



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis estructural de ensamblados macromoleculares y sus componentes

Pablo Guerra Lahoz

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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA

**ANALISIS ESTRUCTURAL DE ENSAMBLADOS
MACROMOLECULARES Y SUS COMPONENTES**

Memòria presentada per Pablo Guerra Lahoz per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directora: Prof. Núria Verdaguer Massana

Doctorando: Pablo Guerra Lahoz

Tutora: Prof. Josefa Badia Palacín

PABLO GUERRA LAHOZ 2017

*“Si la libertad significa algo, será, sobre todo, el derecho a decirle a la gente aquello
que no quiere oír”*

(Rebellion en la granja, George Orwell)

“...que por poco no acabas conmigo, pero soy difícil de matar”

(Pesadilla en el parque de atracciones, Los Planetas)

AGRADECIMIENTOS

¡Ya está! No puedo decir que haya sido fácil, pero sí que sin la ayuda de toda la gente que ha participado y me ha ayudado de una manera u otra en esta tesis hubiera sido imposible llegar a este punto. ¡Muchas gracias a todos!

Primero quisiera dar las gracias a mis padres y a mi hermana, que siempre me han apoyado en este camino. Gracias por poner todas las herramientas posibles para poder llegar a este punto y por intentar explicar con sus palabras lo que hago en el trabajo.

Gracias también a Núria Verdaguer, por haberme dado la oportunidad de realizar el doctorado. Por haber abierto las puertas de su laboratorio a un chico de Zaragoza que no conocía de nada, solo que era un poco pesado enviando emails. Gracias también por no haber escatimado nunca esfuerzo ni medios para poder continuar con este proyecto.

Gracias también a Paco Rodríguez, por haberme recibido tantas veces en su laboratorio y haber tenido siempre un momento para hablar. Gracias por transferir esa curiosidad que le caracteriza y poner siempre un punto de humor.

Gracias a Pepe Castón, por aguantar todos los emails preguntado por el proyecto durante dos años sin desesperar. Gracias por haberme permitido tener mi primer contacto con la microscopia en su laboratorio.

También a Israel Fernández, por haberme dado la increíble oportunidad de entrar en la universidad de Columbia (son sus penas y sus alegrías). Por haberme acogido como un amigo en su laboratorio y poner tanta pasión en cada resultado obtenido de una clasificación y otra clasificación y otra clasificación... Gracias también por haberme enseñado Nueva York y el estilo de vida americano.

A toda la gente de los CRIs, por haber tenido siempre abiertas las puertas de sus laboratorios (y de sus armarios de reactivos). Por haberse sentado a hablar un rato cuando hacía falta y echar una mano cuando surgían dudas.

A CRI2, por haber estado presente en cada una de las diferentes partes de mi vida científica. A Xavi, Luca, Marieta, Rosa y David (gracias por mi primera bici), por haber

estado siempre ahí dispuestos para echar una mano o simplemente pasar el rato hablando.

A CRI3, por haberme dejado un Erlenmeyer (y tantas cosas) siempre que hacía falta (¡Es que tenéis tantos!) y a Miguel Ángel, por utilizar su fuerza para abrir una vez y otra vez los tubos de la centrifuga.

A Alfonso y Pep, por venir siempre a solucionar los problemas informáticos, a pesar de los problemas de vocabulario entre nosotros.

A los chicos de CRI7, por haber hecho mis primeros años de doctorado en el laboratorio muy divertidos. A Pablo “Viejo” por sus sesiones de chistes y sus versiones “frikis” de canciones. A Cuppi por haber sido compañera durante este largo camino. A Anna por tener esa alegría y tener esas ideas tan divertidas. A Arka por todas las conversaciones científicas y las ganas por conocer resultados positivos.

A las chicas de la sala de purificaciones, Jenny, Isabel y Laia a ratitos, por haber soportado mis interminables preguntas sobre cómo funcionan las cosas y haberme solucionado los problemas que surgían una vez y otra vez... Gracias por la paciencia y no haberse enfadado nunca conmigo.

A mi grupo, CRI6, por haber creado un ambiente inmejorable durante todos estos años. Aquí he conocido gente que me han marcado como persona y formaran parte de mi vida para siempre. A Laia, por haberme soportado durante tantos años trabajando codo con codo (Cristiña no aguantó), por las tardes de música, por todo... A Arnau por introducirme el gusanito de la ciencia, por los fines de semana en Zúrich y por ser tan grande. Al Jordi, por haberme enseñado todo lo que se sabe sobre ciencia, por las conversaciones, pitís, cervezas, sincrotronadas,... A Cris “paleta”, por haberme descubierto un mundo musical, literario y de estilo de vida que quizás sin ella nunca lo hubiese descubierto (y quiso pasá en un 60 entre 80 kilómetro por hora). A Celia, por haber sido una técnica sin par durante dos años (la niña de los peines). A Damià, por transmitirme esa pasión por la ciencia y compartir el amor por los wombats. A Cris Ferrer por todas las conversaciones (científicas y no científicas) y dar siempre un empujón cuando más hacía falta. A Diego, por explicarme con palabras que pudiese entender (recuerda que soy químico) todo la biología que había alrededor de los distintos experimentos. A Víctor, por ser compañero de mesa estos últimos años

siempre con buena cara y con ganas de hacer cosas. A Mónica por compartir todas las inquietudes que suponen el criar a un hijo. A María por poner tanto entusiasmo en todos los experimentos, por estar siempre dispuesta a trabajar un poco más y a no desanimarse nunca (sigue así, que aún nos queda mucho).

A todos los de Madrid: Idoia, Mariana, Susana, Ana, Antonio, Romy, Gema... Gracias por cuidarme tanto las largas temporadas que estuve por allí. Por no permitir que me aburriera allí y tener siempre un plan preparado para salir. A Aida por las laaaargas conversaciones por teléfono divagando sobre las vaults (de algo han servido). A Daniel Luque por ese curso intensivo de tres días de microscopia. No creo que exista un *workshop* de microscopia en el que hubiese aprendido tanto en tan poco tiempo.

Y por supuesto a todos los amigos de aquí: Marta, Sandra, Aniya, Thais, Jose, Glori, Chus, Laura, Manu, Paula, Juan,... Porque sin vosotros no hubiese sido posible llegar a este punto. Gracias por interesarse por lo que hago y poner esa cara de: ¡¡¡Haaaalaaaa!!! Por todos los ratos divertidos que hacían olvidar los malos resultados. ¡¡¡Muchas gracias¡¡¡

Por último y por encima de todo, gracias Bianca. Gracias por soportarme, por motivarme, por tus “ya sabes lo que no tienes que hacer”, por levantarme la moral, por mis estancias fuera, por todo... Esta tesis también es tuya y sin ti, seguro que no estaría escribiendo esto. Y a Mauro, por permitirme acabarla. Por no enfadarte cuando estaba ausente una temporada. No es fácil hacer una tesis y ser padre a la vez, pero tú lo has hecho posible.

RESUMEN

Los grandes ensamblados macromoleculares presentan unas propiedades mecánicas extraordinarias las cuales los hacen perfectos para su uso con fines muy distintos dentro de la nanotecnología y la biomedicina. El virus diminuto del ratón y la partícula vault son dos ejemplos de ensamblados macromoleculares que podrían usarse con estos fines.

La determinación estructural de la cápside del mutante N170A de MVM, el estudio de sus propiedades mecánicas y la comparación con el mutante L172W ha permitido entender mejor la base estructural que hay detrás de la rigidificación de la cápside causada por estos dos tipos de mutaciones que afectan al ciclo infectivo del virus.

Por otro lado, la caracterización de las propiedades mecánicas de las vaults y el estudio de los distintos mutantes de MVP por diversas técnicas, proporciona nueva información sobre el comportamiento dinámico de la partícula, así como sobre su mecanismo de apertura, que podría ayudar a entender el papel desempeñado por esta partícula en la célula.

Por último y dentro del estudio de esta partícula, se ha llevado a cabo la caracterización estructural por cryo-EM de la vault en complejo con la proteína TEP1, resultando en la obtención de la primera estructura de esta proteína a baja resolución. El estudio de la misma ha mostrado que esta proteína presenta una alta heterogeneidad estructural en solución.

INDICE

1. INTRODUCCION	5
1.1. EL VIRUS DIMINUTO DEL RATON	7
1.1.1. ESTRUCTURA DE MVM.....	7
1.1.2. ESTRUCTURA DEL PORO	11
1.1.3. CICLO BIOLOGICO DE MVM	13
1.1.4. PROPIEDADES MECANICAS DE MVM	17
1.2. VAULTS.....	19
1.2.1. COMPOSICION DE LAS VAULTS.....	20
1.2.2. LOCALIZACION INTRACELULAR Y MOVIMIENTOS DE LAS VAULTS.....	22
1.2.3. ESTRUCTURA DE LAS VAULTS	25
1.2.4. FUNCION CELULAR DE LAS VAULTS	29
1.2.5. APLICACIONES DE LAS VAULTS EN NANOBIOTECNOLOGIA	33
1.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MECANICAS DE ENSAMBLADOS MACROMOLECULARES.....	37
1.3.1. PROPIEDADES MECANICAS DE VIRUS	38
1.3.2. PROPIEDADES MECANICAS EN APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS....	40
1.4. PROTEINA ASOCIADA A TELOMERASA-1	41
1.5. CRIOMICROSCOPIA	48
1.5.1. DESARROLLO DE LA CRYO-EM.....	49
1.5.2. NUEVAS ESTRUCTURAS RESUELTAS POR CRYO-EM.....	51
2. OBJETIVOS	55
3. RESULTADOS Y DISCUSION	59
3.1. EFECTO DE LAS MUTACIONES N170A Y L172W EN LAS PROPIEDADES MECANICAS Y ESTRUCTURA DE LA CAPSIDE DEL MVM	63
3.1.1. EFECTOS LOCALES Y GLOBALES EN LA MECANICA DE LA CAPSIDE DE MVM COMO CONSECUENCIA DE LAS MUTACIONES N170A Y L172W	63
3.1.2. EFECTOS EN LA DINAMICA CONFORMACIONAL DE LAS MUTACIONES N170A Y L172W	67
3.1.3. ESTRUCTURA CRISTALINA DEL MUTANTE N170A DE MVM Y COMPARACION CON LA ESTRUCTURA DE LA CAPSIDE NATIVA	68

3.1.4.	<i>EFFECTOS ESTRUCTURALES COMPARADOS DE LOS MUTANTES N170A Y L172W EN LA CAPSIDE DE MVM</i>	74
3.1.5.	<i>BASES A NIVEL ATOMICO DE LA RIGIDIFICACION MECANICA DE LAS PARTICULAS VIRALES</i>	76
3.1.6.	<i>IMPLICACIONES BIOLOGICAS</i>	77
3.1.7.	<i>IMPLICACIONES NANOTECNOLOGICAS Y BIOMEDICAS</i>	80
3.2.	PROPIEDADES MECANICAS DE LAS VAULTS Y MECANISMO DE APERTURA DE LA PARTICULA	83
3.2.1.	<i>TOMA DE IMAGENES USANDO AFM</i>	83
3.2.2.	<i>RIGIDEZ Y FUERZA DE ROTURA DE PARTICULAS INDIVIDUALES</i>	89
3.2.3.	<i>AUTO-REPARACION DE LAS VAULTS DESPUES DE SU ROTURA</i>	91
3.2.4.	<i>MEDIDA DE LA DINAMICA ESTRUCTURAL EN TIEMPO REAL EN FUNCION DEL PH</i>	94
3.2.5.	<i>RIGIDEZ Y ESTABILIDAD DE LAS VAULTS EN FUNCION DEL PH</i>	97
3.2.6.	<i>PAPEL DE LOS RESIDUOS LOCALIZADOS EN LA CINTURA DE LA PARTICULA SOBRE EL MECANISMO DE APERTURA</i>	99
3.2.7.	<i>MEDIDA DE LA FUERZA DE ASOCIACION DE LAS VAULTS MUTANTES</i> 104	
3.2.8.	<i>EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA ESTABILIDAD TERMICA DE LAS VAULTS</i> 106	
3.2.9.	<i>IMPLICACIONES BIOLOGICAS Y NANOTECNOLOGICAS</i>	108
3.3.	CARACTERIZACION DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEINA TEP1	113
3.3.1.	<i>EXPRESION DOMINIO TROVE</i>	113
3.3.2.	<i>EXPRESION DE LA TEP1</i>	116
3.3.3.	<i>CO-EXPRESION DE TEP1 CON MVP PARA LA GENERACION DE VAULTS CON TEP1 EN SU INTERIOR</i>	117
3.3.4.	<i>CRIOMICROSCOPIA ELECTRONICA DEL COMPLEJO VAULT-TEP1</i>	120
3.3.5.	<i>CO-EXPRESION TEP1 CON DISTINTOS CONSTRUCTOS DE MVP QUE CONTENGAN EL DOMINIO DE INTERACCION ENTRE AMBAS</i>	132
4.	CONCLUSIONES	135
4.1.	MVM.....	137
4.2.	VAULT	137
4.3.	TEP1.....	138
5.	MATERIALES Y METODOS	139
5.1.	CULTIVOS CELULARES	141

5.2.	PLASMIDOS RECOMBINANTES Y MUTAGENESIS	142
5.3.	BACULOVIRUS RECOMBINANTES	145
5.4.	VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES	146
5.5.	EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS VLPS DE MVM	147
5.6.	EXPRESION Y PURIFICACION DE VAULTS RECOMBINANTES.....	148
5.7.	SDS-PAGE.....	149
5.8.	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TINCION NEGATIVA	149
5.9.	DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA CRISTALO GRAFICA DE LA CAPSIDE DEL MUTANTE N170A DE LA CEPA P DE MVM	150
5.9.1.	<i>CRISTALIZACION, RECOGIDA DE DATOS Y PROCESAMIENTO</i>	150
5.9.2.	<i>RESOLUCION ESTRUCTURAL Y REFINADO</i>	154
5.10.	ANALISIS RIGIDEZ MECANICA DE PARTICULAS DE MVM USANDO AFM 155	
5.11.	ANALISIS DE TRANSICIONES ESTRUCTURALES DE LAS CAPSIDES MVM MEDIANTE FLUORESCENCIA INTRINSECA DE LOS TRIPTOFANOS	156
5.12.	ANALISIS DE LAS PROPIEDADES BIOFISICAS DE LAS VAULTS RECOMBINANTES USANDO AFM	156
5.12.1.	ESTUDIO DE PROPIEDADES MECANICAS MEDIANTE AFM.....	157
5.13.	EXPERIMENTOS DE QCM-D DE LAS VAULTS RECOMBINANTES	161
5.14.	THERMOFLUOR DE VAULTS RECOMBINANTES	162
5.15.	CRIOMICROSCOPIA ELECTRONICA.....	162
5.15.1.	<i>PRINCIPIOS BASICO DE LA CRIOMICROSCOPIA ELECTRONICA</i>	162
5.15.2.	<i>PROCESADO DE IMAGENES</i>	166
6.	BIBLIOGRAFIA	167
7.	ANEXO: PUBLICACIONES	187

1. INTRODUCCION

1.1. EL VIRUS DIMINUTO DEL RATON

El virus diminuto del ratón (MVM por sus siglas en inglés: *Minute Virus of Mice*) es un virus perteneciente a la familia *Parvoviridae*. Los virus de esta familia poseen una cápside icosaédrica sin envuelta que empaqueta una molécula de DNA genómico lineal de en torno a 5 kb (King et al., 2001; Myers et al., 1980; Richards et al., 1977; Yuan et al., 2001). Dentro de esta familia, los virus pertenecientes al género *Dependovirus* empaquetan una cadena de DNA de polaridad positiva o negativa con la misma frecuencia, mientras que en el caso de virus del género *Parvovirus*, como es el caso de MVM, encapsulan predominantemente la cadena de sentido negativo (Tattersall et al., 2005). La polaridad de la cadena encapsulada está determinada por la eficiencia relativa de cada uno de los orígenes teloméricos en el proceso de replicación de los virus de este género (Cotmore and Tattersall, 2005). MVM posee dos cepas serológicamente indistinguibles cuyos genomas tienen un 97% de identidad de secuencia (Astell et al., 1986): la cepa inmunosupresora (MVMi) y la cepa prototipo (MVMp).

Este virus ha sido muy empleado como modelo para estudios biomecánicos debido a sus características. El virión de MVM es uno de los virus más pequeños y estructuralmente simples que existen. Unido al notable conocimiento adquirido sobre su biología molecular, hacen de él un sujeto perfecto para llevar a cabo estudios que relacionen la estructura a nivel atómica, con sus propiedades mecánicas y su función biológica. Todo el trabajo realizado con esta partícula se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo del Profesor Mauricio G. Mateu, cuyo grupo tiene una gran experiencia en la expresión, purificación y caracterización biofísica de estas partículas.

1.1.1. ESTRUCTURA DE MVM

La estructura del virión de MVM (Agbandje-McKenna et al., 1998; Llamas-Saiz et al., 1997) es similar a la de otros virus del mismo género, como el parvovirus canino (CPV; Wu y Rossmann, 1993), el parvovirus felino (FPV; Agbandje et al., 1993), el parvovirus porcino (PPV; Simpson et al., 2002) y el parvovirus humano B19 (Kaufmann et al., 2004).

INTRODUCCION

La cápside de este virus (Figura 1) tiene un diámetro máximo de en torno a 280 Å y presenta una simetría icosaédrica con un número de triangulación $T=1$. Está formada por 60 subunidades proteicas a las que contribuyen la proteína viral-1 (VP1), la proteína viral-2 (VP2) y la proteína viral-3 (VP3), las cuales difieren únicamente en la longitud de sus extremos N-terminal (Figura 2); de estas la mayoría son VP2 y alrededor de 10 de ellas son VP1 (Tattersall et al., 1976). La VP2 es una proteína de 587 aminoácidos (64 kDa) capaz de formar por sí sola VLPs (*Virus Like Particles*) con una estructura y propiedades similares a las de las cápsides vacías (Hernando et al., 2000; Kontou et al., 2005; Chen et al., 2006). La VP1, con una masa de 84 kDa, presenta la misma secuencia que la VP2 con la adición de 142 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína (Cotmore y Tattersall, 1987). La VP3 es generada por la eliminación proteolítica de 20 aminoácidos del extremo N-terminal de la VP2, durante la internalización del virus en la célula huésped (Paradiso, 1981; Tullis et al., 1992; Cotmore y Tattersall, 2007; Cotmore et al., 2010).

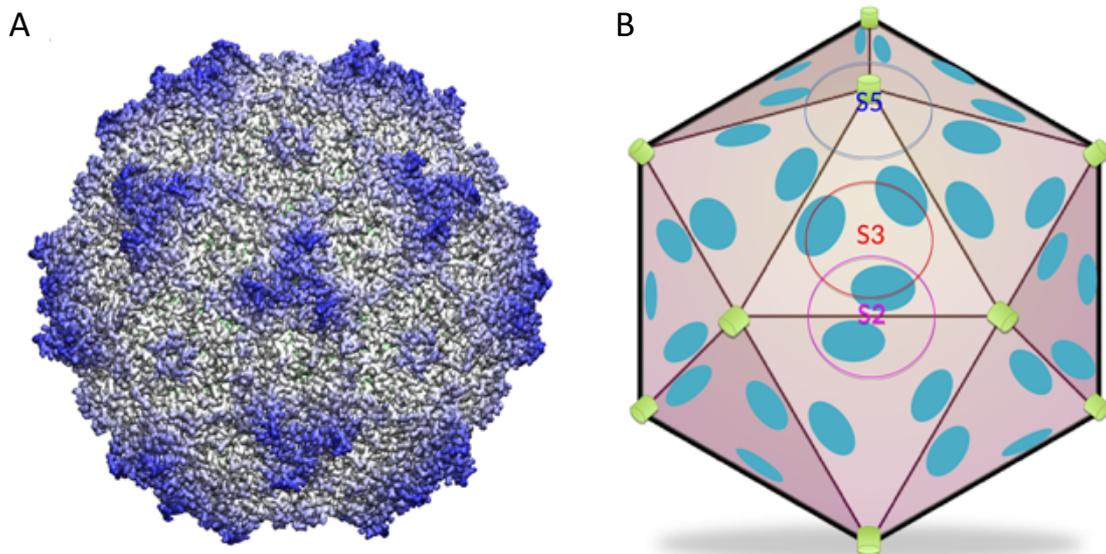


Figura 1. Cápside de MVM. (A) Estructura de alta resolución de la cápside nativa de MVM de la cepa p (PDB id: 1Z14; Kontou et al., 2005) representado como superficie. (B) Esquema de la arquitectura de la cápside, donde se ha señalado un eje de cada simetría presente en la cápside (un eje quinario S5, un eje ternario S3 y un eje binario S2). Los poros de la cápside, localizados en los ejes S5, están indicados con cilindros verdes y las superficies interiores donde se unen los segmentos de DNA, se muestran como elipses en azul cian.

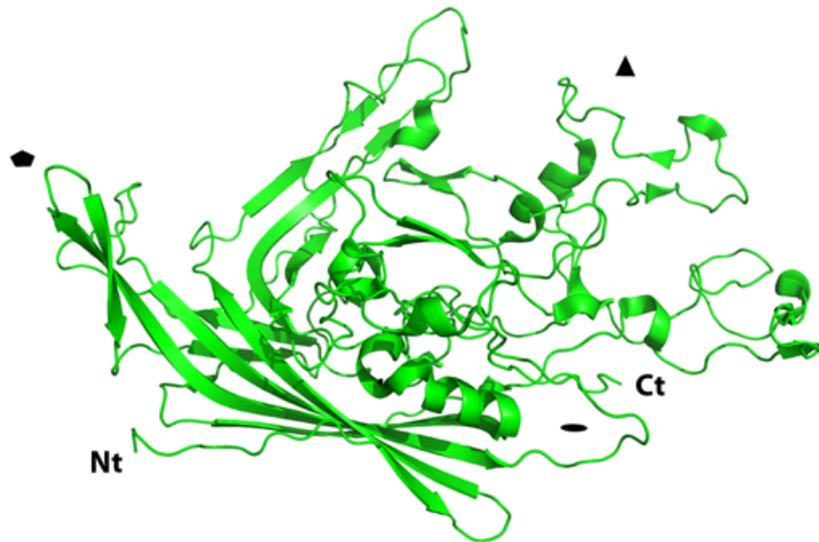


Figura 2. Estructura de la VP2 de MVM representada con sus elementos de estructura secundaria. Se han indicado los extremos N-terminal (Nt) y C-terminal (Ct), así como la disposición de los elementos de simetría de la cápside con respecto al monómero (S5, S3 y S2).

En la estructura cristalina del virión de MVM aparecen trazados 547 aminoácidos de cada subunidad (Figura 2; Agbandje-McKenna et al, 1998; Llamas-Saiz et al, 1997). La estructura de esta subunidad contiene un barril- β formado por 8 láminas- β antiparalelas, conectadas por unos *loops* muy largos. No se tiene información estructural de los extremos N-terminales de las proteínas que conforman la cápside, que engloban a 38 residuos en VP2 y 180 residuos en VP1. Uno de estos *loops* que conectan las láminas- β , interaccionan alrededor de los ejes de simetría ternaria de la partícula con otros de distintas subunidades, formando protuberancias en la superficie denominadas espículas. Además de estas, hay presentes unas estructuras cilíndricas alrededor de los ejes quínicos denominadas poros, los cuales, a su vez, están rodeadas de una depresión o cañón de unos 11 Å de profundidad; esta estructura ya había sido descrita para otros parvovirus (Tsao et al., 1991; Agbandje et al., 1994; Agbandje-McKenna et al., 1998).

En MVM, así como en otros virus (Chen et al., 1989; McKenna et al., 1992; Fisher y Johnson, 1993; Larson et al., 1993; Tang et al., 2001; Bink y Pleij, 2002), algunos segmentos del DNA viral adoptan conformaciones muy similares en posiciones simétricamente equivalentes dentro de la cápside (alrededor del 34% en el caso de MVM), lo que hace que sean visibles en la estructura cristalográfica del virus (Figura

INTRODUCCION

3). Cada uno de estos segmentos de DNA está unido de manera no-covalente a varios residuos localizados en una de las 60 posiciones equivalentes presentes en la pared interior de la cápside (Agbandje-Mckenna et al., 1998; Kontou et al., 2005). Cada uno de estos fragmentos de DNA adopta una conformación en forma de cuña, que se introduce parcialmente en un hueco de la pared interna de la partícula viral, interaccionando con los residuos localizados en esa zona. Esta disposición del DNA viral también se observó en el parvovirus CPV (Tsao et al., 1991; Wu y Rossmann, 1993; Chapman y Rossmann, 1995; Xie y Chapman, 1996). El análisis mutacional llevado a cabo por Reguera et al. (Reguera et al., 2005), donde se estudió las interacciones cápside-ácido nucleico, concluyó que estas contribuyen a aumentar la resistencia del virión frente a la inactivación térmica.

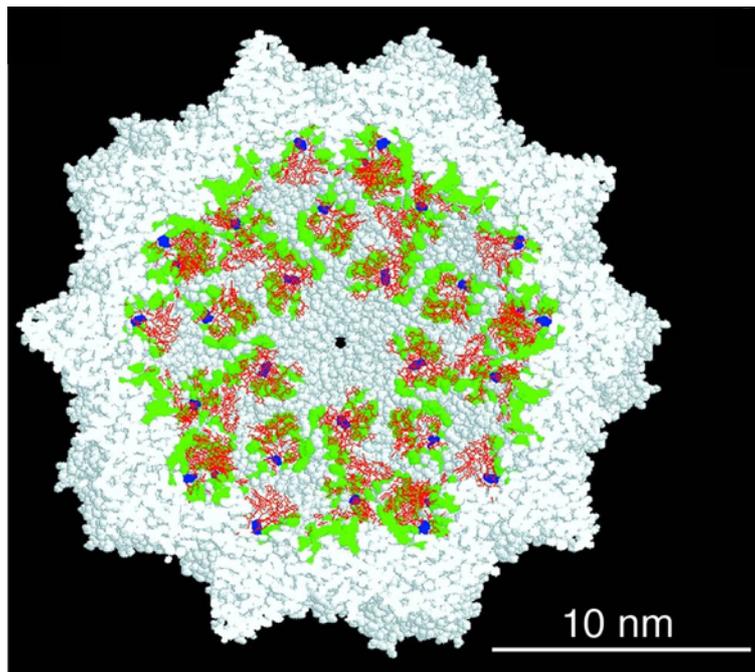


Figura 3. Interacción del DNA con la pared interna de la cápside de MVM. Se muestra un corte transversal de un modelo de Van der Waals de la estructura del virión de MVM (Kontou et al., 2005), donde los segmentos de DNA aparecen en rojo y los residuos a los que están unidos en color verde. Estas regiones se encuentran en posiciones geométricamente equivalentes en la pared interna de la cápside (Carrasco et al., 2008).

1.1.2. ESTRUCTURA DEL PORO

Como se mencionó en el apartado anterior, el virión de MVM presenta unas estructuras denominadas poros, alrededor de cada uno de los doce ejes quaternarios presentes en las cápsides de los parvovirus (Figura 4). Estas estructuras están formadas por cinco *loops* de cinco subunidades distintas, cada uno de los cuales une las láminas- β D y E de una subunidad (residuos del 153 al 172 de la VP2), formando una horquilla (Chapman y Rossmann, 1993; Tsao et al., 1991). En el interior se genera un canal o poro, de unos 8 Å de ancho en su región más estrecha, que atraviesa la cápside de un lado a otro. Como se describió en el apartado anterior, las regiones N-terminales de las proteínas que conforman la cápside del virus están desordenadas y no son visibles en las estructuras cristalográficas. Sin embargo, en los mapas de densidad se ha observado una densidad muy difusa en el interior del canal del poro, la cual se ha atribuido a una región rica en glicinas presente en los extremos N-terminales de la VP2 y la VP1 (residuos 28-38 en VP2 y 170-180 en VP1; Wu et al., 1993; Agbanje-McKenna et al., 1998) y muy conservada a lo largo de diferentes parvovirus (Tsao et al, 1991; Chapman y Rossmann, 1993).

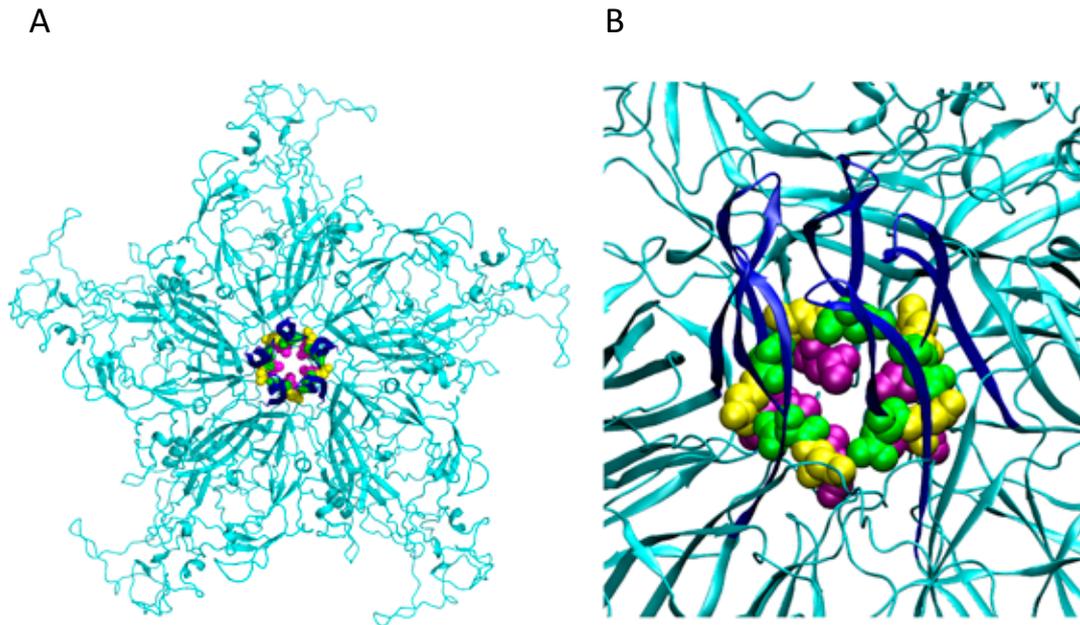


Figura 4. Estructura del poro de MVM. (A) Representación en estructura secundaria de cinco VP2 alrededor de un eje S5 de la cápside nativa de MVMp (PDB id: 1Z14; Kontou et al., 2005) con los *loops* que forman el poro en azul marino y los residuos N170, D171 y L172 representados como esferas de color verde, amarillo y magenta respectivamente. (B) Zoom de la región del poro con el mismo código de colores.

La región del poro permitiría la externalización de los extremos N-terminales de las VPs, que como se explicará en el apartado siguiente, parecen jugar un papel fundamental en los mecanismos de salida y entrada celular del virus. Siguiendo un modelo hipotético, el poro tendría que abrirse para permitir el paso de aminoácidos voluminosos por su interior, pero una vez la secuencia rica en glicinas se introdujese en él, el pequeño volumen de estas permitiría que el poro volviese a su conformación original (Cotmore y Tattersal, 2005). La accesibilidad de esta región de VP2 a anticuerpos específicos y la ausencia de las funciones localizadas en el extremo N-terminal de VP1, entre otras evidencias, sugieren que es el segmento N-terminal de VP2, y no el de VP1, el que atraviesa el poro del virión (Farr y Tattersall, 2004).

Por otro lado, existen evidencias genéticas que respaldan la idea de que el poro podría servir como lugar de entrada del material genético para su encapsulación y posterior extrusión en el ciclo infeccioso del virus (Bleker et al., 2005; Cotmore et al., 1999; Cotmore et al., 2010; Farr et al., 2006). La parte más estrecha del poro se encuentra

localizada cerca de la base del mismo y está formada por la leucina 172 de la VP2 (Agbandje-McKenna et al, 1998). Estudios realizados sobre mutantes de este residuo mostraron, que a excepción de dos mutantes viables (L172I y L172V), el resto eran inviables; en el caso del cambio a triptófano, se observó que este solo producía partículas vacías, las cuales no eran capaces de encapsular el DNA viral en su interior (Farr y Tattersall, 2004). La posterior caracterización estructural de este mutante mostró un desplazamiento del N-terminal de VP2 con respecto al nativo, así como una disminución del diámetro del poro, lo que podría explicar los problemas para poder encapsular el genoma del virus (Plevka et al., 2011).

1.1.3. CICLO BIOLÓGICO DE MVM

En el mecanismo de infección de los parvovirus (Figura 5), estos se unen a uno o más receptores de la superficie celular para, a continuación, producirse la encapsulación del virus dentro de vesículas, las cuales son transportadas al interior del citoplasma. Después de liberarse en el citoplasma, las partículas virales se mueven hasta las proximidades del núcleo, ayudándose de elementos del citoesqueleto, en un proceso mediado por microtúbulos y motores moleculares (Choi y Chae, 2000). Finalmente, el transporte al interior del núcleo de la partícula viral para la posterior replicación de su genoma, parece llevarse a cabo de un proceso activo.

Después de la unión al receptor, los parvovirus son endocitados dentro de la célula. En el caso de MVM, es rápidamente transportado al interior de la célula con la ayuda de clatrina, la cual recubre las vesículas que contienen al virus (Lindser et al., 1997). Una vez internalizadas, los viriones son liberadas en el citoplasma mediante un mecanismo dependiente de pH (Ros et al, 2002), cerca de la envuelta nuclear. Durante el proceso de transporte al interior de la célula, parece que la partícula viral sufre cambios conformacionales (Mani et al., 2006), así como la proteolización de los extremos N-terminales de las VP2 expuestos al exterior de la partícula, generando la VP3 (Santaren et al., 1993). La proteolización de VP2 es un requisito indispensable para la posterior externalización de los extremos N-terminales de VP1: esta región de VP1 presenta actividad fosfolipasa A2, y su externalización es necesaria para la liberación al citosol de las partículas reclutadas en los endosomas (Zadori et al, 2001; Tijssen et al., 2006; Cotmore y Tattersall, 2007).

El transporte celular de las partículas virales de los parvovirus hasta las proximidades del núcleo, parece ocurrir a través de mecanismos de transporte activos. Estudios de microscopía electrónica revelaron la presencia de cápsides del parvovirus CPV en asociación con tubulina y dineína. Por otro lado, ensayos de co-precipitación mostraron que las partículas virales se asociaban con cadenas intermediarias de dineína (Suikkanen et al., 2003). Estos resultados sugieren que los microtúbulos y la dineína participan en el movimiento de las partículas virales en el citoplasma, facilitando tanto el transporte al núcleo, como el proceso de infección.

El transporte al interior del núcleo está dirigido por una señal de localización nuclear (NLS) localizada en el extremo N-terminal de VP1 (Lombardo et al., 2000). Como se comentó antes en este mismo apartado, la externalización del extremo N-terminal de VP1 requiere de cambios conformacionales de la partícula. Para que este proceso se lleve a cabo, es necesario la actividad quimiométrica (corte peptídico en residuos hidrofóbicos) del proteosoma. Se ha visto que inhibidores del proteosoma bloquean la actividad de MVM. En este caso los viriones se acumulan en el entorno perinuclear sin poder acceder al núcleo (Ros et al., 2002; Ros y Kempf, 2004). Por otro lado, el poro nuclear es lo suficientemente grande como para permitir el paso de la partícula viral, pero no está claro que la partícula entera penetre en el núcleo (Lombardo et al., 2002).

INTRODUCCION

La liberación del DNA genómico del virus en el interior del núcleo para su posterior replicación, es un proceso que aún no está claro. El genoma viral de MVM y otros parvovirus presenta unos 20-30 nucleótidos en el extremo 5', los cuales están expuestos al exterior de la cápside. La proteína no estructural NS1 o Rep se une covalentemente a este en las nuevas cápsides producidas (Nuesch et al., 1995). El extremo 3' también puede externalizarse sin requerir el desensamblado de la cápside. Este DNA externalizado podría ser usado en el proceso de iniciación de la replicación del genoma viral, mediante la DNA polimerasa de la célula huésped. En el núcleo tiene lugar la transcripción y replicación del material genético. Existen evidencias que sugieren que la cápside protege el DNA hasta el momento en que la célula entra en fase S de división celular, fase en la que ocurre la replicación del DNA vírico (Ros et al., 2006). Aun así, otros mecanismos de liberación de DNA, incluyendo el desensamblado de la cápside, podrían ser posibles.

El genoma de los parvovirus es un DNA lineal de cadena simple con extremos palindrómicos. El proceso de replicación ha sido muy estudiado en los parvovirus que afectan a roedores como MVM. Solo dos proteínas no estructurales son codificadas por el genoma viral, y ninguna de ellas es la DNA polimerasa, por lo que el virus depende de la maquinaria de replicación de la célula huésped. El modelo de replicación de MVM es el denominado *rolling hairpin*, donde se forma una horquilla en el extremo 3' del DNA, que sirve como iniciador para la replicación usando la polimerasa de la célula huésped (Cotmore y Tattersall, 2006).

El proceso de traducción ocurre en el citoplasma de las células huésped, donde las VPs de la cápside se autoensamblan formando trímeros de VP1 y VP2 o solo VP2. Estos trímeros no son capaces de formar la cápside por si solos en el citoplasma, tienen que ser transportados al interior del núcleo para poder formarla. Los trímeros de las VPs contienen una NLS que los transportan al interior del núcleo celular (Lombardo et al., 2000; Lombardo et al., 2002; Riobos et al., 2006). Ya dentro del núcleo, los trímeros de VPs son capaces de ensamblarse formando cápsides con el DNA viral en su interior (Riobos et al., 2006); la encapsidación del DNA seguramente ocurra a través del poro del eje quinario (Farr y Tattersall, 2004; Plevka et al., 2011). Como se comentó más arriba, la proteína no estructural NS1 se une con el DNA genómico en el extremo 5' y se le ha relacionado con el proceso de encapsidación del DNA, donde funcionaría como motor molecular. Esta proteína también presenta actividad nucleasa en su extremo N-

terminal (Nuesch et al, 1995; Mouw y Pintel, 1998; Hickman et al., 2004) y actividad helicasa en el extremo opuesto (Gorbanyela et al, 1990; Christensen y Tattersall, 2002); esta última es la que se cree que participaría en la encapsidación del DNA dentro de la cápside preformada, en sentido 3'-5' (King et al, 2001; Yoon-Robarts et al., 2004; Cotmore y Tattersal, 2005). Como se comentó arriba, la polaridad de la cadena de DNA empaquetada depende de diferencias en el uso de sus secuencias finales para la iniciación de la replicación.

Estudios llevados a cabo por los profesores Tattersall y Almendral indican que, durante el proceso de morfogénesis del virión de MVM, se produce la externalización del extremo N-terminal de VP2, en respuesta a la entrada del genoma del virus en el interior de la cápside (Tattersall y Cotmore, 1988; Almendral, 2006). Se describió que este proceso es indispensable para la capacidad infectiva del virus, ya que la exposición del extremo de VP2 fosforilado dirige fuera del núcleo a los viriones ensamblados (Maroto et al, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, si se llevan a cabo mutaciones en los residuos localizados en la base del poro de la cápside, se produce una disminución drástica en la capacidad infectiva del virión, debido seguramente a la imposibilidad de externalizar el extremo N-terminal de la VP2 (Reguera et al, 2004).

Una vez en el citoplasma celular, la liberación de los viriones de MVM al medio extracelular parece ocurrir a través de la lisis de la célula infectada (Richards et al, 1977), aunque otros mecanismos, que no requieran la destrucción de la célula, podrían también ocurrir (Whittaker y Helenius, 1998).

1.1.4. PROPIEDADES MECANICAS DE MVM

Las propiedades mecánicas de MVM han sido estudiadas con anterioridad por el grupo del Profesor Mauricio G. Mateu. Entre ellas, se ha estudiado la elasticidad mecánica de diferentes regiones de este virus. Para ello, se llevaron a cabo modificaciones en la cadena polipeptídica de la VP2 de este virus, con el fin de afectar el dinamismo conformacional de la región localizada alrededor del poro de la cápside (Castellano et al., 2012). Como se ha comentado en el apartado anterior, esta región está involucrada en el proceso de translocación molecular necesario para la capacidad infectiva del virus (Castellano et al., 2012; Castellano et al., 2015). Los resultados obtenidos por AFM

INTRODUCCION

corroboraron que cualquier mutación que perjudicase el cambio conformacional de la región del poro, aumentaría su rigidez mecánica. Este estudio confirmó que la elasticidad mecánica y el dinamismo conformacional de las regiones del virus están relacionados.

Estos resultados fueron contrastados con otros obtenidos anteriormente, donde se mostraba que el DNA se unía a ciertas regiones de la pared interior de la cápside, obteniendo como resultado una distribución anisotrópica de la rigidez en el virión (Carrasco et al., 2006; Carrasco et al., 2008). Estas interacciones no-covalentes entre la molécula de DNA y la cápside se localizan en las inmediaciones de las regiones de los ejes binarios y ternarios de la partícula, pero no se observaron regiones de unión alrededor de los ejes quíntarios. Se sugirió que quizás una rigidificación similar de esta zona hubiese afectado dramáticamente a la capacidad infectiva de la cápside. Estos resultados están en concordancia con los descritos arriba, donde se concluía que el dinamismo conformacional de la región del poro es importante para la capacidad infectiva del virus.

De especial interés es el resultado obtenido del estudio de las propiedades mecánicas de MVM donde, al contrario de lo que se podría esperar, la creación de cavidades en la base del poro mediante la mutación de los residuos clave allí localizados, conduce a un aumento de la rigidez mecánica de la región (Castellanos et al., 2012). Resultado que podría parecer inesperado ya que, por regla general, la creación de cavidades en una estructura produce una disminución de su resistencia. Esta rigidificación esta inexorablemente relacionada con una disminución en el dinamismo conformacional de la cápside (Castellanos et al., 2012), necesario para la exposición, a través de los poros, del extremo N-terminal de VP2.

La relación descrita en el párrafo anterior entre rigidificación y sus consecuencias en la capacidad infectiva del virus fue estudiada *in vitro* mediante cápsides formadas únicamente por VP2, donde calentando progresivamente se obtiene el valor de la energía necesaria para desencadenar el cambio conformacional (Carreira et al., 2004). Los mutantes de los viriones que producían una rigidificación de la cápside perdían su capacidad para infectar células. Este hecho no se observó en los mutantes en los que el poro mantenía intactas su flexibilidad. Por otro lado, se observó que mutantes donde se

eliminaban grupos alrededor del poro producían rigidificación en regiones distantes del poro (Castellanos et al, 2012).

1.2. VAULTS

La partícula vault, con una masa de 10 MDa y unas dimensiones de 70 x 40 x 40 nm (Figura 6) es la mayor ribonucleoproteína presente en los organismos eucariotas (Kedersha et al., 1990; Hamill y Suprenant, 1997; Herrman et al., 1997). A pesar de encontrarse tanto en humanos, así como en una amplia variedad de animales, las vaults tardaron en identificarse; fueron descubiertas por Kedersha y Rome en 1986 (Kedersha and Rome, 1986). Esto fue debido a que estas partículas, formadas en su mayoría de proteína, no eran visibles en las preparaciones de microscopía electrónica de la época, donde se usaban agentes de tinción que teñían mayoritariamente membranas y ácidos nucleicos. Sin embargo, con la llegada de la tinción negativa a la microscopía electrónica, estas partículas fueron fácilmente reconocibles como contaminantes en una preparación de vesículas recubiertas de clatrina, obtenidas de tejidos de hígados de rata. Debido a su morfología en forma de barril, que recordaba a los techos de las catedrales góticas, se les denominó vault (bóveda o cúpula en inglés; Rome et al., 1991).

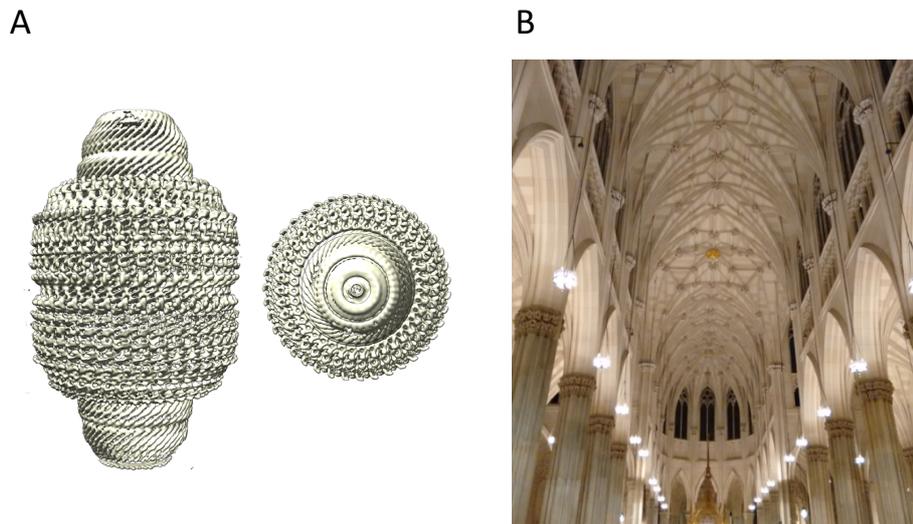


Figura 6. Partícula vault. (A) Distintas vistas de la estructura de la ribonucleoproteína vault a 9 Å de resolución obtenida a partir de cristales de la partícula (Querol-Audi et al., 2009). (B) Ejemplo de un techo de una iglesia que inspiró el nombre de las vaults (catedral de St. Patricks en Nueva York).

1.2.1. COMPOSICION DE LAS VAULTS

En mamíferos, las vaults están formadas de 3 proteínas (Figura 7): la *major vault protein* (MVP, 100kDa; Kedersha and Rome, 1986), la *vault poly(ADP-ribose) polimerase* (VPAAP, 240 kDa; Kickhoefer et al., 1999a) y la *telomerase-associated protein-1* (TEP-1; Kickhoefer et al., 1999b). Además de estas, las vaults también contienen uno o más RNAs no traducidos de un tamaño aproximado de 100 nucleótidos (vRNA; Kickhoefer et al., 1993).

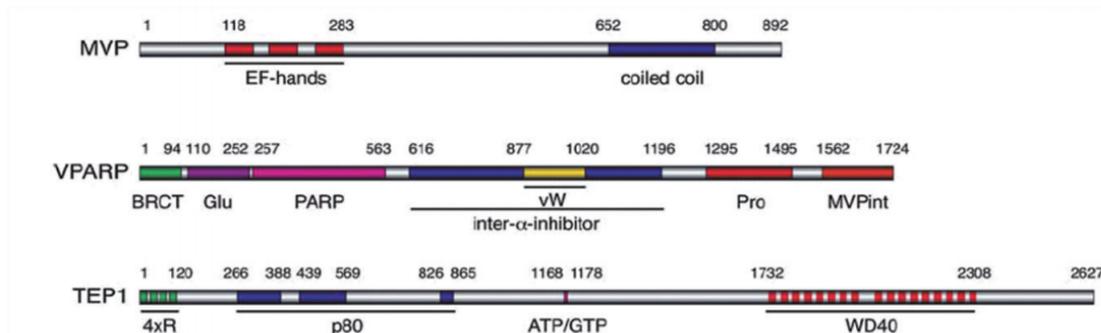


Figura 7. Representación esquemática de las tres proteínas que forman parte de la vault, con sus dominios estructurales y funcionales (Berger et al., 2009).

Mediante técnicas de biología estructural, se ha caracterizado tanto la partícula vault, como las interacciones con sus componentes. Se presenta a la vault como una nanocápsula con forma de barril, que posee dos protuberancias apicales y una invaginación en la parte media. La cubierta de la capsula está formado por 78 copias de la MVP; la expresión de esta proteína produce por si sola la formación de partículas vaults recombinantes (VLPs: *Vault Like Particles*) similares en forma y tamaño a las vaults endógenas purificadas (Stephen et al, 2001). El número de copias de las otras dos proteínas minoritarias que forman parte de las vaults no está claro del todo; basados en los datos de microscopia electrónica, habría dos copias de TEP-1 y ocho copias de la vPAAP por partícula (Kong et al., 1999), las cuales se encuentran en ambos casos en el interior de la partícula.

Las vaults han sido identificadas en una amplia variedad de especies (Figura 8), incluyendo, además de diversos mamíferos, seres evolutivamente muy separados, tales como protozoa (la ameba *Dictyostelium discoedium*), moluscos y equinodermos (el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*), anfibios (la rana catesbeina, *Xenopus laevis*), aves (*Gallus gallus*) y peces (la raya eléctrica, *Torpedo marmorata*). Por otro lado, resulta muy sorprendente la pérdida de estas partículas en otras especies populares en biología molecular, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, así como también en plantas. La conservación de las vaults a lo largo de la evolución sugiere que desempeña una función fundamental que estaría relacionada con la estructura capsular que presenta esta partícula.

INTRODUCCION

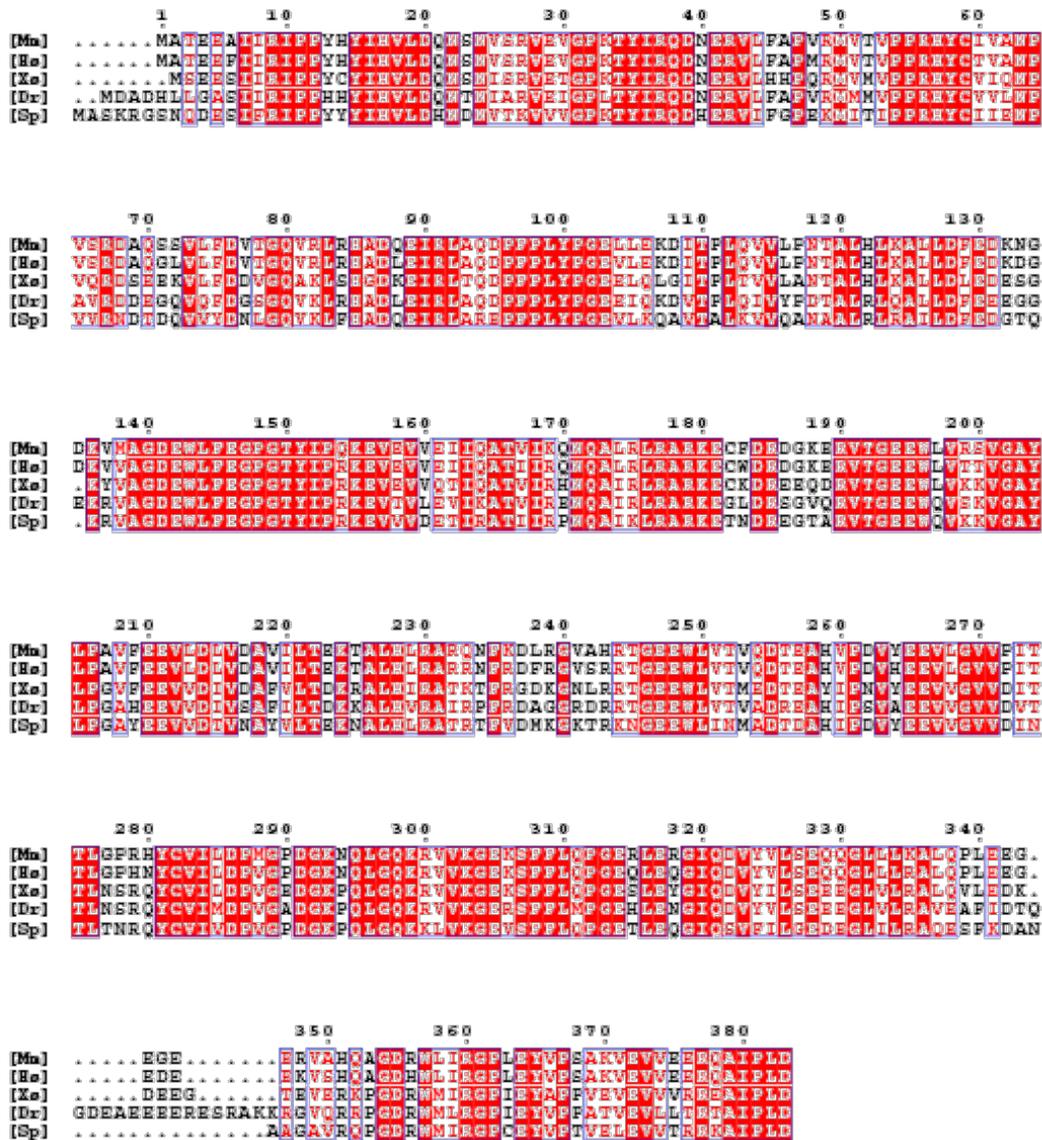


Figura 8. Comparación de las secuencias de los extremos N-terminales de las MVPs de ratón (Mn), humano (Hs), rana (Xs), pez cebra (Dr) y oruga (Sp) obtenido con el software ESPrpt (Robert, X. and Gouet, P., 2014). Se observa que la conservación de la secuencia de esta proteína en las diferentes especies es muy alta.

1.2.2. LOCALIZACION INTRACELULAR Y MOVIMIENTOS DE LAS VAULTS

Se han descrito diferencias importantes en la localización intracelular de las vaults y los artículos publicados presentan observaciones parcialmente contradictorias, incluso cuando lo que se compara son vaults de distintos tipos celulares usando idénticos métodos de detección. Estos hechos nos lleva a pensar que la localización celular no

depende tanto del tipo de especie que se esté estudiando, sino más bien es algo más variable y sujeto a cambios en respuesta a estímulos externos. La mayoría de artículos concuerdan que, al menos en mamíferos, las vaults (MVP) son mayoritariamente citoplasmáticas (~ 90%; Figura 9). Esta conclusión está basada en los resultados de inmunomarcaje de MVP, MVP fusionado a proteínas detectables y fraccionamiento bioquímico de células (Kickhoefer et al., 1996; van Zon et al., 2003; Steiner et al., 2006).

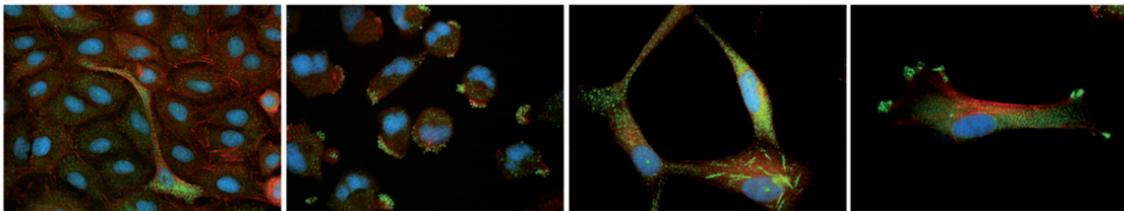


Figura 9. Localización celular de las vaults. Imágenes de inmunofluorescencia de vaults (en verde) en células de cáncer de pulmón A549 en ausencia (primera foto de la izquierda) y presencia (segunda foto) de un agente inductor de la diferenciación. La tercera foto muestra células de glioblastoma tratadas con daunomicina, donde se observa la aparición de “tubos de vaults” en una de las células. La foto de la derecha muestra la distribución celular de las vaults después de la expresión de la MVP fusionada a la *green-fluorescence protein* en células de glioblastoma humano (Berger et al., 2009).

Además de esto, se encontraron una parte de las vaults en la envuelta nuclear de células humanas (Mossink et al., 2003; Mikyas et al., 2004; Berger et al., 2000). Estos resultados fueron corroborados mediante unos experimentos de *photobleaching* (van Zon, et al., 2006), donde se demostró que las vaults podían trasladarse del citoplasma a la envuelta nuclear de las células cancerígenas de pulmón. Resultados similares se obtuvieron para células de rata, erizo de mar y *Dictyostelioum*, proponiendo la idea de que las vaults pueden asociarse con el poro nuclear (NPC por sus sigla en inglés *Nuclear Pore Complex*; Chugani et al., 1993; Dickenson et al., 2007). Unas imágenes de cryo-tomografía revelaron la existencia de una masa, dinámica e inidentificable en el centro del NPC, que muy probablemente representa un *cargo* en tránsito (Beck et al., 2004). Todas estas observaciones en conjunto, junto con la idea de que las vaults poseen

INTRODUCCION

un tamaño similar al del poro nuclear, sugieren que, al menos ocasionalmente, las vaults realizan alguna función dentro del NPC.

Es importante comentar también que se han encontrado grandes cantidades de MVP en el núcleo de células, tanto de mamíferos como de seres inferiores (Slesina et al., 2005; Kim et al., 2006; Ryu et al. 2008). Algunos grupos incluso han sugerido que la MVP podría desempeñar diferentes funciones en varios procesos nucleares, basándose en la capacidad de las vaults para actuar como transportadores entre citoplasma y núcleo. Estas funciones incluyen la importación nuclear de la molécula supresora de tumores PTEN (Chung y Eng, 2005; Chung et al., 2005) o receptores de hormonas nucleares (Abbondanza, C. et al. 1998), así como la exportación de fármacos (Kitazono, et al. 1999; Kitazono et al. 2001).

Estudios enfocados en la localización celular de estas nanopartículas, propusieron que las vaults interaccionaban con componentes del citoesqueleto (Figura 10). En uno de ellos, la MVP fue inmunolocalizada en las proximidades de las fibras de actina en balsas lipídicas y sitios de adhesión celular, así como en terminales nerviosas colinérgicas de las rayas eléctricas (Kedersha et al., 1990; Herrmann et al, 1999). También se ha descrito una colocalización e interacción con tubulina en varios tipos celulares (Hamill et al, 1997; Herrmann et al, 1998; van Zon, et al., 2006). El tamaño de las vaults, así como su colocalización con estructuras del citoplasma, sugiere que el movimiento de estas requiere de la participación de mecanismos activos, en lugar de moverse a través del citoplasma por difusión (Luby-Phelps et al., 1987). Observaciones llevadas a cabo por Slesina et al., usando FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) y *video-enhanced microscopical analysis* atribuyeron a estas partículas un movimiento citoplasmático rápido, con una velocidad aproximada de 10 $\mu\text{m/s}$ (Slesina et al., 2006), lo que estaría en el rango del movimiento vesicular en el proceso de sinapsis entre axones (Kaether et al., 2000). Esta velocidad de movimiento confirma la implicación de mecanismos activos en el movimiento de estas partículas, donde aparte de microtúbulos, participarían motores moleculares.

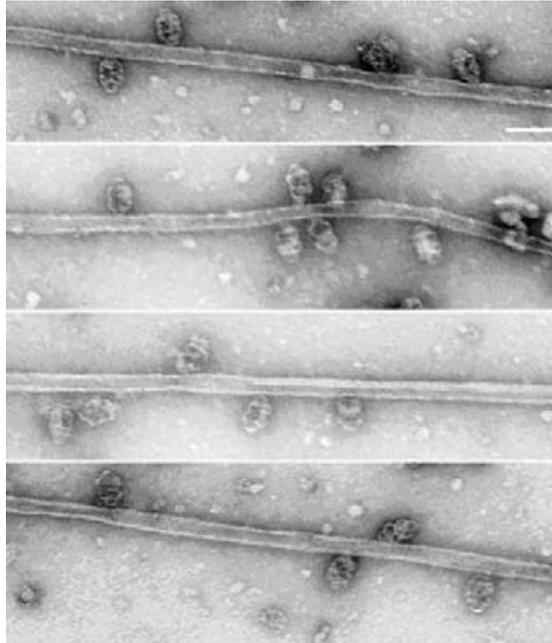


Figura 10. Movimiento de las vaults. Micrografías de microscopia de tinción negativa donde se observan vaults unidas a microtúbulos por la parte del *cap* (Eichenmuller, Kedersha et al. 2003).

1.2.3. ESTRUCTURA DE LAS VAULTS

Se han llevado a cabo varios estudios de la estructura de las vaults, los primeros de los cuales se llevaron a cabo usando distintas técnicas de microscopia electrónica. Uno de los primeros trabajos, propuso un modelo estructural perteneciente al grupo de simetría puntual D8 (Kedersha et al., 1991). Este estudio presento por primera vez unas estructuras en forma de flor con ocho “pétalos” unidos a un anillo central. Estas estructuras se solían encontrar en parejas, sugiriendo que las vaults contenían dos de esas estructuras plegadas. La primera reconstrucción de criomicroscopía fue llevada a cabo a partir de la partícula purificada de rata, que a una resolución $\sim 31 \text{ \AA}$ suministro una imagen mucho más clara de las partículas (Kong et al., 1999; Figura 11). Esta estructura presentaba la partícula con una capa exterior fina, una zona central en forma de barril y dos caperuzas que sobresalían. Las dimensiones de las vaults eran de $40 \text{ nm} \times 40 \text{ nm} \times 75 \text{ nm}$. El barril presentaba una invaginación en la cintura de la partícula. En la mayoría de la estructura, la pared de la partícula tiene un espesor de unos 25 \AA .

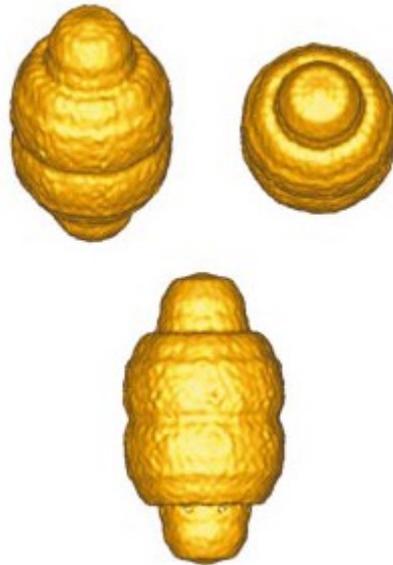


Figura 11. Reconstrucción de la vault con una simetría impuesta de orden ocho presentada en diferentes orientaciones (Kong et al., 1999).

Varios grupos, incluido el nuestro, hemos cristalizado las vault para ayudar a dilucidar las funciones de esta partícula basándose en la estructura de la misma. Los primeros cristales de estas partículas fueron obtenidos por nuestro grupo en el año 2005, como contaminantes en una preparación de un astrovirus humano, donde fueron copurificadas con el virus (Querol-Audi et al., 2005). Por otro lado, se obtuvieron cristales de vaults recombinantes, los cuales alcanzaron una resolución de 9 Å (Anderson et al., 2007). Pero fue el grupo del Dr. Tsukihara quien obtuvo unos cristales que difractaron a más alta resolución, llegando a 3.5 Å para vaults purificadas de hígado de rata (Kato et al., 2008; Tanaka et al., 2009). Por otro lado, nuestro grupo cristalizó y resolvió las estructuras de la región N-terminal de la MVP de ratón conteniendo los siete primeros dominios de repetición R1-R7 (Querol-Audi et al., 2009) a 2.1 Å y de la vault entera a 9 Å (Figura 6A).

La estructura de rayos-X de las vaults de rata resuelta a 3.5 Å (Tanaka et al., 2009) mostró que la envuelta de las vaults está organizada en dos mitades idénticas, cada una de ellas constituida de 39 copias de la MVP (Figura 12). A su vez, el monómero de MVP está organizado en 12 dominios estructurales: 9 dominios de repetición en el extremo N-terminal (Met1 a Gly519), seguidos por un dominio α/β shoulder (Pro520 a Val646), un dominio *cap-helix* (Asp647 a Leu802) y finalmente, un dominio *cap-ring*

en el extremo C-terminal (Gly803 a Ala845). Los nueve dominios de repetición (R1-R9) pueden ser clasificados en dos subgrupos basándonos en la disposición de las láminas- β antiparalelas en ellos. Los dominios R8 y R9 están formados por 5 láminas- β antiparalelas, mientras que los otros siete dominios tienen dos laminas- β adicionales. Como se ha mencionado arriba, la estructura de los 7 primeros dominios de repetición que forman el barril de las vaults fue resuelta a alta resolución en nuestro laboratorio (Querol-Audi et al., 2009). Comparando ambas, las estructuras de los dominios R3 a R7 son bastante similares y es en los dominios R1 y R2 donde encontramos diferencias significativas. El análisis estructural en profundidad reveló que R1 pertenecía en realidad al subgrupo de R8 y R9, con 5 láminas- β antiparalelas, mientras que R2 presentaba 7, como se había predicho (Casañas et al., 2013). El análisis de los contactos presentes en la sección central de la partícula, da algunas ideas sobre las interacciones que gobiernan la asociación de las dos mitades de la vault. Esta asociación consta de una combinación de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los dominios R1 de cada mitad. A pesar de que los análisis de la secuencia de MVP sugerían la presencia de dos posibles dominios EF en R3 y R4, la estructura en esa zona no presenta dominios EF, solo laminas- β .

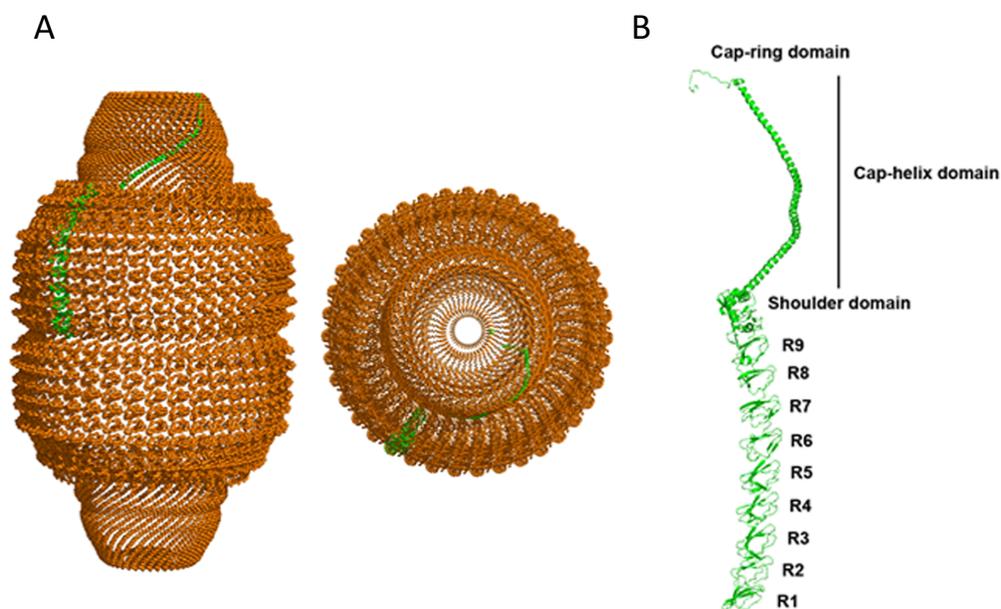


Figura 12. Estructura de la vault. (A) Modelo de la estructura cristalina de la vault a 3.5 Å representada en *ribbon* en su vista lateral y apical. Aparece en verde una de las copias de la MVP que forma la partícula. A la derecha estructura del monómero MVP con los distintos dominios señalizados, representada con los elementos de estructura secundaria (PDB ID: 4HL8; Casañas et al., 2013).

INTRODUCCION

El dominio *shoulder* (Pro520 a Val646) se pliega adoptando una conformación globular α/β con cuatro laminas- β antiparalelas en un lado y cuatro hélices- α en el otro. Una búsqueda de estructuras similares identificó la similitud de este dominio con el dominio nuclear de la estomatina del organismo *Pyrococcus horikoshi* (PDB id: 3BK6; Yokoyama et al., 2008), el cual forma parte de la familia de dominios estomatina-ptohibitina-flotilina-HflK-C (SPFH; Tavernarakis et al., 1999). Se ha descrito que los dominios SPFH están involucrados en la unión a balsas lipídicas (Umlauf et al., 2004), que como se describirá más abajo es una zona de reclutamiento de vaults en células infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* (Kowalski et al., 2007).

El dominio *cap-helix* está formado por una hélice- α de 42 giros que muestra una estructura de superhélice con las otras 39 hélices. La densidad de la región C-terminal del *cap-ring*, en la cual se observan dos capas de densidad en forma de U, resultó más difícil de interpretar: después de la Pro815 solo están trazados los $C\alpha$ de los residuos siguientes (Figura 13). A pesar de esto, se pudo ver que la zona de unión entre las dos capas de densidad corresponde muy bien con una lámina- β de cuatro residuos, probablemente de la Leu822 a la Leu825, formando un anillo de láminas- β constituido por varias subunidades. El análisis estructural de esta región reveló impedimentos estéricos que imposibilita la internalización de las 39 MVPs y se propuso que este anillo estaría formado seguramente por 36 subunidades. Como consecuencia, en esta región se rompería la simetría de orden 39 presente en el resto de la partícula (Casañas et al., 2012).

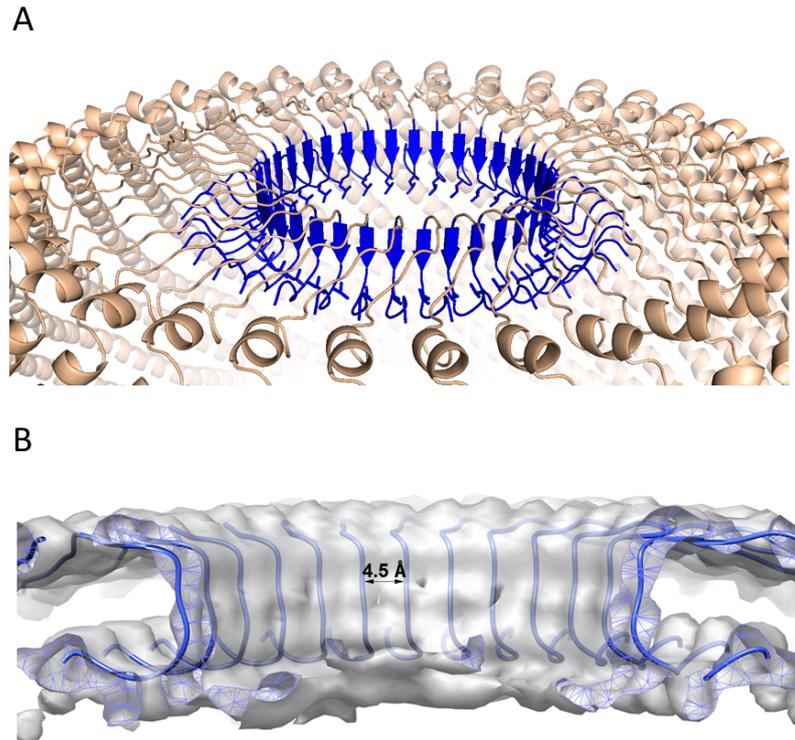


Figura 13. Estructura del dominio *cap-ring* de la vault. (A) Representación de una posible organización de la región C-terminal del *cap* con un anillo formado de 36 láminas- β mostrado en azul y las 39 subunidades que conforman la vault mostradas en beige. (B) Vista de la densidad electrónica que forma el dominio *cap-ring* de la vault. Se muestran trazadas 13 subunidades con la distancia entre ellas (Casañas et al., 2013).

1.2.4. FUNCION CELULAR DE LAS VAULTS

Teniendo en cuenta que las vaults están presentes en la mayoría de organismos eucariotas, el alto grado de conservación a lo largo de la evolución y su peculiar estructura, no parecería extremadamente difícil identificar la función de esta partícula, pero la realidad es que la función exacta de las vaults todavía no está clara. Se han propuesto diversas hipótesis sobre la función de estas ribonucleoproteínas, basadas en su forma hueca y tamaño (todas ellas implican el transporte de carga), pero ninguna de ellas ha sido corroborada experimentalmente. A continuación se presentan todo lo que se conoce sobre las funciones celulares de las vaults (Figura 14).

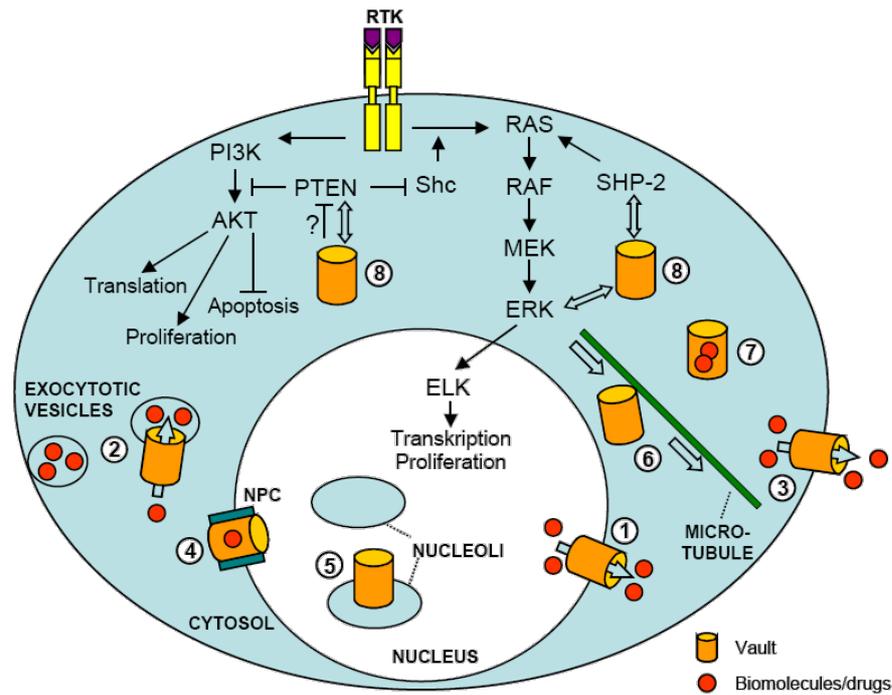


Figura 14. Representación esquemática de algunas de las funciones propuestas para la partícula vault (Steiner, Holzmann et al. 2006).

Con el descubrimiento de que la MVP de ratón era idéntica a la proteína resistente al cáncer de pulmón (LRP; Scheffer et al. 1995), conocida por estar sobreexpresada en múltiples modelos que presentan resistencia a quimioterapia, se asoció a las vaults con la resistencia intrínseca a fármacos (Scheffer et al., 1995). Además de la correlación existente entre la expresión de la MVP y la resistencia a fármacos en estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo en varios cánceres humanos (Steiner et al., 2006), la MVP se encuentra sobreexpresada casi generalmente en células humanas cancerígenas resistentes a un amplio espectro de fármacos quimioterapéuticos (Berger et al., 2009). Sin embargo, otras observaciones excluyen un papel directo de la MVP en esta función, tal como se ha demostrado mediante experimentos de *knockout* en ratones, que generaban ratones sin vaults. Estos ratones no presentaban defectos aparentes en su desarrollo ni tampoco presentaban hipersensibilidad a diversos fármacos antineoplásicos (impiden el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales cancerígenas; Mossink et al, 2002). Es importante tener en cuenta que estas observaciones, llevadas a cabo en la regulación de expresión de genes en ratones, podrían no ser reproducibles en células humanas.

Herlevsen et al. encontraron que el *knockdown* de MVP usando RNA interferente producía una sensibilización a la doxorubicina (Herlevsen et al., 2007). El fármaco fue detectado en el núcleo inmediatamente después de su adición y posteriormente se encontró en los lisosomas, los cuales se colocaban mayoritariamente alrededor del núcleo. No solo se vio modificada la distribución usual de este fármaco, sino también los marcadores de lisosomas se mostraban teñidos de forma distinta a la de los controles con expresión inalterada de MVP. Estos resultados sugieren que la MVP, y por consiguiente las vaults, son necesarias para la correcta función del lisosoma. Un conjunto de experimentos en paralelo mostraron que la vault se disociaba en sus dos mitades en condiciones de pH ácido (Goldsmith et al., 2007; Esfandiary et al., 2008). Los autores proponen en este trabajo que el medio ácido del interior de los lisosomas podría servir como un excelente ambiente para desencadenar la apertura de la partícula. Este comportamiento dinámico de las vaults ya fue observado por Poderycki et al. (2006), los cuales encontraron que las proteínas minoritarias de las vaults (VPARP y TEP-1) eran capaces de incorporarse a vaults recombinantes previamente ensambladas. Además de esto, otros experimentos mostraron que las vaults son capaces de separarse *in vitro* en sus dos mitades por la cintura de la partícula y volverse a reensamblar rápidamente (Yang, J. et al. 2010). Este estudio también describió que las vaults eran capaces de intercambiar subunidades de MVP *in vivo*. Todas estas observaciones presentan a las vaults no como unas cajas rígidas e impenetrables, sino más bien como unas estructuras dinámicas poseedoras de una flexibilidad sustancial.

Su estructura hueca, su alta velocidad de movimiento, la distinta localización subcelular y su relación con la resistencia a fármacos lleva a la hipótesis de que esta partícula podría representar un vehículo de transporte indiscriminado (Steiner et al., 2006). Esta hipótesis fue corroborada por la presencia de masas en su cavidad interior (Kong et al., 1999). Varias proteínas han sido identificadas unidas y algunas otras se sabe que son transportadas por MVP; sin embargo, si estaban o no encapsuladas en su interior está todavía por determinar. Entre estas proteínas se encuentra la fosfatasa tumor-supresora (PTEN), la cual se une a la MVP de manera dependiente de calcio (Yu et al., 2002). PTEN actúa como un gen supresor de tumores y juega un papel crucial en la progresión, angiogénesis, migración e invasión del ciclo celular así como en la regulación de células madre. Por otro lado, se demostró que la MVP era capaz de unirse a varios efectores de la vía metabólica de MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos; Kolli et al.,

2004), entre ellos la forma activada MAPK/Erk y la tirosina fosfatasa SHP-2. Esta ruta coopera en la transmisión de varias señales extracelulares y, por consiguiente, controla un gran número de procesos celulares, dentro de los que se encuentra la proliferación, diferenciación, desarrollo, respuesta a estrés y apoptosis. También se ha descrito que la MVP se une a la *constitutive photomorphogenesis 1* (COP-1; Yi et al., 2005), una ubiquitina-ligasa originalmente descrita como esencial para el desarrollo de las plantas. Las implicaciones de estas interacciones tienen que ser todavía estudiadas. Por último lugar, se demostró que tanto MVP como el vRNA co-inmunoprecipitaban con el receptor del estrógeno de extractos de la línea celular cancerosa MCF7 (Abbondanza et al., 1998); estos datos sugieren que la vault podría jugar un papel importante en la importación al núcleo del receptor del estrógeno y/o la activación del mismo.

Varias observaciones indican que las vaults podrían estar involucradas en respuestas inmunológicas, como, por ejemplo, la activación del promotor de MVP por acción del interferón (Steiner et al., 2006). Otro ejemplo es la inducción de expresión de vRNA en respuesta a la infección del virus Epstein-Barr (EBV; Motsch et al., 2007), observación que condujo a sus autores a proponer que el vRNA, y por consiguiente las vaults, podrían estar involucrados en el mecanismo de defensa anti-viral mediante el transporte núcleo-citoplasmático. También se ha demostrado que las vaults resultan esenciales en el mecanismo de resistencia contra la infección pulmonar causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Kowalski et al., 2007), participando en la internalización y eliminación del patógeno. Los mecanismos exactos que describan el papel de la MVP en este campo de la biología no están dilucidados, pero tanto la función regulatoria del citoesqueleto en la formación de balsas lipídicas (esenciales en el papel de las vaults contra la infección por *P. aeruginosa*) o los efectos sobre rutas metabólicas como la del MAPK, podrían estar relacionadas.

Paspaslas et al., usando una combinación de inmunoprecipitación acoplado con PCR de transcripción reversa, mostraron que la MVP se asocia con mRNAs en neuronas que se sabe es traducido en respuesta a actividad sináptica (Paspaslas et al., 2009). Basados en los resultados obtenidos por este grupo en lo referente a la expresión de MVP en el eje núcleo-neurita, su unión a microtúbulos y su asociación con múltiples mRNAs, sugirieron que MVP podría desempeñar un papel en el transporte de estos mRNAs.

Un artículo publicado el año pasado presenta que la MVP regula la señalización de crecimiento/supervivencia en células musculares humanas de las vías respiratorias a través de modificaciones oxidativas (Das et al., 2016). Los resultados establecieron una nueva vía metabólica en la cual la oxidación mediada por un ligando/receptor promueve la S-glutationalización de la MVP, permitiendo que se una a miosina-9 para reprimir la muerte inducida por calentamiento de estas células musculares.

1.2.5. APLICACIONES DE LAS VAULTS EN NANOBIOOTECNOLOGIA

Uno de los mayores desafíos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades es la falta de métodos apropiados para el envío de agentes terapéuticos (proteínas, fármacos o ácidos nucleicos) a células diana de manera específica. La hidrofobicidad y la baja solubilidad acuosa son características presentes en muchos fármacos que requieren de su solubilización con co-solventes o detergentes, los cuales pueden ser tóxicos o producir efectos secundarios no deseados. La encapsulación de estas sustancias dentro de nanopartículas es una estrategia prometedora que podría mejorar el envío a tejidos específicos y reducir los efectos secundarios (Brigger et al., 2002; Torchilin et al., 2004). Las vaults poseen muchas características que hacen de ellas unos recipientes ideales para su uso como vehículos en el envío de agentes terapéuticos, incluyendo su capacidad de autoensamblarse, tamaño en el rango de los 100 nm, información estructural a nivel atómico, presencia natural en humanos (asegurando la biocompatibilidad), un sistema de producción recombinante, la presencia de cargos en su interior y una estructura dinámica que podría ser modificada mediante manipulación genética. Todos estos atributos hacen de ellas unas partículas con un enorme potencial para su uso como plataforma en el envío de fármacos, genes o proteínas.

Un transportador de fármacos ideal debería ser biocompatible y capaz de proteger el contenido encapsulado de la degradación prematura, liberando su contenido en óptimas condiciones allí donde sea necesario. El gran tamaño de estas partículas, con espacio suficiente para encapsular cientos de proteínas, ha propuesto que las vaults sean utilizadas como nanocápsulas para el envío de agentes terapéuticos (Kickhoefer et al., 2005). Al mismo tiempo, estas partículas no presentan algunos de los grandes inconvenientes existentes en otros vehículos comunes utilizados para estos fines, tales como cápsides virales, liposomas o partículas polímeras. Aunque los virus han

INTRODUCCION

resultados útiles como vacunas, su inmunogenicidad puede producir una respuesta inmune que podría ser peligrosa al usarlo como vehículo para el transporte (Macrobattista et al., 2006). Por otro lado, los liposomas exhiben, comúnmente, una estabilidad física y química muy bajas, así como las micelas, que también muestran una baja estabilidad física y se desensamblan fácilmente si son diluidas por debajo de su concentración micelar crítica.

Para que las vaults sean efectivas en las aplicaciones propuestas, es necesario que sean capaces de encapsular en su interior la molécula de interés. Ha sido descrita una encapsulación pasiva de un polímero semiconductor en las vaults (Ng et al., 2008), confirmando que las vaults son estructuras dinámicas, capaces de encapsular sustancias en su interior en un rango de tiempo de segundos a minutos. Las interacciones moleculares que hacen posible la encapsulación no han sido descritas, pero lo que sí se sabe es que el polímero era un polielectrolito aniónico. La estructura de los dominios R1-R7 de la MVP, reveló una acumulación de residuos cargados positivamente en la parte interior de la vault (Querol–Audi et al., 2009). Esto abre el camino a la encapsulación de moléculas cargadas negativamente, como podrían ser moléculas de DNA con fines terapéuticos. Por otro lado, existe una secuencia específica de unión a la vault que fue identificada en el extremo C-terminal de la proteína minoritaria VPARP (aa 1563-1724). Esta secuencia ha sido definida como mINT, por dominio mínimo de interacción. Cuando las proteínas son fusionadas al mINT, estas son directamente encapsuladas en el interior de las vaults recombinantes, manteniendo sus propiedades nativas (Figura 15; Kickhoefer et al., 2005). Mediante mapas de diferencia de densidad se encontró que el mINT se unía en dos zonas del interior de las vaults recombinantes: por encima y por debajo de la cintura de la partícula. Otros trabajos han llevado a cabo la encapsulación de proteínas para mejorar la penetración de la vault en las células diana; en uno de esos casos se llevó a cabo la fusión del mINT al dominio lítico de membrana de la proteína VI del adenovirus (pVI). La actividad lítica de membrana de la proteína fusionada permaneció inalterable (Lai et al., 2009). Este experimento demostró que las vaults pueden ser modificadas para aumentar su internalización en las células. Recientemente se han publicado unos resultados donde se internaliza dentro de las vaults la Manganese peroxidase (MnP), vía fusión al dominio mINT en el C-terminal de la proteína (Wang et al., 2015). La MnP es una proteína ampliamente usada en la biodegradación de contaminantes orgánicos y cuya actividad fue mantenida una vez la

proteína fue encapsulada en la nanopartícula. Es importante remarcar que la estabilidad de la proteína dentro de la vault aumentó significativamente. Este estudio abre la puerta al desarrollo de técnicas para eliminar distintos contaminantes del agua potable o aguas subterráneas usando las vaults.

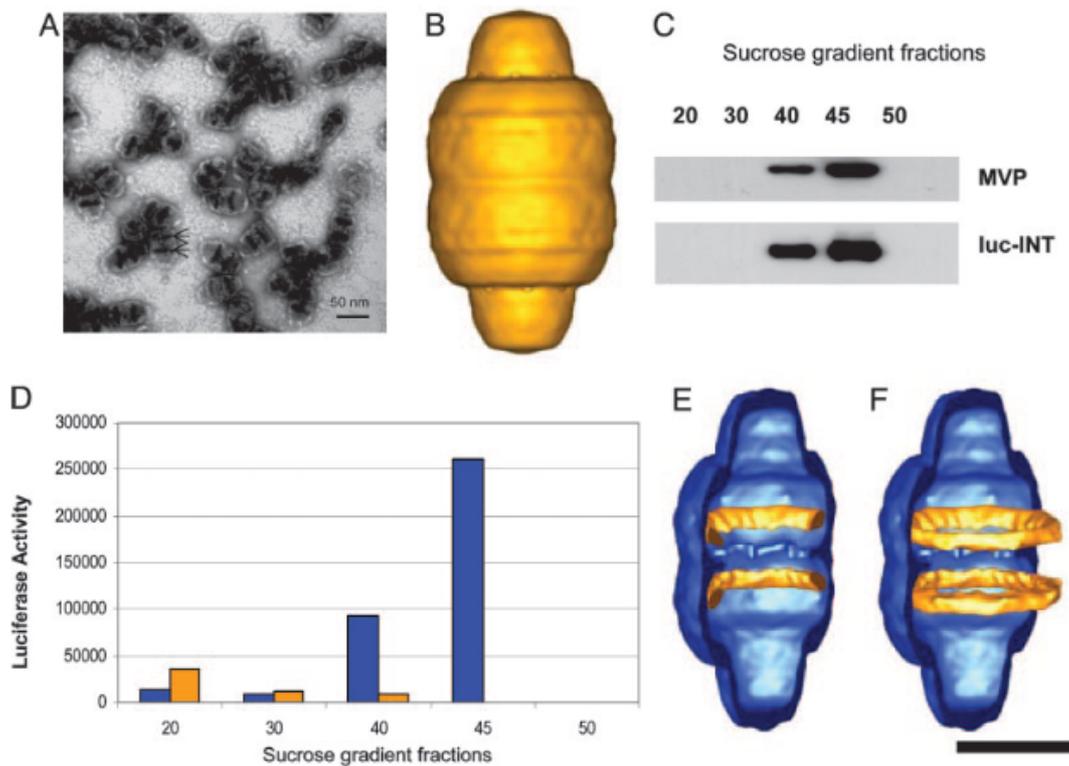


Figura 15. Internalización de compuestos dentro de las vaults. (A) Micrografía de tinción negativa de vaults que contienen luciferasa fusionada a mINT (luc-INT) en su interior. (B) Reconstrucción de la vault a una resolución de 28 Å. (C y D) fracciones del gradiente de sacarosa que fueron inmunobloteadas para detectar la copurificación de las vaults con luc-INT en su interior. Se observan picos de actividad de luciferasa con las vaults en las fracciones de 40% y 45 % del gradiente de sacarosa. Los bloques azules muestran las vaults que contienen luc-INT y los amarillos muestran a la luc-INT sola. (E y F) Diferencias en la densidad atribuida a luc-INT (amarillo) al superponer la reconstrucción obtenida de la misma con la vault formada por MVP solo (barra de escala: 25 nm; Kickhoefer, García et al. 2005).

Una aproximación para encapsular fármacos dentro de las vaults sin tener que recurrir a fusionarlas a mINT fue llevada a cabo por Buehler et al., los cuales modificaron las vaults recombinantes para generar un core lipofílico en el interior de la partícula (Buehler et al., 2014). Para ello se les fusiono una pequeña hélice α antipática en el

extremo N-terminal de la MVP, generando en el lumen de la partícula un microambiente lipofílico, donde compuestos lipofílicos podían ser reversiblemente encapsulados. Estas vaults fueron capaces de encapsular una gran variedad de agentes terapéuticos, incluyendo ácido retinoico, anfotericina B y briostatina 1, incorporando miles de moléculas del fármaco por nanopartícula.

La internalización y liberación de los agentes terapéuticos en, únicamente, las células diana, reducirá los efectos secundarios causados por estos agentes en el resto de células. Una meta muy ambiciosa y de gran interés biomédico sería modificar las vaults para que solo se introdujesen en las células cancerosas, sin afectar a las células sanas. Para alcanzar este objetivo se requiere el desarrollo de estrategias que dirijan las vaults hacia las dianas. Se ha demostrado que cuando se añaden extensiones al extremo C-terminal de la MVP, las vaults recombinantes obtenidas presentan el péptido en una zona accesible en el exterior de la partícula, en la zona de las protuberancias apicales. Esta estrategia ha sido usada, por ejemplo, para dirigir vaults al receptor de superficie celular para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tanto directamente o como complejo con un anticuerpo que se una a la fracción externa del receptor (Figura 16; Kickhoefer et al., 2009). Estas dos estrategias pueden ser usadas para dirigir vaults recombinantes a receptores de la superficie celular, representando un paso de gigante hacia el desarrollo de las vaults como nanotransportadores para el envío de agentes terapéuticos.

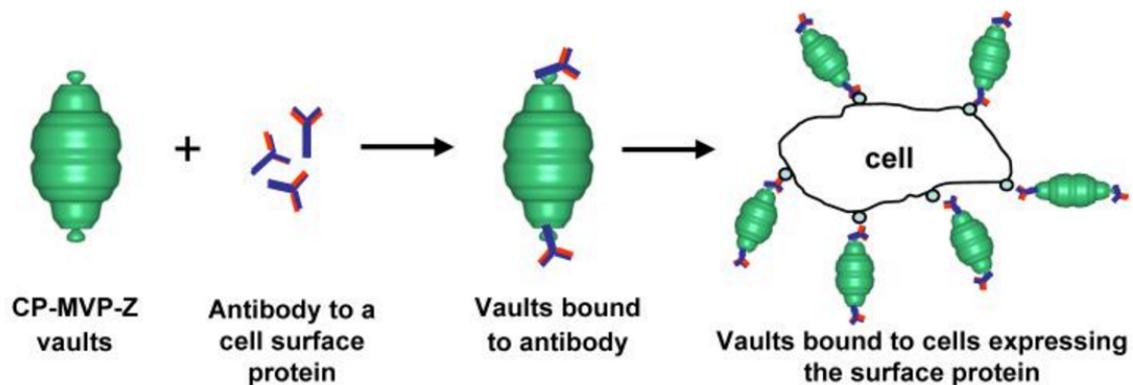


Figura 16. Modelo de mecanismo de *targetting* de vaults a células diana, donde las vaults solo se unirían a las células que presentasen en su superficie la proteína reconocida por el anticuerpo que se encuentra conjugado a la vault.

A la vista de todos estos resultados, no es sorprendente que hayan aparecido ya las primeras aplicaciones médicas de estas nanopartículas. Como por ejemplo, el uso de vaults recombinantes como plataforma para el envío de vacunas contra infecciones de las mucosas. En este caso fue la proteína de membrana *major outer* (MOMP) de *Chlamydia muridarum* la que fue encapsulada en el interior de las vaults, fusionándola al mINT. Al mismo tiempo las vaults recombinantes fueron ingenierizadas modificando su C-terminal para unirse mayoritariamente a los IgG, con el objetivo de aumentar la respuesta inmunológica. La inmunización por vaults produjo una respuesta inmune sin la inflamación normalmente asociada con adyuvantes (Champion et al., 2009). Otro ejemplo del uso de las vaults con fines terapéuticos fue el estudio en el que se utilizaron vaults con el fin de estimular al sistema inmune para luchar contra células cancerosas, enviando la quimiocina CCL21 a células tumorales cancerígenas de pulmón. Los estudios preclínicos en ratones con cáncer de pulmón mostraron que la administración de vaults, con CCL21 encapsulada, estimulaba el sistema inmune para reconocer y atacar las células cancerosas, inhibiendo el crecimiento del cáncer (Kar et al., 2011).

La capacidad de las vaults de separarse reversiblemente en dos mitades idénticas ha sido objeto de gran cantidad de estudios. La posibilidad de abrir y cerrar las vaults de una manera controlada sería de gran utilidad en su aplicación en nanobiotecnología. Hasta el momento se ha demostrado que la fusión de *crosslinkers* en los extremos N-terminales de la MVP aumentaba la estabilidad de las vaults recombinantes (Yu et al., 2008). En esta dirección, la dilucidación de los residuos claves que participan en las interacciones entre las dos mitades de las vaults, resultaría de gran utilidad para hacer combinaciones de vaults modificadas que presentan variabilidad en el mecanismo de apertura/cierre. Esto podría permitir una liberación mucho más gradual del fármaco durante un tiempo sustancial de tiempo.

1.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MECANICAS DE ENSAMBLADOS MACROMOLECULARES

Las propiedades mecánicas de los grandes ensamblados macromoleculares se han venido estudiando desde hace tiempo, primero mediante modelos teóricos muy simplificados y, más adelante, se comenzaron a analizar experimentalmente. Al principio, las técnicas usadas para estudiar las propiedades mecánicas se basaban en

experimentos en los que se mide la misma propiedad en muchas moléculas al mismo tiempo, de tal manera que lo que se obtiene es un valor promedio. Más recientemente, el desarrollo de técnicas y métodos ha posibilitado el diseño de experimentos donde se miden estas propiedades en moléculas individuales. Entre estas técnicas encontramos: las pinzas ópticas (Ashkin y Dziedzic, 1987), las pinzas magnéticas (Gosse y Croquete, 2002) y el microscopio de fuerza atómica o AFM (por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*; Binnig et al., 1986).

1.3.1. PROPIEDADES MECANICAS DE VIRUS

Las propiedades mecánicas de algunos complejos macromoleculares son esenciales para que lleven a cabo su función. En esa dirección, fuerzas en la escala nano juegan un papel importantísimo en la bioquímica; como ejemplos, está el sistema de la miosina-actina (Shiroguchi y Kinosita, 2007), el cual es responsable del movimiento muscular o los motores moleculares presentes en células y virus (Moreno-Herrero et al., 2005).

El estudio de las propiedades mecánicas de los virus nos permite entender algunos aspectos de sus funciones y capacidades. Entre estas está su capacidad para sobreponerse a una variedad de agresiones físico-químicas fuera de la célula, incluyendo temperaturas elevadas, cambios de pH, irradiación desde fuentes diversas o deshidratación parcial (Chiu et al, 1997; Moody, 1999, Hernando et al., 2000; Prigent et al., 2005). Durante el estadio extracelular del ciclo infectivo del virus, la cápside viral puede ser considerada como un envase (Moody, 1999) que protege el genoma viral de las condiciones físico-químicas externas. Por otro lado, la necesidad de desencapsidar el DNA durante la infección de la célula huésped, ha originado la generación de cápsides metaestables, es decir, complejos biológicos que presentan cierto dinamismo conformacional. Propiedades mecánicas tales como la elasticidad y la fuerza de tensión están entre las propiedades materiales de un objeto sólido, incluyendo a las partículas víricas. El estudio de las propiedades mecánicas de los virus y sus implicaciones biológicas tiene esencialmente dos objetivos: la comprensión del funcionamiento de los virus como recipientes biológicos y el diseño de partículas virales con unas propiedades mecánicas óptimas para ser usadas con un fin concreto, dentro del campo de la nanotecnología y la biomedicina.

Los primeros estudios llevados a cabo con estos fines, fueron los realizados sobre el bacteriófago $\Phi 29$. Por un lado, se estudiaron las fuerzas que intervienen en el empaquetamiento de su genoma (Smith et al., 2001; Hugel et al., 2007; Yu et al., 2010). Para ello, usando pinzas ópticas se midió la presión ejercida por el DNA viral, fuertemente condensado, sobre las paredes de la cápside (Smith et al., 2001). Por otro lado, fue el primer virus donde se estudió la rigidez mecánica usando AFM, llevando a cabo la determinación de la constante elástica del fago mediante nanoindentaciones (Ivanovska et al., 2004). Estos experimentos fueron repetidos posteriormente en otros virus, con el fin determinar las propiedades mecánicas de diferentes cápsides virales. El virus MVM (Carrasco et al, 2006 y 2008), el fago λ (Ivanovska et al., 2007), CCMV (Miche et al, 2006) y el virus de la hepatitis B (Arkhipov et al., 2009) son algunos ejemplos de virus estudiados mediante AFM. Estos estudios revelaron que algunos conceptos mecánicos fundamentales pueden ser aplicados a todas las cápsides en general. Sin embargo, también se extrajo que las cápsides virales pueden variar significativamente en algunas características mecánicas. La comparación de las propiedades mecánicas de diferentes virus ayuda a la comprensión sobre los fundamentos estructurales que rigen estas propiedades mecánicas y su posible papel en la biología de estos virus.

Las propiedades mecánicas de las partículas virales dependen de varios factores: interacciones entre subunidades (Arkhipov et al., 2009), mecanismo de ensamblaje (Roos et al., 2007), así como del estado de maduración de la partícula viral (Kol et al., 2006). La comparación de las estructuras moleculares de distintas cápsides, revela información sobre la variación en sus propiedades mecánicas; el tamaño, espesor, así como el número, tamaño, forma y geometría de las subunidades de las que están hechas, afectan a las mismas. Una cápside más ancha será más difícil de deformar por la punta del AFM que una más fina, hecha del mismo material. Así como una esfera hueca pequeña será más difícil de deformar que una esfera del mismo espesor pero más grande. La medida de la rigidez de una cápside de un virus u otro objeto sólido, se representa mediante la constante de elasticidad, y depende no solo del material del que está hecha, sino también de sus dimensiones y geometría.

1.3.2. PROPIEDADES MECANICAS EN APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS

El interés en el uso de las partículas virales para aplicaciones nanotecnológicas y biotecnológicas está creciendo (Mateu, 2011). Las características de estos grandes ensamblados macromoleculares, capaces de autoensamblarse y de encapsular y transportar contenidos de diversa naturaleza, los hacen muy atractivos para tales fines. Sin embargo, es fácil imaginar que para una gran parte de esas aplicaciones, las partículas virales naturales no son lo suficientemente resistentes. Las nanopartículas en interés pueden estar sujetas a procesos de estrés mecánico durante la purificación, fabricación, almacenamiento, etc. Su utilización, una vez llevadas a cabo las modificaciones necesarias mediante ingeniería genética, tendrá múltiples aplicaciones en nanobiotecnología. Es importante remarcar, como se ha mencionado arriba, que las partículas virales son metaestables y sufren cambios conformacionales durante su ciclo biológico. Esta inestabilidad conformacional podría ser útil para algunas aplicaciones (terapias celulares). Dentro de sus posibles aplicaciones estarían su uso como vehículo para el envío y liberación controlada de fármacos, genes o proteínas; agente de contraste en técnicas de imagen en medicina, creación de materiales estructurados, dispositivos electrónicos y magnéticos,... (Mateu, 2011).

La manipulación física, química y/o genética de partículas virales, generalmente llevada a cabo para investigar las bases estructurales o la relevancia biológica de las características mecánicas, ha conducido a la desestabilización mecánica de las cápsides manipuladas. Se han obtenido partículas más elásticas por el truncado de algunos dominios proteicos (Baclayon et al., 2011; Kol et al., 2007), la eliminación de capsómeros (Roos et al., 2009), eliminación o reducción de moléculas de ácidos nucleicos (Ivanovska et al., 2007), neutralización de la carga del DNA (Evilevitch et al. 2011) o eliminación de interacciones entre la cápside y los ácidos nucleicos. Sin embargo, pensando en la aplicación nanotecnológica de los virus, conseguir un aumento de la estabilización de las partículas puede resultar más útil. Se han llevado a cabo varios estudios en esta dirección. Por ejemplo, se encontró que durante la maduración del fago λ , la proteína gpD se une a la cápside, actuando como un cemento que estabiliza la partícula (Lander et al., 2008). Otro ejemplo se encuentra en el CCMV, donde la sustitución de un único aminoácido, producido de manera natural en una variante de este virus, le confiere resistencia en situaciones de alta concentración de sal

y también aumenta su rigidez (Michel et al., 2006). El uso de las evidencias biológicas y biofísicas con el fin de aumentar la resistencia de las partículas virales mediante la ingeniería de proteínas es una estrategia que ya se está desarrollando. Por ejemplo, la sustitución de algunos aminoácidos de la cápside de MVM que disminuían su dinamismo conformacional, se predijo que aumentaría su rigidez mecánica. Además, la sustitución de aminoácidos alrededor de las cavidades, los cuales modificaban el tamaño y forma de las mismas, dieron lugar a un incremento en la rigidez mecánica de la cápside de MVM. Estos estudios son solo ejemplos de la significativa estabilización mecánica de cápsides virales llevada a cabo por la ingeniería de proteínas.

1.4. PROTEINA ASOCIADA A TELOMERASA-1

La proteína asociada a telomerase-1 (TEP1 por sus siglas en inglés: *telomerase associated protein-1*) fue descrita por primera vez como un homólogo de la proteína p80 de *Tetrahymena*, uno de los dos componentes proteicos de la telomerasa de *Tetrahymena*, en el año 1997 (Harrington, 1997). El cDNA que codificaba para este homólogo de la p80 se identificó de las secuencias obtenidas de un tejido de colon de ratón: la secuencia tenía 8160 nucleótidos y contenía un único marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés: *open reading frame*) de 2629 aminoácidos. Debido a su homología con la p80, se le denominó como TEP1. Se utilizó esta secuencia para identificar el gen de esta proteína en humanos, a partir de una librería hecha de una línea celular de carcinoma de colon humano. Los ORFs de ratón y humanos poseen una identidad de secuencia del 75%.

Posteriormente, Bateman y Kickhoefer (2001) identificaron mediante análisis *in silico*, un dominio TROVE dentro de la TEP1, definido como un módulo ribonucleoproteico presente tanto en la p80 de *Tetrahymena*, en la TEP1 y en la proteína Ro60, componente del complejo ribonucleoproteico Ro (Figura 17). Además del dominio TROVE, la región de la TEP1 homóloga con la p80 contiene una secuencia correspondiente a un dominio von Willebrand/integrina A (vWA), la cual también está presente en el gen de la vPARP, el otro componente minoritario de las vaults.

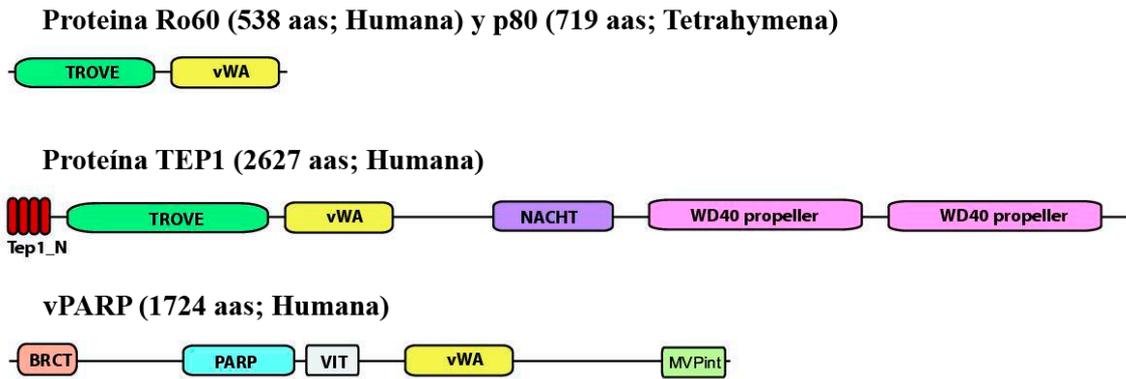


Figura 17. Representación esquemática de las proteínas que contienen dominios TROVE (adaptada de Bateman y Kickhoefer, 2001)

La estructura cristalográfica del dominio TROVE ha sido resuelto en la proteína Ro de *Xenopus laevis* (Stein et al, 2005) y en la proteína Rsr de *Deinococcus radiodurans* (Figura 18; Ramesh et al., 2007) a una resolución de 1.9 Å. Es un dominio con forma elíptica, formado por varias repeticiones de una pareja de hélices- α antiparalelas denominadas repeticiones HEAT (Andrade y Bork, 1995). El dominio TROVE se describió como el dominio de unión a RNA de esta proteína. Este dominio fue cristalizado junto con el dominio vWA de la misma proteína, formado por un sándwich de láminas- β con múltiples hélices- α . Este último presenta un lugar de unión a un ion calcio MIDAS, denominado así por sus siglas en ingles *metal ion-dependent adhesión site* (Whittaker y Hynes, 2002).

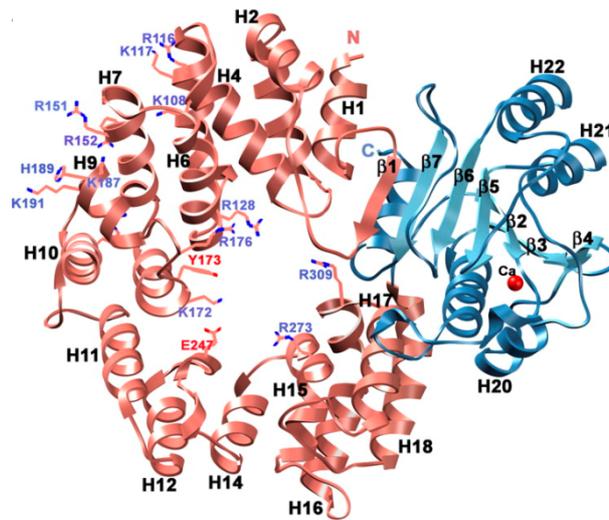


Figura 18. Estructura global de la proteína Rsr de *D. radiodurans*. Esta proteína está compuesta de dos dominios: el dominio TROVE en color rosa consistente de 18 hélices- α y el dominio vWA en color azul formado por un sándwich de seis laminas- β , localizadas entre cuatro hélices- α . El ion de calcio localizado en este último aparece en color rojo (Ramesh et al., 2007).

Aparte de los dos dominios mencionados arriba, se ha descrito un dominio NTPase (NATCH en la figura 17) localizado a partir del aminoácido 1179 de la secuencia de la TEP1 de ratón. También hay presente una secuencia de 30 aminoácidos, la cual se repite cuatro veces en el extremo N-terminal de TEP1 (Tep1_N en la figura 17). En el último tercio de la secuencia de la proteína se encontraron 16 dominios WD40 (marcados como dos WD40 *propeller* en la figura 17), conocidos por formar en muchos casos estructuras en forma de hélice compuestas por varios de ellos. Estas estructuras representan una posible plataforma para la unión reversible y el ensamblado de complejos multiproteicos, como por ejemplo histonas (Saganuma et al., 2008).

Con el objetivo de determinar la distribución en los diferentes tejidos de la TEP1 (transcritos), se llevaron a cabo experimentos de *northern blot* (RNA) de diferentes tejidos de ratones adultos. Se detectó un RNA de en torno a 8 kb en varios de los tejidos analizados, utilizando un RNA de TEP1 de ratón como sonda. El mismo estudio realizado en células humanas también presentó una amplia expresión del mRNA de TEP1 (Harrington et al., 1997).

INTRODUCCION

En este mismo artículo se llevaron a cabo experimento de triple – híbrido en levaduras para determinar si la TEP1 interaccionaba con el RNA de telomerase (telRNA). Los ensayos de triple – híbrido en levaduras son una versión de los ensayos de doble - híbrido en el cual el RNA de interés es fusionado a una secuencia horquilla del fago MS2, usado para activar la transcripción a través de la interacción con la proteína de la envuelta del MS2 (Sengupta et al. 1996). El extremo N-terminal de la TEP1 de ratón, que como se comentó arriba contiene la región homologa con la p80 de *Tetrahymena*, fue la región utilizada para el ensayo, cuyos resultados confirmaron que sí interacciona con el telRNA de ratón. También se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación, los cuales mostraron que la TEP1 se encuentra asociado con la actividad telomerasa *in vivo*, sugiriendo, por tanto, que la TEP1 estaría asociada con el complejo telomerase *in vivo*.

Después de describir la relación entre la TEP1 y la telomerasa, Weinruch et al. estudiaron el papel desempeñado por esta proteína en el complejo ribonucleoproteico, concluyendo que esta proteína no es necesaria para la correcta actividad del complejo telomerasa. También se describió que, aunque si se asociaba con la telomerasa, no es un componente del núcleo del mismo (Weinrich 1997).

En el año 1999, Kickhoefer et al. identificaron una banda de alto peso molecular (en torno a 250 kDa) que aparecía en los geles de SDS-PAGE de las purificaciones de vaults endógenas. Llevaron a cabo un análisis de secuencia de esa banda, identificando a esa proteína como la TEP1 (Kickhoefer et al., 1999). Con el fin de saber si esta proteína se unía realmente a la vault o solo se estaba copurificando, se llevaron a cabo experimentos de inmunomarcaje, confirmando que la TEP1 formaba parte de esta partícula, describiendo a partir de ese momento un componente común entre la vault y el complejo telomerasa. Se llevó a cabo un ensayo de triple – híbrido en levaduras similar al realizado por Harrington et al. (1997) para comprobar si la TEP1 unía también el vRNA, demostrando una interacción entre ambos.

Liu et al (2000) llevaron a cabo el *knockdown* del mRNA que codifica para la TEP1 mediante recombinación homóloga en ratones. Los ratones TEP1 (-/-) eran viables y fueron capaces de reproducirse durante siete generaciones consecutivas sin mostrar anormalidades fenotípicas obvias. Por otro lado, todos los tejidos analizados de los ratones TEP1 (-/-) poseían niveles de actividad telomerasa comparables a las de los

ratones nativos. Por otro lado, el análisis de varios tejidos de los ratones TEP1 deficientes, que normalmente carecían de actividad telomerasa, reveló que no se producía una reactivación de la misma. Por último, se vio que la longitud de los telómeros de estos era comparable a la de los ratones nativos, incluso en las últimas generaciones (Liu et al., 2000), confirmando que la actividad telomerasa no se veía afectada. Otros estudios llevados a cabo por Kickhoefer et al. en el año 2001 sobre los ratones TEP1 (-/-) no mostraron diferencias ni en los niveles del telRNA ni tampoco en su asociación con el complejo telomerasa comparándolos con ratones nativos. Todos estos resultados en conjunto conducen a la idea de que si bien la TEP1 se asocia con el complejo telomerasa, la actividad del mismo no se ve alterada en ausencia de esta proteína.

Aunque las vaults purificadas del hígado de ratones TEP1 (-/-) parecían estructuralmente intactas, la comparación de las reconstrucciones 3D obtenidas por criomicroscopía electrónica para esta y las nativas tratadas con RNAsa reveló una disminución en la densidad de la región del *cap* (Figura 19; Kickhoefer et al., 2001). En este mismo trabajo se observó que la ausencia de TEP1 produce vaults incapaces de unir vRNA, afectando también a los niveles y estabilidad del mismo. Para medir la disminución en la estabilidad del vRNA se tuvo en cuenta la disminución de la vida media del mismo en varios tejidos. Estos datos sugieren que la TEP1 es indispensable para la unión del vRNA a la partícula vault y que la asociación entre vRNA con TEP1 y/o vault parece afectar a la estabilidad del vRNA.

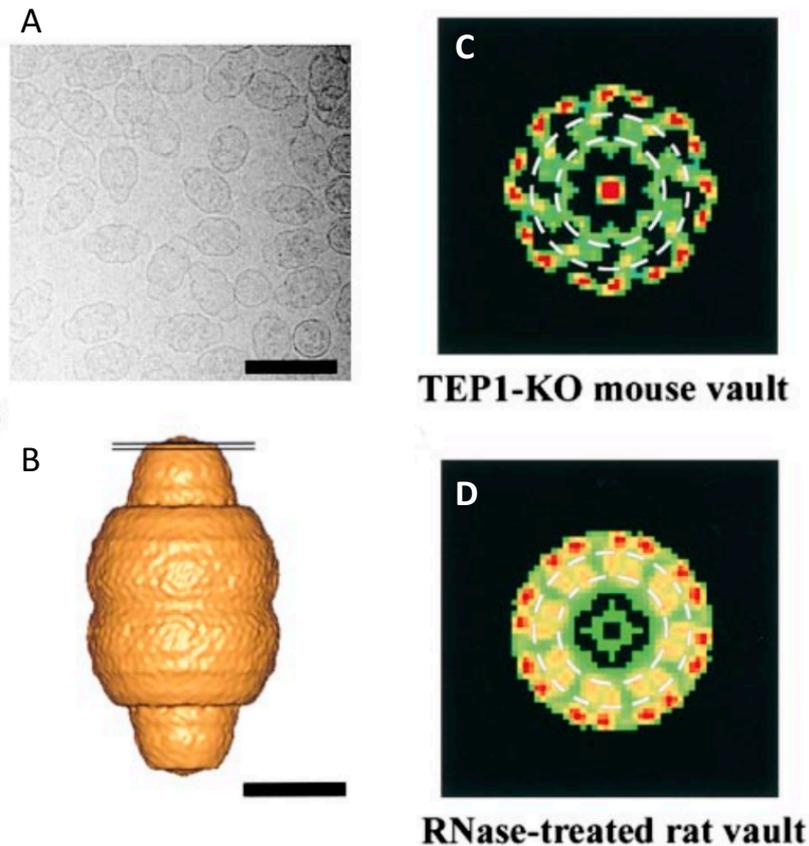


Figura 19. Reconstrucción de criomicroscopía electrónica de vaults purificadas de ratón TEP1 (-/-). (A) Micrografía de vaults. (B) Representación en superficie de una reconstrucción de las vaults a una resolución 27 Å. Las dos líneas negras indican la posición de la sección de densidad mostrado en la figura C y D. (C) Proyección 2D de la sección de densidad de la zona superior del *cap* de las vaults purificadas de ratones TEP1 (-/-). (D) Sección de densidad correspondiente para la reconstrucción de las vaults tratadas con RNAsa (Kong et al., 2000). Barras: (A) 1,000 Å; (B) 250 Å (Kickhoefer et al., 2001)

Se llevaron a cabo estudios para determinar si la TEP1 unía simultáneamente o no el vRNA y el telRNA (Poderycki et al., 2005). En estos se determinó primero, mediante un ensayo de triple-hibrido en levaduras, cuál era la región más pequeña necesaria para que la proteína se asociara a los distintos RNAs, concluyendo, que se necesitaba que estuviera presente toda la región homóloga a la p80 de la proteína. Mediante ensayos de cambio en el movimiento electroforético del RNA (EMSA por sus siglas en inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assays*), usando un constructo de la TEP1 que contuviera la región de interacción a RNA (TEP1-RBD) del aminoácido 1 al 871, se observó que este era capaz de unir RNA por si solo y que, como en el caso de p80, lo hace de manera inespecífica. Sin embargo, los estudios *in vitro* mostraron que, aunque el telRNA se

unía al TEP1-RBD, en el caso del vRNA se unía débilmente a este constructo. Cuando se llevaron a cabo mutaciones en el vRNA con el fin de romper las interacciones del bucle central, este era capaz de interactuar más fuertemente con el TEP1-RBD, sugiriendo que harían falta otros factores para que se establezca esta asociación de manera eficaz. Los resultados de los experimentos de competición indican que probablemente solo hay un lugar de unión a RNA, ya que vRNA y telRNA no son capaces de unirse al mismo tiempo al TEP1-RBD. En este mismo trabajo se llevó a cabo la purificación de vaults recombinantes obtenidas de la coinfección con los baculovirus de MVP y de un conjunto de constructos de TEP1, demostrando que la misma región de TEP1 homóloga a p80, que era la involucrada en la interacción con el RNA, también contiene el dominio de interacción con la pared interna de la vault.

Para localizar la proteína TEP1 dentro de las vaults con más exactitud de lo descrito en la estructura de arriba (los ratones TEP1 (-/-) presentaban menos densidad en la región superior del cap), se hicieron mapas de diferencia entre las reconstrucciones de criomicroscopía electrónica de vaults endógenas de rata y las vaults purificadas de ratones TEP1 (-/-), así como entre los de vaults recombinantes en las que se expresaba todos los componentes de la vault (MVP, TEP1 y VPARP) y otras en las que se expresaba todo lo anterior menos la TEP1 (Mickyas et al., 2004). En los mapas de diferencia correspondientes, se mostraba una densidad en la parte de arriba del *cap* de la vault (mapas no disponibles en el artículo), por lo tanto se sugirió asignar esta densidad a la TEP1, como ya había sido propuesto en estudios estructurales anteriores realizados sobre esta partícula (Kickhoefer, V. A. et al., 2001; Kong et al., 2000). También se observó una densidad difusa en la parte interior del *cap*, alcanzando la zona del barril que podría atribuirse a esta proteína (resultados no mostrados en el artículo). Esta densidad fue observada tanto en las vaults endógenas de rata como en las de ratón (nativas). Con el objetivo de estimar el volumen de la TEP1, se llevó a cabo una aproximación teniendo en cuenta las estructuras conocidas para los diferentes dominios de plegamiento definidos: TROVE, vWA, NACHT y 16 WD40. Poniendo todos los modelos de plegamiento descritos arriba en la misma escala que el modelo de la vault, describieron que la TEP1 necesitaría un hueco similar al del interior del cap, introduciéndose posiblemente en la cavidad central del barril.

Por último, resulta interesante remarcar los resultados obtenidos por Liu et al. en 2004, el cual estudió la relación existente entre la vPARP, el otro componente minoritario de las vaults, y el complejo telomerasa. Estos mostraron que la vPARP estaba asociado con la actividad telomerasa e interaccionaba con la TEP1 expresada de manera exógena en células humanas (Liu et al., 2004).

1.5. CRIOMICROSCOPIA

Las macromoléculas biológicas adoptan complicadas estructuras tridimensionales que son cruciales para su función. Algunas macromoléculas, como las enzimas, actúan por si solas generando un ambiente químico que favorece la catálisis de reacciones químicas específicas. Otras macromoléculas forman grandes complejos con otras proteínas, ácidos nucleicos, lípidos o azúcares. Muchos complejos llevan a cabo funciones a través de movimientos de dominios individuales de su estructura. Una meta muy ambiciosa de la biología molecular sería entender como estas estructuras llevan a cabo sus funciones. Debido a la reciente “revolución” ocurrida dentro del campo de la criomicroscopía electrónica, se hace una pequeña introducción de la técnica que será utilizada para estudiar la estructura de la TEP1.

Los complejos macromoleculares son demasiado pequeños para ser vistos con luz visible. Los fotones con longitudes lo suficientemente cortas para visualizar a nivel atómico se encuentran en la región de los rayos-X del espectro electromagnético. Los rayos-X interaccionan débilmente con la materia biológica, lo que hace difícil usarlos para estudiar complejos proteicos individuales. Pero cuando muchas copias de la misma proteína están ordenadas en un cristal tridimensional, se puede obtener información sobre la estructura atómica de la proteína a partir de experimentos de difracción de rayos-X. La difracción de rayos-X, ha sido la herramienta más importante de la biología estructural durante las últimas décadas. Otra técnica que se ha usado en la caracterización estructural de proteínas es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), la cual mide interacciones en función de la distancia entre átomos. La NMR puede ser usada para conocer la estructura de proteínas relativamente pequeñas, además de ofrecer información sobre la dinámica de las proteínas y sus interacciones con otras moléculas.

Los electrones pueden ser utilizados para ver las estructuras de las proteínas. Las proteínas dispersan los electrones 10000 veces más fuerte que los rayos-X, aparte de que estos pueden ser acelerados por campos eléctricos de varios cientos de miles de voltios, alcanzando longitudes de onda que son mucho más cortas que las distancia existente entre los átomos de las proteínas. Además de todo esto, la carga eléctrica de los electrones permite enfocarlos de forma relativamente fácil usando lentes electromagnéticas. Por lo tanto, pueden construirse microscopios electrónicos para obtener imágenes con detalle a nivel atómico. La contribución de la microscopia electrónica a la biología estructural de alta y media resolución ha sido modesta en el pasado, en comparación con la cristalografía de rayos-X y la NMR, pero esto ha cambiado radicalmente en los últimos años. El rápido progreso en la determinación estructural de proteínas usando imágenes de microscopia electrónica en los últimos años se ha definido como el comienzo de una revolución en la biología estructural.

1.5.1. DESARROLLO DE LA CRYO-EM

Los grandes ensamblados moleculares y complejos que contienen oligonucleótidos dan imágenes con relaciones de señal-ruido más altas. La presencia de simetría interna en un complejo también ayuda a mejorar la resolución. Esto explica porque las estructuras de ribosomas y virus icosaédricos han estado al frente del campo de la cryo-EM. En el año 2008, las estructuras de varios virus fueron resueltas a una resolución casi atómica a partir de imágenes de cryo-EM (Jiang et al. 2008; Yu et al., 2008; Zhang et al., 2008). Las estructuras de ribosomas también consiguieron resolverse hasta una resolución de 6 Å (Villa et al., 2009; Seidelt et al., 2009). Estos resultados se obtuvieron como resultado del desarrollo en instrumentación, técnicas y procesado de imágenes llevado a cabo durante los últimos 40 años (Vinothkumar y Henderson, 2016).

Sin embargo, la calidad de las estructuras de cryo-EM de proteínas no respaldaba los datos teóricos, los cuales predecían que la determinación estructural sería posible a resolución atómica para complejos de proteínas con pesos moleculares por debajo de los 100 kDa (Henderson, R. 1995). La diferencia podría explicarse debido a la baja detección de los electrones. Las imágenes eran originalmente recogidas en películas fotográficas, pero al principio del siglo XXI, el desarrollo de las cámaras con un dispositivo digital de carga-acoplada (CCD por sus siglas en ingles *charge-coupled*

device) abrió el camino para la recogida automática de imágenes (Potter et al., 1999). Las películas fotográficas detectan solo una parte de los electrones que le llegaban y las CCDs aún eran menos eficiente, debido a la conversión de los mismos a fotones. El bajo número de electrones que se usa en los experimentos para limitar el daño por radiación produce imágenes demasiado ruidosas que dificultan la correcta determinación de la orientación relativa de las partículas.

En el año 2012, tres compañías produjeron los primeros prototipos de una nueva generación de detectores directos de electrones. Los chips eran lo suficientemente resistentes para aguantar el daño producido por el impacto directo de la radiación, siendo capaces de detectar de manera directa los electrones, lo que mejoraba la eficiencia de detección (McMullan et al., 2014). Toda la tecnología que hay alrededor de estos detectores directos de electrones facilitó la captura rápida de imágenes. También permitió resolver un problema asociado a la toma de imágenes de muestras hidratadas y congeladas, donde la energía liberada por los electrones que la atraviesan, causan movimiento dentro de la capa de hielo (*blurring*) desdibujando las imágenes obtenidas. Las películas (se recogen varias imágenes por campo) grabadas durante la exposición de la muestra a los electrones, podían ser procesadas eficientemente para eliminar el efecto de *blurring* (Campbell et al., 2012), y utilizar esta corrección (*beam-induced motion*) para mejorar la resolución de las estructuras hasta alcanzar unos valores sin precedentes hasta ese momento (Bai et al., 2013).

Muchas máquinas macromoleculares adoptan un rango de conformaciones en solución y la purificación de estas proteínas casi nunca es perfecta. Esto significa que las muestras preparadas para cryo-EM normalmente contienen una variedad de estructuras. Cuando estas muestras son analizadas mediante *single-particle*, las proyecciones 2D de cada una de las estructuras 3D tiene que ser separado y clasificado. Una primera solución general al problema de la mezcla fue dado por los algoritmos de clasificación 3D de *maximum-likelihood* (Scheres, 2006). Estos métodos son más robustos al ruido de los que se utilizaban antes, debido a que ellos incorporan una descripción estadística de los datos. De esta manera, la presencia de numerosas estructuras en las muestras de cryo-EM, permitiría obtener información muy valiosa sobre la dinámica de la proteína en un solo experimento (Clare et al, 2012).

Cuando los detectores directos de electrones llegaron al mercado en el año 2013, el campo de la cryo-EM se fue encaminando hacia una revolución. La gran calidad de las imágenes obtenidas permitió asignar orientaciones a la gran parte de la población de partículas. La capacidad para separar partículas en distintas conformaciones estructurales mejoró todavía más: la extensión de los métodos de *maximum-likelihood* en aproximaciones bayesianas hizo el procesado de imágenes más accesible a no-expertos, debido a que algunos parámetros cruciales no necesitaban ser elegidos, eran estimados directamente de los datos (Scheres, 2012). Además, la automatización en la recogida de imágenes que fue desarrollada originalmente para las CCDs, facilitó recoger grandes conjuntos de datos, de los cuales podían seleccionarse las mejores mediante la clasificación de las mismas. Como resultado, en los últimos cuatro años muchos grupos han resuelto estructuras por cryo-EM de una gran variedad de muestras, incluyendo complejos de menos de 200 kDa (Bai et al, 2015) y alcanzando límites de resolución por debajo de 3 Å (Bartesaghi et al. 2015).

1.5.2. NUEVAS ESTRUCTURAS RESUELTAS POR CRYO-EM

Los avances metodológicos de la cryo-EM han permitido la resolución de muchas proteínas de membrana. Tales proteínas son difíciles de purificar en solución, debido a que sus dominios intermembrana altamente hidrofóbicos deben ser estabilizados utilizando detergentes. Los detergentes hacen el proceso de cristalización muy difícil. Por estas razones, las proteínas de membrana son una meta muy ambiciosa dentro de la biología estructural. Esto ha sido un problema importante, ya que aproximadamente la mitad de los fármacos conocidos se unen a este tipo de proteínas. Sin embargo, la determinación de la estructura a través de cryo-EM no requiere de la cristalización de la proteína. Es posible obtener imágenes de las proteínas de membrana solubilizadas con detergentes (Althoff et al., 2011) o estabilizadas en un ambiente lipídico usando nanodiscos (Bayburt y Sligar, 2009). De las primeras estructuras resultas de una proteína de membrana usando cryo-EM fue la TRPV1 (Figura 20; Liao et al., 2013). Esta proteína es responsable de la sensación de picante que producen los chiles y es una importante diana para fármacos paliativos del dolor. Su estructura fue resuelta solubilizada en *amphipols*. Después de que esta estructura fuera resuelta, la estructura de muchos otros canales iónicos medicamente relevantes fue publicada, incluyendo el

INTRODUCCION

canal de calcio dependiente de voltaje $Ca_v1.1$ (Wu et al. 2015), un canal de sodio-potasio (Hite et al., 2015) y el receptor de glicina (Du et al., 2015).

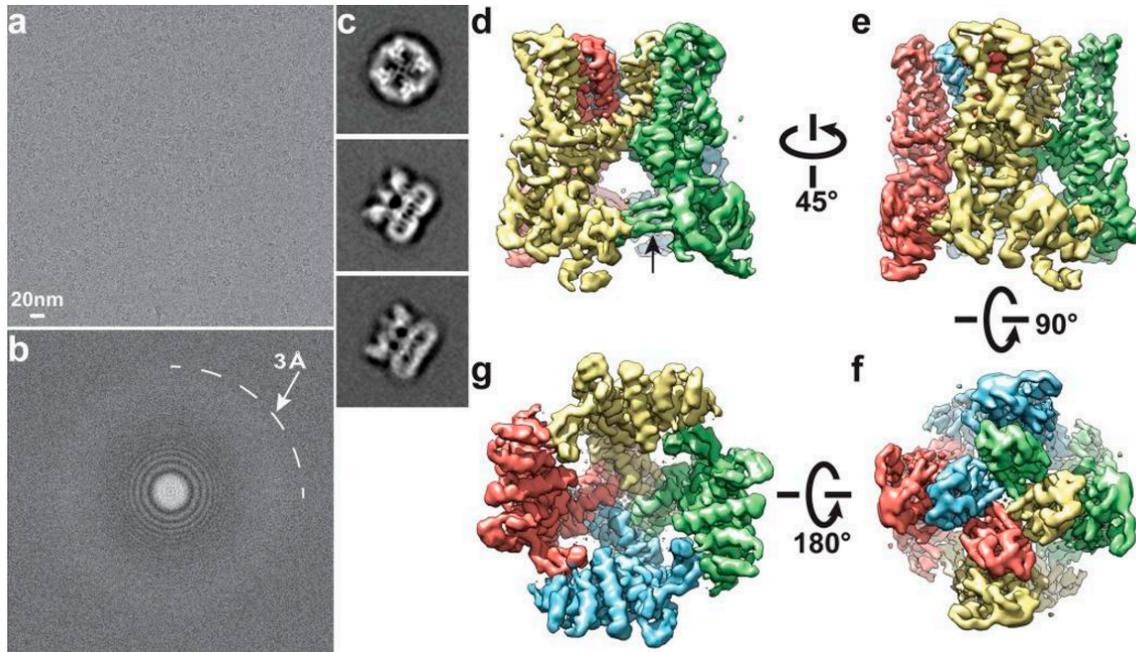


Figura 20. Estructura de la TRPV1 (a) Micrografía de la proteína TRPV1 embebida en una fina capa de hielo amorfo tomada a un desenfoque de $1.7 \mu\text{m}$. (b) Transformada de Fourier de la micrografía mostrada en la figura a, con anillos Thon hasta 3 \AA . (c) Vistas de algunas clases 2D representativas de las partículas. (d-g) Mapas de densidad de la proteína TRPV1 filtrados a una resolución de 3.4 \AA .

Otra ventaja de la cryo-EM es que las regiones flexibles de las proteínas no impiden la determinación de la estructura de la misma. Para facilitar la cristalización de proteínas, los loops flexibles o azúcares eran eliminados usando complicadas estrategias de ingeniería de proteínas (Baker, 2010). Sin embargo, una proteína glicosilada o que presente regiones flexibles puede ser resuelta usando cryo-EM de manera nativa. Por ejemplo, la estructura del complejo humano de secretasa- γ fue resuelto, a pesar de contener al menos once cadenas de azúcares y un gran *loop* desordenado (Bai et al., 2015). Esta proteasa embebida en una membrana, genera los péptidos de amiloide- β que agregan en el cerebro de la gente enferma de Alzheimer. Esta proteína con una masa de unos 130kDa , es una de las proteínas más pequeña determinada por cryo-EM a una resolución por debajo de 3.5 \AA .

Los complejos proteicos purificados de fuentes nativas pueden ser también muestras perfectas para la resolución estructural mediante cryo-EM. El problema de estas muestras es que se obtienen en cantidades muy pequeñas, pero en realidad, solo hacen falta unos microgramos de proteína para hacer unas rejillas. Consecuentemente, las estructuras de varios grandes complejos de proteínas de membrana, que se habían resistido a cristalizar por la dificultad en su purificación en grandes cantidades han sido determinados mediante cryo-EM, incluyendo el receptor de rianodina (Efremov et al., 2015), complejo I de mamíferos (Vinothkumar et al, 2014), supercomplejo de fotosistema-II (PSII-LHCII; Wei et al. 2016) y la ATP sintetasa (Zhao et al., 2015).

La posibilidad de caracterizar grandes complejos estructurales purificados de fuentes nativas ha tenido un gran impacto también en la caracterización de complejos macromoleculares solubles. En los últimos tres años han sido determinadas más de veinte estructuras a alta resolución del ribosoma, lo que ha suministrado una gran cantidad de información sobre la biosíntesis de proteínas. Otras máquinas macromoleculares que también han podido ser determinadas estructuralmente han sido, entre otras, el inflamosoma (Zhang et al. 2015), el exosoma (Liu et al. 2016.), el proteosoma 26s (Schweitzer et al. 2016) y el complejo dineína-dinactina (Chowdhury et al, 2015) entre otros. Todos los citados arriba presentan distintas conformaciones, ya sea reorganizando sus subunidades o bien uniendo varios *partners* o sustratos durante su proceso de ensamblado o función. La cryo-EM permite el estudio de estas conformaciones temporales, las cuales son difíciles de aislar bioquímicamente.

En casi todos estos estudios, el proceso de clasificación de imágenes ha jugado un papel crucial en la selección de subconjuntos de partículas estructuralmente homogéneos para su determinación estructural (Figura 21). Para muchas estructuras, solo una pequeña fracción de las partículas del *dataset* inicial es seleccionada para su uso en el cálculo de un mapa final.. Además, como se ha explicado arriba, las maquinas macromoleculares sufren movimientos de algunas de sus partes para llevar a cabo sus funciones. Los nuevos algoritmos de clasificación de partículas ofrecen la oportunidad de clasificar y estudiar la libertad conformacional presente en estos complejos en un solo experimento. Un ejemplo es la ATP sintetasa embebida en una membrana, la cual actúa como una turbina molecular, convirtiendo un flujo de protones en un movimiento de rotación usado para sintetizar moléculas de ATP. El proceso de clasificación de imágenes revelo la presencia de tres estados rotacionales distintos en un único *dataset* de cryo-EM.

INTRODUCCION

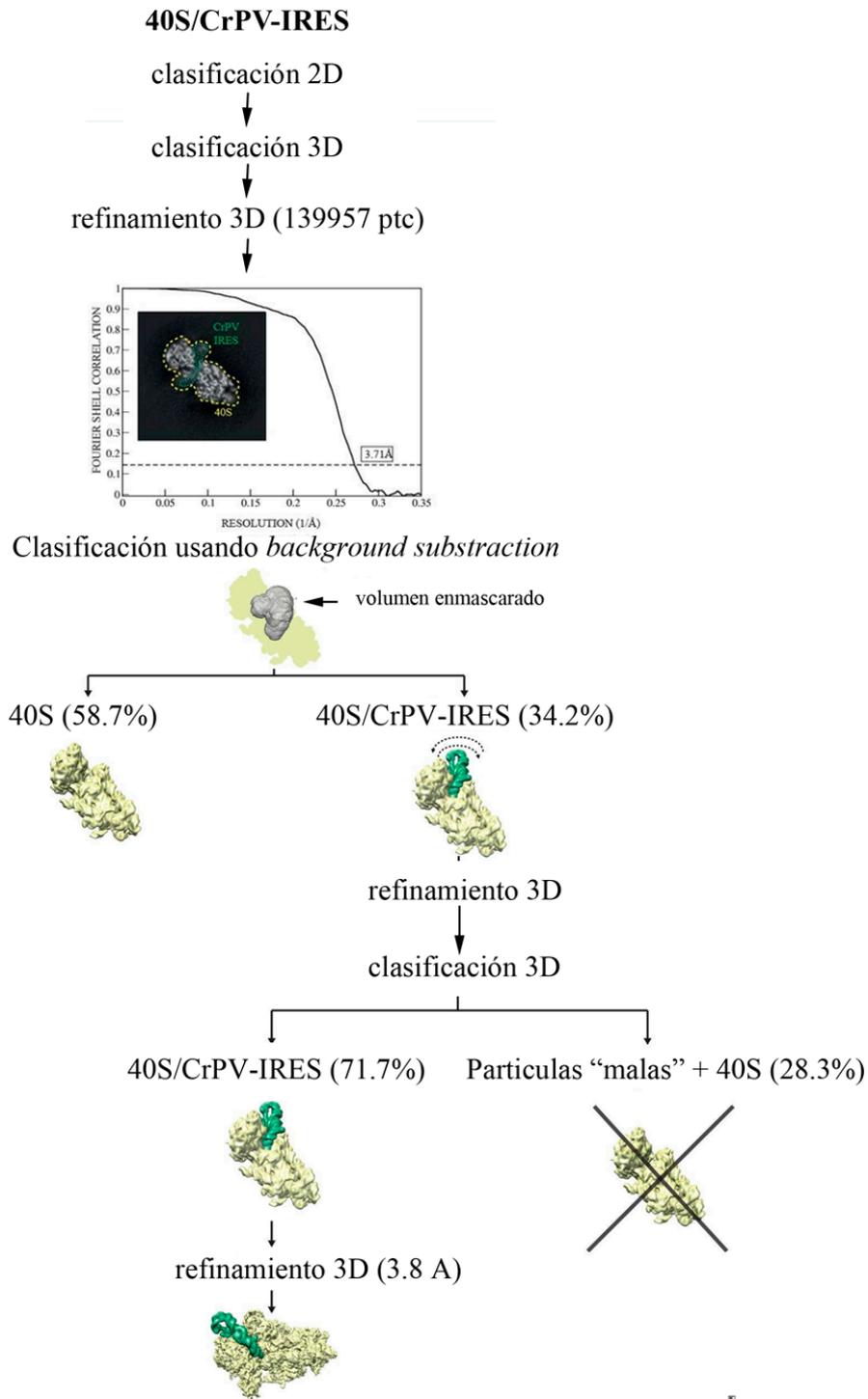


Figura 21. Ejemplo de flujo de trabajo de procesamiento de cryo-EM para el CrPV-IRES/40S (Sánchez et al. 2016)

2. OBJETIVOS

Estudiar el efecto de las mutaciones N170A y L172W en las propiedades mecánicas y estructura de la cápside del MVM:

- Comparar los efectos en la rigidez mecánica local y global de las partículas mutantes con respecto a las nativas.
- Dilucidar diferencias a nivel local y global entre las estructuras de las cápsides de MVM. Resolución de la estructura cristalográfica del mutante MVM N170A y comparaciones con las estructuras de las cápsides nativa y mutante L172W.

Estudiar las propiedades mecánicas de las vaults y el mecanismo de apertura de la partícula:

- Determinar las propiedades mecánicas de las vaults bajo condiciones fisiológicas.
- Estudiar el efecto del pH en la estabilidad y las propiedades mecánicas de las vaults.
- Estudiar el efecto producido por mutaciones en residuos localizados en la cintura de la partícula a nivel conformacional.

Caracterización de la estructura de la proteína TEP1:

- Estudios de cristalización de los dominios TROVE y TROVE-vWa de la proteína TEP1.
- Estudio estructural mediante crio-microscopía electrónica de la proteína TEP1 sola y formando parte de la partícula vault.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

**EFEECTO DE LAS MUTACIONES N170A Y
L172W EN LAS PROPIEDADES MECANICAS
Y ESTRUCTURA DE LA CAPSIDE DEL MVM**

3.1. EFECTO DE LAS MUTACIONES N170A Y L172W EN LAS PROPIEDADES MECANICAS Y ESTRUCTURA DE LA CAPSIDE DEL MVM

3.1.1. EFECTOS LOCALES Y GLOBALES EN LA MECANICA DE LA CAPSIDE DE MVM COMO CONSECUENCIA DE LAS MUTACIONES N170A Y L172W

Para llevar a cabo una comparación detallada de las distintas cápsides de MVM, tanto mecánica como estructural, se usaron cápsides formadas solo por la proteína VP2 de las cepas p e i. El uso de cápsides formadas solo por VP2 nos permite descartar el efecto debido a la presencia del extremo N-terminal de VP1, lo que podría causar dudas en la interpretación de los resultados.

En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos de AFM para determinar los efectos causados por la mutación en la rigidez global y local de las cápsides del mutante N170A de la cepa p de MVM. Se confirmó por secuenciación que la VP2 nativa y el mutante N170A diferían únicamente en el residuo 170. Ambas cápsides fueron producidas en células, para posteriormente ser purificadas como se describirá en materiales y métodos. Se determinaron las constantes elásticas k_s de la cápside mutante N170A en regiones centradas en un eje binario, ternario y quinario y después se compararon con los valores obtenidos en las mismas regiones de la cápside nativa. Para cada una, se hicieron varias curvas de fuerza (FZC) midiendo en diferentes partículas. Los resultados (Figura 22 y Tabla 1) obtenidos muestran que la mutación puntual N170A causa un aumento drástico en la rigidez de las cápsides de MVMp (80% en los S5, 50% en los S3 y 59% en los S2). Comparando con los resultados obtenidos para las cápsides de MVM formadas por VP2 y VP1 (Castellanos et al. 2012), se observa que el aumento en la rigidez de la cápside mutante no depende de la presencia o ausencia de las extensiones N-terminales presentes en la VP1 (Tabla 1).

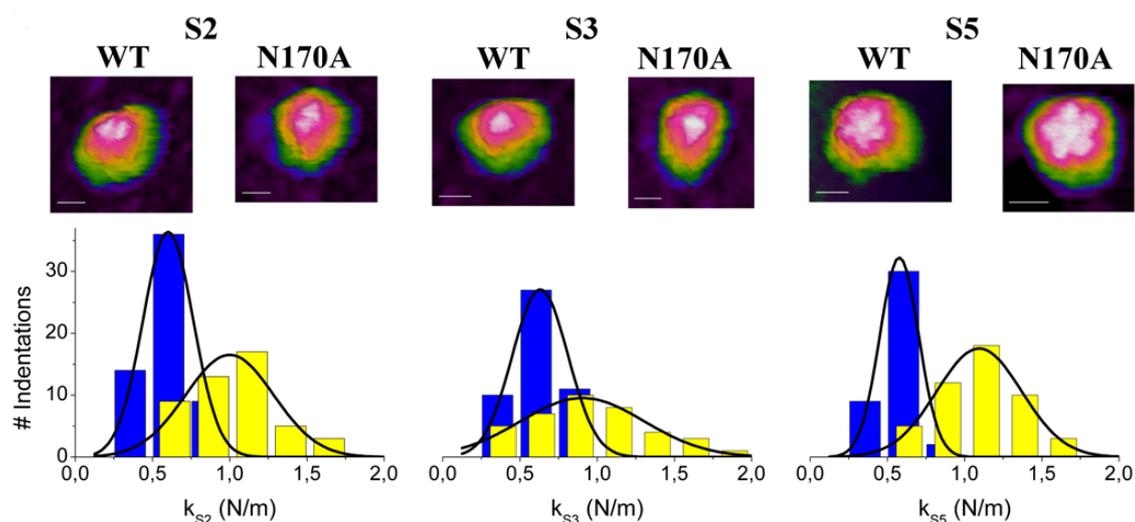


Figura 22. Topografías y rigidez mecánica de la cápside de MVMp nativa y mutante N170A. Se muestran imágenes de AFM de cápsides individuales orientadas respectivamente a lo largo de los ejes S2 (izquierda), S3 (medio) o S5 (derecha). La barra de escala en las imágenes es de 15 nm de larga. Debajo de estas imágenes se muestran las distribuciones de las constantes elásticas k_s determinadas por AFM para cada orientación mostrada. Cada histograma representa el número de determinaciones individuales *versus* la k_s obtenida para la cápside del mutante (barras amarillas) y la cápside nativa (barras azules) sobre cápsides en las tres orientaciones antes definidas.

Asimismo, analizamos los efectos en la rigidez global y local de las cápsides del mutante L172W de la cepa i de MVM, donde la mutación rellena un hueco existente en la estructura, al sustituir la cadena lateral de una leucina por la de un triptófano. Igual que en el caso anterior, confirmamos por secuenciación que la VP2 nativa y el mutante L172W diferían únicamente en el residuo 172. Las cápsides de MVMi nativas y mutantes fueron producidas *in vitro* en las células, purificadas y posteriormente, se determinó el valor de las k_s exactamente igual a como se hizo para las cápsides de MVMp. Los resultados obtenidos (Figura 23 y Tabla 1) muestran que la rigidez mecánica en las regiones S5, S3 y S2 es similar para las cápsides nativas de las cepas i y p, las cuales difieren en 13 aminoácidos por subunidad de la cápside (780 residuos en total; Figura 24). Por el contrario, la mutación puntual L172W produce un aumento significativo en los valores de las k_s en comparación con las cápsides nativas de la cepa inmunosupresora, como ocurría en el caso del mutante N170A, (35% en los S5, 58% en los S3 y 87% en los S2; Figura 23 y Tabla 1).

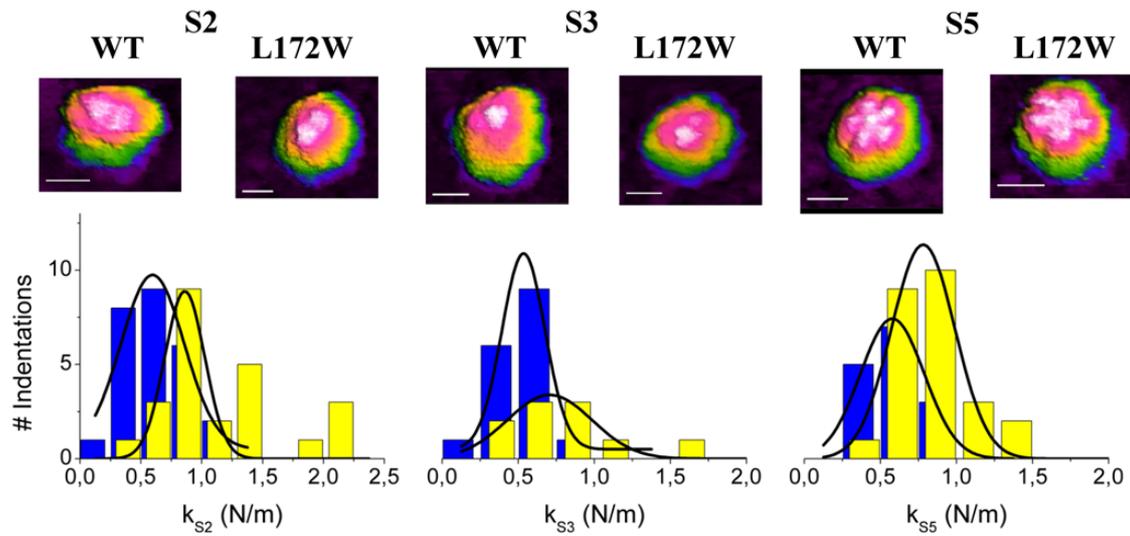


Figura 23. Topografías y rigidez mecánica de la cápside de MVM nativa y mutante L172W. Se muestran imágenes de AFM de cápsides individuales orientadas respectivamente a lo largo de los ejes S2 (izquierda), S3 (medio) o S5 (derecha). La barra de escala en las imágenes es de 15 nm de larga. Debajo de estas imágenes se muestran las distribuciones de las constantes elásticas k_s determinadas por AFM para cada orientación mostrada. Cada histograma representa el número de determinaciones individuales vs la k_s obtenida para la cápside del mutante (barras amarillas) y la cápside nativa (barras azules) sobre cápsides en las tres orientaciones antes definidas.

Tabla 1. Constantes elásticas k_s determinadas para las distintas cápsides de MVM (nativa y mutantes N170A y L172W) a lo largo de los ejes S2, S3 y S5.

	S2				S3				S5			
	k_s (N/m) ^c	Fz^d	n^e	p^f	k_s (N/m) ^c	Fz^d	n^e	p^f	k_s (N/m) ^c	Fz^d	n^e	p^f
wtp_{VP1/VP2}	0.55 ± 0.14	109	14	-	0.54 ± 0.14	110	16	-	0.59 ± 0.11	99	6	-
wtp_{VP2}	0.63 ± 0.12	41	7	0.0009	0.62 ± 0.16	52	10	0.002	0.61 ± 0.11	24	4	0.59
wti_{VP2}	0.62 ± 0.27	26	6	0.064	0.52 ± 0.17	17	8	0.64	0.61 ± 0.14	15	2	0.48
N170Ap_{VP1/VP2}	1.00 ± 0.48	99	12	3×10^{-18}	0.88 ± 0.35	113	20	8×10^{-18}	0.98 ± 0.21	123	5	1×10^{-40}
N170Ap_{VP2}	1.00 ± 0.27	46	8	6×10^{-30}	0.93 ± 0.37	38	10	2×10^{-16}	1.10 ± 0.25	48	8	5×10^{-36}
L172Wi_{VP2}	1.16 ± 0.51	24	7	7×10^{-20}	0.82 ± 0.35	10	4	3×10^{-6}	0.82 ± 0.24	25	6	7×10^{-11}

^b p, cepa p; i, cepa i; _{VP1/VP2}, cápsides que contienen 10 VP1 and 50 VP2; _{VP2}, cápsides que contienen 60 VP2.

^c constante elástica (valor promedio ± desviación estándar).

^d número de indentaciones realizadas por análisis.

^e número de partículas medidas por análisis.

^f valor-p relativo a $wtp_{VP1/VP2}$, obtenido del test-t de Student con un nivel alfa de 0.05

En resumen, nuestros resultados muestran que al cambiar trece aminoácidos de la cadena peptídica del monómero de la cápside en dos cepas distintas (Figura 24), no se observan diferencias significativas en la rigidez mecánica de ninguna región en particular. Sin embargo, cuando se llevan a cabo mutaciones puntuales que crean tanto una cavidad (N170A) o bien rellenan un hueco (L172W) en las inmediaciones de los residuos de la pared del poro, se produce un aumento drástico en la rigidez, tanto global como local, de la partícula viral. En el caso de N170A, este aumento es mayor en los alrededores del residuo mutado (S5), mientras que en el mutante L172W el cambio es más pronunciado en las regiones más alejadas del poro (S2).



Figura 24. Alineamiento de secuencia de las cepas p (MVMp) e i (MVMi) de MVM, donde se muestra los 13 residuos diferentes entre ambas, obtenido con el software ESPrict (Robert y Gouet, 2014).

3.1.2. EFECTOS EN LA DINAMICA CONFORMACIONAL DE LAS MUTACIONES N170A Y L172W

En el grupo del Profesor Mauricio G. Mateu habían observado previamente que la rigidificación mecánica causada por la mutación N170A afectaba a la reorganización conformacional de la cápside de MVMp, afectando al mismo tiempo a su ciclo biológico. Esta transición estructural fue estudiada *in vitro* usando cápsides de MVM constituidas solo por VP2 como en el caso anterior. Para desencadenar esta transición *in vitro*, se calientan las muestras y se detecta un sutil, pero reproducible cambio en la fluorescencia de algunos triptófanos de la cápside (Reguera et al., 2004). Ahora se ha estudiado de la misma manera si esta reorganización conformacional ocurre en la cápside de la cepa i de MVM y, si en el caso del mutante L172W, como ocurrió con el mutante N170A, esta se ve afectada. Los resultados obtenidos mostraron que la

transición tenía lugar en la cápside nativa de MVMi, pero no en el mutante L172W (Figura 25). Como conclusión, se puede decir que ambas cepas del virus MVM experimentan una transición conformacional asociada con la externalización del extremo N-terminal de VP2, y tanto la mutación N170A como L172W perjudican esta dinámica, afectando a los eventos de translocación en el poro necesarios para el ciclo biológico del virus.

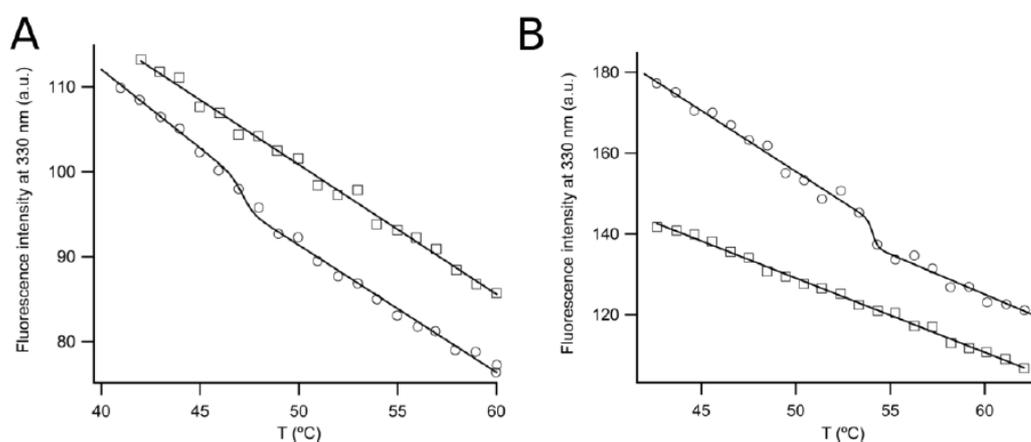


Figura 25. Intensidad de fluorescencia intrínseca de los Trp a 330 nm de la cápside de (A) MVMp y (B) MVMi en función de la temperatura. Las puntos marcados como círculos son los datos obtenidos para las cápsides nativas, mientras que los puntos representados como cuadrados son los datos obtenidos para los mutantes N170A (A) y L172W (B).

3.1.3. ESTRUCTURA CRISTALINA DEL MUTANTE N170A DE MVM Y COMPARACION CON LA ESTRUCTURA DE LA CAPSIDE NATIVA

Para profundizar en las bases estructurales a nivel atómico de la rigidificación mecánica producida por la mutación N170A, resolvimos la estructura cristalina de las cápsides del mutante N170A de MVM de la cepa p. Una vez determinamos la estructura cristalina, la comparamos con la de la cápside nativa de la misma cepa, resuelta previamente a 3.25 Å de resolución (Kontou et al., 2005).

La cápside del mutante N170A de MVMp cristalizó en el grupo espacial romboédrico R32. El empaquetamiento del cristal indica que la unidad asimétrica contiene 1/6 o diez protómeros de dos partículas virales distintas (Tabla 2), con un eje S2 y un eje S3 cristalográficos coincidiendo con un eje S2 y un S3 icosaédrico respectivamente, para

cada una de las partículas virales en la celda unidad. La estructura se resolvió a una resolución de 3.8 Å por reemplazo molecular usando simetría no-cristalográfica de orden veinte, utilizando como modelo la estructura de la cápside nativa de MVMp (PDB ID: 1Z14; Kontou et al., 2005).

Tabla 2. Estadísticas de la toma de datos de rayos-X y del refinamiento para la cápside del mutante N170A de la cepa p de MVM.

Recogida de datos	
Grupo espacial	R32
Parámetros de la celda	
a, b, c (Å)	410.19, 410.19, 559.7
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Resolución (Å)	49.9 – 3.8 (3.97 – 3.8)
R_{merge}	0.203 (0.789)
$I/\sigma I$	7.7 (2.4)
<i>Completeness</i> (%)	99.8 (97.7)
Redundancia	10.5 (9.9)
Refinamiento	
Resolución (Å)	49.9 – 3.8
No. reflexiones	1845645
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.282 / 0.286
No. átomos	
Proteína	4319
<i>B-factors</i>	
Proteína	96.7
RMSD	
Longitud de los enlaces (Å)	0.003
Ángulos de los enlaces (°)	0.701

Protein	97.7
Ramachandran plot (%)	
Most favored regions	91.8
Additional allowed regions	7.9

Los mapas de densidad electrónica modificados con simetría no-cristalográfica (NCS) y aplanamiento de solvente, mostraron una densidad bien definida (Figura 26), lo que permitió trazar un modelo en su interior y compararlo con la estructura de la cápside nativa de MVMp. Como se había descrito previamente en la estructura de MVM nativa y también en otros parvovirus (Agbandje et al., 1998; Kontou et al., 2005), los mapas de densidad electrónica no permiten interpretar los extremos N-terminales de las VP2 (del residuo 1 al 38, incluyendo el conjunto de glicinas que en el virión se encontraban en el interior del poro de la cápside). La falta de densidad electrónica en el interior del poro indica que los extremos N-terminales de VP2 no están externalizados en el mutante N170A. Las estructuras de la cápside nativa y la de la mutante son muy similares pero claramente no idénticas. La desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés *root mean standard deviation*) es de 0.58 Å para la cadena de átomos C α equivalentes en ambas estructuras (1.08 para todos los átomos de los 549 residuos superpuestos de las VP2). En el caso de la cápside nativa formada solo por VP2 y la nativa formada por VP1 y VP2 (resuelta a 3.75 Å de resolución), la RMSD entre ambas es de 0.08 Å para los átomos C α equivalentes entre ambas estructuras.

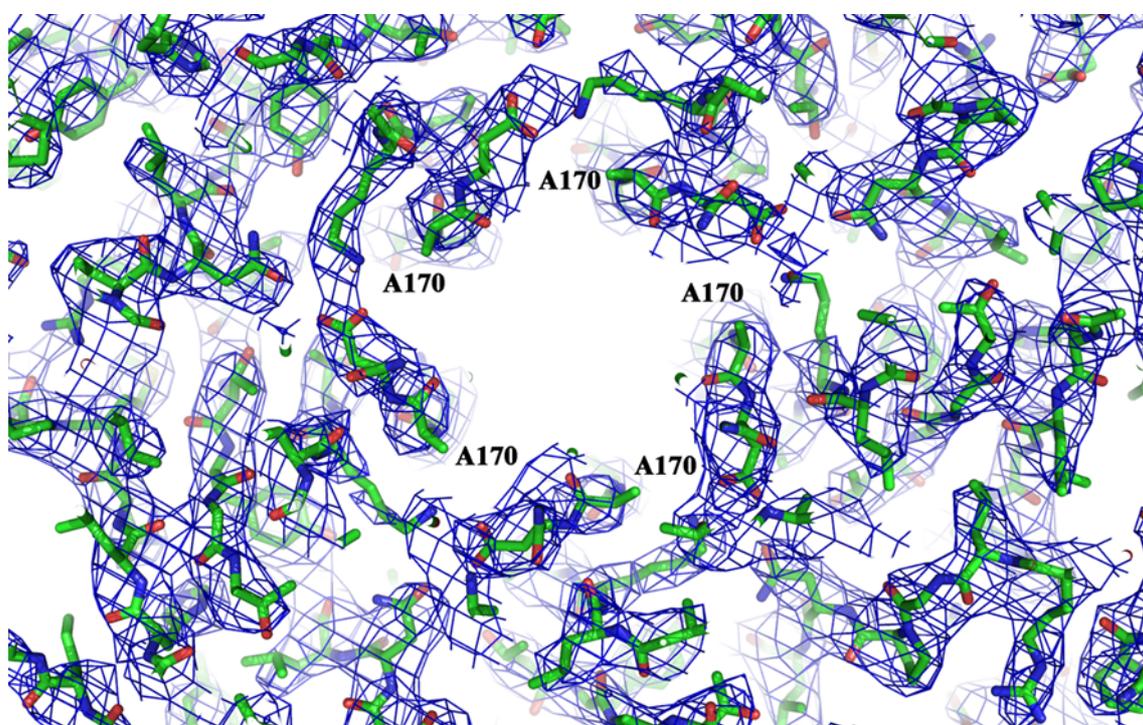


Figura 26. Mapa de densidad electrónica $2F_o - F_c$ correspondiente al mutante N170A de la cápside de MVMp (1.5σ). La región mostrada aquí corresponde a la base del poro en el eje S5. El residuo mutado A170 está etiquetado.

Comparando en profundidad la estructura de la cápside nativa y la mutante, se observan diferencias conformacionales sutiles, tanto en los alrededores del residuo mutado, como en el resto de la estructura de la cápside. En el anillo formado por los residuos N170/D171, localizado cerca de la base de cada poro de la cápside, el grupo amida del residuo N170 forma un enlace de hidrogeno con el grupo carboxílico del residuo D171 de la subunidad VP2 vecina. Esta interacción entre monómeros se pierde en el mutante de la cápside, además de que la eliminación del grupo amida de los cinco residuos N170, genera una cavidad en esta región próxima al poro. Como consecuencia, se observa también una ligera reorganización de las cadenas laterales de los residuos D171 y T173, moviéndose hacia las cavidades creadas como consecuencia de la mutación. Sin embargo, la apertura del poro permanece casi inalterada; medido en el punto más estrecho (formada por los residuo L172) tiene un diámetro de 7.9 Å en la cápside del mutante frente a los 8.2 Å que presenta la cápside nativa (Figura 27).

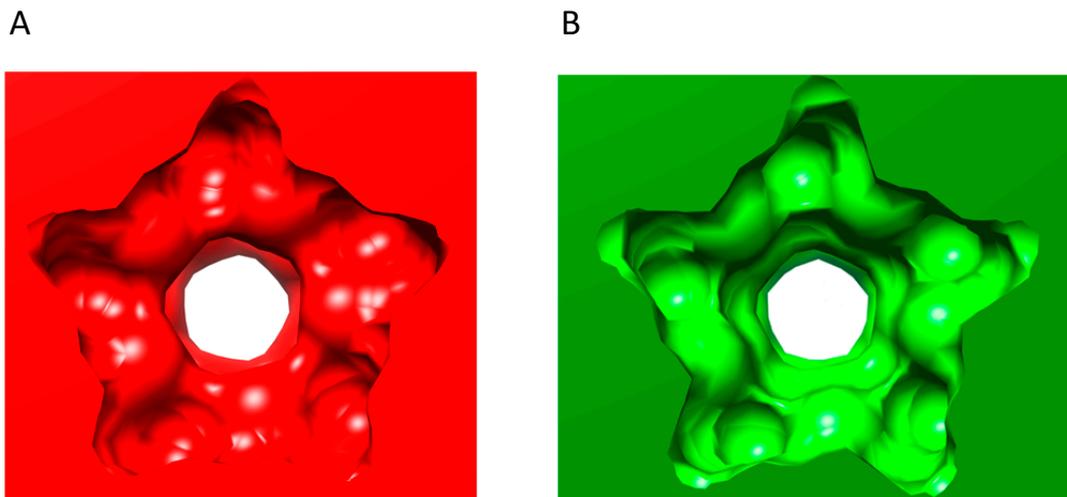


Figura 27. Representación en superficie de la región localizada alrededor del eje s5 en la cápside de MVMp. (A) Cápside nativa (PDB id: 1Z14). (B) Cápside del mutante N170A (resuelta en este estudio; PDB id: 4ZPY). Vista de la superficie interna de la cápside. Se pueden observar cambios sufridos en la apertura de las constricciones primaria y secundaria de la pared del poro.

Continuando con la comparación de ambas estructuras, se observa que un número de regiones de la cápside expuestas al solvente también exhiben diferencias estructurales significativas entre las cápside del mutante N170A y la del nativo, con unas RMSD que exceden tres veces el valor medio de la misma (Figura 28). Estas regiones incluyen entre otras: las paredes de los poros en los S5 (residuos 150-170), los hombros de las espículas a lo largo de los S3 (residuos 219-238), el loop localizado entre los ejes S5 y S2 (residuo 382-392) y un loop expuesto formado por los residuos 503-519, el cual está muy mal definido en todas la estructuras de viriones o cápsides de MVM resueltas hasta la fecha (Agbandje-McKenna et al., 1998; Kontou et al., 2005; Plevka et al., 2011).

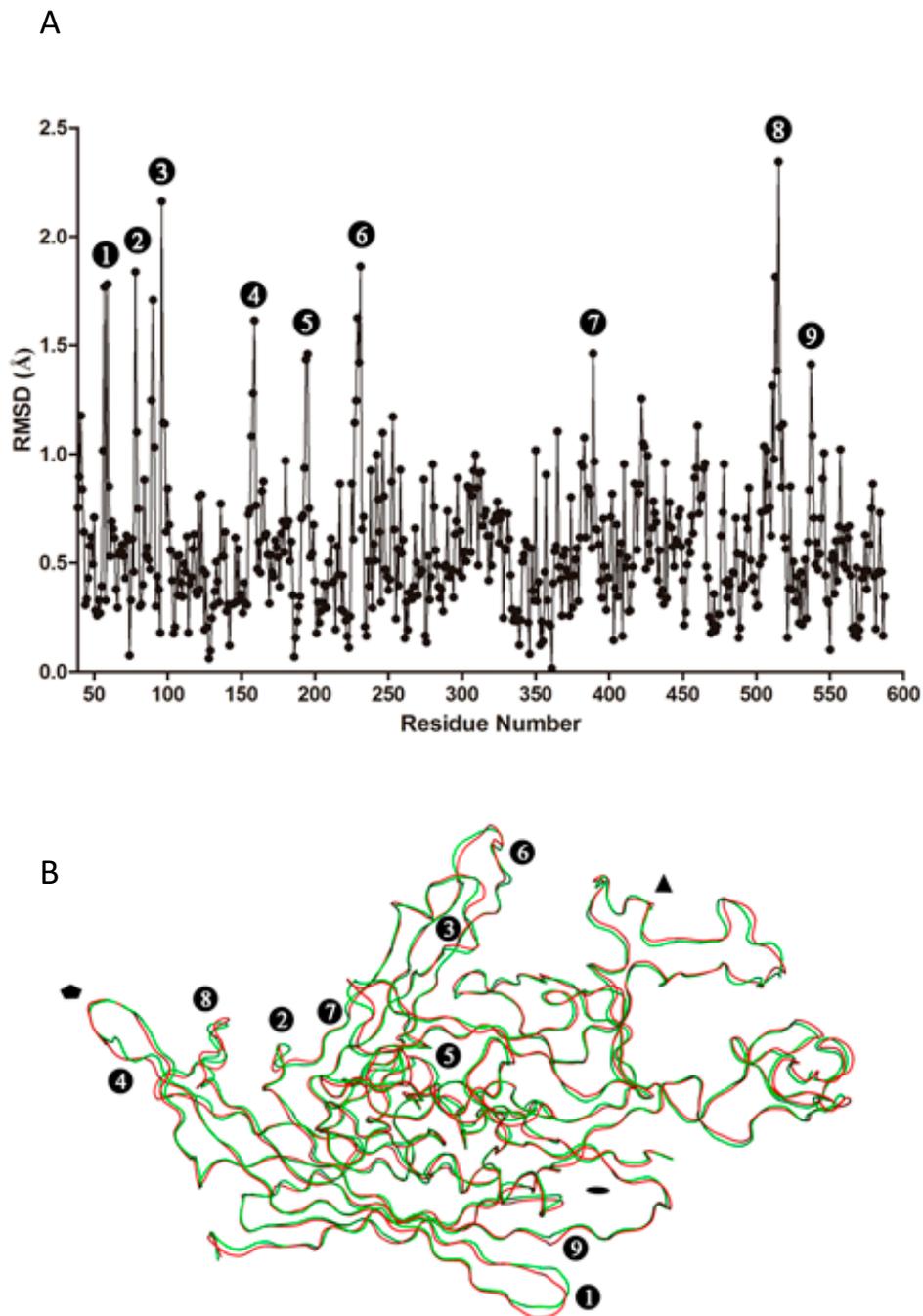


Figura 28. Comparación de las estructuras de la VP2 nativa y del mutante N170A de MVM. (A) Gráfico en el que se muestra la RMSD de las distancias entre los átomos equivalentes C α en las estructuras de VP2 nativas y mutante N170A de la cápside de la cepa p de MVM. Las regiones que tienen un valor RMSD > 1.5 Å han sido etiquetados del 1 al 9. (B) Superposición de las estructuras de las dos VP2 mostrando solo los átomos C α . En rojo, VP2 nativa y en verde mutante N170A. Las regiones que tienen un valor RMSD > 1.5 Å han sido etiquetadas también del 1 al 9. La posición aproximada de los ejes S2, S3 y S5 en la cápside está indicada por un triángulo, un triángulo negro y un pentágono negro respectivamente.

La superposición de las cinco subunidades de VP2 localizadas alrededor del eje S5 (las cuales generan un pentámero) para la cápside nativa de MVMp y la del mutante N170A, reveló la presencia de una serie de cambios sutiles que se dan en esta región como consecuencia de la mutación. Estos cambios parecen propagarse a lo largo de toda la cápside, produciendo una compactación de la misma. Además, la comparación de los factores de temperatura (*B-factors*) normalizados de ambas estructuras evidenció que los cuatro elementos estructurales expuestos al solvente descritos en el párrafo anterior, los cuales aparecen como altamente flexibles en la estructura de la cápside nativa (con factores de temperatura cuatro veces mayores que el valor promedio) parecen ser menos flexibles en el mutante N170A, donde exhiben unos factores de temperatura normalizados más cercanos al valor promedio (a excepción del *loop* que va del residuo 503 al 519; Figura 29).

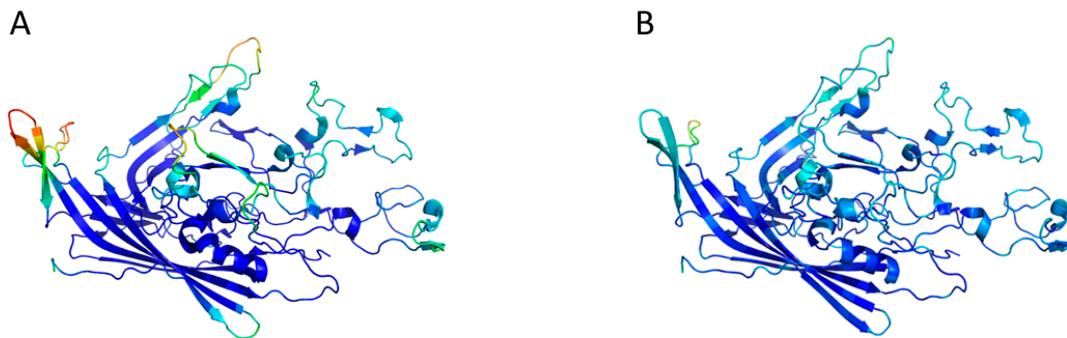


Figura 29. Estructura de la VP2 en la cápside de MVM de la cepa p, coloreado dependiendo del valor del *B-factor* normalizado para cada residuo. El espectro de color va de azul marino (valores bajos) a rojo (valores altos) (A) VP2 de la MVMp nativa (B) VP2 de la MVMp mutante N170A.

3.1.4. EFECTOS ESTRUCTURALES COMPARADOS DE LOS MUTANTES N170A Y L172W EN LA CAPSIDE DE MVM

Como ocurría con la mutación N170A (Reguera et al., 2004), la mutación L172W en la base de los poros de la cápside se ha visto que es perjudicial para el ciclo biológico de MVM a temperatura fisiológica (Farr y Tattersall, 2004). Plevka et al. resolvieron la estructura cristalina del mutante L172W de la cápside de MVM de la cepa i, formada solo por VP2, a una resolución de 4.2 Å (PDB ID: 2XGK; Plevka et al., 2011) y la

comparó con la estructura del virión de MVMi a 3.5 Å de resolución (PDB ID: 1Z1C; Kontou et al., 2005) con el fin de explicar el efecto de esta mutación en el ciclo biológico de este virus. No pudo comparar con la estructura de la cápside vacía del MVMi nativo ya que no estaba (ni esta) disponible y la comparación con la cápside vacía de MVMp no sería adecuada, ya que las VP2 de ambas cepas difieren en 13 residuos (Figura 24). En la comparación de ambas estructuras, los autores encontraron una alta similitud estructural entre ellas (una RMSD de 0.3 Å para los átomos C α equivalentes para los 542 residuos superpuestos), así como algunas diferencias específicas en los poros y en la organización del extremo N-terminal de la VP2. Juntando estos resultados con un análisis fenotípico, concluyeron que el anillo formado por las cadenas laterales de Trp 172 reducía el diámetro de la constricción del poro e impedía estéricamente el empaquetamiento del DNA viral (Plevka et al., 2011).

La disponibilidad de las coordenadas de la estructura de la cápside del mutante L172W de MVMi, nos permitió estudiar a nivel atómico las bases estructurales del aumento en la rigidez mecánica de este mutante y compararlo con los resultados obtenidos para el mutante N170A. Esta comparación fue particularmente interesante, debido a que tanto N170A y L172W se encuentran en las inmediaciones de la pared del poro y perjudican la infectividad del virus, pero a través de mecanismos distintos.

La superposición de las cinco subunidades de la cápside localizadas alrededor del eje S5 (generando un pentámero) en las estructuras de la cápside mutante L172W y la nativa de MVMi reveló una compactación global de la estructura del mutante. Así mismo, la comparación de los factores de temperatura normalizados entre las estructuras de ambas cápsides nativas, mostró que las cuatro regiones que exhiben unos valores altos en la cápside nativa de la cepa p, también lo son en el caso de la cápside nativa de MVMi (Figura 30). Por el contrario, en la cápside del mutante L172W, estas regiones exhiben valores de los factores de temperatura normalizados mucho menores, sugiriendo una rigidificación de los elementos estructurales, como pasaba en el mutante N170A de MVMp. En este caso, la rigidificación de la cápside está también extendida al *loop* localizado entre los residuos 503-519.

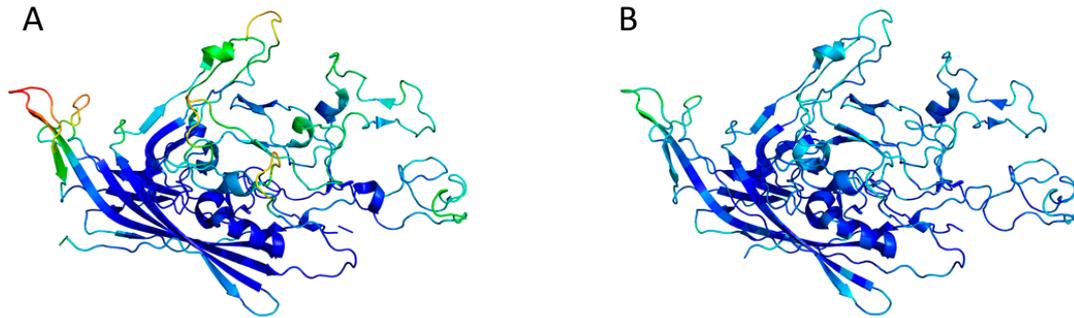


Figura 30. Estructura de la VP2 en la cápside de MVM de la cepa i, coloreado dependiendo del valor del *B-factor* normalizado para cada residuo. El espectro de color va de azul marino (valores bajos) a rojo (valores altos) (A) VP2 de la MVMi nativa (B) VP2 de la MVMi mutante N170A.

3.1.5. BASES A NIVEL ATOMICO DE LA RIGIDIFICACION MECANICA DE LAS PARTICULAS VIRALES

Cuando presionamos con la punta del AFM sobre una cápside viral, múltiples interacciones no covalentes (Van der Waals, enlaces de hidrogeno, interacciones iónicas,...) entre los átomos se ven estresadas y ocasionalmente, afectadas por la fuerza aplicada. Si la fuerza aplicada no es demasiado fuerte y la indentación no es demasiado profunda, las interacciones se recuperarán después de que la punta del cantiléver se retire. Como resultado, los átomos son reversiblemente desplazados de sus posiciones originales y esta deformación reversible puede ser descrita como una deformación elástica (de Pablo y Mateu, 2013; Ivanovska et al., 2004). Si el número de las interacciones que mantienen los átomos en una región particular aumenta, se podría esperar que haga falta más fuerza mecánica (F) para mover esos átomos relativamente lejos de sus posiciones originales y alcanzar una cierta deformación (d) de la cápside. Dado que la constante elástica k_s es una razón entre fuerza y deformación ($k_s = F/d$), su valor en este caso debería aumentar. Esta interpretación simplificada de las variaciones en la rigidez mecánica a nivel atómico se complica por la no-homogeneidad estructural de las proteínas y el carácter vectorial de las interacciones. El análisis mediante AFM ha proporcionado una herramienta ideal para obtener una relación general, para diferentes variantes de la misma partícula viral, entre un aumento en el número de las

interacciones y el aumento local o global de la rigidez (Carrasco et al., 2008; Michel et al., 2006; Douglas y Young, 2006)

Esta hipótesis expuesta es desafiada por los resultados obtenidos para los distintos mutantes de la cápside de MVM, donde la rigidificación afecta tanto a la región del poro, así como a otras regiones distantes a él (S2 y S3; Castellanos et al., 2012). La estructura cristalina del mutante N170A de la cápside de MVM obtenida en este estudio, ha revelado que la eliminación del grupo amida de la N170 produce la eliminación de algunas interacciones locales, la generación de una cavidad y el reordenamiento estructural de algunas regiones. Pero además, el efecto de la mutación se propaga a la cápside entera de MVM, llevando a una ligera, pero significativa reordenación conformacional de múltiples elementos estructurales localizados lejos del lugar mutado. La mayoría de estos elementos, tanto alrededor del poro como en zonas más alejadas, mostraron una disminución de los valores de los *B-factors*, indicativo de una reducción en la flexibilidad estructural. El efecto global es una conformación más compacta y menos flexible de la cápside mutante de N170A, en la cual la fuerza de varias interacciones no-covalentes podría verse aumentada. Estos resultados dan una explicación estructural para los efectos observados en la rigidificación mecánica local y global producidos por una única mutación en la proteína de la cápside viral.

La interpretación estructural para la rigidificación de la cápside no es específica para mutaciones que crean una cavidad, como es el caso de la mutación N170A. De hecho, la mutación L172W de la cepa i de MVM, la cual rellena un hueco existente, produce unos cambios similares en la conformación y la rigidificación de los elementos estructurales desperdigados a lo largo de toda la cápside de MVM y da como resultado, otra vez, una compactación global de la cápside viral.

3.1.6. IMPLICACIONES BIOLÓGICAS

Como se explicó en la introducción, Tattersall, Almendral y otros científicos descubrieron una participación en el ciclo infeccioso de MVM de diferentes translocaciones en el poro de la cápside, incluyendo procesos como el empaquetamiento del genoma y la externalización de los extremos N-terminales de VP2 y VP1. Sin embargo, la estructura cristalina de la cápside nativa de ambas cepas reveló que el

diámetro del poro (alrededor de 8 Å) no era suficientemente ancho para permitir el paso del genoma o del extremo N-terminal. Por esta razón, los poros deben poseer una dinámica conformacional que permita aumentar su diámetro interior en respuesta a estímulos biológicos, lo cual permitiría que se llevaran a cabo estos procesos.

Como se ha mencionado varias veces a lo largo del texto, los residuos de la cápside localizados alrededor de la base del poro, incluyendo la N170 y la L172, son críticos para la capacidad infectividad de MVM a temperatura fisiológica (Reguera et al., 2004; Farr et al., 2004). La sustitución de la L172 por otros residuos y la de la N170 (o residuos vecinos) por alanina condujo a múltiples defectos fenotípicos, incluyendo deficiencias en el ensamblado de la cápside, en el empaquetamiento del genoma, en la externalización de los extremos N-terminales de las VPs y en el proceso de entrada en la célula. En nuestro caso nos centraremos solo en los casos de los mutantes N170A y L172W, que son para los cuales tenemos disponibles tanto la estructura atómica, así como los valores de su rigidez mecánica.

El defecto en el empaquetado del genoma de la mutación L172W se relacionó con la reducción en el diámetro del poro de la cápside (de 8 a 6 Å; Plevka et al., 2011). Se podría argumentar que el poro, a pesar de su reducido diámetro en la estructura, podría abrirse transitoriamente lo suficiente para permitir la entrada del DNA viral. Sin embargo, la reducción significativa en los valores de los factores de temperatura normalizados en el cilindro de láminas-β dibujado alrededor del poro, indica que la dinámica del poro se ve reducida, contribuyendo a la imposibilidad de empaquetar el genoma.

La mutación N170A conduce, entre otros efectos, a la desaparición de la transición conformacional asociada a la externalización del extremo N-terminal de VP2 de la cápside (Reguera et al., 2004) y a la salida prematura del DNA al exterior. Estas observaciones condujeron a pensar que quizás el diámetro del poro sería mayor en este mutante. Sin embargo, la estructura cristalina de la cápside del mutante N170A revela que esta mutación no aumenta, sino que reduce ligeramente el diámetro del poro, así como reduce sustancialmente la dinámica del poro, como reveló el descenso en los valores de los factores de temperatura normalizados en la zona localizada alrededor del poro. Además de esto hay que tener en cuenta el aumento en la rigidez mecánica de la región S5 (poro) en relación a las cápsides nativas. Estos resultados son consistentes

con la hipótesis de que la mutación N170A reduce la reorganización conformacional necesaria para la externalización del extremo N-terminal de la VP2, un efecto que probablemente contribuye a reducir la capacidad infectiva del virus (Maroto et al., 2004; Valle et al., 2006).

Tiene un especial interés que la mutación L172W perjudique la infectividad del virus a temperatura fisiológica, mientras que la sustitución isomérica L172I no lo haga (Farr et al., 2004). Análisis mecánicos y de fluorescencia llevados a cabo en este estudio revelan que en la cápside de L172W, como pasa en el caso de N170A, las regiones S5 se rigidifican en relación a las cápsides nativas y la transición conformacional asociada al poro no ocurriría. Por el contrario, en la cápside L172I la región S5 no se ve rigidificada y sí se observó la transición conformacional del poro (Castellanos et al, 2012). Previamente se había observado una relación directa entre la rigidificación de la región S5, la pérdida de la transición conformacional y una disminución en la capacidad infectiva del virus en mutantes de residuos situados cerca de la base del poro (Castellanos et al., 2012). Cuando alguno de esos mutantes del virus fueron probados, se encontraron defectos adicionales, incluyendo externalización prematura del DNA en el virión, como pasaba en el mutante N170A.

Considerando todo lo discutido en este apartado, sugerimos que el efecto de la mutación N170A (y de posiblemente otras mutaciones que crean cavidades alrededor del poro) podría afectar tanto a cambios en la apertura y cierre del poro, así como a la flexibilidad estructural y la rigidez mecánica de la cápside. Por ejemplo, la reducción de la flexibilidad en los elementos estructurales y aumento en la rigidez de la región S2/S3, cerca de las zonas de unión al DNA, podría reducir el número y fuerza de las interacciones DNA-cápside observadas en la estructura cristalina del virión de MVM. Este efecto podría facilitar la liberación prematura del DNA viral. La disminución de la dinámica del poro también contribuiría a reducir la infectividad, ya que perjudicaría la externalización de los extremos N-terminales de las subunidades de la cápside. Independientemente del mecanismo preciso, los resultados presentados refuerzan los resultados anteriores, donde se describía una relación entre compactación estructural y rigidificación mecánica.

3.1.7. IMPLICACIONES NANOTECNOLOGICAS Y BIOMEDICAS

La elasticidad mecánica relativamente alta de las partículas de muchos virus y su asociada tendencia a experimentar cambios conformacionales, podría hacerlas poco adecuadas para su uso como nanopartículas en varias aplicaciones (Mateu, 2016). La ingeniería de proteínas aplicada a nanopartículas basadas en virus, como la introducción de mutaciones con efectos de compactación inducida, similares a los observados en el mutante N170A de la cápside de MVM, podría aumentar su rigidez y mejorar su capacidad para tales aplicaciones.

Este estudio anima también a explorar fármacos antivirales que favorezcan una conformación más compacta de la partícula viral. Una compactación global inducida por un compuesto, similar al efecto de la mutación N170A en la cápside de MVM, podría reducir la dinámica conformacional necesaria durante el ciclo infectivo de muchos virus (Mateu 2013). La AFM podría ser usada como una técnica rápida y precisa para detectar, bajo condiciones fisiológicas, el efecto de estos compuesto en la rigidez de las partículas virales, como un indicador de su dinámica conformacional.

**PROPIEDADES MECANICAS DE LAS
VAULTS Y MECANISMO DE APERTURA
DE LA PARTICULA**

3.2. PROPIEDADES MECANICAS DE LAS VAULTS Y MECANISMO DE APERTURA DE LA PARTICULA

3.2.1. TOMA DE IMAGENES USANDO AFM

Una vez las vaults se unieron a la superficie de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG), la toma de imágenes por AFM en *jumping mode* reveló que las vaults se adsorbían en tres orientaciones distintas (Figura 31): partículas enteras tumbadas sobre el barril, tumbadas sobre el *cap* y medias-vaults adsorbidas por la parte de la cintura, con el *cap* mirando hacia arriba. Las topografías obtenidas de las vaults por AFM mostraron una relación muy buena entre la altura medida para las partículas y la descrita para las estructuras de rayos-X y criomicroscopía, descartando cualquier efecto de desnaturalización en la proteína producido en el proceso de adsorción.

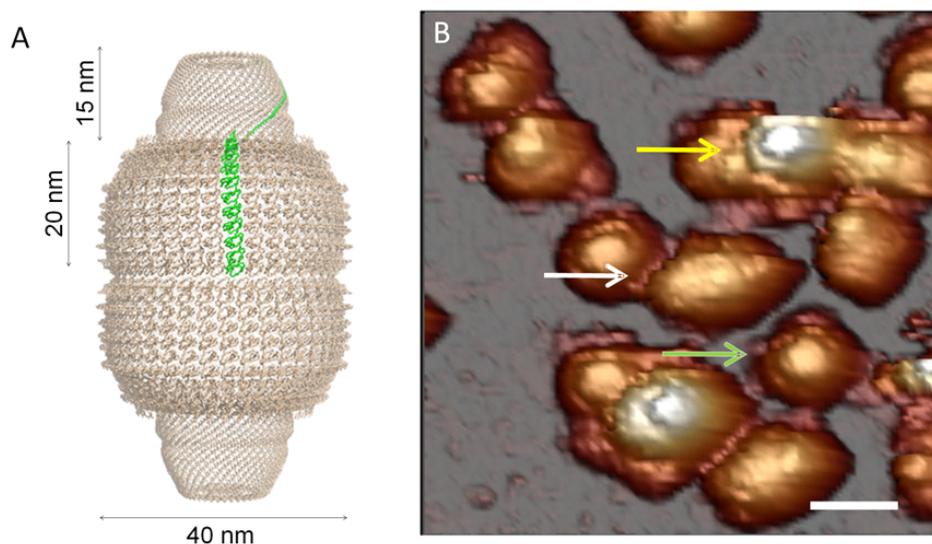


Figura 31. Adsorción de las vaults en AFM. (A) Estructura cristalográfica de la partícula vault (PDB id: 4HL8) junto con sus dimensiones. (B) Imagen topográfica general de las vaults medidas a pH fisiológico, donde se muestra una partícula tumbada sobre el barril (flecha blanca), una partícula entera de pie sobre el *cap* (flecha amarilla) y media partícula con el *cap* hacia arriba (flecha verde). Escala de la barra: 75 nm.

Primero se llevaron a cabo medidas a diferentes fuerzas de retroalimentación con el fin de obtener un primer estudio de la estabilidad mecánica de estas partículas. En este caso, la fuerza utilizada para tomar imágenes se cambia intencionalmente de imagen a imagen (Figura 32), produciendo variaciones en la altura de las vaults. Las topografías

obtenidas revelaron que las vaults sufrían algún daño en la región del barril, como se puede observar comparando, por ejemplo, las topografías del fotograma 1 y del fotograma 7 (Figura 32). Además de esto, la partícula sufría una pérdida de altura con el paso del tiempo en experimentos sucesivos. Sin embargo, si comparamos los fotogramas parece como que la partícula sufriera una recuperación parcial de su estructura original con el paso del tiempo.

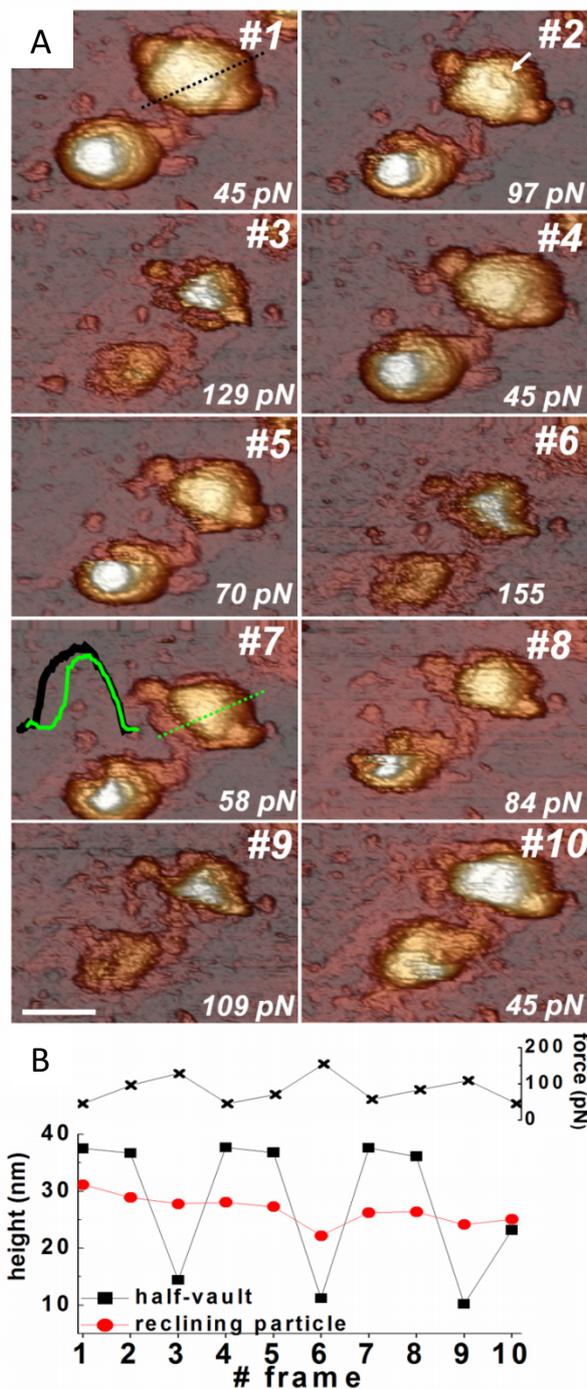


Figura 32. Imágenes de AFM de las vaults a diferentes fuerzas. (A) Imágenes topográficas secuenciales tomadas en intervalos de ~3 minutos. En cada imagen se puso el valor de la fuerza aplicada. Escala de la barra: 50 nm. Se presenta una comparación de los perfiles (imagen 7) de las partículas a lo largo de las líneas de puntos de las imágenes 1 (línea de puntos negros) y la imagen 7 (línea de puntos verdes) donde se muestra un colapso parcial de la estructura. (B) Evolución de la fuerza utilizada para tomar la imagen (arriba) y evolución de la altura de vault enteras tumbadas (rojo) y medias vaults (negro). La escala en altura en la topografía va de blanco-marrón-gris, yendo de más alto a más bajo.

En el caso de las medias vaults, cuando la fuerza utilizada para tomar imágenes aumentaba, la altura de estas se veía reducida de 36 nm a 15 nm (Figura 32). A pesar de sufrir una gran deformación, las topografías tomadas *a posteriori* a fuerzas más bajas, revelaron que la partícula recuperaba su altura original. La habilidad para experimentar un esfuerzo tan grande de una manera reversible, lo que fue observado varias veces para medias vaults, demuestra la estabilidad estructural de estas partículas bajo estrés mecánico. Las imágenes evidenciaron que las vaults recombinantes (formadas únicamente por MVP) presentan una capacidad de autoreparación a escala local, como se puede observar en los fotogramas tomados de una partícula, donde la fractura en el barril desaparece con el tiempo (Figura 32 A).

Con el fin de obtener más información sobre el efecto causado por el descenso del pH en el mecanismo de apertura y en las propiedades mecánicas de las vaults, se tomaron también imágenes de estas a pH distintos del fisiológico. Para obtener imágenes de AFM a distintos pH se trabajó de dos maneras distintas. Primero, se bajó el pH de la disolución antes de adsorber las partículas, que en el caso del pH 6.0, se seguía observando las vaults tumbadas y las medias vaults adsorbidas por la cintura. La figura 33 muestra una imagen de AFM con partículas enteras a pH 6.0, donde se observa que las partículas ven disminuida su altura, siendo en el caso de las vaults tumbadas, de un 14% de promedio y de un 7% para las medias vaults. Este resultado sugiere que la estructura global de la partícula se debilita al bajar el pH. Las imágenes de AFM adquiridas de partículas incubadas a pH 5.2 antes de ser adsorbidas, mostraron la mayoría de las regiones vacías y algunos clústeres, sugiriendo que las vaults a ese pH generan altos niveles de agregación de proteína.

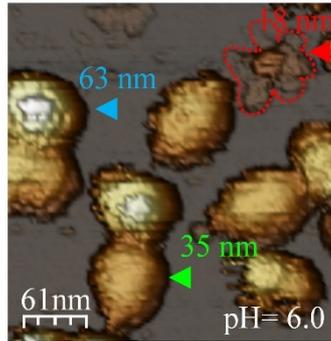


Figura 33. Imagen topográfica de AFM tomada a pH 6.0 mostrando vaults enteras de pie (flecha azul) y partículas enteras tumbadas sobre el barril (flecha verde). También se marcó con puntos rojos una estructura en la conformación en forma de flor. La escala en altura en la topografía va de blanco-marrón-gris, yendo de más alto a más bajo.

La agregación de proteína comentada arriba a pH 5.2, obstaculizaba la identificación de las partículas individuales, por ello se procedió a cambiar de estrategia. Primero, se unieron las partículas al sustrato a pH = 7.5 y una vez unidas, se bajó el pH de la solución hasta 5.2 lavando la cámara de AFM con buffer, repitiendo de este modo los experimentos llevados a cabo por Esfandary et al. (2009). De esta manera, las partículas no podían ser capaces de difundir libremente, evitando así la formación de cúmulos de proteína agregada al acidificar el medio. Trabajando de esta manera, fue posible identificar vaults individuales a pH 5.2. Las imágenes tomadas a pH 5.2 mostraron un deterioro estructural en la región del barril formado por los dominios de láminas- β (R1-R9; figura 32).

Como ya se observó para el caso de pH 6, a pH 5.2 también se identificaron estructuras en forma de pétalos de flores. En estas estructuras encontradas a pH 6 y 5.2, la altura de la partícula ($\sim 15\text{nm}$) corresponde a la altura del *cap* en las partículas a pH 7.5, indicando que la asociación entre las hélices α localizadas en esta región de la partícula mantiene su conformación estable, a pesar de bajar el pH. La estructura atómica de la vaults proporciona una explicación plausible para la estabilidad del dominio *cap*. Esta se debe al número y tipo de interacciones presentes entre los dominios de hélices α de las MVPs. Los contactos más fuertes entre las MVPs se encuentran en el dominio *cap helix*, donde las interacciones hidrofóbicas dominan el plegamiento (29 de las 41 residuos de la interfase son hidrofóbicos). Las interacciones entre monómeros en el barril son más débiles y principalmente involucran contactos polares. Nuestras

imágenes de AFM muestran que a pH 5.2 la región del barril está seriamente dañada, probablemente debido a la desaparición de las interacciones polares en la región central (Figura 34).

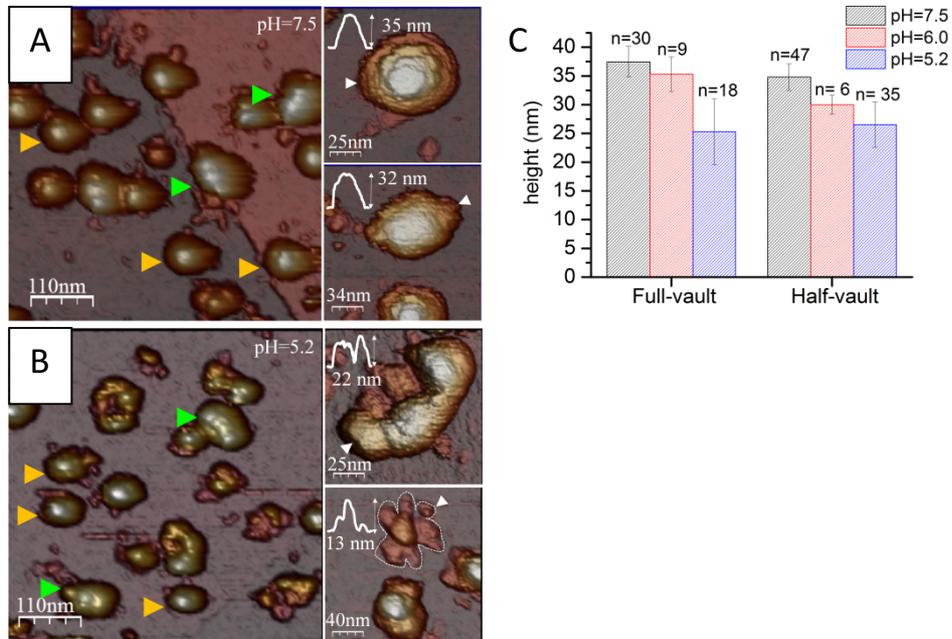


Figura 34. Descenso de la altura de las vaults con el pH. (A) Imágenes topográficas de AFM de partículas a pH 7.5, mostrando partículas con varias orientaciones. Las imágenes de alta resolución de las vaults a pH 7.5 se muestran a la derecha: media vault (arriba) y partícula entera tumbada (abajo). La flecha blanca muestra la dirección en la que se midió el perfil de la partícula mostrado. (B) Imágenes de AFM tomadas después de bajar el pH de la solución de 7.5 a 5.2. Las imágenes de la derecha muestran las típicas estructuras de las vaults encontradas a este pH: vault tumbada (arriba), media vault y estructura en forma de flor (abajo). (C) Gráfico de la altura de las partículas a pH 7.5, 6.0 y 5.2. En ambas estructuras obtenidas (enteras y medias vaults) se observa una disminución progresiva de la altura.

La altura promedio de las partículas medida a 7.5, 6.0 y 5.2 disminuyó con la disminución del pH (Figura 34). A pH 5.2, las partículas presentaron un daño latente que no se recuperó con el paso del tiempo, por lo que no es descabellado argumentar que a ese pH, la disminución en la altura es consecuencia de la pérdida de subunidades de la partícula. Sin embargo, a pH 6 no se observaba un efecto tan claro y la estructura global permanecía preservada. En esos casos, la disminución en la altura, podría ser

debido seguramente a un debilitamiento global de la estructura más que a la pérdida de subunidades, lo que produciría una disminución en la altura medida con el AFM.

3.2.2. RIGIDEZ Y FUERZA DE ROTURA DE PARTICULAS INDIVIDUALES

Como se ha comentado en el apartado anterior, las vault sufrían una recuperación del daño producido en la estructura a pH fisiológico en los experimentos de AFM. Con el fin de estudiar como ocurre este proceso se llevaron a cabo nanoindentaciones sobre partículas individuales, tanto partículas enteras tumbadas sobre el barril como sobre medias vaults adsorbidas por la cintura (Figura 35).

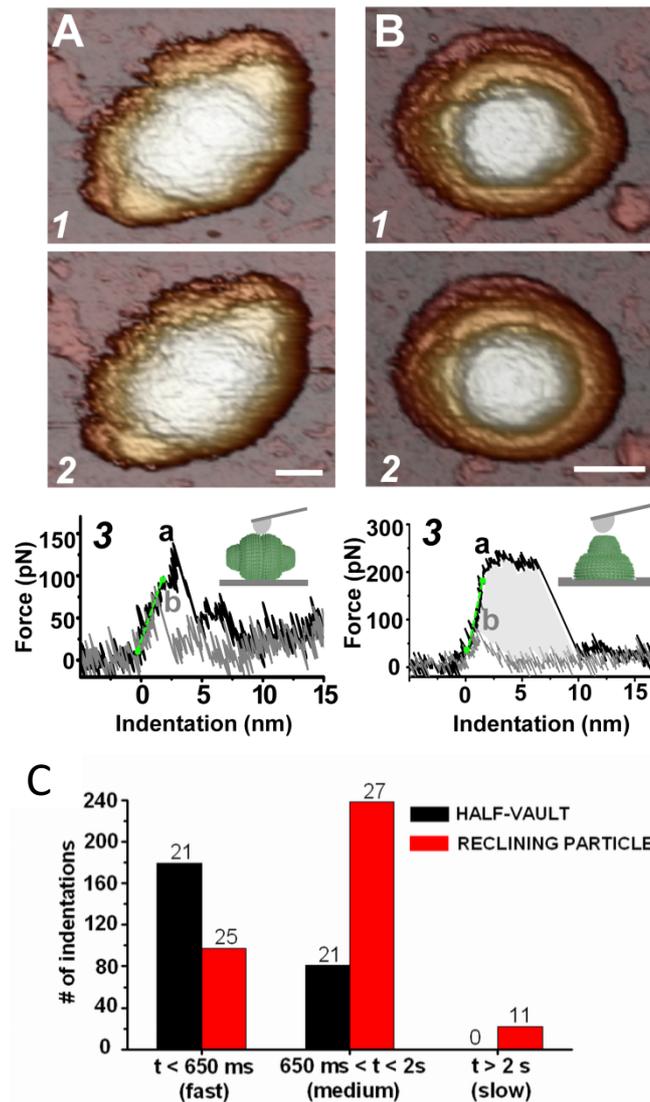


Figura 35. Estudio de las propiedades mecánicas de las vaults a pH fisiológico. (A y B)

Imágenes topográficas de una partícula tumbada entera y una media vault antes (arriba) y después (abajo) de llevar a cabo la curva FIC. La curva de ida (negro) da el valor de constante elástica (línea verde) y la fuerza de rotura (valor máximo alcanzado, a). La curva de vuelta (gris) muestra la recuperación de la partícula durante la retracción de la punta. (C) Histograma de los tiempos de recuperación de las partículas. El histograma contiene 357 curvas FIC de 28 partículas tumbadas (rojo) y 260 curvas FIC de 26 medias vaults (negro).

Los ensayos de indentación individuales consistían (como ocurría en el caso de MVM) en presionar perpendicularmente una partícula individual con la punta de la palanca del microscopio. Al entrar en contacto con la muestra, la palanca se deforma de manera proporcional a la fuerza aplicada sobre la vault. La resultante curva de fuerza-

indentación (FIC) da información sobre las propiedades mecánicas de las partículas, tales como la dureza (constante elástica) y la fuerza de rotura (Roos et al., 2010; Carrasco et al., 2006; Michel et al., 2006). La fuerza de rotura es definida como la fuerza máxima alcanzada antes de la caída dramática (Figura 35). La pendiente de la parte lineal de la FIC, después de establecer contacto la punta y el espécimen, proporciona el valor de la constante elástica de la partícula. Nuestros experimentos dieron unos valores medios para rigidez y fuerza de rotura de 0.03 ± 0.01 N/m y 122 ± 83 pN, respectivamente para 13 partículas enteras tumbadas medidas a pH 7.5. Estos valores aumentan hasta 0.06 ± 0.03 y 165 ± 38 pN para medias vaults medidas al mismo pH (Tabla 3).

Tabla 3. Constante elástica, fuerza de rotura e indentación a la que las partículas sufren rotura.

	K (N/m)	F_{breaking} (pN)	Indent_{breaking} (nm)	Energy (K_BT)	n
Medias vaults	(0.06±0.03)	(165±38)	(4±2)	(302±34)	21
Vaults tumbadas	(0.03±0.01)	(122±83)	(3.9±1.5)	(220±34)	13

3.2.3. AUTO-REPARACION DE LAS VAULTS DESPUES DE SU ROTURA

La fuerza de rotura es un indicador claro de daño en la partícula, comúnmente relacionado con la fractura de la estructura debido a la nanoindentación (Ivanovska et al., 2011). Para estudiar las fracturas producidas, focalizamos los experimentos en analizar las curvas hacia adelante y hacia atrás. En la curva de ida, después de una primera parte de deformación lineal (Figura 35), la estructura de las vaults se quiebra, reflejada en una caída en el valor de la fuerza. En otros estudios se ha concluido que este comportamiento estaría relacionado con una ruptura permanente de la estructura estudiada (Ivanovska et al., 2011; Roos et al., 2009; Castellanos et al., 2012). Pero en el caso de las vaults, parece que el proceso es reversible (Cuellar et al., 2010), ya que se observa una recuperación de la fuerza cuando la punta de la palanca se aleja de la superficie (Figura 35). Por otro lado, las imágenes tomadas de la partícula antes y

después de los experimentos de nanoindentación, confirmaron que la estructura de la vault permanecía intacta. Cuando indentamos partículas repetidamente, encontramos el mismo comportamiento: todas las curvas FIC mostraron caídas en el valor de la fuerza relacionada con la rotura, pero la estructura permanecía inalterada en las imágenes tomadas después de este ciclo. En estas curvas también se observa que el comportamiento elástico mostrado al principio del experimento también estaba presente después de cada fractura.

Para interpretar las fracturas ocurridas en los experimentos de AFM es necesario tener en cuenta la estructura de las vaults. Teniendo en cuenta que las simulaciones de modelos moleculares sugieren que los cambios abruptos en la fuerza de indentación son debidos a la rotura de enlaces moleculares (Cieplak et al., 2010), para realizar una correcta interpretación del mecanismo de fractura, hace falta una revisión de todas las interacciones no-covalentes inter e intra-subunidades de la partícula. La estructura de la vault entera reveló que los contactos más fuertes entre MVPs se encuentra entre los dominios *cap-helix*, donde, como se comentó anteriormente, las interacciones hidrofóbicas dominan el empaquetamiento. Las interacciones intermonoméricas en la parte del barril son más débiles y principalmente involucran contactos iónicos (Tanaka et al., 2009).

Para estudiar estas fracturas en más detalle, llevamos a cabo una toma de imágenes de AFM de la zona dañada de la vault antes de su recuperación (Figura 36). Las topografías de AFM en la figura 36 mostraron la evolución de una partícula tumbada que recupero su forma inicial en 90 s. Aquí se muestra que la rotura ocurre en la dirección en la que se colocan las MVPs en el barril central de la partícula. Los perfiles ϵ y γ mostrados en la figura 36, representan la evolución de la altura en la región fracturada en las direcciones transversales y longitudinales respectivamente. Las curvas verdes y negras, las cuales representan el perfil de la altura antes y después de la fractura, confirman la recuperación estructural de la partícula; los perfiles rojos describen las regiones fracturadas: el perfil ϵ muestra que el contorno topográfico está cortado por una caída afilada, mientras que el perfil γ revela que después de crecer en altura, la topografía cae de una manera más suave. Este resultado confirma que la rotura es producida en la zona del barril central y además nos permite estudiar que el patrón de la fractura ocurre a lo largo de la dirección de los contactos entre dos MVPs. Los otros casos en los que se tomó imágenes del proceso de recuperación estructural, los

resultados iban en la misma dirección, mostrando que la dirección de rotura es independiente de la orientación de la partícula con respecto a la dirección de medida.

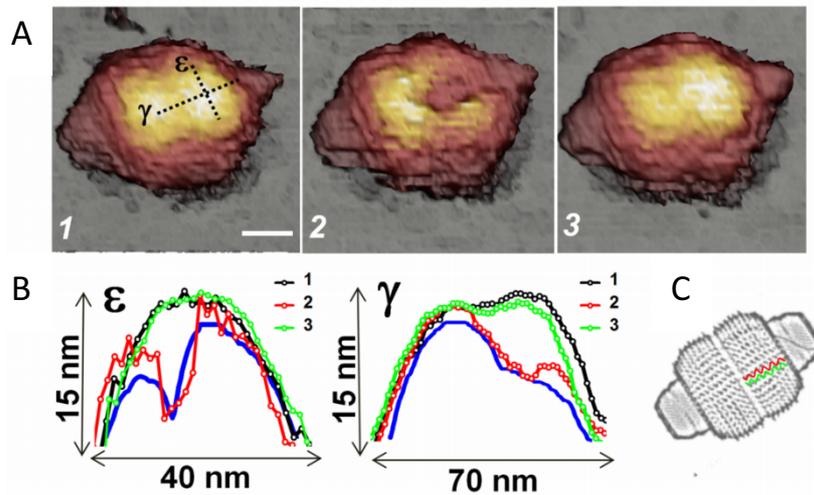


Figura 36. Estudio del proceso de reparación de las vaults. (A) Imágenes topográficas de una partícula antes de producirse la fractura (izquierda), después (medio) y después de recuperarse de la misma (derecha). Las líneas marcadas como ϵ y γ indican las direcciones transversal y longitudinal. Escala de barra: 35 nm. (B) Perfiles tomados en las direcciones ϵ y γ antes de la fractura (negro), después de la fractura (rojo) y después de la recuperación (verde). Las líneas azules están referidas al modelo de dilatación del tip (C) Fractura ocurra entre los dominios de láminas β de dos MVPs vecinas (líneas roja y verde).

El cálculo de las propiedades mecánicas mediante las FIC medidas en las vaults, nos dieron resultados en la misma dirección que los explicados en el párrafo anterior. Para partículas tumbadas, la fuerza después de la rotura muestra varios picos, mientras que en las media vaults la fuerza muestra un único pico (Figura 37). Este resultado sugiere en el caso de las medias, que la dirección de contacto entre la punta y el barril no hace posible registrar la separación secuencial de los distintos dominios de láminas beta, ya que el cap distribuye el estrés provocado en la partícula por la fuerza de indentación a lo largo de todo el barril. El patrón de los picos para partículas tumbadas sugiere una rotura secuencial, como si la estructura se abriese como con una cremallera.

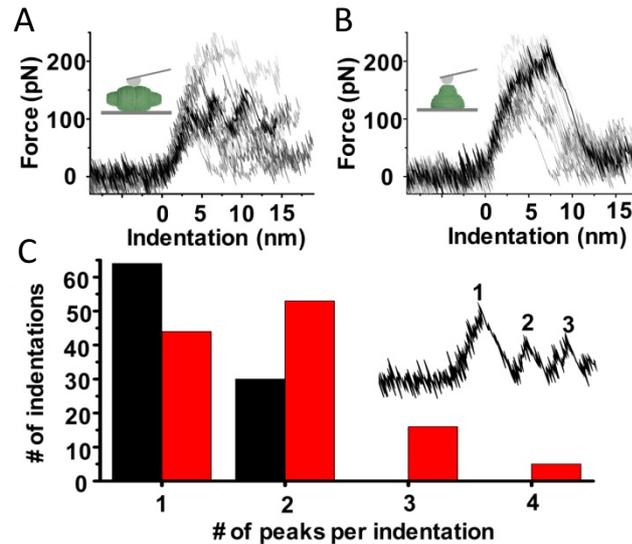


Figura 37. Estudio de las propiedades mecánicas en el proceso de recuperación de la vault.

(A) FICs para 21 indentaciones llevadas a cabo en partículas tumbadas (B) FICs para 13 indentaciones llevadas a cabo en medias vaults. (C) Histograma del número de picos contados en cada nanoindentación para las medias vault (negro) y partículas tumbadas (rojo).

3.2.4. MEDIDA DE LA DINAMICA ESTRUCTURAL EN TIEMPO REAL EN FUNCION DEL PH

Para identificar la reorganización estructural producida en las vaults al acidificar el medio, se llevaron a cabo experimentos de AFM mientras se bajaba el pH de 7.5 a 5.2, midiendo en tiempo real. Antes de iniciar el cambio de pH, se seleccionaba un área ($\sim 700\text{nm}^2$) de la superficie del sustrato que contenía las vaults adsorbidas. Primero, las partículas se equilibraron a un pH de 7.5. Al tiempo $t=0$ min (Figura 38) se empezó a bajar el pH del buffer. Se fueron tomando continuamente fotos del área seleccionada hasta que el pH disminuyó hasta 5.2 ($T=71\text{min}$, imagen 26). La figura 38 muestra seis imágenes del área seleccionada de la que se recogieron 32, mientras se bajaba el pH: se muestra la evolución de las partículas en función del pH. Se observa un descenso general en la altura de las partículas al bajar el pH; este descenso en la altura podría ser debido a la pérdida de la integridad estructural de la partícula, incluyendo daños en la estructura del barril.

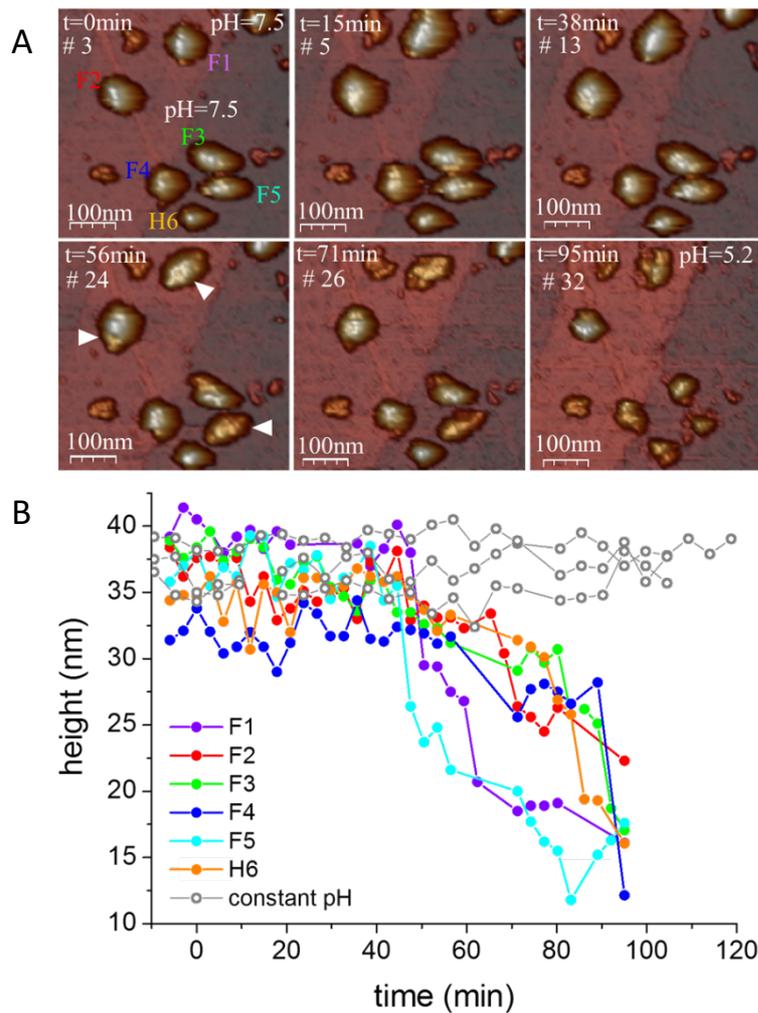


Figura 38. Efecto del descenso del pH en la estructura de las vaults. (A) Diferentes imágenes de la película adquirida durante el descenso del pH. Cada imagen está marcada con el tiempo y su orden de imagen dentro de la película. El pH se fue disminuyendo gradualmente de 7.5 (imagen #3) a 5.2 (imagen #32). La imagen #3 ($t = 0$ min) muestra la situación inicial de las partículas, con las partículas numeradas del 1 al 6: 5 partículas tumbada (F1-5) y una media vault (F6). Se marcan con flechas blancas el daño sufrido en las estructuras de las partículas.

Cuando habían transcurrido 95 min (imagen #32), las estructuras habían colapsado. (B) Evolución de la altura para cada partícula con el paso del tiempo. Desde el tiempo $t = 50$ min se observa un descenso constante de la altura de las partículas. Las líneas grises corresponden a los experimentos control e indican la evolución en la altura de las partículas de las que se tomaron imágenes a pH constante (7.5).

Imágenes tomadas a $t = 60$ min a más alta resolución confirmaron que el descenso en el pH producía la formación de depresiones en la superficie de las partículas (Figura 39). Un debilitamiento de los contactos laterales entre MVPs vecinas podría explicar estas depresiones y la disminución en la altura. Una imagen de la misma partícula tomada más tarde (Figura 39), muestra una depresión en la zona del barril. Asimismo, la partícula situada en la parte inferior de la figura 39 presenta una disminución en la altura cerca del dominio *shoulder* de la MVP, que conecta la zona del barril con el *cap*. La siguiente imagen tomada, muestra que la depresión se extiende a la otra mitad de la partícula, formando una fractura longitudinal en la vault.

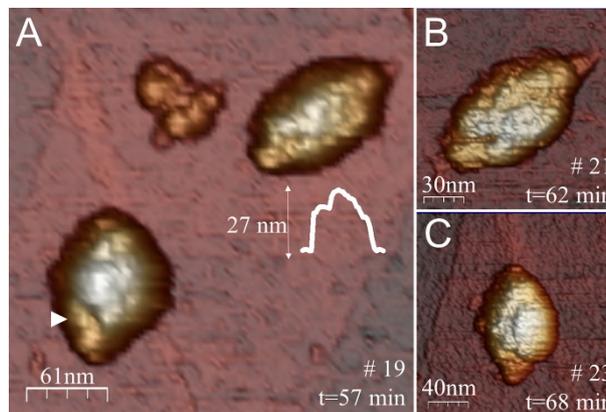


Figura 39. Imágenes de AFM de alta resolución de las partículas F1 y F2 (referida a figura 41). La región del barril presenta unos daños claros, debidos seguramente al debilitamiento de las interacciones inter-monómeros. La flecha blanca indica la pérdida de estructura cerca de la región del shoulder, medido con el perfil de altura mostrado en blanco. (B) Imagen de AFM de la partícula superior derecha de la figura A cinco minutos más tarde (C) Imagen de AFM de la partícula inferior izquierda de la figura A diez minutos más tarde. Escala de colores va de blanco-marrón-morado de los puntos más altos hasta el sustrato.

Estos datos no sugieren que el descenso en el pH produzca una apertura de las vaults en sus dos mitades por la cintura de la partícula, como había sido propuesto en estudios anteriores (Esfandiary et al., 2007). Se podría argumentar que el sustrato podría estar impidiendo la apertura de las vaults en sus dos mitades. En este caso, las interacciones entre partícula y superficie afectarían solamente a un pequeño área de la partícula, involucrando solo a unas pocas subunidades de MVP de las 39 que forman cada mitad.

Dado que partículas vaults son proteínas que pueden modificar su conformación, una división ecuatorial por la cintura de las partículas iniciada en la parte superior del barril y que creciera hasta alcanzar la parte inferior sería observable en nuestras imágenes de AFM. La unión al sustrato evitaría separarse solamente a unas pocas subunidades de MVP situadas en la parte inferior del barril, pero el resto se abrirían sin ningún problema. Otra observación que sugiere que no se abren por la mitad es que las partículas enteras de pie mantenían sus dos mitades unidas a pH 5.2. En estas orientaciones se veía como disminuía la altura de las partículas de 70 nm a 51 nm, lo que estaría de acuerdo con un debilitamiento de la estructura completa pero no con la separación en dos mitades (cada mitad mide 35 nm de altura).

Finalmente, debido a que en los experimentos de AFM se establecen contactos mecánicos con las vaults durante el proceso de toma de imágenes (Ortega-Esteban et al., 2012), fue importante descartar este efecto como la principal causa de daño o debilitamiento de la estructura. Para ello, se llevaron a cabo experimentos control de la toma de imágenes de vaults a pH neutro, pero trabajando en las mismas condiciones: área de toma de imagen, fuerza *set point* y número de píxeles. Escaneamos partículas 33 veces durante 110 minutos a un pH constante de 7.5 y no se observó una disminución significativa en la altura.

3.2.5. RIGIDEZ Y ESTABILIDAD DE LAS VAULTS EN FUNCION DEL PH

La transición estructural ocurrida en las vaults como consecuencia de la disminución del pH fue también medida usando *quartz crystal microbalance with dissipation monitoring* (QCM-D), una técnica directa y sensible que mide cambios viscoelásticos asociados con proteínas y complejos proteicos. Para medir y comparar la rigidez de las partículas, se adsorbieron sobre una superficie de cristal de cuarzo y se midieron cambios en la frecuencia y disipación en función del pH (Figura 40). Las vaults se adsorbieron durante 50 minutos, tiempo en el cual se produjo un decaimiento en la frecuencia y un aumento en la disipación. La introducción del buffer a pH 6.0 produjo una pequeña disminución en la frecuencia (12%) y también una disminución en la disipación (15%). La disminución fue más significativa en la frecuencia (45%) y en la disipación (52%) después de añadir el buffer a pH 5.0. Los cambios en la frecuencia están relacionados a un cambio en la masa unida al chip, el cual podría ser debido, por

ejemplo, a la separación de la partícula de la superficie, a una disociación/compresión parcial de las nanopartículas o a una reducción de la capa de hidratación de las vaults.

La disminución en la disipación es indicativa de un aumento en la rigidez. Un material blando es fácilmente deformable durante las oscilaciones, lo que conduce a una alta disipación, mientras un material rígido tiene una baja disipación, ya que se engancha fuertemente al cristal. El aumento en la rigidez observado aquí es probablemente debido al colapso de la partícula al bajar el pH. Un descenso del pH por debajo de 5.0 produjo un aumento brusco en la frecuencia (30%) y una disminución de la disipación (33%). Estos resultados muestran que bajar el pH, tiene un efecto desestabilizante en la estructura de las vaults, lo que en principio no es compatible con la teoría de la división de las partículas en sus dos mitades al bajar el pH.

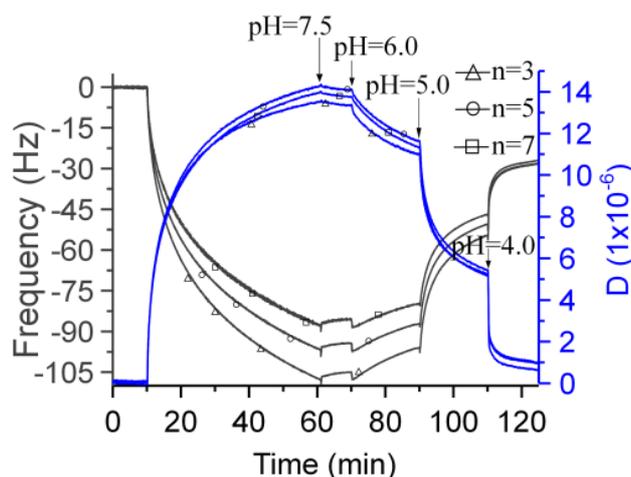


Figura 40. QCM-D análisis de las vaults. Se muestra la frecuencia en negro y la disipación en azul para 3 overtone ($n=3, 5$ y 7 , correspondiente a 15 MHz, 25 MHz y 35 MHz). Después de unir las partículas a la superficie se fue disminuyendo el pH de 7.5 a 6.0 , 5.0 y 4.0 respectivamente (flechas negras). Se observan cambios evidentes en la frecuencia y la disipación cada vez que se produce un descenso en el pH.

3.2.6. PAPEL DE LOS RESIDUOS LOCALIZADOS EN LA CINTURA DE LA PARTICULA SOBRE EL MECANISMO DE APERTURA

Con el objetivo de arrojar nueva luz sobre el mecanismo de apertura/cierre de la partícula, así como obtener información sobre la importancia de cada uno de los residuos localizados en la zona de interacción entre las dos mitades, se llevaron a cabo experimentos de microscopía electrónica de tinción negativa con vaults recombinantes formadas por la MVP nativa o sus distintos mutantes. Antes de esto, se repitieron los experimentos descritos en el artículo Goldsmith et al. (2007), donde se habían tomado imágenes de tinción negativa de las vaults recombinantes a pH ácido, observando a las partículas abiertas en sus dos mitades. Sorprendentemente, cuando bajamos el pH siguiendo el protocolo descrito en este artículo, las imágenes obtenidas por tinción negativa no mostraron ninguna partícula (Figura 41), sugiriendo que la proteína se había perdido, seguramente, al haber agregado y precipitado en el proceso de descenso del pH. Como experimento control se tomaron fotos de la misma muestra antes de bajar el pH, obteniendo micrografías llenas de partículas con una morfología similar a la observada en artículos anteriores (Buehler et al. 2014).

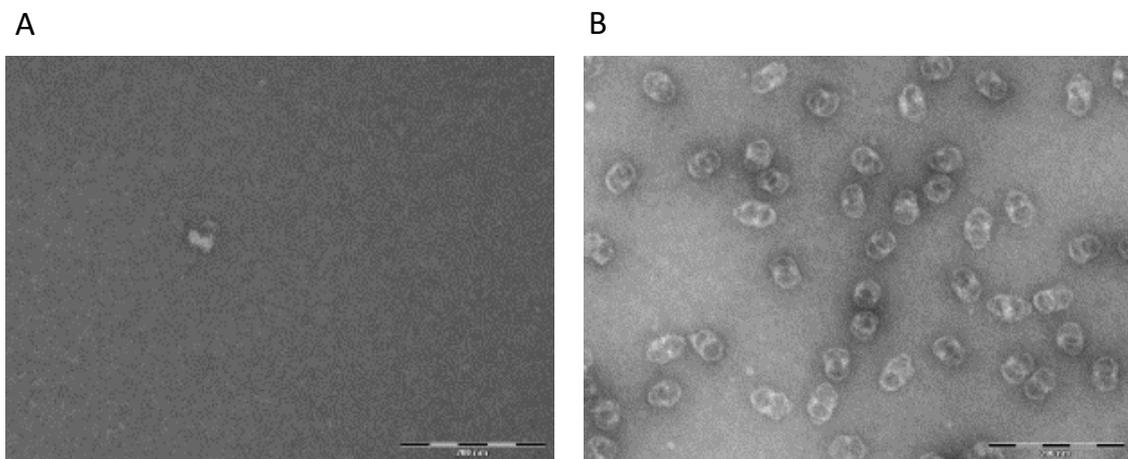


Figura 41. Imágenes de microscopía electrónica de tinción negativa de las vaults. (A) Incubadas a pH 4 durante 30 minutos antes de llevar a cabo la adsorción en las rejillas. (B) Adsorbidas en las rejillas en buffer a pH fisiológico. Barra escala: 200 nm.

Después de esta primera aproximación al mecanismo de asociación/disociación de las vaults, enfocamos el trabajo en la caracterización de las vaults formadas por mutantes de la MVP. El primer mutante es el mutante D39A, residuo que en su forma nativa establecía una interacción iónica con la Arg42 de una subunidad de la otra media partícula (Figura 42). Como se ha comentado más arriba, estudios previos proponían que a bajo pH los residuos capaces de protonarse jugarían un papel crucial en el mecanismo de apertura de las vaults desencadenado por el descenso del pH. El Asp39, con un pKa de 3.90, es un residuo capaz de protonarse a pH ácido, adquiriendo una carga neutra. Como resultado tendríamos una carga electropositiva en la superficie de interacción entre las dos mitades (debido a las Arg42), que podría desencadenar la apertura de la vaults por repulsión de cargas. Las imágenes de microscopía electrónica de tinción negativa mostraron que casi el 100% de las partículas estaban formando partículas enteras, como ocurría con las vaults formadas por MVPs nativas (Figura 43). De 736 partículas, se contabilizaron 725 partículas como vaults enteras y 11 como medias (22 medias vaults en total).

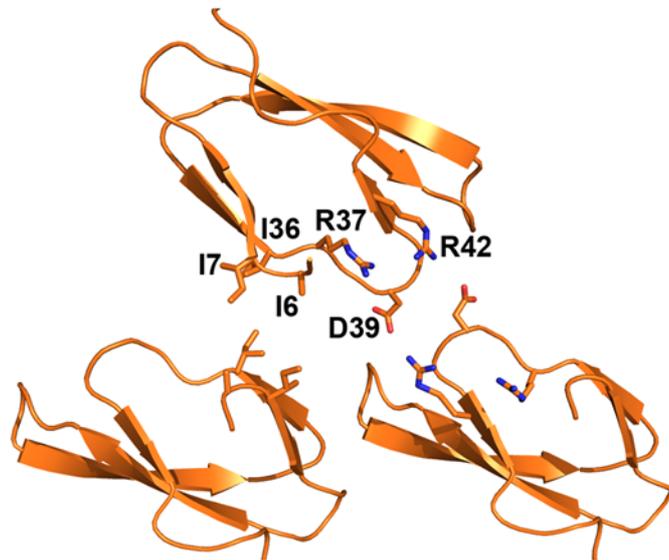


Figura 42. Interacciones R1-R1 en la zona de interacción entre las dos mitades de la vault.

El dominio de referencia (superior) establece contactos con dos dominios R1 consecutivos (PDB id: 4HL8; Casañas et al., 2013)

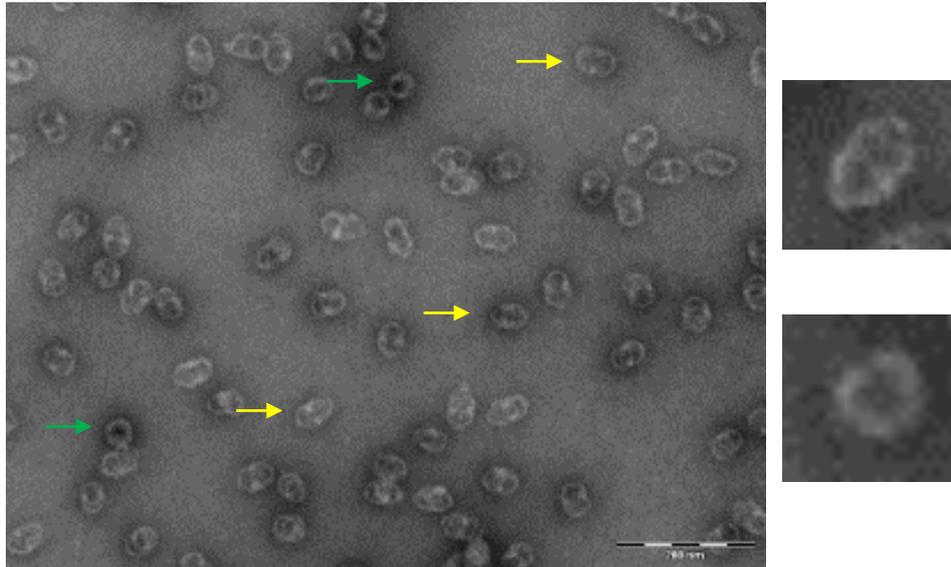


Figura 43. Imagen de microscopía electrónica de tinción negativa de vaults formadas por el mutante D39A de MVP. Se marcan con flechas amarillas partículas enteras y con verdes las medias vaults. Escala barra: 200 nm. A la izquierda se pone un ejemplo de una vault entera (arriba) y de media vault (abajo) para facilitar la identificación de ambas en la micrografía.

El segundo mutante de MVP se diseñó con el objetivo de romper el clúster hidrofóbico formado entre las dos mitades, por los residuos Ala6, Ile7 e Ile36. Con este fin, mutamos el residuo Ile7 a lisina. La elección de este residuo en vez de otro dentro del clúster hidrofóbico, estuvo basado en dos observaciones: por un lado, los alineamientos de secuencia de las MVP de diferentes especies muestra que este residuo está altamente conservado (Figura 11) y por otro lado, su localización en el centro del clúster hidrofóbico parece crucial para la formación del mismo. Sorprendentemente, las imágenes de tinción negativa tomadas mostraron la presencia de muchas más partículas formando medias vaults (Figura 44) que en las imágenes de la MVP nativa y del primer mutante. De 883 partículas, se contabilizaron 788 partículas como vaults enteras y 95 como medias (190 medias vaults en total).

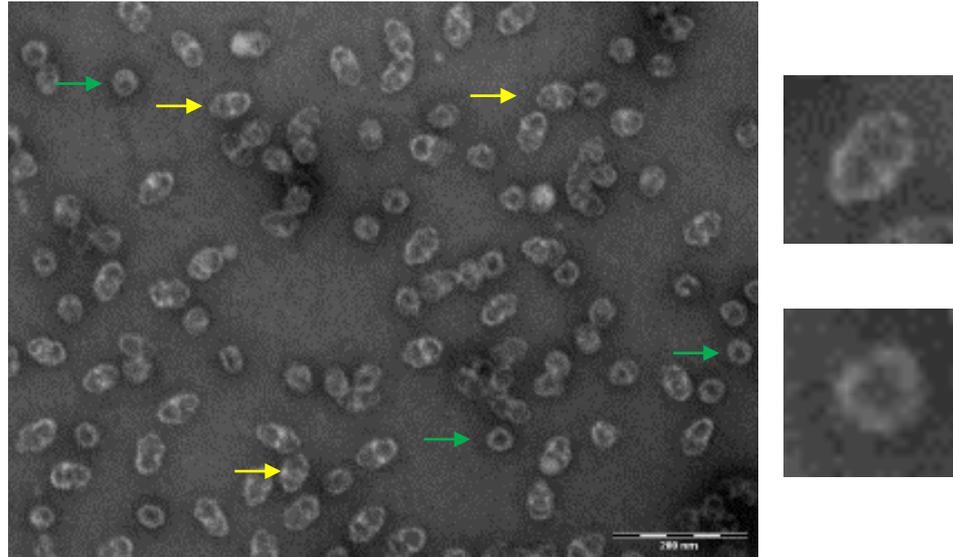


Figura 44. Imagen de microscopía electrónica de tinción negativa de vaults formadas por el mutante I7K de MVP. Se marcan con flechas amarillas partículas enteras y con verdes las medias vaults. Escala barra: 200 nm. A la izquierda se pone un ejemplo de una vault entera (arriba) y de media vault (abajo) para facilitar la identificación de ambas en la micrografía. Se observan muchas más medias vaults que en el mutante anterior.

El último mutante diseñado es un mutante múltiple en el que se llevaron a cabo varias mutaciones en la interfase de interacción entre las dos mitades de la vault, con el objetivo de obtener la mayoría de las partículas disociadas. Tenemos cuatro residuos mutados (MVP x4): por un lado los residuos Asp39 y la Ile7 mutados anteriormente y, aparte, otros dos residuos cargados localizados también en la intersección de las dos mitades y que son capaces de ser protonados en medio ácido, el Glu4 y el Glu5. Las imágenes de TEM mostraron un resultado inesperado (Figura 45): las mutaciones en la cadena de residuos rompió las interacciones entre los dominios R1 que mantenían unidas las dos mitades, lo que dio como resultado la obtención de un gran número de medias vaults. Pero estas, en vez de encontrarse en disolución de forma individual, se organizaron una sobre otra de tal manera que formaban como torres de piezas de construcción. Se observaron así “torres” de medias vaults formadas por 2, 3 o, en algunos casos, 4 medias vaults superpuestas, formando una población muy heterogénea de partículas. De 615 partículas, se contabilizaron 187 partículas como vaults enteras, 32 como medias vaults individuales y 396 como torres de medias vaults.

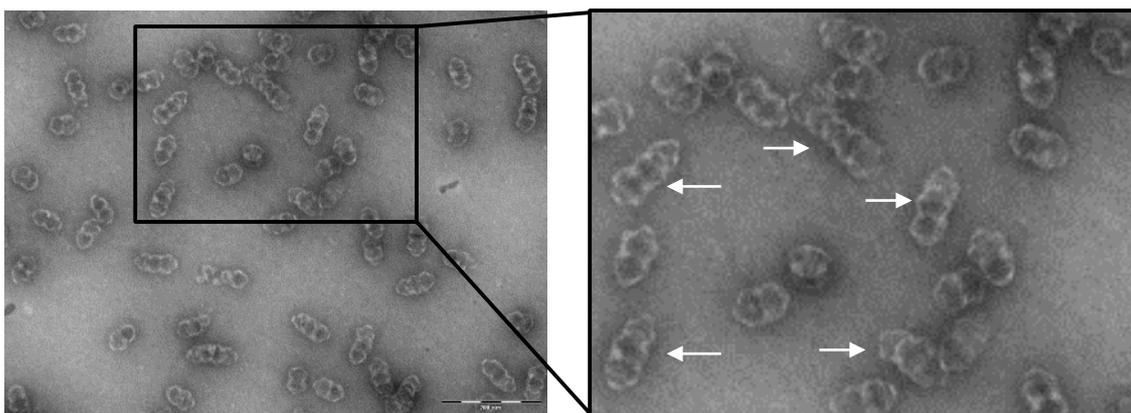


Figura 45. Imágenes de microscopia electrónica de tinción negativa de vaults formado por los mutantes MVPx4. En la derecha se ha hecho una ampliación de una sección de la imagen original donde se pueden observar las “torres” de medias vaults (señaladas con flechas blancas).

Si se ponen en conjunto todos los resultados obtenidos de los experimentos de microscopia electrónica de tinción negativa (Tabla 4), se observa que el porcentaje de partículas formando medias vaults es mayor en el mutante de la MVP Ile7 que en el Asp39, sugiriendo que las interacciones hidrofóbicas son también importantes en la asociación de las mismas para dar vaults enteras. Los datos obtenidos para el cuádruple mutante, muestran una disminución dramática en el número de vaults enteras a favor de medias vaults, ya sean individuales o formando “torres” de medias vaults. Este último resultado muestra la importancia del papel que desempeñan las interacciones hidrofílicas en el mecanismo de apertura/cierre de esta partícula.

Tabla 4. Porcentajes de vaults presentes como partículas enteras o medias (o “torres” de medias vaults) contabilizada a partir de las imágenes de microscopia electrónica de tinción negativa para cada uno de los mutantes de MVP y la forma nativa.

	MVP wt	MVP D39A	MVP I7K	MVP x4
Vaults enteras	97.6%	97.2%	88%	30%
Medias vaults	2.4%	2.8%	12%	30%
Torre de medias vaults	-	-	-	88%

3.2.7. MEDIDA DE LA FUERZA DE ASOCIACION DE LAS VAULTS MUTANTES

Se llevaron a cabo experimentos de AFM con los distintos mutantes de MVP para estudiar el efecto de las mismas en la estabilidad de la asociación de las dos medias vaults. Para ello, nos centramos en estudiar las partículas individuales tumbadas sobre el barril, realizando nanoindentaciones para encontrar diferencias en el valor de la fuerza necesaria para romper las partículas en sus dos mitades.

En los ensayos llevados a cabo sobre partículas individuales de los distintos mutantes de MVP, se produjo la fractura de las partículas en el barril en la dirección de las MVPs, no por la cintura. Aunque las mutaciones afectaban a la zona de interacción de las dos mitades, no es del todo inesperado que no se produjera la rotura en esta dirección vistos los resultados obtenidos en los estudios previos de AFM. Con estas nanoindentaciones también se obtuvo información sobre los valores de la constante elástica y la fuerza de rotura, pero no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para las vaults nativas y los obtenidos para los distintos mutantes de MVP. En vista de no encontrar diferencias significativas entre los distintos tipos de vaults en estos ensayos, se observó que la distribución de la población de partículas entre las diferentes orientaciones de adsorción variaba de unos mutantes a otros. Se contabilizó el número de partículas que se encontraban como partículas enteras o como medias vaults adsorbidas en el sustrato (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de vaults presentes como partículas enteras o medias contabilizadas a partir de las imágenes de AFM para cada uno de los mutantes de MVP y la forma nativa.

	MVP wt	MVP D39A	MVP I7K	MVP x4
Vaults enteras	75.0 %	69.3 %	56.7 %	6.1 %
Medias vaults	25.0 %	30.7 %	44.3 %	93.9 %

Como se observa en la tabla 5, las vaults formadas por MVP nativas presentaban una población donde la mayoría de las partículas se encontraban formando partículas enteras (75%). Para el mutante D39A, la proporción entre medias vaults y partículas enteras descendió un poco con respecto al nativo (69.2 %), pero no puede decirse que sea significativo. Fue en el mutante I7K de la MVP, donde la disminución en la población de partículas enteras se hace importante, cayendo hasta un 57% de las partículas contabilizadas, casi un 20% más de partículas formando medias vaults que en las nativas. Por último, en el cuádruple mutante el descenso en el número de partículas enteras fue dramático; de todas las partículas medidas solo un 6% eran partículas enteras, frente a un 94% de partículas medidas formando medias vaults individuales (Figura 46).

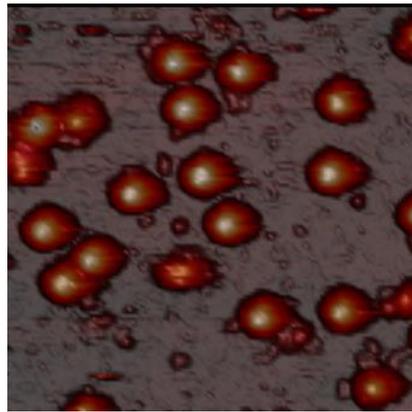


Figura 46. Imagen topográfica de AFM de una muestra de vaults formadas por MVP x4.

Se observa que todas las partículas presentes en este campo son medias vaults. La escala en altura en la topografía va de blanco-marrón-gris, yendo de más alto a más bajo.

Las diferencias en las poblaciones de vaults formando partículas enteras y medias vaults para cada mutante están en consonancia con los resultados observados en los experimentos de microscopia electrónica.

3.2.8. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA ESTABILIDAD TERMICA DE LAS VAULTS

Se llevaron a cabo estudios de la estabilidad térmica de las partículas midiendo la fluorescencia con respecto a la temperatura. El estudio se planteó en la dirección de que las partículas más estables tendrán temperaturas de desnaturalización más altas. Por lo tanto, en el caso de mutaciones en la MVP que afectan a la unión de las dos mitades de la vault, debería observarse una temperatura de desnaturalización menor.

En los gráficos se representa la variación en la emisión de fluorescencia en función del aumento de la temperatura. Cuando la proteína se va desplegando, va exponiendo la superficie hidrofóbica, la cual se une al agente de tinción, produciendo un aumento en la fluorescencia, hasta que la temperatura llega a un punto donde la proteína empieza a agregar y provoca una caída en la medida de la fluorescencia. La temperatura en este punto se denomina temperatura de fusión (T_m) y es un indicador de la estabilidad de la proteína. Si lo que se representa es la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura, la identificación de la T_m es mucho más clara.

Los resultados obtenidos y medidos por triplicado (Figura 47), dan una T_m para la MVP nativa de $59,0^{\circ}\text{C}$, para el mutante D39A de $58,6^{\circ}\text{C}$, un valor muy similar al de la nativa y para el mutante I7K bajo hasta los $55,6^{\circ}\text{C}$, sugiriendo que estas partículas son más inestables que las nativas. Pero fue en el cuádruple mutante de la MVP donde la bajada del valor de la T_m fue más drástico, alcanzando un valor de $46,3^{\circ}\text{C}$, trece grados por debajo del valor obtenido para las partículas formadas por la MVP nativa.

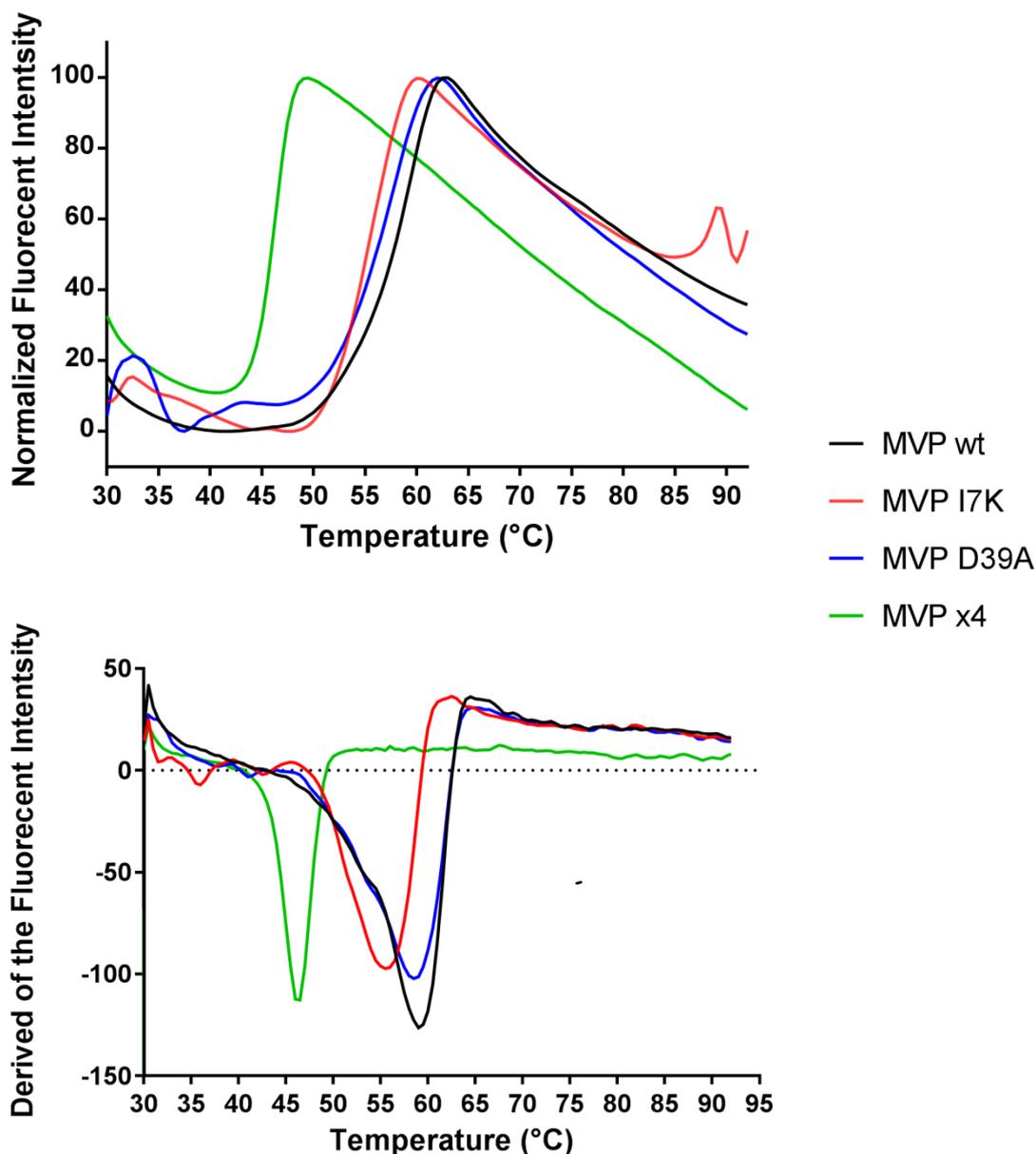


Figura 47. Curvas de los ensayos de thermofluor, representando arriba la intensidad de la fluorescencia en función de la temperatura y abajo la derivada de esta en función de la temperatura para cada uno de los distintos mutantes de MVP y su forma nativa.

La medida de la estabilidad térmica muestra unos resultados en consonancia a los obtenidos por las otras dos técnicas con las que se han analizado los mutantes de MVP. La rotura del clúster hidrofóbico presente en la zona de interacción entre las dos medias vaults es más desestabilizante que la desaparición de las interacciones iónicas en la asociación de las dos mitades. Sin embargo, es en el caso en que ambos tipos de interacciones desaparecen cuando se produce una desestabilización total de la partícula.

3.2.9. IMPLICACIONES BIOLÓGICAS Y NANOTECNOLÓGICAS

Varios estudios han revelado que la vault es una estructura dinámica capaz de “respirar” y permitir el paso de material del exterior al interior de la misma (Poderycki et al., 2006). Aunque la función concreta de las vaults todavía no se conoce, está ampliamente aceptado que actúan como transportadores celulares. Nuestros experimentos aportan nuevas características a la dinámica de estas partículas en situación de estrés mecánico. Demostramos que las uniones entre las MVPs son capaces de ser autoreparadas simplemente por encontrarse en un medio líquido a temperatura ambiente. Esta característica indica que estas partículas son altamente adaptativas a deformaciones mecánicas, haciéndolas capaces de comportarse como nanotransportadores capaces de adaptarse a limitaciones geométricas. De hecho, estas partículas podrían ser capaces de transportar material desde la envuelta del poro nuclear (Chugani et al., 1993; Dickenson et al., 2007), una puerta con un diámetro de 39 nm (Pante y Kann, 2002), menor que el de la vaults (40 nm).

Por otro lado, las vaults se presentan como un prometedor sistema de transporte celular de fármacos debido a su biocompatibilidad y a la capacidad de ser modificadas para dirigirlas a células diana con fármacos en su interior. Estas partículas exhiben un mecanismo de apertura altamente regulado para incorporar y transportar eficientemente un cargo específico. El entendimiento de la dinámica de las vaults resulta necesario para entender cómo transcurre este mecanismo. La recuperación de la rotura mecánica sufrida explicada anteriormente, está probablemente relacionada con la naturaleza de las interacciones inter-dominios y la geometría impuesta en esta peculiar partícula. En este caso, las interacciones entre los dominios de láminas- β del barril son suficientemente lábiles para permitir que las partículas sufran unos cambios conformacionales reversibles. De hecho, la fuerza que las vaults deben experimentar para romperse es relativamente bajo comparado con los de otros ensamblados moleculares (Ivanovska et al., 2004; Michel et al. 2006). Por estas razones, las vaults parecen estar optimizadas para autorepararse después de una fractura mecánica. Aunque se había sugerido que estas capacidades podrían estar presentes en otros ensamblados proteicos (Schaap et al., 2006), nuestros experimentos presentan por primera vez un mecanismo de recuperación de la rotura que ha sido topográficamente monitorizado por primera vez. Por lo tanto, parece que las vaults podrían haber evolucionado para facilitar estos cambios conformacionales que ocurren de manera reversible. Esta capacidad podría ser

aprovechada para inspirar a la ciencia de nanomateriales en el diseño de nanocontenedores.

El análisis de las interacciones laterales entre las distintas subunidades de la partícula, usando la estructura de la partícula entera (PDB id: 4HL8), mostró la presencia de unos residuos en las interfases entre MVPs (His85, His464, His534 y His592) que serían fácilmente protonables a pH ácido (Figura 48). Se podría pensar que la protonación de esos residuos al acidificar el medio desestabilizaría las interacciones iónicas en estas regiones, debilitando las interacción laterales entre MVP en la zona del barril y desencadenando la formación de las depresiones observadas en las imágenes de AFM. El debilitamiento de estas interacciones entre subunidades también sería compatible con los experimentos donde la punta del AFM producía una fractura que se recuperaba por ella sola en la superficie de la partícula en lo largo de la dirección de contacto entre las MVPs y no en la dirección de la cintura.

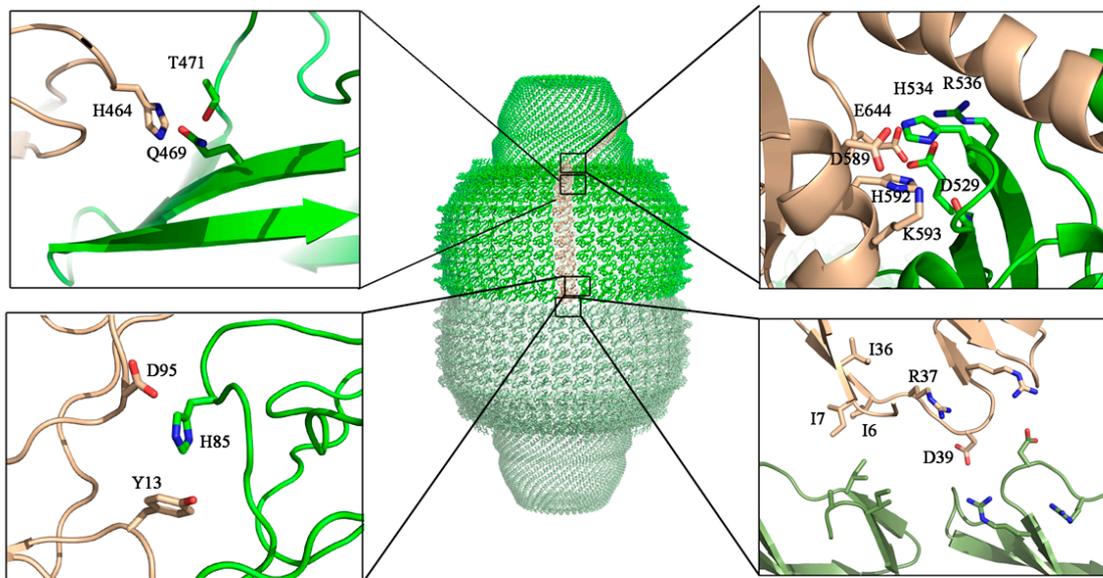


Figura 48. Estudio de las interacciones inter-subunidades de la estructura de la vault.

Estructura de la vault coloreada en verde brillante la mitad superior y verde palo la mitad inferior de la partícula. Una de las 78 copias que forman la partícula está coloreada en beige (PDB id: 4HL8). Los cuadros izquierdos muestran las interacciones interdominios donde está presente alguna histidina en el dominio R2 (abajo) y R9 (arriba). La figura superior derecha muestra las interacciones electrostáticas presentes en el shoulder. La figura inferior derecha muestra las interacciones entre dominios R1 que forman la zona de interacción entre las dos mitades.

Por último, los datos obtenidos en el estudio de la estabilidad de los distintos mutantes de MVP han revelado el papel de los distintos residuos que forman la interfase entre las dos mitades de la vault y por consiguiente, los mecanismos de asociación/disociación de la partícula. En vista de los resultados obtenidos, no es absurdo pensar en el diseño de un “ejercito” de mutantes de vaults, con diferentes mutaciones en los residuos de la región de asociación. Estas vaults mutantes presentarían distintas velocidades de apertura en medio líquido. En una situación hipotética la mezcla de las distintas vaults mutantes encapsularían el fármaco deseado y, una vez internalizadas dentro de la célula, podría llevarse a cabo el control de la liberación del agente terapéutico a distintos tiempos, dependiendo del tipo de mutantes de la MVP y de sus proporciones dentro de la población de vaults usada.

**CARACTERIZACION DE LA
ESTRUCTURA DE LA PROTEINA TEP1**

3.3. CARACTERIZACION DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEINA TEP1

3.3.1. EXPRESION DOMINIO TROVE

En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda de las estructuras de proteínas resueltas que contuvieran el dominio TROVE, obteniendo dos resultados: la estructura de la proteína Ro de *Xenopus laevis* (PDB id: 1YVR; Stein et al, 2005) y la de la proteína Rsr de *Deinococcus radiodurans* (PDB id: 2NVO; Ramesh et al., 2007). Como se ha comentado anteriormente, el dominio TROVE ha sido identificado en tres ribonucleoproteínas (Ro, telomerasa y vault) y se ha definido como un dominio de interacción con RNA, es más, la estructura de la Rsr de *D. radiodurans* también se resolvió en complejo con un RNA (Ramesh et al., 2007). Se utilizaron estas estructuras para hacer una predicción de los elementos de estructura secundaria de la secuencia de TEP1 alrededor de este dominio utilizando el *software* Phyre2 (Kelley et al., 2015), con el objetivo final de diseñar diferentes constructos para la cristalización de esta región de la proteína (Figura 49). Se hicieron constructos tanto del dominio TROVE (definido entre los aas 249-678) por si solo y con el dominio vWa (definido entre los aas 680-779), presente justo después en la secuencia. En el caso de las estructuras de las proteínas Ro resueltas, ambos dominios fueron cristalizados juntos. Se diseñaron cinco constructos distintos de ambos dominios juntos y otro que contenía solo el dominio TROVE. Todos ellos fueron clonados en tres vectores distintos, cada uno de ellos expresa proteínas fusionadas a una cola de seis histidinas (HIS), una glutatión-s transferasa (GST) y una proteína de unión a maltosa (MBP). Se hicieron pruebas de solubilidad y sobreexpresión de todos ellas en la cepa *E.coli* BL21 (DE3) sin obtener ningún constructo soluble (Tabla 6). Todas las pruebas se llevaron a cabo a dos temperaturas de inducción diferentes (37° y 22°C) y a dos concentraciones de IPTG distintas (1 mM y 0.5 mM) sin obtener en ninguno de los casos proteína soluble.

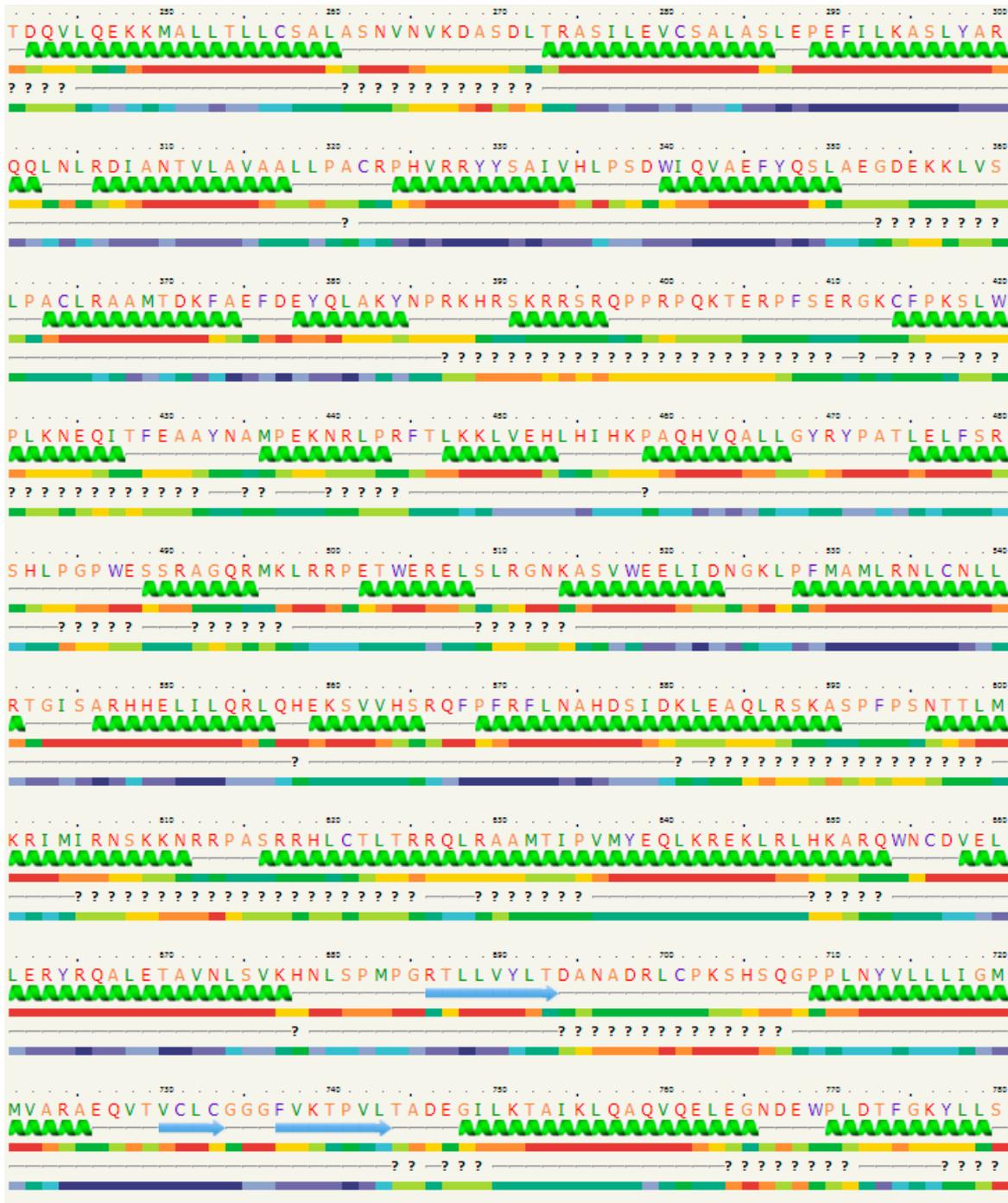


Figura 49. Esquema de la predicción de elementos de estructura secundaria de la región que engloba los dominios TROVE y vWA de la secuencia de la TEP1 obtenido con Phyre2.

Tabla 6. Esquema de los resultados obtenidos en las pruebas de solubilidad de los diferentes constructos diseñados de la región TROVE de la TEP1, inducidos a 37°C y 1 mM IPTG. Los resultados obtenidos a 32°C y 0.5 mM IPTG no mejoraron lo mostrado en esta tabla.

	pETM30 MBP	pGex-6P1 GST	pET28a HIS
AAAs 223-679	Degrada	No soluble	No soluble
AAAs 223-885	Degrada	Degrada	No soluble
AAAs 239-885	Degrada	No soluble	No soluble
AAAs 244-885	Degrada	No soluble	No soluble
AAAs 270-885	Degrada	Degrada	No soluble
AAAs 223-874	Degrada	Degrada	No soluble

En el artículo del año 2005 donde Poderycki definió la región más pequeña para la asociación de la TEP1 con el vRNA, se llevaron a cabo, entre otros, la expresión de un constructo de la TEP1 de ratón del residuo 201 al 871 en la cepa *E. coli* BL21 CodonPlus, el cual era soluble y fue utilizado para realizar ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés *electrophoretic mobility shift assay*). Se intentó repetir esta expresión siguiendo paso a paso lo explicado en los materiales y métodos del artículo citado, pero no se consiguió proteína soluble.

Con todos los constructos descritos arriba hicimos también pruebas de sobreexpresión y solubilidad utilizando la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus (Stratagene), células capaces de obtener altos niveles de expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*. La producción eficiente de proteínas heterólogas en *E. coli* esta frecuentemente limitada por la rareza de ciertos tRNAs, que son abundantes en el organismo del que viene la proteína. La cepa BL21 CodonPlus está diseñada para contener copias extras de los genes que codifican los tRNA que más frecuentemente limitan la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli*. Aunque el nivel de expresión se vio mejorado en general, no se obtuvo ningún constructo soluble.

En vista de los resultados obtenidos en los intentos de expresión en bacterias, cambiamos de sistema de expresión y utilizamos el sistema de expresión de baculovirus (Life technologies). Todos los constructos descritos arriba, incluyendo el definido en el artículo de Poderycki et al., (2005), fueron clonados dentro del vector pFastBac Hta

(Invitrogen) para producir los baculovirus recombinantes correspondientes, con los que expresar proteína en células de insecto. En todos los casos las pruebas de sobreexpresión y solubilidad mostraron que, mientras que sí se expresaban todos ellos, ninguno resultó ser soluble.

3.3.2. EXPRESION DE LA TEP1

El interés principal de este proyecto era obtener la estructura de la proteína TEP1 entera, pero debido a su gran tamaño, parecía más fácil obtener gran cantidad soluble del dominio de unión a RNA. En vista de los problemas que iban surgiendo para obtener un constructo soluble de esta región, se decidió llevar a cabo en paralelo la expresión de la TEP1 entera. En primer lugar, se utilizó el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto, ya que el tamaño de la proteína (290 kDa) la hacía impensable para su expresión en bacterias (el límite de tamaño para la expresión de proteínas heterólogas en bacterias suele marcarse en 100 kDa). Una vez obtenido el baculovirus recombinante de esta proteína, se llevaron a cabo pruebas de sobreexpresión y solubilidad en células H5, observando una sobreexpresión de la proteína entera, pero a un nivel muy bajo (este sistema de sobreexpresión está caracterizado por obtener unos niveles de sobreexpresión altísimos). La poca proteína que se producía, no era soluble. Para intentar solubilizarla se modificó el buffer de lisis (subir concentración de NaCl y añadir diferentes detergentes a distintas concentraciones) así como modificaciones en el proceso de lisis celular (tratamiento a temperatura ambiente con DNAsa I y RNAsa A).

Con el fin de aumentar el nivel de expresión de la proteína en este sistema, se llevó a cabo la optimización de los codones de la secuencia de la proteína TEP1 de ratón para su expresión en células de insecto H5, usando el programa Optimizer (Puigbo et al., 2007). Una vez diseñado y adquirido el gen con los codones optimizados, se clonó en el vector de interés y se obtuvo el baculovirus recombinante. Las pruebas de sobreexpresión y solubilidad no mostraron ningún aumento en el nivel de expresión ni en la solubilidad de la proteína. Se estuvo trabajando durante largo tiempo modificando las condiciones de infección y purificación, con el fin de mejorar estos resultados, pero no se obtuvo nada mejor.

Ante la imposibilidad de obtener proteína soluble en este sistema de expresión, se decidió intentar expresar la TEP1 en células de mamífero. En principio este sistema parecería el idóneo, ya que el gen es el de una proteína de mamífero (ratón). Se utilizó el sistema de expresión de los virus de vaccinia recombinante (rVV), donde primero se llevó a cabo la generación del rVV de la proteína de interés, como se describirá en materiales y métodos. Se llevaron pruebas de sobreexpresión a dos temperaturas distintas de inducción (37° y 32°C), así como a distintas concentraciones de IPTG, obteniendo los mayores niveles de sobreexpresión a 32°C y 2 mM de IPTG. En las pruebas de solubilidad llevadas a cabo en estas condiciones de sobreexpresión (y en el resto) no se detectó proteína soluble. Al igual que se hizo para la expresión en el sistema de baculovirus, se modificó tanto el buffer de lisis como el proceso de lisis celular con el fin de solubilizar la proteína, sin mejorar en nada la solubilidad de la proteína.

3.3.3. CO-EXPRESION DE TEP1 CON MVP PARA LA GENERACION DE VAULTS CON TEP1 EN SU INTERIOR

Como se describió en la introducción, la TEP1 es una proteína que se encuentra presente en las células formando parte de dos complejos ribonucleoproteicos: por un lado la partícula vault y por otro el complejo telomerasa. Nuestro laboratorio tiene experiencia en la purificación de vaults endógenas de rata, formadas por MVP, TEP1, vPARP y el vRNA; así como en la producción y purificación de vaults recombinantes, formadas únicamente por la MVP. Con el objetivo de intentar obtener la TEP1 soluble, se llevaron a cabo la coexpresión de esta proteína junto a la MVP en células de insecto y de mamífero.

En el primer caso, se coinfectaron las células de insecto con los baculovirus recombinantes de MVP y TEP1 y después, se llevó a cabo el protocolo de purificación de vaults recombinantes igual que se hacía en el caso de las infecciones con el baculovirus de MVP solo. Una vez purificadas las partículas, se observó en los geles de SDS-PAGE, que aparte de la banda en torno a los 100 kDa debido a la MVP, aparecía una banda muy arriba en el gel por encima de los 250 kDa (Figura 50 B). Esta banda nunca se había observado en las purificaciones previas de vaults recombinantes (Figura 50 A). También se observaban una serie de bandas muy numerosas por debajo de la banda asignada a la MVP. El análisis por *western blot* de la banda de alto peso

molecular confirmó que esta correspondía a la proteína TEP1 (Figura 50 C). Esta fue la primera vez que se observó la proteína TEP1 en una fracción soluble. Sin embargo, el *western blot* también dio señal para la mayoría de las otras bandas con pesos moleculares mucho menores que el teórico de TEP1, sugiriendo que se obtenía una mezcla de vaults con TEP1 entera en su interior, junto a vaults que contenían distintos fragmentos de TEP1 generados de la degradación de la misma. Con el objetivo de intentar disminuir esta degradación, se llevaron a cabo varias pruebas con los inhibidores de proteasas presentes en el set de inhibidores de proteasas de Roche, sin obtener diferencias en el patrón de bandas atribuidas a la TEP1.

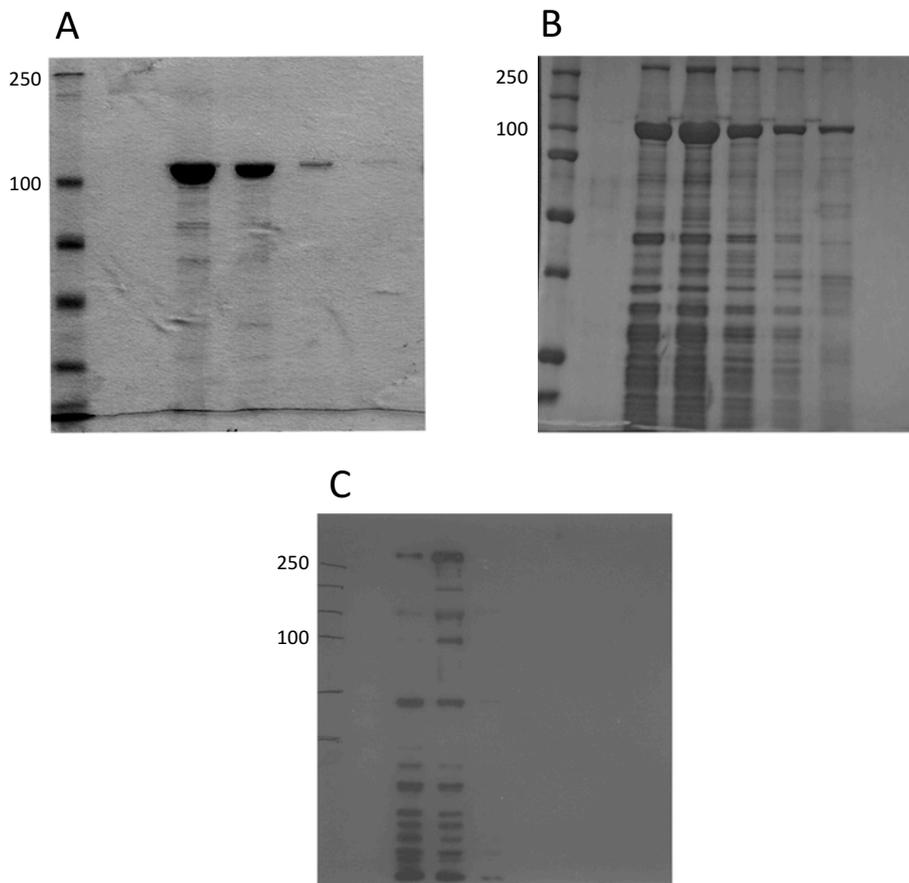


Figura 50. Geles de SDS-PAGE y *Western blot* de las distintas fracciones obtenidas de la purificación de las vaults de células de insecto. (A) Gel de SDS-PAGE de la expresión de solo la MVP. (B) Gel de SDS-PAGE de la expresión de MVP y TEP1. (C) *Western blot* usando un anticuerpo α TEP1 de la coexpresión de MVP y TEP1.

En este sistema de expresión se generan muchas proteasas debido al proceso de infección con baculovirus, lo que podría explicar el alto nivel de degradación de nuestra proteína. Para intentar reducir la degradación que sufre la TEP1, se decidió llevar a cabo la expresión en células de mamífero, usando el sistema de expresión de rVVs. Para ello, se coinfectó con los rVVs de la MVP y de la TEP1 conjuntamente y se siguió el protocolo de purificación de vaults recombinantes. Igual que ocurría en el caso de la expresión en células de insecto, en las fracciones donde se observaba una banda en torno a los 100 kDa debida a la MVP, se observaba otra de alto peso molecular por encima de los 250 kDa. A diferencia de lo observado en el caso de la expresión en células de insecto, no aparecen muchas bandas por debajo de 100 kDa. Se llevó a cabo la comprobación de si la banda de gran peso era debida a la TEP1 mediante un *western blot* (Figura 51 B), confirmando que lo era y que en el caso de las bandas de bajo peso molecular, no había tantas ni tan intensas que diesen señal en el *western blot* α TEP1. Estos resultados muestran que la proteína se degrada mucho menos cuando se produce en células de mamífero usando el sistema de expresión de rVVs.

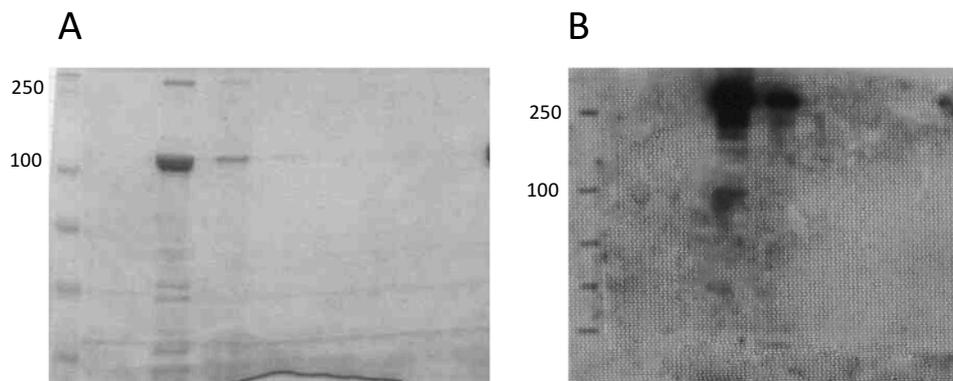


Figura 51. Geles de SDS-PAGE y *western blot* de las distintas fracciones obtenidas de la purificación de las vaults de la expresión de MVP y TEP1 en células de mamífero. (A) Gel de SDS-PAGE. (B) *Western blot* usando un anticuerpo α TEP1.

3.3.4. CRIOMICROSCOPIA ELECTRONICA DEL COMPLEJO VAULT-TEP1

Teniendo en cuenta el tamaño de la vault y la imposibilidad de utilizar la cristalografía para dilucidar la estructura de la TEP1, cuando esta se encuentra dentro de la vault (ya que la cristalización del complejo estaría dirigido por las vaults y la TEP1 localizada en su interior, se vería como un promediado de todas sus posible orientaciones dentro de la partícula), se decidió que la mejor manera de estudiar la estructura de nuestra proteína, sería a través de la criomicroscopía electrónica (cryo-EM). Además, teniendo en cuenta los últimos avances tecnológicos y metodológicos explicados en la introducción, donde se están obteniendo estructuras a resoluciones a nivel atómico en proteínas sin simetría, la elección de esta técnica se hizo más atractiva.

La caracterización mediante microscopia electrónica y tinción negativa de las partículas purificadas según el protocolo descrito en los materiales y métodos, mostró que estas tendían a formar agregados al ser concentradas (Figura 52 A). Además, el análisis preliminar mediante cryo-EM, llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Castón (CNB, Madrid), reveló que las partículas tendían a adsorberse únicamente sobre el carbono de las rejillas, dejando los agujeros (donde serán adquiridas las imágenes) prácticamente vacíos. Con el fin de eliminar los contaminantes responsables de este comportamiento, se introdujo un segundo paso de purificación en el protocolo. Este se basaba en la ultracentrifugación de la muestra en un colchón de CsCl al 36%, lo que permitía obtener partículas a alta concentración no agregadas (Figura 52 B). La obtención de muestra a alta concentración es necesaria para conseguir rejillas con una alta proporción de partículas en los agujeros de la misma.

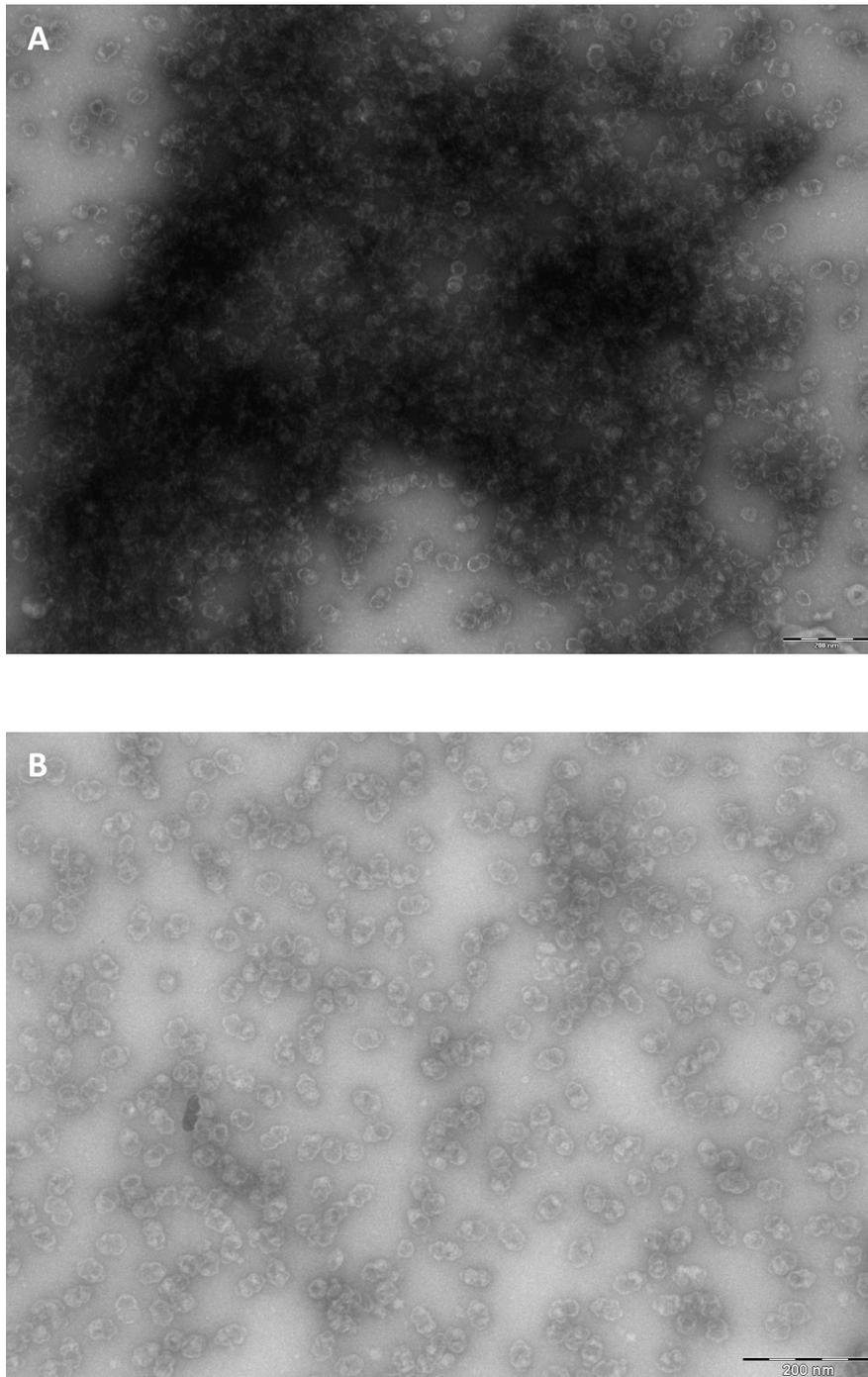


Figura 52. Micrografías de tinción negativa de vaults con TEP1 en su interior después de ser concentradas. (A) Antes de incorporar el colchón de CsCl al protocolo de purificación: se ve como las partículas se pegan unas a otra formando un gran agregado de vaults. (B) Después del colchón de CsCl: las partículas ya no forman esos agregados tan grandes al estar a alta concentración.

Una vez tuvimos una muestra óptima, se hicieron rejillas Quantifoil de agujeros para llevar a cabo una primera recogida de imágenes, con el fin de hacer una reconstrucción preliminar a baja resolución del complejo. Con esta reconstrucción se decidiría si esta muestra era susceptible de análisis a alta resolución. Para esta reconstrucción, se recogieron 509 micrografías con un microscopio electrónico FEI Tecnai G2 equipado con un *Field emission gun* que opera a 200 kV con un CCD. De estas, se llevó a cabo un picado de 15280 partículas, las cuales se utilizaron para hacer una clasificación 2D con 64 clases. De las 64 clases nos quedamos con ocho clases, que contenían 11887 partículas en total (Figura 53). Con todas ellas se realizó una clasificación 3D con 3 clases distintas, quedándonos finalmente con una de ellas que englobaba 9793 partículas. Con estas partículas se llevó a cabo un refinamiento del modelo 3D del complejo (Figura 54) aplicando simetría C1, alcanzando una resolución de $\sim 32 \text{ \AA}$. En este modelo se ve la vault bien definida con una densidad de forma circular en su interior, la proteína TEP1. Lo importante de este mapa no es la vault en sí, sino que se observa por primera vez una densidad atribuida a la TEP1 en el interior de la partícula, localizada entre el cap y la zona donde empieza el barril de la partícula.

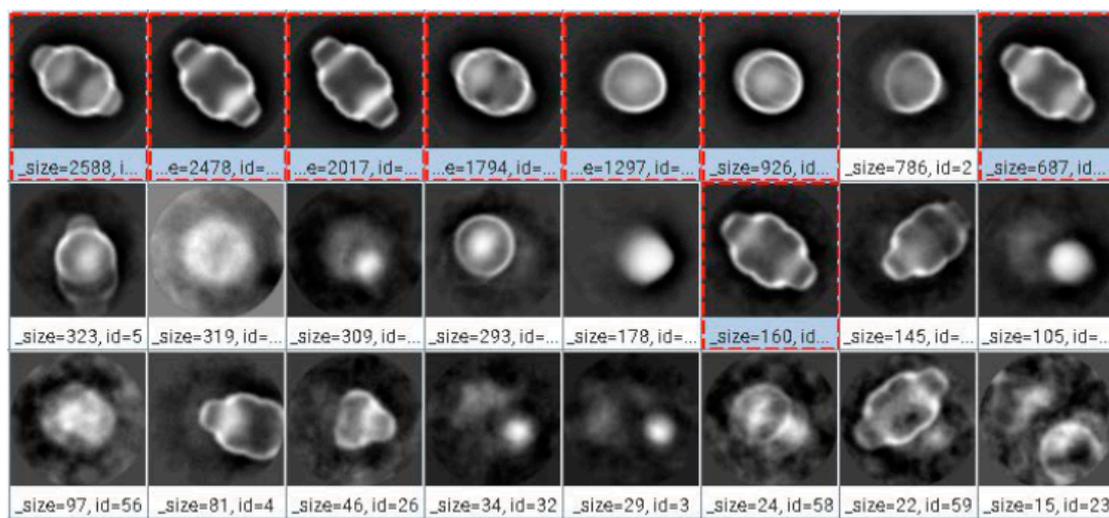


Figura 53. Clasificación 2D llevada a cabo con RELION (Scheres, 2012). Se clasificaron las 15280 partículas picadas del set de imágenes recogido en el FEI Tecnai G2 localizado en el CNB (Madrid) en 64 clases distintas, quedándonos solos con las ocho clases marcadas en rojo.

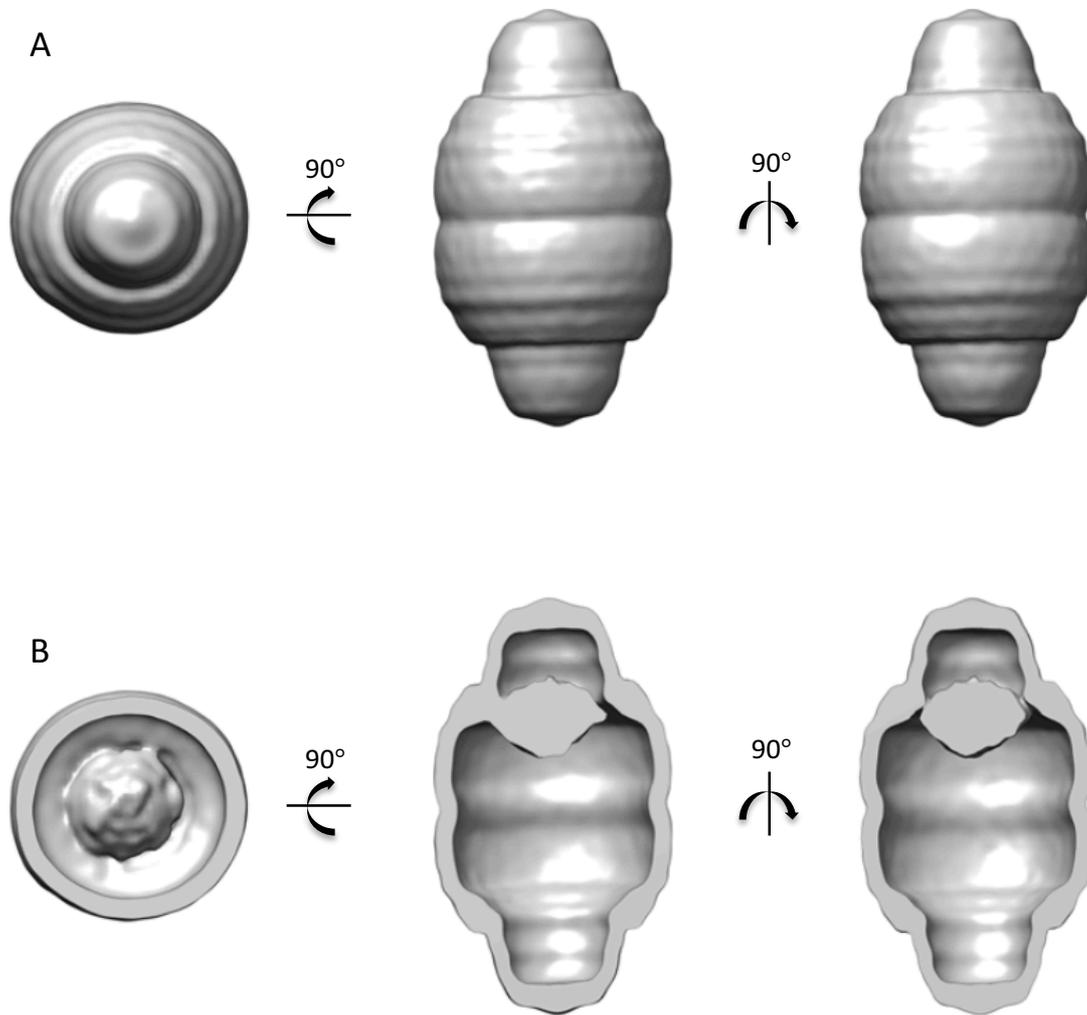


Figura 54. Estructura del complejo vault-TEP1. (A) Mapa de superficie de la partícula vault visto desde la zona apical y la zona lateral. (B) Sección del mapa de superficie de la vault en las mismas vistas que la figura A, donde aparece una densidad en su interior correspondiente a la proteína TEP1.

Otra información muy importante que se puede extraer de este mapa, es que por primera vez se observa la región de interacción entre la TEP1 y la vault. Llevando a cabo un ajuste de la estructura atómica de la vault en el mapa de densidad de cryo-EM, se puede observar que la TEP1 interacciona con la pared interna de la vault alrededor de la región del *shoulder*, entre los residuos 500 y 660 de la MVP más o menos (Figura 55). Hasta este momento nunca se había definido la región de la MVP involucrada en la interacción con la TEP1. La única información estructural que se tenía hasta ahora sobre

la estructura de esta proteína en complejo con la vault, era la mostrada en el artículo Kong et al. (2000), donde, como se explica en la introducción, al comparar los mapas de las vaults nativas y de las vaults endógenas sin TEP1, se veía una diferencia en la densidad en la zona más alta del *cap* que se atribuyó a la TEP1. Estos resultados están en desacuerdo con lo observado en esta primera reconstrucción de cryo-EM.

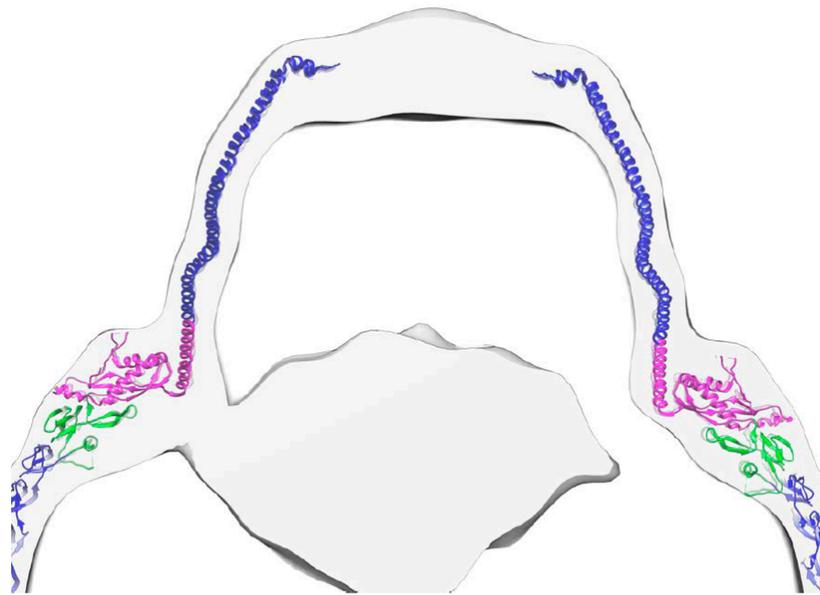


Figura 55. Sección del mapa de superficie del complejo vault-TEP1 con la estructura de dos MVP (PDB ID: 4HL8; Casañas et al., 2013) ajustadas en su interior, mostrando la zona de interacción de la TEP1 con la pared interna de la vault. El código de colores utilizado indica las regiones de interacción probables entre ambas (aas 500-660 de la MVP en magenta), el dominio R9 de la MVP (verde) y el resto de la estructura de la MVP (en azul).

Una vez comprobado que la muestra es potencialmente buena para el análisis a alta resolución de la estructura de la TEP1 mediante cryo-EM, se decidió analizar las muestras en un microscopio FEI Talos Arctica operado a 200 kV, equipado con un detector directo de electrones Falcon II (FEI, Eindhoven, Holanda). Se recogieron 2407 micrografías de las que picaron un total de 37108 partículas, las cuales se utilizaron para hacer una clasificación 2D con 32 clases. De las 32 clases nos quedamos con 16 clases que contenían 27024 partículas en total (Figura 56). Con todas ellas se realizó una

clasificación 3D con 3 clases distintas, quedándonos finalmente con una de ellas que englobaba 21619 partículas. Con estas partículas se llevó a cabo un refinamiento del modelo 3D del complejo (Figura 57), alcanzando una resolución de $\sim 20 \text{ \AA}$. Las primeras reconstrucciones obtenidas mejoraban notablemente la resolución del mapa para la vault, al compararlos con el de la figura 54: en el nuevo se puede identificar los distintos monómeros que forman la partícula, así como los dominios de cada MVP. Pero la densidad de la TEP1 no experimenta esa mejora: se observa una densidad en la misma región donde ya se vio en la primera reconstrucción, pero no es posible identificar dominios propios y hace falta bajar mucho el *threshold* del mapa para poder visualizar las zonas de interacción con la pared interna de la vault. Se llevaron a cabo distintas estrategias para intentar mejorar el mapa de densidad de la proteína interior sin mejorarlo. El problema en este punto parece ser la alta heterogeneidad estructural que presenta la proteína de interés. Ahora mismo estamos trabajando con un set de imágenes seis veces más grandes, que esperamos nos permita poder solucionar este problema.

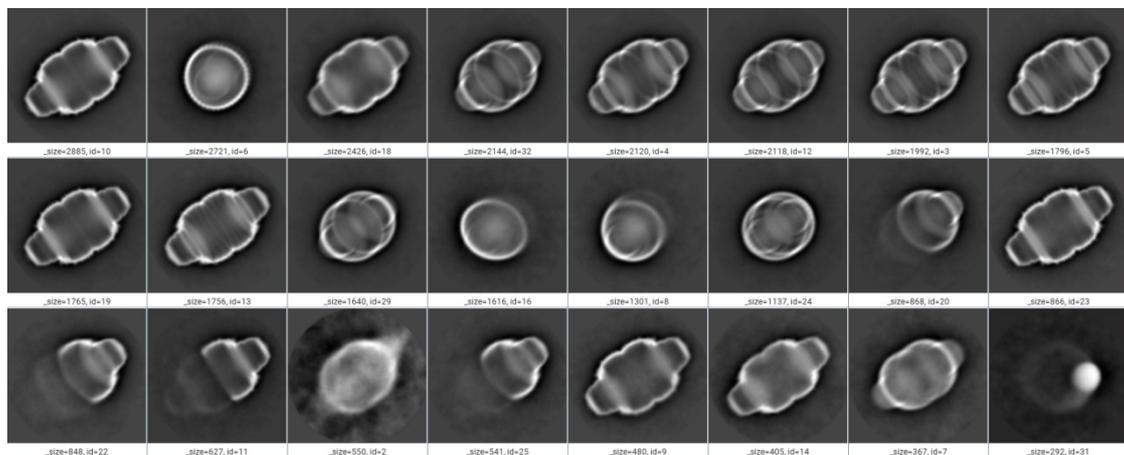


Figura 56. Clasificación 2D llevada a cabo con RELION (Scheres, 2012). Se clasificaron las 37108 partículas picadas del set de imágenes recogido en el FEI Talos Arctica localizado en el CNB (Madrid) en 32 clases distintas, quedándonos solo con las representativas.

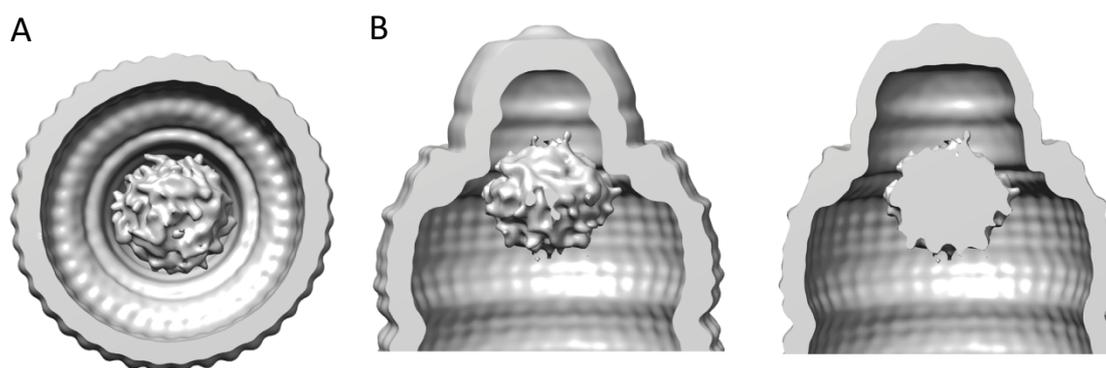
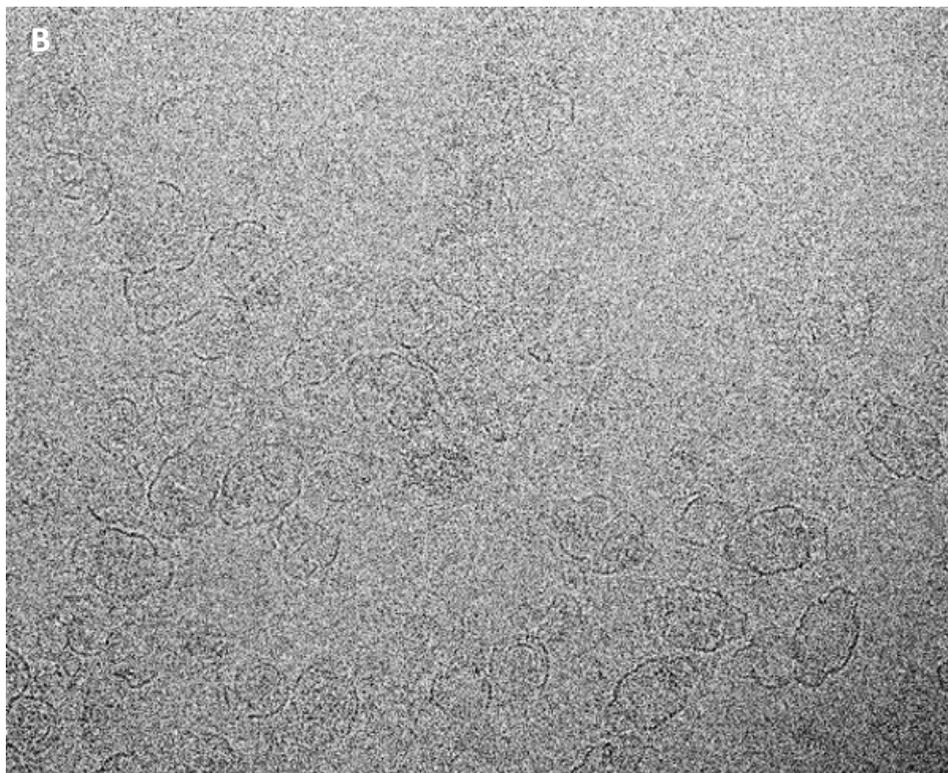
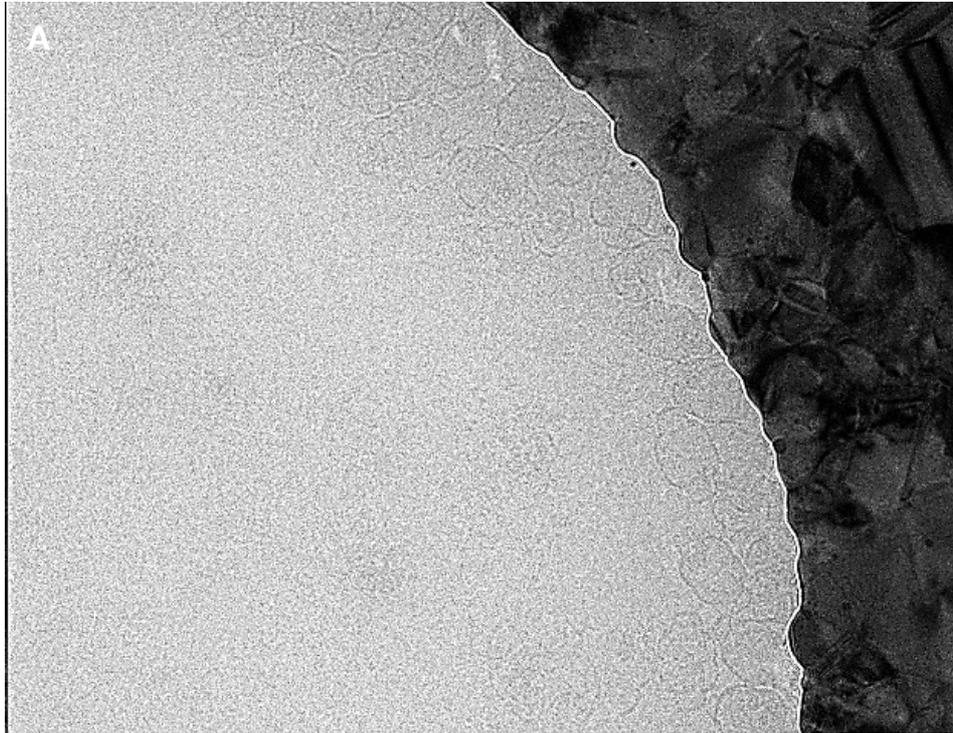


Figura 57. Secciones del mapa de superficie del complejo vault-TEP1 de los datos obtenidos del FEI Talos Arctica. (A) Sección del mapa de una vista apical de la vault (B) Secciones del mapa de una vista lateral de la partícula, mostrando solo media vault.

Durante el proceso de trabajo con los datos del Talos Arctica, surgió la posibilidad de hacer una estancia en el laboratorio del Prof. Israel S. Fernández en la Universidad de Columbia (New York, NY, USA). En este instituto disponen de tres microscopios electrónicos dotados de detectores directos de electrones: un FEI Tecnai G2, que opera a 200 kV, con un K2 (Gatan); un FEI Tecnai Polara, que opera a 300 kV, con un K2 (Gatan); y por último, un FEI Titan Kryos, que opera a 300 kV, que también dispone de un K2 (Gatan). El primer cambio con respecto al trabajo descrito arriba, es que aquí usamos rejillas con agujeros hechas completamente de oro (no contienen carbono), que presentan dos ventajas con respecto a las rejillas de agujeros de carbono comunes de cryo-EM: por un lado se reduce notablemente el movimiento de los especímenes congelados en el proceso de toma de imágenes y por otro, al estar hechas de un material inerte, evita que la proteína se una al soporte y se coloque más fácilmente en los agujeros. En las primeras rejillas de oro con vaults que miramos en el microscopio, se observó como las partículas tendían a ir hacia los bordes del agujero (Figura 58 A) y que las partículas colocadas en la parte central del agujero aparecían muchas veces rotas (Figura 58 B). Estas dos observaciones nos hicieron pensar que quizás el gradiente de espesor del hielo formado dentro de cada agujero, que lo hace más fino en su parte central, podría estar ejerciendo una tensión sobre las partículas, desplazándolas hacia los bordes del agujero por un lado y colapsando las partículas congeladas en la parte central. Para intentar solucionarlo, se congeló muestra en rejillas con un diámetro de

agujero más pequeño y al mirarlas al microscopio electrónico se confirmaron nuestras teorías: cuando el gradiente de hielo era menos pronunciado las vaults se distribuían más homogéneamente y en el centro de los agujeros, las vaults presentaban una morfología normal.



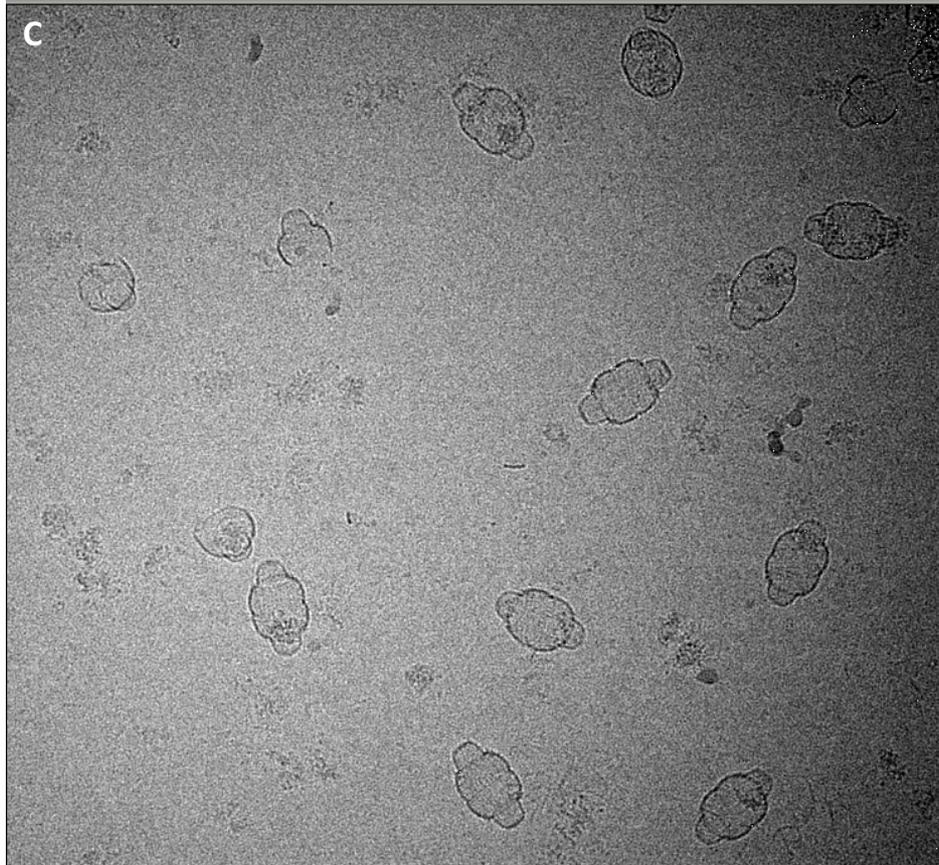


Figura 58. Micrografías de criomicroscopía electrónica del complejo vault-TEP1 obtenidas con FEI Tecnai G2 operado a 200 kV con una K2. (A) Micrografía mostrando a las vaults pegadas al borde de la rejilla de oro (B) Micrografía mostrando a las partículas con una morfología muy dañada en una foto tomada en el centro del agujero de a rejilla de oro. (C) Micrografía tomada de una rejilla con un agujero más pequeño, donde se pueden observar a las vaults con un morfología correcta. Esta última fue recogida con un FEI Titan Kryos operado a 300 kV con una K2.

Una vez optimizadas las rejillas de cryo-EM, se llevó a cabo una adquisición de imágenes en un FEI Titan Kryos de 3 días de duración, recogiendo un total de 3295 imágenes. Esta se realizó sobre rejillas de oro con el tamaño de agujero más pequeño disponible en ese momento y tomando las imágenes cerca de uno de los bordes, intentado así conseguir el mayor número de partículas por micrografía. Una vez procesadas las películas, se llevaron a cabo dos estrategias de picado distintos: en la primera, se picaron las TEP1 usando una caja más pequeña y en la segunda, se picaron las vaults enteras (con la TEP1 en su interior) usando una caja mayor. En el proceso de picado de la proteína TEP1 por si sola se tuvo que realizar todo de manera manual, ya

que los programas de autopicado no eran capaces de identificar la TEP1 en el interior de las vaults; se picaron tanto las partículas localizadas en el interior de las partículas, como las que se encontraban en el hielo como consecuencia de la rotura de las partículas. Se picaron un total 27085 partículas de las 3295 micrografías, con las cuales se llevó a cabo una clasificación 2D con 14 clases, para intentar identificar vistas características de la proteína (Figura 59). Como se puede observar, no se llegan a identificar vistas características de la proteína, apareciendo en la mayoría de ellas parte de la vault con una débil señal en su interior. Se seleccionaron tres clases (la primera, la tercera y la última) que parecían representativas de la TEP1 y que contenían 11045 partículas. Como no disponemos de ningún modelo inicial para esta proteína, se utilizó el programa CryoSPARC (Punjani et al., 2017) para generar una clasificación 3D *ab initio* con las partículas que habíamos seleccionado en cuatro clases distintas. De las distintas clases 3D generadas, la que más nos gustó y que contenía 6596 partículas, se intentó refinar utilizando el mismo software, pero los resultados del refinamiento nos daban unas reconstrucciones con mucho ruido, lo que nos confirma que existe una alta heterogeneidad estructural que dificulta el cálculo de un mapa consistente.

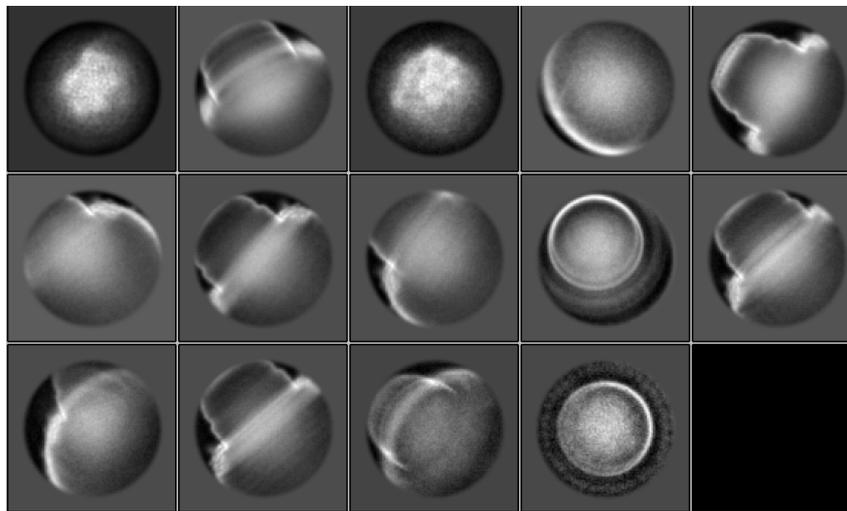


Figura 59. Clasificación 2D llevada a cabo con RELION (Scheres, 2012) de las proteínas TEP1 picadas tanto dentro como fuera de la vault. Se puede observar como en la primera, tercer y última parece que se va una densidad más definida y fueron las usadas para hacer una reconstrucción 3D de la proteína.

Como se comentó arriba, en la segunda estrategia llevada a cabo con las datos obtenidos en el FEI Titan Kryos, se picaron las vaults enteras (igual a como se hizo anteriormente con los datos obtenidos del Fei Talos Artica). De las 3295 micrografías se picaron un total de 34822 partículas, las cuales se utilizaron para hacer una clasificación 2D con 45 clases. De las 45 clases nos quedamos con nueve clases que contenían 21024 partículas en total (Figura 60). Con todas ellas, se realizó una clasificación 3D con seis clases distintas quedándonos finalmente con una de ellas que englobaba 9193 partículas. Con estas partículas se llevó a cabo un refinamiento del modelo 3D del complejo (Figura 61), obteniendo un mapa que no mejoraba lo mostrado en la figura 54. El mapa, que parecía mostrar la densidad interior con mayor detalle, no permitía identificar dominios ni tampoco la unión a MVP, a no ser que se bajase mucho el *threshold*, como ya nos ocurrió con el mapa mostrado en la figura 57.

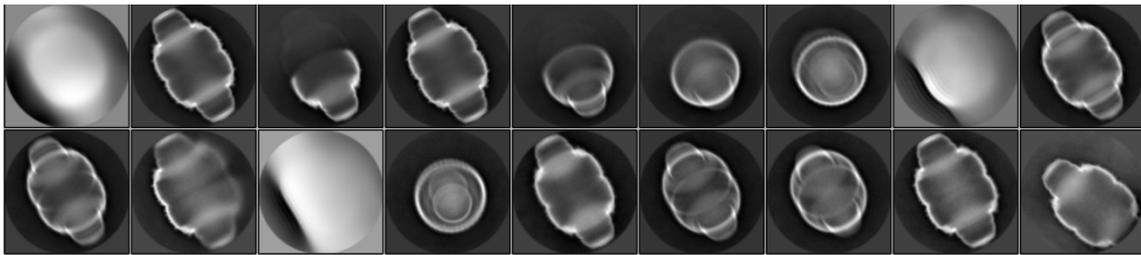


Figura 60. Clasificación 2D llevada a cabo con RELION (Scheres, 2012). Se clasificaron las 34822 partículas picadas del set de imágenes recogido en el FEI Titan Kryos localizado en la Universidad de Columbia (Nueva York, USA) en 45 clases distintas, quedándonos solos con las representativas.

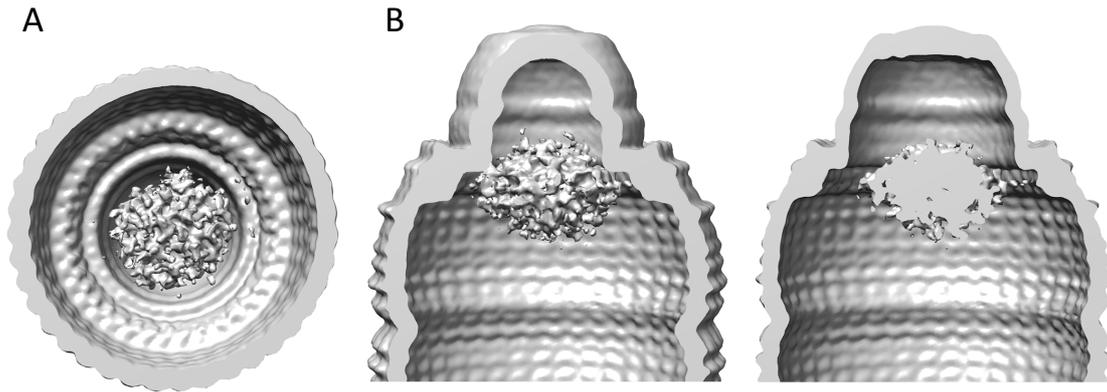


Figura 61. Secciones del mapa de superficie del complejo vault-TEP1 de los datos obtenidos del FEI Titan Kryos. (A) Sección del mapa de una vista apical de la vault (B) Secciones del mapa de una vista lateral de la partícula, mostrando solo media vault.

Después de varias tomas de datos, distintos picados y varios procesos de clasificación 2D y 3D, parece claro que la TEP1 presenta una alta heterogeneidad estructural en la muestra. Es más, si uno se para a observar las micrografías de criomicroscopía electrónica (Figura 62), se puede observar como hay algo dentro de la vault, pero no parece tener ni una forma ni un tamaño reproducible en todas ellas, características que si se diesen en la proteína, sería posible resolver su estructura con los detectores directos actuales. Es importante remarcar que esta proteína, cuando forma parte de la vault nativa, se encuentra unida al vRNA, de tal manera que no es descabellado pensar que quizás necesite estar unido a este para poder plegarse correctamente. De esta manera quizás se consiga reducir la alta heterogeneidad estructural de la misma. Partiendo de esto, el siguiente paso sería la obtención del complejo vault-TEP1-vRNA, ya sea por expresión de los tres en células de mamífero o bien mediante la purificación de partículas endógenas que contengan todos estos componentes, a parte de la vPARP, la cual se sabe que se localiza en el interior de la vault y quizás también juegue un papel determinante en el plegamiento y estabilización de la TEP1.

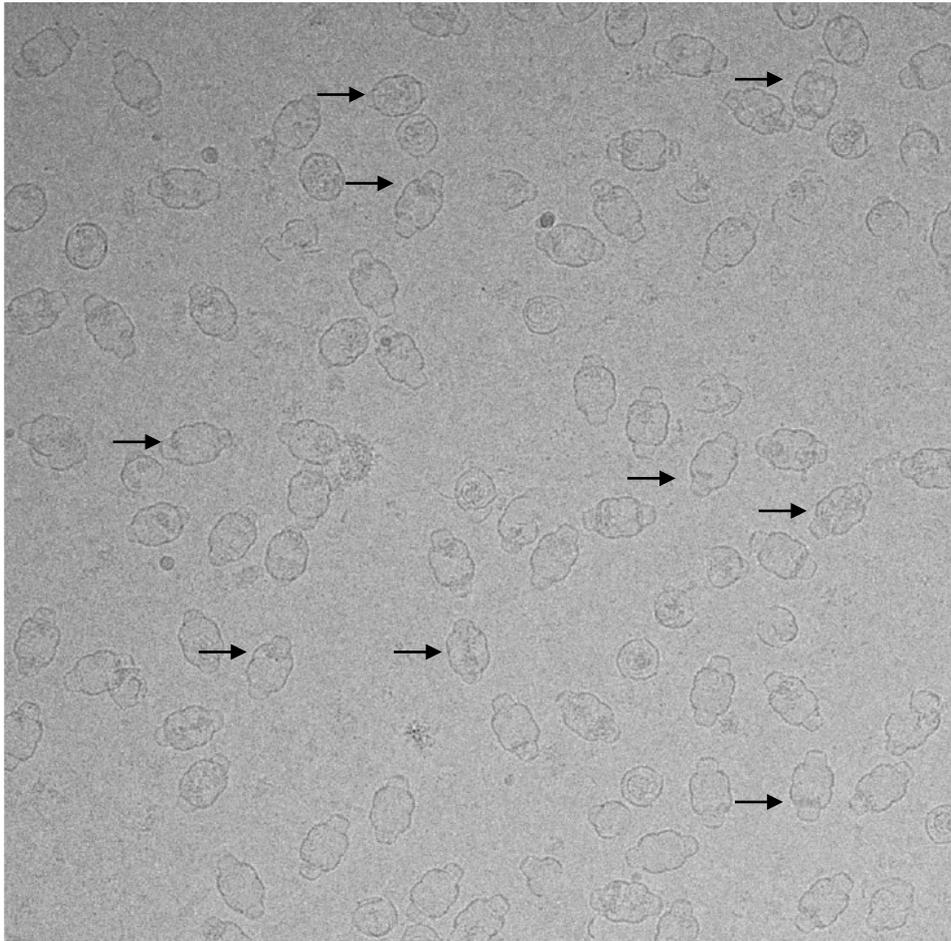


Figura 62. Micrografía de la purificación de vaults con TEP1 donde se indican con flechas la proteína TEP1 alojada en el interior de la misma, obtenida con el FEI Talos Arctica con un Falcon II.

3.3.5. CO-EXPRESION TEP1 CON DISTINTOS CONSTRUCTOS DE MVP QUE CONTENGAN EL DOMINIO DE INTERACCION ENTRE AMBAS

De la primera reconstrucción obtenida de la vault con la TEP1 en su interior, se pudo identificar la región de la pared interna de la partícula que interaccionaba con la TEP1. Teniendo en cuenta la resolución a lo que está el mapa, se podría decir que la zona de interacción está comprendida por el dominio *shoulder* y parte de la zona de hélices- α que conforma el *cap*; a este resolución no se puede descartar que también esté involucrado el dominio R9. Teniendo en cuenta esta información no resulta descabellado intentar obtener complejos de la TEP1 con distintos constructos de la

MVP, definidos alrededor de la zona de interacción entre ambos. La obtención de la proteína soluble fuera de la vault facilitaría su resolución por criomicroscopía electrónica, al no tener toda la contribución de la vault, e incluso se podría cristalizar si se obtuviese en cantidad suficiente.

Debido a la dificultad para identificar la zona de interacción exacta entre las dos proteínas en los mapas de cryo-EM obtenidos, se llevó a cabo el diseño de cuatro constructos distintos. Cada uno de ellos contiene:

- los dominios R9, *shoulder* y parte del *cap-helix* (aas 449-663)
- los dominios R9 y *shoulder* (aas 449-647)
- los dominios *shoulder* y parte del *cap-helix* (aas 496-663)
- el dominio *shoulder* (aas 496-647)

Ya que el sistema de expresión donde se obtuvo en mejores condiciones la TEP1 era el de rVVs en células de mamífero, se decidió seguir trabajando en este mismo sistema de expresión para los nuevos complejos. Se produjeron los rVVs de cada uno de los cuatro constructos de MVP. Una vez obtenidos, se infectaron células de mamífero con cada uno de ellos y se coinfectaron con el de TEP1 para hacer pruebas de expresión y solubilidad por si solos y formando complejo con la TEP1. Ninguno de los cuatro dominios resultó ser soluble por si solos o en presencia de la TEP1. Llegados a este punto, se podrían seguir dos estrategias para intentar alcanzar el objetivo planteado: por un lado, llevar a cabo el diseño de nuevos constructos de MVP, hasta obtener uno que sea soluble y por otro lado, llevar a cabo la expresión de cada uno de estos constructos fusionado a la TEP1 con una secuencia de corte TEV entre ellos, como se describe en el trabajo Cusack et al. (2014) para la obtención de la estructura del heterotrímero de la polimerasa de influenza A.

4. CONCLUSIONES

4.1. MVM

El análisis mecánico llevado a cabo por AFM revela que las mutaciones que generan cavidades (como el mutante N170A), así como las que rellenan huecos (como el mutante L172W) en los residuos localizados en la base del poro de la cápside de MVM, causan un aumento importante en la rigidez mecánica de la partícula a nivel local y global.

La determinación de la estructura de rayos-X de la cápside del mutante de N170A y la comparación con la estructura de la cápside nativa, revela diferencias sutiles en la conformación que se propagan a lo largo de toda la estructura, generando una estructura más compacta y menos flexible en el mutante.

Esta misma relación entre compactación y aumento en la rigidez mecánica se da en el caso del mutante L172W de la VP2 de la cápside de MVM.

Estos resultados revelan una base estructural para la rigidificación de la cápside causada por estos dos tipos de mutaciones que afectan al ciclo infectivo del virus.

4.2. VAULT

La caracterización de las propiedades mecánicas de las vaults usando AFM demuestra que estas partículas poseen la capacidad de auto-repararse rápidamente después de una fractura causada por una indentación de la punta del AFM.

La fractura producida en los experimentos de indentación se produce en la zona del barril en la dirección de interacción de dos MVPs vecinas, no en la cintura como se esperaría teniendo en cuenta todo lo descrito hasta este momento en la literatura sobre estas partículas.

Los experimentos llevados a cabo, tanto sobre partículas individuales como por técnicas promedio, sobre las partículas a diferentes pHs demuestran que de 7.5 a 6.0 la estructura cuaternaria de las vaults permanece estable.

La capacidad de seguir la dinámica de la partícula en tiempo real mientras se baja el pH revela que las partículas no se abren por la cintura, como había sido descrito con

CONCLUSIONES

anterioridad, sino que se produce una desestabilización global de la región del barril y del dominio del *shoulder*.

El estudio de los distintos mutantes de MVP por diversas técnicas demuestra que los residuos hidrofóbicos parecen más importantes que las cargas en la asociación de las dos mitades de la vault. Si bien es cierto, que en la asociación de ambas mitades están involucrados ambos tipos de interacciones

Todos estos resultados relacionados con la dinámica y las propiedades mecánicas de las vaults, da nueva información muy importante que podría ayudar a entender el papel desempeñado por esta partícula en la célula, así como su uso como nanocontenedores en biomedicina.

4.3. TEP1

La única manera de obtener la proteína TEP1 entera y soluble ha sido mediante la coexpresión de la misma con la MVP en células de mamífero, obteniendo vaults con la TEP1 en su interior.

Las reconstrucciones 3D obtenidas por cryo-EM muestran a la TEP1 localizada en el interior de la vault, en la región comprendida entre el cap y el comienzo del barril. La TEP1 interacciona con la pared interna de la vault en una región definida alrededor del dominio *shoulder* de la MVP.

La imposibilidad de mejorar la resolución de las reconstrucciones 3D de cryo-EM con los datos adquiridos con detectores directos de electrones indican que la proteína presenta una alta heterogeneidad estructural.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. CULTIVOS CELULARES

- CELULAS PROCARIOTAS

Las células *E. coli* DH5 α (Raleigh et al., 2002) se utilizaron para amplificar plásmidos recombinantes.

Las células *E. coli* DH10Bac (Luckow et al., 1993) se utilizaron en la generación de los b α cmidos recombinantes usados para la transfección de células de insecto. Estas células contienen un vector derivado del baculovirus (b α cmido) y un plásmido auxiliar que las hacen capaces de llevar a cabo la recombinación específica entre el vector pFastBac (Invitrogen) y el b α cmido.

La cepa *E. coli* BL21 DE3 fueron usadas para la expresión de proteínas.

Para el crecimiento de todas las cepas de *E. coli* se utilizaron los medios LB o SOC en solución y el medio solido LB al 1.5% de agar bacteriológico, ambos suplementados con el antibiótico de selección propio para cada plásmido.

- CELULAS EUCARIOTAS

Para la generación, amplificación y expresión de los baculovirus recombinantes se usaron células High-Five (H5), adaptadas para su crecimiento en monocapa de la cepa Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al., 1977). Los cultivos celulares de H5 se crecieron en medio TC-100 (GIBCO) suplementado con FBS (Sigma-Aldrich) al 5%, penicilina (100 μ g/ml; Sigma-Aldrich), estreptomina (100 μ g/ml; Sigma-Aldrich) y anfotericina B (0.5 μ g/ml; Sigma-Aldrich).

Para la obtención, amplificación y expresión de proteínas codificadas dentro del genoma del virus vaccinia recombinante (rVV) se utilizaron células BSC40 (ATCC, CRL-2761), células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops* derivadas de la línea BSC1 (ATCC, CCL-26). Las células de mamífero BSC40 fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) suplementado al 5% con FBS (Sigma-Aldrich), penicilina (100 μ g/ml; Sigma-Aldrich), estreptomina (100 μ g/ml; Sigma-Aldrich) y anfotericina B (0.5 μ g/ml; Sigma-Aldrich).

5.2. PLASMIDOS RECOMBINANTES Y MUTAGENESIS

- PLASMIDO pFB1-VP2i (wild type y mutante L172W)

El plásmido pMVMi Δ VP1, que contiene el gen de la proteína VP1 de la cepa inmunosupresora de MVM (MVMi), fue obtenido del laboratorio del Prof. J.M. Almendral (Lombardo et al., 2000). La región codificante de la VP2 de MVMi, contenida en el plásmido pMVMi Δ VP1, fue amplificada por PCR con lugares de restricción BamH1 y XhoI en los extremos. Seguidamente, se usaron los lugares de restricción BamH1 y XhoI para subclonar esta región dentro del vector pFastBac1 (Invitrogen) obteniendo el plásmido pFB1-VP2i (Carreira et al, 2004).

Para ello, el segmento de DNA purificado obtenido por PCR y el vector fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, repurificados por electroforesis de gel agarosa y ligados usando la T4 DNA ligasa (New England Biolabs). El plásmido recombinante pFB1-VP2i se obtuvo al transformar en *E. coli* DH5 α y se procedió a la secuenciación del mismo. Para obtener el mutante L172W, se llevó a cabo la introducción de la mutación puntual en el plásmido pFB1-VP2i mediante el método de PCR inversa usando el kit QuickChange (Stratagene), seguido de secuenciación de DNA para confirmar la presencia de la mutación deseada. Una vez comprobada la secuencia, fue usada para generar los baculovirus recombinantes.

- PLASMIDO pFB1-VP2p (wild type y mutante N170A)

El plásmido pSVtk-VP1/2 que contiene el gen que codifica para las proteínas VP1 y VP2 de la cepa prototipo de MVM (MVMp) fue obtenido del laboratorio del Prof. J.M. Almendral (Ramírez et al., 1995). Para la generación del plásmido que contuviera la región codificante de VP2 de esta cepa en el pFastBac1 (así como para el mutante N170A), se procedió de manera similar que para la generación del vector pFB1-VP2i. Una vez comprobada la secuencia fue usado para generar los baculovirus recombinantes.

- PLASMIDO pFB-MVP

El fragmento de DNA que contiene la secuencia de MVP de *Mus musculus*, flanqueado por sitios de restricción NcoI y KpnI en sus extremos, fue producido por PCR. Una vez obtenido el fragmento de DNA, fue purificado y seguidamente digerido a 37°C con las

enzimas correspondientes, al igual que el vector donador del b acmido pFastBac Hta (Invitrogen). Se llev o a cabo la inserción del fragmento de MVP digerido y repurificado en el *m ultiple cloning site* del vector, también digerido y repurificado, usando la T4 DNA ligasa a 16 C. El plásmido resultante pFB-MVP se secuenció para comprobar que el plásmido era correcto.

La producción de los mutantes de MVP fue hecha mediante la introducción de mutaciones puntuales por PCR usando protocolos estándar, seguido de secuenciación de DNA para confirmar la presencia de la/s mutación/es deseada/s. Una vez comprobadas las secuencias fueron usados para generar los baculovirus recombinantes.

- PLASMIDOS DE LOS DISTINTOS CONSTRUCTOS DOMINIO TROVE EN pETM30 MBP, pGEX-6P1 y pET-28 A

El fragmento de DNA que contiene la secuencia de cada uno de los constructos dise nados del dominio TROVE de la TEP1 de *Mus musculus*, flanqueado por sitios de restricción NcoI y XhoI en sus extremos, fue producido por PCR. Una vez obtenido el fragmento de DNA fue purificado y seguidamente digerido a 37 C con las enzimas correspondientes, al igual que cada uno de los tres vectores de expresión en bacterias pETM30 MBP (cedido por el grupo del Prof. F. Xavier Gomis-R uth), pGEX-6P1 (GE healthcare) y pET-28 A (Novagen). Se llev o a cabo la inserción del fragmento de DNA digerido y repurificado en el *m ultiple cloning site* de cada vector, también digerido y repurificado, usando la T4 DNA ligasa (Thermo Fischer) a 16 C. Cada uno de los distintos plásmidos obtenidos se secuenció para comprobar la corrección de la secuencia del mismo.

- PLASMIDO pFB-TEP1

El fragmento de DNA que contiene la secuencia de la TEP1 de *Mus musculus*, flanqueado por sitios de restricción NcoI y EcoRI en sus extremos, fue producido por PCR. Una vez obtenido el fragmento de DNA fue purificado y seguidamente digerido a 37 C con las enzimas correspondientes, al igual que el vector donador del b acmido pFastBac Hta (Invitrogen). Se llev o a cabo la inserción del fragmento de la TEP1 digerido y repurificado en el *m ultiple cloning site* del vector, también digerido y repurificado, usando la T4 DNA ligasa a 16 C. El plásmido resultante pFB-TEP1 se secuenció para comprobar que el plásmido era correcto.

- PLASMIDO pFB-MVP

El fragmento de DNA que contiene la secuencia de la MVP de *Mus musculus*, flanqueado por sitios de restricción NcoI y KpnI en sus extremos, fue producido por PCR. Una vez obtenido el fragmento de DNA fue purificado y seguidamente digerido a 37°C con las enzimas correspondientes, al igual que el vector donador del b́acmido pFastBac Hta (Invitrogen). Se llev³ a cabo la inserci³n del fragmento de la MVP digerido y repurificado en el *m³ltiple cloning site* del vector, tambi³n digerido y repurificado, usando la T4 DNA ligasa a 16°C. El pl³smido resultante pFB-MVP se secuenci³ para comprobar que el pl³smido era correcto.

- PLASMIDO pVOTE2-MVP

El fragmento de DNA que contiene la secuencia de la MVP de *Mus musculus*, flanqueado por sitios de restricción NdeI y SmaI en sus extremos, fue producido por PCR. Una vez obtenido el fragmento de DNA fue purificado y seguidamente digerido a 37°C con las enzimas correspondientes, al igual que el vector de expresi³n de genes mediante rVV pVOTE2 (cedido por el laboratorio del Dr. Bernard Moss). Se llev³ a cabo la inserci³n del fragmento de la MVP digerido y repurificado en el *m³ltiple cloning site* del vector, tambi³n digerido y repurificado, usando la T4 DNA ligasa a 16°C. El pl³smido resultante pVOTE2-MVP se secuenci³ para comprobar que el pl³smido era correcto.

- PLASMIDO pVOTE2-TEP1

El fragmento de DNA que contiene la secuencia de la TEP1 de *Mus musculus*, flanqueado por sitios de restricción NdeI y SmaI en sus extremos, fue producido por PCR. Una vez obtenido el fragmento de DNA fue purificado y seguidamente digerido a 37°C con las enzimas correspondientes, al igual que el vector de expresi³n de genes mediante rVV pVOTE2 (cedido por el laboratorio del Dr. Bernard Moss). Se llev³ a cabo la inserci³n del fragmento de la TEP1 digerido y repurificado en el *m³ltiple cloning site* del vector, tambi³n digerido y repurificado, usando la T4 DNA ligasa a 16°C. El pl³smido resultante pVOTE2-TEP1 se secuenci³ para comprobar que el pl³smido era correcto.

- PLASMIDOS DE LOS DISTINTOS CONSTRUCTOS DE LA ZONA DE INTERACCION DE MVP CON TEP1 EN pVOTE2

El fragmento de DNA que contiene cada una de las secuencias de cada uno de los constructos diseñados de la MVP de *Mus musculus*, flanqueado por sitios de restricción NdeI y Sall en sus extremos, fue producido por PCR. Una vez obtenidos los fragmentos de DNA fueron purificados y seguidamente digeridos a 37°C con las enzimas correspondientes, al igual que el vector de expresión de genes mediante rVV pVOTE2 (cedido por el laboratorio del Dr. Bernard Moss). Se llevó a cabo la inserción del fragmento de MVP digerido y repurificado en el *múltiple cloning site* del vector, también digerido y repurificado, usando la T4 DNA ligasa a 16°C. Los plásmidos resultantes se secuenciaron para comprobar que eran correctos.

5.3. BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Los baculovirus recombinantes (rBV) fueron generados usando el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método está basado en la transposición de los genes recombinantes al genoma del baculovirus infectivo contenido en un vector (bácmido) mantenido en la cepa *E. coli* DH10Bac. Se llevaron a cabo la generación de los baculovirus recombinantes de las VP2 de las cepas p e i de MVM (así como sus mutantes) y también de la proteína MVP y de todos sus mutantes.

Una vez clonada la secuencia de interés en el plásmido donador pFastBac, como se explicó arriba, se llevó a cabo la transformación del plásmido en las células *E. coli* DH10Bac, donde tuvo lugar la transposición de este gen al bácmido. Una vez seleccionados los bácmidos recombinantes de las colonias positivas, se llevó a cabo la transfección de células H5 con estos para generar los baculovirus recombinantes. Finalmente, se amplificaron mediante la infección de células H5 con el sobrenadante de las células transfectadas con el bácmido. Los primeros experimentos de expresión y producción de vaults recombinantes usando este sistema se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. José F. Rodríguez (CNB, Madrid).

5.4. VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES

Las secuencias clonadas en el vector pVOTE2 se encuentran bajo el control transcripcional de un promotor híbrido, formado por la secuencia del promotor del bacteriófago T7 fusionada a la secuencia operadora del operon lactosa de *E. coli*. El bloque de inserción, que también contiene el gen de selección xantina-guanina fosforibosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt), se encuentra flanqueado por secuencias correspondientes al gen viral A56R, que codifica la hemaglutinina del virus vaccinia (Word et al., 1995). Se llevaron a cabo la generación de los virus vaccinia recombinantes (rVV) de la MVP y la TEP1, así como de los constructos de la MVP de interacción con la TEP1. Los primeros experimentos de expresión y producción de vaults con TEP1 usando este sistema se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. José F. Rodríguez (CNB, Madrid).

Para la generación de los rVVs se infectaron células BSC40 con el virus VT7LacOI a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.05 unidades formadoras de placas por célula (PFU/cell). Tras una hora, las células fueron transfectadas con los plásmidos recombinantes de pVOTE2. La inserción de los genes de interés recombinantes se produce mediante recombinación homóloga entre el plásmido y el genoma viral. A las 72 hpi se recogen los virus recombinantes, los cuales son sometidos a tres rondas de selección mediante la adición de ácido micofenólico, xantina e hipoxantina. El ácido micofenólico inhibe a la enzima inosita-monofosfato deshidrogenasa y provoca la depleción de nucleótidos púricos. Solo los virus que contenga el gen recombinante expresaran el gen Ecogpt que, en presencia de xantina e hipoxantina, permite la síntesis de nucleótidos púricos. Por lo que solo los virus recombinantes que contengan el gen de interés, crecerán en este medio. Los rVVs producidos como se ha descrito fueron amplificados usando células BSC40.

Para la generación de los rVVs se utilizó como cepa parental el virus recombinante VT7LacOI (Ward et al., 1995). Este virus fue cedido por el Dr. Bernard Moss.

- TITULACION DE LOS rVVS

Los rVVS se titularon para conocer la carga viral de los mismos; para ello se infectaron cultivos confluentes de células BSC40 con distintas diluciones de los virus. Tras una

hora de adsorción, se retiró el medio de infección y se añadió medio DMEM al 2% de FBS. Pasadas 48 hpi, las células se fijaron con una solución de formaldehído al 10 % durante 10 minutos a 37°C y posteriormente se tiñeron con una solución de cristal de violeta al 2%, haciendo visibles las placas formadas por el virus. Los títulos de los virus se determinaron por recuento de las placas de lisis teniendo en cuenta la dilución de trabajo.

5.5. EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS VLPS DE MVM

La expresión y purificación de las partículas de MVM fue llevada a cabo en el laboratorio del Prof. Mauricio G. Mateu. Para la producción de VLPs de MVMi y MVMp (nativas y mutantes) se siguió el protocolo previamente descrito por Hernando et al. (2000) con algunas modificaciones. Los baculovirus recombinantes se utilizaron para infectar células H5 adheridas en placas de cultivo p150 (8 placas) a un 80% de confluencia con una *multiplicity of infection* (MOI) de 2 unidades formadoras de placa por célula (PFU/célula). Las células se incubaron a 27°C y fueron recogidas a las 72 hpi, momento en el que presentaban un efecto citopático claro de infección por baculovirus. Las células se recogieron en el medio de infección usando un raspador y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet celular se resuspendió en unos 25 ml de PBS y se repitió la centrifugación. El pellet se resuspendió en 10 ml de buffer de lisis (50 mM TRIS –HCl pH=8, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 0.5 mM EDTA) y se sonico en hielo para lisar las células, usando un sonicador con punta cónica de 4 mm de diámetro: se llevaron a cabo 6 pulsos de 15 segundos a 20 % amplitud, separados entre sí por intervalos de 30 segundos.

Seguidamente el extracto celular ya sonicado se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C para eliminar el debris celular usando el rotor JA 25.50 (Beckmann). El sobrenadante fue cargado en un colchón de sacarosa al 20% en PBS (10 ml de muestra para 2 ml de colchón) y centrifugado en un rotor SW41 (Beckmann) a 16000 RPM durante 21.5 horas a 10 °C. El pellet precipitado en el fondo del tubo fue resuspendido en 0.5 ml de PBS. El resuspendido fue aplicado sobre un gradiente de sacarosa de 12 ml del 10 al 40 % en PBS y se centrifugó a 30000 rpm durante 5.5 horas a 10 °C. El gradiente se fraccionó desde la parte de arriba tomando alícuotas de 0.5 ml; las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE para localizar las que contenían proteína.

Las fracciones que contenían VLPs purificadas fueron mezcladas y dializadas frente a PBS a 4°C, posteriormente alicuoteadas y guardadas a 4° o -80°C según fuese necesario. En el caso de que se necesitase concentrar las VLPs, se utilizó un filtro de centrifuga Amicon Ultra-4 100MWL (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración de las VLPs purificadas se determinó mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), usando cantidades conocidas de seroalbumina bovina (BSA) para construir una curva patrón para la cuantificación. La calidad y pureza de las muestras obtenidas fue chequeada mediante tinción negativa usando el microscopio electrónico.

5.6. EXPRESION Y PURIFICACION DE VAULTS RECOMBINANTES

La expresión y purificación de vaults recombinantes se llevó a cabo siguiendo el protocolo de purificación puesto a punto por el Dr. Arnau Casañas. Diez placas p150 de células H5 fueron infectadas a una MOI de 1-5 PFU/célula con el baculovirus recombinante de MVP. Después de una hora de adsorción, el inóculo fue retirado y se le añadió medio TC-100 al 2% de FBS. Pasadas 72 horas después de la infección, las células fueron recogidas y peleteadas centrifugándolas 5 minutos a 1500 rpm. El pellet celular se lavó utilizando unos 25 ml de PBS y se repitió la centrifugación. El pellet lavado con PBS se resuspendió en 6 ml de buffer de lisis (75 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.75 mM MgCl₂, 1% IGEPAL, RNasa A, DNasa I, inhibidores de proteasas) y se dejó en hielo durante 30 minutos, vortejando suavemente cada 5 min. Seguidamente, la mezcla se sónico usando una punta cónica de 4 mm de diámetro haciendo 10 ciclos al 30 % de amplitud de 10 segundos, dejando otros 10 segundos entre ciclo y ciclo. La muestra fue centrifugada durante 30 minutos a 10000 rpm usando el rotor F-34-6-38 (Eppendorf). Se extrajo el sobrenadante y se aplicó en un colchón de sacarosa al 25% en buffer A (75 mM NaCl, 50 mM tris-HCl pH 7.4, 0.75 mM MgCl₂) de 4ml; este se centrifugó a 37000 rpm usando el rotor SW41 Ti (Beckmann) durante 2.5 horas. El pellet obtenido en el fondo del tubo fue resuspendido en 600 µl de buffer A y cargado en un gradiente de sacarosa 25-50%. Este gradiente se preparó añadiendo en un tubo 5.5 ml de solución al 50% sacarosa en buffer A, se congeló y posteriormente se la añadió el mismo volumen de disolución al 25 % en sacarosa y se volvió a congelar. Una vez congelado se deja descongelar a 4°C generándose un gradiente

continuo. El gradiente de sacarosa fue centrifugado a 37000 rpm usando el rotor SW41Ti (Beckmann) durante 45 minutos, para posteriormente ser fraccionado en alícuotas de 1 ml desde la parte superior. Cada fracción fue precipitada ultracentrifugandola a 50000 rpm usando un rotor SW55 Ti (Beckmann) durante 2 horas. Los pellet obtenidos en las fracciones superiores del gradiente fueron resuspendidos en 100 μ l de buffer A; su concentración y pureza fue analizada mediante geles de SDS-PAGE y microscopia electrónica de tinción negativa.

5.7. SDS-PAGE

El análisis de la pureza de las preparaciones, así como la localización de las fracciones de los gradientes de sacarosa que contenían VLPs y la estimación de la concentración de proteínas se realizaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La muestra de proteína se mezcló con un volumen igual de tampón de ruptura 2x (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 8.3% glicerol v/v, 3.3% SDS, 4% β -mercaptoetanol y 0.16 mg/ml de azul de bromofenol) se calentó a 95°C durante 5 minutos y se cargó en los geles de acrilamida con un porcentaje de en torno a 10% de la misma. La electroforesis del gel se lleva a cabo a una intensidad de 35 mA. Posteriormente, los geles se mantuvieron 0.5 horas en solución de tinte (2% de azul de Coomassie en 10 % metanol, 10% ácido acético glacial), después se pasó a una disolución de destintado (10% metanol, 10% ácido acético glacial) durante 30 minutos.

5.8. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TINCION NEGATIVA

La calidad y pureza de las muestras obtenidas fue chequeada mediante tinción negativa usando el microscopio electrónico. En el caso de las VLPs de MVM purificadas se fijaron por deposición durante 4 minutos sobre rejillas de cobre de 200-300 huecos por pulgada, recubiertas de coloidon y carbón e ionizadas mediante *glow discharge*. Las rejillas, después de 3 lavados sucesivos en agua destilada, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% en agua durante 45 segundos. Las muestras fijadas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (JEOL) en el servicio de microscopia electrónica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, con la ayuda de la Dra. M. T. Rojas y la técnico M. Guerra. Se tomaron fotografías desde 40000 hasta 100000

aumentos utilizando como detectores las cámaras Bioscan 792 (Gatan) y TemCa-F416 (TVips) acopladas al microscopio.

En el caso de las muestras de vaults recombinantes, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las muestras teñidas con acetato de uranilo, aparte de para chequear la pureza de las mismas, para chequear la morfología global de la partículas y estudiar alteraciones producidas en la misma en el caso de los mutantes de MVP. Las vaults purificadas fueron absorbidas sobre rejillas de cobre revestidas de carbono ionizado mediante *glow discharge* durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después de la absorción, las rejillas fueron colocadas sobre una gota de acetato de uranilo al 2 % durante 10 segundos y después se repitió el proceso sobre otra gota y sobre una tercera, para después secar el resto de agente tinción usando papel de filtro en contacto con ella. Las rejillas se miraron usando un microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI, Eindhoven, Holanda) equipado con un cátodo de La₆B disponible en los CCiT UB del PCB. Las imágenes fueron adquiridas a 100 kV y una magnificación entre 50000 y 75000x con una cámara CCD de 1376x1024 pixeles (FEI, Eindhoven, Holanda).

5.9. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA CRISTALO GRAFICA DE LA CAPSIDE DEL MUTANTE N170A DE LA CEPA P DE MVM

5.9.1. CRISTALIZACION, RECOGIDA DE DATOS Y PROCESAMIENTO

La obtención de cristales es la base de la determinación de estructuras mediante la técnica de difracción de rayos X y es considerada uno de los cuellos de botella de este proceso. La cristalización de macromoléculas es un proceso multiparamétrico que envuelve la solución de proteína purificada altamente concentrada en un estado de sobresaturación que fuerza a las moléculas a moverse al estado sólido, el cristal. Dos de los métodos más utilizados para la cristalización de proteínas están dentro de la categoría de difusión de vapor. Estos son conocidos como el método de gota colgada y de gota sentada.

En el caso del mutante de la cápside de MVMp se obtuvieron cristales mediante el método de difusión de vapor usando gota colgada (Figura 63). Este método consiste en depositar una gota de unos pocos microlitros de solución de proteína sobre un cubre de

vidrio, y se mezcla con un volumen igual o similar de solución de cristalización (normalmente compuesta por tampón, sal y agente precipitante). Con el cubreobjetos invertido se cierra un pocillo que contiene de 0.5-1 ml de solución de cristalización, dejando la gota colgando boca abajo. La diferencia de concentración de sales y precipitantes entre la gota y el deposito provoca la difusión de las especies más volátiles generando una nueva situación de equilibrio (Bergfords, 1999). Esta difusión de solventes hace variar el volumen de la gota, por lo que la concentración de la proteína también cambia. Otro factor que se ha de tener en cuenta en la técnica de difusión de vapor es que es sensible a las variaciones de temperatura. Por esta razón las placas de cristalización se guardan en una sala a una temperatura constante, normalmente 20° o 4°C.

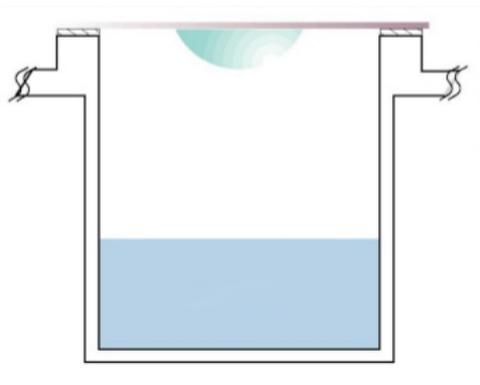


Figura 63. Esquema del método de cristalización de difusión de vapor de gota colgada.

Resulta extremadamente difícil predecir las condiciones apropiadas para la nucleación o el crecimiento de cristales de buena calidad. Por esa razón, en la práctica se hacen pruebas de diversas condiciones con el fin de encontrar una o más condiciones en las que se favorece la formación de cristales de proteína. Una vez obtenidos los primeros cristales se lleva a cabo una optimización, en donde se realizan pequeñas variaciones de las condiciones iniciales, buscando mejorar la calidad de los cristales obtenidos.

Los cristales del mutante N170A de MVMp se obtuvieron, como se menciona arriba, mediante el método de difusión de vapor usando gota colgada a 20°C. Las gotas contenían 1 μ l de solución de proteína purificada a una concentración de 10 mg/ml en

10mM Tris-HCl pH 7.5 y un volumen igual de la solución contenida en el reservorio de la placa de cristalización: 14% 2-metil-2,4- pentanediol (MPD), 200 mM NaCl, 100 mM NaAc pH 4.5. En un plazo de 3 a 4 días aparecieron cristales.

Para preservar los cristales de los daños producidos por la radiación, se utiliza la técnica de la criocristalografía. Esta se basa en congelar el cristal en nitrógeno líquido evitando que las moléculas de agua del solvente formen cristales de hielo. Para ello se sumerge el cristal en una solución crioprotectora y se deja por un tiempo. En el caso de los cristales de MVMp, se utilizó lo mismo que la disolución del reservorio más un 20 % de MPD como solución crioprotectora y se incubaron durante 1 minuto. Seguidamente, se pescaron los cristales utilizando *loops* del tamaño adecuado al cristal (quedando sumergidos en la solución de incubación) y se congelaron rápidamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido.

Para llevar a cabo la difracción de los cristales, hace falta disponer de rayos-X de alta energía. Por esta razón, para obtener datos de difracción de nuestros cristales se utiliza radiación de sincrotrón, la cual se puede obtener en el ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) en Grenoble y en el ALBA (*Alba Synchrotron Light Facility*) en Cerdanyola del Vallés, entre otros lugares. Para la generación de estos rayos-X, se utilizan electrones que son acelerados a elevadas energías mediante imanes. Al variar la trayectoria de los mismos emiten parte de su energía en forma de rayos-X de alta energía.

El haz de rayos incide sobre el cristal, interaccionando con los electrones de los átomos que la forman, convirtiéndose así en focos de una nueva radiación-X; a este fenómeno se le denomina dispersión. Los rayos dispersados interfieren unos con otros y debido a que el cristal es un sólido ordenado de manera regular y periódica, hace que estos se combinen y refuercen (interferencia constructiva) para dar lugar a la difracción. Para poder detectar estos rayos difractados por el cristal se sitúa un detector en línea con la salida de rayos x y la muestra.

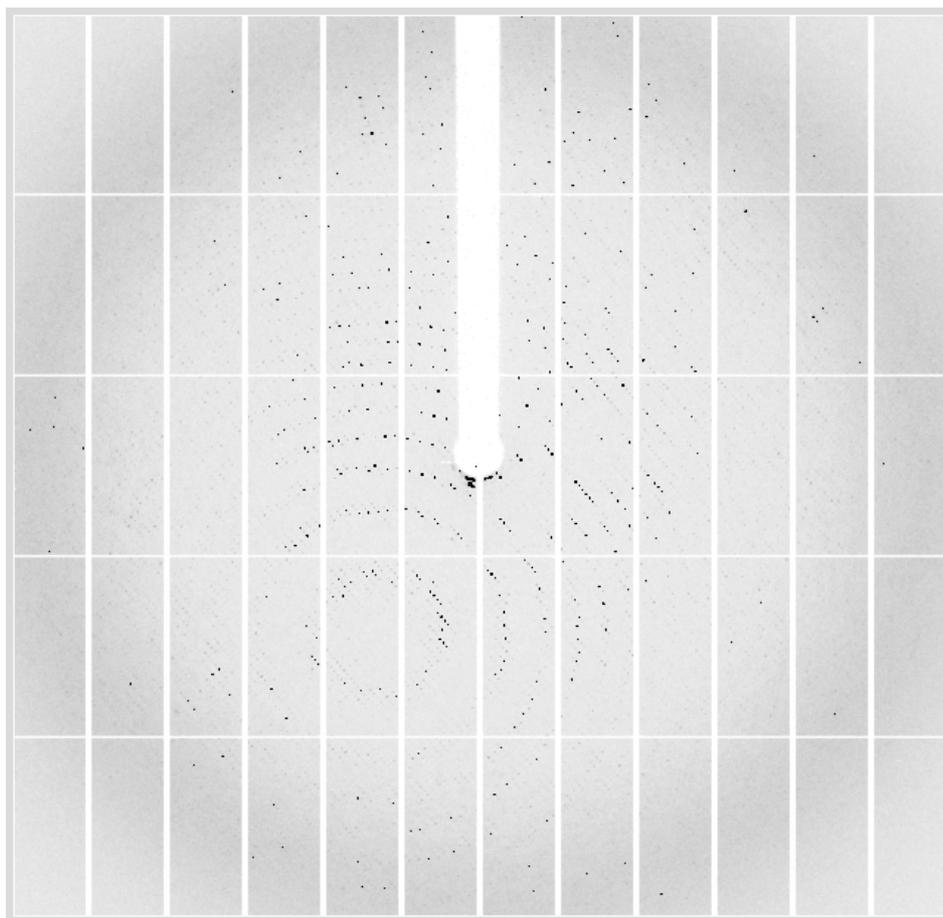


Figura 64. Patrones de difracción obtenidos de difractar los cristales de la VP2 de MVMp en el ESRF (Grenoble, Francia). Imagen tomada en la línea ID29 $\lambda=0.98$ con un detector Pilatus. Rotación de 0.3° 0,1 seg exposición.

Los parámetros que se evalúan en los patrones de difracción recogidos en el detector son la posición relativa de cada rayo difractado, que depende de la red cristalina y la intensidad de cada reflexión, que depende de la distribución de los átomos en la celda del cristal. Para ello, los difractogramas se procesan y se indexan, permitiendo deducir la simetría del cristal y el grupo espacial de los mismos.

Los cristales de MVMp se difractaron en la línea ID29 del ESRF (Grenoble, Francia) y en la línea XALOC del ALBA (Cerdanyola del Valles, España). Las imágenes obtenidas de la difracción de un único cristal fueron procesadas usando XDS (Kabsch, 2010) y SCALA (Evans, 2005). Los cristales de los que se recogieron datos de difracción eran pertenecientes al grupo espacial romboédrico R32, indexado como

hexagonal con los siguientes parámetros de celda unidad: $a = b = 410.24 \text{ \AA}$ y $c = 559.77 \text{ \AA}$.

5.9.2. RESOLUCION ESTRUCTURAL Y REFINADO

Los datos recogidos en la difracción se pueden relacionar con la red cristalina porque son equivalentes en el espacio recíproco. Para poder obtener un mapa de densidad electrónica de la proteína cristalizada es necesario determinar los factores de estructura. De hecho, estos son la representación matemática de las reflexiones obtenidas en la difracción del cristal.

A partir de los difractogramas, se pueden obtener las intensidades de las reflexiones, que nos permiten calcular las amplitudes de los factores de estructuras. Pero la ecuación de los factores de estructura tienen dos componentes: la amplitud y la fase de la onda difractada y son necesarias las dos para poder obtener el mapa de densidad electrónica. El problema está en que las fases asociadas a los factores de estructura no son magnitudes que se puedan medir experimentalmente. Con el fin de conseguir esa información se han desarrollado una serie de métodos que posibilitan su determinación, solucionando lo que se define como el problema de la fase.

Si se dispone de un modelo de la estructura tridimensional de alguna proteína similar a la nuestra, se puede utilizar el método de remplazo molecular, el cual consiste en asignar las fases de la estructura usada como modelo, como las fases iniciales para resolver la estructura problema. Para poder llevarlo a cabo, primero se han de calcular los parámetros de rotación y traslación necesarios para colocar el modelo en la celda unidad de nuestro cristal. En el caso de MVM disponíamos del modelo de la estructura tridimensional de la partícula MVMp nativa (PDB id: 1Z14), por lo que se pudo usar el método de reemplazo molecular utilizando el software PHASER (McCoy et al, 2007). En este caso, la molécula cristalizada presenta simetría no-cristalográfica (NCS), que se puede aprovechar como restricción (*constraint*) para la modificación de los mapas de densidad electrónica en la extensión de las fases y el aplanamiento de solvente. En nuestro caso se llevaron a cabo ciclos promedio usando la simetría no-cristalográfica de orden 20 y afinamiento de solvente usando el programa DM (Cowtan y Main, 1998). Para determinar la existencia de la NCS así como la orientación de la proteína dentro de la celda unidad, se utiliza la función de auto-rotación (self-rotation functions), que nos indica la rotación relativa entre dos moléculas de la unidad asimétrica.

Una vez solucionado el problema de la fase, se procede a calcular el mapa de densidad electrónica, en donde se coloca la cadena polipeptídica teniendo en cuenta las restricciones espaciales y distancias de los átomos de la macromolécula. Para minimizar las energías, se realiza un afinamiento automático de la estructura usando programas como REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) o CNS (Brunger et al., 1998). Este modo de trabajo se hace alternando procesos de afinamiento con procesos de trazado de la cadena polipeptídica automática o manual usando programas como COOT (Emsley y Cowtan, 2004). En nuestro caso se realizaron varios ciclos de refinamiento *rigid body* usando el software REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) y reconstrucción manual de la cadena de aminoácidos dentro del mapa de densidad electrónica con el programa COOT (Emsley y Cowtan, 2004). Durante el refinamiento se aplicó simetría no-cristalográfica de orden 20 a un trímero de VP2 usando el programa CNS (Brunger et al., 1998). De esta manera se alcanzaron unos valores de $R_{\text{work}} = 27.6$ y $R_{\text{free}} = 28.1$.

Todos los datos estadísticos, tanto de la recogida de datos como del proceso de refinamiento están resumidos en la tabla 1. Las coordenadas atómicas han sido depositadas en el PDB con el ID: 4ZPY.

5.10. ANALISIS RIGIDEZ MECANICA DE PARTICULAS DE MVM USANDO AFM

Los experimentos de microscopia de fuerza atómica (AFM) en las cápsides de MVM fueron llevados a cabo por el grupo del Prof. Maurico G. Mateu. Para llevar a cabo la determinación de la constante elástica k_s de distintos tipos de partículas de MVM, como una medida de su rigidez mecánica, así como la obtención de imágenes de estas partículas en medio líquido, se procedió como ya habían hecho antes en este grupo para este virus (Carrasco et al., 2006 y 2008). Las VLPs purificadas de MVM fueron diluidas unas 20 veces en PBS para los experimentos de AFM. Una gota de unos 20 μl de proteína diluida fue depositada en una superficie de cristal tratado con hexametildilazano y permaneció 30 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo la adsorción del virus. Las imágenes de AFM fueron obtenidas trabajando *en jumping mode* (Moreno-Herrero et al., 2004), usando las palancas RC800PSA (Olympus) con

una constante elástica nominal de 0.1 N/m y manteniendo la fuerza aplicada alrededor de los 50 pN. Antes de empezar cada experimento, la constante elástica k_s de cada palanca usada fue calibrada usando el método Sader (Sader et al., 1999). Las imágenes de AFM obtenidas fueron procesadas usando el software WSxM (Horcas et al., 2007).

5.11. ANALISIS DE TRANSICIONES ESTRUCTURALES DE LAS CAPSIDES MVM MEDIANTE FLUORESCENCIA INTRINSECA DE LOS TRIPTOFANOS

Se siguieron los protocolos descritos en Reguera et al. (2004) para el análisis de transiciones estructurales en las cápsides de MVM. El espectrofotómetro usado fue un Cary Eclipse (Varian) equipado con una unidad de control de temperatura tipo Peltier. El volumen de muestra fue de 0.3 ml a 0.5 μ M; las muestras se desgasificaron antes en un desecador para evitar posibles errores en las medidas de la fluorescencia causados por las burbujas. Los parámetros de medida utilizados fueron: longitud de onda de excitación (λ_{EXC}) de 295 nm, longitud de onda emisión (λ_{EM}) de 330nm. El gradiente térmico se realizó desde 25°C a 85°-100°C a una velocidad de 1°C por minuto. La temperatura fue medida sobre el bloque térmico que contenía la muestra, aplicándole un factor de corrección de 0.9705 (determinado experimentalmente por Carreira et al. 2004). Las medidas de intensidad de la fluorescencia en unidades arbitrarias fue representado con respecto a la temperatura en la que se midió, que ajustando a una transición sigmoidea cooperativa usando el programa KaleidaGraph (Abelbeck Software), fue posible determinar el valor de la T_m en °C. Estos experimentos fueron llevados a cabo por el grupo del Prof. Mauricio G. Mateu.

5.12. ANALISIS DE LAS PROPIEDADES BIOFISICAS DE LAS VAULTS RECOMBINANTES USANDO AFM

La AFM constituye una herramienta fundamental para el estudio estructural y dinámico de la topografía y propiedades mecánicas de estructuras biológicas individuales, de proteínas a virus, y células en medio líquido y condiciones cercanas a las fisiológicas.

5.12.1. ESTUDIO DE PROPIEDADES MECANICAS MEDIANTE AFM

Los principios en los que está basada la AFM son relativamente sencillos (Figura 65). Una punta muy fina colocada en el extremo de una palanca flexible, escanea la superficie a medir durante pasos sucesivos (Binnig et al., 1986). La deformación de la palanca causada por la interacción con la muestra se mide en un fotodiodo, que registra el movimiento de un haz de laser focalizado en el extremo de la palanca (Meyer y Amer, 1988; Alexander et al., 1989). La señal recogida en el fotodiodo es usada para hacer una reconstrucción topográfica de la superficie de la muestra y corregir la posición de la punta con respecto al piezoeléctrico, que controla el movimiento de la superficie de la muestra. Este movimiento se lleva a cabo por la dilatación o contracción del material piezoeléctrico en respuesta al voltaje aplicado. Hay diferentes maneras de corregir esta posición, denominados como modos de toma de imágenes, y todos ellos dependen básicamente de cuál es el parámetro usado para corregirlo (por ejemplo la fuerza normal, la amplitud de oscilación, la frecuencia de oscilación,...; Alexander et al., 1989).

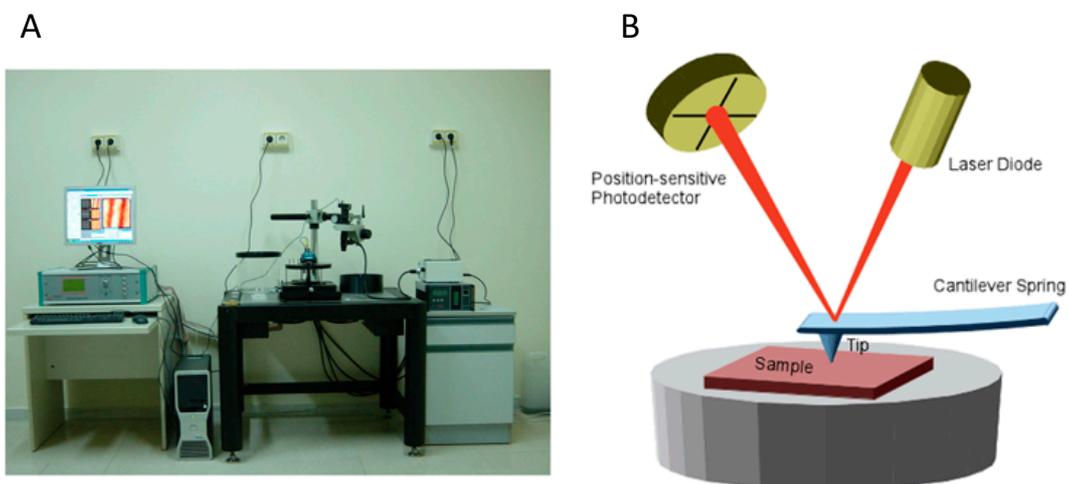


Figura 65. Microscopio de fuerza atómica (AFM). (A) Fotografía de un AFM con sus componentes básicos: cámara de medida (fotodiodo, laser, portamicropalancas y micropalanca), base motora, piezoeléctrico, sistema de control electrónico y ordenador. (B) Esquema básico del funcionamiento de un AFM.

El desplazamiento del piezoeléctrico a lo largo del eje z aproxima la punta a la superficie de la muestra. Llegado un momento, se establecerá una interacción entre ambos; si se siguen aproximando, la interacción entre ambos provocará la deflexión de la palanca, deformación que será detectada por el desplazamiento del haz de laser en la superficie del fotodiodo. Mediante un sistema de retroalimentación, que controla la dilatación del piezoeléctrico en la dirección del eje z, se consigue mantener constante la fuerza entre la muestra y la punta mientras se barre toda la superficie a lo largo de los ejes x e y. La dilatación del piezoeléctrico a lo largo del eje z, manteniendo constante la fuerza entre ambos especímenes, nos da una medida de la altura de la muestra en cada punto de la superficie barrida, permitiendo la reconstrucción de una imagen topográfica del objeto.

Como se ha comentado más arriba, existen diversos métodos para corregir el movimiento del piezoeléctrico. Uno de ellos es el que usa la fuerza normal como parámetro y es denominado jumping mode (JM) (de Pablo et al., 1998). En resumen en este método la punta del cantiléver se va aproximando a la muestra, hasta que el fotodiodo detecta una deflexión. Para medir las curvas de fuerza de otros puntos de la muestra, la punta del cantiléver se mueve lateralmente después de haberse separado de la muestra, haciéndolo ideal para la formación de imágenes de grandes ensamblados macromoleculares (Figura 66), debido a que minimiza las fuerzas de cizallas aplicadas durante el proceso previo de adquisición de la imagen (Moreno-Herrero et al., 2003).

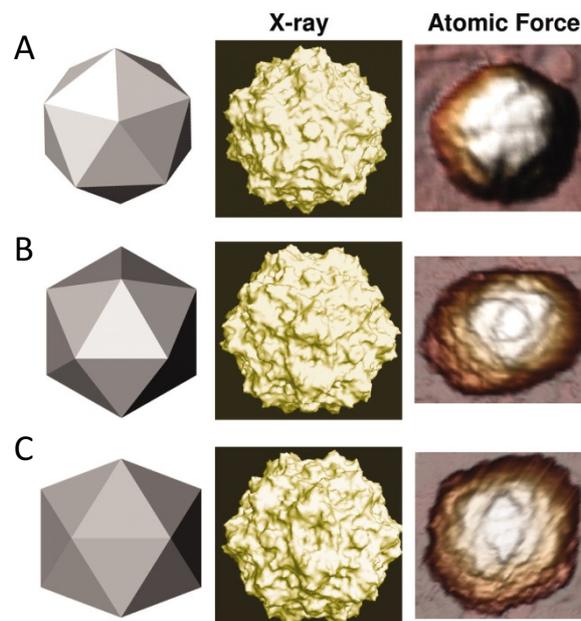


Figura 66. Toma de imágenes de AFM en *jumping mode*. (Izquierda) Partículas virales de MVM vistas desde los diferentes ejes: quinario (A), ternario (B) y binario (C). (Derecha) Dibujos simplificados de las partículas. (Centro) Modelo en superficie obtenido de la estructura cristalográfica de MVM nativo cepa i (PDB id: 1MVM; Carrasco et al., 2008).

En cada punto de la imagen se realiza un ciclo de aproximación y retracción, lo que se traduce en una curva de fuerza (FZC; Figura 67). En estas curvas, se representan la señal medida por el microscopio en voltios (proporcional a la fuerza aplicada), frente a la distancia entre punta y el espécimen, medida en el eje z. Al principio no existe interacción entre la punta y la muestra (punto A). En el momento en el que la punta entra en contacto con la superficie de la muestra (punto B), experimenta una leve fuerza atractiva, reflejada en una leve flexión de la palanca. Desde este punto, la fuerza de contacto entre la punta y la muestra va aumentando, reflejándose en la gráfica un aumento de la altura con la fuerza aplicada hasta llegar a un punto (punto C) elegido por el usuario. En este punto se activa el sistema de retroalimentación del piezoeléctrico y este empieza a contraerse. La fuerza ejercida disminuye, pero debido a las fuerzas de adhesión existentes entre muestra y la punta del cantiléver, no se separan al llegar al punto B, sino que permanecen unidas, provocando la flexión del cantiléver, hasta llegar a un punto (punto D) en el que la fuerza que provoca la flexión de la micropalanca es mayor que las fuerzas de adhesión, volviendo a su posición inicial.

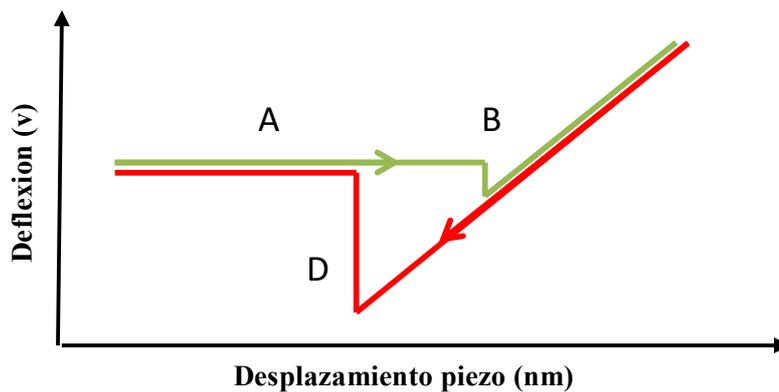


Figura 67. Esquema gráfico explicativo de una curva de fuerza. Curva verde representa el acercamiento de la punta de la palanca a la muestra (curva de ida) y la roja la de alejamiento (curva vuelta).

La AFM no es solo una herramienta para obtener imágenes de diferentes tipos de muestra biológicas, sino que también es posible manipularlas para determinar su rigidez mecánica. Presionando sobre una partícula, localizada con anterioridad, usando la punta del AFM, es posible aplicar fuerzas sobre el punto deseado (indentación) y medir como las partículas responden a ellas (curva FZC). En el campo de la virología física, la deformación de partículas es un comportamiento mecánico que puede ser descrito dentro del modelo de cascara elástica delgada (Landau y Ligshitz, 1970), donde la palanca y la muestra son representadas como dos muelles ideales en serie (Ivanovska et al., 2004). Las indentaciones (FZC) llevadas a cabo sobre el sustrato solo tienen en cuenta la deformación de la palanca. Las indentaciones llevadas a cabo sobre la partícula contienen las deformaciones de tanto la palanca y de la partícula. Para obtener las propiedades mecánicas de la partícula por sí sola, se ha de eliminar la contribución de la palanca por diferencia de las FZC, lo que da como resultado la obtención de la curva de fuerza-indentación (FIC). De las FIC se puede extraer información sobre las propiedades mecánicas de las nanopartículas, tales como su rigidez, deformación crítica o fuerza de rotura.

Todos los experimentos de AFM con muestras de vaults recombinantes fueron realizados por la Dra. Aida Llauro, del grupo del Prof. Pedro De Pablo. Las medidas se tomaron con un microscopio de AFM (Nanotec Electronica, Madrid, España)

funcionando en *jumping mode plus* (Ortega-Esteban et al., 2012). En este modo de trabajo, la punta se desplaza lateralmente cuando está lejos de la muestra y las imágenes son tomadas mediante curvas FZC en todos los puntos. La mayoría de las imágenes fueron tomadas con una fuerza máxima de ~ 75 pN, que conducía a unas alturas máximas de 38 ± 2 nm y 35.5 ± 2 nm para vaults tumbadas sobre el barril y medias vaults respectivamente. Estos valores están de acuerdo con las dimensiones obtenidas de la estructura de la partícula: 35 nm para las medias vaults y 40 nm para partículas tumbadas (Tanaka et al., 2009). Para realizar los experimentos se usaron palancas rectangulares de nitrato de silicio (RC800PSA, Olympus, Center Valley, PA, USA) con una constante de elasticidad de 0.05 N/m y calibrados usando el método Sader (Sader et al., 1999). Los experimentos fueron llevados a cabo bajo condiciones fisiológicas: una gota de 20 μ l de solución stock, consistente en vaults diluidas 20 veces en buffer TMS, fue incubada en una superficie de grafito pirolítico fresco (ZYA quality; NT-MDT, Tempe, AZ) y, después de 30 minutos, lavado con buffer hasta un volumen final de 60 μ l. La punta también fue prelavada con una gota de 20 μ l de buffer.

5.13. EXPERIMENTOS DE QCM-D DE LAS VAULTS RECOMBINANTES

Los cambios producidos en la estructura de las vaults a diferentes pH fueron estudiados usando QCM-D (Q-Sense D300 system, Q-Sense AB, Goteborg, Suecia) en colaboración con el grupo del Dr. Brian Bothner. Para estas medidas, se usaron cristales de cuarzo con una resonancia fundamental de 5 MHz. Antes de cargar las vaults, se llevaron a cabo experimentos control a los distintos pHs para cuantificar el efecto de los buffers en la frecuencia y en la disipación. Se estableció una línea base con el buffer 50 mM Tris a pH 7.5 mantenida durante 10 minutos. Después de tener una línea base estable, las vaults (50 μ g en 600 μ l de buffer Tris a pH7.5) fueron depositadas gradualmente en el cristal y se les dejaron estabilizar durante 50 minutos. Para eliminar el material sobrante después de la fijación, se lavó la superficie con 600 μ l de buffer a pH 7.5 durante 10 minutos. El buffer fue intercambiado, consecutivamente, para bajar el pH a 6.9, 5.0 y 4.0. El tiempo de intercambio de buffers fue de 20 minutos. El mismo experimento se repitió, pero con 10 μ g de proteína en vez de 50 μ g, para asegurarse de que no había ninguna señal por la presencia de agregación de proteína o la presencia de

partículas en múltiples capas. Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Brian Bothner.

5.14. THERMOFLUOR DE VAULTS RECOMBINANTES

La estabilidad térmica de las vaults nativas y mutantes fue estudiada mediante desnaturalización térmica con el fin de estudiar el efecto de la ruptura de interacciones en la región media. Después de llevar a cabo unas pruebas iniciales, nos dimos cuenta que los mejores resultados se obtenían con cantidades relativamente altas de proteína (alrededor de 50 µg de proteína). A cada muestra se le añadió 7.5 µl del agente de tinción Sypro-Orange al 1% (LifeTechnologies) llevándola a un volumen final de 50 µl usando una placa de PDR de 96 pocillos. La fluorescencia fue medida usando un equipo de qPCR Biorad IQ5 al que se le aplicó una rampa de temperaturas de 30° a 90°C con un aumento de 1° por minuto. Las temperaturas medias de transición (T_m) fueron determinadas usando la primera derivada (dF/dT) de los datos de fluorescencia. Todos estos experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

5.15. CRIOMICROSCOPIA ELECTRONICA

5.15.1. PRINCIPIOS BASICO DE LA CRIOMICROSCOPIA ELECTRONICA

Debido a que los electrones pueden ser dispersados por las moléculas de aire, los microscopios electrónicos deben trabajar a alto vacío. Esto plantea un problema cuando estudiamos muestras biológicas, puesto que estas se encuentran en ambiente acuoso. Las estructuras biológicas son además muy sensibles al daño producido por la radiación. Por cada electrón que contribuye a la formación de la imagen, hay como tres electrones que depositan su energía en la muestra. Esta energía causa la rotura de enlaces químicos y, como resultado, la destrucción de la estructura de interés. Manteniendo las muestras a la temperatura del nitrógeno líquido, la criomicroscopía electrónica (cryo-EM) permite la preservación de las mismas a alto vacío y suministra protección contra los efectos dañinos producidos por la radiación (Taylor & Glaeser, 1974).

Para preparar la muestra de cryo-EM (Figura 68), se cogen unos pocos microlitros de la solución de proteína purificada y se colocan sobre una rejilla de metal (normalmente de

cobre), sobre la que hay depositada una fina película de carbono amorfo que contiene agujeros. Después de retirar el exceso de muestra líquida (blotting) con papel de filtro, la rejilla es sumergida en etano líquido (Dubochet et al., 1982). Idealmente, este proceso resulta en la formación de una fina capa de hielo amorfo, en el cual las proteínas se depositan en un rango de orientaciones. Las imágenes son tomadas a través de los agujeros de la película de carbono, las cuales contienen proyecciones en dos dimensiones de las partículas embebidas en el hielo. Las proyecciones de las partículas en varias orientaciones da información complementaria sobre la forma 3D del objeto al que pertenecen. Si se tienen numerosas proyecciones 2D, se pueden combinar para formar una reconstrucción 3D, suponiendo que las orientaciones relativas de cada una de ellas es conocida.

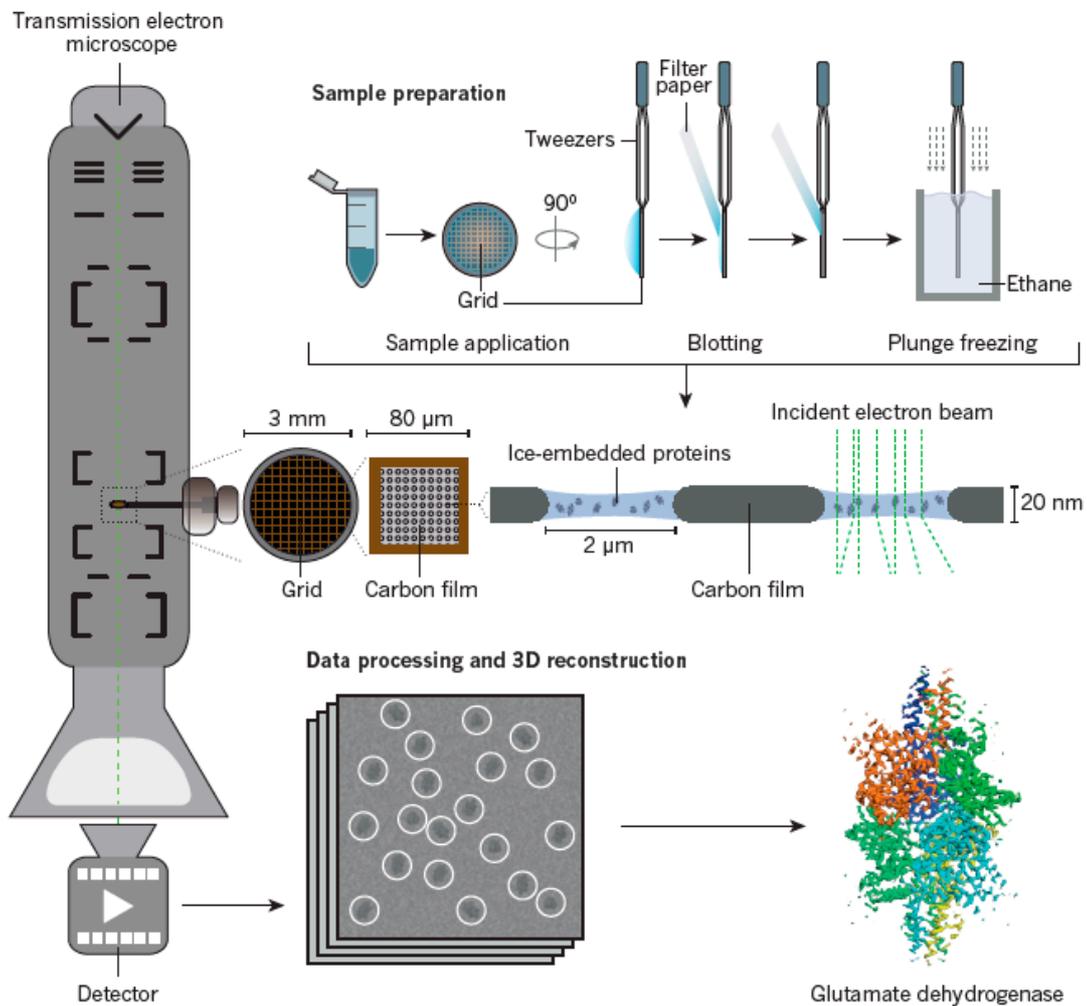


Figura 68. Esquema de todos los pasos llevados a cabo para la determinación estructural de proteínas mediante cryo-EM: preparación de muestra, toma de datos, procesado de los mismos y por último reconstrucción 3D (Leiro y Scheres, 2016).

La orientación relativa de las partículas puede ser determinada a posteriori mediante el procesamiento de las imágenes de las proyecciones 2D (Frank et al., 1981), en un proceso conocido como el análisis de *single-particle*. Las imágenes recogidas en *single-particle* cryo-EM poseen un bajo contraste, debido a que las proteínas dispersan los electrones solo un 30% más que el hielo que les rodea. Esto no sería un problema si se pudieran usar muchos electrones para determinar diferencias en la intensidad de las imágenes. Sin embargo, para reducir los daños causados por la radiación, el número de

electrones usado debe ser cuidadosamente limitado, dando como resultado unas imágenes extremadamente ruidosas. Este ruido dificulta la asignación de orientaciones a las partículas, lo que se convierte en el cuello de botella de esta técnica.

Para las muestras de vaults recombinantes con TEP1 se recogieron imágenes en tres microscopios distintos (el FEI Tecnai G2 y el FEI Thalos Arctica del CNB en Madrid y en el FEI Titan Kryos de la Universidad de Columbia en Nueva York). En los dos primeros, se incubaron alícuotas de 4 μl de la muestra a unos 10 mg/ml durante 60 s sobre rejillas de carbono agujereado (Quantifoil R2/2) que habían sido expuestas a acetona vapor previamente. Las rejillas fueron *bloteadas* manualmente durante 3 segundos y sumergidas en etano líquido ayudándose de una CCP-EM de Leica. Las rejillas se transfirieron a un microscopio FEI Thalos Arctica, el cual opera a 200 kV. Se recogieron imágenes a una dosis estimada de 28 electrones/ $\text{\AA}^2\cdot\text{s}$ y la total de 50 electrones/ \AA^2 y a unos valores de desenfoque de 1-3 μm . Las imágenes fueron recogidas usando el programa EPU (FEI) en un detector de electrones directo FEI Falcon II a una magnificación calibrada de 104478 (tamaño de pixel de 1.37 $\text{\AA}/\text{px}$); cada una de ellas cuenta con 32 fotogramas. Todas las micrografías que presentaban signos de un astigmatismo o *drift* significativo fueron descartadas. Todo este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Daniel Luque y el Dr. José R. Castón.

En las adquisiciones de imágenes de cryo-EM realizadas en la Universidad de Columbia en colaboración con el Prof. Israel S. Fernández se procedió de la siguiente manera. Se incubaron alícuotas de 3 μl de la muestra a unos 10 mg/ml durante 15 s sobre rejillas de oro (UltrAufoil R 1.2/1.3) ionizadas mediante *glow discharge* (Gatan Plasma System). Las rejillas fueron *bloteadas* durante 3 segundos, con una fuerza de 3 y sumergidas en etano líquido utilizando un Vitrobot (FEI). Las rejillas se transfirieron a un microscopio electrónico FEI Titan Kryos, el cual opera a 300 kV. Se recogieron imágenes a una dosis estimada de 2.5 electrones/ $\text{\AA}^2\cdot\text{s}$ trabajando en *counting mode* y una total de 30 electrones/ $\text{\AA}^2\cdot\text{s}$ y a unos valores de desenfoque de 1-3 μm . Las películas fueron tomadas usando el programa Legikon (Suloway et al., 2005) en un detector de electrones directo K2 (Gatan) a una magnificación de 79096 (tamaño de pixel de 1.78 $\text{\AA}/\text{px}$) y cada una de ellas cuenta con 40 fotogramas. Todas las micrografías que presentaban signos de un astigmatismo o *drift* significativo fueron descartadas.

5.15.2. PROCESADO DE IMAGENES

En el caso de las imágenes adquiridas en el FEI Talos Arctica del CNB, se obtuvieron un total de 27037 partículas que fueron seleccionadas usadas el programa de picado semiautomático Gautomach. Los fotogramas de cada película recogida fueron alineadas usando MotionCor2 (Zheng et al. 2017). La función de transferencia de contraste (CTF) fue calculada usando el programa CTFFind4 (Rohou y Grigorieff, 2015). Todas las clasificaciones 2D y 3D, así como los refinamientos de las estructuras fueron llevados a cabo usando RELION (Scheres, 2012).

Para las imágenes recogidas en el FEI Titan Kryos de Nueva York, se obtuvieron un total de 34128 partículas que fueron seleccionadas usadas el programa de picado semiautomático FindEM (Roseman, 2004). Los fotogramas de cada película recogida fueron alineadas usando MotionCor2 (Zheng et al. 2017). La función de transferencia de contraste (CTF) fue calculada usando el programa Gctf (Zhang, K. 2016). Antes de llevar a cabo el refinamiento estructural, se llevó a cabo el promediado de clases 2D libre de modelo y clasificación 3D para identificar subconjuntos de datos estructuralmente homogéneos. Todas las clasificaciones 2D y 3D, así como los refinamientos de las estructuras fueron llevados a cabo usando RELION (Scheres, 2012). En el caso de la clasificación 3D de la TEP1 sin modelo se utilizó el software CryoSPARC (Punjani et al., 2017).

En todas las clasificaciones 3D y refinamientos 3D se utilizó como modelo el mapa de la vault que está depositado en el Protein Data Bank (PDB id: 4HL8) filtrado a 60 Å.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbondanza, C. et al. 1998. Interaction of vault particles with estrogen receptor in the MCF-7 breast cancer cell. *J. Cell Biol.* 141:1301 – 1310.

Agbandje, M., Rossmann, M.G., Strassheim, M.L. y Parrish, C.R. 1993. Structure determination of feline panleukopenis virus empty particles. *Proteins* 19:155-171.

Agbandje, M., Kajigaya, S., McKenna, R., Young N.S. y Rossmann, M.G. 1994. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology* 203:106-115.

Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang F., Tattersall, P. y Rossmann, M.G. 1998. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* 6: 1369-1381.

Alexander, S. et al. 1989. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *Journal of Applied Physics* 65:164-167.

Almendral, J.M: 2006. Parvoviridae. En *Virus Patogenos*, (L.,Carrasco y J.M. Almendral, eds.) pp. 165-184. Helice. Madrid.

Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.L. y Kühlbrandt, W. 2011. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I III₂ IV₁. *The EMBO journal.* 30:4652–4664.

Amunts, A. et al. 2014. Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science* 343, 1485–1489.

Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H. W. y Ramakrishnan, V. 2015. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science* 348, 95–98.

Anderson, D.H. et al. 2007. Draft crystal structure of the vault shell at 9-Å resolution. *PLoS Biol* 5(11):318.

Andrade, M.A. y Bork, P. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet.* 11(2):115-6.

Arkhipov, A., Roos, W.H., Wuite, G.J. y Schulten, K. 2009. Elucidating the mechanism behind irreversible deformation of viral capsids. *Biophys J.* 97(7):2061-9.

Ashkin, A. y Dziedzic, J.M. 1987. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 235:1517-20.

Astell, C.R., Gardiner, E.M. y Tattersall P. 1986. DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* 57: 656-669.

Baclayon, M. et al. 2011. Prestress strengthens the shell of Norwalk virus nanoparticles. *Nano Lett.* 11:4865-9.

BIBLIOGRAFIA

Bai, X.C., Fernández, I.S., McMullan, G. y Scheres, S.H.W. 2013. Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles. *eLife*.

Bai X.C. et al. 2015. An atomic structure of human γ -secretase. *Nature*. 525:212–217.

Baker, M. 2010. Making membrana proteins for structures: a trillion tiny tweaks. *Nature Meth.* 7:429–434.

Bartesaghi A, et al. 2015. 2.2 A resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cellpermeant inhibitor. *Science*.

Bateman, A. y Kickhoefer, V. 2003. The TROVE module: a common element in Telomerase, Ro and Vault ribonucleoproteins. *BMC Bioinformatics*, 4, 49–54.

Bayburt, T.H. y Sligar, S.G. 2009. Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett.* 584:1721–1727.

Beck, M. et al. 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306(5700): 1387-90.

Berger, W., Elbling, L., y Micksche, M. 2000. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer* 88, 293 – 300.

Berger, W. et al. 2009. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci* 66(1): 43-61.

Bink, H.H. y Pleij, C.W. 2002. RNA-protein interactions in spherical viruses. *Arch. Virol.* 147:2261-2279.

Binnig, G., Quate, C.F. y Gerber., C. 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56: 930.

Bleker, S., Sonntag, F., Kleinschmidt, J.A. 2005. Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J. Virol.* 79:2528-2540.

Brigger, I. et al. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54(5): 631-51.

Brunger, A.T. et al. 1998. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* 54, 905-921.

Buehler, D.C. et al. 2014. Bioengineered vaults: self-assembling protein shell-lipophilic core nanoparticles for drug delivery. *ACS Nano*. 8(8):7723-32.

Campbell, M.G. et al. 2012. Movies of Ice-Embedded Particles Enhance Resolution in Electron CryoMicroscopy. *Structure*. 20:1823–1828.

- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. y Julius, D. 2013. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*. 504:113–118.
- Carrasco, C. 2006. DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:13706-13711.
- Carrasco, C., Castellanos, M., de Pablo, P.J. y Mateu, M.G. 2008. Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:4150-4155.
- Carreira, A., Menéndez, M., Reguera, J., Almendral, J.M. y Mateu M.G. 2004. In vitro disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops. *J. Biol. Chem.* 279:6517-6525.
- Casañas, A. et al. 2013. New features of vault architecture and dynamics revealed by novel refinement using the deformable elastic network approach. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 69(Pt 6):1054-61.
- Castellanos, M. et al. 2012. Mechanical elasticity as a physical signature of conformational dynamics in a virus particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:12028-12033.
- Castellanos, M., Carrillo, P.J.P. y Mateu, M.G. 2015. Quantitatively probing propensity for structural transitions in engineered virus nanoparticles by single-molecule mechanical analysis. *Nanoscale* 7:5654-5664.
- Champion, C. I. et al. 2009. A vault nanoparticle vaccine induces protective mucosal immunity. *PLoS One* 4.
- Chapman, M.S. y Rossmann, M.G. 1993. Structure, sequence and function correlations among parvovirus. *Virology* 194:491-508.
- Chapman, M.S. y Rossmann, M.G. 1995. Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus. *Structure* 3: 151-162.
- Chen, D.H. et al. 2006. Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. *Nano Lett.* 6:611-615.
- Chen, Z. et al., 1989. Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science* 245:154-159.
- Chiu, W., Burnett, R.M. y Garcea, R.L. 1997. *Structural Biology of Viruses*, (Chiu, W., Garcea, R. y Burnett, R. eds). pp.157-186. Oxford University Press, Oxford.
- Choi C, Chae C. 2000. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J Comp Pathol.* 123(4):302-305.

BIBLIOGRAFIA

Chowdhury, S., Ketcham, S. A., Schroer, T. A. y Lander, G. C. 2015. Structural organization of the dynein–dynactin complex bound to microtubules. *Nature Struct. Mol. Biol.* 22, 345–347

Christensen, J. y Tattersall, P. 2002. Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *J Virol.* 76(13):6518-31.

Chugani, D.C. et al. 1993. Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J Cell Sci* 106 (Pt 1): 23-9.

Chung, J. H. y Eng, C. 2005. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.* 65:8096–8100.

Chung, J. H., Ginn-Pease, M. E. y Eng, C. 2005. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res.* 65:4108 – 4116.

Clare, D.K. et al. 2012. ATP-Triggered Conformational Changes Delineate Substrate-Binding and - Folding Mechanics of the GroEL Chaperonin. *Cell.* 149:113–123.

Cotmore, S.F., D'abramo, A.M., Ticknor, C.M. y Tattersall, P. 1999. Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* 254:169-181.

Cotmore, S.F. y Tattersall, P. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33:91-174.

Cotmore, S.F. y Tattersall, P. 2005. Packaging sense is controlled by the efficiency of the nick site in the right-end replication origin of parvoviruses MVM and LuIII. *J. Virol.* 79:2287-2300.

Cotmore, S.F. y Tattersall, P. 2006. Parvoviruses. P. 593-608. In M. De Pamphilis (ed.) *DNA replication and human disease.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Cotmore, S.F. y Tattersall, P. 2007. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv. Virus Res.* 70: 183-232.

Cotmore, S.F., Hafenstein, S. y Tattersall, P. 2010. Depletio of virion-associated divalent cations induces parvovirus minute virus of mice to eject its genome in a 3'-5' direction from an otherwise intact viral genome. *J. Virol.* 84:1945-1956.

Cowtan, K. y Main, P. 1998. Miscellaneous algorithms for density modification. *Acta Crystallogr. D* 54:487-493

Das, D., Wang, Y.H., Hsieh, C.Y. y Suzuki, Y.J. 2016. Major vault protein regulates cell growth/survival signaling through oxidative modifications. *Cell Signal.* 28(1):12-18.

- Daya, S. y Berns, K. 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical*
- de Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. y Baró, A. M. 1998. Jumping mode scanning force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 73:3300-3302.
- de Pablo, P.J., Schaap, I.A., MacKintosh, F.C. y Schmidt, C.F. 2003. Deformation and collapse of microtubules on the nanometer scale. *Phys Rev Lett.* 91(9).
- Dickenson, N.E. et al. 2007. Vault ribonucleoprotein particles and the central mass of the nuclear pore complex. *Photochem Photobiol* 83(3): 686-91.
- Du, J., Lü, W., Wu, S., Cheng, Y. y Gouaux, E. 2015. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature*.
- Dubochet, J., Chang, J.J., Freeman, R., Lepault, J. y McDowell, A.W. 1982. Frozen aqueous suspensions. *Ultramicroscopy.* 10: 55–61.
- Emsley, P. y Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* 60:2126-2132.
- Esfandiary, R. et al. 2008. Structural stability of vault particles. *J Pharm Sci.*
- Evans, P.R. 2005. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D* 62:72-82.
- Evilevitch, A. et al. 2011. Effects of salts on internal DNA pressure and mechanical properties of phage capsids. *J Mol Biol.* 405(1):18-23
- Farr, G.A. y Tattersall, P. 2004. A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection. *Virology* 323:243-256.
- Farr, G.A., Cotmore, S.F. y Tattersall, P. 2006. VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice. *Nucleic Acids Res.* 35:W375-W383.
- Fisher, A.J. y Johnson, J.E. 1993. Ordered duplex RNA controls capsid architecture in an icosahedral animal virus. *Nature* 361:176-179.
- Frank, J., Verschoor, A. y Boublik, M. 1981. Computer averaging of electron micrographs of 40S ribosomal subunits. *Science.* 214: 1353–1355.
- Goldsmith, L.E. et al. 2007. Vault nanocapsule dissociation into halves triggered at low pH. *Biochemistry* 46(10): 2865-75.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V. y Wolf, Y.I. 1990. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett.* 262(1):145-8.
- Gosse, C. y Croquette, V. 2002. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys J.* 82(6):3314-29.

BIBLIOGRAFIA

Hamill, D.R. and Suprenant, K.A. 1997. Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev Biol* 190(1): 117-28.

Harrington, L. et al. 1997. A mammalian telomerase associated protein. *Science*, 275, 973–977.

Henderson, R. 1995. The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 28:171– 193.

Hernando, E. et al. 2000. Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles. *Virology* 267:299-309.

Hernando-Perez, M. et al. 2012. Direct measurement of phage phi29 stiffness provides evidence of internal pressure. *Small* 8:2366.

Hernando-Perez, M. et al. 2014. Cementing proteins provide extra mechanical stabilization to viral cages. *Nat Commun* 5.

Herrmann, C., et al. 1997. Analysis of a cDNA encoding the major vault protein from the electric ray *Discopyge ommata*. *Gene* 188(1): 85-90.

Herrmann, C. et al. 1999. Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells. *J Cell Biol* 144(6): 1163-72.

Herrmann, C., Golkaramnay, E., Inman, E., Rome, L., and Volkhardt, W. 1999. Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells. *J. Cell Biol.* 144:1163 –1172.

Hickman, A.B., Ronning, D.R., Kotin, R.M. y Dyda, F. 2002. Structural unity among viral origin binding proteins: crystal structure of the nuclease domain of adeno-associated virus Rep. *Mol Cell*. 10(2):327-37.

Hite, R.K. et al. 2015. Cryo-electron microscopy structure of the Slo2.2 Na⁺-activated K⁺ channel. *Nature*. 527:198–203.

Horcas, I. et al. 2007. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments* 78:13705.

Hugel, T. et al. Experimental test of connector rotation during DNA packaging into bacteriophage phi29 capsids. *PLoS Biol.* 5(3):e59.

Ivanovska, I. et al. 2004. Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:7600-7605.

Ivanovska I, Wuite G, Jönsson B, Evilevitch A. 2007. Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(23):9603-9608.

- Jaafar, M., Martínez-Martín, D., Cuenca, M., Melcher, J., Raman, A. y Gómez-Herrero, J. 2002. Drive-amplitude-modulation atomic force microscopy: From vacuum to liquids. *Beilstein journal of nanotechnology* 3:336-344.
- Jiang, W. et al. 2008. Backbone structure of the infectious $\epsilon 15$ virus capsid revealed by electron cryomicroscopy. *Nature*. 451:1130–1134
- Kabsch, W. 2010. XDS. *Acta Crystallogr. D* 66:125-132.
- Kaether, C., Skehel, P. y Dotti, C. G. 2000. Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a twocolor video microscopy study in cultured hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* 11:1213 – 1224.
- Kar UK. 2011. Novel CCL21-vault nanocapsule intratumoral delivery inhibits lung cancer growth. *PLoS One*.;6(5):e18758
- Kato, K. et al. 2008. A vault ribonucleoprotein particle exhibiting 39-fold dihedral symmetry. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64(Pt 5): 525-31.
- Kaufmann, B., Simpson, A.A. y Rossmann, M.G. 2004. The structure of human parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13671-13674.
- Kedersha, N. L. et al. 1986. Subpopulations of liver coated vesicles resolved by preparative agarose gel electrophoresis. *J Cell Biol* 103(1): 287-97.
- Kedersha, N. L. et al. 1990. Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J Cell Biol* 110(4): 895-901.
- Kedersha, N. L. et al. 1991. Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol* 112(2): 225-35.
- Kelley, L.A. et al. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845-858
- Kern, A. et al. 2003. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol*. 77(20):11072-81.
- Kickhoefer, V. A., Stephen, A. G., Harrington, L., Robinson, M. O. y Rome, L. H. 1999. Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J. Biol. Chem.* 274, 32712–32717
- Kickhoefer, V. A. et al., 2001. The telomerase/vault-associated protein TEP1 is required for vault RNA stability and its association with the vault particle. *J. Cell Biol.* 152, 157–164.
- Kickhoefer, V. A. et al. 1993. Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III. *J Biol Chem* 268(11): 7868-73.

BIBLIOGRAFIA

Kickhoefer, V. A., Vasu, S. K., and Rome, L. H. (1996) Vaults are the answer, what is the question? *Trends Cell Biol.* 6, 174 – 178.

Kickhoefer, V.A. et al. 1999. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 146(5): 917-28.

Kickhoefer, V.A. et al. 1999. Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem* 274(46): 32712-7.

Kickhoefer, V. A. et al. 2005. Engineering of vault nanocapsules with enzymatic and fluorescent properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(12): 4348- 52.

Kickhoefer, V. A. et al. 2009. Targeting vault nanoparticles to specific cell surface receptors. *ACS Nano* 3(1): 27-36.

Kim, E. et al. 2006. Crosstalk between Src and major vault protein in epidermal growth factor-dependent cell signalling. *Febs J.* 273:793 – 804.

King, J.A., Dubielzig, R., Grimm S.W. y Kleinschmidt, J.A. 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* 20: 3282-3291.

King, N. P., et al., 2014. Accurate design of co-assembling multi-component protein nanomaterials. *Nature* 510: 103-108.

Kitazono, M., et al. 1999. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1647 – 1653.

Kitazono, M. et al. 2001. Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells. *Int. J. Cancer* 91:126 – 131.

Kol, N., Gladnikoff, M., Barlam, D., Shneck, R.Z., Rein, A. y Rousso, I. 2006. Mechanical properties of murine leukemia virus particles: effect of maturation. *Biophys J.* 91(2):767-74.

Kol, N. et al. 2007. A stiffness switch in human immunodeficiency virus. *Biophys J.* 92(5):1777-83.

Kolli, S. et al. 2004. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 279(28): 29374-85.

Kong, L. B., Siva, A. C., Rome, L. H., y Stewart, P. L. 1999. Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure Fold Des.* 7, 371 – 379.

Kong, L. B., Siva, A. C., Kickhoefer, V. A., Rome, L. H., and Stewart, P. L. 2000. RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault. *Rna* 6, 890 – 900

- Kontou, M. et al. 2005. Structural determinants of tissue tropism and in vivo pathogenicity for the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 79:10931-10943.
- Kowalski, M. P. et al. 2007. Host resistance to lung infection mediated by major vault protein in epithelial cells. *Science* 317(5834): 130-2.
- Lai, C. Y. et al. 2009. Vault nanoparticles containing an adenovirus-derived membrane lytic protein facilitate toxin and gene transfer. *ACS Nano* 3(3): 691-9.
- Landau, L. y Ligshitz, E. *Theory of Elasticity (Second Edition)*. Vol. 7 (Pregamon Press, 1970).
- Lander, G.C., Evilevitch, A., Jeembaeva, M., Potter, C.S., Carragher, B. y Johnson, J.E. 2008. Bacteriophage lambda stabilization by auxiliary protein gpD: timing, location, and mechanism of attachment determined by cryo-EM. *Structure* 16(9):1399-1406.
- Larson, S.B., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A., Dodds, J.A. y McPherson, A. 1993. Double-helical RNA in satellite tobacco mosaic virus. *Nature* 361:179-182.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D. y Cheng, Y. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 504:107–112.
- Linser, P.J., Trapido-Rosenthal, H.G. y Orona, E. 1997. Glutamine synthetase is a glial-specific marker in the olfactory regions of the lobster (*Panulirus argus*) nervous system. *Glia*. 20(4):275-83.
- Li, X. et al. 2013. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nature Meth.* 10:584–590.
- Liu Y. et al. 2000. Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol.* 20(21):8178-84.
- Liu y. et al. 2004. Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(12):5314-23.
- Liu, J.-J. et al. 2016. CryoEM structure of yeast cytoplasmic exosome complex. *Cell Res.* 26, 822–837.
- Llamas-Saiz, A.L., Agbandje-McKenna, M., Wikoff, W.R., Bratton, J., Tattersall, P. y Rossmann, M.G. 1997. Structure determination of minute virus of mice. *Acta Crystallogr. D.* 53:93-102.
- Lombardo, E., Ramírez, J.C., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J.M. 2000. A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol.* 74(8):3804-3814.

BIBLIOGRAFIA

Lombardo E, Ramírez JC, Garcia J, Almendral JM. 2002. Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol.* 76(14):7049-7059.

López-Bueno, A. 2002. Cambios de aminoácidos en la superficie de la cpside del parvovirus MVM determinan la adaptación, el tropismo y el escape a anticuerpos neutralizantes, en un hospedador inmunodeficiente. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

López-Bueno, A., Rubio, M.P., Bryant, N., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J.M. 2006. Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol.* 80(3):1563-73.

Luby-Phelps, K., Castle, P. E., Taylor, D. L., y Lanni, F. 1987. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84:4910 – 4913.

Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J.M., Kempf, C. y Ros, C. 2006. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol.* 80(2):1015-1024.

Mateu, M.G. 2011. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Prot Eng Des Sel* 24:53-63.

Mateu, M.G. 2012. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virologica perspectives. *Virus Res.* 168:1-22.

Maroto, B., Valle, N., Saffrich, R. y Almendral, J.M. 2004. Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface. *J.Virol.* 78:10685-10694.

Mastrobattista, E. et al. 2006. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 5(2): 115-21.

Matthews, B.W. 1996. Structural and genetic analysis del plegamiento y fncion de la lisozima T4. *FASEB J.* 10, 35-41.

McCoy, A.J. et al. 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* 40:658-674.

McMullan, G., Faruqi, A.R., Clare, D. y Henderson R. 2014. Comparison of optimal performance at 300keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy.* 147:156–163

Meyer, G. y Amer, N. M. 1988. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 53:1045-1047.

- McKenna, R. et al. 1992. Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage phi X174 and its functional implications. *Nature* 355:137-143.
- Michel JP. et al. 2006. Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(16):6184-9
- Mikyas, Y. et al. 2004. Cryoelectron microscopy imaging of recombinant and tissue derived vaults: localization of the MVP N termini and VPARP. *J. Mol. Biol.* 344, 91 – 105.
- Moody MF. 1999. Geometry of phage head construction. *J Mol Biol.* 293(2):401-33.
- Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N.H., Kanaar, R., Wyman, C. y Dekker, C. 2005. Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437(7057):440-443.
- Moreno-Herrero, F., de Pablo, P.J., Álvarez, M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. y Baró, A.M. 2003. Jumping mode scanning force microscopy: a suitable technique for imaging DNA in liquids. *Appl. Surf. Sci.* 210:22-26.
- Moreno-Herrero, F., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. and Baró, A.M. 2004. Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 69, 31915.
- Mossink, M. H., A. van Zon, et al. (2002). "Disruption of the murine major vault protein (MVP/LRP) gene does not induce hypersensitivity to cytostatics." *Cancer Res* 62(24): 7298-304.
- Mossink, M. H. et al. 2003. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene* 22, 7458 – 7467.
- Motsch, N. et al. 2007. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol* 4(3): 131-7.
- Mouw, M. y Pintel, D.J. 1998. Amino acids 16-275 of minute virus of mice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)₂₋₃-containing DNA. *Virology* 251(1):123-31.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. y Dodson, E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* 53:240-255.
- Myers, M.W. y Carter, B. J. 1980 Assembly of adeno-associated virus. *Virology* 102:71-82.
- Ng, B. C. et al. 2008. Encapsulation of semiconducting polymers in vault protein cages. *Nano Lett* 8(10): 3503-9.

BIBLIOGRAFIA

Nüesch, J.P., Cotmore, S.F. y Tattersall, P. 1995. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* 209(1):122-35.

Ortega-Esteban, A. et al., 2012. Minimizing tip-sample forces in jumping mode atomic force microscopy in liquid. *Ultramicroscopy*. 114:56-61.

Ortega-Esteban, A. et al. 2013. Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Sci. Rep.* 3: 1434.

Panté, N. y Kann, M. 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell.* 13:425-434.

Paradiso, P.R. 1981. Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density and viral infectivity. *J. Virol.* 39:800-807.

Paspalas, C. D. et al. 2009. Major vault protein is expressed along the nucleus-neurite axis and associates with mRNAs in cortical neurons. *Cereb Cortex* 19(7): 1666-77.

Patterson, D.P., Prevelige P.E. y Douglas, T. 2012. Nanoreactors by programmed enzyme encapsulation inside the capsid of the bacteriophage. *ACS Nano* 6:635-639.

Plevka, P., Hafenstein, S., Li, L., D'Abbramo, A., Cotmore, S.F., Rossmann, M.G. y Tattersall, P. 2011. Structure of a packaging-defective mutant of minute virus of mice indicates that the genome is packaged via a pore at a 5-fold axis. *J. Virol.* 85:4822-4827.

Prigent, M., Leroy, M., Confalonieri, F., Dutertre, M. y DuBow, M.S. 2005. A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. *Extremophiles.* 9(4):289-96.

Poderycki, M. J., Rome, L. H., Harrington, L. y Kickhoefer, V. A. 2005. The p80 homology region of TEP1 is sufficient for its association with the telomerase and vault RNAs, and the vault particle. *Nucleic Acids Res.* 33, 893 – 902.

Poderycki, M.J. 2006. The vault exterior shell is a dynamic structure that allows incorporation of vault-associated proteins into its interior. *Biochemistry* 45(39):12184-93.

Potter, C.S. et al. 1999. Legion: a system for fully automated acquisition of 1000 electron micrographs a day. *Ultramicroscopy.* 77:153–161.

Puigbo P., Guzman E., Romeu A. y Garcia-Vallve S. 2007. OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Research.* 35:126-131.

Punjani, A., Rubinstein, J.L., Fleet, D.J. y Brubaker, M.A. 2017. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination.

- Querol-Audi, J. et al. 2005. Preliminary analysis of two and three dimensional crystals of vault ribonucleoprotein particles. *J Struct Biol* 151(1): 111-5.
- Querol-Audi, J. 2009. The mechanism of vault opening from the high resolution structure of the N-terminal repeats of MVP. *EMBO J* 28(21): 3450-7.
- Ramesh, A., Savva, C.G., Holzenburg, A., Sacchettini, J.C. 2007 Crystal structure of Rsr, an ortholog of the antigenic Ro protein, links conformational flexibility to RNA binding activity. *J.Biol.Chem.* 282: 14960-14967
- Ramírez, J.C., Santarén, J.F. y Almendral, J.M. 1995. Transcriptional inhibition of the parvovirus minute virus of mice by constitutive expression of an antisense RNA targeted against the NS-1 transactivator protein. *Virology* 206(1):57-68.
- Reguera, J., Carreira, A., Riolobos, L., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. 2004. Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):2724-9.
- Reguera, J., Grueso, E., Carreira, A., Sánchez-Martínez, C., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. 2005. Functional relevance of amino acid residues involved in interactions with ordered nucleic acid in a spherical virus. *J. Biol. Chem.* 280:17969-17977.
- Richards, R., Linser P. y Armentrout, R.W. 1977. Kinetics of assembly of a parvovirus, minute virus of mice, in synchronized rat brain cells. *J. Virol.* 22:778-193.
- Riolobos, L., Reguera, J., Mateu, M.G. y Almendral, J.M. 2006. Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J Mol Biol.* 357(3):1026-38.
- Rohou, A. y Grigorieff, N. 2015. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J Struct Biol.* 192(2):216-21
- Rome, L. et al. 1991. Unlocking vaults: organelles in search of a function. *Trends Cell Biol* 1(2-3): 47-50.
- Roos, W.H., Radtke, K., Kniesmeijer, E., Geertsema, H., Sodeik, B. y Wuite, G.J. 2009. Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(24):9673-8
- Roos, W.H., Bruinsma, R. y Wuite, G.J.L. 2010. Physical virology. *Nat. Phys.* 6:733-743.
- Ros, C., Burckhardt, C.J. y Kempf, C. 2002. Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J Virol.* 76(24):12634-12645.
- Ros, C. y Kempf, C. 2004. The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology.* 324(2):350-60.

BIBLIOGRAFIA

Ros, C., Baltzer, C., Mani, B. y Kempf, C. 2006. Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology* 345(1):137-147.

Roseman, A.M. 2004. FindEM--a fast, efficient program for automatic selection of particles from electron micrographs. *J Struct Biol.* 145(1-2):91-9.

Ryu, S. J. et al. 2008. On the role of major vault protein in the resistance of senescent human diploid fibroblasts to apoptosis. *Cell Death Differ.*

Sader, J.E., Chon, J.W.M. y Mulvaney, P. 1999. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* 70:3967-3969.

Santarén, J.F., Ramírez, J.C. y Almendral, J.M. 1993. Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J Virol.* 67(9):5126-5138.

Scheffer, G. L. et al. 1995. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat. Med.* 1, 578 – 582.

Scheres, S.H.W. et al. 2006. Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nature Meth.* 4:27–29

Scheres SHW. A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination. *J Mol Biol.* 2012; 415:406– 418.

Schweitzer, A. et al. 2016. Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, 7816–7821.

Seidelt, B. et al. 2009. Structural Insight into Nascent Polypeptide Chain-Mediated Translational Stalling. *Science.* 326:1412–1415.

Sengupta, D.J. et al. 1996. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16):8496-8501.

Shiroguchi, K. y Kinosita, K. Jr. 2007. Myosin V walks by lever action and Brownian motion. *Science.* 316(5828):1208-1212.

Simpson, A.A., Hebert, B., Sullivan, G.M., Parrish, C.R., Zadori, Z., Tijssen, P. y Rossmann, M.G. 2002. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J. Mol. Biol.* 315:1185-1198.

Slesina, M., Inman, E. M., Rome, L. H., and Volkandt, W. 2005. Nuclear localization of the major vault protein in U373 cells. *Cell Tissue Res.* 321:97 – 104.

Slesina, M., Inman, E. M., Moore, A. E., Goldhaber, J. I., Rome, L. H., y Volkandt, W. 2006. Movement of vault particles visualized by GFP-tagged major vault protein. *Cell Tissue Res.* 324:403 – 410

- Smith, D.E., Tans, S.J., Smith, S.B., Grimes, S., Anderson, D.L. y Bustamante, C. 2001. The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413(6857):748-52.
- Sotres, J. y Baró, A.M. 2010. AFM imaging and analysis of electrostatic double layer forces on single DNA molecules. *Biophys. J.* 98: 1995-2004.
- Steiner, E., Holzmann, K., Elbling, L., Micksche, M. y Berger, W. 2006. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr. Drug Targets* 7:923 – 934.
- Steiner, E. et al. 2006. The major vault protein is responsive to and interferes with interferon-gamma-mediated STAT1 signals. *J Cell Sci* 119(Pt 3): 459-69.
- Stephen, A. G et al. 2001. Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein. *J Biol Chem* 276(26): 23217-20.
- Stein, A.J., Fuchs, G., Fu, C., Wolin, S.L., Reinisch, K.M. 2005. Structural Insights into RNA Quality Control: The Ro Autoantigen Binds Misfolded RNAs via Its Central Cavity. *Cell* 121: 529-539.
- Suganuma, T., Pattenden, S. G. Y Workman, J. L. 2008. Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition. *Genes Dev.* 22, 1265 – 1268.
- Suikkanen, S. et al. 2003. Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol.* 77(19):10270-10279.
- Suloway, C. et al. 2005. Automated Molecular Microscopy: The New Legion System. *Journal of Structural Biology* 151 (1): 41-60.
- Sun, J. et al. 2007. Core-controlled polymorphism in virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1354-1359.
- Tanaka, H. et al. 2009. The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science* 323(5912): 384-8.
- Tang, L., Johnson, K.N., Ball, L.A., Lin, T., Yeager, M. y Johnson, J.E. 2001. The structure of pariacoto virus reveals a dodecahedral cage of duplex RNA. *Nat. Struct. Biol.* 8:77-83.
- Tattersall, P., Cawte, P.J., Shaktin, A.J. y Ward, D.C. 1976. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* 20:273-289.
- Tattersall, P. y Cotmore, S.F. 1988. The nature of parvoviruses. En *Parvoviruses and Human Disease*, (John R. Pattison, ed.) pp. 5-42. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Tattersall, P. et al. 2005. Parvoviridae, p. 593-608. *In* C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball (ed.), *Virus taxonomy*. 8th report of the

BIBLIOGRAFIA

International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London England.

Tavernarakis, N., Driscoll, M. y Kyrpides, N.C. 1999. The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24:425–427.

Taylor, K.A. y Glaeser, R.M. 1974. Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science.* 186(4168):1036-7.

Tijssen, P., Szelei, J. y Zadori, Z. 2006. Phospholipase A2 domains in structural proteins of parvoviruses. En *The Parvoviruses*, (J. Kerr, S.F. Cortmore, M.E. Bloom, R.M. Linden, C.R. Parrish, eds.) pp 95-105. Hodder Arnold, London.

Torchilin, V. P. 2004. Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell Mol Life Sci* 61(19-20): 2549-59.

Tresnan, D.B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J.Y. y Parrish, C.R. 1995. Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. *Virology.* 211(1):123-32.

Tsao, J., et al., 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251:1456-1464.

Tullis, G.E., Burguer, L.R. y Pintel, D.J. 1992. The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo. *Virology* 191:846-857.

Umlauf, E., Csaszar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G.J., Parton, R.G. y Prohaska, R. 2004. Association of stomatin with lipid bodies. *J. Biol. Chem.* 279:23699–23709.

van Zon, A. et al. 2002. Structural domains of vault proteins: a role for the coiled coil domain in vault assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 291(3): 535-41.

van Zon, A., Mossink, M. H., Scheper, R. J., Sonneveld, P., and Wiemer, E. A. 2003. The vault complex. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1828 – 1837.

van Zon, A. et al. 2006. Vault mobility depends in part on microtubules and vaults can be recruited to the nuclear envelope. *Exp Cell Res* 312(3): 245-55.

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro.* 13(4):213-7.

Villa, E. et al. 2009. Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:1063–1068.

Vinothkumar, K. R., Zhu, J. y Hirst, J. 2014. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515, 80–84.

- Vinothkumar, K.R. y Henderson, R. 2016. Single particle electron cryomicroscopy: trends, issues and future perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 49:251–276.
- Wang, M., Abad, D., Kickhoefer, V.A., Rome, L.H. y Mahendra, S. 2015. Vault Nanoparticles Packaged with Enzymes as an Efficient Pollutant Biodegradation Technology. *ACS Nano*. 9(11):10931-40.
- Ward, G.A., Stover, C.K., Moss, B. y Fuerst, T.R. 1995. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(15):6773-7.
- Wei, X. et al. 2016. Structure of spinach photosystem II–LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature* 534, 69–74
- Weinrich, S. L. et al. 1997. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat. Genet.* 17, 498 – 502.
- Whittaker, G.R. y Helenius, A. 1998. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246(1):1-23.
- Whittaker, C. A. y and Hynes, R. O. 2002. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* 13, 3369 – 3387.
- Wu, H. y Rossmann, M.G. 1993. The canine parvovirus empty capsid structure. *J. Mol. Biol.* 223:231-244.
- Wu, J. et al. 2015. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science*. 350:aad2395–aad2395.
- Xie, Q. y Chapman, M.S. 1996. Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 6:264-267.
- Yang J. et al. Vaults are dynamically unconstrained cytoplasmic nanoparticles capable of half vault exchange. *ACS Nano*.;4(12):7229-40.
- Yi, C., Li, S., Chen, X., Wiemer, E. A., Wang, J., Wei, N., and Deng, X. W. 2005. Major vault protein, in concert with constitutively photomorphogenic 1, negatively regulates cJun-mediated activator protein 1 transcription in mammalian cells. *Cancer Res.* 65:5835 – 5840.
- Yokoyama, H., Fujii, S. y Matsui, I. 2008. Crystal structure of a core domain of stomatin from *Pyrococcus horikoshii* Illustrates a novel trimeric and coiled-coil fold. *J Mol Biol.* 376(3):868-78.
- Yoon-Robarts, M. et al. 2004. Residues within the B' motif are critical for DNA binding by the superfamily 3 helicase Rep40 of adeno-associated virus type 2. *J Biol Chem.* 279(48):50472-81.

BIBLIOGRAFIA

- Yu, Z. et al. 2002. PTEN associates with the vault particles in HeLa cells. *J Biol Chem* 277(43): 40247-52.
- Yu, X., Jin, L. y Zhou, Z.H. 2008. 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. *Nature*. 453:415–419
- Yu, J., Moffitt, J., Hetherington, C.L., Bustamante, C. y Oster, G. 2010. Mechanochemistry of a viral DNA packaging motor. *J Mol Biol.* 400(2):186-203.
- Yuan, W. y Parrish, C.R. 2001. Canine parvovirus capsid assembly and differences in mammalian and insect cells. *Virology* 279: 546-557.
- Zadori, Z. et al. 2001. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell.* 1(2):291-302.
- Zhao, J., Benlekbir, S. & Rubinstein, J. L. 2015. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature* 521, 241–245.
- Zhang, X. et al. 2008. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:1867–1872.
- Zhang, L. et al. 2015. Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science* 350, 404–409.
- Zhang, K. 2016. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J Struct Biol.* 2016 Jan;193(1):1-12
- Zheng, S.Q. et al. 2017. MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature Methods* 14, 331–332.

7. ANEXO: PUBLICACIONES