

# SEBBM DIVULGACIÓN

## ACÉRCATE A NUESTROS CIENTÍFICOS

### La Crio-Microscopía Electrónica para el estudio de virus y aplicaciones biotecnológicas

DOI: [http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_ANC.2020.06.1](http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2020.06.1)

**José R. Castón**

Centro Nacional de Biotecnología - CSIC, Madrid



#### Biografía

José R. Castón es el investigador principal del Laboratorio de Máquinas Moleculares Virales en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en Madrid. Se graduó en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) en 1988, y realizó su tesis doctoral en el Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), bajo la dirección de José Berenguer Carlos y José L. Carrascosa, estudiando la proteína de la capa S de *Thermus thermophilus* mediante microscopía electrónica convencional (1988-1992). En el periodo postdoctoral (1993-1997) en el laboratorio de Alasdair C. Steven (NIH, Bethesda, EEUU) realizó el análisis estructural del virus L-A de levadura. En esta etapa se especializó en la crio-microscopía electrónica tridimensional que permite determinar la estructura 3D en condiciones nativas. Cuando se incorporó al sistema de investigación español, inicialmente con el Dr. Carrascosa (CNB-CSIC), implementó la metodología de la crio-ME, así como la reconstrucción tridimensional de virus icosaédricos. Como investigador Ramón y Cajal (2001-2006) constituyó su propio grupo de investigación, y en el año 2006 obtuvo una plaza de científico titular del CSIC, que consolidó como investigador científico del CSIC en 2010. Sus investigaciones se centran en el análisis estructural, funcional y evolutivo de virus de diversa complejidad, implementando la determinación directa de la estructura atómica de las proteínas a partir de imágenes de crio-ME. El análisis estructural es complementado con el estudio de las propiedades mecánicas mediante microscopía de fuerzas atómicas. Estos estudios combinados han desembocado en la actualidad en el área de la virotecnología estructural.

#### Resumen

**Los virus son ensamblados macromoleculares dinámicos y metaestables que representan un paradigma de optimización de recursos. Una o unas pocas proteínas se autoensamblan en un nanocontenedor multifuncional, la cápsida. La crio-microscopía electrónica permite el análisis estructural de los virus a resolución cuasi-atómica, un paso necesario para desarrollar nuevas terapias y utilizarlos como plataformas en aplicaciones biotecnológicas.**

#### Summary

**Viruses are dynamic and metastable macromolecular assemblies. They constitute a paradigm of the economy of genomic resources, in which a few building blocks self-assemble into precisely defined nanosized structures. Although studied mostly as pathogens, their properties have led to explore virus capsids as versatile platforms for nanotechnological applications. For that, cryo-EM is ideal to determine the structure of viruses at near atomic resolution.**

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA: [http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos\\_10/acercate-a-nuestros-cientificos\\_107](http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107)

Las unidades funcionales de la vida son complejas asociaciones de macromoléculas altamente ordenadas que controlan todos los procesos fundamentales en la célula. Estas máquinas moleculares son ensamblados dinámicos de proteínas (algunos contienen ácidos nucleicos) que convierten la energía química en cambios conformacionales. La comprensión de estos procesos requiere establecer la organización estructural de sus componentes individuales; muchos de estos procesos celulares se han descubierto directa o indirectamente a través del estudio de virus. Aunque las cápsidas virales están implicadas en múltiples funciones durante el ciclo viral, muchas contienen solo unas pocas proteínas que, a partir de su polimorfismo estructural, se autoensamblan para formar un contenedor proteico con simetría icosaédrica o helicoidal.

Los nanocontenedores proteicos como las cápsidas virales están muy extendidos en la naturaleza, desde la capsulina y la chaperona GroEL/ES en bacterias, hasta los vaults y ferritinas en eucariotas. Estas "nanocajas" proteicas están siendo analizadas para aplicaciones en nanotecnología, nanomedicina y ciencias de los materiales, ya que pueden modificarse química y/o genéticamente, y su cavidad puede almacenar distintos cargos moleculares. Estos nanocontenedores son excelentes plataformas como nanoreactores, vehículos de transporte de fármacos y presentación de antígenos, en medicina de imagen, o como orgánulos artificiales. Las pseudo-partículas virales (VLPs), o cápsidas no-infecciosas derivadas de virus que carecen del genoma viral, constituyen una plataforma óptima para el desarrollo de nuevos sistemas biomiméticos. Para ello, el análisis de la estructura atómica de las VLPs, sus propiedades mecánicas, así como el ensamblaje de las proteínas estructurales son necesarios, no sólo para comprender los procesos naturales en los que están implicadas, sino también para determinar cómo pueden ser rediseñadas para desarrollar nuevas funcionalidades.



Sociedad Española  
de Bioquímica y  
Biología Molecular

La criomicroscopía electrónica tridimensional (crio-ME 3D) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) de virus y cápsidas virales son complementarias para analizar la estrecha relación estructura-función. Mientras que la crio-ME 3D permite la visualización directa de ensamblados macromoleculares en su conformación nativa y en su contexto celular, mediante AFM se determinan propiedades mecánicas como la flexibilidad, la fragilidad y la respuesta a interacciones con otros factores externos. Recientemente, la crio-ME ha revolucionado la biología estructural, y es posible determinar a resolución atómica la estructura de numerosos ensamblados macromoleculares a partir de varios miles de imágenes bidimensionales adquiridas con un detector directo de electrones. Además de posibilitar el análisis dinámico de los ensamblados virales, la crio-ME tridimensional se ha constituido en una herramienta óptima para el desarrollo de ensamblados virales más eficientes, y la virotecnología estructural es una realidad.

Desde hace más de 15 años, mi laboratorio de Máquinas Moleculares Virales en el Centro Nacional de Biotecnología/CSIC ha caracterizado el polimorfismo estructural y temporal de numerosas cápsidas virales y otros complejos virales como las RNA-polimerasas (sin simetría interna), el genoma viral empaquetado, y estructuras filamentosas con simetría helicoidal [<http://www.cnb.csic.es/~jrcaston/Caston-lab/Home.html>]. La cápsida viral está implicada en múltiples funciones: se ensambla en un compartimento cerrado, selecciona el ácido nucleico viral en el entorno celular, protege el genoma viral durante su transporte de un hospedador a otro, reconoce su receptor específico, se internaliza en la célula huésped y, finalmente, libera el ácido nucleico para su replicación. Algunas cápsidas incluso participan activamente en la replicación del genoma. Por tanto, la visión de las cápsidas como estructuras cerradas e inertes es inadecuada y deben ser consideradas estructuras dinámicas y metaestables. Mi grupo está trabajando con distintos sistemas virales de diversa complejidad. Nuestros estudios en el virus de la bursitis infecciosa (IBDV), un virus RNA de cadena doble (dsRNA), abarcan todos los procesos clave de su ciclo viral. El ensamblaje de IBDV, similar al de los bacteriófagos dsDNA, se inicia con una procápsida basada en una proteína de andamiaje transitoria. Sin embargo, la proteína de la cápsida es similar a la de los picornavirus (virus RNA de cadena sencilla de polaridad positiva que incluyen muchos patógenos humanos), y su genoma está organizado como complejos ribonucleoproteicos, típicos de virus ssRNA de polaridad negativa. Es decir, desde un punto de vista evolutivo, IBDV comprende características de los diversos linajes virales actuales. Los análisis estructurales a resolución

cuasi-atómica se han extendido a otros sistemas más simples como los virus dsRNA de hongos, en particular el chrysovirus de *Penicillium chrysogenum* (PcV) y el quadrivirus de *Rosellinia necatrix* (RnQV1), y los virus ssRNA del resfriado humano (rinovirus humano tipo 2, HRV2) y de la fiebre hemorrágica del conejo (RHDV).

El amplio conocimiento sobre la estructura y función de numerosas proteínas y cápsidas virales nos ha permitido plantearnos introducir modificaciones en sus estructuras para desarrollar nuevos nanocontenedores y nanotransportadores. En este sentido hemos construido VLPs quiméricas de IBDV que contienen epítopos de distintas proteínas del virus de la gripe humana. También hemos analizado VLPs híbridas del virus del moteado clorótico del guisante (CCMV) conteniendo cromóforos con interés médico como las ftalocianinas, o como nanocontenedor para reacciones en cascada catalizadas por varias enzimas, y del bacteriófago P22 con distintas proteínas heterólogas. Otras cápsidas que estamos analizando para el desarrollo de futuras aplicaciones biotecnológicas son las del picobirnavirus humano y la capsulina bacteriana. Es decir, las aplicaciones biotecnológicas basadas en el conocimiento de la estructura de los virus están en pleno desarrollo en nuestro grupo.

**Referencias:**

1. R. Castón and J.L. Carrascosa (2013). The basic architecture of viruses. *Subcell. Biochem.* **68**, 53-75.
2. D. Luque, J. Gómez-Blanco, D. Garriga, A.F. Brilot, J.M. González, W.M. Havens, J.L. Carrascosa, B.L. Trus, N. Verdaguer, S.A. Ghabrial and J.R. Castón (2014). Cryo-EM near-atomic structure of a dsRNA fungal virus shows ancient structural motifs preserved in the dsRNA viral lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7641-7646.
3. R.M. Putri, C. Allende-Ballester, D. Luque, R. Klem, K.-A. Rousou, A. Liu, C. H.-H. Traulsen, W.F. Rurup, M.S.T. Koay, J.R. Castón and J.J.L.M. Cornelissen (2017). Structural characterization of native and modified capsulins as nanoplatforams for in vitro catalysis and cellular uptake. *ACS Nano* **11**, 12796-12804.
4. C.P. Mata, D. Luque, J. Gómez-Blanco, J.M. Rodríguez, J.M. González, N. Suzuki, S.A. Ghabrial, J.L. Carrascosa, B.L. Trus and J.R. Castón (2017). Acquisition of functions on the outer capsid surface during evolution of double-stranded RNA fungal viruses. *PLoS Pathog* **13**, e1006755 (2017).
5. C.P. Mata, J. Mertens, J. Fontana, D. Luque, C. Allende-Ballester, D. Reguera, B.L. Trus, A.C. Steven, J.L. Carrascosa, and J.R. Castón (2018). The RNA-binding protein of a double-stranded RNA virus acts like a scaffold protein. *J. Virol.* **92**, e00968-18
6. M.V. de Ruiter, R. Klem, D. Luque, J.J.L.M. Cornelissen and J.R. Castón (2019). Structural nanotechnology: three-dimensional cryo-EM and its use in the development of nanoplatforams for in vitro catalysis. *Nanoscale* **11**, 4130-4146.
7. D. Luque and J. R. Castón (2020). Cryo-electron microscopy for the study of virus assembly. *Nat Chem Biol* **16**, 231-239.

**Figura. Diversas aplicaciones biotecnológicas de los virus como nanocontenedores proteicos.**

