

Universidad Autónoma de San Luis Potosí



Facultad de Ciencias Químicas

Posgrado en Ciencias Químicas



**Formación de estructuras polimórficas de la proteína de cápside
de Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) con sales
monovalentes y divalentes.**

**Tesis para obtener el grado de
Maestría en Ciencias (Química)**

Presenta:

I.Q. Alma Jovanna Madera Bañuelos

Asesor:

Dr. Jaime Ruiz García

San Luis Potosí, S.L.P.

Julio 2020

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 000519, en el nivel consolidado.

No de registro de la beca otorgada por CONACYT: 626232

No. CVU alumno: 743069 No. CVU asesor: 14177

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime Ruiz García por su constante apoyo, motivación y asesoramiento que con su guía me otorgó armas para mi formación profesional y personal.

A la Dra. María Verónica Villagrana Escareño por su guía, empatía y disponibilidad para realizar este proyecto.

Al L.I.E. Emmanuel Vázquez Lezama, sin cuya ayuda técnica no hubiera sido posible concluir mi trabajo

Mi profundo agradecimiento a la M.C.Q. Xóchilt Fabiola Segovia por su constante ayuda, entusiasmo y amistad. Así como a mis compañeros y amigos del laboratorio, el Dr. Pablo Hernández, M.C.Q. Emmanuel Gómez y I.N.E.R Antonio Zúñiga.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me ofreció durante mi estancia en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

DEDICATORIA

A mis padres José Madera y Victoria Bañuelos.

A mis hermanas por elección Alejandra Fernández e Irene Márquez

A mi mejor amigo y ahora compañero de vida Carlos R. Gámez.

Y, por último, pero no menos importante, al SARS-CoV-2 por demostrar al mundo la importancia de la virología y la divulgación científica. Por supuesto, de no ser por su ayuda no hubiera terminado esta tesis.

Resumen

Los virus más simples consisten en una cápside de una sola proteína de espesor, la cual envuelve y protege el genoma viral, esta estructura puede ser de diversas formas (como un cilindro para el virus del mosaico del tabaco -TMV), las cuales están formadas de un solo tipo de proteína que se ensambla alrededor del material genético del virus. Bancroft y Hiebert demostraron que en el caso de los virus esféricos como el Cowpea Chlorotic Mosaic virus, es posible reensamblarlos al poner en contacto sus componentes purificados con soluciones de buffers adecuadas.

El Cowpea Chlorotic Mottle virus (por sus siglas en inglés: CCMV) es perteneciente al género *Bromovirus*, familia *Bromoviridae*. Es un virus de RNA de cadena sencilla que provoca un importante daño en los cultivos de leguminosas a nivel mundial; es transmitido por un vector o por inoculación mecánica a su hospedero natural el frijol “California Black Eye”, provoca en las plantas síntomas de mosaico sistémico moteados o manchas amarillas. Sus viriones son partículas formadas por 180 subunidades proteínicas de un peso molecular de 20 kDa idénticas. La característica estructural del CCMV más importante es que a un bajo pH reversible desarrolla una dependencia en su hinchamiento, resultado en un incremento del 10% del tamaño del virus.

El CCMV como virus vegetal ha confirmado su habilidad para infectar células mamíferas, además constituye un claro modelo para la comprensión de los virus esféricos, gracias a su capacidad de hinchamiento y desensamblaje, la cual presenta dependencia polimórfica respecto al pH y la fuerza iónica; el primero al cambiar el grado de ionización de los residuos proteicos y la segunda afectando las interacciones electrostáticas y la estabilidad de las uniones de calcio. Dicha estabilidad puede ser modificada mediante a interacción con sales monovalentes y divalentes, que teóricamente podrían resultar en nuevas estructuras de agregados proteicos; estas interacciones nos darían un panorama más amplio de los retos que se presentan al utilizar la proteína viral del CCMV como nanotrasportador biológico.

Justificación

Se ha demostrado que la proteína de la cápside vacía del CCMV posee un amplio rango de polimorfismo y que tal comportamiento tiene una dependencia respecto al pH y la fuerza iónica. Esto evidencia el efecto primario del pH el cual es cambiar el grado de ionización de los residuos proteicos; mientras que la fuerza iónica afecta primordialmente el rango de interacciones electrostática y el efecto estabilizante de las uniones entre proteínas de la cápside vacía. Es por ello por lo que la interacción con cationes de sales monovalentes y divalentes representan un factor a estudiar para conocer la estabilidad termodinámica que podrían resultar en nuevas estructuras de agregados proteicos; estas interacciones nos darían un panorama más amplio de los retos que se presentan al utilizar la proteína viral del CCMV como nanotransportador biológico.

INDICE

CAPÍTULO I	1
1. Introducción	1
1.1 Virus	1
1.1.1 Autoensamblaje de la proteína de cápside de TMV	3
1.1.2 Diagrama de fases del <i>Cowpea Chlorotic Mottle Virus</i> de Bancroft y colaboradores	5
2.1 Objetivo General	6
2.1.1 Objetivos particulares	6
3. Fundamento teórico	7
3.1 Virus y sus propiedades	7
3.2 Componentes virales	9
3.2.1 Proceso de replicación de un virus	10
3.2.2 Clasificación de los virus	13
3.2.4 Número de triangulación	17
3.2.5 Termodinámica del ensamblaje viral	19
3.3 Cowpea Chlorotic Mottle Virus	23
3.3.1 Infectividad del virus	26
3.3.2 Propiedades de la proteína del CCMV	27
3.3.3 Factores que alteran las propiedades de la proteína del CCMV	29
3.3.3.1 Fuerza iónica y pH	31
3.3.4 Terminal Amino y terminal Carboxilo	34
3.3.5 Carga eléctrica superficial	34
3.3.6 Autoensamblaje de virus <i>in vitro</i>	35
CAPITULO II	37
4 Métodos	37
4.1 Amplificación del virión	37
4.2 Siembra del frijol	37
4.3 Inoculación	38
4.4 Cosecha de hojas infectadas	39
4.5 Purificación del virus	40
4.6 Purificación de proteína	46
4.7 Reensambles	48

4.8 Preparación de portadoras de muestras para el microscopio electrónico de transmisión.....	49
4.8.1 Aplicación de Parlodion	49
4.8.2 Aplicación de la película de carbón sobre el parlodion.....	51
4.8.3 Descarga brillante	52
4.8.4 Depósito de muestra y tinción.....	53
CAPITULO III.....	55
5 Resultados	55
5.1 Amplificación del virus de CCMV	55
5.2 Purificación del virus de CCMV extrayéndolo de los tejidos vegetales.....	56
5.3 Aislamiento de la proteína del CCMV mediante la separación del RNA virus.	57
5.4 Reensambles de la proteína del CCMV en sales monovalentes y divalentes.	60
5.4.1 Reensambles realizados en sal divalente.....	60
5.4.2 Reensambles realizados en combinación de sales divalentes y monovalentes.....	62
5.5 Análisis y caracterización de estructuras proteicas virales mediante microscopía electrónica de transmisión.	63
5.5.1 Microscopías de MET con muestras en una de proporción 80-20% de sales monovalentes y divalentes.....	63
5.5.2 Microscopías de MET con muestras en una proporción 99-1% de sales monovalentes y divalentes.....	69
5.5.3 Microscopías de MET con muestras en una proporción 99.5-0.5% de sales monovalentes y divalentes.....	80
5.5.4 Microscopías con 100% de sales divalentes.	85
CAPITULO IV	90
6 Conclusiones.....	90
Bibliografía.....	93

Índice de figuras

Figura 1 Diagrama de fases de la proteína del TMV mostrando las especies de proteína particulares que participan significativamente en el equilibrio del virus (Klug, 1999).....	4
Figura 2 Representación esquemática de los tipos de estructuras virales.	10
Figura 3 Componentes de un virus helicoidal.....	15
Figura 4 Representación de una disposición icosaédrica.....	15
Figura 5 A la derecha micrografía del Virus de Papiloma Humano; a la izquierda: descripción de los componentes de un virus icosaédrico.....	16
Figura 6 Componentes de un virus complejo	17
Figura 7 A la izquierda, construcción de un icosaedro en un modelo plano de red hexagonal. La red consiste en 20 triángulos equiláteros. A la derecha, icosaedro formado con el modelo de red hexagonal.	18
Figura 8 a) Diámetros interior y exterior del CCMV. b) Estructura icosaédrica idealizada del CCMV T=3, mostrando tres subunidades asimétricas A1, B1 y C1. c) Estructura del CCMV de T=3 con subunidades asimétricas coloreadas de rojo, azul y verde.	24
Figura 9 a) Estructura cristalina de rayos X, subunidades proteicas (rojo, azul y verde cada una) y la amino terminal (amarillo): b) CCMV nativo organizado en 12 pentámeros (5 subunidades azul) y 20 hexámeros (3 subunidades rojas y 3 verdes); c) el virus nativo hinchándose 10% en dimensiones al aumentar el pH de 5 a 7.5 en la ausencia de catines divalentes (Miao, Johnson, & Ortoleva, 2010).	25
Figura 10 Secuencia de aminoácidos perteneciente a la estructura primaria de la proteína del CCMV (Dasgupta & Kaesberg, 1982).....	27
Figura 11 Estructura obtenida por cristalografía de rayos X, en la cual se muestran los extremos amino y carboxilo y en la cual se pueden observar sus formaciones β -laminares y α -hélice. Figura adaptada desde la referencia para fines de este documento (Speir JA, Bothner B, Qu C, Willits DA, Young MJ, 2006)	28
Figura 12 Concentración de equilibrio de cápsides y dímeros de CP libres en función de la concentración total de dímero a pH (a) 5.0, (b) 5.5 y (c) 6.0. Las cifras	

adaptadas de Adolph y Butler (círculos) y Johnson (triángulos) en el panel a) se obtuvieron a $I=1.0$ y 0.5 M, respectivamente. Las imágenes b) y c) se obtuvieron a $I=1.0$. En el panel d) K_D , se obtuvo el pH aparente frente a los paneles a) -c) y dos puntos de datos adicionales pH 4.8 y 5.3 de Johnson 30

Figura 13 Diagrama de fases del ensamble de proteínas como función del pH y la F.I (Vega-Acosta, Cadena-Nava, Gelbart, Knobler, & Ruiz-García, 2014)..... 33

Figura 14 Cargas eléctricas por virión de acuerdo a su movilidad electroforética(Vega-Acosta et al., 2014). 35

Figura 15 Siembra de frijol Cowpea dentro de las macetas del invernadero, en una disposición de 5 cm cada uno y una profundidad de 1.5 cm..... 38

Figura 16 Hoja de 7 días heridas por piquete y siendo infectadas por solución de inoculación esparciéndola por toda la hoja..... 39

Figura 17 a) Hojas de 7 días de crecimiento sin infección. b) hojas después de la infección. 40

Figura 18 Proceso de molienda con arena de mar desacidificada en mortero. 41

Figura 19 Proceso de filtrado de la solución con varias capas de gasas. 42

Figura 20 Proceso de separación de componentes celulares: a) mezcla obtenida de la molienda y cloroformo en agitación. b) solución después de la centrifugación donde se distinguen la fase color ocre. 43

Figura 21 a) Técnica de introducción de sacarosa. b) Tubo con solución ocre y colchón de sacarosa. 44

Figura 22 Franja azul dentro del gradiente de sacarosa, sitio donde se concentra el virus del CCMV. 45

Figura 23 Pellet en el fondo de los tubos, donde se concentra el virus CCMV. ... 45

Figura 24 Membrana cerrada con clips a punto de ser introducida al buffer. 47

Figura 25 a) Vista superior de la rejilla mostrando la malla, b) Vista lateral de la rejilla recubierta y exponiendo la posición relativa de la capa de carbono y la muestra. 49

Figura 26 a) Tazón de vidrio lleno de agua desionizada donde se añade la gota de parlodion y posteriormente se disponen las rejillas de cobre. b) Rejillas de cobre en la superficie del parlodion aún dentro del tazón. 50

Figura 27 a) Cabezal con ánodo y cátodo y tornillos de soporte con el hilo de grafito montado, b) Rejillas de carbono con parlodion y recubiertas de carbón.	52
Figura 28 a) Equipo de descarga brillante. b) Descarga eléctrica del TESLA	53
Figura 29 Hoja infectada de virus CCMV con signos de clorosis.	55
Figura 30 Espectro de absorción típico del virus CCMV a una concentración de 1mg/ml. Es posible observar una absorbancia máxima de 6 a una longitud de onda de 260 nm (sitio de absorción de los ácidos nucleicos - línea amarilla).	56
Figura 31 Espectro de absorción de varios lotes de proteína que se obtienen al purificar el virión. En éste es posible observar la absorción de las proteínas en 280 (línea roja) y la absorción del RNA en 260 (línea verde).	58
Figura 32 Micrografía de solución amortiguadora con I=0.1 y pH 3.0 en la cual se pueden observar cápsides de distintos tamaños.	64
Figura 33 Micrografía con buffer I=0.1 y pH 3.0 con cápsides incompletas.	65
Figura 34 Micrografía de I= 0.1 y pH 3.8 con cápsides de borde difuso, en algunas es posible observar el usual centro oscuro, pero sin el usual borde definido.	65
Figura 35 Micrografía de I=0.1 y pH= 3.8 con presencia de proteína precipitada cerca de estructuras similares a cápsides.	66
Figura 36 Micrografía tomada de Diagrama de Fases realizado por Lavelle et. al. (L. Lavelle et al., 2009)	67
Figura 37 Micrografía tomada en I=0.1 y pH 3.0 donde se observan cápsides apareadas.	67
Figura 38 Micrografías de uniones múltiples de cápsides en presencia de RNA, imagen adaptada de referencia (Cadena-Nava et al., 2012) Escala de 50nm.	68
Figura 39 Micrografía de I=0.1 y pH 3.8 con presencia de tres tipos de estructuras coexistentes.	68
Figura 40 Micrografía de I=0.07 y pH 3.0 con presencia de proteína dispersa no agregada, agrupada es estructuras pequeñas sin curvatura estable. Escala 200 nm.	70
Figura 41 Micrografía de I=0.07 pH 3.8 donde se observa proteína con mayor densidad proteica (contraste oscuro) denotando una modificación en los ángulos de los dímeros para formar estructuras irregulares.	70

Figura 42 Instantáneas de la conformación de un dímero para salinidades de 0,1, 0,2 y 0,5 M. Las colas de un dímero (residuos 2-39) están en rojo (Chen et al., 2018).	71
Figura 43 Micrográficas de $I=0.07$ pH 3.8 con estructuras proteicas alargadas, como consecuencia de un aparente estiramiento entre dímeros consecuencia de una baja fuerza iónica. Escala a 200 nm.	72
Figura 44 Micrográficas de $I=0.07$ pH 3.8 de vista panorámica donde se aprecian las redes proteicas y su persistencia en longitud.....	72
Figura 45 Acercamiento de las micrográficas de $I=0.07$ pH 3.8 donde se marcan los dominios hidrófobos.	73
Figura 46 Micrografía de solución a $I=0.1$ y pH 4.4. Vista panorámica del comportamiento periódico de la proteína para formar rosetas o “discos proteicos”.	74
Figura 47 Micrografía de $I=0.1$ pH 4.4 con acercamiento para apreciación a detalle de las estructuras en forma de rosetas. Escala 200 nm.....	74
Figura 48 Micrografía de $I=0.3$ y pH 3.8 con dímeros dispersos en la muestra....	75
Figura 49 A la derecha esquema proteico del capsómero hexaédrico y de lado derecho el esquema del dímero. Esquema adaptado desde referencia. (Chang, Knobler, Gelbart, & Mason, 2008).....	75
Figura 50 Estructura tipo red creada por el empaquetamiento hexagonal de capsómeros en cercanía de dímeros proteicos de una superficie plana. Esquema adaptado desde referencia. (Chang et al., 2008).	76
Figura 52 Micrografía de $I=0.3$ y pH 5.6 con estructuras laminares de proteína. .	76
Figura 53 Detalle de micrografía con resalte en los puntos de baja densidad proteica.	77
Figura 54 Micrografía de $I=0.7$ y pH 3.8 donde se aprecia entidades proteicas similares a cápsomeros dilatados.	78
Figura 55 Micrografía de $I=0.7$ y pH 4.4 con dispersión de proteína creando dominios más comprimidos.	78
Figura 56 Micrografía de $I=0.7$ y pH 5.6 Ensamblajes proteicos con aparente estado de transición que genera dominios proteicos.	79

Figura 57 Microscopía correspondiente a pH 5.6, I=0.1 donde se observa la proteína diseminada sin estructura estable pero homogénea respecto a aparente porosidad proporcionada por la deposición con contraste de acetato de uranilo y la base de la rejilla.	81
Figura 58 Micrografías de solución salina con proteína en I=0.1 y pH 4.7 en mezcla de 99.5-0.5%.	82
Figura 59 Micrografía correspondiente a la I=0.1 y pH 4.7 donde se observan estructuras esféricas.	82
Figura 60 Micrografías correspondientes a la solución de I=0.1 y pH 3.8 donde se observan formaciones esféricas con diámetros de 20 y 30 nm.	83
Figura 61 Esquema de la proteína del CCMV en densidad electrónica donde se representa la interacción carboxilo terminal de la subunidad A (azul claro) y la “pinza” creada por la subunidad B ₅ (rojo), aquí es fácil identificar la estructura de listón representada en las imágenes de cristalografía; además, es posible observar un extremo de la subunidad C (verde), y se aprecian los aminoácidos que interacciona en la formación de hexámeros. Figura adaptada de referencia (Speir et al., 1995b).	84
Figura 62 Micrografías correspondiente a I=0.1 pH 3.0; a) Es una imagen abierta de la muestra, b) se presentan a detalle las mediciones de las estructuras observadas en la imagen a).	84
Figura 63 Micrografía a I=0.007 pH 5.6 donde se observan múltiples estructuras poligonales con tendencia a una curvatura accidentada. Escala 200 nm.	86
Figura 64 Micrografía a I=0.007 pH 5.6 donde se muestra una estructura plana formada de proteína acomodada en hexámeros,	86
Figura 65 Micrografía a I=0.007 pH 5.6 con estructura laminar de hexámeros proteicos.	87
Figura 66 Micrografía a I=0.01 pH 3.0 se presenta proteína en estado libre, sobre el contraste de la rejilla. Destaca la ausencia de estructuras precipitadas o aglomeraciones proteicas.	87
Figura 67 Micrografía de I=0.01 pH 6.0 donde se observan múltiples cápsides proteicas con borde bien definido similares a la nativa. Escala 100 nm.	88
Figura 68 Micrografía de I=0.01 pH 6.0 con muestra de estructuras apareadas. .	89

Figura 69 Micrografía de $I=0.01$ pH 6.0 donde se muestra la coexistencia de diversas estructuras icosaédricas. 89

Índice de tablas

Tabla 1 Absorbancias obtenidas por espectrofotometría UV/Vis, resultados de pureza, concentración y cantidad de virión del proceso de purificación.....	56
Tabla 2 Absorbancias obtenidas por espectrofotometría UV/Vis, resultado de pureza, concentración y cantidad de proteína después del proceso de purificación	59
Tabla 3 Gramos añadidos de $MgCl_2$ por cada fuerza iónica.	62
Tabla 4 Gramos de sales monovalentes y divalentes añadidos de acuerdo con la fuerza iónica de la solución	63

Cuadro de abreviaturas

<i>BMV</i>	<i>Brome Mottle Virus</i>
$^{\circ}\text{C}$	<i>Grados Centígrados</i>
Ca^{2+}	<i>Catión de calcio</i>
<i>CMC</i>	<i>Concentración micelar critica</i>
<i>CP</i>	<i>Proteína de cápside</i>
<i>CK</i>	<i>Caspar y Klug</i>
<i>Csalt</i>	<i>Concentración de sales</i>
<i>Da</i>	<i>Daltons</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<i>DTT</i>	<i>1,4 Dithiothreitol</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilendiaminoatetraacético</i>
<i>FI</i>	<i>Fuerza iónica</i>
<i>I</i>	<i>Fuerza iónica</i>
<i>ICTV</i>	<i>International Committe taxonomy virus</i>
<i>M</i>	<i>Molar</i>
<i>mBar</i>	<i>Milibar</i>
<i>MET</i>	<i>Microscopio Electrónico de Transmisión</i>
Mg^{2+}	<i>Catión de magnesio</i>
MgCl_2	<i>Cloruro de Magnesio</i>
<i>mV</i>	<i>Mili volts</i>
<i>NaCl</i>	<i>Cloruro de Sodio</i>
<i>pH</i>	<i>Potencial hidrógeno</i>
<i>PMSF</i>	<i>Fluoruro de fenilmetilsulfonio</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>RCMV</i>	<i>Red Clover Mottle Virus</i>
<i>Rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
<i>SMD</i>	<i>Simulación Molecular dinámica</i>
<i>T</i>	<i>Número de Triangulación</i>
<i>TMV</i>	<i>Tobacco Mosaic Virus</i>
<i>V/V</i>	<i>Proporción Volumen - Volumen</i>
<i>VLP</i>	<i>Virus like Particles</i>
<i>WC</i>	<i>Watson y Crick</i>

CAPÍTULO I

1. Introducción

1.1 Virus

Un virus es un ente nanoscópico con una amplia capacidad infecciosa, carente de componentes celulares y limitado a sus capacidades estructurales pues están desprovistos de maquinarias para la síntesis de proteínas y producción de energía. Su replicación depende de la introducción de éste en las células hospederas que activan sus partículas virales.

La invención del microscopio en 1590 por Zacharias Janssen indujo a los científicos a comenzar a analizar aquello que se escapaba de la vista del ojo humano, permitiendo la identificación de vasos sanguíneos, espermatozoides, protozoos y hasta glóbulos rojos. Pero no fue hasta Robert Koch y Lois Pasteur que comenzó a considerarse la existencia de los gérmenes, entes microscópicos causantes de graves enfermedades.

Por su parte Adolf Mayer, químico alemán, observaba en 1886 la coloración moteada de las plantas de tabaco, a la que él nombró como enfermedad de Mosaico del Tabaco (*Tobacco Mosaic Virus - TMV*)(Bos, 1999). Incluso fue capaz de demostrar que al inyectar savia infectada a una planta sana era posible replicar la enfermedad. Es aquí donde al igual que Pasteur con la rabia, le resultó imposible demostrar que se trataba de algún agente infeccioso.

El botánico ruso Ivanoski retomó la cuestión planteada por Mayer y llevó la savia de la planta enferma al punto de ebullición demostrando de esta manera que era posible erradicar su capacidad infecciosa. Ambos, Ivanoski y Mayer, consideraban a las bacterias como causantes de la enfermedad del tabaco. Más tarde el holandés M.W. Beijerinck negaría la consideración de sus colegas y se dio a la tarea de exponer que el agente infeccioso se encontraba activo aún al traspasar filtros finos de porcelana, los cuales eran capaces de retener cualquier bacteria visible y al ser este

el caso, era posible reproducir la infección en un tejido vivo, esto le hizo llamar a tal savia como un *líquido contagioso (contagium vivum fluidum* (Bos, 1999)).

Con tal fenómeno intrigando a una gran cantidad de investigadores intentando describir catalogar esta enfermedad, el genetista alemán Erwin Baur, creó una discusión etiológica al respecto. Baur consideraba que en vista de la ausencia de *“cualquier tipo de organismo parásito foráneo”* lo que debía estar provocando el TMV no podía ser un *“ser vivo”* más bien una *“sustancia química capaz de asimilar sustancias extranjeras en orden de reconstruirse a sí misma a partir de ellas, a pesar de ser una sustancia aún desconocida para nosotros”*(Bos, 1999) y con ello nombró a tal sustancia como *virus*, suponiendo que este debía funcionar como un producto del metabolismo de la planta. Tal determinación sigue causando controversia sobre si los virus son o no seres vivos.

Después de las consideraciones de Baur que aclararon el panorama un poco, Beijerinck observó que la replicación del TMV solo era posible en tejidos en desarrollo, con lo que concluyó que el virus era intracelular y solo se mantenía activo mientras que el metabolismo de la célula huésped se mantuviera dinámico. Sin embargo además de la inoculación mecánica a edad temprana de la planta, se desconocía aún el modo en que se transmitía el virus; esta cuestión fue aclarada por F. Twort y F. d'Hérelle en 1915 y 1917 respectivamente, pues ambos descubrieron que algunos virus eran transferidos por fagos y que eran capaces de infectar incluso bacterias, ya que hasta entonces se consideraba a las enfermedades víricas dañinas solo para animales y vegetales (Churchill, 1990).

No obstante, sin la biología molecular, estos conocimientos se veían limitados y resultaba imposible comprender más a fondo la naturaleza de los virus, como su morfología, sus genes o sus componentes (Smith, 1977). Hasta este momento, los virus solo podían ser estudiados por su transmisibilidad de planta a planta o por su reacción con otras plantas (Bos, 1999). Para poder realizar cualquier análisis, como su observación o incluso el estudio de sus propiedades físicas, era primordial separar el virus de los constituyentes de la célula huésped, es decir el aislamiento del virus. Este procedimiento fue realizado por primera vez por el bioquímico

americano W. M. Stanley en 1935 al aislar de manera exitosa la proteína cristalizada del TMV (Bos, 1999) lo que permitió comprender a los virus como entidades genéticas verdaderas.

El avance en la microscopía electrónica sucedida en los años treinta del siglo pasado (Khan, 2014), contribuyó a la primera visualización de la morfología del virus cuando W. M. Stanley examinó el TMV y encontró que estaba hecho casi completamente de proteína (Peter J. Bowler, 2015) proporcionando información del tamaño y forma entre otras propiedades. Bernal y Fankuchen observaron que la alta concentración del virus provocaba un aumento en la birrefringencia en la luz polarizada del microscopio, lo que era provocado por una sustancia bien ordenada, esto animó a ambos investigadores a examinar el TMV en suspensión usando difracción de rayos X, permitiéndoles ser los primeros en establecer de manera detallada, el tamaño y la forma del virus, esto fue complementado con ayuda de Rosalind Franklin quien mostró que el TMV tenía de 17 a 18 subunidades proteicas que cubría vuelta a vuelta un RNA helicoidal (Rossmann, 2013). Con lo anterior, se concluyó que los virus eran sustancias homogéneas con una proteína de cápside que protegía un genoma viral.

1.1.1 Autoensamblaje de la proteína de cápside de TMV

Después de ser el primer virus en ser identificado y aislado, el TMV ha representado durante décadas y hasta la fecha, una plataforma para comprender la naturaleza de los virus helicoidales por su aparente simpleza en su estructura. Por lo que respecta a lo anterior; Fraenkel, Conrat y Williams demostraron en 1955 que una vez aislados la proteína de cápside y el RNA por separado, eran capaces de formar *in vitro*, viriones completamente infecciosos e indistinguibles de un virión nativo (Fraenkel-Conrat & Williams, 1955). A su vez Schramm y Zillig, establecieron la formación de cilindros huecos y otras estructuras, al suceder la agregación reversible de la proteína en ausencia de RNA, en función a la temperatura, pH y fuerza iónica

(Scramm et al., 1955), incluso al realizar los estudios de difracción de rayos X se reveló que estos cilindros libres de RNA tenían una estructura interna casi indiscernible de aquellos formados por la proteína de cápside del virus original (Simmons & Blout, 1960).

Los estudios previamente expuestos, incitaron a una serie de investigaciones impulsadas por esta premisa. En su caso, Caspar había sugerido que el polimorfismo de la proteína podría jugar un papel intermediario para el ensamblaje de un agregado helicoidal (Klug, 1999) Durham, Finch y A. Klug buscaron caracterizar todas los agregados de la proteína viral del TMV basados en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (MET), realizando un estudio a modo de barrido en un parámetro amplio de pH y fuerza iónica (Durham, Finch, & Klug, 1971) . Al recolectar esta información diseñaron el primer diagrama de fases de una proteína viral (Figura 1), impulsando con esto los estudios biofísicos en el área de la virología.

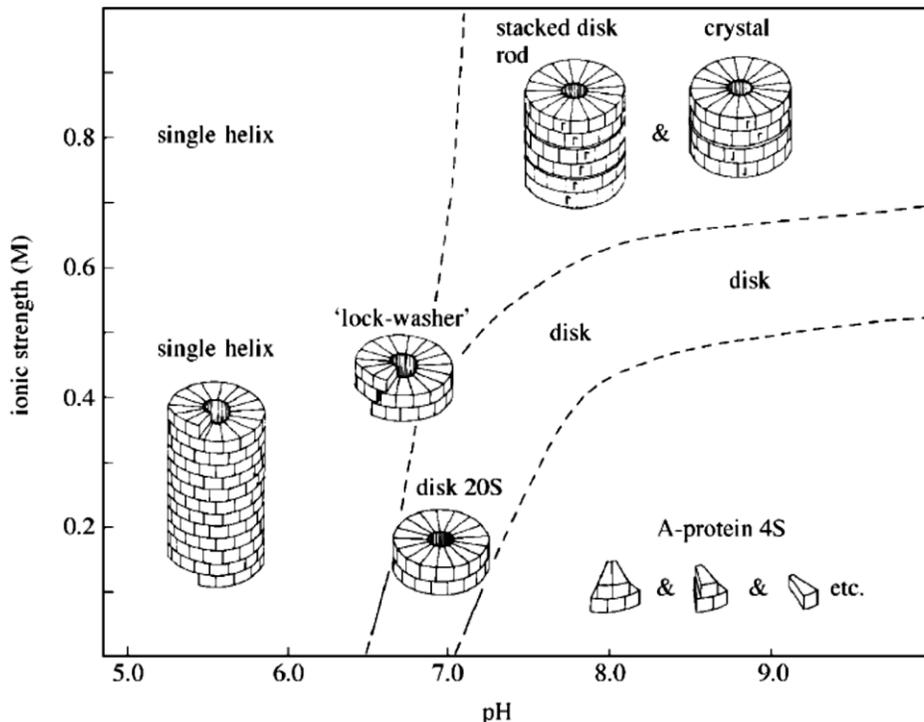


Figura 1 Diagrama de fases de la proteína del TMV mostrando las especies de proteína particulares que participan significativamente en el equilibrio del virus (Klug, 1999).

1.1.2 Diagrama de fases del *Cowpea Chlorotic Mottle Virus* de Bancroft y colaboradores

Una vez descubierta la capacidad polimórfica de la proteína viral del TMV, la cuestión se trasladó a los otros tipos de virus vegetales existentes, comenzando por aquellos icosaédricos, y fue impulsada por el equipo de Bancroft, Bracker y Wagner en 1969. Al inicio seleccionaron a tres integrantes de la familia de *Bromoviridae* como el virus del moteado clorótico del caupí (*Cowpea Chlorotic Mottle Virus* – CCMV), el virus del mosaico del bromus (*Brome Mosaic Virus* - BMV) y el virus moteado del haba (*Brome Bean Mottle Virus* - BBMV); por sus cualidades y características similares. Con ellos realizaron mezclas proteicas de los tres virus para determinar su capacidad de reensamblarse en presencia de soluciones amortiguadoras alternando condiciones iónicas (Bancroft, Bracker, & Wagner, 1969). Su estudio arrojó luz sobre las propiedades del CCMV para reensamblarse aún sin su ácido nucleico, siendo elegido sobre los demás para una investigación más detallada.

Los parámetros seleccionados para realizar sus estudios se basaron en tres factores: la fuerza iónica, el pH y la presencia de sales monovalentes y divalentes. Con ello lograron determinar los coeficientes de sedimentación del CCMV; los principios del hinchamiento de su cápside al ser dializada en pH neutro; así como las estructuras formadas por los agregados proteicos al reensamblarla bajo diversas condiciones de pH, fuerza iónica y NaCl. Como resultado de todo lo anterior, Bancroft y colaboradores diseñaron un bosquejo de un diagrama de fases mostrando el polimorfismo de la proteína del CCMV en presencia y ausencia de su genoma, bajo los factores establecidos (Bancroft, Hills, & Markham, 1967).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Realizar un estudio detallado del diagrama de fases de la proteína del Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV), para determinar las estructuras proteicas formadas al variar parámetros termodinámicos como el pH y su interacción con sales monovalentes y divalentes.

2.1.1 Objetivos particulares

- Amplificar el virus de CCMV a partir de la infección de plantas específicas utilizando alícuotas del virus CCMV con la finalidad de replicarlo.
- Purificar el virus del CCMV extrayéndolo de los tejidos vegetales.
- Aislar la proteína del CCMV mediante la separación del RNA del virus con alto grado de pureza.
- Reensamblar de la proteína viral en buffers con sales monovalentes y divalentes a diferentes pH y fuerza iónica.
- Analizar y caracterizar las estructuras obtenidas mediante MET.

3. Fundamento teórico

Los virus como entidades infecciosas han sido estudiados muy ampliamente y sus características estructurales los hacen factibles para su uso como medio de transporte intracelular de diversos materiales. Para exponer tales características, es importante definir algunos conceptos básicos que resultan necesarios para la comprensión de las propiedades de los virus y más específicamente, la proteína del CCMV.

La denominación virus se ha derivado del latín que significa líquido limoso o veneno y fue denominado de esta manera a cualquier agente infeccioso y por mucho tiempo, hasta fines del siglo XVIII, sin embargo, hoy en día se conoce como virus solamente a aquellos agentes filtrables o capaces de atravesar los filtros bacteriológicos más finos de aquella época.

El siglo XX trajo consigo el nacimiento de la invención del microscopio electrónico y la cristalografía de rayos X, dos herramientas que ayudaron al nacimiento de la virología. Además, se descubrió el eficiente uso del embrión de pollo como medio de cultivo, que permitió la replicación *in vitro* de entidades infecciosas. Los adelantos tecnológicos y el nacimiento de nuevas técnicas abrieron esta vasta área de investigación que ha ofrecido como resultado el descubrimiento de nuevas enfermedades, sus agentes causales, su control y medios para evitarlas (Romero Carbello, 2007)

3.1 Virus y sus propiedades.

Los virus han causado y siguen causando el deceso de millones de personas al año, sin considerar los otros tipos de organismos que afectan para su replicación, como plantas y bacterias.

A continuación, estudiaremos algunas de sus características:

Los virus son más grandes que una molécula, pero más pequeños que una célula, lo que los convierte en partículas infecciosas con un tamaño que oscila entre los 20 a 300 nm y en algunos casos hasta más grandes.

Están constituidos de forma relativamente simple, pues tan solo tienen un tipo de ácido nucleico y proteínas, algunas veces otros virus denominados envueltos, presentan una envoltura de lipoproteínas o de lipoproteínas insertadas en una bicapa lipídica que rodea la cápside. Incluso, puede llegar a tener una estructura más compleja, como es el caso de los bacteriófagos. La unidad infecciosa completa es denominada virión.

Las proteínas virales son específicamente codificadas por el genoma viral durante su ciclo de replicación y crean cubiertas proteicas que se ensamblan formando cápsides, encargadas de rodear y proteger o estabilizar el ácido nucleico viral contra agentes degradantes de genomas de la célula hospedera, protegiéndolo también del entrono extracelular y que facilita la penetración del virus en la célula.

No tienen núcleo, ribosomas o sistemas generadores de energía, tampoco organelos de locomoción, lo que les obliga a ser parásitos intracelulares de un huésped. El rango de hospedador para un virus específico puede ser muy amplio o limitado, sin embargo, sabemos que es posible que se reproduzcan en bacterias, parásitos, plantas o animales, incluido el humano. (Brooks, Butel, Carroll, Mietzner, & Morse, 2011)

Dada la simpleza de su estructura, carecen de la capacidad de multiplicarse y deben infectar células vivas para secuestrar sus maquinarias metabólicas, es entonces cuando logran sintetizar los componentes que necesitan para replicarse.

Cada partícula vírica de una misma especie resulta geométricamente precisa e idéntica, permitiéndole ordenarse en forma tridimensional regular y periódica, lo que le compete una propiedad cristalizante, tal cual fue descubierta en 1935 por W. Stanley (Bos, 1999)

3.2 Componentes virales

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas que posee un virus dependen íntegramente de la organización de las macromoléculas que le componen. Estas macromoléculas son el DNA o RNA (nunca ambos), proteínas, lípidos e hidratos de carbono. La combinación entre ellas nos ayuda a conocer parte de la morfología de los virus, lo que las distingue de una célula microbiana.

A continuación, se describe algunas de ellas:

Nucleoide o genoma: Parte central del virus constituido por ácido nucleico, en formación de una o doble cadena (monocatenarios o bicatenarios) y pueden estar dispuesto en forma lineal, circular o en segmentos.

Proteínas virales: Sintetizadas en base a la información genética contenida en el genoma viral, les otorga propiedades y diversas funciones biológicas, entre ellas la infectividad del virus. Los virus más simples contienen solo RNA o DNA suficiente para codificar al menos cuatro proteínas, pero existen algunos más complejos que son capaces de codificar 100 – 200 proteínas.

Lípidos y carbohidratos: La membrana viral es considerada como una bicapa de lípidos, formada por fosfolípidos y proteínas, estas son llamadas glicoproteínas y se proyectan hacia el exterior (espículas), las cuales tienen la función de reconocimiento de receptores de la célula lo que favorece la absorción del virión en la célula huésped. Es por ello que los lípidos se encuentran en la envoltura viral confiriéndoles cierto grado de fluidez, la cual debe ser menor en el virus respecto a la célula huésped (Manuel Vargas Córdoba, 2009).

Los carbohidratos por su parte manejan dos tipos de asociación con la estructura viral, la primera es directa con los lípidos, formando *glicolípidos*, y la segunda es uniéndose a las proteínas para formar *glicoproteínas*. Es después de la asociación que se adicionan al retículo endoplásmico granuloso a través de un proceso de translocación traslacional. Posteriormente en el aparato de Golgi, el proceso de empaquetamiento termina y en él se adicionan otros residuos de carbohidratos

como la galactosa, la fructuosa, entre otros. Los carbohidratos también suelen jugar un papel de enmascaramiento de los epítopes antigénicos, como lo que sucede en el virus de la influenza. (Manuel Vargas Córdoba, 2009)

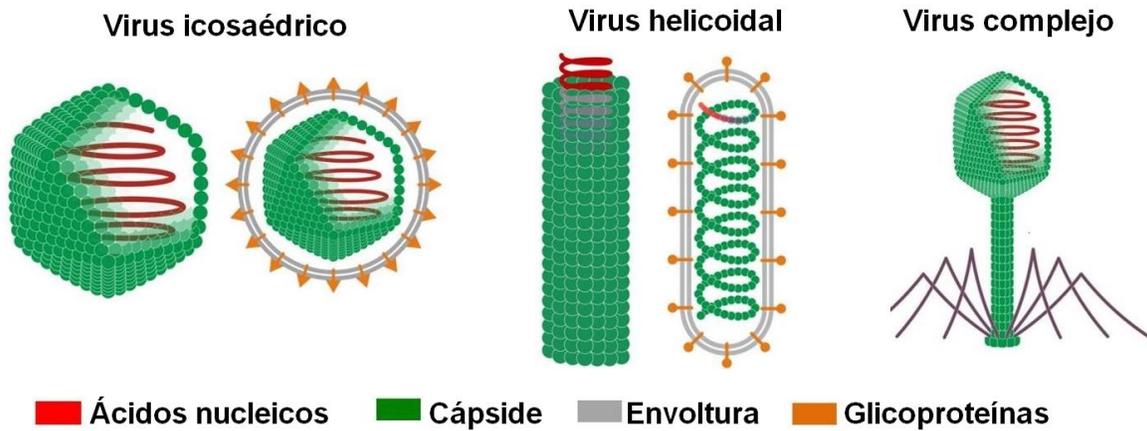


Figura 2 Representación esquemática de los tipos de estructuras virales.

3.2.1 Proceso de replicación de un virus

El particular proceso de replicación de un virus depende íntegramente de la invasión de una célula huésped, así como la dirección de la maquinaria metabólica del huésped para producir enzimas y componentes vitales, es entonces cuando se producen muchas copias en el interior de la célula. Quizás sea esto la mayor diferencia existente a las bacterias, pues estas tan solo son capaces de producir dos de sí misma, mientras que un virus es capaz de generar hasta 100.000 copias.

A continuación, enumeramos los pasos de la replicación viral.

- i. **Adsorción:** Se trata de la unión del virus con la membrana celular y existen diversas particularidades para esta etapa, pero se pueden identificar por la morfología del virus (envuelto o desnudo) o por el tipo de huésped (vegetal o animal). De acuerdo con la morfología podemos

hablar de cuando se trata de un virus envuelto. Aquí es posible que la penetración sea por fusión con la membrana plasmática, permitiendo que los componentes internos del virión entren en contacto inmediato con el citoplasma celular. También puede ocurrir que ingrese mediante endosomas, es por ello por lo que algunos virus envueltos cuentan con un pH ácido que favorece la fusión; a medida que los endosomas se tornan ácidos, las proteínas virales se activan y se fusionan con la membrana. Por otro lado un virus desnudo es capaz de atravesar la membrana plasmática directamente o con ayuda de los endosomas en cuyo caso cruzan (o destruyen) la membrana de dichas estructuras (Hunt, 2017).

En cuanto al tipo de huésped, encontramos que para el virus vegetal su adsorción implica un ingreso pasivo del virión a través de heridas entre la cutícula y la pared celular, causadas por daño mecánico (inducidas por prácticas agrícolas) o por organismos llamados vectores (bacterias, hongos, nematodos o artrópodos). Mientras que para el virus animal depende íntegramente de los receptores que son los componentes complementarios con las propiedades fisicoquímicas del virus, por lo general son de naturaleza glucoproteíca. Los receptores glucoproteicos también son los responsables de concentración iónica, que reduce la repulsión electrostática con la célula (Romero Carbello, 2007).

Este paso involucra el tropismo del virus, es decir la capacidad de éste para ser selectivo respecto al tipo de células de un órgano o un tejido y su habilidad para causar infecciones localizadas o generalizadas. La afinidad está dada por las pequeñas secuencias de aminoácidos localizadas en un solo péptido que marca un sitio específico en la membrana, identificándolo como una zona permisiva o por zonas antigénicas secuenciales que pertenecen a varias proteínas virales (Manuel Vargas Córdoba, 2009).

- ii. **Penetración:** Se considera como el paso de la partícula viral hacia el interior de la célula y generalmente se realiza de tres formas distintas, la primera es la *penetración directa*, en el cual tan solo el material genético

es introducido (asociado a los bacteriófagos); el segundo es la *endocitosis* o *viropexis*, que consiste en la formación de una vesícula o vacuola a consecuencia de fagocitosis que engloba al virus y lo penetra en la célula (mecanismo común en los virus sin envoltura); y el tercero es la *fusión* en el cual los virus con envoltura logran fusionarse íntegramente con los componentes de la membrana celular (Negroni, 2009).

- iii. **Latencia o “eclipse”:** Es llamado de esta forma puesto que el virus logra penetrar completamente la célula hasta “desaparecer” sin dejar algún rastro de sí mismo. Es conocido también como decapsidación o desnudamiento del ácido nucleico que se apodera de la maquinaria celular y se dedica a la síntesis de nuevos virus. Este proceso provoca la pérdida de la estabilidad estructural de la cápside viral y su fusión con la membrana celular.
- iv. **Maduración y síntesis:** Consiste en la producción de proteínas virales que participan en la replicación de los ácidos nucleicos y la formación de nuevas nucleocápsides. Para codificar el genoma, los virus deben mostrar a la célula la proteína que sea reconocible por un RNA mensajero es producido por el virus en el núcleo y todos ellos deben desarrollar sus propias enzimas para generarlo y de esta manera encausarlo a cada gen. Es entonces cuando el código de los genes virales es incluido en el genoma celular, existe aquí una clasificación dependiendo de su integración. Son conocidos como monopartitas cuando están distribuidos en varios cromosomas. Es así como se ensamblan todos los componentes y se constituyen los nuevos virus, que pueden llegar a permanecer dentro de la célula el tiempo suficiente para madurar.
- v. **Liberación:** Es este el paso en el que sucede la liberación de los viriones y se conocen dos procesos para ello. El primero consiste en la *citólisis*, es decir, la muerte de la célula y el segundo es conocido como *exocitosis* o *gemación*, que no produce un daño a la célula, pero conlleva una infección latente. Durante este proceso el virión atraviesa la membrana celular por sitios que previamente ha codificado, lo que crea una evaginación, durante la cual el virión se lleva consigo componentes de la

membrana para crearse una envoltura lipídica viral (Manuel Vargas Córdoba, 2009).

Con los virus desnudos el proceso requiere de una desintegración celular pues su ensamble, maduración y adquisición de su capacidad infectante sucede íntegramente dentro de la célula. Mientras que los virus envueltos, previo al ensamble se unen a la membrana celular y brotan a través de ella. Sin embargo, al salir de la célula modifican la especificidad antigénica de está volviéndola un blanco del sistema inmunológico del huésped (Romero Carbello, 2007).

3.2.2 Clasificación de los virus

Las características de los virus pueden variar drásticamente en comparación a otro si tan solo se toman en cuenta algunas particularidades, por ejemplo, el tipo de células que infectan o el tipo de secuencia del ácido nucleico. Es por ello por lo que la clasificación de los virus puede reflejar alguna peculiaridad puntual o el sitio donde han sido encontrados, su finalidad es integrarlos en un sistema taxonómico.

A pesar de que han existido variados intentos de clasificación de virus a través de la historia, el descubrimiento constante de nuevos especímenes ha retrasado bastante este logro. Actualmente el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses*), ha intentado por varios años conseguir una clasificación universal que logre regular la descripción formal de las cepas nuevas y las ya conocidas, dicha clasificación está basada en el trabajo de Robert Horn, Paul Tourpier, y André Lwoff. De esta manera un virus puede ser nombrado de acuerdo con un orden (-virales), familia (-*viridae*), subfamilia (-*virinae*), género (-*virus*) y especie (-virus)

Existe otro método propuesto por el laureado premio Nobel de Medicina, David Baltimore, quien clasifica los virus de acuerdo con el tipo de ácido nucleico (ADN o ARN) y su modo de expresión génica. Podría decirse que ambos criterios podrían integrarse entre sí, pues el ICTV incluye criterios presentes en la clasificación de

Baltimore. Incluso es posible clasificar los virus por el tipo de cápside (helicoidal, esférica o cilíndrica) o según el tipo de huésped al que atacan, como bacterias, vegetales o animales.

3.2.3 Geometría de cápside

Las partículas virales pueden ser distinguidas por varios componentes fundamentales que se ensamblan en el interior de la célula, su estructura resulta de la interacción de un gran número de unidades químicas idénticas. La cápside viral protege el material genético de una degradación lítica que compromete la supervivencia del virus. Considerando lo limitado es el material genético, resulta necesario ejercer una eficiencia sobre la traducción en proteínas virales, es por ello por lo que estas proteínas adquieren a una simetría mediante el uso de varias copias de sí mismas, o creando otras proteínas que puedan emplear varias conformaciones.

i. Virus helicoidales

De apariencia semejante a la de un bastón o barra, los virus helicoidales poseen un solo tipo de capsómeros que se autoensamblan en una estructura cilíndrica en torno a un eje central donde se encuentra el RNA monocatenario (en pocas ocasiones se trata de un DNA monocatenario), su unión depende de la interacción de cargas negativa y positiva entre el material genético y la proteína, respectivamente. De acuerdo con estas cargas, las estructuras pueden ser cortas o largas, flexibles o bastantes rígidas; para su descripción se utiliza un diámetro (d), una altura de la subunidad (p) y el número de unidades en la estructura.

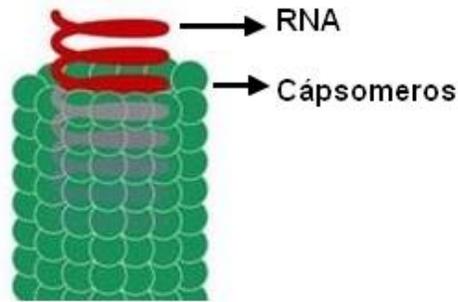


Figura 3 Componentes de un virus helicoidal.

ii. Virus icosaédricos

Una estructura icosaédrica está formada por un poliedro de 20 caras triangulares equiláteras con 12 vértices, por lo que tiene 6 ejes de simetría quíntuple que pasan a través de pares de vértices opuestos: 10 ejes de simetría triple que pasan a través del centro de las caras, 15 ejes de simetría binaria, a través de los puntos medios de las aristas, como se muestra en la Figura 4.

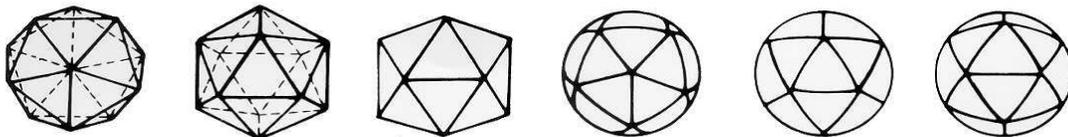


Figura 4 Representación de una disposición icosaédrica.

En una cápside viral, tal arreglo está formado por unidades globulares de proteína ensambladas en pentámeros (5 proteínas) generalmente ubicados en los vértices, y hexámeros (6 proteínas) que se asocian para formar caras y bordes del icosaedro. Están afilados por enlaces no covalentes encerrados al ácido nucleico. Esta estructura le confiere una apariencia esférica de fácil reconocimiento en el microscopio como se muestra en la Figura 5.

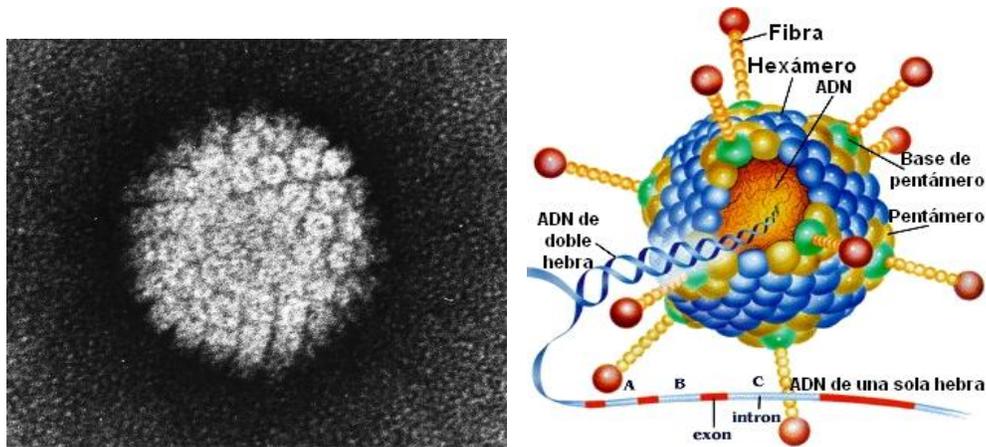


Figura 5 A la derecha micrografía del Virus de Papiloma Humano; a la izquierda: descripción de los componentes de un virus icosaédrico.

iii. Virus complejos

La complejidad de estos virus reside en la combinación de dos estructuras comunes, poseen una cápside icosaédrica encargada de proteger el ácido nucleico y tiene una cola con una estructura helicoidal hueca, además conserva un collar de capsómeros a lo largo de la cabeza y la cola, donde termina con una placa basal; al final de la cola tiene unos puntos de anclaje para una menor fijación sobre la membrana celular de huésped. Generalmente, estos virus meten su genoma por medio de un motor biológico, de tal manera que la cápside se encuentra a una alta presión, la cual puede ser del orden de 40 atm de presión. Esto permite que cuando el virus encuentra su receptor en la membrana, la cola se abre y el genoma es inyectado ayudado por su alta presión a la que se encuentra. Esta descripción es la más común en los bacteriófagos, se muestra en la Figura 6.

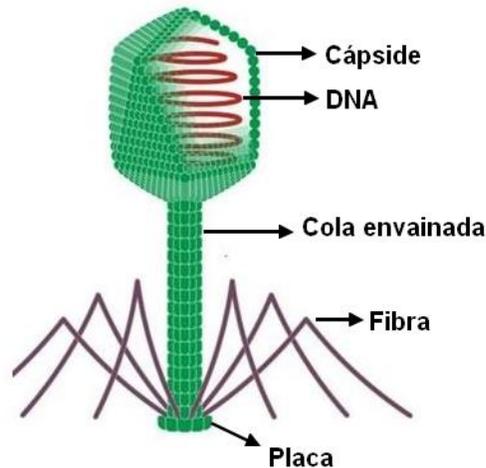


Figura 6 Componentes de un virus complejo

3.2.4 Número de triangulación

Con la cristalografía de rayos X se hicieron las primeras predicciones de la geometría de los virus, suponiendo que la mayoría de ellos eran esféricos o superiores a los 200 Å y que además tenían una cápside proteica que protegía una carga genética. En 1953 Watson y Crick (WC) descubrieron que la secuencia de ADN era la encargada de codificar la proteína que debía cubrir y proteger el genoma, sin embargo, estas subunidades proteicas deberían ser idénticas para rodearlo, por lo tanto, también tendrían entornos idénticos. La suposición de WC establecía que, si bien la cápside viral debería ser casi esférica, esto correspondería a una simetría de poliedros regulares. Discutían que solo una simetría distintiva de este poliedro poseería caras idénticas, vértices idénticos y puntos de encuentro igual al mismo número de caras, así como orillas equivalentes y sus líneas se unirían en vértices adyacentes. La selección arrojaba la formación icosaédrica con 20 caras triangulares con 3 dobleces simétricos y 30 orillas con 2 dobleces simétricos.

Dicha suposición fue más tarde confirmada por Caspar y Klug (CK) en 1956 al analizar patrones de difracción de rayos X en cristales de virus esféricos de plantas, sin embargo, existía una discordancia entre lo propuesto por WC y lo obtenido por

CK. Los primeros establecían que para obtener una cápside esférica la simetría se debería a 60 subunidades proteicas acomodadas en poliedros regulares; sin embargo, CK hicieron la observación de que la mayoría de los virus esféricos excedían con creces esa cantidad de subunidades. Para resolver esa complicación, ellos sugirieron que las subunidades idénticas podrían adaptarse a entornos ligeramente diferentes, para ello realizaron un esquema (Véase Figura 7) basado seis subunidades hexaméricas en contacto entre sí (hexámeros) y cinco subunidades en un pentámeros (pentones). En este esquema, los pentones formarían 12 vértices icosaédricos, mientras que los hexones cubrirían las 20 caras icosaédricas.

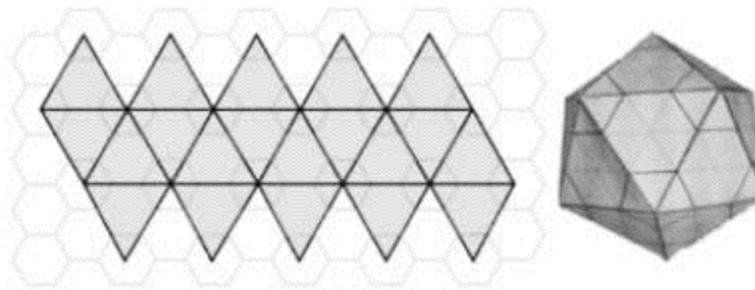


Figura 7 A la izquierda, construcción de un icosaedro en un modelo plano de red hexagonal. La red consiste en 20 triángulos equiláteros. A la derecha, icosaedro formado con el modelo de red hexagonal.

Para comprender más ampliamente este esquema, se estableció que T (número de triangulación) representa el número de subunidades estructuradas de manera similar por unidad asimétrica icosaédrica, los posibles valores de T que permitirían a cada subunidad tener un entorno similar se limitarían:

$$T = h^2 + hk + k^2$$

Donde h y k cuentan el número de hexones entre pentones a lo largo de los ejes h y k de una matriz hexagonal. T toma valores discretos como 1,3,4,7, etc. mientras que h y k son cero o enteros positivos. En la mayoría de los casos, la geometría

icosaédrica que presentan las cápsides virales es descrita por medio del número de triangulación T , sin embargo, CK se percataron que distintos números de triangulación podían presentar propiedades geométricas y físicas similares, por lo que podían ser reagrupados en “clases” a las cuales llamaron *clase P*. Estas están caracterizadas por un par de números h_0 y k_0 , los cuales ayudan a la reclasificación de los distintos números de triangulación en sus respectivas clases, como ejemplos notables, para pares irreducibles de tipo $(0, h_0)$ y $(k_0, 0)$ tenemos que $P=1$, para pares de tipo (h,h) obtenemos $P=3$, para otras configuraciones obtenemos $P>3$, donde estas estructuras presentan formaciones quirales las cuales a su vez pueden ser descritas por medio de la letra *l* (*levógiras*), para los casos en los que $h>k$, o con la letra *d* (*dextrógiras*), para los casos con $k>h$, esta nueva clasificación resulta de importancia, puesto que las cápsides que forman parte de la misma clase tienen una distribución análoga de capsómeros a lo largo de su geometría.

Sin embargo es importante mencionar que si bien la mayoría de las descripciones de cápsides icosaédricas está hecha en base a su número de triangulación o a su clase P , estas descripciones pueden verse comprometidas en algunos casos especiales, puesto que para números de triangulación altos ($T \geq 49$), múltiples pares de números h y k pueden dar origen a un mismo número T sin que dichos pares correspondan a la misma clase P , lo mismo ocurre en el caso inverso, en el cual distintos pares h y k pertenecen a una misma clase P pero a diferentes números T , a este fenómeno se le conoce como la degeneración del número de triangulación, y es por ello que si se está tratando con cápsides de alto número de triangulación, su geometría sea descrita unívocamente a través de sus números h y k en lugar de los números T o P .

3.2.5 Termodinámica del ensamblaje viral.

Si bien el ensamblaje de la cápside viral es un proceso que ocurre normalmente de manera “espontánea”, dada la naturaleza de su estructura, la cual está conformada

por múltiples copias de las mismas subunidades base, y tal como se mencionó en el capítulo referente al análisis de su geometría, estas subunidades pueden formar múltiples estructuras “estables” distintas, que sin embargo no resultan de utilidad para el virus, pues se requiere de una conformación específica para que pueda ser considerado funcional, es por ello que si bien se trata de un proceso espontaneo, deben existir una serie de condiciones que regulen el ensamblaje de tal forma que al final del proceso, se tenga una cápside funcional.

Termodinámicamente hablando, como cualquier otro proceso espontaneo, se requiere que la energía libre del sistema se encuentre en un mínimo una vez el proceso ha terminado. En este caso esto significa que la energía del sistema una vez que las cápsides virales se encuentran ensambladas será menor que cuando solo se tienen subunidades libre (Perlmutter & Hagan, 2015; A. Zlotnick & Katen, 2009). Esto nos lleva a nuestra primer constricción para la formación correcta de una cápside, donde la energía libre del sistema (F_{EC}) esta dada por (Hagan, 2014):

$$F_{EC}/k_B T = \sum_{n=1}^N k_B T \rho_n [\log(\rho_n v_0) - 1] + \rho_n G_n^{cap}$$

Donde v_0 es el volumen de nuestro sistema, ρ_n es la densidad de estructuras intermedias con n subunidades, y G_n^{cap} denota la energía libre de interacción de estas estructuras intermedias, donde la energía libre de interacción depende de las múltiples degeneraciones posibles para las subunidades y puede ser modelada por:

$$G_n^{cap}(g_b) = \sum_{j=1}^n (n_j^c g_b) - T S_n^{degen}$$

Con n_j^c el numero de nuevos contactos subunidad-subunidad que forma la subunidad j al unirse a la estructura intermedia, g_b es la energía libre del contacto en cuestión, y S_n^{degen} corresponde al número de distintas formas (degeneraciones) en las que las subunidades puedes unirse o separarse de las estructuras intermedias, este término depende de la geometría específica de la cápside. La energía libre de contacto g_b a su vez depende también de la temperatura, fuerza iónica y pH de nuestro sistema.

Para obtener una simplificación de este modelo, tenemos que buscar los puntos de equilibrio de este, y una de las constricciones de este sistema nos indica que la concentración de subunidades se mantiene constante, esto lo obtenemos de minimizar la energía libre del sistema (F_{EC}) con la restricción dada, con lo que obtenemos:

$$\sum_{n=1}^N n\rho_n = \rho_T$$

Con ρ_T la concentración total de subunidades, con este resultado se obtiene la ley de masas del sistema para la concentración de estructuras intermedias:

$$\rho_0 v_0 = \exp[-\beta(G_n^{cap} - n\mu)]$$

$$\mu = k_B T \log(v_0 \rho_1)$$

Donde μ es el potencial químico de las subunidades libres y $\beta = -1/k_B T$. Por simplicidad y como resultado de las contracciones antes mencionadas, se considera que, en un estado de equilibrio, solo existen subunidades libres o cápsides completas, por lo que la concentración total de subunidades ρ_T se puede escribir como:

$$\rho_T = \rho_1 + N\rho_N$$

Se define también la fracción de subunidades que se encuentran en las cápsides como

$$f_c = N\rho_N/\rho_T$$

Si se combinan las ecuaciones para la concentración de estructuras intermedias y se tiene en cuenta las condiciones impuestas por el equilibrio, se obtiene que:

$$\frac{f_c}{1-f_c} = N(v_0 \rho_T)^{N-1} \exp[-\beta G_n^{cap}]$$

Analizando esta ecuación para $N \gg 1$, se obtienen las siguientes expresiones:

$$f_c \approx \left(\frac{\rho_T}{\rho^*}\right)^N \ll 1 \text{ para } \rho_T \ll \rho^*$$

$$f_c \approx 1 - \frac{\rho^*}{\rho_T} \text{ para } \rho_T \gg \rho^*$$

Donde ρ^* representa la concentración crítica de subunidades, lo cual quiere decir que para sistemas en los que su concentración inicial se encuentre por debajo de esta concentración crítica, no se presentara la formación de cápsides virales. Esto resulta hasta cierto punto intuitivo, puesto que si se tiene una mayor concentración proteica, se tendrá un mayor número de interacciones específicas subunidad-subunidad, lo cual a su vez afecta la energía libre del sistema y promueve la libre formación de las cápsides, es importante mencionar que tal como se puede analizar en las ecuaciones anteriores, estos procesos debidos a las interacciones específicas de las subunidades, puede también verse afectado por la temperatura del sistema, lo cual también indica que estas interacciones son principalmente de naturaleza hidrófoba.

Dando un panorama general, podemos resumir el ensamblaje de las cápsides virales con un enfoque termodinámico de la siguiente forma:

- *Preparación inicial del sistema*, cuyo factor importante a monitorear es la concentración proteica.
- *Concentración proteica menor a concentración crítica*, donde en consecuencia, no se presenta ensamblaje.
- *Concentración proteica mayor a la concentración crítica*, iniciando la formación de cápsides.
- *Iniciación de la agregación proteica*, provocada por las interacciones específicas subunidad-subunidad.
- *Inicio de la formación de agregados mayores a las subunidades*, debido a las fuerzas electrostáticas presentes.
- *Agregación de nuevas subunidades a las estructuras intermedias existentes*; al ser fuerzas reguladoras, distintos factores (fuerza iónica, pH, temperatura) afectan la forma en la que interaccionan.
- *Unión persistente de subunidades proteicas hasta lograr un mínimo de energía libre*.

Una vez que el sistema ha llegado a su mínimo de energía libre, se pueden analizar las estructuras formadas por las interacciones entre las subunidades, y de esta forma realizar una valoración de los efectos que tiene la variación de los parámetros limitantes en la correcta formación y ensamblaje de las cápsides.

3.3 Cowpea Chlorotic Mottle Virus

El Cowpea Chlorotic Mottle virus (por sus siglas en inglés: CCMV) es perteneciente al género *Bromovirus*, familia *Bromoviridae* que incluye otros dos miembros como el Broad Bean Mottle Virus (BBMV) y el Brome Mosaic Virus (BMV). Es un virus de RNA de cadena sencilla que provoca un importante daño en los cultivos de leguminosas a nivel mundial.

El virus es transmitido por un vector o por inoculación mecánica a su hospedero natural el frijol “California Black Eye” Los vectores naturales son insectos artrópodos del orden *Cloptera rificornis Olivier*, *Ceratoma trifucata*, *Diabrotica balteata*, *Diabrotica undecimpunctata howardii* (Mello, Clark, & Perry, 2010). El virus provoca en las plantas síntomas como lesiones necróticas locales, rayas, mosaico sistémico moteados o manchas amarillas (Kuhn, 1979).

Los viriones del CCMV son partículas formadas por 180 subunidades proteínicas de un peso molecular de 20 kDa idénticas (del cual un 23.7% es ácido nucleico y 76.3% es proteína), agrupadas en 12 pentámeros y 20 hexámeros (Speir, Munshi, Wang, Baker, & Johnson, 1995a), las cuales se agrupan para generar una cápside icosaédrica intacta con un número de triangulación $T=3$. Su diámetro exterior es de aproximadamente 28 nm, mientras que su diámetro interior es de 21 nm (a pH de 4.7) Figura 8. Ésta contiene tres especies de RNA genómico y un RNA 4 derivado de un RNA 3, con un tamaño total de genoma de 8942 nucleótidos (Ali & Roossinck, 2007).

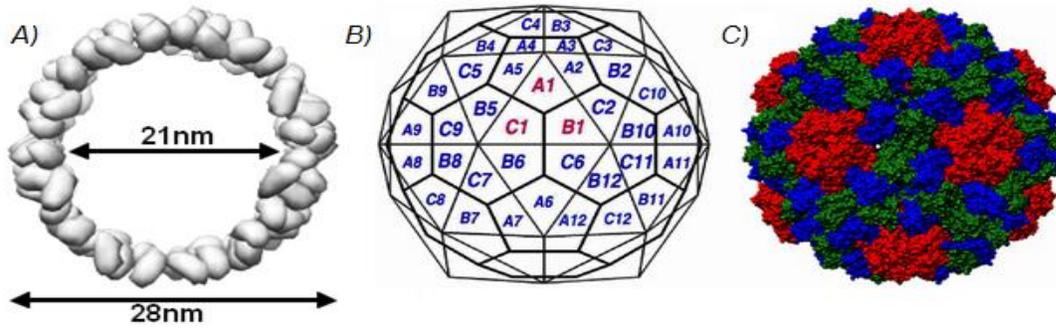


Figura 8 a) Diámetros interior y exterior del CCMV. b) Estructura icosaédrica idealizada del CCMV T=3, mostrando tres subunidades asimétricas A1, B1 y C1. c) Estructura del CCMV de T=3 con subunidades asimétricas coloreadas de rojo, azul y verde.

La característica estructural del CCMV más importante es que en un pH de bajo a moderadamente alto, desarrolla un hinchamiento reversible, resultado en un incremento de aproximadamente el 10% del tamaño del virus. Esta transición resulta al cambiar el pH de 5 a 7.5 con una expansión considerable, lo cual causa la formación de 60 entradas separadas, cada una de aproximadamente 20 Å en diámetro, en la cápside de la proteína.

En cuanto a los coeficientes de sedimentación del virus CCMV, se presenta una variación en presencia de iones de calcio. Sin ellos presenta un coeficiente de 88.3 S (correspondiente a 10^{-13} segundos) en un rango de pH de 3 a 6 y 77.8 S a pH 7, tal comportamiento se debe a que a un pH mayor a 6.5 provoca un hinchamiento (Véase Figura 9) y esto disminuye su velocidad de sedimentación (Bancroft & Hiebert, 1967). El punto isoeléctrico (pH al cual la carga eléctrica neta de la superficie es cero) del virus es de 3.7 a una fuerza iónica de 0.1 M.

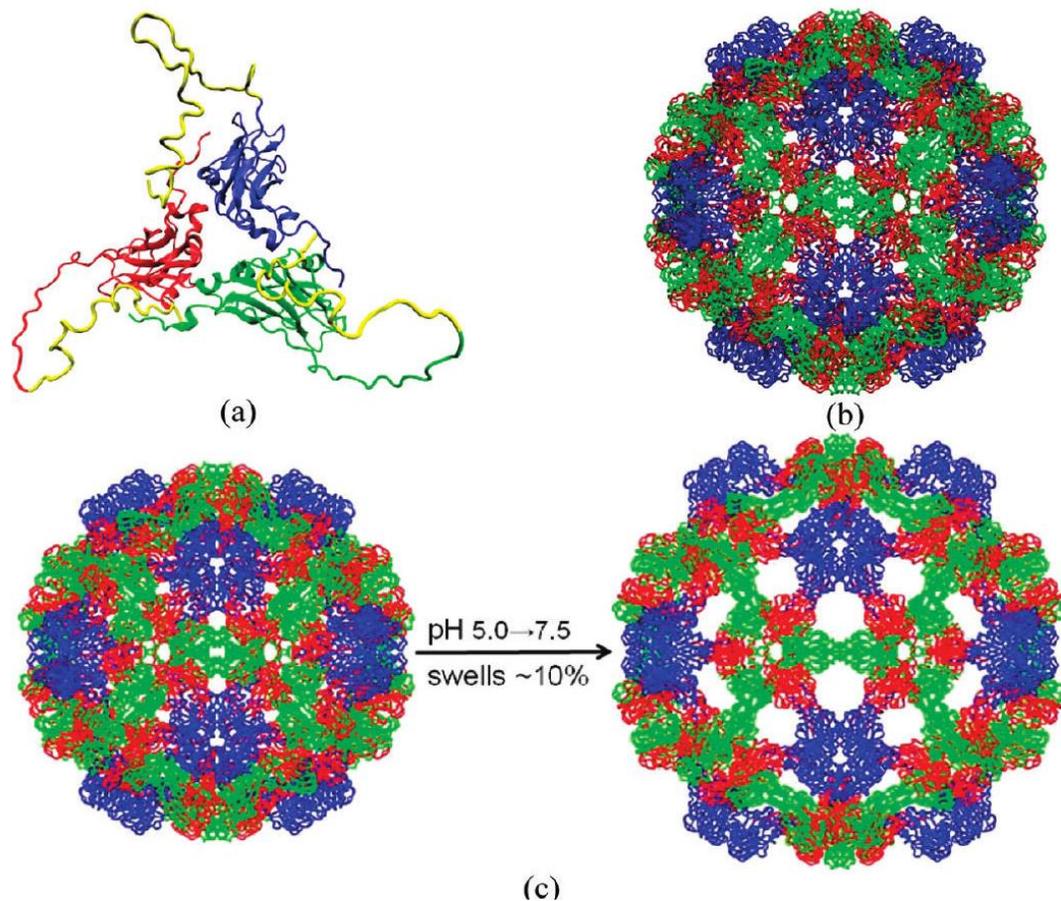


Figura 9 a) Estructura cristalina de rayos X, subunidades proteicas (rojo, azul y verde cada una) y la amino terminal (amarillo); b) CCMV nativo organizado en 12 pentámeros (5 subunidades azul) y 20 hexámeros (3 subunidades rojas y 3 verdes); c) el virus nativo hinchándose 10% en dimensiones al aumentar el pH de 5 a 7.5 en la ausencia de cationes divalentes (Miao, Johnson, & Ortoleva, 2010).

Gracias a sus propiedades el CCMV constituye un sistema modelo para el estudio de ensamble desde que fue el primer virus icosaédrico reensamblado *in vitro* en un virión infeccioso a partir de sus componentes nativos purificados, así como también se pueden reensamblar las proteínas de su cápside en cápsides vacías (Laurence Lavelle, Michel, & Gingery, 2007).

3.3.1 Infectividad del virus

Uno de los efectos de mayor importancia después del descubrimiento de los virus fue determinar sus síntomas e infectividad. En el caso del CCMV los estudios al respecto fueron realizados por Kuhn en 1965, concluyendo que la efectividad de la infección era dependiente de la edad de la planta inoculada, además del incremento de la concentración de las partículas virales después del primer día de inoculación hasta llegar a un máximo de 10 días antes de decrecer lentamente (Kuhn, 1965).

Para cuantificar la infectividad es necesario identificar el número de lesiones cloróticas por hoja de planta infectada. Si se realiza una infectividad sistemática en nuevas plantas, es posible que la calidad de la infección del CCMV no se deteriore genéticamente durante todo el tiempo de infección. Sin embargo, sí existe un declive que comienza a los 2 o 3 días después de la inoculación hasta alcanzar un 5% del valor inicial después de un mes. Otro factor de la infectividad es la temperatura ambiental en donde se encuentre la planta inoculada, pues existe un incremento a los 16°C y decae al alcanzar los 33°C.

En cuanto a los procesos secundarios a los que puede ser sometido el virión del CCMV en el proceso de hinchamiento también refleja un efecto en la infectividad del virus (Laurence Lavelle et al., 2007). Se considera que el hinchamiento de la partícula viral a pH 6 o menores conserva puentes de hidrógeno en subunidades adyacentes de los grupos carboxilos en los aminoácidos de la proteína (Bancroft et al., 1969), sin embargo, al acercarse a la neutralidad el grupo carboxilo se ioniza provocando repulsión entre los grupos carboxilo que induce el hinchamiento en presencia de iones de calcio. Es posible dializar el CCMV sustituyendo el calcio con magnesio u otros cationes divalentes, y esto les permite la infectividad del virus (Jacrot, 1975).

3.3.2 Propiedades de la proteína del CCMV

La proteína de cápside del CCMV muestra una geometría de $T=3$, además de una estructura de cristalografía de 3.2 Å como se ha demostrado por cristalografía de rayos X. En su cuasi-simetría tiene 12 pentámeros y 20 hexámeros conocidos como capsómeros. Sus subunidades proteicas adoptan una estructura de láminas β en los aminoácidos del 27-49 y 179-190, estas laminas se extienden hasta los extremos amino y carboxilo, donde su rol principal es permitir la estructura cuaternaria (Speir et al., 1995a). Es en el extremo carboxilo donde se tienen múltiples residuos de ácido aspártico (D) otorgándole un carácter negativo que resulta útil en las interacciones proteína-proteína. Los residuos del 1-26 contribuyen en la unión del RNA negativo, puesto que posee 6 residuos de Arginina y 3 residuos de Lisina volviendo esta zona altamente positiva, como se muestra en la Figura 10; sin embargo, si estos residuos son mutados, no representan un cambio significativo en la unión del RNA con la proteína (Zhao, Fox, Olson, Baker, & Young, 1995), es decir, que la interacción proteína-RNA es dominada por fuerzas electrostáticas y estas se encuentran bien estabilizadas en conjunto por el extremo terminal.

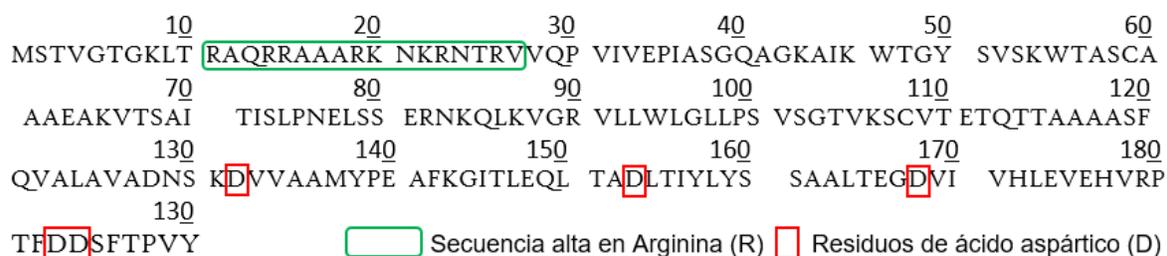


Figura 10 Secuencia de aminoácidos perteneciente a la estructura primaria de la proteína del CCMV (Dasgupta & Kaesberg, 1982).

En el CCMV existen residuos que forman láminas beta provocadas por el posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, en el que los grupos de amino de una de las cadenas forman enlaces hidrógeno con los grupos carboxilo de la opuesta. Además, se forman hélices donde

los aminoácidos están dispuestos en una estructura helicoidal dextrógira compuesta por aminoácidos que forman dos puentes de hidrógeno con su enlace peptídico. Todas las unidades en la estructura terciaria de la proteína adoptan una forma canónica, extendiéndose hasta los extremos de la proteína, estas son de gran importancia para la formación de estructuras cuaternarias, donde pueden unirse formando dímeros, trímeros, pentámeros, hexámeros e incluso el virión (Elrad & Hagan, 2008), (Adam Zlotnick & Stray, 2003) (Krol et al., 1999).

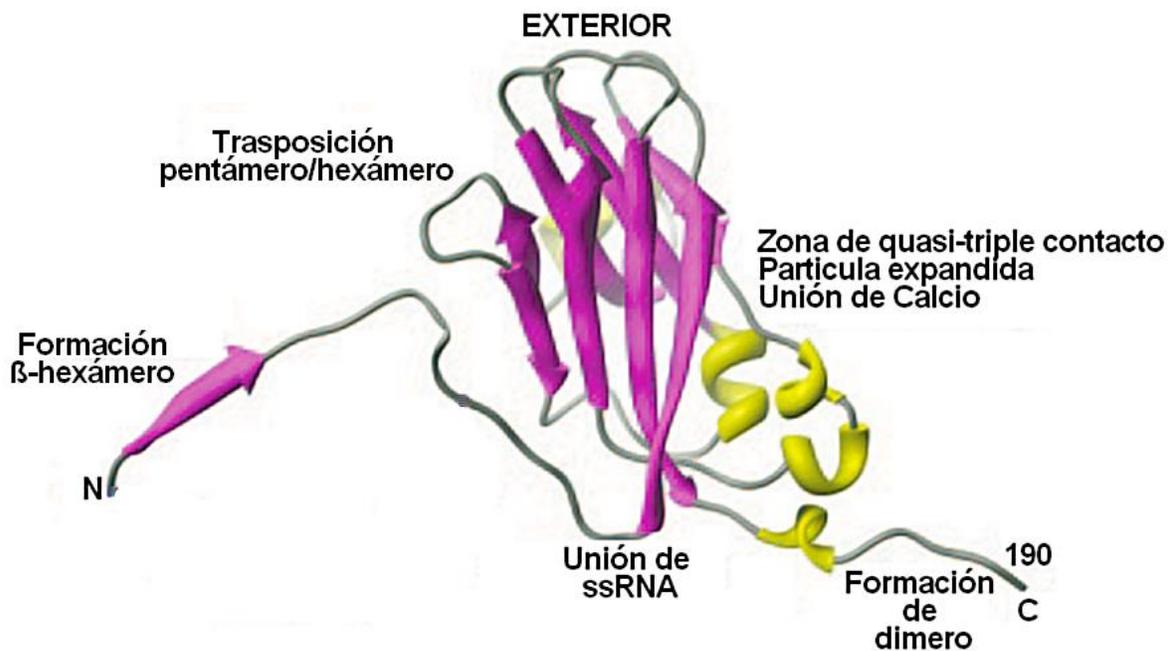


Figura 11 Estructura obtenida por cristalografía de rayos X, en la cual se muestran los extremos amino y carboxilo y en la cual se pueden observar sus formaciones β -laminares y α -hélice. Figura adaptada desde la referencia para fines de este documento (Speir JA, Bothner B, Qu C, Willits DA, Young MJ, 2006)

3.3.3 Factores que alteran las propiedades de la proteína del CCMV

Se ha demostrado ampliamente que los cambios en la temperatura, la fuerza iónica y el pH tienden a alterar la morfología y estabilidad de la proteína del CCMV (Adolph & Butler, 1974). Resulta importante conocer estos factores, puesto que cualquiera de ellos que modifique la interacción de la proteína con su entorno puede disminuir su estabilidad y provocar su precipitación. La agregación intermolecular resulta en un efecto irreversible que ocasiona pérdida de actividad biológica de la proteína y puede ser provocada por la neutralización de cargas eléctricas repulsivas, la desaparición total o participar en la envoltura acuosa o la ruptura de puentes de hidrógeno.

Efecto de la temperatura: La agregación y precipitación de las proteínas desnaturalizadas se ve provocado por el aumento de la energía térmica que está relacionado con los aumentos de temperatura. Cuando la energía térmica se ve alterada, el interior hidrofóbico de la proteína interacciona con el medio acuoso, a consecuencia de la destrucción de las interacciones débiles y de la organización de la estructura de la proteína.

Efecto de la concentración de proteína: Adolph y Butler observaron el efecto de la concentración de proteína a partir de diversos experimentos. En ellos se mantenía una temperatura (20°) y una fuerza iónica constante (1.0), pero se realizaba una variación en el pH (5.0, 5.5, 6.0). Como resultado se observó que a una concentración de 1 mg/ml existía mayor agregación a 50 S con un pH de 5.0; mayoría de 3 S a pH 6.0 y una igualdad de 3 S y 50 S en un pH de 5.5 (Adolph & Butler, 1974). Es posible observar en la Figura 12 que cuando las concentraciones son suficientemente bajas, hay una mayor cantidad 3 S (dímeros libres) que 50 S (cápsides) y esto se revierte cuando hay un aumento en la concentración.

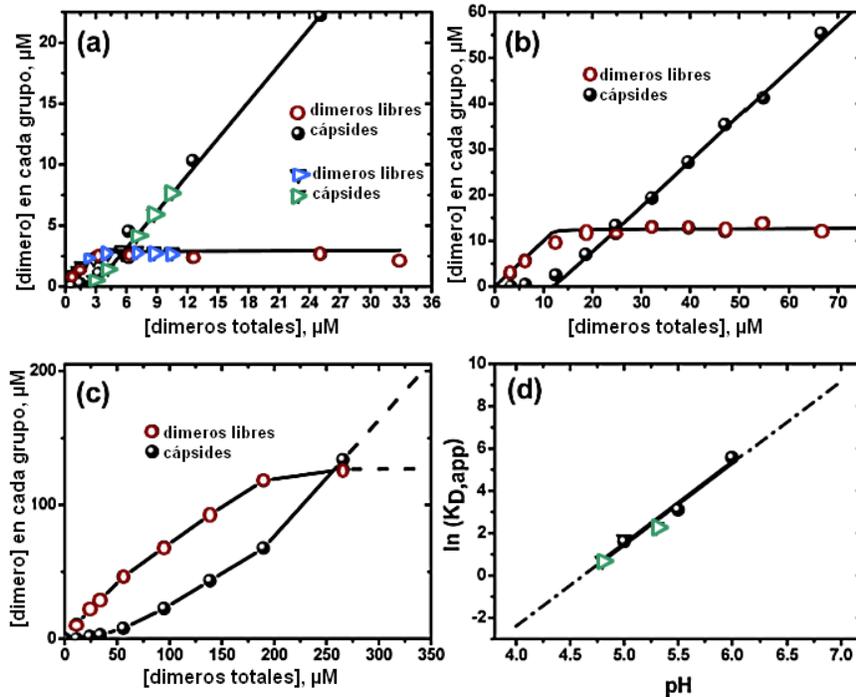


Figura 12 Concentración de equilibrio de cápsides y dímeros de CP libres en función de la concentración total de dímero a pH (a) 5.0, (b) 5.5 y (c) 6.0. Las cifras adaptadas de Adolph y Butler (círculos) y Johnson (triángulos) en el panel a) se obtuvieron a $I=1.0$ y 0.5 M, respectivamente. Las imágenes b) y c) se obtuvieron a $I=1.0$. En el panel d) K_D , se obtuvo el pH aparente frente a los paneles a) -c) y dos puntos de datos adicionales pH 4.8 y 5.3 de Johnson

Existe una concentración a la cual en cada uno de los casos es posible observar que la cantidad de 3 S llega a un valor que se mantiene constante, aunque haya un aumento en la concentración. También se observa que para realizar un ensamble a un pH = 6 es necesario 50 veces más proteína que para un pH = 5, esto dice que la cantidad de proteína necesaria para un ensamble aumenta si existe un aumento en el pH.

Los resultados observados en estos experimentos suponen un comportamiento similar al micelar de las proteínas. Esto es denominado como concentración micelar crítica (CMC) que es la concentración mínima a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una solución y es un punto precisamente definido para cada compuesto. Es por ello por lo que con la CMC y la teoría micelar posible determinar la zona del diagrama de fases donde se puede realizar ensambles con la menor cantidad de proteína.

3.3.3.1 Fuerza iónica y pH

La solubilidad de las proteínas es sensible a la concentración de sales y es posible expresar la concentración de una sal en términos de fuerza iónica que es la concentración de todos los iones presentes en una disolución.

$$F.I = \frac{1}{2} \sum C_i \cdot Z_i^2$$

Generalmente, el aumento en la concentración de la sal provoca un aumento en la solubilidad de la proteína. Es posible explicar esta relación con dos fenómenos el “*salting in*” y el “*salting out*”. El primero de estos es el aumento de la solubilidad a causa del incremento en la concentración de la sal; mientras que el exceso de la fuerza iónica ocasiona una disminución de la solubilidad de la proteína, provocando el segundo fenómeno. Ambos casos son la expresión de la competencia entre los iones de sal y los iones de las proteínas por las moléculas de agua, esto crea una capa de solvatación parcial.

El aumento o disminución de la fuerza iónica puede provocar precipitación, sin embargo, se puede considerar un proceso reversible. La razón se debe a que un aumento en la fuerza iónica disminuye el grado de hidratación en los grupos iónicos superficiales de la proteína, a causa de la competición existente de los solutos por el agua, inhibiendo la disociación de los grupos ácidos o aminos de la proteína y esto disminuye la solubilidad y por tanto se precipita. Las alteraciones en los iones H^+ y OH^- son capaces de provocar un efecto similar a la fuerza iónica, en su caso particular su efecto primordial es el de cambiar el grado de protonación de los residuos de proteínas, que altera las cargas eléctricas de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Una alteración como la mencionada en la carga superficial excluye las interacciones electrostáticas encargadas de la estabilidad de la estructura terciaria, lo que provoca la agregación de la proteína. La carga de una proteína en su punto isoeléctrico es nula y por lo tanto cero, es decir, que hay igual número de cargas negativas que positivas y esto

puede llevar a la atracción entre las proteínas o la desaparición de cualquier fuerza de repulsión electrostática.

En consideración de estas interacciones entre la fuerza iónica y el pH, y contando las contribuciones de ambos (puentes salinos, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas e interacciones estéricas entre las proteínas y la estabilidad relativa entre pentámeros y hexámeros) entendemos que son la clave para los mecanismos de autoensamblaje. Es por lo anterior que se ha documentado la propiedad de la proteína del CCMV para crear estructuras diferentes a la formación natural de la cápside y más importante aún, la posibilidad de controlar mediante soluciones amortiguadoras la proliferación de una estructura sobre otra. Esta premisa la demostró Lavelle *et. al.* en el 2009, al someter la proteína al contacto con soluciones con variedad de pH y fuerza iónica y con ello realizó un diagrama de fases a partir de las imágenes obtenidas por TEM.

El diagrama de la Figura 13 nos muestra las condiciones ideales para la creación de una cápside proteica sin la presencia del RNA del virus, también conocida como una *partícula tipo virus (Virus like-particles – VLP)* de 28 nm; en él también podemos observar cápsides multipared cercanos al pH 4 y F.I. cercana a 0 hasta 0.1. En un pH de 5 a 7 y F.I. muy baja hasta aproximadamente 1, comienza la aparición de tubos. Es importante mencionar respecto al diagrama que dicho estudio fue realizado con el uso exclusivo de sales monovalentes, siendo NaCl principalmente. Es bien sabido que en un pH 7.0 y baja fuerza iónica la proteína pasa de un estado estable a un estado aumentado (mencionado en el subtema) protagonizado por la expansión radial de la cápside del virión alrededor de los ejes de tripolares, lo que sucede al remover los iones de Ca^{2+} , encargados de la unión de la cápside en estos ejes. Esta transición puede ser revertida si el pH disminuye a un pH 5.0 o si las concentraciones de Ca^{2+} o sales divalentes como $MgCl_2$ se aumentan. Estos mecanismos de aumento radial controlados por el pH y la concentración de iones metálicos son considerados como un mecanismo liberación del RNA durante la infección viral y conciernen a muchos otros tipos de virus en plantas (Tama & Brooks, 2002).

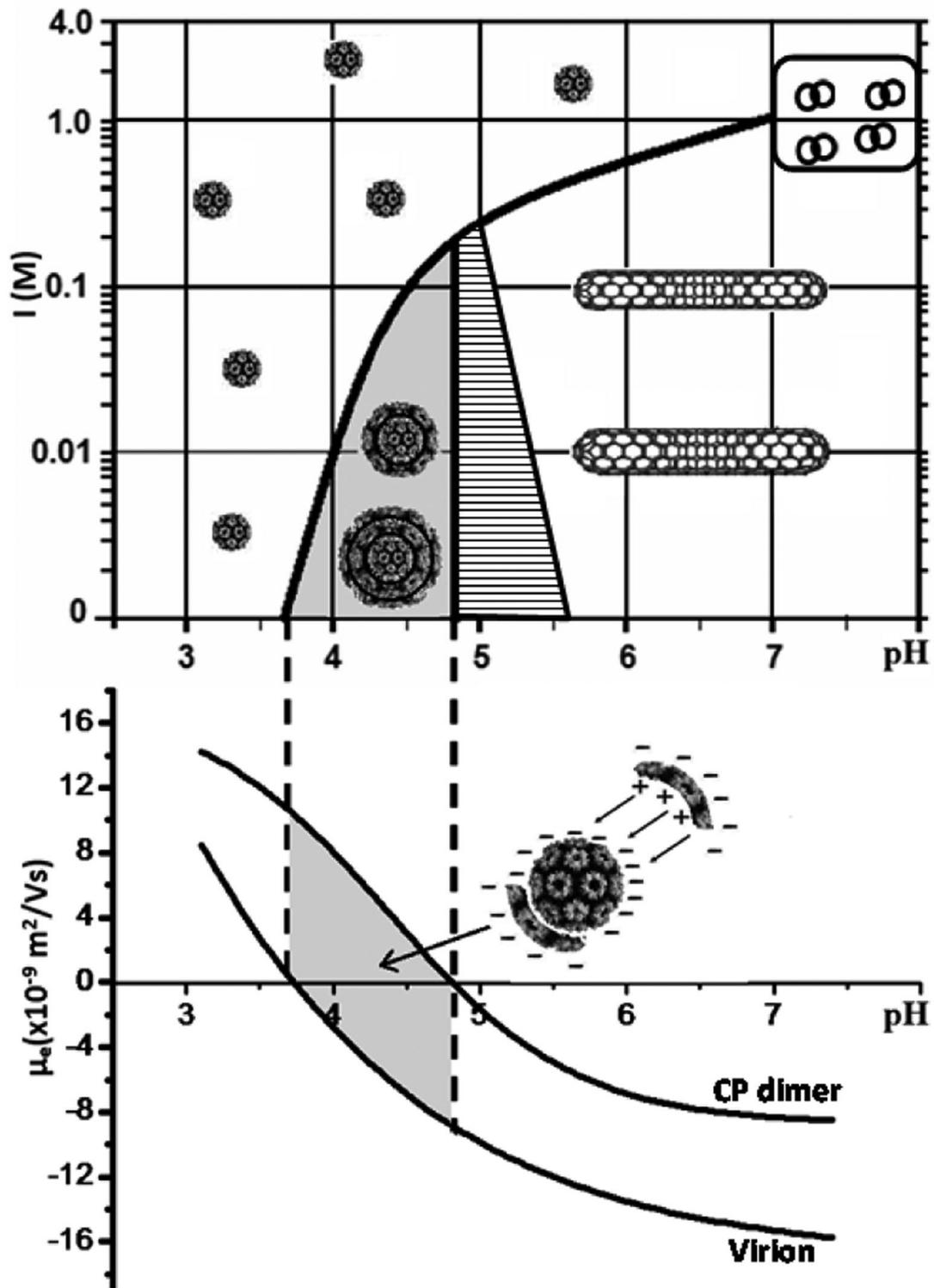


Figura 13 Diagrama de fases del ensamble de proteínas como función del pH y la F.I (Vega-Acosta, Cadena-Nava, Gelbart, Knobler, & Ruiz-García, 2014).

3.3.4 Terminal Amino y terminal Carboxilo.

Las terminales amino y carboxilo de la proteína del CCMV han demostrado tener importancia en el ensamble de partículas virales. Se han realizado experimentos utilizando proteína sin amino terminal *in vitro*, demostrando que la eliminación de esta región restringe la encapsidación del RNA, pero aún puede formar partículas virales vacías (Vriend, Verduin, & Hemminga, 1986). Cuando sucede lo anterior, las proteínas de cápside tienden a ensamblar estructuras con 60 proteínas y una simetría de T=1, en pseudo T=2, se forma partículas con 120 proteínas y de 22 nm de diámetro, o partículas T=3 similares en tamaño al nativo (Tang et al., 2006). Por otro lado, los experimentos con proteína sin carboxilo terminal demostraron que no es posible formar dímeros ni cápsides (Zhao et al., 1995).

3.3.5 Carga eléctrica superficial.

La carga eléctrica de una proteína tiende a ser neta cuando se encuentra en un medio con pH diferente al de su punto isoeléctrico y esto les confiere la propiedad de desplazamiento cuando se someten a un campo eléctrico. El parámetro que determina el comportamiento de una molécula bajo la acción de un campo eléctrico es conocido como movilidad electroforética.

En el 2014 Vega-Acosta *et. al.* sometió la proteína del CCMV a un cambio eléctrico bajo variando la fuerza iónica (Véase Figura 14). De esta manera demostraron que cuando hay un aumento en la fuerza iónica existe una disminución de la movilidad electroforética, a causa del apantallamiento de las cargas de la proteína en presencia de la sal, lo que reduce la repulsión entre las proteínas y de esta manera llegan a agregarse y precipitar.

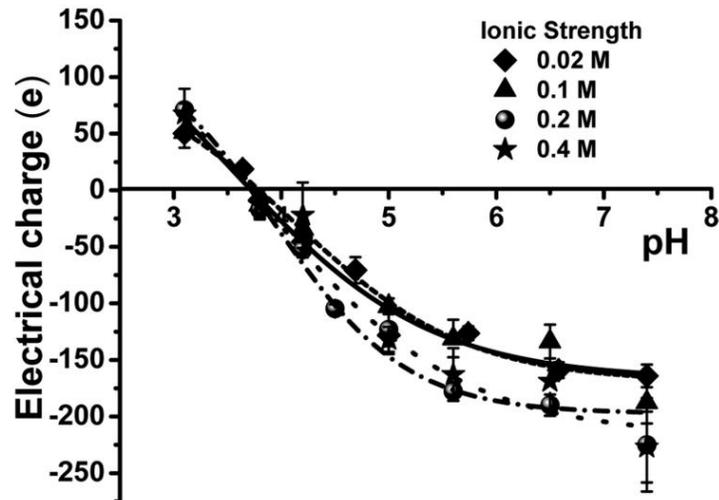


Figura 14 Cargas eléctricas por virión de acuerdo a su movilidad electroforética(Vega-Acosta et al., 2014).

3.3.6 Autoensamblaje de virus *in vitro*

El primer virus en autoensamblarse fue el TMV por Frankel-Conrat y Williams en 1955. Ellos demostraron que bajo condiciones adecuadas, era posible producir partículas infecciosas utilizando proteínas y RNA que habían sido desensambladas de una partícula viral (Fraenkel-Conrat & Williams, 1955).

El CCMV ha sido usado ampliamente como modelo viral de ensamble desde que Bancroft y Hiebert lograron demostrar que el RNA purificado y la cápside proteica podían reensamblarse *in vitro* (Hiebert & Bancroft, 1969a). Esto convirtió al CCMV en el primer virus icosaédrico en ser autoensamblado de esta manera.

El ensamblaje, estabilidad y el desensamble de los virus icosaédricos están coordinados por interacciones proteína-proteína, así como proteína-ácido nucleico, sin embargo, existen factores que pueden retardar el autoensamblaje de una cápside, aun cuando generalmente el proceso se realiza de forma espontánea. No es necesario añadir energía al sistema o alguna otra información al genoma esto ha

llevado a suponer que la partícula se encuentra en su configuración mínima de energía al completarse.

Para el caso particular del CCMV, estudios han mostrado que se tiene una concentración crítica $\rho^* = 6\mu M$ y una energía libre de asociación de 3.1kcal/mol a un pH=5.25, 3.4 kcal/mol a pH=5.0, y 3.7kcal/mol a pH=4.75 (A. Zlotnick & Katen, 2009).

Una vez que comienza la formación de la cápside viral, entran en juego otros factores que actúan como reguladores para la agregación y subsecuente crecimiento de la cápside. Las principales fuerzas que actúan como reguladores de su formación son de tipo electrostático y con preferencia direccional, lo cual ayuda a su correcta formación. Estas fuerzas son principalmente de corto alcance, como las ya mencionadas interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno, las cuales tienen una longitud de acción de unos pocos angstroms, e interacciones meramente electrostáticas cuyo rango de acción esta normalmente determinado por la Longitud de Debye (λ_D), que en condiciones fisiológicas tiene un alcance de aproximadamente 1nm, y depende de la fuerza iónica del sistema (I).

$$\lambda_D \approx 0.3/I^{1/2}$$

La cual también se puede relacionar con la concentración de sales en la solución con las que se está trabajando (C_{salt}) (Hagan, 2014; Perlmutter & Hagan, 2015). Cambios en la fuerza iónica presente en el sistema, puede llevar a la formación de estructuras que no corresponden con la conformación nativa de la cápside que se esté estudiando, en el caso concreto de CCMV, se pueden obtener cápsides de menor tamaño las cuales pueden corresponder a números de triangulación (T) de menor orden, normalmente se presentan con T=1, pero también se pueden llegar a formar estructuras pseudo-estables T=2, lo cual difiere de la estructura nativa T=3 del virus.

CAPITULO II

4 Métodos

4.1 Amplificación del virión.

La obtención de la materia prima para este proyecto parte de su hospedero natural, el frijol *Cowpea Vigna unguiculata*, (Cowpea California Black eye No. 5) mediante un proceso de crecimiento, inoculación y cosecha de las hojas infectadas; método reportando inicialmente en 1964 por Khun.

4.2 Siembra del frijol

El invernadero de cultivo del frijol *Cowpea Vigna unguiculata*, se ha adecuado dentro de una habitación en el Laboratorio de Física Biológica del instituto de Física, aislado de la luz solar, pero con instalaciones eléctricas necesarias para proporcionar luz artificial a las plantas en periodos de 12 horas. Se cuadraron dentro de esta habitación una serie de macetas con tierra para invernadero enriquecida con fertilizantes previamente esterilizada marca "Miracle Grow".

El acomodo de los frijoles dentro de las macetas se realizó a una distancia de 5 centímetros entre cada uno para enterrarse después a una profundidad de un centímetro aproximadamente, como se muestra en la Figura 15. Al terminar se acomodaron las macetas a una distancia idónea de las lámparas fluorescentes para proporcionarles suficiente luz y calor para el crecimiento de la planta.



Figura 15 Siembra de frijol Cowpea dentro de las macetas del invernadero, en una disposición de 5 cm cada uno y una profundidad de 1.5 cm.

4.3 Inoculación

El proceso de inoculación de virus debe realizarse durante la primera generación de hojas en crecimiento, las cuales debieron ausentarse de luz por 24 horas antes de iniciar el proceso con la finalidad de debilitarlas lo suficiente y que se infecten lo más posible. Para el ingreso del virus en la planta es necesario realizar una herida mecánica en el cuerpo de la hoja. Una vez realizada la herida se añade 20 μ l de buffer de inoculación (0.01 M de fosfato de sodio y 0.01 M de cloruro de magnesio a un pH=6) y se procede a regar la planta, evitando que muera. Véase la Figura 16.



Figura 16 Hoja de 7 días heridas por piquete y siendo infectadas por solución de inoculación esparciéndola por toda la hoja.

4.4 Cosecha de hojas infectadas

El síntoma característico de esta infección viral es la presencia de manchas amarillas conocida como *Clorosis* (Figura 17), que aparece en las hojas infectadas dos o tres semanas después de la inoculación; aunque este tiempo puede variar dependiendo de diversos factores como la temperatura, la humedad, calidad de frijol, etc. Es este el momento idóneo para la cosecha, esta se realiza cortando la hoja sin el tallo y almacenándola a -80 °C para su uso posterior.



a)

b)

Figura 17 a) Hojas de 7 días de crecimiento sin infección. b) hojas después de la infección.

4.5 Purificación del virus

El proceso de purificación de CCMV ha sido optimizado a través de los años por diversos grupos de investigación. Kuhn fue el primero de ellos, basando su proceso en la extracción de los componentes celulares usando n-butanol y cloroformo; Bancroft añadió a lo anterior una molienda de hojas infectadas con buffer de acetato a pH 5.0, así como una filtración previa a su almacenamiento durante una noche a 4 °C para finalmente pasar por varios tiempos de centrifugado. Sin embargo, es la metodología de Rao (A.L.N. Rao, R. Duggal, F. Lahser, 1994), la que se ha utilizado en este proyecto y que se escribe a continuación.

Molienda de la hoja. Es durante este proceso que se realiza el lisado de las células vegetales para liberación del virus, para ello se utiliza un buffer de extracción (0.5 M de acetato de sodio, 0.08 M de acetato de magnesio y es titulado con ácido acético glacial a un pH de 4.5) al que se le ha añadido Mercapto-etanol como inhibidor de DNAsas y RNAsas beneficiando la lisis.

- Dentro de la campana de extracción se licuan las hojas en proporciones de 100 gramos con 1 % (v/v) de buffer de extracción (0.5 M de acetato de sodio y 0.08 M de acetato de magnesio a pH=4.5) con mercapto-etanol por espacio de dos o tres minutos. Para romper las células vegetales (debe agregarse la misma cantidad en volumen de buffer y peso en hojas). La mezcla obtenida es vaciada en un mortero añadiendo arena de mar desacidificada, la cantidad necesaria para cubrir la mezcla uniformemente en la superficie (Ver la Fig. 18). La molienda debe detenerse cuando se ha obtenido una pasta fina y el sonido de la arena es imperceptible. Esto nos asegura que se ha roto la mayoría de las células y que la cantidad de virus para obtener será mayor.



Figura 18 Proceso de molienda con arena de mar desacidificada en mortero.

- La pasta conseguida debe ser filtrada cuantas veces sea necesario, utilizando varias capas de gasa fina (Cheesecloth, Fisher Scientific), de esta forma se separará toda la fase líquida de la pasta en donde se encuentra el virus (Figura 19).

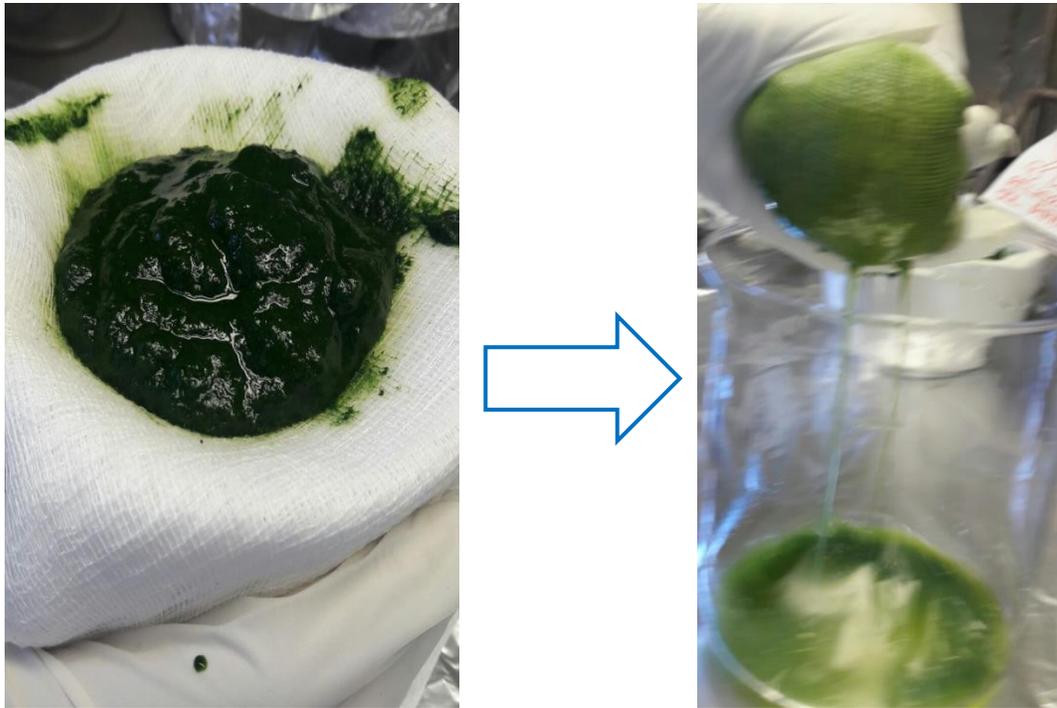


Figura 19 Proceso de filtrado de la solución con varias capas de gasas.

Separación de componentes celulares. En esta etapa se utiliza el cloroformo que permite extraer la mayor parte de los componentes celulares, dejando al virus en un estado de suspensión en la fase acuosa que es separada posteriormente del material vegetal.

- El volumen de la solución filtrada durante la molienda debe ser el mismo del cloroformo añadido, obteniendo una coloración verdosa, y debe agitarse continuamente por dos horas. Una vez pasado este tiempo debe vaciarse la solución en tubos de teflón de 50 ml para centrifuga, ya que estos son resistentes al cloroformo, son centrifugados en la centrifuga de mesa Heraeus Biofuge Stratus con un rotor de ángulo fijo Thermo 3335 a 12000xg (10000 rpm) por 17 minutos a 4 °C, alcanzando entonces una coloración amarillo ocre (Véase Figura 20).
- Después de la centrifugación es sencillo distinguir dos fases en la solución. El sobrenadante debe ser recolectado en un vaso de precipitados y dejar en

agitación por lo menos 4 horas a 4 °C permitiendo que el cloroformo se evapore.



Figura 20 Proceso de separación de componentes celulares: a) mezcla obtenida de la molienda y cloroformo en agitación. b) solución después de la centrifugación donde se distinguen la fase color ocre.

Colchón de sacarosa. Se recurre a la técnica de la centrifugación por gradiente de densidad para la separación de partículas a través de su tamaño, utilizando una solución acuosa, densa e inerte de sacarosa para que las partículas más grandes queden en la parte superior y las pequeñas le atraviesan sin dañar la muestra por reacciones osmóticas o químicas. Este método no genera estrés mecánico permite obtener las partículas morfológicamente intactas.

- La solución ocre se vacía en tubos de polialómero para centrifuga de 31 ml (modelo 355642 para rotor SW-32Ti) donde se añaden 25 ml de la solución. Utilizando una jeringa de punta larga de 2 mm de diámetro y 15 cm de largo sin punta, se introducen 5 ml de sacarosa al 10 % (125g de sacarosa en 500ml de buffer de virus de suspensión) hasta el fondo de tubo sin perturbar la solución, donde se observarán dos fases como se muestra en la Figura 21. Con cuidado se debe contrapesar todos los tubos y se introducen en camisas

de ángulo variable (SW-32Ti). Se centrifugan a 58500xg (28000 rpm) durante 128 min a 4 °C en una centrifuga Beckman L-80.



Figura 21 a) Técnica de introducción de sacarosa. b) Tubo con solución ocre y colchón de sacarosa.

- Al terminar la centrifugación debe desecharse el sobrenadante rápidamente para evitar una resuspensión del pellet. Entonces se agregan 50 μ l de buffer de suspensión (1/10 de buffer de extracción) al pellet que es donde se encuentra el virus, pero sin diluirlo demasiado, esto facilita la extracción. Todos los pellets recuperados se agitan lentamente por 8 horas a 4 °C.
- Utilizando tubos ultraclaros (modelo 344058) se prepara 30 ml de un gradiente de sacarosa al 25 % para congelarse a -80 ° C durante una hora y después cambiarlo a 4 °C por 8 horas evitando cualquier perturbación durante sus traslados. Una vez pasado este tiempo, se toma la solución de pellet y se utiliza una micropipeta para hacer resbalar 1 ml del virus por cada tubo, esto evita el rompimiento del gradiente. Se colocan todos los tubos en un rotor de ángulo variable SW-31Ti) para ser centrifugados a 58500xg (28000rpm) por 78 min en la centrifuga Beckman L-80.
- En un cuarto oscuro se instala un soporte universal y una luz blanca en la parte inferior con el foco iluminando hacia el techo. En cuanto termina la centrifugación y evitando cualquier perturbación a los tubos, se debe observar una franja azul a una altura de aproximadamente $\frac{3}{4}$ del tubo, (esto

se debe al tamaño del virus que dispersa la luz azul cuando se irradia luz blanca como se muestra en la Figura 22, la cual se extrae con micropipeta.

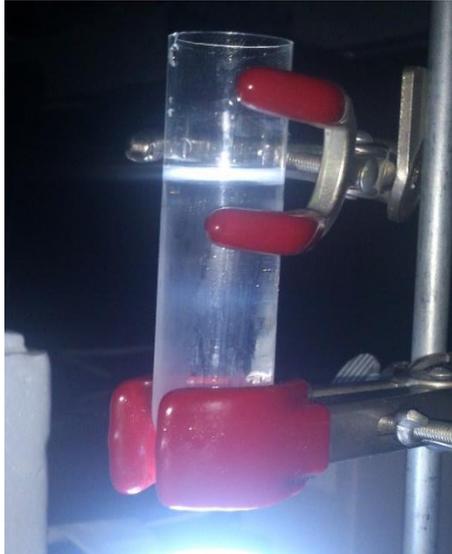


Figura 22 Franja azul dentro del gradiente de sacarosa, sitio donde se concentra el virus del CCMV.

Remoción de sacarosa

- Toda la solución de la franja azul recolectada se coloca en tubos de policarbonato de 3.2 ml (marca Beckman modelo 362305) para el rotor de ángulo fijo TLA-110 con un máximo de 3ml y se contrapesan en parejas de tubos (Véase Figura 23). Se centrifugan a 104546xg por 100 min a 4 °C en una centrifuga de mesa marca Beckman Coulter optima MAX-XP. Al terminar se desecha el sobrenadante y se recolecta el pellet color café para ser resuspendido en 100 μ l de buffer de suspensión.



Figura 23 Pellet en el fondo de los tubos, donde se concentra el virus CCMV.

Pureza y concentración del virus.

- Después de recolectar todos los pellets en un solo tubo se mezclan homogéneamente para medir su concentración con ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis modelo Nanodrop marca Thermo Scientific obteniendo una curva de absorbancia del virión. Se calcula su concentración y pureza, para entonces hacer alícuotas de 1 mg/μl de virus en tubos de 1 ml y se guardan a -80°C.

4.6 Purificación de proteína

La purificación de proteína se realiza mediante diversos métodos, sin embargo, en el protocolo del CCMV se basa en lo descubierto por Bancroft y colaboradores en 1967 (Bancroft & Hiebert, 1967), en el cual se busca desensamblar el virión de RNA y proteínas de la cápside mediante diálisis en un buffer de desensamble (500 mM de CaCl₂, 50 mM Tris-HCl en pH 7.5, 1 mM de EDTA a pH 8.0, 1 mM de PMSF y 0.55 mM de DTT, en pH general de 7.5), para entonces separar los componentes mediante centrifugación y finalmente determinar su concentración y pureza.

Se sabe que el desensamble se produce al provocar el hinchamiento de la cápside del virión mediante las altas concentraciones de sales con un pH cercano a 7.5, lo cual desacopla la proteína de la cápside y deja al RNA libre. Es entonces que los iones de calcio presentes en el buffer de desensamble precipita el RNA para facilitar su separación mediante ultracentrifugación.

El proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: Se dializa el virus purificado en una membrana de diálisis de celulosa regenerada (marca Spectra) con un tamaño de poro de 8000 a 12000 Da, en 1 litro de buffer de desensamble en un lapso de 12 horas a 4 °C con agitación constante (Véase Figura 24). Después de este tiempo

de espera se toma la solución dializada y se coloca 1.2 ml dentro de tubos ultraceros marca Beckman modelo 344058 y es contrapesado, este tipo de tubo es apropiado para el rotor de ángulo fijo TLA-110. Se centrifuga en la ultracentrífuga de mesa (Beckman Coulter Optima MAX-XP) a 290420xg (100000 rpm) por un periodo de 2.06 horas a 4 °C. Al terminar, se toman con mucho cuidado fracciones de 200 µl, de arriba hacia abajo, sin perturbar la solución.



Figura 24 Membrana cerrada con clips a punto de ser introducida al buffer.

A las fracciones obtenidas se les mide la pureza y concentración con el espectrofotómetro UV-Vis (Modelo Nanodrop marca Thermo Scientific), manteniéndolo a 4 °C. Se utilizan solo las fracciones con pureza mayor a 99.5%, es decir una relación de una relación de ácidos nucleicos y proteína (A_{260}/A_{280}) igual o mayor a 1.5. Las fracciones con pureza óptima se colocan en otra membrana de diálisis con un tamaño de poro máximo de 12000 Da, y esta se deja en buffer de proteína (1 M de NaCl, 20 Mm de Tris-HCl pH=7.5, 1 Mm de EDTA pH=8, 1 mM de DTT y 1 mM de PMSF) por 12 horas, este paso le otorga estabilidad a la proteína. Finalmente, se vuelve a medir la concentración y pureza de las fracciones y se almacena a 4 °C.

4.7 Reensambles

Para los fines de este proyecto, la proteína del CCMV resulta ser fundamental, es por lo que los estándares de pureza proteica obtenidos del desensamblaje deben ser los más altos. Se ha expuesto con anterioridad la capacidad de la proteína de reensamblarse en diversas soluciones buffer dadas las condiciones adecuadas, lo que resulta favorable para realizar un estudio detallado de las estructuras formadas en un amplio rango de pH y fuerza iónica.

Para comprobar los efectos de las sales monovalentes y divalentes en las cargas electrostáticas de la proteína y las estructuras, se ha seleccionado el buffer de citratos en un rango de fuerza iónica de 0 a 4. El ajuste de cada uno de los buffers se realizará con su ácido y base conjugada correspondiente. La sal monovalente añadida para alcanzar los intervalos de fuerza iónica deseada es NaCl y como sal divalente se añadirá MgCl₂ en proporciones de 80-20%, 99-1% y 99.5-0.5% respectivamente. Además, se realizará un análisis con un 100% de sales divalentes. Los reensambles se realizarán con una diálisis de 24 horas a 4°C con agitación constante, en un volumen de 200-300 ml con una proporción de 1 µM de proteína viral para pH ≤5, 2-2.5 µM para un pH >5 y de 150 µM para pH=7 (Vega-Acosta et al., 2014). De acuerdo con la concentración de la proteína se realizarán diluciones de un total de 30 µl, y para proteger la integridad de esta se añadirá 250 µl de DTT y 500 µl de PMSF. Las estructuras conseguidas a partir de estas diálisis serán entonces observadas en TEM.

4.8 Preparación de portadoras de muestras para el microscopio electrónico de transmisión.

Las rejillas portadoras de muestras son un pequeño disco de cobre fundido con una malla fina, ésta puede variar dependiendo de su aplicación, pero generalmente se trata de 15 recuadros por milímetro, es decir 300 o 400 cuadrados por pulgada (Ver Figura 25), esto favorece su observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión. Las rejillas son recubiertas con una película de soporte llamado parlodion que otorga estabilidad y contraste a la rejilla, además tienen otra cubierta de carbón. Posteriormente se somete a una descarga brillante para volver la superficie hidrofílica.

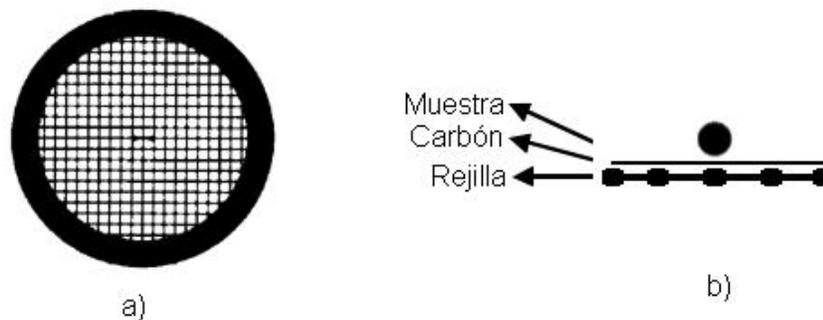


Figura 25 a) Vista superior de la rejilla mostrando la malla, b) Vista lateral de la rejilla recubierta y exponiendo la posición relativa de la capa de carbono y la muestra.

4.8.1 Aplicación de Parlodion

El parlodion es un polímero a base de celulosa, insoluble en agua e inflamable, es utilizado como soporte de las películas de carbón. El proceso de aplicación se realiza en presencia de agua miliQ, por lo cual se llena un tazón de vidrio hasta el borde. Se añade una gota de parlodion en el centro del tazón, dejando que se

expanda uniformemente sobre la superficie, el parlodion provocará una apariencia lisa en la superficie del agua cuando esté listo para las rejillas. Con el uso de pinzas y evitando tocar el centro de las rejillas, se colocan en forma de rombo a aproximadamente medio centímetro de distancia con la parte más brillante hacia arriba. Con ayuda de una caja de Petri de plástico a su vez, forrada con plástico adherente, se presiona rápidamente el rombo de rejillas, hundiéndolas brevemente dentro del tazón antes de sacar la caja de Petri a la superficie; las rejillas se adherirán a la parte central y lisa del plástico, al terminar se procede a poner la caja de Petri con las rejillas en reposo de 24 horas dentro del desecador, para retirar el exceso de agua (Véase dentro de la Figura 26). Pasado el tiempo de espera, se colocan con pinzas las rejillas sobre una plantilla de papel filtro dentro de una caja de Petri de vidrio. La aplicación del carbón no debe distar demasiado tiempo desde el recubrimiento de parlodion, pues la eficiencia de las rejillas se ve comprometida.



a)



b)

Figura 26 a) Tazón de vidrio lleno de agua desionizada donde se añade la gota de parlodion y posteriormente se disponen las rejillas de cobre. b) Rejillas de cobre en la superficie del parlodion aún dentro del tazón.

4.8.2 Aplicación de la película de carbón sobre el parlodion.

El delicado recubrimiento de carbono sobre las rejillas previamente tratadas con parlodion se realiza mediante un proceso típico de deposición por pulverización catódica. Este proceso se lleva a cabo en un evaporador de carbón, que consiste en una cámara de vacío con cabezal que consta de dos abrazaderas donde se inserta la fibra de carbono, ajustándola con dos tornillos, además de un cátodo y un ánodo.

Para realizar la deposición se acomoda dentro de la cámara la caja de Petri de vidrio contenedora de las rejillas con parlodion y se sitúa la fibra de carbono entre los tornillos del cabezal cuidando que quede firmemente ajustada y tensa (Véase Figura 27). Una vez hecho lo anterior se engrasa la cámara en los extremos que inferiores que entran en contacto con los empaques del equipo. Se posicionan los electrodos en el cabezal y se inicia proceso de despresurización, este paso permite la minimización de las presiones parciales de los gases de fondo y contaminantes potenciales. Una vez que se alcanza la presión base de 10^{-2} mBar se procede a aplicar un voltaje de 0 a 3 mV en corriente continua (modulándolo con ayuda de la perilla del equipo) durante 5 segundos para quitar el recubrimiento encerado de la fibra de carbono, al terminar se espera nuevamente a que la cámara alcance de otra vez la presión base. Cuando las condiciones barométricas sean las adecuadas, se aplica una segunda carga eléctrica pulsante, esta vez de 0 a 7 mV durante 5 segundos. Este voltaje entre el cátodo y el ánodo provoca que los electrones presentes en el gas dentro de la cámara se aceleren alejándose del cátodo y causando colisiones que, a su vez, provocan una repulsión electrostática produciendo una ionización. Los átomos de gas positivos se aceleran entonces hacia el cátodo cargado negativamente “expulsando” átomos del carbón hacia la superficie de las rejillas. Visualmente es posible identificar el proceso con el desprendimiento de luz en el cabezal del equipo al inicio del intercambio eléctrico. Para finalizar se apaga la corriente eléctrica y se rompe el vacío de la cámara. Se

abre lentamente el cabezal para retirar la caja de Petri con las rejillas (Véase Figura 27).

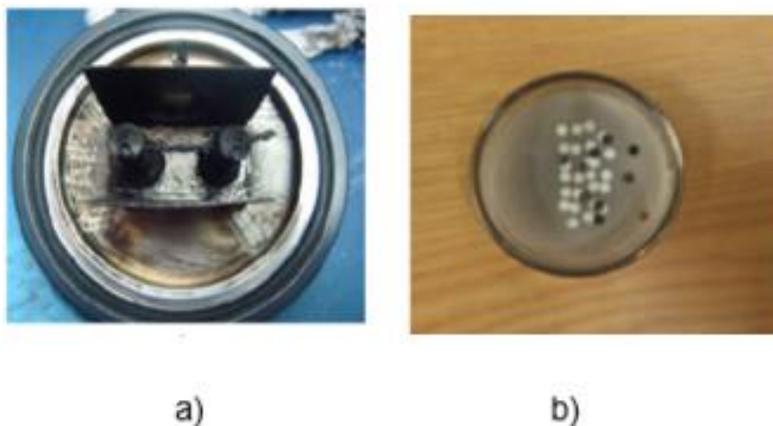


Figura 27 a) Cabezal con ánodo y cátodo y tornillos de soporte con el hilo de grafito montado, b) Rejillas de carbono con parlodion y recubiertas de carbón.

4.8.3 Descarga brillante

El carbón es generalmente una sustancia hidrofóbica, por lo tanto, si una gota de agua entra en contacto con él, el agua intentará minimizar su contacto con este. Para lograr que la superficie de carbón presente en la rejilla sea más accesible al agua o a una muestra suspendida, es necesario volver la superficie hidrofílica. Tal condición puede lograrse mediante una descarga brillante.

El laboratorio de coloides e interfaces ha construido un equipo para realizar el procedimiento, se trata de una placa metálica con un par de válvulas, una de ellas está conectada a una bomba de vacío y la otra sirve como entrada de aire que rompe el vacío. Además, se ha adaptado un tazón de vidrio con cinta metálica en el centro del fondo por el exterior para aplicar sobre ella una descarga eléctrica con un TESLA.

Para el procedimiento se sitúan las rejillas cubiertas de carbón en el centro de la placa metálica, a continuación, se engrasa el tazón con grasa de vacío y se coloca

boca abajo sobre la superficie. Se cierra la válvula de liberación y se enciende la bomba de vacío por 5 minutos. Con cuidado de no tocar ninguna superficie conductora, se acerca el TESLA a la cinta metálica del tazón y se realiza la descarga por un minuto (Ver Figura 28). La descarga provoca una ionización del aire que reacciona con la superficie de las rejillas.

La descarga brillante cumple su función de volver las rejillas hidrofílicas por un tiempo limitado, es decir, las muestras deben depositarse en las próximas dos horas después del procedimiento, de otra forma la condición hidrofílica desaparece y debe repetirse el procedimiento.

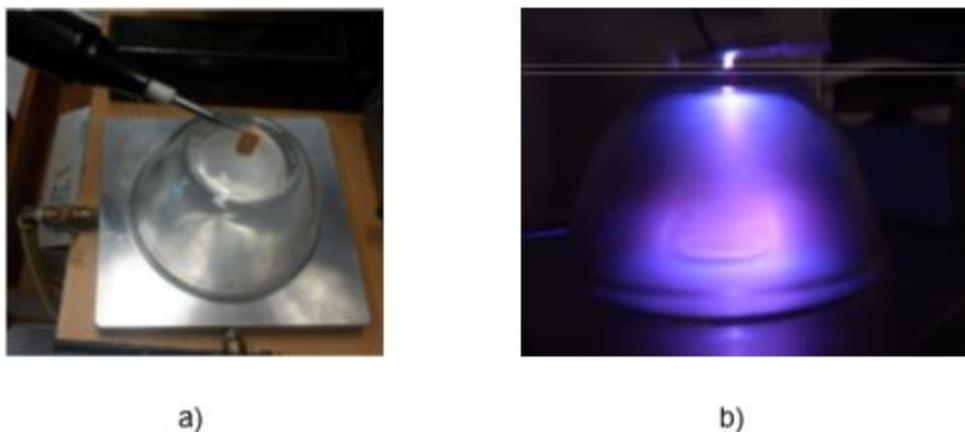


Figura 28 a) Equipo de descarga brillante. b) Descarga eléctrica del TESLA

4.8.4 Depósito de muestra y tinción

Una vez realizados los procedimientos previamente descritos, la rejilla está lista para recibir la muestra. Se colocan 8 μl de la muestra sobre la rejilla y se espera 1 min para su fijación a ésta, entonces con ayuda de un trozo de papel filtro, se quita el exceso de humedad. Es importante evitar el contacto del papel con la superficie de la rejilla para evitar su contaminación.

A continuación, se utiliza una solución de acetato de uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), al 2 %. Se colocan 6 μl sobre la rejilla y se espera por un minuto,

esto sirve para teñir las muestras biológicas, al término de la espera se quita el exceso con otro trozo de papel filtro Las rejillas son colocadas en un portarejillas que se lleva después al desecador por al menos 12 horas antes de su uso en el TEM.

Para la tinción negativa en microscopia electrónica, el acetato de uranilo es quizás el compuesto más utilizado. Se trata de un sólido amarillento formado por cristales tetraédricos con un olor levemente acético. Esta sal tiene la habilidad de fijarse a distintos compuestos orgánicos de forma catiónica, aniónica o neutra. En este caso el acetato tiñe la parte negativa y positiva de la proteína.

CAPITULO III

5 Resultados

Los resultados y observaciones obtenidas a partir de la experimentación realizada para este proyecto previamente expuesta se representan en las siguientes páginas.

5.1 Amplificación del virus de CCMV

Utilizando un buffer de inoculación conteniendo el virión de CCMV se realizó la infección del virus a hojas de frijol Black Eyed, a través de un suave daño mecánico, como resultado de este, las plantas presentaron clorosis en patrón moteado lo que denota infección viral a una semana después de realizado el procedimiento (Figura 29)

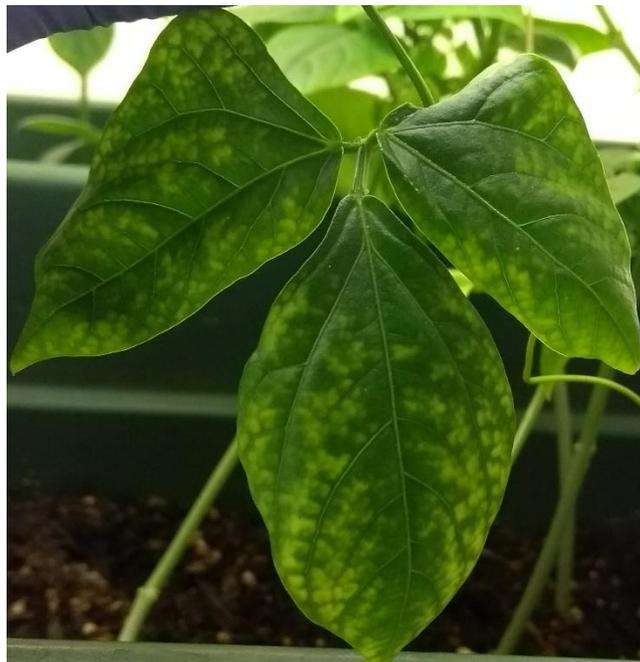


Figura 29 Hoja infectada de virus CCMV con signos de clorosis.

5.2 Purificación del virus de CCMV extrayéndolo de los tejidos vegetales.

Para este proceso se utilizaron 300 gr de hoja infectada del frijol California Black Eyed, obteniendo 7.9 mg de virión de CCMV, se determinó su concentración y pureza a partir de los datos obtenidos en su caracterización por espectroscopia UV/Vis, los resultados obtenidos durante este proceso pueden ser observados en la Tabla 1 y Figura 30.

Tabla 1 Absorbancias obtenidas por espectrofotometría UV/Vis, resultados de pureza, concentración y cantidad de virión del proceso de purificación.

Tabla 1						
Purificación (gr)	A260	A280	Pureza	Concentración (mg/ml)	Volumen de virus (ml)	Cantidad de virión (mg)
300	6.388	3.895	1.64	0.9292	8.5	7.9

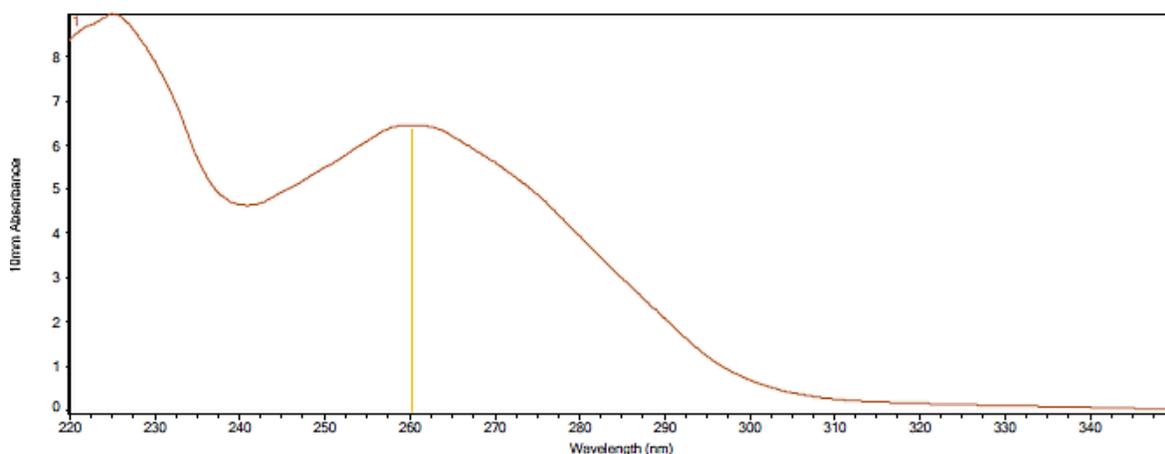


Figura 30 Espectro de absorción típico del virus CCMV a una concentración de 1mg/ml. Es posible observar una absorbancia máxima de 6 a una longitud de onda de 260 nm (sitio de absorción de los ácidos nucleicos - línea amarilla).

Los cálculos realizados para la determinación de pureza, concentración y cantidad de viales se muestran a continuación.

$$\text{Pureza del virión} = \frac{A_{260}}{A_{380}} = \frac{6.388}{3.895} = 1.64$$

$$\text{Concentración del virión} = \frac{A}{\epsilon b} = \frac{A_{260} \left(4.6 \times 10^6 \frac{g}{mol} \right)}{(1 \text{ cm}) \left(2.7 \times 10^7 \frac{l}{mol \cdot \text{cm}} \right)} \rightarrow \frac{5.436}{5.85} = 0.9292 \frac{mg}{ml}$$

$$\text{Cantidad del viales} = [\text{Solución de virus} (ml)] \left[\text{Concentración} \left(\frac{mg}{ml} \right) \right] \rightarrow \\ [8.5 \text{ ml}] \left[\left(0.929 \frac{mg}{ml} \right) \right] = 7.8982 \text{ mg}$$

Los viales obtenidos poseían una relación de absorbancia A260/A280 de 1.64 siendo 1.7 el valor máximo de absorbancia obtenido para el CCMV (Cadena-Nava et al., 2012), denotando una pureza del 96.47%. Además, se obtuvieron 7.89 viales repartidos en alícuotas de 1 ml con una concentración de 1 mg/ml, que corresponde una eficiencia de 61% respecto a los 13 viales históricos obtenidos por este método en el Laboratorio de Física Biológica desde 300 gramos de hoja infectada; cabe destacar que los factores como el grado de infección de las hojas utilizadas.

5.3 Aislamiento de la proteína del CCMV mediante la separación del RNA virus.

Una vez finalizada la purificación de virus se procedió a la purificación proteína por diálisis y centrifugación. La proteína obtenida por extracción fraccionada se analizó utilizando espectroscopia UV/Vis con la relación de absorbancia de A280/A260, la cual presenta un drástico cambio durante la extracción del RNA respecto a la curva del análisis anterior. Es posible determinar la presencia de proteína o de RNA de CCMV comparando las curvas de absorción, pues en la primera observamos una

máxima absorbancia en 260 nm (Figura 30) y por otro lado cuando el RNA es eliminado, la máxima curva de absorbancia es observada a 280 nm, sitio donde corresponden las absorbancias en presencia de proteína.

En la Figura 31 se observan las curvas de los espectros de absorción de varias fracciones de 200 µl extraídas después de la centrifugación. La fracción con más alta concentración corresponde a la curva de color verde seco, donde se aprecia un hombro máximo en la absorbancia de 280 nm.

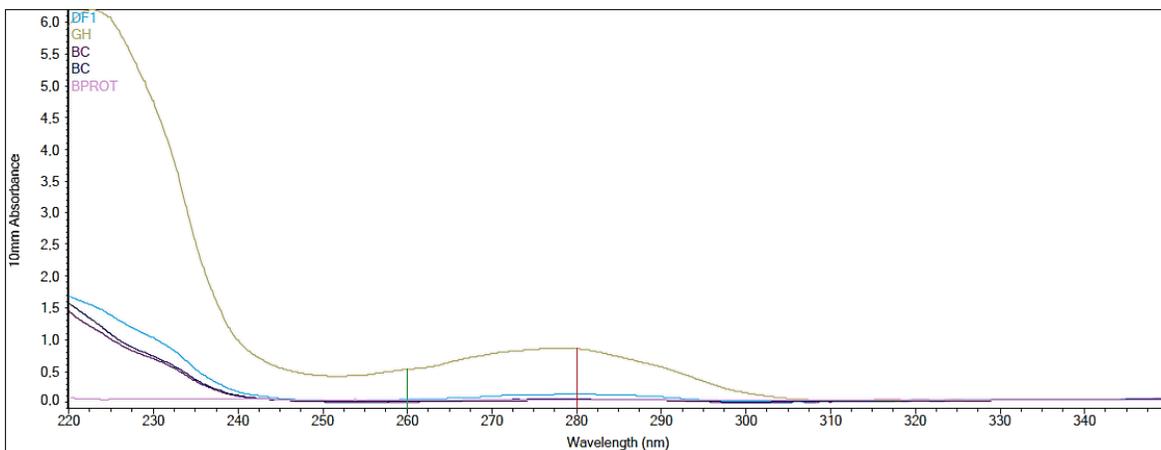


Figura 31 Espectro de absorción de varios lotes de proteína que se obtienen al purificar el virión. En éste es posible observar la absorción de las proteínas en 280 (línea roja) y la absorción del RNA en 260 (línea verde).

Los resultados de estos espectros se pueden consultar en la Tabla 2, donde aquellas fracciones con concentraciones similares se unifican para aumentar su volumen. Por lo general, en este tipo de extracciones las primeras fracciones conllevan una baja concentración proteica, que aumenta conforme se acerca al fondo del tubo; esto puede ser observado en los resultados negativos de la fracción BC del Lote 1.

Tabla 2 Absorbancias obtenidas por espectrofotometría UV/Vis, resultado de pureza, concentración y cantidad de proteína después del proceso de purificación

Tabla 2						
Lote	Fracciones	A280	260/280	Pureza	Concentración mg/ml	Cantidad de proteína μ l
1	BC	0.012	-2.17	-9.5696	-9.6596	-
2	DF	0.091	0.16	6.25	116.0989	230
3	GH	0.809	0.59	1.6949	944.9073	350
Total						580

En seguida se detallarán los cálculos que se realizaron para determinar la pureza, concentración y cantidad de proteína del lote 3, los cálculos para los lotes restantes se efectuaron de la misma manera.

$$\text{Pureza de la proteína} = \frac{A_{260}}{A_{380}} = \frac{6.388}{3.895} = 1.64$$

Este valor equivale a una contaminación de 0.25% de RNA residual respecto a la proteína, de acuerdo con Warburg *et. al.*, demostrando que se obtuvo una proteína de cápside de alta calidad y pureza.

$$\text{Concentración de la proteína} = \frac{A}{\epsilon b} = \frac{A_{280} \left(\frac{20256 \frac{g}{mol}}{l} \right)}{(1cm) \left(\frac{24075 \frac{l}{mol \cdot cm}}{l} \right)}$$

$$\rightarrow A_{280}(0.84) \rightarrow 0.809(0.84) = 0.6806 \frac{mg}{ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de proteína} &= (\mu l) \left[\text{Concentración} \left(\frac{\mu g}{\mu l} \right) \right] \rightarrow [200 \mu l] \left[0.6806 \frac{\mu g}{\mu l} \right] \rightarrow \\ &= 136.12 \mu g \end{aligned}$$

De acuerdo con los datos detallados en la Tabla 3, el lote 1 fue descartado al no presentar una pureza mayor a 1.5 que es la pureza mínima necesaria para considerar que existe menos del 0.50% RNA residual. Los lotes con estas características de pureza fueron almacenados en buffer de proteína a 4 °C, de esta manera se les confiere mayor estabilidad.

5.4 Reensambles de la proteína del CCMV en sales monovalentes y divalentes.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los reensambles realizados según la Tabla 1, además de los cálculos elaborados para cada una de las condiciones de pH y fuerza iónica.

5.4.1 Reensambles realizados en sal divalente.

Para ejecutar estas condiciones se realizó el cálculo de la fuerza iónica de la solución una vez amortiguada para determinar los gramos de MgCl₂ necesarios para alcanzar la fuerza iónica en el experimento en cuestión. El procedimiento se detalla a continuación.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow \frac{C_1V_1}{V_2} = C_2 \rightarrow \frac{(0.1M)(5.2ml)}{200ml} = 2.611 \times 10^{-3}$$

Donde C₁ es la concentración inicial de las soluciones de ácido y base conjugadas utilizadas para realizar el buffer al pH deseado, V₁ es el volumen total añadido de éstas; C₂ es la concentración resultante al ser diluido en V₂ que es el volumen total en el que se diluyeron las soluciones iniciales. C₂ es el valor que estamos buscando,

pues nos dirá la concentración real del buffer y en relación con ésta podremos saber los gramos que deben ser añadidos para alcanzar la fuerza iónica deseada, sin embargo, es importante determinar primero la molaridad de la sal divalente correspondiente a la fuerza iónica. Esto es determinado utilizando la ecuación de la fuerza iónica, previamente expuesta y utilizando como C_i el valor dado por C_2 recién obtenido.

$$F.I = \frac{1}{2} \sum C_i x_i^2 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$0.1 = \frac{1}{2} [2.611 \times 10^{-3} \cdot (1)^2 + x(2)^2 + 2x(-1)^2] \quad \text{Ecuación 2}$$

$$0.1(2) = 2.611 \times 10^{-3} + 4x + 2x \rightarrow 0.1(2) = 2.611 \times 10^{-3} + 6x \quad \text{Ecuación 3}$$

$$x = \frac{(0.1 \times 2) - 2.611 \times 10^{-3}}{6} \rightarrow x = 3.9 \times 10^{-2} M \quad \text{Ecuación 4}$$

El valor de x es la molaridad de la sal divalente necesaria para alcanzar la fuerza iónica solicitada, siendo para este ejemplo de 0.1 como se muestra en la Ecuación 3, en seguida se realizará el cálculo de los gramos del $MgCl_2$ utilizando la formula general de la molaridad, despejada para gramos.

$$gr = \left(3.9 \times 10^{-2} \frac{M}{L}\right) (0.2L) \left(203.31 \frac{gr}{mol}\right) = 1.337 \text{ gr } MgCl_2$$

Por lo tanto, para alcanzar la fuerza iónica de 0.1 en un buffer de citratos para un pH 3 a 6, se deberá añadir 1.337 gr de $MgCl_2$ a la solución amortiguadora. Una vez incorporada la sal, se volvió a ajustar el pH y se dispuso del buffer para su interacción con la proteína en diálisis. A continuación, en la Tabla 3 se muestran las condiciones de fuerza iónica a la que se trabajó, además de los gramos de $MgCl_2$ añadidos en cada una de ellas,

Tabla 3 Gramos añadidos de MgCl₂ por cada fuerza iónica.

Tabla 3	
Fuerza iónica	Gramos de MgCl₂
0.002	0.0571
0.01	0.2856
0.03	0.8576
0.07	1.99
0.1	2.86
0.3	8.56
0.7	19.99
1	28.56
2	57.12
4	114.25

5.4.2 Reensambles realizados en combinación de sales divalentes y monovalentes.

Para simular mejor las condiciones a las que se somete la proteína en un entorno más análogo al natural, se establecieron relaciones porcentuales de NaCl y MgCl₂, con la mayor proporción en la primera respecto a la otra. Se seleccionaron proporciones de 80-20%, 99-1% y 99.5-0.5%. Las condiciones de diálisis se mantuvieron sin cambios y los cálculos para el gramaje de las sales se realizaron de acuerdo con las proporciones con el procedimiento previamente expuesto.

A continuación, se muestra en la Tabla 4 con los gramos de sal añadidos de acuerdo con las mezclas de sal.

Tabla 4 Gramos de sales monovalentes y divalentes añadidos de acuerdo con la fuerza iónica de la solución

Fuerza iónica	Mezcla 80-20%		Mezcla 99-1%		Mezcla 99.5-0.5%	
	NaCl	MgCl ₂	NaCl	MgCl ₂	NaCl	MgCl ₂
0.002	0.0467	0.0309	0.0057	5.748x10 ⁻³	0.0109	3.2 x10 ⁻⁴
0.01	0.0921	0.0584	0.1459	2.867x10 ⁻³	0.1702	1.63x10 ⁻³
0.03	0.3951	0.1758	0.0485	5.746x10 ⁻³	0.3197	1.90x10 ⁻⁵
0.07	0.9539	0.4034	1.1893	0.0200	1.20	0.01
0.1	1.3881	0.5784	1.7140	0.02866	1.76	0.0146
0.3	4.1942	1.7200	5.1843	0.0857	5.21	0.0429
0.7	9.8101	4.0071	12.1491	0.2003	12.21	0.1
1	14.0939	5.7605	16.4329	0.2708	14.5	0.1190
2	29.0408	11.8387	35.0746	0.5771	29.04	0.238
4	57.1449	23.2870	70.1589	1.1549	69.76	0.571

5.5 Análisis y caracterización de estructuras proteicas virales mediante microscopía electrónica de transmisión.

En esta sección se examinarán a detalle las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, correspondientes a las diversas mezclas de porcentaje salino. Para su exposición y análisis se han seleccionado las micrografías de las condiciones más relevantes de cada mezcla.

5.5.1 Microscopías de MET con muestras en una de proporción 80-20% de sales monovalentes y divalentes.

El uso de sales divalentes como auxiliares del desensamblaje viral representa un fenómeno importante al comprender translocación proteica que conlleva su simetría

eficiente y polimorfismo, es por lo que se expuso a la proteína del CCMV desde concentraciones adecuadas para ensamblaje y posteriormente se realizó un incremento de proporción de sales divalentes.

En la proporción de 80-20% de sales monovalentes y divalentes las estructuras que se observan tienen similitud con cápsides. El tamaño del diámetro exterior de estas estructuras como se observa en la Figura 32, varía desde 18 hasta 23 nanómetros aproximadamente, confiriéndole un número de triangulación de $T=3$; el rango de tamaño puede ser resultado de la alta protonación de los iones carboxilos de la proteína que se ven afectados por la baja fuerza iónica y la presencia del Mg^{2+} . Este último suele estar posicionado para formar puentes con los grupos carboxilos durante el reensamblaje, considerando la disminución del pH. Es en este el momento en el que usualmente se pierden los iones Mg^{2+} y finalmente se forman los puentes de hidrógeno; las cápsides que no se encuentran totalmente formadas (Véase la Figura 33) pueden ser resultado de una mala protonación, desestabilizando las cargas exteriores de la estructura y resultando en un ensamblamiento exterior poco definida.

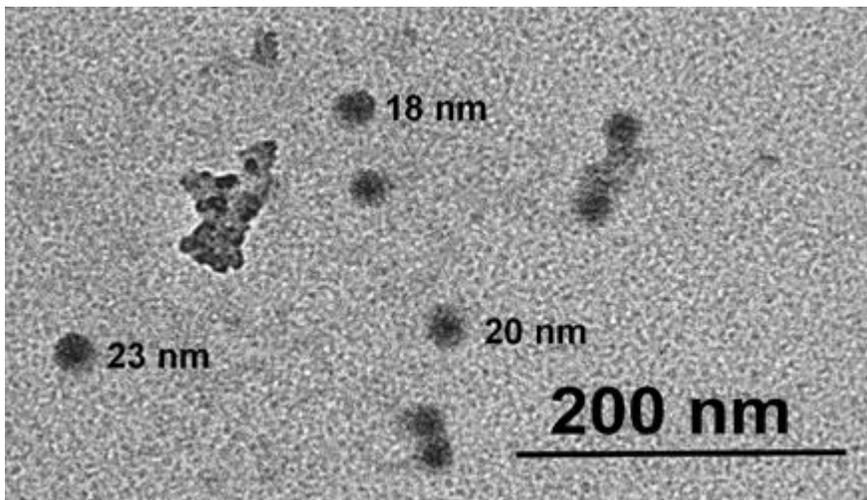
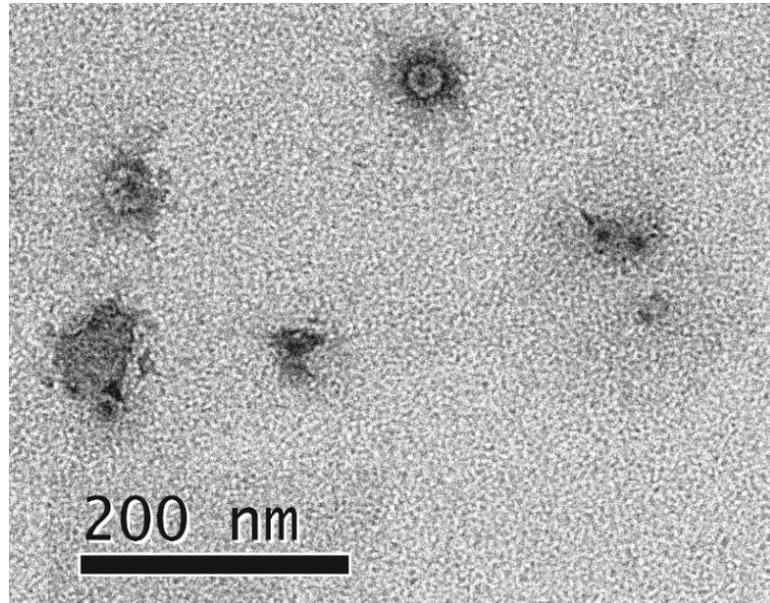


Figura 32 Micrografía de solución amortiguadora con $I=0.1$ y pH 3.0 en la cual se pueden observar cápsides de distintos tamaños.

Figura 33 Micrografía con buffer $I=0.1$ y pH 3.0 con cápsides incompletas.



La escasa nitidez de capa exterior también puede ser consecuencia de la variación en el aporte de carga de los residuos básicos de la proteína, que se ven afectados en pH ácido, es posible que el aumento en el medio soluble de los iones divalentes interfiera cualitativamente en la curvatura espontánea de la cápside y su mal ensamblamiento exterior sea la representación de las interacciones competitivas interferidas por el Mg^{+2} (Véase la Figura 34). En condiciones en las que la estructura de la cápside esta ordenada la curvatura no se ve afectada con un cambio en el pH (L. Lavelle et al., 2009).

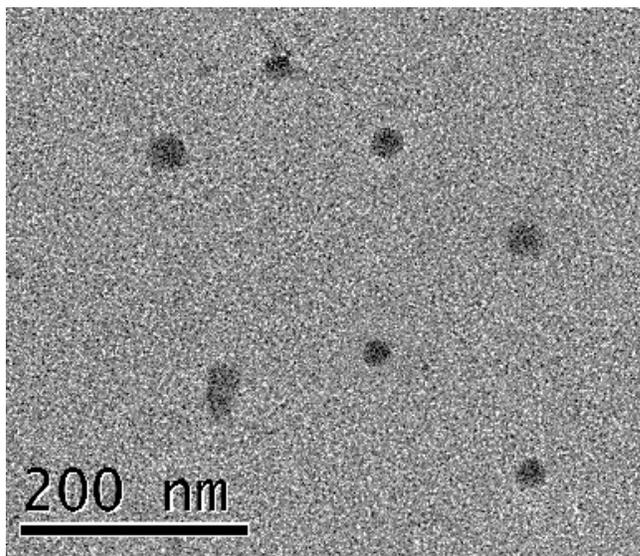


Figura 34 Micrografía de $I= 0.1$ y pH 3.8 con cápsides de borde difuso, en algunas es posible observar el usual centro oscuro, pero sin el usual borde definido.

Por otro lado, se ha reportado en el pasado que el aumento del pH y la alta concentración de sales divalentes, ejerce un efecto en la proteína que se refleja en la precipitación acelerada (Bancroft et al., 1967), este comportamiento también se observa en la Figura 35, donde se presenta la coexistencia de estructuras tipo cápside y proteína degradada. Lo anterior puede ser relacionado al aumento de las interacciones electrostáticas presentes en el medio a causa de los iones divalentes libres, que elevan la barrera energética para formación de estructuras estables, rezagando las cápsides a solo unas cuantas.

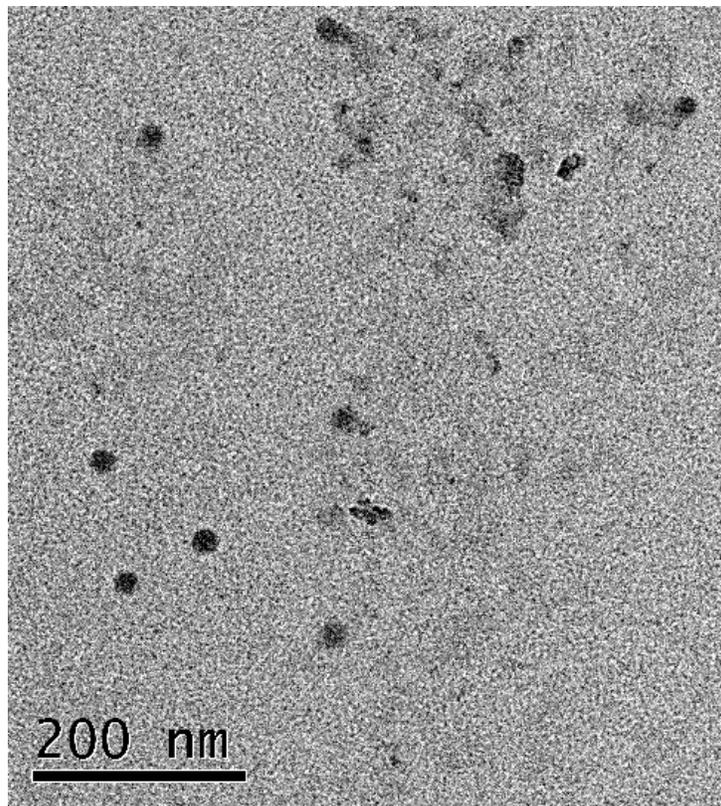


Figura 35 Micrografía de $I=0.1$ y $\text{pH}= 3.8$ con presencia de proteína precipitada cerca de estructuras similares a cápsides.

Otro hallazgo interesante que se puede resaltar de esta mezcla es la tendencia de aquellas cápsides con mal ensamblamiento, a unirse en pares o triadas. En el diagrama de fases realizado por Lavelle *et. al.*, se reportan estructuras tipo

“campana” como las que se muestran en la Figura 36 en condiciones de pH de 7 y en solución amortiguadora de cacodilato sin presencia de sales añadidas. En nuestro caso se observan en un extremo de este diagrama, en pH de 3.0 y 3.8 como se muestra en la Figura 37. Este comportamiento de la proteína ya ensamblada puede ser resultado de la variación en las cargas electrostáticas externas, resultando en una ambivalencia positiva y negativa coexistentes, que a su vez provoca una estabilidad mediante el apareamiento.

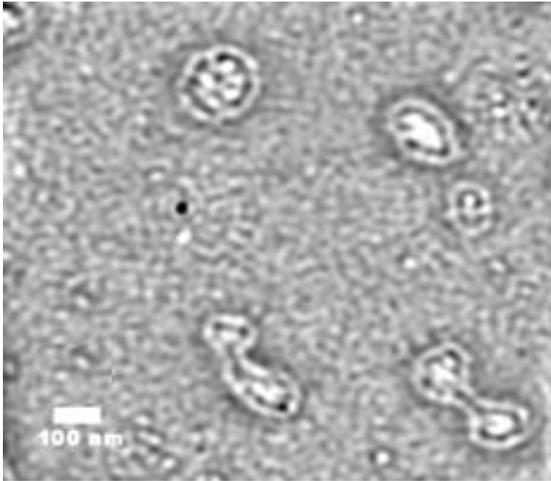
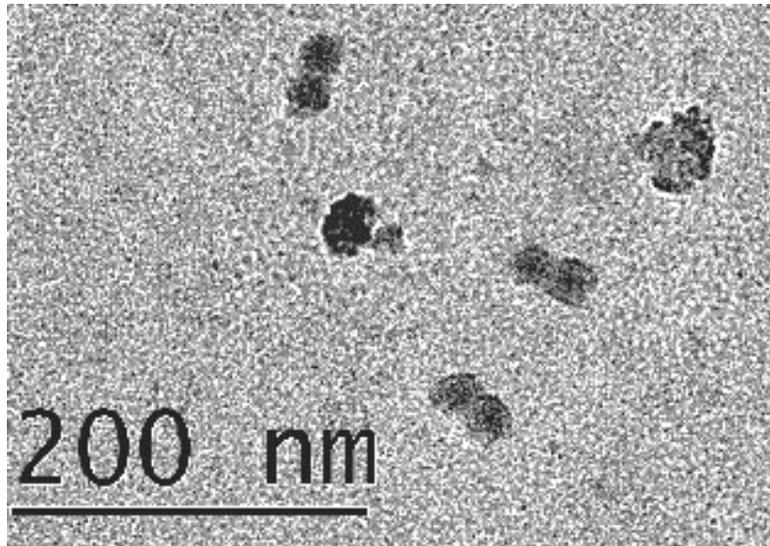


Figura 36 Micrografía tomada de Diagrama de Fases realizado por Lavelle *et. al.* (L. Lavelle et al., 2009)

Figura 37 Micrografía tomada en $I=0.1$ y pH 3.0 donde se observan cápsidas apareadas.



También se ha observado este comportamiento en la cápsidas proteicas que interaccionan con RNA de diferentes rangos de longitud (Véase la Figura 38) (Cadena-Nava et al., 2012), en este caso como consecuencia de la compensación de cargas entre el amino terminal y el RNA, que corresponden a una mayor

interacción proteína-polímero en comparación de las interacciones proteína-proteína.

Es posible las estructuras que se aprecian en la Figura 39 se deban al exceso de proteína en el medio, provocando la saturación de sitios de unión de los aminoácidos básicos, que a su vez aumentan en las interacciones proteína-proteína, a consecuencia de una alta disponibilidad de cargas divalentes y un bajo pH.

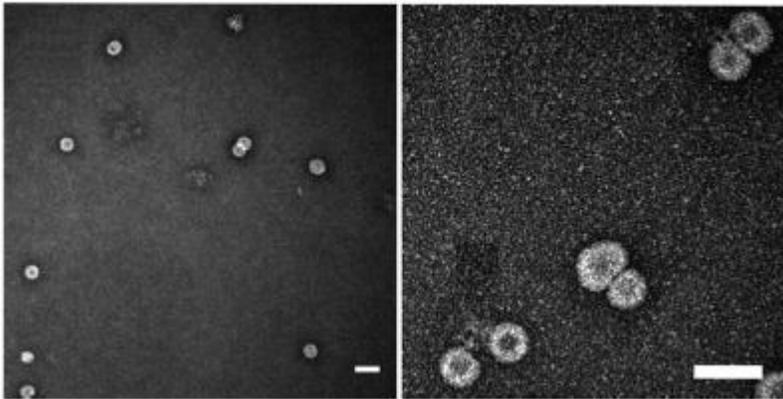
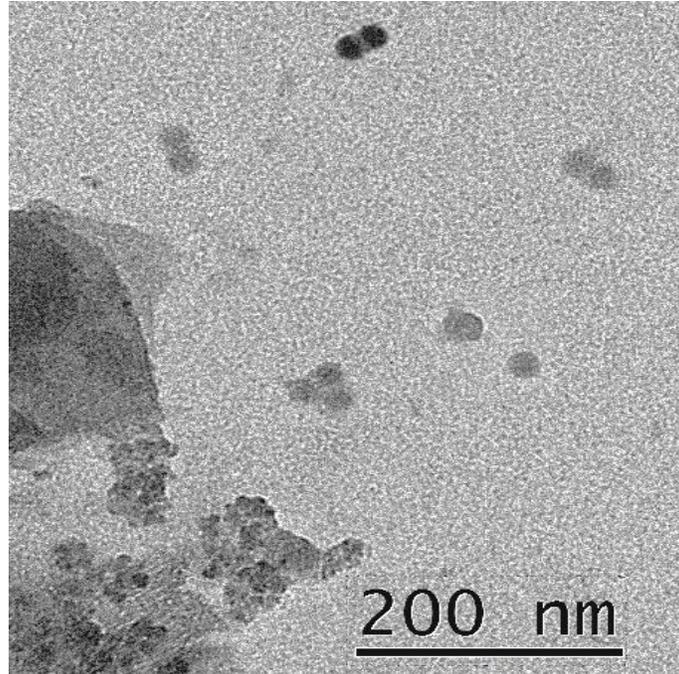


Figura 38 Micrografías de uniones múltiples de cápsides en presencia de RNA, imagen adaptada de referencia (Cadena-Nava et al., 2012) Escala de 50nm.

Figura 39 Micrografía de $I=0.1$ y pH 3.8 con presencia de tres tipos de estructuras coexistentes.



5.5.2 Microscopías de MET con muestras en una proporción 99-1% de sales monovalentes y divalentes.

Los estudios realizados hasta el momento sobre las fases de estructuración proteica viral como el realizado por Bancroft (Bancroft et al., 1969) y posteriormente por Lavelle *et. al.* 2009, reportan un espectro de estructuras presentes entre las fases delimitadas para sus diagramas; incluso Speir en su reporte de estructuras por cristalografía de rayos X (Speir, Munshi, Wang, Baker, & Johnson, 1995) hace mención de estas “*estructuras aberrantes*”. Para este proyecto se ha considerado la variación del estado catiónico de la solución al disminuir gradualmente la cantidad de sales divalentes presentes en una solución no saturada, proporcionando un ambiente listo para la interacción electrostática.

Para comenzar el ensamblaje de una cápside proteica, se parte de la asociación de dos dímeros donde las colas amino terminales tienen un papel clave y como se ha observado en los resultados de la mezcla anterior, tienen una sensibilidad importante a la fuerza iónica. Esto se debe a que la orientación estérica, que contribuye al acomodo adecuado de los dímeros para ubicar las cargas positivas en disposición del RNA o de otros dímeros (Chen, Lansac, & Tresset, 2018).

Como resultado se puede observar una dispersión en la proteína, sin llegar a un estado de agregación como se observa en la Figura 40, esto podría ser consistente con el diagrama de fases en sales monovalentes (L Lavelle et al., 2009) en donde se observan ausencia de cápsides hasta elevar la fuerza iónica por encima de 0.1 M, sin embargo, resulta relevante al comparar este acomodo proteico cuando se aumenta el pH a 3.8 (Véase la Figura 41) donde los dímeros proteicos cambian su conformación espacial para agruparse en estructuras más grandes, variando sus ángulos e incluso aumentando su densidad proteica.

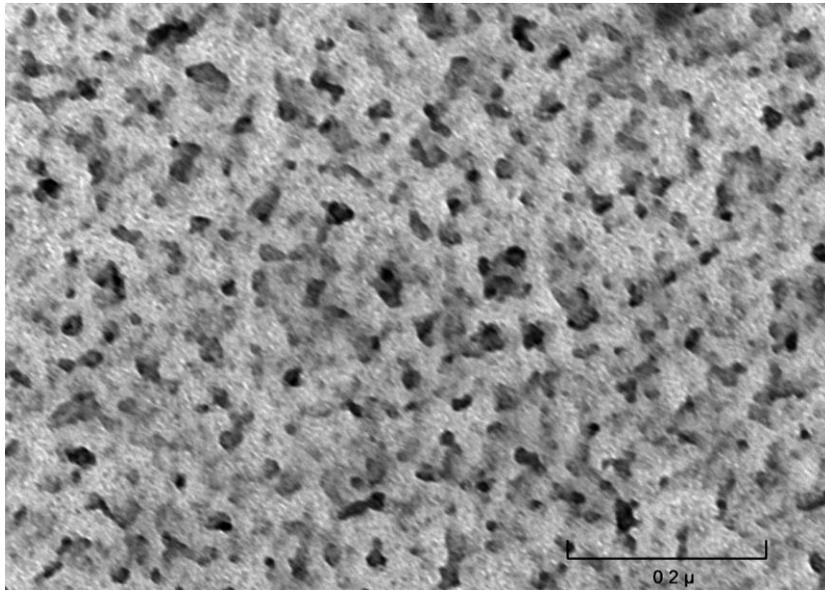


Figura 40 Micrografía de $I=0.07$ y pH 3.0 con presencia de proteína dispersa no agregada, agrupada en estructuras pequeñas sin curvatura estable. Escala 200 nm.

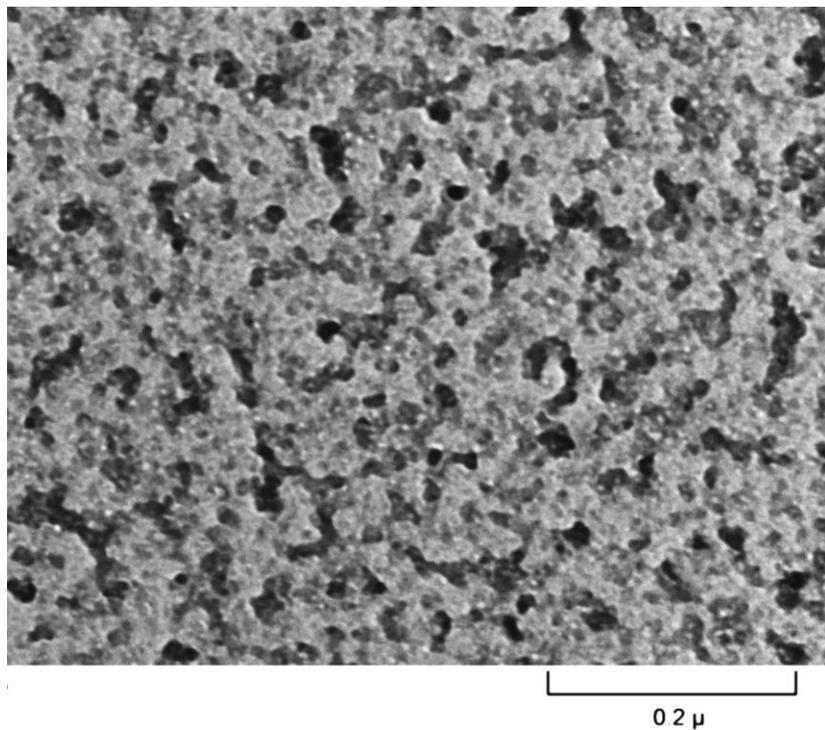


Figura 41 Micrografía de $I=0.07$ pH 3.8 donde se observa proteína con mayor densidad proteica (contraste oscuro) denotando una modificación en los ángulos de los dímeros para formar estructuras irregulares.

La baja concentración de sales divalentes en esta mezcla podría tener efecto de *estiramiento* entre los dímeros, aumentando el ángulo espacial entre ellos y acercándolo los extremos proteicos con carga negativa. Para una mejor representación se muestra la Figura 42 donde se observa la variación en el ángulo entre dos dímeros cabe destacar que la estructura de un dímerno libre es más suelta en comparación de su posición dentro de una cápside (Chen et al., 2018).

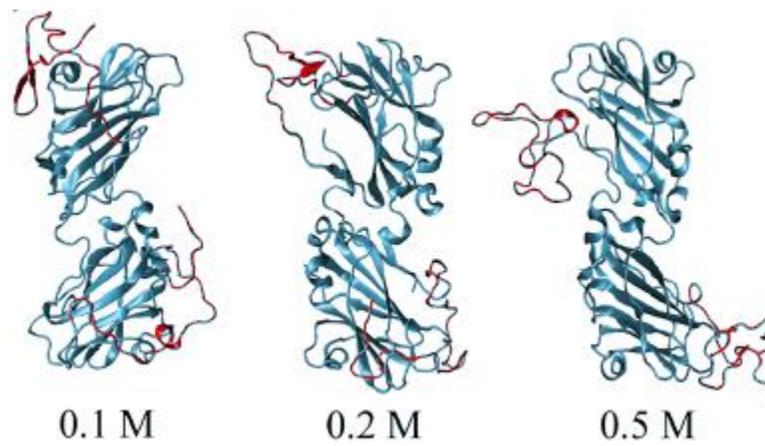


Figura 42 Instantáneas de la conformación de un dímerno para salinidades de 0,1, 0,2 y 0,5 M. Las colas de un dímerno (residuos 2-39) están en rojo (Chen et al., 2018).

No existe una distribución equitativa de las cargas, en su defecto, estas se distribuyen arbitrariamente a lo largo de la proteína. Esto último contribuye a una fuerte asociación energética entre los dímeros, que influye en la formación de trampas cinéticas. Esta obstrucción es consecuencia de los extremos amino terminal de la proteína ocupando dominios hidrofóbicos e inhibiendo el acceso a otros dímeros (Chen et al., 2018).

En la Figura 43 podemos observar con más detalle la propiedad en la cual se presentan estructuras alargadas que comienzan a orientarse para formar una especie de *redes*. La unión de dímeros se vuelve más ordenada disminuyendo la cantidad de proteína libre a su alrededor (Véase la Figura 44) y ganando densidad proteica, incluso formando dominios hidrófobos dentro de las mismas *redes*, como se detalla en la Figura 45.

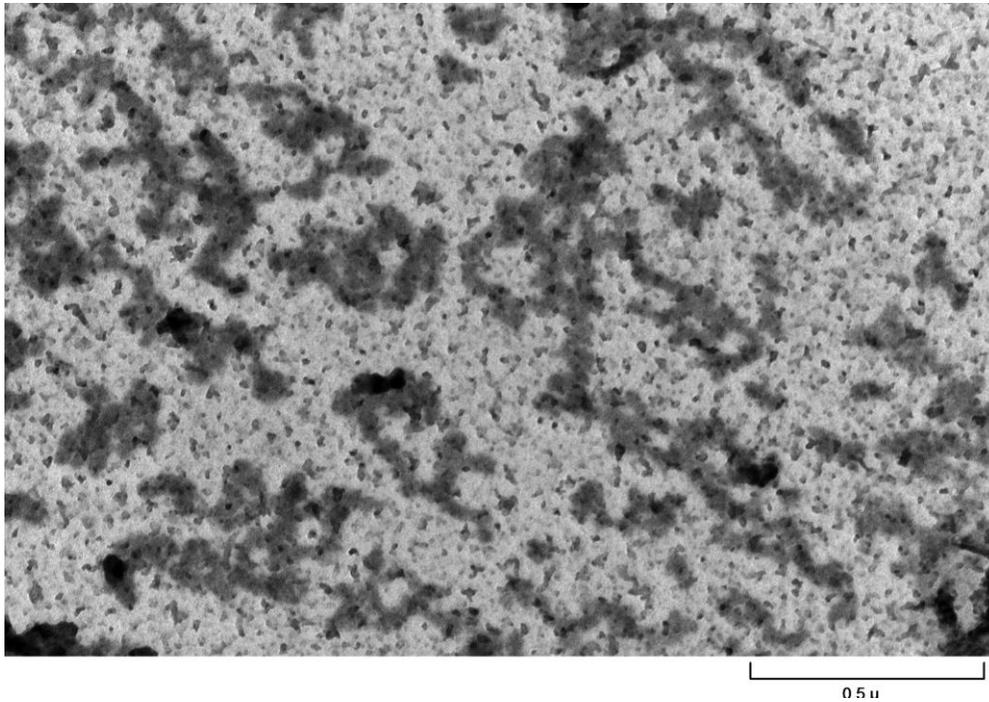


Figura 43 Micrografías de $I=0.07$ pH 3.8 con estructuras proteicas alargadas, como consecuencia de un aparente estiramiento entre dímeros consecuencia de una baja fuerza iónica. Escala a 200 nm.

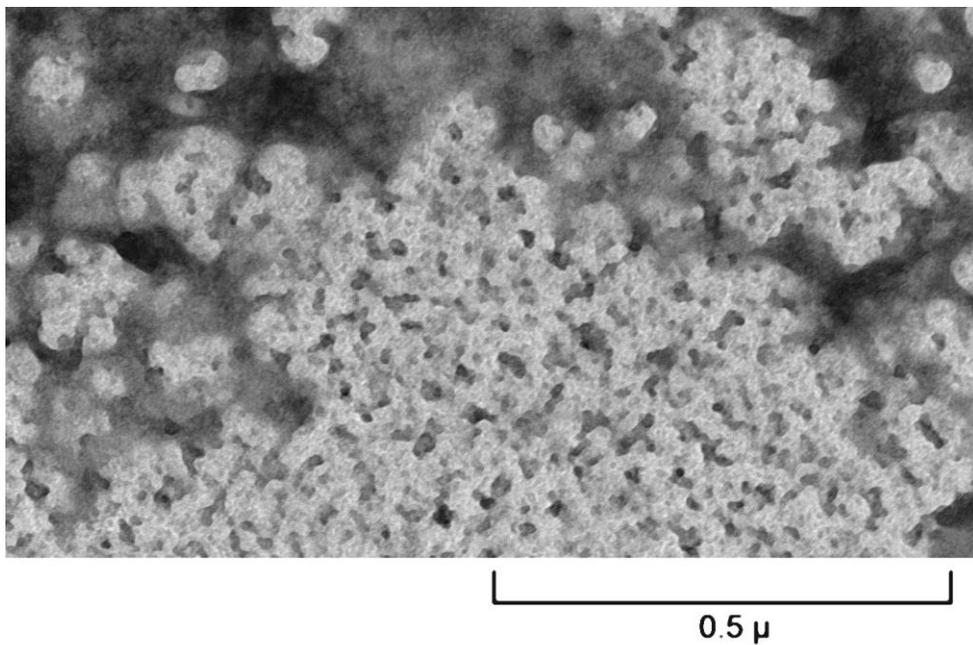


Figura 44 Micrografías de $I=0.07$ pH 3.8 de vista panorámica donde se aprecian las *redes* proteicas y su persistencia en longitud.

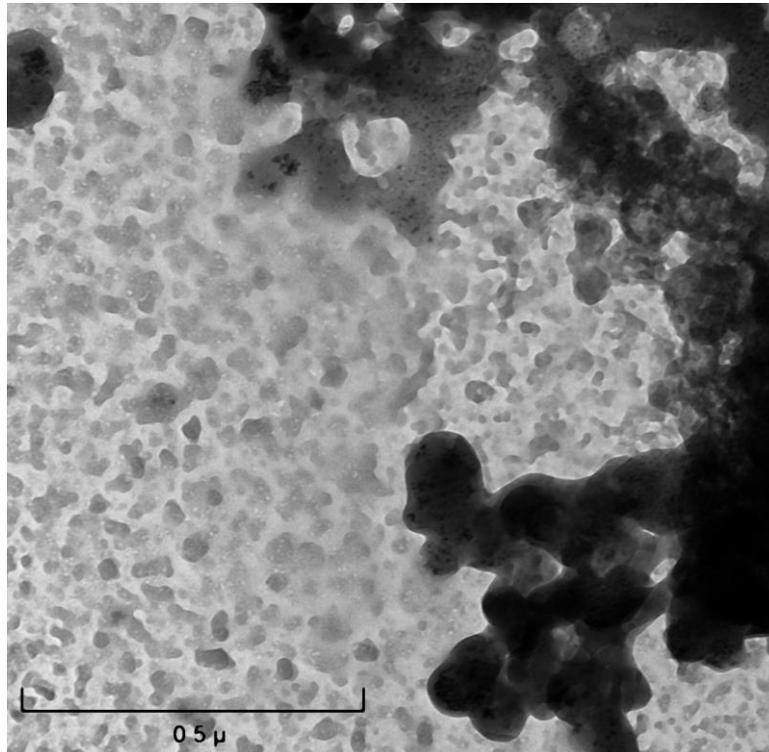


Figura 45 Acercamiento de las micrografías de $I=0.07$ pH 3.8 donde se marcan los dominios hidrófobos.

Al aumentar la fuerza iónica a 0.1 en la mezcla, el comportamiento de la proteína se ve afectado formando rosetas o discos proteicos (Véase la Figura 46), organizados en *redes estrelladas* similares a hexámeros superpuestos (Véase Figura 47), esto es consistente con el diagrama de fases original, donde el reensamble proteico se lleva a cabo por debajo del pH 5, sin embargo en este caso podríamos estar observando una de las multi-fases de ensamblaje cinético en el cual se prevé la formación de oligómeros seguida de una formación lenta de cápsides. No obstante, la presencia de sales divalentes podría inducir a la formación temprana, acelerada y abundante de productos polimerizados provocando la formación de numerosos “núcleos” que resultan en estructuras “aberrantes” (Adam Zlotnick, Aldrich, Johnson, Ceres, & Young, 2000).

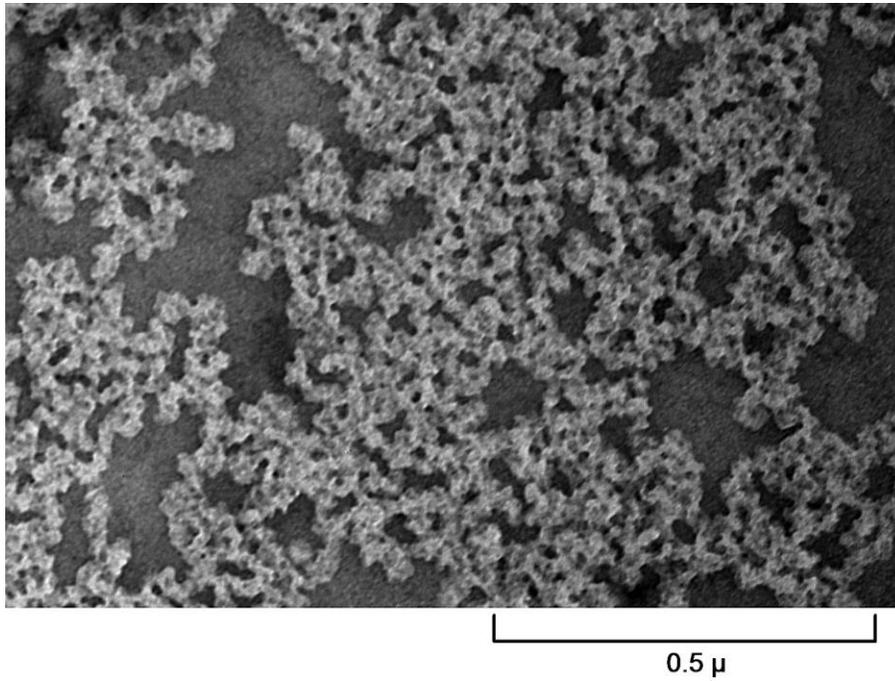


Figura 46 Micrografía de solución a $I=0.1$ y pH 4.4. Vista panorámica del comportamiento periódico de la proteína para formar rosetas o “discos proteicos”.

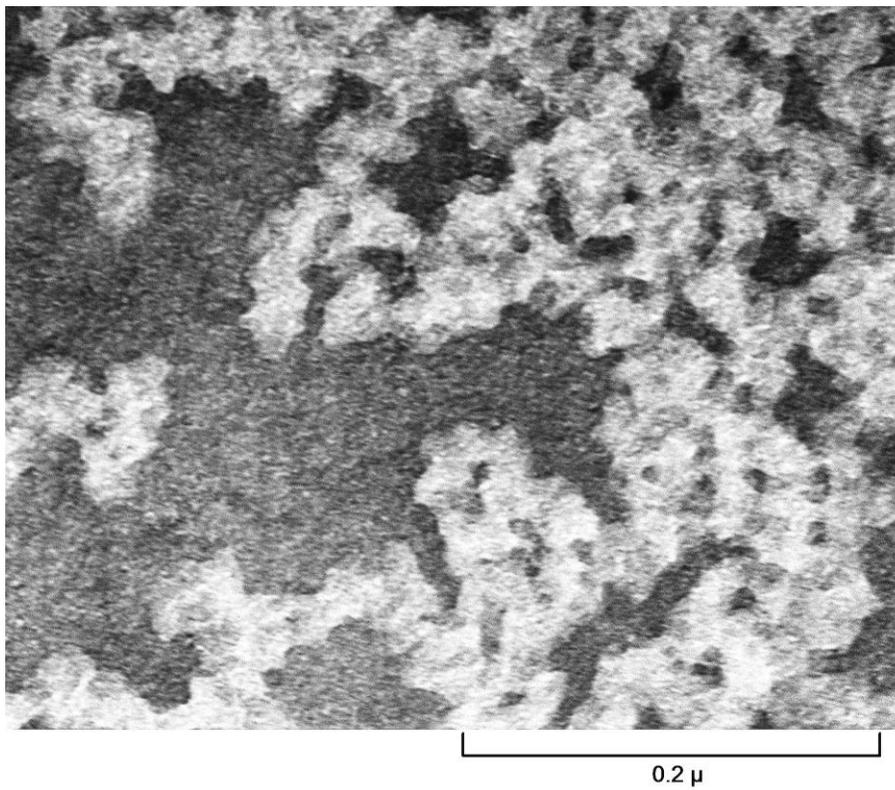


Figura 47 Micrografía de $I=0.1$ pH 4.4 con acercamiento para apreciación a detalle de las estructuras en forma de rosetas. Escala 200 nm.

Para continuar con el diagrama de fases es necesario realizar un incremento de fuerza iónica, por lo que es aumentada a 0.3 M. En el barrido de pH se observan similitudes en el comportamiento proteico observado en fuerzas iónicas anteriores, con presencia de trampas cinéticas en pH de 3.8 (Figura 48) que resultan en dímeros dispersos en el fondo.

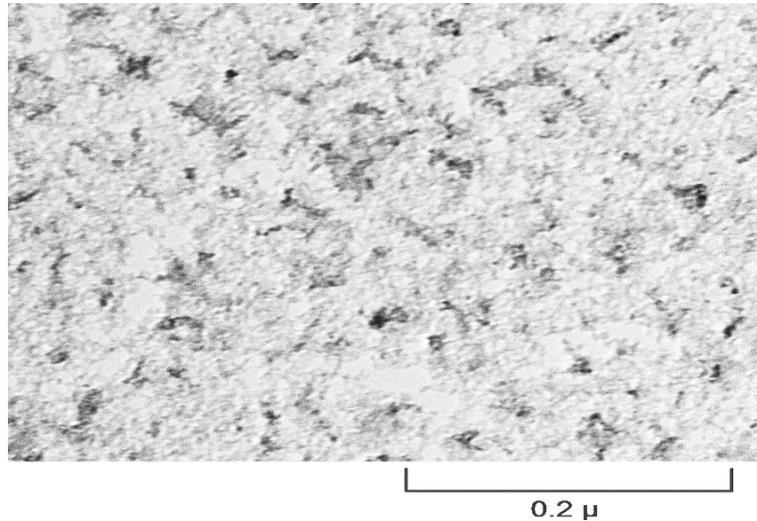


Figura 48 Micrografía de $I=0.3$ y pH 3.8 con dímeros dispersos en la muestra.

Con el aumento de pH se presenta un cambio en la fase proteica, donde se observa una translocación de los dímeros en capsómeros con orientaciones diversas e irregulares (Véase Figura 49) distribuidos en estructuras planas y la presencia de sitios hidrófobos disminuye (Chen et al., 2018; Miao et al., 2010; Tama & Brooks, 2002).

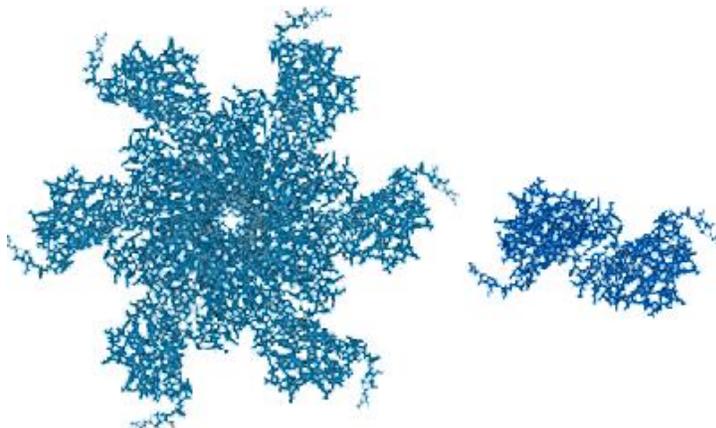


Figura 49 A la derecha esquema proteico del capsómero hexaédrico y de lado derecho el esquema del dímero. Esquema adaptado desde referencia. (Chang, Knobler, Gelbart, & Mason, 2008)

Con el siguiente aumento de pH en esta solución, el comportamiento proteico debería sufrir una traslocación en su ángulo diedrico que permita la ordenación de hexameros y pentameros y a su vez conformación una curvatura natural, resultando en la formación de cápsides (Bereau, Globisch, Deserno, & Peter, 2012). Cuando no existe flexibilidad entre subunidades proteicas, se limita el polimorfismo de la proteína pero no así su estabilidad energética. Lo anterior puede ser demostrado en la Figura 50 donde se observa una especie proteica singular, con apariencia de discos o bien, *redes globulares*; este tipo de estructuras tienen un acomodo laminar similar al mostrado en la Figura 51 y con mayor detalle en la Figura 52 donde los puntos rojos demuestran las areas con baja densidad proteica.

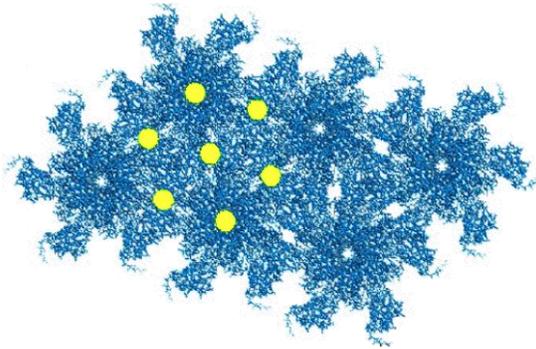


Figura 50 Estructura tipo red creada por el empaquetamiento hexagonal de capsómeros en cercanía de dímeros proteicos de una superficie plana. Esquema adaptado desde referencia. (Chang et al., 2008).

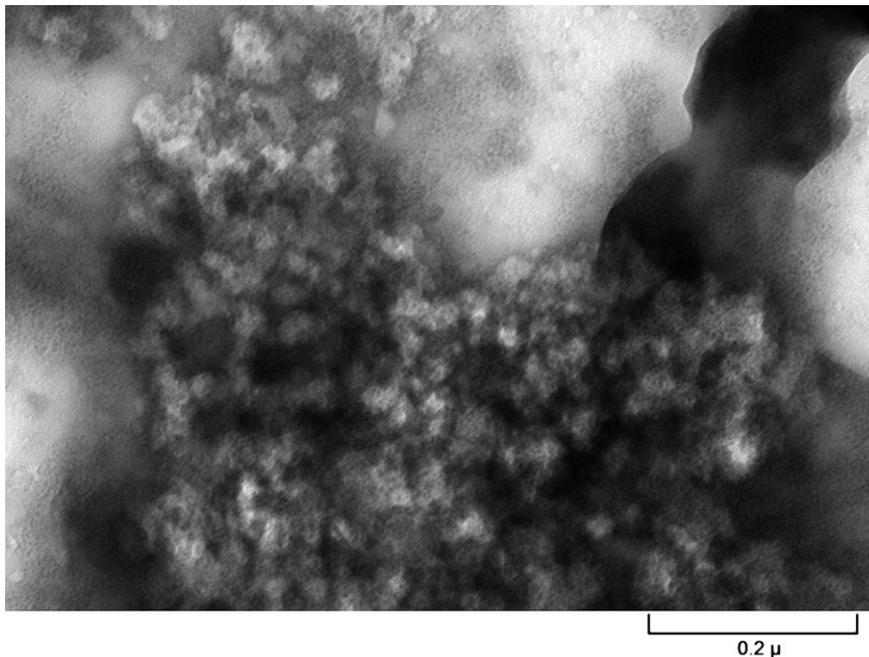


Figura 51 Micrografía de $I=0.3$ y pH 5.6 con estructuras laminares de proteína.

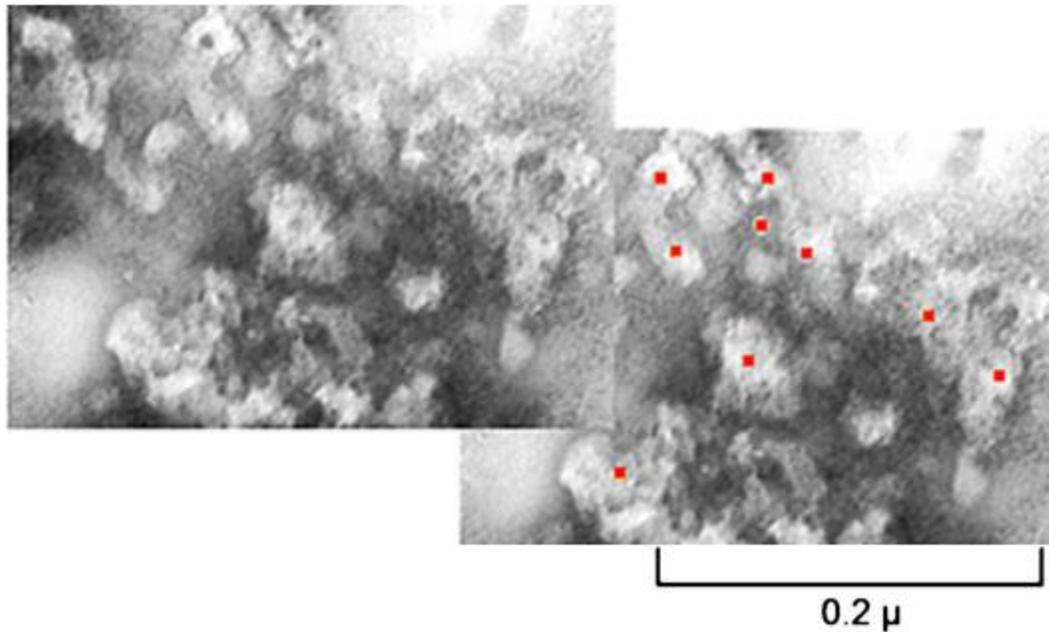


Figura 52 Detalle de micrografía con resalte en los puntos de baja densidad proteica.

En condiciones de fuerza iónica de 0.7 M la variación en las fases parecen estar un paso adelante respecto a la translocación proteica se refiere, puesto que a pH de 3.8 la proteína no se distribuye en dímeros angulares, en su defecto, se observa un estiramiento entre dímeros para formar capsómeros dilatados, como se observa en la Figura 54. Este comportamiento se manifiesta en largos dominios, esto último es consistente con el comportamiento de los extremo amino-terminal de la proteína, donde al compactarse, disminuye su probabilidad de unirse a otro cuerpo proteico y por lo tanto a formar estructuras estables como pentámeros o hexámeros (Chen et al., 2018).

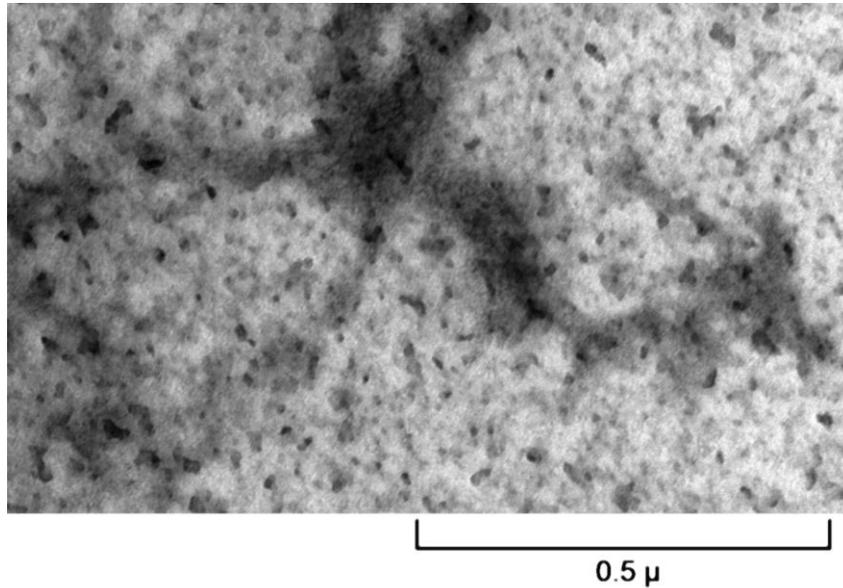


Figura 53 Micrografía de $I=0.7$ y pH 3.8 donde se aprecia entidades proteicas similares a cápsomeros dilatados.

Como se había presentado en condiciones estudiadas previamente en esta mezcla, el efecto del pH se refleja en el desorden proteico resultado de la dispersión de los dímeros y la formación de trampas cinéticas (Johnson et al., 2005), es por ello que al elevar el pH a 4.4 los cápsomeros levemente formados en el estado anterior desaparecen para dar lugar a los dominios proteicos (Chen et al., 2018) como se aprecia en la Figura 55.

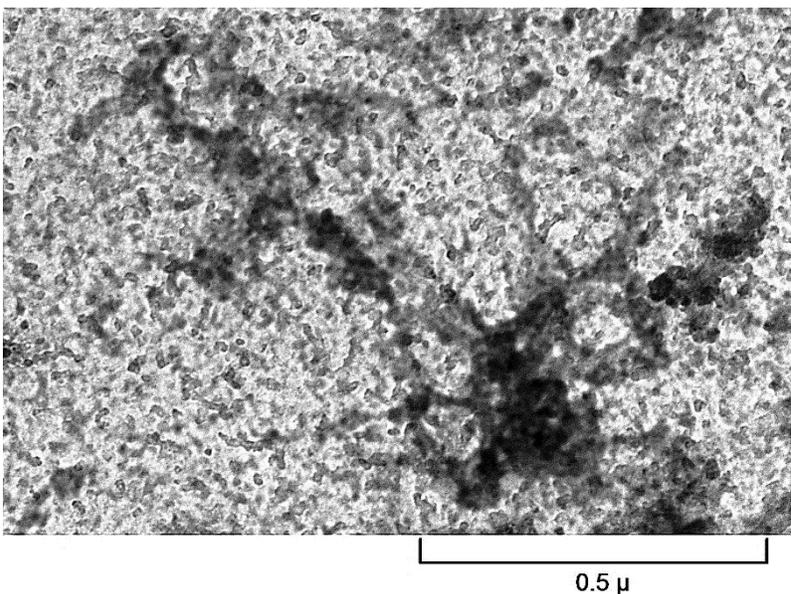


Figura 54 Micrografía de $I=0.7$ y pH 4.4 con dispersión de proteína creando dominios más comprimidos.

Después de observar la formación de capsómeros podría intuirse que en un pH más cercano a 5, la formación de partículas tipo cápside debería estar más próxima, sin embargo, cuando se presentan altas concentraciones cationicas unidas a elevadas concentraciones proteicas, puede resultar en formación de pentámeros que bajo estas condiciones agota la concentración de subunidades proteicas libres y evita el ensamblaje (Adam Zlotnick et al., 2000). En algunos casos, con estas condiciones podrían formarse estructuras tipo cápside de simetría de $T=2$, sin embargo, debido a al estado altamente cationico, solo es posible observar una fase de dominios proteicos más ordenada cuando se aumenta el pH a 5.6 (Véase la Figura 56).

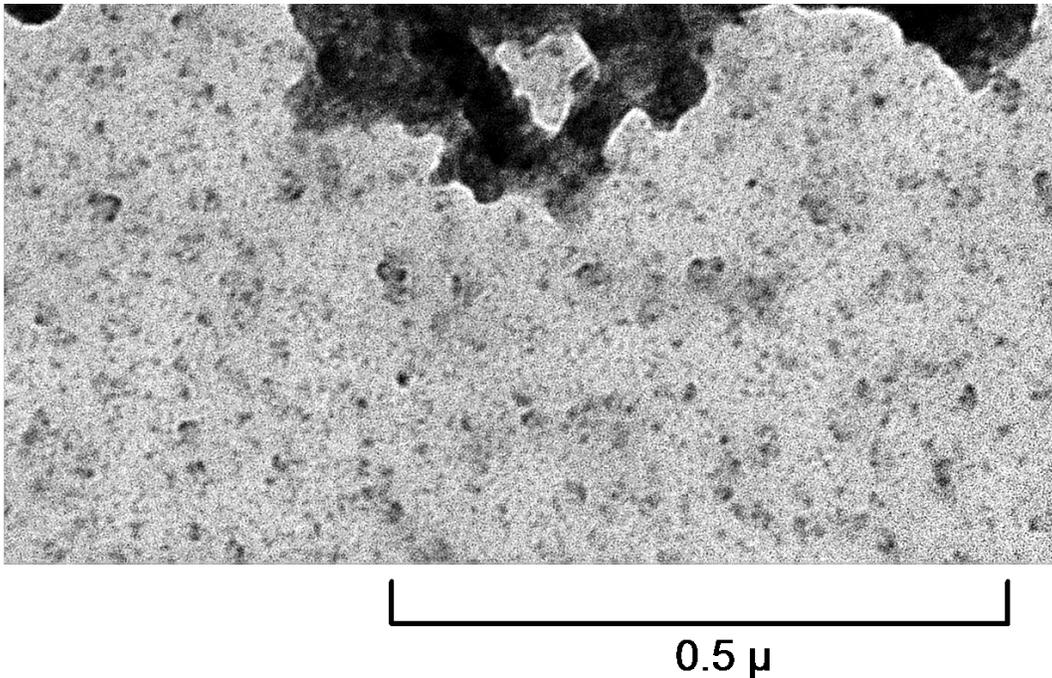


Figura 55 Micrografía de $I=0.7$ y pH 5.6 Ensamblajes proteicos con aparente estado de transición que genera dominios proteicos.

5.5.3 Microscopías de MET con muestras en una proporción 99.5-0.5% de sales monovalentes y divalentes.

Como se ha mencionado previamente, las transiciones estructurales de la proteína presentan un cambio importante cuando se alcanzan las “condiciones” ideales para una estabilidad proteica, esto se refleja en formaciones más homogéneas y a su vez en un reensamblaje exitoso de la proteína en cápsides similares a las nativas. Lo anterior se debe en su mayoría a la presencia de sales que estabilizan la proteína permitiendo el reacomodo correcto de diferentes grupos funcionales.

Para describir la importancia de la “concentración adecuada” de sales divalentes, se ha estudiado en el pasado su efecto al transitar el proceso de reensamblaje proteico en presencia de distintos tipos de sales metálicas (Hiebert & Bancroft, 1969), concluyendo que el Mg^{2+} representa un elemento importante al permitir la formación de enlaces metálicos entre las subunidades que no se ven fuertemente atraídas al ácido nucleico, como lo son los grupos carboxilo particularmente ionizados durante la diálisis.

En pH por encima de 7 y fuerza iónica menor a 0.2 M las partículas muestran cápsides dilatadas, como resultado de una expansión radial de la cápside vírica en los ejes de 3-pliegue, puesto que el aumento del pH remueve los iones Ca^{2+} de estos ejes desestabilizando la estructura natural del virus (Tama & Brooks, 2002). Sin embargo, en esta mezcla de 99.5-00.5%, al disminuir el pH a valores por debajo de 6.0 y fuerza iónica menor a 0.2, los ensamblajes obtenidos en presencia de Mg^{2+} podrían resultar parciales, distinto a la cápside natural, cuyo comportamiento se observa en la Figura 57.

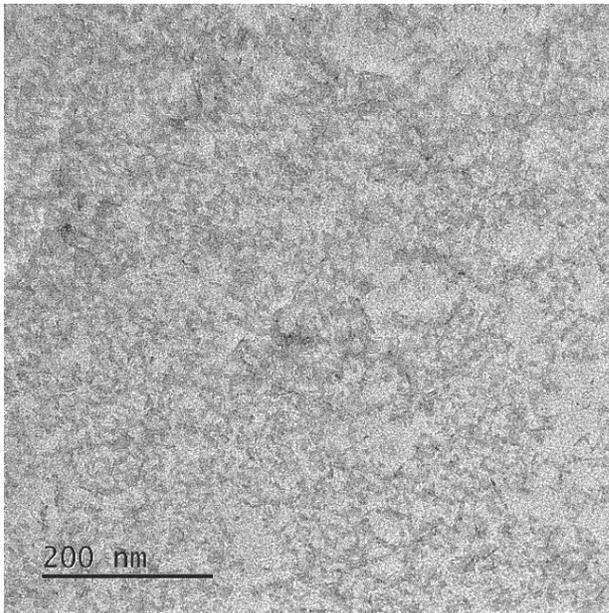


Figura 56 Microscopía correspondiente a pH 5.6, I=0.1 donde se observa la proteína diseminada sin estructura estable pero homogénea respecto a aparente porosidad proporcionada por la deposición con contraste de acetato de uranilo y la base de la rejilla.

Según el diagrama de fases realizado por Lavelle *et. al.* el reensamblaje proteico en estructuras indistinguibles de las nativas en ausencia de RNA, se ve altamente promovido cuando se alcanzan un pH <5 y donde la fuerza iónica participa afectando el diámetro o la multipared de las cápsidas formadas. Aún con la ausencia de sales divalentes en los buffers de tratamiento de la proteína y su posterior estabilización termodinámica, no es posible ejercer una ausencia total de cationes divalentes, debido a aquellos que se encuentran intrínsecos en la proteína.

Para el análisis de este proyecto, se trató la proteína con muy bajas concentraciones de Mg^{2+} (<0.02M) y NaCl (<0.2M), como resultado es posible observar la dinámica proteica que tiene a la formación de pseudo-estructuras esféricas con degradación en su simetría (véase la Figura 58), denotando su inestabilidad a falta de la cantidad adecuada de cationes divalentes (Miao et al., 2010). Aquellos sitios de la solución salina en la cual se ha logrado estabilizar la proteína, consigue formar estructuras esféricas con una geometría T=2 (<60 subunidades), como lo demuestra su diámetro variable en la Figura 59.

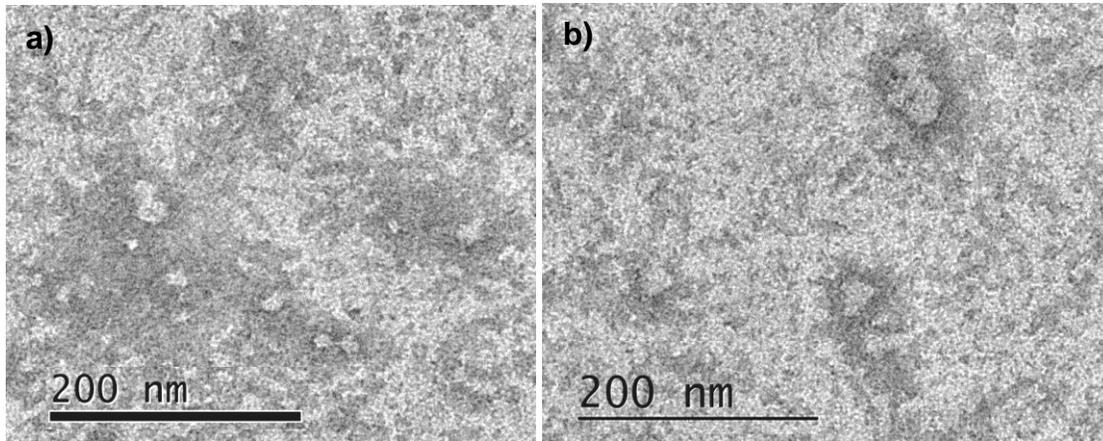


Figura 57 Micrografías de solución salina con proteína en $I=0.1$ y pH 4.7 en mezcla de 99.5-0.5%.

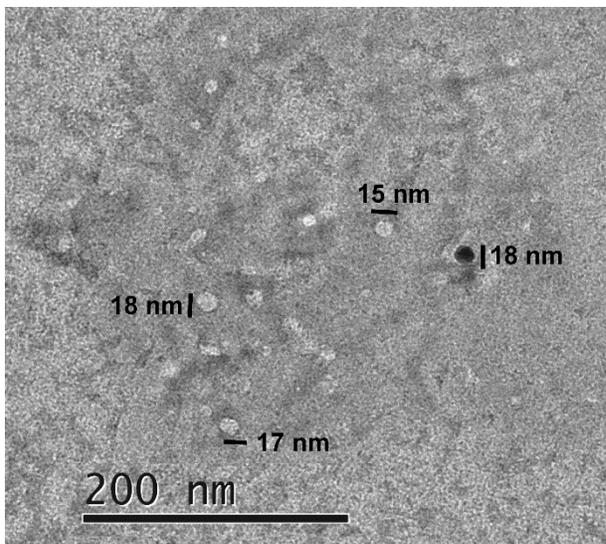


Figura 58 Micrografía correspondiente a la $I=0.1$ y pH 4.7 donde se observan estructuras esféricas.

Las estructuras heterogéneas mostradas, también resultan de los residuos proteicos ácidos como el ácido aspártico y glutámico, que no logran quelarse adecuadamente para lograr una estabilidad energética, como función directa de la disminución del pH (Hiebert & Bancroft, 1969b). Al llegar al pH 3.8 este efecto se resalta de forma colaborativa con el punto isoeléctrico de la proteína que corresponde a 3.7. Como resultado, las estructuras encontradas resultan menos estables debido a las repulsiones electrostáticas mínimas que provocan la agregación de la proteína, por lo cual se observa en la Figura 60 con proteína diseminada en el fondo.

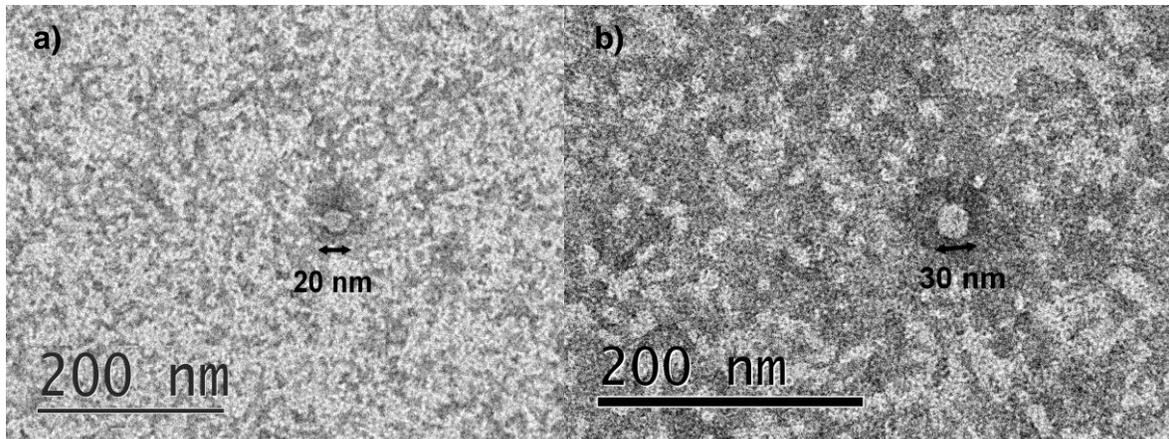


Figura 59 Micrografías correspondientes a la solución de $I=0.1$ y pH 3.8 donde se observan formaciones esféricas con diámetros de 20 y 30 nm.

Al alcanzar un pH de 3.0 es posible observar una fase particular en la cual sucede una interacción de dímeros. Speir *et. al.* determino que esta interacción representa el contacto primario entre los cápsomeros y se ven favorecidas por las regiones carboxilo terminal extendidas de los polipéptidos (residuos 181-190) que al formar un virón se encuentran en la superficie del virus. En este caso podemos observar la sujeción del brazo amino terminal de una subunidad proteica “invadida” y doblemente relacionada que interacciona con un extremo carboxilo interpenetrante y un barril β invadido. Esta sujeción es reciproca a través de los dos pliegues y forma una interacción entre subunidades. Los residuos del terminal amino y varios residuos de la pared del barril β interactúa formando un sitio de la abrazadera de la subunidad e interactúan los residuos del terminal carboxilo invasor (Véase Figura 61) (Speir et al., 1995b). Estas interacciones incluyen contactos hidrofóbicos e hidrofílicos que pueden apreciarse a su vez en la Figura 62. Los resultados obtenidos en esta condición de pH demuestran la razón por la cual no se observan estructuras representativas en el diagrama de Lavelle *et. al.*

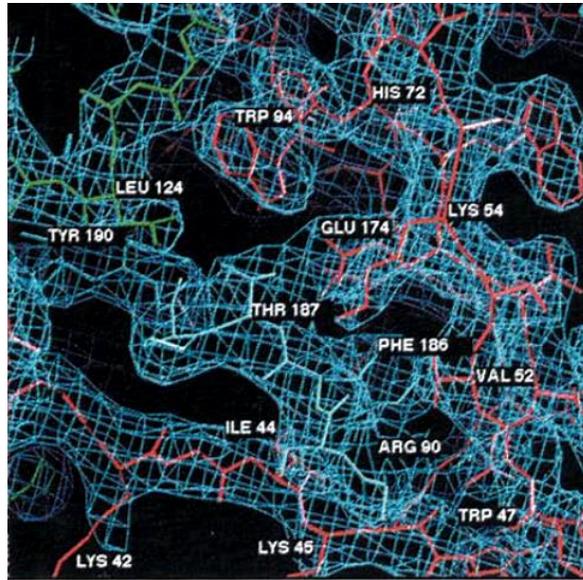


Figura 60 Esquema de la proteína del CCMV en densidad electrónica donde se representa la interacción carboxilo terminal de la subunidad A (azul claro) y la “pinza” creada por la subunidad B₅ (rojo), aquí es fácil identificar la estructura de listón representada en las imágenes de cristalografía; además, es posible observar un extremo de la subunidad C (verde), y se aprecian los aminoácidos que interacciona en la formación de hexámeros. Figura adaptada de referencia (Speir et al., 1995b).

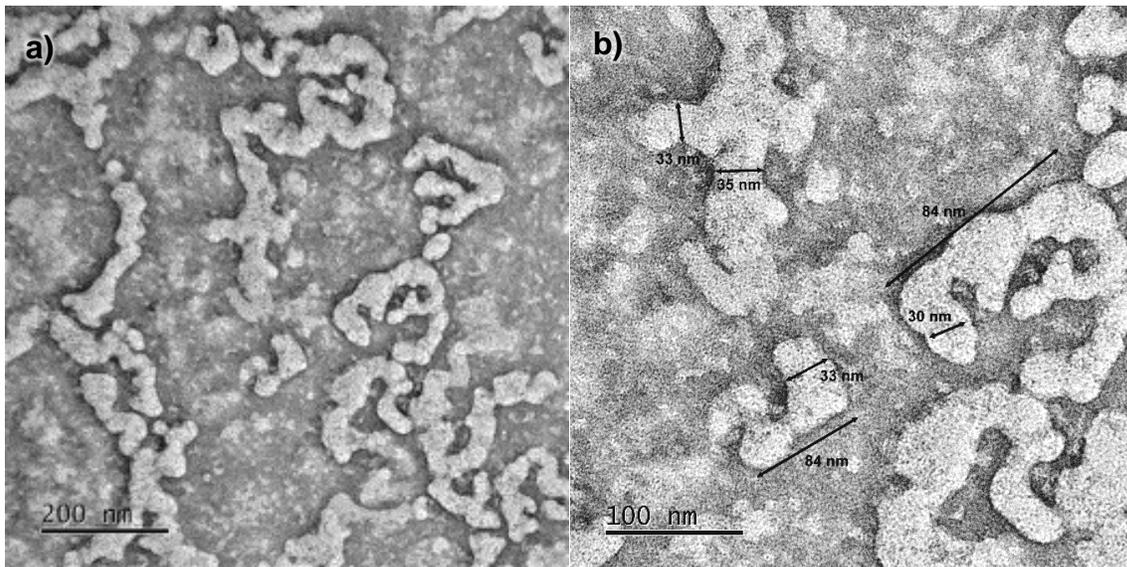


Figura 61 Micrografías correspondiente a $I=0.1$ pH 3.0; a) Es una imagen abierta de la muestra, b) se presentan a detalle las mediciones de las estructuras observadas en la imagen a).

5.5.4 Microscopías con 100% de sales divalentes.

Se ha estudiado en el pasado la ausencia del Mg^{2+} o Ca^{2+} durante el ensamblaje proteico viral, como es el caso del RCMV (*Red Clover Necrotic Mosaic Virus*), determinando que el Ca^{2+} tiene una función pivote para la creación de capsómeros penta- y hexámicos; mientras que la ausencia de Mg^{2+} provoca un desequilibrio en la carga electrostática impidiendo de en la formación completa de la cápside (Sherman et al., 2006)

Para resaltar el efecto y relevancia de las sales divalentes, se realizó una mezcla en ausencia de NaCl usando el buffer de citratos. La función del Mg^{2+} por su parte, es contribuir a el reacomodo proteico durante el ensamblaje, gracias a su efecto en la formación de puentes iónicos entre iones carboxilo adyacentes en las subunidades proteicas. En presencia de un virión, la alta concentración de Mg^{2+} provoca un incremento en su electronegatividad (Hiebert & Bancroft, 1969a).

Lo anterior puede apreciarse en los resultados de la mezcla, donde se presentan grandes cantidades de proteína en las muestras, pero con diferentes grados de precipitación, este comportamiento no tiene variación en condiciones de menores $I=0.01$ en pH ácidos. Cuando las condiciones se acercan a la neutralidad es posible observar el reacomodo proteico para comenzar el reensamblaje, como se observa en la Figura 63, donde sin un perímetro definido y simétrico, se aprecian entidades proteicas poligonales.

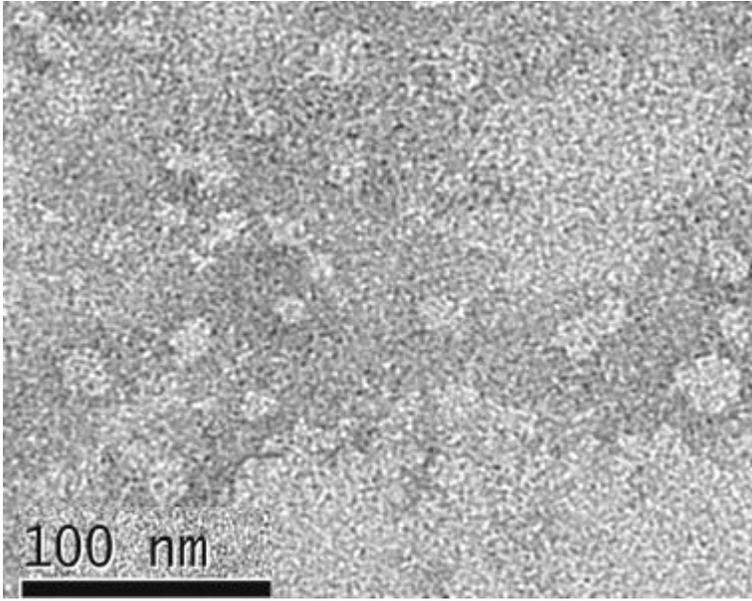


Figura 62 Micrografía a $I=0.007$ pH 5.6 donde se observan múltiples estructuras poligonales con tendencia a una curvatura accidentada. Escala 200 nm.

Esto puede ser resultado de la intervención del Mg^{2+} en el amino-terminal de la proteína, pues se sabe que a bajas condiciones de pH y baja fuerza iónica, la proteína puede formar hojas (Adam Zlotnick et al., 2000), como las que se observan en las Figuras 64 y 65, que se encuentran enteramente formadas de hexámeros;. Esta podría tratarse de la fase donde la fuerza iónica y el pH intervienen en la formación de pentámeros, para los cuales resulta imposible nuclearse dentro de una capa compuesta enteramente en estructura β -hexámerica.

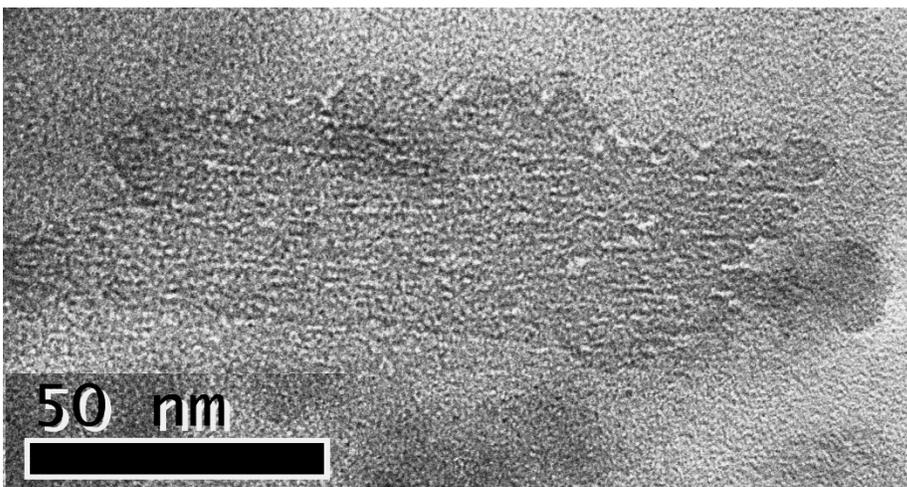


Figura 63 Micrografía a $I=0.007$ pH 5.6 donde se muestra una estructura plana formada de proteína acomodada en hexámeros,

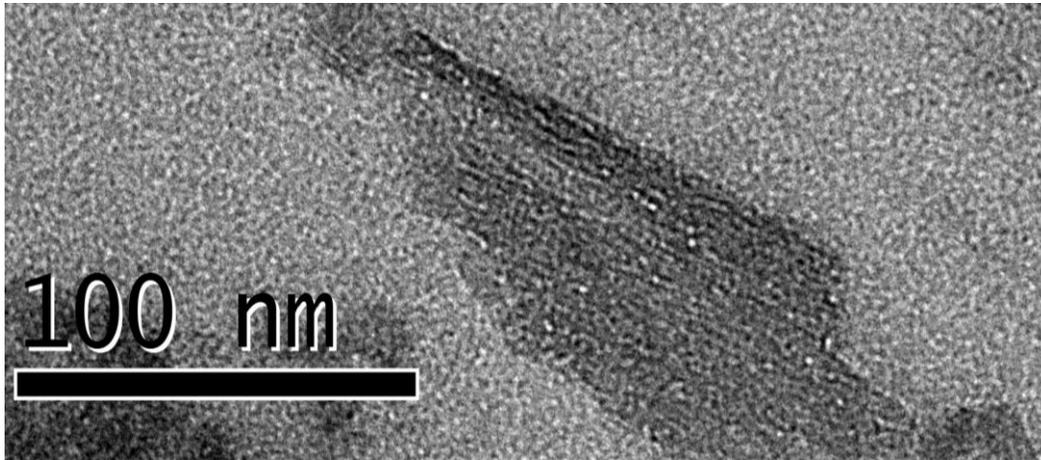


Figura 64 Micrografía a $I=0.007$ pH 5.6 con estructura laminar de hexámeros proteicos.

Cuando se trabaja en condiciones de $I=0.1$ y pH ácido, el estado proteico parece inadecuado para cualquier tipo de ensamblaje o precipitación, como se ha reportado en otros diagramas de fases (L Lavelle et al., 2009). La proteína se encuentra en estado libre y ausente de cualquier tipo de estructuras o degradación, esto se observa en la Figura 66.

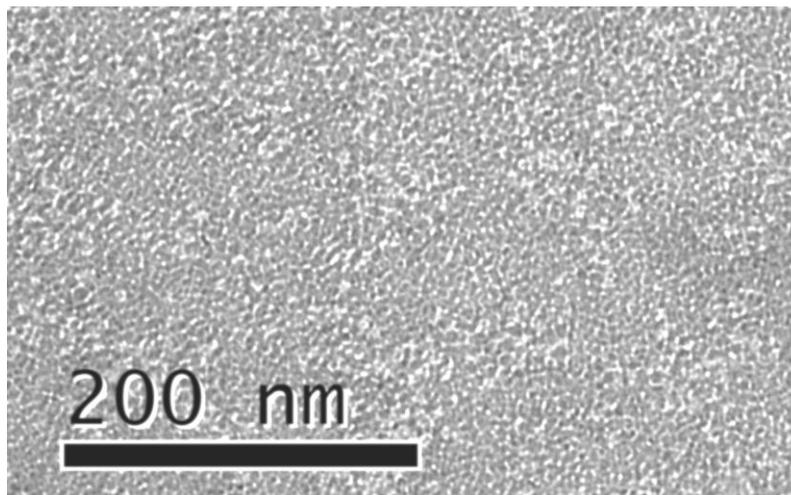


Figura 65 Micrografía a $I=0.01$ pH 3.0 se presenta proteína en estado libre, sobre el contraste de la rejilla. Destaca la ausencia de estructuras precipitadas o aglomeraciones proteicas.

En la interacción de condiciones de $I=0.01$ y pH de 6.0 se presenta una conformación estructural ausente en el diagrama de Lavelle et. al. y se trata de

cápsides similares a la nativa con un claro borde definido (Véase la Figura 67), a diferencia de las observadas en mezclas anteriores (Figura 32). Esto se debe principalmente a la unión de catión Mg^{2+} difundido en el buffer circundante con los sitios de unión de iones metálicos presente en la proteína. La baja fuerza iónica también contribuye a que la escala de duración de estas interacciones se vea aumentada, proporcionándole estabilidad (Miao et al., 2010).

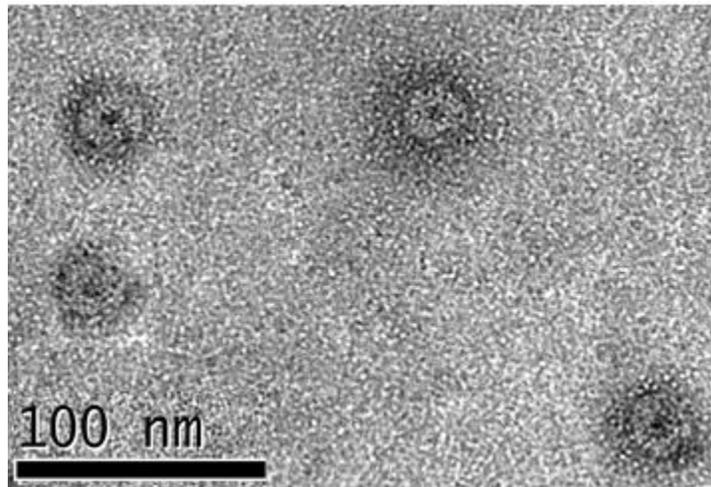


Figura 66 Micrografía de $I=0.01$ pH 6.0 donde se observan múltiples cápsides proteicas con borde bien definido similares a la nativa. Escala 100 nm.

Otra característica sobresaliente de la condición $I=0.01$ y pH 6.0 es un comportamiento que ya se había presentado previamente en mezclas de proporción 80-20%, y se trata del apareamiento de las partículas tipo cápside (Véase la Figura 38). Es posible que se deba a la ausencia de cargas monovalentes donde los iones carboxilos han logrado un acomodo apropiado y altamente protonado para finalmente, crear puentes de hidrogeno y equiparar las cargas externas, sin embargo, en aquellos casos en los que las subunidades proteicas aún conservan sus puentes con el Mg^{2+} , se ven atraídas a subunidades adyacentes de otras cápsides. La coexistencia de este tipo de estructuras en la misma condición experimental, como se aprecia en la Figura 68 y 69, demuestra que la variación en la presencia de sales divalentes provoca no solo cambios en la estructura, si no que su ausencia desestabiliza las cargas de tal manera que puede provocar cápsides incompletas o en compartición electrostática para su persistencia.

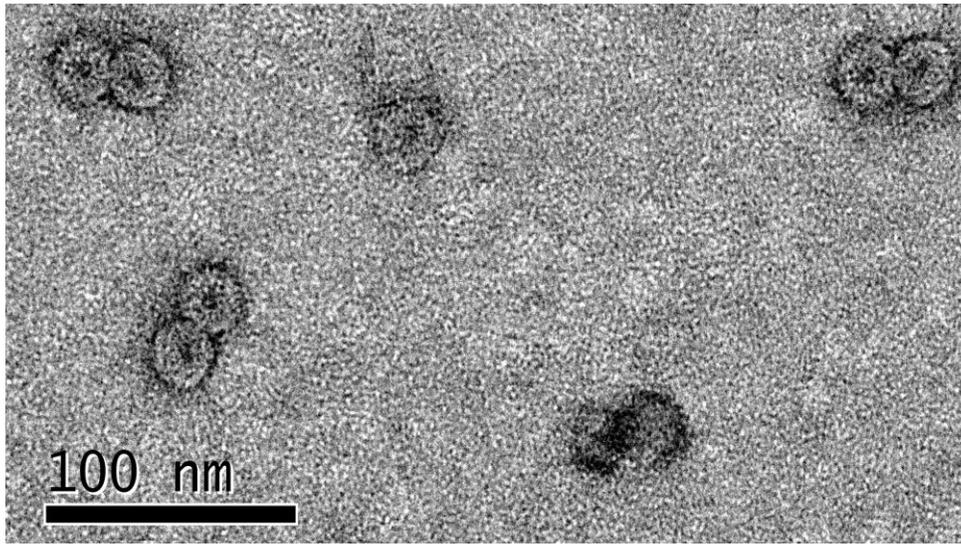


Figura 67 Micrografía de $I=0.01$ pH 6.0 con muestra de estructuras apareadas.

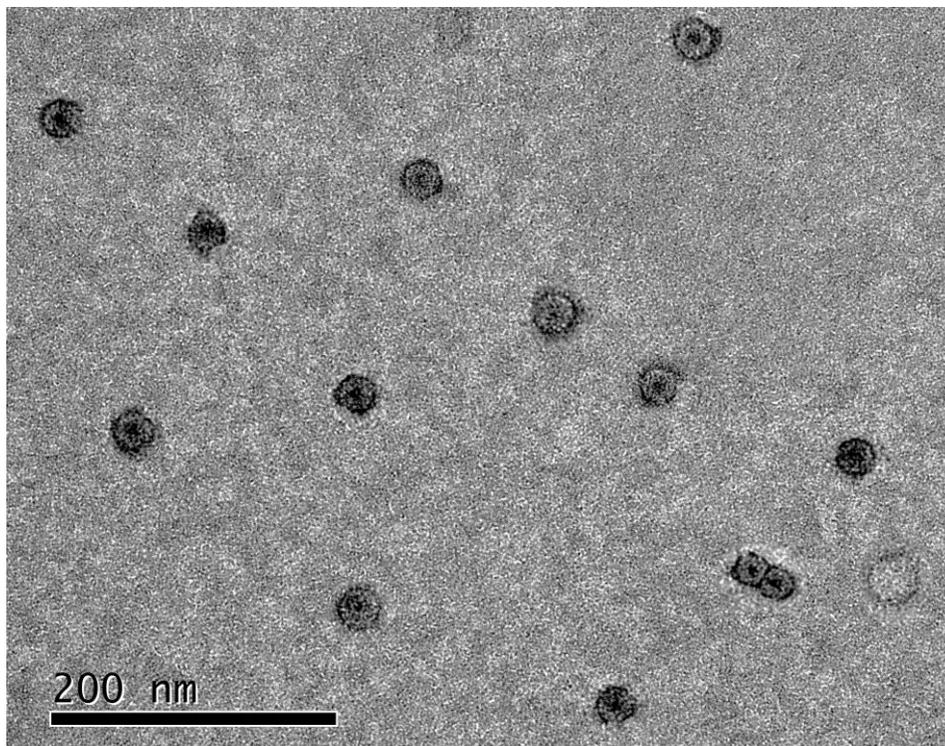


Figura 68 Micrografía de $I=0.01$ pH 6.0 donde se muestra la coexistencia de diversas estructuras icosaédricas.

CAPITULO IV

6 Conclusiones

En el presente proyecto de investigación se ha logrado la amplificación viral efectiva del virus de CCMV de la que se cosechó hojas infectadas para una purificación de un 61% de eficiencia. El proceso de disociación de RNA y proteína de cápside se ha cumplido con una pureza que constituye un 0.25% de remanente genético viral, en un volumen que compone aproximadamente el 60% de volumen inicial. Estos resultados demuestran un funcionamiento adecuado de la técnica de amplificación en hospedero natural, con las limitaciones propias del desarrollo de foliar. En cuanto a la purificación proteica, el alto nivel de pureza del producto muestra una optimización ideal y eficiente del proceso

Con la exposición anterior se ha discutido una diversidad de estructuras, que nos permite echar un vistazo a la amplia variedad de ensamblajes virales posibles, sin embargo, no existe actualmente una técnica instrumental disponible para su análisis detallado y extensivo, lo cual limita muchas las indagaciones y observaciones que puedan ser realizadas.

Se ha demostrado en otros diagramas de fases que el pH y la fuerza iónica juega un papel decisivo en el ensamblaje y desensamble viral, sin embargo, con este trabajo podemos observar como la variación en las moléculas catiónicas, así como otros agentes reductores, participan activamente en estos procesos y su estabilidad termodinámica.

Con la coexistencia de múltiples estructuras en un mismo punto de encuentro entre el pH y fuerza iónica, podemos contrastar la dinámica electrostática presente en la proteína y los iones metálicos. Las moléculas como el Mg^{2+} , muestran una repercusión en la flexibilidad de dímeros proteicos, promoviendo o limitando la estructuración de entidades simétricas que conllevan a la formación natural de partículas icosaédricas.

La distribución de cargas particular y propia de la proteína constituye tres subunidades proteicas que interaccionan entre ellas para formar capsómeros hexaédricos o pentámericos. Para la unión de estas dos estructuras es necesario un puente iónico, donde las moléculas como el Ca^{2+} participa. El Mg^{2+} , por su parte dilata los extremos amino y carboxilo de la proteína en aparente conveniencia de la estructura a formar, sin embargo, se ha podido observar con este estudio que su participación depende enteramente de la cantidad de cationes disponibles en la solución.

Los cationes monovalentes no sustituyen a los divalentes en una variación del sistema, pero si aumentan la cantidad de fuerzas electrostáticas disponibles, acrecentando la cantidad de energía libre en el sistema, esto se traduce en múltiples estados energéticos estables, o de mínima energía que a su vez permiten la formación de varias estructuras, como hojas proteicas, cápsides apareadas o cápsides estables y similares a las nativas.

La selección de una concentración crítica de proteína debería llevar a un ensamblaje eficiente, no obstante, al aumentar el porcentaje de sales divalentes limita los estados energéticos estables para la formación de cápsides, resultando en “*estructuras aberrantes*”. Estas estructuras son resultado de trampas cinéticas, provocadas por una nucleación excesiva durante el inicio de ensamblaje de los embriones de cápside, que se ven afectadas por la presencia del Mg^{2+} , alargando la adición ilimitada de subunidades proteicas. De esta manera se forman *redes* constituidas de hexámeros y pentámeros con sitios hidrófobos.

La estabilidad de estas estructuras y su periodicidad en varios puntos de pH y fuerza iónica demuestra un aparente estado de equilibrio energético, en los cuales la proteína encuentra una energía libre que puede asociar a la formación de cápsides. Pese a lo anterior, la creación de un modelo cinético apropiado de este fenómeno involucra la resolución numérica de un amplio grupo de ecuaciones de reacción, lo cual está limitado a la capacidad computacional.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este proyecto constituyen una guía para la elaboración de un diagrama de fases de sales divalentes, como complemento de

las simulaciones dinámicas moleculares que se han realizado sobre la proteína. Con lo anterior se muestra una posibilidad de identificar interfases proteicas que no representan una conformación habitual, pero encausan la formación de cápsides y de esta manera contribuir a un acercamiento más conciso del papel fundamental de los cationes divalentes en la interacción electrostática y bioquímica de las subunidades de la proteína.

Como premisa es posible decir que la proteína del CCMV no sufre limitaciones en su ensamblaje, lo cual representaba un objetivo de este proyecto, pero sí dependen de las condiciones termodinámicas proporcionadas por el medio para obtener estructuras que puedan ser utilizadas para fines de nanotransportación, hibridación genética o infección efectiva. Además, el uso de cationes divalentes podría ser utilizado como un interruptor electrostático para el seguimiento del proceso de hinchamiento o incremento radial del virus.

Bibliografía

- A.L.N. Rao, R. Duggal, F. Lahser, T. C. H. (1994). Analysis of RNA replication in plant viruses. *Methods in Molecular Genetics: Molecular Virology Techniques Vol. 4*, 216–236.
- Adolph, K. W., & Butler, P. J. G. (1974). Studies on the assembly of a spherical plant virus. I. States of aggregation of the isolated protein. *Journal of Molecular Biology*, 88(2), 345–357. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90485-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90485-9)
- Ali, A., & Roossinck, M. J. (2007). Rapid and efficient purification of Cowpea chlorotic mottle virus by sucrose cushion ultracentrifugation. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 84–86. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.038>
- Bancroft, J. B., Bracker, C. E., & Wagner, G. W. (1969). Structures derived from cowpea chlorotic mottle and brome mosaic virus protein. *Virology*, 38(2), 324–335. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90374-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90374-2)
- Bancroft, J. B., & Hiebert, E. (1967). Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus. *Virology*, 32(2), 354–356. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90284-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90284-X)
- Bancroft, J. B., Hills, G. J., & Markham, R. (1967). A study of the self-assembly process in a small spherical virus formation of organized structures from protein subunits in vitro. *Virology*, 31(2), 354–379. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90180-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90180-8)
- Bereau, T., Globisch, C., Deserno, M., & Peter, C. (2012). Coarse-grained and atomistic simulations of the salt-stable cowpea chlorotic mottle virus (SS-CCMV) subunit 26-49: β -barrel stability of the hexamer and pentamer geometries. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(10), 3750–3758. <https://doi.org/10.1021/ct200888u>
- Bos, L. (1999). Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: Historical context and

- legacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1383), 675–685. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0420>
- Brooks, G. F., Butel, J. S., Carroll, K. C., Mietzner, T. A., & Morse, S. A. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. Microbiología Médica Lange*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal of Virology*, 86(6), 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/jvi.06566-11>
- Chang, C. B., Knobler, C. M., Gelbart, W. M., & Mason, T. G. (2008). Curvature Dependence of Viral Protein Structures on Encapsidated Nanoemulsion Droplets, 2(2), 281–286.
- Chen, J., Lansac, Y., & Tresset, G. (2018). Interactions between the Molecular Components of the Cowpea Chlorotic Mottle Virus Investigated by Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(41), 9490–9498. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.8b08026>
- Churchill, F. B. (1990). *The Mendelian Revolution. The Emergence of Hereditarian Concepts in Modern Science and Society*. Peter J. Bowler. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1989. viii, 207 pp., \$29.95. *Science*, 247(4940), 348–349. <https://doi.org/10.1126/science.247.4940.348>
- Dasgupta, R., & Kaesberg, P. (1982). *Acids Research Nucleic*, 10(2), 703–713.
- Durham, A. C., Finch, J. T., & Klug, A. (1971). States of aggregation of tobacco mosaic virus protein. *Nature: New Biology*, 229(2), 37–42.
- Elrad, O. M., & Hagan, M. F. (2008). Mechanisms of size control and polymorphism in viral capsid assembly. *Nano Letters*, 8(11), 3850–3857. <https://doi.org/10.1021/nl802269a>
- Fraenkel-Conrat, H., & Williams, R. C. (1955). Reconstitution of Active Tobacco

- Mosaic Virus From Its Inactive Protein and Nucleic Acid Components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41(10), 690–698. <https://doi.org/10.1073/pnas.41.10.690>
- Hagan, M. F. (2014). *Modeling Viral Capsid Assembly Michael. Adv. chem. Phys.* (Vol. 155). <https://doi.org/10.1002/9781118755815.ch01.Modeling>
- Hiebert, E., & Bancroft, J. B. (1969a). Factors affecting the assembly of some spherical viruses. *Virology*, 39(2), 296–311. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90050-6)
- Hiebert, E., & Bancroft, J. B. (1969b). Factors affecting the assembly of some spherical viruses. *Virology*, 39(2), 296–311. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90050-6)
- Hunt, M. (n.d.). Microbiology and Immunology On-Line.
- Jacrot, B. (1975). Studies on the assembly of a spherical plant virus. II. The mechanism of protein aggregation and virus swelling. *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90201-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90201-6)
- Johnson, J. M., Tang, J., Nyame, Y., Willits, D., Young, M. J., & Zlotnick, A. (2005). Regulating self-assembly of spherical oligomers. *Nano Letters*, 5(4), 765–770. <https://doi.org/10.1021/nl050274q>
- Khan, F. (2014). *Biotechnology in Medical Sciences*. Boca Raton: CRC Press.
- Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1383), 531–535. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0404>
- Krol, M. A., Olson, N. H., Tate, J., Johnson, J. E., Baker, T. S., & Ahlquist, P. (1999). RNA-controlled polymorphism in the in vivo assembly of 180-subunit and 120-subunit virions from a single capsid protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13650–13655. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13650>
- Kuhn, C. W. (1965). Decline of specific infectivity of cowpea chlorotic mottle virus

- in vivo. *Virology*, 25(1), 9–14. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(65\)90245-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(65)90245-X)
- Kuhn, C. W. (1979). A Variant of Cowpea Chlorotic Mottle Virus Obtained by Passage Through Beans. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-621>
- Lavelle, L., Gingery, M., Phillips, M., Gelbart, W. M., Knobler, C. M., Cadena-Nava, R. D., ... Ruiz-Garcia, J. (2009). Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(12), 3813–3819. <https://doi.org/10.1021/jp8079765>
- Lavelle, L., Gingery, M., Phillips, M., Gelbart, W. M., Knobler, C. M., & Obrego, A. V. (2009). Phase Diagram of Self-assembled Viral Capsid Protein Polymorphs †, 3813–3819.
- Lavelle, Laurence, Michel, J. P., & Gingery, M. (2007). The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *Journal of Virological Methods*, 146(1–2), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.020>
- Manuel Vargas Córdoba. (2009). *Virología Médica*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Mello, A. F. S., Clark, A. J., & Perry, K. L. (2010). Capsid protein of cowpea chlorotic mottle virus is a determinant for vector transmission by a beetle. *Journal of General Virology*, 91(2), 545–551. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016402-0>
- Miao, Y., Johnson, J. E., & Ortoleva, P. J. (2010). All-atom multiscale simulation of cowpea chlorotic mottle virus capsid swelling. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(34), 11181–11195. <https://doi.org/10.1021/jp102314e>
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica*. Editorial Panamericana.
- Perlmutter, J. D., & Hagan, M. F. (2015). Mechanisms of Virus Assembly. *Annual Review of Physical Chemistry*, 66(1), 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214-121637>
- Peter J. Bowler. (2015). *The Mendelian Revolution: The Emergence of*

Hereditarian Concepts in Modern Science and Society (History: Bloomsbury Academic Collections). Bloomsbury Academic (November 19, 2015).

- Romero Carbello, R. (2007). Microbiología y Parasitología humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. *Editorial Médica Panamericana*. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.10.6848>
- Rossmann, M. G. (2013). Structure of viruses: a short history. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(2), 133–180. <https://doi.org/10.1017/s0033583513000012>
- SCHRAMM, G., SCHUMACHER, G., & ZILLIG, W. (1955). An Infectious Nucleoprotein from Tobacco Mosaic Virus. *Nature*, 175(4456), 549–550. <https://doi.org/10.1038/175549a0>
- Sherman, M. B., Guenther, R. H., Tama, F., Sit, T. L., Brooks, C. L., Mikhailov, A. M., ... Lommel, S. A. (2006). Removal of Divalent Cations Induces Structural Transitions in Red Clover Necrotic Mosaic Virus, Revealing a Potential Mechanism for RNA Release. *Journal of Virology*, 80(21), 10395–10406. <https://doi.org/10.1128/jvi.01137-06>
- Simmons, N. S., & Blout, E. R. (1960). The Structure of Tobacco Mosaic Virus and Its Components: Ultraviolet Optical Rotatory Dispersion. *Biophysical Journal*, 1(1), 55–62. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(60\)86875-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(60)86875-0)
- Smith, K. M. (1977). *Plant Viruses*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-9653-9>
- Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S., & Johnson, J. E. (1995a). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*, 3(1), 63–78. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00135-6)
- Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S., & Johnson, J. E. (1995b). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*, 3(1), 63–78. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00135-6)

- Speir JA, Bothner B, Qu C, Willits DA, Young MJ, J. J. (2006). Enhanced local symmetry interactions globally stabilize a mutant virus capsid that maintains infectivity and capsid dynamics. *Journal of Virology*, 80, 3582–3591. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3582-3591.2006>
- Tama, F., & Brooks, C. L. (2002). The mechanism and pathway of pH induced swelling in cowpea chlorotic mottle virus. *Journal of Molecular Biology*, 318(3), 733–747. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00135-3)
- Tang, J., Johnson, J. M., Dryden, K. A., Young, M. J., Zlotnick, A., & Johnson, J. E. (2006). The role of subunit hinges and molecular “switches” in the control of viral capsid polymorphism. *Journal of Structural Biology*, 154(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.10.013>
- Vega-Acosta, J. R., Cadena-Nava, R. D., Gelbart, W. M., Knobler, C. M., & Ruiz-García, J. (2014). Electrophoretic mobilities of a viral capsid, its capsid protein, and their relation to viral assembly. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(8), 1984–1989. <https://doi.org/10.1021/jp407379t>
- Vriend, G., Verduin, B. J. M., & Hemminga, M. A. (1986). Role of the N-terminal part of the coat protein in the assembly of cowpea chlorotic mottle virus. *Journal of Molecular Biology*, 191(3), 453–460. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90140-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90140-3)
- Zhao, X., Fox, J. M., Olson, N. H., Baker, T. S., & Young, M. J. (1995). In vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in *Escherichia coli* and in vitro-transcribed viral cDNA. *Virology*. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1108>
- Zlotnick, A., & Katen, S. (2009). The thermodynamics of virus capsid assembly. *Methods in Enzymology*, 6879(08), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04214-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04214-6).The
- Zlotnick, Adam, Aldrich, R., Johnson, J. M., Ceres, P., & Young, M. J. (2000). Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*, 277(2), 450–456. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0619>

Zlotnick, Adam, & Stray, S. J. (2003). How does your virus grow? Understanding and interfering with virus assembly. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.09.012>