



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA**

**DESENSAMBLE Y REENSAMBLE DE UN VIRUS
ICOSAÉDRICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

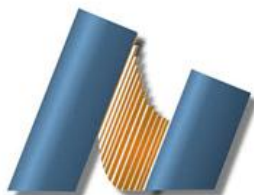
**LICENCIADA EN
NANOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A :

ALMA CELESTE CASTAÑEDA LEAUTAUD

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RUBÉN DARÍO CADENA NAVA**

ENSENADA, B.C, MEXICO A JULIO DEL 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, graficas, etc., sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso no respetar lo anterior puedo ser sujeto a sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Alma Celeste Castañeda Leautaud

I. Dedicatorias

A mi madre

Por ser mi inspiración, mi motivo, el más grande amor y lo más dulce del universo.

A mi padre y mi abuelo

Por ustedes siempre. Llegamos, ganamos y sin avisar nos vamos.

A Josefina de Leautaud, Tadeo, y Silvia García

Por forjar lo mejor de mí.

Oh God! I could be bounded in a nutshell, and count myself a King of infinite space.

Hamlet, II, 2

II. Agradecimientos

A mi madre, por su incondicional apoyo, por creer en mí, por ser mi mejor amiga y mi guía.

A la máxima casa de estudios del país: UNAM, siempre estaré orgullosa de pertenecer a esta gran universidad.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM por acogerme estos últimos años, por brindarme todo el conocimiento profesional que ahora me respalda, por permitirme hacer uso de sus instalaciones para el desarrollo de mi tesis y prácticas, a todo su personal por su integra amabilidad, a todos los investigadores, maestros y estudiantes que nunca se negaron a ayudarme y enseñarme durante toda mi trayectoria académica.

A mi asesor Dr. Rubén D. Cadena Nava por guiarme en el desarrollo de mi tesis, por su apoyo académico y humano, por mantener siempre una actitud positiva y por su excelsa amabilidad.

A los proyectos CONACyT 239878 de Ciencia Básica y CONACyT 247474 de Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales

Al Departamento de Bionanotecnología y mis sinodales los Dres. Rafael Vázquez Duhalt, Alejandro Huerta Saquero, Katrin Quester y Javier Pérez Robles por su ayuda y consejos.

A mis compañeros David, Ángel, Brian y Fernanda.

A mis amigos Ana, Elenice, Rebeca, José, Aaron, Jorge, Ramón y Josué por creer en mí.

III. Contenido

I.Dedicatorias	3
II.Agradecimientos	4
III.Contenido	5
Índice de figuras	7
IV.Resumen	10
1. Introducción	12
2. Antecedentes	17
2.1.1 Generalidades sobre virus	17
2.1.2 Virus de plantas	20
2.1.3 El virus del moteado clorótico del caupí.	21
2.1.4 Proteínas de la cápside del CCMV y sus interacciones	22
2.1.5 Desensamble del CCMV	25
2.1.6 Mecanismos de ensamble del virus CCMV	26
2.1.7 Autoensamble en condiciones fisiológicas de la cápside del CCMV	28
2.1.9 Técnica snapshot-blotting	31
2.2.1 Microscopia electrónica de transmisión	33
3. Hipótesis	36
4. Objetivo general	36
5. Objetivos específicos	36
6. Materiales y Método	37
6.1 Amplificación y purificación del CCMV	37
6.2 Desensamble y re-ensamble del CCMV	38
6.3 Electroforesis y snapshot-blotting	39
6.4 Análisis por medio de microscopia electrónica de transmisión	40
7. Resultados y discusión	41
7.1 Desensamble a las 4 horas	43
7.2 Desensamble a las 8 horas	52
7.3 Desensamble a las 12 horas	53

7.4 Desensamble a las 24 horas _____	54
7.5 Discusión del desensamble _____	59
7.6 Reensamble _____	70
7.7 Reensamble a pH neutro _____	71
7.8 Reensamble a pH ácido _____	79
7.9 Discusión del reensamble _____	85
8. Conclusión _____	91
9. Anexos _____	93
9.1 Anexo 1: Algoritmo Zuker y Algoritmo McCaskill _____	93
9.2 Anexo 2: secuencias de los genomas del CCMV _____	98
10. Bibliografía _____	102

Índice de figuras

1. Icosaédro conformado por 20 hexágonos y 12 pentágonos. _____ 14
2. Principios geométricos para construir enrejados icosaédricos de cierto número de triangulación T. _____ 20
3. Vista esquemática del hexámero β . _____ 24
4. Esquemas de la cápside de CCMV. _____ 26
5. Dos posibles mecanismos de autoensamble de la cápside del CCMV. ____ 28
6. Esquema del método snapshot-blotting. _____ 32
7. Esquema del microscopio electrónico de transmisión. _____ 35
8. Gel nativo de agarosa al 1% del desensamble del virus del CCMV corrido en TAE. _____ 42
9. Micrografía del desensamble del CCMV a las 4 horas: Algunas cápsides presentan expansión radial. _____ 44
10. Micrografías del desensamble del CCMV a las 4 horas, muestra directa sobre rejilla: conglomerados proteicos. _____ 45
11. Micrografía del desensamble a las 4 horas del sitio A2 del gel de agarosa. _____ 46
12. Micrografías de la muestra del sitio A2 del gel de desensamble: Fragmentación de cápside. _____ 47
13. Micrografía del gel de desensamble a las 4 horas: Casquetes de cápside y "nubes" proteicas. _____ 48

14. Muestras del gel de desensamble a las 4 horas: las cápsides se desensamblan de distintas formas. _____	49
15. Micrografía del sitio A2 del gel de desensamble, 4 horas: Túbulo proteico fibroso. _____	50
16. Micrografías del área C1 del gel de desensamble, 4 horas. _____	51
17. Muestra depositada sobre rejilla de TEM, desensamble a las 8 horas. ____	52
18. Muestra depositada directo sobre rejilla del desensamble a las 8 horas: Cápsides estables sin agregación. _____	53
19. Imagen 19. Micrografías de la muestra depositada directo sobre rejilla de TEM desensamblada a las 12 horas: Agregados proteicos de cápsides desensambladas y cápsides estables. _____	54
20. Micrografías de muestras depositada directo sobre rejilla del virus desensamblado a 24 horas: Componentes de los virus no agregados. ____	55
21. Micrografía de la muestra de 24 horas en desensamble depositada directo sobre la rejilla: ARN decorado con proteínas. _____	56
22. Desensamble a 24 horas obtenida del gel de desensamble en los sitios C2 y B2: Partículas, nanotúbulos y ARN. _____	57
23. Estructura secundaria del ARN 1 generada con el programa RNAfold. ____	62
24. Estructura secundaria del ARN2 del CCMV generada con el programa RNAfold. _____	63
25. Estructura secundaria del ARN 3 y 4 hibridado. _____	64
26. Comparativo del ARN1 y el híbrido del ARN 3 y 4. _____	66
27. Diagrama del proceso de desensamble del virus CCMV. _____	69
28. Electroforesis en gel del reensamble del CCMV a pH 7.2. _____	71

29. Micrografías del área C3 del gel de ensamble a pH neutro: agregados y múltipletes. _____	72
30. Micrografía del gel del reensamble a pH neutro: Múltipletes. _____	73
31. Micrografía de un triplete reensamblado a pH neutro. _____	74
32. Micrografía del reensamble a pH neutro: Dupletes. _____	76
33. Micrografía del ensamble a pH neutro, muestra depositada directamente sobre rejilla: procápsides fractales. _____	77
34. Micrografías del reensamble a pH neutro, muestras depositadas directo sobre rejilla: Múltipletes. _____	78
35. Muestras reensambladas y acidificadas en geles nativos de agarosa al 1% usando como buffer de electroforésis el buffer de virus (pH 4.8). _____	79
36. Micrografía del ensamble a pH ácido, muestra del sitio B3 del gel de ensamble: procápsides de múltipletes. _____	80
37. Micrografía del área C3 del gel de ensamble en buffer de virus: múltipletes. _____	81
38. Micrografía del área C3 del gel de reensamble en buffer de virus: vista global. _____	82
39. Micrografía del ensamble acidificado en buffer de virus, muestra depositada directo sobre rejilla: Cápsides idénticas a las nativas. _____	83
40. Micrografía del ensamble en buffer de virus, muestra depositada directo sobre rejilla: vistas panorámicas de las cápsides. _____	84
41. Cadenas de ARN ligadas por iones de calcio. _____	87
42. Proceso de re-ensamble de las cápsides del CCMV. _____	89

IV. Resumen

En este trabajo se estudió el desensamble y reensamble de un virus icosaédrico. Para llevar a cabo este trabajo de investigación se usó como modelo de estudio el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV). Los viriones fueron purificados de plantas infectadas, y se desensamblaron usando los protocolos tradicionales, mediante altas concentraciones de sal y pH mayor al neutro. Después, sin alterar de ninguna forma los productos del desensamble, considerando todos los componentes del virus nativo (4 ARNs), fue reensamblado el virus en dos fases: en la primera se colocó la muestra a una fuerza iónica baja y pH neutro, en la segunda fase se acidificó.

Para analizar el desensamble y reensamble del CCMV, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa, posteriormente se analizaron por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM); también se observaron los complejos núcleoproteicos separados por medio de electroforesis utilizando la técnica *snapshot-blotting*, lo anterior también se hizo para las muestras de las dos fases del reensamble.

Las imágenes de los geles de electroforesis en conjunto con las de TEM nos ofrecen una vista general de las proteínas y ARN del CCMV desde su desensamble hasta su reensamble. Estos resultados muestran que la técnica *snapshot-blotting*, en conjunto con la microscopía electrónica de transmisión es admisible para poder estudiar la dinámica del desensamble y reensamble de un virus.

En los análisis de las imágenes obtenidas por microscopio de transmisión electrónica TEM se encontró que el desensamble de las cápsides se lleva a cabo por el desprendimiento progresivo de fragmentos de cápside. Estos fragmentos no se desprenden al azar, sino que el acomodo del ARN dentro de la cápside gobierna la estabilidad local, es decir, algunas regiones de las cápsides son más estables que otras y es por ello que la cápside se fragmenta en sitios específicos. También se encontró que, por el mismo motivo, algunos viriones comienzan el proceso de desensamble primero que otros, por lo que el proceso no es uniforme sino que se divide en dos poblaciones que se desensamblan a distintos tiempos. Además, una vez desensambladas las cápsides, las proteínas y el ARN se agregan, formando grandes conglomerados.

En cuanto al reensamble, se ha encontrado que el ARN puede ser encapsidado a una razón estequiométrica de 180:3000 (proteínas:nucleótidos), y esto es posible al compactar el ARN por medio de cationes divalentes, calcio y magnesio, dando como resultado múltiples cápsides unidas o múltipletes. Estas estructuras son la solución al paso irreversible del desensamble, que es el requerimiento de proteínas en exceso, que según estudios anteriores es necesario para el correcto empaquetamiento del genoma; una vez que se ensamblan las cápsides en exceso proteico, desechan a dichas proteínas. También se encontró que aún a pH neutro es posible formar estructuras bien definidas y bajando el pH (a pH 4.8) se induce la formación de cápsides individuales, no obstante, una gran parte de las cápsides forman múltipletes. Es importante mencionar que estos resultados contribuyen al entendimiento de los virus y posibles aplicaciones biotecnológicas.

1. Introducción

Un virus es una estructura nanométrica con un tamaño que oscila entre los 20 - 1000 nanómetros, que está formada por ácidos nucleicos (ADN o ARN) protegidos por una cubierta proteica llamada cápside. Esta estructura puede estar rodeada, a su vez, por una capa lipídica con diferentes proteínas denominada envoltura vírica. Un virus puede comportarse como una nanopartícula bioquímicamente inerte, es decir sin actividad biológica, y lo es, siempre y cuando no infecte a su organismo hospedero. No obstante, una vez que logran violar los mecanismos de defensa del ser vivo hospedero e introducirse hasta sus células, quedan muy lejos de estar inactivos, se despojan de su cápside y se vuelven parásitos nanoscópicos apoderándose de la maquinaria de replicación celular para replicar su información genética. De esta forma se generan los componentes necesarios para la reproducción de nuevos entes virales, y muchas veces ocasionan modificaciones o daños considerables, provocando incluso la muerte del organismo infectado [1,2].

Dependiendo del tipo de material genético que contiene un virus es posible clasificarlo en dos grandes grupos. Por un lado están los que contienen ADN, estos toman como escenario de infección inicial al núcleo de la célula huésped y en el caso de las procariontas, únicamente el contenido genético logra atravesar la membrana citoplasmática, pero esto no significa que el contenido genético este desnudo sino que en muchos casos permanece decorado con proteínas, las cuales pueden incluir enzimas necesarias para su replicación. Por otro lado, están los virus que contienen ARN, que en general se replican directamente en el citoplasma [2].

El material genético de los virus puede ser ADN como ARN en forma monocatenaria o bicatenaria, esto es de cadena sencilla o doble [1,3]. Los tipos de estructuras del ARN que se pueden encontrar en los virus son más complejos que en los casos del ADN. El ARN se presenta en cuatro categorías: el monocatenario positivo, el monocatenario negativo, monocatenario retrotranscrito y el bicatenario. Los virus de ARN de sentido positivo tienen genomas con la misma polaridad que el ARN mensajero y pueden ser empleados directamente (sin transcripción previa) para la síntesis de proteínas usando la maquinaria de traducción de la célula huésped. Por el contrario, los virus de sentido negativo son complementarios del ARN mensajero. Esto significa que se debe invertir el sentido del ARN, de negativo a positivo, para que pueda actuar como plantilla o patrón para la síntesis de proteínas. Un virus ARN retrotranscrito es un virus que se replica en la célula huésped mediante transcripción inversa, es decir, mediante la formación de ADN a partir del molde ARN, un ejemplo de virus retrotranscrito es el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [1,3].

Los virus protegen su genoma de factores externos que puedan degradarlo rodeándolo con envoltorios proteicos denominados cápsides. Las cápsides deben ser resistentes pero también adecuadamente lábiles para asegurar que el contenido se libere cuando los virus entren en la célula diana. Las cápsides son ensamblajes moleculares metaestables, es decir, que dichas estructuras evolucionan temporalmente con un aporte de energía mínimo hacia estados de mayor equilibrio o estabilidad inducidos mediante señales ambientales, moleculares y/o celulares específicas [4].

La mayoría de los virus tienen cápsides con estructura helicoidal o icosaédrica. Algunos virus, como los bacteriófagos, pueden tener estructuras más complicadas [3]. Las cápsides están conformadas de subunidades proteicas llamadas capsómeros. En las estructuras helicoidales los capsómeros se encuentran colocados alrededor del ácido nucleico formando una estructura tipo espiral [3].

Los virus con estructura icosaédrica abarcan a la mayoría de estos. Esta simetría es sin duda una de las más interesantes, ya que es de las más estables que se encuentran en la naturaleza. Dicha estructura consiste de un poliedro de 20 caras triangulares; hay 12 ángulos o vértices y una simetría de 5 dobleses alrededor de cada vértice. Los capsómeros se sitúan en cada uno de los doce vértices del icosaedro. A los elementos que configuran el vértice con cinco dobleses en conjunto se le conoce como pentámero y se llama así porque tiene 5 capsómeros vecinos. En el caso de capsómeros con seis partículas vecinas, son llamados hexámeros; entre más hexámeros contenga el virus mayor será su tamaño manteniéndose constante el número de pentámeros [3].

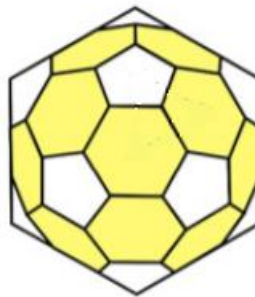


Figura 1. Icosaédro conformado por 20 hexágonos y 12 pentágonos. Imagen modificada de: Kyung et al. (2006), [5].

El CCMV constituye un modelo para el estudio de los virus, ya que fue el primer virus esférico en ser re-ensamblado *in-vitro* [6], se conoce bastante acerca de las interacciones moleculares que gobiernan la estructura, estabilidad y propiedades dinámicas de este virión y además, es relativamente sencillo de cultivar y aislar [7]. El virus del CCMV pertenece a la familia *Bromoviridae* del grupo IV (ARN monocatenarios positivos) el cual incluye otros dos miembros, el BBMV por sus siglas en inglés *Broad bean mottle virus* y el BMV por sus siglas en inglés *Brome mosaic virus*. El CCMV infecta específicamente a la planta caupí (*Vigna unguiculata*). Los síntomas que presentan las hojas de las plantas infectadas es un mosaico o manchas amarillas [8].

El interior de la cápside del CCMV tiene una carga superficial catiónica, por lo que de forma natural es posible encapsular especies aniónicas, como el ADN o el ARN. En general los virus se autoensamblan mediante interacciones electrostáticas proteína-ácido nucleico e interacciones proteína-proteína, dando como resultado la estructura global del virus sin necesidad de agregar energía al sistema de conformación [9].

El objetivo de esta tesis es describir el proceso de desensamble y re-ensamble *in-vitro* de un virus icosaédrico por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) usando la técnica *snapshot-blotting* la cual consiste en transferir la muestra de las bandas de interés en los geles después de haber realizado la electroforesis de ácidos nucleicos y/o complejos de nucleoproteína a las rejillas de microscopía electrónica de transmisión. Este método permite el análisis estructural de las especies macromoleculares que se han formado [10]. Para lograr el objetivo propuesto se usará como modelo de estudio el virus CCMV.

La importancia de estudiar cómo se desensambla y reensambla un virus, nos permitirá comprender este fenómeno y mejorar el diseño de antivirales, o el uso de las cápsides virales como nanoacarreadores de fármacos, proteínas, enzimas o genes [10].

2. Antecedentes

2.1.1 Generalidades sobre virus

La virología es una rama de la microbiología y de la biofísica, las cuales se encargan del estudio de los virus. Esta se centra en los siguientes aspectos: Estructura, clasificación, evolución, mecanismos de infección e interacción con la fisiología de la célula hospedera, inmunidad, terapia génica, técnicas de aislamiento, cultivo, y análisis de su desarrollo en general con la finalidad de combatir infecciones virales, o bien enfocarlos para alguna otra aplicación como utilizar a estos como acarreadores de fármacos o encapsulación de alguna sustancia para cumplir cierta función [3].

Los virus son entidades biológicas nanoscópicas infecciosas y que pueden ser capaces de cambiar genéticamente a los seres vivos. Las modificaciones que provocan pueden conducir a la muerte, es por ello que su nombre significa veneno, según su etimología latina. A la fecha se sigue sin definir si un virus está vivo o no, debido a que estos no se nutren ni se relacionan entre sí para cumplir sus demás funciones de ser vivo. Definido llanamente un virus es ADN o ARN encerrado en un paquete proteico denominado cápside y que puede replicarse únicamente en su célula huésped [2,3].

El ácido ribonucleico, o ARN, es una de las tres macromoléculas biológicas más importantes para todas las formas de vida existentes junto con el ácido desoxirribonucleico o ADN y las proteínas. El ARN es una molécula que consiste de una ribosa. Los carbonos de la ribosa se numeran de 1' a 5' en sentido de las manecillas del reloj. Una base nitrogenada se une al carbono 1', esta base es el bloque básico que permite codificar la información genética, esta puede ser guanina, citosina, adenina y uracilo, en el caso del ADN en lugar de uracilo utiliza timina; el grupo fosfato se une al carbono 5' y al carbono 3' de la ribosa del siguiente nucleótido. El grupo fosfato tiene una carga negativa, a pH cercanos al fisiológico, lo que confiere al ARN y ADN carga aniónica [3].

La información genética del virus es transportada y protegida por sus cápsides virales. La evolución ha llevado a los virus a conformar cápsides especificadas para engañar al sistema inmune del ser hospedero, a su vez poseer un sistema altamente versátil de protección y liberación génica [3,11].

La mayoría de los virus tienen cápsides con estructura helicoidal cilíndrica o icosaédrica. Algunos virus, como los bacteriófagos, pueden tener estructuras más complicadas [3]. Una hélice, en geometría, es el nombre que recibe toda línea curva cuyas tangentes forman un ángulo constante (α), siguiendo una dirección fija en el espacio la cual puede ser circular, cilíndrica o cónica. En el caso de los virus la estructura sigue una dirección cilíndrica [3,11].

Las estructuras helicoidales se conforman de una sola unidad proteica, protómero, los cuales se asocian en espiral para formar cilindros huecos. En su interior se encuentra el ácido nucleico y la longitud de este determina el tamaño de la cápside, la cual generalmente es caracterizada por su diámetro, el paso de hélice y el número de monómeros por vuelta [3].

Las cápsides complejas son una combinación de simetrías helicoidales e icosaédricas, además de otras estructuras como fibras, colas u nanotubos formados por estructuras hexagonales, por ejemplo en el caso de los bacteriófagos este tipo de estructuras en conjunto pueden servir como jeringas que inyectan el material genético en las bacterias que infectan [11].

Un icosaedro, es un poliedro de 20 caras triangulares equiláteras con 12 vértices. Presenta simetría rotacional 5.3.2, presenta seis ejes de simetría rotacional de orden 5 que pasan por los vértices, diez ejes de orden 3 en el centro de los triángulos y quince ejes de orden 2 en el centro de las aristas) [3,11].

Los protómeros forman grupos idénticos entre sí que constituyen los bloques constructivos de la cápside viral, estos bloques se conocen como capsómeros. En el caso de los virus icosaédricos cinco capsómeros se asocian en círculo para formar pentámeros y seis capsómeros asociados de la misma manera conforman

los hexámeros. Los pentámeros se sitúan en los 12 vértices del icosaedro. Entre los pentámeros se sitúan los hexámeros los cuales determinan el tamaño del virus; entre más grande sea el virus más hexámeros tendrá [11].

Una forma de caracterizar la forma y tamaño de una cápside de virus icosaédrico puede ser por su número de triangulación (abreviado como T). Este número fue descrito por Caspar y Klug en 1961, ellos definen un plano en 3D y una ecuación para obtener el número de triangulación. La definición del plano es la siguiente: Comenzando con un plano hexagonal en dos dimensiones y dividiendo cada hexágono en 6 triángulos equiláteros, se obtiene un plano de unidades triangulares como el que se muestra en la figura 2-a. Si cortamos un lado a uno de los hexágonos, necesitaremos pasar a tres dimensiones si deseamos unir los dos ejes libres del hexágono descompuesto, obtendremos entonces un pentágono. Al repetir doce veces estos cortes y uniones en 12 hexágonos contiguos obtendremos entonces un icosaedro T=1. Si se hiciesen los cortes más espaciados, por ejemplo saltando un hexágono, obtendremos un icosaedro de mayor tamaño [12].

Definiendo en el plano de triángulos dos ejes h y k, con centro en el centro de uno de los pentágonos podremos determinar la ubicación del siguiente pentágono más cercano, (figuras 2-b y 2-c). De este modo el número de triangulación es el cuadrado de la distancia entre dos pentágonos y viene dado por la ecuación:

$$T=h^2 + hk + k^3 \quad [12]$$

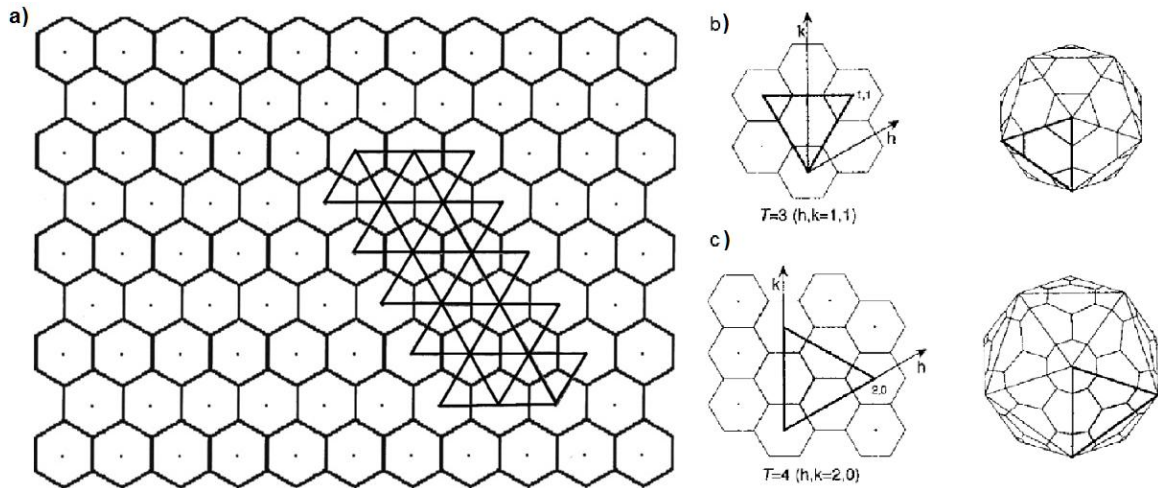


Figura 2. Principios geométricos para construir una cápside icosaédrica de cierto número de triangulación T . Una red 2D hexagonal con los índices h and k indicados. Un icosaedro cerrado puede ser generado al remplazar el hexágono en doce posiciones (h, k) apropiadas por un pentágono. b) Principios geométricos para la construcción de un icosaedro $T=3$. c) Principios geométricos para la construcción de un icosaedro $T=4$. Imagen a modificada de Huiskonen J. 2005 [13].

2.1.2 Virus de plantas

En año de 1935 Wendell M. Stanley identificó y aisló el primer virus de plantas (Virus del mosaico del tabaco, TMV) [14]. Hasta el momento, se llevan identificados más de 700 virus de planta de acuerdo a su género y la estructura de su cápside, la naturaleza de su genoma, su forma de transmisión, su hospedero y sus mecanismos de replicación e infección [15].

Los genomas de los virus de plantas pueden ser ARN o ADN. La gran mayoría son de ARN y se caracterizan por contener genomas entre los 4 mil y 20 mil nucleótidos en longitud. Por lo general, sus genomas codifican pocas proteínas, las cuales deben cumplir todas las funciones necesarias para completar su ciclo de replicación e infección [15].

Los virus de planta se pueden clasificar de acuerdo a la estructura de su cápside: algunos tienen una cápside que adopta una forma icosaédrica, mientras que otros poseen una estructura tubular rígida [15].

Los virus fitopatógenos se transmiten de muchas formas. Estas son:

- Inoculación mecánica: Forma más común de transmisión. Se presenta por el roce directo de planta a planta o por el contacto entre savias [15].
- Vectores: Se les llama vectores a los insectos, bacterias o cualquier ser vivo que transporte el virus de planta a planta. Entre los vectores más comunes que propagan los virus de plantas se encuentran varias especies de ácaros, nematodos, bacterias y ciertos hongos habitantes del suelo [15].
- Propagación vegetal: al cultivar tubérculos, brotes, etc. de una planta madre infectada [15].
- Semilla o polen: los virus que se conservan en las semillas o en el polen, pueden propagarse de generación en generación. En general, cuando un virus es transmitido por granos de polen, infecta tanto a la planta que está polinizando, como también a la futura planta que nacerá de dicha polinización. Este tipo de transmisión es muy común entre los árboles de frutas. Cabe señalar que la diseminación de los virus por medio de semillas incrementa significativamente la severidad de la infección, ya que el virus ataca a la planta en sus primeros estadios de desarrollo e impide que crezca normalmente [15].

2.1.3 El virus del moteado clorótico del caupí.

En esta investigación se trabajótrabajaré con el virus CCMV el cual tiene una cápside icosaédrica de un diámetro de 28 nm de diámetro, compuesta por 180 proteínas idénticas de 20 k Da, los cuales se agrupan en 12 pentámeros y 20 hexámeros. La cápside tiene número de triangulación $T=3$; y pertenece a la familia Bromoviridae del grupo IV (ARN monocatenarios positivos) el cual incluye otros dos miembros, BBMV (*Broad bean mottle virus*) y el virus BMV (*Brome mosaic virus*). Este virus infecta a la planta caupí o planta del frijolito de vaca. Las plantas infectadas presentan síntomas en sus hojas desarrollando manchas o moteado

amarillo [8]. El genoma del virus CCMV es ARN de cadena sencilla (ssARN) y es tripartita, es decir, se encuentra fraccionado en 3 moléculas de ssARN. En el CCMV, la encapsidación del ssARN con la proteína de la cápside se lleva por medio del autoensamble en tres viriones con longitudes de ARN distintos, en uno de ellos se empaqueta el ARN 1 que es de 3171 nt, en el segundo el ARN 2 de 2774 nt, en el tercero se coempaquetan el ARN 3 de 2173 nt y un ARN subgenómico de 824 nt (RNA 4) [16].

El CCMV ha servido como modelo por excelencia para análisis de las interacciones proteína-proteína y proteína-ARN ya que estas dictan el ensamblaje del virus icosaédrico, su estabilidad, así como también su desensamble. Además, es el primer virus esférico en ser reensamblado *in-vitro* y por tanto existen múltiples estudios acerca de su autoensamble. Se ha reportado que las proteínas de la cápside (CP) del CCMV son capaces de encapsidar una amplia gama de ARNs heterólogos de distintas longitudes siempre y cuando la proporción de proteínas por ARN sea de 6:1 en masa [16]. También se ha demostrado que es posible encapsidar otros polímeros sintéticos aniónicos o bien por mutagénesis dirigida modificar la carga de la parte amino N-terminal de la proteína de la cápside del CCMV para empaquetar otras especies moleculares [17].

Estudios previos han demostrado que el CCMV es biocompatible en mamíferos, esta característica es muy importante para las potenciales aplicaciones de este virus de planta en nanobiotecnología, por lo que las cápsides virales del CCMV pueden usarse como nanoacarreadores de fármacos, enzimas, proteínas o genes [19, 20,21]. Además, de su posible uso como nanobioreactores o incluso como sitio huésped para la síntesis de nanomateriales [15,16].

2.1.4 Proteínas de la cápside del CCMV y sus interacciones

Experimentos hechos *in-vitro* han demostrado que existe una relación óptima para encapsidar el 100% del ssRNA con proteínas de la cápside del CCMV. El hecho de

que se requiera una relación 6:1 en masa entre la CP del CCMV y ARN es para conformar un equilibrio electrostático, por lo que debe estar presente una CP por cada 10 nt de ARN, debido a que hay 10 residuos catiónicos en la N-terminal de la proteína [16]. Aunque hay otros residuos catiónicos en la proteína de la cápside, sin embargo los extremos N-terminales son los que interactúan directamente con el ARN [16].

Similar a otros virus icosaédricos, las subunidades proteicas de la cápside del virus CCMV, tienen un acomodo de hoja plegada β orientadas verticalmente en referencia la superficie de la cápside. Las terminales carboxilo y amino que están en los extremos de la hoja juegan un rol importante en la formación de la estructura cuaternaria. Los residuos que son predominantemente básicos (9 argininas más una lisina) y que se encuentran hacia el núcleo de la cápside son los que interactúan con el genoma viral, (figura 3) [22].

Las interacciones entre los residuos de aminoácidos hidrofóbicos estabilizan los capsómeros. Las subunidades hexaméricas son formadas mayoritariamente por las interacciones entre las porciones N-terminales, donde seis cadenas β se entrelazan para formar un túbulo hexámero llamado hexámero- β ; en conjunto estas estructuras proporcionan una carga superficial negativa en el virus del CCMV, promoviendo la repulsión electrostática entre estos evitando la agregación y por lo tanto contribuyen a la propagación del virus en la planta huésped, (figura 3) [22].

Los capsómeros se unen entre ellos por interacciones entre las C-terminales que se extienden radiales en la cápside. Estas terminales se ligan con la parte central de la hoja plegada β y la N-terminal más cercana a ella, esta interacción puede ser la responsable del inicio del autoensamble de la cápside del virus [22].

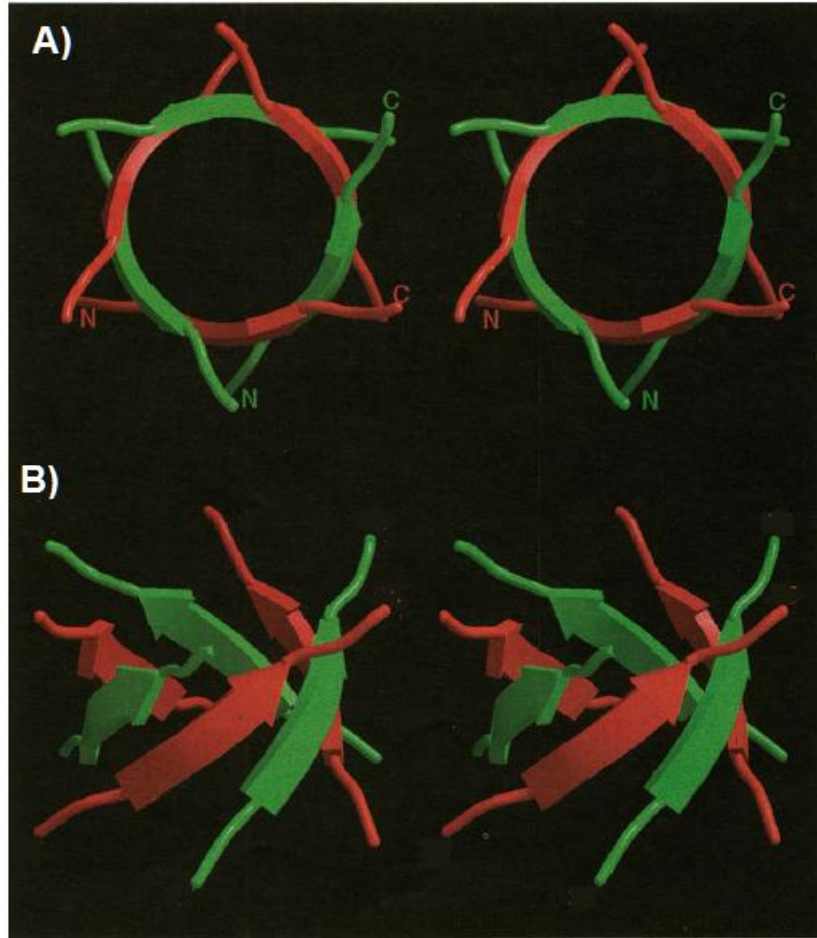


Figura 3. Vista esquemática del hexámero β . 6 subunidades proteicas se entrelazan tangenciales a la superficie de la cápside a) vista directamente hacia abajo, las terminales amino y carboxilo están marcadas para dos de las subunidades. b) Vista lateral del hexámero β , esta vista corresponde también a como se acomoda el hexámero en la superficie de la cápside. Imagen modificada de: (Speir J.A, Munshi S.1995)[22].

Los iones metálicos Mg^{2+} y Ca^{2+} contribuyen a la unión de los capsómeros. Hay 180 sitios de unión para iones metálicos en la cápside. Cada ion metálico está coordinado por 3 aminoácidos de dos capsómeros adyacentes [22, 23].

2.1.5 Desensamble del CCMV

El virus nativo del CCMV es estable entre un pH 3- 6, y con una energía iónica baja ($I \sim 0.1 \text{ M}$). Los iones en gran concentración generan apantallamiento electrónico entre las terminales catiónicas y los grupos fosfato del ARN, además la unión de los iones a las terminales carboxilo genera un desequilibrio electrostático; es por esto que las cápsides pueden ser desensambladas a una concentración $> 1\text{M}$ de sal y a un pH superior a 7.4 [24, 25]. El desensamble comienza con el incremento del tamaño del virus, es decir, cuando el virión se expande radialmente, en un 10% aproximadamente. A pH neutro los iones de calcio y magnesio son removidos a causa de la desprotonación de residuos ácidos adyacentes a los sitios de unión de los iones, por consiguiente se presenta una expansión radial debido a la repulsión electrostática entre los sitios de unión, estos sitios se encuentran a 8 \AA de los ejes cuasi-triples. Los hexámeros y pentámeros se mantiene intactos, excepto que se mueven hacia un radio mayor separándose entre ellos [22, 25].

Si se disminuye el pH por debajo de 5 y a una fuerza iónica de entre $0.1\text{-}0.2 \text{ M}$ las proteínas de la cápside desensambladas son capaces de re-ensamblarse incluso sin contenido genético [8,9].

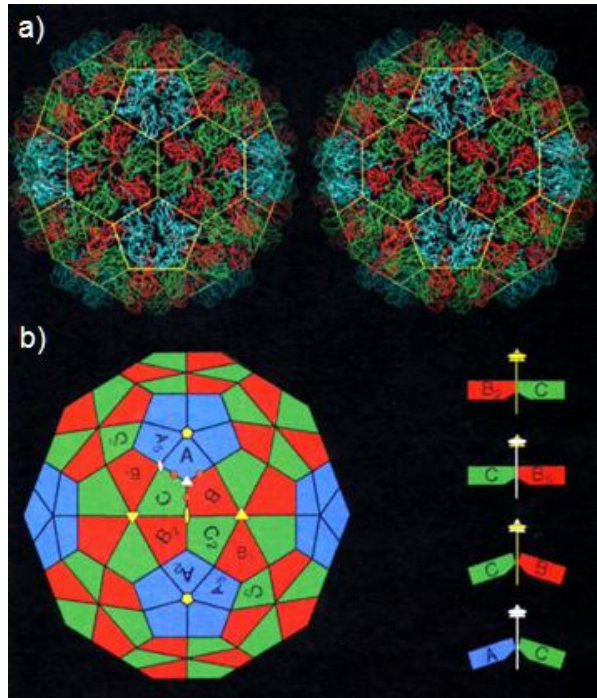


Figura 4. Esquemas de la cápside de CCMV. (A) vista esquemática de la cápside proteica. A) En amarillo se indican las posiciones de los ejes de rotación icosaédrica (pentágonos: ejes de rotación quintuples; triángulos: ejes de rotación triples; óvalos: ejes de rotación dobles). B) Las letras A, B y C en los capsómeros están indicados para mostrar los sitios en los que el icosaedro se curva. B_2 con C y C con B_5 como se indica en los esquemas de la derecha, tienen un ángulo de 180° , lo que indica que los hexámeros son planos. C y B, es decir el ángulo entre hexámeros es de 138° , mientras que el ángulo entre A y C que corresponde al del hexámero y pentámero tiene un ángulo de 142° respectivamente. B) los círculos rojos entre las letras indican los sitios de unión y posiblemente de separación durante el desensamble. Imagen modificada de: Speir J.A, Munshi S. (1995) [22].

2.1.6 Mecanismos de ensamble del virus CCMV

Las interacciones entre proteína-proteína y proteína-ARN son las que llevan a cabo el proceso de autoensamble viral, no obstante, el mecanismo in-vivo aún no ha sido totalmente dilucidado. Se conoce que el ensamble y desensamble del CCMV in-vitro puede conducir a una amplia gama de formas polimórficas dependientes de ambientes químicos variados [22, 26,27]. Esto sugiere que los cambios en la fuerza iónica, pH y temperatura pueden afectar las interacciones entre las moléculas que constituyen el virión [9].

Las CPs del CCMV, tienen una terminal negativa y otra positiva, las cargas pH dependientes de las terminales negativas se localizan en la cara al exterior de las cápsides virales, mientras que las terminales positivas también pH dependientes se direccionan hacia el interior, estabilizando las cargas negativas del ARN [28].

Para que el ensamble se pueda llevar a cabo las fuerzas de las interacciones atractivas deben ser mayores que las repulsivas entre las CPs. Las interacciones repulsivas compiten con el apareamiento de CPs mediado por una combinación de fuerzas atractivas que incluyen interacciones hidrofóbicas entre las interfaces CP-CP e interacciones entre los grupos carboxilos de los residuos de CPs adyacentes que son protonados por la disminución del pH [28].

De acuerdo con Elrad & Hagan [29] hay dos mecanismos de autoensamble, obsérvese figura 5, los cuales dependen de que fuerza de interacción es mayor entre CP-CP y CP-ARN. Si la fuerza de interacción entre CP-ARN es mayor en comparación con CP-CP se produce el mecanismo denominado “*en masse*”; en este proceso las proteínas se unen al mismo tiempo y de forma desordenada al ARN para proceder a expulsar el exceso de proteínas y reacomodarse en la forma icosaédrica que caracteriza al CCMV. La interacción entre proteínas y ARN es promovida indirectamente cuando la fuerza iónica del buffer donde se mezclan los componentes es baja y tiene un pH ~7, bajo este pH las fuerzas atractivas entre proteínas bajan y por lo tanto las fuerzas electrostáticas entre ARN y proteínas son mayores [29,30].

Un proceso de autoensamble distinto puede llevarse a cabo cuando las fuerzas de interacción entre proteínas son mayores que las que existen entre proteínas y ARN. Estas fuerzas mayoritariamente son promovidas a pH ácidos y bajo fuerzas iónicas altas. Cuando se mezclan los componentes bajo las condiciones descritas, incluso sin necesidad de agregar ARN, se presenta el mecanismo de nucleación y crecimiento, en donde el ensamble comienza por la formación de un pentámero seguido de la adición de subunidades proteicas hasta conformar la cápside completa [9, 29, 30].

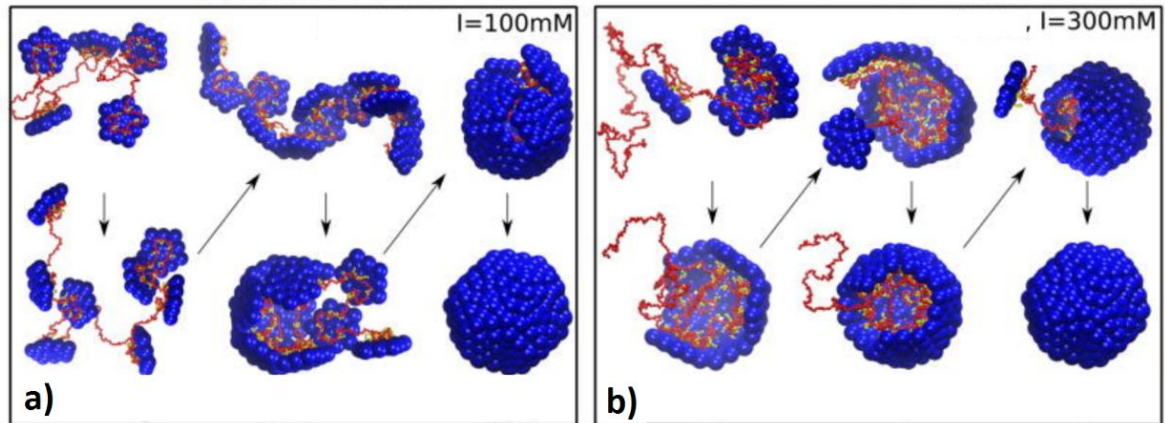


Figura 5. Dos posibles mecanismos de autoensamble de la cápside del CCMV. a) Simulación de la trayectoria del mecanismo “en masse”. Este mecanismo se presenta a baja fuerza iónica, donde las interacciones entre genoma-proteína son más fuertes que las de las subunidades proteicas entre sí. b) Mecanismo de “nucleación y crecimiento”. Este mecanismo se da bajo condiciones de alta fuerza iónica donde las interacciones entre subunidades proteicas son mayores que las del ARN y proteínas. Imagen modificada de: Perlmutter J.D and Hagan M.F. (2015) [30].

2.1.7 Autoensamble en condiciones fisiológicas de la cápside del CCMV

Los viriones con genoma ssARN+ se autoensamblan en el citoplasma de la célula. Existen varias investigaciones en donde se ha buscado encontrar cual es el mecanismo de ensamble *in vivo* del virus en cuestión; Según Zlotnik et al (2000) el mecanismo de autoensamble en condiciones fisiológicas es de nucleación y crecimiento: Se inicia con la primera fase que es la nucleación, comenzando con un pentámero para posteriormente continuar con la segunda fase que es la adición de dímeros hasta formar completamente la cápside. Ellos infieren que se debe iniciar con la nucleación pentámerica puesto que esta da lugar a la geometría esférica de la cápside nativa; de ser de otra forma, bajo ciertas condiciones por ejemplo, con un hexámero como núcleo inicial, se conformarían formas tubulares [31]. Además de este argumento, en distintos estudios se ha detectado formación de pseudo-cápsides T=2 con genoma interno las cuales se forman como resultado de grandes concentraciones de proteína; estas aberraciones capsídicas se deben a la formación de múltiples pentámeros [31], lo que respalda el argumento sobre el

inicio de un pentámero en el mecanismo de nucleación y crecimiento para condiciones fisiológicas [6,9, 31].

No obstante, en concordancia con los estudios de Elrad & Hagan [29], en condiciones fisiológicas el ensamblaje del virus ARN debe ser por mecanismo *en masse* (obsérvese de nuevo la figura 5), ya que a un pH 7 las fuerzas de interacción proteína-proteína se cancelan, por lo que las proteínas se verán mayormente atraídas hacia el genoma, sin ninguna fase previa para la formación de pentámeros. Respaldo este supuesto se han propuesto estudios teóricos en los que el ensamblaje de los virus de ARN comienza con la formación de un complejo CP-ARN desordenado y que es facilitado a una alta concentración de CP [18,22, 29].

En recientes investigaciones sobre el autoensamble *in-vitro* del CCMV encontraron que al inicio se tiene una mayor cantidad de proteínas ligadas al ARN que las necesarias para formar la cápside viral [16]. Estas afirmaciones están soportadas en dos argumentos: Es necesario tener un exceso de proteínas, así se asegura que las terminales amino en las proteínas se unan a los fosfatos en la cadena de ARN para formar el complejo ARN-CP. Además, la alta densidad proteica facilita la compactación del genoma para una eficiente formación de la cápside. En las fases finales del ensamblaje el exceso de proteínas es liberado del ARN, por atracción electrostática de la carga superficial negativa de la cápside [16,29]. Sin embargo, hasta este momento no se tiene elucidado completamente el desensamble y ensamble de los componentes nativos del virus, por lo cual en este trabajo se consideran los 4 ARNs nativos del virus. Una de las técnicas que se han usado para la caracterización de los virus es la electroforesis en geles nativos de agarosa que se describe en el siguiente subtema.

4.1.8 Electroforesis en gel de agarosa

El principio que gobierna la electroforesis consiste en la migración de proteínas y ácidos nucleicos a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, mediados por acción de un campo eléctrico. Las muestras son separadas de acuerdo a su peso molecular y carga eléctrica [32].

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio [32].

$$V = q E / f$$

La velocidad de migración electroforética depende de la relación entre carga y peso, del voltaje del campo eléctrico aplicado y del tamaño y densidad porosa del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor debido al efecto Joule. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética [32].

La mayoría de las biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) poseen grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula se ve influida por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con otras moléculas iónicas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración. En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo [32].

Para facilitar la visualización de las distintas especies, éstas son teñidas con diferentes colorantes. Esta tinción reduce el análisis la observación de simples bandas que de acuerdo a su ubicación e intensidad de coloración serán interpretadas.

Se sabe que la agarosa raramente interactúa con biomoléculas por lo que ha sido ampliamente usada para la conformación de los geles de electroforesis. Los poros de los geles de agarosa oscilan entre los 50 nm y 200 nm de diámetro [32]; la mayoría de los virus tienen tamaños menores a los 200 nm por lo que fácilmente pueden ser analizados por electroforesis en agarosa. Además las muestras después de la electroforesis pueden ser analizadas posteriormente por microscopia electrónica de al recuperar la muestra por medio de *snapshot-blotting*.

2.1.9 Técnica snapshot-blotting

La técnica *snapshot-blotting* se aplicó en este estudio para analizar las etapas del autoensamblamiento y desensamble del virus, y nos permitió la transferencia y aislamiento de complejos núcleoproteicos directamente de gel después de la electroforesis a rejillas para su análisis por medio de microscopia electrónica de transmisión [33].

Esta técnica tiene como paso inicial la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa o poliacrilamida, el cual es un método comúnmente utilizado para investigar proteínas y ADN o ARN, así como sus interacciones [34,35].

Las rejillas utilizadas están recubiertas con una película de carbón el cual es hidrofóbico, por lo cual tiene baja afinidad a soluciones acuosas. Por consiguiente, es necesario tratar a las rejillas de TEM para que puedan adherirse muestras que están en soluciones acuosas a la superficie de la rejilla. Uno de los métodos más usados para tratar las rejillas consiste en someterlas a una descarga brillante, plasma, a bajas presiones a un corto tiempo [36].

Una vez preparadas las rejillas, y después de la electroforesis, se seleccionan las bandas de interés en donde se encuentra la muestra a analizar. Se hacen cortes transversales sobre las bandas de interés teniendo cuidado de no atravesar al gel con un bisturí. El paso siguiente es la inserción de la rejilla, este paso es el más crítico del proceso por lo que debe hacerse con extremo cuidado. Primero se

reinserta el escalpelo en la incisión para abrir ligeramente, se inserta la rejilla completamente dentro del gel con la película de carbón hacia el ánodo de la cámara de electroforesis y se lleva a cabo la electroforesis nuevamente por 10 minutos, con la finalidad de que los complejos biológicos se adhieran a las rejillas. Después se retira la rejilla del gel y se tiñe la muestra con una solución que le confiera alta densidad electrónica para permitir su análisis en el microscopio electrónico [36]. En este trabajo las muestras se tiñeron con ácido fosfotungstico (PTA) o acetato de uranilo (UA); aquellas muestras con pH ácido se tiñeron con UA y en el caso de las muestras a pH Neutro se utilizó PTA, esto para no producir cambios estructurales no deseados en las muestras y que pueden ser ocasionados por un cambio en el pH.

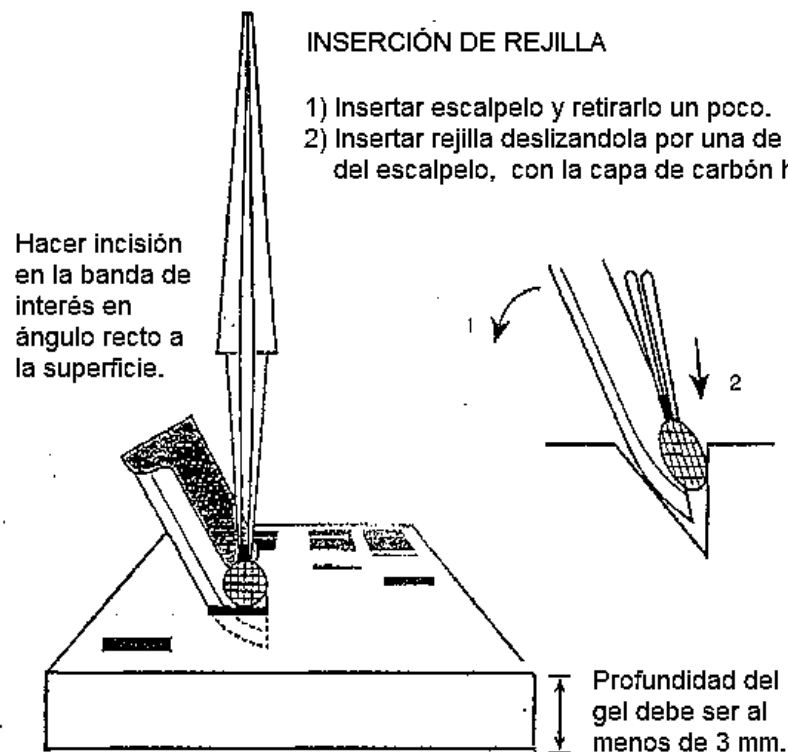


Figura 6. Esquema del método snapshot-blotting. Imagen modificada de: S.D Jett, D. G Bear.(1994) [26].

4.2.1 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica muy poderosa para la visualización y análisis de materiales hasta escalas atómicas. El principio de esta técnica está basada en la generación y control de un haz de electrones de alta energía, el cual debe atravesar la muestra y posteriormente recoger la información proveniente de los electrones transmitidos, es por eso que la muestra a analizar debe ser lo suficientemente delgada [12].

La interacción entre los electrones provenientes del haz de electrones y los átomos de la muestra puede ser usada para determinar características como la estructura cristalina, fronteras de grano, dislocaciones etc. También se pueden hacer análisis químicos, como análisis de composición y físicos como la calidad, forma, tamaño y densidad de pozos cuánticos [12].

El microscopio de transmisión electrónico opera bajo los mismos principios básicos del microscopio óptico, pero en vez de usar luz, usa un haz de electrones. Debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho más pequeña que la luz, la resolución óptima para las imágenes generadas por medio de TEM es de muchos ordenes de magnitud mayor que aquellas obtenidas por medio de la microscopía óptica. Es por ello que el TEM permite analizar los más mínimos detalles de la estructura interna, a tal grado que en algunos casos se pueden observar hasta los átomos [12].

El TEM en su forma convencional usa un haz de electrones a alto voltaje producido por un cátodo que puede ser un filamento de tungsteno como fuente de electrones. El haz de electrones es acelerado por un ánodo típicamente entre los 40 y 400 keV con respecto del cátodo. El rayo es enfocado por el lente condensador, obsérvese la figura 6; la apertura del condensador excluye a los electrones con ángulos

grandes de modo tal que el resultado es un haz delgado y coherente que incide sobre la delgada muestra, la parte que atraviesa a esta es transmitida por el lente objetivo a una pantalla de fosforo o a un sensor CCD. Las aperturas opcionales del objetivo pueden ser usadas para incrementar el contraste, al bloquear electrones difractados a ángulos grandes. Los electrones transmitidos pasan por los lentes intermedio y proyector en la columna, y de esta manera la imagen de la muestra analizada es incrementada [12].

Los electrones transmitidos inciden en la pantalla de fosforo, permitiendo al observador ver la muestra: Las zonas oscuras de la imagen representan aquellas áreas de la muestra en la que atravesaron pocos electrones, mientras que aquellas zonas más iluminadas corresponden a las que atravesaron un mayor número de electrones [12].

La resolución del TEM está limitada principalmente por la aberración esférica, pero una nueva generación de correctores de aberración han hecho posible superar en gran parte esta limitante. Estas correcciones han permitido obtener imágenes con resoluciones por debajo de los 0.5 angstrom y magnificaciones $> 50 \times 10^6 \times$ [12].

El microscopio de transmisión puede ser usado en modo de difracción de electrones para análisis de estructuras cristalinas. Las ventajas de la difracción de electrones sobre la cristalografía de rayos X es que se pueden analizar muestras compuestas por múltiples cristales, además de que la reconstrucción por transformada de Fourier del objeto magnificado ocurre físicamente y es por eso se evita la necesidad de resolver el problema de fases que enfrenta la cristalografía de rayos X [12].

Una de las mayores desventajas del TEM es la necesidad de secciones extremadamente delgadas de muestra, típicamente menores a 100 nm. La mayoría de los especímenes biológicos deben ser químicamente tratados, deshidratados y embebidos en una resina polimérica para poder estabilizarlos lo suficiente para permitir el traspaso de los electrones a tan grandes aceleraciones. Además de requerir una tinción con átomos pesados para obtener el contraste requerido [12].

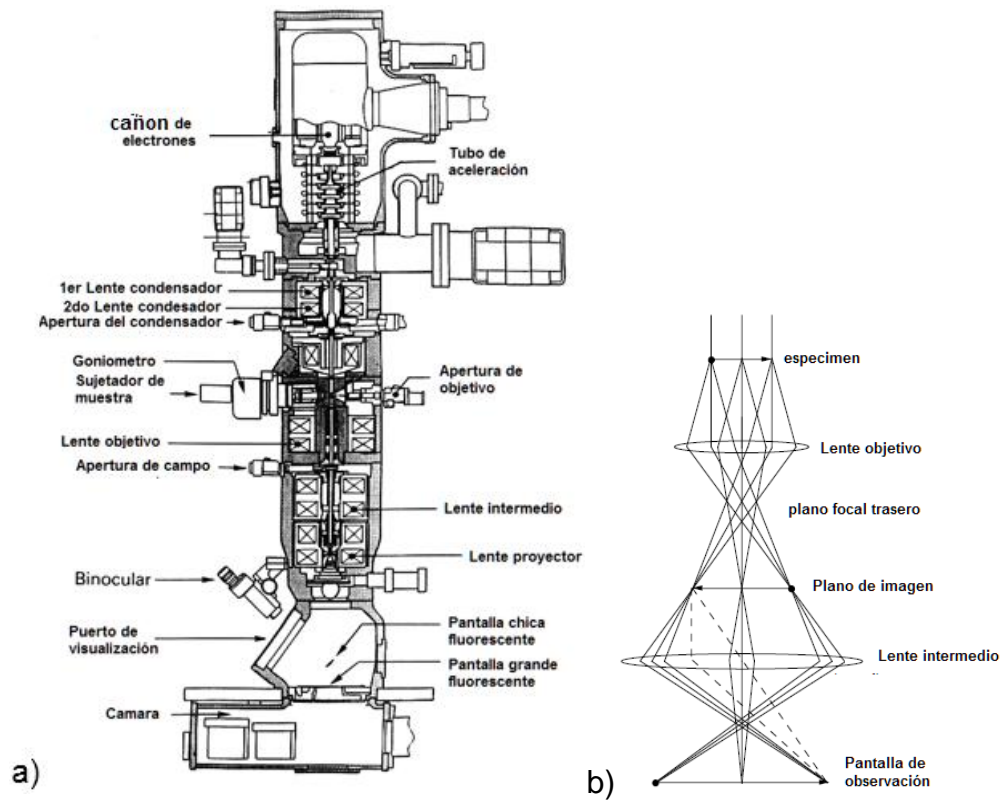


Figura 7. Esquema del microscopio electrónico de transmisión. a) Componentes básicos del microscopio de transmisión en su forma original. b) Diagrama que indica la trayectoria que sigue el haz de electrones por acción de las lentes después de atravesar la muestra o espécimen hasta su incidencia sobre la pantalla de observación de fosforo. Imágenes modificadas de Fultz, B., Howe, J.M. (2013) [12].

3. Hipótesis

El desensamble y reensamble de los virus, aun cuando puede ser un proceso complejo y espontaneo, puede ser analizado de manera práctica y eficiente por medio de la movilidad electroforética y microscopia electrónica de transmisión de los complejos formados por sus proteínas y ácidos nucleicos. La electroforesis al separar los complejos núcleoproteicos por tamaño y carga eléctrica, nos permitirá obtener imágenes claras y nítidas de las estructuras al ser analizadas en el microscopio electrónico de transmisión, al mismo tiempo que nos proporcionará información de la interacción de las proteínas y genoma viral en cuestión.

4. Objetivo general

Desarrollar un procedimiento rápido y práctico para estudiar el proceso de desensamble y reensamble de un virus.

5. Objetivos específicos

1. Analizar por medio de la movilidad electroforética los complejos núcleoproteicos resultado del proceso de desensamble y reensamble del virus CCMV.
2. Analizar por medio de microscopia electrónica de transmisión los complejos núcleoproteicos resultado del proceso de desensamble y re-ensamble de las cápsides virales del CCMV.

6. Materiales y Método

6.1 Amplificación y purificación del CCMV

Para poder realizar los experimentos se cultivaron aproximadamente 45 plantas de frijol cowpea (*Vigna unguiculata*) en un invernadero y posteriormente se infectaron con el virus CCMV. Después de dos semanas las plantas de frijol cowpea germinaron, la parte superior de las hojas fueron previamente dañadas mecánicamente con una fibra pelo de ángel #00, para posteriormente infectarlas usando una solución amortiguadora de inoculación (0.01 M de NaPO_4 , pH 6; 0.01 M de MgCl_2) que contenía los virus.

Después de que las hojas presentaron síntomas de infección (~ 3 semanas) fueron colectadas y se molieron usando el buffer de extracción (0.5 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$; 0.08 M $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, pH 4.5)). El líquido se mezcló con un volumen igual de cloroformo y se dejó agitando a 4°C durante 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos para eliminar restos y se recuperó la fase acuosa en donde se encuentra el virus. Posteriormente la muestra se purificó usando un colchón de sacarosa al 10% y se ultracentrifugó a 154,300 g en un rotor Beckmann SW 41 Ti rotor: 30,000 rpm, factor K 230.9 por 2 horas a 4°C con el fin de poder eliminar material con densidad menor al virus.

El pellet o botón fue recuperado y resuspendido con un volumen mínimo de buffer de suspensión de virus (50 mM acetato de sodio, $C_2H_3NaO_2$; 8 mM $Mg(CH_3COO)_2$, pH 4.5). Posteriormente, la solución anterior fue purificada usando un gradiente de sacarosa y se ultracentrifugó minutos usando la ultracentrífuga Beckman SW 41 Ti rotor: 30,000 rpm, factor K 230.9 SW 41 Ti rotor: 30,000 rpm, factor K 230.9 a 210,000 xg por 50 min a 4°C y la banda correspondiente al virus fue recuperada. Finalmente se eliminó la sacarosa ultracentrifugando el virus a 163,300 xg por 100 minutos usando la ultracentrífuga Beckmanbeckman SW 41 Ti rotor: 30,000 rpm, factor K 230.9. El virus fue cuantificado por medio de espectrofotometría Uv-vis y guardado a -80 °C. La concentración del virus fue cuantificada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[C](mg/mL) = Abs_{260\text{ nm}} (\text{factor de dilución})/5.8$$

6.2 Desensamble y re-ensamble del CCMV

Para separar al virus en sus componentes proteínas y ARN, el CCMV se dializó por 24 hrs en buffer de desensamble (0.5 M $CaCl_2$; 50 mM TRIS-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA, pH 8; 1mM DTT; 0.5 mM PMSF). Para llevar a cabo el desensamble es necesario agregar una concentración alta de sal, es por eso que se agrega cloruro de calcio, el DTT se añade para romper y prevenir los enlaces disulfuros, mientras que el PMSF inhibe las proteasas, el TRIS-HCl se usa para obtener el pH deseado, en este caso cercano al neutro para que los residuos en las proteínas de la cápside se desprotonen y los dímeros se repelan entre sí.

Se tomaron muestras cada 4 horas durante 24 horas, y se guardaron a -20°C, para posteriormente analizar el mecanismo de desensamble en función del tiempo.

Para el análisis del reensamble del virus CCMV, una alícuota de la muestra desensamblada a 24 horas fue reensamblada in-vitro. Para ello, la muestra fue dializada en buffer de proteínas (1 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH7.2; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) con la finalidad de que las proteínas se mantuvieran como dímeros. Posteriormente, la muestra se dializó en buffer de ensamble de ARN (50 mM NaC; 10 mM KC; 50 mM TRIS-HCl, pH 7.2; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT) por al menos 4 horas. Este buffer proporciona la fuerza iónica suficiente para para promover las interacciones entre las proteínas de la cápside y el ARN; durante el desensamble los iones de calcio y magnesio son expulsados y por eso es necesario remplazarlos al reensamblar el virus. Por último, la muestra fue acidificada en buffer de virus, el cual tiene pH 4.8, por al menos 4 horas, debido que a pH ácido se facilita la formación de las cápsides incluso en ausencia de genoma viral al promoverse la interacción proteína-proteína.

6.3 Electroforesis y snapshot-blotting

La electroforesis de las muestras desensambladas a diferentes tiempos se realizó a 37 volts en un gel nativo de agarosa al 1% en TAE (40 mM Tris, pH 7.6; 20 mM ácido acético; 1mM EDTA). El contenido genético (ARN) fue teñido con GelRed™ y las proteínas con InstantBlue™. El mismo procedimiento se utilizó para las muestras del reensamble. Además, se realizaron electroforesis a 50 volts en buffer de virus (pH 4.8), para evitar cambiar el pH de las muestras reensambladas y acidificadas.

Después de la electroforesis y tinción de las muestras, se seleccionaron las bandas de interés que contenían las muestras para analizarlas por medio de TEM, por lo cual fueron transferidas a rejillas de TEM por medio de la técnica de *snapshot-blotting* [33] el cual ya fue descrito en antecedentes.

Para estudiar específicamente la integridad de las proteínas se analizaron por medio de electroforesis en un gel desnaturante de poliacrilamida. La muestra a analizar fueron las cápsides re-ensambladas en buffer de virus y como control se agregó un carril con CCMV nativo. El gel de poliacrilamida tiene dos fases: una de concentración y la otra de separación. La fase concentradora fue de 5% y la separadora contiene 15% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó por 35 minutos a 200 Volts.

6.4 Análisis por medio de microscopia electrónica de transmisión

Para poder realizar el análisis de una muestra en TEM es necesario que esta tenga una alta densidad electrónica, por lo cual en nuestro caso fue necesario realizar una tinción previa de las muestras ya que están constituidas de proteínas y ácidos nucleicos. Todas las muestras se tiñeron con ácido fosfotungstico (PTA al 2% (pH 7.5) excepto las muestras reensambladas que se tiñeron a pH 4.8. Estas últimas fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo (UA) al 2%. Se analizaron muestras de desensamble a las 24 horas, depositándose directamente sobre la rejilla de TEM y se guardaron en un desecador para su posterior análisis. Las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico JEOL JEM-2010 a un voltaje de aceleración de 200 Kv.

7. Resultados y discusión

El objetivo principal de esta tesis es describir el proceso de desensamble de un virus icosaédrico, así como su reensamble. El proceso de autoensamblado de los virus es un fenómeno que puede ser muy complicado y que puede tomar algunas fracciones de milésimas de segundos [14]. Sin embargo, en algunos virus icosaédricos, como en el caso del CCMV y algunos otros virus, basta con mezclar a los componentes en las condiciones adecuadas para inducir la formación de viriones idénticos al virus nativo [9,16], y así mismo al modificar o controlar dichas condiciones es posible producir el desensamble del virión [25]. Para cumplir con lo planteado en este trabajo de investigación se partió del virus del CCMV nativo y se procedió a desensamblarlo a pH alto (7.2) y una fuerza iónica alta por 24 horas. Para poder dilucidar el proceso del desensamble se tomaron muestras en períodos de 4 horas aproximadamente.

En la figura 8 se muestra el proceso de desensamble del virus CCMV mediante el cambio de su movilidad electroforética de sus diferentes componentes en geles nativos de agarosa en TAE. En la Figura 8-a se muestra el ssRNA del virus. La tinción del ARN en el gel de agarosa se llevó a cabo con GelRed™; dicha tinción se hizo posterior a la electroforesis para que no hubiese un cambio debido al marcador. En la figura 8-b se observan las proteínas de la cápside del virus CCMV al teñir el mismo gel con *InstantBlue*™ que exclusivamente marca proteínas. En la figura 8-c se indica que bandas en el gel fueron transferidas a la rejilla de TEM mediante la técnica *snapshot-blotting*.

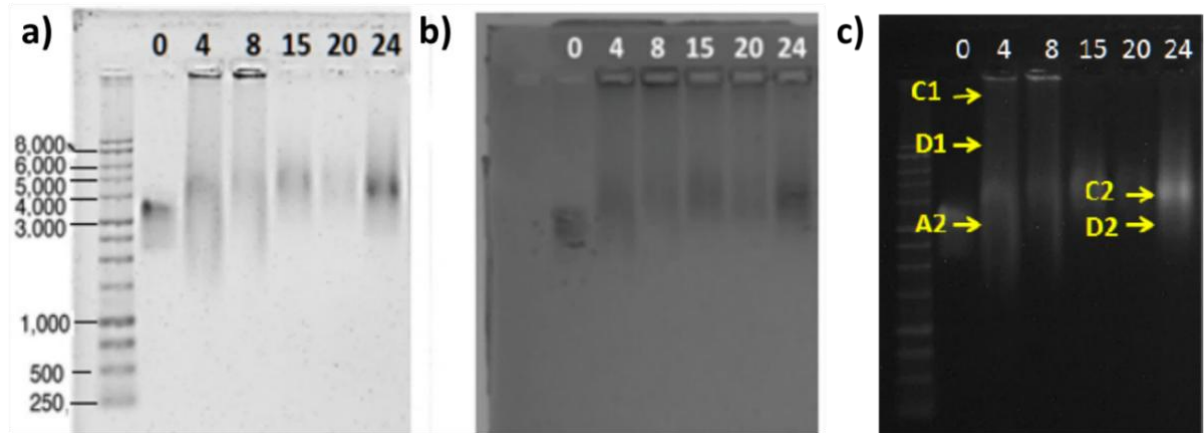


Figura 8. Electroforesis nativa del desensamble del virus CCMV en TAE. Se muestra la progresión del desensamble en función del tiempo. El tiempo de desensamble en horas se indican en la parte superior de los carriles. a) Gel teñido con GelRed™ para observar el ssARN durante el desensamble; b) Proteínas de la cápside del CCMV teñidas en InstantBlue™; c) Sitios de inserción de rejillas para análisis de la muestra mediante microscopía electrónica de transmisión.

La tinción del ARN y proteínas en el gel del desensamble muestran que los dos componentes del CCMV se encuentran aún interaccionando entre sí, incluso a las 24 horas de haberse mantenido en diálisis en el buffer de desensamble usado convencionalmente. Además, en todos los carriles se observa que parte de la muestra presenta una movilidad menor en comparación al virus nativo; lo que sugiere que el ssRNA y la proteína de la cápside del CCMV pueden estar formando agregados de tamaños regulares, sin importar el tiempo en buffer de desensamble. Las imágenes en el microscopio electrónico de las muestras depositadas directamente sobre rejilla (sin tratarlas con *snapshot-blotting*), confirman la tendencia de las proteínas a formar agregados, (figura 10). Aunque no se distingue el ARN en las micrografías electrónicas de transmisión, los resultados de la electroforesis en geles nativos de agarosa, que muestran que ARN y proteínas están interaccionando, nos permiten inferir que el genoma no es visible debido a que está decorado con proteínas.

7.1 Desensamble a las 4 horas

Se tomaron 20 μ l aprox. de las muestras del desensamble. La primera fue la de las 4 horas. Dichas muestras se guardaron a -80°C para preservar la estructuras de los complejos resultantes. Una vez que obtuvimos muestras cada 4 horas durante 24 horas, procedimos a realizar su electroforesis en gel de agarosa al 1% a -4°C para su análisis y observación en microscopio. Además, una alícuota de cada una de las muestras de cada tiempo se colocó directo sobre rejilla, se tiñeron con PTA, y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión. Las imágenes que se muestran a continuación corresponden a las muestras depositadas directamente sobre la rejilla de TEM.

En la figura 9 se pueden apreciar partículas esféricas con un diámetro de 28 nm aproximadamente, otras partículas de menor tamaño y partículas de virus hinchadas en las que resaltan las estructuras proteicas o capsómeros. Esta figura permite asociar el estado transitivo al desensamble, es decir, las partículas del virus aumentan su volumen y después se forman agregados proteicos, en donde la forma esférica de las cápsides ya se han perdido y en conjunto se asocian en una estructura amorfa.

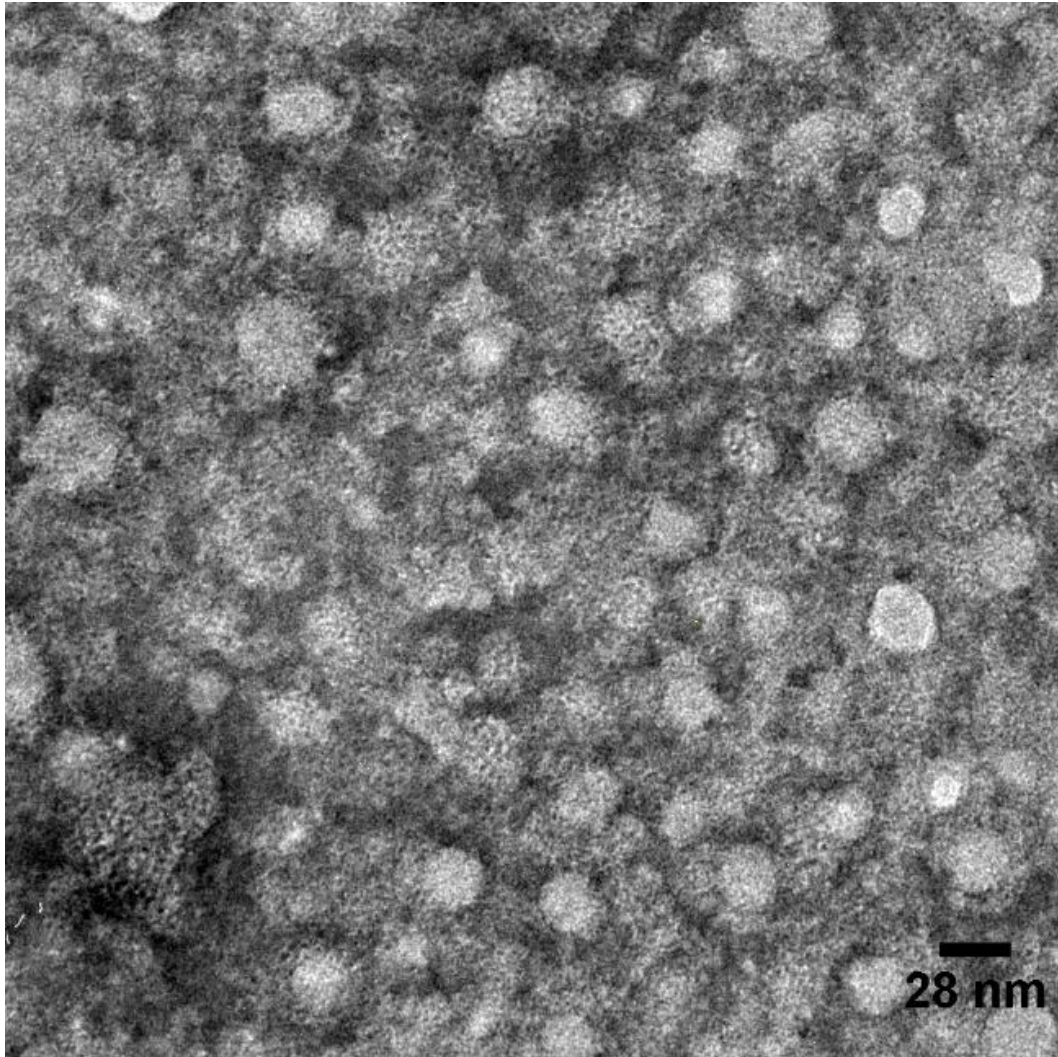


Figura 9. Micrografía del desensamble del CCMV a las 4 horas: Algunas cápsides presentan expansión radial. Se observan Partículas de virus estables, otras aumentadas en tamaño, donde se pueden apreciar los capsómeros separados entre si. También hay otras cápsides que ya han perdido su forma icosaédrica, aunque aún se observan algunos capsómeros como parte de las estructuras amorfas.

En algunas zonas de la misma muestra se observaron agregados proteicos de gran tamaño. En estos se alcanza a apreciar que están compuestos por cápsides semi-deshechas (figura 10).

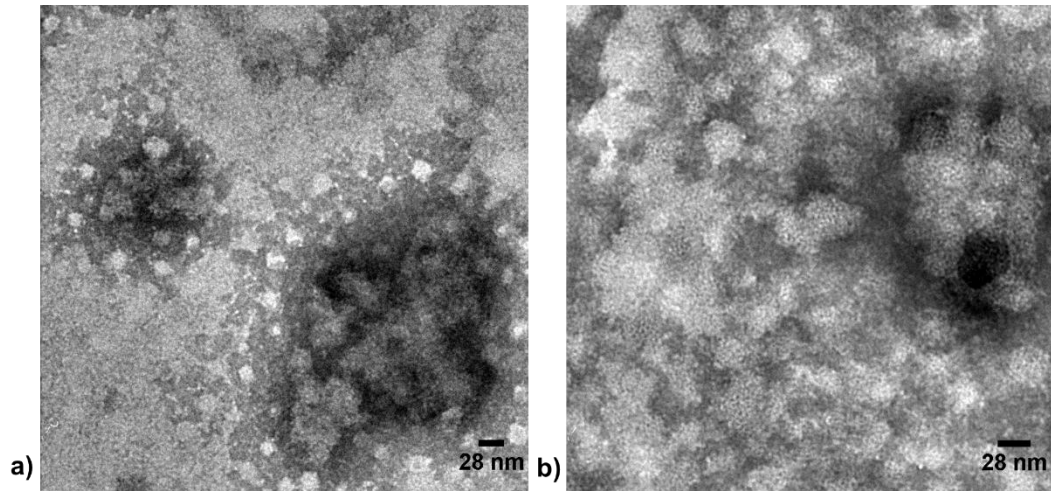


Figura 10. Micrografías del desensamble del CCMV a las 4 horas. Muestra depositada de manera directa sobre la rejilla y teñida con PTA. Se observaron conglomerados en distintas regiones de la muestra conformados por cápsides desensambladas. a) se observan dos conglomerados de proteínas, alrededor de estos aún se pueden observar cápsides. b) en esta micrografía se pueden apreciar que en uno de los conglomerados se alcanza a apreciar la forma semi-esférica de las cápsides, que constituyen el conglomerado proteico-ARN.

La técnica EMSA (por sus siglas en inglés, electrophoretic mobility shift assay) tiene como principio facilitar la caracterización de los complejos núcleo-proteicos, al separar las partículas por tamaño o carga eléctrica. En las imágenes siguientes se presentan micrografías seleccionadas de la muestra del desensamble a las 4 horas al transferirla mediante *snapshot blotting*. Estas imágenes corresponden a los sitios C1, D1 y A2 del gel del desensamble correspondiente al virus desensamblado durante 4 horas, tal como se indica en la figura 8.

Probablemente existen distintos mecanismos de desensamble; lo cual va en contra de lo que se esperaba inicialmente, en el que se suponía un desprendimiento simultáneo de los capsómeros posterior a la expansión radial de la cápside, esta suposición se basa en que hemos observado estructuras muy diferentes entre sí, obsérvese figura 11.

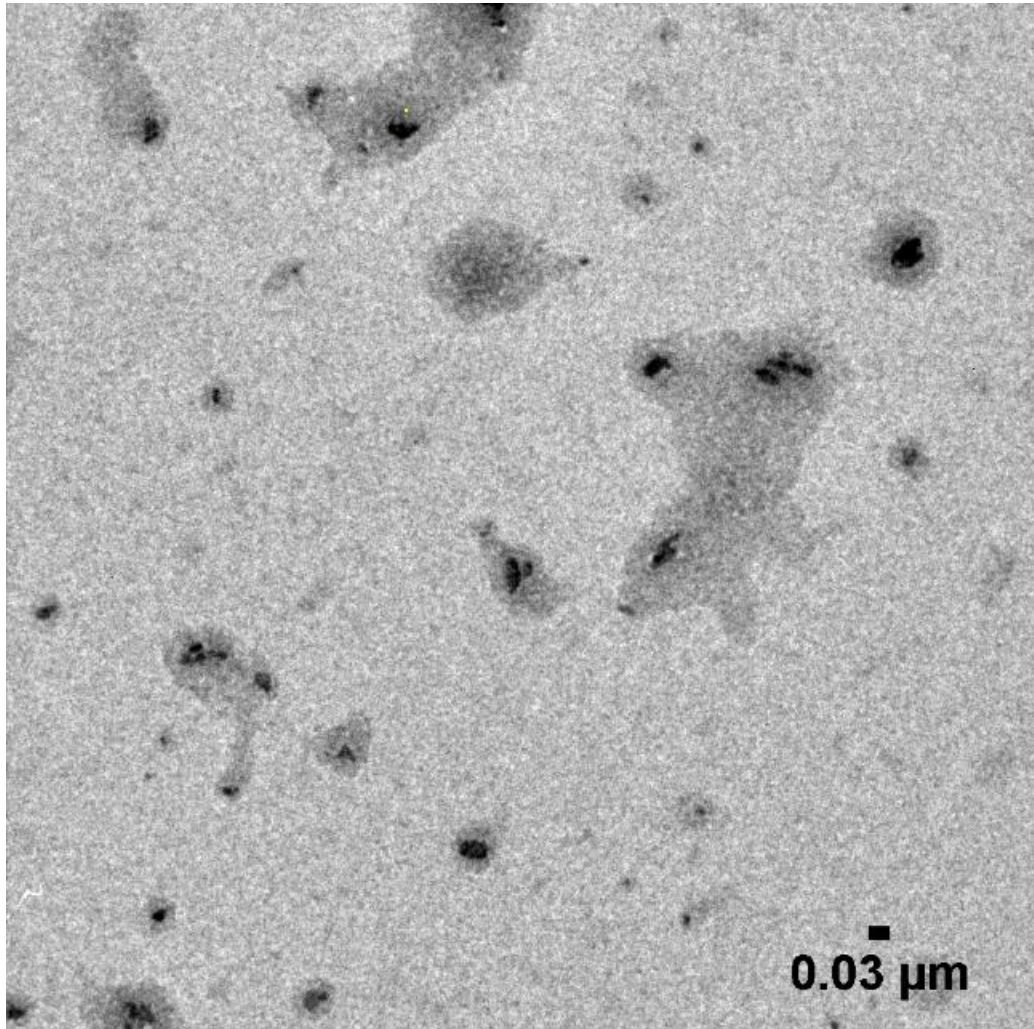


Figura 11. Micrografía del desensamble a las 4 horas del sitio A2 del gel de agarosa. Muestra teñida con PTA y transferida por snapshot-blotting del gel a la rejilla de TEM. Se pueden observar partículas amorfas de distintos tamaños; los grupos y partículas cercanos entre si corresponden a fragmentos de cápsides desensambladas.

El virus aumenta su volumen debido a la expansión radial producida por el incremento en pH, lo cual provoca que los iones divalentes se liberen, esto genera una inestabilidad en la cápside que culmina en la separación de los componentes. Los resultados muestran que después de la fragmentación de las cápsides las proteínas se aglomeran. Para poder entender cómo se inicia la agregación de proteínas se ha observado con detalle a cierto tipo de estructuras que podrían ser los núcleos de formación de la cápside. Las siguientes imágenes se enfocan en partículas de 8-12 nm que aparentan estar embebidas en una película muy delgada y que en algunas partículas cubre de manera uniforme el perímetro de estas.

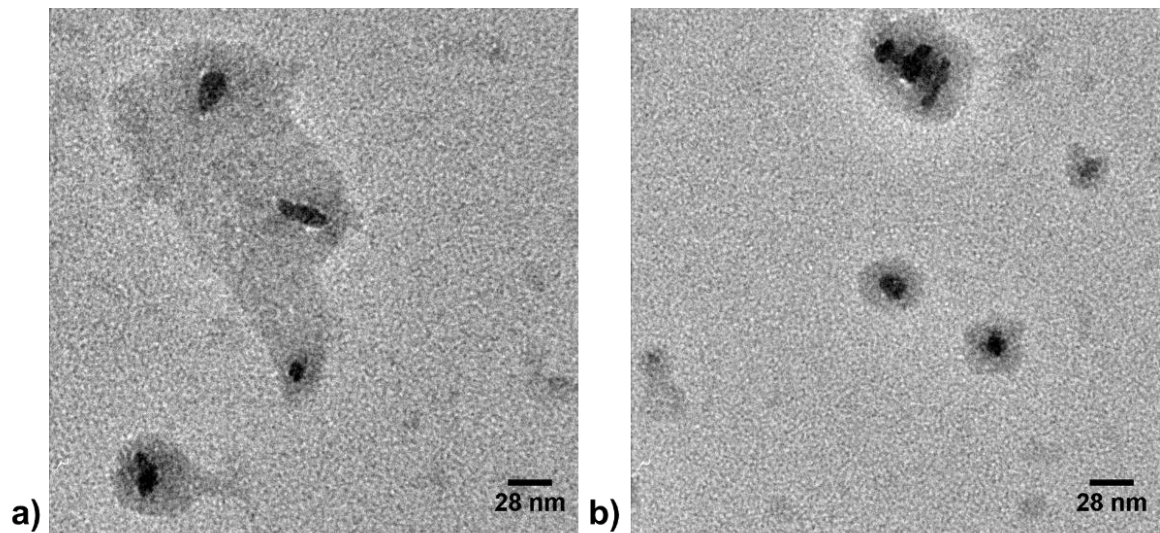


Figura 12. Micrografías de la muestra del sitio A2 del gel de desensamble: Fragmentación de cápside. Muestra de las 4 horas teñida con PTA. En estas imágenes se observan partículas amorfas cubiertas por películas delgadas. A) Muestra tres estructuras embebidas en la película delgada. También pueden observarse partículas de ~10 nm de diámetro B) Muestra tres estructuras en la película, totalmente separadas entre ellas. Las imágenes en conjunto, aunque son dos complejos con morfología distinta, muestran la dinámica que siguen los casquetes durante el desensamble.

El análisis por medio de TEM muestra que las cápsides están en proceso de disgregación. En una de ellas se aprecia una masa de baja densidad entre casquetes de cápside (figura 13). Estas micrografías dan un indicio de la probable procedencia de la película delgada que rodea a los agregados. Lo cual sugiere que la película delgada está constituida por complejos de proteínas y ARN tal como lo confirma la electroforesis en geles nativos de agarosa.

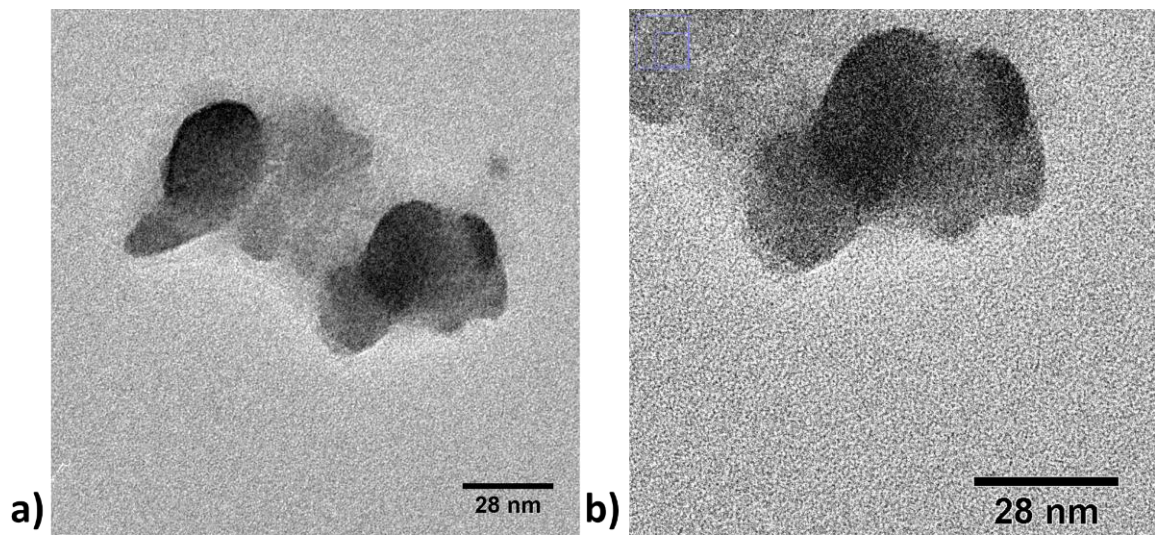


Figura 13. Micrografía del gel de desensamble a las 4 horas: Casquetes de cápside y "nubes" proteicas con ARN. a) Se observan casquetes de una o varias cápsides desensambladas y una nube o masa de baja densidad entre estos. B) Acercamiento a la figura a). Se hizo zoom a uno de los casquetes para poder apreciar los capsómeros en este.

En las siguientes imágenes, además de pequeñas partículas (~10 nm), se muestran dos tipos de conglomerados de tamaños muy cercanos a los del CCMV nativo que se encontraron de forma regular en las muestras: El primer tipo engloba a cápsides divididas en tres casquetes y el otro abarca a partículas de entre 6-8 nm; estos últimos conglomerados han perdido totalmente la forma icosaédrica, no obstante debido a que la agrupación en conjunto mide ~28 nm se ha asumido que se trata de cápsides individuales parcialmente desensambladas.

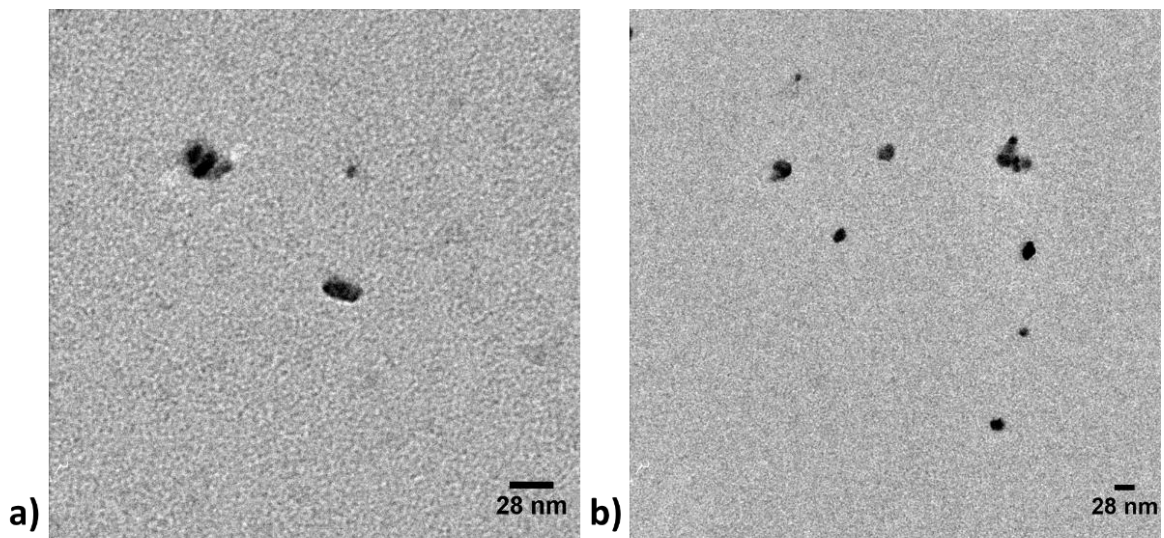


Figura 14. Muestras del gel de desensamble a las 4 horas: las cápsides se desensamblan de distintas formas. A) cápside dividida en 3 casquetes. Se observa también otro probable casquete en la figura. B) Conglomerado conformado por proteínas de diámetros 6-8 nm, también se observan partículas individuales de entre 8-12 nm de diámetro. Este conglomerado puede ser una cápside individual de la que se han desprendido capsómeros por separado.

También fueron encontradas nanobarras o estructuras nanotubulares de diferentes tamaños en las muestras analizadas a diferentes tiempos de desensamble. En algunas estructuras túbulares o en forma de rodillos se observan fibras que podrían atribuirse al ARN del virus decorado con proteínas. Así mismo se observan agregados de partículas agrupadas en línea asemejando túbulos, claramente distintos de los fibrosos y en algunos casos estructuras tipo ovoides.

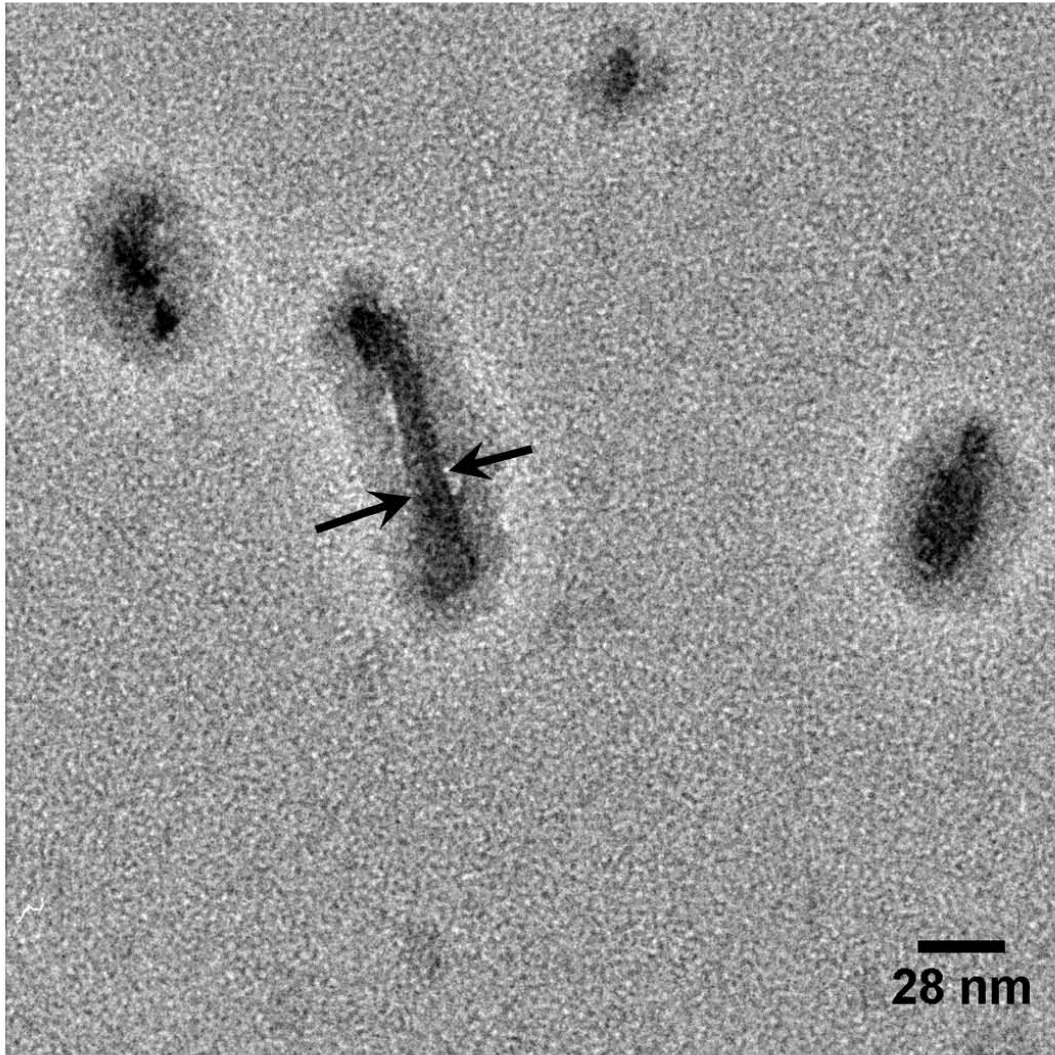


Figura 15. Micrografía del sitio A2 del gel de desensamble, 4 horas: Túbulo proteico fibroso. Muestra transferida mediante snapshot-blotting y teñidas con PTA. Se observan estructuras tipo

ovoides, nanobarras o estructuras fibrosas de distintos tamaños. Estos se atribuyen a fragmentos cortos del ARN del virus, que se encuentra adornado con proteínas.

En la muestra del gel a las 4 horas aún se observan conglomerados o partículas que varían en diámetro de 6 a 10 nm. Esto significa que los agregados que se encontraron en la muestra de desensamble (4 horas) que se depositaron de forma directa sobre la rejilla de TEM están constituidos por este tipo de partículas; es decir, los conglomerados que se observan en la figura 16 corresponden a los conglomerados de la figura 10 solo que por acción de la electroforesis se separaron en sus bloques constructivos que son este tipo de partículas. Cabe mencionar que los tamaños de las partículas corresponden a la de los capsómeros de las cápsides del CCMV.

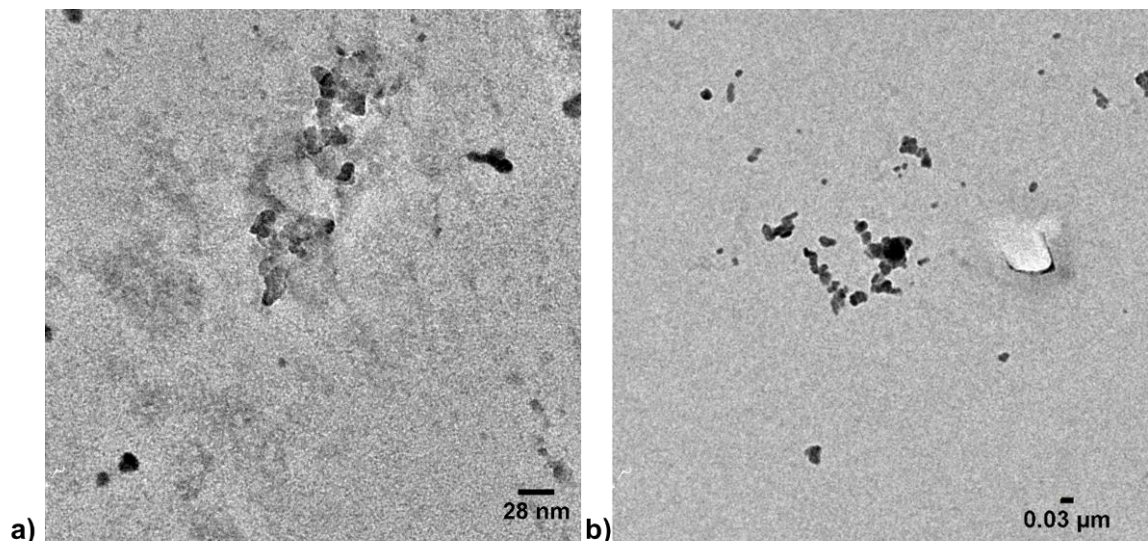


Figura 16. Micrografías del área C1 del gel de desensamble, 4 horas. Muestra transferida a rejillas de TEM mediante snapshot-blotting del gel de agarosa y teñida con PTA. En ambas imágenes se pueden observar agregados partículas de entre 6 a 10 nm de diámetro.

7.2 Desensamble a las 8 horas

A las 8 horas de dializar el virus CCMV en buffer de desensamble se tomó una muestra y se depositó directamente sobre la rejilla para ser analizada por medio de TEM. Las imágenes indican distintas especies en diferentes áreas de la misma muestra. En algunas zonas hay conglomerados similares a los encontrados en la muestra de las 4 horas en desensamble. En otras se pueden observar partículas de un diámetro alrededor de los 28 nm, mientras que en ciertas micrografías hay partículas de 12 nm de diámetro.

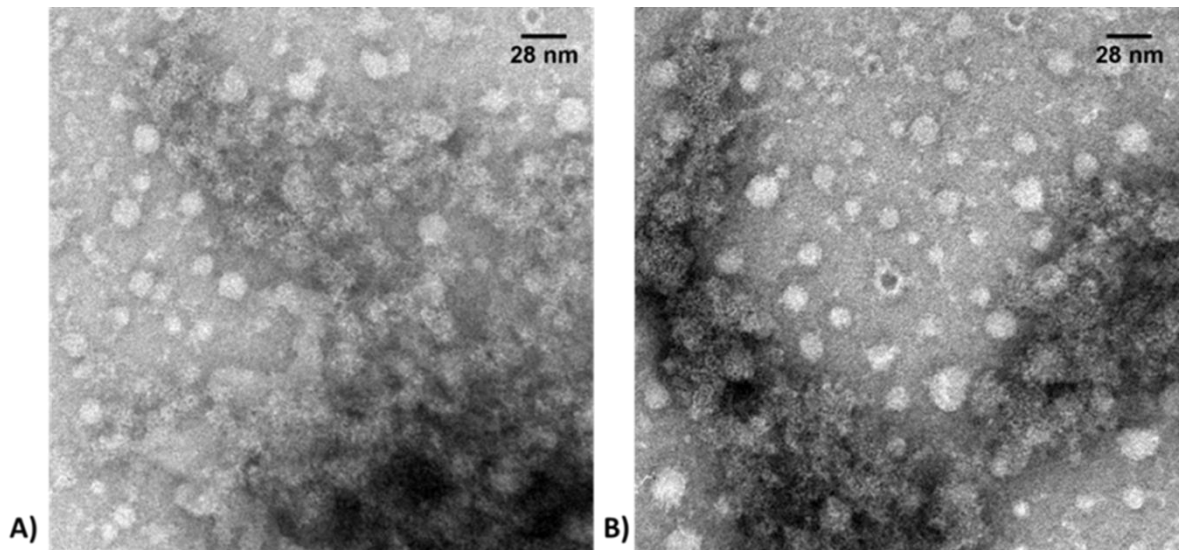


Figura 17. Muestra depositada sobre rejilla de TEM, desensamble a las 8 horas. Muestra teñida con PTA. Se observan aglomerados de cápsides desensambladas, algunas de ellas no están totalmente desensambladas aún.

La agregación se presenta exclusivamente cuando hay desensamble. Si las cápsides se mantienen estables, como lo muestran las siguientes imágenes, se mantienen uniformemente distribuidas.

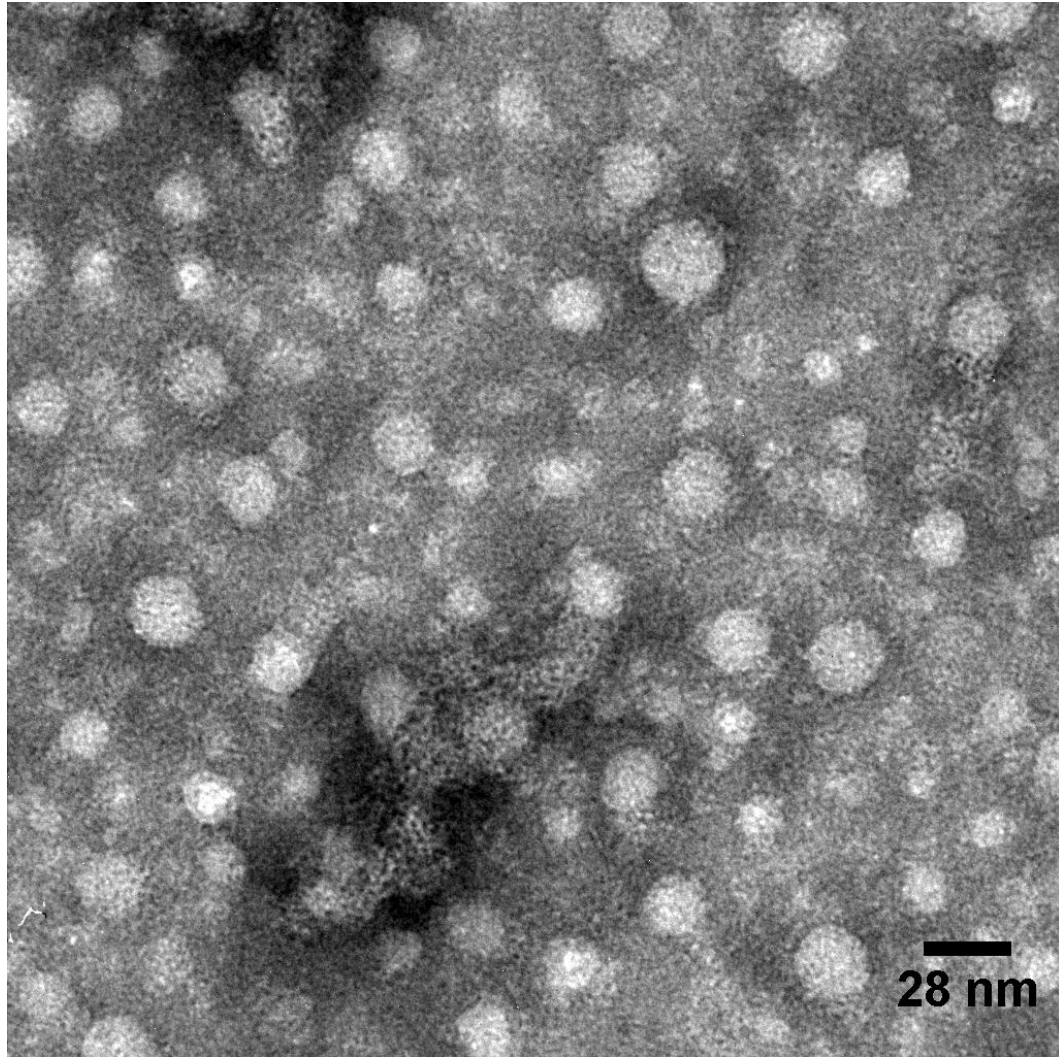


Figura 18. Muestra depositada directo sobre rejilla del desensamble a las 8 horas: se pueden observar algunas cápsides estables sin agregación. La tinción de la muestra se realizó con PTA. Se observan partículas virales sin desensamblar lo que muestra que la agregación proteica se presenta únicamente en cápsides desensambladas.

7.3 Desensamble a las 12 horas

El mismo comportamiento se presenta a las 12 horas: conglomerados de partículas desensambladas junto a algunos virus aún completos y otras partículas de diámetro mucho menor a los 12 nm. Esto muestra que el desensamble no es un proceso uniforme, ni rápido al menos en condiciones *in-vitro*.

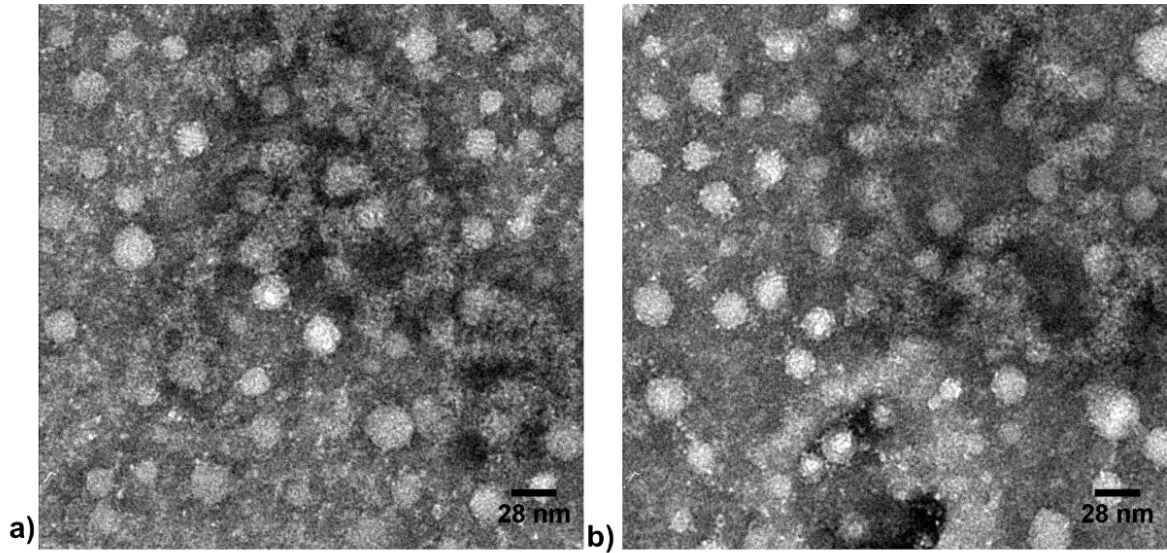


Figura 19. Micrografías de la muestra desensamblada a las 12 horas y depositada directamente sobre rejilla de TEM: Agregados proteicos de cápsides desensambladas y cápsides estables. Muestra teñida con PTA. Se observa que las cápsides desensambladas están formando agregados, mientras que aún pueden observarse partículas virales estables.

7.4 Desensamble a las 24 horas

A las 24 horas, la muestra aparentemente está desensamblada a excepción de unas cuantas cápsides, de las cuales varias presentan expansión radial. Aunque claramente desensambladas, las proteínas de la cápside del virus están agregadas en clústeres de tamaño uniforme tal como se puede observar en la figura 20, además están distribuidas uniformemente.

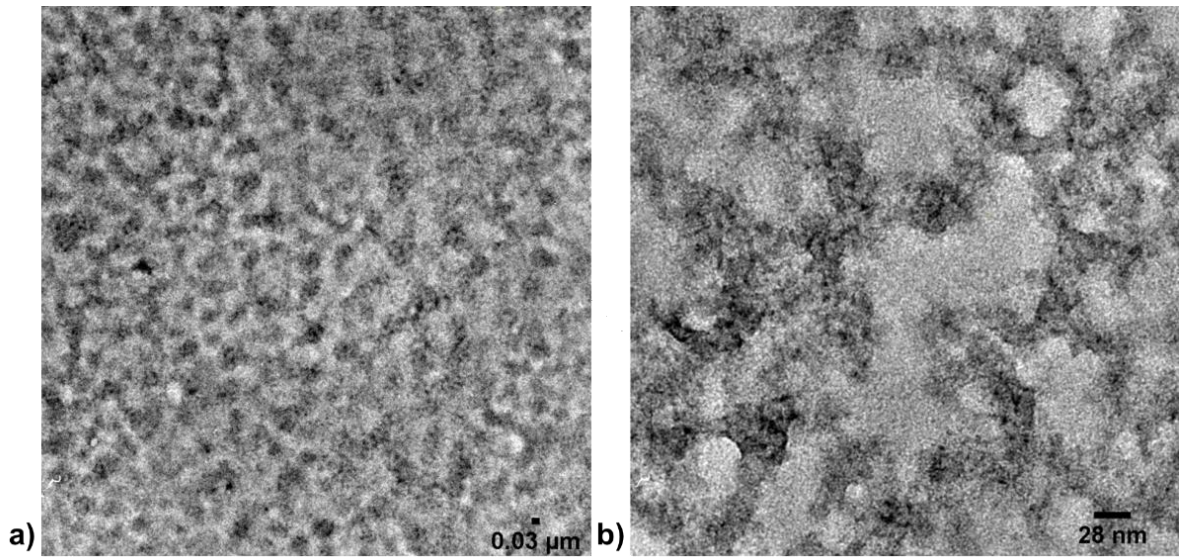


Figura 20. Micrografías de muestras del virus dializado en buffer de desensamble durante 24 horas y depositada directamente sobre una rejilla de TEM, y teñidas con PTA. Se observan agregados de proteínas de cápsides del CCMV distribuidas uniformemente sobre la superficie. a) algunos virus no están desensamblados y solo sus cápsides presentan expansión radial. B) En esta imagen se logra apreciar que las cápsides han sido reducidas a proteínas, de las que unas se mantiene en su forma capsomérica.

En la misma muestra se encontraron estructuras en forma de hebras fibrosas de mayor longitud a las encontradas en los geles de 4 horas en desensamble. El grosor de dichas hebras es demasiado grueso para tratarse de ARN monocatenario, por lo que se induce que el ARN está decorado con proteínas. El decorado con proteínas del ARN se debe a las interacciones entre los oxígenos de los grupos fosfato del ARN, los 2' hidroxilos y subconjuntos de nucleobases nitrogenadas con los extremos terminales positivos de arginina y lisina de las proteínas de la cápside [37].

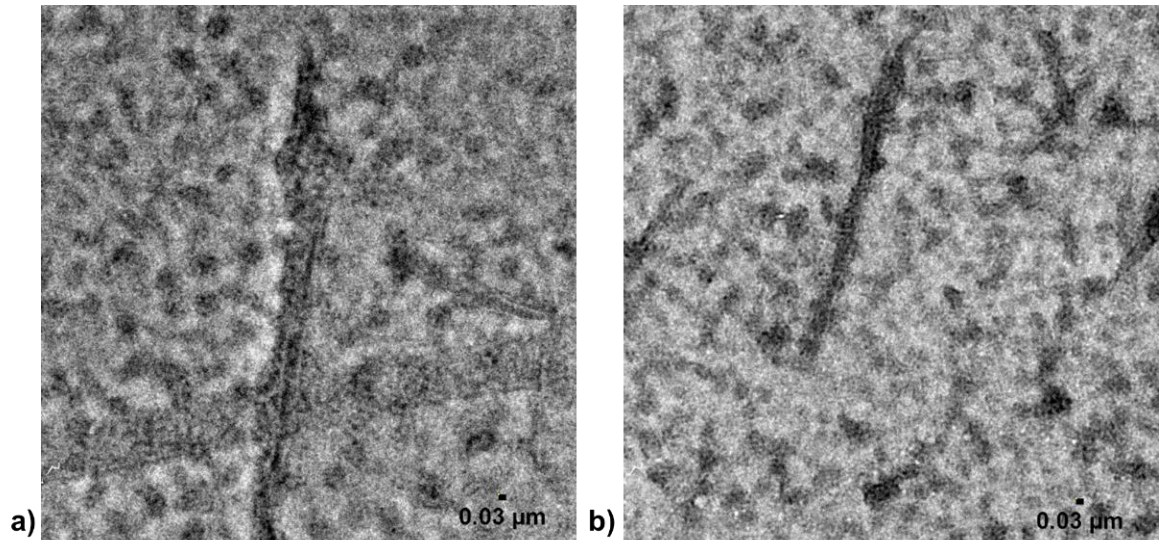


Figura 21. Micrografía de la muestra de 24 horas en desensamble depositada directo sobre la rejilla: ARN decorado con proteínas. Muestra teñida con PTA. En ambas imágenes se observan hebras fibrosas de ARN decorado con proteínas.

Las micrografías que se muestran anteriormente (figura 21) fueron tomadas de los sitios C2 y B2 del gel de desensamble, estos corresponden a las muestras de 24 horas en desensamble. En estas imágenes se observan especímenes similares a las analizadas en los diferentes tiempos de desensamble, aunque en general a 24 horas de desensamble hay un mayor número de partículas más pequeñas de entre 8-12 nm de diámetro.

Aún se encontraron nanotúbulos y conglomerados rodeados por películas de baja densidad, en ambos casos pueden ser complejos de ARN y proteínas de la cápside del CCMV, es posible que las regiones de mayor densidad estén constituidas de ARN mayormente condensado por las proteínas.

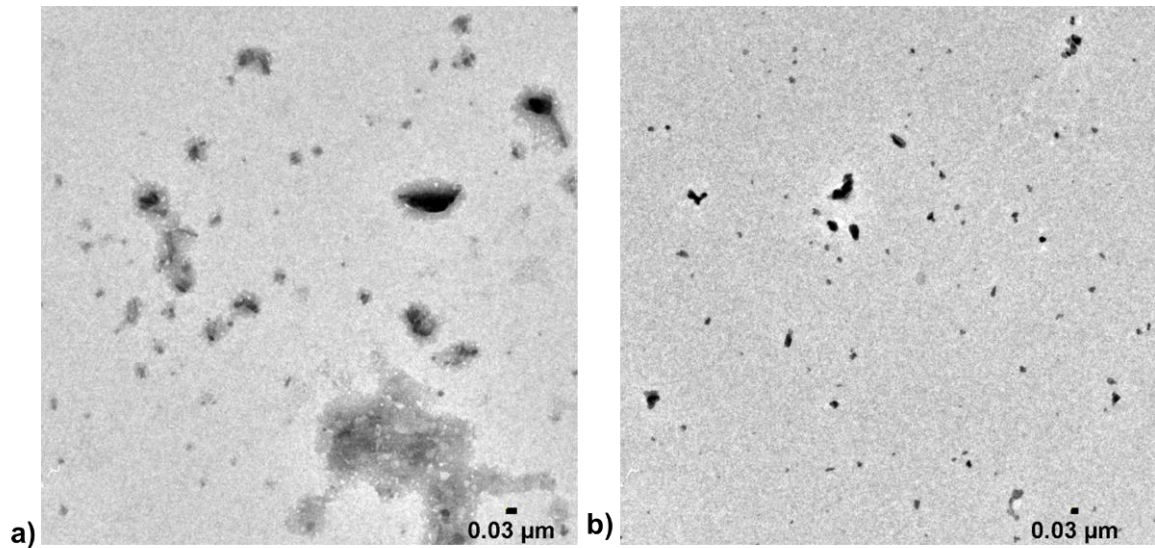
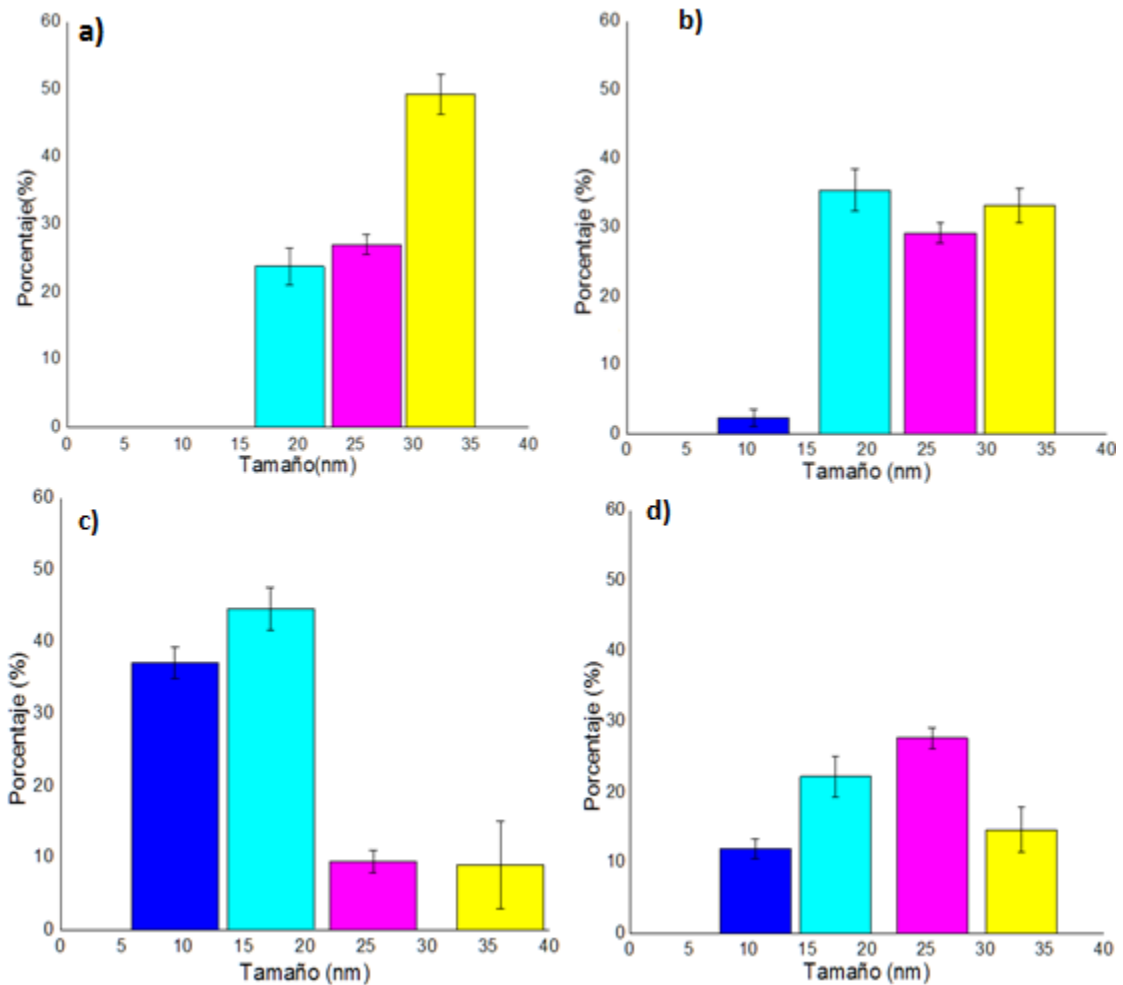


Figura 22. Desensamble a 24 horas obtenida del gel de desensamble en los sitios C2 y B2: partículas, nanotúbulares. Muestra teñida con PTA. a) Conglomerados dentro de películas de baja densidad de proteínas, el ARN está adornado con proteínas tal como se demuestra por medio de electroforesis. B) partículas proteicas de 5-12 nm

En la gráfica 1 se muestra la población porcentual de partículas separadas según su tamaño a diferentes tiempos. Estas graficas otorgan una categorización del desensamble del virus en intervalos de tiempo, y que puede ser en especies o estructuras de tamaño característico. Esta clasificación ayudará a determinar a qué tiempos se producen cambios considerables durante el desensamble del virus. Se midieron 200 partículas por cada tiempo analizado y se clasificaron por diámetros; aquellas menores a 12 nm corresponden a capsómeros; aquellas entre 12 y 23 nm se identificaron como fragmentos de cápsides; las de entre 23 y 28 nm son cápsides estables. Aunque el diámetro de las cápsides del CCMV es de 28 nm se ha escogido un rango amplio debido al error de medida que se debe a la tinción con PTA y efectos de secado de las partículas e interacciones con la rejilla de TEM. Las partículas con diámetros mayores a 28 nm son las cápsides que presentan expansión radial.



Grafica no. 1 Histograma en porcentajes poblacionales de partículas según su diámetro. Cada gráfica corresponde a una población de 200 partículas en promedio observadas con el microscopio electrónico de transmisión en muestras tomadas en un tiempo dado de desensamblado. **a) Partículas de las 4 horas en desensamblado.** El número de fragmentos de cápsides (12-23 nm) y las cápsides aumentadas (28 > 40 nm) están en equilibrio y representan el 70% de cápsides desensambladas. El 30% de las cápsides remanecen estables. Y tan solo el 2% representan capsómeros desligados. **b) Partículas en las muestras de las 8 horas en desensamblado.** Las cápsides estables representan el 30% de la población, mientras que los fragmentos de cápsides (12-23 nm) son el 40% y están por sobre las cápsides expandidas. El número de capsómeros es del 12%. **c) Población de partículas del desensamblado a las 12 horas.** El número de cápsides hinchadas representa la mayoría de las partículas, casi el 60%, después le siguen las cápsides fragmentadas y en conjunto son el 80% de cápsides desensambladas. **d) Población de partículas del desensamblado a las 24 horas.** El número de cápsides estables e hinchadas están en equilibrio entre ellas y los capsómeros y fragmentos representan la gran mayoría de partículas.

7.5 Discusión del desensamble

Los resultados muestran que el desensamble no es un proceso uniforme; unas cápsides se desensamblan primero que otras. Algunas cápsides están desensambladas desde las 4 horas, y el tiempo para que se desintegren completamente se ha estimado en 24 horas tal como lo muestran diferentes trabajos desde Bancroft (1960) hasta la fecha [24,25]. A las 4 horas en buffer de desensamble, según el histograma población aproximadamente el 70% de las cápsides ya están desestabilizadas y para las 24 horas la mayoría de las cápsides ya están totalmente desensambladas. Es interesante observar que a las 12 horas no hay capsómeros visibles; los conglomerados que se han observado en varias micrografías explican por qué los capsómeros desaparecieron de las gráficas, y es debido a que estos se agregaron después del desensamble. A este mismo tiempo hay un dramático incremento en las cápsides expandidas radialmente y una correspondiente disminución de las cápsides estables. Para las 24 horas menos del 10% de las cápsides se mantienen estables y una gran parte de la población ha sido reducida a capsómeros. Es necesario agregar más tiempo en buffer de desensamble para poder completar el desensamble de toda la población viral, sin embargo esto podría comprometer la estabilidad del ARN y con ello la pureza de la proteína en el caso de que se requiera recuperar.

En otras investigaciones se ha demostrado que las cápsides se expanden radialmente (hasta un 10%) previas al desensamble [22, 25], nuestros resultados por medio de TEM indican que algunos viriones presentan diámetros mayores a 28 nm, lo que confirma que las cápsides aumentan su tamaño previa al desensamble.

La razón por la que algunas cápsides se desensamblan primero que otras puede ser debido a que el genoma del CCMV es tripartita, esto ocurre frecuentemente en los virus, y quiere decir que está dividido o segmentado en tres ARNs de diferentes longitudes. Esto confiere una diferenciación importante, la carga aniónica puede variar según la longitud del genoma. Entre más larga sea la cadena mayor carga tendrá y por lo tanto interactuará con un mayor número de proteínas [38]. La longitud óptima de encapsulación para cápsides T=3 es de 3200 nt [38] para el CCMV. En todo proceso la tendencia a la estabilidad siempre predomina, esta longitud (3200 nt) ofrece la mayor estabilidad a las cápsides [16,38,30]. Lo anterior significa que existe una correlación con la longitud del genoma; entre más larga sea la cadena mayor equilibrio de cargas entre las fracciones internas de las proteínas que constituyen la cápside y el ARN habrá [30]. Los resultados indican que también hay una preferencia de desensamble en ciertas, lo cual se atribuye a que unas cápsides son más estables que otras. Una posible razón a la diferencia en estabilidad puede estar estrechamente relacionada a la secuencia del genoma, lo cual además determina que tan efectivamente se encapsulará el ARN [15,38]. En un estudio *in-vitro* en el que se analizó la preferencia de ensamble de proteínas del CCMV por dos genomas distintos y de la misma longitud, el ARN 1 del BMV y el ARN 1 del CCMV, se encontró que las proteínas tienden a encapsular al genoma del BMV [38]. La explicación a este fenómeno se sustenta en la estructura secundaria y terciaria que adopta el ARN. La estructura del genoma tiene sitios específicos en los que se forman estructuras ramificadas que pueden actuar como centros de nucleación para la formación de la cápside, esto significa que hay una mayor densidad de cargas negativas en estos sitios y que atraen con mayor fuerza a las terminales positivas de las proteínas de cápside. Resultados teóricos han mostrado que se puede tener una presión osmótica negativa por acción de una sobrecarga negativa y que esta se puede incrementar conforme mayor número de ramificaciones tenga el ARN de cadena sencilla; al tener mayor número de ramificaciones se genera una densidad mayor de cargas negativas, de esta manera la energía libre de formación de las cápsides virales disminuye, debido a

que la atracción de las terminales catiónicas de las proteínas serán mayormente atraídas a la gran carga negativa, lo que resulta en cápsides más estables [13].

La estabilidad de las cápsides, además de variar de virión a virión, también puede cambiar localmente en la cápside. Se esperaba que los capsómeros que constituyen las cápsides se desprendieran simultáneamente, sin embargo las cápsides aparentan disgregarse de forma aleatoria, es decir, estas se separan en tres partes al inicio o simplemente se desprenden capsómeros. Es probable que los centros de nucleación del ARN determinen la manera en la que se fragmenta la cápside; aquellos sitios con mayor densidad de carga en el ARN atraen con mayor fuerza a las proteínas de la cápside, además de que estructuralmente pueden otorgar mayor soporte al acomodo proteico.

De acuerdo con lo anterior, la estabilidad local de la cápside es proporcional a la densidad de ramificaciones en la estructura secundaria del ARN, por lo que basados en este argumento, se puede determinar qué zonas en las cápsides tienen mayor estabilidad y por donde optarán por fragmentarse, es decir que partes son las más inestables. Por lo cual, se han obtenido las estructuras secundarias con mínima energía libre para los 3 genomas, uno de ellos considerando la hibridación del ARN 3 y 4, para comparar de manera efectiva la estabilidad de los tres viriones.

Las estructuras secundarias fueron generadas por dos programas, *RNAfold* y *RNAcofold*, dentro del paquete *ViennaRNA* 2.3.5 [49]. El programa *RNAfold* se utiliza para representar las estructuras secundarias con mínima energía de secuencias individuales de ARN, estas estructuras se construyen en base al algoritmo Zuker. Además, también calcula la probabilidad de apareamiento de cada base por medio del algoritmo de *McCaskill*. El programa *RNAcofold* funciona de manera muy similar al *RNAfold* pero este logra hibridar dos cadenas de ARN y determinar su estructura secundaria con la menor energía libre. Los detalles de estos programas se encuentran en el anexo 1.

Cada nucleótido presenta un color que indica la probabilidad de que este apareado; azul indica una baja probabilidad, mientras que rojo indica una probabilidad de 1.

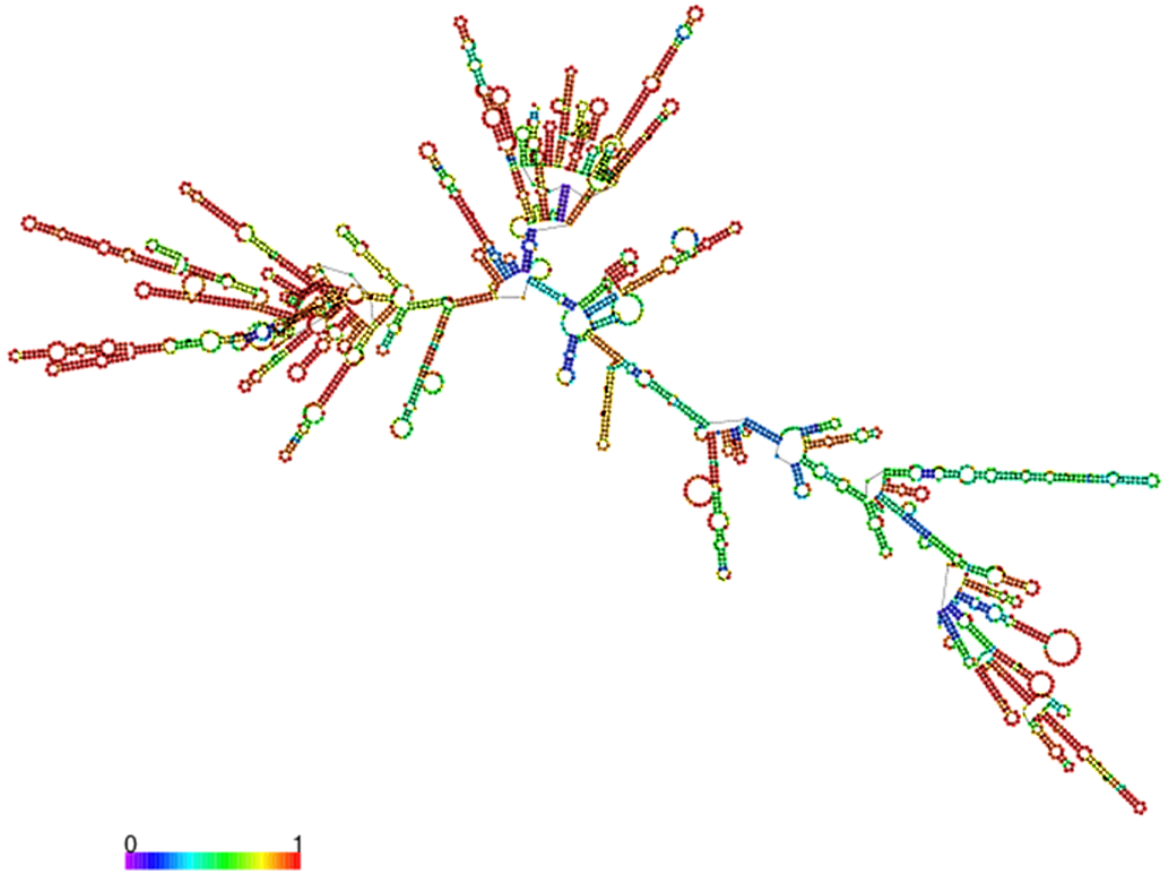


Figura 23. Estructura secundaria del ARN 1 (3171 nt) [39] generada con el programa RNAfold . La energía mínima de formación para esta secuencia es de -1042.30 kcal/mol. Se observan tres regiones con alta densidad de ramificaciones.

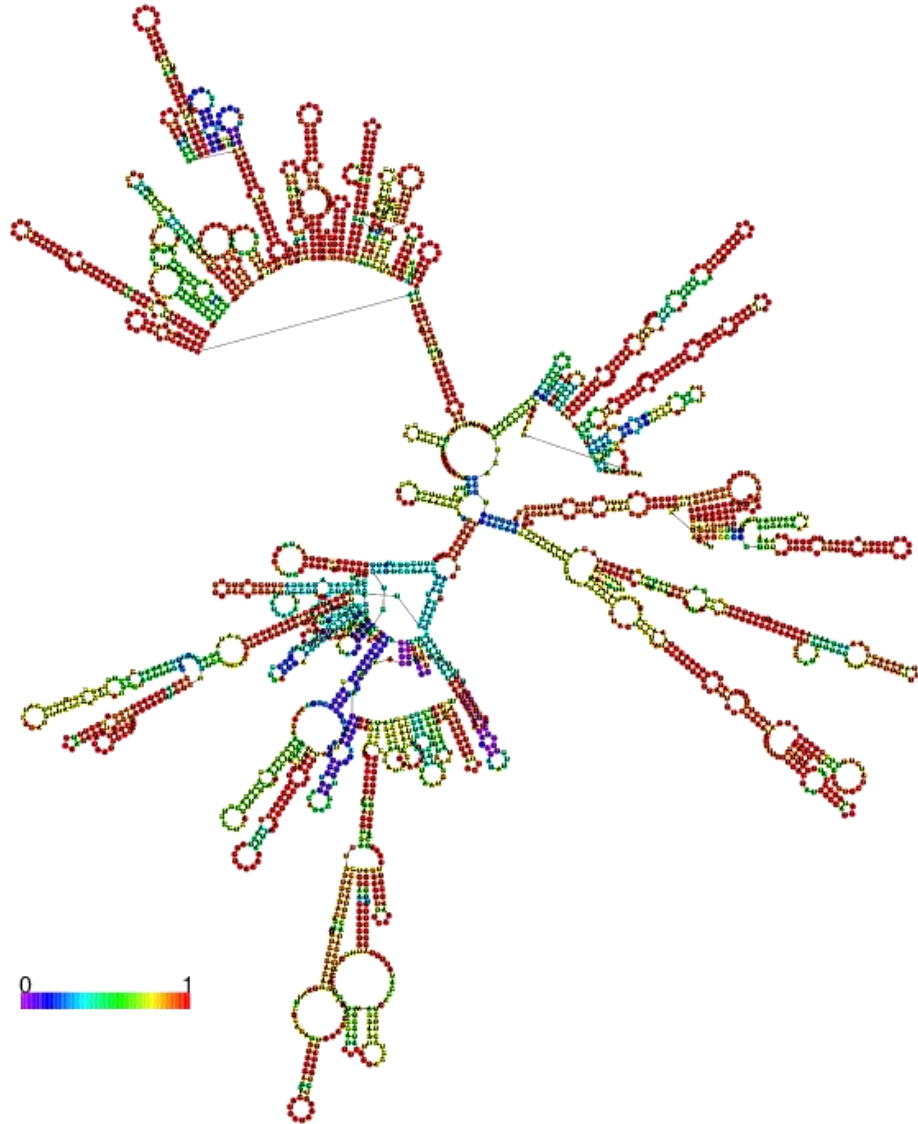


Figura 24. Estructura secundaria del ARN2 (2774 nt) [39] del CCMV generada con el programa RNAfold . La estructura tiene una energía mínima de formación de -872.70 kcal/mol. En esta estructura también se observan 3 regiones con alta densidad de ramificaciones.

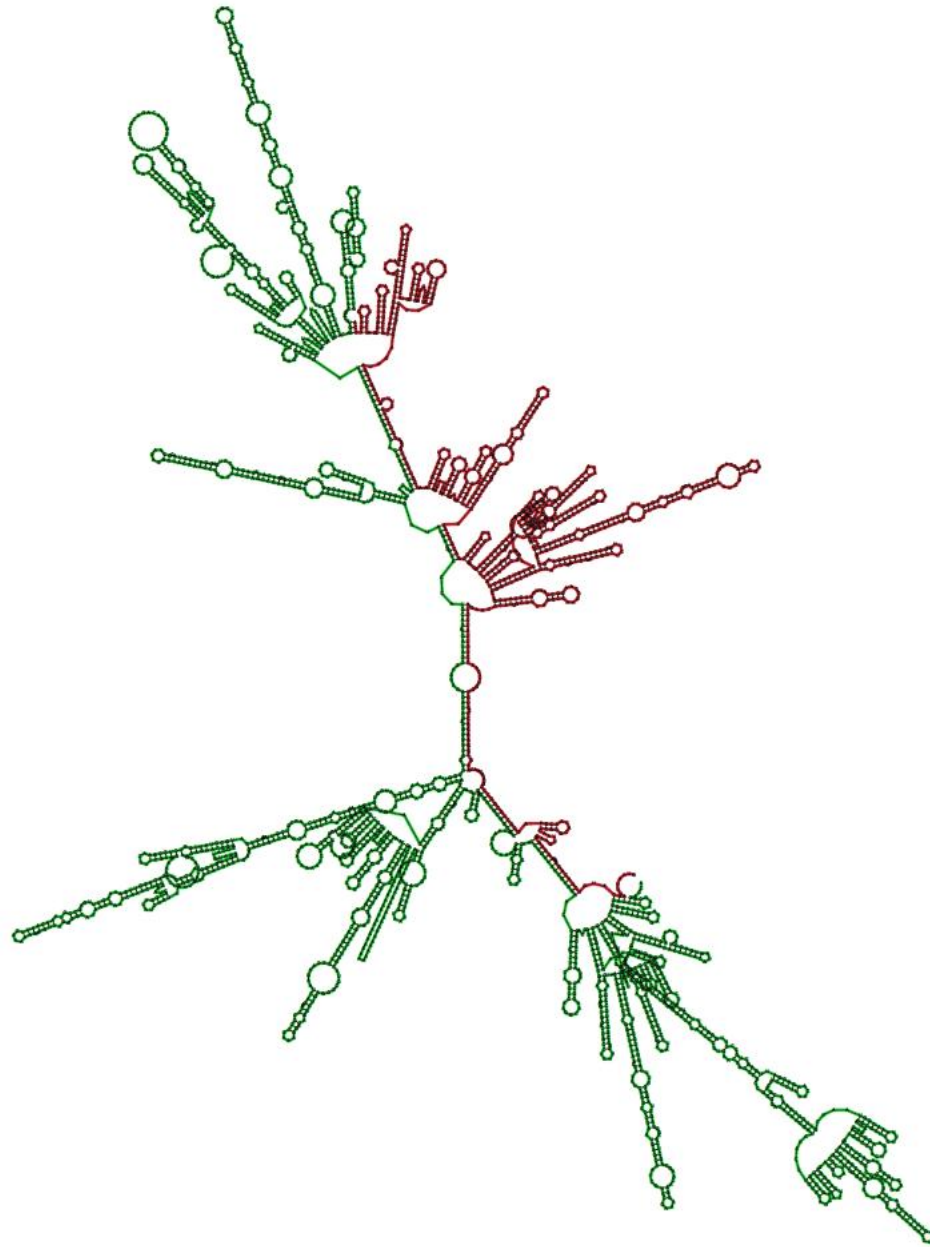


Figura 25. Estructura secundaria del ARN 3 (2173) [40] acoplado al ARN 4 (824 nt) [41] (hibridado), se observan tres regiones con alta densidad de ramificaciones. Estructura generada con el programa RNAcofold . La energía mínima libre de este híbrido es de -1033 Kcal/mol. En verde se muestra la secuencia del ARN3 y en rojo la del ARN4.

Las tres estructuras tienen algo en común, todas tienen 3 densidades predominantes de ramificaciones. Esto podría explicar por qué en algunas imágenes se observaron cápsides fraccionadas en tres pedazos, obsérvese figura 12 y 14-a; Cada uno de los ARNs que constituyen el genoma del CCMV tienen 3 secciones con mayor densidad de carga electrostática y que pueden funcionar como centros de nucleación, lo que significa que durante el ensamble de la cápside las proteínas se anclan predominantemente en estas tres regiones. En el caso de que se presente el mecanismo de nucleación y crecimiento, los dímeros se asocian en tres regiones al mismo tiempo, lo que hace el mecanismo de ensamble un proceso bastante funcional y dinámico. Debe considerarse que además de estas regiones más susceptibles, también hay diferencias energéticas entre los pentámeros y hexámeros. Los hexámeros son más inestables que los pentámeros, lo cual implica que la cápside tiene distintos sitios susceptibles a fragmentarse, es por eso que es difícil determinar con exactitud el mecanismo de desensamble.

Si comparamos las estructuras secundarias del ARN1 y el híbrido de los ARN 3-4 se observa que estos presentan grandes similitudes (figura 26); ambos tienen preferencialmente tres centros de nucleación y presentan una forma más alargada en comparación con la estructura del ARN2. Así mismo, sus energías libres son muy similares, -1042.30 kcal/mol para el ARN1 y -1033 Kcal/mol para el híbrido ARN 3-4, y están por debajo de la energía mínima libre de la estructura secundaria del ARN2 que es de -872.70 Kcal/mol; esto indica que el ARN 2 es estructuralmente menos estable que el ARN hibridado 3-4 y el ARN 1. Lo anterior explica por qué una porción de la población del CCMV se desensambla en menor tiempo que la población restante. Los resultados del histograma (gráfica 1) muestran que desde las cuatro horas una porción de las cápsides se expande y desensambla, estas cápsides podrían corresponder a la del ARN2, a las 12 horas se vuelve a observar el mismo comportamiento, en el que se vuelve a notar un aumento considerable de cápsides expandidas, estas cápsides podrían corresponder a las del ARN1 y el co-empacado (ARN3 y ARN4).

Otro factor que contribuye a la estabilidad de las cápside es la sobrecarga negativa que presenta el ARN dentro de las cápside. Conforme mayor sea la sobrecarga mayor presión osmótica negativa otorga al sistema, por que atraerá con mayor fuerza hacia si las cargas positivas de las proteínas, lo que se traduce en una estabilidad mayor [12]. El ARN1 tiene una sobrecarga negativa de $-1371 e^-$, esta es la carga mayor porque tiene la cadena más larga de los 3 ARNs, le sigue el híbrido de ARN 3-4 con $-1199 e^-$ y al final el ARN2 con $-971 e^-$. De nuevo se encuentra que los ARN 1 y el híbrido de ARN 3-4 tienen cápsides más estables que el ARN2. Otro posible argumento para explicar por qué el ARN 1 y el híbrido 3-4 son más estables radica en la estructura completa de la cadena, en el caso del ARN2 este se encuentra más centralizado en comparación con los otros, lo que genera una estructura menos flexible, lo que dificulta su compactación al momento de la encapsidación.

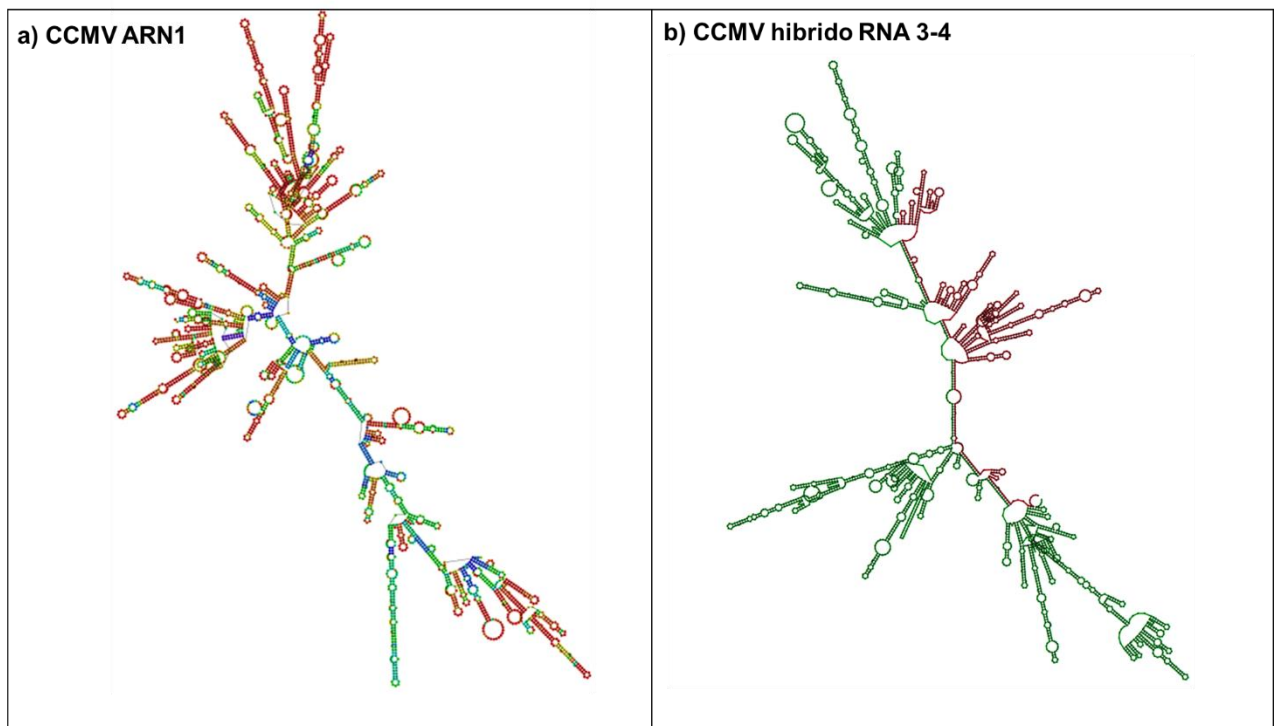


Figura 26. Se han colocado las estructuras secundarias del ARN1 en a) y el híbrido del ARN 3 y 4 en b) para mostrar las similitudes estructurales entre estos.

Los conglomerados que se observan en las muestras directas sobre rejillas, según los resultados de la electroforesis, están constituidos por proteínas y ARN interaccionando electrostáticamente entre ellos. La electroforesis permitió la separación de los diferentes complejos de acuerdo a su tamaño, por lo que los conglomerados muy grandes no lograron emigrar y se quedaron cercanos al pozo donde se depositó la muestra. No obstante, los iones divalentes de calcio juegan un rol muy importante en la formación de estas especies. La cantidad molar de EDTA que contiene el buffer de desensamble fue muy poca en comparación con la sal (1:500), por lo que la actividad quelante del EDTA sobre los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} fue muy baja. Es conocido que los cationes divalentes precipitan a los ácidos nucleicos al interaccionar con los grupos fosfato [32], esto propició que se formaran grandes agregados de ARN que a su vez pueden estar decorados parcialmente con proteínas, dando como resultado los complejos que observamos por medio de TEM y electroforesis. Como conclusión, se considera que el método que tradicionalmente se ha utilizado en el desensamble de estos virus (u otros virus) no es el adecuado. Es necesario modificar el procedimiento si se desea purificar las proteínas de cápside de una manera más eficiente; Un posible método podría implicar el incremento del pH al mismo tiempo que se agrega el EDTA; esto para asegurar que el EDTA secuestre los iones de las cápsides (y no los iones del buffer de desensamble); posteriormente agregar las sales para desensamblar el virus y precipitar el ARN con la finalidad de separarlo eficientemente de las proteínas por medio de ultracentrifugación.

La película de baja densidad que rodea a las cápsides fragmentadas que se observaron en varias imágenes (figura 12) en conjunto con la figura 13 inducen a pensar que los fragmentos o casquetes de cápside más grandes atraen a las proteínas de su alrededor. La ley de Coulomb puede justificar este fenómeno; estos fragmentos tienen ligados a ARN, los cuales están cargados electrostáticamente y pueden atraer a las proteínas a su alrededor, dando como resultado que los casquetes se rodeen de nubes proteicas, y que se observan como películas delgadas en el microscopio electrónico. Esto sería el paso reversible de lo que se ha considerado en trabajos anteriores [16,29] del ensamble de virus, en este caso es la decoración de las cadenas libres de ARN con proteínas para mantener un sistema en equilibrio por medio de la estabilización de cargas.

En cuanto a las estructuras fibrosas se atribuye a que están formados por varias cadenas de ARN cubiertos por proteínas. De acuerdo al tiempo en desensamble y el análisis de las muestras por medio de sus micrografías, se han ordenado en el siguiente diagrama imágenes que muestran el proceso que se pudo elucidar en esta investigación en el desensamble del virus CCMV.

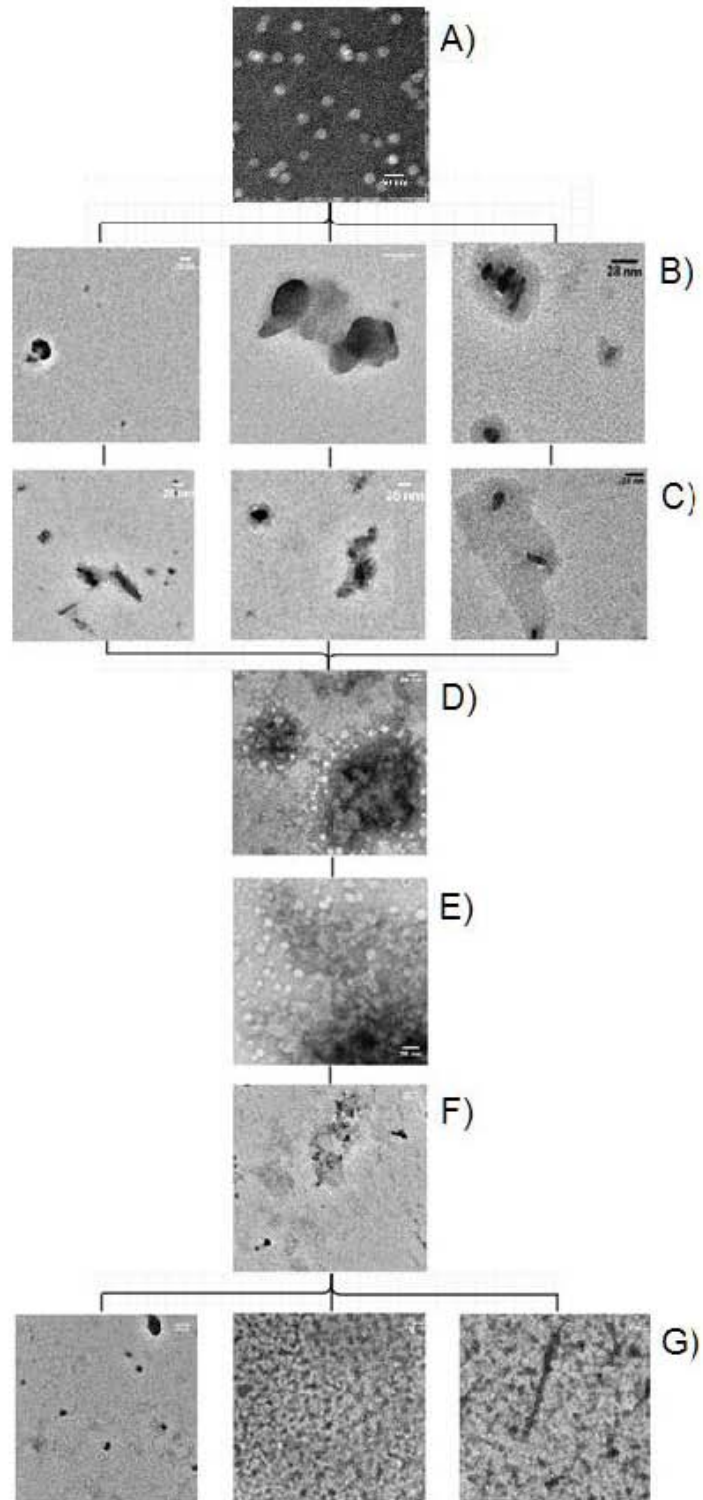


Figura 27. Proceso de desensamble del virus CCMV. (A) Las cápsidas comienzan por expandirse radialmente. (B) el resultado del hinchamiento es que las cápsidas se desfragmentan sin un patrón definido; se separan los capsómeros entre sí de forma aleatoria, y al hacerlo se liberan proteínas del interior. (C) los componentes proteicos se disgregan o difunden (D) Una vez desintegradas los componentes forman agregados con los de otras cápsidas. (E) Posteriormente las proteínas comienzan a difundirse, el de ARN continúa adornados con proteínas.

7.6 Reensamble

El estudio del reensamble del virus CCMV se llevó a cabo en dos fases para hacer más eficiente el proceso de acuerdo con lo reportado en trabajos previos; primero se incrementa la interacción entre proteínas y ARN, y luego se induce el reacomodo proteico al disminuir el pH en la segunda fase [24,25]. Los complejos resultantes del desensamble por 24 horas, fueron dializados en buffer de proteínas, para mantenerlas en forma de dímeros, y posteriormente dializado en buffer de ensamble de ARN, el cual tiene fuerza iónica baja y pH 7.2. En esta primera fase se espera obtener complejos núcleoproteicos amorfos o procápsides, puesto que la interacción entre ARN y proteínas es favorecida bajo estas condiciones. En una segunda diálisis a buffer de virus, el cual tiene pH ácido (4.8), se promueve que la interacción entre proteínas sea mayor que la de proteínas-ARN, por acción de la protonación de los residuos acídicos, de esta forma ya no hay repulsión electrostática entre proteínas, y permite que estas se reacomoden para formar partículas icosaédricas estables e idénticas al virus nativo. Los resultados concuerdan con lo que se esperaba obtener, no obstante se obtuvieron algunas estructuras que no han sido reportadas. Los resultados experimentales muestran la formación de múltipletes (cápsides unidas a otras) que van desde dos cápsides unidas hasta conglomerados grandes de cápsides con números de triangulación que van desde $T=1$ a $T=3$. En la bibliografía no se han reportado estructuras constituidas por un sinnúmero de cápsides unidas entre sí, ni la formación de cápsides con número de triangulación $T=1$ conteniendo como cargo ácidos nucleicos, a excepción de polímeros sintéticos como el PSS [42].

De acuerdo con la electroforesis en geles nativos de agarosa al 1%, todas las proteínas y el ARN están interaccionando, puesto que las tinciones de ambas biomoléculas se encuentran en los mismos sitios o posiciones en el gel en donde se analizaron los reensambles. Además, fue analizada la integridad de la proteína en geles desnaturizantes de proteínas después de haberse reensamblado con la finalidad de mostrar que la proteína se mantiene integra (imagen 31).

7.7 Reensamble a pH neutro

El análisis del reensamble en la primera fase por medio de electroforesis en geles nativos de agarosa en TAE, el cual tiene un pH 7.2, es mostrado en la figura 24. En estos se observa la encapsidación del ARN desde la primera fase, puesto que la banda que corresponde a la migración del virus nativo y las de los re-ensambles coinciden; lo más probable es que bajo estas condiciones se formen procápsides, algunas muy similares a las del virus nativo. El ARN fue teñido en el gel con RedGel™, este se agregó a una concentración de 0.1 µl/ ml y la proteína con InstantBlue™. El reensamble en esta etapa fue analizado por medio de microscopia electrónica de transmisión a partir de muestras obtenidas mediante *snapshot-blotting* en diferentes regiones del gel de reensamble.

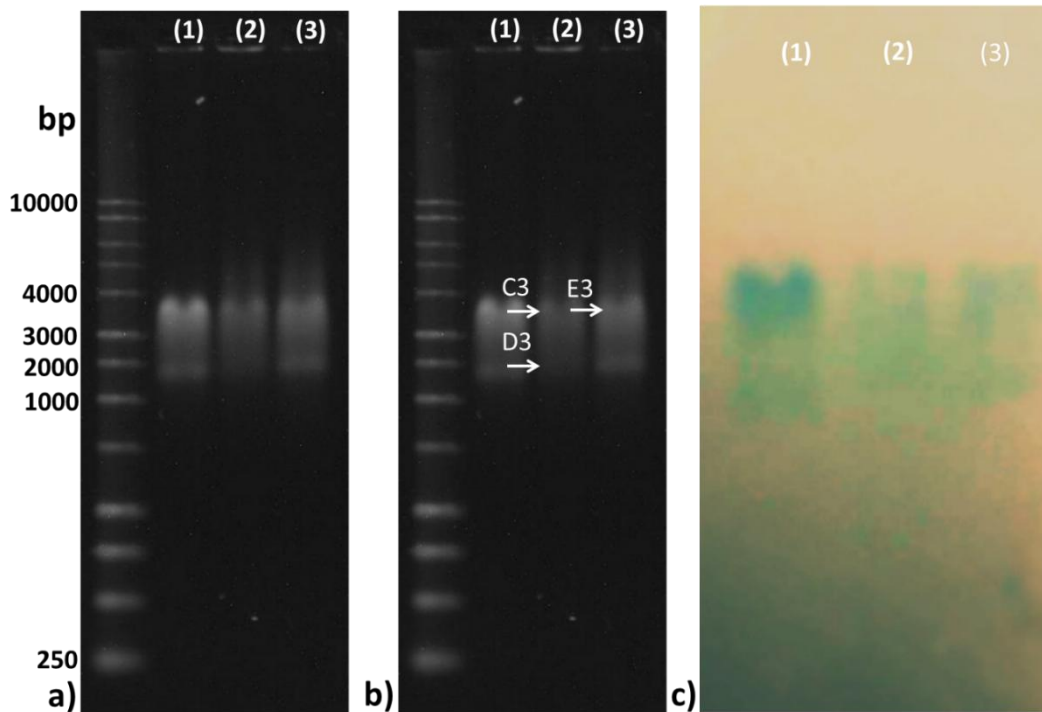


Figura 28. Electroforesis en gel del reensamble del CCMV a pH 7.2. a) Análisis del reensamble del virus CCMV en electroforesis en geles nativos de agarosa al 1% en Buffer TAE. La electroforesis se realizó por 3 ½ horas a 37 volts. En el carril 1 se corrió muestra de CCMV nativo como control, el carril 2 corresponde a la muestra de la primera fase del re-ensamble a pH 7 y en el carril 3 es la muestra del reensamble de la segunda fase que se realizó a pH 4.8 b) el mismo gel que a) con flechas indicando donde se colocarán las rejillas para el *snapshot-blotting* para su posterior análisis mediante TEM. En la figura c) se muestran las proteínas de la cápside teñidas con instantBlue.

Después de analizar por medio de TEM, la muestra del área C3 del gel de ensamble se observaron dos clases de conglomerados: Amorfos de distintos tamaños donde no se ve ninguna cápside y otros agregados de cápsides con diámetros entre 26-30 nm. Debido a la similitud en tamaño y forma de los agregados se puede considerar que estas estructuras anteceden a las cápsides unidas o múltipletes.

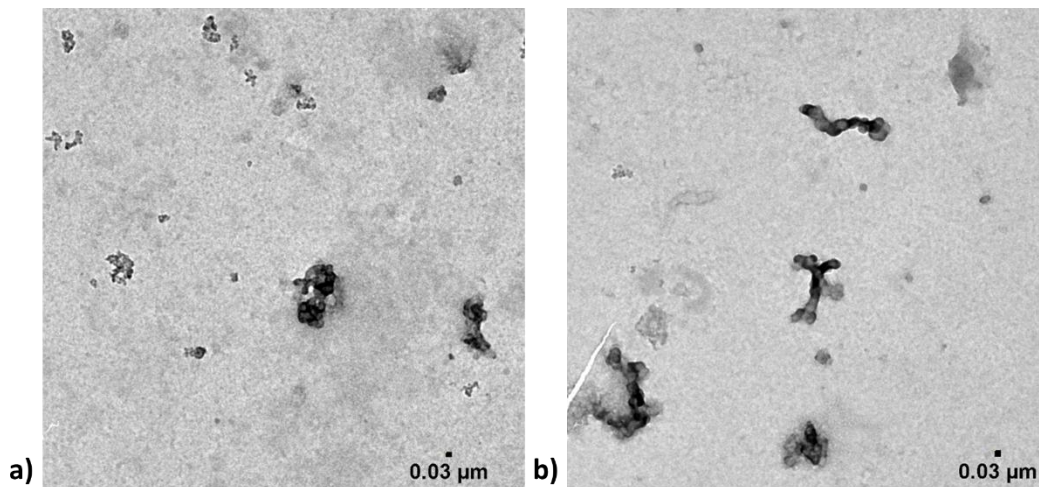


Figura 29. Micrografías del área C3 del gel de ensamble a pH neutro: agregados y múltipletes. La muestra fue teñida con PTA y transferida del gel a la rejilla por snapshot-blotting. a) En la figura se puede observar un conglomerado o procápsides en forma de estructuras cuasi esféricas. b) uniones de varias cápsides o Múltipletes.

En las siguientes imágenes, centramos la atención en estas cápsides unidas o múltipletes. Las cápsides en los múltipletes parecen estar adheridas en forma de ramificaciones, en conjunto los agregados dan la apariencia de un racimo de uvas. Esto podría esperarse con moléculas muy largas de ARN, tal como se ha mostrado en otros estudios [16]. Sin embargo, los ARNs son de 1000 a 3000 nts. Este comportamiento puede ser explicado por la agregación entre los ARNs por los iones de calcio, además de su tendencia a formar estructuras de doble hebra. Durante el proceso de desensamble del virus del CCMV, se adicionó 0.5 M Ca provocando que los ARNs se agreguen y compacten.

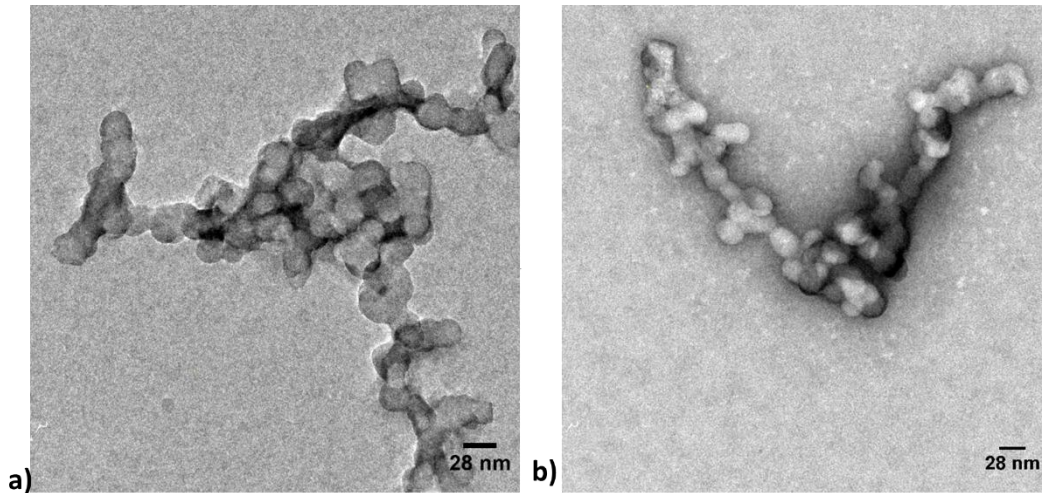


Figura 30. Micrografía del gel del reensamble a pH neutro. La muestra fue transferida del gel a rejillas de TEM por medio de snapshot-blotting y teñida con PTA. a y b corresponden al sitio C3 del gel nativo de electroforesis en buffer TAE. En estas imágenes se muestran cápsidas agregadas en forma de racimo de uvas. Este tipo de estructuras pueden deberse a la compactación del ARN por la presencia de calcio.

Casi todos los complejos se encontraron formando agregados, a excepción de unos cuantos como se muestra en la figura 31, en el que se puede observar un triplete formado por cápsidas de tamaño de 34 nm de diámetro, las cuales podrían corresponder a un número de triangulación $T=4$ (diámetro 28 nm) [16]. No obstante, estas cápsidas están expandidas; esto era de esperarse debido a que la electroforesis se hizo en amortiguador TAE, el cual tiene pH cercano al neutro, y no influye en el cambio estructural de las procápsidas.

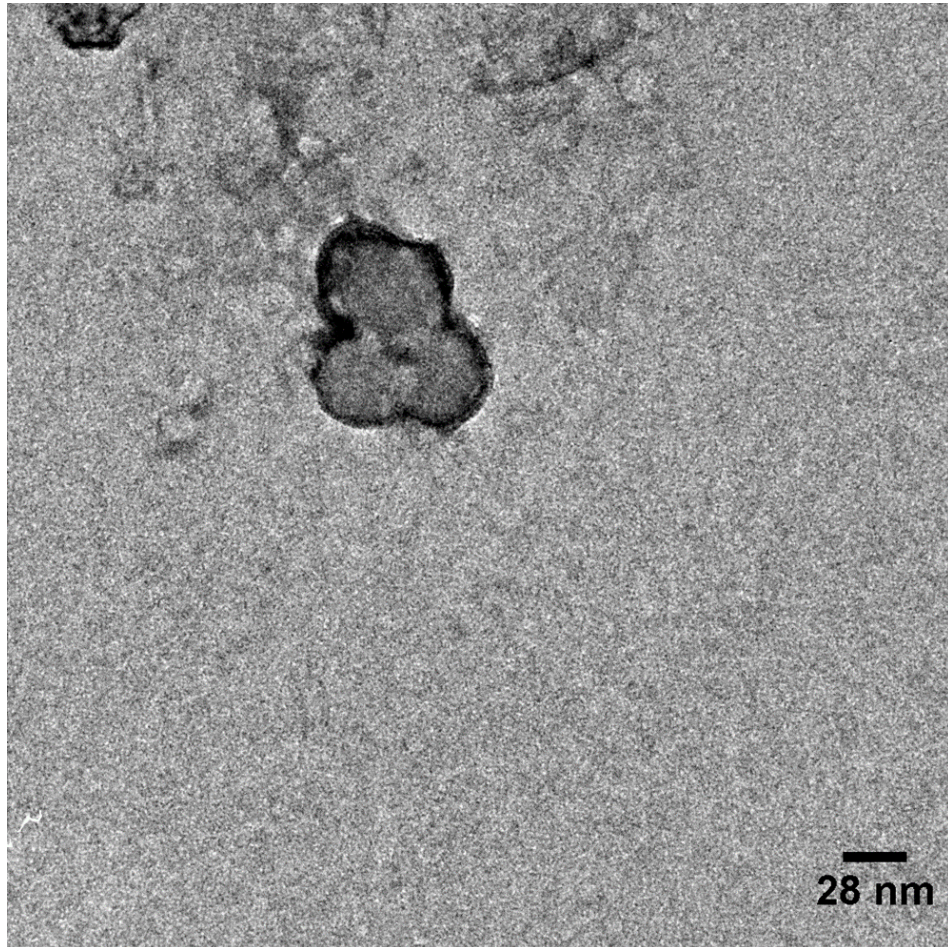


Figura 31. Micrografía de un triplete reensamblado a pH neutro. Muestra obtenida por medio de snapshot-blotting del sitio C3 del gel de electroforesis nativo en TAE y teñida con PTA.

La figura siguiente (fig.32) muestra un número significativo de dúpletos. Esta imagen se tomó de la muestra obtenida por *snapshot-blotting* del sitio D3 del gel de ensamble a pH neutro. Se ha reportado que los dúpletos se presentan únicamente cuando el genoma es de 6400 nt y los tripleteos en el caso de 9000 nts [16] y de forma natural los geminivirus. Estos resultados podrían considerarse confusos o que no están de acuerdo con los estudios realizados previamente [16], ya que el genoma más largo con el que se trabajó en este experimento no supera los 3200 nt, que corresponden a los propios de cápsides nativas. En los resultados se esperaba reensamblar solo cápsides individuales y procápsides debido a que la razón estequiometría para reensamblar el 100% del ARN debe de ser 6:1 en peso de proteína a ARN, es decir, se necesita un exceso de proteína en comparación con la razón estequiométrica del virus nativo [16]. Estos resultados nos sugieren que las moléculas de ARN están agregadas debido al calcio usado en el desensamble del virus. Por ejemplo, en el caso del tripleteo posiblemente estén unidas 3 moléculas de ARN 1 o combinaciones de los diferentes ARNs que sumados den un tamaño aproximado de 9000 nts [7]. Esto es interesante porque sugiere la posibilidad de poder autoensamblar estructuras en forma de racimos de uva cuando se tienen moléculas de ARN de cadena sencilla muy largas, y posiblemente también pueda aplicarse para moléculas de ácidos nucleicos de doble cadena usando una cantidad menor de proteína, es importante hacer énfasis que esto no ha sido reportado previamente y consideramos que es relevante en el caso de que se deseen encapsular moléculas de ácidos nucleicos o polímeros aniónicos de cadenas muy largas.

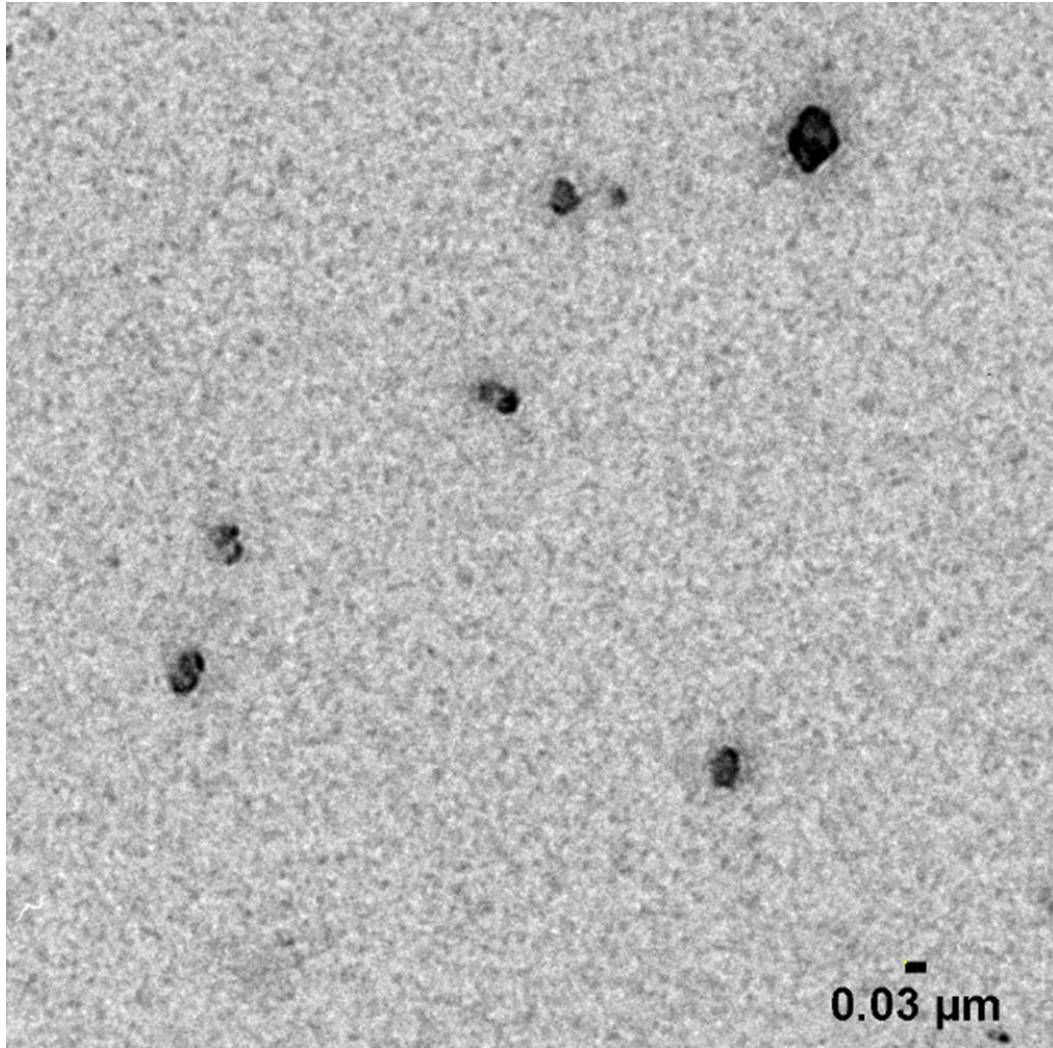


Figura 32. Micrografía del reensamble a pH neutro: dupletes. Muestra obtenida del gel de electroforesis en TAE y teñida con PTA. procápsides unidas o dúpletos.

En algunas áreas de la muestra depositada de forma directa sobre rejilla se encontraron complejos en los que se nota la tendencia a formar racimos de cápsides. El principio del proceso de la fase inicial del reensamble podría comenzar con la acumulación desordenada de proteínas alrededor del genoma.

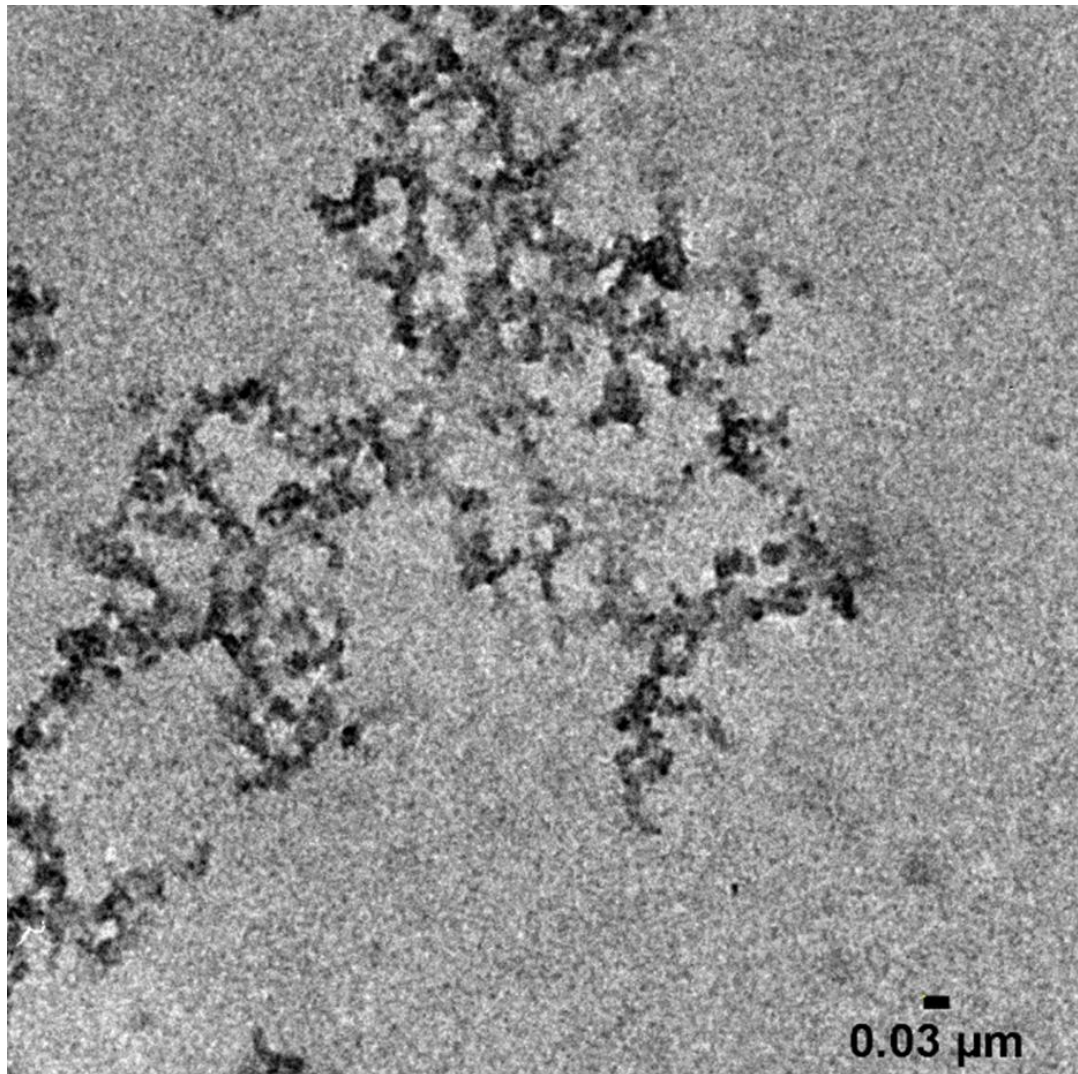


Figura 33. Micrografía del ensamble a pH neutro, muestra depositada directamente sobre rejilla: procápsides fractales. Muestra teñida con PTA al 2%. A) aunque no hay cápsides visibles ya se observa formación de racimos por proteínas y ARN en forma de estructura de fractal.

Los múltipletes también se observan en las muestras depositadas directo sobre rejilla. No obstante, de esta manera se ven un tanto diferentes a los de los geles; Es difícil decir que se trata de múltipletes ya que están rodeados por nubes proteicas que impiden ver claramente la estructura. Esto comprueba los beneficios de la técnica *snapshot-blotting*, la cual “limpia” las especies núcleoproteicas otorgando una visión más clara de las estructuras en cuestión.

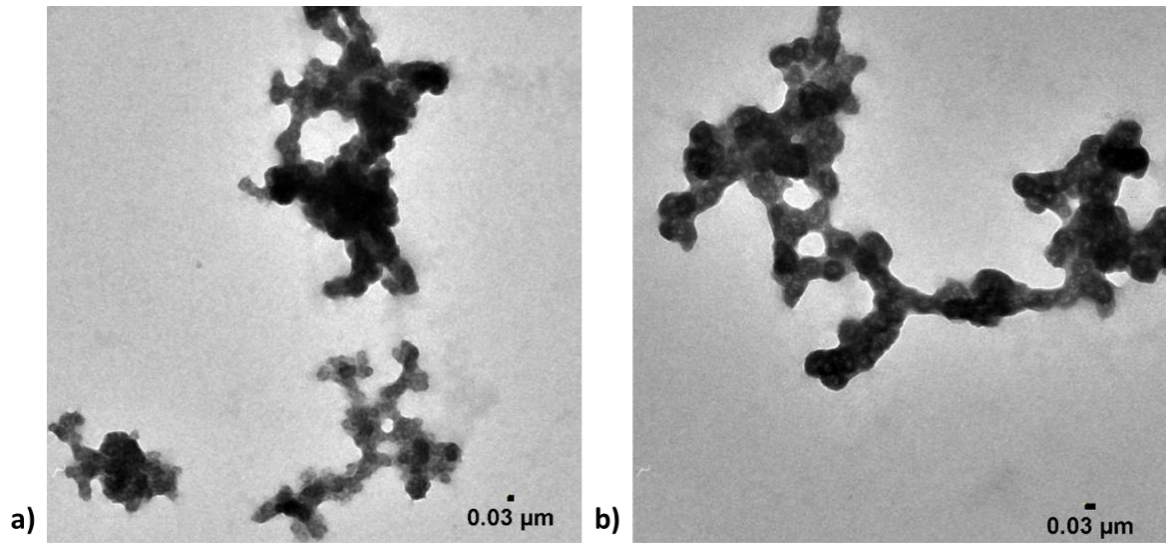


Figura 34. Micrografías del reensamble a pH neutro, muestras depositadas directo sobre rejilla: Multiplaxos. Muestras teñidas con PTA al 2%. A) múltipletes T=3 envueltas en una película de carácter proteico. B) cápsidas unidas entre sí formando racimos. Las estructuras observadas son similares a las muestras reensambladas en la primera fase, y obtenidas por snapshot-blotting después de la electroforesis en geles nativos de agarosa en TAE a pH 7.2, las especies tienen muchas proteínas ancladas que impiden ver claramente la morfología de las cápsidas.

7.8 Reensamble a pH ácido

Después de acidificar los productos de la primera fase del reensamble, la muestra fue analizada en geles nativos de agarosa usando como amortiguador de electroforesis el buffer de virus (pH 4.8) con el fin de mantener estables los productos del ensamble en la segunda fase. Los geles dan evidencia de que las cápsides se han reensamblado, tal como se esperaba. En el carril de la primera fase del reensamble la mayor parte del ARN forma complejos con la proteína o procápsides unidas como las mostradas anteriormente, en forma de racimos de uvas, y se mantiene en los pozos del gel debido al tamaño; en la muestra de la segunda fase se tienen partículas que emigran de manera similar al virus nativo pero aún se tienen estructuras muy grandes debido a los complejos o agregados entre las moléculas de ARNs. Esto nos sugiere que la acidificación es necesaria para la formación adecuada de partículas virales estables e idénticas al virus nativo, y va de acuerdo con estudios previos [26, 29, 24, 25]. Como se había planteado, con la proteína de la cápside del CCMV se pueden encápsidar moléculas muy grandes de ARN con poca cantidad de proteína; siempre que el ARN este compactado o agregado previamente con calcio u otro catión polivalente, y esto puede ser una estrategia que puede ser usada por algunos virus.

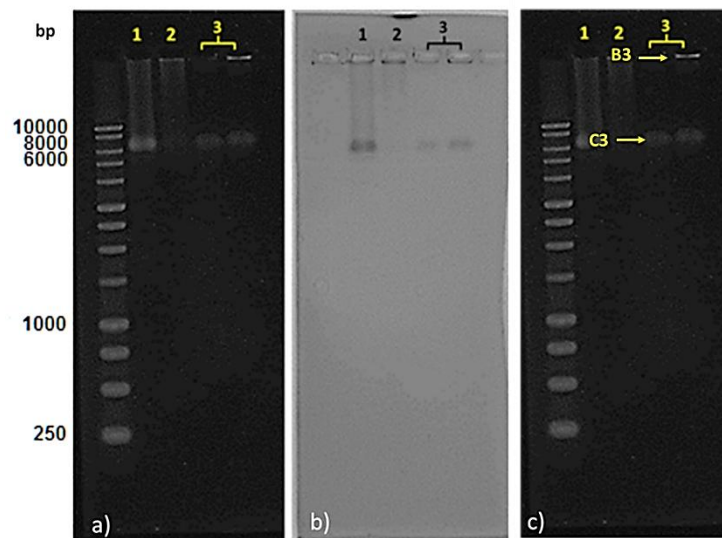


Figura 35. Electroforesis de las muestras reensambladas y acidificadas en geles nativos de agarosa al 1% usando como buffer de electroforesis el buffer de virus (pH 4.8). En el carril 1 se muestra el virus CCMV nativo como control, el carril 2 corresponde al reensamble en pH neutro, primera fase

del ensamble y en el carril 3 la muestras del reensamble adicionalmente acidificadas a pH 4.8. a) Genoma teñido con RedGel™. b) tinción de proteínas con InstantBlue™. c) B3 y C3 son los sitios donde se insertaron rejillas para hacer snapshot-blotting y posteriormente proceder a observarlas en el microscopio electrónico de transmisión.

Las micrografías revelan que cerca de los pozos, en el área B3 del gel nativo de agarosa de ensamble en buffer ácido, hay grandes cúmulos proteicos conformados por partículas que tienen diámetros entre 10-15 nm. Por la forma esférica de las partículas y la forma en la que se agregaron, la cual es similar a la de los múltipletes, asumimos que se trata de procápsides de múltipletes.

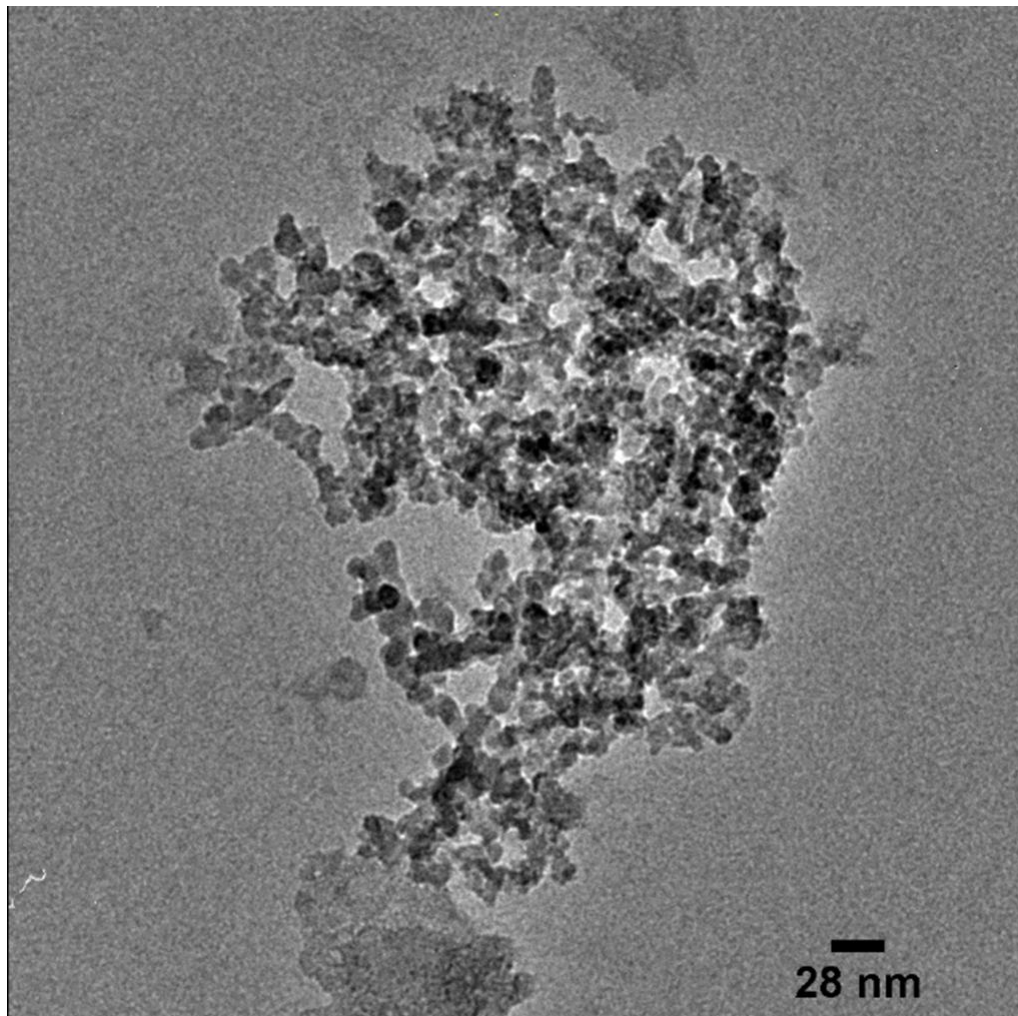


Figura 36. Micrografía del ensamble a pH ácido, muestra tomada del sitio B3 del gel de ensamble. Se pueden observar procápsides de múltipletes. Muestra teñida con acetato de uranilo al 2%. Enorme conglomerado de partículas proteicas de diámetros 10-15 nm.

También en las muestras del ensamble a pH ácido, en el área C3, se encontraron múltipletes dispuestos en forma de racimo de cápsides.

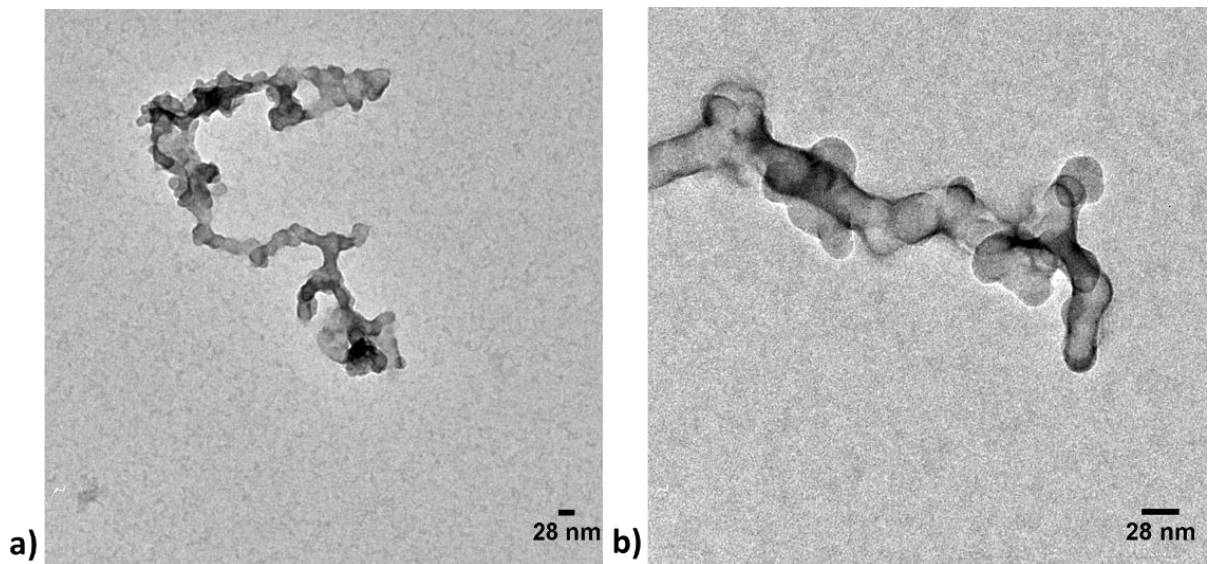


Figura 37. Micrografía del área C3 del gel de ensamble en buffer de virus, se pueden observar múltipletes. Muestra teñida con acetato de uranilo. Múltipletes dispuestos en forma de racimo o ramillete, las cápsides tienen diámetros que oscilan en los 28 nm.

La siguiente figura da una vista global del proceso de ensamble en el área C3 del gel de ensamble ácido. En estas se observan partículas proteicas de las cuales unas están agregadas y otras no. Los conglomerados están en forma de racimos y parecen ser el paso previo a la formación de los múltipletes.

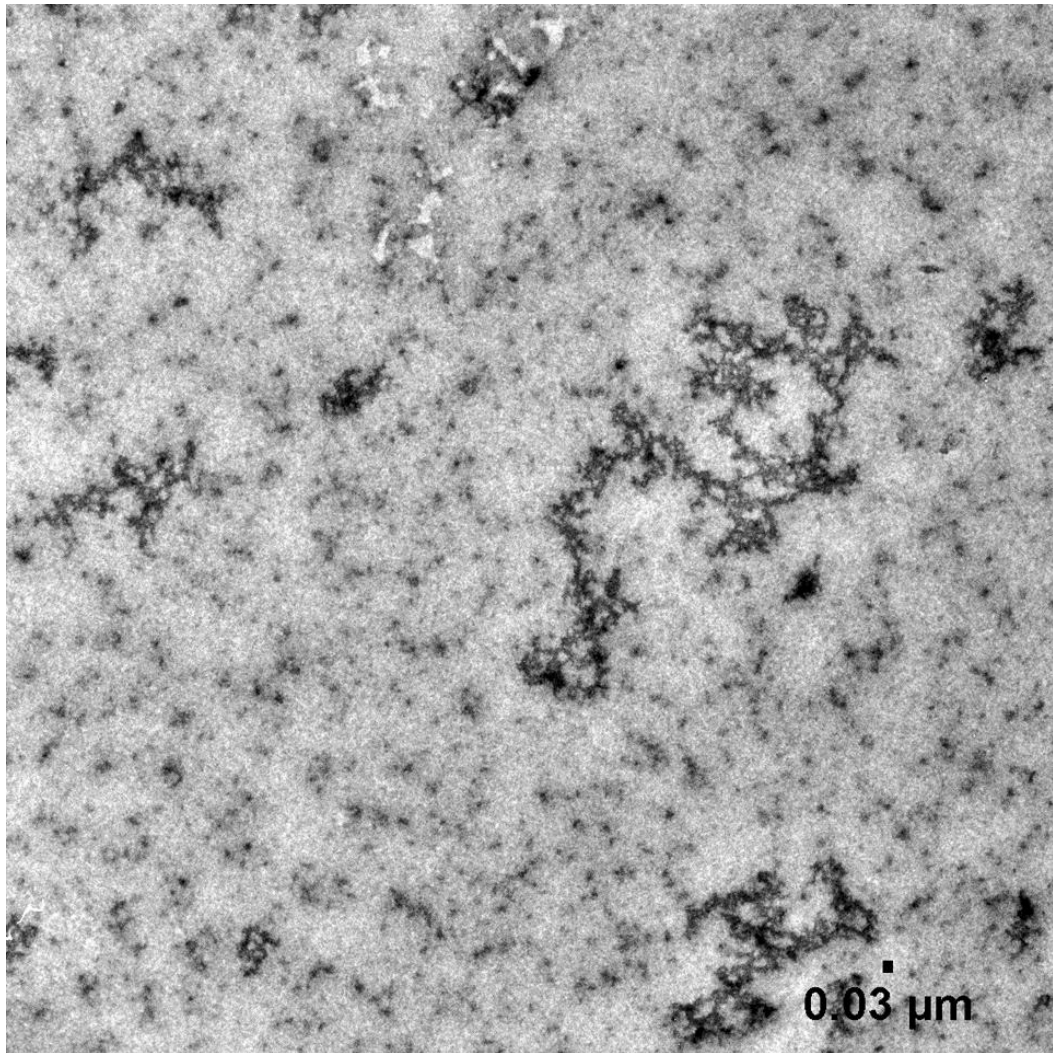


Figura 38. Micrografía del área C3 del gel de reensamble en buffer de virus. Muestra teñida con acetilo de uranilo. Estos son los productos de la segunda fase del proceso de reensamble. Se observan agregados de partículas y otras que están distribuidas uniformemente sobre la superficie, posiblemente sean cápsides individuales.

Las micrografías de las cápsides re-ensambladas en la segunda diálisis en buffer de virus muestran claramente que las cápsides se han logrado reensamblar en cápsides icosaédricas idénticas a las cápsides nativas.

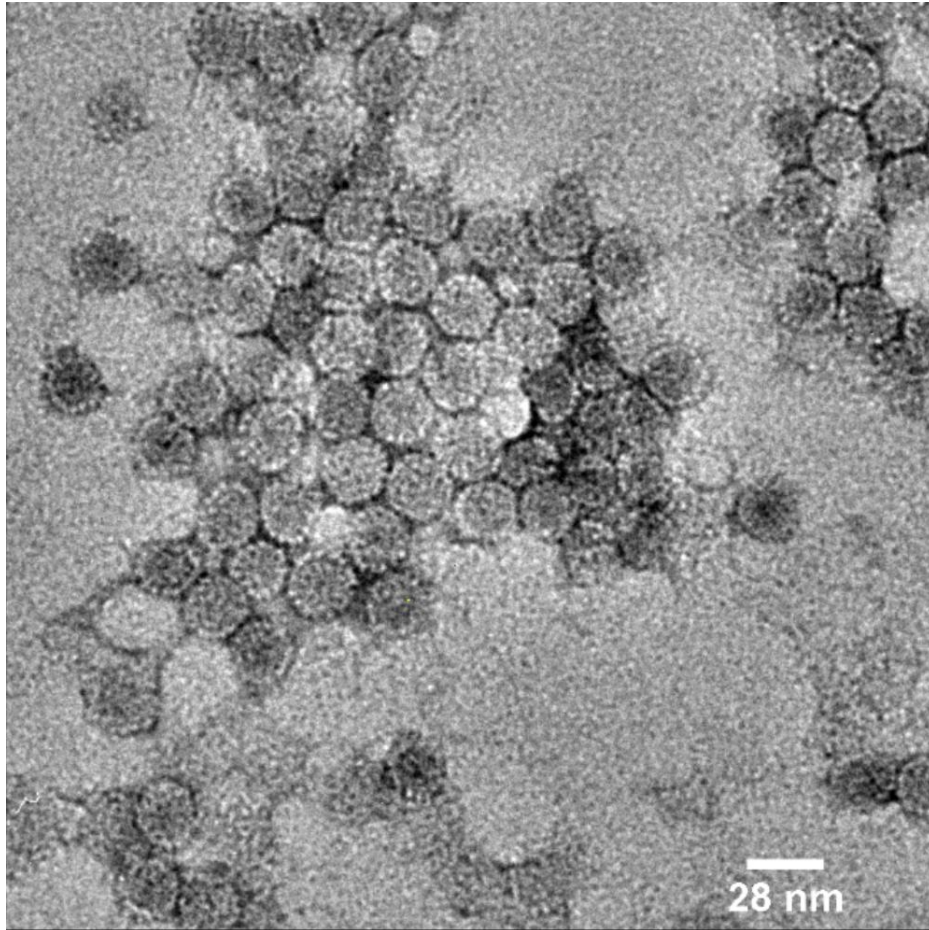


Figura 39. Micrografía del ensamble acidificado en buffer de virus, muestra depositada directo sobre rejilla: Cápsides idénticas a las nativas. Muestra teñida con acetato de uranilo al 2%. Esta imagen muestra las cápsides reensambladas correctamente, en esta se puede apreciar perfectamente la forma icosaédrica y los capsómeros.

En otras áreas de la muestra las cápsides no están agregadas, y no se observan agregados de proteínas. Esto demuestra que la acidificación (pH 4.8) de las procápsides es necesario para el reacomodo proteico, y así poder formar partículas virales individuales y estables.

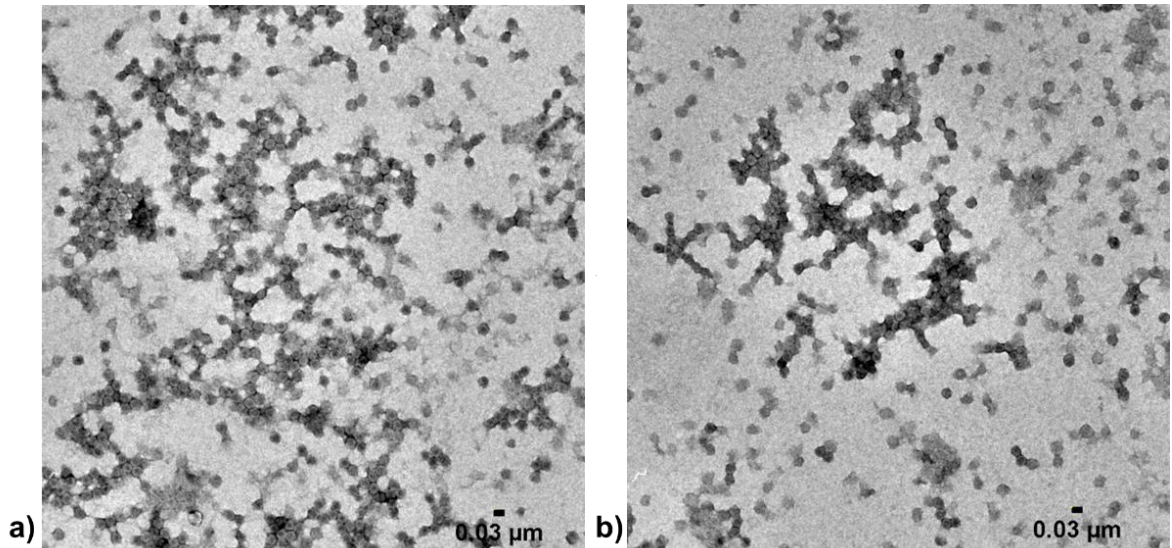


Figura 40. Micrografía del ensamble en buffer de virus, muestra depositada directamente sobre rejilla. Muestras teñida con acetato de uranilo. a) Cápsides reensambladas idénticas a las nativas y agregados de cápsides. b) Vista global de la muestra en la que se observan viriones del CCMV distribuidas uniformemente, y agregados de partículas virales T=3.

En algunas regiones de la rejilla se encontraron agregados de partículas virales que, a diferencia de otras zonas, es difícil determinar si las cápsides son icosaedros individuales o si están unidas entre sí. Probablemente estos agregados son los mismos que se muestran en los geles de electroforesis. En estas imágenes se ve que hay proteínas que no forman parte de las cápsides, pero sí del conglomerado.

7.9 Discusión del reensamble

En este experimento el proceso de reensamble duró 8 horas. Hemos obtenido cuatro especies distintas reensambladas, tres de ellas son cápsides unidas. En específico hemos encontrado cápsides individuales idénticas a las del CCMV nativo, dúpletos, tripletes y múltipletes.

Desde la primera diálisis a buffer de ensamble, es decir bajo condiciones de baja concentración de sal y pH neutro se hallaron múltipletes formados. Este hallazgo es sorprendente pues se piensa que en estas condiciones no se forman cápsides aun cuando se tiene la proporción idónea de proteínas para encapsidar eficientemente el ARN [16]. El ensamble correcto de cápsides virales no es posible a pH neutro, a pesar de que las CPs y el ARN si estén interaccionando, el ordenamiento correcto entre proteínas no se puede llevar a cabo porque no hay los iones hidrógeno suficientes para protonar los residuos negativos de los sitios de unión de los iones en las proteínas, por lo que no disminuye la repulsión electrostática entre las proteínas y no se pueden reacomodar en la estructura típica de la cápside [28]. Sin embargo, es posible que el agregado o compactación de los ARNs favorezcan la formación de cápsides por la disminución en la energía libre de formación de los ARN unidos como un todo.

Las figuras 25-a, 29 y 32 muestran que las proteínas comienzan por agregarse en complejos con el ARN de manera desordenada, formando grandes cúmulos, y después, dichos cúmulos siguen dos vías: Una de ellas es el reacomodo proteico para formar las cápsides y su subsecuente disgregación. La segunda vía también forma cápsides, pero en este caso no se disgregan sino que los cúmulos se transforman en estructuras ramificadas de cápsides unidas entre sí. Este comportamiento indica que se están ensamblando cadenas muy largas de ARN, no obstante la cadena más grande con la que se trabajó es de 3200 nts, que es la longitud máxima que se empaqueta en una cápside T=3 de manera natural. La explicación a este fenómeno se debe a los iones Ca^{+2} se añadieron durante el proceso de desensamble. Estos iones jugaron el rol de mediadores entre las cadenas de ARN, al unirse directa e indirectamente con los átomos de oxígeno de los grupos fosfato y a las bases nitrogenadas (obsérvese figura 41) [43]. De esta manera se formaron largas de ARN ramificadas, y que las proteínas del CCMV decoraron completamente. Dependiendo del tamaño del ARN se ha demostrado que este se puede encapsidar en dúpletos para cadenas de longitud de 6400 nt, tripletes para aquellas de 9000 nt y múltipletes con número de cápsides dependientes a la longitud del ARN [16]. Además, en estudios anteriores se ha fundamentado la necesidad de un exceso proteico para formar las cápsides [16, 7, 9]; en este experimento no se agregaron proteínas extras, y este desbalance entre ARN y proteínas pudo verse compensado por los agregados de moléculas de ARN. Además, el área a cubrir por las proteínas de cápside se reduce cuando se empaquetan cadenas compactadas en comparación con cadenas lineales, de aquí se deduce que la encapsidación del genoma es más eficiente, o lo que se traduce a que se necesitan menos proteínas para encapsidar la misma cantidad de ARN si la cadena está más compactada [13,44].

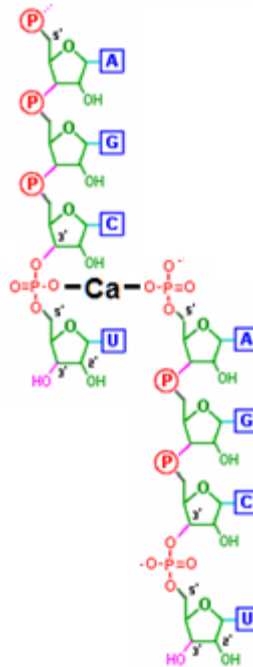


Figura 41. Cadenas de ARN ligadas por iones de calcio. Estos iones estaban presentes en exceso durante el proceso de desensamble del virus. El aparente alargamiento de las cadenas puede ser la causa de la formación de múltipletes.

Los geles de ensamble mostraron que prácticamente todo el ARN fue empacado por las proteínas de la cápside del CCMV en complejos o cápsides unidas e individuales. Aunque no había las suficientes subunidades proteicas, la reacción siguió por ley de acción de masas, y no impidió que el último paso detuviera la cascada de reacciones precedentes que inducen al reensamble; por lo que la reacción de desensamble de las cápsides del CCMV puede ser reversible [45]. A pesar de la falta de exceso proteico, las estructuras múltipletes son la solución al paso irreversible de la reacción del desensamble; para que estas estructuras multicapsídicas se formen es imprescindible la presencia de iones catiónicos divalentes que cooperen a la compactación del ARN, así como a la neutralización de cargas negativas que sustituyan la necesidad de más proteínas para el balance de cargas.

La agregación del ARN propició que menos proteínas sean necesarias para su completa encapsidación. Hemos comprobado experimentalmente que es posible encapsidar el genoma a una razón estequiométrica 180:1 (CP: RNA1). Esto sugiere que, puesto que los virus han evolucionado para tener la máxima eficiencia de reproducción, *in-vivo* deba existir algún mecanismo que se ocupe de mantener esta proporción durante la producción de cápsides individuales nativas. No obstante, hasta ahora no hay registro de alguna investigación sobre el mecanismo exacto de ensamble de las cápsides *in-vivo*.

Como era de esperarse, se presentó preferencia de ensamblaje, es decir, algunas cápsides se terminaron de formar desde la primera diálisis y otras permanecieron como procápsides en la segunda. La preferencia fue mayor por que las diferencias de longitudes del ARN también lo fueron; en vez de tener ARN de 1000 a 3000 nts, las longitudes excedieron a tamaños mayores. La formación de procápsides, aún en concentraciones menores a lo propuesto en estudios anteriores, puede deberse a varias razones que se discutirán más adelante; una de ellas es que algunas proteínas quedan fuertemente unidas a moléculas de ARN aún después de haberse desensamblado, favoreciendo la formación de cápsides. Por lo anterior es que es posible encapsidar el 100% del ARN, y una estrategia tomada por las proteínas es no solo formar cápsides individuales sino múltipletes y estructuras en forma de racimos o ramilletes de cápsides. La hipótesis de que las proteínas aún quedan unidas a las cadenas de ARN después de desensamblar el virus, es soportada por el hecho de que solo es posible purificar aproximadamente el 70% de la proteína del CCMV.

Parece contradictorio que largas cadenas de ARN se empaquen en múltipletes de cápsides $T=3$; En principio genomas largos se empaquetan en cápsides más grandes, siempre y cuando no exista un ángulo de curvatura preferente, ψ . En el caso del CCMV se ha estimado que es de aproximadamente 0.3 radianes. Sin embargo, también factores estequiométricos están involucrados [44]. Si no se obtuvieron cápsides más pequeñas o mayores fue porque el radio de curvatura de

la proteína de la cápside del CCMV lo impidió. Por tanto, las cápsides del CCMV pueden (y en este experimento las obtuvimos) adoptar tamaños T=2 (diámetro de cápside: 24 nm) y T=4 (30 nm de diámetro), pero siempre preferirán formar cápsides T=3 (26 nm de diámetro) [7].

A continuación se muestra un diagrama que describe en síntesis el mecanismo de re-ensamble de las cápsides nativas desensambladas del CCMV (figura 42).

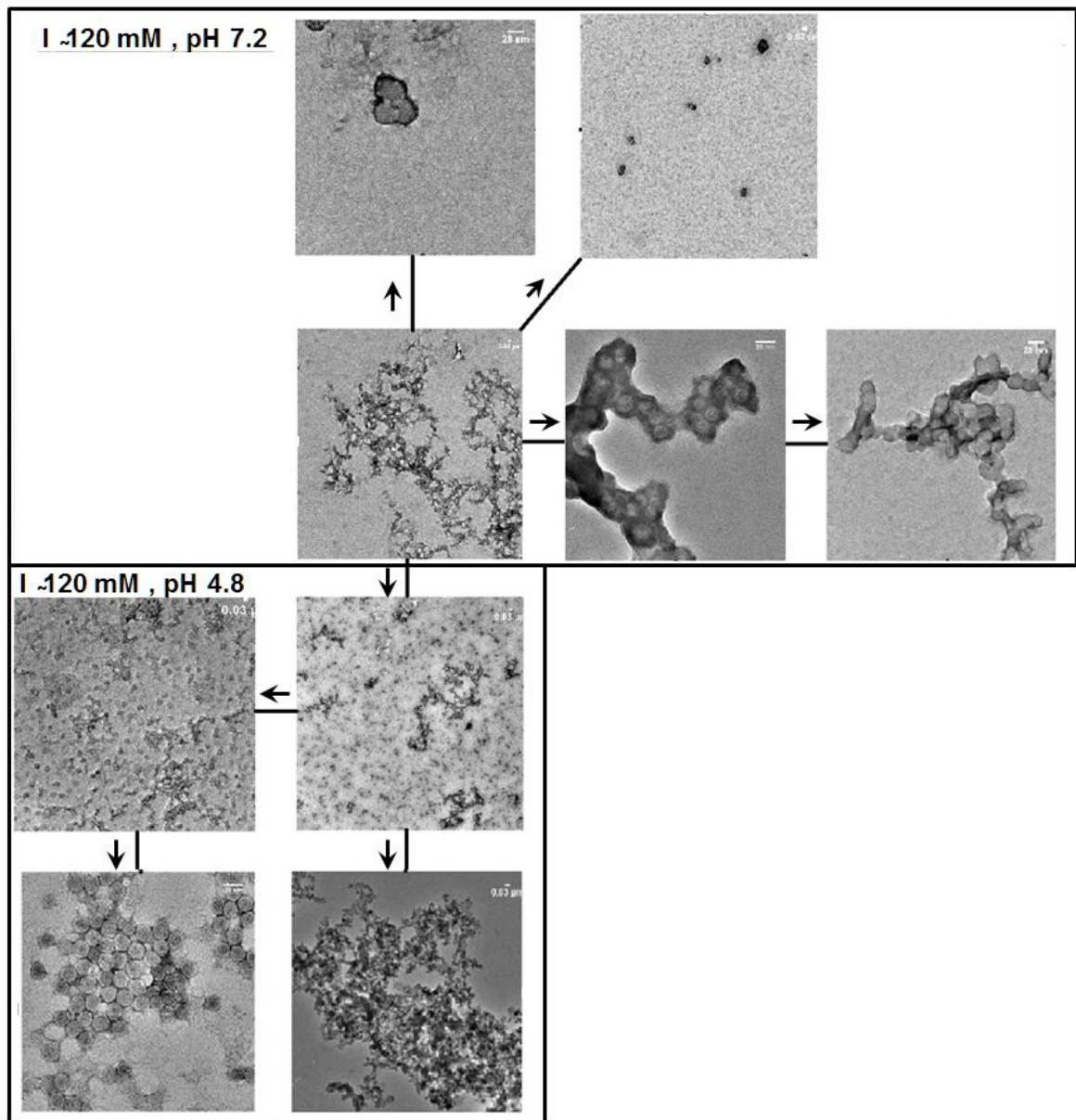


Figura 42. Proceso de re-ensamble de las cápsides del CCMV. El proceso se llevó a cabo disponiendo los componentes virales bajo dos condiciones de fuerza iónica y pH. Se comenzó en condiciones de pH neutro y fuerza iónica baja, después se dializo a buffer de virus con pH 4.8. El mecanismo que se

presenta corresponde al de en masse: el mecanismo comienza con la agregación desordenada de proteínas al genoma; después las proteínas se re-ordenan para ensamblar las cápsides, nótese que la formación de capsómeros es simultánea al ensamble de la cápside; los conglomerados se disgregan durante la formación de las cápsides y múltipletes. Obsérvese que desde condiciones de pH neutro y baja fuerza iónica se forman múltipletes de distintos números de cápsides, tripletes y dúpletes y cápsides idénticas a las nativas. Al bajar la acidez se observa mayor número de cápsides individuales formadas y conglomerados de partículas.

8. Conclusión

La técnica *snapshot-blotting* permite purificar y facilitar el análisis estructural de los complejos núcleoproteicos. Por ejemplo, en el caso de los múltipletes, las micrografías del gel se observaron libres del exceso proteico, mientras que en las muestras depositadas directamente sobre rejilla no se delimitaban tan claramente porque las proteínas rodeaban la superficie de las cápsides. No obstante, el análisis de las imágenes en conjunto nos ha proporcionado una visión general del proceso de desensamble y re-ensamble.

En concreto el proceso de desensamble que se observó a partir de los geles y las micrografías indica que las cápsides comienzan el proceso aumentando su volumen, seguido de una desfragmentación, que en algunas cápsides se presenta por la división en tres casquetes. La fragmentación en tres casquetes se puede deber a que las estructuras secundarias de los ARN del CCMV que tienen 3 centros de nucleación, es decir, hay tres regiones con mayor densidad de ramificaciones en las cadenas del ARN que otorgan mayor estabilidad local a las proteínas ancladas en estos sitios. No obstante otros factores están implicados, como el hecho de que los hexámeros son menos estables que los pentámeros, de esta forma los hexámeros se desprenderán primero que los pentámeros. También se observó que después de desensamblarse los virus, los componentes tienden a agregarse formando grandes estructuras amorfas, sin embargo, pasadas las 24 horas en buffer de desensamble el tamaño de los cúmulos disminuye.

Aunque la mayoría de la población viral se ha desensamblado a las 24 horas, no es suficiente para deshacer completamente el 100% de las cápsides.

La estructura secundaria de los distintos ARNs del CCMV genera que las cápsides tengan estabilidades estructurales distintas. El ARN1 y el híbrido del ARN 3 y 4 presentan estructuras muy similares, tanto en forma como en la energía libre de sus estructuras, por lo que se asume que estas se desensamblan al mismo tiempo. La energía libre de formación del ARN 2 es más alta que los otros genomas y de acuerdo a las partículas halladas a distintos tiempos de desensamble, se concluye que posiblemente las cápsides conteniendo el ARN 2 se desensamblan primero que las demás.

Los productos del desensamble se mantuvieron intactos y el proceso de reensamble de las cápsides del CCMV se hizo en dos fases. La mayoría de los productos fueron múltipletes, estas estructuras no habían sido descritas con anterioridad. El mecanismo de reensamble que se produjo bajo estas condiciones corresponde al de *en masse*, en el que la formación de los capsómeros es simultánea al reordenamiento de las proteínas para conformar las cápsides. Se observaron múltipletes desde la primera fase de ensamble, estos resultados son sorprendentes puesto que se piensa que bajo pH neutro no se forman cápsides. No obstante, en condiciones ácidas se detectó mayor número de cápsides individuales.

Evidentemente no se requiere la proporción necesaria de 6:1 en masa (proteína: ARN) que se había descrito en investigaciones anteriores para la formación de cápsides. En este trabajo se encontró que la encapsidación completa del ARN puede ser lograda compactando el genoma con iones divalentes. Por lo que se puede argumentar que, puesto que los virus evolutivamente se han formado de tal manera que no desperdician material ni energía, en su replicación *in-vivo* deben mantener una proporción cercana a 180 CPs por 3000 nts (ARN), sin embargo más investigaciones *in-vivo* deben llevarse a cabo antes de poder dar una aseveración concreta. Los resultados obtenidos contribuyen al entendimiento de los virus y posibles aplicaciones biotecnológicas.

9. Anexos

9.1 Anexo 1: Algoritmo Zuker y Algoritmo McCaskill

Los programas RNAfold y RNAcifold que forman parte del paquete ViennaRNA están basados en dos algoritmos principales: El algoritmo Zuker, que determina la mínima energía de formación de las estructuras secundarias y el algoritmo McCaskill para calcular la probabilidad de apareamiento de cada nucleótido [49].

El algoritmo Zuker es un grupo de ecuaciones recursivas que determinan por medio de matrices las energías mínimas de formación de las subestructuras en las secuencias de ARN, es decir, se centra en las energías libres de las regiones (bases no apareadas) entre bases de pares. Además, la suma de estas energías de formación da la energía mínima de la estructura secundaria de la secuencia [50].

$$E(P) := \sum_{(i,j) \in P} E_{ij}^P$$

En la siguiente figura se presentan las posibles subestructuras que pueden adquirir las cadenas de ARN.

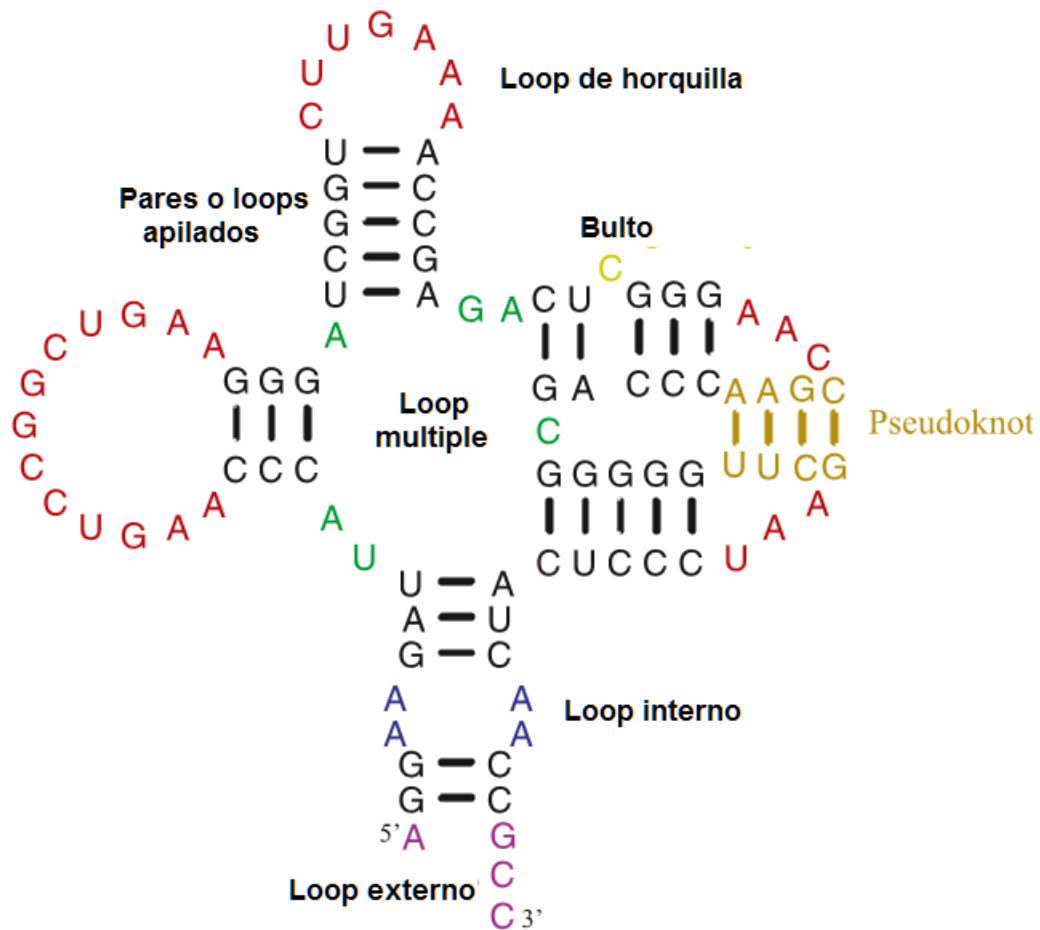


Ilustración 1. Subestructuras en una cadena de ARN secundaria. Se muestran las diferentes maneras en que los nucleótidos pueden acomodarse en una secuencia, cada subestructura otorga una energía de formación específica. Imagen modificada de: Turner D.H, Mathews D.H (2010) [51].

El algoritmo recursivo funciona añadiendo un nucleótido por cada cálculo y observando cual es la mejor estructura en cada paso. El último paso da la energía mínima de la secuencia completa y su correspondiente estructura secundaria [50].

La energía mínima para cada caso se calcula de la siguiente manera: sean i y j dos nucleótidos en la secuencia S con N nucleótidos, tales que $1 < i < j < N$. $W(i,j)$ es la energía mínima de todas las posibles estructuras admisibles que se pueden formar en S . entonces tenemos que:

$$\begin{aligned}
 W(i,j) &= \min \begin{cases} W(i+1,j) & \text{a)} \\ W(i,j-1) & \text{b)} \\ V(i,j) & \text{c)} \\ \min_{i < k < j} \{W(i,k) + W(k+1,j)\}, & \text{d)} \end{cases} \\
 V(i,j) &= \min \begin{cases} eh(i,j) & \text{a)} \\ es(i,j) + V(i+1,j-1) & \text{b)} \\ VBI(i,j) & \text{c)} \\ VM(i,j), & \text{d)} \end{cases} \\
 VBI(i,j) &= \min_{\substack{i < i' < j' < j \\ i' - i + j - j' > 2}} \{ebi(i,j,i',j') + V(i',j')\}, \text{y} \\
 VM(i,j) &= \min_{i < k < j-1} \{W(i+1,k) + W(k+1,j-1)\} + a.
 \end{aligned}$$

La matriz $W(i,j)$ considera las 4 posibilidades de apareamiento a) en el caso de que i este apareada, b) si j esta apareada, c) cuando i y j están apareadas entre ellas y d) cuando i y j están apareadas, pero no entre ellas. La matriz $V(i,j)$ es la tercera posibilidad de $W(i,j)$, es decir cuando i y j están apareadas, de modo que considera 4 casos posibles en los que i y j están unidas. La primera ecuación de $V(i,j)$ calcula la energía mínima de formación de un loop en horquilla, la segunda de un par de bases apiladas, la tercera de un loop interior y la cuarta de un loop múltiple. La matriz VBI considera la formación de un loop interior o un bulto. El cuarto caso considera la manera en que se formaría un loop múltiple [46].

Además, el programa también determina la probabilidad de apareamiento de cada base, este cálculo se hace con el algoritmo de McCaskill el cual obtiene la función de partición para cada nucleótido. La función de partición es la normalización del factor de Boltzmann, es decir, la probabilidad de que un sistema ocupe un estado s .

$$\sum_s P_s = \frac{1}{Z} \sum_s e^{-\beta \epsilon_s} = \frac{1}{Z} Z = 1$$

Donde Z es la función de partición, β se define como el inverso del producto de la temperatura por la constante de Boltzmann [47].

Por medio de la función de partición es posible determinar la probabilidad de que una base se enlace a otra. La suma directa de estas probabilidades da la probabilidad de que determinada base en la secuencia esté enlazada. La precisión del algoritmo es del 76% [47, 48].

McCaskill desarrollo su algoritmo basado en la idea de que la adición de las funciones de energía libre implica la multiplicación de las funciones de partición. El algoritmo se desarrolla como sigue: cada par de base en la estructura contribuye a un término fijo de energía E_{bp} . Dado esto, se pueden generar dos tablas Q y Q_b . $Q_{i,j}$, donde i,j es la posición de cada par de base y $i < j$, provee la función de partición para una subsecuencia de i a j , mientras que $Q_{b,i,j}$ es la función de partición para aquellos valores que forman un par de base únicamente (si no se forma un par de base toma el valor de cero) [47,48].

$$Q_{i,j} = Q_{i,j-1} + \sum_{i \leq k < (j-1)} Q_{i,k-1} \cdot Q_{k,j}^b$$

$$Q_{i,j}^b = \begin{cases} Q_{i+1,j-1} \cdot \exp(-E_{bp}/RT) \\ 0 \end{cases}$$

Una vez obtenidos Q y Q_b es posible calcular las probabilidades de cada par de base (i,j) en la secuencia, i.e $P_{i,j}^{bp}$. Para su cálculo se sigue el algoritmo de McCaskill, que cubre los casos de pares de base externos (i,j) y los pares de bases internos (p,q) , es decir que estén cubiertos por pares de base más externos:

$$P_{i,j}^{bp} = \frac{Q_{1,i-1} \cdot Q_{i,j}^b \cdot Q_{j+1,n}}{Q_{1,n}} + \sum_{p < i, j < q} P_{p,q}^{bp} \cdot \frac{\exp(-E_{bp}/RT) \cdot Q_{p+1,i-1} \cdot Q_{i,j}^b \cdot Q_{j+1,q-1}}{Q_{p,q}^b}$$

[50]

Con el programa RNAcofold es posible construir la estructura secundaria de dos secuencias de ARN. El programa calcula la energía de hibridación y el patrón de apareamiento de bases entre dos secuencias. Explicado de forma breve, esto se logra concatenando las secuencias y tratando al loop conteniendo la concatenación como si fuera un loop exterior, de este modo se procede igual que con el programa RNAfold. La limitante de ambos programas es que no considera que las bases pueden interaccionar con más de un nucleótido a la vez, dicho de otro modo no se consideran los casos de pseudoknots o knots (observe de nuevo la figura 23) [49].

9.2 Anexo 2: secuencias de los genomas del CCMV

ARN 1: 3171 nt [40]

```
1 GUAAUCCACG AGAACGAGGU UCAAUCCCUU GUCGACUCAC GGAGUAUCGA ACUUUUUCUUA
61 AUUUUAUUUA AUGGCAAGUU CUUUAGAUCU UUUGAAAUUG AUUUCUGAGA GAGGCGCUGA
121 CAGCCGAGGC GCUUCGGACA UAGUUGAACA ACAAGCUGUA AAGCAAUUGC UUGAGCAAGU
181 UGACUACUCG AAAAGGUCCA AGAAAAUCAU UAUUAGAAAU AAACUCACGC CCGAUGAAGA
241 GAAUGCUUUC CGGGCGCGCU AUGGAGGAGC UUUUGAUUUG AACUUAACUC AACAAUAUAA
301 UGCUCCCCAU AGUUUGGCUG GAGCUCUGCG AAUAGCGGAG CAUUAUGACU GUCUUUCAAG
361 CUUCCCCCUU CUUGAUCCCA UCAUUGAUUU UGGUGGUUCU UGGUGGCAUC AUUAUUCAG
421 GAAGGACACA CGUAUUCACA GUUGUUGUCC CGUUGUUGGC GUCAGAGAUG CUGCUCGACA
481 UGAAGAACGA CUAUGUAGAA UGCGUAAGUU GUUACAAGAG GUUACAAGAG UGUGACGACA GAGAAGAUUC
541 ACCAGAUUUC UGUUUUGAUA GAGCUGAAUC CUGCAGUGUC CAGGCUGAUU GGGCCAUUUG
601 UAUUCAUGGU GGUUAUGACA UGGGUUACAC AGGUCUAUGU GAAGCUAUGC AUUCCCACGG
661 GGUGCGUAUU UUGCGGGGUA CUAUUUUGUU CGACGGUGCU AUGUUUUUUU ACAACGAAGG
721 CGUUUUACCU UUGUUUGAAGU GCCGUUGGAU GAAGUCUGGG AAAGGUAAAA CUGAGGUCAU
781 UAAAUUUUUAU UUCAUGAAUG AGAGCACACU UUCUUUAUUAU CAUUCUUGGA CCAAUCUUGG
841 UUCAUUUUUG ACUGAGUCUG UGCAUGUGAU AGGAGGUACU ACUUAUCUCC UAGAACGUGA
901 GCUCUUAAAA UGCAAUAUUA UGACCUAUAU AAUCGUUGCC ACAAUUCUGA AGUGUCCUAA
961 GGAAACGUUG CGACAUUGUG UUUUGUUUGA GAAUAUUUCC CAUAUUGUCG CCGUUAACAU
1021 UCCUGAAGAC UGGAAUCUGA CUCAUUGGAA ACCCGUACGU GUGGCAAAAA CCACCGUAAG
1081 AGAGGUUGAA GAGAUUGCUU UUCGAUGUUU UAAGGAGAAU AAAGAGUGGA CGGAGAAUUA
1141 GAAAGCGAUA GCAUCUAUUC UGUCCGCUAA AUCUUCUACA GUCAUUAUCA ACGGUCACAGC
1201 UAUCAUGGCC GGAGAGAGGC UGAACAUGA UGAGUAUCAU CUCGUCGCCU UUGCUCUCAC
1261 UAUGAAUUUG UAUCAGAAAU AUGAAAAUUA UCGGAAUUUU UAUAGUGAGA UGGAAUGGAA
1321 GGGCUGGGUC AACCACUUUA AAACUAGAUU UUGGUGGGGA GGAAGUACGG CUACCUCAAG
1381 CACUGGUAAG AUUCGAGAGU UUCUGGCUGG UAAAUUCCCU UGGCUGAGGU UAGAUUCGUA
1441 CAAAGACAGU UUUUUUUUUC UGUCGAAGAU CUCUGAUGUC AAAGAUUUG AGAACGAUUC
1501 UUUUCCCAU UCCAGACUGA GGAGUUUCUU CAGCAGUGAG GACCUAUGG AGCGCAUUGA
1561 AUUAGAGCUU GAAUCUGCGC AAAAGCGUCG UCGGGAAAAG AAAAAAGAAAG AGGUCGAAAA
1621 AAUCGAUGAG GAGGAAUUUC AAGAUGCCAU CGAUUACCCG AAUGAUGCCG UCAGAGAUGA
1681 CGCUAAACCU GAAAAGGAGC CUAAACCGGA AGUGACCGUU GGAGCUGAAC CAACAGGCC
1741 CGAAGAGGCA UCGAGACACU UUGCCAUCAA GGAAUUCUCU GAUUAUUGUC GUCGCCUUGA
1801 CUGUAACGCU GUGUCAAAUC UUCGUCGUUU AUGGGCCAUU GCUGGCUGCG AUGGGAGGAC
1861 UGCGAGAAAU AAGUCGAUCC UUGAAACUUA UCAUAGGGUU GACGAUAUGA UCAAUUUGCA
1921 CUAUCCUGGG GGUCAAUGGU UGUACCCAA GAAAUACGAC UAUGAAGUGG GUUUCAAUGA
1981 CUCGGGCUUA GGUCCGAAGU UUGAUGAUGA GCUUUUUGUC GUUGACAAAU CAUGUAUAUG
2041 UGCGAAUUUA CAGGUGCUGA GCAAAAUAC AGAUAGCUUA AAAGCACCUU CUUGCAAAAU
2101 CUCGUUGUGU GACGGAGUUG CUGGAUGCGG GAAGACCACA GCAAUUAAAU CCGCGUCCAA
2161 CAUAGCUGAG CACCUAGUGG UAACUGCUAA CAAGAAGUCC GCUGAAGACG UCAGGGAGGC
2221 UCUAUUCCCU CAUAAUCCAU CGUCUGAGAU AGCGUUCUAG GUUAUAAGGA CGGCAGACUC
2281 UGCUUUAAUG CAUGGUUUAC CGCGAUGUAA GCGCUUAUUG GUCGAUGAAG CUGGGCUACU
2341 ACACUAUGGU CAGCUGCUCG CUGUGGCUCG UCUCUGUAAG UGUCAGUCUG UUCUUGCAUU
2401 CGGAGACACG GAGCAAUUUU CUUUUAAAUC GCGAGAUGCA ACUUUCCGCC UGAAAUAUGG
2461 UGAUUUGCAG UUUUGACAGUC GCGAUUAUUGU UACGGAGACA UGGAGAUGUC CGCAAGAUGU
2521 UAUUUCGCA GUUCAGACUC UGAAAAGAGG CGGGAACAGG ACCUCCAAAU AUUUGGGUUG
2581 GAAAUCCCAU UCUAAAAGUAU CCAGGAGCAU UAGUCAUAAA GAAAUAGCAU CACCUUUACA
2641 GGUGAGCCUU UCAAGGGAAA AAUUCUAUUU GACAAUGACU CAGGCUGAUA AAGCCGCCCU
2701 UGUUUCCAGG GCUAAGGAUU UCCCGAGCUU UGAUAAGGCC UGGAUUUGAGA AACAUUAAA
2761 AACCGUUCAU GAGGCUCAAG GUGUGUCAGU AGAUCACGCU GUUUUGGUA GACUUAAAUC
2821 UACCAAGUGU GAUCUAUUUA AAACUGAAGA AUUAUUGCUUG GUGGCUUUGA CUCGACAUAA
2881 GAUUACCUUU GAGUAUCUUU AUGUUUGUAU GCUAUCAGGU GAUUUAAUAU UUAGAAGUAU
```

2941 AUCUUGAUCC UGAGUGUGAU UCACUUACGA AUCAGUUCUA ACGGUUUCUA UAAACCGUAG
3001 UCGUCGUUGC GACGCCGACC GUCUUACAAG ACGUUCGAGC UGCCUUUGGG UUUUACUCCU
3061 UGAACCCUUC AGAAGAAUUC UUCGGAGUUC GUACCAGUAU CUCACAUAGU GAGGUGAUAA
3121 GACUGGUGGG CAGUGCCUAG UCGAAAGACU AGGUGAUCUC UAAGGAGACC A

ARN 2: 2774 nt [39]

1 GUAAUCCACG AGAGCGAGGU UCAAUCCCUU GUCGACUCAC GGUUCUCCAU CAGUUGAAAA
61 CAGUUUUAUAC AUUUUUCUUCU UGAUUAUUUU CUUCUUUACU UCCAUAUAUA UGUCUAAGUU
121 CAUCCAGAA GGUGAGACUU ACCACGUUCC CUCAUUCCAA UGGAUGUUUG AUCAGACUCU
181 CGAAUCUGAC UCACACCAUG AUGAGGGCAU AUUCGUAAAC GAAUCGAUUA AUGAAAUGGG
241 AGUUGAUACU UCUGUUGAAA UAACCGCAGA UGGCACGCUA GCAAGUUUAU UGCAUGCCGU
301 AAAGCCCUA GUGGAGGAUG GUCUUCUGAA UCCCCUUUU GAUCAAGCUA GAUGGGGUCU
361 UUGCUGCAAG AACGUCGUUG ACGUUUAUGA CGGGCUGCUC GGUUAUAGC UCAUACCAAU
421 GGCUGAAGCC GCUAGAAUGU UGAUACCUC UGAUAGUUUC ACCGAAGCAA UGUUUGAUGU
481 GUGUGACGAU UGGCGGCCGG UAGAUACCUC UGAUAGUUUC ACCGAAGCAA UGUUUGAUGU
541 GAUGAAUGAG AUUCCUGGCG AGGAAACAAA AAAUACAUGC GCUUUAAGUC UUGAAGCUGA
601 AUCAAGGCAA GCUCCAGAAA CUUCCGAUUA GGUGCCGUCU GAAUAUACGU UGGCAGAUAG
661 GUACGUUACC ACCAGAGAGG AGUUCGCGUC UGUUGACUCG GAUUAUGACA UAUCCUAAAA
721 CCUGGUGAGC CCUGUGGAGU UCAGGGUGGG AGUGUGUGAA GACACAUACC GUCAUUCGGA
781 AGCUGAUGAU CCUACGAUGC CUCAAUAUCA CGAUAGGAUC AGUUUAAAAU CGCUGGAGGC
841 GGCUGGCCAU CACAUGUUC CGACUCAUGC CUUUUUUGAC GACACUUACU ACCAGCCUUU
901 GGAAGAGCUA GGC GAUUAUA AUGUCGAUUA UAGUAAGUUG UCUGUCCGGC AGAGUGAUGU
961 UGAUUGGUUAU CGUGACCCUG AAAAGUACUA UGAGCCUGAG UUAAGUAUAG GGUCAUCCA
1021 ACGUAGAAUA GGUACGCAA AGACGGUCCU UACC CGUUA AAGAAACGGA ACGCUGACGU
1081 GCCUGAGUUA GCAGAUUCUG UUGAUUAUUA AAGAGUAGCC UGUGAAGUAG CUGAAAAUU
1141 UAAACGGGCU UAUCUUAUUC AUUCCGGUUA AGGGCUGUUA GGGCAAAGUA UGGAUGUCAU
1201 GUCCAGAGGA CUUGAGUACC AUAAGAAAUG GAAAGACCAC AAAGACCUGA CUGGUGUGAC
1261 AGUUUUUGUCU GAGAUUAAUU UGCGAGAGUA UCAGCACAUG AUAAAGUCUG AUUUUAAACC
1321 AGUUGUCUCG GAUACGUUAC ACCUCGAACG AGCUGUUGCU GCAACAAUUA CAUUUCAUGG
1381 UAAAGGAGUU ACUAGCUCGU UCUCACCAUA UUUUACGGCU UGUUUCGAGA AGUUUUCAAA
1441 AGCUUUAAAA UCAAGGUUUG UGGUCCCAU AGGGAAGAU UCCUCCUGG AACUGAAAAA
1501 UGUUCCCUU UCGAAUAAU GGUUUUCUUA GCGGAUUUG AGUAAGUUUG AUAAAUCUCA
1561 GGGUGAGCUU CAUCUUGAGU UCCAAAGAGA GAUAUUUGUU UCAUUGGGUU UCCAGCCCC
1621 UUGACUAAU UGGUGGUGUG AUUCCAUAG GGAUUCUAUG CUAUCGGAUC CUCAUGCUGG
1681 AGUUAACAUG CCAGUUUCCU UUCAGCGUCG UACUGGUGAU GCUUUUACUU AUUUUGGGAA
1741 UACUUUGGUG ACUAUGGCCA UGAUGGCCUA UUGUUGCGAU AUGAACACCG UGGACUGUGC
1801 UAUCUUUUC GGUGAUGAUU CUCUGUUAAU UUGUAAAAGU AAACCACAUC UGGAUGC UAA
1861 UGUUUUCAA UCUCUGUUUA AUAUGGAAU UAAAGUUUUG GACCCAAGUU UGCCAUACGU
1921 UUGUAGUAAG UUUUUUUUAG AAACUGAAU GAAUAACUUG GUGUCUGUGC CUGAUCCUUAU
1981 GAGAGAGUA CAGAGACUGG CUAAGCGAAA GAUCAUCAA UCGCCUGAGU UGUUAAGAGC
2041 CCACUUUGAG UCCUUUUGUG AUAGGAUGAA AUUCCUAAAC AAAUUUGAUG AAAAAUGAU
2101 AAAUUUAUUA UGCAAGUUUG UGGCUCUCA GUAUAAAAA CCUGACGUUG AAAACGAUGU
2161 CAGAGUAGCC AUUGCUGCUU UCGGUACUA CUCAGAAAAU UUCUUGAGAU UUUGCGAAUG
2221 UUAUGCGACU GAAGGGGUC AUAUAUUA GGUAAAACAU CCCAUCACCC AGGAGUGGUU
2281 CGAGGCCUCU AGGGAUCGAG ACGGUGACUG GUUCCAUGAC UGGCGUAAUC CGAAGUUUCC
2341 CACUGCCUUA GAUAAGGUUU GGAGAUUCU UGGAAAAUAC GCGAGAGAUG AUCCUAUGAA
2401 GCACAUAGAA GAGAGAGUA GGAGACAUAG GCUUAAUCGA GCCAUGAAUU CUUCCUUGAA
2461 ACUUGCCUUA GAUCGUAGGA GUCUUGAUAA GGAAUAAAGAA ACCGUUGCGU GGGUGCGUAA
2521 GACCCUUUCU AAAUAAUGUU GGUCACAUUU AAGACUUGUU UAGUCCACAU UAGGACUGGU
2581 UCUAACAGUU UCUUUAAACU GUAAUCGUCG UUGCGACGUU GGUUUGCUUA CAAGCAAUCA
2641 AUCUGCCUUU GAGUUUUACU CCUUGAACUC UUCAGAAGAA UUCUUCGGAA UUCGUACCAG
2701 UAUCUCACAU AGUGAGGUAA UAAGACUGGU GGGCAGCGCC UAGUCGAAAG ACUAGGUGAU
2761 CUCUAAGGAG ACCA

ARN 3: 2173 [40]

1 GUAAUCUUUA CCAAACAACU UUCAAAUUU AUAGUUUAUG UAGUUGCUGU GAUUCCCGUG
61 AGCAGCGUUU AGAUUACUGA CUUGGACACA UCGGUUUUUU AAGCAUCGGA UAGAGGUGAU
121 UAACGCUAAA CCGUACCAUA GUAGGCUGUU ACCUGACUCG AACUCAGGCG GACGUCAGCU
181 GACAUUCACG GAAUAGUUCG AUAUCAUAAU UCCUCGUUCU UUGCUGUUU AUAGUCCCGAU
241 GUCUAACACU ACUUUUAGAC CUUUUACUGG UUCUCCAGG ACCGUGGUCG AGGGAGAACA
301 AGCCGGCGCC CAGGAUGAUA UGUCGUUGUU ACAGUCACUU UUUUCCGACA AAUCCAGGGA
361 GGAGUUUGCU AAGGAGUGUA AGUUGGGUAU GUUACCAAU UUAUCCUCUA AUAACCGGCU
421 UAAUUUAUUA GAUCUAGUCC CCAAGAACAC UGGUAGUAGA GCUCUGAACU UAUUUAAAGUC
481 AGAGUAUGAA AAAGGUCACA UUCUCCAG CCGUGUGCUU AGUAUACCUA GAGUGCUGGU
541 UUUUCUUGUG AGGACGACAA CAGUGACUGA AUCUGGGAGU GUCACCAUUA GAUUGGUUGA
601 CUUGAUAAAG GCUUCGUCGG UUGAGAUUUU AGAACCUUGU GAUGGUACGC AAGAGGCUAC
661 UAUUCCUAUU UCUAGUCUUC CGGCUAUCGU UUGUUUUUCU CCUAGUUUUG ACUGUCCCAU
721 GCAGAUGAUA GGGAAUAGAC ACAGAUUUU CCGUUUGGUA ACUCAACUGG AUGGUGUCAU
781 AUCCUCAGGG UCUACCGUCG UUAUGAGUCA UGCGUAUUGG UCUGCGAACU UUCGUAGUAA
841 ACCUAAUAAU UACAAGCAGU ACGCACCUAU GUUUAAGUAU GUGGAACCCU UUGCAGGUU
901 GAAACGUUUG AGCCGUAAA AAUUGAAAAA UUAUGUUAGG GGCAUAACGA AUCAAUCUGU
961 AAAUCAUGGU UAUCUAUUGG GUAAACCACU ACUGAAGACU GACGACAAG AUCCAGAGAU
1021 GAUUGUGUUA GAGGAGGAAU CACUAACCCC UACCGACAGC AACGGAGUCG GCAAGGAUAA
1081 AAUCGCCGUA ACCGCUAAA CCGUUGCGGG GCUUCCGACG GCCUCGUUGU CUAUCAUCCG
1141 UAGAUAGCUA GAUCUAUUGC UAACAGACUU AGUGUCAUGG GAGCAAAACU CAUAUGAGGU
1201 CAGUGAAACA UGAAUUGGGA AGAAUCAGAA CCCGCCGAAA GGACAGGCUG AGGGCGUACG
1261 AUUCAUGUGU AGCUGGCUGG GUGUGAGACA CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
1321 AAAAAAAAAA AUCUAUGUUU AAUUUGAUAG UAAUUUAUCA UGUCUACAGU CGGAACAGGG
1381 AAGUUAAUCU GUGCACAACG AAGGGCUGCG GCCCGUAAGA ACAAGCGGAA CACUCGUGUG
1441 GUCCAACCUG UUAUUGUAGA ACCCAUCGCU UCAGGCCAAG GCAAGGCUAU UAAAGCAUGG
1501 ACCGGUUAACA GCGUAUCGAA GUGGACC GCC UCUUGUGCGG CUGCCGAAGC UAAAGUAACC
1561 UCGGCUAUAA CUAUCUCUCU CCCUAAUGAG CUAUCGUCCG AAAGGAACAA GCAGCUCAAG
1621 GUAGGUAGAG UUUUAUUUUG GCUUGGGUUG CUUCCCAGUG UUAGUGGCAC AGUGAAAUCC
1681 UGUGUUACAG AGACGCAGAC UACUGCUGCU GCCUCCUUU AGGUGGCAU AGCUGUGGCC
1741 GACAACUCGA AAGAUUUUGU CGCUGCUAUG UACCCCGAGG CGUUUAAGGG UAUAAACCUU
1801 GAACAACUCA CCGCGGAUUU AACGAUCUAC UUGUACAGCA GUGCGGCUCU CACUGAGGGC
1861 GACGUCAUCG UGCAUUUGGA GGUUGAGCAU GUCAGACCUA CGUUUGACGA CUCUUUCACU
1921 CCGUGUUAUU AGUGCCCUCU GAAGAGCGUU ACACUAGUGU GGCCUACUUG AAGGCUAGUU
1981 AUAACCGUUU CUUUAAACGG UAAUCGUUGU UGAAACGUCU UCUUUUUAU AGAGGAUUGA
2041 GCUGCCCUUG GGUUUUACUC CUUGAACCCU UCGGAAGAAC UCUUUGGAGU UCGUACCAGU
2101 ACCUCACUA GUGAGGUAAU AAGACUGGUG GGCAGCGCCU AGUCGAAAGA CUAGGUGAUC
2161 UCUAAGGAGA CCA

ARN 4: 824 nt [41]

1 GUAAUUUAUC AUGUCUACAG UCGGAACAGG GAAGUUAAUCU CGUGCACAAC GAAGGGCUGC
61 GGCCCGUAAG AACAAAGCGGA ACACUCGUGU GGUCCAACCU GUUAUUGUAG AACCCAUCGC
121 UUCAGGCCAA GGCAAGGCUA UUAAGCAUG GACCGGUUAC AGCGUAUCGA AGUGGACCGC
181 CUCUUGUGCG GCUGCCGAA CUAAGUAAC CUCGGCUAUA ACUAUCUCUC UCCCUAAUGA
241 GCUAUCGUCC GAAAGGAACA AGCAGCUCAA GGUAGGUAGA GUUUUAUUU GGCUUGGGUU
301 GCUUCCAGU GUUAGUGGCA CAGUGAAUUC CUGUGUUACA GAGACGCAGA CUACUGCUGC

361 UGCCUCCUUU CAGGUGGCAU UAGCUGUGGC CGACAACUCG AAAGAUGUUG UCGCUGCUAU
421 GUACCCCGAG GCGUUUAAGG GUAUAACCCU UGAACAACUC GCCGCGGAUU UAACGAUCUA
481 CUUGUACAGC AGUGCGGCUC UCACUGAGGG CGACGUCAUC GUGCAUUUGG AGGUUGAGCA
541 UGUCAGACCU ACGUUUGACG ACUCUUUCAC UCCGGUGUAU UAGUGCCCGC UGAAGAGCGU
601 UACACUAGUG UGGCCUACUU GAAGGCUAGU UAUAAACCGUU UCUUUAAAACG GUAUUCGUUG
661 UUGAAACGUC UUCUUUUUAC AAGAGGAUUG AGCUGCCCUU GGGUUUUACU CCUUGAACCC
721 UUCGGAAGAA CUCUUUGGAG UUCGUACCAG UACCUCACAU AGUGAGGUAA UAAGACUGGU
781 GGGCAGCGCC UAGUCGAAAG ACUAGGUGAU CUCUAAGGAG ACCA

10. Bibliografía

- [1] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. [1999]. Molecular Cell Biology. New York, USA: W.H Freeman & Co Ltd.
- [2] Teresa Urribarren . (17/08/2015). Generalidades de virus. 03/05/2016, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Sitio web:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/generalidades.html>
- [3] Cann A. (2012). Principles of Molecular Virology. Sexta edición, Oxford, UK: Elsevier.
- [4] Marsh, M., A. Helenius. 2006. Virus entry: Open sesame. Cell. 124:729–740.
- [5] Kyung H. Choi, Marc C. Morais, et al. (2006). Determinants of Bacteriophage ø29 Head Morphology. Structure 14, p. 1723–1727.
- [6] J.B Bancroft, et al. (1967) Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus. Journal of Virology 32, 354-356.
- [7] Rees F. Garmann, Mauricio Comas-García, et al. (2014), The Assembly Pathway of an Icosahedral Single-Stranded RNA Virus Depends on the Strength of Inter-Subunit Attractions. J. Mol.Biol. 426, p.1050–1060.
- [8] S. Llamas-Espinoza. (2000). Caracterización de las relaciones virus-planta en la formación y acumulación de los RNAs defectivos interferentes del Bromovirus del moteado del haba (BBMV) (Tesis doctoral). Universidad politécnica de Madrid, Madrid, España.
- [9] Zlotnick A. et al. (2000) Mechanism of Capsid Assembly for an Icosahedral Plant Virus. Virology 277, p. 450±456.
- [10] Azizgolshani O., Garmann R.F., Cadena-Nava R.D., et al. (2013). Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. Virology. 441(1), 2-17.
- [11] Mathews R.E.F (1992). Fundamentals of plant virology. 3^{ra} edición. Academic press, inc.
- [12] Fultz, B, Howe, J.M. (2013) Transmission electron microscopy and diffractometry of materials. 3ra edición, springer. P. 61-113.

- [13] Erdemic-Tandogan, G.; Wagner, J. et al, (2016). Effects of RNA branching on the electrostatic stabilization of viruses. *Physical Review E*, 94(2), [022408]. DOI:10.1103/PhysRevE.94.022408.
- [14] Stanley W.M. (1935). Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science*, vol. 81, No. 2113, pages 644-645.
- [15] Equipo pedagógico del programa educativo “por qué biotecnología”,(04/11/2017).Virus en plantas. “El cuaderno de porquébiotecnología” de ArgenBio. Edición 121. p 1-2.
- [16] Cadena-Nava R. Comas-García M. et al. (2012). Self-Assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: Requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *Journal of Virology*. 86. P.1-2.
- [17] Douglas T. Young M. (1998).Host–guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature*.393:152-155.
- [18] Bancroft, J.B (1970). The self-assembly of spherical plant viruses. *Advances in Virus research*. Vol 16. P. 99-131.
- [19] Kaiser, C.R. (2007). Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *Int J.Nanomedicine*. 2(4):715-733.
- [20] Cadena-Nava R.D., Hu Y., Garmann R.F et al. (2011). Exploiting fluorescent polymers to probe the self-assembly of virus-like particles. *J. of Physical Chemistry B*. 115(10), 2386-2391.
- [21] Destito, G. et al. Folic-acid mediated targeting of Cowpea mosaic virus particles to tumor cells. *Cell Press*, 2007.
- [22] Speir JA, Munshi S, et al. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure* 3:63–78.
- [23] Basu G., Allen M., et al (2003), Metal binding to cowpea chlorotic mottle virus using terbium (III) fluorescence. *J Biol Inorg Chem*. sep:8(7): 721-5.
- [24] Bancroft, J.B., Hiebert, E., 1967. Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus. *Virology* 32, 354–356.
- [25] Lavelle L.. Michel JP, et al, (2007), The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *J. Virol methods*. Dec; 146(1-2):311-6.

- [26] Hiebert E, Bancroft JB. (1969). Factors affecting the assembly of some spherical viruses. *Virology* 39:296–311.
- [27] J. B. Bancroft, et al. (1966). A study of the self-assembly process in a small spherical virus formation of organized structures from proteins subunits in vitro. *Journal of virology* 31,354-379.
- [28] R. F. Bruinsma, M. Comas-Garcia, R. F. Garmann, et al. (2016). Equilibrium self-assembly of small RNA viruses. *Phys. Rev. E* 93, 032405. 66:217-239
- [29] O. M. Elrad and M.F Hagan. (2011). Encapsulation of a polymer by an icosahedral virus. *Phys Biol.*; 7(4): 045003. doi:10.1088/1478-3975/7/4/045003.
- [30] Perlmutter J.D and Hagan M.F. (2015). Mechanisms of Virus Assembly. *Annual Review of Physical Chemistry* Vol. 66:217-239. Vol.
- [31] Krol, M. A., Olson, N. Het al. (1999). RNA-controlled polymorphism in the in vivo assembly of 180-subunit and 120-subunit virions from a single capsid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13650±13655.
- [32] García-Pérez, H.M (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 2000;1(2):31-4.
- [33] S.D Jett, D. G Bear.(1994). Snapshot blotting: transfer of nucleic acids and nucleoprotein complexes from electrophoresis gels to grids for electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 6870-6874.
- [34] Carey, J.(1991). Gel retardation. *Methods Enzymol.* 208:103-117.
- [35] Ceglarek J.A and A. Revzin. (1989). Studies of DNA-protein interaction by gel electrophoresis. *Electrophoresis* 10:360-365.
- [36]] Adolph K W and Butler P J (1974). Studies on the assembly of a spherical plant virus. I. States of aggregation of the isolated protein. *J. Mol. Biol.* 88. 327-41.
- [37] Sigel RK, Pyle AM, (2007). Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry. *Chem Rev.* 2007;107:97–113.
- [38] Comas-Garcia M., Cadena-Nava R.D. et al. (2012). In vitro quantification of the relative packaging efficiencies of single-stranded RNA molecules by viral capsid protein. *J. Virol.* Vol. 86 no. 22 12271-12282.
- [39] Allison, R.F., Janda, M. and Ahlquist, P. (1989). Sequence of cowpea chlorotic mottle virus RNAs 2 and 3 and evidence of a recombination event during bromovirus evolution. *Virology* 172 (1), p. 321-330.

- [40] Dzionot, A.M. and Bujarski, J.J. (1991). The nucleotide sequence and genome organization of the RNA-1 segment in two bromoviruses: broad bean mottle virus and cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* 185 (2), p. 553-562.
- [41] Dasgupta, R. and Kaesberg, P. (1982). Complete nucleotide sequences of the coat protein messenger RNAs of brome mosaic virus and cowpea chlorotic mottle virus. *Nucleic Acids Res.* 10 (2), 703-713.
- [42] Sikkema, F. D., M. Comellas-Aragones, et al. (2007). Monodisperse polymer-virus hybrid nanoparticles. *Org. Biomol. Chem.* 5:54–57.
- [43] R. Ahmad, H. Arakawa, and H. A. Tajmir-Riahi. (2003). A Comparative Study of DNA Complexation with Mg(II) and Ca(II) in Aqueous Solution: Major and Minor Grooves Bindings. *Biophys J. Apr*; 84(4): 2460–2466.
- [44] Roya Zandi and Paul van der Schoot, (2008). Size Regulation of ss-RNA Viruses. *Biophys J. Jan 7*; 96(1): 9–20.
- [45] Zlotnick A. (2007) Distinguishing reversible from irreversible virus capsid assembly. *J. Mol. Biol.*; 366:14–18.
- [46] Michael Zuker and Patrick Stiegler. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic acid research*. Vol. 9, pages(s):133-149.
- [47] Douglas H. Turner David H. Mathews. (2010). NNDB: the nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. *Nucleic Acids Research*, Vol. 38 page(s): D280–D28
- [48] Bernhart SH, Tafer H, Mückstein U, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. (2006). Partition function and base pairing probabilities of RNA heterodimers. *Algorithms Mol Biol.*, Mar 16, 1(1).
- [49] Lorenz, R. and Bernhart, S.H et al. I.L. "ViennaRNA Package 2.0", *Algorithms for Molecular Biology*, 6:1 page(s): 26, 2011.
- [50] McCaskill JS. (1990). The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure, *Biopolymers*, vol. 29 (pg. 1105-1119).

