el voltaje detectado en el fotodiodo por cada nanómetro que se deflexiona la micropalanca. Para obtener este valor la micropalanca se deforma sobre una superficie dura.

Si consideramos la micropalanca como un oscilador armónico lineal su deformación (d) puede ser descrita por la ley de Hook (ecuación 1.2). Calculando sus fluctuaciones térmicas en torno a su posición de equilibrio y aplicamos el Teorema de Equipartición (ecuación 1.3) podemos obtener el valor de su constante elástica (k_L) [40].

$$F = k_L * d \quad (1.2)$$

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k_L \langle d^2 \rangle \quad (1.3)$$

$$k_L = \frac{k_B T}{\langle d^2 \rangle} \quad (1.4)$$

Puesto que una micropalanca es un oscilador armónico esta viene descrita también por su frecuencia de resonancia a través de la expresión $\omega_0 = \sqrt{\frac{k_L}{m_{eff}}} = 2\pi f_0$

Otra forma de obtener el valor de su constante elástica K_L a partir de su frecuencia de resonancia ω_0 y sus dimensiones es aplicando el método desarrollado por Sader [41].

$$k_L = 0.1906\rho b^2 L Q \omega_0^2 2\Gamma_i^f f(\omega_f) \quad (1.5)$$

Donde L , b , ω_0 , y Q son: la longitud, el ancho, ω_0 y Q son la frecuencia de resonancia y el factor de calidad del modo fundamenta, respectivamente. Y ρ y Γ_i^f son la densidad del fluido y la parte imaginaria de la función hidrodinámica que depende del número de Reynolds.

De esta forma, y haciendo uso del carácter elástico lineal de la micropalanca ($F=k \cdot d$), podemos convertir los voltios detectados en el fotodiodo en unidades de fuerza (N) aplicando la ecuación 1.6.

$$F(nN) = k \left(\frac{N}{m} \right) \cdot \text{deflexión (V)} \cdot \text{sensibilidad} \left(\frac{nm}{V} \right) \quad (1.6)$$

Existe una amplia variedad de micropalancas que varían su longitud, tamaño, material, forma, constante de muelle, etc. De forma general podemos decir que la longitud de la micropalanca es del orden de decenas-centenas de micras. Están fabricadas de silicio o nitruro de silicio, recubiertas por un material reflectante (oro) y suelen ser rectangulares o triangulares. La punta situada en un extremo finaliza en unos pocos nanómetros de diámetro y pueden tener forma cónica o piramidal.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos utilizado principalmente micropalancas rectangulares (figura 1.10).

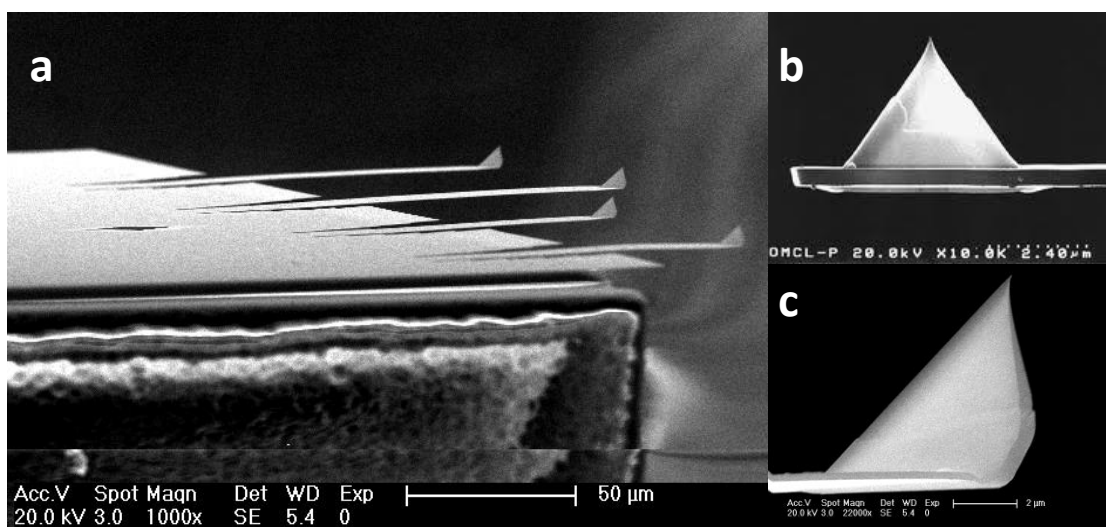


Figura 1.10: Micropalancas. a) Imagen de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM) de un chip de cuatro micropalancas rectangulares. b) Imagen de SEM de la punta de una micropalanca ORC800-PSA de Olympus cuya constante de fuerza varía de 0.05-0.76 N/m. c) Imagen de SEM de la punta de una micropalanca BL-RC150VB de Olympus cuya constante de fuerza varía de 0.006-0.03 N/m.

Para poder medir la muestra en las direcciones X, Y y Z, ésta se sitúa sobre un sistema piezoeléctrico tubular. Estos materiales se contraen o expanden cuando están sometidos a una diferencia de potencial. La realimentación en el eje Z se encarga de mantener la deflexión constante de la micropalanca. Los voltajes aplicados al piezoeléctrico en los ejes X e Y permiten el movimiento a lo largo del plano XY y seleccionar el área de escaneo de la muestra colocada sobre él. Este tipo de sistema de piezoeléctricos permite controlar la posición de la muestra con una precisión por debajo del nanómetro.

Todos los sistemas mecánicos están conectados a un controlador (unidad electrónica) comunicado con un ordenador mediante un procesador de señales digitales, DSP (*Digital Signal Processor*). En esta tesis se ha utilizado un microscopio de Nanotec Electrónica S.L., controlado para su utilización a través del software WSxM [42]. La figura 1.11 muestra un esquema de las componentes básicas de un AFM (figura 1.11a) y una imagen del AFM utilizado durante el desarrollo de esta tesis (figura 1.11b).

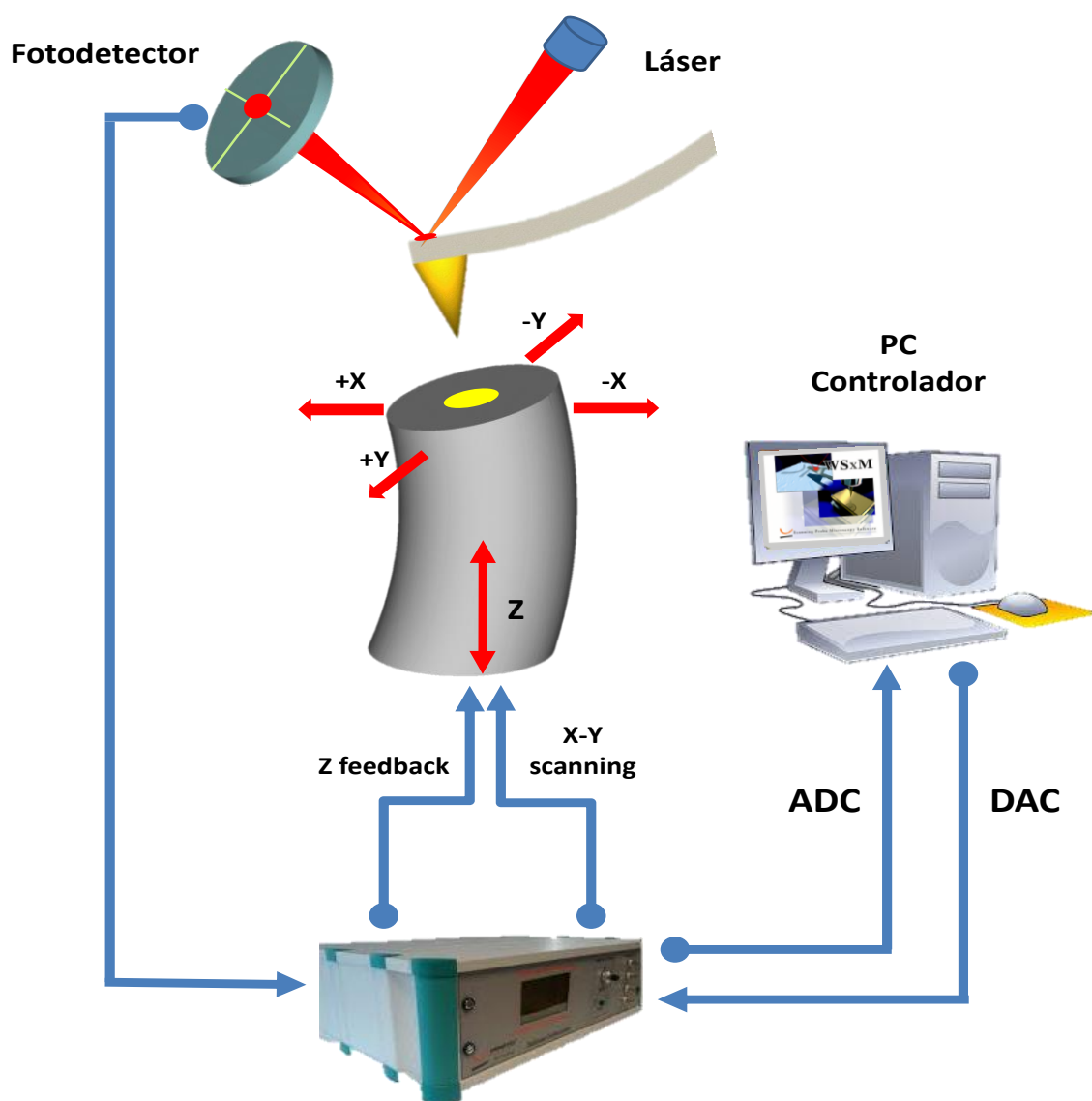


Figura 1.11a: AFM. Esquema de los principales componentes de un AFM. Láser, micropalanca, fotodetector, tubo piezoeléctrico, unidad electrónica, procesador de señal digital (DSP) y ordenador (PC) que controla el sistema.

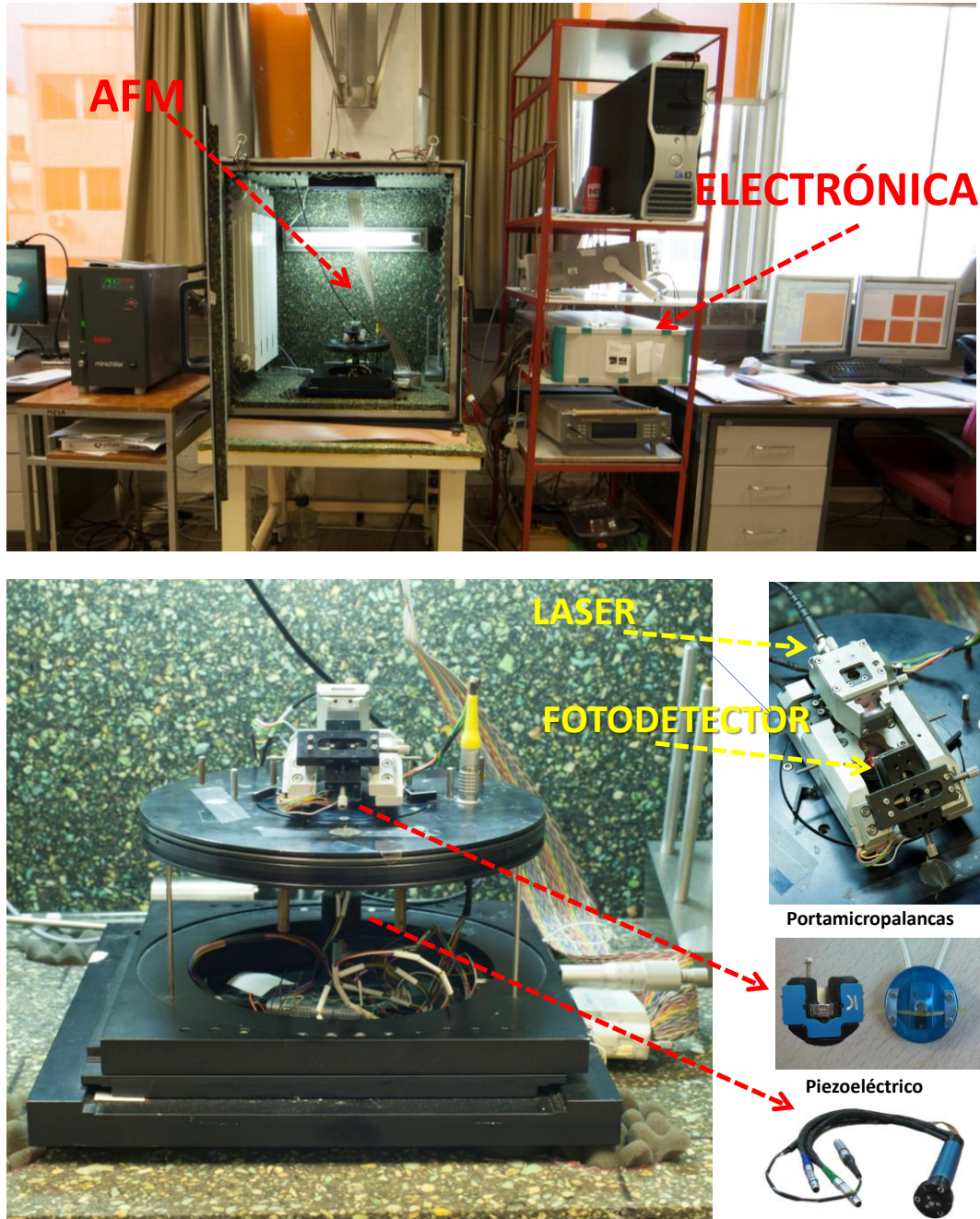


Figura 1.11b: Imagen del sistema de AFM utilizado en esta tesis. Componentes básicos del sistema: AFM, unidad electrónica- PC para controlar el sistema. Láser, fotodetector, portamicropalancas (aire y líquido) y tubo piezoeléctrico.

1.3.2. El microscopio de fuerzas atómicas y sus aplicaciones a sistemas biológicos

El microscopio de fuerzas atómicas (AFM) es una técnica versátil dada su fácil adaptación a la realización de experimentos. Aunque en sus principios fue diseñado para estudiar superficies aislantes y duras en condiciones de vacío o ambiente, las necesidades existentes y sus nuevas posibles aplicaciones, hicieron que esta técnica evolucionara para la realización de medidas en medio líquido, permitiendo el estudio de biomoléculas en condiciones fisiológicas que, generalmente, se trata de un medio acuoso con una pequeña concentración de sales. Así, el AFM en medio líquido puede ser considerado como una técnica complementaria porque aporta información distinta que las técnicas de volumen o “*bulk*”.

Cuando se realizan experimentos con AFM sobre biomoléculas individuales o pequeños ensamblados de proteínas se deberían tener en cuenta algunas consideraciones. Los materiales biológicos presentan un bajo módulo de Young. La presión ejercida por la punta cuando entra en contacto con éstos, puede ser del mismo orden de magnitud que el módulo de Young. Por tanto sólo son capaces de soportar fuerzas bajas, del orden de unos cientos de (pN), que deben ser controladas. Las biomoléculas deben ser adsorbidas en una superficie, por lo que hay que tener en cuenta las posibles interacciones biomolécula-superficie que se producen entre ambas.

Por el contrario podemos decir que el AFM puede proporcionar imágenes de topografía 3D de moléculas individuales con una resolución de unos pocos nanómetros que puede ser comparable a las imágenes de microscopía electrónica. Al aplicar bajas fuerzas, utilizando los modos de medida apropiados como pueden ser el “*jumping mode plus*” [43] o los modos dinámicos [44], se impide que las muestras sean dañadas durante el muestreo y permite que puedan ser observadas en medio fisiológico.

El AFM, como hemos mencionado anteriormente, permite obtener información acerca de propiedades físicas como pueden ser la constante elástica, la densidad de carga superficial, la constante dieléctrica, la estabilidad mecánica, etc.

Mediante espectroscopia de fuerzas, a partir de curvas Fuerza vs. Distancia (F vs. D), se pueden obtener las propiedades mecánicas y electrostáticas de estos sistemas [45], y a través de experimentos de estiramiento se realizan estudios de des plegamiento de proteínas [46, 47]. De forma más detallada se estudian la interacción entre la muestra biológica y diferentes sustratos y su evolución temporal, incluso la interacción con otra biomoléculas que pueden ser situadas en la punta.

Diversos grupos han utilizado esta técnica para el estudio de las propiedades mecánicas de los virus encontrando que estas dependen de factores variados como pueden ser: la cantidad de genoma empaquetado en el bacteriófago Lambda [48], la interacción DNA-cápsida en el virus MVM [49], del estado de maduración en que se encuentra la cápsida viral en el fago HK97 [50] o del entorno iónico en el que se encuentran [51].

A lo largo de esta tesis nos hemos centrado en el estudio de las propiedades mecánicas y la estabilidad de las partículas víricas que aparecen durante el ciclo biológico de tres bacteriófagos. El AFM ha sido la herramienta principal en el desarrollo de este estudio. Se han utilizado diferentes modos de operación de AFM para obtener información de nuestro sistema objeto, así como modelos teóricos y simulaciones para describir e interpretar los resultados experimentales obtenidos, como se explicará con más detalle en los sucesivos capítulos.

1.3.3. Modos de operación

El microscopio de fuerzas atómicas puede operar en diferentes modos, que dependen de las fuerzas de interacción que se establecen entre la punta y la muestra (figura 1.8). Si las interacciones que predominan son fuerzas repulsivas o de corto alcance se trabaja en un régimen de contacto, mientras que si las fuerzas que predominan son atractivas o de largo alcance se trabaja en régimen de no contacto [52].

Los modos en los que opera el AFM se pueden clasificar en: Modos Estáticos, como el modo contacto (*Contact Mode*, CM); modos dinámicos (*Dynamic Mode AFM*, DAFM) como modulación en amplitud (*Amplitude Modulation*, AM-DAFM) y modulación en frecuencia (*Frequency Modulation*, FM-DAFM); y los modos cuasi-estáticos como son el modo de salto (*Jumping Mode*, JM) y peak-force.

Modo Contacto:

El CM es el primer modo de operación de medida que se desarrolló para este tipo de microscopía. En este modo, las interacciones entre la punta y la muestra son de carácter repulsivo, por lo que para obtener imágenes de la topografía de la superficie se utiliza como condición de realimentación que la deflexión de la micropalanca sobre la superficie sea constante. Este modo es altamente eficaz para la observación de materiales inorgánicos que posean gran dureza y estabilidad. Hay que tener presente que aunque la fuerza normal aplicada durante el barrido puede ser pequeña (del orden de pN), existe otra fuerza, la de torsión o lateral; cuyo valor puede alcanzar un orden de magnitud superior al de la fuerza normal [53]. Por eso el CM no ofrece grandes ventajas para la observación partículas individuales de material biológico y sólo se utiliza cuando éstas se encuentra en forma de cristal.

Modos Dinámicos:

Los modos dinámicos se caracterizan porque la micropalanca se mantiene oscilando cerca o en la frecuencia de resonancia fundamental ω_0 . La micropalanca es excitada por la acción de una señal externa periódica y con la misma frecuencia ω_0 . Este modo de operar minimiza las fuerzas laterales [52]. Los modos dinámicos vienen descritos por la amplitud de oscilación A , la frecuencia de oscilación ω y el desfase ϕ entre la señal de excitación y la respuesta de la micropalanca.

El movimiento de oscilación de la micropalanca se puede describir de forma simple como un oscilador armónico no lineal amortiguado. Este sistema se puede describir por las siguientes ecuaciones:

$$m\ddot{q} + \gamma\dot{q} + kq = F_{ts} + F_0\cos(\omega t) \quad (1.7)$$

donde q es la posición de la micropalanca, k la constante de fuerzas, m la masa del sistema, ω la frecuencia de la señal excitadora, γ el factor de amortiguamiento (*damping*), F_0 la amplitud de excitación y F_{ts} la fuerza de interacción entre la punta y la superficie.

Cuando $F_{ts}(q) = 0$, es decir no existen fuerzas de interacción, se puede describir el sistema como un oscilador armónico forzado y amortiguado. La solución a la ecuación 1.7 viene dada entonces por:

$$q(t) = Be^{-\alpha t} \cos(\omega + \beta) + A\cos(\omega t - \phi) \quad (1.8)$$

$$2\beta = \frac{\gamma}{m} \quad (1.9)$$

La solución tiene un término transitorio y uno estacionario. El término estacionario es una función sinusoidal armónica, cuya dependencia con la amplitud (F_0), la frecuencia (ω) y el desfase (ϕ) con la señal de excitación se puede escribir como:

$$A(\omega) = \frac{\frac{F_0}{m}}{\left[\omega_0^2 - \omega^2 + \left(\frac{\omega\omega_0}{Q}\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}} \quad (1.10)$$

$$\tan(\phi) = \frac{\frac{\omega\omega_0}{Q}}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad (1.11)$$

Donde ω_0 es la frecuencia natural de la micropalanca, Q es el factor de calidad y ω la frecuencia con la que se excita la micropalanca.

El factor de calidad Q de un sistema oscilatorio viene definido por

$$Q = \frac{\omega_0}{2\beta} = \frac{m\omega_0}{\gamma} \quad (1.12)$$

Se observa por las ecuaciones 1.5 y 1.12 que la frecuencia de resonancia ω_0 y el factor de calidad Q, dependen del medio en el que estemos trabajando, aire, líquido o vacío. Por ejemplo, como se ve en la figura 1.12, una punta con un Q=15 en aire puede alcanzar un Q=1.6 en líquidos (BL-RC150VB de Olympus $k = 0.03\text{N/m}$, $f_r = 30\text{kHz}$). Por el contrario una punta con $Q = 450$ en aire aumentará a un $Q= 19000$ en vacío (Nanosensors PPP-NCH $k = 20\text{-}40\text{N/m}$, $f_r = 204\text{-}497\text{ KHz}$).

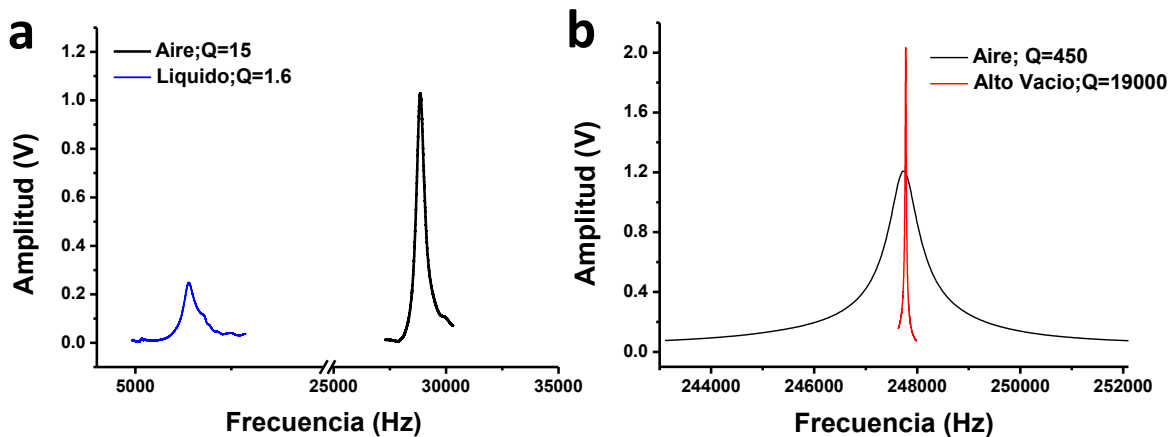


Figura 1.12: Frecuencia de resonancia y factor de calidad Q: Curvas experimentales del espectro de la oscilación para a) una micropalanca de $k = 0.03\text{ N/m}$ en aire (curva negra) y en medio líquido (curva azul) y b) para una micropalanca de $k = 20\text{-}40\text{ N/m}$ en aire (curva negra) y condiciones de alto vacío (curva roja). Se observa que en medio líquido las micropalanca decrecen tanto su frecuencia de resonancia como su factor de calidad. Por el contrario, al pasar de aire a condiciones de alto vacío se produce un aumento significativo en el factor de calidad, pero no un cambio en frecuencia.

En este modo de operación, DAFM, la realimentación actúa sobre cualquiera de las señales de repuesta de la micropalanca. Así, la realimentación se puede aplicar en la amplitud, en la frecuencia y en la fase.

Dependiendo de las condiciones de barrido, de las características del medio y por tanto de las interacciones que se producen entre la punta y la muestra, los modos dinámicos pueden trabajar en condiciones de contacto intermitente (*Tapping Mode-DAFM*) o en condiciones de no contacto (*Non contact DAFM*).

El modo dinámico *FM-DAFM* (*Frequency Modulation*) se mantiene constante la amplitud y se registra las variaciones en la frecuencia de oscilación debida a la interacción entre la punta y la muestra. Este tipo de modo ha sido convencionalmente utilizado en condiciones de Ultra Alto Vacío (*Ultra High Vacuum, UHV*) llegando a obtener resolución atómica de la superficie [54] y aportando información sobre la naturaleza química de la muestra [55], En los últimos años se ha implementado a condiciones ambiente y medio líquido [56-58].

En el modo de *AM-DAFM* (*Amplitud Modulation*) la micropalanca se mantiene oscilando en su frecuencia de resonancia fundamental con una amplitud de oscilación fijada en unos pocos nanómetros, La amplitud de la oscilación es sensible a las interacciones que se producen entre la punta y la muestra. En este modo, dependiendo de las condiciones de barrido y de las fuerzas de interacción (atractivas o repulsivas) existentes, es posible mantener condiciones de no-contacto; siendo lo más habitual que la punta realice un contacto intermitente con la muestra (*Tapping Mode*).

En medio líquido la punta establece contacto intermitente con la superficie. Además, las fuerzas de interacción entre punta y muestra (F_{ts}) producen que la curva de amplitud muestre una forma asimétrica en su reducción, de modo que la deflexión promedio de la micropalanca es distinta de cero [44, 59]. En la figura 1.13 se muestra la deflexión observada de una micropalanca en función del desplazamiento Z del piezo tras realizar una curvas Fuerza vs. Z desplazamiento (F vs. Z) (a) en aire y (b) en medio líquido.

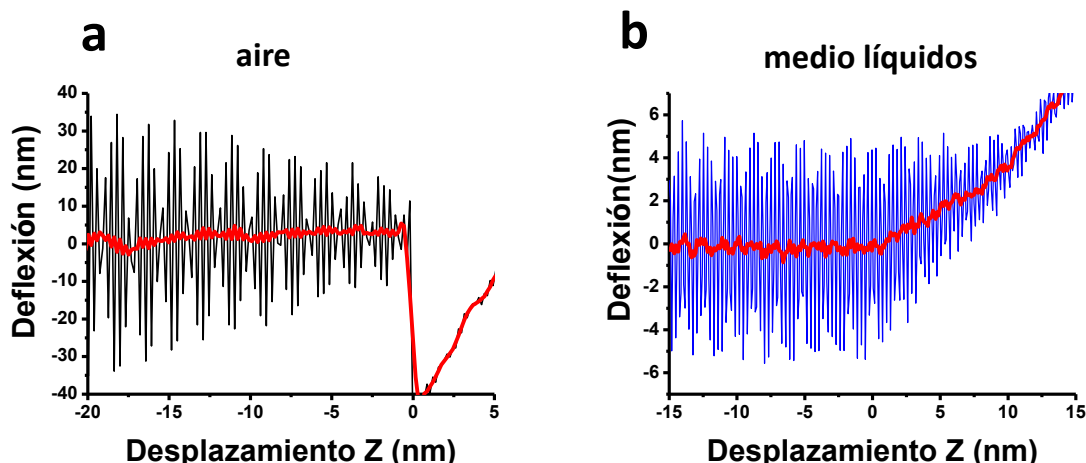


Figura 1.13: Comparación entre líquidos y aire. a) Curva de la deflexión de la micropalanca observada en aire (línea negra) y deflexión (línea roja) para una micropalanca de $k= 0.76\text{N/m}$ (RC800-PSA). b) Curva de la deflexión de la micropalanca observada en medio líquido (línea azul) y deflexión (línea roja) para una micropalanca de $k = 0.03\text{N/m}$ (BL-RC150VB). La deflexión promedio en medio líquido es distinta de cero.

Al final de cada ciclo de oscilación aparece una distorsión producida por el contacto intermitente, dando lugar a una fuerza pico F_{pico}^{rep} (ecuación 1.13) [44]. La distorsión está relacionada con el bajo factor de calidad Q que existe en medio líquido. Esta fuerza depende tanto de la constante elástica de la micropalanca k , la amplitud inicial A y de A_{ratio} , que es la razón entre la de amplitud reducida usada como realimentación (85-90% de A), como del factor Q de calidad de las micropalanca. Para una misma micropalanca y usando las mismas de amplitud A y A_{ratio} , las fuerzas picos son menores en aire que en líquidos.

$$F_{pico}^{rep} = 2^{\frac{-5}{2}} 3^{\frac{2}{3}} \pi^{\frac{2}{3}} k^{\frac{1}{3}} \left(\frac{k}{Q}\right)^{\frac{2}{3}} A(A_{ratio} - A_{ratio}^3)^{\frac{1}{3}} \quad (1.13)$$

Para una micropalanca con $k=0.03 \text{ N/m}$, $Q = 1.2$ en medio líquido, $A = 5\text{nm}$ y $A_{ratio} = 90\%$ se obtiene que el valor de esta fuerza la $F_{pico}^{rep} \sim 230\text{pN}$.

La micropalanca puede ser oscilada principalmente mediante excitación acústica, magnética o fototérmica [60]. A lo largo de esta tesis, hemos utilizado la excitación acústica y la excitación magnética.

En el modo de excitación acústica, la micropalanca se oscila a su frecuencia de resonancia a través de la vibración de un piezoeléctrico laminar, *dither piezo*. Mientras que en aire el espectro de resonancia muestra un pico en la frecuencia natural de la micropalanca, en medio líquido aparecen picos adicionales debido a la oscilación del piezoeléctrico. Esto da lugar a un “bosque de picos” o *forest peak* que dificultan la elección de la frecuencia de resonancia natural de la micropalanca [59] por lo que se han realizado mejoras para minimizar este bosque de picos [61].

En el modo de excitación magnética, una micropalanca recubierta de material magnético es excitada por la acción de un campo magnético alterno. Este tipo de excitación sólo se detecta el movimiento de la micropalanca, por lo que en el espectro de oscilación sólo aparece un único pico, que corresponde a la frecuencia natural de la misma. La magnetización de la micropalanca puede cambiar tanto su constante elástica como el radio de la punta, siendo esta último incrementado.

Modo de Salto

El modo de salto o *Jumping Mode* (JM) es el modo de operación de AFM más utilizado durante el desarrollo de esta tesis.

El modo de salto [62] surge al mismo tiempo que el modo de Fuerza Pulsada [63]. En esta forma de operación se realiza una curva F vs. Z en cada uno de los puntos de la superficie, de manera que es posible medir y controlar la fuerza que ejerce la punta sobre la muestra. Pocos años después diferentes empresas han desarrollado modos de operación similares como por ejemplo, *Peak-Force QNM*.

En cada una de las curvas F vs. Z realizadas podemos distinguir dos partes. La primera, corresponde a la aproximación de la muestra a la punta, durante la cual la realimentación es activada, y la segunda al retroceso o alejamiento de la muestra, en de la

cual la realimentación se desactiva. Para la aproximación se establece un determinado valor de fuerza normal o *set point*, por lo que el sistema cambiará la distancia entre la punta y la muestra hasta alcanzar lo. Una vez alcanzado, la realimentación se desactiva y se aleja de la muestra. En el punto más alejado, se desplaza lateralmente al punto contiguo de la imagen. De esta forma se minimiza la fuerza lateral. Por eso, de todos los modos operación del AFM, el JM puede considerarse *a priori* es el menos invasivo para el estudio en muestras blandas y biológicas.

Cada curva realizada viene descrita por parámetros que pueden ser ajustados a las características de la muestra:

La fuerza máxima aplicada por la punta o *set point*; la distancia máxima entre la punta y la muestra o *jump off*; el tiempo que la punta permanece a la máxima fuerza o *control cycles*; y el número de pasos necesarios para realizar cada curva o *jump sample*. El tiempo de adquisición de datos o de una imagen, está determinado principalmente por estos dos últimos parámetros.

La figura 1.14a muestra un ejemplo de una curva F vs. Z experimental realizada en aire con una micropalanca de constante de fuerza $K = 0.3 \text{ N/m}$. En el punto **A**, el piezo está retraído evitando que la punta toque la superficie de la muestra. A medida que el piezo comienza a estirarse (línea verde), la distancia entre la punta y la muestra disminuye. En el punto **B** debido a la presencias de las fuerzas de interacción atractivas, generalmente vdW y electrostáticas, la punta salta al contacto. Una vez en contacto mecánico el piezo continúa estirándose hasta alcanzar un valor máximo en el punto **C**. Este valor máximo viene determinado por el valor *set point* elegido. Seguidamente el piezoeléctrico comenzará a encogerse (línea roja) para aumentar la distancia entre ambas. En este proceso la micropalanca debe vencer la fuerza de adhesión que experimenta la punta. El origen de esta fuerza en aire es la formación de un menisco líquido entre ambas (figura 1.14c), mientras que en líquido esta fuerza es consecuencia a la diferencia de hidrofobicidad y de carga electrostática entre ambas (figura 1.14d). La fuerza de adhesión en medio líquidos es generalmente mucho menor que en aire (figura 1.14b). Por último el piezo detendrá su retroceso cuando alcance el punto **A**.

Aunque ya hemos sugerido que el modo de operación JM se propone como uno de los modos menos agresivo con muestras blandas, nosotros hemos observado cómo determinadas muestras han sido dañadas durante el barrido. En la mayoría de los casos el daño se producía debido a que el control de la fuerza (*set point* seleccionado) no era lo suficientemente preciso, porque la información del *feedback* provenía del punto anterior. Por ello, se ha decidido implementar un nuevo parámetro de control, *stop moving if limit is reached*. Gracias a este nuevo parámetro de control, *stop moving*, la punta detiene su acercamiento a la muestra una vez alcanzado otro *set point* adicional (*limit*) que nos sirve como parámetro de seguridad para no sobrepasar la fuerza que se desea aplicar [43].

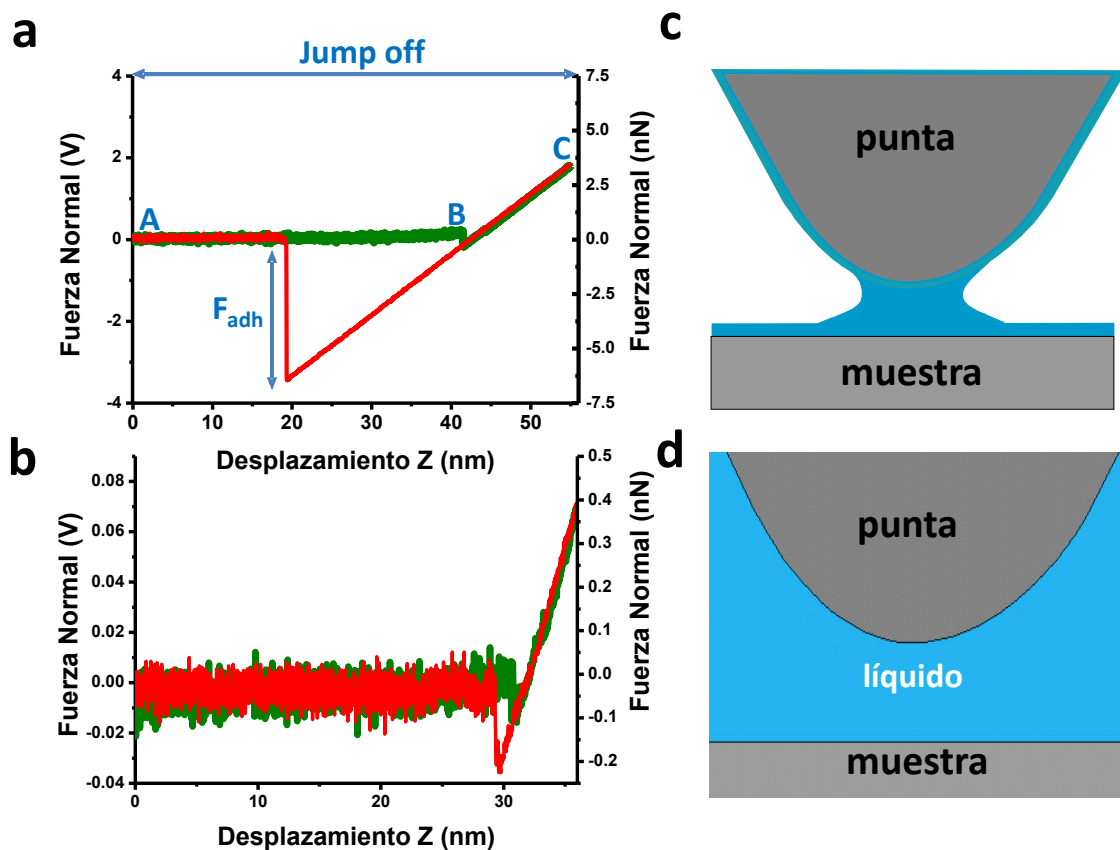


Figura 1.14: Jumping Mode. a) Curva experimental F vs. Z realizada con una micropalanca de $k = 0.3 \text{ N/m}$. Durante la curva de aproximación (línea verde) el piezoeléctrico se extiende progresivamente. La distancia entre la punta y la muestra empieza a reducirse hasta que la punta salta al contacto mecánico (B). La punta se deflexiona hasta un valor máximo de fuerza (C). Tras ello el piezoeléctrico se contrae (línea roja) hasta alcanzar su posición original (A). b) Curva experimental F vs. Z en medio líquido con una micropalanca de $k = 0.3 \text{ N/m}$. c) Dibujo de un menisco de agua formado entre una punta y la superficie. Parte de la fuerza adhesión que debe superar la punta es producida por el menisco de agua que se forma entre ambas. c) Dibujo de una punta sumergida en un medio líquido las fuerza de adhesión dependerá únicamente de las interacciones entre punta y muestra.

1.3.4. Caracterización de propiedades mecánicas mediante el AFM

La gran mayoría de los trabajos relacionado con los virus han tratado de correlacionar su estructura y los cambios que esta sufre durante su ciclo biológico con la función que desempeña. En este tipo de estudios las técnicas más frecuentemente utilizadas son cryo-EM y Rayos X. Como ya se mencionó, estas técnicas están dentro de las denominadas técnicas de volumen y proporcionan información promediada sobre la estructura a partir de un elevado número de partículas.

La caracterización de las partículas víricas con el AFM no sólo proporciona información sobre la estructura de las mismas, sino que, además, nos permite estudiar otras propiedades físicas como dureza, estabilidad mecánica, elasticidad o constante dieléctrica, a nivel de partícula individual, aportando de esta manera información complementaria en este tipo de estudios.

Como hemos mencionado anteriormente mediante el uso del AFM se pueden obtener propiedades físicas de partículas biológicas a efectos de moléculas individuales. Durante los últimos años numerosos grupos han intentado estimar propiedades mecánicas, electrostáticas y químicas usando métodos dinámicos como son AM-AFM [64, 65] FM-AFM [57], cuasi-estáticos como son *peaks-force-QMC* [66, 67] y *Force-Volume* [14] o estáticos mediante la realización de nanoindentaciones [68]. En general, en los métodos cuasi-estáticos, que quizás son los más sencillos de interpretar, la manera de proceder consiste en la realización de nanoindentaciones individuales en cada uno de los puntos del área de escaneo. En ambos casos, nanoindentaciones y *Force Volume*, se realizan curvas F vs. D de manera controlada sobre el objeto a estudiar. En estos dos últimos dependiendo de tipo de información que se desea obtener se tiene en cuenta la curva de ida, como es el caso de los experimentos de indentación [68] o la curva de vuelta, como es el caso de los experimentos de estiramientos sobre proteínas para estudiar su estabilidad mecánica [47, 69].

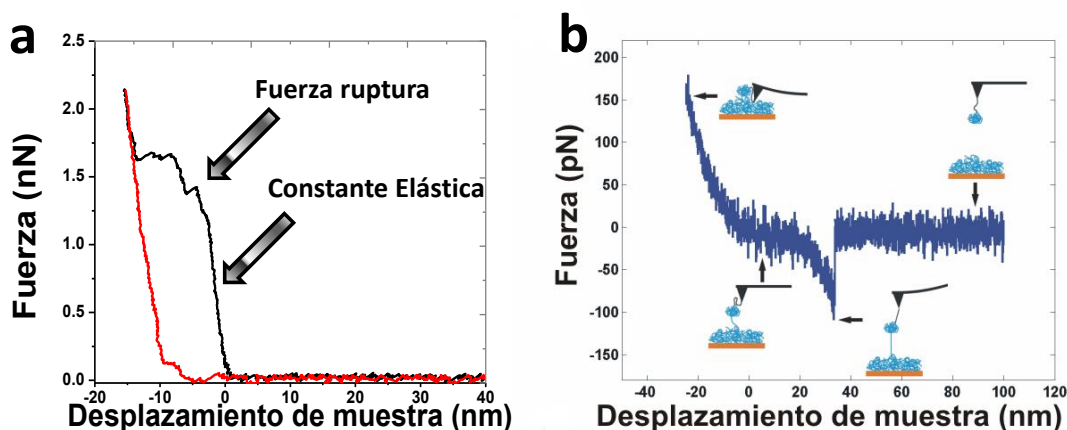


Figura 1.15: Curvas F vs. D realizadas sobre biomoléculas. a) Curva realizada sobre una partícula vírica de MVM. La curva de aproximación (negra) permite obtener información sobre la fuerza de ruptura y la constante elástica. Curva de separación (roja). b) Curva de separación realizada sobre una molécula de proteína Tau. En la curva se muestra un evento de ruptura precedido de un comportamiento elástico característico de la extensión de un polímero flexible. (Curvas cedidas por el Doctor Javier Sotres)

Mediante experimentos de indentación se realiza la caracterización mecánica de partículas víricas. La información mecánica obtenida mediante la realización de estos experimentos es: módulo de Young (E), constante de elasticidad (k), fragilidad mecánica, fuerza de ruptura, etc, como se observa en la figura 1.15a. La respuesta elástica de un objeto ante una fuerza aplicada puede ser lineal o no lineal. Dependiendo del comportamiento se pueden utilizar diferentes modelos que explican la respuesta mecánica ante la fuerza aplicada. Así, cuando la respuesta es no lineal, el comportamiento mecánico de la partícula objeto puede ser descrito por el modelo de contactos mecánicos elásticos de Hertz (ecuación 1.14), en el cual se describe cómo la fuerza es proporcional al cubo de la deformación realizada.

Por el contrario, si la respuesta es lineal con la deformación, la respuesta elástica a deformaciones del orden del espesor de la pared de la cubierta proteica puede ser descrita por el modelo "*Thin Shell*" o modelo de cáscara delgada [70] (ecuación 1.15). Este tipo de comportamiento ha sido el observado en partículas víricas.

Modelo Hertz: $F = \sqrt{\left(\frac{16RE^2}{9}\right)} \delta^{3/2}$ (1.14)

Thin Shell Model $F = k \cdot \delta$ (1.15)

Donde δ es la indentación, k constante elástica y E el Modulo de Young

En general, cuando realizamos una curva F vs. Z sobre nuestra partícula objeto, estamos midiendo directamente la deflexión que sufre la micropalanca cuando la punta deforma la partícula. Este sistema la micropalanca-partícula puede ser considerado como dos muelles en serie (k_{eff}). Si conocemos cuál es la constante de muelle de nuestra micropalanca (k_c) podremos obtener de nuestras curvas directamente la constante elástica de la muestra (k_v) a partir de las expresiones contenidas en la figura 1.16.

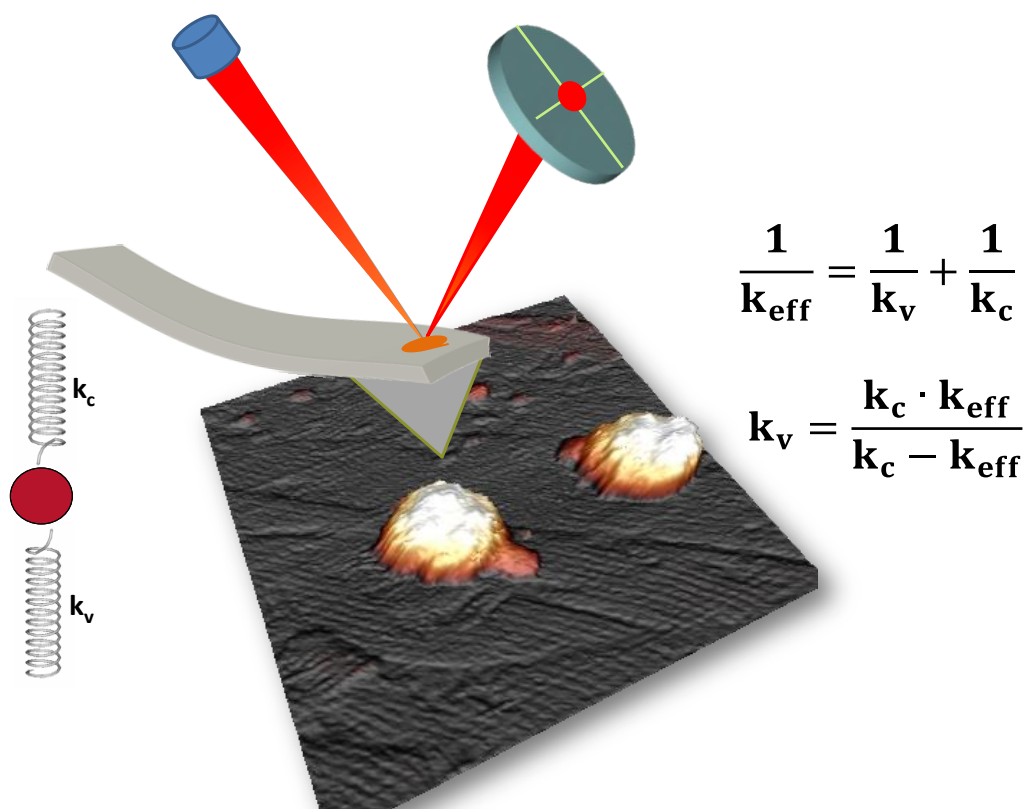


Figura 1.16: Constante Elástica. Representación esquemática de una nanoindentación realizada sobre una bacteriófago $\phi 29$. Se considera un sistema formado por dos muelles en serie.

Otra manera de expresar las nanoindentaciones realizadas es en términos de Fuerza vs. Indentación (F vs. I). La obtención de este tipo de curvas a partir de la F vs. Z requiere una pequeña transformación. La pendiente de esta curva F vs. I es la constante elástica objeto a estudiar.

$$\delta = Z_{piezo} - d \tag{1.16}$$

Donde δ es la indentación y d es la deflexión del cantiléver sobre el objeto a estudiar.

En la figura 1.17 se muestra un ejemplo de transformación de curva F vs. Z a F vs. I .

De esta forma es posible observar la deformación del objeto cuando aplicamos una fuerza determinada y el tipo de comportamiento como sistema mecánico. Si el comportamiento es lineal, la pendiente de esta curva corresponde a la constante elástica de la partícula en estudio.

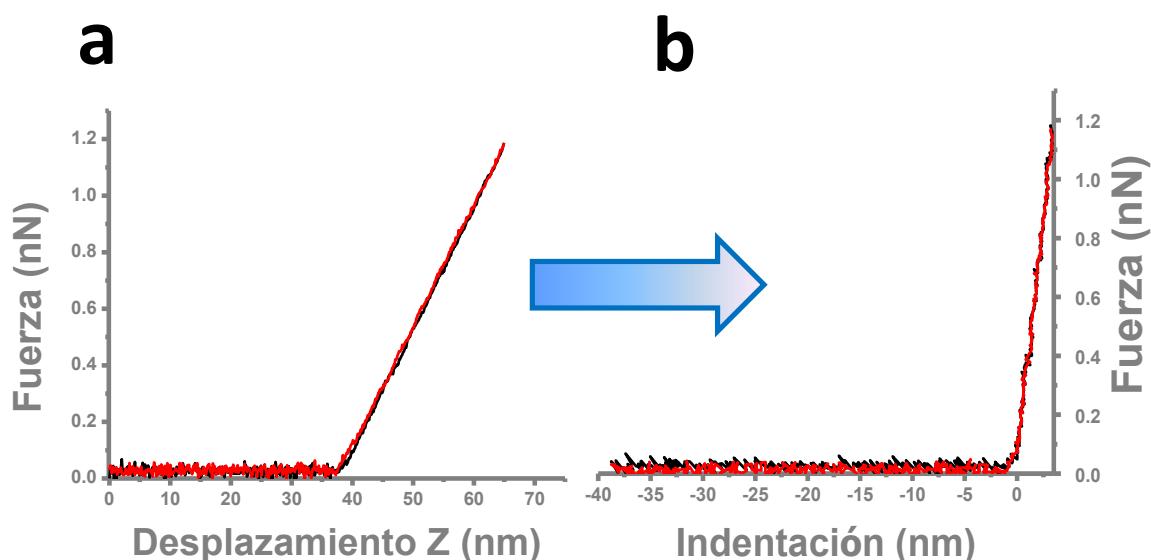


Figura 1.17: F vs. I . a) Curva F vs Z realizada sobre una partícula vírica. b) Misma curva en términos de indentación sobre la partícula.

A lo largo de esta tesis, nos hemos centrado en el estudio y en la caracterización de las propiedades mecánicas de las diferentes partículas de virus procariotas como son los bacteriófagos, y en particular, en la respuesta elástica, fragilidad y estabilidad. Los sistemas modelos estudiados han sido los bacteriófagos $\phi 29$, T7 y λ . A partir de estas propiedades intentaremos obtener información acerca del posible *stress* residual que estas estructuras soportan, la presión interna creada dentro del cápsida por la presencia del material genético en el interior o la estabilidad de sus estructuras.

1.4. Motivación

Los virus pueden ser considerados como los organismos más abundantes en la naturaleza. Se ha estimado que en la naturaleza existen alrededor de 10^{31} partículas virales [72], superando el número de bacterias en un orden de magnitud.

Los virus, durante su ciclo, están expuestos a diversos ataques físico-químicos. Para adaptarse a estas condiciones, han evolucionado modificando su estructura para alcanzar una mayor estabilidad. Estas modificaciones conllevan desde cambios conformacionales en las proteínas que componen la cápsida, como pueden ser giros y cambios de orientación, hasta variaciones en la forma y el tamaño. Estas reestructuraciones, que dependen de la ruta de maduración desarrollada por el virus, se manifiestan tanto en las propiedades físicas como en las químicas. Por tanto, los mecanismos desarrollados por estas nanomáquinas para adaptarse ante condiciones fisicoquímicas extremas y completar su ciclo viral, son complejos, a la vez que fascinantes.

Trabajos previos realizados en el virus MVM muestran la existencia de correlación entre las propiedades mecánicas de su estructura y la eficiencia infectiva de los viriones. La cubierta proteica es más flexible en la simetría que contiene los poros. Estos poros son los orificios por los cuales el DNA es liberado cuando se encuentra dentro de la célula. Además, la interacción del material genético con la cápsida producía un reforzamiento en zonas específicas de la misma.

Los bacteriófagos, al contrario que los virus eucariotas, no infectan desde el interior de la célula huésped, sino que lo hacen desde el medio extracelular. La eyección del genoma a través de la membrana bacteriana se realiza, en primer lugar, gracias a la energía almacenada por el ADN empaquetado, y en segundo lugar, por la ayuda de las proteínas que se encuentran en el interior de la bacteria. Las cápsidas de los bacteriófagos son muy resistentes a cambios fisicoquímicos: pH, temperatura, fuerza iónica, etc.. Estas cualidades junto con la bio-compatibilidad, fácil producción y rápida degradación, hacen que estas estructuras sean propuestas como nanocontenedores para la liberación de medicamentos o como posibles vacunas.

Los bacteriófagos que propusimos como estudio son $\phi 29$, T7 y λ puesto que maduran usando diferentes rutas. Conocer los cambios que se producen en la estructura de la cápsida para alcanzar la estabilidad aporta información crucial. Por un lado porque ayuda a entender la relación que existe entre las propiedades mecánicas y las funciones que realiza en su ciclo biológico, y por otro para conocer la capacidad de estos ensamblados proteicos para posibles aplicaciones en nanotecnología y biomedicina.

La estructura y los mecanismos de replicación de los bacteriófagos $\phi 29$ y T7 han sido profundamente estudiados por el grupo del Profesor José López Carrascosa (Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Madrid) en este mismo Campus. El bacteriófago λ se considera uno de los fagos más estudiados. El grupo de Profesor Carlos Enrique Catalano (University of Washington, USA) ha dedicado gran parte de su investigación al estudio del proceso de maduración de este virus. Puesto que las estructuras de estos tres fagos están muy bien descritas, podemos investigar la relación entre la estructura, la función y las propiedades mecánicas.

El microscopio de fuerzas atómica (AFM) se considera como una herramienta complementaria a las técnicas de volumen, ya que no puede competir en resolución con la criomicroscopía electrónica (cryo-EM), del orden de unos pocos Angstroms. En cambio el AFM proporciona información acerca de propiedades físicas como dureza, fragilidad, estabilidad, constante dieléctrica, carga superficial, etc, que no pueden ser observadas y medidas con las técnicas como TEM, cryo-EM, rayos X, calorimetría, etc. Además la ventaja que presenta el AFM, es que se puede obtener información a nivel de partícula individual. Trabajar con estos fagos nos permitirá comparar los diferentes mecanismos de estabilización de la cápsida utilizados por los virus y evaluar la eficiencia de los mismos.

1.5. Referencias

1. Feynman, R., *There's Plenty of Room at the Bottom*. American Physical Society, 1959).
2. Taniguchi, N., On the Basic Concept of 'Nano-Technology Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Part II, Tokyo, Japan Society of Precision Engineering, Part II, (18–23.) 1974).
3. Moody, M.F., Geometry of phage head construction. *Journal of Molecular Biology*, 293 (2): p. 401-433, (1999).
4. Carrasco, C., et al., The capillarity of nanometric water menisci confined inside closed-geometry viral cages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (14): p. 5475-5480, (2009).
5. Douglas, T. and M. Young, Viruses: Making friends with old foes. *Science*, 312 (5775): p. 873-875, (2006).
6. Douglas, T. and M. Young, Viral capsids as natural and synthetic molecular containers. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 232: p. 969-969, (2006).
7. de la Escosura, A., R.J.M. Nolte, and J.J.L.M. Cornelissen, Viruses and protein cages as nanocontainers and nanoreactors. *Journal of Materials Chemistry*, 19 (16): p. 2274-2278, (2009).
8. Pearson, K., *Biofísica*. Gram of Science., 470 (OED) 2892).
9. Veige, C. I., et al., The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nature Cell Biology*, 4(1): p. 59-65, (2001).
10. Ibarra, B., et al., Dna Unwinding Dynamics of a Processive DNA Polymerase. *Biophysical Journal*, 100 (3): p. 239-239, (2011).
11. Fuentes-Perez, M.E., et al., Using DNA as a Fiducial Marker To Study SMC Complex Interactions with the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal*, 102 (4): p. 839-848, (2012).
12. Carrasco, C., et al., Magnetic tweezers studies of AddAB: a molecular motor for repairing broken DNA. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 40: p. 215-215, (2011).
13. Peterman, E.J.G., H. Sosa, and W.E. Moerner, Single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy of biomolecular motors. *Annual Review of Physical Chemistry*, 55: p. 79-96, (2004).

14. Sotres, J. and A.M. Baro, DNA molecules resolved by electrical double layer force spectroscopy imaging. *Applied Physics Letters*,93 (10): p. 103903,(2008).
15. Mateos-Gil, P., et al., Depolymerization dynamics of individual filaments of bacterial cytoskeletal protein FtsZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,109 (21): p. 8133-8138,(2012).
16. Moreno-Herrero, F., et al., Characterization by atomic force microscopy of Alzheimer paired helical filaments under physiological conditions. *Biophysical Journal*,86 (1): p. 517-525,(2004).
17. Ortega-Esteban, A., et al., Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Scientific Reports*,3 (1434): p. 1-7,(2013).
18. Alcaraz, J., et al., Collective epithelial cell invasion overcomes mechanical barriers of collagenous extracellular matrix by a narrow tube-like geometry and MMP14-dependent local softening. *Integrative Biology*,3 (12): p. 1153-1166,(2011).
19. Alcaraz, J., et al., Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *Embo Journal*,27 (21): p. 2829-2838,(2008).
20. Ivanovska, I.L., et al., Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101 (20): p. 7600-7605,(2004).
21. Fumagalli, L., et al., Label-free identification of single dielectric nanoparticles and viruses with ultraweak polarization forces. *Nature Materials*,11 (9): p. 808-816,(2012).
22. Stanley. WM, L.M., Disintegration of tobacco mosaic virus in urea solutions. *Science*,88: p. 345-347,(1939).
23. Breitbart, M. and F. Rohwer, Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*,13 (6): p. 278-284,(2005).
24. Baltimore.D, *Viral Genetic Systems*. *Transactions of the New York Academy of Sciences*,33 (3): p. 327-&,(1971).
25. Xiang, Y., et al., Structural changes of bacteriophage phi 29 upon DNA packaging and release. *Embo Journal*,25 (21): p. 5229-5239,(2006).

26. Rossmann, M.G., et al., From structure of the complex to understanding of the biology. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*,63: p. 9-16,(2007).
27. Mancini, E.J., et al., Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. *Molecular Cell*,5 (2): p. 255-266,(2000).
28. Pattanayek, R., Stubbs, G, Structure of the U2 strain of tobacco mosaic virus refined at 3.5 Å resolution using X-ray fiber diffraction. *J.Mol.Biol.*,228: p. 516-528,(1992).
29. Crick, F.H.C. and J.D. Watson, Structure of Small Viruses. *Nature*,177 (4506): p. 473-475,(1956).
30. Caspar, D.L.D. and A. Klug, Physical Principles in Construction of Regular Viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*,27: p. 1,(1962).
31. Lombardo, E., et al., A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *Journal of Virology*,74 (8): p. 3804-3814,(2000).
32. Donate, L.E., et al., Bacteriophage T3 connector: Three-dimensional structure and comparison with other viral head-tail connecting regions. *Journal of Molecular Biology*,201 (1): p. 91-100,(Journal of Molecular Biology).
33. Ionel, A., et al., Molecular Rearrangements Involved in the Capsid Shell Maturation of Bacteriophage. *Journal of Biological Chemistry*,286 (1): p. 234-242,(2011).
34. Martin, C.S., Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses-Basel*,4 (5): p. 847-877,(2012).
35. Schmalz, G., Über Glätte und Ebenheit als phisikalisches und physiologishes. *Zeitchrift des Vereimes deutcher Ingenieure*: p. 1461-1467,(1929).
36. Young. R, W.J., Scire.F, The Topografiner: An Instrument for Measuring Surface Microtopography. *Review of Scientific Instruments*,43 (7): p. 999-1011,(1972).
37. Binnig, G. and Rohrer, H., Scanning tunneling microscopy. *Surface Science*,126 (1-3): p. 236-244,(1983).
38. Baro, A.M., et al., Determination of Surface-Topography of Biological Specimens at High-Resolution by Scanning Tunnelling Microscopy. *Nature*,315 (6016): p. 253-254,(1985).

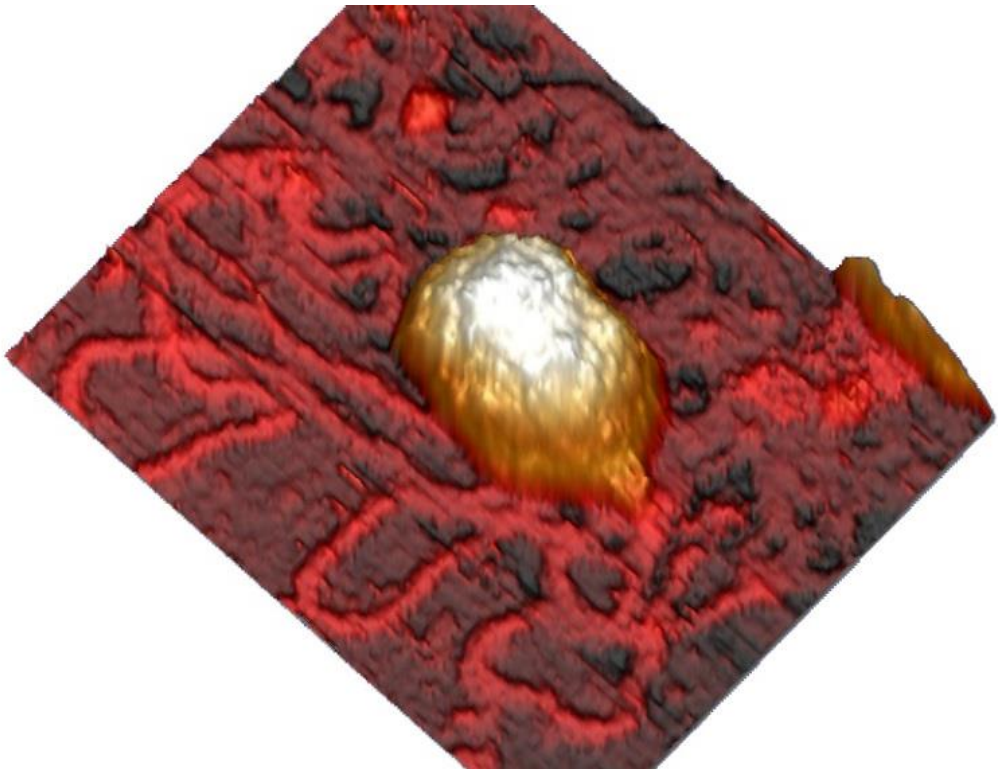
39. Binnig, G., Quate, C.F.Q, and Gerber, C., Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56: p. 930–933, (1986).
40. Hutter, J.L. and J. Bechhoefer, Calibration of Atomic-Force Microscope Tips *Review of Scientific Instruments*, 64 (11): p. 1868, (1993).
41. Sader, J.E., J.W.M. Chon, and P. Mulvaney, Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70 (10): p. 3967-3969, (1999).
42. Horcas, I., et al., WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*, 78 (1): p. 013705, (2007).
43. Ortega-Esteban, A., et al., Minimizing tip-sample forces in jumping mode atomic force microscopy in liquid. *Ultramicroscopy*, 114: p. 56-61, (2012).
44. Xu, X., et al., Unmasking imaging forces on soft biological samples in liquids when using dynamic atomic force microscopy: A case study on viral capsids. *Biophysical Journal*, 95 (5): p. 2520-2528, (2008).
45. Sotres, J. and A.M. Baro, AFM Imaging and Analysis of Electrostatic Double Layer Forces on Single DNA Molecules. *Biophysical Journal*, 98 (9): p. 1995-2004, (2010).
46. Valbuena, A., et al., On the remarkable mechanostability of scaffoldins and the mechanical clamp motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (33): p. 13791-13796, (2009).
47. Hervás, R., et al., Common Features at the Start of the Neurodegeneration Cascade. *Plos Biology*, 10 (5): p. 1545-7885, (2012).
48. Ivanovska, I., et al., Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (23): p. 9603-9608, (2007).
49. Carrasco, C., et al., DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (37): p. 13706-13711, (2006).
50. Roos, W.H., et al., Mechanics of bacteriophage maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (7): p. 2342-2347, (2012).
51. Arkhipov, A., et al., Elucidating the Mechanism behind Irreversible Deformation of Viral Capsids. *Biophysical Journal*, 97 (7): p. 2061-2069, (2009).

52. Garcia, R. and R. Perez, Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*,47 (6-8): p. 197-301,(2002).
53. Choi , D., W. Hwang, and E. Yoon, Improved lateral force calibration based on the angle conversion factor in atomic force microscopy. *Journal of Microscopy*,228 (2): p. 190–199,(2007).
54. Hosokawa, Y., et al, Small Amplitude Frequency Modulation Atomic Force Microscopy of Lead Phthalocyanine Molecules Using Cantilever with Very High Spring Constant. *Japanese Journal of Applied Physics*,47: p. 6125–6127,(2008).
55. Sugimoto, Y., et al., Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy. *Nature*,446 (7131): p. 64-67,(2007).
56. Palacios-Lidon, E., B. Perez-Garcia, and J. Colchero, Enhancing dynamic scanning force microscopy in air: as close as possible. *Nanotechnology*,20 (8)2009).
57. Martinez-Martin, D., et al., Resolving Structure and Mechanical Properties at the Nanoscale of Viruses with Frequency Modulation Atomic Force Microscopy. *Plos One*,7 (1): p. 30204,(2012).
58. Melcher, J., et al., High-resolution dynamic atomic force microscopy in liquids with different feedback architectures. *Beilstein Journal of Nanotechnology*,4: p. 153-163,(2013).
59. Putman, C.A.J., et al., Tapping Mode Atomic-Force Microscopy in Liquid. *Applied Physics Letters*,64 (18): p. 2454-2456,(1994).
60. Xu, X. and A. Raman, Comparative dynamics of magnetically, acoustically, and Brownian motion driven microcantilevers in liquids. *Journal of Applied Physics*,102 (3): p. 034303-1,(2007).
61. Carrasco, C., et al., Cutting down the forest of peaks in acoustic dynamic atomic force microscopy in liquid. *Rev Sci Instrum.*,79 (12): p. 126106,(2008).
62. de Pablo, P.J., et al., Jumping mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters*,73 (22): p. 3300-3302,(1998).
63. RosaZeiser, A., et al., The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation. *Measurement Science & Technology*,8 (11): p. 1333-1338,(1997).

64. Melcher, J., et al., Origins of phase contrast in the atomic force microscope in liquids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,106 (33): p. 13655-13660,(2009).
65. Raman, A., et al., Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology*,6 (12): p. 809-814,(2011).
66. Rico, F., C.M. Su, and S. Scheuring, Mechanical Mapping of Single Membrane Proteins at Submolecular Resolution. *Nano Letters*,11 (9): p. 3983-3986,(2011).
67. Berquand, A., Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy” *Bruker Application Note* p. 135,(2011).
68. de Pablo, P.J., I.A.T. Schaap, and C.F. Schmidt, Observation of microtubules with scanning force microscopy in liquid. *Nanotechnology*,14 (2): p. 143-146,(2003).
69. Garcia-Manyes, S., et al., Force-clamp spectroscopy of single-protein monomers reveals the individual unfolding and folding pathways of I27 and ubiquitin. *Biophysical Journal*,93 (7): p. 2436-2446,(2007).
70. Landau, L.D. and E. Lifshitz, *Theory of Elasticity*. 3rd ed. Pergamon London,1986).
71. Wommack, K.E.a.R.R.C., *Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,61 (1): p. 69,(2000).

CAPÍTULO 2:

BACTERIÓFAGO Φ 29: *PRE-STRESS* Y PRESIÓN INTERNA



2. BACTERIOFAGO ϕ 29: *PRE-STRESS* Y PRESIÓN INTERNA

2.1. Introducción

Como vimos en la introducción (capítulo 1), el mecanismo utilizado por los virus para llevar a cabo su proceso de infección depende del tipo de célula que infectan [1]. Mientras que los virus eucariotas lo hacen por vía endosoma (endocitosis), los virus procariotas, como son los bacteriófagos, lo hacen desde el exterior de la célula.

Los mecanismos utilizados por los bacteriófagos para introducir el material genético dentro de la célula a infectar no han sido todavía completamente entendidos por lo que originan un gran interés dentro de la comunidad científica. Se sabe que, tras haber reconocido la membrana de la bacteria a infectar el virus se ancla a la misma [2]. Después transloca el material genético a través de la cola que actúa a modo de canal. Con la ayuda de proteínas que se encuentran en el citoplasma bacteriano introduce por completo el material genético para poder ser procesado [3]. Sobre este proceso se han planteado diversas hipótesis pero sigue siendo aún un interrogante. Experimentos y modelos teóricos [4] sostienen la hipótesis de que en algunos bacteriófagos durante la primera fase de este proceso se inyecta el genoma sin coste energético. El ADN es impulsado por la energía elástica almacenada en el interior de la cápsida viral durante el empaquetamiento del mismo. Además se estima que la fuerza necesaria para realizar este empaquetamiento oscila entre 50-100pN [5-7].

El ADN es confinado a densidad casi cristalina [8], en una estructura altamente optimizada, originando una presión que tiene dos posibles orígenes. El primero es que el material genético debe ser almacenado en una cápsida cuyo diámetro es inferior a la longitud de persistencia del ADN (50nm) [9]. El segundo origen es el hecho de que las cadenas de ADN deban reducir su distancia a unos pocos angstroms (Å), venciendo la

repulsión electrostática producida entre ambas debido a la presencia de iones fosfato [10].

Las cápsidas virales del fago ϕ 29 son estructuras proteicas capaces de soportar condiciones fisiológicas adversas como cambios de pH, temperatura y deshidratación [11], además son estructuras altamente resistentes a la presión ejercida por el material genético almacenado en su interior.

2.1.1. El bacteriófago ϕ 29

A lo largo de este capítulo, nos hemos centrado en el estudio detallado de las propiedades mecánicas del bacteriófago ϕ 29. Este bacteriófago pertenece a la familia de los *Podoviridae* e infecta a la bacteria *Bacillus Subtilis*. Aunque por su tamaño es considerado como un virus pequeño, por su gran complejidad estructural, en comparación con otros bacteriófagos, se ha considerado dentro de la comunidad científica como un virus modelo. En la Universidad Autónoma de Madrid por ejemplo, desde finales de los años sesenta el grupo de la Profesora Margarita Salas ha estudiado profundamente los mecanismos de replicación de este virus y el grupo del Profesor José Lopez Carrascosa en la actualidad continua con múltiples estudios relacionados con complejos estructurales del mismo.

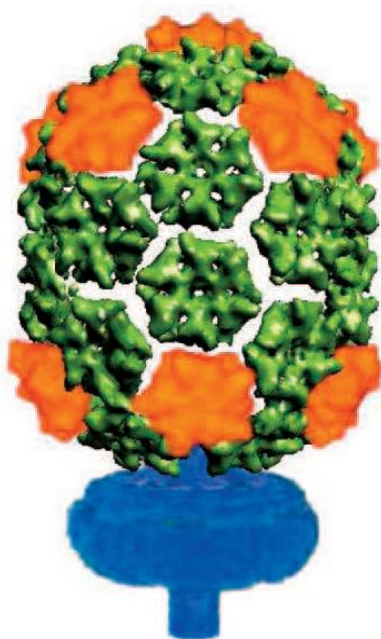


Figura 2.1: Bacteriófago ϕ 29 [13]

El bacteriófago ϕ 29 es un virus formado por 6 polipéptidos diferentes, siendo la proteína mayoritaria la gp8 [12]. Unas 235 subunidades de esta proteína organizadas en 11 pentámeros (naranja en la figura 2.1) y 30 hexámeros (verde en la figura 2.1) [13] se ensamblan en una primera estructura icosaédrica prolada cuyo número de triangulación es $T=3$, $Q=5$, dimensiones 54×42 nm y denominada cabeza o cápsida [14] [15]. En uno de los extremos, el pentámero central es reemplazado por el complejo del conector [16]. Durante el proceso de maduración de la estructura se produce la liberación de la proteína de andamiaje, (en inglés *scaffolding*

proteins) acompañado del proceso de empaquetamiento de aproximadamente 6 μm (micras) en longitud de ADN de cadena doble [17]. Después, el conector interactúa con una estructura tubular, denominada cola y formada por las proteínas gp11, gp12 y gp9. Existe además un componente adicional, las fibras situadas en la cabeza formadas por la proteína gp8.5, que son necesarias para poder llevar a cabo el proceso de infección [18].

Mediante el uso del AFM como herramienta principal, se ha pretendido relacionar las propiedades mecánicas de la estructura de cada una de las partículas víricas que aparecen durante el ciclo viral (figura 2.2a) con la función que desempeñan en cada una de las fases de este ciclo. Para ello, se ha caracterizado mecánicamente tres partículas diferentes (figura 2.2 b-d) de este bacteriófago: precabeza, virión y cápsida (virus sin material genético). De esta forma se han explorado los cambios en respuesta mecánica que se producen. Primero por la reorganización de proteínas durante la maduración del fago, y segundo por la presencia del material genético altamente empaquetado en el interior de la cápsida vírica.

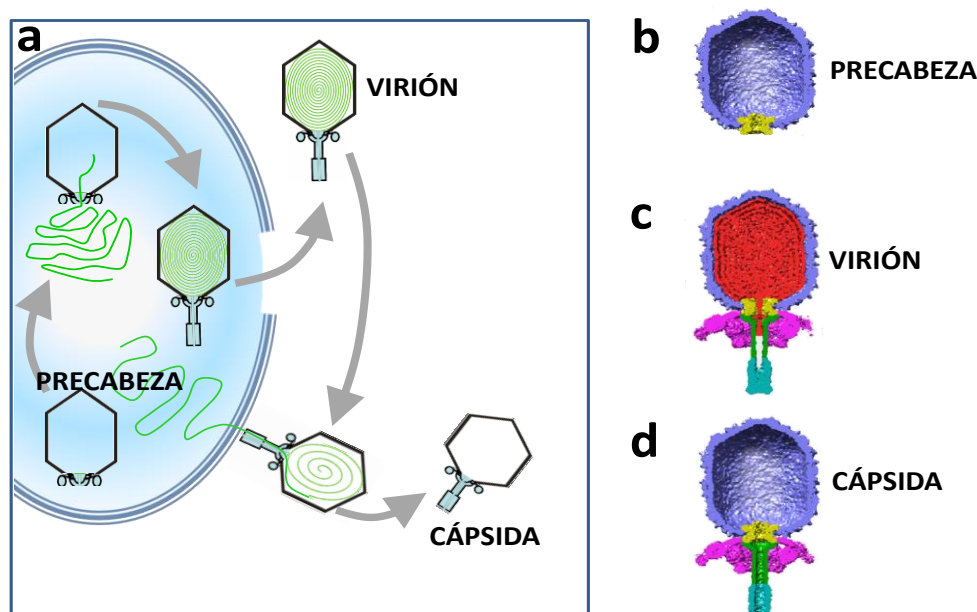


Figura 2.2: Ciclo viral del bacteriófago ϕ 29. a) Esquema del ciclo biológico del bacteriófago ϕ 29. Imágenes de reconstrucción cryo-EM de bacteriófago ϕ 29 [19]. b) precabeza, c) virión y d) cápsida. Como se puede observar las dimensiones de la estructura de la precabeza y la cápsida del virión son similares, lo que indica que no tiene lugar un aumento de volumen durante el proceso de maduración.

2.2. Estudio de la respuesta mecánica de las precabezas del bacteriófago ϕ 29

Las precabezas, por ser la primera estructura de proteínas ensambladas, son las partículas más sencillas de este virus. El bacteriófago ϕ 29 utiliza una línea de maduración que se caracteriza por una reorganización estructural, sin aumento de volumen, que conlleva a la inserción de nuevos dominios entre proteínas. Es decir, si comparamos la estructura de la precabeza con la cabeza del virión, podemos observar que no existen cambios significativos en volumen, pero sí en la disposición de las proteínas en la estructura. Además las precabezas no muestran cola, apéndices, ni fibras.

La Doctora Carolina Carrasco investigó si la distribución de las proteínas en la precabeza, para darle la forma de esfero-cilindro, se reflejaba las propiedades mecánicas en la estructura. Es decir, comprobar si la precabeza presenta anisotropía en la respuesta elástica dependiendo de la geometría de adsorción. Para poder medir la elasticidad de las precabezas de ϕ 29, se realizaron experimentos de nanoindentaciones sobre partículas intactas y lo suficientemente fijadas a la superficie en condiciones de fisiológicas como se describió en el experimento realizado por Ivanovska et al. [20]. Sobre las partículas estables depositadas en grafito (*High Orientated Pirlotic Graphite*; HOPG) (Apéndice I) se realizaron ciclos de 5 curvas F vs. Z en la parte superior de cada una de ellas. Antes y después de cada ciclo, fueron caracterizadas topográficamente para comprobar la integridad de las mismas. Puesto que la precabeza presenta forma de icosaédrica prolado, posee dos geometrías de adsorción en la superficie. Una cuando la mayor parte del cilindro interactúa con la superficie (*tendida*) y otra cuando lo es la parte más esférica (*vertical*). Además en ambas geometrías muestran características topográficas diferentes. Así aquellas que están tendidas muestran una geometría hexagonal alargada, mientras que en las que están verticales se puede distinguir el pentámero situado en el correspondiente eje pentamérico.

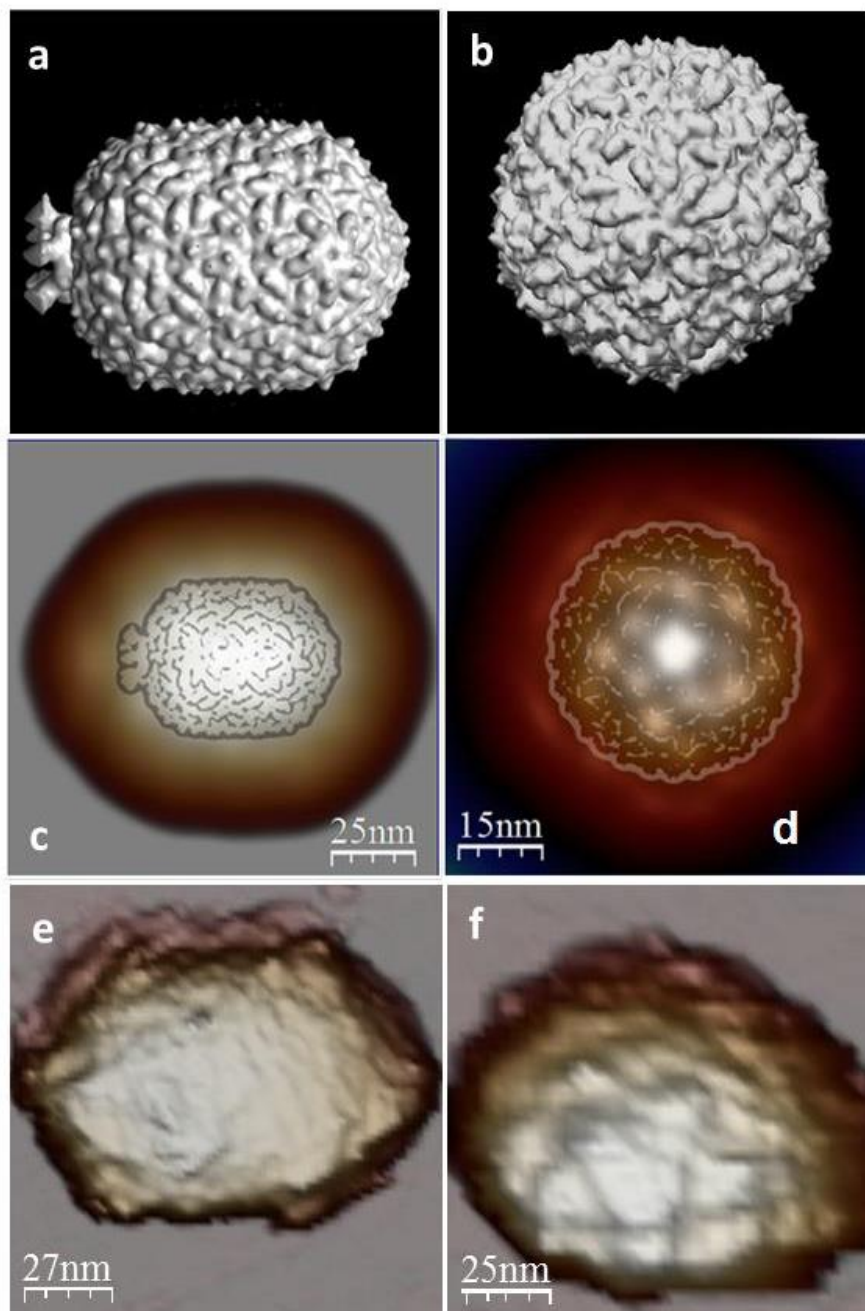


Figura 2.3: Precabeza del bacteriófago $\phi 29$. a) y b) Imagen de cryo-EM de precabeza obtenida a partir de los datos de EM en posición *tendida* y *vertical*, [19] [21] respectivamente. c) y d) Imágenes de cryo-EM superpuesta con la Imagen del volumen dilatado de una precabeza en posición *tendida* y *vertical*, obtenido a partir de los datos de EM [19][22]. e) Imagen de AFM de la precabeza adsorbida en la superficie de HOPG en posición *tendida*. f) Imagen de AFM de una precabezas adsorbidas en posición *vertical* sobre una superficie de HOPG.

En la figura 2.3 se puede ver una comparación entre las imágenes de reconstrucciones de cryo-EM y las imágenes topográficas de AFM en las dos orientaciones posibles de adsorción. A partir de la reconstrucción de cryo-EM se han obtenido las imágenes correspondientes al volumen dilatado de las mismas. Para ellos se ha aplicado un algoritmo a la imagen original de cryo-EM. Este algoritmo considera una punta parabólica con radio de curvatura de aproximadamente 10 nm escaneando la de cryo-EM. Se obtiene un volumen dilatado, debido a convolución entre la punta y la muestra, que sirvió para justificar las características de la estructura de la precabeza que se observan en las imágenes que se han obtenido mediante el AFM [22, 23].

En análisis de altura de las partículas adsorbidas en el sustrato, muestra la presencia de dos picos uno de 42 nm y el otro de 55 nm, como se observa en el histograma de la figura 2.4 a-b, y que corresponden a las altura de las partículas en posición tendida y vertical respectivamente.

Los valores de las constantes elásticas obtenidas de las curvas F vs. Z (figura 2.4c), realizadas durante los experimentos de nanoindentación para cada una de la geometría de adsorción [24], están contemplados también en forma de histograma en la figura 2.4d. El valor más probable obtenido a partir de un ajuste gaussiano es: $0.075 \pm 0.02\text{N/m}$ y $0.19 \pm 0.03\text{N/m}$ para las partículas verticales y tendidas, respectivamente. **Este resultado indica que la partícula es 2.6 veces más rígida por la parte cilíndrica que por la parte esférica.** Como se verá más adelante, este resultado no se puede explicar aplicando la teoría de la elasticidad de medios continuos que predice un aumento de la rigidez con el inverso del radio de curvatura de una estructura.

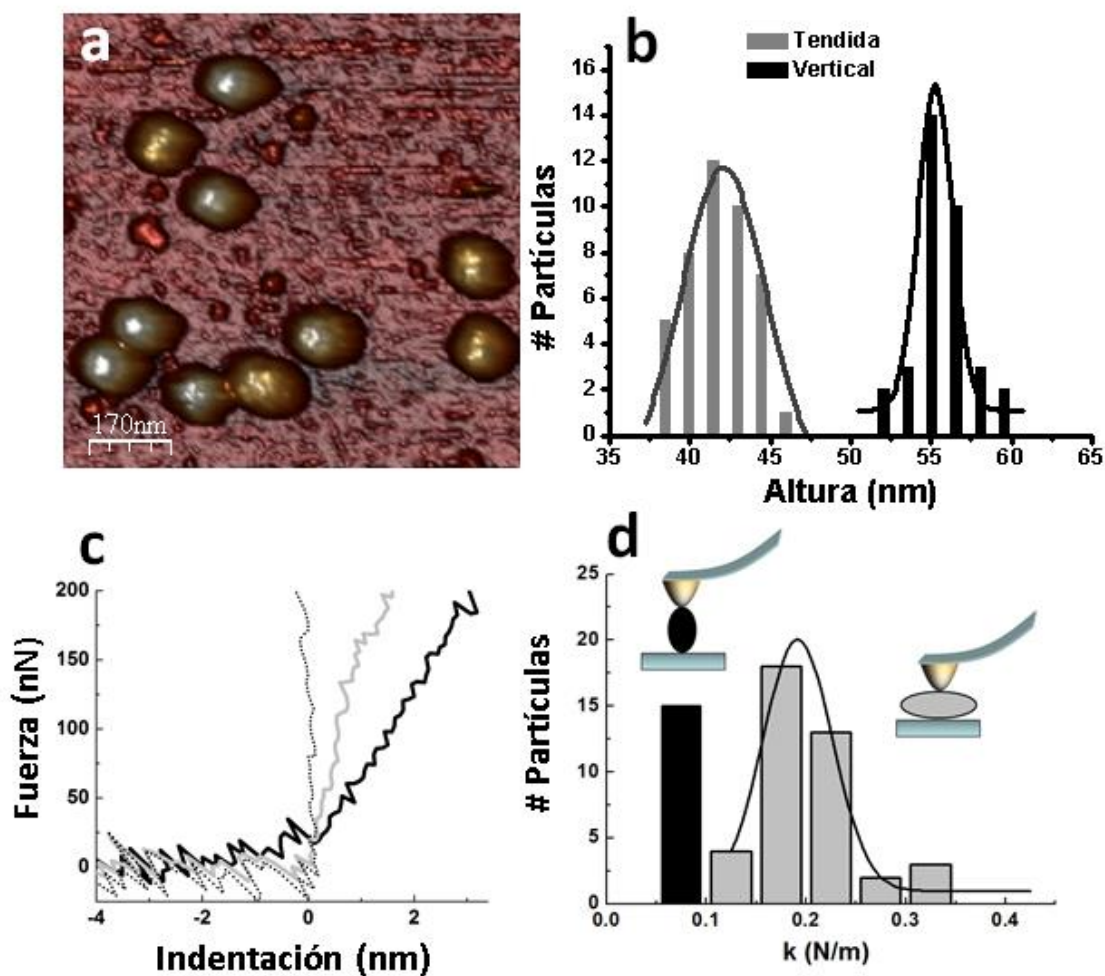


Figura 2.4: Respuesta mecánica de las precabezas. a) Imagen de AFM de una muestra de precabezas depositadas en HOPG en la que se observa las dos posibles orientaciones de adsorción de las mismas. b) Histograma de alturas en el que se observa dos picos que corresponden a partículas depositadas en posición vertical y tendida. c) Curvas extraídas de un experimento de nanoindentación. La curva punteada se realizó sobre sustrato, la curva gris-claro sobre la precabeza en posición vertical y la curva negra sobre la precabeza en posición tendida. d) Histograma de los valores de constante elástica obtenidos durante el experimento.

Adicionalmente se ha observado que el valor de la constante elástica de las partículas que se encuentran en posición vertical es independiente de la geometría de adsorción en relación a la posición del conector. Las precabezas de $\phi 29$ sitúan el complejo del conector, con forma de anillo, en la posición uno de los pentámeros centrales. **La presencia del conector no influye en la respuesta elástica** y por tanto esta respuesta elástica está dominada por la propia organización de las proteínas en la estructura.

2.2.1. Análisis mediante simulación de elementos finitos

Una de las herramientas más utilizada en los últimos años para predecir, corroborar e interpretar las respuestas elásticas de este tipo de nanoestructuras son las simulaciones basadas en el método de elementos finitos (en inglés *Finite Element Method*; FEM).

Estudios anteriores han demostrado que la presencia de defectos en cápsidas víricas puede cambiar el valor de la constante elástica [25]. Para una correcta interpretación de los resultados experimentales se realizaron dos clases de simulaciones. Estas simulaciones se enfocaron, por un lado en el estudio de cambios en la respuesta mecánica de la precabeza de $\phi 29$ por la presencia del conector, y por otro, la influencia de la geometría de la estructura. Estas simulaciones fueron realizadas por el Doctor Iwaan Shaap y el Profesor Arvind Raman [26]. La primera de ella consiste en una representación de elementos finitos de la precabeza de $\phi 29$ usando COMSOL Multiphysics (COMSOL Multiphysics3.5 solver package, Comsol, Stockholm, Sweden). La precabeza $\phi 29$ es modelada como un esfero-cilindro. La parte cilíndrica de 20 nm de radio de la precabeza se modeló como dos esferas de radio 21 nm desplazadas, produciendo un cuerpo de 54 nm de longitud y con forma esfero-cilindro (figura 2.5). Se consideró un espesor de pared de 1.6 nm y un módulo de Young de valor 1.6 GPa [20].

Esta simulación está dentro de la modelo de cáscara elástica delgada, (en inglés *Thin Shell*) en la cual se considera que la pared no se comprime cuando se realiza una indentación. Se simularon indentaciones realizadas con una esfera de unos 20 nm de diámetro aproximadamente. Para observar la influencia del conector en la respuesta elástica se realizaron simulaciones en dos tipos de estructuras: con y sin conector. La ausencia del conector es imitado como la pérdida del pentámero en el cual se encuentra situado, es decir, como un defecto. Estructuras huecas con ausencia de un pentámero se representan en la figura 2.5a. Se sugirieron cinco estados de estructura que mostraban las diferentes orientaciones de adsorción. Los valores de constante elástica se obtuvieron a partir la pendiente de curvas Fuerza vs. Indentación (F vs. I) realizadas para un rango de valores de fuerza de 0 a 0.3 nN. **Las simulaciones mostraron que las partículas presentan**

una constante elástica mayor cuando están adsorbidas de forma vertical, independientemente de la presencia o ausencia de conector.

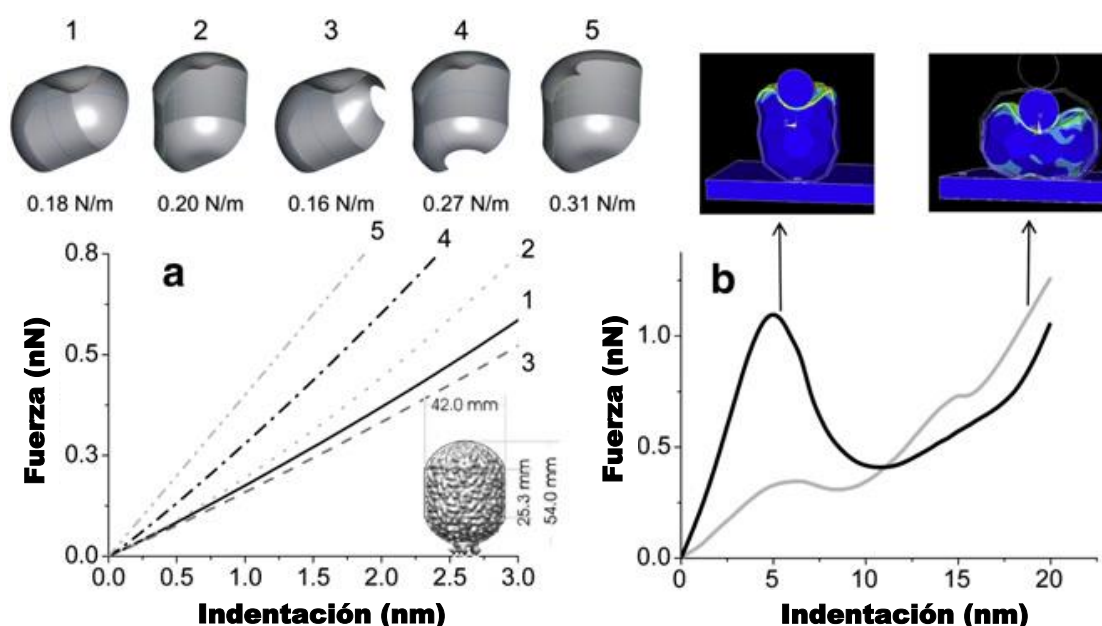


Figura 2.5: Simulaciones de FEM para un cuerpo que representa una precabeza del bacteriófago $\phi 29$. a) Simulación realizada en precabezas en las dos posibles orientaciones de adsorción, con ausencia y sin conector. Las dimensiones de la precabeza para estas simulaciones fueron obtenidas a partir de su estructura real de cryo-EM [17]. b) Comparativa entre una curva F vs. I simulada sobre la precabeza, en posición vertical y tendida, teniendo en cuenta la geometría icosaédrica de la estructura.

La segunda simulación que se realizó fue usando el programa ANSYS (ANSYS, Canonsburg, PA) (Figura 2.5b). El modelo consiste en tres cuerpos geométricos que imitan las dimensiones y forma real de la precabeza del bacteriófago medidas mediante cryo-EM [14]. La estructura de la precabeza es modelada como un icosaedro hueco con una banda extra en la zona ecuatorial que produce el efecto de cilíndrico. La punta es modelada con una esfera rígida de 20 nm de diámetro. La superficie en la cual esta adsorbida la precabeza es plana y rígida. Se consideró un módulo de Young 1.8 GPa [27]. La partícula fue deformada 20 nm durante la simulación.

Los resultados obtenidos a partir de esta simulación de FEM muestran de nuevo que las partículas verticales son más rígidas que las tendidas.

Las predicciones de respuesta elástica obtenidas a partir de las simulaciones de FEM realizadas están en desacuerdo con los resultados experimentales.

Supongamos que la estructura de la precabeza se puede representar de forma simplificada como un cilindro cerrado por dos semiesferas. La teoría de la elasticidad de medios continuos predice que un cilindro es más fácil de deformar que una esfera. Por tanto, las partículas en la posición vertical deben mostrar mayor constante elástica que las partículas que están tendidas sobre la superficie. La razón toma su origen en que una estructura cilíndrica puede estar doblada fácilmente puesto que el *stress* es menor que el que presenta la parte esférica [28], como se muestra a continuación.

Si tenemos en cuenta que la energía para una esfera viene dada por:

$$E_t = E_{str} + E_{ben} \quad (2.1)$$

$$E_{str} = Eh \left(\frac{\xi}{R}\right)^2 d^2 \quad (2.2)$$

$$E_{ben} = Eh^3 \left(\frac{\xi}{R}\right)^2 \quad (2.3)$$

Donde E_{str} es energía de *stretching*, E_{ben} es la energía de *bending*, h es el grosor de la estructura, R el radio, ξ es la deformación de la estructura (figura 2.6).

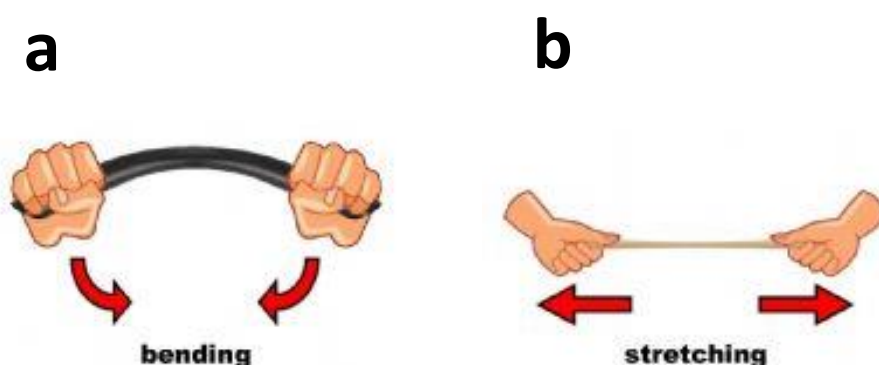


Figura 2.6: Bending and stretching. a) dirección de la energía de *bending*. b) dirección de la Energía de *bending*. La energía de *bending* (fuera del plano) es la requerida para deformar o flexionar un cierto ángulo una estructura, mientras que la energía de *stretching* (dentro del plano) es la requerida para estirar una estructura

Una minimización de la energía para la parte esférica implicaría que la deformación es proporcional a la fuerza con una constante elástica de:

$$K_{eff}^{sph} = \frac{E h^2}{R} \quad (2.4)$$

Si realizamos el mismo análisis para la parte cilíndrica se obtiene que la constante elástica es:

$$K_{eff}^{cyl} = \frac{E h^{5/2}}{R^{3/2}} \quad (2.5)$$

Si comparamos los ratios de constante elástica obtenidas, considerando que $h=1.6\text{nm}$ y $R=21\text{nm}$, se obtiene:

$$\frac{K_{eff}^{sph}}{K_{eff}^{cyl}} \sim \sqrt{\frac{R}{h}} \sim 3.6 \quad (2.6)$$

La teoría de la elasticidad de medios continuos predice que la parte cilíndrica de la precabeza sea 3.6 veces más blanda que la parte esférica.

2.2.2. Fórmula de Laplace y simulación de grano grueso: *pre-stress*

Para poder entender el desacuerdo que existe entre la predicción teórica y el experimento, se tuvo en cuenta una aproximación adicional. El hecho de que cuando una punta de AFM deforma un cuerpo, la deformación viene controlada por la tensión superficial del mismo. Esta tensión superficial en una de las direcciones se puede aproximar a la constante elástica.

Existen dos posibles orígenes atribuidos a esta tensión superficial, la existencia de presión interna dentro de la cápsida o a la existencia de *pre-stress* en la estructura.

Es conocido que los bacteriófagos almacenan grandes cantidades de material genético provocando presiones de 30 a 60 atmósferas aproximada mente [6, 29, 30]. La ley de Laplace predice que para un cuerpo cilíndrico hueco cerrado por dos semiesferas las tensiones de membrana en la dirección axial es diferente que en la dirección angular cuando está sometido a una presión P (figura 2.7).

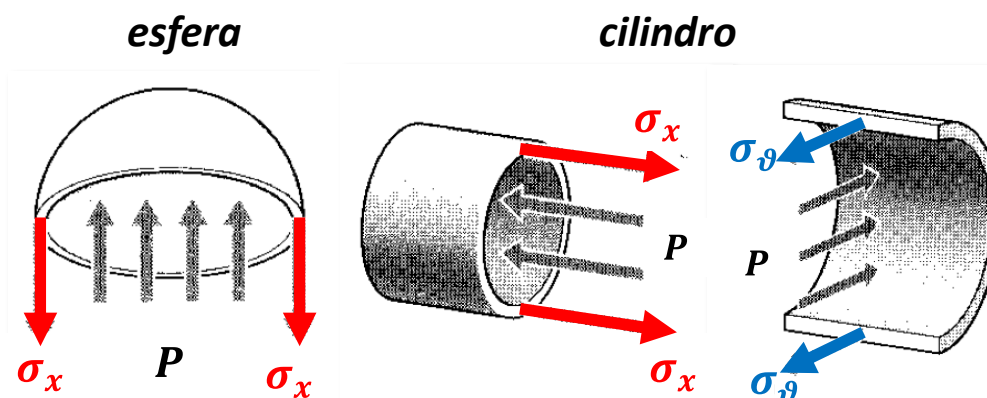


Figura 2.7: Esfero cilindro presurizado. Esquema de las direcciones del stress inducido en la superficie de un esfero-cilindro por presión interna. σ_x es el stress en dirección axial y σ_θ es el stress en dirección angular.

En las semiesferas y a lo largo del cilindro en la dirección axial, la tensión de membrana bien dada por:

$$T_x = h\sigma_x = \frac{\Delta PR}{2} \quad (2.7)$$

Mientras que en la dirección angular bien dada por:

$$T_\theta = h\sigma_\theta = \Delta PR \quad (2.8)$$

Donde h es el grosor de la pared, σ_x y σ_θ son los *stress* en la dirección axial y angular respectivamente, y P es la presión dentro de la cápsida en coordenadas cilíndricas.

El promedio de la tensión de membrana será la media de las tensiones soportadas en ambas direcciones. En la parte cilíndrica viene dada por la expresión:

$$\frac{T_x + T_\theta}{2} = \frac{3T_x}{2} \quad (2.9)$$

Para el caso de la parte esférica la tensión promedio viene dada por:

$$\frac{T_x + T_x}{2} = T_x \quad (2.10)$$

Esto nos sugiere (ecuaciones 2.9 y 2.10) que la tensión en la parte cilíndrica puede ser 1.5 veces mayor que en la parte esférica lo cual es compatible con los resultados experimentales obtenidos. Sin embargo las precabezas no contienen material genético por lo que la diferencia de presión debe ser considerada cero.

Otro de los mecanismos que producen el mismo efecto que la presión es el *stress residual* en las estructura. En este caso podríamos atribuir como origen de la tensión al *stress residual* que se almacena en la estructura durante su proceso de auto-ensamblado. Recordemos que para que las precabezas de $\phi 29$ se auto ensamblen es necesaria la presencia de las proteínas denominadas *scaffolding* que, una vez el ADN comienza a empaquetarse, son eliminadas. Las subunidades proteicas (capsómeros) de la cápsida vírica están expuestas a diferentes valores de interacciones intercapsoméricas que dependen de la posición ocupada en la estructura. Esto produce una distribución de *stress lateral* en la estructura y ha sido observado en algunos virus icosaédricos [31] y estructuras como furelenos y nanotubos de carbono [32]. Este *stress* aumenta para compensar el momento de fuerza requerido para curvar una red hexagonal en una forma

cilíndrica o esférica. La magnitud de *stress residual* depende del radio de la cápsida y de la curvatura espontánea, que depende a su vez, de las interacciones que se producen entre las proteínas que forman la cápsida.

Para entender con más detalle esta hipótesis del *stress residual* se decidió realizar simulaciones basadas en el modelo de grano grueso, (en inglés *Coarse-Grained Model*; CGM) y obtener así más información sobre la distribución de *stress* que soporta la estructura de precabeza del $\phi 29$ (figura 2.8). Estas simulaciones fueron realizadas por el grupo del Profesor David Reguera [33]. Se considera un modelo sencillo de interacción capsómero-capsómero utilizado previamente para describir estructuras icosaédricas y proladas [34, 35]. Para la simulación se utilizaron un total de 42 capsómeros (30 hexámeros y 12 pentámeros) distribuidos en una estructura en forma de esfero-cilindro de longitud L y dos semiesferas de radio R . La interacción capsómero-capsómero se aproximó por un potencial tipo Lennard-Jones (ecuación 2.11) que depende de la distancias entre capsómeros [33]. De esta forma la interacción entre hexámero-pentámero se puede considerar diferente a la que existe entre hexámero-hexámero y pentámero-pentámero.

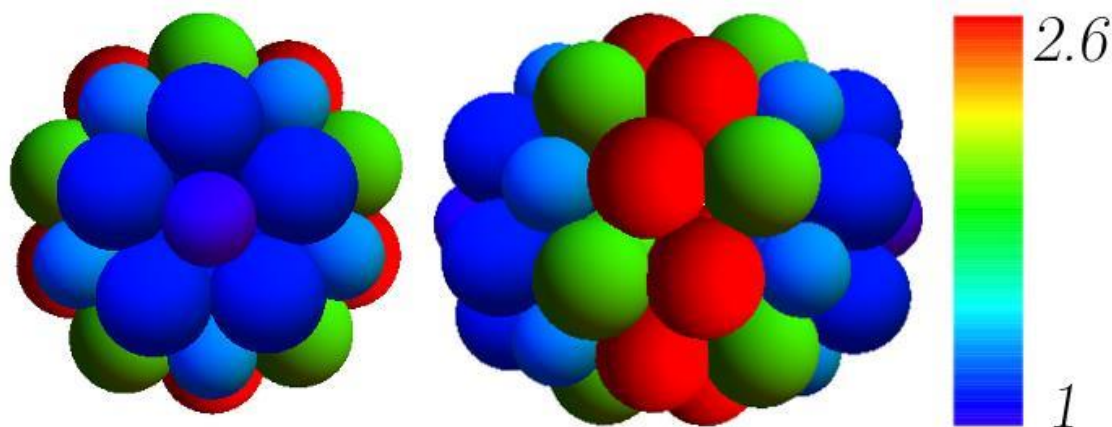


Figura 2.8: Distribución local del *stress* en una precabeza de $\phi 29$. La figura muestra una visión desde la posición vertical e tendida de la misma. La precabeza es modelada dentro de la aproximación de Grano Grueso. Los pentámeros y hexámeros son representados con esferas de diferentes tamaños, siendo los pentámeros 0.8 más pequeños que los hexámeros. La escala de colores lateral ha sido normalizada al valor más pequeño obtenido.

Se buscó la configuración óptima y se analizó la distribución de *stress* local y de *stress* lateral siguiendo el procedimiento utilizado en otros estudios [31]. Las simulaciones sugirieron que el *stress* depende del valor de la constante elástica, de la curvatura espontánea que adopta las estructuras, que depende de la fuerza de interacción entre capsómeros. Se encontró que el *stress* local al que está sometido un hexámero situado en la zona ecuatorial del esfero-cilindro es 2.6 veces el que siente un pentámero de la zona esférica.

La distribución promedio de *stress* lateral mostraba que **el ratio entre el *stress* en la zona cilíndrica y la esférica es aproximadamente 1.5**, como se observa en la figura 2.8. Este resultado corroboró la tendencia encontrada en los experimentos de AFM.

2.2.3. Experimento con gluteraldehido

Para comprobar que la simulación de CGM explicaba de una forma correcta la tendencia observada, se realizó un experimento de control. El objetivo de este experimento fue comprobar que para una cápsida con forma de esfero-cilindro la parte esférica es más dura que la cilíndrica cuando no está sometida al *stress residual*, almacenado en el interior de la estructura, y cuyo origen está en el proceso de formación de la misma. Así se decidió obtener la constante elástica de partículas tendidas y verticales sobre la superficie en presencia de gluteraldehido (GAD). El GAD es conocido por su utilidad en el estudio de células y tejidos pues facilita la manipulación en experimentos que requieren del uso de un microscopio [36]. Es un agente químico que se intercala entre las subunidades proteicas formando entre ellas enlaces covalentes, (en inglés *Cross-linking*). Esto produce un aumento de dureza de las estructuras, permite borrar las tensiones asociadas al *stress residual*.

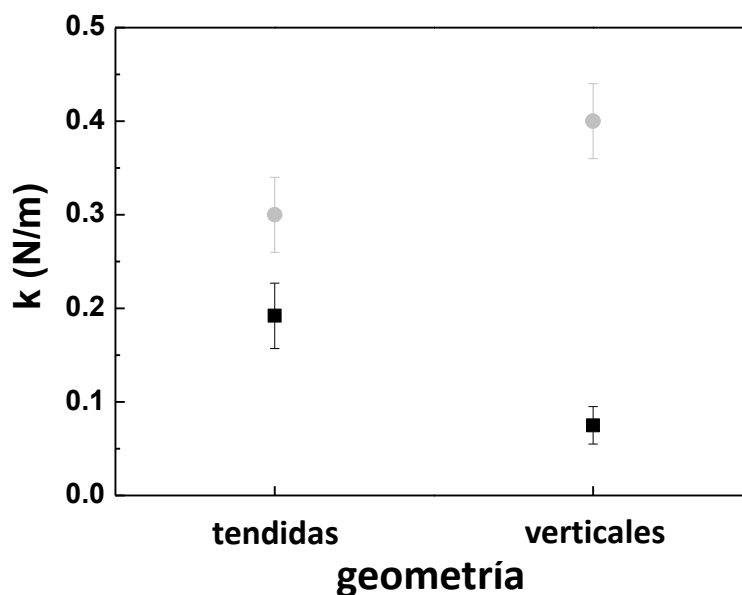


Figura 2.9: Estudio de las respuesta mecánica. En color gris claro de los valores obtenidos de constante elástica para partículas en posición vertical y tendida en presencia de gluteraldehído (GAD). En color negro los valores de la constante elástica obtenidas en condiciones de buffer. Como se puede observar el GAD borra la presencia de *stress residual* corroborándose los resultados obtenidos por simulaciones de FEM.

La presencia de este *stress residual* podría desempeñar un papel biofísico importante para la viabilidad del virus. El aumento de rigidez que se produce en la estructura de la cápsida la hace más resistente a las agresiones mecánicas por cambios de presión osmótica durante el ciclo extracelular para proteger el material genético.

Por otro lado la presencia de este *stress residual* podría desempeñar un papel significativo en la translocación de ADN, mediante presión interna y través de la cola, en la bacteria.

En la figura 2.9 se recogen los valores obtenidos de constante elástica de las partículas tendidas y verticales en grafito en condiciones de buffer y se comparan con los valores de las constantes elásticas con GAD.

La comparación muestra que en presencia de GAD las partículas en posición vertical parecen ser más duras. De hecho la constante elástica de **la parte esférica es 1.3 veces mayor que de la parte cilíndrica**, como predecían las simulaciones de FEM.

2.3. Estudio de la presión interna en el bacteriófago $\phi 29$

Los bacteriófagos son capaces de empaquetar el material genético de micras de longitud en cápsidas que sólo alcanzan unas decenas de nanómetros de diámetro. Además el ADN debe ser confinado a densidades casi cristalinas [8] provocando una presión dentro de la cápsida que posee dos orígenes. Por un lado hay que tener en cuenta que la distancia entre las cadenas de ADN suele ser de unos pocos angstroms (Å). A estas distancias las fuerzas de repulsión electrostáticas debido a la presencia grupos fosfatos es importante [10]. El segundo origen se debe a que la curvatura que adquiere dentro de la cubierta proteicas es generalmente menor que la longitud de persistencia característica del ADN (50 nm) [9].

En particular, para el caso del bacteriófago $\phi 29$ se ha propuesto que el proceso de infección por eyección del ADN consta de dos etapas de *push-pull*. En la primera etapa *push*, el 65 % de genoma se introduce gracias a la liberación de esta presión interna. En la segunda etapa *pull*, son algunas de las proteínas de la bacteria las que tiran del ADN hacia el interior [37]. Otro estudio paralelo basado en la medición de la fuerza necesaria para empaquetar el material genético usando Pinzas Ópticas, mostró que es aproximadamente de 57 pN. Transformando esta fuerza en términos de presión se establece un límite superior de 60 atm [6].

La presión que se puede alcanzar dentro de estas nanoestructuras es muy elevada. Por ello se decidió como objetivo buscar evidencias de presión interna dentro del bacteriófago $\phi 29$ mediante el uso del AFM.

2.3.1. Caracterización de las propiedades mecánicas de las partículas víricas del bacteriófago $\phi 29$

Para poder detectar evidencias de presión interna dentro del bacteriófago $\phi 29$ mediante el uso del AFM se decidió buscar un cambio en la respuesta mecánica del mismo debido a la presencia del material genético. Por ello se realizaron experimentos de nano indentación sobre precabezas, cápsidas y viriones para obtener cambios en la constante elástica. En el virión se representa la constante elástica generada por dos muelles en paralelo, uno relacionado con la estructura de la cápsida y otro al ADN como se muestra en la figura 2.10a. Por otro lado la figura 2.10b muestra una comparación de curvas de indentación obtenidas sobre los tres tipos de partículas virales.

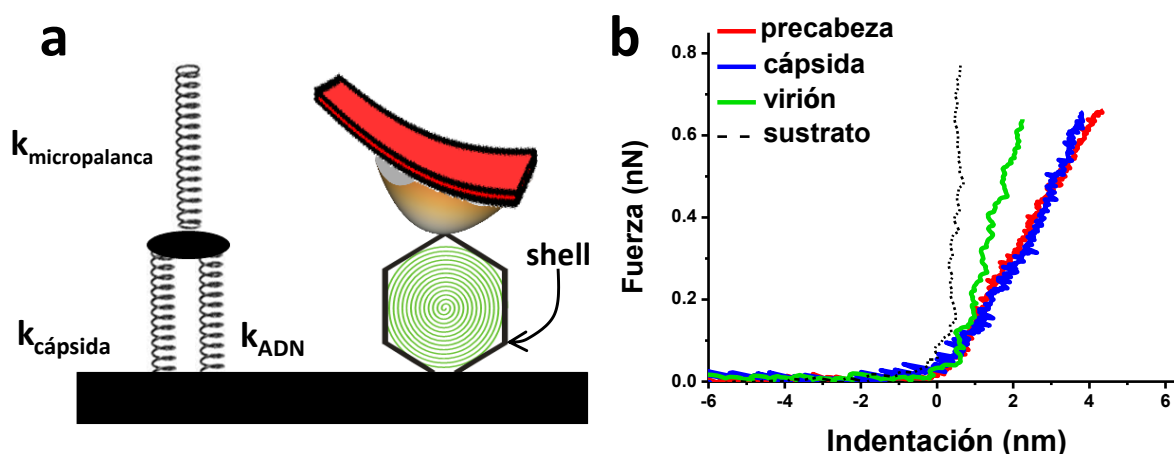


Figura 2.10: Experimento de nanoindentaciones en partículas virales. a) Esquema de un virión indentado por una punta. Para tener en cuenta los efectos del material genético, el ADN es considerado como un muelle en paralelo a la cápsida vírica y ambos en serie con la micropalanca. b) Comparación entre curvas de indentación realizadas sobre las partículas víricas y el sustrato.

Se realizaron 116 curvas fuerza-distancia sobre 14 viriones, 8 precabezas y 3 cápsidas (virus vacío de material genético). Los valores de constante elástica son recogidos en un histograma y las distribuciones de cada una ajustados a una distribución gaussiana. Los valores de constante elástica obtenidos son 0.23 ± 0.05 N/m, 0.33 ± 0.05

N/m and 0.23 ± 0.04 N/m para precabezas, viriones y cápsidas, respectivamente (figura 2.11). Según lo obtenido, tanto las precabezas como las cápsidas presentan la misma constante elástica, indicándonos que la presencia de la cola no contribuye en esta propiedad física.

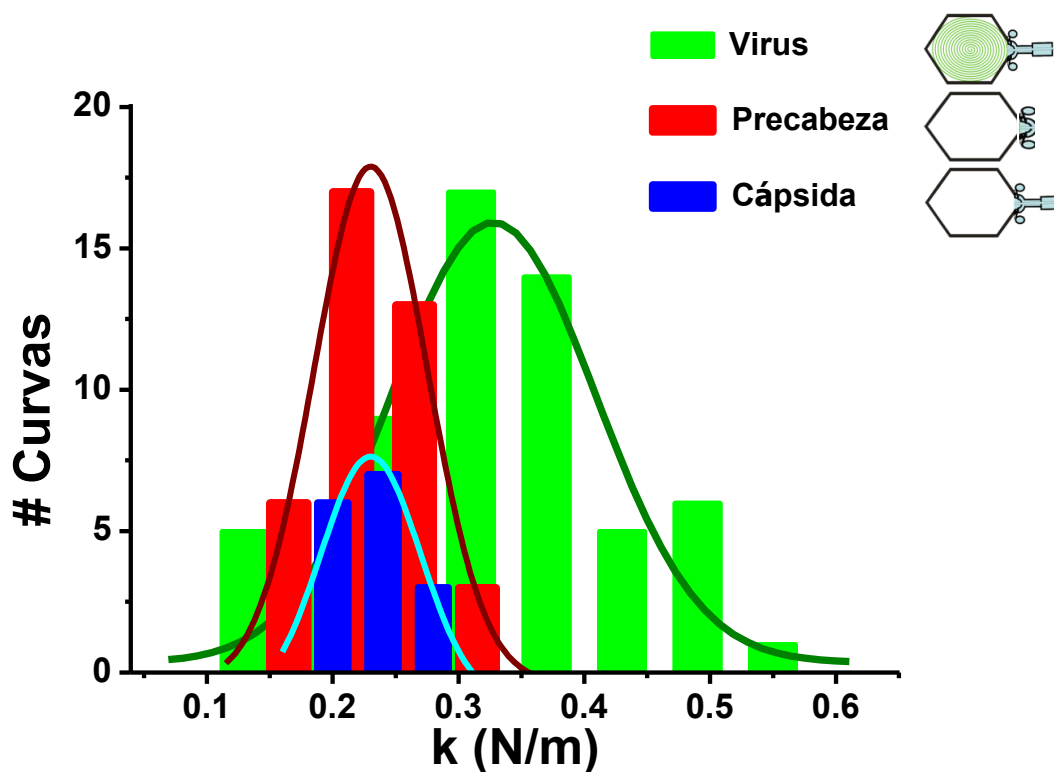


Figura 2.11: Constante elástica de las partículas víricas de bacteriófago $\phi 29$. Histograma comparativo de los valores de constante elástica obtenidos, a partir de las curvas de F vs. l realizadas, para precabezas, cápsidas y viriones del bacteriófago $\phi 29$.

Por otra parte se ha observado que los viriones son 0.1 N/m más rígidos que las precabezas y que las cápsidas. Por tanto este aumento de la rigidez se puede atribuir al ADN empaquetado en el interior de la cápsida. Este comportamiento ya fue observado en otros virus como el bacteriófago λ [38]. Como experimento control se co-adsorbieron viriones y cápsidas, y se realizaron nanoindentaciones en cada uno de ellos. Los resultados obtenidos sobre la constante elástica son los mismos que se obtuvieron en los experimentos anteriores. La figura 2.12 muestra una imagen de topografía de AFM de una precabeza y un virión. Se puede apreciar que las diferencias topográficas en la cubierta

proteica son leves. Sólo la presencia de cola en el virión, permite que ambas partículas sean fácilmente distinguibles.

El mecanismo de reforzamiento asociado a la presencia del ADN en el interior de cápsida puede tener dos orígenes diferentes:

Origen estructural, debido a que el ADN rellena toda la cápsida del virus como un sólido o las interacciones que éste establece con las proteínas que se encuentran en el interior de la cápsida. Este último tipo de reforzamiento fue encontrado en el virus MVM [24]. Los estudios demostraron como el ADN de cadena simple (*ss-DNA*) se introduce a modo de cuña en zonas específicas y bien localizadas de la cápsida vírica provocando un reforzamiento asimétrico en la estructura [39].

El material genético confinado y sometido a alta presión en el interior genera fuerzas dirigidas hacia fuera que podrían endurecer la estructura, como ocurre por ejemplo cuando inflamos un balón de fútbol o un neumático. Experimentos realizados en bacteriófago lambda [40] y T5 [41] mostraron que es posible detener el proceso de eyección del ADN cuando se somete al virus a una determinada presión externa. [40].

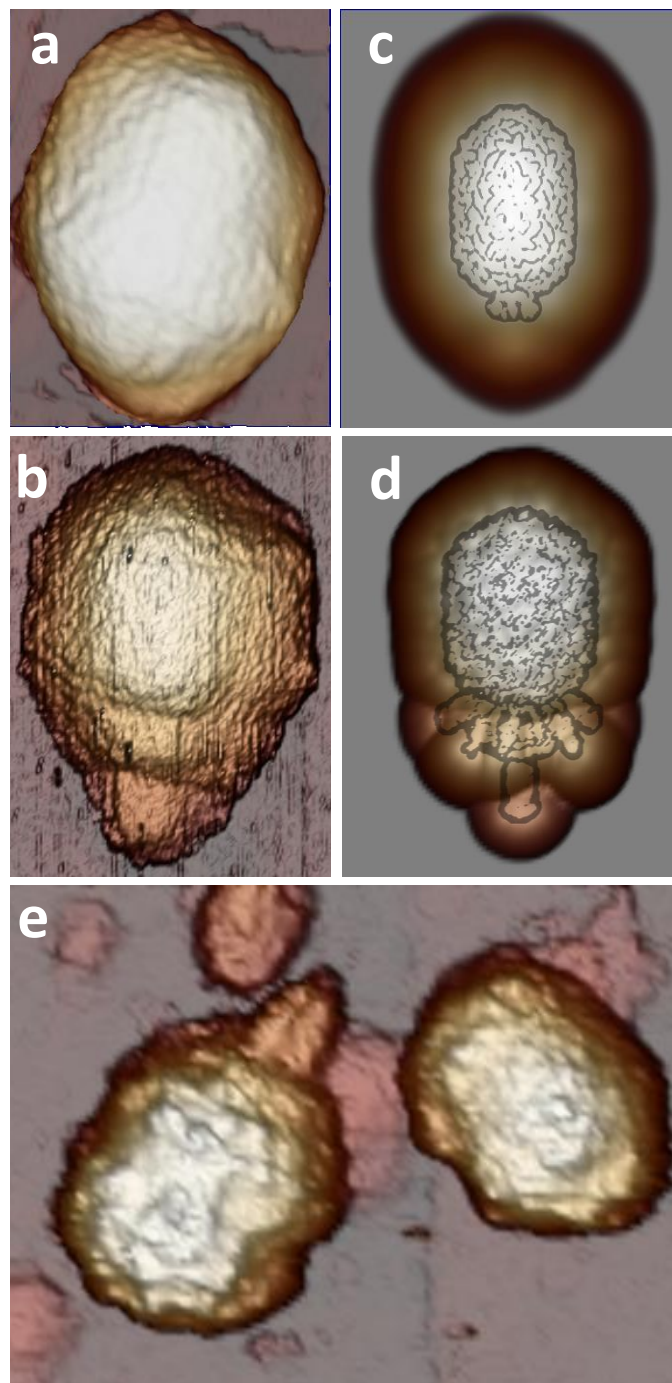


Figura 2.12: Precabeza y virión del bacteriófago $\phi 29$. a) y b) Imagen de topografía tomada con AFM de una precabeza y un virión de $\phi 29$ respectivamente, adsorbidos en HOPG. Modelo de dilación de una precabeza c) y un virión d) a partir de la reconstrucción de cryo-EM [19]. e) Imagen de topografía de AFM de una co-adsorción de virones y precabezas de $\phi 29$. Como se observa de las imágenes obtenidas con AFM es posible distinguir características topográficas de ambas estructuras cuando se comparan con las imágenes del volumen dilatado [22] obtenidas a partir de la estructura de cryo-EM [19].

2.3.2. Evidencias de presión interna

La estrategia más sencilla para desvelar cuál es el origen de nuestro reforzamiento mecánico consiste en modificar los factores que regulan las energías a las cuales está sometido el ADN confinado. Recordemos que el ADN adquiere una curvatura menor que longitud de persistencia característica y además, que existe una gran repulsión electrostática entre las hebras del mismo. Se propuso como objetivo modular esta repulsión electrostática de forma que la distancia entre hebras disminuya para observar cambios en la constante elástica de la partícula.

Se sabe que es posible formar condensados de ADN en disolución en presencia de agentes químicos específicos o de contra iones con valencia mayor de 2. Estos presentan una carga neta positiva, como se muestra en tabla 2.1; por lo que sería de esperar que se unieran a los grupos fosfatos expuestos del ADN.

Los condensados de ADN en disolución aparecen debido a que estos agentes a una cierta concentración, provocan la aparición de fuerzas atractivas, o la disminución de fuerzas repulsivas existentes entre las hebras [42]. En algunas ocasiones la distancia entre las hebras de ADN organizado en forma de toroide ha llegado a ser 2.4nm [43]. Además si el tamaño de los iones es suficientemente pequeño o difunden a través de la cápsida vírica, es posible formar condensados dentro de un virus [44].

<p style="text-align: center;">CATIONES MULTIVALENTES (VALENCIA ≥ 2)</p>	<p style="text-align: center;">Cu⁺² Mn² Mg⁺²</p>
<p style="text-align: center;">AGENTES CONDENSADORES</p>	<p style="text-align: center;">Espermina⁺⁴ Espermidina⁺³ Co(NH₃)₆⁺³ Polyethynelene Glycol (PEG)</p>

Tabla 2.1. Diferentes tipo de agentes químicos utilizados para la obtención de condensados de ADN. La espermidina es una poliamina con valencia ⁺³.

Bacteriófagos como λ , ϕ 29, T7 y T4 [8] empaquetan el ADN formando capas, cuya distancia varía entre 2.3-2.9 nm. Como se puede ver estas distancias son comparables con las que se obtiene para condensados de ADN en disolución.

Para el bacteriófago λ ya fue mostrado que en presencia de Mg^{+2} la constante elástica disminuía 0.1 N/m [38]. Por ello se decidió medir la respuesta mecánica del bacteriófago ϕ 29 en presencia de espermidina (SP).

La espermidina es una poliamina trivalente comúnmente usada para crear condensados en disolución. En presencia de 1mM de SP, se realizaron 60 indentaciones en 12 partículas diferentes de virion ϕ 29. El valor medio de la constante elástica fue de 0.23 ± 0.05 N/m, que corresponde al valor obtenido para una partícula vacía o una precabeza. Se observa que la presencia de SP modificaba la respuesta mecánica del bacteriófago. Para descartar posibles efectos en la estructura de la cápsida por la presencia de SP se propuso un experimento control. Se realizó el mismo experimento con precabezas de ϕ 29. En presencia de SP se realizaron 40 indentaciones a 10 partículas obteniendo una constante elástica de 0.23 ± 0.05 N/m, que corresponde al valor obtenido en ausencia de la poliamina.

Se ha observado que este **proceso es reversible**. Se realizaron 54 indentaciones en 8 partículas diferentes tras lavar la muestra de viriones varias veces con una disolución buffer que no contiene SP. Se observó que los viriones recuperaban el valor original de la constante elástica, 0.33 ± 0.05 N/m. Los valores obtenidos durante estos experimentos se muestran en la figura 2.13.

Este resultado indica que **la SP no afectaba a la estructura proteica del bacteriófago** puesto que las precabezas en presencia y ausencia de SP muestran la misma constante elástica. Por tanto la SP borra la repulsión electrostática entre las hebras del material genético empaquetado desvelando que **la presión interna es el origen del reforzamiento mecánico**.

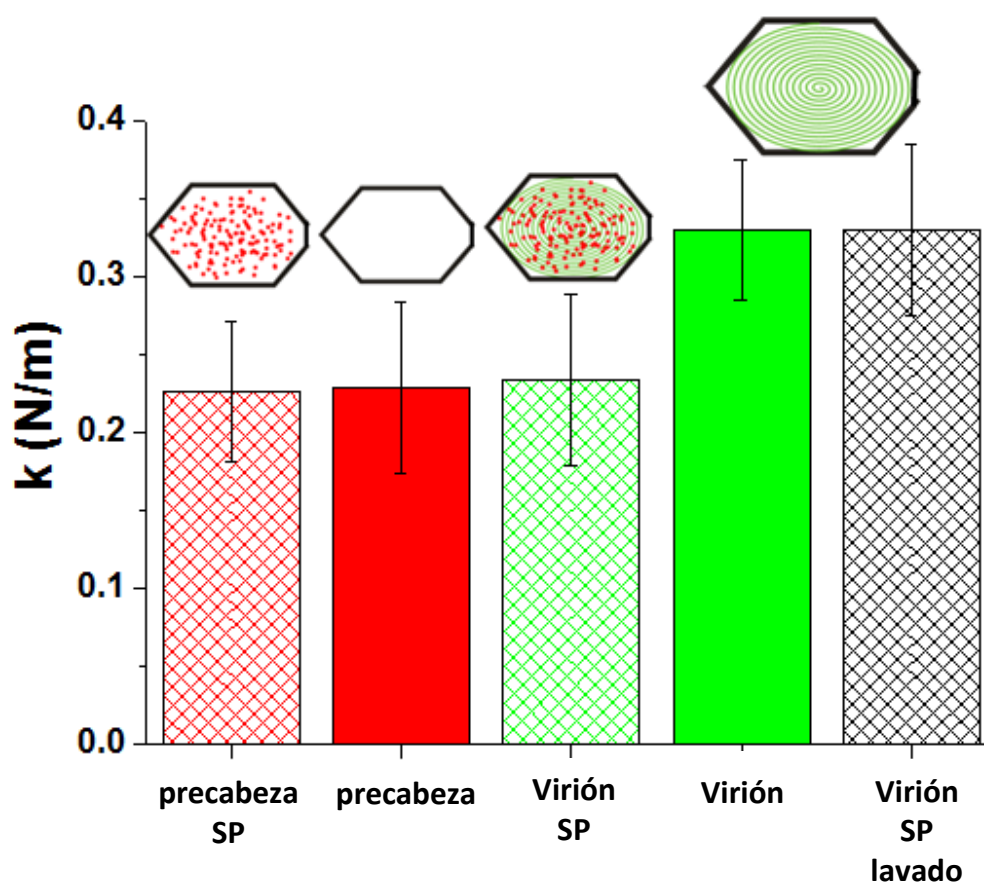


Figura 2.13: Distribución de las constantes elásticas. Diagrama de barras de los valores de elasticidad obtenidos para precabezas y viriones en presencia de SP. Como se puede observar en presencia de SP el valor de constante elástica de los viriones decae hasta el valor de la precabeza. Después de eliminar la SP, los viriones recuperan su elasticidad original.

2.4. Modelo teórico de Purohit

Para explicar el origen físico de la diferencia de rigidez que existe entre la cápsida y el virión, se propuso buscar un modelo basado en las interacciones electrostáticas que aparecen entre las hebras del ADN de cadena doble. El grupo del Profesor David Reguera desarrolló las ecuaciones y realizó cálculos basados el modelo de Purohit [5, 45] para aplicarlo al bacteriófago $\phi 29$ y evaluar la contribución del material genético en el aumento de constante elástica observado en el virión. Este modelo [5] estima cual es la presión interna dentro de una cápsida producida por el material genético empaquetado. Se considera que la energía que posee el ADN contiene dos contribuciones: la energía de *bending*, debido a que el ADN debe estar doblado a distancias menores que la longitud de persistencia (estimada en 50 nm); y la energía electrostática de interacción debida a la repulsión entre hebras vecinas. El ADN estaría almacenado a modo de carrete con una separación entre cada capa d_s que depende de la cantidad de genoma empaquetado.

$$G_{tot}(L, d_s) = G_{bend} + G_{int} \quad (2.13)$$

Donde G_{bend} es la energía de *bending* y G_{int} la energía electrostática.

Un valor exacto de esta energía puede llegar a ser un cálculo complicado. Varios experimentos confirman que la energía de interacción depende tanto de la valencia como de la concentración de la sal del medio en el cual esté inmerso. Para electrolitos monovalentes y divalentes esta contribución es puramente repulsiva, y la dependencia de la presión osmótica $\Pi(d_s)$ con la distancia entre las cadenas de ADN d_s fue obtenida de manera empírica por of Rau et al. (1984) [46]

$$\Pi(d_s) = F_0 e^{-\frac{d_s}{c}} \quad (2.14)$$

Donde c y F_0 son parámetros característicos de que dependen del electrolito.

Para el caso sales trivalentes y tetravalentes se obtiene que la interacción electrostática no es puramente repulsiva, puesto que depende de la distancia de separación entre hebras. En este caso la relación empírica puede escribirse como:

$$\Pi(d_s) = F_0 \left(\exp \left[-\frac{d_s - d_0}{c} \right] - 1 \right) \quad (2.15)$$

Donde d_0 es la separación óptima entre las hebras de ADN ($d_0 = 2.97 \text{ nm}$ para el caso de la espermidina [47]).

A partir de la fórmula empírica de la presión osmótica $\Pi(d_s)$, el Profesor David Reguera dedujo la expresión de la energía G_{int} y la expresión de la energía $G_{bend}(L)$.

$$G_{int} = \sqrt{3}L \int_{\infty}^{d_s} \Pi(x) x dx \quad (2.16)$$

$$G_{int} = \sqrt{3}F_0L(c^2 + cd_s)e^{-d_s/c} \quad (2.17)$$

$$G_{int} = \sqrt{3}F_0L \left[(c^2 + cd_s) \exp \left(-\frac{d_s - d_0}{c} \right) - (c^2 + cd_0) - \frac{1}{2}(d_0^2 - d_s^2) \right] \quad (2.18)$$

Se ha de tener en cuenta que esta energía de interacción obtenida a partir de la presión osmótica no sólo refleja la electrostática del ADN, sino que tiene en cuenta la contribución de la entropía y la de hidratación [48].

Los valores de las constantes c y F_0 que gobiernan las interacciones electrostáticas para las diferentes condiciones de *buffer* usadas en nuestros experimentos, se han obtenido mediante el ajuste de las ecuaciones 2.14-2.15, deducidas de los experimentos de *stress* osmótico por Rau et al., para el *buffer* TMS [49] y el *buffer* TMS + 1mM SP [47]. Del ajuste realizado para el *buffer* TMS, se obtiene que $F_0 = (3 \pm 1) 10^4 \text{ pN/nm}^2$ y $c = 0.30 \pm 0.01 \text{ nm}$, mientras el ajuste para para el *buffer* TMS+ 1mM SP (figura 2.14) se obtiene que $F_0 = 0.93 \pm 0.05 \text{ pN/nm}$ y $c = 0.210 \pm 0.005 \text{ nm}$ y usando como distancia de equilibrio entre fibras de ADN de $d_0 = 2.97 \text{ nm}$ [47].

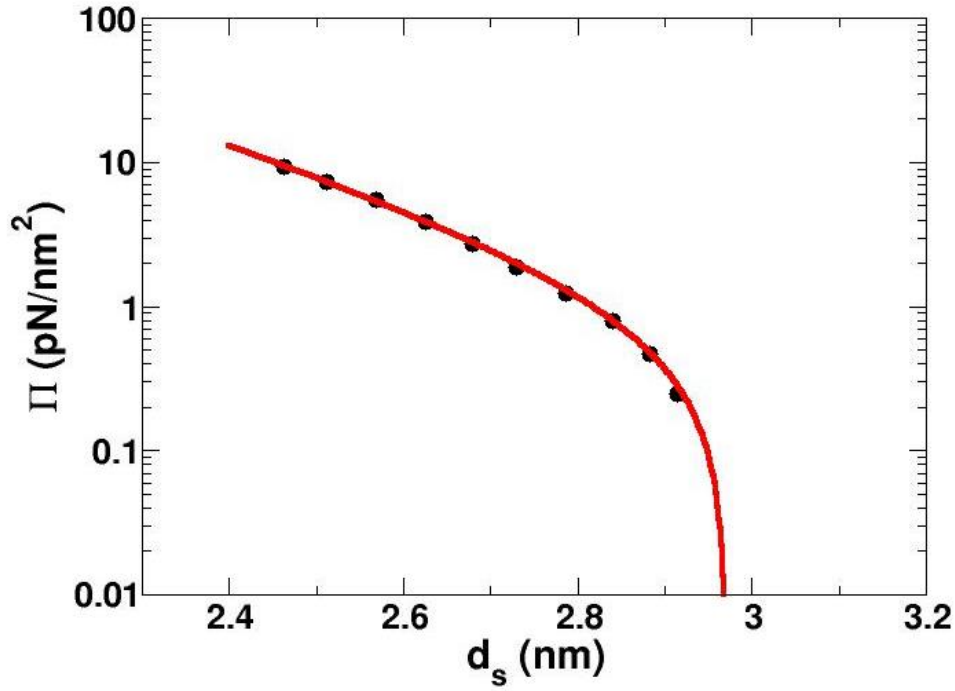


Figura 2.14: Presión osmótica. Curva de la presión osmótica (Π) en función de la separación hebras de ADN en presencia de espermidina (SP). Los puntos representan datos experimentales obtenidos por Todd et al [47]. La línea roja es un ajuste utilizando la ecuación 2.15.

La energía de *bending* G_{bend} viene expresada en función de la longitud del ADN y las dimensiones del espacio en el cual está confinado.

$$G_{bend}(L) = \frac{2\pi\xi_p k_B T}{\sqrt{3}d_s} \int_R^{R_{out}} \frac{N(R')}{R'} dR' \quad (2.19)$$

$$L = \frac{4\pi}{\sqrt{3}d_s} \int_R^{R_{out}} R' N(R') dR' \quad (2.20)$$

Una vez conocidas las contribuciones de las energías G_{bend} y G_{int} se obtuvo la distancia óptimas entre las hebras de ADN d_s minimizando la energía total.

$$P = - \left(\frac{\partial G_{tot}}{\partial V} \right) \quad (2.21)$$

$$L = \frac{8\pi}{3\sqrt{3}d_s^2}(R_{out}^2 - R^2)^{3/2} - \frac{8h}{\sqrt{3}d_s^2} \left(\frac{R}{2} \sqrt{R_{out}^2 - R^2} + \frac{R_{out}^2}{2} \left(\sinh^{-1} \left(\frac{R}{R_{out}} \right) - \frac{\pi}{2} \right) \right) \quad (2.21)$$

$$G_{bend}(L) = -\frac{4\pi\xi_p k_B T}{\sqrt{3}d_s} \left(\sqrt{R_{out}^2 - R^2} - R_{out} \log \left(\frac{R_{out} + \sqrt{R_{out}^2 - R^2}}{R} \right) \right) \quad (2.22)$$

Donde R_{out} denota el máximo radio externo que puede alcanzar el material genético enrollado a modo de ovillo y que coincidiría con el radio interno R_{in} de la cápsida vírica.

A partir de estas expresiones utilizando las dimensiones de la cápsida del bacteriófago $\phi 29$ y longitud de ADN de doble cadena que empaqueta, el Profesor David Reguera obtuvo la distancia óptima de separación entre cadenas ADN (figura 2.15a) y el valor de la presión interna que se producía para cada uno de las condiciones de buffer utilizadas en los experimentos como se muestra en la figura 2.15b.

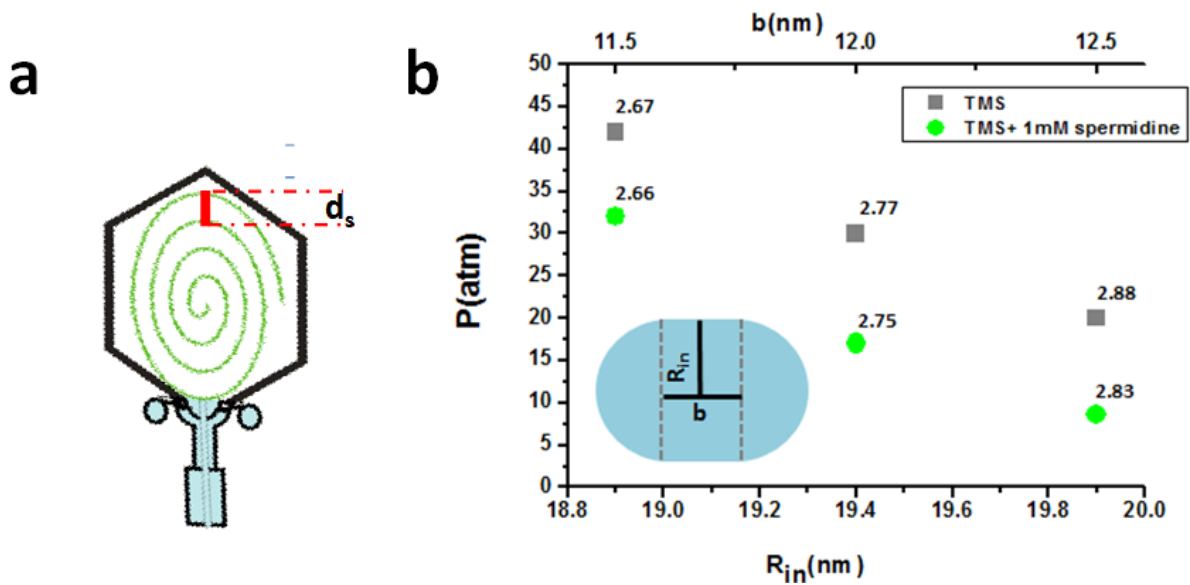


Figura 2.15: Presión interna en bacteriófago $\phi 29$. a) Esquema representativo de la distribución ADN empaquetado en el interior del bacteriófago. b) Representación de los valores de presión predichos por el modelo de Purohit en función de las dimensiones de la cápsida vírica para dos condiciones de *buffer*. R_{in} denota el radio máximo que puede alcanzar el material genético empaquetado a modo de ovillo, y b la longitud del cuerpo cilíndrico de la cápsida.

Para evaluar esta presión se consideró al bacteriófago $\phi 29$, como un esfero-cilindro de radio interno $R_{in} = 19.4 \text{ nm}$, espesor de pared $h = 1.6 \text{ nm}$ y longitud del cuerpo cilíndrico $b = 12 \text{ nm}$ [14]. De esta forma se obtuvo que el valor de la presión interna del bacteriófago $\phi 29$ es de $30 \pm 12 \text{ atm}$ y $17 \pm 12 \text{ atm}$ para condiciones de buffer TMS y TMS+ 1mM SP respectivamente. Estos valores indican que **la presencia de espermidina (SP) reduce significativamente la repulsión electrostática entre las cadenas de ADN, disminuye la presión dentro del bacteriófago y por tanto la constante elástica del mismo.**

2.5. Modelo mecánico de cápsida presurizada

Otro de los recursos utilizados en el grupo del Profesor David Reguera para evaluar la presión interna dentro del bacteriófago $\phi 29$ a partir de los cambios de dureza obtenidos en viriones y cápsidas, es la utilización de las simulaciones de FEM en nanocontenedores presurizados. En este caso se optó por abordar el problema desde un punto de vista puramente mecánico. Se pretendió obtener u observar cambios en la constante elástica de una estructura cerrada debidos a una presión interna. Notar que en estas simulaciones el origen de la presión no es considerada. El grupo del Profesor David Reguera realizó múltiples simulaciones usando el programa COMSOL Multiphysics 4.2a (Comsol, Stockholm, Sweden) [45].

La cápsida del bacteriófago $\phi 29$ fue modelada con 5000 elementos que dan lugar a una estructura con forma de esfero-cilindro, dentro de la aproximación *Thin Shell* y con dimensiones de la cápsida del fago $\phi 29$, que es indentada por una esfera en la parte ecuatorial de la misma (figura 2.16a). El valor de la constante elástica es obtenida de la pendiente de las curvas F vs. I para pequeñas deformaciones. De esta forma se observaron los cambios en la respuesta elástica de la estructura como función de la presión en el interior de la misma (figura 2.16b).

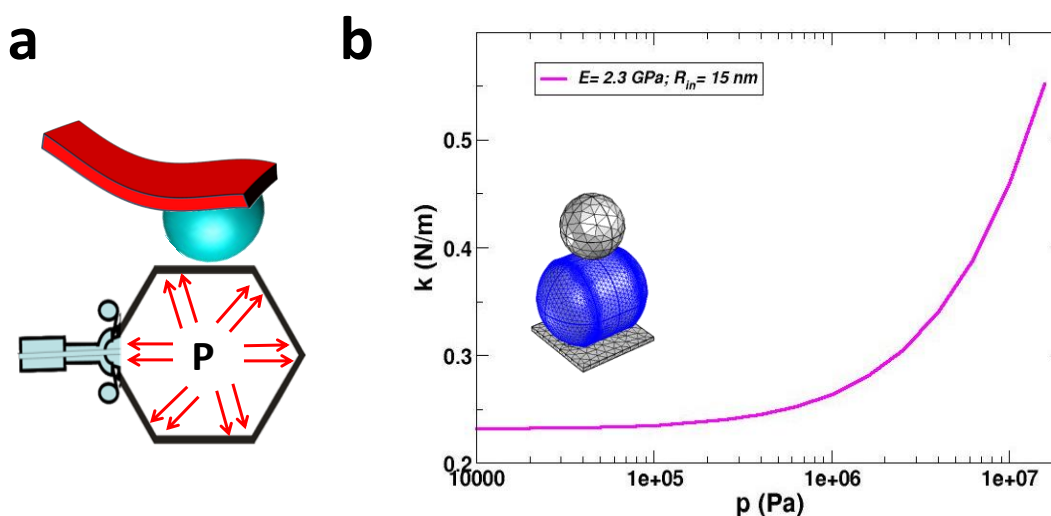


Figura 2.16: Modelo mecánico de cápsida presurizada. a) Esquema de una nanoindentación realizada con una punta esférica sobre una cápsida presurizada. b) Representación de la variación de la constante elástica en función de la presión interna para una estructura hueca con $E=2.3\text{GPa}$ y $R_{in}=15\text{nm}$. El valor de 0.33 N/m se alcanza cuando la presión es de 40 atm .

Se realizaron múltiples simulaciones considerando diferentes valores para el módulo de Young para la cápsida (1GPa a 10GPa), diferentes tamaños de radio de la punta esférica R_{in} (5nm a 15nm) y k_0 igual al valor de la constante elástica obtenida en los experimentos de AFM para la cápsida vacía (no presurizada). Los resultados de estas simulaciones convergieron en una curva universal (línea roja en figura 2.17) que proporciona la diferencia de rigidez de la cápsida de en función una variable adimensional τ , que depende de la presión interna según la ecuación 2.23.

$$\tau = p \cdot R / k_0 \quad (2.23)$$

Para cambios de respuesta elástica similares a los obtenidos en los experimentos de nanoindentaciones con AFM, $k/k_0 = 1.44 \pm 0.22$ (figura 2.17) se obtuvo que $\tau = 0.36 \pm 0.2$. Traducido a unidades de presión nos indicaría que la estructura debiera estar **presurizada con 40 ± 20 atmósferas** aproximadamente, como se deduce de la curva representada en la figura 2.17.

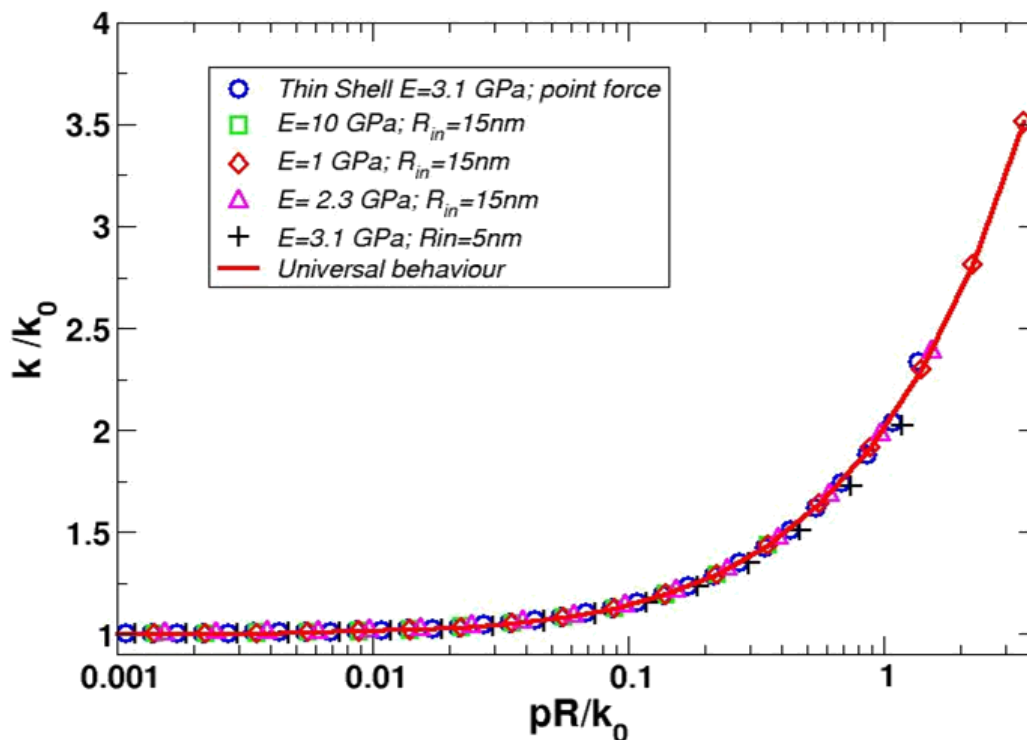


Figura: 2.17: Simulaciones de FEM para cápsida presurizada. Resultados de múltiples simulaciones de FEM que predicen los cambios de respuesta elástica de una estructura con forma de un esfero-cilindro como función de la presión interna en su interior

El valor de presión interna estimado mediante las simulaciones de FEM (40 ± 20 atm) concuerda, dentro del error, con el obtenido usando la aproximación del modelo de Purohit 30 ± 12 atm.

2.6. Resumen y conclusiones

A largo de este capítulo se ha caracterizado mecánicamente las partículas víricas que aparecen en el ciclo viral del bacteriófago $\phi 29$: precabeza, cápsida y virión.

Se ha observado que la precabeza del bacteriófago $\phi 29$ muestra anisotropía en la respuesta elástica, cuyo orden no se puede justificar mediante simulaciones de FEM y aplicando la teoría de la elasticidad de medios continuos. **La parte cilíndrica de las precabezas muestra un valor de constante elástica más alto que la esférica siendo irrelevante la existencia del conector.** El desacuerdo existente con la teoría se puede justificar por la existencia de *pre-stress* en la estructura cuyo origen proviene de la forma de ensamblado de las proteínas que la componen. Las subunidades proteicas (capsómeros) están expuestas a diferentes valores de interacciones intercapsoméricas que dependen de la posición ocupada en la estructura. Esto provoca una distribución de *stress* lateral en la estructura. Así, **los hexámeros situados en la parte ecuatorial del esfero cilindro soporta 2.6 más veces *stress* lateral local que los pentámeros situados en la región esférica.** Además **la relación entre la variación de *stress* en la zona cilíndrica y la esférica es aproximadamente 1.5, siendo consistente con la tendencia observada en los experimentos.**

Se ha observado experimentalmente que **la ausencia de cola no modifica la respuesta elástica ya que el valor de constante elástica obtenido en las precabezas es el mismo que para las cápsidas.**

Se ha observado que **el ADN provoca un aumento de la rigidez mecánica en los virus.** Además este aumento indicaría la existencia de presión interna en su interior y el origen de ésta provendría de las interacciones electrostáticas existentes entre las cadenas de ADN empaquetado. **Los experimentos en presencia de espermidina (SP) confirman la existencia de presión interna en el bacteriófago $\phi 29$.**

Usando **el modelo de Purohit** para dar una **interpretación puramente electrostática** de nuestros resultados experimentales se obtiene que **la presión interna en el interior del virus es de aproximadamente 30 ± 12 atm.**

Por otro lado, **una interpretación puramente mecánica**, ya que no se tiene en cuenta el origen de la presión, **nos indicaría que el bacteriófago se encuentra presurizado a 40 ± 20 atm.**

Por tanto se confirma que **mediante experimentos de AFM hemos podido obtener, por primera en un bacteriófago, evidencias de presión interna en su interior.**

2.7. Referencias

1. Carter, J. and V. Saunders, *Virology: Principles and Applications*, ed. Wiley. 2007, New Jersey.
2. Xiang, Y., et al., Structural changes of bacteriophage phi 29 upon DNA packaging and release. *Embo Journal*,25 (21): p. 5229-5239,(2006).
3. Gelbart, W.M., et al., What drives the translocation of stiff chains? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,100 (15): p. 8649-8653,(2003).
4. Gelbart, W.M. and C.M. Knobler, Pressurized Viruses. *Science*,323 (5922): p. 1682-1683,(2009).
5. Purohit, P.K., et al., Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. *Biophysical Journal*,88 (2)2005).
6. Smith, D.E., et al., The bacteriophage phi 29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*,413 (6857)2001).
7. Rickgauer, J.P., et al., Portal motor velocity and internal force resisting viral DNA packaging in bacteriophage phi 29. *Biophysical Journal*,94 (1): p. 159-167,(2008).
8. Earnshaw, W.C. and S.C. Harrison, DNA Arrangement in Isometric Phage Heads. *Nature*,268 (5621): p. 598-602,(1977).
9. Wiggins, P.A., et al., High flexibility of DNA on short length scales probed by atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology*,1 (2): p. 137-141,(2006).
10. Rau, D.C., B. Lee, and V.A. Parsegian, Measurement of the repulsive force between polyelectrolyte molecules in ionic solution: hydration forces between parallel DNA double helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*,81 (9): p. 2621-2625,(1984).
11. Cordova, A., et al., Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophysical Journal*,85 (1): p. 70-74,(2003).
12. Camacho, A., et al., Assembly of Bacillus-Subtilis Phage-Phi-29 .1. Mutants in Cistrons Coding for Structural Proteins. *European Journal of Biochemistry*,73 (1): p. 39-55,(1977).

13. Yu, Z.Y. and C. Bajaj, Computational Approaches for Automatic Structural Analysis of Large Biomolecular Complexes. *Ieee-Acm Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*,5 (4): p. 568-582,(2008).
14. Tao, Y.Z., et al., Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. *Cell*,95 (3): p. 431-437,(1998).
15. Choi, K.H., et al., Determinants of bacteriophage phi 29 head morphology. *Structure*,14 (11): p. 1723-1727,(2006).
16. Ibarra, B., et al., Topology of the components of the DNA packaging machinery in the phage phi 29 prohead. *Journal of Molecular Biology*,298 (5): p. 807-815,(2000).
17. Morais, M.C., et al., Bacteriophage phi 29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. *Nature Structural Biology*,10 (7): p. 572-576,(2003).
18. Guasch, A., et al., Detailed architecture of a DNA translocating machine: The high-resolution structure of the bacteriophage phi 29 connector particle. *Journal of Molecular Biology*,315 (4): p. 663-676,(2002).
19. Tang, J.H., et al., DNA poised for release in bacteriophage phi 29. *Structure*,16 (6): p. 935-943,(2008).
20. Ivanovska, I.L., et al., Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101 (20): p. 7600-7605,(2004).
21. Morais, M.C., et al., Conservation of the capsid structure in tailed dsDNA bacteriophages: the pseudoatomic structure of phi 29. *Molecular Cell*,18 (2): p. 149-159,(2005).
22. Villarrubia, J.S., Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimation. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*,102 (4): p. 425-454,(1997).
23. Horcas, I., et al., WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*,78 (1)2007).
24. Carrasco, C., et al., DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,103 (37): p. 13706-13711,(2006).

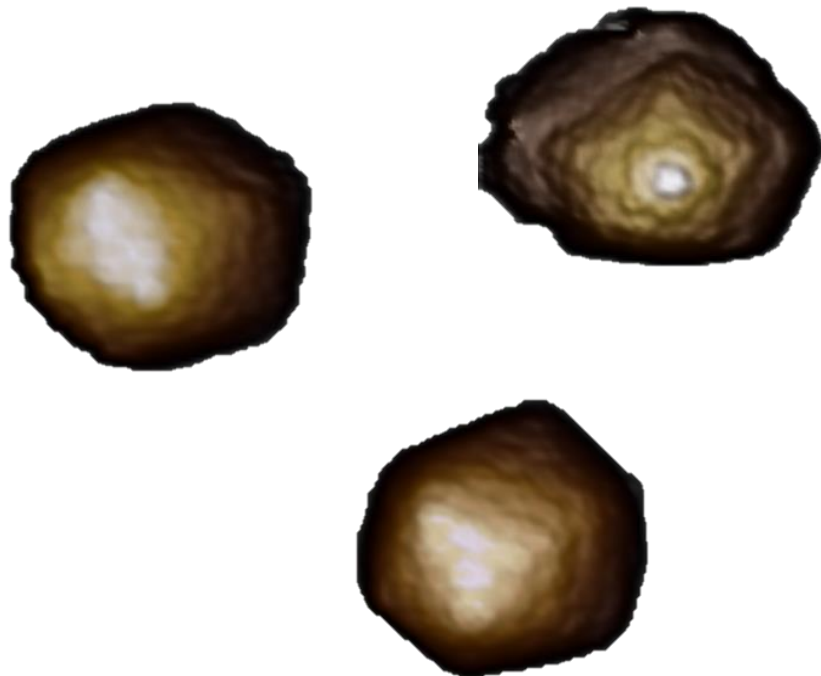
25. Roos, W.H., et al., Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,106 (24): p. 9673-9678,(2009).
26. Carrasco, C., et al., Built-In Mechanical Stress in Viral Shells. *Biophysical Journal*,100 (4): p. 1100-1108,(2011).
27. Ivanovska, I.L., et al., Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101 (20): p. 7600-7605,(2004).
28. Landau, L.D. and E. Lifshitz, *Theory of Elasticity*. 3rd ed. 1986, London: Pergamon
29. Evilevitch, A., et al., Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (16): p. 9292-9295,(2003).
30. Koster, S., et al., Influence of Internal Capsid Pressure on Viral Infection by Phage lambda. *Biophysical Journal*,97 (6): p. 1525-1529,(2009).
31. Zandi, R. and D. Reguera, Mechanical properties of viral capsids. *Physical Review E*,72 (2): p. 21917,(2005).
32. Chandra, N., S. Namila, and C. Shet, Local elastic properties of carbon nanotubes in the presence of Stone-Wales defects. *Physical Review B*,69 (9): p. 094101,(2004).
33. Luque Santolaria, A., *Structure, Mechanical Properties, and Self-Assembly of Viral Capsids*. Tesis doctoral, Departament de Física Fonamental, Facultat de Física, Universitat de Barcelona,(2011).
34. Zandi, R., et al., Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101 (44): p. 15556-15560,(2004).
35. Luque, A., R. Zandi, and D. Reguera, Optimal architectures for elongated viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,107 (2): p. 5323–5328,(2010).
36. Kuznetsov, Y.G. and A. McPherson, Atomic Force Microscopy in Imaging of Viruses and Virus-Infected Cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,75 (2): p. 268-285,(2011).

37. Gonzalez-Huici, V., M. Salas, and J.M. Hermoso, The push-pull mechanism of bacteriophage O29 DNA injection. *Molecular Microbiology*,52 (2): p. 529-540,(2004).
38. Ivanovska, I., et al., Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,104 (23): p. 9603-9608,(2007).
39. Carrasco, C., et al., Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,105 (11): p. 4150-4155,(2008).
40. Evilevitch, A., et al., Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,100 (16): p. 9292-9295,(2003).
41. Leforestier, A., et al., Bacteriophage T5 DNA Ejection under Pressure. *Journal of Molecular Biology*,384 (3): p. 730-739,(2008).
42. Bloomfield, V.A., DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers*,44 (3): p. 269-282,(1997).
43. Hud, N.V. and K.H. Downing, Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: The fine structure of DNA toroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,98 (26): p. 14925-14930,(2001).
44. Leforestier, A. and F. Livolant, Structure of toroidal DNA collapsed inside the phage capsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,106 (23): p. 9157-9162,(2009).
45. Hernando-Pérez, M., et al., Direct Measurement of Phage phi29 Stiffness Provides Evidence of Internal Pressure. *Small*,8 (15): p. 2365,(2012).
46. Parsegian, V.A. and D.C. Rau, WATER NEAR INTRACELLULAR SURFACES. *Journal of Cell Biology*,99 (1):p.196-200,(1984).
47. Todd, B.A., et al., Attractive forces between cation condensed DNA double helices. *Biophysical Journal*,94 (12): p. 4775-4782,(2008).
48. Purohit, P.K., J. Kondev, and R. Phillips, Mechanics of DNA packaging in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,100 (6): p. 3173-3178,(2003).

-
49. Harvey, S.C. and A.S. Petrov, Structural and thermodynamic principles of viral packaging. *Structure*,15 (1): p. 21-27,(2007).

CAPÍTULO 3:

**BACTERIÓFAGO T7: ESTABILIDAD QUÍMICA
Y ESTRUCTURAL**



3. BACTERIÓFAGO T7: ESTABILIDAD QUÍMICA Y ESTRUCTURAL

3.1. Introducción

Una de las etapas particularmente importantes del ciclo vírico es el proceso de maduración de la precabeza. Durante este proceso, primero las proteínas víricas son expresadas en el núcleo o citoplasma de la célula infectada. Después se ensamblan, a modo de “Lego”, en una primera estructura en forma de contenedor, denominada precabeza. Las proteínas de la precabeza sufren cambios conformacionales, como pueden ser giros y cambios de orientación, que permitirán establecer nuevas interacciones con las proteínas vecinas. Durante este proceso además, es posible que estas estructuras proteicas aumenten su volumen, como consecuencia de un aumento en diámetro y una disminución del grosor de la pared. Esta nueva estructura es denominada cápsida madura, la cual empaquetará el material genético, dando lugar a una nueva partícula vírica con capacidad infectiva, el virión.

El proceso de maduración es específico de cada virus variando en virus eucariotas y procariotas. En particular, los bacteriófagos después de encapsular el material genético, sellan la cápsida con una estructura a modo de canal, la cola.

Durante el ciclo viral, las estructuras proteicas que forman el virus están sometidas a diferentes condiciones fisicoquímicas [1] como cambios de temperatura, pH, fuerza iónica [2] o deshidratación [3]. Por tanto, el proceso de maduración de los virus es la fase que debe garantizar la formación de una cápsida estable para hacer frente a estas fuentes de *stress* durante la etapa extracelular del ciclo, y que pueda infectar a otra célula [4]. El proceso de reorganización de las proteínas de la precabeza, por tanto, parece ser crucial para alcanzar la estabilidad fisicoquímica necesaria para completar el ciclo. Se han descrito diferentes rutas de maduración para los bacteriófagos. Estos procesos incluyen entre otros mecanismos, la inserción de nuevas proteínas como el bacteriófago λ [5],

inserción de nuevos dominios como el bacteriófago $\phi 29$ [6] o el aumento del número de enlaces covalente en la estructura como en el fago HK97 [7].

A lo largo de este capítulo se ha estudiado el proceso de maduración del bacteriófago T7. Nos hemos centrado en los cambios de estabilidad que se producen durante maduración de la cápsida. Se han estudiado para ello la precabeza y la cápsida madura. De ambas estructuras víricas, se ha caracterizado la resistencia frente a diferentes dos fuentes de estres químico, como urea y GuHCl , y a estres mecánico mediante experimentos de fatiga mecánica realizados con el microscopio de fuerzas atómicas.

3.1.1. El bacteriófago T7

El bacteriófago T7 proviene de la familia *Podoviridae*. El virión presenta una cápsida icosaédrica con una corta cola de 18.5 nm de longitud situada en uno de los vértices del icosaedro [8, 9]. La cápsida de T7 está formada por 415 copias de la proteína mayoritaria gp10A y gp10B, distribuidas en hexones (6 proteínas) y pentones (5 proteínas) proporcionando un número de triangulación $T=7$ [8]. En el mismo vértice donde se sitúa la cola, existe una estructura formada por la proteína gp8 denominada conector. El conector está unido a una estructura cilíndrica interna, el *core* (gp14, gp15 y gp16), que junto a la estructura de la cola, forman un canal por el cual el material genético es eyectado en el interior de la célula huésped [10]. Las precabezas de T7 además, contienen unas proteínas de andamiaje (gp9) necesarias para el auto-ensamblado de la cápsida (figura 3.1a). Estas proteínas son expulsadas cuando comienza la expansión de la precabeza, iniciada por el empaquetamiento de ADN de cadena doble y la adición de la cola. Los 40 kbp de material genético de aproximadamente 13.6 μm de longitud se enrollan a modo de ovillo a la estructura del *core*, como se muestra en la figura 3.1b.

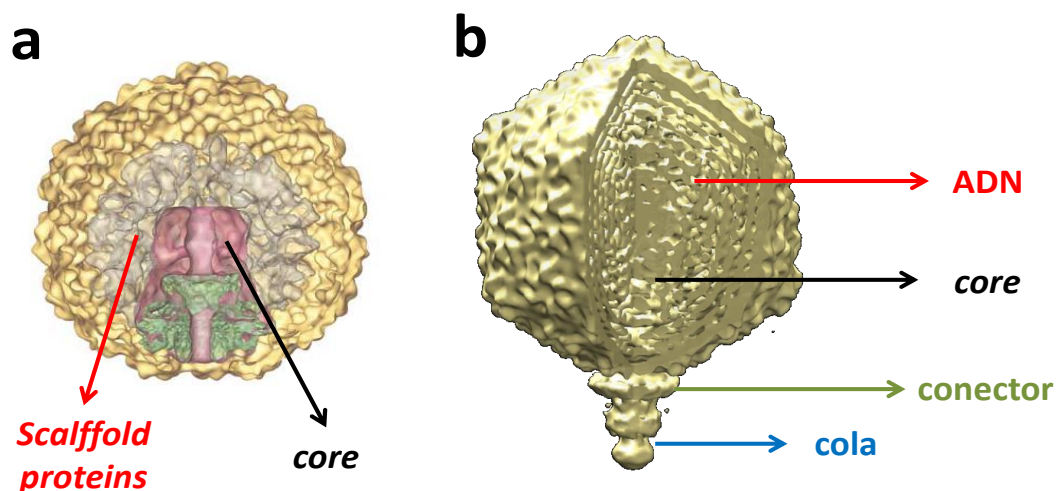


Figura 3.1: Estructura de las partículas víricas del bacteriófago T7. a) Imagen de la sección transversal de la reconstrucción de cryo-EM de la precabeza del bacteriófago T7. En la imagen se observa la estructura de la precabeza (amarillo) EMD 1161-1164. Se distingue el complejo núcleo-proteína de andamiaje reconstruida sin aplicar simetría (gris transparente), la estructura del *core* (magenta) y la estructura del conector (verde). b) Imagen de cryo-EM de la estructura del bacteriófago T7. Se observa la estructura de la cabeza, el ADN ordenado, el *core*, el conector y la cola.

Durante el proceso de maduración la precabeza de T7 incrementa su volumen. El diámetro interno del icosaedro aumenta de 51 a 60 nm y el grosor de la pared disminuye de 4.1 a 2.3 nm como consecuencia de la reorganización de las proteínas de la estructura de la precabeza [8, 11], como se observa en la figura 3.2. Recientemente se ha descubierto que, en el caso del bacteriófago T7, esta reorganización conlleva únicamente un aumento de las áreas de interacción entre las subunidades proteicas [12]. Se puede deducir por tanto que el bacteriófago T7 presenta la ruta o vía de maduración más simple de todos los bacteriófagos.

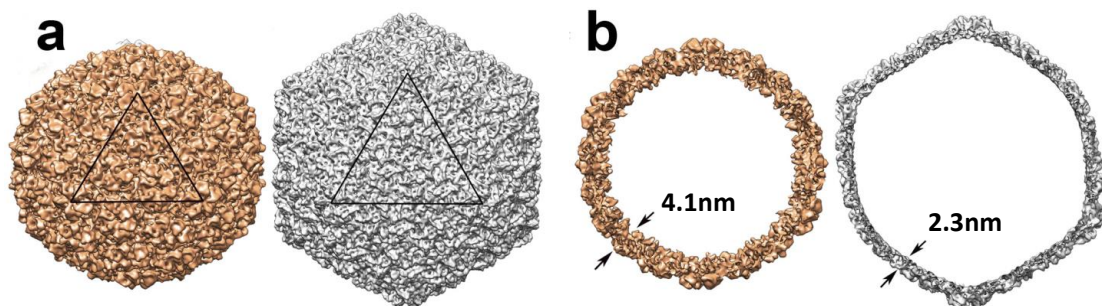


Figura 3.2: Maduración de bacteriófago T7. Comparativa de los cambios en volumen producidos durante la maduración de la precabeza del bacteriófago T7 [12]. a) Imágenes de cryo-EM orientadas en el eje de simetría 3 para una precabeza (naranja) y una cápsida madura (gris). Se observa un aumento del diámetro de la estructura. b) Corte transversal de las imágenes de cryo-EM de la precabeza (naranja) y cápsida madura (gris). El grosor de la estructura de la precabeza disminuye durante el proceso de expansión de la misma.

3.2 Estabilidad química durante la maduración

Durante el ciclo extracelular las partículas víricas deben hacer frente a condiciones fisicoquímicas adversas. El proceso de maduración de un bacteriófago no sólo debe garantizar la creación de una nueva partícula infectiva, sino también la formación de una cápsida madura capaz de soportar estas condiciones fisiológicas durante la etapa extracelular. La cápsida del virus debe ser lo suficientemente estable como para poder proteger el material genético que debe transportar durante su ciclo vírico. Se estudiaron los cambios en la estabilidad química y mecánica que se producen en la estructura de la cápsida durante el proceso de maduración del bacteriófago T7. Para examinar las diferencias en la estabilidad química entre las precabezas y las cápsidas maduras el grupo del Profesor José. L. Carrascosa sometió ambas estructuras a diferentes tipos de *stress* químicos. Se utilizaron diferentes concentraciones de Urea y GuHCl, dos agentes químicos que provocan la desnaturalización de proteínas. Mientras la adición de Urea bloquea los parches hidrofóbicos expuestos, el GuHCl provoca el bloqueo de las interacciones electrostáticas entre las subunidades proteicas.

La figura 3.3 corresponde a una selección de las imágenes de TEM tomadas después del tratamiento realizado durante 20 minutos con diferentes concentraciones de los agentes desnaturalizantes. Se observa que para una concentración 3M de Urea un alto porcentaje de las precabezas se ha desensamblado, alcanzando la totalidad (100 %) al someterlas a una concentración 4M de la misma. Por el contrario las cápsidas maduras se mantienen íntegras bajo las mismas condiciones químicas. El mismo efecto o comportamiento fue encontrado cuando ambas partículas se sometieron a concentraciones 1M y 2M de GuHCl. Estos resultados indicaron que **el proceso de maduración en el bacteriófago T7 incrementa la estabilidad de la estructura ante tratamientos químicos**. Este aumento proporcionará a la estructura la estabilidad necesaria para soportar condiciones adversas durante el periodo extracelular del ciclo vírico.

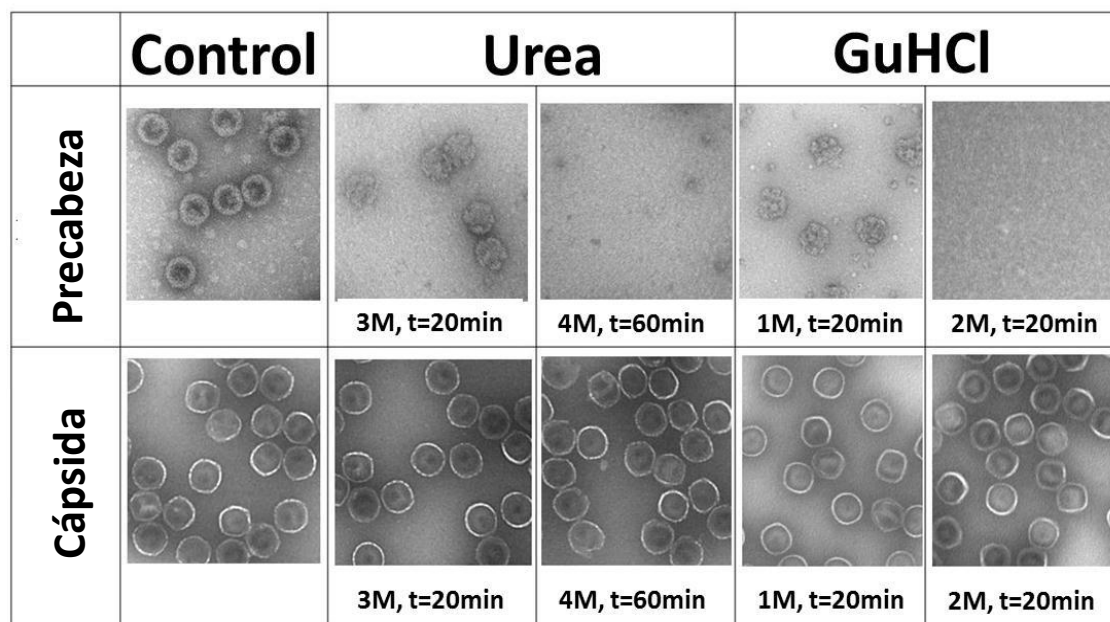


Figura 3.3: Estabilidad química de precabezas y cápsidas de T7. Selección de imágenes de EM tomadas por el grupo del Profesor José. L. Carrascosa después de tratar ambas partículas, precabeza y cápsida madura, con agentes desnaturizantes, Urea y GuHCl. Se observa que bajo las mismas condiciones las estructuras de las cápsidas maduras permanecen intactas mientras que las estructuras de las precabezas se han desnaturizado por completo.

3.3. Caracterización mecánica del bacteriófago T7

Diversos trabajos realizados en los últimos años basados en experimentos con AFM han tratado de justificar la estabilidad de los virus basándose en algunas propiedades mecánicas de la estructura como son: la dureza, la fragilidad, la elasticidad o el módulo de Young [13, 14].

A partir de las simulaciones de FEM [15] se modela la estructura de la cápsida como homogénea y continua para justificar la respuesta elástica o aplicando la teoría de la elasticidad de medios continuos homogéneos [14, 16] se utiliza la relación entre el módulo de Young (E) y la constante elástica (k), $k = \frac{\alpha E h^2}{R}$. De esta forma se han estimado cambios en el valor del módulo de Young a partir de la constante elástica para justificar cambios mecánicos en la estructura de las cápsidas vírica. Algunos autores han propuesto

que el aumento de ambas propiedades mecánicas, la constante elástica [17] y el módulo de Young [14], está asociado con un aumento de la estabilidad de la estructura proteica.

Para estimar los posibles cambios en estabilidad que se producen en las cubiertas proteicas de las partículas víricas que aparecen en el ciclo biológico del fago T7 se estudió la respuesta elástica de la precabeza, la cápsida maduras y el virión realizando experimentos de nanoindentación con el AFM en condiciones fisiológicas.

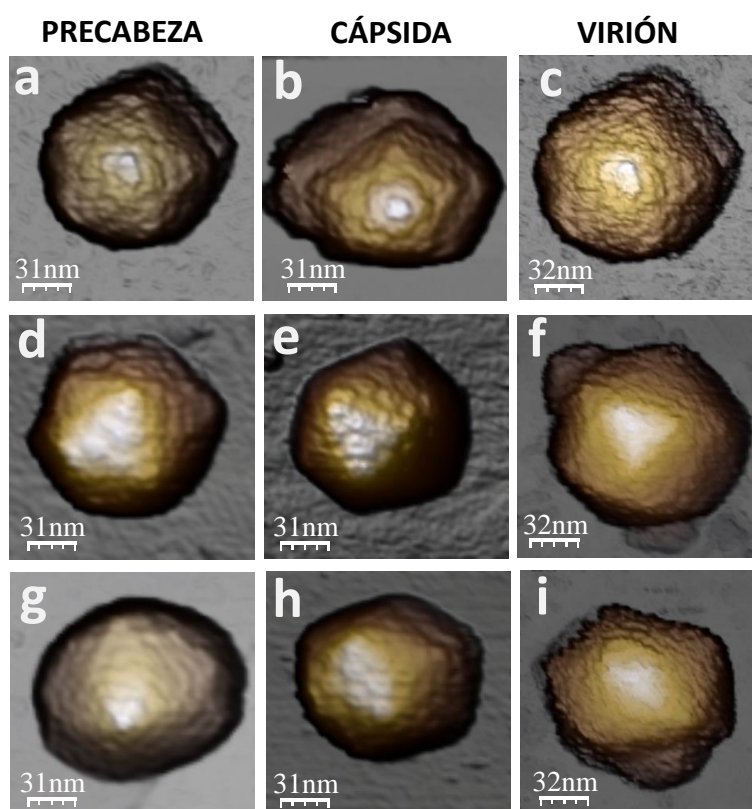


Figura 3.4: Precabeza, cápsida y virión del bacteriófago T7. Imágenes de topografía de AFM de las partículas víricas del bacteriófago T7 depositadas sobre HOPG en condiciones fisiológicas sobre las diferentes geometrías de adsorción. a-c) eje de simetría 5. d-f) eje de simetría 3. g-i) en orientación no específicas (ONE).

Precabezas, cápsidas maduras y viriones fueron adsorbidas sobre un sustrato de grafito (HOPG) siguiendo el procedimiento descrito en el Apéndice I (figura 3.4). Las imágenes de AFM muestran partículas de entre 50-60 nm de altura, en las que se distinguen las diferentes geometrías de adsorción sobre el sustrato: simetría 5 (S5),

simetría 3 (S3) y simetría 2 (S2). Aparecen también otras orientaciones de adsorción que no corresponden a simetrías evidentes, a las que denominamos Orientación No Específica (ONE). Como comprobación, se extrajeron las imágenes de los volúmenes dilatados de la estructura del bacteriófago orientada en las diferentes geometrías de adsorción. Estas imágenes fueron obtenidas a partir la reconstrucción de cryo-EM (EMD.1164.map) [8] y aplicando el algoritmo de dilatación descrito por Villarubia et al [18, 19], con una punta de radio de 10 nm (Figura 3.5). De las características en topografía de los volúmenes dilatados y de las imágenes de reconstrucción cryo-EM se deduce que, a partir de las imágenes obtenidas con AFM, es posible identificar las diferentes geometrías de adsorción de todas las partículas víricas. En la figura 3.4 se observa que no sólo es posible identificar la orientación de las partículas sobre el sustrato sino también, la posición de las unidades morfológicas de la estructuras (pentones y hexones).

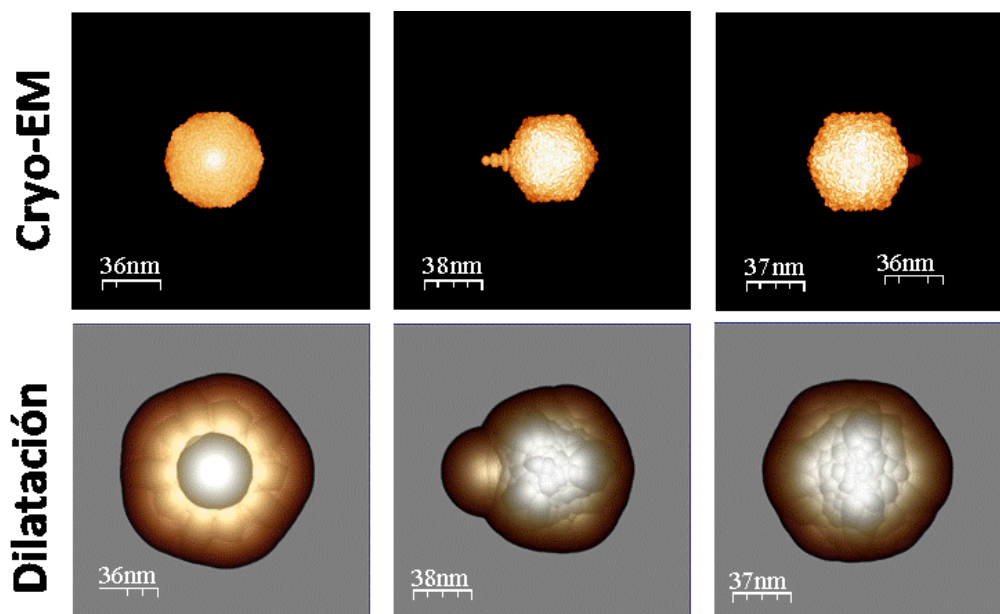


Figura 3.5: Volumen dilatado de la estructura del virión del bacteriófago T7. En la fila de la arriba se muestran las imágenes de cryo-EM del bacteriófago T7 en las diferentes geometrías de adsorción sobre un sustrato, mostrando las características morfológicas de los diferentes ejes de simetría orientación (S5, S3 y S2). En la fila de la abajo se muestran las imágenes dilatadas obtenidas a partir de las imágenes de cryo-EM, considerando una punta de 10nm de radio.

Se caracterizó la respuesta mecánica en función de los tres ejes de simetría S5, S3 y S2 y sobre aquellas que no mostraban una orientación bien definida. Los viriones adsorbidos en simetría 2 no fueron caracterizados mecánicamente debido a que en esta orientación la cola está tocando el sustrato y puede llevar a una caracterización mecánica errónea. Del mismo modo, esta orientación no fue estudiada para las precabezas debido a la inestabilidad en adsorción que presentan.

Para caracterizar mecánicamente la respuesta elástica de todas las partículas se realizaron ciclos de 5 curvas F vs. Z en la parte más alta de cada una de ellas. La longitud de la indentación producida por las curvas F vs. Z fue del orden del grosor de la pared de cada una de las estructuras. Del valor de la pendiente de cada una de las indentaciones se obtuvo el valor de la constante elástica. Así se realizaron 137 nanoindentaciones en 25 precabezas (rojo), 219 nanoindentaciones en 41 cápsidas (gris) y 138 nanoindentaciones en 25 viriones (azul). Los valores de la constante elástica fueron clasificadas según la geometría de adsorción para cada una de ellas: S5, S3, S2 y ONE. Los valores promedios de la constante elástica, se muestran a modo de histograma en la figura 3.5 y recogidos en la Tabla 3.1.

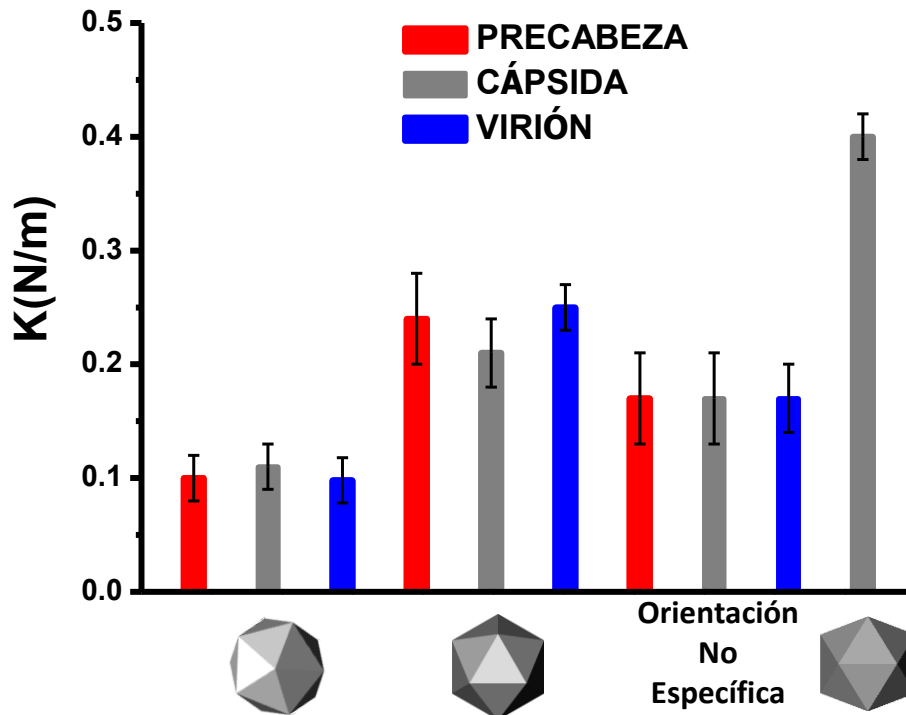


Figura 3.5: Constantes elásticas de precabezas, cápsidas y viriones. Valores de las constantes elásticas en los diferentes ejes de simetría obtenidos para precabezas, cápsidas y viriones del bacteriófago T7. Precabezas (columna roja), cápsidas (columna gris) y viriones (columna azul). Las partículas víricas presentan anisotropía en la respuesta mecánica.

	K_{S5} (N/m)	K_{S3} (N/m)	K_{S2} (N/m)	K_{ONE} (N/m)	# partículas	# FvZ
Precabeza	0.10 ± 0.02	0.24 ± 0.04	-----	0.17 ± 0.04	25	137
Cápsida	0.11 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.17 ± 0.04	41	219
Virión	0.10 ± 0.01	0.25 ± 0.02	-----	0.17 ± 0.03	25	138

Tabla 3.1 Sumario de constante elástica. Valores de las constantes elásticas obtenidos de las curvas de indentación realizadas en cada uno de los ejes de orientación S5, S3, S2 y ONE respectivamente. Los valores indicados corresponden a la media \pm Desviación Estándar.

Todas las partículas muestran anisotropía en la respuesta elástica, es decir, los valores obtenidos en cada uno de los ejes de simetría de adsorción son diferentes entre sí. Si observamos los valores de constante elástica obtenidos para la precabeza y la cápsida vemos son similares dentro del error. Únicamente se aprecia una leve diferencia entre la capsida y el virión alrededor de los ejes de simetría de orden 3. Esto indicaría que la presencia del material genético en el interior induce un aumento de la rigidez como ya ha sido observado en el fago λ [20], el fago $\phi 29$ [21], o el virus MVM [22]. Al contrario que el comportamiento encontrado cuando las partículas son sometidas a tratamientos químicos, vemos que las precabezas y las cápsidas poseen la misma elasticidad, y por tanto, la maduración no induce un aumento en la dureza de la estructura. Se deduce que **la constante elástica no es un indicador de estabilidad de las estructuras de las partículas víricas del bacteriófago T7**. Además, el hecho de que estas partículas presenten anisotropía en la respuesta elástica conllevaría a una anisotropía en el valor del módulo de Young, siendo esto inconsistente con las aproximaciones de la teoría de la elasticidad de medios continuos [16, 23] utilizados en trabajos anteriores para justificar la estabilidad [14]. Por tanto, **el módulo de Young no puede ser utilizado como parámetro físico descriptivo de estabilidad para el caso del bacteriófago T7**.

3.4. Estudio de la estabilidad mecánica durante la maduración

Como hemos visto, la elasticidad y el módulo de Young de las precabezas y cápsidas del bacteriófago T7 no pueden describir el comportamiento observado en los experimentos de estabilidad química. Para poder encontrar una correlación entre estabilidad química y mecánica se realizaron experimentos de fatiga mecánica en precabezas y cápsidas [24].

Los ensayos de fatiga mecánica son comúnmente usados en el estudio de la estabilidad de materiales en la macroescala. En este tipo de ensayos los materiales son sometidos a diferentes tipos de ciclos: de carga de fuerza constante o de carga a fuerza fluctuante. El primero de ellos es quizás el más conocido y utilizado. El material se somete a múltiples cargas de fuerza cíclicas para obtener información de la degradación del mismo debido a la formación de defectos o fisuras en la estructura.

Del mismo modo las precabezas y las cápsidas fueron sometidas a ciclos de carga mediante la realización de múltiples curvas F vs. l [25]. Todas las partículas fueron observadas después de cada curva para comprobar los efectos producidos en la estructura de las mismas. La fuerza aplicada en cada curva alcanzó valores de unos cientos de pN, produciendo deformaciones en las cubiertas proteicas de aproximadamente 6 nm. El alcance de estas deformaciones induce que ambas estructuras, procápsidas y cápsidas, respondan dentro de su comportamiento elástico, evitando la destrucción de las mismas [26].

En la figura 3.6 se muestran dos ejemplos significativos de los experimentos realizados sobre las precabezas. En el primero de ellos observamos una precabeza adsorbida sobre el eje de simetría 5 (figura 3.6a): después de la tercera deformación o ciclo de carga (figura 3.6a2, curva roja), la precabeza muestra una fractura evidente en un lado de la estructura de aproximadamente 24 nm de profundidad (figura 3.6a3) que produce una disminución de altura de la misma. En el segundo de los ejemplos (figura 3.6b) se observa otra precabeza que tras ser sometida a un ciclo de carga (figura 3.6b2) presenta una gran fractura en el centro de su estructura (figura 3.6b3).

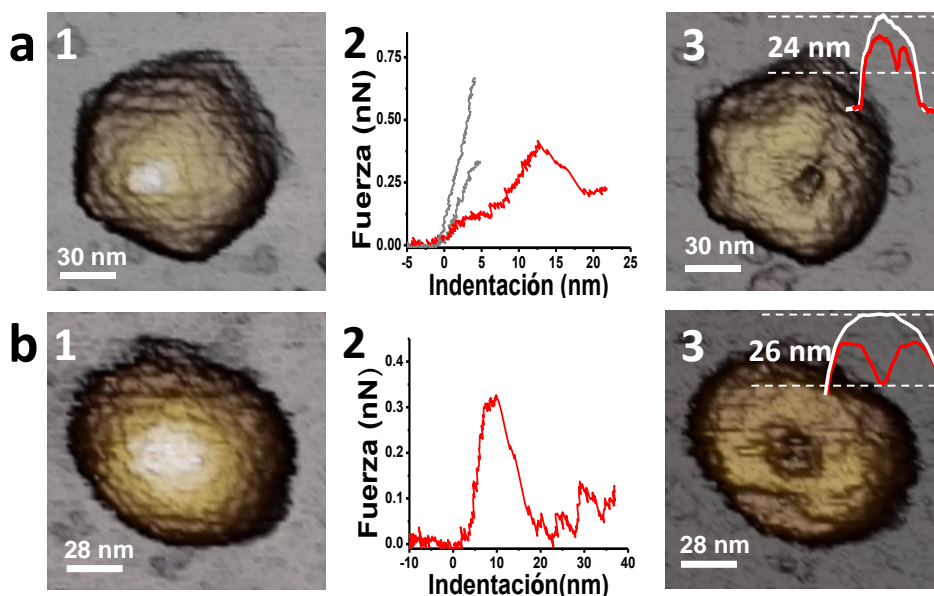


Figura 3.6: Fatiga mecánica de precabezas. a) Experimento de fatiga mecánica realizado sobre una precabeza madura adsorbida en sustrato a lo largo del eje de simetría 5. (a1) Imagen de AFM de una precabeza adsorbida en sustrato en el eje de simetría S5 antes de la fractura. (a2) Curvas F vs. I realizadas durante el experimento de fatiga. La curva roja induce un daño estructural en la precabeza. (a3) Imagen de AFM de la precabeza fracturada. b) Mismo análisis para una precabeza adsorbida en ONE la cual se fracturó tras realizar sólo una curva F vs. I .

En la figura 3.7 se muestran tres ejemplos representativos de los experimentos de fatiga realizados sobre las cápsidas de T7.

La figura 3.7a muestra una cápsida adsorbida en el eje de simetría 3 (S3). Después de nueve indentaciones se observa una fractura en el centro de la cara triangular (figura 3.7a3) cuya profundidad es del orden de 1.5 nm. Aplicando un filtro en las imágenes de topografía alrededor de las zonas afectadas se resuelve la posición de las unidades morfológicas de las estructuras y la identificación de las subunidades afectadas durante el experimento. Una comparación con la estructura de cryo-EM (EMD 1161-1164) [8, 11] indica que se ha eliminado un monómero perteneciente a uno de los tres hexámeros centrales (figura 3.7a6). La figura 3.7b muestra el ejemplo de una cápsida adsorbida en S3, en la cual el cuatro ciclos induce un defecto en la estructura que parece corresponder a un trímero. La figura 3.7c, muestra una cápsida adsorbida en orientación S5 que ha perdido un pentón en el cuarto ciclo.

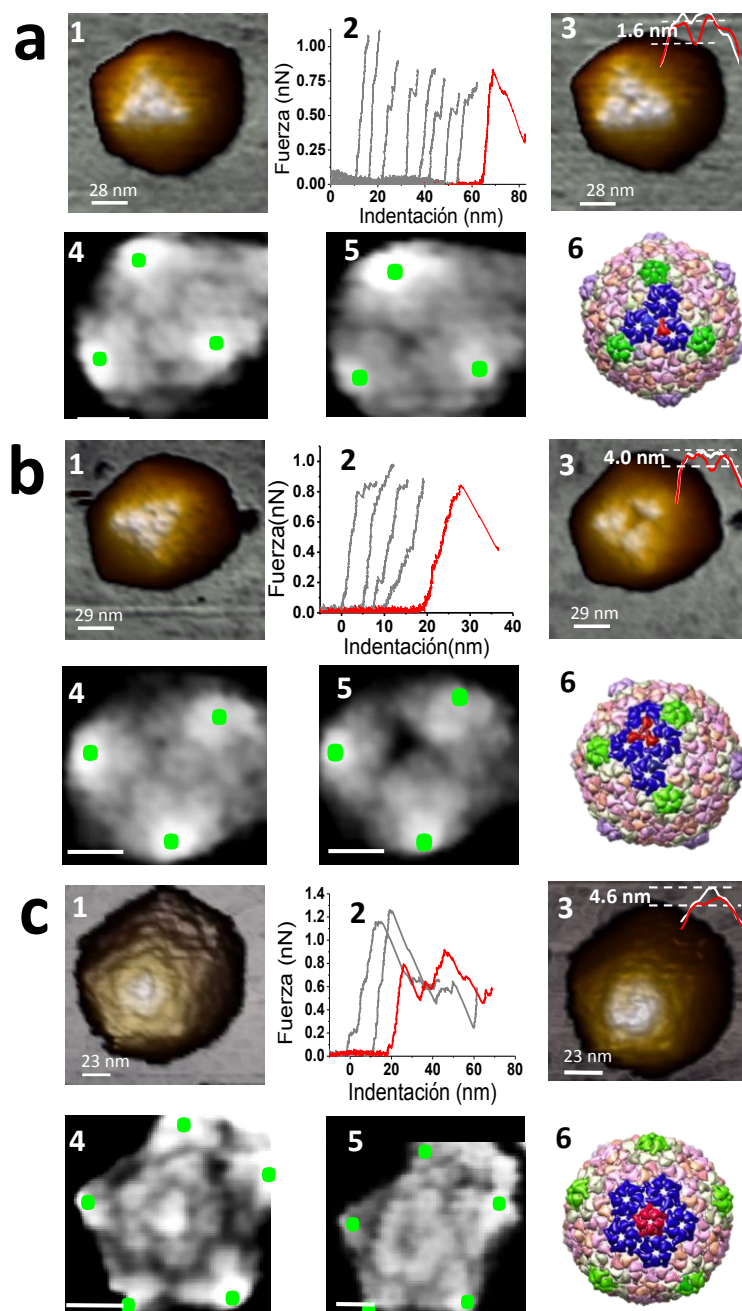


Figura 3.7: Fatiga mecánica de cápsidas. a) Experimento de fatiga mecánica realizado sobre una cápsida madura adsorbida a lo largo del eje de simetría S3 (a1) Imagen de AFM de una cápsida antes de la fatiga mecánica. (a2) Curvas F vs. I realizadas durante el experimento de fatiga. La curva roja induce un defecto estructural en la cápsida. (a3) Imagen de AFM de la cápsida dañada. (a4 y a5) Imágenes filtradas del área afectada antes y después. (a6) Imagen de cryo-EM de la estructura de la cápsida en la que se indican las unidades morfológicas: hexámero (azul) y pentámero (verde). Las subunidades afectadas durante el experimento se muestran en rojo. b) y c) La misma descripción para dos cápsidas adsorbida a lo largo de los ejes de simetría S3 y S5, que muestran la pérdida de un trímero y un pentón de proteínas, respectivamente.

Para confirmar si los defectos inducidos corresponden a monómeros o trímeros, se decidió generar el volumen dilatado correspondiente a una cápsida que presenta la vacante de un monómero y de otra que ha perdido un trímero. Los volúmenes dilatados se obtuvieron a partir del volumen de cryo-EM y considerando una punta de 8 nm de diámetro (figura 3.8). Los perfiles realizados sobre las imágenes obtenidas mediante AFM presentan un comportamiento similar al de los volúmenes dilatados [18, 19], indicando la alta resolución en las imágenes de topografía de AFM y la validez de nuestras hipótesis.

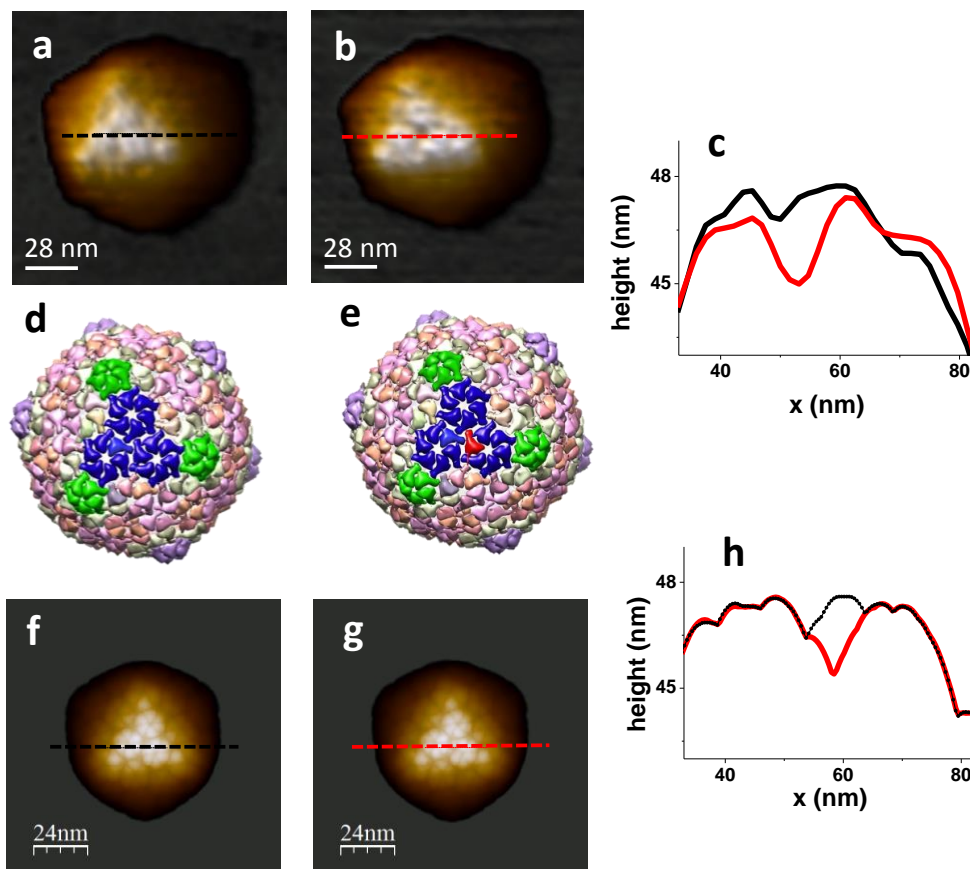


Figura 3.8: Pérdida de un monómero. a) y b) Imágenes de AFM de una cápsida de T7 antes y después de la fractura. c) Perfiles en topografía realizados sobre las imágenes de AFM antes (negro) y después (rojo) del daño. f) Volumen dilatado de la estructura de cryo-EM (EMD 1161-1164) de una cápsida de T7 con una punta de 8 nm de diámetro. g) Volumen dilatado de la estructura de cryo-EM de una cápsida de T7 a la cual le ha sido extraído el trímero central. h) Perfiles realizados sobre los volúmenes dilatados f) en color negro y en g) en color rojo. Una comparación entre c) y h) indica que ambos perfiles presentan el mismo comportamiento.

El número de ciclos de carga necesarios para inducir la fatiga mecánica de una estructura proporciona información crucial sobre su estabilidad. Por ello, hemos cuantificado para ambas partículas el número de ciclos de carga aplicados antes de producir el primer daño estructural. La figura 3.9 muestra un histograma del número (#) de ciclos de carga aplicados para producir un daño en la estructura de la precabeza (rojo) y en la estructura de las cápsidas (negro).

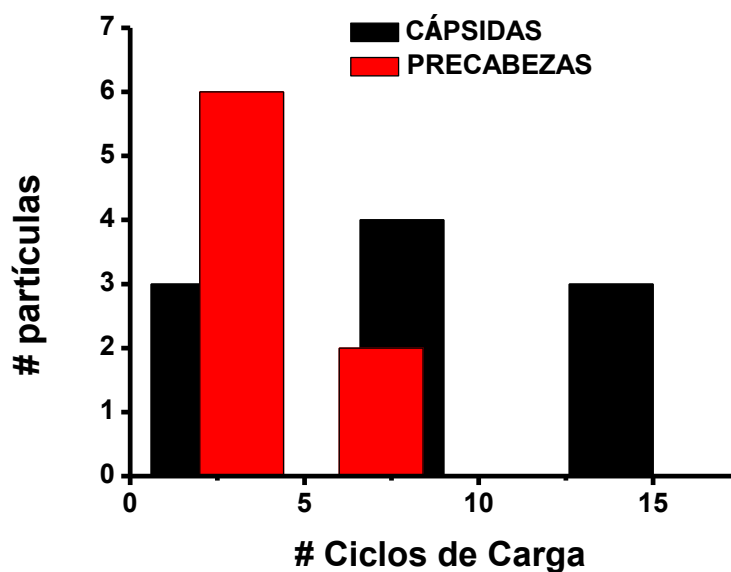


Figura 3.9: Ciclos de carga. Histograma del número de ciclos de carga (#) necesarios para inducir un daño en la estructura de las precabezas (color rojo) y cápsidas (color negro).

Se observa que después de cuatro ciclos de carga sólo el 20% de las cápsidas presentan pequeños defectos mientras que el 90% de las precabezas están destruidas. Por tanto, es necesario aplicar menos ciclos de cargas para inducir una fractura en las precabezas en comparación con las cápsidas. Es decir, **las cápsidas son más resistentes a la fractura que las precabezas.**

El comportamiento observado ante la fractura es el mismo que el que se ha observado ante *stress* químico. Es decir, **el proceso de maduración no sólo aumenta la estabilidad química, sino que también aumenta la resistencia de la estructura frente a la fatiga mecánica.** Se ha establecido por tanto, una relación fenomenológica entre estabilidad química y mecánica para el bacteriófago T7.

3.4.1 Fracturas en precabezas y cápsidas de T7

Otra fuente de información es la evaluación de las áreas y los volúmenes de las fracturas. La comparación entre los perfiles topográficos sobre el área afectada para cada tipo de partícula sirvió para cuantificar la profundidad de la fractura, siendo de entre 10 a 20 nm para las precabezas y de sólo 1.6 a 7 nm para las cápsidas (figura 3.10). En color negro se muestran los perfiles realizados antes de la fractura y en color rojo los de después.

Para cuantificar el área y el volumen eliminado en la estructura (ΔA y ΔV) se obtuvo la imagen diferencia restando a la imagen de la partícula inalterada (antes) la de la fracturada (después). Se analizaron 8 precabezas y 10 cápsidas. Las figuras 3.10 y 3.11 muestran el procedimiento de análisis realizado para la caracterización de las fracturas. La figura 3.10 para las precabezas y la figura 3.11 para las cápsidas.

En la figura 3.12a se presenta una gráfica comparativa de los valores de la pérdida de volúmenes normalizados ($\Delta V/V$) frente a la pérdida de áreas normalizadas ($\Delta A/A$), para las precabezas (rojo) y las cápsidas (negro). Se deduce que mientras las precabezas pierden un $48 \pm 15\%$ de área y $7 \pm 2\%$ de volumen, las cápsidas pierden un $5 \pm 3\%$ de área y un $0.2 \pm 0.1\%$ de volumen. Estas dos magnitudes físicas muestran un comportamiento lineal entre ellas cuando se expresan en escala logarítmica, cuya pendiente presenta un valor de 1.57 ± 0.06 aproximadamente (figura 3.12b). Esto indicaría que la dependencia entre ambas es: $\Delta V \propto \Delta A^{1.57}$; que concuerda con la dependencia esperada para estas dos magnitudes físicas, $\Delta V \propto \Delta A^{3/2}$. De este análisis se deduce además (figura 3.12c) que en general las **precabezas presentan daños estructurales de tamaño más grande que el de las cápsidas para un menor número de ciclos.**

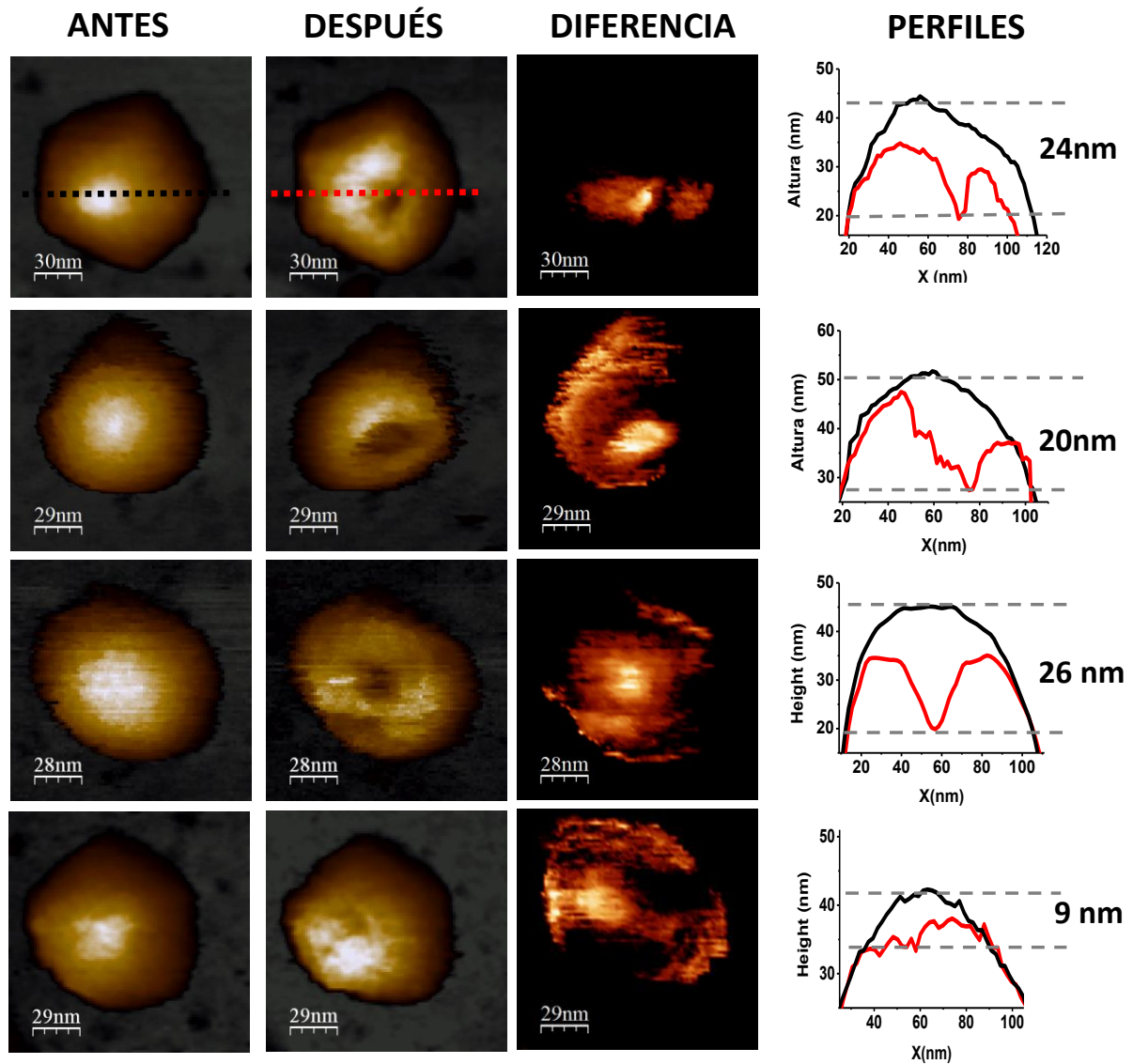


Figura 3.10 Fracturas en las precabezas de T7. Análisis realizados para el estudio de las fracturas producidas en las precabezas de T7 durante los experimentos de fatiga mecánica. La comparación de los perfiles realizados en las imágenes adquiridas antes y después de producir la fractura nos muestran la profundidad de la fisura. La imagen diferencia nos permite cuantificar el área y el volumen de la fractura.

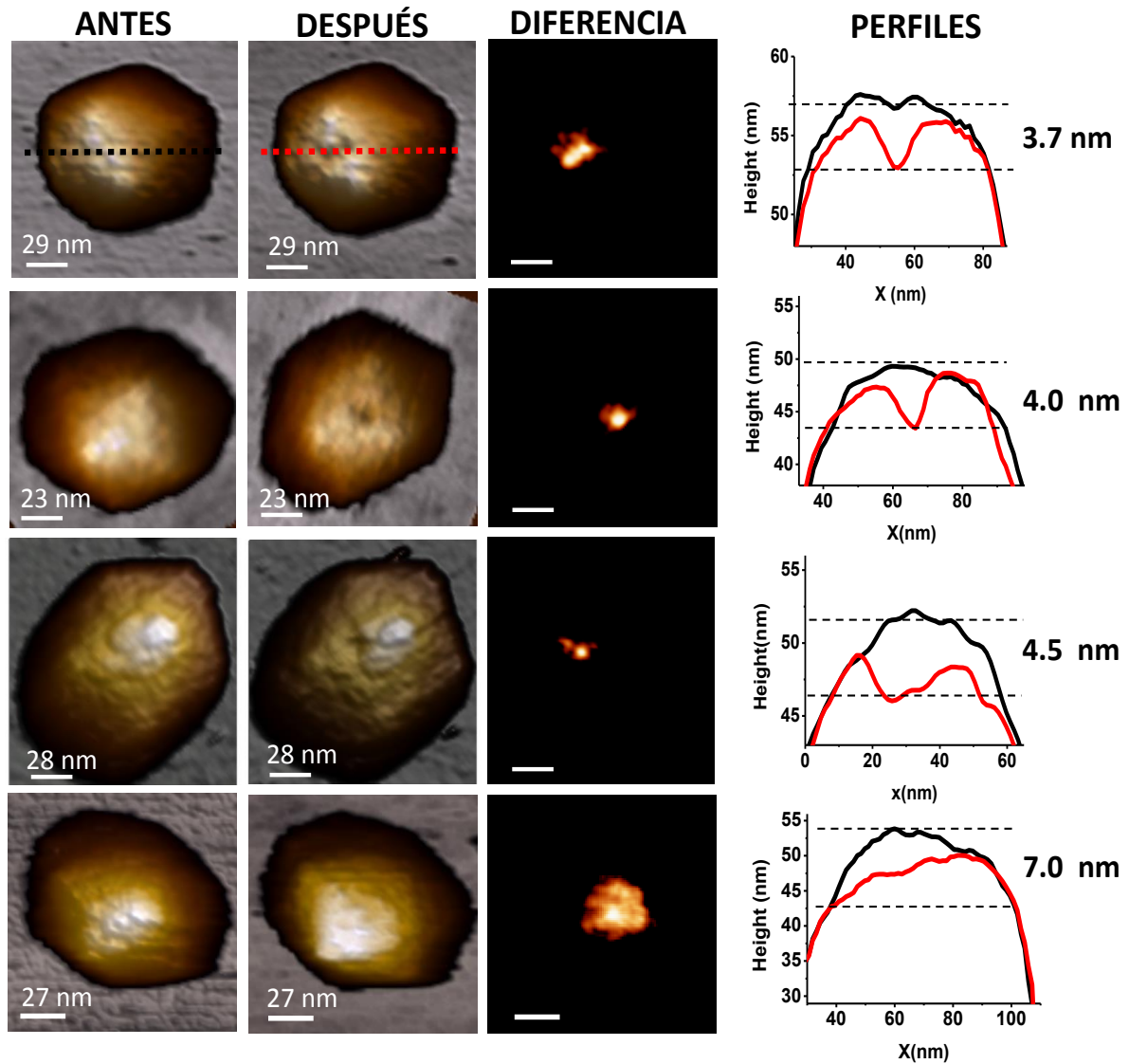


Figura 3.11: Fracturas en las cápsidas de T7. Análisis realizados para el estudio de las fracturas producidas en las cápsidas de T7 durante los experimentos de fatiga mecánica. La comparación de los perfiles realizados en las imágenes adquiridas antes y después de producir la fractura nos muestran la profundidad de la fisura. La imagen diferencia nos permite cuantificar el área y el volumen de la fractura.

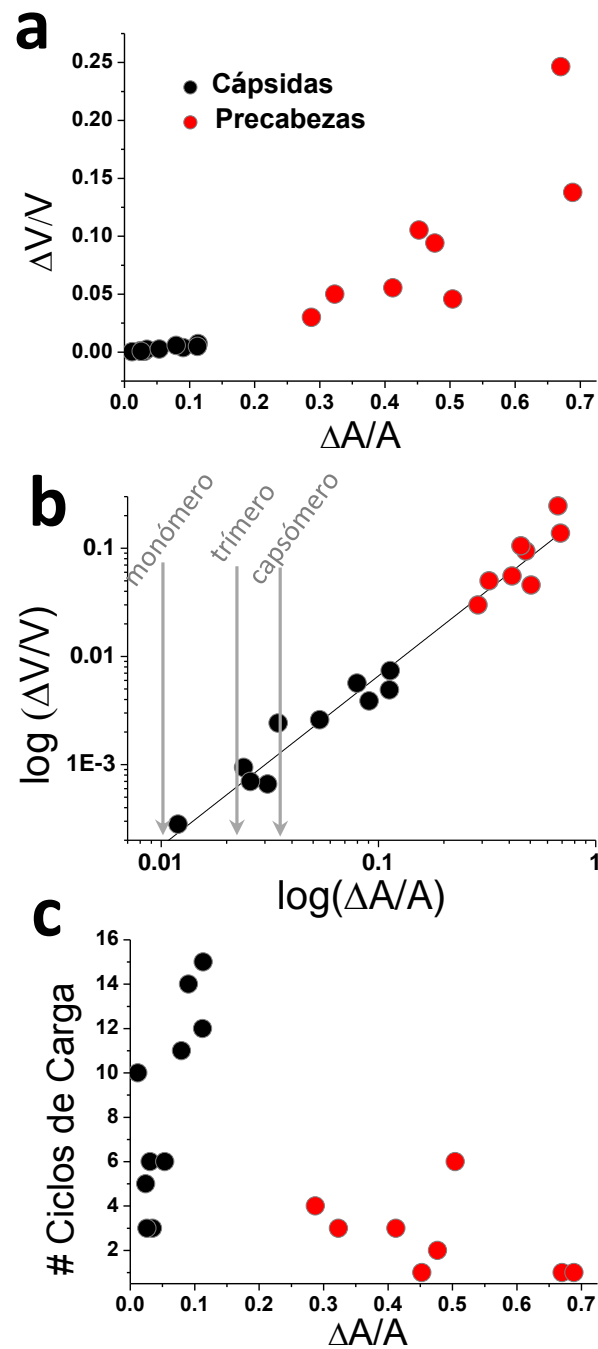


Figura 3.12: Fragilidad de precabezas y cápsidas de T7. a) Pérdida de volumen normalizado frente a la pérdida de área normalizada producida por las fracturas creadas durante los experimentos de fatiga mecánica para precabezas (rojo) y cápsidas (negro). b) Representación en escala logarítmica de los datos presentados en (a). La pendiente de la recta es 1.57 ± 0.06 . c) Gráfica de las áreas normalizadas de las fracturas en función del número de ciclos de carga aplicados.

3.5. Interpretación de la respuesta elástica de la cápsida del bacteriófago T7

Como hemos visto, todas las partículas del bacteriófago T7 presentan anisotropía en la respuesta elástica. Este comportamiento ha sido encontrado de forma experimental anteriormente sólo en otros viriones eucariotas como el MVM [22], el Adenovirus [27] o fagos con estructura prolada como el $\phi 29$ [28]. El fago T7 el primer ejemplo de bacteriófago icosaédrico que presenta anisotropía en la respuesta elástica en precabeza, cápsida y virión. Análisis basados en modelos del continuo, han permitido corroborar, interpretar o predecir las respuestas elásticas de estas nano-estructuras en primera aproximación. La anisotropía en la respuesta elástica de estas estructuras ha sido finalmente atribuida a interacción ADN-cápsida, *stress* residual, o cambios en interacción proteína-cápsida. En los últimos años se han desarrollado otros tipos de análisis teóricos basados en la teoría elástica como el modelo de Grano-Grueso (en inglés *Coarse-Grained Model*) [29, 30], Simulaciones de Dinámica Molecular (en inglés *Molecular Dynamics Simulation*; MDS) [31] y otras aproximaciones físicas [32-36].

Para entender la naturaleza de la anisotropía que muestra la cápsida de T7 se realizaron dos tipos de simulaciones. Ambas fueron realizadas por el grupo del Profesor David Reguera de la Universidad de Barcelona. Como primera aproximación se realizaron simulaciones de AFM modelando la cápsida mediante métodos de elementos finitos (en inglés *Finite Elements Methods*; FEM) y la aproximación de cáscara de pared gruesa (en inglés *Thick Shell*). Después se realizaron simulaciones con un AFM virtual en el cual la cápsida de T7 se modeló como una estructura discreta usando el modelo de Grano Grueso (en inglés *Coarse-Grained Model*; CGM).

3.5.1 Simulaciones de elementos finitos

La interpretación de la respuesta elástica de las partículas virales usando métodos de análisis teóricos permite establecer el origen de este comportamiento. Las simulaciones de FEM, aplicando la teoría de la elasticidad de medios continuos homogéneo, han reproducido hasta el momento la respuesta elástica de las estructuras de las partículas víricas.

Se propuso, por tanto, este tipo de análisis para estudiar el origen de la anisotropía en la respuesta elástica de la cápsida del bacteriófago T7. Las simulaciones fueron llevadas a cabo usando el programa COMSOL.Multiphysic 4.3 (Comsol, Stockholm, Sweden). La cápsida de T7 fue modelada dentro de la aproximación *Thick Shell* como un icosaedro formado por 20000 elementos tetraédricos, con un radio externo $R_{ext}=31.5$ nm y un espesor de pared homogéneo de $h=2.5$ nm, como se muestra en la figura 3.13a. Se consideró un módulo de Young de valor $E=0.4$ GPa y coeficiente de Poisson $\nu=0.3$ [23]. El icosaedro fue orientado con el sustrato plano mostrando las diferentes orientaciones de adsorción: S5, S3 y S2. Después fue deformado a lo largo de cada una de estas simetrías con una esfera de radio, $R_{tip}=15$ nm. Este radio de punta es comparable con los utilizados durante los experimentos de AFM. El valor de la constante elástica fue obtenido de la parte lineal de las curvas F vs. I . y el de la fuerza aplicada fue elegido para producir pequeñas deformaciones. A partir de las curvas F vs. I simuladas se obtuvo el valor de la constante elástica (figura 3.13b). Para deformaciones de aproximadamente 1.5 nm las pendientes de las curvas son similares. Para indentaciones mayores los resultados de estas simulaciones mostraron anisotropía en la constante elástica, con una tendencia u orden de $k_{S2}<k_{S3}<k_{S5}$, que no predecía la tendencia observada en los experimentos de nanoindentación realizados con AFM, $k_{S5}<k_{S3}<k_{S2}$.

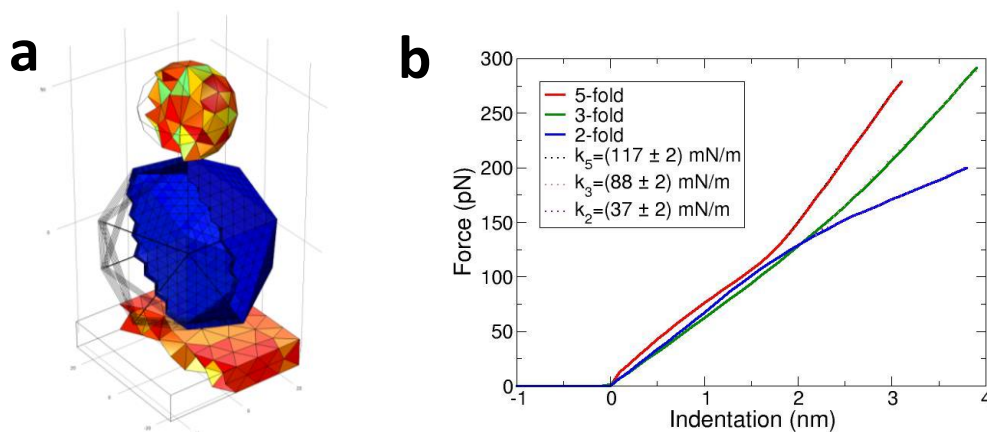


Figura 3.13: Simulaciones de FEM de una cápsida homogénea. a) Cuerpo geométrico generado a partir de un modelo de elementos finitos para simular la cápsida de T7. La cápsida es modelada como un icosaedro de radio externo $R_{\text{ext}}=31.5$ nm, espesor de pared homogéneo $h=2.5$ nm, módulo de Young $E=0.4$ GPa y coeficiente de Poisson $\nu=0.3$. b) Curvas F vs. I obtenidas de las simulación FEM, realizadas sobre la cápsida de T7 modelada a lo largo de las tres geometrías de adsorción: S5 (rojo), S3 (verde) y S2 (azul).

Dado que una modelización simplificada de la estructura de la cápsida no reproduce la tendencia en de la respuesta elástica encontrada durante los experimento de AFM, se decidió realizar modificaciones sobre el cuerpo geométrico utilizado para modelar la cápsida de T7. Las imágenes de reconstrucción de cryo-EM de la cápsida de T7 (EMDM-1810) muestran un grosor de la pared variable debido al posicionamiento de las proteínas que la componen. Por ello, se propuso una nueva simulación que considera un cuerpo geométrico con espesor variable generado a partir del volumen de cryo-EM (EMDB-1810) de la cápsida madura. Este cuerpo geométrico representa de forma más realista la cápsida de T7. La cápsida fue modelada con 10000 elementos tetraédricos, módulo de Young de valor $E=0.4$ GPa y un coeficiente de Poisson $\nu=0.3$ (figura3.14a). Después fue deformada con una esfera de 15 nm de radio a lo largo de los tres ejes de simetría. Las curva obtenidas a partir de la simulación, para pequeñas deformaciones, muestran una tendencia en constante elástica de $k_{S2} \approx k_{S3} < k_{S5}$ (figura3.14b). Al igual que en la simulación anterior, la tendencia encontrada muestra la existencia de anisotropía pero no reproduce la tendencia obtenida de manera experimental.

Por tanto, se puede concluir que **las aproximaciones del continuo homogéneo no reproducen la anisotropía encontrada en la cápsida del bacteriófago T7.**

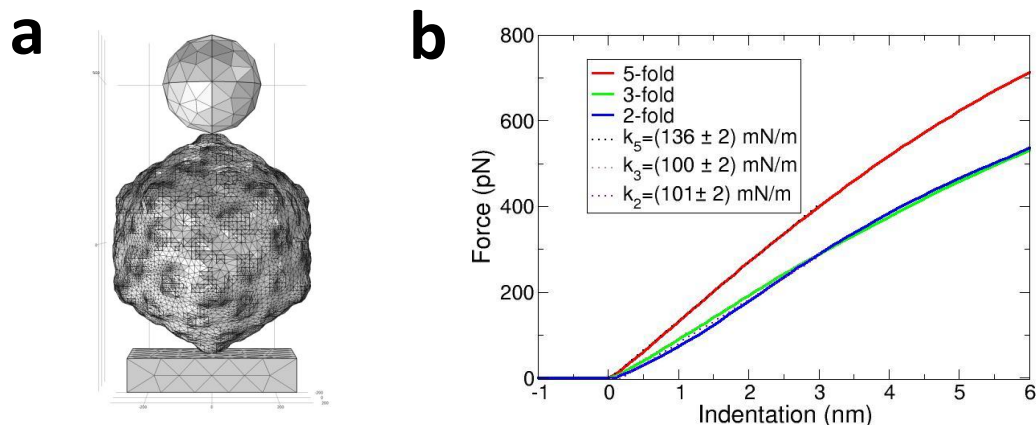


Figura 3.14: Simulaciones de FEM de una cápsida inhomogénea. a) Cuerpo geométrico usado para simular la cápsida de T7 obtenido a partir de la estructura de cryo-EM (EMDB-1810). Se considera un módulo de Young $E=0.4\text{GPa}$ y un coeficiente de Poisson $\nu=0.3$. b) Curvas F vs. I obtenidas de las simulaciones FEM sobre la cápsida de T7 modelada a lo largo de las tres geometrías de adsorción: S5 (rojo), S3 (verde) y S2 (azul).

3.5.2 AFM Virtual: cápsida madura del fago T7

Trabajos previos relacionados con el estudio de propiedades mecánicas de cápsidas víricas han utilizado la aproximación de CGM para modelar estas estructuras. Este tipo de aproximaciones han demostrado que la naturaleza discreta de las cápsidas víricas tiene una importante influencia en las propiedades mecánicas, especialmente en virus pequeños [29, 30, 33]. De acuerdo con esto, se propuso estudiar si la anisotropía observada en la cápsida de T7 podía emerger desde la naturaleza discreta de su estructura.

El Profesor David Reguera y la Doctora María Aznar crearon un modelo de la cápsida de T7 usando las aproximaciones de CGM. La cápsida de T7 fue modelada a nivel de unidades morfológicas, hexámeros y pentámeros, como se deduce de la estructura de cryo-EM [12]. La figura 3.15 muestra una comparación entre la estructura de cryo-EM de la cápsida madura (figura 3.15a) y la modelada utilizando la aproximación de CGM (figura 3.15b). Se han identificado las unidades morfológicas, hexones (hexámeros) en color verde y pentones (pentámeros) en color rojo.

La interacción entre hexámeros y pentámeros, utilizada por la Doctora María Aznar en el modelo, responde a un potencial de Lennard-Jones que incorpora una contribución

de *bending*, de curvatura preferente y de torsión. Se considera el mismo diámetro para ambas unidades morfológicas, que tan sólo difieren en el número de capsómeros que las rodea.

El potencial viene dado por:

$$V(\vec{r}_{ij}, \vec{\Omega}_i, \vec{\Omega}_j) = \begin{cases} V_{LJ}(r) & r < \sigma_{LJ} \\ V_{LJ}(r)V_{ang}(\vec{r}_{ij}, \vec{\Omega}_i, \vec{\Omega}_j)V_{tor}(\vec{\Omega}_i, \vec{\Omega}_j) & r \geq \sigma_{LJ} \end{cases} \quad (3.1)$$

El potencial de Lennard-Jones tiene la forma:

$$V_{LJ}(r) = \varepsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] \quad (3.2)$$

Donde ε es la energía de *bending* entre capsómeros (hexámeros y pentámeros), r es la distancia de separación entre los centros de los capsómeros, r_{ij} es la distancia de equilibrio, r_{\perp} es la distancia donde el potencial Lennard-Jones se anula y $\vec{\Omega}_i$ define el vector de orientación de los capsómeros. Se consideró $\varepsilon = 20 k_B T$, un valor razonable y utilizado en otras simulaciones [37-39].

Este tipo de potenciales reproduce de forma satisfactoria el número de triangulación T que adoptan las cápsidas víricas tanto *in vivo* como *in vitro*. De forma sencilla se ha reproducido una estructura con número de T=7 formada por 72 unidades capsoméricas (60 hexones y 12 pentones). En la figura 3.15 se muestra la cápsida del bacteriófago T7 orientada en el eje de simetría S2 y modelada usando la aproximación de CGM descrita anteriormente. Los hexámeros son modelados con esferas en color verde y los pentámeros con esferas en color rojo.

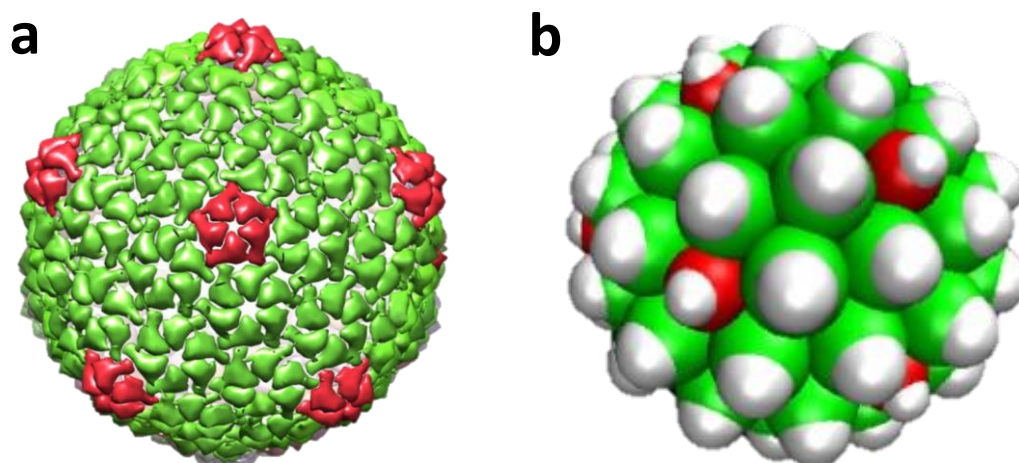


Figura 3.15: CGM para cápsida de T7. a) Volumen de la cápsida de T7 obtenido a partir de la reconstrucción de cryo-EM [12]. Se identifican las unidades morfológicas que constituyen la estructura: hexámeros en verde y pentámeros en rojo. b) Cápsida de T7 modelada a partir de la aproximación CGM a nivel de unidades morfológicas. Los hexámeros son modelados con esferas en color verde y los pentámeros con esferas en color rojo. Las esferas blancas indican la orientación de los capsómeros $\vec{\Omega}_i$.

Recientemente el grupo del Profesor David Reguera, y especialmente la Doctora María Aznar, ha desarrollado un AFM virtual que permite realizar estudios de respuesta elástica de las estructuras modeladas con la aproximación de CGM. La estructura es deformada por una esfera de radio $R_{tip}=3\sigma$, donde $\sigma=3.04\text{nm}$. La interacción entre la punta y los capsómeros fue modelada mediante un potencial armónico repulsivo de constante de muelle, $K_C=40\epsilon/\sigma^2$, que representa la constante elástica de la micropalanca [39] (figura3.16).

La figura3.16b muestra las curvas de indentación obtenidas a partir de las simulaciones del AFM virtual. Estas curvas muestran que la respuesta elástica de la cápsida presenta un comportamiento anisótropo con tendencia $k_{S5}<k_{S3}<k_{S2}$. Esta tendencia coincide con la encontrada en los experimentos (figura3.16c). Por tanto podemos decir que **la anisotropía en respuesta elástica en la cápsida de T7 tiene su origen en la naturaleza discreta en su estructura.**

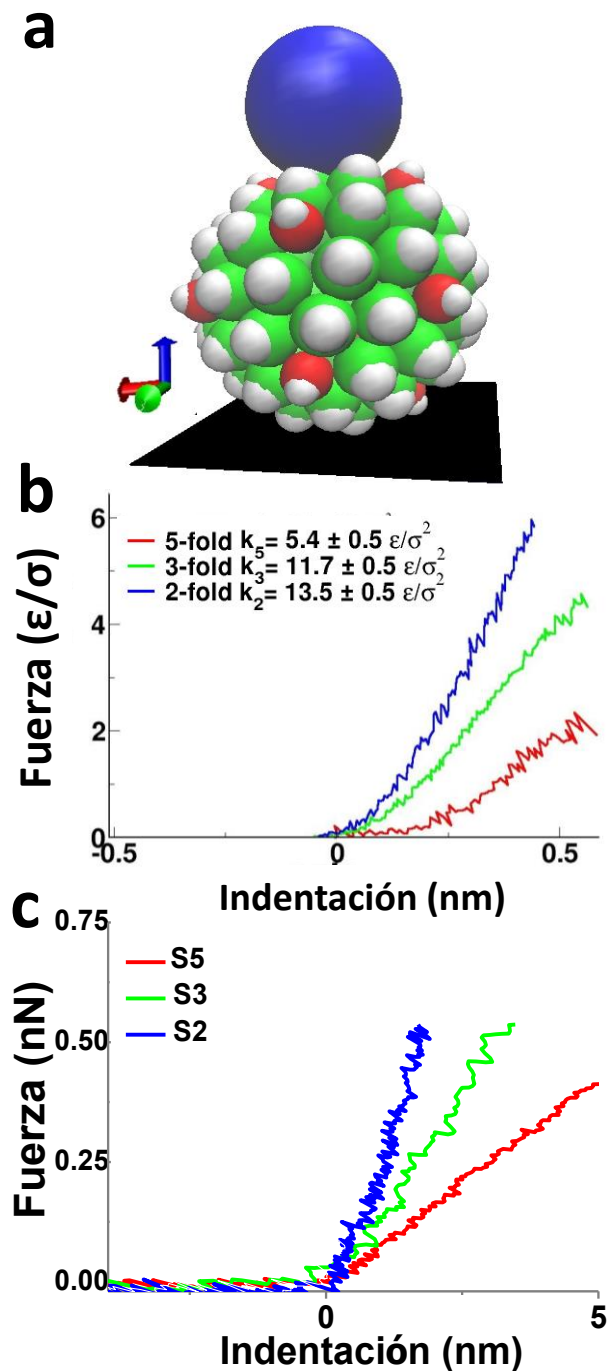


Figura 3.16: AFM virtual. a) Imagen de una simulación realizada con el AFM virtual para el estudio de la respuesta elástica de la cápsida de T7. La cápsida es modelada utilizando la aproximación del modelo de *Grano Grueso* a nivel de unidades morfológicas, donde los hexones son representados con esferas en color verde y los pentones en color rojo. La esfera azul representa la punta de una micropalanca. c) Curva F vs. l simuladas a lo largo de los diferentes ejes de simetría de adsorción de la cápsida: S5 (roja), S3 (verde) y S2 (azul). Tanto la fuerza como la indentación viene dadas en función de los parámetros de la simulación ϵ y σ . c) Curvas experimentales de nanoindentación realizadas a lo largo de los diferentes ejes de simetría de la cápsida de T7: S5 (roja), S3 (verde) y S2 (azul).

3.6. Resumen y conclusiones

Los virus durante su ciclo vírico deben exponerse a condiciones fisicoquímicas extremas. En el proceso de maduración las cápsidas víricas deben adquirir una estructura lo suficientemente estable para preservar intacto el material genético, empaquetado en su interior, durante la etapa extracelular del ciclo vírico.

El bacteriófago T7 ha desarrollado una de las vías de maduración más simple. Por ello, se ha escogido este virus para estudiar los cambios en la estabilidad de la estructura durante el proceso de maduración. Como procedimiento del estudio las partículas víricas de T7 se sometieron a condiciones de *stress* químico y físico.

Para estudiar cambios ante *stress* químico las precabezas y las cápsidas maduras han sido sometidas a condiciones de agentes desnaturizantes de proteínas. Ambas fueron tratadas con urea y GuHCl. Imágenes de TEM después del tratamiento mostraron que en las mismas condiciones las precabezas se desensamblan por completo mientras que las cápsidas mantenían su estructura original. Este resultado indica **que el proceso de maduración aumenta la estabilidad química de la estructura de proteínas en el bacteriófago T7.**

Para observar si este aumento de estabilidad es reflejado en la respuesta elástica de las partículas se han caracterizado mecánicamente sus estructuras. Para ello se han realizado experimentos de nanoindentación. Ambas partículas muestran un comportamiento anisotópico en la respuesta elástica en los diferentes ejes de simetría de orientación: S5, S3 y S2. Además se ha observado que, precabezas y cápsidas exhiben los mismos valores de constante elástica, poniendo de manifiesto que ni **el módulo de Young ni la constante elástica no son magnitudes físicas adecuadas para caracterizar la estabilidad mecánica.** Por el contrario los experimentos de fatiga mecánica realizados en precabezas y cápsidas, indican que las precabezas presentan fracturas a un número de ciclos inferior que las cápsidas. Este resultado muestra que **el proceso de maduración aumenta la resistencia de la estructura a la formación de fracturas.**

De este modo se ha establecido para el bacteriófago T7 una correlación fenomenológica entre fragilidad y estabilidad química.

La anisotropía encontrada en la respuesta elástica de las precabezas y las cápsida de T7 no ha podido ser explicada usando la teoría del continuo homogéneo e inhomogéneo. Por el contrario, los modelos discretos como *CGM*, han reproducido la tendencia de la anisotropía obtenida de forma experimental. Este resultado indica que **la anisotropía en la respuesta elástica que posee la cápsida de T7, tiene su origen en la naturaleza discreta de su estructura.**

3.7. Referencias

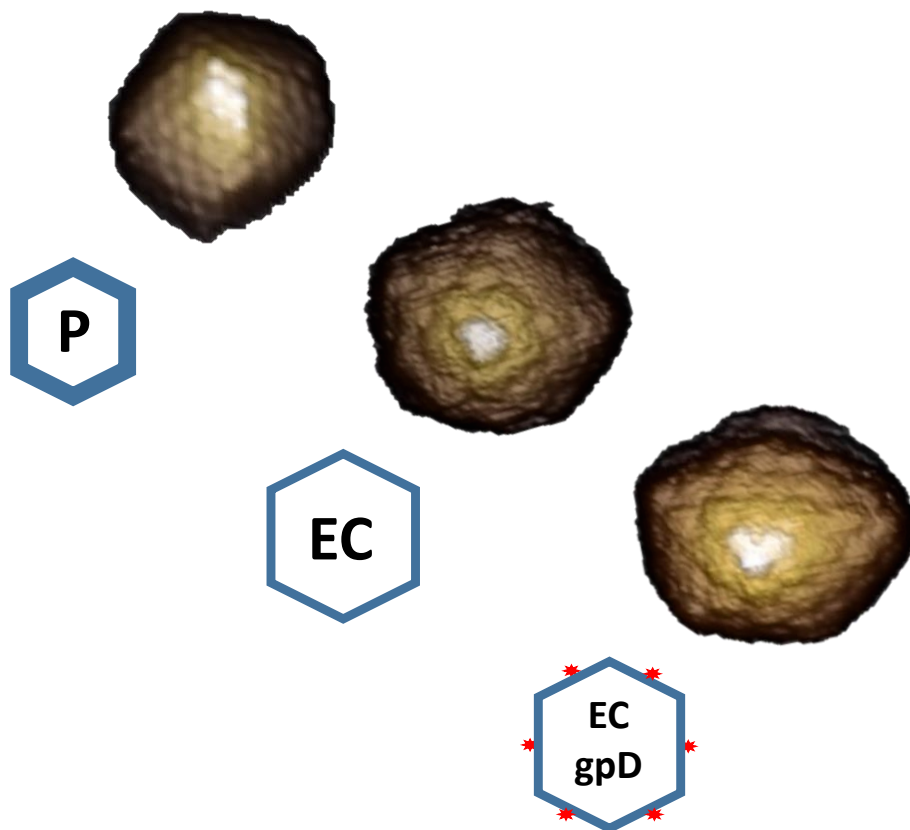
1. Moody, M.F., Geometry of phage head construction. *Journal of Molecular Biology*,293 (2): p. 401-433,(1999).
2. Cordova, A., et al., Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophysical Journal*,85 (1): p. 70-74,(2003).
3. Carrasco, C., et al., The capillarity of nanometric water menisci confined inside closed-geometry viral cages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,106 (14): p. 5475-5480,(2009).
4. Flint, S.J., et al., *Principles of virology*. 2004, Washington D.C.: ASM Press.
5. Lander, G.C., et al., Bacteriophage lambda stabilization by auxiliary protein gpD: Timing, location, and mechanism of attachment determined by cryo-EM. *Structure*,16 (9): p. 1399-1406,(2008).
6. Morais, M.C., et al., Bacteriophage phi 29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. *Nature Structural Biology*,10 (7): p. 572-576,(2003).
7. Conway, J.F., et al., Proteolytic and Conformational Control of Virus Capsid Maturation - the Bacteriophage-Hk97 System. *Journal of Molecular Biology*,253 (1): p. 86-99,(1995).
8. Agirrezabala, X., et al., Maturation of phage T7 involves structural modification of both shell and inner core components. *Embo Journal*,24 (21): p. 3820-3829,(2005).
9. Cuervo, A., et al., Structural Characterization of the Bacteriophage T7 Tail Machinery. *Journal of Biological Chemistry*,288 (36): p. 26290-26299,(2013).
10. Garcia, L.R. and I.J. Molineux, Transcription-independent DNA translocation of bacteriophage T7 DNA into *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*,178 (23): p. 6921-6929,(1996).
11. Agirrezabala, X., et al., Quasi-atomic model of bacteriophage T7 procapsid shell: Insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure*,15 (4): p. 461-472,(2007).
12. Ionel, A., et al., Molecular Rearrangements Involved in the Capsid Shell Maturation of Bacteriophage. *Journal of Biological Chemistry*,286 (1): p. 234-242,(2011).
13. Roos, W.H., R. Bruinsma, and G.J.L. Wuite, Physical virology. *Nature Physics*,6 (10): p. 733-743,(2010).

14. Roos, W.H., et al., Mechanics of bacteriophage maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,109 (7): p. 2342-2347,(2012).
15. Klug, W.S., et al., Failure of viral shells. *Physical Review Letters*,97 (22): p. 228101,(2006).
16. Landau, L.D. and E. Lifshitz, *Theory of Elasticity*. 3rd ed. 1986, London: Pergamon
17. Roos, W.H., et al., Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,106 (24): p. 9673-9678,(2009).
18. Villarrubia, J.S., Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimation. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*,102 (4): p. 425-454,(1997).
19. Horcas, I., et al., WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*,78 (1): p. 013705,(2007).
20. Ivanovska, I., et al., Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,104 (23): p. 9603-9608,(2007).
21. Hernando-Pérez, M., et al., Direct Measurement of Phage phi29 Stiffness Provides Evidence of Internal Pressure. *Small*,8 (15): p. 2365,(2012).
22. Carrasco, C., et al., DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,103 (37): p. 13706-13711,(2006).
23. Ivanovska, I.L., et al., Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101 (20): p. 7600-7605,(2004).
24. Schijve, J., *Fatigue of Structures and Materials*, ed. K.A. Publishers. 2009, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
25. Ortega-Esteban, A., et al., Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Scientific Reports*,3 (1434):p.1-7,(2013).
26. Ivanovska, I.L., et al., Discrete fracture patterns of virus shells reveal mechanical building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,108 (31): p. 12611-12616,(2011).

27. Snijder, J., et al., Integrin and Defensin Modulate the Mechanical Properties of Adenovirus. *Journal of Virology*,87 (5): p. 2756-2766,(2013).
28. Carrasco, C., et al., Built-In Mechanical Stress in Viral Shells. *Biophysical Journal*,100 (4): p. 1100-1108,(2011).
29. Aznar, M., A. Luque, and D. Reguera, Relevance of capsid structure in the buckling and maturation of spherical viruses. *Physical Biology*,9 (3): p. 036003,(2012).
30. Zandi, R. and D. Reguera, Mechanical properties of viral capsids. *Physical Review E*,72 (2): p. 21917,(2005).
31. Roos, W.H., et al., Squeezing Protein Shells: How Continuum Elastic Models, Molecular Dynamics Simulations, and Experiments Coalesce at the Nanoscale. *Biophysical Journal*,99 (4): p. 1175-1181,(2010).
32. Purohit, P.K., et al., Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. *Biophysical Journal*,88 (2): p. 851-866,(2005).
33. Vliegthart, G.A. and G. Gompper, Mechanical deformation of spherical viruses with icosahedral symmetry. *Biophysical Journal*,91 (3): p. 834-841,(2006).
34. Buenemann, M. and P. Lenz, Mechanical limits of viral capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,104 (24): p. 9925-9930,(2007).
35. Gibbons, M.M. and W.S. Klug, Influence of nonuniform geometry on nanoindentation of viral capsids. *Biophysical Journal*,95 (8): p. 3640-3649,(2008).
36. Roos, W.H. and G.L. Wuite, Nanoindentation Studies Reveal Material Properties of Viruses. *Advanced Materials*,21 (10-11): p. 1187-1192,(2009).
37. Luque, A., R. Zandi, and D. Reguera, Optimal architectures of elongated viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,107 (12): p. 5323-5328,(2010).
38. Reddy, V.S., et al., Energetics of quasiequivalence: Computational analysis of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Biophysical Journal*,74 (1): p. 546-558,(1998).
39. Hernando-Pérez, M., et al., The interplay between mechanics and stability of viral cages. *Nanoscale*,6: p. 2702-2709,(2014).

CAPÍTULO 4:

BACTERIÓFAGO λ : LA PROTEÍNA gpD COMO MECANISMO DE ESTABILIZACIÓN



4. BACTERIÓFAGO λ : LA PROTEÍNA gpD COMO MECANISMO DE ESTABILIZACIÓN

4.1. Introducción

El proceso de maduración en los virus tiene como finalidad la formación de una partícula con capacidad infectiva, el virión. Las cápsidas virales maduras son capaces de proteger y transportar el material genético (ADN o ARN de cadena doble o simple) durante el ciclo extracelular. Estas estructuras proteicas son el producto de una serie de transformaciones producidas en la estructura de las precabezas o procápsidas durante el proceso de maduración, que cambian dependiendo de la vía utilizada por el virus para desarrollar este proceso.

En algunos virus el proceso de maduración conlleva una reorganización de los cápsomeros que forman la estructura y suele ir acompañado con un cambio en las dimensiones de la misma. Estos cambios en dimensiones son referidos a un aumento de volumen y una disminución en el grosor de la pared. Las transformaciones producidas en la estructura dependen de la vía de maduración utilizada por el virus. Las vías más comunes se caracterizan por un aumento de los enlaces covalentes “*cross-linking*” [1-3] como en el bacteriófago HK97, un aumento de las áreas de interacción entre las subunidades proteicas como en el bacteriófago T7 [4], una reorganización e inserción de dominios proteicos como en los bacteriófagos P22 [5] y Φ 29 [6], o la inserción de nuevas proteínas que decoran la cápsida como en el caso de Adenovirus [7], bacteriófago T4 [8] y bacteriófago λ [9].

Estudios previos, mediante caracterización con Microscopía de Fuerzas Atómicas, mostraron que la presencia del material genético en el interior de la cápsida puede inducir un aumento de la dureza de la estructura [10-12]. Trabajos relacionados con estudios de

maduración de virus han revelado que los cambios estructurales producidos durante este proceso son reflejados también en las propiedades mecánicas de la estructura, particularmente, los producidos durante la expansión de la precabeza o procápsida y la estabilización de la cápsida madura [13-15].

A lo largo de los capítulos 2 y 3 se han explorado cambios en las propiedades mecánicas de dos bacteriófagos, $\phi 29$ y T7. Estos bacteriófagos difieren en el procedimiento de estabilización de la cápsida madura. El fago $\phi 29$, mantiene su volumen constante, inserta dominios entre proteínas y no presenta cambios en la respuesta elástica entre precabeza a cápsida madura; sólo por la presencia del material genético. El bacteriófago T7 se caracteriza por aumentar su volumen y las áreas de interacción entre proteínas, pero no presenta cambios en la respuesta elástica entre precabeza y cápsida madura. Ambos fagos presentan un comportamiento mecánico similar tras su maduración, puesto que la respuesta elástica de las partículas víricas no se ve modificada durante este proceso. Este comportamiento también ha sido observado en el fago HK97 [14].

El bacteriófago λ inserta la proteína gpD para la estabilización de la estructura de la cápsida madura. Estudios previos indican que la proteína gpD es necesaria para poder llevar a cabo el empaquetamiento completo del material genético. Esta observación sugiere que la proteína gpD proporciona la estabilidad suficiente a la estructura para poder soportar la presión interna provocada por el material genético [16, 17].

Hasta el momento no ha sido estudiada la influencia que supone la incorporación de proteínas “*cemento*” para la estabilización de la cápsida madura desde el punto de vista mecánico. Por tanto, resulta interesante estudiar los efectos que produce la incorporación de la proteína gpD tanto en las propiedades mecánicas como en la estabilización de la estructura del fago λ .

A lo largo de este capítulo, nos hemos centrado en el estudio de las propiedades mecánicas y estabilidad de las partículas víricas que aparecen durante el proceso de maduración del bacteriófago λ : procápsida, cápsida expandida, y cápsida decorada con la proteína gpD; para evaluar la eficiencia de este proceso. Esta caracterización ha sido realizada mediante el uso del AFM.

4.1.1. El bacteriófago λ

El bacteriófago λ infecta a la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) y fue descubierto por Esther Lederberg en 1950. El proceso de maduración en el bacteriófago λ comienza con la formación del portal, el cual está formado por 12 copias de la proteína gpB, posee forma de anillo dodecamérico y se sitúa en uno de los ejes de simetría quaternarios (eje de simetría cinco) [18]. Sobre él y con la ayuda de las proteínas gpNu3 se ensambla una primera estructura en forma de icosaedro y número de triangulación $T=7$ denominada procápsida [19-21] (figura 4.1b). La procápsida posee un diámetro de 50 nm y un espesor de pared de 4 nm. Tras empaquetar 15 kbp de material genético se induce la expansión de la procápsida a cápsida expandida. Esta estructura intermedia posee una forma icosaédrica de aproximadamente 65 nm de diámetro y 2 nm de espesor de pared y ha sido encontrada tanto en virus eucariotas como en procariotas [22, 23]. Durante la expansión se produce una reorganización de las proteínas de la estructura que conlleva un aumento de las áreas hidrofóbicas expuestas para alojar después la proteína gpD [9, 24]. Estudios recientes han demostrado que el cambio de procápsida a cápsida expandida puede inducirse *in vitro* mediante un tratamiento químico que consiste en someter a las procápsidas a condiciones específicas de urea, siendo esta transición reversible cuando se tratan con $MgCl_2$ (figura 4.14a).

La proteína gpD se coloca en los ejes de simetría 3 [25] decorando la nueva cápsida (figura 4.1c). Estudios previos muestran que la proteína gpD es esencial para poder empaquetar el material genético [26].

El virión del bacteriófago λ posee una cápsida icosaédrica de aproximadamente 65 nm de diámetro y 2 nm de espesor de pared [9]. La estructura proteica de la cápsida está formada por 405 unidades de la proteína mayoritaria gpE, cuyo ensamblado muestra un número de triangulación $T=7$, y por, las 415 copias de la proteína gpD. Este bacteriófago presenta una cola de 173 nm de longitud [27] situada en uno de los vértices quinario del icosaedro (figura 4.1d) y empaqueta un total de 48.5Kbp de ADN de cadena doble.

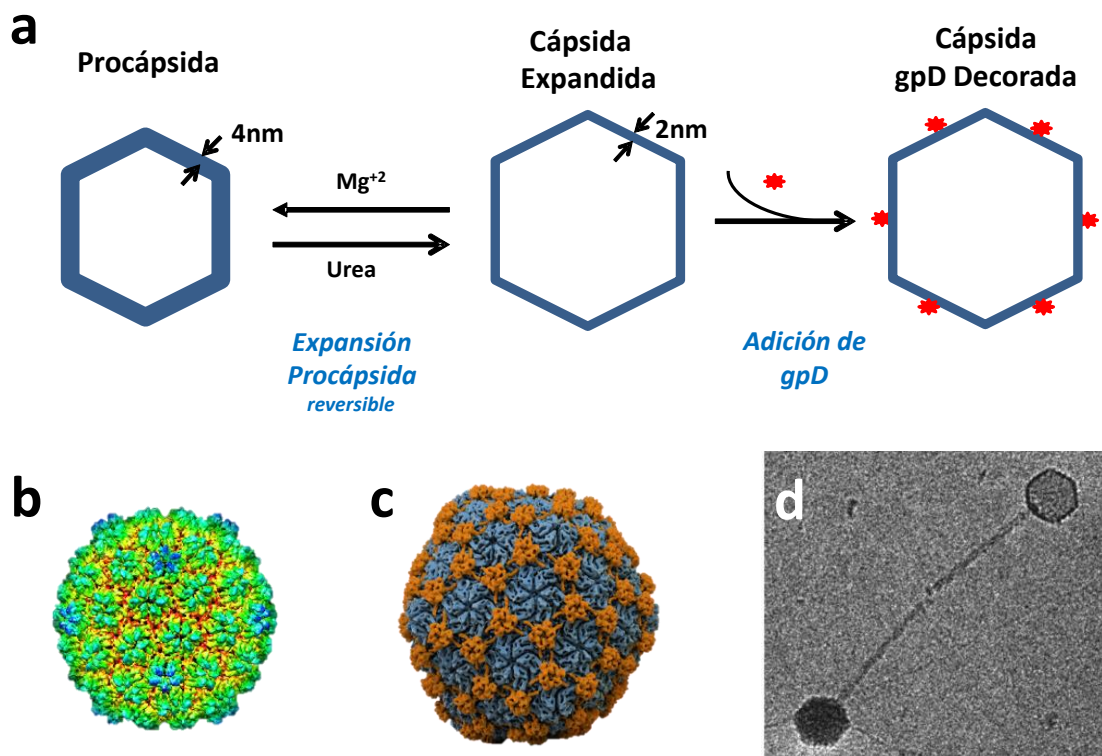


Figura 4.1: Maduración del bacteriófago λ : a) Esquema del proceso de maduración de la estructura del bacteriófago λ . El proceso de expansión de la procápsida a cápsida expandida puede inducirse *in vitro* cuando se trata con urea, siendo un proceso reversible. b) Imagen de cryo-EM [EMDB 1507-5012] de la estructura de la procápsida del bacteriófago λ [9]. c) Esquema de la estructura de la cápsida decorada con proteína gpD (naranja) del bacteriófago λ , obtenida de la galería de imágenes del laboratorio del Profesor G.C. Lander [28]. d) Imagen de cryo-EM del bacteriófago λ . En la imagen se observan dos virus, con y sin material genético (cápsida oscura y clara, respectivamente) [29]. En ambos virus puede distinguirse la cola, situada en uno de los ejes de simetría cinco de la estructura.

4.2. Caracterización de las propiedades mecánicas del bacteriófago λ

La mayoría de los estudios realizados sobre la maduración del bacteriófago λ han utilizado técnicas de “*bulk*” como cryo-EM y TEM [9, 24]. Estos trabajos se han centrado en estudiar los cambios estructurales producidos en la cápsida de dicho fago a lo largo de este proceso. Los cambios más significativos que se producen son en el volumen y en el grosor de la cubierta proteica. Estos cambios son la consecuencia de una serie de reajustes en los estados conformacionales de las unidades proteicas de la estructura [18] que le confieren nuevas propiedades químicas y físicas. Los reajustes producidos a lo largo de este proceso deberán proporcionar una mayor estabilidad a la estructura de la cápsida para soportar la presión interna inducida por el ADN empaquetado y a las condiciones fisicoquímicas que se dan en la etapa extracelular del ciclo viral como son: cambio de pH, temperatura, fuerza iónica, procesos de deshidratación, etc.

Como hemos mencionado durante el proceso de maduración la cápsida del bacteriófago λ presenta tres formas de estructural diferentes: procápsida, cápsida expandida y cápsida decorada con proteína gpD. Datos de cryo-EM muestran que durante la expansión de la procápsida aumentan el número de parches hidrofóbicos expuestos. Estos parches hidrofóbicos serán sitios de nucleación para la proteína gpD, siendo su función estabilizar la estructura de la cápsida expandida para poder empaquetar el material genético. *A priori* todo parece indicar que el estado intermedio (cápsida expandida) presenta poca estabilidad estructural. Las micrografías de microscopio electrónico (EM) muestran que la mayoría de estas cápsidas se rompen durante la preparación de las rejillas para su observación [30]. Por el contrario, las procápsidas y las cápsidas decoradas con proteína gpD muestran inalteradas durante este proceso.

La caracterización de las propiedades mecánicas y estabilidad de estas estructuras mediante la Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM), pretende ser una herramienta para comprender y justificar la falta de estabilidad en las cápsidas expandidas.

4.2.1. Caracterización de la respuesta elástica

Estudios previos con AFM han mostrado que algunos virus presentan diferencias en la respuesta elástica de la cápsida en función de la etapa del ciclo viral en que se encuentren. Los cambios más notables han sido observados en partículas que contienen el material genético. Los viriones presentan una constante elástica mayor que las cápsidas vacías. El material genético produce un reforzamiento en la estructura a través de dos posibles mecanismos; bien por reforzamiento estructural o bien por presión interna [10-12]. A pesar de esto, también se ha visto que las partículas víricas que aparecen durante el proceso de maduración y que no contiene material genético, también pueden variar su elasticidad, fragilidad o módulo de Young. Estas alteraciones se asocian con las modificaciones que se producen en la cápsida para garantizar un aumento de la estabilidad [13-15]. El efecto inducido en las propiedades mecánicas por la adición de proteínas a la estructura de la cápsida no ha sido explorado hasta el momento en virus.

Para estudiar este proceso se realizaron experimentos de nanoindentación con el AFM en las distintas partículas víricas del bacteriófago λ : procápsida, cápsida expandida y cápsida decorada con gpD. Todas ellas fueron depositados en un sustrato de HOPG (ZYA NTMDT) según la metodología explicada en el Apéndice I.

Una vez adsorbidas sobre el sustrato, las partículas fueron observadas y reconocidas utilizando Jumping Mode-AFM en condiciones fisiológicas [31, 32]. La fuerza aplicada durante la exploración fue inferior a 90 pN. Las imágenes de topografía obtenidas con el AFM muestran que las características topográficas para cada una de ellas concuerdan con las descritas en las reconstrucciones de cryo-EM [9, 24]. Esto indica que la interacción con el sustrato no modifica su estructura. En la figura 4.2a se muestra un ejemplo de los perfiles topográficos a lo largo de las secciones de las partículas víricas y en la figura 4.2b se muestra el valor promedio de los perfiles realizados sobre 20 partículas de cada especie (procápsida, cápsida expandida y cápsida decorada con gpD). Además, se observa que es posible distinguir las unidades morfológicas que forman estas estructuras, pentámeros y hexámeros (figuras 4.2c-e). Resulta interesante que la adición de la proteína gpD sobre la cápsida expandida cambia la apariencia granulada de la misma, ya que dificulta la identificación de estas unidades morfológicas.

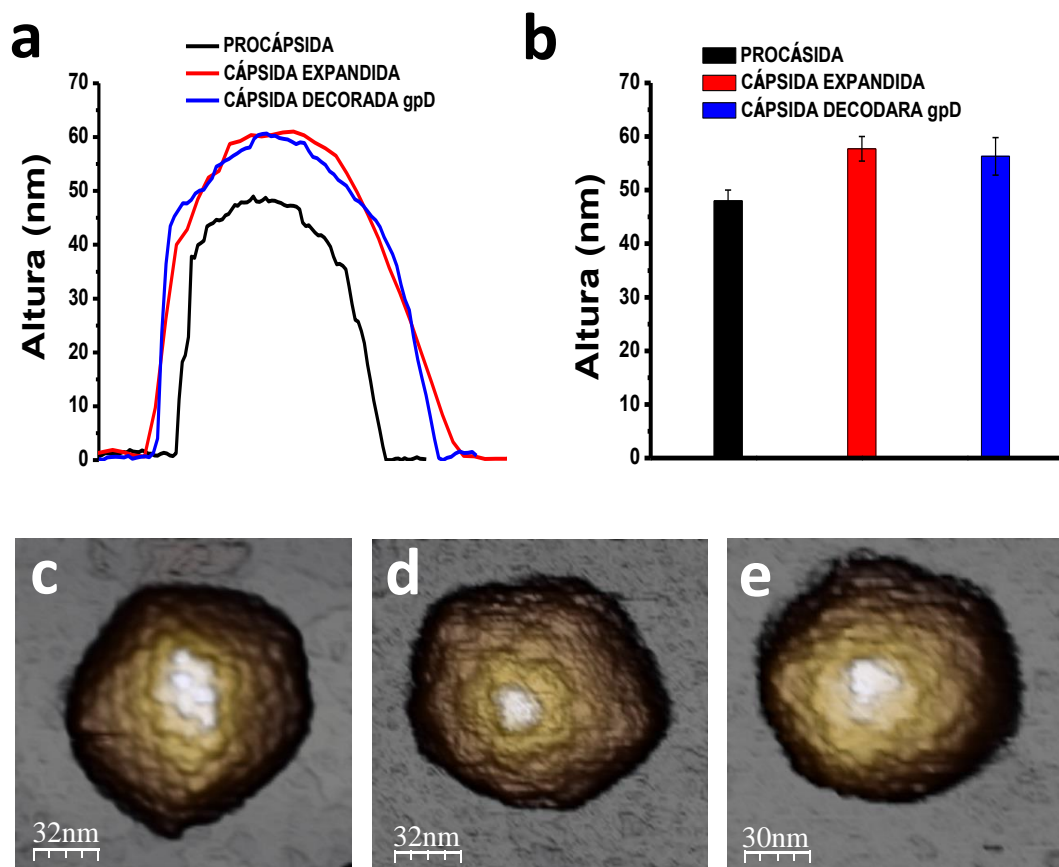


Figura 4.2: Partículas víricas del bacteriófago λ . a) Perfil topográfico realizado sobre la sección de cada partícula: procápsida (negro), cápsida expandida (rojo) y cápsida decorada con gpD (azul). b) Histograma de las alturas medias (medias \pm SD) obtenidas para procápsidas, cápsidas expandidas y cápsidas decoradas con gpD. c-e) Imágenes de AFM de las partículas víricas c) procápsida, d) cápsida expandida y e) cápsida decorada con gpD. En algunas de estas imágenes de topografía es posible identificar las unidades morfológicas que constituyen la cubierta proteica.

Procápsidas, cápsidas expandidas y cápsidas decoradas con proteína gpD fueron sometidas a indentaciones para obtener información sobre la respuesta elástica y la fuerza necesaria para fracturar su estructura.

Las indentaciones son aproximadamente de 2-4 nm de longitud. Este tipo de indentaciones producen deformaciones dentro del régimen elástico lineal de la estructura de la cubierta proteica [33, 34]. El valor de la constante elástica de muelle se obtiene a partir de la pendiente de la curva F vs. l como se explicó en el capítulo 1.

Por otro lado, curvas F vs. I lo suficientemente grandes pueden producir defectos estructurales y fracturas [35, 36]. Los primeros nanómetros de estas curvas presentan un comportamiento lineal, por lo que también se puede extraer información acerca de la respuesta elástica. Estas curvas exhiben un cambio repentino en la pendiente cuyos picos son atribuidos, generalmente, con la fuerza de ruptura. Recientes trabajos han demostrado que el pico de fuerza previo a un decaimiento brusco en la pendiente de las curvas F vs. I no siempre puede ser atribuido a una ruptura de la estructura. Curvas con comportamiento similar pueden estar relacionadas con deformaciones reversibles, resbalones e incluso rotaciones de la partícula [15, 37, 38]. Por este motivo fueron consideradas sólo aquellas curvas que, tras efectuarlas, la estructura de la partícula mostrara evidencias de fractura.

Se caracterizaron 16 procápsidas, 15 cápsidas expandidas y 15 cápsidas decoradas con gpD. Todas ellas fueron escaneadas al menos 3 veces antes de indentarlas para comprobar tanto una perfecta adsorción en el sustrato como su integridad estructural. Del mismo modo, una vez realizada la nanoindentación fueron examinadas para evaluar el alcance del daño producido. En las figuras 4.3a-c se muestran imágenes de una procápsida, una cápsida expandida y una cápsida decorada con gpD, antes y después de la indentación.

El análisis de las curvas muestra que las procápsidas presentan un valor de constante elástica de 0.12 ± 0.01 N/m y una fuerza de fractura de 0.48 ± 0.03 nN. Las cápsidas expandidas poseen una constante de 0.11 ± 0.02 N/m y fuerza de fractura de 0.37 ± 0.02 nN/m y las cápsidas decoradas con gpD una constante elástica de 0.20 ± 0.02 N/m y una fuerza de fractura de 0.88 ± 0.07 nN. Los valores mostrados corresponden a la media \pm Desviación Estándar (figuras 4.3d y e).

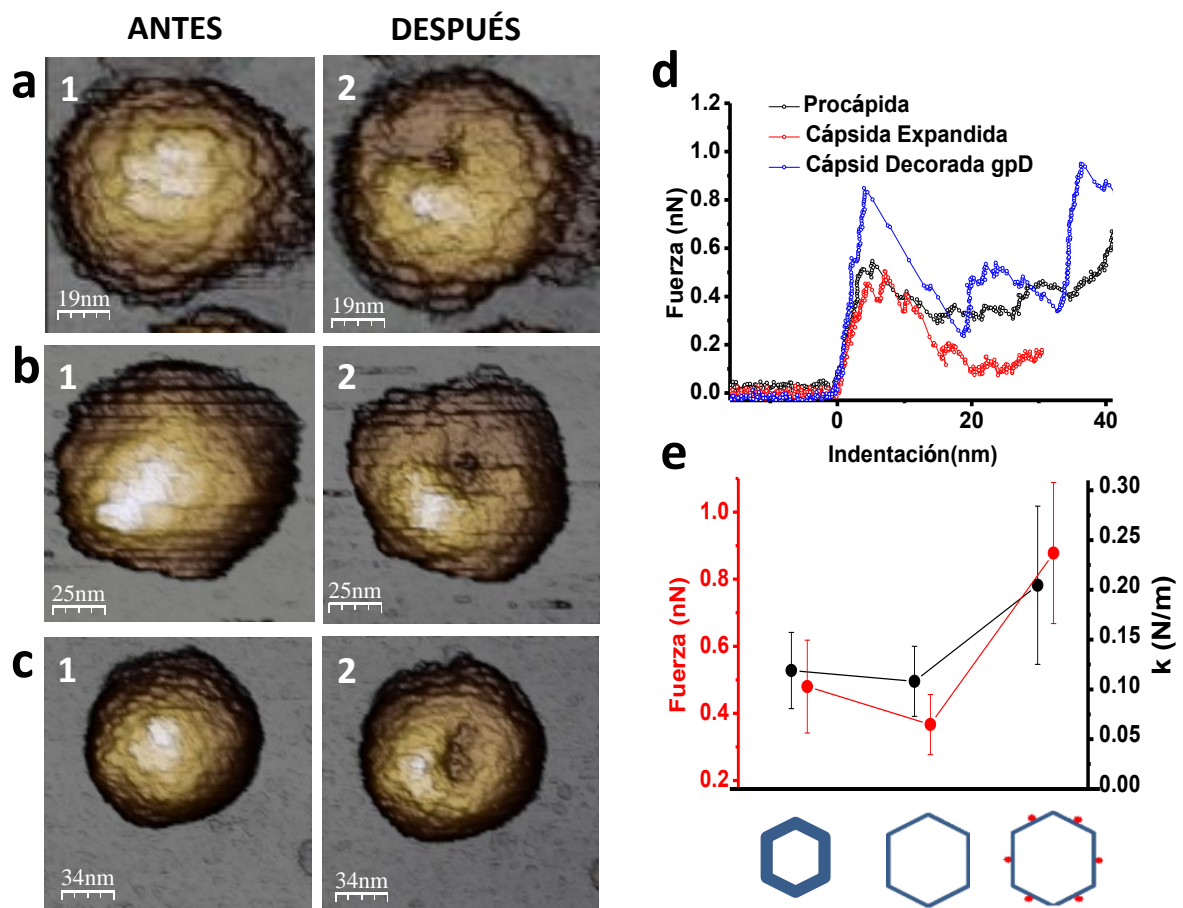


Figura 4.3: Rigidez y fuerza de fractura. a) Imágenes de AFM de una procápsida, (a1) antes y (a2) después de la fractura. b) La misma descripción que en (a) para la cápsida expandida. c) La misma descripción que en (a) para la cápsida decorada con gpD. d) Una comparación de las curvas de F vs. I realizadas en cada partícula vírica. e) Comparación de la (media \pm Desviación Estándar) de la fuerza de fractura y la dureza de las de partículas víricas.

Las procápsidas y las cápsidas expandidas presentan una respuesta elástica similar. Este resultado es consistente con el hecho de que el proceso de expansión sea reversible, dado que un aumento de la respuesta elástica podría dificultar la contracción de la misma tras someterla a condiciones de $MgCl_2$. Por otro lado la fuerza de ruptura es menor en las cápsidas expandidas que en las procápsidas.

Aplicando la teoría de la elasticidad de medios continuos en la aproximación de *Thin Shell* (ecuación 4.1) a la geometría de las partículas víricas del bacteriófago λ [33, 35] se obtiene que el módulo de Young (E) de la cápsida expandida es aproximadamente 5 veces mayor que el de la procápsida..

$$E = \frac{kR}{\alpha h^2} \quad (4.1)$$

$$E_{CE} = 5 \cdot E_P \quad (4.2)$$

Donde k es la constante elástica, R es el radio, h es el grosor y α es el coeficiente de Poisson de la cubierta proteica. Para la procápsida $k_P = 0.12 \pm 0.01$ N/m, $R_P = 25$ nm y $h_P = 4$ nm y para la cápsida expandida $k_{CE} = 0.11 \pm 0.02$ N/m, $R_{CE} = 32.5$ nm y $h_{CE} = 2$ nm.

Cambios en el módulo de Young durante la maduración también han sido observados en el bacteriófago HK97 [3, 14].

Se deduce que **el proceso de expansión aumenta la fragilidad, indicando que la cápsida expandida es un estado intermedio no estable**. Este resultado es consistente con lo observado en las micrografías de TEM. Se puede decir entonces que el principal objetivo de la expansión es aumentar el volumen de la estructura proteica y exponer los parches hidrofóbicos para la nucleación de la proteína gpD.

Por el contrario las cápsidas decoradas con proteína gpD muestran un aumento significativo en la constante elástica respecto a los valores obtenidos para las procápsidas y cápsidas expandidas, como se observa en la figura 4.3e. Además, **la incorporación de la proteína gpD no sólo produce un aumento en la dureza, sino que también, en la fuerza de fractura de la estructura**. Este resultado sugiere que la proteína gpD estabiliza la cápsida para poder soportar la presión interna originada por el ADN de cadena doble empaquetado [16, 17].

4.2.2. Experimentos de fatiga mecánica

Se ha observado que a lo largo del proceso de la maduración en el bacteriófago λ se produce un aumento en la dureza de la cápsida tras la incorporación de la proteína gpD. Este comportamiento no ha sido observado en otros fagos parecidos morfológicamente como HK97 o T7. A pesar de esto, estos fagos aumentan la estabilidad de la cápsida durante este proceso [14, 15]. Como ha sido demostrado de forma detallada en el capítulo 3 para el bacteriófago T7, la dureza no tiene por qué ser indicador de estabilidad mecánica.

Se decidió por tanto investigar sobre la estabilidad de las tres partículas víricas, procápsida, cápsida expandida y cápsida decorada con proteína gpD, para evaluar posibles cambios. Los ensayos de fatiga mecánica son comúnmente usados para caracterizar la estabilidad de los materiales con dimensiones en la escala macromolecular, pudiendo ser adaptados a la escala nanométrica. Experimentos de fatiga mecánica han sido utilizado previamente para las examinar las diferencias que existen durante el desensamblare de las partículas víricas del Adenovirus [39, 40].

Las partículas fueron sometidas a ciclos de carga a fuerza constantes, siendo el valor de esta fuerza inferior a la de fractura. El número de ciclos necesarios para producir el primer daño estructural proporciona información sobre la estabilidad de los capsómeros. El método que se ha utilizado consiste en realizar un muestreo ininterrumpido de cada partícula usando el modo Jumping Mode plus AFM [32]. Este modo de medida de AFM está basado en la realización de curvas F vs. Z , a fuerza controlada, en cada uno de los puntos de muestreo, siendo el número estos del orden de miles para escanear un virus. Cada ciclo de carga (F vs. Z) produce una deformación en la cápsida. El alcance de la deformación producida viene determinada por la fuerza aplicada en cada ciclo y la constante elástica de la misma. Se eligió una fuerza de muestreo de 100 pN basándonos en los valores de constante elástica que las partículas víricas presentan. Para este valor de fuerza la deformación producida por cada ciclo es menor de 1nm y entro del régimen elástico. Se estudiaron 7 procápsidas, 7 cápsidas expandidas y 8 cápsidas decoradas con gpD.

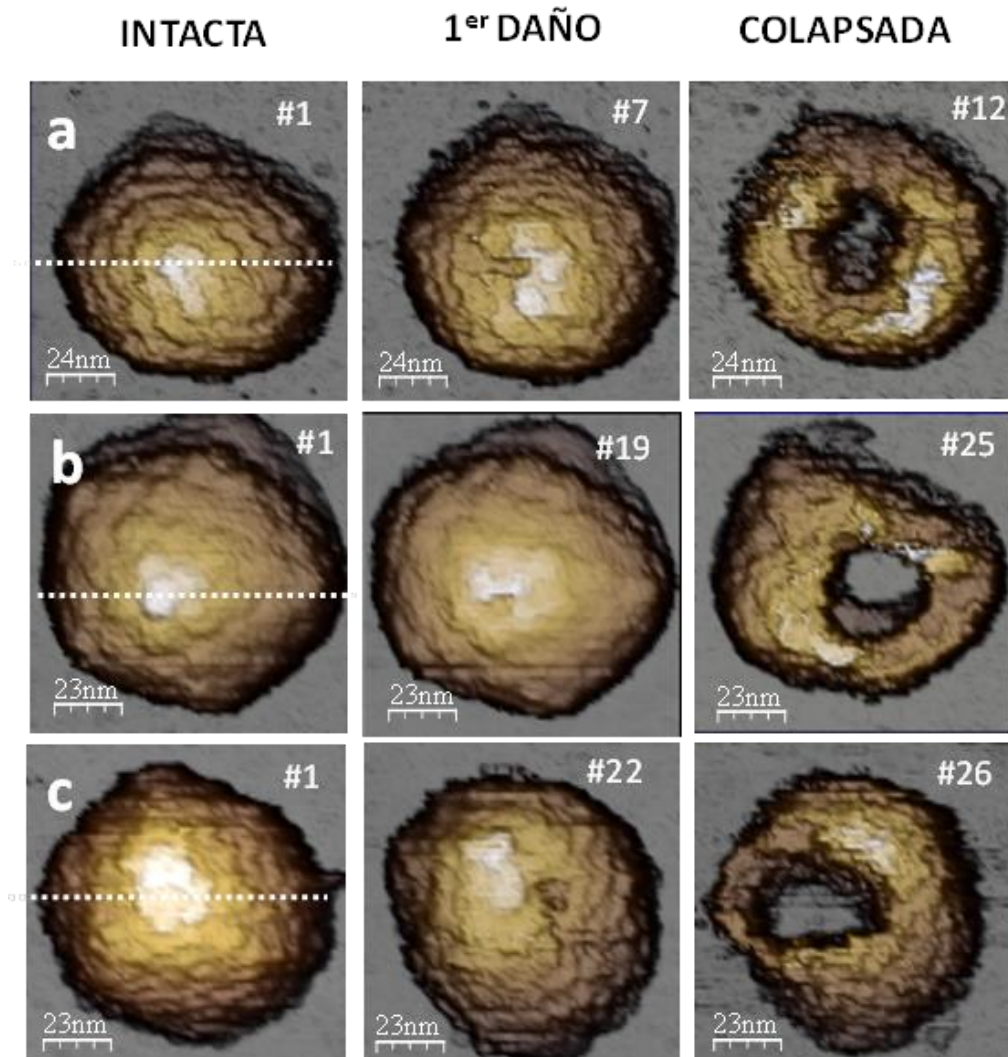


Figura 4.4: Estabilidad y fatiga mecánica. Selección de imágenes de las películas obtenidas durante los experimentos de fatiga mecánica realizados sobre procápsidas, cápsidas expandidas y cápsidas decoradas con gpD. (#) Hace referencia al número de imagen adquirida durante el experimento. a) procápsida a 100 pN de fuerza, b) cápsida expandida a 100pN de fuerza y c) cápsida decorada con gpD a 120 pN de fuerza. Las líneas de puntos en las imágenes #1 muestran la zona donde se estudiará la evolución de la topografía mostrada en la figura 4.5.

En la figura 4.4a se muestra un ejemplo de los experimentos de fatiga mecánica a 100 pN de fuerza realizado sobre una procápsida. Se muestran las imágenes (#) tomadas al comienzo del experimento, después de producir el primer daño estructural y después del colapso de la cápsida. La procápsida fue dañada después de seis imágenes consecutivas (#7) y su estructura colapsó después de 11 imágenes (#12). Las figuras 4.4b y c muestran el mismo experimento realizado para una cápsida expandida y una cápsida

decorada con gpD a 100 pN y 120 pN de fuerza, respectivamente. En estos experimentos se observa que la cápsida expandida y la decorada con gpD presentan su primer defecto estructural para un número de imágenes de 18 y 21, respectivamente. Para el caso de las cápsidas decoradas con proteína gpD se aumentó la fuerza a 120 pN debido a que 100 pN son insuficientes para producir daños estructurales en un periodo de tiempo de experimento razonable.

De los múltiples experimentos realizados se observa un comportamiento común en el proceso de fatiga para los tres tipos de partículas víricas. Primero se produce un defecto debido a la pérdida o hundimiento de alguno/s capsómero/s, el cual muestra ser el origen de la fractura o fisura que se propaga por toda la cápsida hasta producir el colapso de la misma. El procedimiento por el cual se desarrolla este proceso parece ser diferente al que se ha observado en virus eucariotas. En Adenovirus se observó la pérdida progresiva de los pentones antes de que la fisura se propagara por la estructura [39, 40]. Este comportamiento observado en las partículas del fago λ puede ser entendido teniendo en cuenta que durante el proceso de infección, los bacteriófagos abandonan la cápsida vacía en el medio extracelular, sin ser necesario su desensamblase para poder liberar el material genético ocurre para los virus eucariotas.

Para cuantificar la diferencia existente entre cada tipo de partícula viral se analizaron los cambios de topográficos producidos en cada una de la imágenes adquiridas durante los experimentos de fatiga mecánica. De esta forma se puede conocer el momento en el cual la estructura de la partícula fue alterada. La figura 4.5a muestra la evolución temporal de la topografía a lo largo de una línea de muestreo en las tres partículas víricas de la figura 4.4. Los perfiles realizados sobre estas imágenes (líneas punteadas en figura 4.5a) nos proporcionan información acerca de la cinética del proceso (figura 4.5b). Se deduce que las procápsidas muestran defectos estructurales y colapsan para un número inferiores de imágenes que las cápsidas expandidas y las decoradas con gpD. Además se observa que una fuerza de 100 pN para cada ciclo de carga no es suficiente para crear defectos o fracturas en las cápsidas decoradas con gpD. Estas estructuras permanecían inalteradas tras cinco horas de experimento. Por ese motivo, se decidió aumentar la fuerza aplicada en cada ciclo a 120 pN. Se cuantificaron el número de

ciclos de carga (#) aplicados antes de producir el primer daño estructural para cada una de las 22 partículas estudiadas. La figura 4.5c muestra un histograma de los valores medios del número de ciclos aplicados a cada tipo de partícula. Mientras que las cápsidas decoradas con proteína gpD resisten tras 1.8×10^5 ciclos de 120 pN, las procápsidas y cápsidas expandidas resisten para 0.4×10^5 y 1.1×10^5 ciclos de 100 pN, respectivamente.

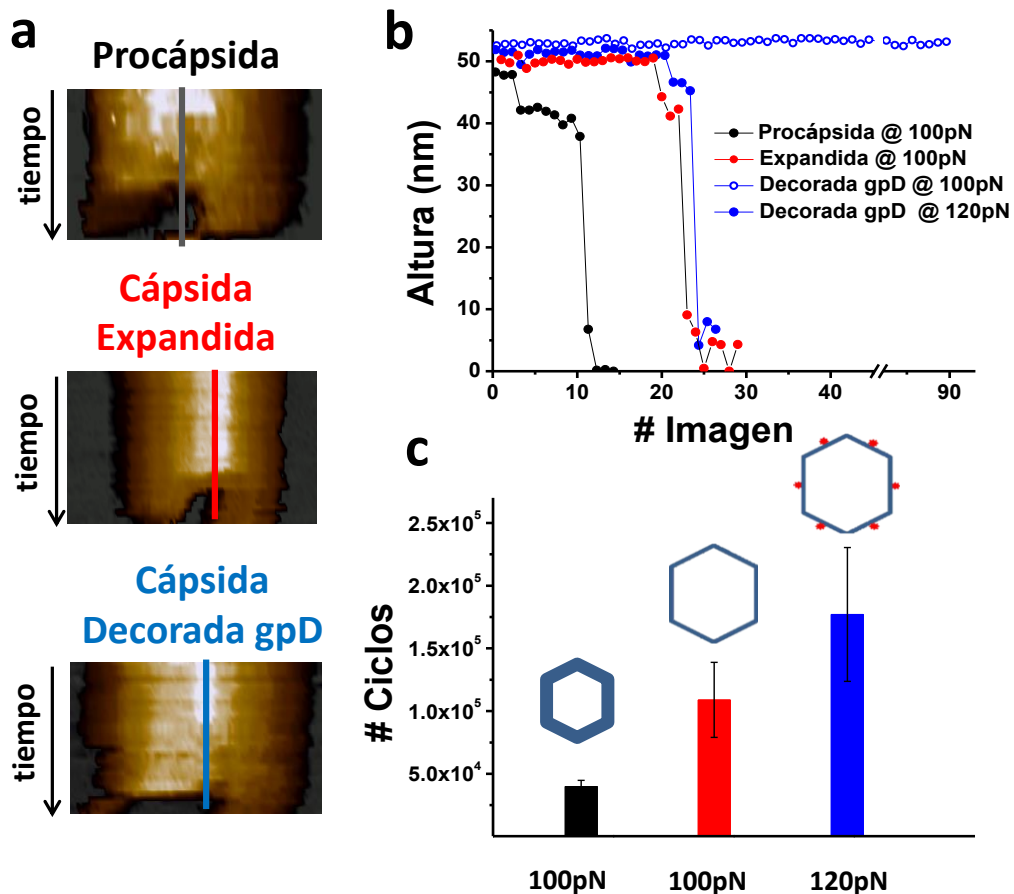


Figura 4.5: Fatiga mecánica: a) Imágenes de la evolución en topografía obtenidas a lo largo de la línea punteada blanca para las partículas mostradas en la figura 4.4 durante los experimentos de fatiga mecánica. b) Comparación de la evolución de la alturas a lo largo del tiempo para procápsidas (puntos negros, 100pN), cápsida expandida (puntos rojos, 100pN) y cápsida decorada (circunferencias azules, 100pN y puntos azules, 120pN). c) Histograma del número de ciclos de carga necesarios para producir el primer daño estructural sobre la procápsida (negro), cápsida expandida (rojo) y cápsida decorada con gpD (azul).

Estos resultados indican que **la adición de la proteína gpD aumenta la resistencia de la estructura frente a fracturas.**

Hemos de tener en cuenta que las cápsidas de las partículas virales durante el ciclo viral están sometidas a múltiples y continuadas colisiones con las moléculas del medio cuya energía promedio es del orden de $\approx 3/2 k_B T$. Los ciclos de carga a fuerza constante aplicados en los experimentos de fatiga mecánica pueden compararse con los impactos moleculares que sufren estas estructuras como consecuencia del *molecular-crowding* durante el ciclo vírico. La energía aplicada por la punta durante cada ciclo es del orden de $10 k_B T$, como se muestra en la figura 4.6, donde k_B es la constante de Boltzmann y $T=300$ K.

Durante el ciclo vírico podemos distinguir dos etapas importantes, la intracelular y la extracelular. Tanto las procápsidas como la cápsidas expandidas se localizan en la etapa intra-celular (citoplasma de la bacteria). Por el contrario, las cápsidas expandidas decoradas con gpD se localizan en la etapa extracelular.

Podemos utilizar la viscosidad η como un parámetro indirecto para evaluar el *molecular crowding*. A partir del coeficiente de difusión del GFP (*Green Fluorescent protein*) en el citoplasma de E.coli [41], y usando la ecuación de difusión (ecuación 4.3), se ha estimado que el coeficiente de viscosidad en el citoplasma es $\eta_{\text{citoplasma}} \approx 0.15$ P, cuyo valor es 15 veces mayor que el del agua ($\eta_{\text{agua}} \approx 0.01$ P). La bacteria E. coli se localiza en el sistema digestivo del ser humano y algunos vertebrados. El coeficiente de viscosidad del fluido formado por la bilis, el jugo pancreático y lípidos emulsionados que se produce en el duodeno (quilo) tiene un valor de $\eta_{\text{quilo}} \approx 1$ P [42].

$$\eta = \frac{k_B T}{6\pi R D} \quad (4.3)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, R el radio de la partícula y D es el coeficiente de difusión del medio.

Por tanto la viscosidad del quilo, donde se encuentra la cápsida expandida decorada con proteína gpD, es mucho mayor que la viscosidad del citoplasma bacteriano. Esto podría explicar el resultado encontrado en los experimentos de fatiga mecánica. Se observa un aumento en la estabilidad de las cubiertas proteicas durante el proceso de

maduración, siendo la cápsida expandida y decorada con proteína gpD es la estructura más estable.

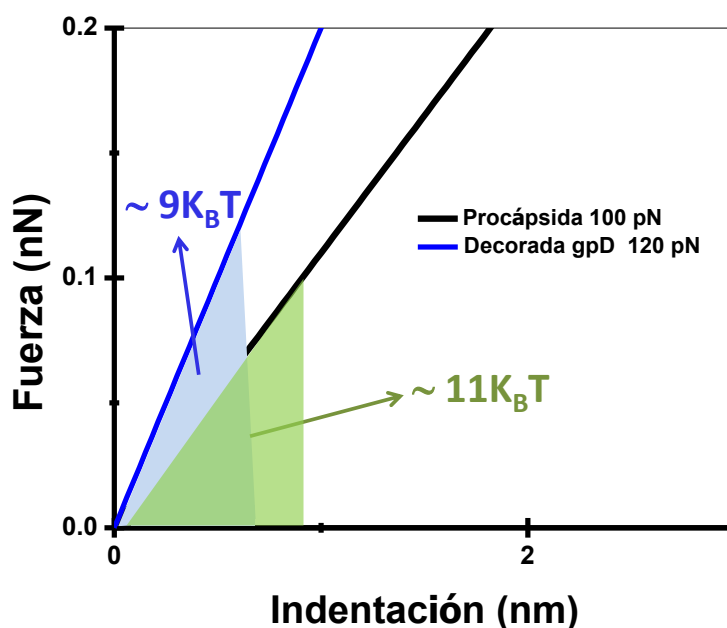


Figura 4.6: Energía. Estimación de la energía aplicada por cada uno de los ciclos de fuerza realizados en los experimentos de fatiga mecánica para cada una de las partículas. En color azul para procápsidas y cápsidas expandidas y en verde para cápsidas decoradas con proteína gpD.

La proteína gpD sobre la superficie de la estructura de la cápsida expandida produce un comportamiento similar al que se observa en el fago HK97 cuando introduce *cross-linking* entre las subunidades proteicas. Sin embargo, mientras que la fuerza de ruptura aumenta también en el bacteriófago HK97 durante el proceso de maduración, no han sido observados cambios en la dureza como en el bacteriófago λ . Por tanto, se deduce que **las interacciones no-covalentes de las proteínas gpD con la cápsida parecen ser más efectivas para estabilizar la estructura que el proceso de *cross-linking* observado en el fago HK97.**

4.3. Resumen y conclusiones

A lo largo de este capítulo se ha caracterizado mecánicamente el bacteriófago λ . Este virus se caracteriza por presentar un proceso de maduración cuyo proceso de estabilización de la estructura es diferente al de los fagos T7 y ϕ 29, estudiados en los capítulos 2 y 3. Este proceso se caracteriza por incluir una proteína de refuerzo (gpD) tras expandirse la procápsida. Es conocido que la presencia de esta proteína es imprescindible para el completo empaquetamiento del material genético.

Desde un punto de vista bioquímico los cambios estructurales que se producen en la cápsida para incluir esta proteína de decoración gpD han sido muy estudiados. Aunque se ha sugerido que la presencia de la proteína gpD produce un aumento de estabilidad química, nada se sabía acerca de la estabilidad mecánica que esta proteína induce.

Los experimentos de caracterización mecánica con el AFM en las partículas víricas que aparecen durante la maduración de este bacteriófago: procápsida, cápsida expandida y cápsida decorada con gpD, han permitido estudiar los cambios que se producen a lo largo de este proceso. En particular, se han centrado en la caracterización de la constante elástica (k) con indentaciones, y en el estudio de la estabilidad mecánica con experimentos de fatiga.

De los experimentos de nanoindentación se deduce que **en el proceso de expansión no aumenta dureza de la estructura, pero si la fragilidad de la cápsida**. Este resultado indica que, **la cápsida expandida es un estado intermedio no estable**, en acorde con el hecho de que estas estructuras puedan contraerse y expandirse de forma reversible. El principal objetivo de la expansión es aumentar el volumen de la cápsida y exponer los parches hidrofóbicos para la nucleación de la proteína gpD. Además **la adición de proteína gpD aumenta la constante elástica de la cápsida**. Este comportamiento no ha sido observado durante maduración en otros bacteriófagos. **La incorporación de la proteína gpD produce no sólo un aumento en la dureza, sino también, en la fuerza de fractura de la estructura**.

Los experimentos de fatiga mecánica han mostrado que **es necesario aplicar un mayor número de cargas cíclicas para producir un daño estructural en las cápsidas**

decoradas con proteína gpD. Además, la magnitud de esta fuerza es superior (120 pN) a la aplicada en cada ciclo sobre las procápsidas y cápsidas expandidas (100 pN). **La incorporación de la proteína gpD aumenta la resistencia de la estructura.** Este aumento indican que la finalidad del proceso de maduración en el bacteriófago λ es el desarrollo de una estructura capaz de, por un lado, soportar altas presiones procedentes del material genético empaquetado, y por otro, ser lo suficientemente resistente frente a condiciones fisicoquímicas extremas.

La adición de proteínas gpD para aumentar la estabilidad mecánica de la cápsida vírica parece ser un mecanismo más efectivo que los observados en otros fagos (i.e., *cross-linking*, aumento de áreas de contacto, o inserción de dominios).

4.4. Referencias

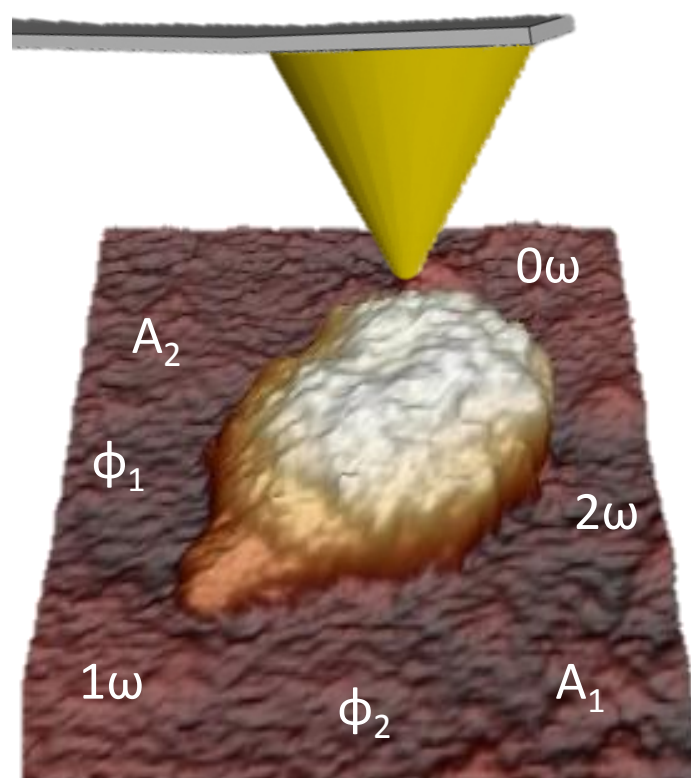
1. Conway, J.F., et al., Proteolytic and Conformational Control of Virus Capsid Maturation - the Bacteriophage-Hk97 System. *Journal of Molecular Biology*,253 (1): p. 86-99,(1995).
2. Rader, A.J., D.H. Vlad, and I. Bahar, Maturation dynamics of bacteriophage HK97 capsid. *Structure*,13 (3): p. 413-421,(2005).
3. Ross, P.D., et al., Crosslinking renders bacteriophage HK97 capsid maturation irreversible and effects an essential stabilization. *Embo Journal*,24 (7): p. 1352-1363,(2005).
4. Ionel, A., et al., Molecular Rearrangements Involved in the Capsid Shell Maturation of Bacteriophage. *Journal of Biological Chemistry*,286 (1): p. 234-242,(2011).
5. Parent, K.N., et al., P22 Coat Protein Structures Reveal a Novel Mechanism for Capsid Maturation: Stability without Auxiliary Proteins or Chemical Crosslinks. *Structure*,18 (3): p. 390-401,(2010).
6. Morais, M.C., et al., Bacteriophage phi 29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. *Nature Structural Biology*,10 (7): p. 572-576,(2003).
7. San Martin, C., Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly (vol 4, pg 847, 2012). *Viruses-Basel*,4 (12): p. 3952-3952,(2012).
8. Ren, Z.J., et al., Phage display of intact domains at high copy number: A system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein Science*,5 (9): p. 1833-1843,(1996).
9. Lander, G.C., et al., Bacteriophage lambda stabilization by auxiliary protein gpD: Timing, location, and mechanism of attachment determined by cryo-EM. *Structure*,16 (9): p. 1399-1406,(2008).
10. Carrasco, C., et al., DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,103 (37): p. 13706-13711,(2006).
11. Ivanovska, I., et al., Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,104 (23): p. 9603-9608,(2007).
12. Hernando-Pérez, M., et al., Direct Measurement of Phage phi29 Stiffness Provides Evidence of Internal Pressure. *Small*,8 (15): p. 2365,(2012).
13. Kol, N., et al., Mechanical properties of murine leukemia virus particles: Effect of maturation. *Biophysical Journal*,91 (2): p. 767-774,(2006).

14. Roos, W.H., et al., Mechanics of bacteriophage maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,109 (7): p. 2342-2347,(2012).
15. Hernando-Pérez, M., et al., The interplay between mechanics and stability of viral cages. *Nanoscale*, 6: p. 2702-2709,(2014).
16. Evilevitch, A., et al., Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,100 (16): p. 9292-9295,(2003).
17. Purohit, P.K., et al., Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. *Biophysical Journal*,88 (2): p. 851-866,(2005).
18. Murialdo, H. and A. Becker, Head Morphogenesis of Complex Double-Stranded Deoxyribonucleic-Acid Bacteriophages. *Microbiological Reviews*,42 (3): p. 529-576,(1978).
19. Fane, B.A. and P.E. Prevelige, Jr., Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly. *Advances in Protein Chemistry*,64: p. 259-99,(2003).
20. Johnson, J.E., Virus particle maturation: insights into elegantly programmed nanomachines. *Current Opinion in Structural Biology*,20 (2): p. 210-216,(2010).
21. Zlotnick, A. and B.A. Fane, Mechanisms of Icosahedral Virus Assembly, in *Structural Virology*, M.A.-M.a.R. McKenna, Editor. 2011, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 182-204.
22. Catalano, C.E., Viral Genome Packaging Machines: An Overview, in *Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structure, and Mechanism*, C.E. Catalano, Editor. 2005, Kluwer Academic: New York.
23. Roizman, B., Herpes Simplex Viruses, in *Fields Virology*, D.M.K.a.P.M. Howley, Editor. 2007, Lippincott, Williams, and Wilkins: New York. p. 2501-2602.
24. Dokland, T. and H. Murialdo, Structural Transitions during Maturation of Bacteriophage-Lambda Capsids. *Journal of Molecular Biology*,233 (4): p. 682-694,(1993).
25. Yang, F., et al., Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD. *Nature Structural Biology*,7 (3): p. 230-237,(2000).
26. Qin Yang, N.K.M., Carlos Enrique Catalano, Packaging of a Unit-Length Viral Genome: The Role of Nucleotides and the gpD Decoration Protein in Stable Nucleocapsid Assembly in Bacteriophage λ . *Journal of Molecular Biology*,383 (5): p. 1037-1048,(2008).
27. Hendrix RW, et al., *Lambda II*. Cold Spring Harbor Lab Press, Woodbury, NY,1983).

28. Lander, G.C., Galería de Imágenes. <http://www.scripps.edu/lander/images.php>,
29. Evilevitch, A., et al., Measurements of DNA lengths remaining in a viral capsid after osmotically suppressed partial ejection. *Biophysical Journal*,88 (1): p. 751-756,(2005).
30. Medina, E., et al., Thermodynamic Characterization of Viral Procapsid Expansion into a Functional Capsid Shell. *Journal of Molecular Biology*,418 (3-4): p. 167-180,(2012).
31. Moreno-Herrero, F., et al., Jumping mode scanning force microscopy: a suitable technique for imaging DNA in liquids. *Applied Surface Science*,210 (1-2): p. 22-26,(2003).
32. Ortega-Esteban, A., et al., Minimizing tip-sample forces in jumping mode atomic force microscopy in liquid. *Ultramicroscopy*,114: p. 56-61,(2012).
33. Landau, L.D. and E. Lifshitz, *Theory of Elasticity*. 3rd ed. Pergamon London,1986).
34. de Pablo, P.J., et al., Deformation and collapse of microtubules on the nanometer scale. *Physical Review Letters*,91 (9): p. 98101,(2003).
35. Ivanovska, I.L., et al., Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101 (20): p. 7600-7605,(2004).
36. Roos, W.H. and G.L. Wuite, Nanoindentation Studies Reveal Material Properties of Viruses. *Advanced Materials*,21 (10-11): p. 1187-1192,(2009).
37. Klug, W.S., et al., Failure of viral shells. *Physical Review Letters*,97 (22)2006).
38. Llauro, A., et al., Mechanical Stability and Reversible Fracture of Vault Particles. *Biophysical Journal*,106 (3): p. 687-695,(2014).
39. Ortega-Esteban, A., et al., Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Scientific Reports*, 3 (1434):p.1-7,(2013).
40. Perez-Berna, A.J., et al., The Role of Capsid Maturation on Adenovirus Priming for Sequential Uncoating. *Journal of Biological Chemistry*,287 (37): p. 31582-31595,(2012).
41. Mika, J.T. and B. Poolman, Macromolecule diffusion and confinement in prokaryotic cells. *Current Opinion in Biotechnology*,22 (1): p. 117-26,(2011).
42. Jonas, A., Microviscosity of Lipid Domains in Human-Serum Lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*,486 (1): p. 10-22,(1977).

CAPÍTULO 5:

MAPAS DE PROPIEDADES FÍSICAS DEL BACTERIÓFAGO $\phi 29$: MULTI-ARMÓNICOS $0+1+2$



5. MAPAS DE PROPIEDADES FÍSICAS DEL BACTERIÓFAGO $\phi 29$: MULTI-ARMÓNICOS 0+1+2

5.1. Espectroscopia e imagen mediante AFM

Como hemos visto en los capítulos anteriores, el estudio de las propiedades del material de la estructura de los virus (constante elástica, dureza, estabilidad mecánica, densidad de carga superficial, etc) proporcionan información que permite entender la relación que existe entre la estructura y la función biológica [1-4]. El método convencional de medida de alguna estas de magnitudes mediante el uso del microscopio de fuerzas atómicas, como es la constante elástica, ha consistido en realizar curvas estáticas F vs. Z para producir pequeñas deformaciones (nanoindentaciones) en la estructura de las cápsidas víricas [5]. En los últimos años, se han buscado nuevos modos de operación del AFM que permitan obtener en “tiempo real” (mientras se adquieren imágenes) mapas de propiedades locales en biomoléculas y autoensamblados de las mismas. Por eso, los métodos convencionales quasi-estáticos basados en la realización de curvas F vs. Z como el JM (*Jumping Mode*) [6, 7], *Force Volumen* [8] y *Peak Force QNM* [9, 10] intentan evolucionar hacia la obtención de mapas de propiedades físicas. Se han desarrollado también nuevas aproximaciones en los modos dinámicos que permiten interpretar, de forma cuantitativa, propiedades del material a partir de las magnitudes fundamentales como son: los cambios de fase y de la amplitud en el modo dinámico de modulación en amplitud (*Amplitude Modulation-Atomic Force Microscopy*, AM-AFM) [11], o los cambios en la disipación medidos en el modo dinámico de modulación en frecuencia (*Frequency Modulation-Atomic Force Microscopy*, FM-AFM) [12, 13].

Multi-armónicos 0+1+2

El modo con modulación en amplitud (AM-AFM) proporciona, en primera aproximación, información del estado fundamental de oscilación de la micropalanca que viene descrito por los observables A_1 y ϕ_1 (amplitud y fase, respectivamente). Sin embargo, la señal de deflexión del micropalanca contiene información adicional que no está incluida en el modo fundamental. En los últimos años se han desarrollado nuevas aproximaciones que van más allá de considerar el modo fundamental de oscilación y vibración de la micropalanca. Los modos de vibración superiores usando el modo bimodal-AM-AFM y los armónicos excitados usando la aproximación los multi-armónicos 0+1+2 permiten obtener mapas de propiedades físicas del material.

La aproximación bimodal ha sido descrita detalladamente por grupo del Profesor Ricardo García en los últimos años. En esta aproximación la micropalanca se excita a las frecuencias de resonancias de los dos primeros modos flexurales de vibración. La micropalanca se describe como un objeto continuo bidimensional y por tanto aparecen infinitos modos de vibración descritos por la ecuación de Euler–Bernoulli [14]. Además permite un aumento de la resolución lateral y contraste en la componente conservativa [15].

En la aproximación multi-armónicos la micropalanca se considera dentro del modelo unidimensional o modelo de masa puntual. En este modelo la micropalanca es considerada como un muelle. La ecuación que describe la dinámica de la micropalanca bajo la acción de la interacción entre la punta y la muestra corresponde a la de un oscilador armónico no lineal amortiguado que da lugar a la aparición de diferentes armónicos. En contraste con la aproximación bimodal que considera la micropalanca como un objeto continuo con infinitos modos de vibración, la aproximación de multi-armónicos se centra en los estudio de los armónicos de un muelle excitados por la no linealidad en la fuerza de interacción entre la punta y la muestra, (en inglés *Interaction tip-sample Force*, F_{ts}).

En este capítulo se propone la teoría de los multi-armónicos 0+1+2 AFM, desarrollada por el Profesor Arvind Raman y aplicada anteriormente en estudios con células para la obtención de mapas cuantitativos de sus propiedades a nivel local [16]. Mediante el uso del modo de operación dinámico en AM-DAFM y aplicando esta teoría *multi-armónicos 0+1+2* se pretende obtener, no sólo imágenes de topografía con alta resolución, sino mapas locales de propiedades de material dentro de los virus individuales en condiciones fisiológicas. La teoría de los *multi-armónicos 0+1+2* considera una micropalanca operando en modo dinámico de amplitud modulada (AM-DAFM), que interacciona de forma discontinua con la superficie de un virus. La no linealidad en la dinámica de la micropalanca debido al contacto intermitente con la muestra, produce la excitación de los armónicos consecutivos del estado fundamental de oscilación de la misma. Los observables fundamentales de estos armónicos (amplitud y fase) pueden ser relacionados y descritos en términos de F_{ts} , mediante expresiones matemáticas sencillas. Estas fuerzas de interacción dependen, a su vez, de las propiedades del material como son: la constante elástica, la viscosidad intrínseca y la fuerza de adhesión.

Esta nueva interpretación de los observables aplicando la teoría de los multi-armónicos en AFM permite explorar dos hechos importantes. Por un lado, la no linealidad de las fuerzas F_{ts} debido a presencia de interacciones electrostáticas, de elasticidad y de fuerzas de hidratación en la superficie del virus. Estas fuerzas F_{ts} permiten que la señal de los armónicos de frecuencia 0ω , 1ω y 2ω sean amplificadas y sus observables fácilmente detectados. Por otro lado, la micropalanca es oscilada magnéticamente. La fuerza Lorentz que experimenta la micropalanca para ser oscilada está bien definida, y las amplitudes y fases (A_0 , A_1 , A_2 , ϕ_1 y ϕ_2) de los armónicos excitados pueden ser relacionadas de forma directa con la fuerza F_{ts} entre la punta y la muestra.

En este capítulo se aplicará la teoría de los multi-armónicos 0+1+2 al bacteriófago $\phi 29$. Este bacteriófago ha sido descrito y caracterizado mecánicamente en el capítulo 2 mediante el uso de modos de operación cuasi estáticos de AFM. Debido a su simplicidad y a los conocimientos que se tenían del mismo, se decidió aplicar la teoría de multi-

armónicos 0+1+2 y obtener mapas cuantitativos de las propiedades locales para complementar los estudios ya realizados.

Los resultados mostrados a lo largo de este capítulo fueron obtenidos gracias a la colaboración realizada con el grupo del Profesor Arvind Raman; que adaptó la teoría de multi armónicos 0+1+2 para aplicarla a los virus [17].

5.2. Teoría de Multi-armónicos 0+1+2

El uso de la teoría de Multi-armónicos 0+1+2 promete ser una herramienta potente para la obtención de mapas a nivel local de propiedades de sistemas biológicos de tamaño nanométrico, como son los virus.

En los últimos años, la caracterización de las propiedades mecánicas de partículas víricas ha consistido en la realización de curvas de nanoindentación, obteniendo un valor promedio del valor de la constante elástica de las mismas. Los métodos cuasi estáticos basados en nanoindentaciones y modos dinámicos han sido también utilizados para el estudio de propiedades físicas de virus. Estos métodos han permitidos obtener únicamente mapas cuantitativos de propiedad mecánicas, como son la elasticidad (k) o el módulo de Young (E).

Como un intento de mejora de la información obtenida mediante modos dinámicos se propone la teoría de multi-armónicos 0+1+2. Mediante el uso de esta teoría es posible obtener de manera simultánea mapas de alta resolución de propiedades como son la elasticidad, la viscosidad y la fuerza de adhesión en partículas víricas aumentando el grado de aportación en comparación con los métodos convencionales.

En la figura 5.1 se muestra un esquema representativo de los fundamentos en los que se desarrolló la teoría multi-armónicos 0+1+2. Se representa una micropalanca oscilando a una frecuencia ω en régimen de contacto intermitente. Los armónicos de la fuerza de interacción entre la punta y la muestra son excitados debido a la no linealidad de la interacción. La fuerza F_{ts} se puede expresar como una expansión de términos de Fourier.

Durante el experimento se registrarán los observables de los $n\omega$ armónicos (A_0, A_1, A_2, ϕ_1 y ϕ_2) que serán analizados y tratados para cada experimento. De estos observables se obtendrán los mapas de los armónicos de la fuerza de interacción que a su vez se relacionan con las propiedades del material como se indica en la figura 5.1.

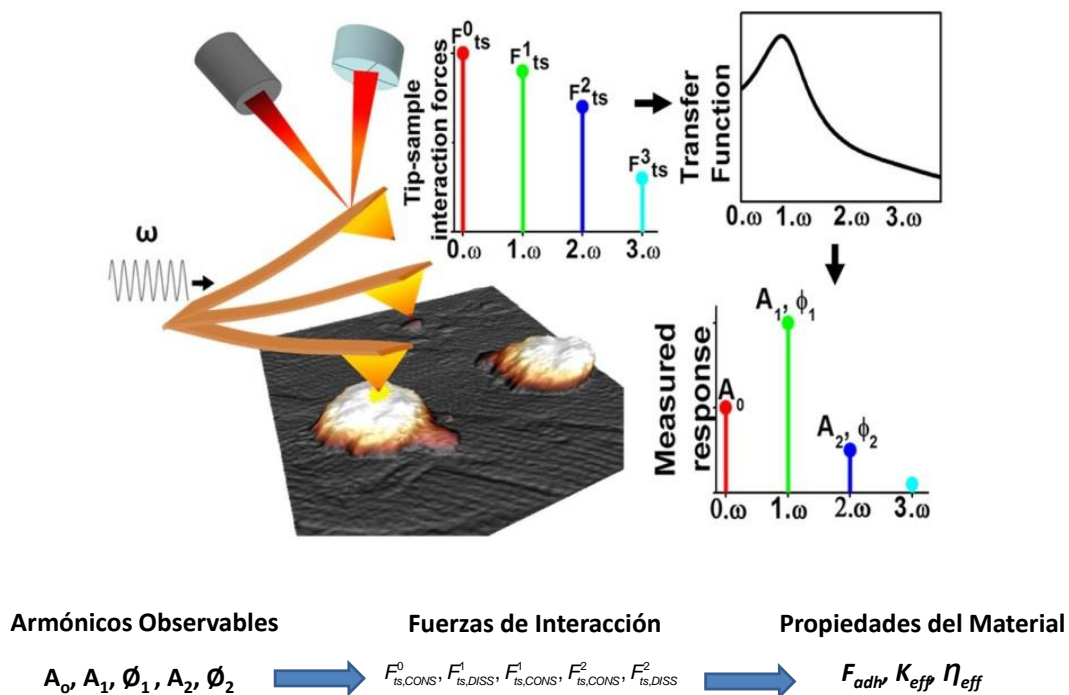


Figura 5.1: Los armónicos $n\omega$ de la micropalanca son excitados por el contacto intermitente con un virión de $\phi 29$ y el sustrato. Debido a la no linealidad de las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra los armónicos $n\omega$ de F_{ts} , son excitados. Las fuerzas son filtradas con una función de transferencia, (en inglés *Transfer Function*) y como resultado se obtiene la respuesta de los $0\omega, 1\omega$ y 2ω del espectro de vibración de la micropalanca.

Se consideran las ecuaciones que gobiernan el movimiento de la micropalanca oscilando con una amplitud pequeña (A_1) en torno a su frecuencia de resonancia (ω_{far}). Cuando la punta está cerca de la superficie comienza a notar las fuerzas de interacción

durante parte de su oscilación. El movimiento de la micropalanca q (t) viene descrito por las ecuaciones:

$$\frac{\ddot{q}}{\omega_{\text{far}}^2} + q + \frac{\dot{q}}{Q_{\text{far}}\omega_{\text{far}}} = \frac{F_{\text{mag}} \sin(\omega t) + F_{\text{ts}}(Z+q, \dot{q})}{k_{\text{cant}}} \quad (5.1)$$

$$F_{\text{mag}} = \frac{k_{\text{cant}} A_{1\text{far}}}{Q_{\text{far}}} \quad (5.2)$$

$$F_{\text{ts}}(Z + q, \dot{q}) = F_{\text{ts},\text{CONSS}}(Z + q) + F_{\text{ts},\text{DISS}}(Z + q, \dot{q}) \quad (5.3)$$

Donde k_{cant} es la constante elástica de la micropalanca, ω_{far} es la frecuencia, Q_{far} el factor de calidad natural y F_{ts} es la fuerza de interacción entre la punta y la muestra y Z es el desplazamiento del piezo. Los parámetros ω_{far} y Q_{far} son medidos cuando la micropalanca está lejos de la muestra ($\sim 5 \mu\text{m}$). La fuerza F_{ts} puede descomponerse en sus dos términos $F_{\text{ts},\text{CONS}}$ y $F_{\text{ts},\text{DISS}}$, conservativo y disipativo respectivamente. Para nuestros experimentos se utilizó una micropalanca BL-TR-400PB (Olympus, Tokio, Japón) con radio punta de 50 nm y con $k_{\text{cant}} = 0.09 \text{ N/m}$, $Q_{\text{far}} = 1.8$, $\omega_{\text{far}} = 8.4 \text{ kHz}$ en medio líquido. La micropalanca se oscila usando el modo de excitación magnética (iDriveTM, Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) y a una amplitud de oscilación $A_{1\text{far}} \approx 4 \text{ nm}$.

Las ecuaciones de movimiento de la micropalanca también pueden ser descritas en función de las componentes de los $n\omega$ armónicos, $n = 0, 1$ y 2 por las ecuaciones:

$$q(t) = A_0 + A_1 \sin(\omega t + \phi_1) + A_2 \sin(2\omega t + \phi_2) \quad (5.4)$$

$$\dot{q} = A_1 \cos(\theta) + 2A_2 \omega (2\theta + 2\phi_1 - \phi_2) \quad (5.5)$$

$$\theta = \omega t + \phi_1 \quad (5.6)$$

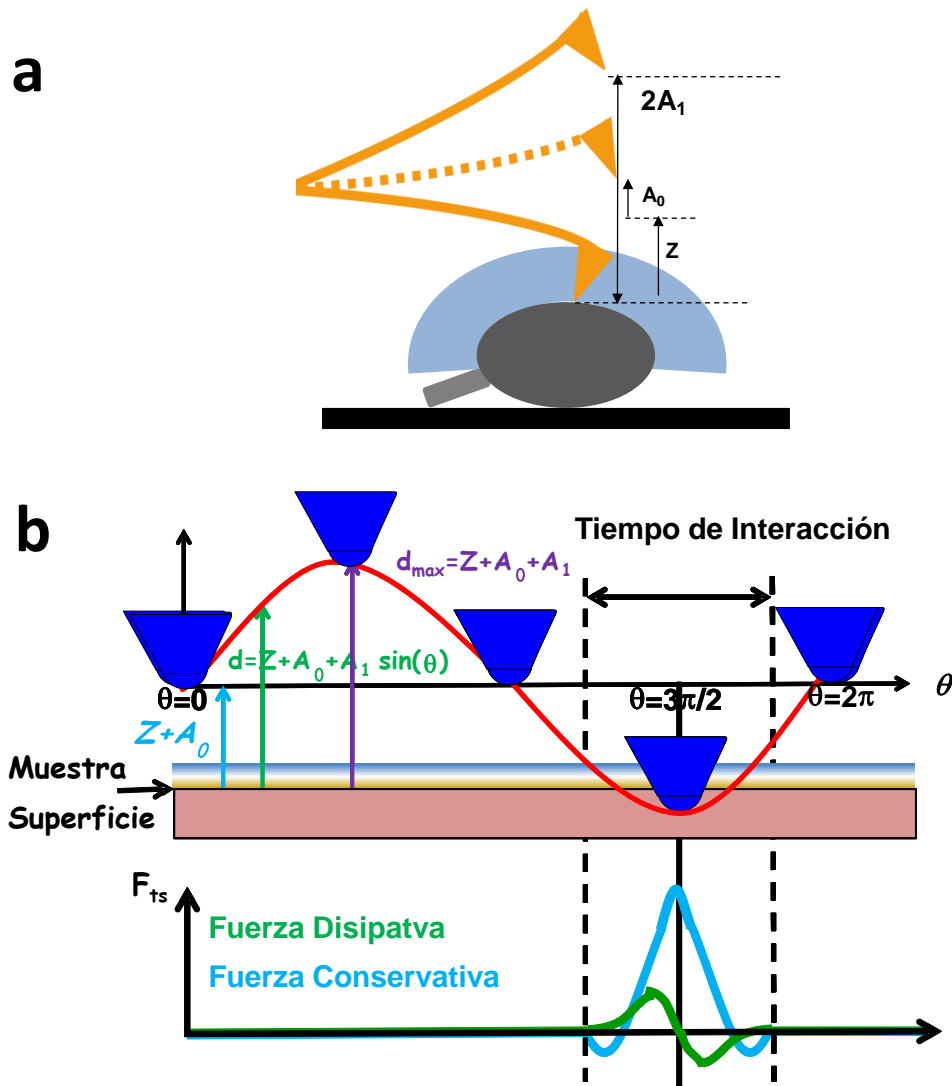


Figura 5.2: a) Representación de una micropalanca oscilando en medio líquido. b) Historia del movimiento que realiza la micropalanca mostrando la presencia de las componentes no conservativas y conservativas de las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra, F_{ts} .

Puesto que F_{ts} es considerada periódica como el movimiento de la micropalanca y no lineal, se pueden obtener los n -ésimos coeficientes de Fourier.

$$F_{ts}(Z + q(\theta), \dot{\theta}) = F_{ts,CONS}^0 + \sum_{n=1}^{\infty} F_{ts,CONS}^n \sin(n\theta) + \sum_{n=1}^{\infty} F_{ts,DISS}^n \cos(n\theta) \quad (5.7a)$$

Multi-armónicos 0+1+2

$$F_{ts}^0 = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} F_{ts} d\theta$$

$$F_{ts,CON}^n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} F_{ts} \sin(n\theta) d\theta \quad (5.7b)$$

$$F_{ts,DISS}^n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} F_{ts} \cos(n\theta) d\theta \quad N=1, 2, 3, \dots, \infty$$

Donde $F_{ts,CONS}^n$ y $F_{ts,DISS}^n$ son los n-ésimos coeficientes de Fourier de las fuerzas de interacción conservativas y disipativas. En régimen de contacto intermitente $F_{ts,CONS}(\theta)$ es simétrica en $\theta=3\pi/2$ mientras que $F_{ts,DISS}(\theta)$ es anti simétrica (figura 5.2) [16].

Sustituyendo las ecuaciones 5.5 y 5.7a en la ecuación 5.3, se obtienen las relaciones entre las componentes de la fuerza F_{ts} y los observables de los armónicos.

$$F_{ts,CONS}^0 = k_{cant} A_0$$

$$F_{ts,CONS}^1 = -F_{mag} \cos(\phi_1) + k_{cant} A_1 \left[1 - \left[\frac{\omega}{\omega_{far}} \right] \right]$$

$$F_{ts,DISS}^1 = -F_{mag} \sin(\phi_1) + k_{cant} A_1 \frac{\omega}{\omega_{far} Q_{far}}$$

$$F_{ts,CONS}^2 = k_{cant} A_2 \left[\cos(2\phi_1 - \phi_2) \left(1 - \frac{4\omega^2}{\omega_{far}^2} \right) - \frac{2\omega}{\omega_{far} Q_{far}} \sin(2\phi_1 - \phi_2) \right]$$

$$F_{ts,DISS}^2 = k_{cant} A_2 \left[\sin(2\phi_1 - \phi_2) \left(1 - \frac{4\omega^2}{\omega_{far}^2} \right) + \frac{2\omega}{\omega_{far} Q_{far}} \cos(2\phi_1 - \phi_2) \right]$$

Tabla 5.1: Relación de los n= 0, 1,2 coeficientes de Fourier de F_{ts} con los observables de los armónicos (A_0 , A_1 , A_2 , ϕ_1 y ϕ_2).

Como se mencionó en el capítulo 1 para una micropalanca con una constante elástica pequeña, en medio líquido, tanto el factor de calidad Q como la frecuencia natural ω de la misma decrecen. Estas magnitudes ω , Q y la amplitud de oscilación A_{1far} se

ven disminuidas además a medida que la punta se acerca a la muestra, es decir, a distancias menores de 50nm tendremos que $\omega_{far} < \omega_{near}$ y $Q_{far} < Q_{near}$ y $A_{1far} < A_{1near}$ [18]. Donde ω_{near} , Q_{near} y A_{1near} denotan la frecuencia de oscilación, factor de calidad y amplitud de oscilación cerca de la muestra.

Teniendo en cuenta estas consideraciones la ecuación de movimiento de la micropalanca cerca de la muestra viene dada por:

$$q_{near} = A_{1near} \sin(\omega t - \phi_{1near}) \quad (5.8)$$

$$\text{Donde } \phi_{1near} > \frac{\pi}{2} \quad \phi_{1far} = \pi/2$$

Sustituyendo las ecuaciones 5.5 y 5.7 en la ecuación 5.3 y la condición de la ecuación 5.8, obtenemos las siguientes expresiones de los n-ésimos coeficientes de Fourier de las fuerzas de interacción, denominados armónicos de las fuerzas conservativa y disipativa.

$$F_{ts,CONS}^0 = k_{cant} A_0$$

$$F_{ts,CONS}^1 = \frac{k_{cant} A_{1far}}{Q_{far}} \left(-\cos(\phi_1) + \frac{A_1}{A_{1near}} \cos(\phi_{1near}) \right)$$

$$F_{ts,DISS}^1 = \frac{k_{cant} A_{1far}}{Q_{far}} \left(-\sin(\phi_1) + \frac{A_1}{A_{1near}} \sin(\phi_{1near}) \right)$$

$$F_{ts,CONS}^2 = k_{cant} A_2 \left[\cos(2\phi_1 - \phi_2) \left(\frac{4A_1}{A_{1near}} \cos(\phi_{1near}) - 3 \right) - \frac{2A_1}{A_{1near}} \sin(\phi_{1near}) \sin(2\phi_1 - \phi_2) \right]$$

$$F_{ts,DISS}^2 = k_{cant} A_2 \left[\sin(2\phi_1 - \phi_2) \left(\frac{4A_1}{A_{1near}} \cos(\phi_{1near}) - 3 \right) - \frac{2A_1}{A_{1near}} \sin(\phi_{1near}) \cos(2\phi_1 - \phi_2) \right]$$

Tabla 5.2: Relación de los n= 0, 1,2 coeficientes de Fourier de F_{ts} con los observables de los armónicos (A_0 , A_1 , A_2 , ϕ_1 y ϕ_2), cuando la punta está cerca de la muestra.

Como se muestra en la tabla 5.2 se establece una relación para cada una de las componentes de los coeficientes de los n términos de Fourier de la fuerza de interacción (F_{ts}) con los observables (amplitud y fase) [16] de los armónicos $n= 0, 1$ y 2 . Por tanto, a partir de los observables del movimiento de oscilación de la micropalanca (A_0, A_1, A_2, ϕ_1 y ϕ_2) y de parámetros específicos de la misma (k_{can}, Q_{far} y ω_{far}) podemos obtener mapas cuantitativos en términos de F_{ts} o los denominados armónicos de la fuerza de interacción.

5.2.1. Obtención de mapas de fuerzas y propiedades físicas

Los bacteriófagos $\phi 29$ fueron depositados en HOPG en condiciones de buffer. Las imágenes de topografía se obtuvieron usando el modo de operación AM-AFM en régimen de contacto intermitente. Usando la excitación Lorentz, la micropalanca se osciló a su frecuencia natural de resonancia con una amplitud libre $A_{1far} \approx 4\text{nm}$ y ratio $A_1/A_{1far} = 0.8-0.85$ como señal de realimentación y $\phi = 90^\circ$. En nuestras condiciones experimentales, una amplitud $A_{1far} \approx 4\text{nm}$ ejerce una fuerza $\leq 200\text{pN}$. Esta fuerza permite evitar posibles daños en la partícula durante el muestreo. Los observables de los multi-armónicos (A_0, A_1, A_2, ϕ_1 y ϕ_2) son claramente detectados.

En la figura 5.3 se muestran los mapas cuantitativos de los armónicos que componen la fuerza F_{ts} para un bacteriófago $\phi 29$. Estos mapas fueron obtenidos a partir de las relaciones mostradas en la tabla 5.2. La imagen de topografía (figura 5.3a) muestra una alta resolución; en la cual se puede apreciar las componentes principales de la estructura del bacteriófago $\phi 29$: cápsida, collar y cola [19]. Las imágenes correspondientes a los observables (A_0, A_1, A_2, ϕ_1 y ϕ_2) indican *a priori* heterogeneidad en el material de la estructura del virus. Pero son quizás los mapas obtenidos de los armónicos de la fuerza F_{ts} (figura 5.3f-j) los que muestran diferencias importantes entre la cápsida, el collar y la cola.

Multi-armónicos 0+1+2

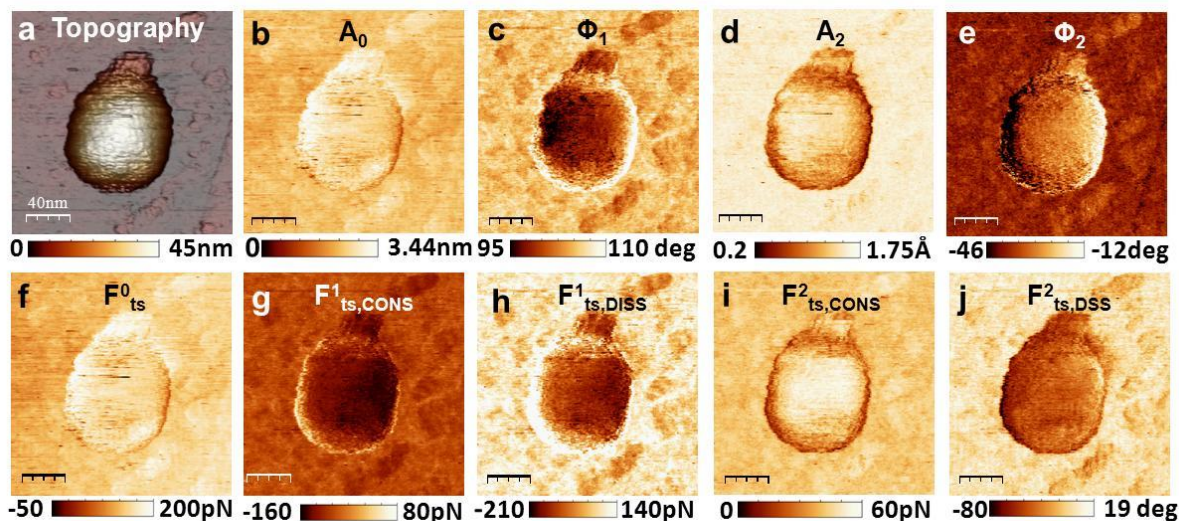


Figura 5.3: Multi-armónicos observables y mapas F_{ts} : a) Imagen de topografía de AFM de un bacteriófago $\phi 29$ con sus respectivos mapas de observables (no filtrados) b) A_0 , c) Φ_1 , d) A_2 y e) Φ_2 . Estos mapas fueron convertidos usando las funciones de la tabla 5.1 en mapas cuantitativos de los armónicos de F_{ts} (pN), f) F_{ts}^0 g) $F_{ts,CONS}^1$ h) $F_{ts,DISS}^1$ i) $F_{ts,CONS}^2$ j) $F_{ts,DISS}^2$.

Debido al interés por extraer mapas cuantitativos de propiedades físicas a partir de los observables de los multi-armónicos, fue necesario definir la forma que adquiere la fuerza de interacción entre la punta y la muestra. Una baja amplitud de oscilación de la micropalanca A_{1far} y ratio $A_1/A_{1far}=0.8-0.85$, para la obtención de imágenes de topografía de las partículas víricas sin provocar daños estructurales, induce que la punta entre en un régimen de fuerzas bajas (< 200 pN, figura 5.4a-b). En este régimen, las fuerzas medidas sobre los virus dependen también de las fuerzas electrostáticas de DLVO(Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeer), debido a que la longitud de Debye es aproximadamente $\lambda_D \sim 2-4$ nm [20] (para la fuerza iónica de nuestro *buffer*, TMS: 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris and 100 mM NaCl, a pH = 7.8). Por tanto la respuesta electromecánica de los virus se caracteriza por un gradiente de la fuerza efectivo, k_{eff} , (ecuación 5.9). Algunos autores proponen que en los experimentos de nanoindentación sobre virus la punta no sólo deforma la cápsida vírica, sino que, la capa de hidratación/solvatación que rodea las proteínas es deformada simultáneamente [21, 22].

$$\frac{1}{k_{eff}} = \frac{1}{k} + \frac{1}{k_{DLVO}} \quad (5.9)$$

Otras de las propiedades físicas a tener en cuenta, son las fuerzas de adhesión (F_{adh}) y la viscosidad (η_{eff}). Las fuerzas de adhesión dependen de las propiedades químicas del material la como hidrofobicidad (figura 5.4c). En condiciones de solución salina se espera que los virus presenten bajas fuerzas de adhesión en comparación con el sustrato, (HOPG) que presenta alta hidrofobicidad. Para tener en cuenta la energía de disipación originada por la viscosidad de las capas de hidratación que rodean el material, se considera la viscosidad intrínseca del virus η_{eff} y la energía transferida en cada modo de vibración de la micropalanca [11, 23-25].

De este modo podemos describir la fuerza de interacción F_{ts} entre la punta la muestra (virus o HOPG) mediante la expresión:

$$F_{ts} = -F_{adh} - k_{eff}(d) - \eta_{eff}\dot{d} \quad ; d < 0 \quad (5.10)$$

$$F_{ts} = 0 \quad ; d > 0$$

Donde d representa la distancia punta-muestra

Multi-armónicos 0+1+2

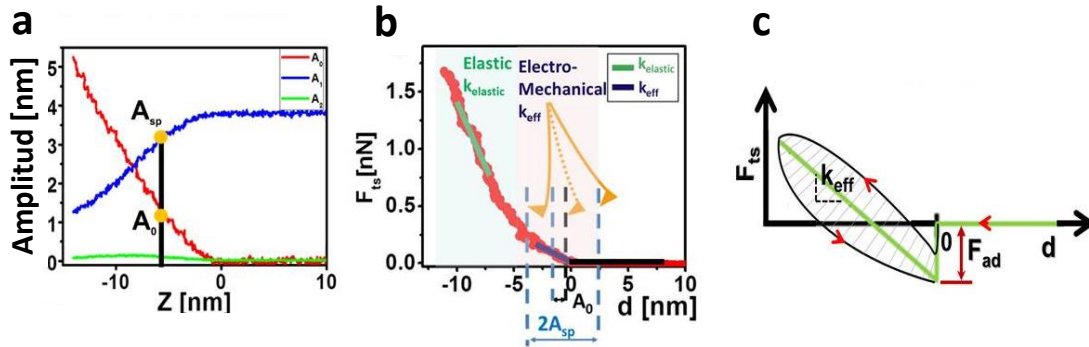


Figura 5.4: Fuerzas de interacción punta muestra. a) Curvas dinámicas realizadas sobre un virión de $\phi 29$, mostrando A_0 , A_1 y A_2 como función de Z_{piezo} . b) En contacto intermitente $A_{sp} = A_{1near} - A_0$. La fuerza de interacción entre la punta y la muestra es de tipo repulsivo (200 pN) y descrita por un gradiente de fuerza electromecánico k_{eff} de la partícula vírica. c) Esquema gráfico de modelo teórico de la fuerza F_{ts} utilizado para la obtención de los mapas locales de propiedades físicas un gradiente repulsivo y adhesión, con histéresis en cada ciclo que representa la energía de disipación debida a la viscosidad de las capas de hidratación.

A partir de las ecuaciones 5.4-5.5 y sustituyéndolas en la ecuación 5.10 se obtienen las siguientes relaciones:

$$F_{ts}^0 = \frac{-F_{ad}(\pi - \arccos(-1 + 2\Delta)) + A_1 k_{eff} \left((1 - 2\Delta)(\arccos(-1 + 2\Delta) - \pi) + 2\sqrt{-\Delta(-1 + \Delta)} \right)}{\pi}$$

$$F_{ts,CONS}^1 = -\frac{2F_{ad}(\pi - \arccos(-1 + 2\Delta)) + A_1 k_{eff} \left(\pi + 2(2\Delta - 1)\sqrt{\Delta(1 - \Delta)} - \arccos(-1 + 2\Delta) \right)}{\pi}$$

$$F_{ts,DISS}^1 = -\frac{A_1 \eta_{eff} \omega \left(\pi + 2(2\Delta - 1)\sqrt{\Delta(1 - \Delta)} - \arccos(-1 + 2\Delta) \right)}{\pi}$$

$$F_{ts,CONS}^2 := \frac{2F_{ad}(-\pi + \arccos(-1 + 2\Delta)) + 2A_1 k_{eff} \left(-\frac{8}{3}\Delta + \frac{8}{3}\Delta^2 \right) \sqrt{\Delta(1 - \Delta)}}{\pi}$$

$$F_{ts,DISS}^2 := \frac{1}{3} \frac{A_1 \eta_{eff} \omega \left(-\sin(3\arccos(-1 + 2\Delta)) + 6\sqrt{-\Delta(-1 + \Delta)} \right)}{\pi}$$

Tabla 5.3: Armónicos de la fuerza de interacción y propiedades físicas. Relación de los $n = 0, 1, 2$ coeficientes de Fourier de F_{ts} con las propiedades física: constante elástica k_{eff} , la viscosidad efectiva η_{eff} y la fuerza de adhesión F_{adh} .

En la ecuaciones de la tabla 5.3 se define $\delta_{\max} = A_1 - Z - A_0$, $\Delta = \delta_{\max} / 2A_1$, $0 < \Delta < 1$ cuando la punta está en contacto intermitente y $\Delta = 0$ cuando está en contacto.

Para cada conjunto de los observables de los multi-armónicos (A_0 , A_1 , A_2 , ϕ_1 y ϕ_2) obtendremos los mapas locales de: la constante elástica efectiva k_{eff} , la viscosidad efectiva η_{eff} y la fuerza de adhesión F_{adh} . Se buscaron por tanto, los valores de (k_{eff} , η_{eff} , F_{adh}) que de manera simultánea ajustaran los cinco mapas obtenidos de los armónicos de la fuerza. Para ello se usó un ajuste *nonlinear least-square* sobre las expresiones mostradas en la tabla 5.2, dando como resultado los mapas de propiedades mostrados en la figura 5.3. Para realizar este ajuste y tratamiento de datos se ha utilizado un programa en Matlab desarrollado por el grupo del Profesor Arvind Raman.

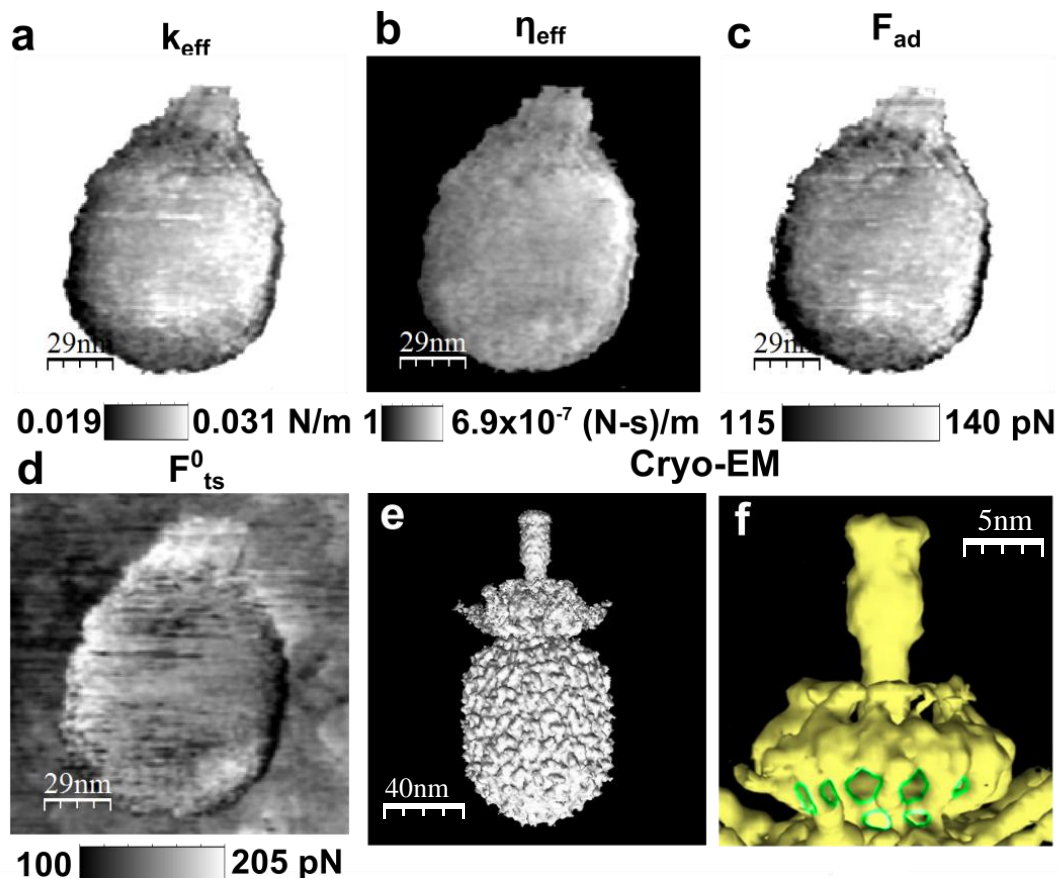


Figura 5.5: Mapas cuantitativos de propiedades físicas del bacteriófago $\phi 29$: a) Mapa del gradiente de fuerza k_{eff} (N/m). b) La viscosidad efectiva η_{eff} (N s/m). (c) La fuerza de adhesión F_{adh} (pN) d) Fuerza normal F_{ts}^0 (pN), e) Imagen de reconstrucción de cryo-EM del bacteriófago $\phi 29$ [26], f) Zoom en la zona del conector de la imagen de reconstrucción de cryo-EM del bacteriófago $\phi 29$ en la cual se aprecian las cavidades formadas en la zona del collar (verde)[27].

Como se observa en la figura 5.5 los mapas cuantitativos obtenidos están correlacionados con las imágenes de reconstrucción de Cryo-EM dentro del posible efecto dilatado debido a las dimensiones de la punta (50 nm de radio) [28]. Estos mapas muestran un alto contraste dentro de la estructura del virus, no estando correlacionados ni entre ellos ni con la imagen de topografía correspondiente (figura 5.3a). **Es posible distinguir no sólo los tres grandes complejos proteicos de la estructura del virus (cápsida, conector y cola); si no también, la presencia de estructuras más pequeñas**

Multi-armónicos 0+1+2

como son las cavidades formadas en el conector, (figura 5.5f, líneas verdes). Estas cavidades son claramente observadas con un contraste más oscuro tanto en k_{eff} (pN) y F_{adh} (pN), mientras que en η_{eff} (N·s/m) no se observa. Imágenes de fase obtenidas en AM-AFM [11], mostraron contraste en la misma región del virus indicando que el origen de la misma debía estar en la diferencia de las propiedades físicas. Un perfil realizado de forma simultánea en la imagen de topografía y en los mapas cuantitativos de las propiedades del material, muestran que k_{eff} es mayor en la zona de la cápsida vírica que en el collar y el conector, mientras que F_{adh} y η_{eff} permanecen constantes (figura 5.6).

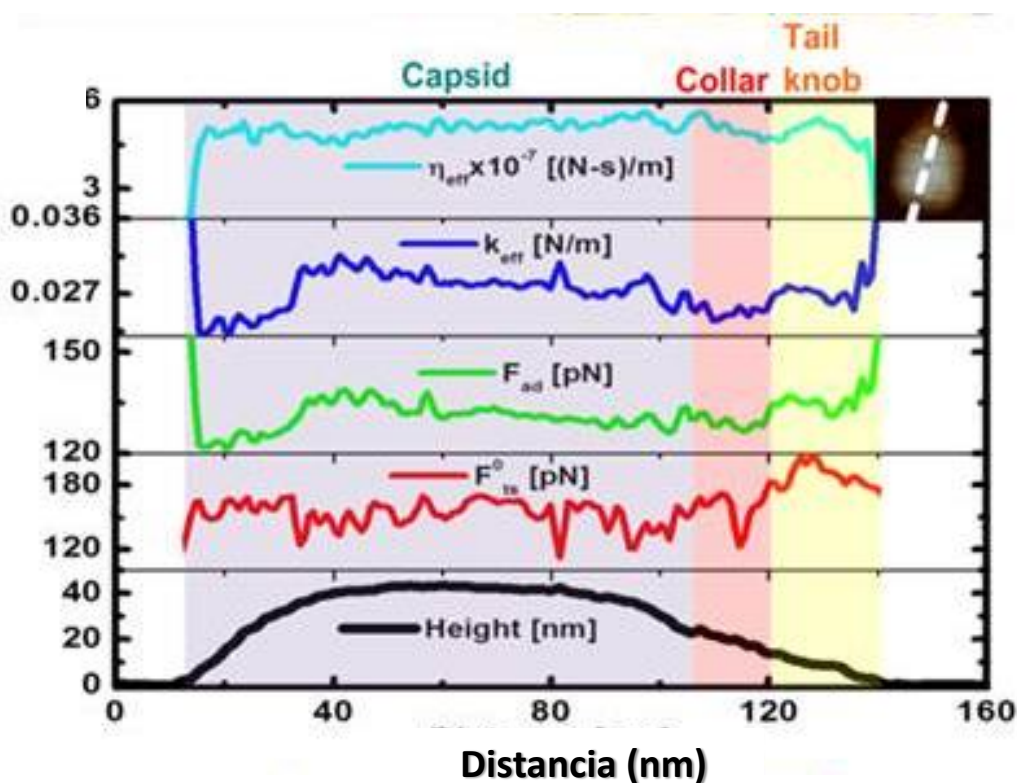


Figura 5.6: Comparación de los perfiles longitudinales realizados de manera simultánea a lo largo de la imagen de topografía (negro), y los mapas locales de propiedades físicas η_{eff} (azul claro), k_{eff} (azul oscuro), F_{adh} (verde) y F_{ts}^0 (rojo). El perfil sobre k_{eff} muestra un alto contraste a lo largo de las diferentes estructuras del virus, mientras F_{adh} y η_{eff} permanecen prácticamente constantes.

5.3. Comparación entre el método multi-armónico 0+1+2 y método estático

Los métodos convencionales utilizados para obtener propiedades físicas y químicas como son la constante elástica (k) y la fuerza de adhesión (F_{adh}) en partículas víricas se han basado en la realización de curvas F vs. I . En estas curvas la indentaciones varían entre 4-8nm sobre la partícula vírica, llegando a alcanzar fuerzas cercanas a 1nN [1, 3, 29]. Los valores de constante elástica k de estas partículas son extraídos a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva F vs. I realizada en la parte superior de las mismas. En el capítulo 2 se muestra que el bacteriófago $\phi 29$ se caracteriza por una constante elástica de $k = 0.33 \pm 0.05$ N/m para un rango de fuerzas superiores a 400 pN. Para estas fuerzas es evidente que la punta se encuentra en contacto mecánico con la muestra.

Como se mostró en la figura 5.4b en una rango de fuerzas por debajo de 200pN, óptimo para el modo de medida AM-AFM, las curvas F vs. D muestran un régimen repulsivo, y por tanto, las propiedades físicas son definidas por un gradiente de fuerza efectivo k_{eff} , una viscosidad efectiva η_{eff} y por la fuerza de adhesión F_{adh} .

Los valores estimados a partir de los mapas locales cuantitativos, k_{eff} , F_{adh} , y η_{eff} , obtenidos usando la teoría de multi-armónicos parecen ser más bajos que los valores extraídos usando métodos cuasi estático clásicos (curvas F vs. I). Para validar estos mapas cuantitativos, se realizó un estudio comparativo entre ambos métodos (curvas estáticas y teoría multi-armónicos 0+1+2). Así, se realizaron curvas F vs. I cuasi-estáticas sobre múltiples viriones y el sustrato.

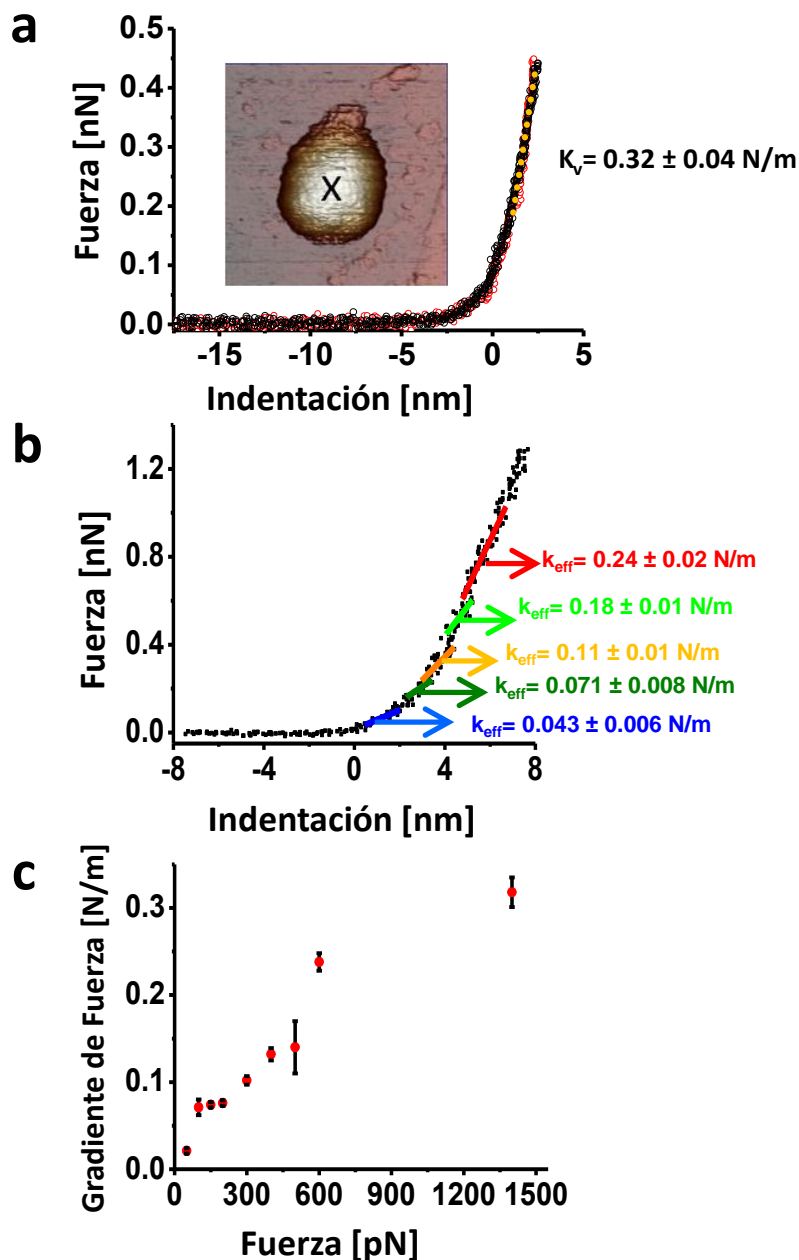


Figura 5.7: Curvas de indentación y gradiente de fuerza a) Curva F vs. I realizada sobre un virión de $\phi 29$. El ajuste lineal realizado para fuerzas superiores a 200pN (línea punteada naranja), muestra que el valor de la constante elástica es $0.32 \pm 0.04 \text{ N/m}$. b) Ajuste lineal en diferentes regiones de la misma curva (a), demostrando que el valor k_{eff} depende de la fuerza máxima aplicada. c) Representación de valores de los gradientes de la fuerza k_{eff} como función de la fuerza aplicada. Los puntos corresponden a media \pm desviación estándar de cinco medidas realizadas en el mismo punto del virus.

La figura 5.7a muestra una curva F vs. l sobre una de las partículas de la cual fueron extraídos los mapas locales. Se puede observar que, para fuerzas superiores a 500 pN el valor de la constante elástica corresponde al obtenido en estudios anteriores (capítulo 2). Teniendo en cuenta la ecuación 5.8, se puede decir **que para fuerzas > 500pN, k_{DLVO} es mucho más grande que $k_{elastic}$ y por tanto $k_{eff} \approx k$. En cambio para fuerzas inferiores a 200 pN, $k_{eff} \approx k_{DLVO}$. Es decir, el valor del gradiente de fuerza, k_{eff} depende de la magnitud máxima de la fuerza aplicada, siendo más pequeño para indentaciones cortas y asintótico a k para indentaciones grandes (figura 5.7b-c).**

El análisis de las curvas se limitó a valores de fuerza de ≤ 200 pN (fuerza máxima aplicada en AM-AFM) tanto en los virus como en el sustrato (HOPG). De las curvas mostradas en la figura 5.8b-c, se obtuvieron valores de $k_{eff} = 0.026$ N/m para el virión y $k_{eff} = 0.11$ N/m y $F_{adh} = 251$ pN para HOPG.

Un histograma de la distribución de los valores de k_{eff} sobre el virion y de F_{adh} sobre sustrato (HOPG), obtenidos de los mapas locales de propiedades del material, nos proporciona el valor medio para cada una de las magnitudes (figura 5.8d-e).

Una comparación de los dos métodos se muestra en la figura 5.8f-g. En esta comparación se observa que los valores medios obtenidos a partir de los histogramas de **los mapas locales de k_{eff} y F_{adh} coinciden, dentro de un margen razonable (10%), con los obtenidos por métodos estáticos** para los mismos valores de fuerza (≤ 200 pN). Del mismo modo, la figura 5.9, muestra un ejemplo realizado en tres virus de manera simultánea.

Se confirma, por tanto, la potencia de teoría de multi-armónicos 0+1+2 para obtener mapas cuantitativos locales de propiedades de los materiales.

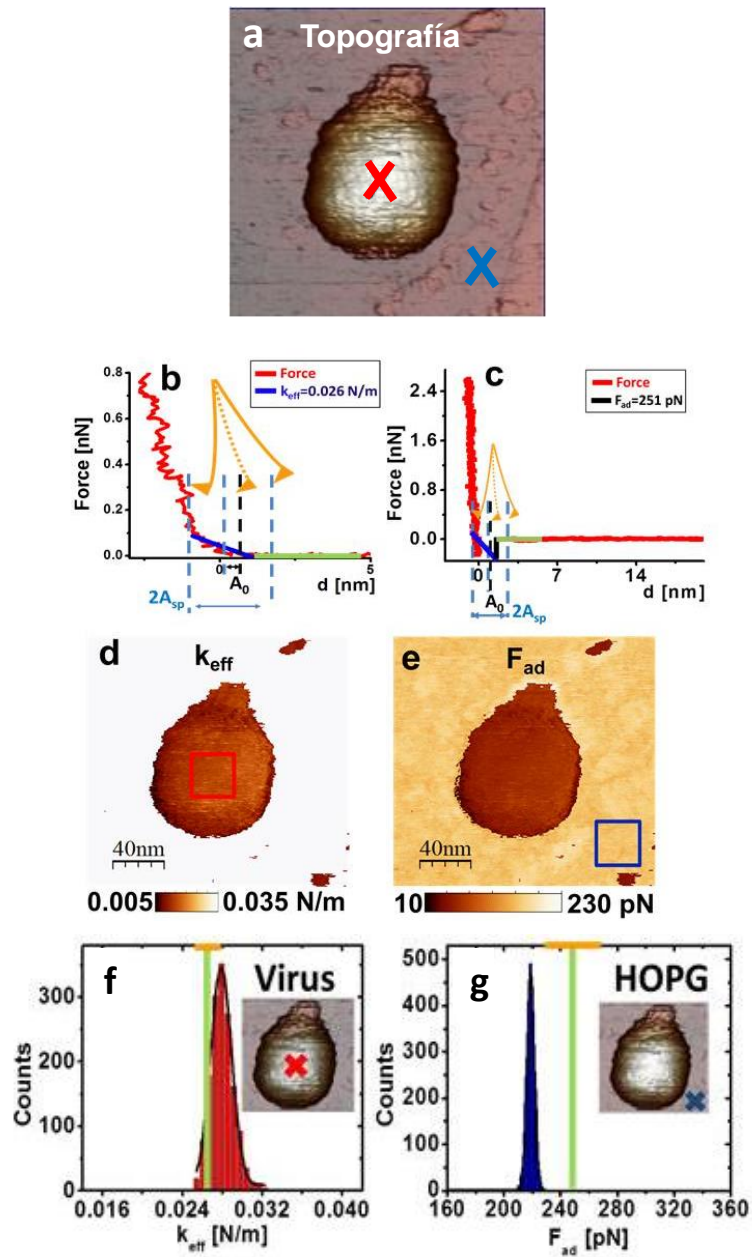


Figura 5.8: Comparación entre método los multi-armónico 0+1+2 y estático. a) Imagen de topografía 3D del bacteriófago $\phi 29$. b) y c) Curva cuasi-estática F vs. D realizada en la parte superior de un virus y sobre HOPG, respectivamente (cruces rojas en (a)). d) y e) Mapas locales de k_{eff} y F_{adh} obtenidas a partir de los observables de los multi-armónicos (A_0 , A_1 , A_2 , ϕ_1 y ϕ_2) y aplicando teoría los de multi-armónicos 0+1+2. f) y g) Histograma de valores que toman los mapas de propiedades en la región marcada (cuadrado) y el valor correspondiente de la curva estática realizada (línea verde) en las mismas zonas (cruces).

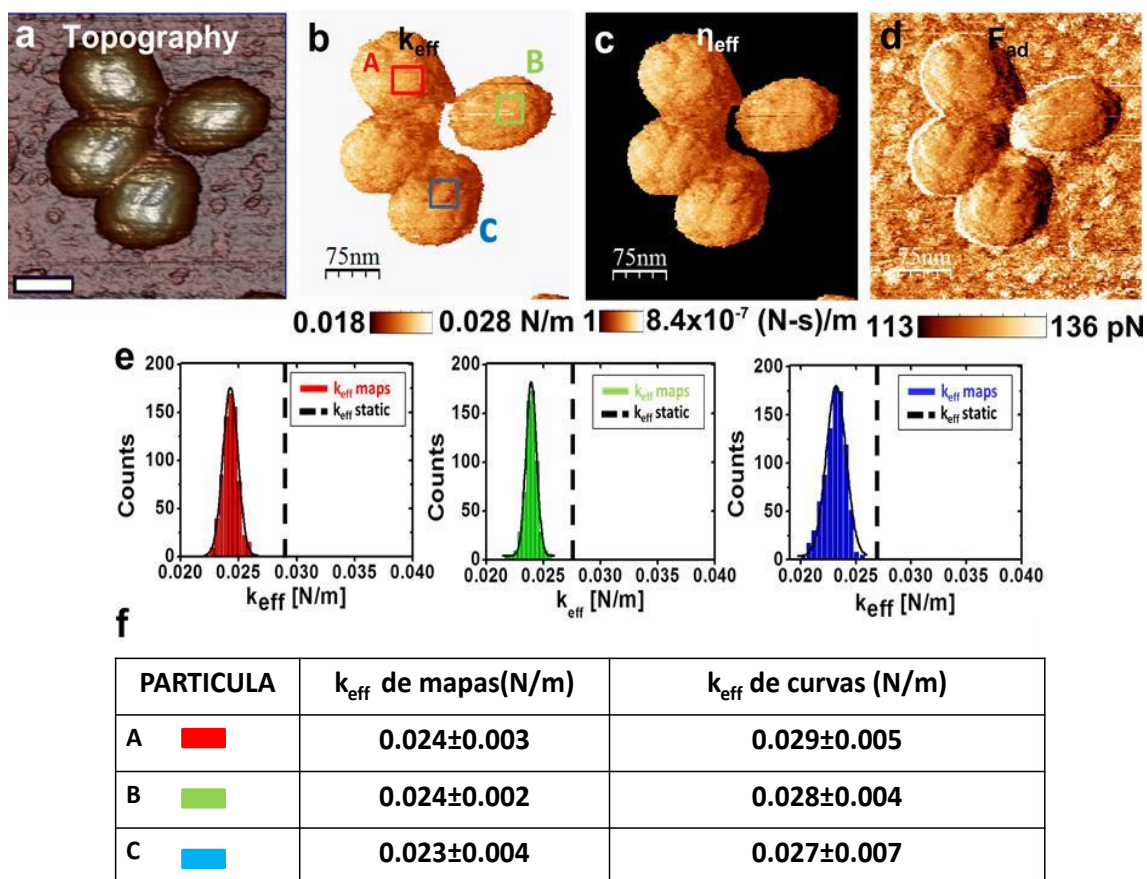


Figura 5.9: Método multi-armónico y estático en virus. Se muestra una comparación de ambos métodos realizada de manera simultánea en tres virus A, B y C (b). a) Imagen de topografía 3D de tres virus adsorbidos en HOPG. b), c) y d) mapas de k_{eff} , η_{eff} y F_{adh} obtenidos a partir de los observables de los multi-armónicos (A_0 , A_1 , A_2 , ϕ_1 y ϕ_2) utilizando la teoría de multi-armónicos 0+1+2. e) Histograma de la distribución de valores obtenidos de k_{eff} sobre los diferentes virus. La línea negra discontinua marca el valor de k_{eff} obtenido a partir de curvas cuasi-estáticas. f) tabla con un resumen de los valores obtenidos con cada uno de los métodos y para cada partícula A, B y C.

5.4. Rupturas de la cápsida del bacteriófago $\phi 29$

Como ya se ha descrito, el método multi-armónico 0+1+2 es capaz de proporcionar mapas locales de propiedades físicas del bacteriófago $\phi 29$ con alta resolución. Se ha detectado que el virión $\phi 29$ presenta anisotropía en las propiedades de las principales estructuras proteicas que lo componen (cápsida, conector y cola) revelando diferencias sus propiedades físicas, como se mostró anteriormente en las precabezas de $\phi 29$ [30].

En los últimos años la mayoría de los estudios realizados sobre virus se han focalizado en comprender la relación que existe entre propiedades físicas del material (elasticidad, dureza, estabilidad mecánica, densidad de carga, viscosidad), con su estructura (unidades morfológicas, interacción entre capsómeros, estructuras proteicas complejas) y su función (ensamblado/desensamblado de las cápsidas, infección, maduración).

Durante el ciclo viral, tiene lugar el ensamblaje y des-ensamblaje de cápsidas víricas. Conocer la cinética de estos procesos resulta relevante para entender cómo desempeñan cada una de las funciones que realiza a lo largo de este ciclo. El AFM ha demostrado ser una potente herramienta para los estudios de la dinámica de des-ensamblaje de la cápsidas víricas [4, 31]. Sin embargo, estudios recientes no han proporcionado información sobre los posibles cambios en las propiedades del material de la estructura durante este proceso. La información que proporcionaron no va más allá de los cambios en respuesta mecánica.

Por ello se propuso estudiar los posibles cambios en las propiedades físicas producidos por daños en la estructura de los virones de $\phi 29$. Para ello se obtuvieron mapas de las propiedades k_{eff} , F_{adh} , η_{eff} y F_{ts}^0 , antes y después de la fractura local de la cápsida. Para producir dichos daños se realizaron nanoindentaciones. La fuerza aplicada en cada curva fue lo suficientemente alta para producir la ruptura de la cápsida (≥ 800 pN).

La figura 5.10 muestra una comparación entre los mapas de propiedades locales del material antes y después de la ruptura en la cápsida. Perfiles simultáneos realizados a lo largo de la estructura en la imagen de topografía (líneas #1, negra y línea #2, roja, en la figura 5.10a) indican que la partícula dañada pierde altura de forma generalizada, siendo esta pérdida más pronunciada en la región donde han sido retirados algunos capsómeros [30]. Además se observa que, los cambios en contraste en los mapas de las propiedades físicas no están correlacionados con los daños visibles en las imágenes de topografía revelando la potencia de la técnica.

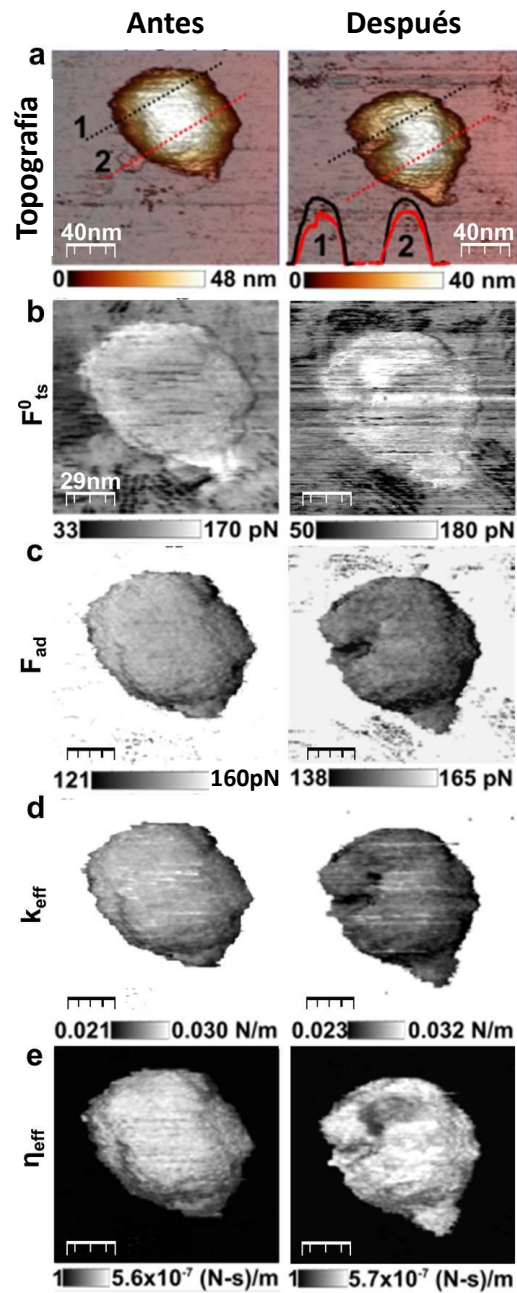


Figura 5.10: Influencia de una fractura en las propiedades físicas de la estructura del bacteriófago $\phi 29$: a) Imagen de topografía de AFM de un virión de $\phi 29$ antes y después de la ruptura producida por una nanoindentación de 800 pN. Insertados en la imagen se muestran dos perfiles: (negro y rojo, antes y después de la ruptura, respectivamente) realizados a lo largo de la línea #1 (negra) y línea #2 (roja). b) mapas cualitativos de la fuerza normal, F_{ts}^0 (pN). c) La fuerza de adhesión F_{adh} (pN). d) El gradiente de fuerza efectivo k_{eff} (N/m) y e) La viscosidad intrínseca efectiva η_{eff} (N·s/m).

Para entender la información que estos mapas nos estaban mostrando, se decidió realizar un análisis más completo. Para cuantificar y evaluar cambios, se extrajeron los mapas diferencia de las propiedades k_{eff} , F_{adh} , η_{eff} , y de la topografía. Los mapas diferencia se obtienen mediante la resta de mapas obtenidos justo antes e inmediatamente después de la ruptura. Estudios anteriores mostraron que, la forma y el tamaño de daños producidos en estas estructuras proteicas están limitados por las líneas de ruptura. Las líneas de ruptura transcurren dentro las unidades morfológicas (hexámeros y pentámeros) [31] y bordean las unidades estructurales de la cápsida (trímeros) [30] (figura 5.11). Por ello se superpuso la red de proteínas del bacteriófago $\phi 29$ sobre los mapas diferencias obtenidos (figura 5.12).

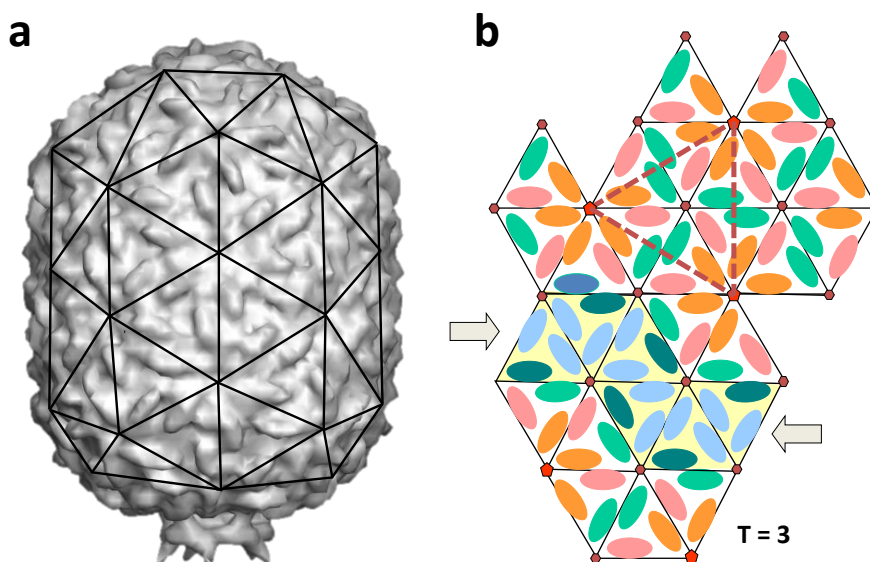


Figura 5.11: Líneas de ruptura de la cápsida del bacteriófago $\phi 29$. a) Superposición de red hexagonal sobre la imagen de cryo-EM del bacteriófago $\phi 29$ indicando las líneas de ruptura de la estructura de la cápsida. b) red hexagonal de las proteínas del bacteriófago $\phi 29$. La línea punteada roja indica los vectores de la celda unidad de la estructura de la cápsida. Se observa que las líneas de ruptura transcurren bordeando los trímeros de proteínas [30].

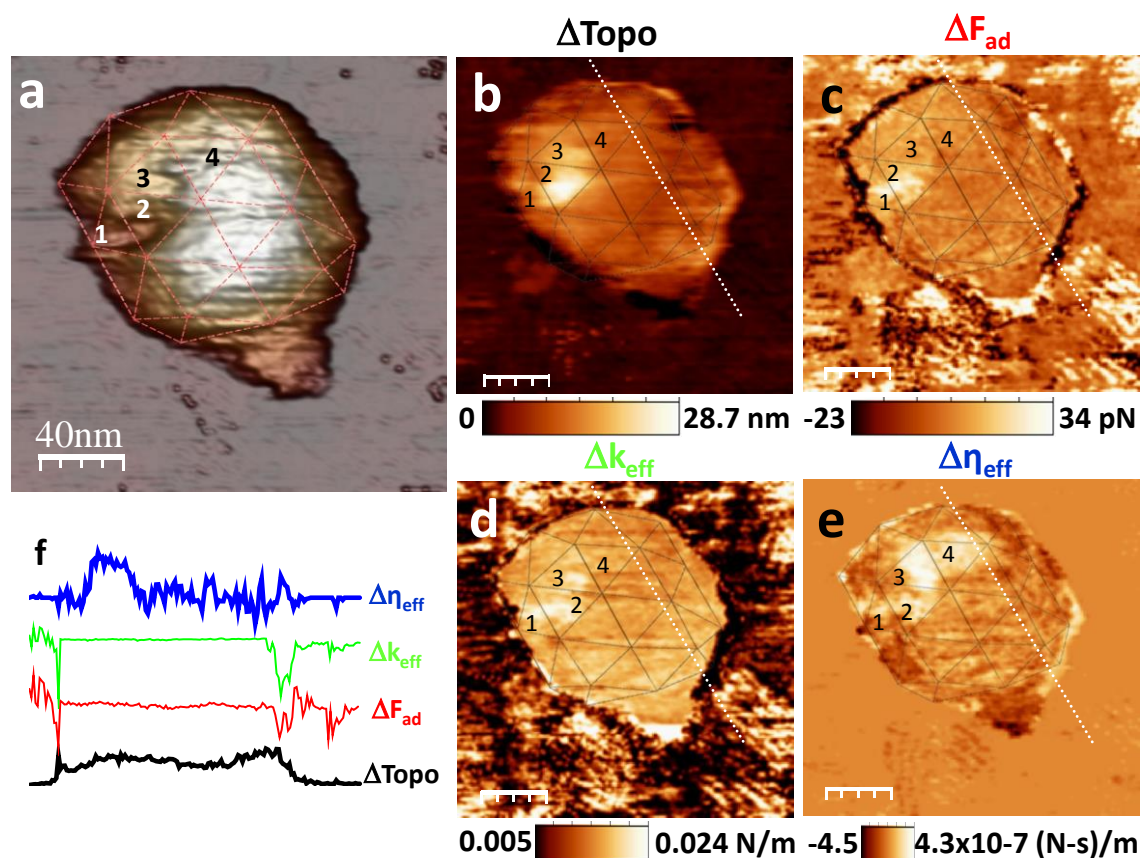


Figura .12: Cambios en los mapas de propiedades de material producidos por un daño estructural. a) Imagen de topografía 3D de un virión de $\phi 29$ que muestra una fractura en la estructura de la cápsida debido a una nanoindentación. Se ha superpuesto la red de capsómeros (línea roja punteada) que componen la estructura, donde cuatro trímeros han sido marcados 1, 2, 3 y 4. b) Diferencia en topografía antes y después del daño. Se observa un gran cambio alrededor de los trímeros 1 y 2 c-e) muestran los mapas diferencia de las propiedades de material F_{adh} (pN), k_{eff} (N/m) y η_{eff} (N·s/m) respectivamente. f) Perfiles realizados a lo largo del virus (línea blanca punteada de (b)) sobre las imágenes de diferencia en topografía y los mapas de propiedades físicas.

La superposición de la red hexagonal del bacteriófago $\phi 29$ sobre las imágenes diferencia de topografía (figura 5.12b) muestra claramente que la zona fracturada se localiza en los trímeros 1, 2 y 3. Se produce la eliminación del trímero 1 y del trímero 2 y una pérdida de volumen la cápsida, ya que la altura después de la fractura ha

disminuido. La disminución del volumen puede asociarse a la pérdida de parte del material genético empaquetado en el interior.

Los mapas de ΔF_{adh} y Δk_{eff} (figuras 5.12d y e, respectivamente) muestran un decaimiento en valores cerca de los trímeros 1 y 2, mientras el valor en el trímero 3 se mantiene similar al del resto de la cápsida. Esto indica que las propiedades físicas no han cambiado por lo que se sugiere que el trímero 3 se ha hundido y no eliminado. El valor constante a lo largo de la cápsida es un $\approx 10\%$ inferior al valor obtenido cuando no se encuentra dañado.

El mapa de $\Delta \eta_{eff}$ (figura 5.12c) no se encuentra correlacionado con los mapas de ΔF_{adh} y Δk_{eff} . El trímero 4 sólo muestra contraste en $\Delta \eta_{eff}$ indicando un decaimiento en la viscosidad. La viscosidad estaría asociada a las capas de hidratación que rodean las proteínas de la cápsida y la interfaz proteína-ADN. Puesto que la cápsida no parece afectada en este trímero, la reducción en la viscosidad indicaría pérdida del material genético. La disminución en la constante elástica observada también es consistente con la hipótesis de que parte del material genético se ha liberado tras la fractura. En el capítulo 2 se observó que los viriones eran más duros que las cápsidas.

5.5. Resumen y conclusiones

A lo largo de este capítulo se ha presentado una nueva técnica aplicada a AM-AFM, la teoría multi-armónico 0+1+2, capaz de proporcionar mapas cuantitativos locales de propiedades físicas de virus, como son: el gradiente de la fuerza electromecánica k_{eff} , la fuerza de adhesión F_{adh} , y la viscosidad intrínseca η_{eff} . La teoría de multi-armónico 0+1+2 ha mostrado la no linealidad de las fuerzas de interacción entre la punta y el virus debida a la presencia de las fuerzas electrostáticas.

Debido al limitado rango de fuerzas que se puede aplicar usando AM-AFM en experimentos con partículas víricas del bacteriófago $\phi 29$ y, teniendo en cuenta las interacciones que se producen entre éstas y la punta, ha sido posible extraer mapas de propiedades físicas con alta resolución. Se ha resuelto no sólo los tres grandes complejos proteicos de la estructura del virus (cápsida, conector y cola); si no, la presencia de estructuras más pequeñas como son las cavidades formadas por las fibras acopladas en el conector. **Estos mapas de gradiente de la fuerza muestran anisotropía en propiedades mecánicas dentro de la estructura del virus.**

Una comparación entre el método multi-armónico 0+1+2 con los modos convencionales utilizados para caracterizar mecánicamente los virus (curvas estáticas) corroboran la validez del mismo. **Los valores obtenidos, dentro de su error, a partir de los mapas de propiedades de k_{eff} , y F_{adh} , reproducen los valores obtenidos a partir de curvas estáticas.** Además, esta nueva técnica proporciona mapas adicionales como son los mapas de la viscosidad intrínseca del material η_{eff} a diferencia de otras técnicas convencionales. Estos mapas, han servido para definir las áreas donde existe una interfaz proteína ADN.

La información contenida dentro de **los mapas realizados en experimentos sobre partículas parcialmente dañadas ha proporcionado evidencias de presión interna** dentro del fago $\phi 29$, siendo esta hipótesis consistente con los resultados que se mostraron en el capítulo 2.

5.6. Referencias

1. Carrasco, C., et al., DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,103 (37): p. 13706-13711,(2006).
2. Hernando-Pérez, M., et al., Direct Measurement of Phage phi29 Stiffness Provides Evidence of Internal Pressure. *Small*,8 (15): p. 2365,(2012).
3. Roos, W.H., et al., Mechanics of bacteriophage maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,109 (7): p. 2342-2347,(2012).
4. Ortega-Esteban, A., et al., Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Scientific Reports*,3(1434):p.1-7,(2013).
5. Ivanovska, I.L., et al., Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101 (20): p. 7600-7605,(2004).
6. de Pablo, P.J., et al., Jumping mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters*,73 (22): p. 3300-3302,(1998).
7. Ortega-Esteban, A., et al., Minimizing tip-sample forces in jumping mode atomic force microscopy in liquid. *Ultramicroscopy*,114 (0): p. 56-61,(2012).
8. Sotres, J. and A.M. Baro, DNA molecules resolved by electrical double layer force spectroscopy imaging. *Applied Physics Letters*,93 (10): p. 103903-1,(2008).
9. Rico, F., C.M. Su, and S. Scheuring, Mechanical Mapping of Single Membrane Proteins at Submolecular Resolution. *Nano Letters*,11 (9): p. 3983-3986,(2011).
10. A. Berquand, Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy. *Bruker Application Note*,#135 2011).
11. Melcher, J., et al., Origins of phase contrast in the atomic force microscope in liquids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,106 (33): p. 13655-13660,(2009).

12. Martinez-Martin, D., et al., Resolving Structure and Mechanical Properties at the Nanoscale of Viruses with Frequency Modulation Atomic Force Microscopy. *PLoS One*,7 (1): p. 0030204,(2012).
13. Herruzo, E.T., et al., Three-dimensional quantitative force maps in liquid with 10 piconewton, angstrom and sub-minute resolutions. *Nanoscale*,5 (7): p. 2678-2685,(2013).
14. Hutter, J.L. and J. Bechhoefer, Calibration of Atomic-Force Microscope Tips (Vol 64, Pg 1868, 1993). *Review of Scientific Instruments*,64 (11): p. 3342-3342,(1993).
15. Herruzo, E.T., DESARROLLO DE LA MICROSCOPIA DE FUERZAS BIMODAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROPIEDADES NANOMECAÑICAS. Tesis Doctoral,(2011).
16. Raman, A., et al., Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology*,6 (12): p. 809-814,(2011).
17. Cartagena, A., et al., Mapping in vitro local material properties of intact and disrupted virions at high resolution using multi-harmonic atomic force microscopy *Nanoscale*,5 (11): p. 4729-4736,(2013).
18. Xu, X., et al., Unmasking imaging forces on soft biological samples in liquids when using dynamic atomic force microscopy: A case study on viral capsids. *Biophysical Journal*,95 (5): p. 2520-2528,(2008).
19. Tang, J.H., et al., DNA poised for release in bacteriophage phi 29. *Structure*,16 (6): p. 935-943,(2008).
20. Isralachvili.J, *Intermolecular and surface force*. 2011).
21. Evilevitch, A., et al., Effects of Salts on Internal DNA Pressure and Mechanical Properties of Phage Capsids. *Journal of Molecular Biology*,405 (1): p. 18-23,(2011).
22. Evilevitch, A., et al., Effects of salt concentrations and bending energy on the extent of ejection of phage genomes. *Biophysical Journal*,94 (3): p. 1110-1120,(2008).

23. de la Torre, J.G., M.L. Huertas, and B. Carrasco, Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophysical Journal*,78 (2): p. 719-730,(2000).
24. Harding, S.E., The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*,68 (2-3): p. 207-262,(1997).
25. Zipper, P. and H. Durchschlag, Modelling of bacteriophage capsids and free nucleic acids. *Journal of Applied Crystallography*,40: p. S153-S158,(2007).
26. Tao, Y.Z., et al., Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. *Cell*,95 (3): p. 431-437,(1998).
27. Xiang, Y., et al., Structural changes of bacteriophage phi 29 upon DNA packaging and release. *EMBO Journal*,25 (21): p. 5229-5239,(2006).
28. Carrasco, C., et al., Built-In Mechanical Stress in Viral Shells. *Biophysical Journal*,100 (4): p. 1100-1108,(2011).
29. Michel, J.P., et al., Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,103 (16): p. 6184-6189,(2006).
30. Ivanovska, I.L., et al., Discrete fracture patterns of virus shells reveal mechanical building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,108 (31): p. 12611-12616,(2011).
31. Castellanos, M., et al., Mechanical Disassembly of Single Virus Particles Reveals Kinetic Intermediates Predicted by Theory. *Biophysical Journal*,102 (11): p. 2615-2624,(2012).

CAPÍTULO 6:

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

A continuación se exponen principales conclusiones de esta tesis.

En primer lugar se ha demostrado que el uso del microscopio de fuerzas atómicas (AFM) como herramienta para el estudio y la caracterización de las propiedades mecánicas de los virus nos proporciona información complementaria a la obtenida mediante otras técnicas. El AFM no sólo permite la caracterización topográfica de los virus, sino que además proporciona información relevante acerca de sus propiedades mecánicas como pueden ser la elasticidad, la fragilidad, la estabilidad mecánica o la presión interna.

En esta tesis se han caracterizado los cambios morfológicos y mecánicos producidos en las estructuras de tres sistemas fagos ($\phi 29$, T7 y λ) en las distintas etapas de su ciclo viral. La comparativa entre los sistemas estudiados demuestra que las propiedades mecánicas y la estabilidad que adquieren las cápsidas virales dependen de la ruta de maduración y, concretamente, del proceso de estabilización de las mismas.

Por otro lado, se ha demostrado que la constante elástica y el módulo de Young no siempre pueden considerarse como las magnitudes físicas adecuadas para caracterizar la estabilidad de las partículas víricas de estos fagos, siendo los experimentos de fatiga mecánica los que proporcionan esta información. Además, las simulaciones FEM y la teoría de la elasticidad de medios continuos, comúnmente utilizadas en el estudio de la respuesta mecánica de virus, no siempre reproducen los comportamientos observados experimentalmente. Por el contrario, las simulaciones que tiene en cuenta la naturaleza discreta de estas cubiertas proteicas basadas en el modelo de CGM, por lo general reflejan de manera correcta este comportamiento.

A continuación se expone de forma más detallada las conclusiones extraídas para cada uno de los tres fagos estudiados: $\phi 29$, T7 y λ .

Caracterización del bacteriófago ϕ 29.

Se realizaron experimentos de nanoindentación de las partículas víricas que aparecen en el ciclo biológico: precabeza, cápsida y virion. De estos experimentos se deduce que:

1. La precabeza del bacteriófago ϕ 29 muestra anisotropía en la respuesta elástica de su estructura. La parte cilíndrica de las precabezas posee una constante elástica mayor que la parte esférica.

2. Las Simulaciones de FEM y la teoría de la elasticidad de medios continuos predicen una tendencia en la respuesta elástica diferente a la observada experimentalmente. La parte esférica de la estructura ha de ser más dura que la cilíndrica.

3. El desacuerdo entre experimento y la teoría puede justificarse por la existencia de *pre-stress* en la estructura, cuyo origen proviene de la forma en que se ensamblaron las proteínas que la componen, provocando una distribución de *stress* lateral en la estructura como ha sido observado en algunos virus icosaédricos y estructuras como furelenos y nanotubos de carbono.

4. Los resultados de las simulaciones basadas en modelos discretos como CGM indican que los hexámeros situados en la parte ecuatorial del esfero-cilindro soportan 2.6 veces más de *stress* lateral que los pentámeros situados en la región esférica. La relación entre el *stress* residual en la zona cilíndrica y la esférica es aproximadamente 1.5, consistente con la tendencia observada en los experimentos.

5. Los valores de constante elástica obtenidos para las cápsidas indican que en el proceso de maduración del bacteriófago ϕ 29 no se produce un aumento en la rigidez de la estructura de la cápsida. Precabezas y cápsidas poseen la misma constante elástica.

6. Por el contrario se ha observado que el virión presenta un aumento en la constante elástica cuando se compara con la precabeza. Se concluye que este aumento es producido por la presencia del ADN empaquetado en el interior.

7. Los resultados obtenidos de los experimentos con espermidina³⁺ indican que esta poliamina reduce las interacciones electrostáticas entre las cadenas del ADN. En

presencia de espermidina³⁺ se observa una disminución en el valor la constante elástica del virión, siendo el valor alcanzado similar al de la precabeza. Por el contrario la constante elástica de las precabezas es inalterada. Además, este proceso es reversible.

8. Una interpretación electrostática de los resultados experimentales basada en el modelo de Purohit indica que la presión interna en el interior del virus es de aproximadamente 30 ± 12 atm.

9. Una interpretación puramente mecánica basada en simulaciones de FEM para un cápsida presurizado muestra que la diferencia en la respuesta elástica observada entre la precabeza y el virión del bacteriófago $\phi 29$ es debida a la existencia de una presión interna de 40 ± 20 atm.

10. Mediante experimentos de AFM se han podido medir de forma directa, por primera vez en un bacteriófago, la existencia de presión interna en el interior de un bacteriófago.

Caracterización del bacteriófago T7

El bacteriófago T7 desarrolla la vía de maduración más simple de todos virus. Por tanto se han investigado los cambios de estabilidad química y mecánica que se producen en la cápsida durante este proceso, en particular, las precabezas y las cápsidas.

1. De los experimentos de *stress* químicos con urea y GuHCl se deduce que, el proceso de maduración aumenta la estabilidad química de la estructura viral.

2. Los experimentos de nanoindentaciones realizados para caracterizar la respuesta elástica de las precabezas y las cápsidas muestran que ambas partículas presentan un comportamiento anisotrópico en la respuesta elástica en los diferentes ejes de simetría S5, S3 y S2. Además, no se observan cambios en la constante elástica durante el proceso de maduración. El hecho de que estas partículas presenten anisotropía en la respuesta elástica conllevaría a una anisotropía en el valor del módulo de Young, siendo esto inconsistente con las aproximaciones de la teoría de la elasticidad de medios

continuos. Esto indica que ni el módulo de Young ni la constante elástica son magnitudes físicas adecuadas para caracterizar la estabilidad de estas partículas víricas.

3. Las simulaciones de FEM no reproducen la anisotropía encontrada en la respuesta elástica de las precabezas y las cápsida de T7.

4. En las simulaciones del AFM virtual la cápsida de T7 es modelada usándolas aproximaciones de CGM. De este modo se ha tenido en cuenta la interacciones que se producen entre las unidades morfológicas (hexámeros y pentámeros). Los resultados de estas simulaciones indican que la cápsida de T7 presenta un comportamiento anisotrópico en la constante elástica y reproducen la tendencia encontrada en los experimentos AFM. Se deduce por tanto que la anisotropía en la respuesta elástica que posee la cápsida de T7, tiene su origen en la naturaleza discreta de su estructura.

5. Los experimentos de fatiga mecánica realizados con ciclos de carga indicaron que las cápsidas son más resistentes que las precabezas, ya que es necesario aplicar un número de ciclos de carga superior para producir una fractura en la estructura.

6. El análisis cuantitativo de las áreas y los volúmenes de las fracturas, inducidas en las estructuras durante los experimentos de fatiga mecánica, indica que los defectos son mucho más pequeños en las cápsidas que en las precabezas.

7. Se concluye que el proceso de maduración en el bacteriófago T7 aumenta la resistencia de su estructura cápsidas, puesto que es más difícil producir una fractura en las cápsidas que en las precabezas.

8. Los resultados obtenidos de los experimentos de *stress* químicos y de fatiga mecánica establecen una correlación fenomenológica entre fragilidad química y fragilidad.

Caracterización del bacteriófago λ

Para investigar cambios de estabilidad y elasticidad en el bacteriófago λ a lo largo del proceso de maduración, se han realizado experimentos de nanoindentaciones y de fatiga mecánica en las partículas víricas que aparecen en este proceso: procápsida,

cápsida expandida y cápsida decorada con proteína gpD. La proteína gpD desarrolla un papel importante en este proceso ya que su ausencia impide el empaquetamiento del material genético para formar una partícula infecciosa. Los resultados experimentales conducen a las siguientes conclusiones:

1. De los experimentos de nanoindentación se deduce que el proceso de expansión no se produce un aumento en la rigidez de cubierta proteica. Las cápsidas expandidas y las procápsidas presentan igual constante elástica. Se observa también que la fuerza necesaria para producir una fractura en las cápsidas expandidas es menor que para las procápsidas. Este mismo comportamiento fue observado durante la preparación de micrografías de TEM. Se deduce que el proceso de expansión aumenta la fragilidad de la estructura y por tanto la cápsida expandida es un estado intermedio no estable.

2. Por el contrario, la adición de proteína gpD produce un aumento tanto en la constante elástica de la cápsida como en la fuerza de fractura. Estudios realizados de caracterización mecánica en otros fagos como T7 y HK97, han mostrado que durante el proceso de maduración no hay cambios en la constante elástica de la cápsida. Por tanto el bacteriófago λ es el primer ejemplo de fago hasta el momento que aumenta la rigidez tras este proceso.

3. Los experimentos de fatiga mecánica mostraron que, es necesario aplicar un mayor número de ciclos de carga para producir un daño estructural en las cápsidas decoradas con proteína gpD. Se concluye que la adición de la proteína gpD aumenta la estabilidad de la estructura.

4. La adición de proteínas de “cemento” para aumentar la estabilidad de la cápsida vírica en los bacteriófagos parece ser el mecanismo más efectivo de los que se han observado, como *cross-linking*, aumento de áreas de contacto, o inserción de dominios.

Como hemos visto a lo largo del capítulo 5 el uso de la teoría de Multi-armónicos 0+1+2 promete ser una herramienta potente para la obtención de mapas a nivel local de propiedades de sistemas biológicos de tamaño nanométrico, como son los virus. De los experimentos realizados se concluye que:

1. La teoría multi-armónico 0+1+2, es capaz de proporcionar mapas cuantitativos locales con alta resolución de propiedades físicas de virus, como son: el gradiente de fuerza K_{eff} , la fuerza de adhesión F_{adh} , y la viscosidad intrínseca η_{eff} .
2. Estos mapas de gradiente de fuerza muestran anisotropía en propiedades mecánicas dentro de la estructura del virus.
3. Una comparación entre los valores extraídos a partir de los mapas adquiridos con el método multi-armónico 0+1+2 y los obtenidos por curvas estáticas indica que los valores obtenidos, dentro de su error, a partir de los mapas de propiedades de K_{eff} , y F_{adh} , reproducen los obtenidos a partir de curvas estáticas.
4. Los mapas de propiedades físicas obtenidos antes y después de la ruptura del bacteriófago $\phi 29$ proporcionan evidencias de presión interna dentro del fago.

APÉNDICE AI

Preparación de superficies y muestras

APÉNDICE I: PREPARACIÓN SUPERFICIES Y DE MUESTRAS

En la caracterización con Microscopía de Fuerzas Atómicas, especialmente en medio líquido, debemos tener en cuenta que tanto la preparación de las superficies como la de las muestras son fundamentales para poder desarrollar un experimento. Por ello, en este apéndice nos centraremos en estos dos procesos.

A.I.1. PREPARACIÓN DE SUPERFICIES

La condición fundamental para poder caracterizar una muestra mediante la Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM) es que debe estar depositada sobre una superficie o sustrato. La elección de la superficie no es trivial, ya que se requiere un conocimiento previo de la muestra. Hemos de tener en cuenta que una correcta adsorción conlleva interacciones entre la muestra y el sustrato. Las interacciones comúnmente observadas son: vdW (van der Waals), electrostáticas, hidrofílicas e hidrofóbicas. Dependiendo de la naturaleza, tanto de la muestra como del sustrato, pueden predominar unas u otras. En particular, a lo largo del desarrollo de esta tesis, hemos observado que las partículas víricas se adsorben a las superficies mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

Existe una amplia variedad de superficies que presentan propiedades diferentes. También hay numerosos agentes químicos que permiten modificar las propiedades de estas superficies tras un tratamiento.

A continuación se exponen tanto las superficies utilizadas como los protocolos de tratamiento de superficies utilizados durante los experimentos desarrollados a lo largo de esta tesis.

A.I.1.1 SUPERFICIES:

Dada su facilidad de adquisición, limpieza y manejo, se han utilizado tres sustratos diferentes: mica, vidrios y grafito.

A.I.1.1.1. Superficie de Mica.

Las superficies de mica están entre las más utilizadas en el estudio de muestras con el AFM. Las micas son minerales pertenecientes a un grupo numeroso de silicatos de alúmina, hierro, calcio, magnesio y minerales alcalinos. En esta tesis se ha utilizado mica moscovita, un aluminosilicato de potasio cuya fórmula idealizada es $K_2Al_4Al_2Si_6O_{20}(OH)_4$. La unidad básica de su estructura son dos láminas de aluminosilicato fuertemente unidas debido a interacciones entre grupos hidroxilo y átomos de aluminio. Estas láminas dobles tienen una carga neta negativa debido a la sustitución de un cuarto de los iones Si^{4+} de los silicatos por iones Al^{3+} . Las láminas dobles se organizan a su vez en una estructura superior que también es laminar, y que se mantienen unidas debido a la existencia de una capa de iones K^+ intercalada entre las láminas dobles de aluminosilicatos, como se muestra en la figura A.I.1.

Debido a esta débil interacción entre las láminas dobles, la mica moscovita resulta fácilmente exfoliable. Esto permite que la limpieza de la superficie utilizada como sustrato se pueda llevar a cabo mediante exfoliación con cinta adhesiva.

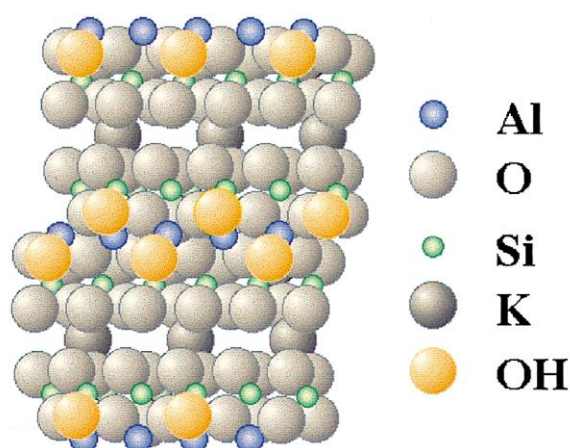


Figura A.I.1.: Estructura cristalina de a mica. Dibujo esquemático de la estructura cristalina de la mica. La unidad básica de su estructura son dos láminas de aluminosilicatos. [1]

A.I.1.1.2. Superficie de Vidrio.

El vidrio es un material inorgánico compuesto por una mezcla compleja de silicatos: un silicato alcalino y el silicato de una o más bases (calcio o plomo). El vidrio es un material duro, frágil, transparente y amorfo. Se obtiene a 1500⁰ C de la fusión de arena de sílice, carbonato sódico y caliza. Dada su naturaleza, la limpieza de los virios requiere ataque químico. Existen diversos protocolos de limpieza, pero en el laboratorio hemos utilizado el siguiente:

1. Inicialmente se prepara una disolución de 20 g. de KOH (potasa) en 50 mL de H₂O. Después añadimos 150 mL de etanol.
2. Los vidrios se colocan en un soporte de teflón, que los mantiene en posición vertical y separados unos de otro.
3. Se introducen en la disolución de KOH, agua y etanol durante cinco minutos, mientras se someterse a un proceso de sonicación.
4. Se lavan tres veces durante cinco minutos con agua destilada sonicando.
5. Para secarlos se introducen en un horno a 120 °C durante 20 minutos aproximadamente.

A.I.1.1.3. Superficie de Grafito.

El grafito es una de las formas alotrópicas en las que se puede presentar el carbono junto al diamante, los fullerenos, los nanotubos y el grafeno. En el grafito, los átomos de carbono presentan hibridación sp^2 y se disponen formando anillos hexagonales, dando lugar a láminas planas. Las distintas láminas se mantienen unidas por fuerza de Van der Waals. Estas fuerzas de atracción sólo son ligeramente superiores a las fuerzas de cohesión de los líquidos, de lo que resulta que la distancia entre láminas sea más del doble de la distancia de enlace entre átomos de carbono y que las láminas se encuentren ligeramente desplazadas, como se muestra en la figura A.I.2. Además, la estructura laminar hace que el grafito sea un material marcadamente anisótropo. Esto, al igual que para la mica moscovita, permite que la limpieza de la superficie utilizada como sustrato se pueda realizar con facilidad exfoliando con cinta adhesiva.

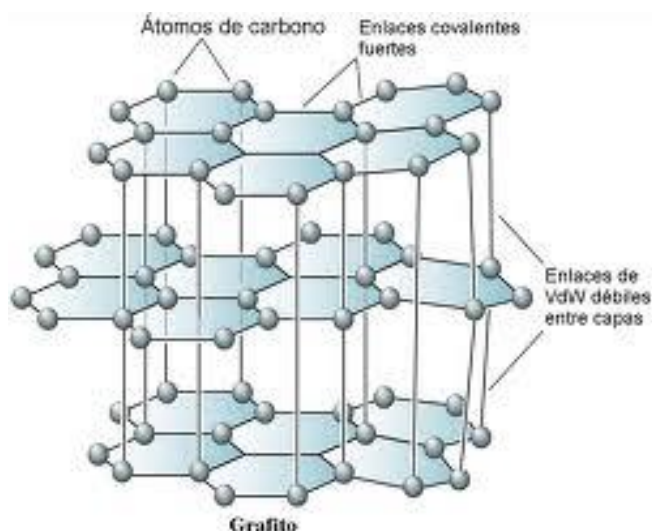


Figura A.I.2: Estructura cristalina del grafito. Dibujo esquemático de la estructura cristalina del grafito. Las esferas azules representan los átomos de carbono en la red hexagonal.

A.I.1.2. FUNCIONALIZACION DE LAS SUPERFICIES

Para modificar las características superficiales de los sustratos se utilizan comúnmente agentes de naturaleza química. En particular, de las tres superficies utilizadas como sustratos: mica, vidrio y grafito; es éste último el que no requiere ningún tratamiento químico para modificar sus propiedades. El grafito es un sustrato que presenta carácter hidrofóbico, por lo que es una superficie óptima para adsorber biomoléculas mediante interacciones hidrofóbicas. Dada la fácil limpieza de la cara externa (exfoliación), el grafito altamente orientado (HOPG, ZYA-NT-MDT) ha sido la superficie más usada durante el desarrollo de esta tesis.

A.I.1.2.1. Superficies tratadas con hexametildisilazano (HMDS).

El HMDS (Sigma Aldrich) es un compuesto basado en silicio cuya fórmula es $(\text{CH}_3)_3\text{-Si-NH-Si-(CH}_3)_3$. Este silano se utiliza generalmente para funcionalizar superficies que contienen silicio. Cuando los átomos de silicio del HMDS reaccionan con los del sustrato se produce una reacción que permite que los grupos metilos se sitúen sobre la superficie

del sustrato. Esto produce que éste adquiera carácter hidrofóbico [2] como se muestra en la figura A.I.3a.

Para realizar la funcionalización con HMDS, se utilizó el siguiente protocolo.

1. Una vez limpia la superficie de los sustratos, estos se colocan en el interior de una cubeta de vidrio sobre un soporte central, formado en nuestro caso por el apilamiento de cuatro portamuestras.

2. Después se deposita sobre el la cubeta 3-4 mL de HMDS, de manera que forme una capa líquida de espesor aproximado de 1 mm.

3. La cubeta de vidrio se cierra y sella durante 12 horas, tiempo necesario para que los vapores del HDMS actúen sobre la cara externa del sustrato.

AI.1.2.2. Superficies tratadas con 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS).

3-aminopropiltriethoxisilano (APTS, Sigma Aldrich) un compuesto basado en silicio cuya fórmula es $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{-Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$. Al igual que el HMDS, se utiliza para la funcionalización de superficies, aportándoles en este caso, no sólo carácter hidrofóbico, sino también cierta carga positiva debido a la protonación de los grupos aminos cuando se encuentran en disolución (NH_3^+) [3], como se muestra en la figura A.I.3b. El APTS se utiliza tanto para la funcionalización de mica como de vidrios.

Para realizar la funcionalización con APTS, se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se prepara una disolución en agua 0.1 % de APTS. Una vez limpios los sustratos se introducen en la disolución de APTS durante 15 minutos.

2. Después se lava una vez con isopropanol y dos veces con agua destilada.

3. Por último se seca la muestra con corriente de nitrógeno gas.

AI.1.2.3. Superficies tratadas iones divalentes: NiCl_2 , MgCl_2 o CaCl_2

La funcionalización con iones monovalentes o divalentes se realiza comúnmente en superficies como la mica. La capa más externa de la mica en aire es completamente neutra, pero cuando está inmersa en una disolución, los cationes K^+ se disocian dejando la superficie cargada negativamente. Disoluciones que contiene sales como NiCl_2 , MgCl_2 o

CaCl₂ disocian los aniones cloro (Cl⁻) y los cationes Ni⁺², Mg⁺² o Ca⁺². Estos cationes poseen un radio similar al del K, por lo que ocuparán su posición dejando la superficie de la mica cargada positivamente [1] [4] . La figura A.I.3c muestra un esquema de una partícula con carga negativa acercándose a la superficie de la mica en una disolución de estas sales.

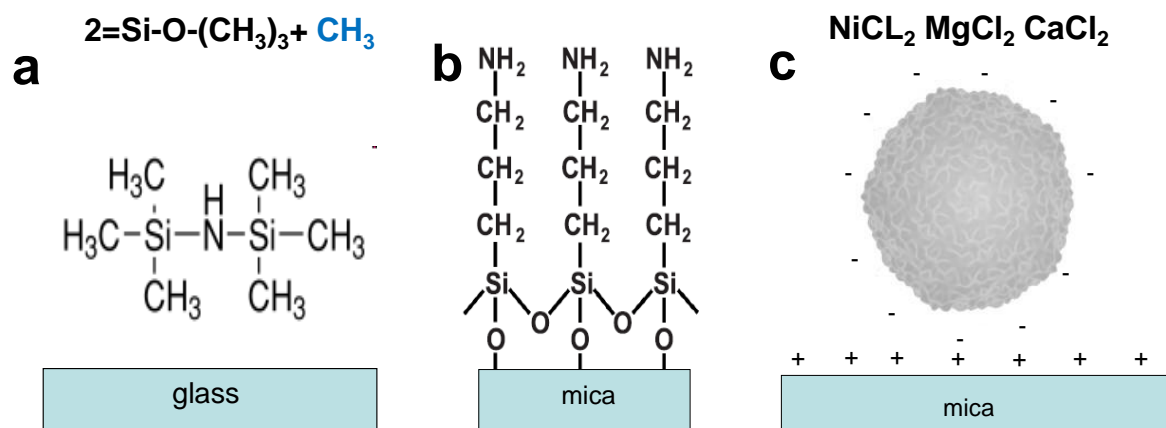


Figura A.I.3: Funcionalización de superficies. Esquema representativo de las funcionalizaciones realizadas. a) HMDS sobre vidrios, b) APTS sobre mica y c) mica en disolución de sales.

A.I.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos investigado tres bacteriófagos distintos: ϕ 29, T7 y λ . De cada uno de ellos hemos explorado partículas víricas que aparecen durante su ciclo biológico.

Como mencionamos anteriormente, la preparación de las muestras y de los sustratos es muy importante para poder desarrollar experimentos con Microscopía de Fuerzas Atómicas. Las muestras biológicas deben de estar limpias de cualquier partícula contaminante y poseer una concentración óptima. La calidad, el valores de pH, y la fuerza iónica deben ser controladas durante el proceso de muestreo. Por ello se han establecidos diferentes protocolos de purificación para cada virus. Tras la purificación todas las muestras fueron comprobadas mediante imágenes de microscopía electrónica. Las purificaciones fueron realizadas por los grupos de colaboración del profesor José

López Carrascosa (bacteriófagos $\phi 29$ y T7) y del profesor Carlos Enrique Calatano (bacteriófago λ).

A.I.2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA AFM.

El protocolo utilizado para la observación de partículas víricas no resulta muy diferente a los utilizados para la deposición de otras partículas almacenadas en disolución.

1. Un volumen de la disolución stock se diluye tanta veces sean requeridas para que la concentración de partículas depositadas en superficie sea la deseada. Todas las diluciones han de realizarse en la disolución salina (buffer o tampón) correspondiente.

2. Un volumen de 30 μL de la disolución de muestra se deposita sobre el sustrato.

3. Tras 20 minutos, la muestra se lava 5 veces con la disolución buffer correspondiente.

4. Durante el proceso de muestreo o desarrollo del experimento se ha de controlar el volumen de la disolución de muestra. En nuestro caso, para evitar pérdidas rápidas de volumen que puedan dar lugar a cambios notables en la concentración salina, se ha instalado un sistema de refrigeración en el AFM. Este sistema no sólo permite controlar la temperatura, para mantener las muestras en estado óptimo, sino que nos permite reducir la deriva térmica (*drift*). Generalmente, la temperatura durante el experimento se mantiene a 18-19⁰C.

Para los experimentos que requieren cambio de buffer, se ha diseñado un sistema de bombeo que permite introducir y retirar buffer a ritmo constante. Este sistema fue utilizado para la realización de los experimentos de caracterización de la respuesta elástica del bacteriófago $\phi 29$ en presencia y ausencia de esperimidina (SP).

La figura A.I.4 muestra un esquema del protocolo utilizado en la preparación de muestras de virus para la microscopía de fuerzas atómicas.

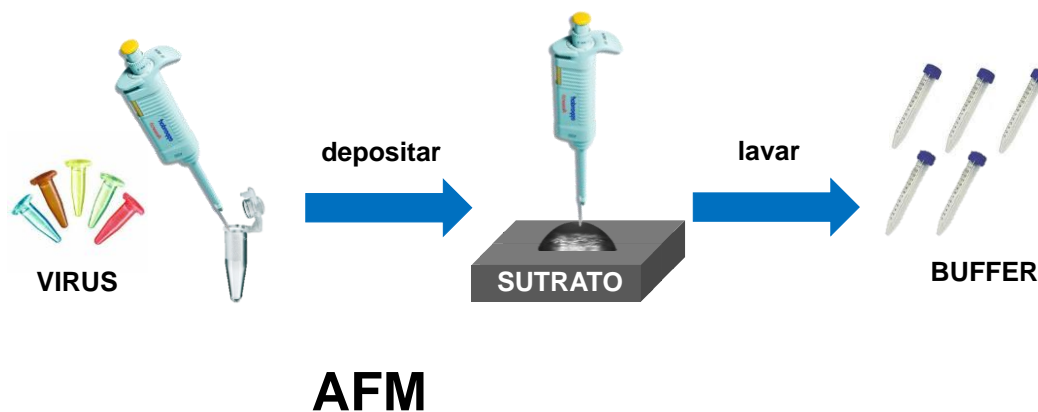


Figura A.I.4: Preparación de muestras para AFM. Esquema del protocolo a seguir en la preparación de muestra para AFM.

A.I.3. ELECCIÓN DE LAS SUPERFICIES.

Como hemos mencionado antes, la mayoría de los virus se adsorben al sustrato mediado principalmente por interacciones de tipo electrostáticas e hidrofóbicas. Por tanto conocer las propiedades químicas de las estructuras de las partículas víricas resulta importante para la elección del sustrato.

Bacteriófago ϕ 29

En los comienzos de esta tesis, las precabezas y los viriones del fago ϕ 29 fueron adsorbidos en superficies de vidrio funcionalizada con Hexamethydisilazane, siguiendo el protocolo descrito en el apartado AI.1.2.1. El tratamiento de vidrios con este silano nos proporciona un sustrato cuya superficie adquiera carácter hidrofóbico. Sobre esta superficie virus están bien adsorbidos y lo suficientemente anclados para la realización de experimentos de nanoindentación. Dado el tiempo empleado en la preparación de las superficies se decidió utilizar HOPG (figura AI.5). El grafito también ha sido usado como sustrato para adsorber proteínas en superficie [5, 6]. Al igual que los vidrios funcionalizados con HMDS, el grafito presenta carácter hidrófoco, Su manipulación como superficie es más sencilla que los vidrios-HMDS, dado que no necesita preparación (exfoliación). Durante el proyecto de master de Álvaro Ortega-Esteban, decidimos investigar los efectos que se producen en la estructura del fago debidos a la interacción con el sustrato. Una comparativa en los perfiles indica que los virus depositados en ambas superficies, vidrios-HMDS y grafito, se adsorben de igual. De los perfiles extraemos que La cápsida permanece paralela a la superficie (figura AI.5).

Para investigar nuevas superficies e interacciones se depositaron las partículas víricas sobre una superficie con carga electrostática. Para ellos se trató la mica con iones divalente, es decir, mica con $MgCl_2$ y $NiCl_2$. En este tipo de superficies pudimos observar que mientras las precabezas mantenían su integridad estructural, los viriones del bacteriófago ϕ 29 expulsan el ADN fuera de la cápsida (figura A.I.5). Además la forma en que los viriones eran adsorbidos discernía de lo observado en las superficies hidrofóbicas. Los perfiles topográficos indican que la cápsida forma un ángulo con la superficie (figura AI.5).

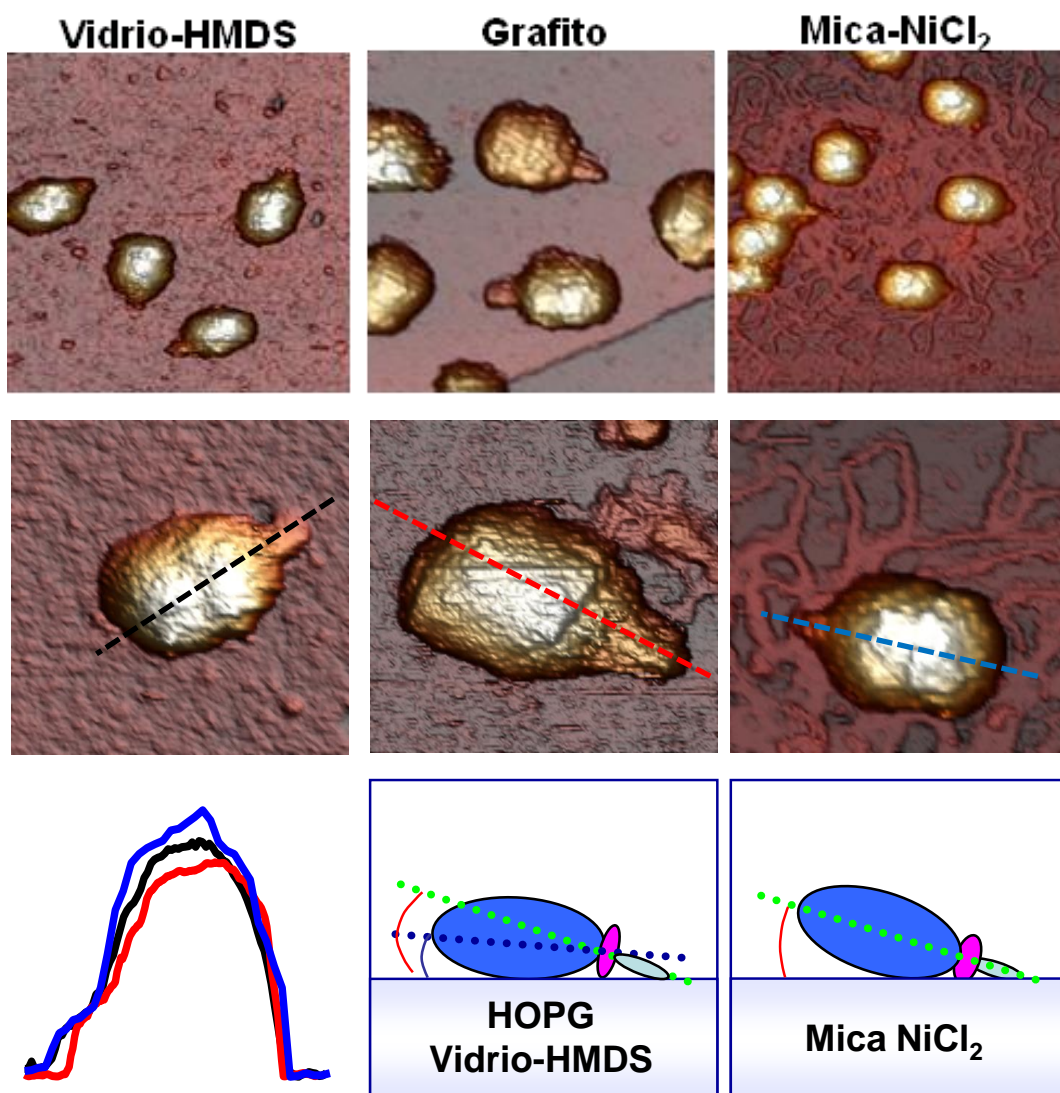


Figura AI.5: Adsorción bacteriófago $\phi 29$: Imágenes del bacteriófago $\phi 29$ depositado en diferentes superficies, vidrio-HMDS, grafito y mica- NiCl_2 . Los perfiles realizados sobre los virus adsorbido, muestran que en superficies hidrofóbicas como Vidrio-HMDS (negro) y HOPG (rojo) las cápsidas de los virus se depositan de forma paralelos a la superficie, mientras en mica (azul) la cápsida se deposita formando un ángulo con la horizontal.

Bacteriófago T7

El bacteriófago T7 presenta simetría icosaédrica, por lo que muestra diferentes geometrías de orientación ejes S5, S3 y S2.. Para la caracterización de la respuesta elástica en función de los ejes de simetría se necesitaba una superficie que permitiera la adsorción en las tres orientaciones. Al igual que para el bacteriófago ϕ 29, las superficies con carácter hidrofóbicas (vidrio-HMDS y grafito) permitían adsorber las partículas víricas, precabeza cápside y virón, sin alterar su estructura. Además en algunas de estas partículas se podría identificar la geometría de adsorción. Observamos también que los porcentajes de adsorción para cara cada simetría varía de una partícula a otra. Además estos porcentajes difieren de los que se esperaría en la adsorción de un icosaedro con misma probabilidad para todas las simetrías (12:20:30, para S5, S3 y S2 respectivamente). Esto indica que las diferentes simetrías de orientación de las partículas víricas interaccionan de forma diferente con el sustrato debido a que la distribución de las proteínas que forman la cápsida del virus varía a lo largo de los ejes de simetría (figura A1.7).

Se exploró también la superficie de la mica tratada con iones divalentes como sustrato. Los resultados mostraron que todas las cápsidas se adsorbían a lo largo del eje de simetría 5. Los virones de T7 al igual que se observó para el virión de ϕ 29, eyectan el ADN fuera de la cápsida (figura A1.6).

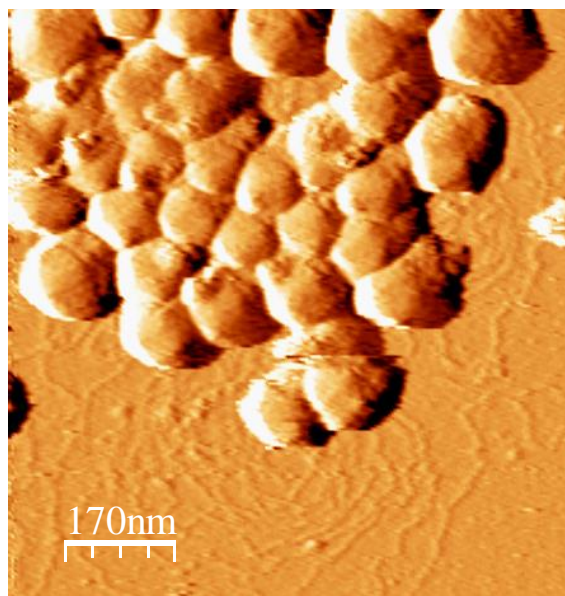


Figura AI.6: Adsorción del virión de T7 en mica-NiCl₂. Sobre esta superficie los viriones eyectan el DNA fuera de la cápsida.

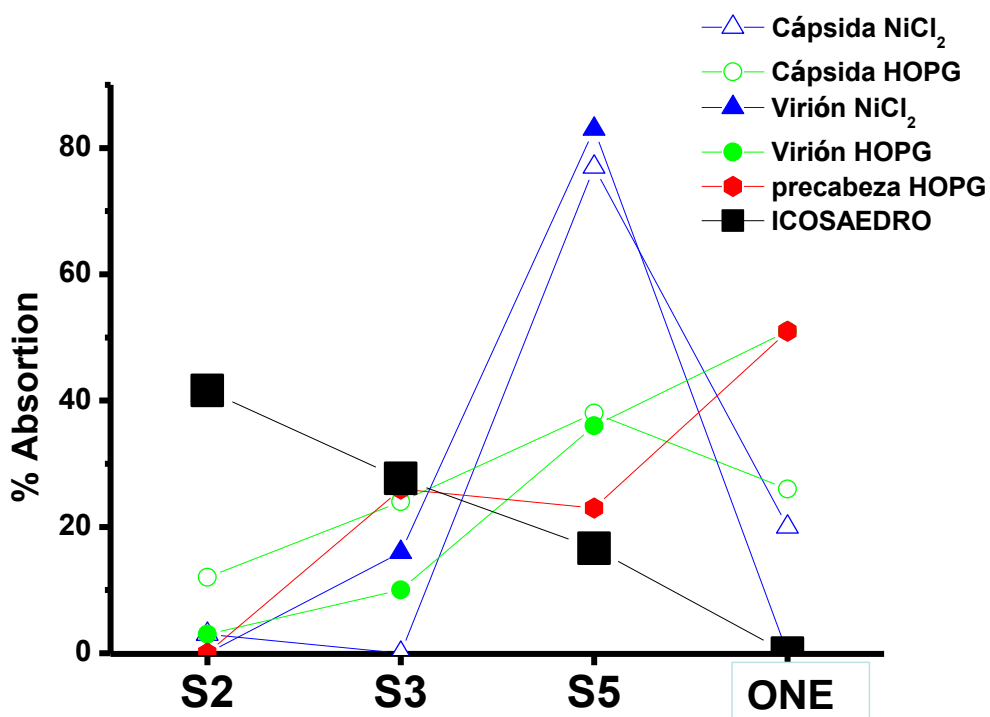


Figura AI.6: Adsorción del bacteriófago T7. Porcentajes de las diferentes simetrías de orientación en las cuales se adsorben las partículas víricas. Como podemos ver la superficie que nos permite observar todas las simetrías es el HOPG.

A.I.3. Referencias

1. Muller, D.J., Amrein, M. and Engel, A. *Adsorption of Biological Molecules to a Solid Support for Scanning Probe Microscopy*. JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, 1997. **119**: p. 172–188.
2. Gun'ko, V.M., et al., *Mechanism and Kinetics of Hexamethyldisilazane Reaction with a Fumed Silica Surface*. Journal of Colloid and Interface Science, 2000. **228**: p. 157–170.
3. Facci, P., et al., *Formation and characterization of protein monolayers on oxygen-exposing surfaces by multiple-step self-chemisorption* Surface Science 2008. **504**: p. 282–292.
4. Moreno-Herrero, F., J. Colchero, and A.M. Barlo, *DNA height in scanning force microscopy*. Ultramicroscopy, 2003. **96**: p. 167–174.
5. Truong, C., Mark, T. and Mc.Dermott, T., *Investigation of dual component protein films on graphite with scanning force microscopy*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **32**: p. 191/202.
6. Gromer, A., et al., *Interfacial Structure of Sugar Beet Pectin Studied by Atomic Force Microscopy*. Langmuir, 2009. **25**(14): p. 8012–8018.

ABREVIATURAS

Core: núcleo.

cross-linking: formación de enlace covalentes entre subunidades proteicas

Stress: tensión, fuerza.

Bending: deformación ó flexión.

Streching: estiramiento.

Scaffold protein: o proteína de andamiaje.

Técnicas de *Bulk*: o técnicas de volumen.

Feedback: realimentación.

Pushing: empujar.

Pulling: tirar.

Thin Shell: cascara delgada.

Thick Shell: cáscara gruesa.

Cantilever: micropalanca.

***et al.*:** es una locución latina que significa literalmente .y otros.

***vs.*:** *versus*. Preposición (contra, frente a).

HOPG: High Orientated Pirilotic Graphite o grafito pirolítico altamente orientado.

Esfero-cilindro: estructura con forma de cilindro y extremos semiesféricos.

Tendida: en posición horizontal.

Vertical: en posición vertical.

Cápsida: cubierta proteica en algunos virus, que sirve para proteger el material genético.

Precabeza o procápsida: primera cubierta proteica ensamblada en el ciclo vírico

Capsómeros: unidades estructurales o morfológicas de la estructura de la cápside.

Traslocar: transporte de material a través de una barrera.

SP: spermidine o espermidina.

Buffer: Solución salina.

ADN: ácido desoxirribonucleico, en inglés DNA.

ARN: ácido ribonucleico, en inglés RNA.

ds-DNA: *double strand DNA* o ADN de cadena doble.

EM: Electron Microscopy o microscopía electrónica.

cryo-EM: *cryo- Electron Microscopy* o microscopía electrónica de criogenia.

SPM: Scanning Probe Microscopy o microscopía de proximidad.

AFM: Atomic Force Microscopy o microscopía de fuerzas atómicas.

STM: Scanning Tunneling Microscopy o microscopía de efecto túnel.

TEM: Transmission Electronic Microscopy o microscopía electrónica de transmisión.

SEM: Scanning Electronic Microscopy o microscopía electrónica de barrido

MFM: Magnetic Force Microscopy o microscopía de fuerzas magnéticas

vdW: van der Waals.

CM-AFM: Contact Mode o modo de contacto.

DAFM: Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico.

AM-DAFM Amplitude Modulation Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico de modulación en amplitud.

FM-DAFM: Frequency Modulation Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico de modulación en frecuencia.

NC-DAFM: Non-Contact Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico de no contacto.

JM: Jumping Mode o modo de salto.

Indentación: profundidad de una deformación.

F vs. Z: Fuerza vs. Z desplazamiento. Curva de fuerza en función del desplazamiento del piezo en la dirección Z.

F vs. I: Fuerza vs. Indentación. Curva de fuerza en función de la indentación en la muestra.

F vs. D: Fuerza vs. Distancia. Curva de la fuerza en función de la distancia entre la punta y la muestra.

UHV: Ultra-High-Vacuum o ultra alto vacío.

DSP: Digital Signal Processor o procesador digital de señales.

DAC: Convertidor de señal digital a Analógica.

ADC: Convertidor de señal analógica a digital.

DLVO: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek.

FEM: Finite Element Methods o métodos de elementos finitos.

CGM: *Coarse-Grained Model* o modelo de garno grueso.

MDS: Molecular Dynamic Simulation o simulaciones de dinámica molecular.

GuHCl: Hidrocloruro de Guanina.

(ONE): Orientación No Específica.

F_{ts} : Fuerza de Interacción entre la punta y la muestra

$F_{ts,CONS}$: Fuerza de interacción conservativa entre la punta y la muestra.

$F_{ts,DISS}$: Fuerza de interacción disipativa entre la punta y la muestra.

PUBLICACIONES

1. M. Hernando-Pérez, S. Kruse, E. Nakatani, C. E. Catalano, P.J. de Pablo. ***Cementing proteins provide extra mechanical stabilization to viral cages.*** *Enviado.*

2. Mercedes Hernando-Pérez, Elena Pascual, María Aznar, Alina Ionel, José R. Castón, Antoni Luque, José L. Carrascosa, David Reguera and Pedro J. de Pablo. ***The interplay between mechanics and stability of viral cages.*** *Nanoscale.* **6**, 2702 (2014).

3. Alexander Cartajena*, Mercedes Hernando-Pérez*, José. L. Carrascosa, Pedro. J de Pablo, Arvind Raman. ***Mapping in vitro material properties of intact and disrupted virions at high resolution using multi-harmonic atomic force microscopy.*** *Nanoscale.* **5** (11), 4729 (2013).

*ambos autores contribuyen por igual en este trabajo.

4. M. Hernando-Pérez., R. Miranda, M.Aznar, J.L. Carrascosa, I.A.T. Schaap, D. Reguera, P.J. de Pablo. ***Direct measurement of phi29 phage stiffness provides evidence of internal pressure.*** *Small.* **8** (15), 2365 (2012).

5. C. Carrasco, A. Luque, M. Hernando-Pérez, R. Miranda, J. L. Carrascosa, P.A. Serena, M. de Ridder, A. Raman, J. Gómez-Herrero, I. Schaap, D. Reguera² and P. J. de Pablo. ***Built-in mechanical stress in viral shells.*** *Biophysical Journal.* **100** (4), 1100 (2011).

Otras publicaciones

1. A. Ortega-Esteban, I. Horcas, M. Hernando-Pérez, P. Ares, A.J. Pérez-Berna, C. San Martín, J.L. Carrascosa, P.J. de Pablo, J. Gómez-Herrero. ***Minimizing tip-sample forces in jumping mode atomic force microscopy in liquid.*** *Ultramicroscopy.* **14**, 56 (2012).

2. David Martinez-Martin, Carolina Carrasco, Mercedes Hernando-Pérez, Pedro J. de Pablo, Julio Gomez-Herrero, Rebeca Perez, Mauricio G. Mateu, Jose L. Carrascosa, Daniel Kiracofe, John Melcher, Arvind Raman. ***Resolving Structure and Mechanical Properties at the Nanoscale of Viruses with Frequency Modulation Atomic Force Microscopy.*** *PlosOne.* **7** (1) (2012).

3. Milagros Castellanos, Rebeca Pérez, Carolina Carrasco, Mercedes Hernando-Pérez, Julio Gómez-Herrero, Pedro J. de Pablo, and Mauricio G. Mateu. ***Mechanical elasticity as a physical signature of conformational dynamics in a virus particle.*** *PNAS.* **109** (30), 12028 (2012).

4. Álvaro Muñoz-Noval, Mercedes Hernando Pérez, Vicente Torres Costa, Raúl J. Martín Palma, Pedro J. de Pablo, and Miguel Manso Silván. ***High surface water interaction in superhydrophobic Nanostructured Silicon Surfaces: Convergence between Nanoscopic and Macroscopic Scale Phenomena.*** *Langmuir* **28** (3), 1909 (2012).
5. Álvaro Muñoz-Noval, Vanessa Sánchez-Vaquero, Vicente Torres-Costa, Darío Gallach, Miguel Manso-Silván, Josefa P. García-Ruiz, M. Hernando-Pérez, P. J. de Pablo and Raúl J. Martín-Palma. ***Silicon-based hybrid luminescent/magnetic porous nanoparticles for biomedical applications.*** *J. Nanophoton.* **5** (2011).
6. Barrantes A., J. Sotres, M. Hernando-Pérez, P.J. de Pablo, A.M. Baró, J. Ávila, J.S. Jiménez. ***Tau Aggregation Followed by Atomic Force Microscopy and Surface Plasmon Resonance, and Single Molecule Tau-Tau Interaction Probed by Atomic Force Spectroscopy.*** *Journal of Alzheimer Disease.* **18** (4), 141 (2009).
7. M. Hernando-Pérez; A. Noval; C. Rodríguez Navas; M. Manso-Silván; V. Torres; G. Ceccone; J. García Ruiz; F.Rossi. ***Scanning Surface modification, characterization and biofunctionality of pegylated titanate films obtained by the sol-gel method.*** *Surface and Interface Analysis.* **40** (3-4), 205 (2008).

Agradacimientos

Hoy he finalizado de redactar el documento que contempla el trabajo realizado durante unos cuantos años. ¡*Habemus Tesis!*!. Hoy me siento muy feliz. Lo conseguí!. Ahora, echo la mirada hacia atrás, observo, analizo y evalúo. Cada momento que recuerdo de esta tesis induce en mí una sonrisa. Han sido tantas las experiencias y los momentos que he vivido durante este periodo de mi vida, que me da pena que se acabe. Además el poder haber realizado un "trabajo" que me gusta y el haber conocido a gente tan maravillosa, me hace sentirme realmente afortunada. Sois muchos los que habéis hecho posible, de una manera u otra, que esta tesis se haya realizado. Con vuestro apoyo, cariño y ánimos habéis conseguido que nunca haya perdido la ilusión. Por eso, os estoy eternamente agradecida.¡¡¡¡¡ GRACIAS!!!!.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis Pedro por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias por dirigirme la tesis, por haber confiado en mí, por transmitirme tus conocimientos y tu ilusión por la ciencia, por tus críticas y tus consejos, por tu apoyo y tus ánimos en los momentos de bajón, por tu amistad fuera y dentro del laboratorio. Espero ser la científica que esperabas formar. Esta tesis es también parte tuya. Lo hemos conseguido!. Muchísimas gracias Pedro. Te deseo lo mejor y espero que volvamos a coincidir.

Después, quiero agradecer especialmente a Julio por haberme aceptado dentro de su grupo y de su *labo*. Creo que tienes que estar orgulloso del maravillo grupo que has montado. Esto no lo hay en cualquier sitio. Gracias por trasmitirme no sólo tus conocimientos, sino también, por tu pasión por la ciencia, por tu trato y cercanía, por tu confianza, por tus consejos, por tu amistad y tu cariño. Te prometo que no volveré a regalarte un cardo. 😊. Gracias Julio.

Mis comienzos en el mundo de los virus fueron un poco solitarios puesto que por una temporada fui la única que trabajaba en esta área, pero poco a poco*The Pedro's Group* comenzó a crecer con la incorporación de Álvaro y Aida, "*Mis BIOS*". Me siento muy afortunada de haber compartido mí día a día con vosotros, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por escucharme, por vuestro apoyo y por los momentos tan

bueno que hemos pasado juntos. Me llevo dos grandes amigos. Ya sabéis donde me tenéis, creo que no hace falta que os lo recuerde. Soy unos grandes científicos. Arrvaaarooooo!!!. Álvaro eres una grandísima persona y vales un montón. Gracias por tu confianza. Hemos vivido muy buenos momentos juntos, congresos, fiestas, surff,.... Me he reído muchísimo contigo *sobre todo* cuando “*se te pira la pinza*”. Ya te queda menos. Mucho ánimo. Y sobre todo no cambies nunca porfa. Ah y recuerda que a las malas siempre podemos montar nuestro chiringuito en la playa ☺. Aida, eres un encanto de persona. Gracias por hacerme ver las cosas menos complicadas de lo que son, por tu apoyo, por tu generosidad y tus ánimos. Lo he pasado muy bien contigo no sólo planificando trastadas para Álvaro, sino también discutiendo de ciencia, hablando de nuestras cosas, etc. Creo que en este último año hemos llegado a conocernos un poco mas mutuamente y a congeniar. Me lo pasé genial en Leiden y Ámsterdam. Tú tampoco cambies. Mucha suerte en tu tesis. Por último recordaros a los dos que nos queda pendiente una foto de grupo, ganar el euro millón, contratar a un esclavito para que nos haga los experimento, un viaje a Australia y conocer a *perriflautas*.jjj Gracias chicos !!!!!.

A la otra parte grupo Nanoforce: Cristina, Willy, Carlos, Mirian Jaafar y Pablo Ares. Sois todos estupendos. Cristina espero que todo te vaya muy bien. Eras una persona admirable tanto en lo personal como en lo científico. Te prometo no volver a comerme tus chocolatinas ;). Willy no vuelvas a meternos más sustos. Nos tuviste muy preocupados. Vales mucho. Gracias por tu alegría. Mucha suerte en tu tesis. Miriám aunque he coincidido menos tiempo contigo, gracias por tus consejos y tú ayudes. Eres un encanto. Carlos gracias por estar siempre ahí cuando se me presenta un problema informático. Y por último Pablo. No sé cómo te voy a agradecer toda la ayuda que he recibido de ti. Como compañero y como persona eres increíble. Muchisimas Gracias.

Y como no. A la otra parte del laboratorio, el grupo de la PUNTA: Chema, Iván, Miguel, Antonio, Nicoleta, Antonela, Bruno, Ana y Hector. Cada uno de vosotros de algún modo u otro habéis contribuido a que durante estos años haya sido fácil disfrutar de este laboratorio. Chema muchas gracias por tus apoyo. Iván gracias por tu ayuda, tus ánimos y tus consejos. Te deseo lo mejor. Miguel, Antonio y Nicoleta, sois unas grandísimas personas. Os hecho mucho de menos. No os imagináis cuanto anhelo esos días improvisados de cervezas con vosotros. Miguel nunca olvidaré tu etapa de escritura de

tesis, cuando nos torturabas con el “*Waka, Waka*” de Shakira. Gracias por estar siempre ahí y ¡Vivan las fiestas de San Miguel!. Antonio eres un sol de persona. Siempre a disposición de los demás. Nico creo que no hace falta decirte ue te diga lo muchísimo que te aprecio. Eres una gran persona y amiga. Vuelve pronto. Ana y Hector, como diríamos los segovianos, sois muy majos. Espero que os lo países, como mínimo, igual de bien que yo durante la tesis. Antonela eres muy buenas persona. Ya te queda menos. Mucho ánimo!. Y por último Bruno. ¡Somos los estudiantes más veteranos!. Jajajaja, ☺ Hemos compartido juntos grandes momentos durante estos años: congresos, celebraciones, despedidas, anécdotas y alguna que otra tarde de domingo. Hemos sentido el partir de una generación de estudiantes y la llegada de otra. Creo que el trabajo que estás haciendo y el esfuerzo que estas dedicando son admirables. Tu tesis va a ser increíble. Muchísimas gracias por tu amistad. Te deseo lo mejor!.

A ese grupo de biofísicos con los que he compartido tantas comidas en la cafetería de psicología, que guiaron durante los primeros años de mi tesis y con los que siempre puedo contar: Javier, Elena, Marta, Lisa, Alex y Pablo. Javi me alegro muchísimo que te que te vaya tan bien en Suecia aunque estés lejos. Gracias por tu ayuda. Elena ¡eres maravillosa!. Tienes unas niñas preciosas. Martuquiiii espero que te vaya muy bien por los “*estates*”. Lisa, ya casi lo ha conseguido. En poquito tiempo serás doctor. Alex eres increíble. Espero que coincidamos más a menudo. Te deseo lo mejor. Pablo me gusta la manera en que vives la ciencia. Sé que te va ir muy bien en Alemania. Te debo una visita. Me lo he pasado muy bien en los viajes que hemos realizado juntos. A todos ¡muchísimas gracias!.

A Santiago Márquez por haber estado siempre pendiente de los problemas técnicos de mis experimentos. Aunque ya llevas muchas tesis en tus espaldas, quiero agradecerte la ayuda que me has prestado durante la mía. Has sido un miembro importante del comité de festejos del laboratorio. Muchas gracias.

A todas esas personas que trabajan o trabajaron en Nanotec S.L. por el trato amigable que me han ofrecido cada vez que he descolgado el teléfono y por la ayuda que me han ofrecido durante estos años: Adriana, Rafa, Eduardo, Jaime, Luis, María, Alejandro, Miriam y Nacho. Adriana me encanta charlar de ciencia contigo y verte siempre sonriente. Nacho ¡¡¡ que te voy a contar!!!. Gracias por aguantar mis chapas y

por ser como eres. Me gusta tu filosofía de vida y además creo que coincidimos en algunos aspectos. Gracias por tu ayuda y tu apoyo. Ya sabes que puedes contar conmigo. Y por último una gran compañera, amiga y persona, Miriam Moreno Moreno. ¡Mi Miriam!. Gracias *guapy* por todo. Gracias por el tiempo que me dedicaste con el AFM en los primeros momentos de mi tesis. Gracia por escucharme y aconsejarme. Gracias por compartir tu tiempo conmigo y por ser mi amiga. No cambies nunca.

Han sido varias personas con las que me compartido parte de tiempo de estas tesis. Con alguno de los cuales tengo un vínculo especial (VIRUS): Carolina, Milagro, Pablo (CBM) y Fran. Carol recuerdo perfectamente cuando te conocí. Aquel día estaban sentada delante del ordenador muy centrada en la escritura de tu tesis. Te levantaste y amablemente respondiste a un montón de dudas que tenía acerca de los virus. Muchas gracias por la atención y los ánimos que me distes en los primeros momentos de mi tesis. Gracias por dedicarme tu tiempo siempre que he necesitado de tu ayuda o consejo. Gracias por la confianza que me has ofrecido durante estos años. Vales mucho como persona y científica. Mila ¡¡¡ que pasa guapa!!! Gracias por los ánimos que me das cada vez que me ves. Por tus consejos y la alegría que me transmites. ¡Qué grande eres!. Pablo eres majísimo. Espero que te vaya muy bien durante la tesis. Y Fran, amigo. Tu marcha me resultó muy dura después de todo el tiempo que habíamos pasado juntos tanto dentro como fuera del laboratorio. Recuerdo esas tardes en las que íbamos a tomarnos unas Estrella de Galicia a la puerta del Sol. Aunque ahora la comunicación entre nosotros ha disminuido, decirte que siempre has estado en mi mente. A todos daros las gracias y deciros que podéis contar conmigo siempre.

No puedo olvidarme del grupo Fisicoquímicos: Rodrigo, Lorena, Isadora, Cristina Hermosa, Mari Luz, David Olea y Vicente. Rodrigo cada día me doy más cuenta de lo parecidos que somos. ¿Será porque los dos somos cáncer? JaJaJa. Me gusta cuando quedamos a tomar unas cervezas y charlamos durante horas. Aunque creo que ya te lo he dicho, muchas gracias por estar siempre ahí cuando te necesito y sobre todo por ser mi amigo. Ya sabes que en Ayllón tienes una casa. ¡Lorena guapa! Te echamos de menos. He perdido la cuenta del número de veces que me has repetido que leyera la tesis, ¡YA! Pues.....¡ Aquí está! Gracias por tu apoyo y tu amistad durante estos años. ¡Tú también eres una joya!. Isadora no te puedes imaginar cuanto te anhelo. Hoy estaba recordando

mucho de los buenos momentos que hemos vivido juntas. ¡Cómo nos lo hemos pasado! Gracias por transmitirme tu alegría. Y si, cada vez que me acuerdo de ti hago sonar el cascabel. Sé que te va ir muy bien en Chile. En cuanto pueda me escapo para allá. ¡BUEN CAMINO!. ¡Que pasa Cris!, Ya te queda nada para terminar. Por fin!. Me alegro muchísimo por ti. Eres una campeona. Muchas gracias por ser tan buena compañera. Por escucharme en los momentos duros. Por estar siempre pendiente de mí Eres genial. Mari Luz ha sido un gran placer conocerte. Olea me muero de risa cada vez que me acuerdo nuestras trifulcas en el laboratorio. Como nos reíamos!. Vicente eres un tipo estupendo y espero que todo te vaya muy bien. A todos vosotros os quiero agradecer lo arropada que me habéis hecho sentir. Como diríamos los de Ayllón: Sois muy buena gente, muy majos. Gracias.

Esta tesis se ha desarrollado gracias a la colaboración de tres grupos de investigación. En primer lugar me gustaría agradecer a José López Carrascosa y a las personas de su grupo: J.R. Castón, Elena Pascual, Alina Lionel y Ana Cuervo (Centro Nacional de Biotecnología), por su colaboración, su trato y su ayuda. Después al grupo David Reguera y a los miembros de su grupo: Toni y María (Universidad de Barcelona). David gracias por tus consejos, tus interpretaciones, por las simulaciones. Creo que tu aportación en los trabajos ha sido fundamental. Toni gracias por haber venido un mes de estancia a nuestro laboratorio. Creo que todos aprendimos mucho de ti y disfrutamos de tu compañía. Eres un excelente científico. Espero que coincidamos en el camino. María ¡que ya está hecho!. Gracias por el gran trabajo que has realizado con el AFM Virtual. Por tu alegría y desparpajo. Ahora Doctora Aznar soy yo la que te debe unas cervecitas. ¡Vente pa Madrid!. Y por último al Profesor Arvind Raman, Profesor Ronald Reifenberger y el Doctor Alexander Cartagena (Purdue University, West Lafayette, Indiana). Arvind muchísimas gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar contigo y por la confianza que depositaste en mí. Gracias por transmitirme tus conocimientos. He aprendido y disfrutado mucho durante las estancias realizadas en tu laboratorio. Ha sido un placer enorme para mí el poder trabajar con un profesional como tú. Espero que podamos seguir colaborando. Ron gracias por ser tan hospitalario e interesarte por mi trabajo. Alex gracias por todo el tiempo que hemos pasado juntos trabajando duro. Lo hemos pasado realmente bien. Espero que te vaya muy bien en tu postdoc en Washintong. Dale un beso a tu preciosa bebita. Eres un gran padre. Espero seguir colaborando contigo también.

A Miguel Manso, Álvaro Muñoz y Predes García, por haberme inculcado la pasión por la ciencia. Fuisteis mis primeros maestros en este mundillo. Por vuestra amistad. Por estar siempre dispuesto a ayudarme. Sois un ejemplo a seguir. Álvaro ¡¡ya está hecho!!!. A ver si de aquí cambiamos el mundo!!!. Gracias a los tres.

A lo largo de esta tesis y fuera del ámbito científico, he sido arropada por mis maravillosos amigos y primos a los que quiero infinitamente. En primer lugar, al grupo de “*Luci-Piscina*”: Luci, Dani, Yago, Gema, Antonio, Mario, Juanjo, Verónica, Alberto, Patxi, Pablo, Raquel, Fran y Conchi. Cada uno de vosotros de una forma u otra hacéis mi vida más completa. A todos os agradezco lo muchísimo que me cuidáis. El cariño que siempre mostráis. Lo magníficos que sois. Os quiero. Espero que los miembros más pequeños del grupo, Mario y Yago, lleguen a ser como sus papas. Conchi gracias por todos tus consejos y cuidado durante estos últimos años. Como tú siempre dices, *al final todo llega*. Gracia churri. Por otro lado a “*Mis chicas de Ayllon*”: Patricia, Patrica Cámara y Olga. Chicas muchísimas gracias por aguantar mis chapas y estar siempre ahí. Por estar siempre pendiente de mí. Por vuestra amistad. Sois muy importantes en mi vida. Os quiero chicas. Y por último a “*los primos del Juerves*”: Toño, Gema, David, Elena y Miram. No sabéis la suerte que tengo de tener estos primos tan estupendo. Disfruto de cada momento que estamos juntos. Una vez me mandaron unas frases que son muy ciertas. La primera es; *los amigos son como los zapatos. Podemos tener muchos, pero siempre andamos con los que nos sentimos más cómodos*. Y la segunda es: *los primos son los primeros amigos en nuestras vidas. Ellos pueden son ser parte de nuestra vida diaria pero nunca están lejos de pensamientos y memoria*. Gracias a todos por estar siempre ahí.

Para finalizar he decidido dejar los agradecimientos para las personas más importantes de mi vida. Mis padres, hermanos, cuñados y sobrinos. MI FAMILIA. A mis hermanos Gerardo, Conchi y Mónica. Gracia por cuidame tanto. Por vuestros consejos, por vuestro apoyo incondicional, por estar siempre pendiente de mí, por vuestro cariño. No os hacéis a la idea de lo afortunada que me siento de teneros. Os quiero muchísimos. A mi *Chupipandi* (mis sobrinos): Sergio, Iván, Sandra, Héctor, Pablo y Rubén. Me encanta que me recibáis siempre con abrazos, sonrisas y besos. Vosotros hacéis que mi vida cobre sentido cada vez que os veo. Os quiero y os adoro. Y por último a mis padres. Papá y Mamá, creo que debéis estar orgullosos del trabajo que habéis hecho con vuestros hijos.

Habéis creado una familia increíble. Gracias por vuestra paciencia en los últimos meses. Gracias por haberme dado la educación que he recibido, por inculcarme los valores de la vida, por apoyarme en cada una de las mis decisiones, por guiarme cuando me he sentido perdida y por estar siempre al pie del cañón. ¡Sois lo más grande!

¡GRACIAS A TODOS ¡

