



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Monterrey**

**Relevancia de los *residuos clave* E176, R179, P188 y  
V189 en la formación de la cápside del virus  
icosaédrico *Cowpea chlorotic mottle virus*:  
caracterización biofísica *in-vitro***

Tesis que presenta

**Alejandra Gabriela Valdez Lara**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

En la Especialidad de Ingeniería y Física Biomédica

Director de Tesis:

**Dr. Mauricio Carrillo Tripp**

Apodaca, Nuevo León.

Septiembre 2019.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de la Diversidad Biomolecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Monterrey, dirigido por el Dr. Mauricio Carrillo Tripp y evaluado por el comité tutorial conformado por el Dr. Bruno Escalante Acosta y el Dr. Daniel P. Sánchez Herrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, por la beca de maestría otorgada a A. G. V. L. Así mismo, se agradece al CINVESTAV por el apoyo económico para la presentación de resultados derivados de este estudio en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, México 2018. Este trabajo se realizó gracias al donativo 32376 aprobado por CONACyT en la Convocatoria de Investigación Científica Básica y a los recursos fiscales asignados por CINVESTAV Unidad Monterrey a M. C. T. Así mismo, los autores agradecen al Dr. Bruno Escalante Acosta por facilitar el uso del equipo bajo su resguardo StepOne Real-Time PCR System, el cual fue pieza fundamental para la obtención de los hallazgos aquí reportados.

## **DEDICATORIAS**

Primeramente, quiero dedicar este trabajo a **Dios**, por darme la esperanza y fuerza para continuar con mis sueños, por creer en mi a pesar de mis tropiezos, por siempre demostrarme que no hay imposibles y que sus planes son mejores. Estoy profundamente agradecida.

A mis padres, Alejandra y Aarón. Por ser mis motores de vida, por la confianza y su amor hacia todo lo que hago. Por siempre desear y anhelar lo mejor para mi, por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante esta etapa.

A mi tutor de tesis, Dr. Mauricio Carrillo. Quien con su experiencia y conocimiento me oriento en la realización de este proyecto.

A mi familia, por su apoyo y amor incondicional. A mi tía Flor y mi abuela Isabel, por apoyarme en cada decisión y proyecto. A mis hermanos Daniela, Alexis y Axel. Mis queridos tíos, tías, primas y mis sobrinas, a quienes les recuerdo que con perseverancia y trabajo se pueden lograr todo lo que anhelemos.

A mis queridos amigos, compañeros, profesores y colaboradores, Mariana, Claudia, Aldo, Raúl, Enrique, Aimé, Luis, Mario, Carlos, Kevin, Paola, Missael, Fernando, Moisés, Karen, Amelia, Angela, a los doctores Christian, Moisés, Jesús, Bruno, Daniel y las doctoras Roxana y Dania ; de quienes siempre encontré de su apoyo, consejo, tiempo y conocimiento para poder continuar con esta meta.

Al al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Monterrey. Por darme la oportunidad de poder cursar mi maestría en esta gran institución.

# Índice

<b>Índice de figuras</b>	<b>9</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1. Complejos proteínicos: <i>residuos clave</i> . . . . .	15
1.2. Modelo experimental . . . . .	20
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>24</b>
2.1. Identificación de residuos clave en la familia <i>Bromoviridae</i> . . . . .	24
2.2. Estructura de la proteína de cápside (CP) y de un virus icosaédrico	25
2.3. La relevancia del <i>dímero primario</i> . . . . .	28
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>30</b>
4.1. Ojetivos específicos . . . . .	30

<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
5.1. Diseño experimental . . . . .	33
5.2. Plásmidos de expresión . . . . .	35
5.3. Transformación de <i>E. coli</i> . . . . .	37
5.4. Inducción de la expresión de la CP del CCMV recombinante . . . .	39
5.5. Purificación de la CP por cromatografía de afinidad . . . . .	39
5.6. Estimación del peso molecular de la CP por electroforesis . . . . .	41
5.7. Identificación de la CP por Western blot . . . . .	41
5.7.1. Separación y transferencia . . . . .	42
5.7.2. Bloqueo de la membrana . . . . .	43
5.7.3. Incubación con anticuerpo primario . . . . .	43
5.7.4. Incubación con anticuerpo secundario . . . . .	43
5.7.5. Detección . . . . .	44
5.8. Visualización de partículas tipo virus (VLPs) . . . . .	44
5.9. Análisis de oligomerización proteínica . . . . .	45
5.10. Caracterización termodinámica . . . . .	46
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>49</b>
6.1. Subclonación del gen y expresión de la CP recombinante . . . . .	49

6.2. El grado de pureza de la CP es mayor al usar columnas de Cobalto con respecto a las de Níquel . . . . .	51
6.3. Las CPs recombinantes se expresan adecuadamente en el sistema heterólogo . . . . .	51
6.4. Existe formación de dímeros de CPs . . . . .	53
6.5. Existe formación de VLPs . . . . .	54
6.6. Caracterización termodinámica . . . . .	54
6.6.1. TSA es equivalente a DSC . . . . .	54
6.6.2. CP del CCMV variante silvestre . . . . .	57
6.6.3. CP del CCMV mutante E77Q . . . . .	58
6.6.4. CP del CCMV mutante V133N . . . . .	60
6.6.5. CP del CCMV mutante E176Q . . . . .	61
6.6.6. CP del CCMV mutante R179Q . . . . .	63
6.6.7. CP del CCMV mutante P188A . . . . .	63
6.6.8. CP del CCMV mutante V189N . . . . .	65
6.6.9. Análisis comparativo de temperaturas de transición . . . . .	67
<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>75</b>

<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>Apéndices</b>	<b>83</b>
<b>10. Protocolo de extracción de ADN plasmídico</b>	<b>83</b>
10.1. Preparación del cultivo . . . . .	83
10.2. Lisis celular . . . . .	83
10.3. Clarificación del lisado . . . . .	83
10.4. Unión del ADN . . . . .	84
10.5. Lavado en membrana de sílica . . . . .	84
10.6. Secado de la membrana de sílica . . . . .	84
10.7. Elución del ADN . . . . .	84



## Índice de figuras

1.	Proteína de cubierta y cápside . . . . .	16
2.	Relevancia de los <i>residuos clave</i> . . . . .	18
3.	Definición de residuo <i>clave</i> . . . . .	19
4.	Estructura completa del CCMV . . . . .	21
5.	Esquema general de obtención de VLPs <i>in-vitro</i> . . . . .	23
6.	Fotografías por TEM del virus del CCMV . . . . .	24
7.	Esquema de organización de las CPs en la cápside del CCMV . . .	27
8.	Dímero funcional alrededor de un eje de simetría tipo <i>2-fold</i> . . .	29
9.	<i>Residuos clave</i> en la estructura terciaria de la CP del CCMV . . .	32
10.	Diseño experimental. . . . .	34
11.	Construcción final en plásmido pET-19b . . . . .	36
12.	Construcción en el plásmido pCOLD I . . . . .	38
13.	Esquema general del entrecruzamiento en proteínas . . . . .	46
14.	Perfil de VLPs por TSA . . . . .	48
15.	Gen de la CP del CCMV . . . . .	50
16.	Comparación de pureza. . . . .	52
17.	Expresión de variantes de la CP . . . . .	52

18.	Homodímeros de la CP variante silvestre. . . . .	53
19.	Micrografía de SEM de VLPs de la CP variante silvestre. . . . .	55
20.	TSA es equivalente a DSC . . . . .	56
21.	TSA característico de la CP del CCMV variante silvestre . . . . .	58
22.	TSA característico de la CP mutante E77Q . . . . .	59
23.	TSA característico de la CP mutante V133N . . . . .	61
24.	TSA característico de la CP mutante E176Q . . . . .	62
25.	TSA característico de la CP mutante R179Q . . . . .	64
26.	TSA característico de la CP mutante P188A . . . . .	65
27.	TSA característico de la CP mutante V189N . . . . .	66
28.	Análisis comparativo de $T_{Mi}$ . . . . .	69

## Índice de tablas

1. Mutaciones puntuales realizadas a la CP del CCMV . . . . . 33
2. Temperaturas de transición ( $T_{Mi}$ ). . . . . 68

## RESUMEN

Los virus son los patógenos más abundantes en el planeta, afectando a todas las formas de vida existentes en él. En general, uno de los componentes estructurales principales de los virus es una cubierta formada por proteínas llamada cápside. Su función es transportar y proteger el genoma viral, además de reconocer las células hospederas adecuadas para la infección. Es razonable pensar que existen interacciones específicas proteína-proteína que dirigen el auto-ensamblaje espontáneo de la cápside. Sin embargo, nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares relacionados a este fenómeno es limitado. Basados en principios de conservación estructural, desde el nivel primario hasta el cuaternario, previamente nuestro grupo propuso una metodología teórica para la identificación de los llamados *residuos clave*, los cuales son residuos localizados en las interfases entre proteínas que se cree contribuyen significativamente a la energía de formación de la cápside.

En este trabajo, hemos caracterizado experimentalmente la contribución termodinámica de los *residuos clave* previamente predichos del *Cowpea Chlorotic Mottle Virus*, un miembro de la familia *Bromoviridae*, en el auto-ensamblado y la estabilidad de la cápside. Nuestra estrategia fue realizar una mutación puntual *in-vitro* en cada uno de dichos residuos de forma independiente. Los perfiles de ensayo térmico biofísico muestran que las mutantes E176Q y V189N inhiben la estructura cuaternaria de la cápside conservando el plegado de la estructura terciaria de la proteína. Por otro lado, mutaciones equivalentes en residuos de la misma interfase no conservados seleccionados al azar no alteran la formación ni estabilidad termodinámica de la cápside comparándolas con la variante silvestre. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis que propone que los *residuos clave*, definidos

con criterios de conservación estructural, son responsables de la formación y estabilidad de la cápside, y arrojan nuevo conocimiento en el mecanismo molecular del proceso de auto-ensamblaje de la cápside.

## ABSTRACT

Viruses are the most abundant pathogens affecting all forms of life. A major structural component of a virus is a protein shell, known as the viral capsid, that encapsulates the genomic material. The capsid has the fundamental functions to protect and transport the viral genome and to recognize the host cell for infection. Specific protein-protein interactions direct the assembly of the capsid. Nevertheless, our understanding of the molecular mechanisms involved in such a process is limited. Based on structural conservation principles, we have previously proposed a methodology to identify the so-called *hot-spots*, a small set of residues in the capsid's inter-subunit interfaces that significantly contribute to the free energy of formation.

In this work, we experimentally characterize the thermodynamic effect on the capsid's assembly and stability by the single mutation of hot-spots in the *Cowpea Chlorotic Mottle Virus*, a member of the *Bromoviridae* family. Biophysical thermal shift assay profiles show that the single hot-spot mutants E176Q and V189N inhibit the quaternary self-assembly of the capsid but still preserve the protein tertiary fold. On the other hand, randomly selected non-conserved interface residues do not alter the capsid's melting point when equivalently mutated. These results support our hypothesis that hot-spots are responsible for the capsid's formation and stability, and shed new light on the molecular mechanism of capsid assembly.

# 1. INTRODUCCIÓN

Por definición, los *virus* son aquellas entidades infecciosas que no son considerados microorganismos. De forma general, estos se conforman por el material genético (ARN o ADN) en el interior de una cubierta llamada cápside. La cápside viral es una macro-estructura formada por proteínas cuya función es transportar y proteger al genoma viral y a su vez es la responsable del reconocimiento de los receptores específicos expuestos en las células hospederas. La cápside se forma a partir de múltiples copias de proteínas de cubierta, o cápside (CPs), que se acomodan en arquitecturas con arreglos simétricos. En términos globales, la cápside puede tener una geometría icosaédrica o helicoidal. Ciertas regiones de las proteínas de la cápside son altamente conservadas [Montiel-García et al. (2016)]. Dichas regiones son específicas y se encuentran localizadas en las interfases que se generan a través de la interacción CP-CP. Estas interacciones son del tipo no-covalente, esto es, electrostáticas y de van der Waals, las cuales generan superficies de contacto, o *interfases*, como se muestra en la Figura 1.

## 1.1. Complejos proteínicos: *residuos clave*

Las proteínas son biopolímeros compuestos de amino ácidos encargados de muchas de las funciones vitales en procesos biológicos. Además, son una de las clases predominantes de biomoléculas representando alrededor del 50 % del peso neto de la célula y alrededor del 20 % de la masa corporal. Las proteínas cumplen todo tipo de funciones; se encuentran formando parte del soporte mecánico, en la respuesta inmune, realizando reacciones catalíticas, en el transporte, en la

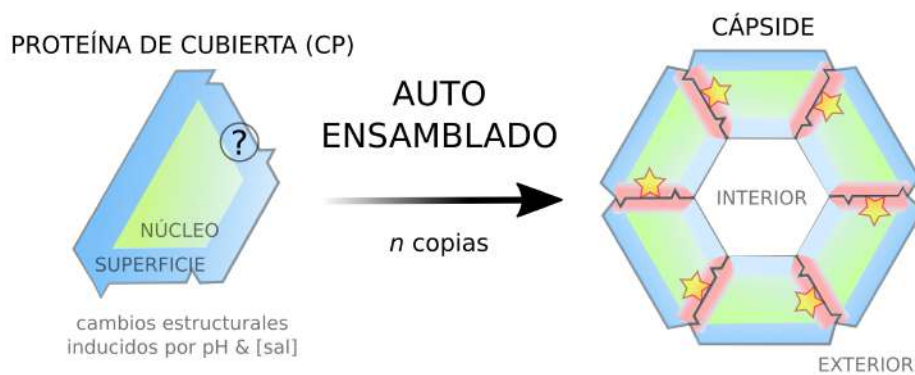


Figura 1: Esquema simplificado de la proteína de cubierta (CP) y la formación de la cápside. En color azul se representa la región de la superficie que está en contacto con el solvente, mientras que en color verde se representa el núcleo hidrofóbico de la proteína. Cuando varias CPs se auto-ensamblan forman regiones de contacto entre CPs vecinas (interfase, en rojo). La existencia y localización de *residuos clave* (estrellas) se ha hipotetizado en trabajos previos.



transmisión de impulsos nerviosos y en el crecimiento y diferenciación celular, entre muchas otras. Es preciso resaltar que en muchos casos las proteínas deben interactuar entre ellas para generar complejos oligoméricos y así cumplir su función [Berg et al. (2002); Murray et al. (2017)]. Así, las regiones llamadas *interfases* son resultado de la generación de oligómeros proteínicos, esto es, son las superficies de contacto que se generan a través de la interacción entre residuos de proteínas vecinas. La cantidad de residuos que componen las interfases llega a ser muy grande; decenas o incluso cientos. En el contexto general de interacciones proteína-proteína, se ha propuesto la existencia de residuos localizados en las interfases que contribuyen significativamente a la formación y función del complejo proteínico en comparación al resto de ellos. Se les ha dado el nombre de *residuos clave*. [S Zerbe et al. (2012)] (Figura 2).

La contribución de los *residuos clave* a la formación del complejo proteínico se puede cuantificar a través de la energía libre de interacción proteína-proteína. Sin embargo, su identificación precisa es altamente difícil de lograr ya que a la fecha no se ha encontrado ningún atributo único que los distinga, como pudiese ser la estructura, la carga, o la hidrofobicidad. Debido a la gran relevancia biológica de los *residuos clave*, se han desarrollado diversos métodos teóricos para predecir su ubicación basados en principios energéticos usando funciones aproximadas de acoplamiento molecular (*molecular docking*) [Grosdidier and Fernández-Recio (2008)] o mutación diferencial por Alanina (*alanine scanning*) [Kortemme et al. (2004); Schymkowitz et al. (2005)].

En el caso particular de las cápsides virales con geometría icosaédrica, Carrillo Tripp y colaboradores propusieron una serie de criterios alternativos para identi-

**Residuos clave:** contribuyen significativamente a la función  
**Problema:** saber cuáles son y dónde están



**Predicción:** son conservados y están en la interfase  
**Validación:** su mutación debe frustrar la función

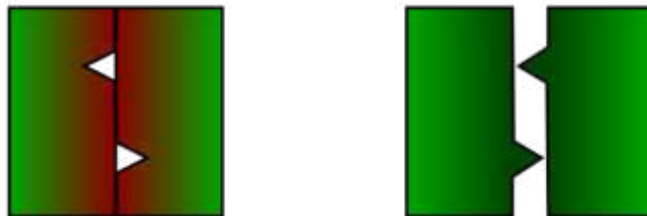


Figura 2: Existen *residuos clave* en las interfases proteína-proteína.

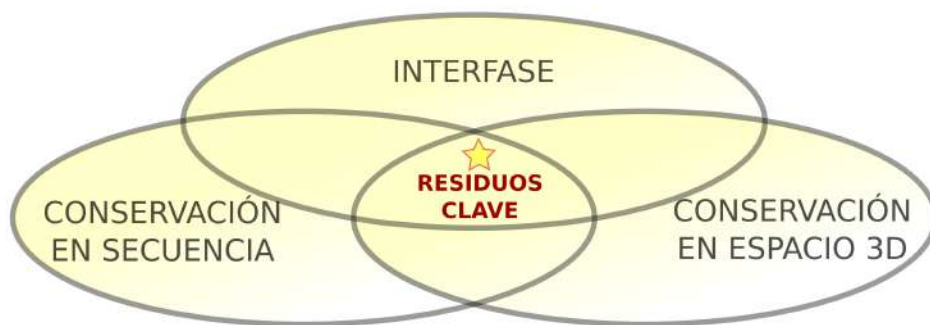


Figura 3: Definición de *residuo clave* basada en el criterio de conservación en todos los niveles estructurales proteínicos de la cápside.

ficar de forma rápida dichos residuos de mayor importancia biológica [Carrillo-Tripp et al. (2008)]. Tal definición no se basa en criterios de energía, como se había hecho hasta entonces, sino en la conservación estructural desde el nivel primario hasta la estructura cuaternaria. Así, se propuso que los denominados *residuos clave* conforman aquel conjunto de residuos de interfase conservados en secuencia y espacio (Figura 3). El proceso de identificación reportado por los autores consiste de tres fases: i) los residuos de interfase se identifican al analizar los contactos existentes en la cápside entre subunidades vecinas, ii) los residuos conservados en nivel primario se identifican al realizar un alineamiento múltiple de secuencias de todos los miembros de un género o familia de virus determinado, y iii) los residuos conservados en espacio se identifican a través del uso de diagramas llamados *CapsidMaps* los cuales simplifican la complejidad de los datos pasando de tres a dos dimensiones [Carrillo-Tripp et al. (2015)]. Esta información se genera para todos los virus para los cuales ya se conoce su estructura cuaternaria, disponible en el portal científico de virología estructural VIPERdb [Carrillo-Tripp et al. (2009)].

## 1.2. Modelo experimental

El virus del *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) es el arquetipo de los virus icosaédricos dado su amplio estudio y caracterización tanto teórica como experimental. El CCMV es un fitopatógeno, el cual contiene un genoma de ARN<sup>+</sup> en una sola cadena envuelto en una cápside en forma de icosaedro. La cápside de este virus se ensambla a partir de 180 copias idénticas de una CP característica con un peso molecular de 20.3 kDa cada una, generando una partícula icosaédrica con un diámetro de aproximadamente 30 nm (Fig. 4) [Speir et al. (1995); Liepold et al. (2005); Udit (2018)]. Se ha reportado que en solución a un valor de pH=7.5 las CPs se encuentran en un estado de agregación de dímeros, mientras que a valores de pH<5 los dímeros se auto-ensamblan para formar la cápside completa [Lavelle et al. (2009); Díaz-Valle et al. (2015); Timmermans et al. (2018)].

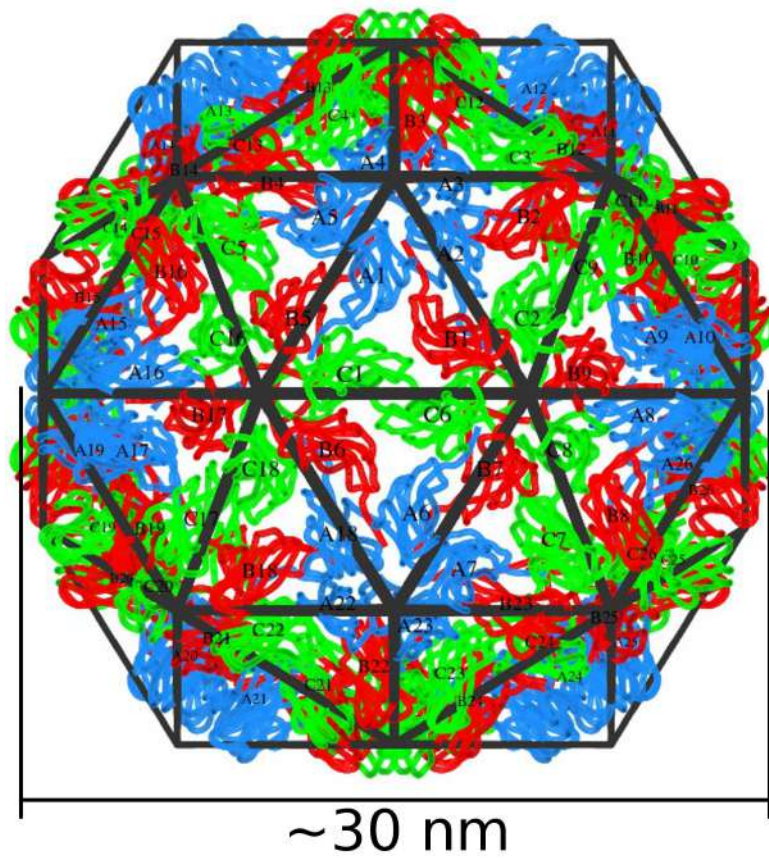


Figura 4: Cápside del *Cowpea chlorotic mottle virus*, formada por 180 copias de la CP (posiciones equivalentes mostradas en azul, rojo y verde). Las características geométricas de simetría de este tipo de cápsides icosaédricas se describen más adelante en la Fig. 7.

Un aspecto interesante de este tipo de virus es que la CP tiene la capacidad de formar partículas tipo virus (VLPs, *virus-like particles*). La única diferencia con las partículas virales, o *viriones*, es que las VLPs no contienen el material genético en su interior. Previamente nuestro grupo de investigación reportó la optimización de una estrategia para la expresión heteróloga de la CP del CCMV basada en *E. coli* [Díaz-Valle et al. (2015)]. Esta metodología describe la clonación del gen de la CP en un vector de expresión y los pasos subsiguientes hasta la purificación de la proteína recombinante en alta cantidad y pureza. Un esquema general de este procedimiento se presenta en la Figura 5.

Como se mencionó con anterioridad, la formación de VLPs requiere del autoensamblado de CPs en una solución con un valor de  $\text{pH} < 5$ . Entonces, siguiendo la metodología propuesta por Díaz-Valle *et al.* es factible la generación de cápsides vacías formadas por proteínas recombinantes de la CP del CCMV, como puede observarse en la Figura 6.

Como se mencionó con anterioridad, el CCMV es el arquetipo de los virus icosaédricos desnudos, no solo por su amplio estudio sino por su potencial uso. Por ejemplo, se ha demostrado previamente cómo las nanopartículas basadas en proteínas de cápside del CCMV fueron administradas vía intravenosa en ratones nativos o inmunizados mostrando una amplia distribución *in-vivo*, ausencia de toxicidad, y una rápida eliminación. Dichos resultados muestran que este tipo de nanoplataformas son seguras y biocompatibles para su futuro uso en aplicaciones biomédicas [Kaiser et al. (2007)].

Más aún, las cápsides se han usado para la encapsulación de diversas biomoléculas, por ejemplo, la proteína fluorescente (GFP), fármacos hidrofóbicos,

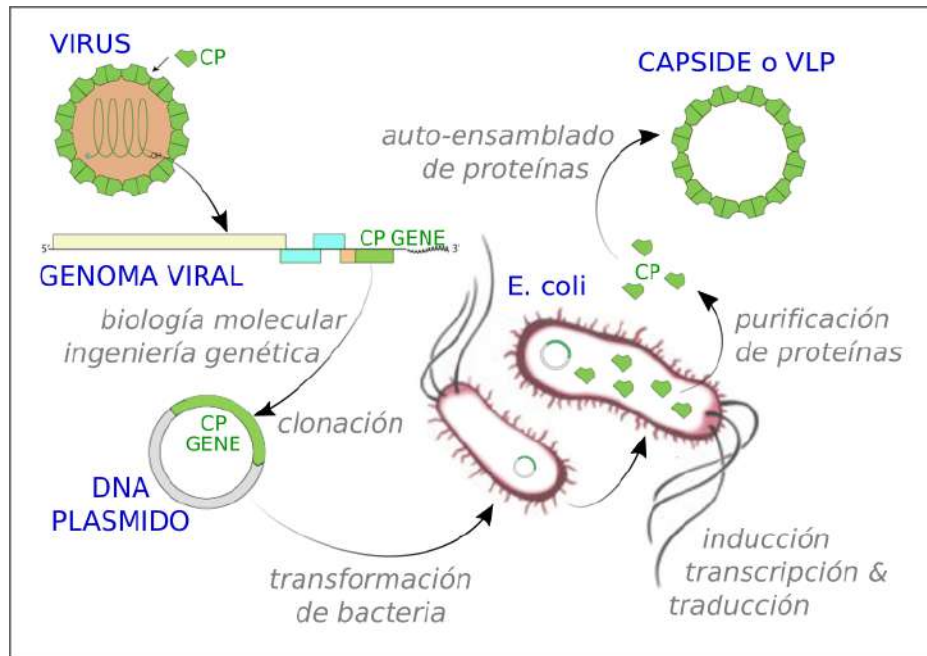


Figura 5: Esquema general de la metodología para obtener cápsides vacías, o partículas tipo virus (VLPs). El primer paso es la obtención del gen de la CP, el cual una vez extraído por técnicas de biología molecular puede ser editado con técnicas de ingeniería genética. El gen se clona en vectores especiales para inducir la sobre-expresión de la proteína de interés. Una vez obtenida una concentración adecuada de CPs, se propicia el auto-ensamblado cambiando condiciones del medio para generar VLPs.

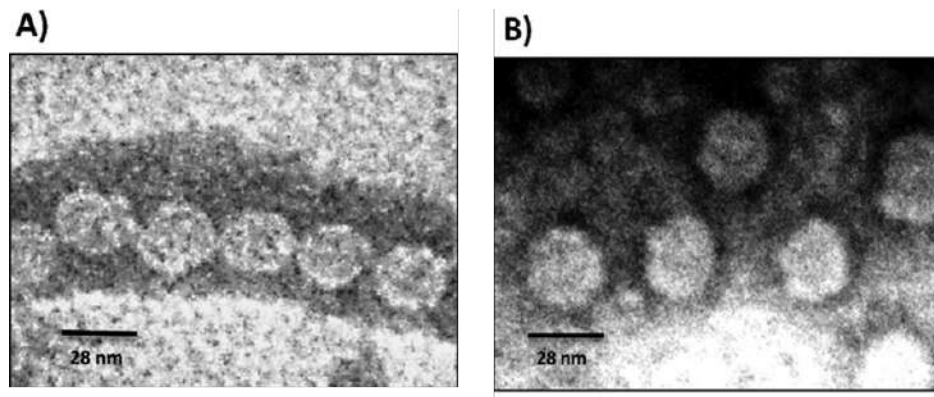


Figura 6: **A)** Viriones aislados de plantas infectadas con el virus del *CCMV*. **B)** VLPs ensambladas a pH=4.8 a partir de la CP recombinante. Figura tomada de [Díaz-Valle et al. \(2015\)](#).

sulfanato de poliestireno con carga negativa, entre otros. Se han demostrado las potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, como nanoarreglos en biomateriales, e incluso en la electrónica [[Hema et al. \(2018\)](#)].

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Identificación de residuos clave en la familia *Bromoviridae*

Basados en el criterio de conservación estructural antes descrito, en el trabajo realizado por Díaz-Valle, A. *et al.* se identificó un total de seis *residuos clave* de la familia *Bromoviridae*, incluyendo al CCMV, por medio de metodologías *in-silico* [[Díaz-Valle \(2014\)](#); [Díaz-Valle et al. \(2019\)](#)]. En dicho estudio, primero se realizaron alineamientos múltiples de secuencia de cuatro miembros de la familia



*Bromoviridae* para resaltar zonas de alta identidad con el objetivo de buscar homologías. Después, se realizaron alineamientos múltiples de estructuras terciarias y cuaternarias. Este último paso fue posible hacerlo gracias a que Carrillo-Tripp y colaboradores en el 2009 publicaron un método que permite analizar la estructura de las CPs ensambladas. Dicha herramienta computacional emplea un modelo esférico que toma en cuenta y analiza a la cápside completa, es decir, a todas las proteínas que la integran considerando cómo están organizadas a nivel de estructura cuaternaria [Carrillo-Tripp et al. (2009)]. Así, los autores mostraron la existencia de residuos que forman parte de las interfases entre subunidades vecinas que son conservados desde la estructura primaria hasta su estructura cuaternaria dentro de la familia *Bromoviridae*. En el caso del CCMV, estos son los seis residuos identificados P99, F120, E176, R179, P188 y V189.

## **2.2. Estructura terciaria de la proteína de cápside (CP) y la estructura cuaternaria de un virus icosaédrico**

Es importante mencionar algunos aspectos fundamentales relacionados a cómo se describe la estructura cuaternaria de las cápsides icosaédricas en general. A pesar de que cada copia de la CP que compone la cápside es idéntica a todas las demás (química y estructuralmente), la configuración espacial relativa de las proteínas que se rodean una a otra puede ser distinta. Una cápside icosaédrica tiene al menos tres tipos de simetrías, y cada una define un eje alrededor del cual se acomodan un número determinado de CPs. Así, estos ejes de simetría definen un cierto ambiente local. Dada la simetría de la cápside, existen posiciones equivalentes dentro de su arreglo molecular cuaternario, como puede apreciarse en la Figura

7.

Las diferentes configuraciones relativas entre CPs generan distintas interfases, esto es, la interfase que se genera entre las CPs A1-B1 no es equivalente a la interfase entre las CPs A2-B1. Sin embargo, la interfase entre las CPs A2-B1 sí es equivalente a la interfase entre las CPs C1-C6. La diferencia radica en qué tipo de eje de simetría relaciona a las dos CPs que conforman cada par. Por ejemplo, el par A1-A2 está relacionado a través de un eje de simetría tipo *5-fold*. Por otro lado, los pares A2-B1 y C1-C6 ambos están relacionados por un eje de simetría tipo *2-fold*, lo que los hace equivalentes.

El número y tipo de interfases que forma una CP cualquier en la estructura cuaternaria de la cápside es diverso. Tomando la CP con la etiqueta B1 como ejemplo, esta forma una interfase distinta con cada una de las CPs vecinas A1, A2, C2, C6, C1, etc. En este sentido, de los seis *residuos clave* que se encontraron en la familia *Bromoviridae*, cuatro de ellos se encuentran en la interfase de los dímeros equivalentes relacionados por un eje de simetría tipo *2-fold*, como el par A2-B1 o el par C1-C6, o cualquiera que cumpla con el mismo criterio de simetría. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de la estructura molecular de un dímero de este tipo, resaltando la localización de dichos *residuos clave* dentro de la interfase (E176, R179, P188 y V189).

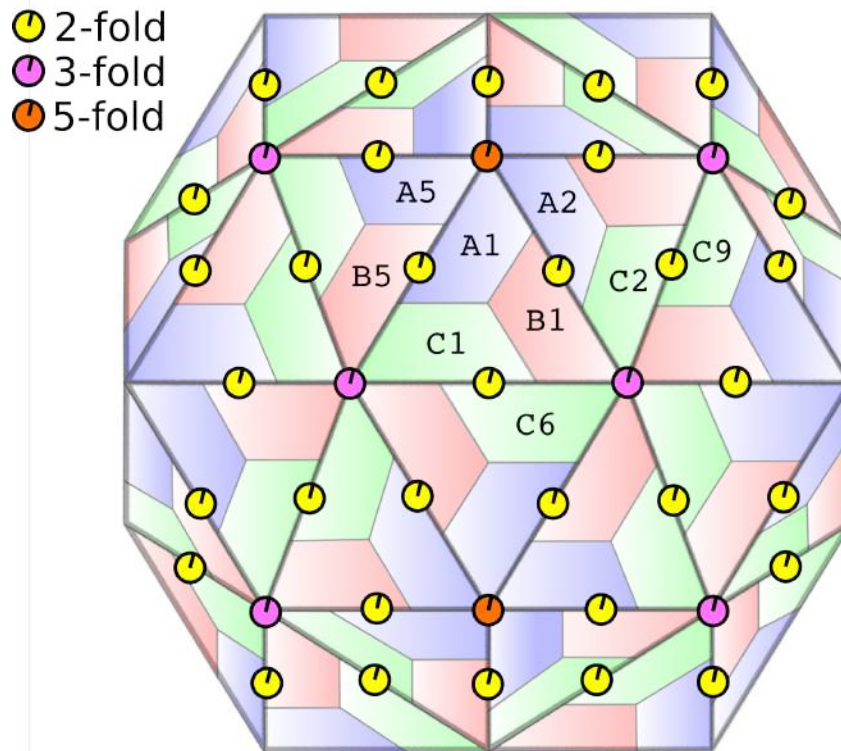


Figura 7: Organización de las CPs en una cápside icosaédrica T=3 como la del CCMV. Las posiciones equivalentes de cada monómero dentro de la cápside se muestran en azul ( $A_i$ ), rojo ( $B_i$ ) y verde ( $C_i$ ). Algunos de estos se muestran etiquetados siguiendo la convención VIPERdb. La localización de los tres tipos de ejes de simetría se muestran en amarillo (2-fold), magenta (3-fold) y naranja (5-fold). Comparar con la estructura de la cápside del CCMV mostrada en la Fig. 4.

### 2.3. La relevancia del *dímero primario*

Las CPs se deben organizar en una configuración relativa determinada para la correcta formación de un tipo particular de cápside. Con anterioridad se han logrado identificar configuraciones oligoméricas intermedias en el proceso de auto-ensamblado de la cápside que son de gran relevancia en términos de la asociación y su energía de unión. Al estado oligomérico inicial en dicho proceso se le ha llamado *dímero primario*. En el caso del CCMV, se ha identificado al dímero relacionado por un eje tipo *2-fold* (por ejemplo A2-B1, A1-B5 o C1-C6) como el primer paso en el auto-ensamblado de la cápside [Zlotnick et al. (2000)].

Los resultados de dichos estudios previos sugieren que los *residuos clave* del CCMV, en particular los que se encuentran en la interfase del *dímero primario*, pudiesen tener algún tipo de relevancia funcional, por ejemplo, ser responsables de la formación de la cápside o de su estabilidad. De esta forma, en este trabajo nuestro objetivo fue caracterizar experimentalmente cada uno de los *residuos clave* involucrados en los dímeros relacionados por un eje *2-fold* (E176, R179, P188 y V189) a través del estudio de su contribución individual al auto-ensamblaje y comportamiento termodinámico de la cápside.

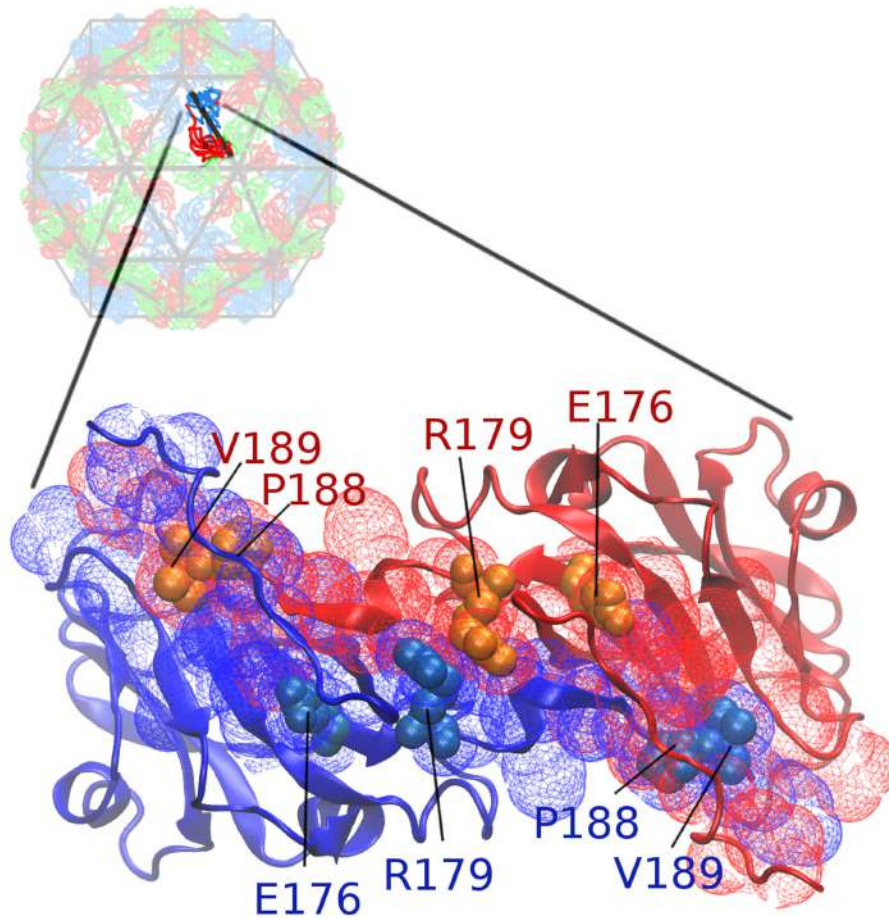


Figura 8: Dímero formado alrededor de un eje de simetría tipo *2-fold*. Existen 90 dímeros de este tipo formando la cápside del CCMV, todos equivalentes entre ellos. Cada monómero (en azul y rojo) consta de 190 residuos (representación de listón). 50 de ellos participan en la interfase de este tipo de dímero (representación de malla). Los cuatro *residuos clave* (representación de esferas) se muestran por monómero.

### **3. HIPÓTESIS**

Los *residuos clave* E176, R179, P188 y V189 de la proteína de cubierta del *Cowpea chlorotic mottle virus* contribuyen de forma predominante al proceso de auto-ensamblado de la cápside, en contraste a otros residuos de interfase no conservados.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la contribución de los *residuos clave* de la CP del *Cowpea chlorotic mottle virus* involucrados en los dímeros relacionados por un eje tipo *2-fold* en el auto-ensamblado y estabilidad termodinámica de la cápside, usando como referencia la CP silvestre y comparando con residuos de interfase no conservados.

#### **4.1. Ojetivos específicos**

1. Producir la CP recombinante de la cápside silvestre del CCMV y generar partículas tipo virus.
2. Optimizar los parámetros del sistema de expresión heteróloga y producir las CPs recombinantes de mutantes puntuales en las posiciones E176, R179, P188 y V189 (i. e. cuatro CPs con una mutación sencilla cada una).
3. Optimizar los parámetros del sistema de expresión heteróloga y producir las CPs recombinantes de mutantes puntuales en las posiciones de dos residuos

de interfase en los dímeros relacionados por un eje tipo *2-fold* que no sean conservados (i. e. dos CPs con una mutación sencilla cada una).

4. Caracterizar la formación y estabilidad de las VLPs formadas con la CP silvestre y las seis mutantes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En el trabajo de [Díaz-Valle](#) y colaboradores se predijo la existencia de seis *residuos clave*, cuatro de ellos participantes en la interfase de nuestro interés (*dímero primario*) [[Díaz-Valle \(2014\)](#); [Díaz-Valle et al. \(2019\)](#)]. En el mismo trabajo también se mutó el gen de la CP silvestre de forma puntual en la posición de cada uno de dichos residuos de acuerdo a sus propiedades físico-químicas. Por ejemplo, si el residuo original poseía carga positiva o negativa se cambió por un residuo con carga neutra, si el residuo original era hidrofóbico se cambió por uno hidrofílico, ó, si el residuo original era grande se cambió por un residuo pequeño. Adicionalmente, se eligieron aleatoriamente dos residuos localizados en la misma interfase: E77 y V133. Ambos pertenecen a la interfase del dímero relacionado por un eje tipo *2-fold*, sin embargo, ninguno de ellos es conservado en secuencia o estructura dentro de la familia *Bromoviridae*. Las mutaciones resultantes se muestran en la Tabla 1. En la Figura 9 se visualiza la estructura terciaria de la CP silvestre del CCMV, indicando la localización de los seis residuos analizados y las mutaciones descritas. En este trabajo partimos de esas construcciones en plásmidos *in-vitro*.

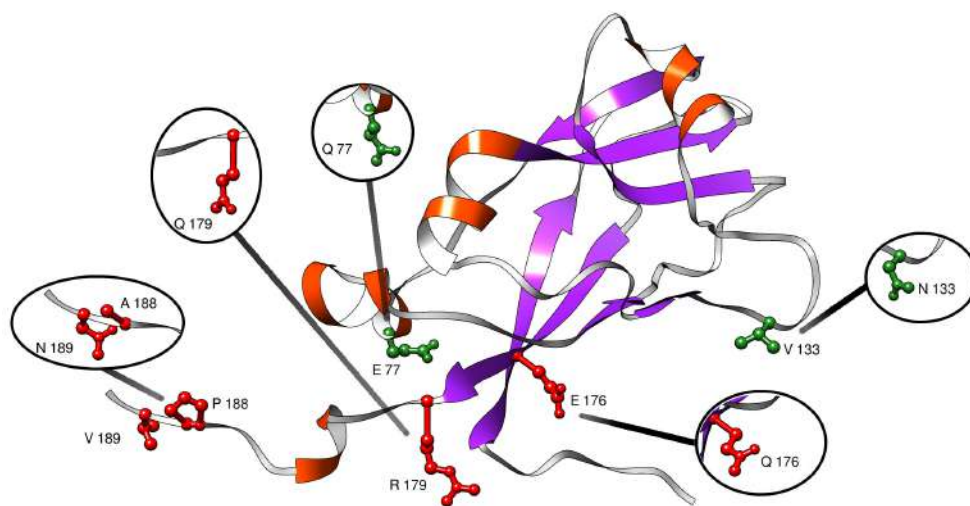


Figura 9: Localización de los *residuos clave* (rojo) y residuos de interfase control (verde) en la estructura terciaria de la CP del CCMV. En los círculos se muestran las mutaciones puntuales que se realizaron de forma individual. Se indican las estructuras secundarias presentes en la CP; hélice  $\alpha$  (naranja) y hojas  $\beta$  (morado).



Variante silvestre		Variante mutante	
Glutamato E176 <sup>a</sup>	Negativo	Glutamina Q	Neutro
Arginina R179 <sup>a</sup>	Positivo	Glutamina Q	Neutro
Prolina P188 <sup>a</sup>	Grande	Alanina A	Pequeño
Valina V189 <sup>a</sup>	Hidrofóbico	Asparagina N	Hidrofílico
Glutamato E077 <sup>b</sup>	Negativo	Glutamina Q	Neutro
Valina V133 <sup>b</sup>	Hidrofóbico	Asparagina N	Hidrofílico

Tabla 1: Mutaciones puntuales realizadas por Díaz-Valle (2014) a la CP del CCMV que dieron lugar a las seis mutantes que se estudiaron en este trabajo.

<sup>a</sup> Residuos *clave* <sup>b</sup> Grupo control

## 5.1. Diseño experimental

Nuestro trabajo involucró la optimización de parámetros en cada una de las seis fases del estudio experimental esquematizadas en la Figura 10. En términos generales, se exploró e identificó i) el plásmido de expresión en el cual clonar los genes de la CP silvestre y mutantes, ii) la cepa de *E. coli* para transformarse con dichos plásmidos, iii) los tiempos y concentraciones de inducción para la expresión de las proteínas recombinantes, así como las condiciones de purificación, iv) las condiciones del medio para propiciar el auto-ensamblado de las CPs en VLPs, y v) las condiciones para realizar la caracterización termodinámica por medio de la técnica *Thermal Shift Assay* (TSA). Finalmente para vi) el análisis de los datos del TSA, se utilizó un paquete de análisis de datos desarrollado por nuestro grupo de investigación (A. A. Pérez-Montoya *et. al*, <https://github.com/triplab/TSA-Tm>).

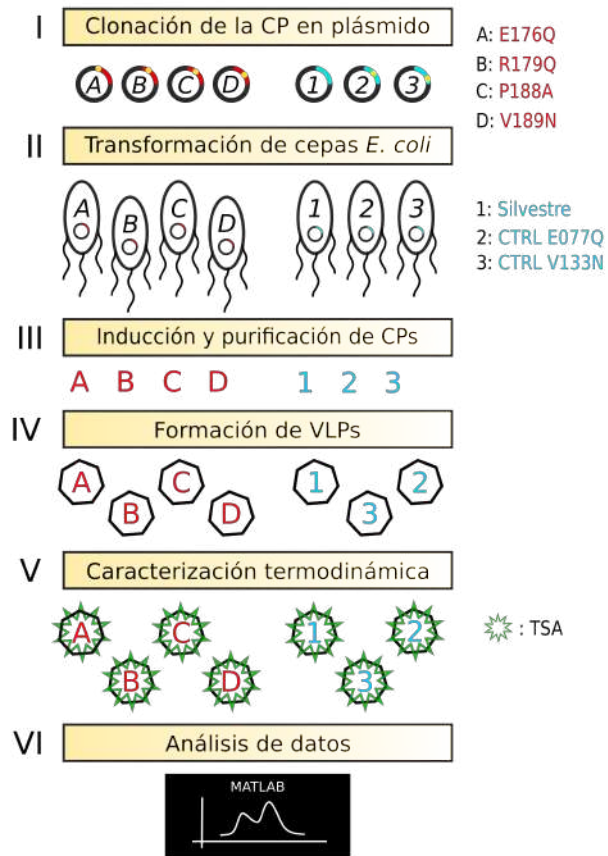


Figura 10: Diseño experimental implementado en este trabajo.

En esta sección se describirán con detalle los protocolos optimizados y las técnicas de verificación de resultados empleados en cada fase.

## 5.2. Plásmidos de expresión

Nuestro estudio inició al probar distintos plásmidos de expresión, lo cual implica realizar la subclonación del gen de la CP (técnica utilizada para mover un gen desde un plásmido origen a un plásmido destino). La construcción previamente realizada por [Díaz-Valle, 2014](#), se hizo en el plásmido de expresión pET19b, el cual contiene una etiqueta de polihistidinas (10His-tag) en el N-terminal del gen de la CP CCMV. Esta etiqueta ayuda a la purificación de la proteína recombinante, que en este caso será la CP-10His-tag la cual llamaremos solo CP en el resto del documento (obviando la presencia de la etiqueta que se demostró que no impide ni afecta la formación de VLPs). Además, dicho plásmido también contiene un gen que confiere resistencia a la bacteria hacia Ampicilina, Carbenicilina y antibióticos relacionados, para realizar la selección de Transformantes (Figura 11).

El primer paso en la subclonación requiere la amplificación del gen de la CP por la técnica de *Polymerase chain reaction* (PCR) utilizando los siguientes oligos:

*reverse* BamHI-R[AAAGGATCCCTAATACACCGGAGTGAAAGAG]

*forward* NdeI-F[AGAAAACATATGTCTACAGTCGGAACAGGGA]

Los oligos fueron usados para la amplificación del gen de la CP del CCMV en todas las variantes ya que son específicos para los sitios de corte por las enzimas de restricción BamHI y NdeI, localizados en el sitio múltiple de clonación del vector pET19b. El diseño de los oligos fue realizado por [Chávez-Calvillo, 2011](#). Se utilizaron  $0.2\mu\text{M}$  de cada uno,  $2\mu\text{M}$  de *deoxynucleoside triphosphates* (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP),  $2\mu\text{L}$  de buffer 10x MyTaq y  $0.1\mu\text{L}$  de la enzima MyTaq DNA Polimerasa (BIOLINE). Se ajustó la reacción a un volumen total de  $20\mu\text{L}$  con

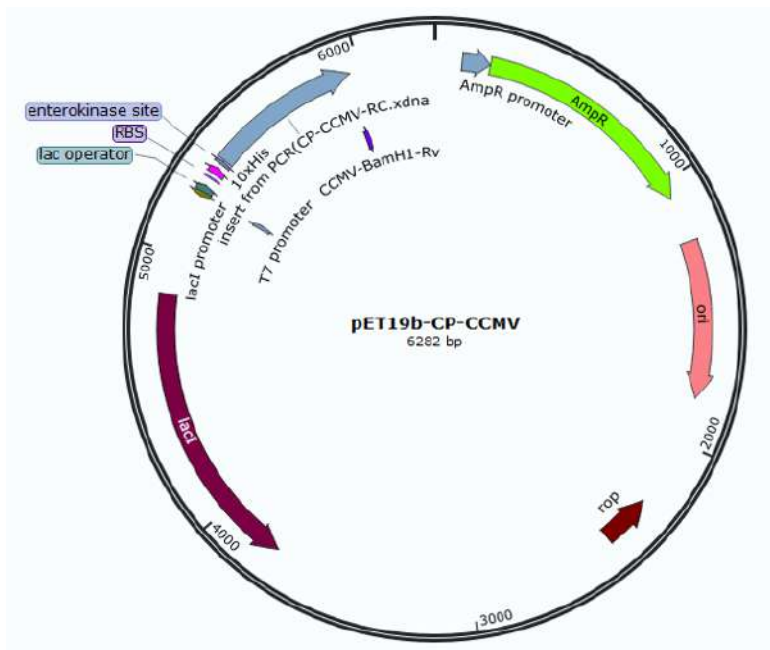


Figura 11: Representación de la construcción en el plásmido pET-19b con inserto del gen de la CP del CCMV.

agua. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización con 1 ciclo a 95°C por 3min, 33 ciclos a 95°C por 15s, 55°C por 30s para alineamiento de oligos, y 72°C por 15s y una extensión de 1 ciclo a 72°C por 10min. Para verificar la integridad y especificidad hacia el gen y su amplificación, se purificó el producto de PCR y se digirió con las enzimas de restricción BamHI y NdeI (ANZA, Thermo Fisher Scientific) El producto se separó en un gel de agarosa al 1%. Finalmente, se cortó la banda según el kit de extracción (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction, Bio Basic).

Una vez obtenido el gen de la CP, este fue ligado en el plásmido de expresión destino pCOLDB I previamente linearizado con las enzimas de restricción BamHI y NdeI de ANZA (Thermo Fisher Scientific). La reacción de ligación se llevó a cabo usando diferentes proporciones plásmido:inserto (1:1, 1:3, 1:10). La proporción óptima fue la segunda. Se usaron al menos 100ng de plásmido, 0.5 $\mu$ L de Ligasa (T4 DNA Ligase, 5 Weiss U/ $\mu$ L, Thermo Scientific), 5  $\mu$ L de buffer (10x T4 DNA Ligase, Thermo Scientific), ajustado a 50 $\mu$ L con agua. Se incubó por 16h a 22°C. Transcurrido este tiempo, se inactivó la enzima calentando a 65°C por 10 min. La construcción final se muestra en la Figura 12.

### 5.3. Transformación de *E. coli*

Transformamos células de *E. coli* químicamente competentes de la cepa Rosetta 2(DE3)pLysS (Novagen, Germany) con resistencia intrínseca a cloranfenicol con los plásmidos que contienen el gen de la CP del CCMV silvestre o con mutación puntual generados previamente a partir del gen nativo clonado en el plásmido pET19b por [Díaz-Valle, 2014](#). La construcción en el plásmido pCOLDB I dio rendimientos menores que la construcción en el plásmido pET19b, por lo que se decidió trabajar con el segundo.

El procedimiento de transformación celular inicia con la adición de una alícuota de 1 $\mu$ L de DNA plasmídico (30 a 150 ng/ $\mu$ L) en 50 $\mu$ L de células calcio competentes de *E. coli*. Se incubaron por 8min en hielo y luego se realizó un choque térmico a 42°C por 30s. Las células se incubaron 5min en hielo. Se añadió 500 $\mu$ L de medio LB y se incubaron por 1h a 37°C a 160rpm en agitación. Posteriormente

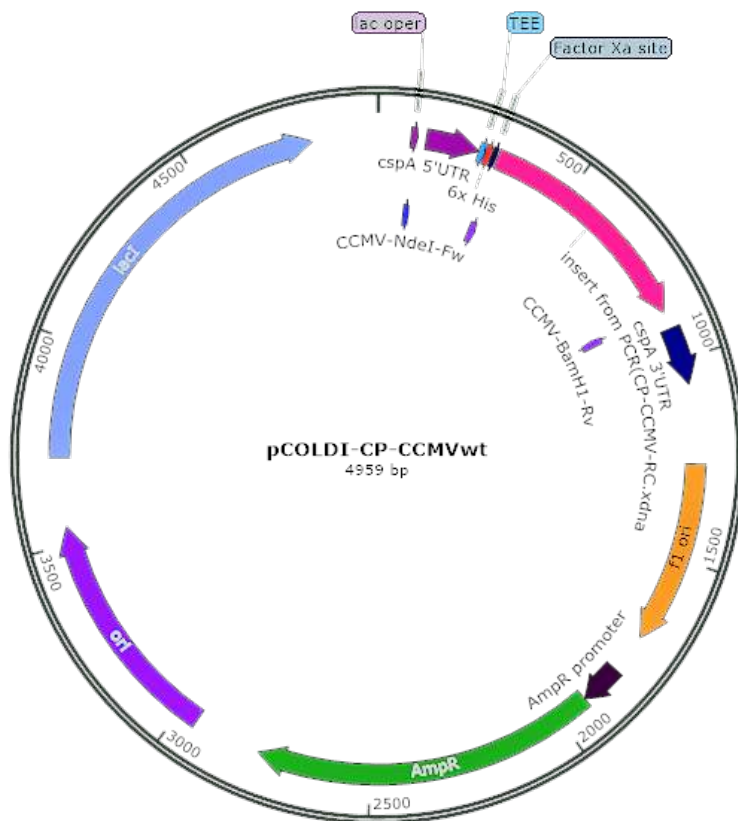


Figura 12: Representación de la construcción en plásmido pCOLDI I con el gen de la CP del CCMV. Esta construcción dio rendimientos menores que el plásmido pET19b, por lo que se descartó por el resto del estudio.

se transfirió a placa de cultivo con medio LB sólido suplementado con carbenicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y cloranfenicol (34  $\mu\text{g/ml}$ ). Una colonia fue seleccionada y se preparó un pre-inóculo de 100mL de medio LB líquido con carbenicilina y cloranfenicol a la misma concentración antes descrita. El cultivo se creció a 37°C por 16h y 200 rpm en agitación. Una vez saturado se transfirió a 1L de medio LB líquido suplementado con carbenicilina y cloranfenicol a la misma concentración antes mencionado. Se incubó a 37°C en constante agitación (200rpm) hasta llegar a una densidad óptica de 600 (OD 600) aproximada de 0.7 unidades de absorción.

#### **5.4. Inducción de la expresión de la CP del CCMV recombinante**

La expresión recombinante de la CP CCMV fue inducida con la adición de *isopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido* (IPTG) a una concentración final de 0.75 mM por 16h a 25°C con agitación de 200 rpm. Posteriormente se centrifugó el cultivo a  $3,000 \times g$  por 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se recuperó la pastilla de bacterias (pellet). Esta última se almacenó a -80°C para su posterior purificación.

#### **5.5. Purificación de la CP por cromatografía de afinidad**

El pellet fue re-suspendido en 60mL de buffer de lisis (100mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH = 6.0) suplementado con lisozima (1mg/ml concentración final) y *fluoruro de fenilmetilsulfonilo* (PMSF) a una concentración final de 1mM. Se incubó por 1h a 4°C con agitación constante. Posteriormente, la solución fue so-

nicada por 10min con ciclos de descanso y actividad cada 20s a una intensidad de 100W, que en nuestro caso corresponde al 20 % del equipo que se uso (QSONICA modelo Q500), utilizando una punta de sonda estándar de 1/2" de diámetro (#4220) con el objetivo de aumentar el lisado celular y así liberar la mayor cantidad de proteína recombinante. Se centrifugó la muestra por 30min a  $13,500 \times g$  (Centrifuga Labnet, Tipo Z 36 HK, rotor C0360-94D, 50mL) a 4°C. Se descartó la pastilla y se recuperó el sobrenadante el cual fue filtrado con una membrana de  $45\mu\text{m}$ . El sobrenadante filtrado fue cargado a una columna de afinidad de Cobalto (Pierce HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Chromatography Cartridge) previamente equilibrada con 10 volúmenes de buffer de lisis. Para el análisis del rendimiento de unión de la CP recombinante a la columna de Cobalto se recolectaron muestras de 1mL de los eluidos con aquellas proteínas que hubieran tenido baja afinidad a la matriz con tres diferentes buffers de lavado: L1 (100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 15mM Imidazol, pH= 7.0), L2 (100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 20mM Imidazol, pH=7.2), L3 (100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 35mM Imidazol, pH=7.3). Cada lavado se realizó con 20 volúmenes que fueron pasados por la columna de Cobalto (HisPur Cobalt Chromatography Cartridge). La CP recombinante fue eluida con 10mL de buffer de elución (100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 500mM Imidazol, pH=8.0) en fracciones de 1.5mL cada una. Se tomaron  $15\mu\text{L}$  de muestra de cada fracción más  $5\mu\text{L}$  de buffer Laemmli 4X para su posterior visualización por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes.

A partir del primer eluido positivo (en el cual se encuentra la proteína recombinante) se dividió el volumen en dos diferentes buffers. El primero fue buffer de diálisis 1x (100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH=7.5). El segundo fue buffer de ensamblado 1x (100mM buffer de acetatos). Se sabe que la CP del CCMV en es-



tos valores de pH forma dímeros y partículas tipo virus (VLPs) respectivamente. Las fracciones fueron dializadas en una membrana con un poro de 14kDa MW-CO (MEMBRA-CEL MD44) en 1L de cada buffer por 16 h a 4°C en agitación constante. Se recuperaron las fracciones y se procedió a cuantificar. Se colocaron 5 $\mu$ L de proteína total en placas de Elisa(Applied biosystems) y después se colocaron 250 $\mu$ L de colorante Bradford al 1X (BIO-RAD Cat. #500-0205). Se incubó a temperatura ambiente por 10min y después se procedió a leer en un lector de placas (Marca BioTek).

## **5.6. Estimación del peso molecular de la CP por electroforesis**

La identidad de la CP del CCMV fue verificada mediante la caracterización de su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-Page) para cada variante de la CP (silvestre y mutantes). Las muestras fueron mezcladas 4:1 con buffer Laemmli 4x(0.25M Tris-HCl, pH=6.8, 8 % SDS, 0.2 % Azul de bromofenol, 40 % glicerol, 20 % de 2-Mercaptoetanol). La proteína fue desnaturalizada por temperatura calentando a 97°C por 5 min. Se incubó en hielo por 5min y se procedió a cargar el gel de poliacrilamida al 12 %. Cada gel fue corrido a 130V por 1.5h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G250. Se espera observar la CP en un peso alrededor de los 25kDa.

## **5.7. Identificación de la CP por Western blot**

La técnica analítica de Western blot, también denominada inmunoblot o electrotransferencia, es comúnmente usada en biología molecular para identificar pro-

teínas específicas en una mezcla compleja, como la que se presenta en extractos celulares. La técnica consiste de tres etapas: separación por tamaño, transferencia a un soporte sólido, y visualización a través de la marcación de la proteína de interés con el uso de anticuerpos primarios o secundarios apropiados.

### **5.7.1. Separación y transferencia**

Para la identificación de la CP se realizó un ensayo de Western Blot, en donde se utilizó un anticuerpo anti-His específico para unirse a la etiqueta 10-His-tag que contiene la proteína de cápside recombinante. El procedimiento comenzó con la corrida de un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-Page) al 12 %. Posteriormente, se sumergió el gel en buffer de transferencia (0.05M Glicina, 0.006M Tris-base, Metanol al 95 %) para equilibrarlo. Después, la membrana Immun-Blot de PVDF (BIO-RAD) fue sumergida en etanol 100 %, seguido por sumergir en agua por 5min y equilibrarla con buffer de transferencia por 10 min. Se pusieron en contacto las siguientes capas: i) 3 papeles filtro Mini Trans-Blot (BIO-RAD) 7.5 x 10 cm, ii) el gel SDS-Page, iii) la membrana Immun-Blot PVDF y iv) 3 papeles filtro. Todos los componentes que estaban en contacto con el gel se pre-introdujeron en la solución de transferencia (10mM Tris-base, 50mM Glicina, 10 % metanol). La transferencia se realizó utilizando un Electroblotter de Thermo Fisher Scientific (Modelo HEP-1) a 15V por 1.5h usando un BIO-RAD PowerPac HC como fuente de poder. Al finalizar la transferencia se recuperó la membrana de PVDF y se lavó una vez con buffer TBS (100mM Tris-HCl, 0.9 % NaCl, pH=7.5) por 15min a temperatura ambiente y en agitación constante, seguido por dos lavados más de 5min cada uno.

### **5.7.2. Bloqueo de la membrana**

Se colocó la membrana en el buffer de leche blot 3 % (TBS 1 x, Leche descremada Svelty 0.3 %) por 1h en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con buffer TBS (100mM Tris-HCl, 0.9 % NaCl, pH=7.5) por 15min a temperatura ambiente y en agitación constante. Se reemplazó el buffer usado por buffer fresco y se dejó por 5min en agitación constante. Este paso se repitió dos veces.

### **5.7.3. Incubación con anticuerpo primario**

Se agregó el anticuerpo primario THE His Tag Antibody, mAb, Mouse (subty-pe IgG1) (GenScript) en dilución 1:3000 en buffer (TBS 1x, Tween 20, 0.5 % leche) y se incubó por 2h en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con buffer TBS (100mM Tris-HCl, 0.9 % NaCl, pH=7.5) por 15min a temperatura ambiente y en agitación constante. Se reemplazó el buffer usado por buffer fresco y se dejó por 5min en agitación constante. Este paso se repitió dos veces.

### **5.7.4. Incubación con anticuerpo secundario**

Se añadió el anticuerpo secundario acoplado a HRP (Invitrogen) en dilución 1:3000 en buffer (TBS 1x, Tween 20, 0.5 % leche) y se incubó por 2h en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con buffer TBS (100mM Tris-HCl, 0.9 % NaCl, pH=7.5) por 15min a temperatura ambiente y en agitación constante. Se reemplazó el buffer usado por buffer fresco y se dejó por 5min en

agitación constante. Este paso se repitió dos veces.

#### **5.7.5. Detección**

La detección se realizó con el kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific), colocando una proporción 1:1 del Peroxid buffer y Enhancer buffer del kit, después de transcurridos 5min de incubación se observaron las proteínas en un equipo transiluminador de Bio-Imaging System (Micro-Chemi).

### **5.8. Visualización de partículas tipo virus (VLPs)**

La formación de cápsides vacías, o partículas tipo virus (VLPs), del CCMV fue confirmada por observación directa utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta técnica se basa en el uso de un haz de electrones para la formación de la imagen y tiene una resolución de 10nm. Se utilizó la CP purificada en buffer con pH=4.8, el cual corresponde a las condiciones en las que la cápside del CCMV se encuentra formada. Para dicho análisis se utilizó una muestra de 3 $\mu$ L con 0.15 mg/ml de proteína purificada en buffer de ensamblado (pH=4.8). Se colocó la muestra en una rejilla de cobre recubierta con carbono y se dejó secar por 10min a temperatura ambiente. Se quitó el exceso con papel filtro y se colocó 3 $\mu$ L de ácido fosfotúngstico al 2 % para generar una tinción negativa. Se dejó secar por 10min a temperatura ambiente y se quitó el exceso de buffer con papel filtro. Las VLPs fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido Nova NanoSEM Modelo 200 (FEI Company). Este equipo se encuentra en el Centro de

Investigación en Materiales Avanzados, S. C. Unidad Monterrey. El acceso a dicho equipo se dio a través de una colaboración con los doctores Nayely Pineda Aguilar y Eduardo Martínez Guerra de dicho centro.

## 5.9. Análisis de oligomerización proteínica

Las interacciones proteína-proteína son la base para la mayoría de los procesos celulares, incluidos la señalización, síntesis de proteínas y el metabolismo. Una herramienta para estudiar estas interacciones son el uso de entrecruzadores (*cross-linking*), los cuales pueden fijar la interacción entre complejos proteínicos como se muestra en la Figura 13A [Leitner (2016)]. Por otra parte, en el estudio realizado por Lavelle et al., 2009, los autores mostraron que la CP del CCMV se auto-ensambla y forma cápsides a valores de pH bajos, mientras que a valores mayores de pH las proteínas forman complejos homodiméricos (Fig. 13B).

El formaldehído en solución es utilizado como agente homobifuncional. Las muestras de proteína fueron preparadas con una concentración de 4 % de formaldehído en un volumen de 25  $\mu$ L y una concentración de 0.5 mg/ml de proteínas (para cada variante) e incubadas 5min a 37°C. La reacción fue detenida al agregar 10  $\mu$ L de buffer de carga Laemmli 4x sin agente reductor. Las muestras se calentaron a 60°C por 5min y se incubaron 5min en hielo. Se realizó un gel de SDS-PAGE al 12 % y se corrió a 100V por 2h. Las proteínas fueron detectadas luego de teñir durante 1h con azul de Coomassie G250.

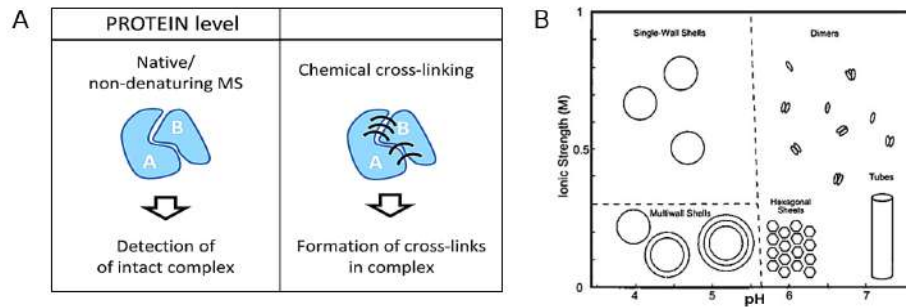


Figura 13: **A)** El uso de entrecruzadores genera puentes covalentes cuando existe una interacción proteína-proteína oligomérica (imagen tomada de [Leitner, 2016](#)). **B)** La CP del CCMV a pH alcalino se mantiene en estado homodimérico (imagen tomada de [Lavelle et al., 2009](#)).

## 5.10. Caracterización termodinámica

Las propiedades biofísicas del proceso de auto-ensamblado de todas las variantes se estudiaron a través de un análisis termodinámico utilizando la técnica conocida como *Thermal shift assay* (TSA) [[Nettleship et al. \(2008\)](#); [Walter et al. \(2012\)](#)]. El TSA está basado en el monitoreo del desensamblaje de un complejo proteínico o la desnaturalización de proteínas por temperatura. El uso de un fluoróforo reportero que emite luz únicamente cuando interactúa directamente con residuos hidrofóbicos de la proteína permite la caracterización de la estabilidad estructural de estas últimas usando el instrumento de PCR en tiempo real (qPCR). El esquema básico de un TSA implica la incubación de VLPs y CPs plegadas con el fluoróforo SYPRO Orange (SIGMA- Aldrich) en tiras de tubos de qPCR.

El flujo de trabajo completo para un experimento de TSA comienza con una reacción que contiene una concentración final de los siguientes componentes para

cada reacción de 30 $\mu$ L: buffer de ensamblado al 1x de concentración final (0.1M buffer de acetatos, pH=4.8) ó buffer de diálisis (100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH=7.5), 7.5 $\mu$ M de CPs, y el fluoróforo Sypro Orange al 6x. Las reacciones de TSA se realizaron utilizando un qPCR StepOne Real-Time PCR System (Cat. #4376357), configurado con una rampa de temperatura de 25°C a 95°C con incrementos de 1°C por minuto. La señal de fluorescencia se generó con una longitud de onda de excitación  $\lambda_{ex}$  de 490nm y se detectó a una longitud de onda de emisión  $\lambda_{em}$  de 585nm. Como control positivo, una muestra de lisozima (Sigma 62970) fue suspendida en buffer de ensamblado 5x(0.1M buffer de acetato de Sodio, 500mM NaCl, pH=4.8) y fue incluida en cada corrida de TSA. La temperatura de ensamblaje de las VLPs ( $T_{M1}$ ) y la temperatura de desnaturalización de la CP ( $T_{M2}$ ) se identificaron al analizar el perfil de la señal de fluorescencia en función de la temperatura,  $F(T)$ , y corresponden a los máximos del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ). En la Figura 14 se muestra un esquema de esta técnica.

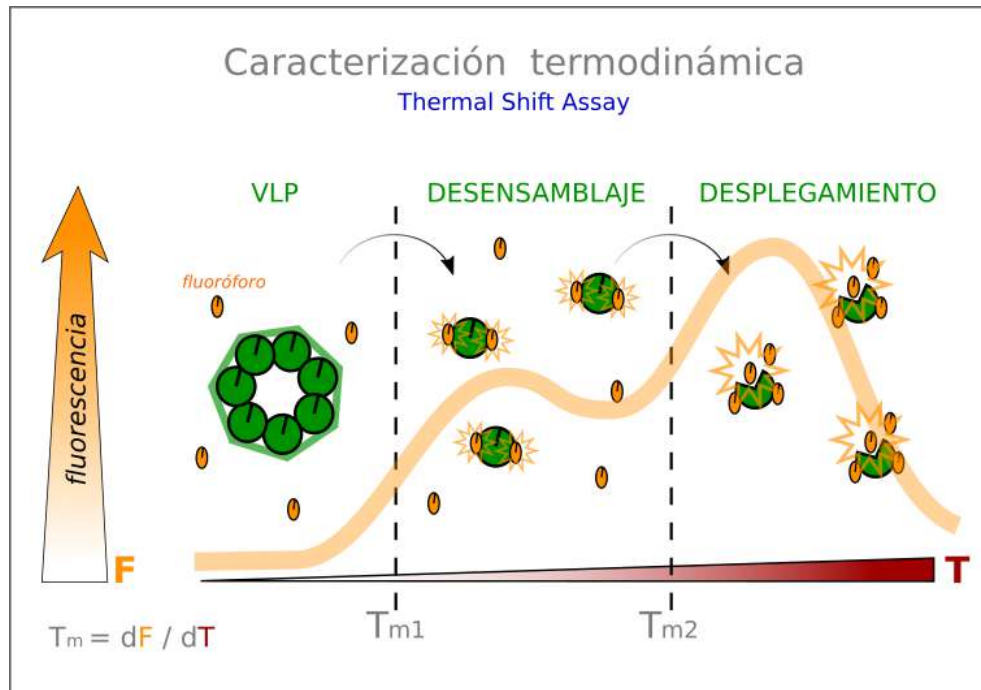


Figura 14: Perfil típico de fluorescencia (fluoróforo en color naranja) obtenido para VLPs (representadas en color verde) con la técnica de TSA. Este método se basa en el calentamiento progresivo de las partículas hasta alcanzar la primer temperatura de transición ( $T_{M1}$ ) en la que podemos observar cómo el fluoróforo que es específico a regiones hidrofóbicas se une al área de las proteínas de la cápside desensamblada y se produce un aumento en la fluorescencia. La segunda temperatura de transición ( $T_{M2}$ ) corresponde a la interacción del fluoróforo con el núcleo hidrofóbico de las CPs cuando se desnaturalizan (despliegan), produciéndose un segundo aumento de la fluorescencia.



## 6. RESULTADOS

En este capítulo se describirán los resultados concernientes a la obtención de la proteína recombinante de la CP del CCMV en sus siete variantes, en el cual se tratarán las condiciones óptimas para su expresión y purificación, así como la caracterización biofísica de cada mutante. Los resultados de la mutante E176Q se presentaron en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, México 2018. En conjunto con el resto de las variantes aquí reportadas, los resultados son parte de un manuscrito en proceso de publicación en una revista científica internacional [Valdez-Lara et al. (2019)].

### 6.1. Subclonación del gen y expresión de la CP recombinante

Para verificar que el gen de la CP del CCMV (577 pb) efectivamente se encontraba clonado en el plásmido pET19b, este se amplificó utilizando los oligos específicos *reverse* BamHI-R y *forward* NdeI-F. El producto de PCR se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1x (Fig. 15A). Con la intención de probar otro plásmido de expresión ya que se pretendía mejorar el rendimiento en la cuantificación de proteína recombinante, el gen de la CP variante silvestre fue subclonado en pCOLD. A partir de esta construcción, se realizó una amplificación por PCR del gen de la CP para confirmar que la subclonación fuera exitosa. Adicionalmente, se linearizó el plásmido con la enzima de restricción BamHI y se encontró en el peso esperado ( $\approx 5,000$  pb) (Fig. 15B). Por último, se expresó la CP bajo las siguientes condiciones: se creció cultivo de la cepa Rosetta 2(DE3)pLysS (Novagen, Germany) en 1000mL de medio LB líquido hasta alcanzar una  $OD_{600}=0.7$

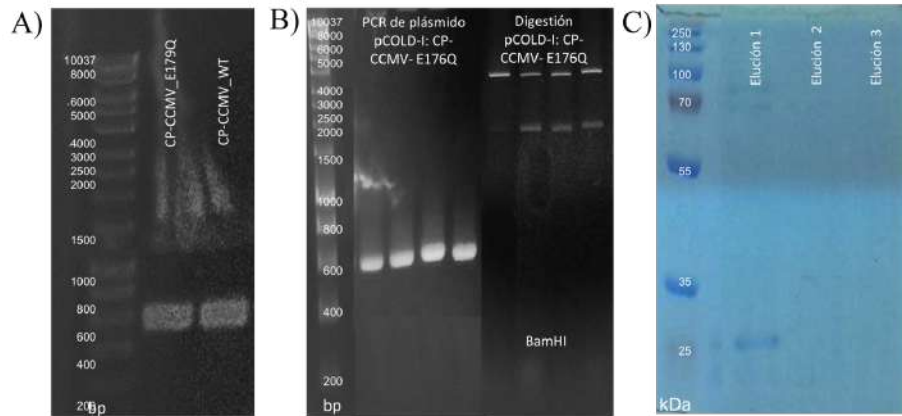


Figura 15: **A)** Producto de amplificación por PCR del gen de la CP (557 pb) de la mutante E176 y la nativa, clonado en el plásmido pET19b identificado en un gel de agarosa. **B)** Producto de amplificación por PCR del gen de la CP (557 pb) de la mutante E176 clonado en el plásmido pCOLD visualizado en un gel de agarosa y digestión del plásmido con BamHI. **C)** Proteína de cápside del CCMV (25kDa) de la mutante E176 identificada en un gel de acrilamida SDS-PAGE.

y después se agregó  $0.75\mu\text{M}$  de IPTG, se incubó por 16h a  $15^{\circ}\text{C}$  con agitación constante (200 rpm). Se purificó la proteína recombinante bajo las técnicas antes mencionadas en la sección de metodologías. La proteína purificada se detectó en un gel desnaturizante SDS-Page (Fig. 15C) en un peso aproximado a los 25kDa. Este es el peso esperado de la CP más la etiqueta 10-His-tag.

## **6.2. El grado de pureza de la CP es mayor al usar columnas de Cobalto con respecto a las de Níquel**

La purificación de la CP por cromatografía de afinidad se realizó en dos diferentes columnas, de Níquel y de Cobalto. Durante la purificación con columnas de Níquel se observó la presencia de otras proteínas adicionales a la CP. Esto disminuía el grado de pureza, como puede ser observado en la Figura 16. Para resolver el problema de impureza fue necesario probar otro tipo de columnas cromatográficas. En este caso se eligió una columna de Cobalto. El resultado obtenido fue el aumento del grado de pureza de la CP, como puede observarse en la Figura 16. Con esto mostramos que es mejor el empleo de columnas de Cobalto para la purificación de las CPs del CCMV.

## **6.3. Las CPs recombinantes se expresan adecuadamente en el sistema heterólogo**

Una vez obtenida una eficiente purificación de CPs recombinantes es necesario comprobar que las proteínas expresadas corresponden a la CP del CCMV. Para tal fin se realizó un ensayo de Western blot específico al anticuerpo His-tag, ya que la CP tiene una etiqueta 10His-tag. El resultado del ensayo se puede observar en la Figura 17, el cual muestra una banda característica de la unión del anticuerpo a la etiqueta. Esto confirma que la proteína purificada efectivamente corresponde a la CP del CCMV.

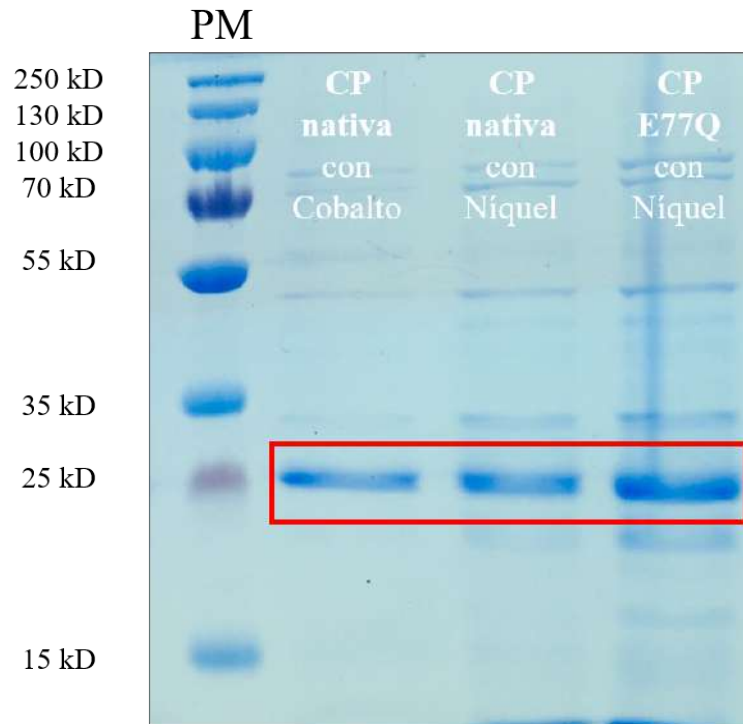


Figura 16: Comparación de pureza resultado de utilizar las columnas cromatográficas de Cobalto o Níquel.

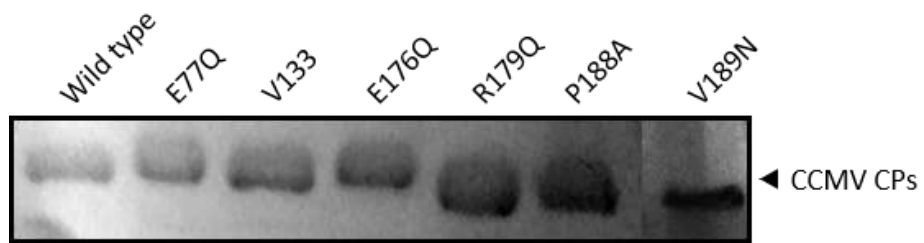


Figura 17: Expresión y purificación exitosa de todas las variantes de la CP del CCMV corroborada por ensayo de Western blot.

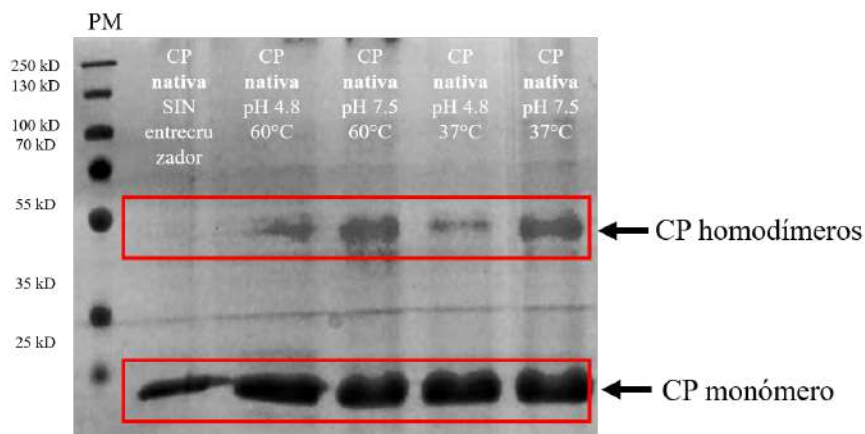


Figura 18: Homodímeros de la CP variante silvestre. Gel SDS-Page del entrecruzamiento con formaldehído en distintos valores de pH y temperatura. El primer carril no contiene formaldehído por lo que solamente se observa el monómero.

#### 6.4. Existe formación de dímeros de CPs

Una vez comprobado que las proteínas recombinantes obtenidas en el sistema heterólogo corresponden a la CP del CCMV, se realizó un ensayo de entrecruzamiento con formaldehído para probar la interacción CP-CP a través de la formación de dímeros. El resultado de este ensayo fue la detección de homodímeros de la CP variante silvestre. En la Figura 18 se observa la presencia del monómero y una banda correspondiente al doble de peso (50kDa).

## **6.5. Existe formación de VLPs**

Se realizó una observación por SEM para comprobar la formación de VLPs a partir de la CP del CCMV variante silvestre purificada y dializada en buffer a pH=4.8, que es la condición en donde las CPs se deben auto-ensamblar. La Figura 19 muestra claramente la existencia de una gran cantidad de partículas con el diámetro esperado de aproximadamente 30nm. Este resultado confirma la formación de VLPs utilizando la metodología descrita en este estudio.

## **6.6. Caracterización termodinámica**

### **6.6.1. La técnica de TSA es equivalente a la microcalorimetría**

Generalmente, los estudios termodinámicos se realizan con la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Cuando se utiliza correctamente, el DSC puede ser una técnica muy precisa y con una alta resolución. Sin embargo, el equipo es costoso y difícil de manejar. Un método alternativo barato y de fácil acceso para estudiar el comportamiento termodinámico de proteínas, ya sea como monómeros o en complejos proteínicos, es el TSA. Antes de iniciar el estudio del proceso de auto-ensamblado de cápsides virales, estimamos la equivalencia entre el TSA y el DSC a través de un análisis de la lisozima en medio con pH constante. La lisozima es una proteína que se encuentra ampliamente caracterizada, por lo que es común que se utilice como referencia en una amplia gama de estudios teóricos y experimentales. En particular, su estabilidad termodinámica ha sido reportada y se conoce su temperatura de desnaturalización ( $\approx 353^{\circ}\text{K}$ ) [Jacob et al. (1998);

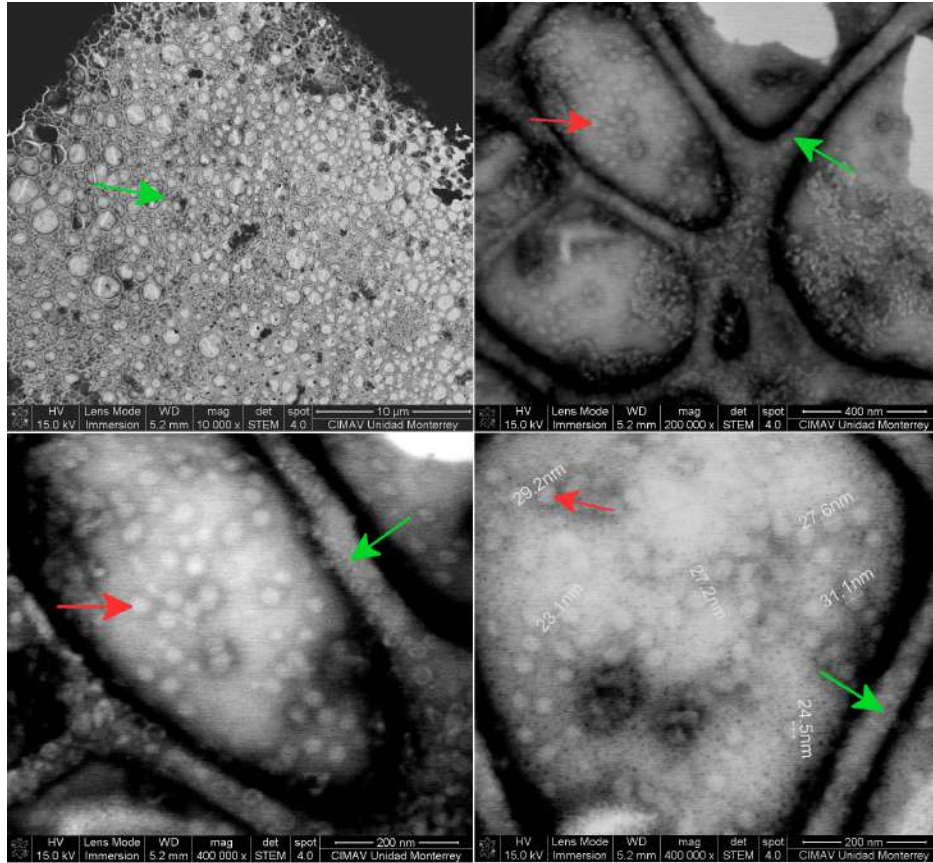


Figura 19: VLPs de CCMV usando la CP variante silvestre en medio con pH=4.8 (flechas rojas). Se puede apreciar la malla de carbono sobre la celda de cobre (flechas verdes). Fotografías obtenidas con microscopía electrónica de barrido (SEM) usando tinción negativa con Tungsteno. Aumento de 10,000x, 200,000x (parte superior) y 400,000x (parte inferior).

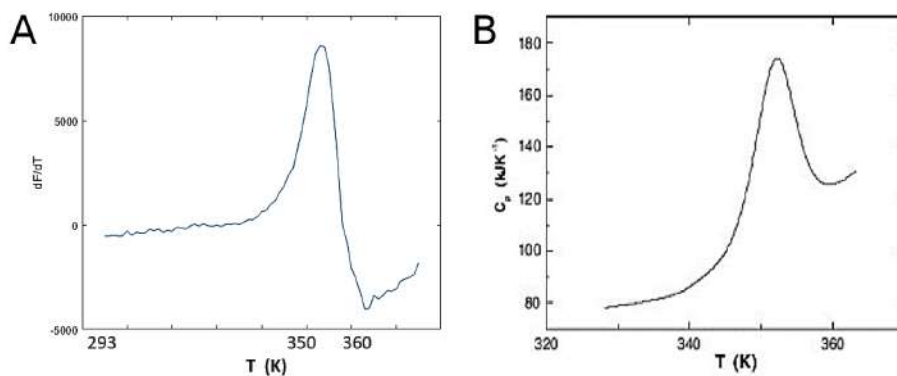


Figura 20: Análisis termodinámico comparativo. **A)** TSA de lisozima en pH=4.8 (este estudio). **B)** Termograma de Lisozima por DSC a pH=4.5 (imagen tomada de [Efimova et al. \(2006\)](#)).

[Le Brun et al. \(2010\)](#)]. En la Figura 20A se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura, resultado de un ensayo de TSA para esta proteína en pH=4.8. Observamos una temperatura de desnaturalización muy cercana a 353°K. Esta temperatura corresponde al valor obtenido en otros estudios en donde emplean DSC. En la Figura 20B se muestra un termograma de la lisozima en un medio con pH=4.5 con dicha técnica, en el que también se observa que la temperatura de desnaturalización es muy cercana a 353°K [[Efimova et al. \(2006\)](#)].



### 6.6.2. CP del CCMV variante silvestre

Una vez expresada y purificada, la CP se guardó a 4°C en los dos diferentes buffers (pH=4.8 y 7.5). Se comprobó su estabilidad en estas condiciones al realizar su caracterización por TSA de forma periódica a partir de las 24h de purificación. Después de un mes, la integridad de la CP seguía intacta al producir VLPs con la misma estabilidad y temperatura de desplegamiento (constantes y reproducibles). Aún así, en todos los experimentos que a continuación se describen se usó proteína recién purificada.

La caracterización biofísica de la CP del CCMV implicó el análisis de esta en buffer de pH=7.5, en el cual las CPs mantienen el estado de monómeros y/o dímeros, así como también en buffer de pH=4.8, en el cual la CP se auto-ensambla y se forman VLPs. En la Figura 21 se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP variante silvestre. Se puede observar que existen temperaturas de transición en los dos diferentes valores de pH, evidentes por los picos de la función. La CP variante silvestre a pH=4.8 presenta dos temperaturas de transición; la  $T_{M1}$  corresponde al desensamblaje de las VLPs y la  $T_{M2}$  corresponde a la temperatura de desnaturalización de la CP (monómero). Como se esperaba para el caso de pH=7.5, sólo se observa la  $T_{M2}$  ya que en este valor de pH no hay formación de VLPs.

Se realizaron 20 experimentos independientes de TSA con al menos tres repeticiones cada uno (61 mediciones en total) para cada valor de pH. Con estos datos se calculó el promedio y desviación estándar como se muestran en la Tabla 2. Los resultados fueron  $T_{M1}=33.0\pm 3.1^{\circ}\text{C}$  y  $T_{M2}=54.4\pm 3.0^{\circ}\text{C}$  para pH=4.8, mientras que

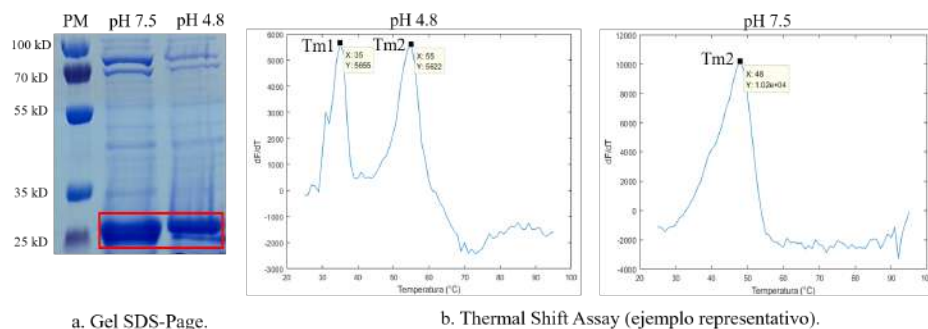


Figura 21: Análisis termodinámico de la CP del CCMV variante silvestre. **A)** Gel SDS-Page con proteína purificada. **B)** Perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP variante silvestre en buffer con pH=4.8 y pH=7.5.

para pH=7.5 se obtuvo  $T_{M2}=48.5\pm 2.8^{\circ}\text{C}$ .

### 6.6.3. CP del CCMV mutante E77Q

Para descartar que cualquier mutación hecha en la región de interfase de la CP del CCMV causara frustración o desestabilización en la formación de VLPs, en este estudio se incluyeron mutantes que no cumplieran los criterios de conservación de los *residuos clave*. Para tal fin, se escogieron al azar dos residuos no conservados localizados en la interfase del *dímero primario*, esto es, el dímero relacionado por un eje de simetría tipo *2-fold*.

El primero de estos es el residuo E77. Siguiendo la misma lógica que se usó para los *residuos clave*, la carga negativa del Glutamato (E) se neutralizó al mutarlo por una Glutamina (Q), manteniendo aproximadamente el volumen ocupado por

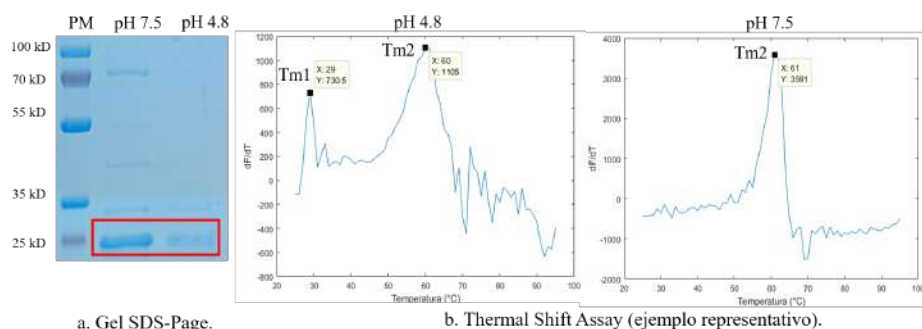


Figura 22: Análisis termodinámico de la CP mutante E77Q. **A)** Gel SDS-Page con proteína purificada. **B)** Perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante E77Q en buffer con pH=4.8 y pH=7.5.

la cadena lateral (Fig. 9). En la Figura 22 se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante E77Q. Se puede observar que existen temperaturas de transición en los dos diferentes valores de pH, evidentes por los picos de la función. Al igual que la CP variante silvestre, la mutante E77Q presenta dos temperaturas de transición a pH=4.8; la  $T_{M1}$  correspondiente al desensamblaje de las VLPs y la  $T_{M2}$  correspondiente a la temperatura de desnaturalización de la CP (monómero). Como se esperaba para el caso de pH=7.5, sólo se observa la  $T_{M2}$  ya que en este valor de pH no hay formación de VLPs.

Se realizaron experimentos independientes de TSA con al menos tres repeticiones cada uno; nueve para pH=4.8 (28 mediciones en total) y siete para pH=7.5 (23 mediciones en total). Con estos datos se calculó el promedio y desviación estándar como se muestran en la Tabla 2. Los resultados fueron  $T_{M1}=31.5\pm 3.0^{\circ}\text{C}$

y  $T_{M2}=57.0\pm 0.9^{\circ}\text{C}$  para  $\text{pH}=4.8$ , mientras que para  $\text{pH}=7.5$  se obtuvo  $T_{M2}=52.7\pm 4.2^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.6.4. CP del CCMV mutante V133N

El residuo V133 es el segundo control experimental que se eligió al azar dentro de la interfase del *dímero primario*. En este caso, la naturaleza hidrófoba de la Valina (V) se cambió por el residuo hidrofílico Asparagina (N), manteniendo aproximadamente el volumen ocupado por la cadena lateral (Fig. 9). En la Figura 23 se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante V133N. Se puede observar que existen temperaturas de transición en los dos diferentes valores de pH, evidentes por los picos de la función. De nuevo, y al igual que la CP variante silvestre, la mutante V133N presenta dos temperaturas de transición a  $\text{pH}=4.8$ ; la  $T_{M1}$  correspondiente al desensamblaje de las VLPs y la  $T_{M2}$  correspondiente a la temperatura de desnaturalización de la CP (monómero). Como se esperaba para el caso de  $\text{pH}=7.5$ , sólo se observa la  $T_{M2}$  ya que en este valor de pH no hay formación de VLPs.

Se realizaron experimentos independientes de TSA con al menos tres repeticiones cada uno; seis para  $\text{pH}=4.8$  (18 mediciones en total) y cinco para  $\text{pH}=7.5$  (15 mediciones en total). Con estos datos se calculó el promedio y desviación estándar como se muestran en la Tabla 2. Los resultados fueron  $T_{M1}=32.6\pm 2.9^{\circ}\text{C}$  y  $T_{M2}=47.9\pm 3.0^{\circ}\text{C}$  para  $\text{pH}=4.8$ , mientras que para  $\text{pH}=7.5$  se obtuvo  $T_{M2}=46.3\pm 2.8^{\circ}\text{C}$ .

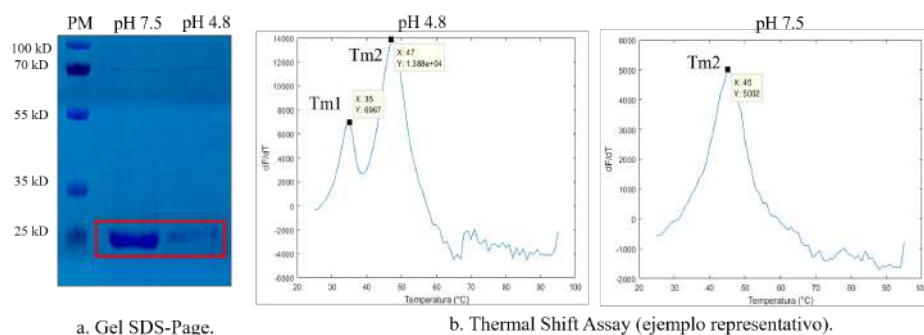


Figura 23: Análisis termodinámico de la CP mutante V133N. **A)** Gel SDS-Page con proteína purificada. **B)** Perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante V133N en buffer con pH=4.8 y pH=7.5.

### 6.6.5. CP del CCMV mutante E176Q

El residuo E176 está clasificado como *residuo clave* de la CP del CCMV, ya que cumple con los tres criterios de conservación antes descritos. Al igual que en el caso del residuo E77, la carga negativa del Glutamato (E) se neutralizó al mutarlo por una Glutamina (Q), manteniendo aproximadamente el volumen ocupado por la cadena lateral (Fig. 9). En la Figura 24 se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante E176Q. Se puede observar que existen temperaturas de transición en los dos diferentes valores de pH, evidentes por los picos de la función. Sin embargo, en contraste con la CP variante silvestre, la mutante E176Q presenta una sola temperatura de transición a pH=4.8; la  $T_{M1}$  correspondiente al desensamblaje de las VLPs no se observa, y la  $T_{M2}$  corresponde a la temperatura

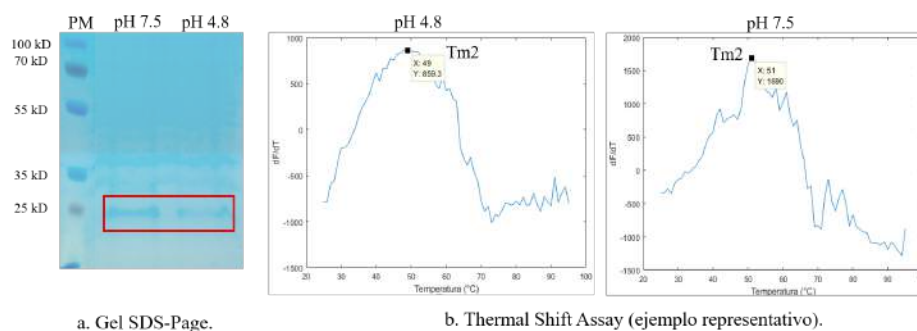


Figura 24: Análisis termodinámico de la CP mutante E176Q. **A)** Gel SDS-Page con proteína purificada. **B)** Perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante E176Q en buffer con pH=4.8 y pH=7.5.

de desnaturalización de la CP (monómero). Como se esperaba para el caso de pH=7.5, sólo se observa la  $T_{M2}$  ya que en este valor de pH no hay formación de VLPs.

Se realizaron experimentos independientes de TSA con al menos tres repeticiones cada uno; cinco para pH=4.8 (15 mediciones en total) y cuatro para pH=7.5 (12 mediciones en total). Con estos datos se calculó el promedio y desviación estándar como se muestran en la Tabla 2. Los resultados fueron  $T_{M1}$ =No observada y  $T_{M2}=51.8\pm 6.5^{\circ}\text{C}$  para pH=4.8, mientras que para pH=7.5 se obtuvo  $T_{M2}=53.9\pm 4.6^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.6.6. CP del CCMV mutante R179Q

El residuo R179 está clasificado como *residuo clave* de la CP del CCMV, ya que cumple con los tres criterios de conservación antes descritos. En este caso, la carga positiva de la Arginina (R) se neutralizó con el residuo Glutamina (Q), manteniendo aproximadamente el volumen ocupado por la cadena lateral (Fig. 9). En la Figura 25 se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante R179Q. Se puede observar que existen temperaturas de transición en los dos diferentes valores de pH, evidentes por los picos de la función. Aquí, la mutante R179Q presenta dos temperaturas de transición a pH=4.8; la  $T_{M1}$  correspondiente al desensamblaje de las VLPs y la  $T_{M2}$  correspondiente a la temperatura de desnaturalización de la CP (monómero). Como se esperaba para el caso de pH=7.5, sólo se observa la  $T_{M2}$  ya que en este valor de pH no hay formación de VLPs.

Se realizaron experimentos independientes de TSA con al menos tres repeticiones cada uno; tres para pH=4.8 (9 mediciones en total) y tres para pH=7.5 (9 mediciones en total). Con estos datos se calculó el promedio y desviación estándar como se muestran en la Tabla 2. Los resultados fueron  $T_{M1}=32.3\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y  $T_{M2}=52.8\pm 2.3^{\circ}\text{C}$  para pH=4.8, mientras que para pH=7.5 se obtuvo  $T_{M2}=50.7\pm 0.9^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.6.7. CP del CCMV mutante P188A

El residuo P188 está clasificado como *residuo clave* de la CP del CCMV, ya que cumple con los tres criterios de conservación antes descritos. Aquí, el volumen ocupado por la Prolina (P) se disminuyó considerablemente con el cambio al

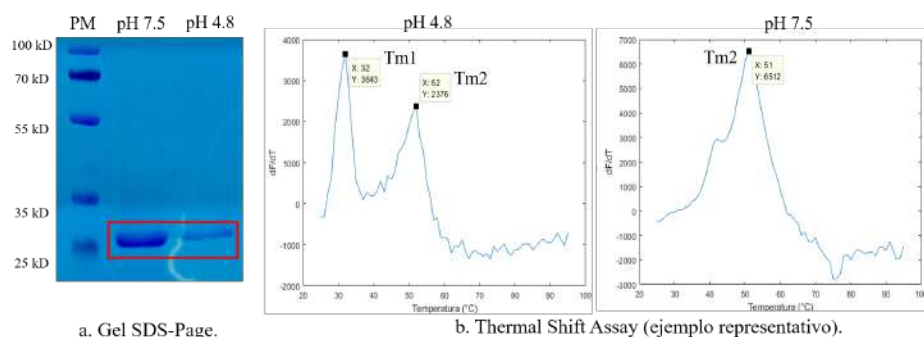


Figura 25: Análisis termodinámico de la CP mutante R179Q. **A)** Gel SDS-Page con proteína purificada. **B)** Perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante R179Q en buffer con pH=4.8 y pH=7.5.

residuo Alanina (A), ya que el tamaño de la cadena lateral del segundo es menor (Fig. 9). En la Figura 26 se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante P188A. Se puede observar que existen temperaturas de transición en los dos diferentes valores de pH, evidentes por los picos de la función. La mutante P188A presenta dos temperaturas de transición a pH=4.8; la  $T_{M1}$  correspondiente al desensamblaje de las VLPs y la  $T_{M2}$  correspondiente a la temperatura de desnaturalización de la CP (monómero). Como se esperaba para el caso de pH=7.5, sólo se observa la  $T_{M2}$  ya que en este valor de pH no hay formación de VLPs.

Se realizaron experimentos independientes de TSA con al menos tres repeticiones cada uno; tres para pH=4.8 (9 mediciones en total) y tres para pH=7.5 (9 mediciones en total). Con estos datos se calculó el promedio y desviación estándar como se muestran en la Tabla 2. Los resultados fueron  $T_{M1}=33.4\pm 1.2^{\circ}\text{C}$  y  $T_{M2}=50.7$



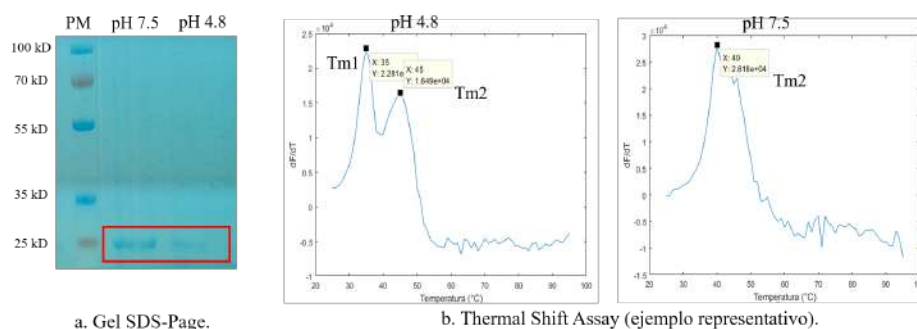


Figura 26: Análisis termodinámico de la CP mutante P188A. **A)** Gel SDS-Page con proteína purificada. **B)** Perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante P188A en buffer con pH=4.8 y pH=7.5.

$\pm 4.4^{\circ}\text{C}$  para pH=4.8, mientras que para pH=7.5 se obtuvo  $T_{M2}=46.9\pm 5.4^{\circ}\text{C}$ .

### 6.6.8. CP del CCMV mutante V189N

El residuo V189 está clasificado como *residuo clave* de la CP del CCMV, ya que cumple con los tres criterios de conservación antes descritos. Al igual que en el caso del residuo V133, la naturaleza hidrófoba de la Valina (V) se cambió por el residuo hidrofílico Asparagina (N), manteniendo aproximadamente el volumen ocupado por la cadena lateral (Fig. 9). En la Figura 27 se muestra un perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante V189N. Se puede observar que existen temperaturas de transición en los dos diferentes valores de pH, evidentes por los picos de la función. En contraste con la CP variante silvestre, la mutante V189N

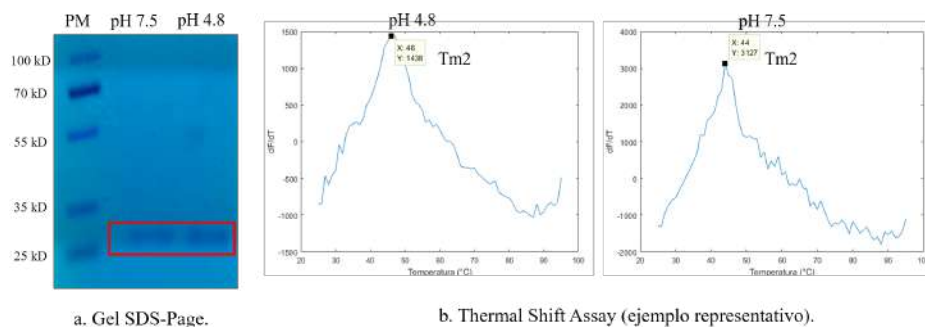


Figura 27: Análisis termodinámico de la CP mutante V189N. **A)** Gel SDS-Page con proteína purificada. **B)** Perfil típico del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) obtenido por la técnica de TSA para la CP mutante V189N en buffer con pH=4.8 y pH=7.5.

presenta una sola temperatura de transición a pH=4.8; la  $T_{M1}$  correspondiente al desensamblaje de las VLPs no se observa, y la  $T_{M2}$  corresponde a la temperatura de desnaturalización de la CP (monómero). Como se esperaba para el caso de pH=7.5, sólo se observa la  $T_{M2}$  ya que en este valor de pH no hay formación de VLPs.

Se realizaron experimentos independientes de TSA con al menos tres repeticiones cada uno; cuatro para pH=4.8 (12 mediciones en total) y tres para pH=7.5 (9 mediciones en total). Con estos datos se calculó el promedio y desviación estándar como se muestran en la Tabla 2. Los resultados fueron  $T_{M1}$ =No observada y  $T_{M2}$ = $46.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$  para pH=4.8, mientras que para pH=7.5 se obtuvo  $T_{M2}$ = $43.3 \pm 1.3^\circ\text{C}$ .

#### **6.6.9. Análisis comparativo de temperaturas de transición**

Finalmente, como complemento a la Tabla 2, en la Figura 28 se presenta un resumen comparativo de forma gráfica del comportamiento de las siete variantes de la CP del CCMV que se estudiaron en este trabajo.

Variante	pH 4.8						pH 7.5					
	T <sub>M1</sub> [°C]			T <sub>M2</sub> [°C]			T <sub>M1</sub> [°C]			T <sub>M2</sub> [°C]		
	n	avg±sdv	valor p	n	avg±sdv	valor p	n	avg±sdv	valor p	n	avg±sdv	valor p
Silvestre	61	33.0±3.1		64	54.4±3.0		61	48.5±2.8				
E077Q <sup>a</sup>	11	31.5±3.0	0.234	28	57.0±0.9	*0.004	23	52.7±4.2	*1.2E-4			
V133N <sup>a</sup>	16	32.6±2.9	0.359	18	47.9±3.0	*1.4E-8	15	46.3±2.8	0.014			
E176Q <sup>b</sup>	15	No VLP	na	15	51.8±6.5	0.154	12	53.9±4.6	*0.002			
R179Q <sup>b</sup>	9	32.3±0.5	0.156	9	52.8±2.3	0.083	9	50.7±0.9	*3.5E-5			
P188A <sup>b</sup>	9	33.4±1.2	0.396	9	50.7±4.4	0.035	9	46.9±5.4	0.398			
V189N <sup>b</sup>	12	No VLP	na	12	46.5±1.0	2.2E-16	9	43.3±1.3	*1.0E-8			

<sup>a</sup> Grupo control

<sup>b</sup> Residuos clave

\* Significancia estadística de prueba *t* contra CP variante silvestre

Tabla 2: Temperaturas de transición (T<sub>M<sub>i</sub></sub>) de las siete variantes de la CP del CCMV. Se probaron dos valores de pH diferentes; pH=4.8 condiciones de auto-ensamblaje de VLPs, y pH=7.5 condiciones de desensamblaje de VLPs. T<sub>M1</sub> es la temperatura de desensamblado de VLPs y T<sub>M2</sub> es la temperatura de desnaturalización de la proteína.

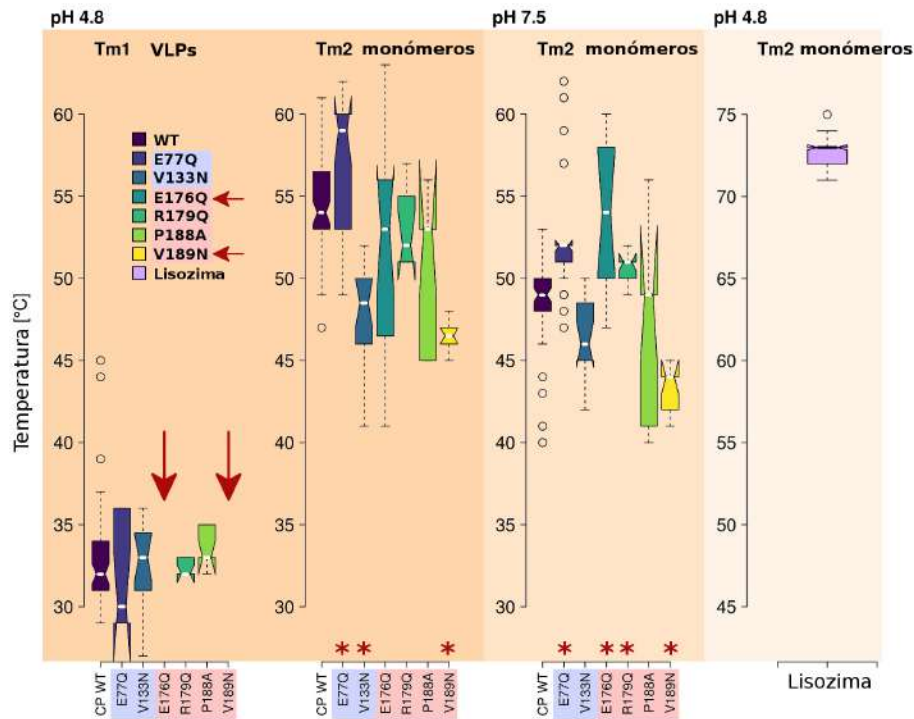


Figura 28: Auto-ensamblado de VLPs y estabilidad termodinámica de la CP del CCMV. Análisis estadístico (diagramas de caja) de dos condiciones diferentes (pH=4.8 y pH=7.5) para la CP variante silvestre (WT) del CCMV, dos residuos de interfase no conservados (E77Q y V133N), y los cuatro *residuos clave* (E176Q, R179Q, P188A, V189N). En el caso de las mutantes E176Q y V189N no se detectó formación de VLPs (flechas rojas). Todos los experimentos de TSA incluyeron la lisozima como un control positivo. \* valor  $p < 0.05$  en una prueba t con respecto a la CP variante silvestre.

## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la mutación puntual en ciertos *residuos clave* de la proteína de cápside del *Cowpea chlorotic mottle virus* impiden la formación de VLPs, sustentando nuestra hipótesis. En este trabajo hemos generado evidencia experimental que valida el poder de predicción teórica basada en criterios de conservación estructural para la identificación de estos residuos en virus icosaédricos. Nuestros hallazgos indican la importancia que puede tener un solo residuo de interfase y su papel en el mecanismo molecular de auto-ensamblaje de cápsides. Se debe resaltar que los *residuos clave* identificados en la interfase CP-CP del *dímero primario* del CCMV son significativamente sobresalientes sólo en la estructura cuaternaria, dado que la mutación remueve la contribución fisicoquímica de esos residuos a las interacciones intra e intermoleculares, pero no destruye el plegamiento de la estructura terciaria de la proteína, inhibiendo únicamente la formación de VLPs. Este efecto inhibitorio no se observa cuando la mutación se realiza en residuos de la misma interfase y con las mismas propiedades físicoquímicas pero que no son conservados. Aún más, nuestros resultados concuerdan con los resultados *in-silico* antes obtenidos por [Díaz-Valle et al. \(2019\)](#).

En nuestra definición, los *residuos clave* están localizados en las interfases CP-CP y están conservados tanto en secuencia como en estructura cuaternaria en todos los miembros de una familia de virus. En el caso del CCMV, miembro de la familia *Bromoviridae*, se predijeron un total de seis *residuos clave*, de los cuales estudiamos los cuatro que se localizan en la interfase del *dímero primario*. Los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmaron la formación de cápsides para la CP de la variante silvestre. Trás esta corroboración,

se realizaron ensayos de TSA para las variantes de CP del CCMV, donde observamos dos temperaturas de transición ( $T_{M1}$  y  $T_{M2}$ ) características al desensamblado de cápsides y desnaturalización de las proteínas, respectivamente, en la mayoría de los casos. Estos resultados son consistentes con trabajos previos en donde estudiaron la estabilidad de cápsides en otros modelos de virus, como los realizados por [Walter et al., 2012](#); [Toinon et al., 2015](#) y [Yang et al., 2017](#).

Particularmente importante, fue nuestro hallazgo referente al *residuo clave* E176. Encontramos que cuando se neutraliza su carga negativa, pero se mantiene el tamaño al sustituirlo con el amino ácido Glutamina (Q), no se detecta la formación de VLPs. Es decir, la remoción de una sola carga eléctrica en ese punto específico frustra la formación de la cápside. En una solución con pH=4.8 no se observan las dos temperaturas de transición características. En lugar de ello, se presenta una distribución más amplia en el perfil del cambio de fluorescencia con respecto a la temperatura. Esto sugiere la posibilidad de que existan varios estados oligoméricos intermedios estancados, sin llegar a formar la cápside. Es necesario continuar realizando estudios, por ejemplo con cromatografía de exclusión molecular, para verificar la estructura cuaternaria de las CPs. Por otro lado, la temperatura de desnaturalización  $T_{M2}$  de la mutante E176Q es similar a la observada en la CP variante silvestre. Esto muestra que dicha mutación no afectó la estructura terciaria de la CP y su plegado sigue siendo el mismo que la variante silvestre. Aún más, en un estudio previo se reportó que el residuo E176 de la CP del CCMV contribuye con más del 75 % de la energía libre de dimerización (para el *dímero primario*) [[Díaz-Valle et al. \(2019\)](#)], lo cual relacionamos con la ausencia de formación de VLPs. Es preciso señalar que en este trabajo se estudió una mutación similar en el residuo E77, el cual es un residuo localizado en la misma interfase donde se en-

cuentra el residuo E176 pero que no cumple con los criterios de conservación de un *residuo clave*. En este caso, la misma mutación de neutralización de carga con la Glutamina sí forma VLPs, indistinguibles de las VLPs variante silvestre. Este resultado muestra que la mutación E77Q no afecta la estructura cuaternaria de la cápside.

El segundo caso interesante es el *residuo clave* V189, cuya mutación puntual también inhibió la formación de VLPs. Un cambio de entorno no-polar a polar, al mutar la Valina por Asparagina (N), perturbó la interfase. Este efecto parece ser significativo solamente para el caso del *residuo clave*. Una mutación similar en el residuo V133 no afectó la estructura cuaternaria de las VLPs ni su estabilidad térmica, dando lugar a cápsides indistinguibles a la variante silvestre.

Con respecto a los otros dos *residuos clave*, la mutación R179Q elimina una interacción electrostática repulsiva y dos atractivas en la interfase del *dímero primario*, de acuerdo a un análisis de contactos reportado previamente [Díaz-Valle et al. (2019)]. Por otro lado, la mutación P188A mantiene un entorno hidrófobo pero aumenta la distancia de interacción entre dos contactos en la interfase. Ambas mutaciones deberían disminuir la estabilidad de dicho dímero. Sin embargo, estas dos mutaciones se comportan de forma indistinta a la variante silvestre. En una solución con pH=4.8, ambas variantes mostraron una temperatura de desensamblaje  $T_{M1}$  en los perfiles de cambio de fluorescencia con respecto a la temperatura, lo cual refleja la formación de VLPs. El valor de las temperaturas de esta transición fueron similares a las observadas para la CP variante silvestre. De esta forma, no observamos ningún efecto en la estabilidad ni en la formación de cápsides. En cuanto a la temperatura de desnaturalización  $T_{M2}$ , sus valores fueron similares a



la CP variante silvestre. Por otro lado, en una solución con  $\text{pH}=7.5$  el valor de la  $T_{M2}$  de la mutante P188A fue estadísticamente igual a la variante silvestre. Por el contrario, en el caso de la mutante R179Q fue significativamente distinto respecto a la CP variante silvestre, ya que disminuyó la temperatura a la cual la CP es desnaturalizada. Probablemente esto se deba al efecto que tuvo esta mutación sobre la estructura terciaria de la proteína, desestabilizando un poco su plegamiento por lo que se sugiere realizar otro estudio para comprobar el estado de ésta. Una opción podría ser la resonancia magnética nuclear (NMR). A pesar de esto, es importante recordar que las VLPs variante silvestre no se forman en una solución *in-vitro* con un valor de  $\text{pH}>5$ .

Hemos demostrado en este trabajo que los *residuos clave* E176 y V189 de la CP del CCMV contribuyen en gran medida a la afinidad de unión y formación del *homodímero primario* relacionado por un eje de simetría tipo *2-fold*, primer paso en la cinética de formación de la cápside. Nuestros hallazgos a través de mutagénesis sobre la formación y estabilidad térmica de VLPs utilizando la técnica de TSA son evidencia de que la identificación teórica de *residuos clave* basada en la conservación estructural tiene alto poder predictivo. Dado que aparentemente los *residuos clave* R179 y P188 de la CP del CCMV no son relevantes para la formación o la estabilidad de la cápside, debe haber otro factor evolutivo importante que los haya fijado en secuencia y estructura. El origen y naturaleza de tal presión de selección será objeto de otro estudio. Nuestros resultados sobre la estabilidad de partículas tipo virus ayudan a avanzar nuestro entendimiento de los mecanismos implicados en las interacciones proteína-proteína, siendo estas el proceso biofísico responsable del auto-ensamblaje de la cápside. En este sentido, logramos probar que existen regiones que producen una alta inestabilidad termodinámica que lle-

gan a frustrar la formación de complejos CP-CP. Con ello, la realización de este tipo de estudios dan lugar a la propuesta de que los *residuos clave* son potenciales blancos antivirales.

## 8. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se validó experimentalmente, *in-vitro*, la identificación de *residuos clave* previamente predichos teóricamente. Las mutaciones realizadas sobre estos residuos en la CP del *Cowpea chlorotic mottle virus* afectaron la estabilidad y la formación de partículas tipo virus (VLPs). Se sugiere continuar caracterizando las mutantes R179 y P188, las cuales presentaron formación de VLPs, para intentar dilucidar cuál es la presión de selección que los ha fijado en secuencia y estructura cuaternaria. Así mismo, se recomienda profundizar el estudio de las estructuras cuaternarias del resto de las mutantes por medio de cromatografía de exclusión molecular para examinar los estados oligoméricos presentes en soluciones con valores de pH bajos. Así mismo, sería interesante verificar el estado de la estructura terciaria de las proteínas (plegamiento) por medio del uso de resonancia magnética nuclear (NMR), o la proporción de estructuras secundarias con dicroísmo circular (DC). Además, sería recomendable ampliar la caracterización *in-vitro* con otras mutaciones *clave* sobre los mismo residuos, pero probando distintos amino ácidos para esclarecer el efecto en el tipo de interacciones y cómo estas afectan la estabilidad y formación de VLPs.

Nuestro estudio se enfocó en el análisis de los *residuos clave* de uno de los miembros de la familia *Bromoviridae*. Dado el criterio de conservación empleado en la identificación de dichos residuos, podemos especular que estas posiciones serán igualmente relevantes en la estabilidad y formación del resto de los miembros de esa familia. Finalmente, es razonable pensar que se puede realizar con certeza la identificación de los *residuos clave* en otras familias de virus de topología icosaédrica que sea de particular interés para diferentes ámbitos de la ciencia.

## 9. REFERENCIAS

- J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer. *Protein Structure and Function*. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman, 2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21177>.
- M. J. Betts and R. B. Russell. *Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions*. Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data, Second Edition, 2007. ISBN 9780470059180. URL <http://doi.org/10.1002/9780470059180.ch13>.
- M. Carrillo-Tripp, C. Brooks, and V. S Reddy. A novel method to map and compare protein-protein interactions in spherical viral capsids. *Proteins*, 73:644–55, 11 2008. doi: 10.1002/prot.22088.
- M. Carrillo-Tripp, C. M. Shepherd, I. A. Borelli, S. Venkataraman, G. Lander, P. Natarajan, J. E. Johnson, C. L. Brooks, III, and V. S. Reddy. Viperdb2: an enhanced and web api enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Research*, 37, 2009. doi: 10.1093/nar/gkn840.
- M. Carrillo-Tripp, D. Montiel-Garcia, C. L Brooks, and V. S. Reddy. Capsidmaps: Protein–protein interaction pattern discovery platform for the structural analysis of virus capsids using google maps. *Journal of structural biology*, 190, 02 2015. doi: 10.1016/j.jsb.2015.02.003.
- G. Chávez-Calvillo. La proteína de la cápside de los virus: un acercamiento a su estructura y ensamblaje. Master’s thesis, Cinvestav, 2011.
- A. Díaz-Valle. Localización y análisis teórico-experimental de residuos clave en

- las interfases proteína-proteína esenciales para el proceso de auto-ensamblado de la cápside del *Cowpea chlorotic mottle virus*. Master's thesis, Cinvestav, 2014.
- A. Díaz-Valle, G. Chávez-Calvillo, and M. Carrillo-Tripp. *in silico* binding free energy characterization of cowpea chlorotic mottle virus coat protein homodimer variants. *Advances in Computational Biology*, 232:21–28, 2014. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-01568-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-01568-2_4).
- A. Díaz-Valle, Y. M. García-Salcedo, G. Chávez-Calvillo, L. Silva-Rosales, and M. Carrillo-Tripp. Highly efficient strategy for the heterologous expression and purification of soluble cowpea chlorotic mottle virus capsid protein and *in vitro* pH-dependent assembly of virus-like particles. *Journal of virological methods*, 225:23, 09 2015.
- A. Díaz-Valle, J. M. Falcón-González, and M. Carrillo-Tripp. Hot-spots and their contribution to the self-assembly of the viral capsid: *in-silico* prediction and analysis. *bioRxiv*, 2019. doi: 10.1101/723023. URL <https://www.biorxiv.org/content/early/2019/08/06/723023>.
- Y. M. Efimova, S. Haemers, B. Wierczinski, W. Norde, and A. A. van Well. Stability of globular proteins in h<sub>2</sub>o and d<sub>2</sub>o. *Biopolymers*, 85:264–273, 12 2006. doi: <https://doi.org/10.1002/bip.20645>.
- J. Figueira-Mansur, E. A. Aguilera, R. M. Stoque, G. T. Ventura, and R. Mohana-Borges. Mutations in the dimer interfaces of the dengue virus capsid protein affect structural stability and impair rna-capsid interaction. *Scientific Reports*, 9:2829, 02 2019. doi: <https://doi.org/10.1021/jp8079765>.

- S. Grosdidier and J. Fernández-Recio. Identification of hot-spot residues in protein-protein interactions by computational docking. *BMC Bioinformatics*, page 447, 10 2008. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-447>.
- M. Hema, G. Vishnu Vardhan, H. Savithri, and M. Murthy. Emerging trends in the development of plant virus-based nanoparticles and their biomedical applications. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 6: 61–82, 12 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00006-4>.
- C. Hurt, V. Lingappa, and W. J. Hansen. The emergence of small-molecule inhibitors of capsid assembly as potential antiviral therapeutics. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 46:283–297, 12 2011. doi: [10.1016/B978-0-12-386009-5.00010-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386009-5.00010-2).
- J. Jakob, C. Kraff, K. Welfle, H. Welfle, and W. Saenger. Melting points of lysozyme and ribonuclease a crystals correlated with protein unfolding: a raman spectroscopic study. *Acta Crystallographica*, 54:74–80, 07 1998. doi: <https://doi.org/10.1107/s0907444997010603>.
- C. Kaiser, M. Flenniken, E. Gillitzer, A. Harmsen, A. Harmsen, M. Jutila, T. Douglas, and M. Young. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 2:715–733, 01 2007.
- O. Keskin, B. Ma, and R. Nussinov. Hot regions in protein–protein interactions: The organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *Journal of Molecular Biology*, 345(5):1281 – 1294, 2005. ISSN 0022-2836. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.077>.

- T. Kortemme, D. E. Kim, and D. Baker. Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Science Signaling*, 2004(219):p12, 2004.
- L. Lavelle, M. Gingery, M. Phillips, W. Gelbart, C. Knobler, R. Cadena-Nava, J. Vega-Acosta, L. Pinedo-Torres, and J. Ruiz-Garcia. Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113:3813–3819, 01 2009. doi: <https://doi.org/10.1021/jp8079765>.
- V. Le Brun, W. Friess, S. Bassarab, and P. Garidel. Correlation of protein-protein interactions as assessed by affinity chromatography with colloidal protein stability: a case study with lysozyme. *Pharmaceutical Development and Technology*, 15:421–430, 06 2010. doi: <https://doi.org/10.3109/10837450903262074>.
- A. Leitner. Cross-linking and other structural proteomics techniques: how chemistry is enabling mass spectrometry applications in structural biology. *Chemical Science*, 7:4792–4803, 04 2016. doi: <https://doi.org/10.1039/C5SC04196A>.
- L. O. Liepold, J. Revis, M. Allen, L. Oltrogge, M. Young, and T. Douglas. Structural transitions in cowpea chlorotic mottle virus (ccmv). *Physical Biology*, 2(4):S166, 2005. URL <http://stacks.iop.org/1478-3975/2/i=4/a=S11>.
- D. J. Montiel-García, R. V. Mannige, V. S. Reddy, and M. Carrillo-Tripp. Structure based sequence analysis of viral and cellular protein assemblies. *Journal of Structural Biology*, 196(3):299 – 308, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.013>.
- J. Murray, N. Laurieri, and R. Delgoda. *Proteins*. Pharmacognos, 2017. URL <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00024-X>.

- J. E. Nettleship, J. Brown, M. R. Groves, and A. Geerlof. *Methods for Protein Characterization by Mass Spectrometry, Thermal Shift (ThermoFluor) Assay, and Multiangle or Static Light Scattering*, pages 299–318. Humana Press, Totowa, NJ, 2008. ISBN 978-1-60327-058-8. doi: 10.1007/978-1-60327-058-8\_19. URL [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-058-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-058-8_19).
- B. S Zerbe, D. R Hall, S. Vajda, A. Whitty, and D. Kozakov. Relationship between hot spot residues and ligand binding hot spots in protein-protein interfaces. *Journal of chemical information and modeling*, 52:2236–44, 07 2012. doi: 10.1021/ci300175u.
- J. Schymkowitz, J. Borg, F. Stricher, R. Nys, F. Rousseau, and L. Serrano. The foldx web server: an online force field. *Nucleic Acids Research*, 33:W382–W388, 2005.
- J. A. Speir, S. Munshi, G. Wang, T. S. Baker, and J. E. Johnson. Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by x-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*, 3(1): 63 – 78, 1995. ISSN 0969-2126. doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00135-6). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212601001356>.
- S. B. Timmermans, D. F. M. Vervoort, L. Schoonen, R. J. M. Nolte, and J. C. M. van Hest. Self-assembly and stabilization of hybrid cowpea chlorotic mottle virus particles under nearly physiological conditions. *Chemistry an Asian Journal*, 13:3518–3525, 07 2018. doi: <https://doi.org/10.1002/asia.201800842>.
- A. Toinon, F. Greco, N. Moreno, M. C. Nicolai, F. Guinet-Morlot, C. Manin, and



- F. Ronzon. Study of rabies virus by differential scanning calorimetry. *Biochemistry and Biophysics Reports*, page 329–336, 10 2015. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.10.010.
- A. K. Udit. *Protein Scaffolds Design, Synthesis, and Applications*. Humana Press, New York, NY, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7893-9,.
- A. G. Valdez-Lara, M. Andrade-Medina, J. A. Alemán-Vilis, A. A. Pérez-Montoya, N. Pineda-Aguilar, E. Martínez-Guerra, P. Gaytán, and M. Carrillo-Tripp. Hot-spots and their contribution to the self-assembly of the viral capsid: in-vitro validation. *bioRxiv*, 2019. doi: 10.1101/724146.
- M. Van Regenmortel and B. W.J. Mahy. Emerging issues in virus taxonomy. *Emerging infectious diseases*, 10:8–13, 02 2004. doi: 10.3201/eid1001.030279,.
- T. Walter, J. Ren, T. J Tuthill, D. Rowlands, D. Stuart, and E. E Fry. A plate-based high-throughput assay for virus stability and vaccine formulation. *Journal of virological methods*, 185:166–70, 06 2012. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.06.014.
- Y. Yang, Q. Zhao, Z. Li, L. Sun, G. Ma, S. Zhang, and Z. Su. Stabilization study of inactivated foot and mouth disease virus vaccine by size-exclusion hplc and differential scanning calorimetry. *Vaccine*, 35:2413–2419, 04 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.037>.
- A. Zlotnick, R. Aldrich, J. M. Johnson, P. Ceres, and M. J. Young. Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*, 277 (2):450 – 456, 2000. ISSN 0042-6822. doi: <https://doi.org/10.1006/viro>.

2000.0619. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682200906196>.

## **Apéndices**

### **10. Protocolo de extracción de ADN plasmídico Kit NucleoSpin Plasmid/ Plasmid (No Lid): Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli***

#### **10.1. Preparación del cultivo**

A partir de un cultivo de E.Coli, se toma una alícuota de 5 mL y se centrifuga por 30 s a 11 000 g por 1 minuto. Al finalizar se desecha el sobrenadante con precaución de no desechar la pastilla (pellet).

#### **10.2. Lisis celular**

- Añadir 250  $\mu$ L de Buffer A1 y se re-suspender la pastilla (pellet) por pipeteo o vortexo.
- Añadir 250  $\mu$ L de Buffer A2 y se mezcla de 6 a 8 veces por inversión.
- Añadir 300  $\mu$ L de Buffer A3 y se mezcla de 6 a 8 veces por inversión.

#### **10.3. Clarificación del lisado**

- Se centrifuga por 5 minutos a 11 000 g a temperatura ambiente. Al termino se decanta el sobrenadante y es guardado, mientras tanto la pastilla (pellet) es desechada.

#### **10.4. Unión del ADN**

- El sobrenadante del paso anterior (750  $\mu\text{L}$  aprox) se pasa a una columna NucleoSpin@ Plasmid/Plasmid Column con un tubo de recolección de 2 mL y se centrifuga por 1 minuto a 11 000 g. - Se desecha el sobrenadante (recolectado en el tubo de 2 mL). - Se repiten los pasos anteriores hasta terminar el sobrenadante.

#### **10.5. Lavado en membrana de silica**

- A la columna NucleoSpin@ Plasmid/Plasmid Column se le añaden 600  $\mu\text{L}$  de Buffer A4. - Centrifugar por 1 minuto a 11 000 g. - Descartar el sobrenadante.

#### **10.6. Secado de la membrana de silica**

- Centrifugar por 2 minutos a 11 000 g y descartar el tubo colector de 2 mL.

#### **10.7. Elución del ADN**

- Cambiar la columna a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. - Agregar 30  $\mu\text{L}$  de Buffer AE. - Centrifugar por 1 minuto a 11 000 g. - Desechar la columna y guardar el tubo eppendorf a  $-2^{\circ}\text{C}$ .