



# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

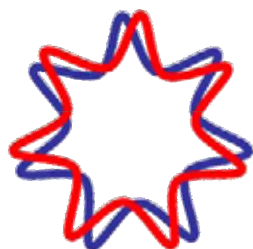
## **Desarrollo de nanopartículas mediante la funcionalización de proteínas virales de rotavirus**

**T E S I S**

**que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Bioquímicas**

**PRESENTA**

**M.C. Germán Plascencia Villa**



**Cuernavaca, Morelos 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de CONACyT (beca 171180), CONACyT Apoyo integral para la formación de Doctores en Ciencia (10006-2006-01), CONACyT-Morelos (2004-C02-058), CONACyT-Salud (2007-C01-69911), PAPIIT-UNAM (206407 y 224409) y CONACyT-CB (101847).

*Todo este trabajo y esfuerzo ha sido por y para mis padres y toda la familia Plascencia Villa.*



# AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez** y **Dra. Laura A. Palomares** por su tutoría durante la realización del proyecto.

A los miembros del **Comité Tutorial**: Dr. José M. Saniger y Dr. Eduardo Horjales.

A los miembros del **Comité de Candidatura**: Dr. Baltazar Becerril, Dr. Ramón González, Dra. Susana López y Dr. Roberto Stock.

A los miembros del **Jurado**: Dr. Jorge A. Ascencio, Dr. Tomás López, Dr. Rafael Vázquez y Dr. Enrique Rudiño.

**Por el apoyo técnico**: Dr. Jimmy A. Mena, MC Ana Ruth Pastor y MC Vanessa Hernández, Dra. Guadalupe Zavala y Dra. Rossana Sánchez (Unidad de Microscopia IBt UNAM), Dra. Alba Neri Lecona (Unidad de Microscopia INSP), Dr. Ariosto Medina (IIM-UMSNH), Dr. Edgar Álvarez Zauco (Fac. Ciencias UNAM), MC Andrés Rodríguez (ICN UNAM), MA Mario Trejo y MC Martin Patiño (Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología IBt UNAM).

A todos y cada uno de los integrantes de los **Grupos OTR y Galindo**.

A todos aquellos que directa o indirectamente ayudaron a la realización y buen término de este proyecto.

# ÍNDICE

|            |   |     |
|------------|---|-----|
|            | ÍNDICE  | i   |
|            | ÍNDICE DE FIGURAS   | iii |
| CAPÍTULO 1 | RESUMEN   | 1   |
| CAPÍTULO 2 | INTRODUCCIÓN  | 3   |
| CAPÍTULO 3 | ANTECEDENTES  | 6   |
|            | 3.1. <i>Conceptos de la nanoescala.</i>   | 7   |
|            | 3.2. <i>Biomoléculas como templado para sintetizar nanomateriales.</i>                    | 8   |
|            | 3.3. <i>Proteínas virales como templado para sintetizar nanomateriales.</i>               | 11  |
|            | 3.4. <i>Proteínas virales como medio para encapsular nanomateriales.</i>                  | 16  |
|            | 3.5. <i>Rotavirus como templado para sintetizar nanomateriales.</i>                       | 17  |
| CAPÍTULO 4 | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS   | 22  |
|            | 4.1. <i>Hipótesis.</i>  | 22  |
|            | 4.2. <i>Objetivo general.</i>   | 22  |
|            | 4.3. <i>Objetivos específicos.</i>  | 22  |
| CAPÍTULO 5 | MATERIALES Y MÉTODOS  | 23  |
|            | 5.1. <i>Líneas celulares, baculovirus y cultivo celular.</i>                              | 23  |
|            | 5.2. <i>Purificación de proteínas recombinantes.</i>                                      | 23  |
|            | 5.3. <i>Electroforesis y western blot.</i>  | 24  |
|            | 5.4. <i>Cuantificación de proteínas.</i>  | 25  |
|            | 5.5. <i>Funcionalización de proteínas virales.</i>  | 25  |
|            | 5.6. <i>Caracterización de proteínas virales funcionalizadas.</i>                         | 25  |
|            | 5.6.1. <i>Espectroscopia de absorción UV-Vis.</i>   | 25  |
|            | 5.6.2. <i>Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz.</i>                      | 25  |
|            | 5.6.3. <i>Microscopia de transmisión electrónica (TEM) y de alta resolución (HR-TEM).</i> | 26  |
|            | 5.6.4. <i>Análisis de imágenes de microscopia electrónica.</i>                            | 26  |
|            | 5.6.5. <i>Actividad catalítica de proteínas funcionalizadas.</i>                          | 26  |
|            | 5.6.6. <i>Conductividad de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas</i>            | 26  |
|            | 5.7. <i>Análisis de estructura de proteína VP6.</i>                                       | 27  |

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO 6</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | <b>28</b> |
| 6.1.              | <i>Producción recombinante de proteínas estructurales de rotavirus.</i>  | 28        |
| 6.2.              | <i>Purificación de proteínas estructurales de rotavirus.</i>   | 31        |
| 6.2.1.            | <i>Clarificación y ultrafiltración.</i>  | 31        |
| 6.2.2.            | <i>Cromatografía de intercambio aniónico.</i>  | 32        |
| 6.2.3.            | <i>Cromatografía de exclusión molecular.</i>   | 34        |
| 6.3.              | <i>Caracterización de proteínas estructurales de rotavirus.</i>  | 35        |
| 6.3.1.            | <i>Pureza de proteínas recombinantes purificadas.</i>  | 35        |
| 6.3.2.            | <i>Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz.</i>  | 36        |
| 6.3.3.            | <i>Microscopía de transmisión electrónica.</i>   | 41        |
| 6.4.              | <i>Funcionalización de proteínas estructurales de rotavirus.</i>   | 44        |
| 6.4.1.            | <i>Espectroscopia de absorción UV-Vis.</i>   | 44        |
| 6.5.              | <i>Caracterización de proteínas estructurales de rotavirus funcionalizadas.</i>  | 48        |
| 6.5.1.            | <i>Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz.</i>  | 48        |
| 6.5.2.            | <i>Funcionalización de VP6 con plata (Ag).</i>   | 49        |
| 6.5.3.            | <i>Funcionalización de VP6 con oro (Au).</i>   | 55        |
| 6.5.4.            | <i>Funcionalización de VP6 con platino (Pt).</i>   | 60        |
| 6.5.5.            | <i>Funcionalización de VP6 con paladio (Pd).</i>   | 65        |
| 6.5.6.            | <i>Actividad catalítica de los tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas.</i>  | 70        |
| 6.5.7.            | <i>Conductividad de los tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas</i>  | 72        |
| 6.5.8.            | <i>Funcionalización de partículas pseudovirales VP2/VP6 con nanopartículas metálicas.</i>  | 74        |
| 6.5.9.            | <i>Funcionalización de VP6 con nanopartículas magnéticas.</i>  | 78        |
| 6.6.              | <i>Estructura del trímero de VP6</i>   | 81        |
| <b>CAPÍTULO 7</b> | <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>86</b> |
| <b>CAPÍTULO 8</b> | <b>PRODUCTOS GENERADOS</b>   | <b>88</b> |
|                   | Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramírez OT. Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials. <i>Biotechnol Bioeng</i> 2009, 104(5): 871-881. | <b>92</b> |

|  |            |
|--|------------|
| Rodríguez-Galván A, Heredia A, Plascencia-Villa G, Ramírez OT, Palomares LA, Basiuk VA. <b>Scanning tunneling microscopy of VP6 protein self-assembled into nanotubes and nanospheres.</b> <i>J Scann Probe Microsc</i> , 3(1): 25-31.   | <b>104</b> |
| Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, Germán Plascencia Villa, Laura Alicia Palomares Aguilera, Yimy Alexander Mena Méndez, José Manuel Saniger Blesa. <b>Use of viral multimeric proteins as templates for the construction of nanobiomaterials.</b> <i>Pub. No. WO/2009/157746. International Application No. PCT/MX2008/000080.</i> | <b>111</b> |
| <b>CAPÍTULO 9 REFERENCIAS</b>  | <b>112</b> |
| <b>CAPÍTULO 10 PERSPECTIVAS</b>  | <b>121</b> |

# ÍNDICE DE FIGURAS

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b>  | Estructura de virus usados como biotemplados.   | <b>13</b> |
| <b>Figura 2.</b>  | Estructura tridimensional de partícula de rotavirus.                                    | <b>17</b> |
| <b>Figura 3.</b>  | Estructura del monómero VP6 de rotavirus.   | <b>18</b> |
| <b>Figura 4.</b>  | Estructura del trímero VP6 de rotavirus.  | <b>19</b> |
| <b>Figura 5.</b>  | Micrografías de estructuras formadas por la proteína VP6.                               | <b>20</b> |
| <b>Figura 6.</b>  | Cinética de células infectadas con bacVP6.  | <b>29</b> |
| <b>Figura 7.</b>  | Cinética de producción de proteína VP6 en células HighFive.                             | <b>30</b> |
| <b>Figura 8.</b>  | Etapas para purificación de proteína VP6.   | <b>32</b> |
| <b>Figura 9.</b>  | Cromatografía de intercambio aniónico.  | <b>33</b> |
| <b>Figura 10.</b> | Cromatografía de exclusión molecular.   | <b>34</b> |
| <b>Figura 11.</b> | Etapas de purificación de VP6.  | <b>35</b> |
| <b>Figura 12.</b> | Geles VP6 purificada.   | <b>36</b> |
| <b>Figura 13.</b> | Distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica.                                  | <b>37</b> |
| <b>Figura 14.</b> | Distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica.                                  | <b>38</b> |
| <b>Figura 15.</b> | Distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica.                                  | <b>39</b> |
| <b>Figura 16.</b> | Distribución de tamaño proteína VP6 después de cambio de buffer.                        | <b>40</b> |
| <b>Figura 17.</b> | Microscopía de Transmisión Electrónica de VP6.  | <b>42</b> |
| <b>Figura 18.</b> | Espectros de absorción UV-Vis durante la reacción de funcionalización con plata.        | <b>45</b> |
| <b>Figura 19.</b> | Espectros de absorción UV-Vis durante la reacción de funcionalización con oro.          | <b>46</b> |
| <b>Figura 20.</b> | Espectros de absorción UV-Vis de la reacción de funcionalización con platino y paladio. | <b>47</b> |
| <b>Figura 21.</b> | Distribución de tamaño de proteínas funcionalizadas.                                    | <b>49</b> |
| <b>Figura 22.</b> | Microscopia de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con plata.                    | <b>50</b> |
| <b>Figura 23.</b> | Microscopia de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con plata.                    | <b>51</b> |
| <b>Figura 24.</b> | Microscopia de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con plata.                    | <b>52</b> |
| <b>Figura 25.</b> | Microscopia HR-TEM VP6 funcionalizada con plata.  | <b>54</b> |
| <b>Figura 26.</b> | Análisis elemental por EDX-HAADF de VP6 funcionalizada con plata.                       | <b>55</b> |
| <b>Figura 27.</b> | Microscopia de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con oro.         | <b>56</b> |
| <b>Figura 28.</b> | Microscopia de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con oro.         | <b>58</b> |
| <b>Figura 29.</b> | Microscopia HRTEM VP6 funcionalizada con oro.   | <b>59</b> |
| <b>Figura 30.</b> | Análisis elemental por EDX-HAADF de tubos de VP6 funcionalizados con oro.               | <b>60</b> |

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| <b>Figura 31.</b> | Microscopia de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con platino.                   | <b>61</b> |
| <b>Figura 32.</b> | Microscopia de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con platino.                   | <b>63</b> |
| <b>Figura 33.</b> | Microscopia HR-TEM de tubos de VP6 funcionalizados con platino.                                       | <b>64</b> |
| <b>Figura 34.</b> | Análisis elemental por EDX-HAADF de tubos de VP6 funcionalizados con platino.                         | <b>65</b> |
| <b>Figura 35.</b> | Microscopia de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con paladio.                   | <b>66</b> |
| <b>Figura 36.</b> | Microscopia de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con paladio.                                | <b>67</b> |
| <b>Figura 37.</b> | Microscopia HRTEM de tubos de VP6 funcionalizados con paladio.  | <b>69</b> |
| <b>Figura 38.</b> | Análisis elemental por EDX-HAADF de tubos de VP6 funcionalizados con paladio.                         | <b>70</b> |
| <b>Figura 39.</b> | Propiedades catalíticas de los tubos de VP6 funcionalizados con platino y paladio.                    | <b>71</b> |
| <b>Figura 40.</b> | Conductividad de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas                                      | <b>73</b> |
| <b>Figura 41.</b> | Caracterización por TEM de partículas pseudovirales VP2/VP6.  | <b>75</b> |
| <b>Figura 42.</b> | Distribución de tamaño de partículas pseudovirales VP2/VP6.   | <b>76</b> |
| <b>Figura 43.</b> | Espectros de absorción UV-Vis de reacciones de funcionalización de partículas pseudovirales VP2/VP6.  | <b>76</b> |
| <b>Figura 44.</b> | Microscopia de transmisión electrónica partículas VP2/VP6 funcionalizadas.                            | <b>78</b> |
| <b>Figura 45.</b> | Microscopia de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas magnéticas. | <b>80</b> |
| <b>Figura 46.</b> | Propiedades magnéticas de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas magnéticas.                 | <b>81</b> |
| <b>Figura 47.</b> | Modelo de trímero VP6.  | <b>82</b> |
| <b>Figura 48.</b> | Localización de sitios de unión de iones.   | <b>83</b> |
| <b>Figura 49.</b> | Potencial electrostático del trímero VP6.   | <b>84</b> |
| <b>Figura 50.</b> | Sitio de unión de iones en VP6.   | <b>84</b> |
| <b>Figura 51.</b> | Sitio de unión de iones en VP6.   | <b>85</b> |

# CAPÍTULO 1

## RESUMEN

Las características estructurales, tales como tamaño y forma predefinidos de las estructuras virales las convierte en herramientas útiles en el área de la nanobiotecnología, en particular como moldes o templados para la construcción de nanobiomateriales novedosos altamente organizados. En este trabajo se demostró, por primera vez, que los nanotubos formados por la proteínas VP6 de rotavirus pueden ser utilizados como templados biológicos para la síntesis de nanomateriales híbridos.

La proteína VP6 de rotavirus fue producida en forma recombinante mediante el sistema de expresión células de insecto-baculovirus. Se obtuvo proteína con >98% de pureza a través de un proceso de purificación que involucra etapas de ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular. Las etapas de purificación, así como el producto final fueron caracterizados mediante electroforesis SDS-PAGE y western-blot, además mediante dispersión dinámica de luz se determinó la distribución de tamaño de los componentes en cada etapa del bioproceso. Mediante microscopia de transmisión electrónica se observó la morfología de los tubos VP6 producidos en forma recombinante.

Nanotubos de varias micras de largo y varios diámetros en el intervalo nanométrico fueron funcionalizados mediante reducción química en medio acuoso para sintetizar *in situ* nanopartículas de plata, oro, platino y paladio, así como nanopartículas magnéticas (FePt, CoPt, CoAu) utilizando un agente reductor fuerte (borohidruro de sodio) o un agente reductor suave (citrato de sodio). Los nanomateriales híbridos obtenidos fueron caracterizados mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) acoplado a espectrometría de dispersión de energía por rayos X (EDX), dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopia de absorción UV-Vis. Además de demostrar que los tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas poseen actividad catalítica y capacidad de conducción de corriente eléctrica.

Los resultados indicaron que la capa externa de los nanotubos VP6 posee afinidad intrínseca por diversos precursores metálicos, ya que se logró la deposición y síntesis *in situ* de nanopartículas

metálicas. Además, que el uso de estructuras biológicas preformadas altamente organizadas, tales como los virus y partículas pseudovirales, resulta en la formación de materiales integrados de alta calidad. Fue además posible obtener diferentes grados de funcionalización y características de las nanopartículas metálicas mediante el control de las condiciones de reacción, logrando una cobertura continua con una capa electrodensa metálica al utilizar citrato de sodio como reductor o la formación de nanopartículas discretas bien definidas que poseen diámetros de 2 a 9 nm al utilizar borohidruro de sodio como agente reductor. Incrementando los tiempos de reacción se logró la formación de una capa continua metálica en la superficie externa de los nanotubos de VP6. Mediante HR-TEM y EDX se confirmó la composición química elemental de las nanopartículas sintetizadas.

Utilizando las condiciones de reacción estandarizadas fue posible sintetizar nanopartículas metálicas de oro y plata sobre la superficie externa de partículas pseudovirales de rotavirus de dos capas (VP2/VP6) que fueron producidas en forma recombinante.

En comparación con otras proteínas no recombinantes utilizadas, los nanotubos VP6 poseen varias ventajas tales como gran longitud axial (de 1 a 3 micrometros de largo), una estructura multifuncional hueca que posee afinidad por diversos metales, además de que al acoplarlo con su producción recombinante se pueden obtener grandes cantidades en forma segura, precisa y reproducible. Estas características confieren a VP6 de rotavirus diversas e importantes aplicaciones en nanotecnología como nuevo nanobiomaterial versátil y multifuncional.



## CAPÍTULO 2

# INTRODUCCIÓN

Las *nanociencias* y *nanotecnología* son áreas de las ciencias que realizan investigación y desarrollo referente al entendimiento, manipulación y control de la materia en las escalas atómica, molecular y macromolecular en el intervalo de 1 a 100 nm [44]. En este intervalo las propiedades difieren significativamente respecto a los materiales en escalas mayores y pueden ser aprovechadas en nuevas aplicaciones.

Una de las características de la nanotecnología es que imita los procesos naturales de autoensamblaje de la materia en el intervalo nanométrico para crear materiales mejorados, componentes, dispositivos y sistemas que explotan estas nuevas propiedades. Recientemente, surgió la *nanobiotecnología* como una división de la nanotecnología, esta involucra el estudio y síntesis de biomateriales, dispositivos y metodologías en la nanoescala que se caracterizan por incluir biomoléculas en estos procesos [12, 15, 101].

La síntesis de biomateriales puede ser realizada por medio de dos diferentes estrategias, la primera es llamada “*top-down*” (de arriba hacia abajo) en la que los biomateriales son generados al dividir materiales complejos en sus diferentes componentes. En contraste, en la estrategia “*bottom-up*” (de abajo hacia arriba) los biomateriales son ensamblados molécula por molécula (y en algunos casos átomo por átomo) para producir nuevas estructuras supramoleculares [101].

El uso de materiales obtenidos de la naturaleza ha permitido a las ciencias de materiales aprovechar diferentes biomoléculas formadas por los organismos vivos, que han sido el resultado de millones de años de evolución. Los organismos vivos sintetizan un gran repertorio de bioestructuras complejas altamente organizadas que están formadas por un número limitado de biomoléculas.

Estas estructuras biológicas complejas son formadas por medio de *autoensamblaje*, en este proceso las moléculas interactúan y se organizan espontáneamente en forma precisa para fabricar estructuras supramoleculares funcionales bien definidas. Observando los procesos de

autoensamblaje de estructuras biomoleculares en la naturaleza, se puede empezar a explotar el autoensamblaje para sintetizar nuevos nanomateriales utilizando péptidos y proteínas como moldes o templados [23, 44, 101].

Diversos organismos son también capaces de producir estructuras complejas a partir de precursores inorgánicos, a través de diversos procesos conocidos colectivamente como *biomineralización* [12]. Este proceso es llevado a cabo por biomoléculas especializadas (péptidos y proteínas) que dirigen la formación de estas estructuras inorgánicas complejas, tales como nanopartículas metálicas o magnéticas, estructuras cristalinas de carbonato de calcio y de sílice. El uso de péptidos y proteínas para dirigir la síntesis de nanomateriales inorgánicos en reacciones *in vitro* es resultado de extrapolar los descubrimientos hechos en el campo de la biomineralización y tomarlos como inspiración y punto de partida para novedosas aplicaciones y propiedades. Estos nanomateriales híbridos son construidos usando las biomoléculas como componentes que coordinan la nucleación, crecimiento, organización y transformación de los precursores inorgánicos para producir objetos integrados discretos con gran orden estructural bajo condiciones de equilibrio [45, 103]. La naturaleza de la fase inorgánica determinará la funcionalidad del nanobiomaterial sintetizado. Entre las fases inorgánicas de interés se encuentran los metales, sales iónicas de metales, semiconductores, magnéticos, fotoactivos, óxidos o cristalinos que estarán integrados químicamente en el templado orgánico.

El conocimiento detallado de la estructura y función de los virus ha revelado una amplia colección de ensamblajes moleculares naturales así como contenedores con una gran variedad de formas, tamaños, estabilidades, propiedades dinámicas y reactividades químicas [74]. Es por esto que diversos virus y partículas pseudovirales han sido recientemente utilizados en ciencias de materiales, biotecnología y nanotecnología como herramientas y bloques moleculares de construcción autoensamblables con aplicaciones potenciales en las áreas de la electrónica, química, catálisis y ciencias biomédicas.

El uso de proteínas virales para dirigir la síntesis *in vitro* de materiales inorgánicos de interés en ciencias de materiales y nanomedicina es atractivo por diversas razones. En primer lugar las condiciones de reacción pueden ser más suaves (temperatura ambiente y en solución acuosa, además de estar a pH neutro o cercano al mismo) que las utilizadas en técnicas tradicionales.

Además de reducir el consumo de energía, se minimiza la formación de subproductos y se evita el uso de solventes inorgánicos, siendo un proceso amigable con el medio ambiente. Las proteínas virales ofrecen un gran control del tamaño, forma, composición y estructura cristalina de los materiales inorgánicos conjugados directamente sobre su superficie. Finalmente, estas proteínas ofrecen la versatilidad de producir materiales con gran especificidad o múltiples funciones.

## CAPÍTULO 3

# ANTECEDENTES

El control preciso de los sitios de nucleación, crecimiento, organización espacial y distribución de nanomateriales funcionales, tales como nanopartículas y “nanoclusters”, desde la escala nanométrica hasta la escala macroscópica, ha sido un gran reto para lograr la síntesis de materiales funcionales integrados discretos altamente ordenados utilizando la estrategia *bottom-up* [45, 103]. La manipulación y conjugación precisa permitirá sacar el máximo provecho de la gran cantidad de nanopartículas disponibles que poseen propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas únicas para generar dispositivos funcionales, tales como sensores, sistemas de almacenamiento de información, hasta fotovoltaicos, superconductores y dispositivos microelectrónicos [91, 103].

Varias estrategias para lograr dirigir la conjugación precisa de nanopartículas han sido exploradas, incluyendo el uso de biomoléculas como el ADN, diversos péptidos, proteínas y algunos polímeros funcionales. El templado ideal debe ser una nanoestructura autoensamblable con tamaño y forma bien definidos, que sirva de plataforma para dirigir el ensamblaje y distribución de las nanopartículas. Los templados antes mencionados no siempre son capaces de cubrir todas las características buscadas o se dificulta su uso al tratar de llevar el proceso a gran escala.

Otro aspecto importante a considerar es la necesidad de modificar la composición de las nanopartículas (precursores, reductores y agentes estabilizadores) para hacerlas compatibles con templados específicos. Esto requiere el desarrollo de métodos de síntesis particulares para cada tipo de nanopartículas lo que resulta un proceso complicado ya que el cambio de la composición de las nanopartículas puede afectar sus propiedades [101, 103]. Como alternativa, se puede realizar la síntesis *in situ* de nanopartículas sobre sitios específicos de los templados, logrando un control preciso de la organización espacial de las nanopartículas y nanoclusters sobre el templado. Además, diversos grupos funcionales pueden servir como agentes estabilizadores, generando materiales integrados con diversas aplicaciones tecnológicas.

### **3.1. Conceptos de la nanoescala.**

Un *nanómetro* (nm) es la mil millonésima parte de un metro ( $1 \times 10^{-9}$  m). El interés en la nanoescala (0.2 a 100 nm) es debido a que en este intervalo las propiedades de los materiales pueden ser muy diferentes a las que se presentan en escalas mayores. *Nanociencia* puede definirse como el estudio de los fenómenos y manipulación de materiales en las escalas atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente respecto a escalas macroscópicas, y *nanotecnología* es el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas por medio del control de la forma y tamaño en el intervalo nanométrico.

Las propiedades de los materiales pueden ser diferentes en la nanoescala por dos razones principales. La primera es que los nanomateriales tienen gran área superficial en comparación con materiales de la misma masa producidos en escalas mayores, incrementando su reactividad química y afectando su resistencia o propiedades eléctricas. La segunda razón es que pueden presentarse algunos efectos cuánticos que modifican el comportamiento de la materia en la nanoescala, particularmente las propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas de estos materiales.

Los *nanomateriales* pueden definirse como componentes estructurados que poseen al menos una dimensión menor a los 100 nm. Los materiales que poseen una dimensión en la nanoescala (y que pueden extenderse en las otras dos dimensiones) son capas o superficies, tales como películas delgadas o superficies funcionales. Los materiales que poseen dos dimensiones en la nanoescala y se extienden en la dimensión restante son los nanoalambres y nanotubos, mientras que los materiales que son tridimensionales en la nanoescala son las nanopartículas, coloides y nanocristales.

Las *nanopartículas* son partículas aproximadamente esféricas con diámetros dentro del intervalo de 1-100 nm, y el término "*nanocluster* o *cluster*" se restringe a nanopartículas con diámetro menor a 4 nm [86]. Estas estructuras son las más estables desde el punto de vista termodinámico respecto a otros nanomateriales ya que debido a su estructura morfológica poseen la menor energía superficial.

Las nanopartículas típicamente no son productos por sí mismas, ya que generalmente sirven como materia prima, ingredientes o aditivos de productos ya existentes. En muchos de sus usos y aplicaciones, las nanopartículas deben estar conjugadas (unidas a una superficie o dentro de dispositivos), aunque en otras pueden estar libres o en suspensión [62]. La unión o conjugación de las nanopartículas se lleva a cabo por medio de las reacciones de *funcionalización*, es decir la modificación específica de grupos funcionales para añadir, modificar o potenciar propiedades o funciones.

### **3.2. Biomoléculas como templado para sintetizar nanomateriales.**

Algunos organismos vivos son capaces de producir estructuras complejas a partir de precursores inorgánicos a través de procesos de biomineralización, en los cuales ocurre la nucleación, crecimiento y ensamblaje sobre un templado [3, 12, 15]. Diversas biomoléculas tales como ADN, proteínas y péptidos juegan un papel importante en dirigir y formar estas estructuras inorgánicas complejas.

Los biopolímeros constituyen los compuestos orgánicos más abundantes e incluyen varios grupos de macromoléculas tales como polisacáridos, polipéptidos y ácidos nucleicos, que poseen una gran diversidad de estructuras y funcionalidades químicas. Los polisacáridos (celulosa, hidroxipropilcelulosa, poli- $\beta$ -(1,3)-glucosa y  $\beta$ -quitina) han demostrado su utilidad como templado o matriz para la síntesis de nanoestructuras híbridas de sílice formando suspensiones cristalinas, películas y nanofibras [15]. En estos casos se observó mediante microscopía electrónica que las estructuras complejas de los polisacáridos mantienen su organización aún después de las reacciones de mineralización.

Otros tipos de biopolímeros pueden ser potencialmente utilizados para generar compuestos híbridos orgánicos/inorgánicos con estructuras bien definidas en el intervalo de nanómetros a micrómetros. Diversos péptidos sintéticos poseen capacidad de autoensamblaje en estructuras de nanotubos, por lo que actúan como moldes para formar nanoalambres metálicos en su cavidad interna o nanotubos al modificar su superficie externa, así como templados para la nucleación de cristales de fosfato cálcico alineados usados como biomateriales híbridos similares a huesos [15, 28, 85, 93]. La morfología y estructura de los nanotubos formados por péptidos sintéticos cíclicos o lineales puede modificarse al introducir sitios de unión que posean

gran afinidad por precursores metálicos específicos (especialmente secuencias ricas en histidina) para lograr sintetizar nanopartículas metálicas monodispersas conjugadas al templado peptídico.

El uso de péptidos sintéticos diseñados por computadora para autoensamblarse en forma tubular tiene la limitante de que estos polipéptidos pueden alcanzar solamente de 1 a 10 nm de diámetro, además de requerir consumir grandes recursos de computo durante el diseño y el hecho de que son materiales estáticos que no están sujetos al proceso de evolución de otros biopolímeros como las proteínas y ácidos nucleicos [15, 28, 85, 93].

Los ácidos nucleicos (ADN y oligonucleótidos) son biopolímeros que además de codificar información genética pueden ser considerados como templados biomoleculares para la síntesis de nanoalambres metálicos [15, 103]. El ADN puede actuar como polielectrolito para autoensamblar nanopartículas cargadas por medio de interacciones electrostáticas o servir como estructura autoensamblada sobre la que se conjugan las nanopartículas covalentemente. Oligonucleótidos modificados con residuos tiol en el extremo se agregan sobre nanopartículas de oro en forma reversible. ADN de doble cadena con diseño-secuencia específica ha sido utilizado como bloques de construcción para formar películas autoensamblables y nanoestructuras tridimensionales [12, 15, 103]. Por medio de un diseño específico de la secuencia del ADN se logró darle afinidad por nanopartículas de oro, por lo que puede ser utilizado como templado para ensamblar arreglos de nanopartículas metálicas en forma simétrica. Es posible integrar varias funcionalidades dentro las nanoestructuras híbridas ADN-nanopartículas, al utilizar diferentes tipos de nanopartículas metálicas con usos y aplicaciones tales como nanorreactores, catálisis, diagnóstico, nanomedicina, etc.

Las proteínas tienen propiedades químicas similares a otros biopolímeros, pero se distinguen por su arreglo en estructuras tridimensionales precisas asociadas a su función específica. Ciertos aminoácidos quedan expuestos hacia el medio y pueden actuar como sitios de unión para lograr el posicionamiento de ligandos específicos a través de una nanoestructura bien definida. Por lo que las proteínas han sido exploradas como moldes o templados para la síntesis de diversos nanomateriales. Adicionalmente, las proteínas pueden verse como bloques de construcción

muy evolucionados que se ensamblan en nanoestructuras altamente ordenadas en un gran intervalo de escalas (de nanómetros hasta micrómetros).

Diversas proteínas que forman superestructuras organizadas en forma jerárquica (colágeno en los huesos), geles estructurados (amelogeninas en dientes) y armazones complejos (proteínas ácidas en conchas de mar) están asociadas con la deposición de biominerales complejos y funcionales [12, 15, 76]. Esta estrecha interrelación entre las proteínas y la nucleación y crecimiento de compuestos inorgánicos involucra diversas interacciones específicas en el intervalo nanométrico. Las proteínas de tejidos biomineralizados sirven como templados para la síntesis controlada y ensamblaje de nanopartículas inorgánicas [15, 45, 46]. Tomando en cuenta los principios de biomineralización, estos templados pueden ahora utilizarse para sintetizar diversos nanomateriales de interés tecnológico logrando una síntesis controlada de materiales.

Las proteínas usadas son diversas incluyendo: colágeno, amelogeninas, proteínas ácidas, mioglobina, hemoglobina, glucosa oxidasa, ferritina, lumazina sintasa (*Listeria spp*), proteínas de choque térmico (*Methanococcus spp*), flagelina, fibras amiloides y chaperonas, que han sido conjugadas a materiales inorgánicos tales como fosfato cálcico, sílice, tetrametoxisilano, sílice amorfo, hierro, óxido de cobalto, metales (oro, plata, platino, níquel, paladio, cobre), semiconductores (CdS, ZnS, PbS, CdSe) y compuestos magnéticos (FePt, FePd, FePtPd) [12, 15, 76]. En la mayoría de los casos las proteínas mantuvieron su estructura y funcionalidad después de la funcionalización logrando sintetizar nanopartículas inorgánicas monodispersas.

Las proteínas usadas como templados para formar materiales nanoestructurados pueden adoptar diversas morfologías, desde esféricas o globulares hasta estructuras anisotrópicas complejas como microtubulos o fibras amiloides que han demostrado ser excelentes templados para la deposición/síntesis de nanopartículas en nanoestructuras ensambladas así como para su ensamblaje o estructuración en conjugados híbridos. Para las proteínas que no poseen afinidad intrínseca por precursores para biomineralización, se ha optado por la mutagénesis sitio-dirigida para favorecer la interacción con los precursores inorgánicos o promover la interacción específica de la proteína por ciertos sustratos manteniendo la estructura del templado proteico.

Inclusive se puede optar por rutas de biomineralización en organismos vivos para sintetizar nanopartículas metálicas, magnéticas o fluorescentes. Los organismos poseen una gran



diversidad de biomoléculas que son capaces de reconocer, interactuar y dirigir la formación de diferentes materiales inorgánicos de interés, que pueden ser explotados en diferentes y novedosos usos y aplicaciones. Por ejemplo, la utilización de los filamentos de *Bacillus subtilis* para depositar sílica o paladio, síntesis de nanopartículas de oro en micelios de *Aspergillus niger*, formación de nanopartículas de CdS en el citoplasma de *Escherichia coli* y algunas plantas acuáticas capaces de absorber y reducir precursores metálicos [12, 15].

El uso de biomoléculas para sintetizar nanomateriales *in vitro* es producto derivado de los estudios de biomineralización, y ha sido un área de gran interés debido a importantes ventajas que ofrecen las biomoléculas para sintetizar nanomateriales complejos de alta precisión en su composición y propiedades. En primer lugar, las condiciones de reacción son más suaves en comparación con métodos usados en nanotecnología y nanociencias, tales como reacciones a temperatura ambiente en solución acuosa, pH cercanos al neutro y no se utilizan solventes orgánicos. Siendo un proceso amigable con el medio ambiente. Además, las biomoléculas ofrecen un gran control del tamaño, forma, propiedades químicas y estructura cristalina de los nanomateriales sintetizados; estas características en conjunto determinan las propiedades del material sintetizado y otorgan gran versatilidad al ser posible sintetizar nanomateriales específicos o multifuncionales [3, 12, 15, 85, 101].

### **3.3. Proteínas virales como templado para sintetizar nanomateriales.**

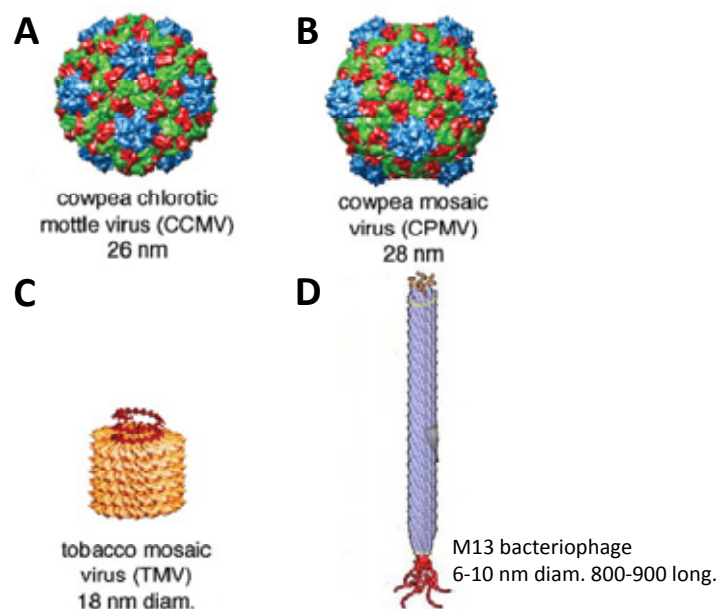
Las proteínas virales forman ensamblajes supramoleculares o macromoléculas con estructura tridimensional bien definida, por lo que pueden ser consideradas como nanomateriales biológicos naturales con topología, simetría y morfología precisas. Debido a esto, las proteínas virales han recibido gran atención debido a su gran potencial en aplicaciones nanotecnológicas. El estudio extensivo de los virus como patógenos ha producido un conocimiento detallado de sus propiedades a nivel biológico, genético y estructural. Diferentes virus de bacterias (bacteriófagos), de plantas (fitopatógenos) y de eucariontes han sido caracterizados por estos métodos [14, 23, 44, 74]. El conocimiento de los ciclos replicativos de los virus permite manipular y ensamblar diferentes tipos de partículas virales formadas por medio de autoensamblaje y utilizarlas para sintetizar diversos materiales.

Los datos de la estructura de las proteínas virales con resolución atómica revelan las posibles formas de modificación de las partículas virales para impartirles nuevos ensamblajes, funciones y propiedades. La gran diversidad de virus y su uso en ciencias de materiales abre innumerables oportunidades para generar nuevas estructuras complejas sintéticas.

Las partículas virales y partículas pseudovirales (PPV) (poseen la misma estructura que los virus pero sin el material genético y son producidas en forma recombinante) sirven como templado o molde para la síntesis, diseño y fabricación de nanomateriales híbridos. Estos son desarrollados a partir de enfoques basados en los principios de biomineralización y conjugación aprovechando el alto grado de organización de las PPV. Las principales ventajas de las PPV son su tamaño en el intervalo nanométrico, la capacidad de autoensamblaje en partículas monodispersas en tamaño y forma, el alto grado de simetría y polivalencia, la capacidad de poder producirse en grandes cantidades, estabilidad y resistencia, y biocompatibilidad [14, 23, 44, 74]. Además, las subunidades de las partículas virales pueden ser modificadas genéticamente o por medio de métodos de bioconjugación.

Diferentes virus han sido utilizados como moldes o templado para la síntesis y ensamblaje *in situ* y nucleación de materiales orgánicos e inorgánicos, que sirven como medio de entrega de compuestos químicos o de diagnóstico, localización y visualización en aplicaciones *in vivo*, así como en la construcción de materiales estructurados en 1, 2 y 3 dimensiones [14, 23, 74]. El proceso involucra interacciones entre el templado biológico y los precursores inorgánicos que son dependientes espacial y temporalmente. La distancia entre las nanopartículas estará determinada por la simetría del templado viral.

Virus esféricos como el “chlorotic cowpea mottle virus” (CCMV), “cowpea mosaic virus” (CPMV), papilomavirus o herpes simplex virus (HSV) protegen su material genético en cápsides proteicas de 26, 28, 65 y 125 nm de diámetro respectivamente, mientras que virus filamentosos o helicoidales que producen una estructura proteica tubular que contiene el ADN plasmídico por ejemplo, el bacteriófago M13 de 800-900 nm de largo o ARN lineal por ejemplo, el virus mosaico del tabaco (TMV) de 300 nm de largo han sido utilizados como templados biológicos en diferentes procesos derivados de los estudios de biomineralización para obtener nanobiomateriales híbridos [14, 23, 44, 74]. **Figura 1.**



**Figura 1.**

**Estructura de virus usados como biotemplados. (A)** "Cowpea chlorotic mottle virus" (CCMV). **(B)** "Cowpea mosaic virus" (CPMV). **(C)** "Tobacco mosaic virus" (TMV). **(D)** "M13 bacteriophage". Imagen modificada de [80].

La cápside de CCMV posee carga positiva en el interior debido a residuos arginina y lisina que favorecen la deposición de precursores iónicos con carga negativa. El CCMV presenta varios residuos carboxilo (glutamato y aspartato) y cisteínas en su superficie externa, que han sido utilizados en reacciones de funcionalización para conjugar fluoróforos y péptidos. Este virus ha sido funcionalizado con W, Fe, Au [15, 80]. El CPMV modificado genéticamente (inserción de Cys e His) se utilizó como molde para el posicionamiento de nanopartículas de oro, níquel y "quantum dots" (CdSe-ZnS) así como algunos fluoróforos en su superficie externa. Se demostró la utilidad del CPMV para formar superficies y redes conductoras o luminiscentes, además de formar superficies autoensamblables que sirven como patrones en nanolitografía [15, 23, 80].

El virus del mosaico del tabaco (TMV) está constituido por 2130 subunidades proteicas idénticas alineadas helicoidalmente sobre el genoma de ARN, formando una estructura tubular de 18 nm de diámetro externo, 4 nm de diámetro interno y 300 nm de largo [5, 78, 89, 90]. Este virus fitopatógeno ha sido explotado como templado para biomineralización y ensamblaje de nanopartículas; posee carga electrostática negativa en su cavidad interior debido a la presencia de residuos glutamato y aspartato y carga electrostática parcial positiva en su superficie externa influenciada por varios residuos de lisina y arginina [5, 15, 35], aunque esta distribución de cargas puede modificarse por medio de pH. El TMV ha sido funcionalizado con diversos

materiales inorgánicos tales como Au, Pt, Fe, Cd, Si, Ag, Pd, Ni, Co [15, 15, 35, 80], utilizando métodos de reducción química (hidracina, citrato o borohidruro), fotoquímica o por radiación para sintetizar nanoalambres y nanotubos funcionalizados que pueden presentar nanopartículas conjugadas en el exterior o interior del templado viral.

El bacteriófago M13 está constituido por un genoma de ADN rodeado por una estructura filamentosa compuesta por ~2700 copias de la proteína pVIII que forma la estructura tubular con arreglo simétrico; en uno de los extremos se localizan las proteínas pVIII y IX y en el otro pVI y III [33, 60]. Mediante técnicas de evolución *in vitro* y despliegue en fagos, se identificaron y utilizaron diversos péptidos que poseen afinidad por diversos materiales semiconductores (ZnS y CdS), magnéticos (CoPt y FePt) y metales (Ag), logrando sintetizar nanoalambres de estos materiales utilizando M13 como templado biológico [15, 93].

Los virus genéticamente modificados promueven y controlan la deposición de los precursores iónicos, la síntesis y ensamblaje de las nanopartículas obteniendo nanomateriales híbridos que han sido utilizados exitosamente en diversas aplicaciones tales como nanobaterías, nanofibras y celdas combustibles [30, 34, 36-38, 48, 49, 58-61, 72, 93, 99, 100].

Otras partículas virales han sido empleadas para el formar nanoestructuras actuando como plataformas para la síntesis y ensamblaje de nanopartículas [12, 14-16, 23, 35, 44, 74, 77, 78, 80, 81, 91]. Por ejemplo, virus que se han empleado en diversas aplicaciones de ciencias de materiales, diagnóstico y nanomedicina incluyen los siguientes: HSV, adenovirus, SIRV, fago MS2, fago Q $\beta$ , "Tobacco yellow mosaic virus" (TYMV), papilomavirus, virus de hepatitis B y *Nudaurelia capensis*  $\omega$  virus (N $\omega$ V).

La mineralización y síntesis de nanopartículas está fuertemente influenciada por las características de los residuos de aminoácidos que están localizados en sitios específicos con arreglos simétricos sobre la superficie de las estructuras virales. También intervienen las condiciones de reacción utilizadas (tipo de precursores, reductores, relaciones estequiométricas, tiempo de reacción, temperatura, etc.), así como la inserción de residuos por medio de mutagénesis sitio-dirigida o por procesos de evolución *in vitro* para lograr obtener modificaciones útiles en la síntesis de diversos tipos de materiales, tales como nanoalambres, nanocristales, nanojaulas, películas y fibras híbridas [14, 15, 16, 23, 35, 77, 80, 91]. En la

mayoría de los casos se procura mantener la estructura terciaria y cuaternaria, así como el ensamblaje multimérico de los templados virales.

La funcionalización con los compuestos inorgánicos (metales, óxidos metálicos, polímeros, semiconductores o fluoróforos) es a través de los residuos con aminas (His, Lys, Arg, Asn y Gln), sulfidrilo (Cys) y carboxilos (Glu y Asp) que están correctamente localizados y expuestos al medio de reacción para actuar como sitios de unión para la conjugación de compuestos específicos a través del templado proteico. Dependiendo de la utilidad y propiedades deseadas, pueden conjugarse metales (Au, Ag, Cu, Co, Ni, Fe, Pt y Pd), compuestos semiconductores (ZnS y CdS), magnéticos ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , FePt, CoPt, CoAu), fotoactivos ( $\text{TiO}_2$ ) o cristalinos ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{SiO}_2$ ) [14-16, 23, 35, 74, 80, 91].

El acercamiento por medio de estructuras virales a la nanobiotecnología constituye una gran plataforma versátil y específica, que utiliza conceptos accesibles y extrapolables para sintetizar una gran variedad de nanoestructuras. Pese a las grandes ventajas, esta plataforma presenta algunos problemas y limitaciones por resolver, tales como: la necesidad de desarrollar variantes genéticas específicas para cada aplicación, los protocolos de producción y purificación para proveer cantidades suficientes de proteínas virales pueden ser tardados y costosos, se deben realizar tratamientos para eliminar los ácidos nucleicos para tener una plataforma biosegura y que las dimensiones (largo y diámetro) están limitadas por la naturaleza misma de los virus. Para resolver algunas de estas limitaciones se han empleado estrategias tales como modificación genética y entrecruzamiento con polímeros para obtener templados más largos.

Podemos concluir que existe la necesidad de encontrar o desarrollar nuevas plataformas que aprovechen las ventajas de los virus, pero que puedan superar las limitantes dimensionales (largo y diámetro), además de que se puedan obtener a través de métodos seguros para el ser humano y el ambiente, cantidades suficientes de proteínas virales de alta calidad y pureza, preferentemente libres de ácidos nucleicos. Asimismo, está la necesidad de contar con la versatilidad y multifuncionalidad de las reacciones de funcionalización para realizar la síntesis de diversos tipos de nanomateriales.

### **3.4. Proteínas virales como medio para encapsular nanomateriales.**

La síntesis de nanomateriales híbridos que comprenden componentes inorgánicos encapsulados necesitan de una estructura orgánica preensamblada que posea espacio interno hueco accesible. Como modelo de estudio de proteínas con capacidad de formar pseudocápsides, se ha utilizado la apoferritina y diversas cápsides virales (CCMV, CMV, etc.) en diferentes usos y aplicaciones, logrando la nucleación controlada y confinamiento de nanopartículas inorgánicas [12, 14, 45].

La adición de diferentes mezclas de precursores inorgánicos en las condiciones de reacción apropiadas (tales como bajas concentraciones, tiempos de reacción prolongados y relaciones subestequiométricas) han permitido lograr la síntesis de una amplia gama de novedosos nanomateriales híbridos con núcleo inorgánico encapsulado por la superficie proteica; entre estos se incluyen nanopartículas de  $\text{CaCO}_3$ , PbS, Ag, Au, In, Pd y CoPt, con aplicaciones en catálisis, almacenamiento de información y diagnóstico [45].

El proceso de síntesis puede describirse en tres etapas. En la primera, los precursores inorgánicos permean la cápside proteica a través de canales o poros dentro de la estructura autoensamblada (por difusión pasiva o a través de choque osmótico por cambio de pH), en la segunda etapa ocurre la nucleación de los precursores en la cavidad interna de la cápside. Finalmente, ocurre la formación de las nanopartículas inorgánicas por autoreducción o por medio de reacción con algún agente reductor. Es de resaltar, que bajo ciertas condiciones el proceso antes descrito puede realizarse en forma reversa, es decir, utilizar nanopartículas inorgánicas presintetizadas de tamaño, forma y composición definidas como molde o templado para ensamblar en forma correcta y precisa las subunidades de la cápside proteica encima formando de igual forma nanomateriales híbridos integrados [15, 45].

El utilizar virus completos como templado usualmente requiere de una etapa extra al inicio en la cual se remueven los ácidos nucleicos de las cápsides virales y posteriormente se purifican las cápsides virales vacías que se utilizan en las reacciones de funcionalización.

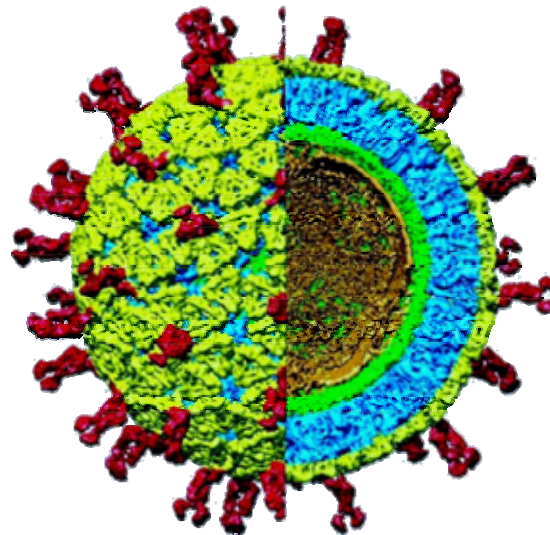
Como alternativa, se ha propuesto utilizar un sistema de expresión recombinante para producir estas cápsides virales vacías (partículas pseudovirales) y evitar la necesidad de etapas

adicionales de remoción de ácidos nucleicos, que además de ser poco eficientes tiene bajos rendimientos, limitando en algunos casos el proceso de síntesis de nanobiomateriales.

### **3.5. Rotavirus como templado para sintetizar nanomateriales.**

Los rotavirus son patógenos causantes de gastroenteritis aguda en infantes y crías de diferentes animales. Son miembros de la familia *Reoviridae*, estos se caracterizan por su genoma compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena y por tener una cápside no envuelta con estructura icosaédrica formada por tres capas proteicas concéntricas [20].

La partícula madura infecciosa de rotavirus está compuesta por la capa interna formada por 120 moléculas de la proteína VP2 que encapsula el genoma así como las proteínas VP1 y VP3. La capa intermedia consiste en 260 trímeros de VP6, seguidos por la capa externa con 260 trímeros de la glicoproteína VP7. La proteína VP4 forma 60 espículas insertadas en las capa externa del virus [2, 3, 39, 50, 65]. **Figura 2.**

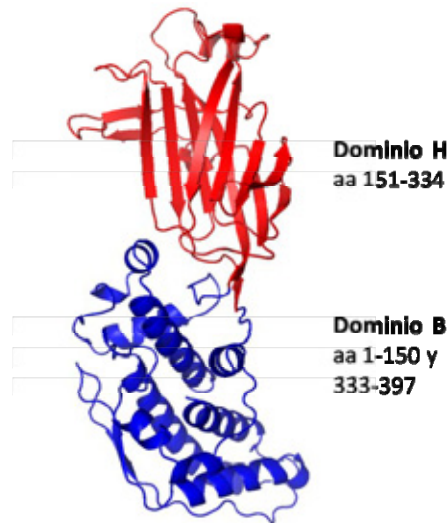


**Figura 2.**

**Estructura tridimensional de partícula de rotavirus.** La capa interna corresponde a VP2 (color verde), rodeada de VP6 (color azul) y la capa externa formada por VP7 (amarillo) y espículas de VP4 (rojo) con un corte parcial. Imagen modificada de [102].

La proteína VP6 al ensamblarse sobre el núcleo formado por VP2 confiere homogeneidad morfológica y estabilidad a largo plazo a las partículas rotavirales de doble capa [20]. Además, VP6 provee integridad estructural y conformacional para que las cápsides sean transcripcionalmente competentes durante el proceso de replicación del genoma de rotavirus.

La subunidad monomérica de VP6 de 397 aa de longitud se pliega en una estructura que presenta dos dominios. El dominio B que forma la base consiste en ocho  $\alpha$  hélices y dos hojas  $\beta$  formadas por los segmentos 1-150 y 333-397, mientras que el dominio H (residuos 151-334) está constituido por hojas  $\beta$  con topología tipo rollo  $\beta$  presente en varias proteínas virales [11, 50, 73]. **Figura 3.**



**Figura 3.**

**Estructura del monómero VP6 de rotavirus.** El dominio H (color rojo) comprende la región de los aminoácidos 150 a 331. El dominio B (color azul) comprende las regiones 1-149 y 332-397. Imagen a partir de archivo PDB 1QHD modelado con PyMOL 1.1.

VP6 forma una estructura trimérica elongada con forma similar a una torre de 95 Å de largo, una base triangular de ~60 Å por lado y la parte superior tiene forma hexagonal con un diámetro de 45 Å [50]. **Figura 4.**

Aminoácidos de ambos dominios (H y B) contribuyen al ensamblaje y estabilización del trímero por medio de interacciones hidrofóbicas, además que para lograr adoptar la estructura trímica, VP6 necesita de iones divalentes, un ión  $Zn^{2+}$  localizado en el centro de la molécula y cinco  $Ca^{2+}$  por monómero que están implicados en el ensamblaje intratrímeros e intertrímeros [50].



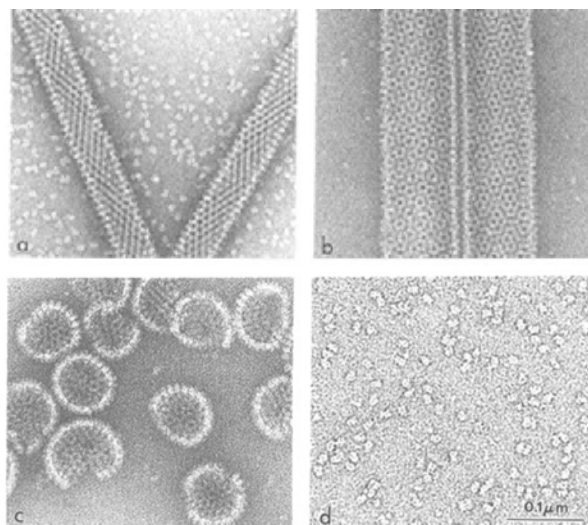


**Figura 4.**

**Estructura del trímero VP6 de rotavirus.** Subunidades A, B y C en colores rojo, azul y amarillo respectivamente. Imagen a partir de archivo PDB 1QHD modelado con PyMOL 1.1.

Las proteínas estructurales de rotavirus VP2, VP6 y VP7 poseen capacidad de autoensamblaje *in vitro* en partículas pseudovirales con características estructurales y morfológicas idénticas al virus nativo en presencia del núcleo formado por VP2 [39, 50, 54]. La proteína VP6 que forma la capa intermedia de rotavirus presenta polimorfismo estructural, ya que en ausencia de otras proteínas virales se autoensambla en diferentes tipos de estructuras dependiendo de las condiciones fisicoquímicas: pH, fuerza iónica, presencia de iones divalentes y concentración de proteína [39, 50, 54, 68-70].

El pH es el principal factor que controla el tipo de ensamblaje adoptado por VP6. Entre pH 7 y 9 se observaron estructuras tubulares con diámetro de 45 nm (Figura 5.A.), en el intervalo de 5.5-7 VP6 adopta forma tubular con un diámetro de 75 nm (Figura 5.B.) y en el intervalo de 3-5.5 se observan partículas semiesféricas con tamaño heterogéneo (diámetro de  $80.1 \pm 3.9$  nm)(Figura 5-C) [39, 50, 53, 54, 65, 68-70]. La presencia de iones divalentes ( $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ) no afecta el tipo de ensamblaje adoptado por VP6, solo concentraciones superiores a 200 mM provocan desensamblaje ya que únicamente se observan estructuras de trímeros (Figura 5-D). En este caso las estructuras formadas por VP6 (tubos y esferas) presentan en su superficie un arreglo hexagonal debido a los trímeros, similar al observado en las partículas de rotavirus de dos capas (VP2/VP6).



**Figura 5.**

**Micrografías de estructuras formadas por la proteína VP6.** a. Tubos de 45 nm de diámetro. b. Tubos de 75 nm de diámetro. c. Esferas. d. Trímeros. Modificada de [39].

A partir de la estructura cristalográfica de rayos X, criomicroscopía y datos de mapas de electrones de VP6 es posible identificar las regiones implicadas en interacciones inter- e intra-trímeros, así como los dominios de unión con el resto de las proteínas estructurales de rotavirus [40, 41, 50, 102].

Las regiones de la hélice  $\alpha\text{b}$  (31-39) y el loop  $\beta\text{b}-\alpha\text{c}$  (59-73) se localizan en la base de VP6 (dominio B), que en la estructura esférica estarían en contacto con VP2 y en la estructura tubular se localizan al interior en el lumen de los mismos. Mientras que el loop A'-A'' (168-177), el loop B-C (194-205) y la hélice  $\alpha\text{A}$  (295-317) están orientadas hacia el exterior tanto de las esferas como de los tubos (dominio H) [40, 41, 50, 102]. Diversas modificaciones en estas regiones expuestas de VP6 no afectan su capacidad de trimerización y ensamblaje, aunque si la actividad de transcripción de la partículas VP2/VP6 [2, 7]. Diversos residuos de aminoácidos en estas regiones pueden servir como sitios de deposición/nucleación para la síntesis y conjugación de diferentes nanopartículas utilizando conceptos de biomineralización sin afectar su capacidad de ensamblaje en tubos y esferas.

Las estructuras proteicas altamente organizadas formadas por VP6 pueden ser una nueva plataforma para la síntesis de nanobiomateriales híbridos con nuevas propiedades, características y usos.

En comparación con otros templados virales utilizados en nanociencias, la proteína VP6 puede ensamblarse *in vitro* sin depender de la presencia de ácidos nucleicos [19, 39, 68, 69, 70]. La expresión recombinante de VP6 mediante el sistema células de insecto-baculovirus (SCIBV) mostró que ocurre el ensamblaje espontáneo *in vivo* en estructuras tubulares en el citoplasma y que éstas poseen varios micrómetros de largo [19, 54, 65].

La estructura de los tubos VP6 como plataforma para la producción de nanobiomateriales híbridos presenta diversas ventajas respecto a los virus filamentosos (bacteriófago M13) y helicoidales (TMV y SIRV). Por ejemplo, está libre de ácidos nucleicos, tiene mayor longitud, y presenta diversas regiones funcionalizables (interior y exterior) que le pueden conferir versatilidad y multifuncionalidad en el proceso de síntesis de nanomateriales híbridos.

# CAPÍTULO 4

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### **4.1. Hipótesis.**

Es posible utilizar las proteínas estructurales de rotavirus como templado para sintetizar nanobiomateriales mediante su funcionalización con nanopartículas metálicas de tamaño y forma definidos.

### **4.2. Objetivo general.**

Estudiar el proceso de funcionalización para lograr la síntesis y ensamblaje de nanopartículas metálicas utilizando como molde o templado la proteína VP6 y partículas pseudovirales VP2/VP6 de rotavirus producidas en forma recombinante.

### **4.3. Objetivos específicos.**

1. Producir, purificar y caracterizar la proteína VP6 y las partículas pseudovirales VP2/VP6 de rotavirus recombinantes que serán utilizadas como molde o templado.
2. Evaluar la afinidad y los posibles mecanismos involucrados en la interacción de las proteínas estructurales de rotavirus con diversos metales.
3. Establecer las condiciones de reacción para lograr la funcionalización de la proteína VP6 y las partículas pseudovirales VP2/VP6 de rotavirus recombinantes.
4. Realizar la caracterización de los materiales formados por funcionalización de la proteína VP6 y las partículas pseudovirales VP2/VP6 de rotavirus con metales.

# CAPÍTULO 5

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **5.1. Líneas celulares, baculovirus y cultivo celular.**

Para la producción de stocks virales y titulación de baculovirus recombinantes se utilizó la línea celular Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Los títulos virales se determinaron por el método reportado por Mena *et al.* [52]. La línea celular HighFive (*Trichoplusia ni*) fue utilizada para la producción de las proteínas recombinantes. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo SF900II-SFM (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Se utilizaron los baculovirus recombinantes bacVP6 y bacVP2RF (amablemente proporcionados por la Dra. Susana López y Dr. Jean Cohen, respectivamente) [7, 19].

Los cultivos se realizaron en matraces de 1000 ml, con 250 ml como volumen de trabajo, agitados a 110 rpm y a 27°C. Los cultivos en crecimiento exponencial fueron infectados a una densidad de  $0.5 \times 10^6$  cel/ml con baculovirus recombinantes (*AcMNPV*) que expresan el gen VP6 de rotavirus (cepa SA11) a una MDI (multiplicidad de infección) de 0.1 ufp/cel.

En el caso de la producción de partículas pseudovirales VP2/VP6 el cultivo se coinfectó a la misma MDI con baculovirus que expresan VP2 (bacVP2RF). El sobrenadante de los cultivos fue cosechado a las 96 hpi (horas post-infección) y clarificado por centrifugación a 4000 g por 10 min a 4°C. Se añadieron inhibidores de proteasas (0.3 mg/ml de aprotinina y 1 mM de leupeptina) y se procedió a las etapas de purificación.

### **5.2. Purificación de proteínas recombinantes.**

La purificación de la proteína VP6 ensamblada en forma tubular y las partículas pseudovirales VP2/VP6 se realizó mediante etapas continuas de ultrafiltración Amicon (Millipore, Billerica, MA, EEUU), cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular [51].

El sobrenadante clarificado así como muestras de etapas intermedias de cromatografía fueron concentradas mediante un sistema de ultrafiltración agitado, usando membranas de celulosa

regenerada con NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) de 30,000 o 100,000 (Amicon Bioseparations, Millipore, Billerica, MA, EEUU) con presión positiva de aire (< 55 psi).

Las etapas de cromatografía fueron realizadas en un sistema ÄKTAprime (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) monitoreando absorbancia (280 nm) y conductividad. En la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó la resina Q-Sepharose FastFlow (Amersham, Pittsburg, PA, EEUU) empacada en una columna XK-16 con un volumen de 40 ml. La columna fue equilibrada con dos volúmenes de buffer A (30 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 6.16) hasta que la conductividad y pH estuvieran estables. Por cada ciclo se cargaron 20 ml de sobrenadante concentrado 2x. Se colectó el primer pico, el cual contenía los componentes no adsorbidos e incluía el intervalo hasta que bajó la absorbancia cerca de la línea base. La remoción de los componentes adsorbidos se realizó con buffer B (30 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 6.16), logrando su elución en un segundo pico. Una vez que la absorbancia disminuyó hasta línea base, se cambió a buffer A para reequilibrar la columna. En todos los casos se utilizó un flujo de 2 ml/min.

La cromatografía de exclusión molecular fue realizada con la resina Toyopearl HW65F (TOSOH Biosciences, San Francisco, CA, EEUU) empacada en una columna tipo XK-26 con un volumen total de 400 ml. La columna fue equilibrada con al menos dos volúmenes de buffer (30 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) antes de cargar 30-40 ml de muestra concentrada por corrida, el flujo de trabajo fue de 2.5 ml/min.

### ***5.3. Electroforesis y western blot.***

Muestras de proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (geles al 12%) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA, EEUU) para inmunodetección. Para determinar proteína total los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Las membranas de western blot fueron primeramente bloqueadas con buffer PBS (pH 7.5) con 5 % de leche descremada y posteriormente incubadas con dilución en PBS de suero policlonal de conejo anti-rotavirus cepa NCDV (producido en el Bioterio del IBt UNAM por M.C. Ana Ruth Pastor con la asesoría de M.V.Z. Elizabeth Mata con rotavirus donados por Dra. Susana López). Después de 1 h, el anticuerpo primario fue removido y la membrana se lavó tres veces con buffer PBS. La membrana fue posteriormente incubada por 1 h con anticuerpo secundario

cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, EEUU) y se lavó tres veces con buffer PBS. Finalmente, la actividad peroxidasa fue detectada por reacción con carbazol.

#### **5.4. Cuantificación de proteínas.**

La concentración de proteína total fue determinada usando el ensayo de Bradford (BIO-RAD, Hercules, CA, EEUU) en microplacas de 96 pozos, utilizando como estándar diluciones de albúmina bovina (0-80 µg/ml).

La concentración de VP6 fue medida con inmuensayo utilizando el kit IDEIA Rotavirus (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) utilizando como estándar proteína VP6 purificada.

#### **5.5. Funcionalización de proteínas virales.**

La funcionalización de las proteínas estructurales de rotavirus se realizó por medio de reducción química en medio acuoso. Se preparó solución de sales metálicas ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HAuCl}_4$ ,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ,  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$  y/o  $\text{FeCl}_2$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) a 0.5 M en agua ultrapura filtrada por 0.22 µm. En cada reacción, con un volumen de 1.5 ml, se utilizaron 25 µg/ml de proteína recombinante (también diluida en agua ultrapura) a la que se le adicionan sales metálicas a una concentración final de 0.5-2 mM. Después de 3 h de incubación a 27°C en agitación suave y protegidas de la luz, se realizó la reducción con una cantidad equimolar de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) o citrato de sodio. La solución de reductor a una concentración de 0.1 M en agua ultrapura debe estar recién preparada justo en el momento de adición. Se incubó por 1 o 9 h mas a temperatura ambiente y finalmente se lavó la muestra por medio de centrifugación a 10,000 g por 5 min y se resuspendió en  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura.

#### **5.6. Caracterización de proteínas virales funcionalizadas.**

##### **5.6.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.**

Las reacciones de funcionalización fueron monitoreadas por medio de espectroscopia UV-Vis en Espectrofotómetro Beckman DU65 (Fullerton, CA, EEUU) en celdas de cuarzo, midiendo la absorbancia en el intervalo de 350-750 nm cada hora desde el inicio de la reacción. Se detectaron los picos de máxima absorbancia correspondientes a la resonancia de plasmón de las nanopartículas metálicas.

### **5.6.2. Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz.**

La distribución de tamaño de las proteínas en solución fue determinada mediante dispersión dinámica de luz (espectroscopia de correlación de fotones) en el sistema Zetasizer Nano ZS Malvern (Worcestershire, Reino Unido), utilizando una celda de cuarzo bajo volumen (45  $\mu$ l) con temperatura controlada (25°C) y como estándar agua ultrapura filtrada por 0.2  $\mu$ m.

### **5.6.3. Microscopia de transmisión electrónica (TEM) y de alta resolución (HR-TEM).**

Las micrografías fueron obtenidas en microscopio de transmisión electrónica Zeiss EM900 (Göttingen, Alemania) o JEOL JM1011 (Tokio, Japón) operados a 80 kV. Los análisis de composición elemental y HR-TEM se realizaron en un microscopio electrónico Philips Tecnai F20 (Hillsboro, Oregon, EEUU) operado a 200 kV acoplado con espectrometro de dispersión de energía por rayos X (EDX) (En el laboratorio de Dr. Ariosto Medina, IIM-UMSNH).

Una muestra de 20  $\mu$ l fue colocada sobre una rejilla de cobre 200 mesh fomvar/carbón (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, EEUU) y fijada por 3-5 min. Las muestras de proteínas sin funcionalizar se fijaron de igual forma, y se realizó tinción negativa con acetato de uranilo 1% por 3 min y un lavado final por 2-3 min con agua ultrapura.

### **5.6.4. Análisis de imágenes de microscopia electrónica.**

La medición de los diámetros, longitud de nanotubos VP6 y la distribución de tamaño de nanopartículas fueron determinados con el software MacBiophotonics ImageJ 1.42I (Ontario, Canada). Para ello, se utilizaron las micrografías con el máximo aumento (250,000 x), se midieron los diámetros y longitudes en diferentes secciones y posteriormente promediados. Para determinar la distribución del tamaño de nanopartículas se tomo una muestra de entre 250-300 mediciones y se aplicó análisis para obtener la estadística descriptiva y posteriormente se agruparon en clases de 1 nm para determinar su frecuencia (%).

Los espectros de frecuencia FFT (*Fast Fourier Transform*) y distancias interplanares fueron determinados a partir de áreas seleccionadas de micrografías HR-TEM por medio del software Gatan Digital Micrograph (Pleasanton, CA, EEUU). Las distancias interplanares en los diferentes ángulos se determinó tomando como referencia la barra de escala de la micrografía correspondiente y promediando entre 15-20 mediciones.



### **5.6.5. Actividad catalítica de proteínas funcionalizadas.**

Nanopartículas metálicas (Pt o Pd) conjugadas a VP6 a una concentración de 1 mM fueron usadas como catalizador para oxidar glucosa (5 g/l) a ácido glucónico a 45°C por 3 h en buffer de 25 mM carbonato de sodio pH 8, en agitación y con burbujeo de aire. Esta reacción es una modificación del método descrito en la patente US 3,607,922 [1].

La concentración de glucosa fue medida cada hora usando analizador bioquímico YSI 2700 (YSI Life Sciences, Yellow Spring, EEUU). Como controles se utilizaron nanopartículas metálicas (Pt o Pd) sintetizadas con el mismo método descrito (**Materiales y Métodos**) pero sin proteína VP6.

### **5.6.6. Conductividad de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas.**

Los electrodos de oro fueron fabricados por fotolitografía sobre una placa de silicón usando técnicas típicas de “lift-off” (Amablemente donados por Dr. Edgar Álvarez Zauco, Fac. de Ciencias UNAM). Para las mediciones de conductividad, se añadieron 20 µl de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas sobre los circuitos, y las gotas se secaron manteniendo los circuitos dentro de un desecador al vacío. Se aplicó una corriente alterna de hasta 300 KHz usando un multímetro analítico HP-Agilent 3458A (Santa Clara, CA, EEUU) a través de dos resistencias unidas al circuito. Para cada voltaje (V) aplicado se registro de 20-50 veces la corriente (A) conducida a través del circuito.

### **5.7. Análisis de estructura de proteína VP6.**

Los cálculos de potencial electrostático de VP6 fueron realizados con los programas H<sup>++</sup> y PDB2PQR [13, 26] usando el archivo PDB de VP6 de rotavirus (1QHD) a las condiciones de pH y fuerza iónica usadas en las reacciones de funcionalización. Los modelos fueron analizados y modelados con PyMOL v1.1 (Palo Alto, CA, EEUU) y UCSF Chimera 1.4 (San Francisco, CA, EEUU).

## CAPÍTULO 6

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los rotavirus pueden ser considerados como nanobiomateriales con múltiples usos y aplicaciones en ciencias de materiales, nanomedicina y nanotecnología. Esto es debido en gran parte a sus características morfológicas y estructurales, tales como tamaño y forma definidos, capacidad de autoensamblaje, estabilidad y facilidad de modificación genética y química.

Las proteínas estructurales de rotavirus pueden ser utilizadas como bloques de construcción autoensamblables, templados o moldes para producir nanomateriales híbridos conjugados con diversos compuestos inorgánicos (metales, magnéticos o semiconductores), que estarán desplegados sobre su superficie con una distribución espacial precisa en la escala nanométrica.

Se planteó el uso de la proteína VP6 como plataforma para la producción de nanobiomateriales híbridos. A continuación se exponen los resultados de los aspectos estudiados y algunos de los parámetros que influyen en el proceso de síntesis y ensamblaje de varios tipos de nanopartículas a partir de la proteína estructural VP6 de rotavirus, así como la caracterización de los nanobiomateriales sintetizados.

### **6.1. Producción recombinante de proteínas estructurales de rotavirus.**

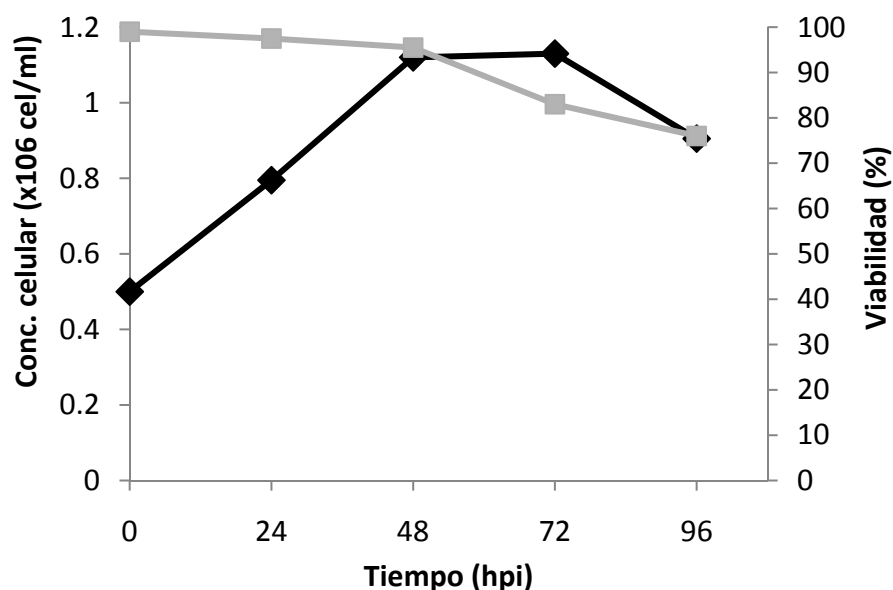
La proteína VP6 de rotavirus al ser expresada en forma recombinante mediante el sistema células de insecto-baculovirus (SCIBV) es capaz de autoensamblarse en el citoplasma de las células formando macroestructuras tubulares [51, 54, 55].

Cultivos de células HighFive en crecimiento exponencial a una concentración de  $0.5 \times 10^6$  cel/ml fueron infectados a una multiplicidad de infección (MDI) de 0.1 ufp/cel con baculovirus recombinantes que expresan VP6 de la cepa SA11 bajo el promotor *polh* (bacVP6). En cultivos infectados con diferentes MDI de bacVP6 se determinó que a MDI=0.1 ufp/cel se tiene la mayor productividad de VP6 y que esta se ensambla correctamente en forma tubular [54, 65]. La **Figura 6** muestra una cinética típica de un cultivo infectado a las 0 h. Se observó un aumento de la concentración celular hasta  $1.09 \times 10^6$  cel/ml a las 48 hpi manteniéndose la viabilidad celular en 96%. En este tiempo de cultivo la mayoría de la población del cultivo ( $88 \pm 3\%$ ) está infectada

y expresando VP6 [54, 65]. A partir de las 48 hpi empieza a disminuir la viabilidad del cultivo llegando a 82 % a las 72 hpi, en este punto se observó la concentración celular máxima que fue de  $1.12(\pm 0.2)\times 10^6$  cel/ml.

A una MDI de 0.1 ufp/ml solamente menos del 10% de la población es inicialmente infectada con bacVP6 y consecuentemente expresa la proteína recombinante y genera además una gran cantidad de baculovirus, mientras que las células no infectadas se duplicarán. Posteriormente ocurre un proceso de infección secundaria ya que los baculovirus producidos en la primera generación infectarán a las células no infectadas maximizando la producción de VP6.

Al final del cultivo (96 hpi) la viabilidad fue de  $72 \pm 2$  % y la concentración celular fue de  $0.86(\pm 0.1)\times 10^6$  cel/ml. La disminución de la concentración celular se debe a la capacidad lítica de los baculovirus, además que la VP6 producida en forma tubular puede causar daño en las células al ser excretada al atravesar la membrana [50].

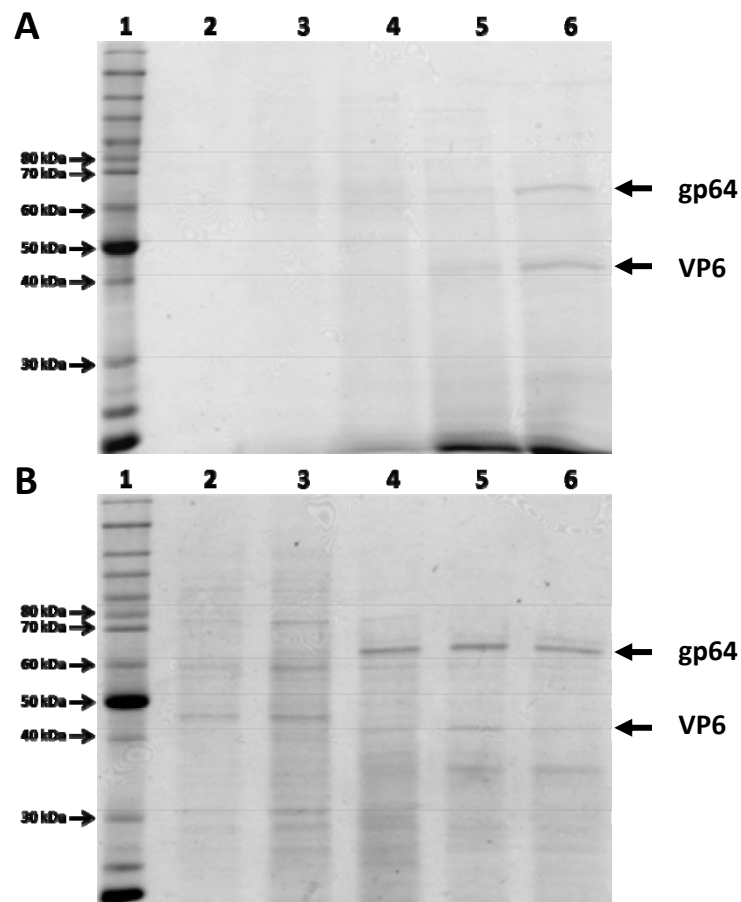


**Figura 6.**

**Cinética de células infectadas con bacVP6.** Línea negra (◆) representa células totales. Línea gris (■) representa viabilidad (%). Promedio de duplicados de cinéticas.

En la **Figura 7** se observa la distribución de VP6 (45 kDa) en el sobrenadante y pellet celular durante la cinética del cultivo infectado. Durante las primeras 48 hpi la proteína VP6 producida se encuentra localizada intracelularmente, la secreción de VP6 acumulada hacia el sobrenadante coincide con la disminución de la viabilidad celular después de las 48 hpi y hasta

las 96 hpi. En los geles de poliacrilamida la banda que correspondiente a VP6 se observa principalmente en el sobrenadante en muestras entre las 72 y 96 hpi cuando la integridad de las células está comprometida y ocurre la liberación de la proteína VP6 previamente acumulada (**Figura 7**). La banda correspondiente a gp64, la proteína mayoritaria de la cápside de los baculovirus, se observa desde las primeras 48 h del cultivo en la fracción del pellet, posteriormente es posible identificarla en ambas fracciones del cultivo ya que tenemos baculovirus en el sobrenadante así como en el interior de las células.



**Figura 7.**

**Cinética de producción de proteína VP6 en células HighFive.** (A) Gel SDS-PAGE sobrenadante. (B) Gel SDS-PAGE pellet. Carriles: (1) Marcador de peso molecular, (2) 0 hpi, (3) 24 hpi, (4) 48 hpi, (5) 72 hpi, (6) 96 hpi. Las flechas indican localización de las bandas correspondientes a VP6 y gp64. Tinción con azul de Coomassie.

En el tiempo de cosecha del cultivo a las 96 hpi, la cuantificación por medio de ELISA indicó que la distribución de la proteína VP6 es de 46 % en el sobrenadante y el 54 % restante en el pellet celular, la producción de proteína VP6 en este punto alcanzó una concentración total de 195  $\mu\text{g/ml}$  [51].

La purificación de proteína VP6 recombinante se realizó a partir de la fracción del sobrenadante, a la cual se le adicionaron inhibidores de proteasas (**MATERIALES Y MÉTODOS**) para minimizar la degradación por las proteasas producidas por las células de insecto y baculovirus que son también secretadas al sobrenadante durante el cultivo.

La purificación de la fracción del pellet no se realizó, ya que requiere de etapas adicionales para liberar la proteína VP6 del interior de las células. Particularmente de la adición de detergentes, sonicación y centrifugación. Estas etapas pueden provocar ruptura y desensamblaje de los tubos VP6, así como interferir en la etapa de cromatografía [82, 84].

## **6.2. Purificación de proteínas estructurales de rotavirus.**

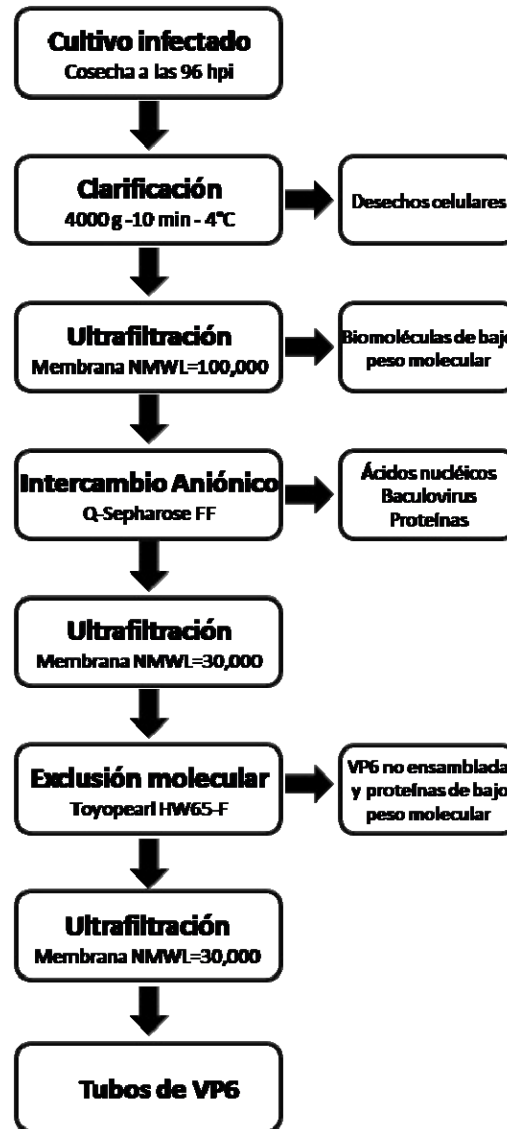
En las etapas de purificación de VP6 se controlaron las condiciones fisicoquímicas (pH y fuerza iónica) para evitar el desensamblaje de las estructuras tubulares. Se siguió un protocolo con etapas continuas de ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular. Este protocolo logra la eliminación de medio de cultivo agotado, proteínas celulares y virales, baculovirus, ácidos nucleicos así como proteína VP6 desensamblada (monómeros y trímeros), obteniendo únicamente VP6 ensamblada en macroestructuras tubulares. En la **Figura 8** se ilustra el orden de las diferentes etapas de purificación realizadas para purificar VP6 ensamblada en forma de tubos.

### **6.2.1. Clarificación y ultrafiltración.**

Después de cosechar el cultivo a las 96 hpi, este es clarificado por centrifugación a 4000 g por 10 min a 4°C para eliminar del sobrenadante las células así como otros componentes de gran tamaño de los desechos celulares (**Figura 8**). El sobrenadante está compuesto por diferentes proteínas en el intervalo de 120 a 20 kDa, en el cual las proteínas gp64 (64 kDa) y VP6 (45 kDa) son los componentes mayoritarios (**Figura 11, Carril 2.**).

La etapa inicial de ultrafiltración en un sistema agitado (Amicon Bioseparations, Millipore) con membrana de celulosa regenerada de NMWL=100,000 removió proteínas con peso molecular menor a 100 kDa, la VP6 no ensamblada así como medio de cultivo agotado mientras se concentran las macroestructuras de alto peso molecular (tubos VP6 y baculovirus). El sobrenadante se concentró hasta aproximadamente la mitad del volumen original utilizando

baja velocidad de agitación y presión positiva de aire para evitar daño de los tubos VP6 y no comprometer su integridad ya que las partículas pseudovirales son sensibles a esfuerzos de corte [56].



**Figura 8.**

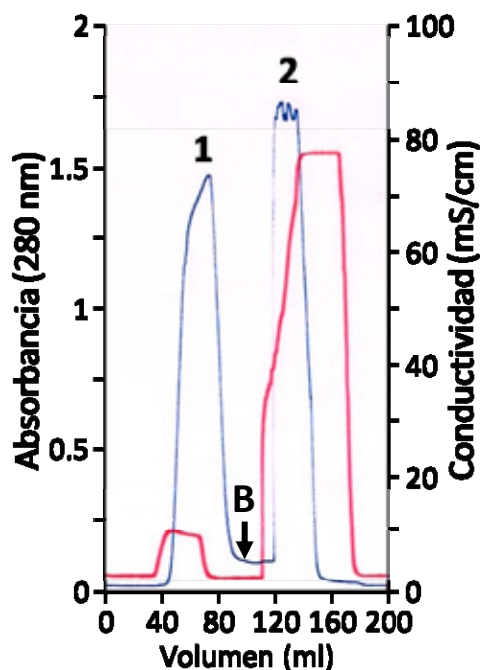
Etapas para purificación de proteína VP6. Se indican las etapas de purificación para la purificación de proteína VP6 ensamblada en forma de tubos a partir de sobrenadante de cultivo.

### 6.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico.

La cromatografía de intercambio aniónico (resina Q-Sepharose FF, GE Healthcare) es una etapa de purificación comúnmente utilizada para la recuperación, remoción o inactivación de virus en productos biotecnológicos [81, 82, 92].

En la **Figura 9** se muestra un cromatograma típico de un ciclo de purificación. El pH del buffer de corrida y de elusión fue ajustado a 6.16 debido a que en estas condiciones los ácidos nucleicos así como los baculovirus interactúan con la resina y permanecen adsorbidos, mientras que los tubos VP6 pasan a través de la matriz y salen en el pico #1 de la cromatografía (**Figura 9, Pico#1**).

La unión de diferentes virus (X-MuLV, MMV y SV40) y de la proteína gp64 de la envoltura de los baculovirus con la resina Q-Sepharose FF es debido a interacciones electrostáticas debido a que en las condiciones de proceso estas poseen carga negativa [33, 75, 81, 82, 92], mientras que VP6 tendrá carga cercana a neutro al estar cerca de su punto isoeléctrico y no se adsorberá en la matriz.



**Figura 9.**

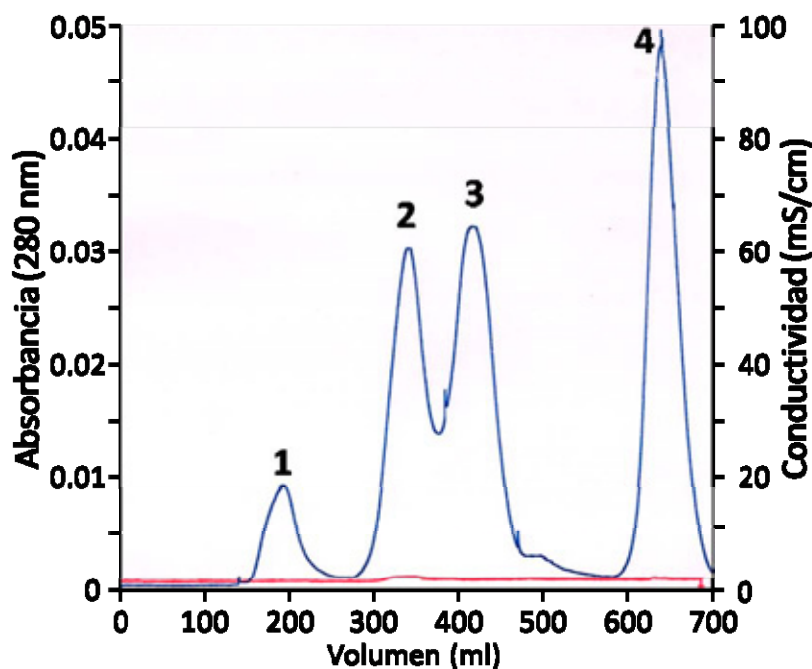
**Cromatografía de intercambio aniónico.** Pico#1, 40-80 ml. A los 100 ml se inicia cambio a buffer B (Indicado con flecha). Línea azul indica absorbancia y línea roja conductividad. Pico#2, 120-150 ml. Flujo a 2 ml/min.

La elusión de los virus adsorbidos se lleva a cabo por aumento de fuerza iónica al utilizar buffer con 1 M de NaCl (**Figura 9, Pico#2**). El proceso de intercambio aniónico ha demostrado ser robusto en su capacidad de remoción de partículas virales utilizando varios virus modelo, buffers con diferentes conductividades y composiciones, así como condiciones de operación [81, 82].

El pico#1 de la etapa de intercambio aniónico que contiene VP6 fue concentrado por medio de ultrafiltración utilizando una membrana NMWL=30,000 hasta alcanzar 1/5 del volumen original antes de pasar a la cromatografía de exclusión molecular (**Figura 10**).

### 6.2.3. Cromatografía de exclusión molecular.

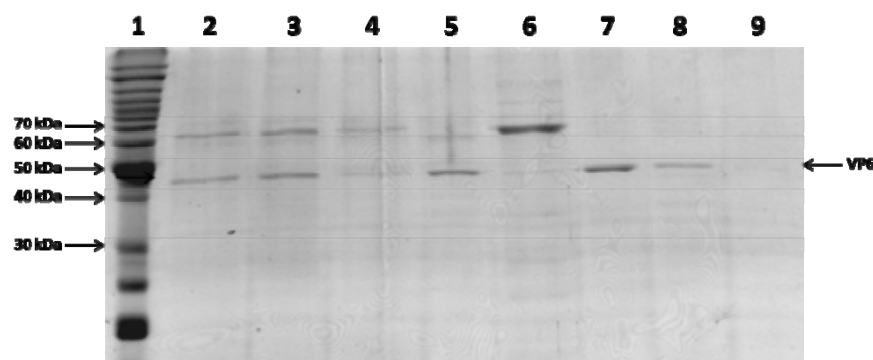
La cromatografía de exclusión molecular (Toyopearl HW65F, TOSOH Biosciences) se utilizó para purificar selectivamente VP6 ensamblada en tubos (de hasta varias micras de largo) de la misma proteína no ensamblada en macroestructuras (trímeros y monómeros) y proteínas de bajo peso molecular. Esta resina tiene un tamaño promedio de poro de 200 nm, similar al tamaño de poro de la columna utilizada en la técnica de cuantificación de rotavirus por GP-HPLC [53]. Por lo que las características de esta columna permiten discriminar entre macroestructuras virales y estructuras de proteínas de menor tamaño, incluyendo VP6 no ensamblada en forma de tubos, ya que las macroestructuras virales no entrarán en los poros de la resina, mientras que el resto de las proteínas difunden a través de los poros. La **Figura 10** muestra un cromatograma típico, cargando 30-40 ml de muestra concentrada. El pico#1 contiene los tubos VP6 de alta pureza que eluyen después de 150 ml desde el momento de inyectar la muestra (**Figura 10**, Pico 1). Proteínas pequeñas eluyen en tres picos a partir de 250 ml (**Figura 10**, Picos 2, 3 y 4).



**Figura 10.**

Cromatografía de exclusión molecular. Pico#1, 150-250 ml. Pico#2-3, 250-450 ml. Pico #4, 550-700 ml. Línea azul indica absorbancia y línea roja conductividad. Flujo a 2.5 ml/min.





**Figura 11.**

**Etapas de purificación de VP6.** Carriles: (1) Marcador de peso molecular. (2) Sobrenadante. (3) Sobrenadante concentrado-retenido. (4) Sobrenadante concentrado-permeado. (5) Pico #1 de cromatografía de intercambio aniónico. (6) Pico #2 de cromatografía de intercambio aniónico. (7) Pico #1 de cromatografía de exclusión molecular. (8) Picos #2-3 de cromatografía de exclusión molecular. (9) Pico #4 de cromatografía de exclusión molecular. En cada carril de cargaron 500 ng de proteína cuantificada por Bradford.

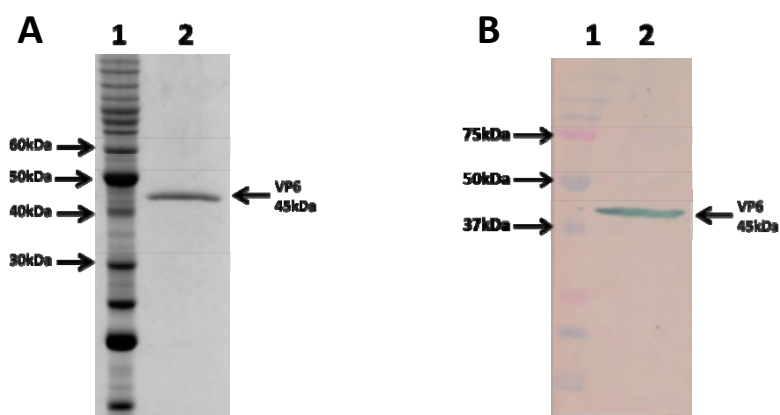
En la **Figura 11** se muestra un gel SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación de VP6. El rendimiento global del proceso de purificación de VP6 es de alrededor del 15-17%, en contraste con el rendimiento típico de purificación por medio de ultracentrifugación que es de apenas 1.6-4.4% [41, 67].

El esquema de purificación (**Figura 8**) puede escalarse y ser utilizado para purificar grandes cantidades de proteínas pseudovirales, permitiendo purificar virus viables a bajo costo en forma reproducible y en tiempos de proceso cortos (en comparación con etapas de ultracentrifugación de 12-18 h). Este proceso puede incluso ser empleado en la purificación de otro tipo de macroestructuras producidas en el SCIBV, por ejemplo partículas pseudovirales de rotavirus de dos capas (VP2/VP6).

### **6.3. Caracterización de proteínas estructurales de rotavirus.**

#### **6.3.1. Pureza de proteínas recombinantes purificadas.**

La pureza de la proteína VP6 purificada fue determinada por medio de SDS-PAGE y western blot. (**Figura 12, A-B**). El análisis por densitometría utilizando el software MacBiophotonics ImageJ v 1.42 indicó que la proteína VP6 purificada posee una pureza >98%. No se observaron indicios de contaminación con otras proteínas, especialmente gp64 de baculovirus o degradación de VP6.



**Figura 12.**

**Geles VP6 purificada.** (A) SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. (B) Western blot con anticuerpo monoclonal antiVP6 revelado con carbazol. Flechas indican posición de banda de la proteína VP6 de 45 kDa.

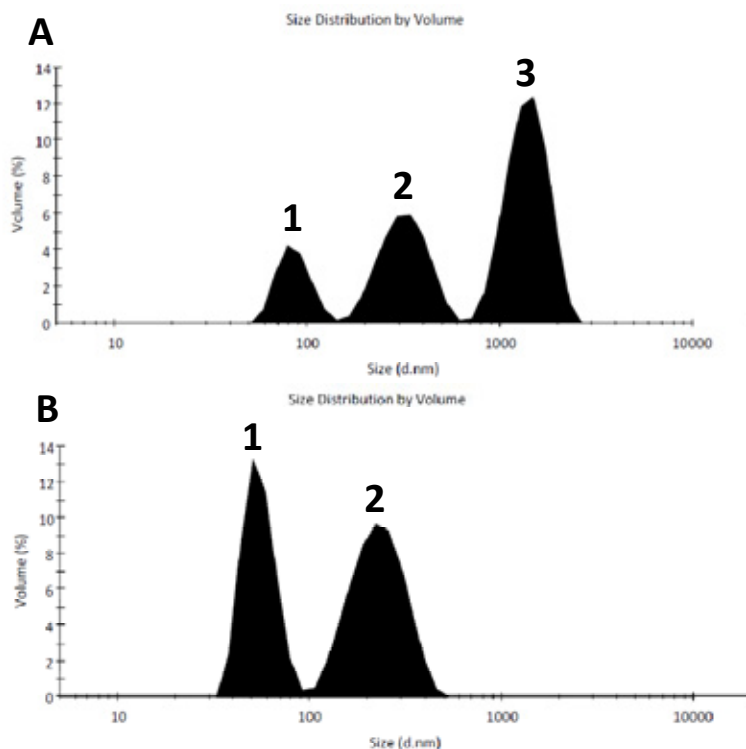
### 6.3.2. Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz.

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) o espectroscopia de correlación de fotones es una técnica de caracterización que permite cuantificar y analizar con gran resolución la distribución de tamaño de las partículas en un gran intervalo, que va desde pocos nanómetros hasta micrómetros de muestras en solución.

En comparación con la microscopía de transmisión electrónica (TEM), que es la técnica comúnmente utilizada para la caracterización de morfología y tamaño de virus y partículas pseudovirales, DLS es una técnica no invasiva y no destructiva que además provee mediciones repetibles en pocos minutos del tamaño y la distribución de las poblaciones presentes en muestras heterogéneas complejas [10].

Se realizó la caracterización por DLS de la distribución de tamaño (reportado como diámetro hidrodinámico en nanómetros) de las diferentes etapas de purificación de VP6 para analizar si este método puede ser empleado como técnica analítica durante los bioprocesos. Al inicio del proceso de purificación el sobrenadante concentrado está compuesto por biomoléculas distribuidas en tres poblaciones con diámetros hidrodinámicos de 86, 323 y 1407 nm, que corresponden al 14.5, 30.5 y 55% del volumen respectivamente (Figura 13-A). Es de particular importancia el pico #3 que está constituido por macroestructuras de 700 nm hasta 2.7  $\mu\text{m}$ , ya que corresponde a los tubos VP6.

El permeado de la etapa inicial de ultrafiltración está constituido por dos poblaciones, la primera con diámetro promedio de 55 nm y la segunda de 232 nm, que representan el 45% y 55% de la muestra (**Figura 13-B**). En el gel SDS-PAGE se había confirmado que esta fracción correspondía a proteínas pequeñas así como medio de cultivo agotado (**Figura 11**).

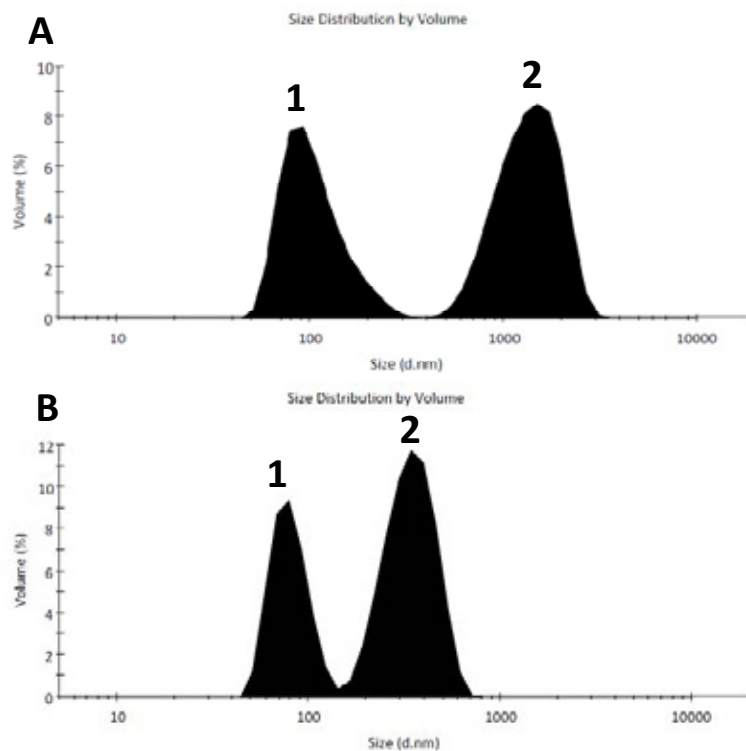


**Figura 13.**

**Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz. (A)** Retenido del sobrenadante concentrado por ultrafiltración, pico 1: diámetro 86 nm, 14.5 % volumen, pico 2: diámetro 323 nm, 30.5 % volumen, pico 3: 1407 nm, 55 % volumen. **(B)** Permeado del sobrenadante concentrado por ultrafiltración, pico 1: 55 nm, 45 % volumen, pico 2: 232 nm, 55 % volumen.

Durante la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, el sobrenadante concentrado se separa en dos fracciones. La primera fracción que no interactúa con la resina está distribuida en dos poblaciones que tienen diámetros promedio de 108 y 1406 nm, respectivamente (**Figura 14-A**). La fracción retenida en la resina de intercambio aniónico y posteriormente eluida está dividida en dos picos de 80 y 348 nm (**Figura 14-B**).

El pico 2 de la **Figura 14-A** son los tubos VP6, mientras que el pico 2 de la **Figura 14-B** con diámetro hidrodinámico promedio de 348 nm corresponde con el tamaño característico de los baculovirus, de entre 300-400 nm [75, 92], confirmando la eficiencia de la etapa de intercambio aniónico en la remoción de partículas baculovirales.

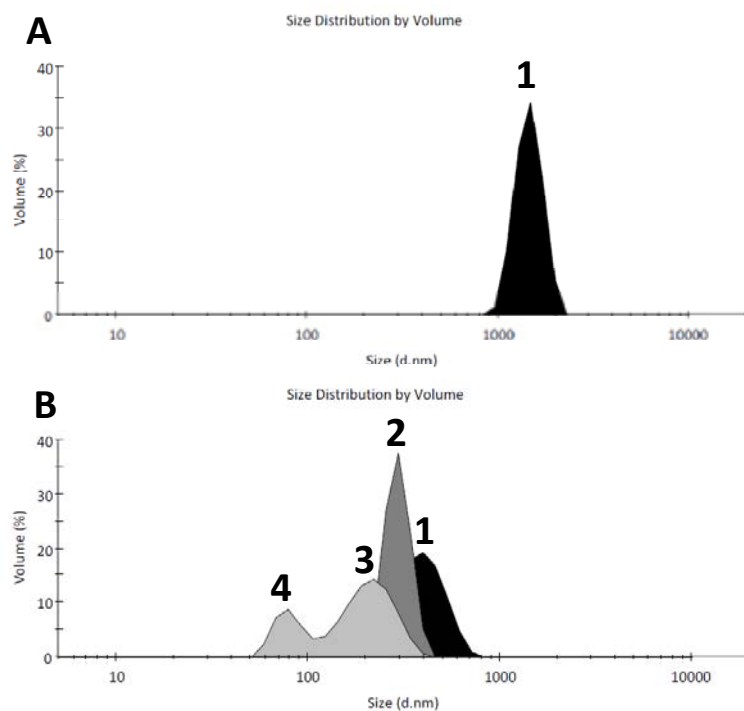


**Figura 14.**

**Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz. (A)** Pico 1 cromatografía de intercambio aniónico, pico 1: diámetro 108 nm, 43 % volumen, pico 2: diámetro 1406 nm, 57 % volumen. **(B)** Pico 2 cromatografía de intercambio aniónico, pico 1: 80 nm, 37 % volumen, pico 2: 348 nm, 63 % volumen.

La cromatografía de exclusión molecular separa los componentes de acuerdo a su tamaño o peso molecular. Este fenómeno es muy claro en el caso de la última etapa de purificación de VP6 ya que la muestra se separa en cuatro fracciones. La primera fracción (**Figura 10, Pico 1**) presenta una distribución homogénea con una sola población con una distribución de tamaño de 825 nm a 2300 nm, con un diámetro hidrodinámico promedio de 1460 nm (**Figura 15-A**). Los picos 2 y 3 de la **Figura 10** poseen diámetros promedio de 387 y 295 nm, respectivamente. La última fracción presenta dos poblaciones con tamaños pequeños igual o menor que el tamaño de poro de la resina, los diámetros hidrodinámicos promedio son de 80 y 210 nm (**Figura 15-B**).

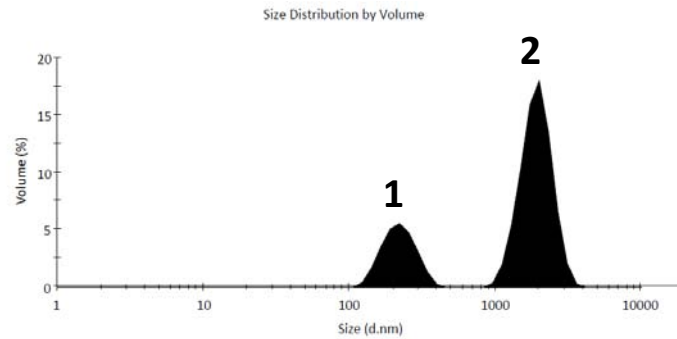
Estos datos confirman la capacidad de resolución de la columna de exclusión molecular, especialmente para obtener macroestructuras (tubos y partículas pseudovirales esféricas) separadas de otras proteínas de menor tamaño.



**Figura 15.**

**Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz. (A)** Pico 1: fracción 1 de cromatografía de exclusión molecular: diámetro 1460 nm, 100 % volumen. **(B)** Pico 1: fracción 2 de cromatografía de exclusión molecular (color negro): 387 nm, 100 % volumen. Pico 2: fracción 3 de cromatografía de exclusión molecular (color gris oscuro): 295 nm, 100 % volumen. Pico 3: fracción 4 de cromatografía de exclusión molecular (color gris claro): 212 nm, 73% volumen y Pico 4: fracción 4 de cromatografía de exclusión molecular (color gris claro): 80 nm, 27% volumen.

Antes de las reacciones de funcionalización, la proteína VP6 debe cambiarse a un buffer con una menor cantidad de sales (10 mM Tris, pH 8.0) o agua ultrapura. Para esto, se utilizó un sistema de ultrafiltración agitado (Amicon, Millipore) con membrana con NMWL=30,000 utilizando al menos tres volúmenes de buffer o agua ultrapura. La distribución de tamaño por volumen de los tubos VP6 después del cambio de buffer se muestra en la **Figura 16**. Se observaron dos poblaciones, la primera con un diámetro promedio de 224 nm correspondiente al 25.7 % en volumen y la segunda con una media de 1940 nm represento el 74.3 % en volumen, distribuido entre 995 y 3500 nm. Ambas poblaciones están formadas por proteína VP6 ya que en la electroforesis SDS-PAGE y western-blot no se detectaron otras proteínas (**Figura 12**). La población de 224 nm corresponde a pequeños agregados de VP6 formados por desensamblaje o ruptura de los tubulos al hacer el cambio de buffer de la proteína antes de la funcionalización.



**Figura 16.**

**Distribución de tamaño proteína VP6 después del cambio de buffer.** Distribución de tamaño por volumen, pico 1: diámetro 223.8 nm, 25.7 % volumen, pico 2: diámetro 1938 nm, 74.3 % volumen.

El virus del mosaico del tabaco (TMV), el bacteriófago M13 y el virus SIRV2 son los templados virales con estructura fibrilar que han sido utilizados en la síntesis de nanomateriales [13, 15, 16, 23, 35, 74, 77, 80, 91]. Los nanotubos de VP6 producidos en forma recombinante y purificados mostraron una longitud mayor a cualquiera de estos virus, ya que en promedio fueron de cuatro a seis veces más largos que TMV (300 nm) y más del doble de largo que M13 y SIRV2 (800-900 nm).

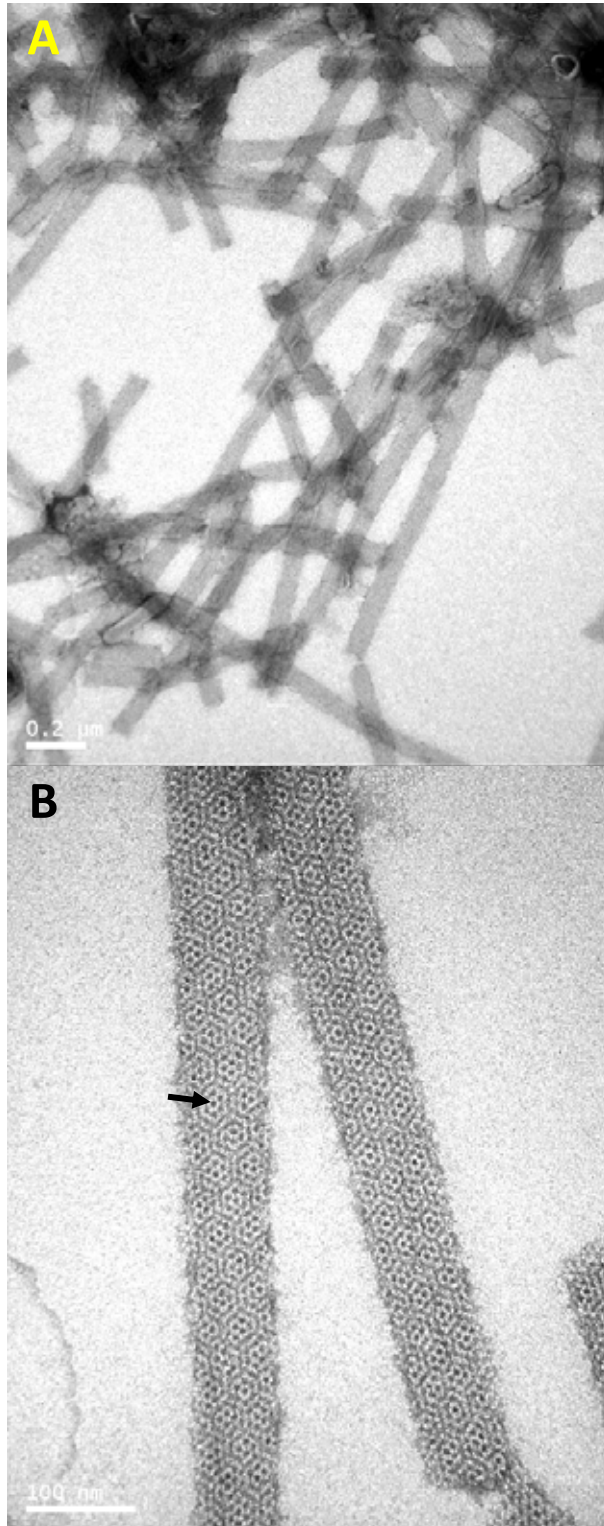
La obtención de nanoestructuras autoensamblables de grandes longitudes ha sido un reto no resuelto, los esfuerzos se han centrado en modificar genéticamente las proteínas de la cápside del bacteriófago M13 por medio de dedos de leucina o por medio de conjugación con polímeros [72, 84, 99, 100], pero la limitante sigue siendo que la longitud está limitada por la organización del material genético contenido en los virus. Las estructuras autoensamblables formadas únicamente por la proteína VP6 son más largas, huecas y libres de material genético, aumentando su versatilidad y disponibilidad de posibles sitios para conjugación de materiales de interés en comparación con los virus previamente empleados.

### 6.3.3. Microscopía de transmisión electrónica.

Análisis estructurales por medio de microscopía electrónica revelaron que rotavirus posee tres capas concéntricas que rodean el genoma. Cada partícula de rotavirus en su capa intermedia tiene 780 moléculas de VP6 (45 kDa) formando 260 trímeros que exhiben simetría con número de triangulación  $T=13$  sobre la estructura icosaédrica y son visibles por medio tinción negativa a través de microscopía electrónica como triángulos proyectándose en la superficie [40].

La proteína VP6 expresada en forma recombinante y purificada fue analizada por medio de microscopía electrónica utilizando tinción negativa con acetato de uranilo. Las micrografías mostraron que la proteína VP6 está ensamblada en estructuras tubulares en las cuales es posible apreciar los típicos arreglos hexagonales de las partículas de rotavirus sobre la superficie de los nanotubos formados por los trímeros de VP6 proyectándose (Figura 17) [39]. El acetato de uranilo se acumula a lo largo de los bordes debido a la estructura tubular. La longitud de los tubos de VP6 observada en las micrografías (de 800 nm a 3000 nm) corresponde a la distribución determinada por medio de dispersión dinámica de luz, y el diámetro de los nanotubos fue de 75 nm con bordes rectos (Figura 17).

Los rotavirus se caracterizan por la presencia de 132 canales o poros que están agrupados en tres tipos de acuerdo a su localización en la estructura icosaédrica [40]. Los canales tipo I que tienen el menor diámetro ( $\sim 10 \text{ \AA}$ ) están localizados en los ejes de simetría cinco, mientras que los canales tipo II se localizan en ejes de simetría seis junto a los canales tipo I, y los canales tipo III están en los ejes de simetría seis y son los que poseen mayor diámetro. Los tubos de VP6 en contraste con las partículas icosaédricas únicamente presentan ejes de simetría seis con arreglos hexagonales y poros tipo II y III dependiendo del diámetro de la estructura tubular (Figura 17-B). El arreglo del patrón de hexágonos está compuesto por seis subunidades del trimero alrededor de áreas electrodensas (oscuras) que corresponden a huecos presentes en la estructura original que son llenados por el uranilo. La distancia entre las subunidades en los tubos es consistente en los tubos encontrados en infecciones así como en los producidos por reensamblaje, de entre 55 y 58  $\text{ \AA}$  [68].



**Figura 17.**

**Microscopía de Transmisión Electrónica de VP6.** Tinción negativa con acetato de uranilo al 1%, microscopio electrónico Zeiss EM900 operado a 80 kV, rejilla 200 mesh de carbón-formvar-cobre. **(A)** 30,000 x. **(B)** 140,000 x, la flecha indica localización de poro en el tubo de VP6. Micrografías tomadas por Jimmy A. Mena y Germán Plascencia-Villa.



La estructura de los tubos de VP6 producidos en forma recombinante es idéntica a la estructura de los tubos VP6 formados por reensamblaje, a los que se han observado en infecciones severas de rotavirus (muestras de bovinos, caballos, ratones y humanos) y en algunos cultivos celulares infectados, determinada por medio de microscopía electrónica, difracción óptica de micrografías de TEM, modelamiento y criomicroscopía [39, 102].

Datos previos indican que los tubos de VP6, así como los formados por la proteína NS1 de Bluetongue virus (BTV), poseen una morfología muy estable (resisten tratamiento térmico a 45°C por 10 min), y que pueden desensamblarse por cambios fisicoquímicos (aumento de fuerza iónica, detergentes o agentes quelantes) [57]. Además, cuando la estructura es alterada se pueden formar filamentos en el extremo de los tubos o inclusive puede ocurrir el desensamblaje.

#### **6.4. Funcionalización de proteínas estructurales de rotavirus.**

Las nanopartículas metálicas pueden sintetizarse por diferentes métodos: condensación de iones metálicos, métodos sonoquímicos, fotoquímicos y descomposición térmica, reducción química de sales metálicas o reducción electroquímica [86]. En todos los métodos se busca tener control del tamaño y forma de las nanopartículas ya que pequeños cambios en los procedimientos de síntesis producirán nanopartículas con diferentes propiedades.

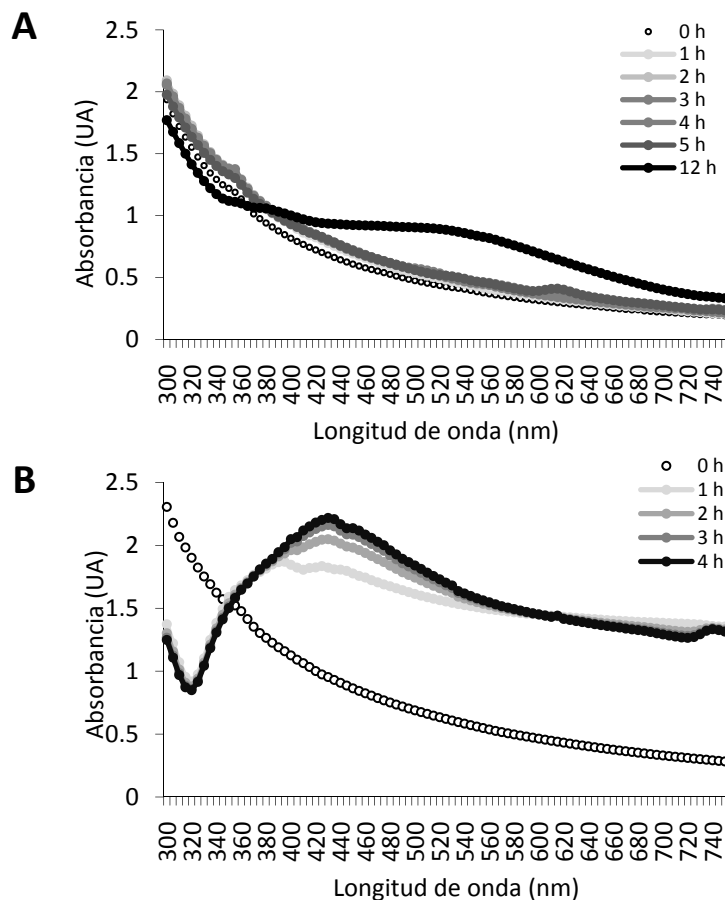
La conjugación de VP6 ensamblada en forma tubular con materiales inorgánicos es de interés en nanotecnología y ciencias de materiales ya que permite expandir los usos y aplicaciones de esta proteína más allá de las áreas de medicina, biotecnología y ciencias básicas. Por ejemplo, para sintetizar nanotubos funcionalizados con nanopartículas de diferentes metales, obteniendo nuevos nanomateriales híbridos al tener el templado biológico conjugado a nanopartículas inorgánicas.

La formación de las nanopartículas es posible en primera instancia dada la capacidad y afinidad de VP6 por unir iones metálicos. El sitio de unión de metales une iones que servirán como sitios de nucleación para sintetizar, estabilizar y organizar las nanopartículas sobre la superficie de los nanotubos. La capacidad de unión de iones metálicos se debe a la carga de los aminoácidos así como su posición espacial precisa. La segunda etapa de la reacción de síntesis de nanopartículas consiste en agregar un agente reductor que sirve como catalizador. La reacción puede monitorearse mediante espectroscopia de absorción en el intervalo UV-Vis (300-750 nm) observando la aparición de un pico de máxima absorción que corresponde a la resonancia de plasmón de las nanopartículas de plata y oro.

##### **6.04.01. Espectroscopia de absorción UV-Vis.**

Las partículas metálicas de escala nanométrica al ser excitadas con un haz de luz exhiben un fenómeno llamado resonancia de plasmón. Esta propiedad óptica de las nanopartículas de plata y oro está determinada por oscilaciones colectivas de densidad de electrones llamados plasmones que en un espectro en el intervalo UV-Vis mostrará un punto de máxima absorción característico [86]. Este fenómeno de absorción produce los colores típicos de las nanopartículas metálicas en dispersiones coloidales.

Se realizó espectroscopia UV-Vis en el intervalo 300-750 nm cada hora desde el inicio y hasta las 4 h de la reacción de funcionalización en el caso de reacciones donde se utilizó borohidruro de sodio o hasta 12 h al utilizar citrato de sodio. **Figura 18.**



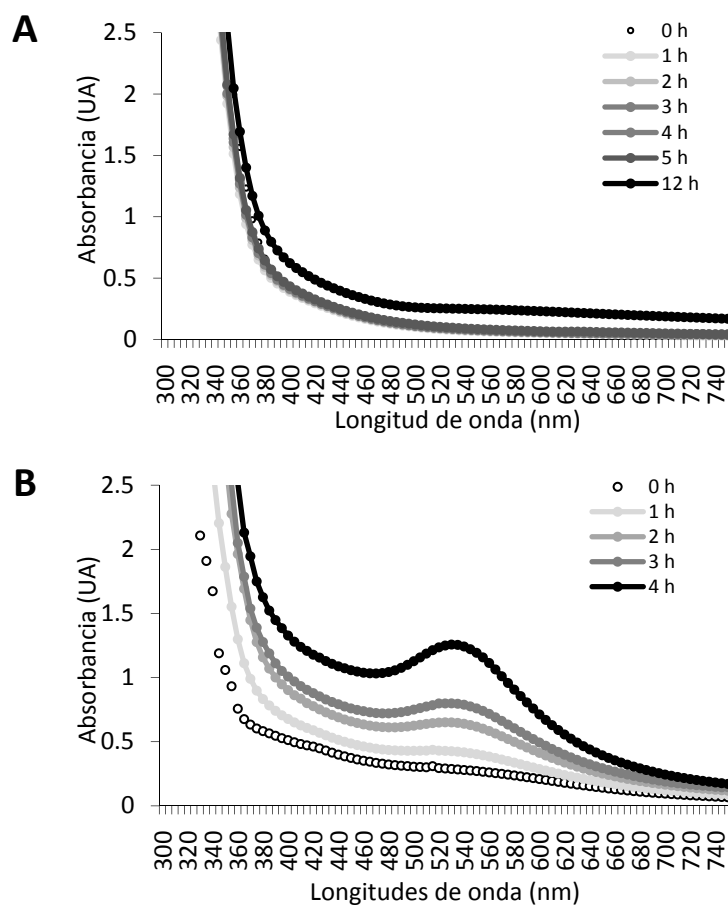
**Figura 18.**

**Espectros de absorción UV-Vis durante la reacción de funcionalización con plata. (A)** Espectro de absorción utilizando citrato como reductor. **(B)** Espectro de absorción utilizando borohidruro de sodio como reductor.

El espectro de absorción de los nanotubos funcionalizados con plata utilizando citrato como reductor no mostró un punto máximo, aunque sí un ligero incremento respecto al inicio de la reacción, lo que indica que los agregados metálicos formados están debajo de los 2 nm de diámetro (**Figura 18-A**) [6]. En cambio, al utilizar un reductor fuerte (borohidruro de sodio) los iones de plata se redujeron hasta valencia cero y mostraron un punto de máxima absorción en 430 nm. Este valor de absorción máxima corresponde dentro del intervalo de 390-480 que ha sido observado durante la síntesis de nanopartículas de plata utilizando diversos templados biológicos (His, Cys, epítopo rico en histidina HRE, imidazol y glutatión) [77, 78].

Las partículas de plata presentan el máximo de absorbancia de plasmón en el intervalo 320-400 nm, pero ya que este valor también depende del tamaño y forma de las nanopartículas de plata, al estar sobre el templado viral en forma tubular provoca un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores tal como ocurre con nanopartículas de mayor tamaño [17].

En la **Figura 19** se muestran los espectros de absorción de las reacciones de funcionalización con oro ( $\text{HAuCl}_4$ ). En la reacción con el reductor suave mostró apenas un ligero aumento en la absorción de los nanotubos funcionalizados con oro pero no logró presentar un pico característico de plasmón de Au (**Figura 19-A**), en forma similar a la reacción con plata indicando que también se obtuvieron agregados de tamaños pequeños con diámetros efectivos menores a 2 nm [6, 86]. En contraste, en las reacciones donde se utilizó  $\text{NaBH}_4$  como reductor el producto mostró un pico de resonancia de plasmón de Au en el intervalo visible centrado en 530nm (**Figura 19-B**), correspondiente a nanopartículas conjugadas a péptidos ricos en histidina (524 nm) [77, 78].

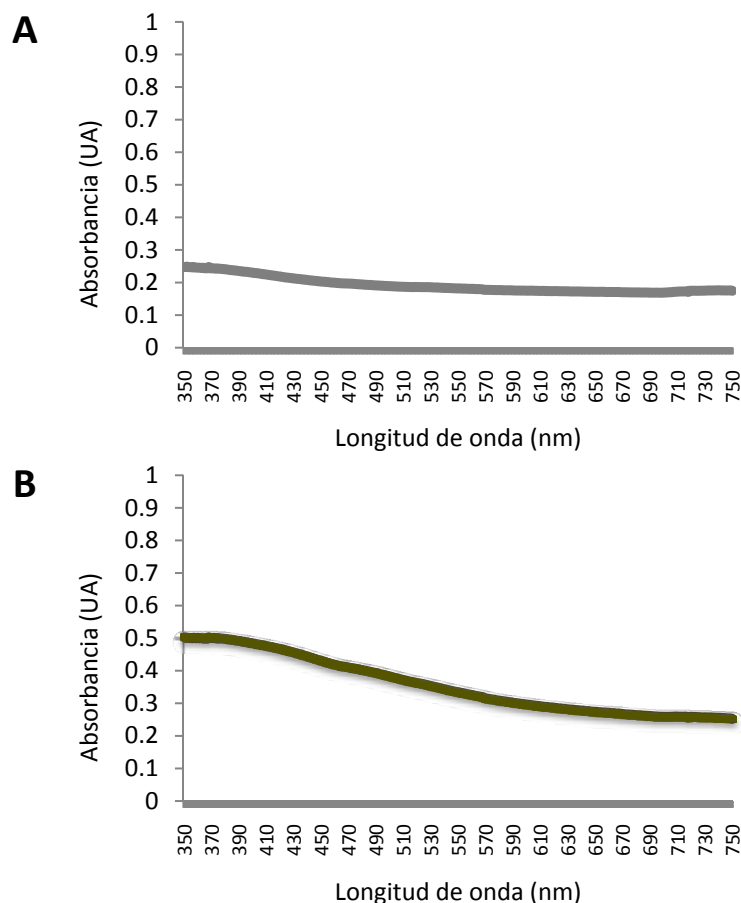


**Figura 19.**

Espectros de absorción UV-Vis durante la reacción de funcionalización con oro. (A) Espectro de absorción utilizando citrato como reductor. (B) Espectro de absorción utilizando  $\text{NaBH}_4$  como reductor.

La forma del pico del espectro de absorción de las nanopartículas al ser simétrico y estrecho usualmente indica la presencia de nanopartículas pequeñas, monodispersas y de forma esférica [17, 86]. También puede dar información acerca de la estructura y el arreglo de las nanopartículas.

Las nanopartículas de platino o paladio no muestran ningún pico característico de resonancia de plasmón debido a las propiedades de estos metales [86]. En la **Figura 20** se muestran los espectros de absorción de las reacciones de funcionalización de VP6 con platino y paladio que no mostraron variación durante el tiempo de reacción. Algunos autores indican que en el caso de nanopartículas de platino en algunos casos puede observarse un pequeño aumento de absorbancia en el intervalo 270-320 nm [76, 78].



**Figura 20.**

**Espectros de absorción UV-Vis de la reacción de funcionalización con platino y paladio. (A)** Espectro de absorción VP6 funcionalizada con platino y borohidruro como reductor. **(B)** Espectro de absorción VP6 funcionalizada con paladio y borohidruro como reductor.

## **6.5. Caracterización de proteínas estructurales de rotavirus funcionalizadas.**

Los nanotubos de VP6 funcionalizados fueron lavados por medio de centrifugación para eliminar nanopartículas sintetizadas en el medio acuoso, proteínas desensambladas así como subproductos que no hubieran reaccionado. Para verificar la integridad de las muestras previo al análisis por microscopía electrónica, se determinó la distribución de tamaño por medio dispersión dinámica de luz.

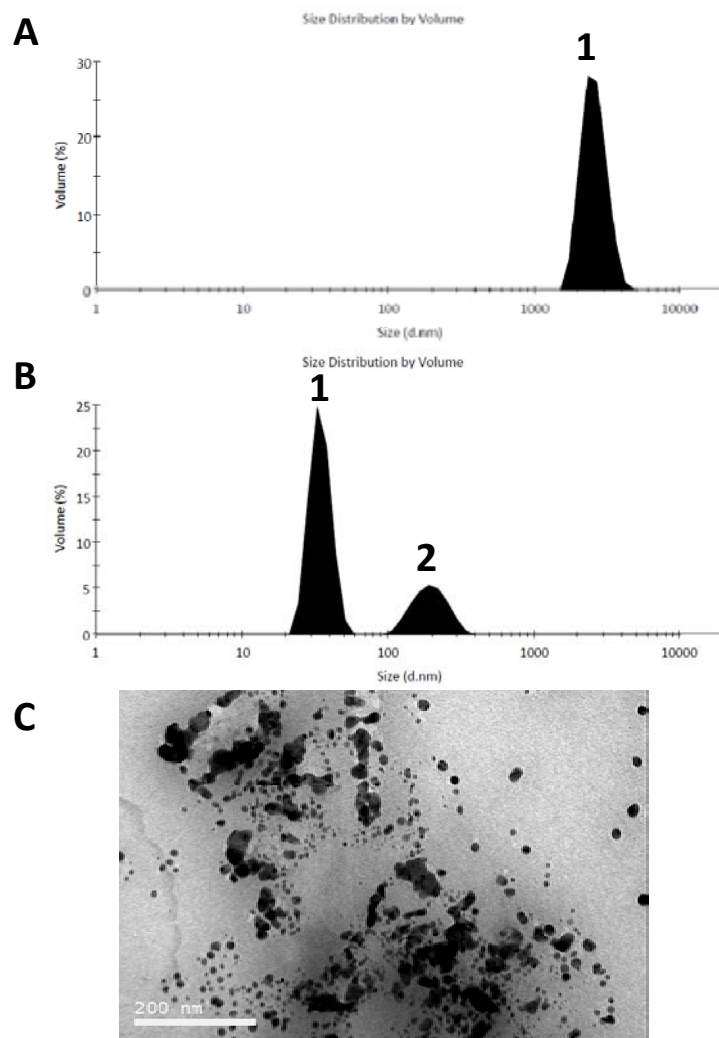
### **6.5.1. Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz.**

La distribución de tamaño de los nanotubos funcionalizados indica que estos no sufrieron de desensamblaje debido a la reacción de síntesis de las nanopartículas sobre su superficie (**Figura 21-A**). La longitud promedio de los nanotubos funcionalizados fue mayor a 2500 nm, este tamaño es mayor a lo observado en las muestras de proteínas purificadas.

Se ha observado que pueden formarse aglomerados de tubos funcionalizados que quedan conjugados por medio de las nanopartículas sintetizadas. Además, que debido al tamaño los tubos tienden a precipitar en pocos minutos, por lo que en ocasiones esto interfiere con la determinación de distribución de tamaño.

En reacciones sin presencia de VP6 o en la fracción eliminada durante las etapas de lavado, se determinó que están constituidas por dos poblaciones de agregados metálicos con diámetros promedio de 34 y 197 nm (**Figura 21-B**). En el recuadro de la **Figura 21-B** se muestra una micrografía con agregados de plata, estos son polimorfos y no presentan organización o ensamblaje característico.

Los nanotubos funcionalizados fueron caracterizados a detalle mediante microscopía de transmisión electrónica y microscopía de transmisión electrónica de alta resolución acoplada son espectrometría de dispersión de energía por rayos X (EDX). Esto fue para determinar la distribución del tamaño, estructura y morfología de las nanopartículas metálicas conjugadas sobre el templado viral.



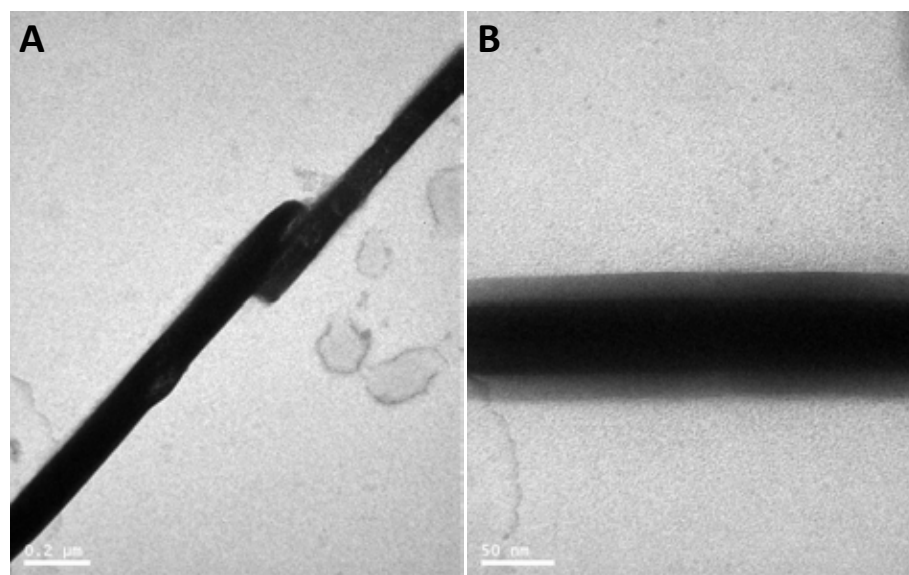
**Figura 21.** Distribución de tamaño de proteínas funcionalizadas. (A) DLS proteína funcionalizada con  $\text{AgNO}_3$ . Pico 1: diámetro 2561 nm, 100% volumen. (B) DLS control sin proteína. Pico 1: diámetro 34.5 nm, 73.9 % volumen. Pico 2: diámetro 197 nm, 26.1 % volumen. (C) Micrografía TEM 85,000x de agregados de plata obtenidos por reducción química sin proteína VP6.

### 6.5.2. Funcionalización de VP6 con plata (Ag).

Las nanopartículas de Ag son sintetizadas por métodos convencionales de deposición física de vapor, implantación de iones y por reducción química utilizando citrato de sodio (método Turkevich), ácido ascórbico o borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). Debido a sus diversos usos y aplicaciones en el área de nanomedicina, como dispositivos electrónicos y nanobaterías, resulta que uno de los retos principales es el poder sintetizar nanopartículas de plata monodispersas con formas y tamaños controlados. Para lograrlo se han utilizado diferentes agentes estabilizantes, altas temperaturas, solventes orgánicos, así como el control de la relación molar precursor/reductor.

Durante la funcionalización de la proteína VP6 con plata se variaron la concentración de precursor ( $\text{AgNO}_3$ ), tipo de reductor (citrato de sodio o  $\text{NaBH}_4$ ), la relación molar precursor/reductor y el tiempo de reacción. Esto con el fin de producir nanotubos mineralizados completamente cubiertos con metal o nanopartículas discretas conjugadas en la superficie de los nanotubos.

Utilizando 1 mM de  $\text{AgNO}_3$ /2 mM citrato de sodio después de 12 h se logra la mineralización de la superficie externa de los nanotubos de VP6. En las micrografías se observó como una capa delgada electrodensa continua, pero el límite de resolución del microscopio electrónico (EM900 Zeiss) no permitió distinguir nanopartículas o agregados discretos (**Figura 22**). La morfología del templado viral sufrió cambio ya que aunque se mantuvo la longitud de los tubos de VP6 si se observó una reducción del diámetro (**Figura 22-A**). El diámetro de los nanotubos cambió de 75 a 45 nm. Esto fue debido al cambio de pH (de 6.5 a 5.5) provocado por el precursor metálico y reductor así como al aumento de la fuerza iónica. Tal observación coincide con el diagrama de fases de VP6 que indica que al pH empleado predomina la morfología de nanotubos de 45 nm de diámetro [39, 70]. En contraste, mediante reducción química utilizando agentes reductores suaves (ácido ascórbico y citrato) pero sin agentes estabilizantes adicionales se obtienen nanopartículas de 3-16 nm, así como estructuras truncadas de 40-60 nm [63, 86].

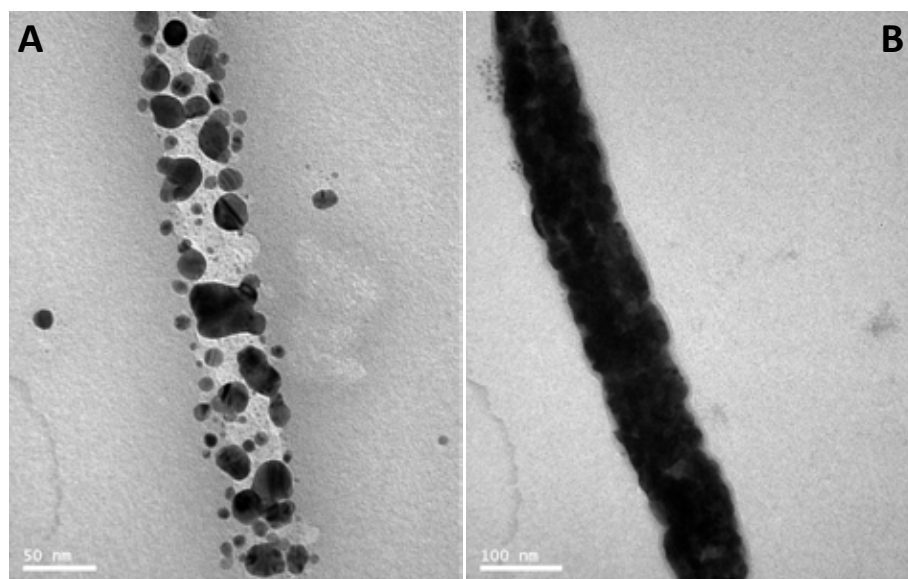


**Figura 22.**

**Microscopía de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con plata. (A)** Funcionalización con 1mM  $\text{AgNO}_3$  y citrato de sodio como reductor, 50000x **(B)** Funcionalización con 1mM  $\text{AgNO}_3$  y citrato de sodio como reductor, 250000x.



Con la misma concentración de plata (1 mM  $\text{AgNO}_3$ ) pero utilizando cantidad equimolar de un reductor fuerte ( $\text{NaBH}_4$ ) también se logra una cobertura completa pero con un patrón distinto. En este caso, la cobertura se dio por nanopartículas metálicas de tamaños variados que crecieron a partir de las 3 h de reacción (justo al momento de añadir el reductor) hasta coalescer formando una cobertura completa (Figura 23). Al igual que en el caso de la mineralización con citrato, el diámetro de los nanotubos cambio de 75 a 45 nm debido al cambio de pH y el aumento de la fuerza iónica [39, 70]. En la Figura 23-A se aprecia el templado viral de 45 nm de diámetro con nanopartículas de diversos tamaños conjugadas sobre su superficie externa. El diámetro del nanotubo de VP6 funcionalizado con la cobertura completa de plata fue de 80 nm (Figura 23-B). Cabe resaltar que no se utilizó tinción negativa con acetato de uranilo, por lo que el templado proteico aparece poco contrastado respecto al soporte de carbón/fomvar de la rejilla de microscopia, mientras que los agregados metálicos de plata al ser electrodensos aparecen más oscuros.

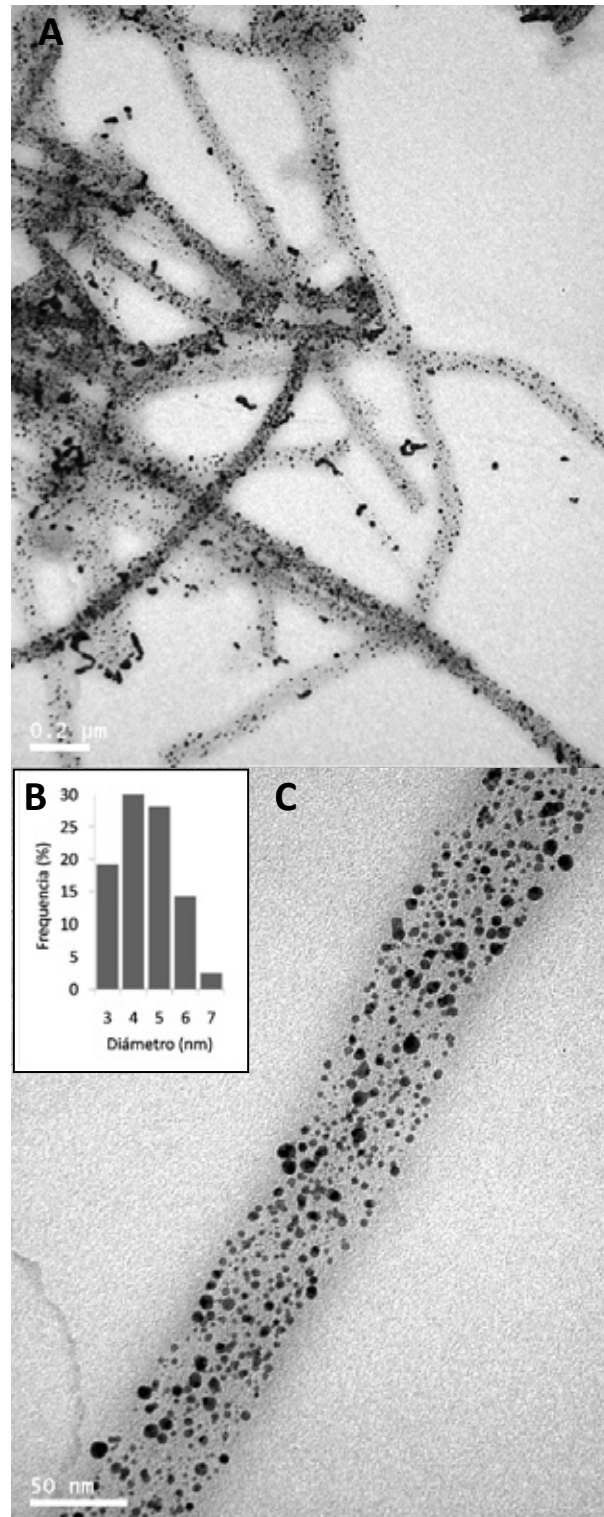


**Figura 23.**

**Microscopia de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con plata. (A)** Funcionalización con 1mM  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor a las 3 h de reacción, 250000x. **(B)** Funcionalización con 1mM  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor a las 4 h de reacción, 140000x.

Utilizando una menor concentración de precursores  $\text{Ag(I)}$  y reductor fuerte (0.5 mM de  $\text{AgNO}_3/0.5$  mM  $\text{NaBH}_4$ ) se logró la formación de nanopartículas discretas y pequeñas conjugadas en la superficie de los nanotubos (Figura 24-A). Las nanopartículas de plata se localizaron en la superficie externa de los nanotubos y presentaron un tamaño de  $4.16 \pm 1.36$  nm, con una

distribución de entre 3 y 7 nm de diámetro (**Figura 24-B-C**), aunque se observaron algunas nanopartículas de hasta 9.5 nm.



**Figura 24.**

**Microscopia de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con plata. (A)** Funcionalización con 0.5 mM  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor, 30000x. **(B)** Distribución de tamaño de nanopartículas en **(C)**. **(C)** Funcionalización con 0.5mM  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor, 250000x.

La síntesis de nanopartículas de plata por métodos de reducción química utilizando  $\text{NaBH}_4$  como reductor produce nanopartículas de 4-12 nm de diámetro, pero se requiere adicionar diferentes agentes estabilizantes tales como poliamidoamina, poliestiren- $\beta$ -polivinilpirrolidina, carboxilatos insaturados de cadena larga o alquantiol sustituido de cadena larga, además del uso de solventes inorgánicos así como de altas temperaturas de reacción [63, 86].

La síntesis de nanopartículas de plata mediada por templados biológicos resulta en agregados de  $52 \pm 13$  nm cuando se emplean algunos péptidos y proteínas o en nanopartículas de 6-13 nm cuando se utilizan aminoácidos (His o Cys) como agentes estabilizadores [74, 78].

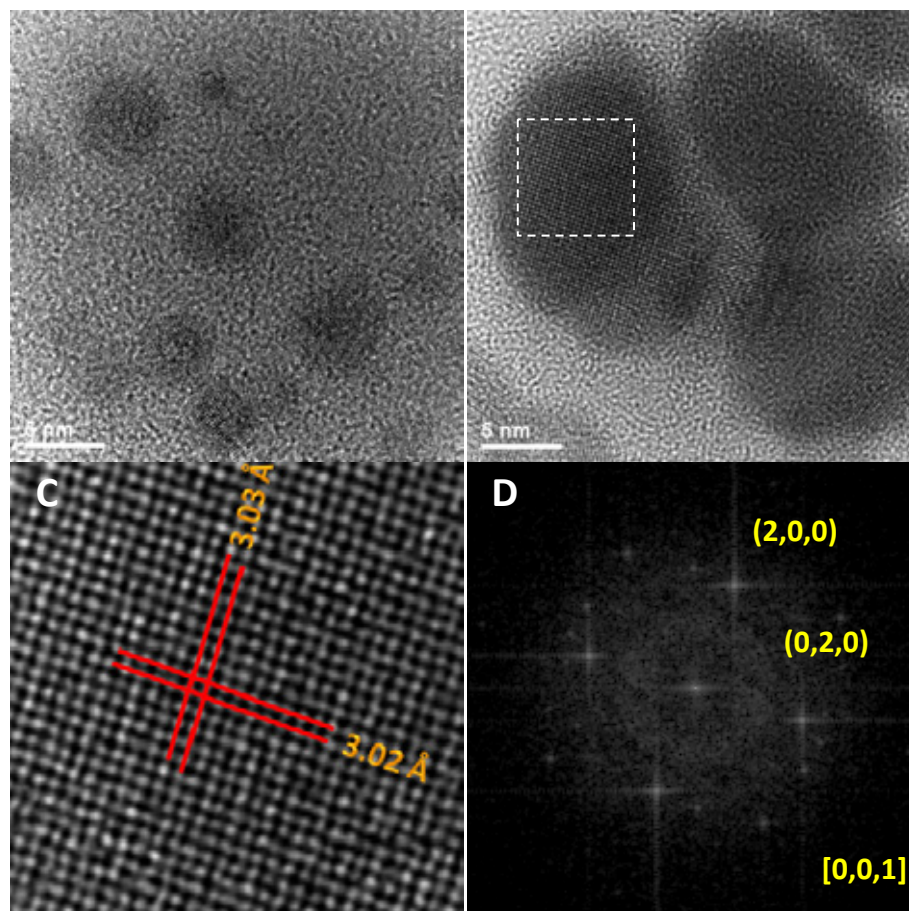
TMV genéticamente modificado se ha utilizado como templado para sintetizar nanopartículas de plata, formando solamente de 2 a 10 nanopartículas en la cavidad interna con un diámetro menor a 5 nm, mientras que el bacteriófago M13 modificado con el péptido E4 permitió sintetizar nanopartículas de aproximadamente 5 nm distribuidas sobre el virus [15, 16, 38]. En comparación, los tubos de VP6 conjugados a nanopartículas de Ag constituyen un excelente ejemplo de utilidad de templados biológicos para obtener nanobiomateriales de alta calidad (con nanopartículas direccionadas con morfología y tamaño controlados).

Las imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) permiten determinar detalles estructurales de las nanopartículas obtenidas que no es posible determinar por medio de TEM. Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra se producen varios tipos de señales, las cuales nos permiten hacer la caracterización estructural y química de la misma. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X característicos [24].

En este caso, las nanopartículas de plata poseen estructura semiesférica al observar los bordes redondeados, el tamaño corresponde a la distribución de las nanopartículas determinada previamente (Figura 24-B). En comparación con el templado biológico y el soporte de la rejilla que poseen estructura amorfa, las nanopartículas presentan arreglos simétricos cúbicos y placas formados por las columnas de átomos de plata organizados dentro de las nanopartículas (Figura 25-A-B).

Al analizar una sección de una nanopartícula de plata, se observó que las distancias interplanares promedio son de 3.02 y 3.03 Å (**Figura 25-C**). Estos datos corresponden a las características típicas de nanopartículas de plata del tipo fcc (“face-centered cubic”) previamente reportadas y caracterizadas, y los datos contenidos en las Tablas Internacionales de Cristalografía (<http://it.iucr.org/>) [15, 63, 87, 94, 97].

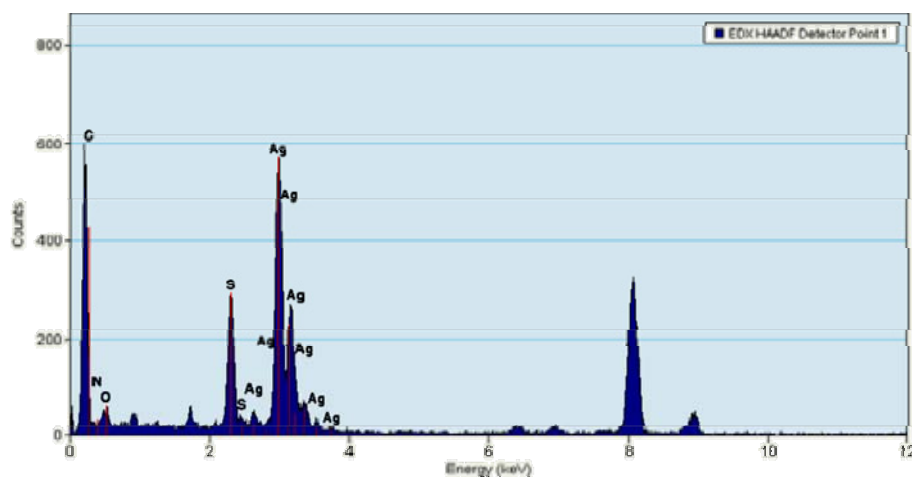
El patrón FFT (*Fast Fourier Transform*) de la micrografía de HR-TEM es similar bajo las condiciones experimentales al patrón de difracción de rayos X, este espectro de frecuencia da información acerca de las características geométricas, orientación y estructura de las nanopartículas [24, 31, 86]. El patrón FFT de la sección marcada de la nanopartícula de plata confirmó el arreglo simétrico cristalino cubico. Además, al comparar con los resportes podemos indicar que la nanopartícula es vista desde el eje [0,0,1] de acuerdo al índice Miller (**Figura 25-D**) [24, 31, 87, 94].



**Figura 25.**

**Microscopia HR-TEM VP6 funcionalizada con plata.** (A) Micrografía HRTEM. (B) Micrografía HRTEM. (C) Detalle de HRTEM indicando distancias interplanares (3.02 x 3.03 Å). (D) Patrón FFT de región detallada en (C). (Asistencia Técnica del Dr. Ariosto Medina, IIM-UMSNH).

El análisis elemental o caracterización química de los tubos de VP6 funcionalizados con plata se realizó mediante espectrometría EDX. Este tipo de análisis se hace directamente en el HR-TEM, y para ello se localizó un tubo de VP6 funcionalizado y hizo pasar el haz de electrones a través de una sección transversal del nanotubo. El detector del microscopio analiza los rayos X característicos emitidos por la muestra y ya que cada elemento posee estructura atómica única, en el espectro obtenido de la muestra es posible identificar la presencia de plata, así como los elementos C, N, O de la proteína y el Cu de la rejilla donde se montó la muestra (**Figura 26**).



**Figura 26.**

Análisis elemental por EDX-HAADF de VP6 funcionalizada con plata. Espectro de dispersión de energía por rayos X región transversal de nanotubo VP6 funcionalizado.

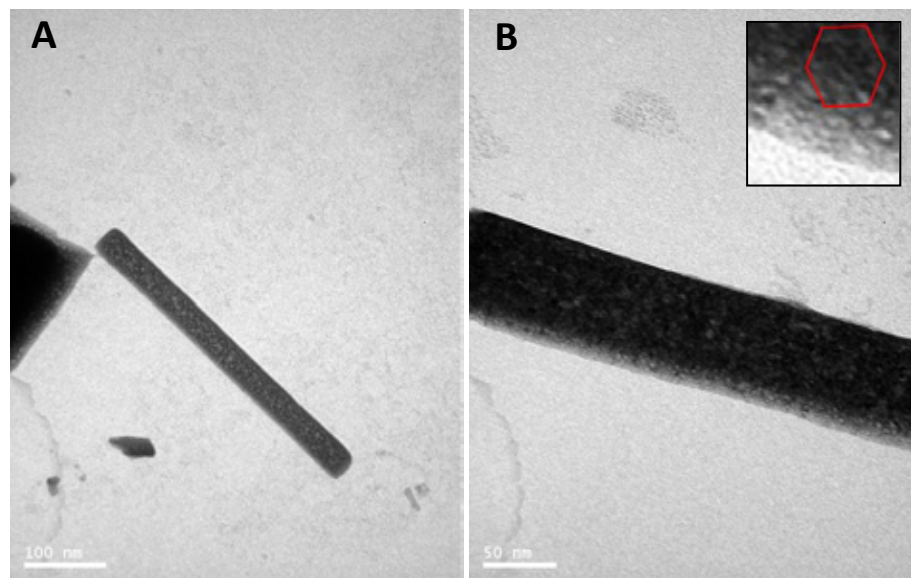
### 6.5.3. Funcionalización de VP6 con oro (Au).

Las nanopartículas de oro son de las más utilizadas y estudiadas en ciencias de materiales. Se caracterizan por su color, que va desde rojo, morado a azul, dependiendo del diámetro y de los agentes estabilizantes utilizados. Estos compuestos han encontrado diversos usos como dispositivos y componentes electrónicos, ópticos, catálisis, sistemas de diagnóstico, así como nanosensores. Las nanopartículas de oro son preparadas mediante el método Turkevich por medio de reflujo de solución diluida de  $\text{HAuCl}_4$  con ácido cítrico o citrato de sodio, produciendo nanopartículas de 10-20 nm de diámetro. Otro método común es utilizar tioles de cadena larga como agentes estabilizantes, altas temperaturas y vacío, lograndose sintetizar nanopartículas con diámetros menores a los 4 nm, aunque la solubilidad de este tipo de nanopartículas se limita a solventes orgánicos [66, 86].



Diferentes usos y aplicaciones requieren tener nanopartículas de oro en solución acuosa, por lo que se requieren métodos adicionales para el cambio de solvente y el empleo de otros agentes estabilizadores. Se utilizó la proteína VP6 como agente estabilizante para la síntesis y ensamblaje de nanopartículas de oro en medio acuoso.

La funcionalización con oro, al añadir citrato de sodio como reductor, resultó en una mineralización de la superficie exterior de los tubos de VP6 después de 3 h de deposición y 9 h de incubación, en forma similar a la obtenida con plata (**Figura 27**). En este caso el diámetro del templado viral permaneció en 75 nm pese a la reducción del pH debido al ácido cloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) y el citrato. La capa delgada metálica electrodensa cubrió toda la superficie externa de los nanotubos; en algunas regiones (especialmente en los bordes) pudo distinguirse la morfología del templado proteico.



**Figura 27.**

**Microscopía de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con oro.** (A) Funcionalización con 1mM  $\text{HAuCl}_4$  citrato de sodio y como reductor, 85000x (B) Funcionalización con 1mM  $\text{HAuCl}_4$  y citrato de sodio como reductor, 250000x. En el recuadro se muestra detalle de arreglo hexagonal de trímeros de VP6.

La utilización de reductores suaves (ácido ascórbico o citrato de sodio) en métodos de síntesis por reducción química promueve la síntesis de nanopartículas de 10-20 nm, que pueden utilizarse posteriormente como sitios de nucleación en nuevas reacciones hasta llegar a formar esferas de 100 nm de diámetro [66, 86]. Para lograr sintetizar nanopartículas de oro de tamaño discreto (entre 3 y 10 nm de diámetro) se requiere de agentes estabilizadores tales como

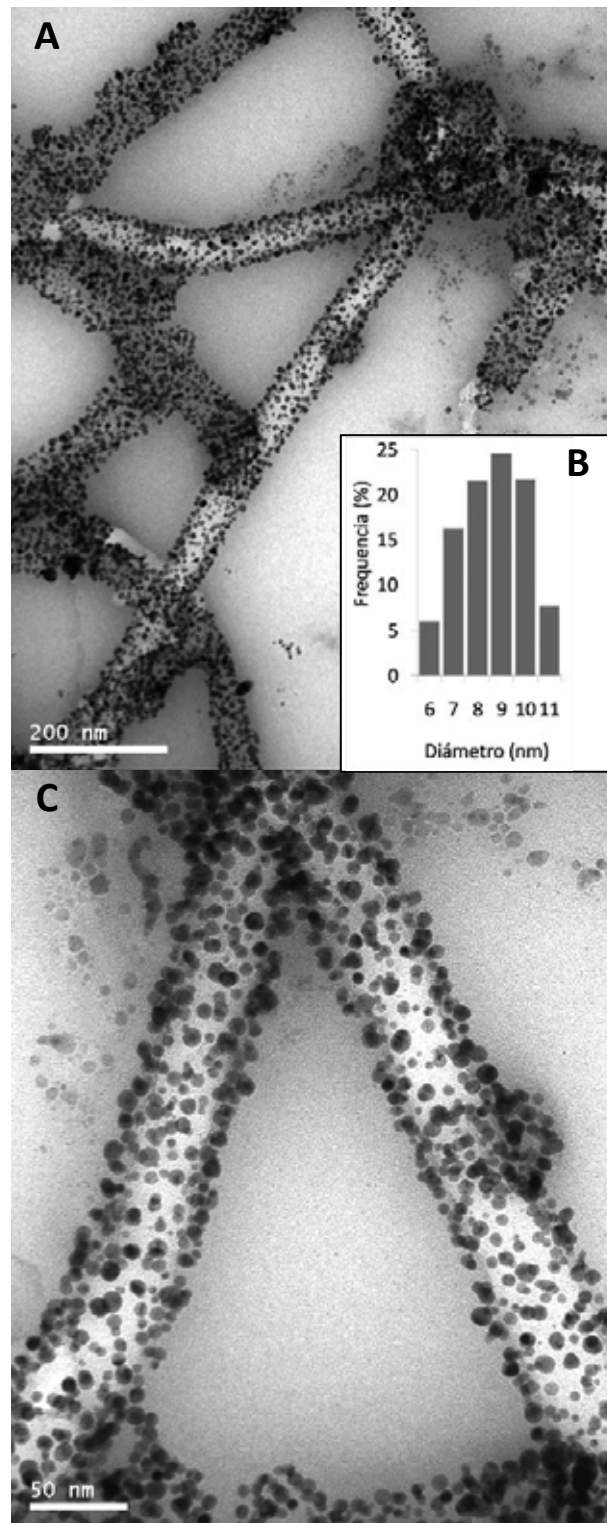
poliestiren- $\beta$ -poli(metacrilato), poliestiren- $\beta$ -poli(oxido etileno), poli-amidoamina, alcano tioles, poli-metilfenil fosfaceno, tetralquilamonio, entre otros, además de un reductor fuerte ( $\text{KBH}_4$  o  $\text{NaBH}_4$ ) [66, 86].

En la **Figura 28** se muestran micrografías de nanotubos de VP6 funcionalizados con oro utilizando borohidruro como catalizador. Los nanotubos funcionalizados con Au se pueden entrelazar al estar conjugados por las nanopartículas metálicas (**Figura 28-A**).

En contraste a lo obtenido con plata, con las mismas condiciones de concentración de precursores y tiempo de reacción, las nanopartículas de oro no coalescieron, por lo que es probable que los sitios de unión de metales eviten la agregación al tener diferentes afinidades hacia estos metales. Este proceso de funcionalización produjo nanopartículas esféricas discretas conjugadas en la superficie exterior, con diámetros promedio de 8 nm distribuidas entre 6 y 11 nm de diámetro (**Figura 28-B-C**).

Algunos aminoácidos, péptidos y proteínas poseen la habilidad de unir y reducir iones de oro, y ser agentes estabilizadores de las nanopartículas formadas. Los ensamblajes proteicos utilizados como templado para sintetizar nanopartículas de oro han sido la apoferritina, colágeno recombinante y flagelina, así como los virus CCMV y TMV [5, 12, 23, 77, 78].

La distribución de tamaño de las nanopartículas es irregular ya que son de 3.6, 6 o hasta 15 nm. La distribución de las nanopartículas de oro conjugadas a VP6 fue similar a la obtenida con el epítipo rico en histidina HRE ( $9.5 \pm 3$  nm) [78], por lo que los aminoácidos His y Glu presentes en ambos templados biológicos deben tener influencia en el tamaño de las nanopartículas obtenidas.

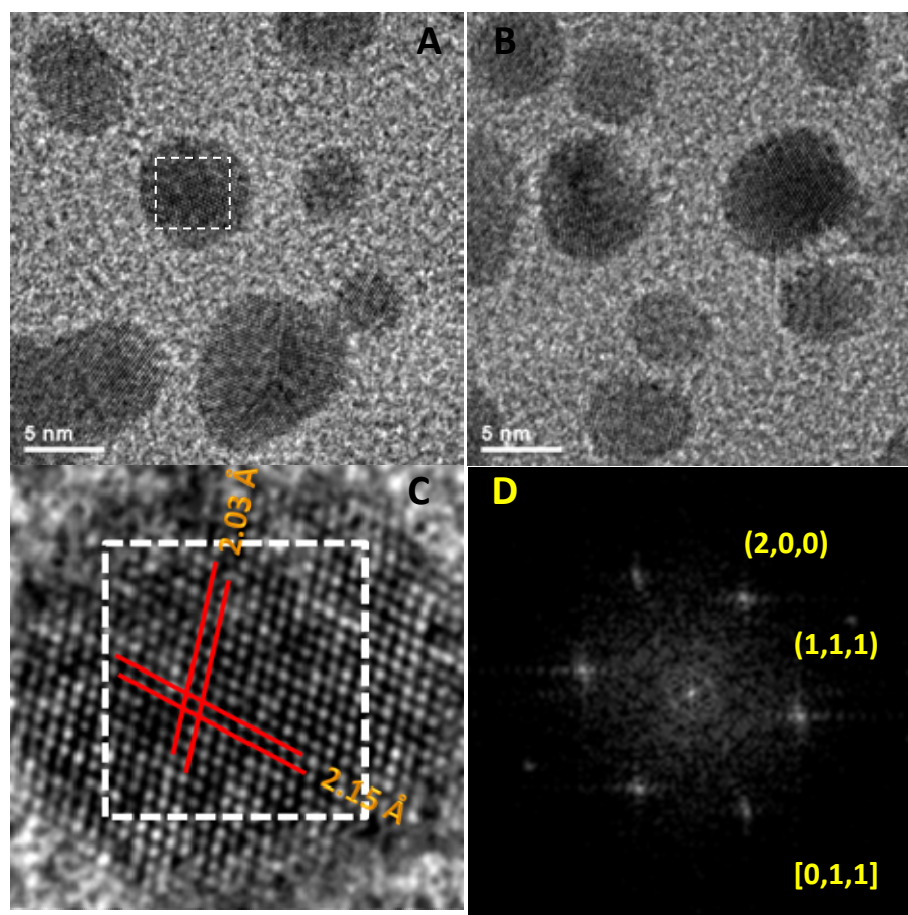


**Figura 28.**

Microscopía de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con oro. (A) Funcionalización con 1mM HAuCl<sub>4</sub> y NaBH<sub>4</sub> como reductor, 85000x (B) Distribución de tamaño de nanopartículas en (C). (C) Funcionalización con 1mM HAuCl<sub>4</sub> y NaBH<sub>4</sub> como reductor, 250000x.



La distribución de tamaño y morfología de las nanopartículas de oro fue confirmada mediante HR-TEM (**Figura 29**). En las imágenes de alta resolución se muestra la interfase entre el templado y las partículas esféricas de oro. El estado cristalino ordenado con arreglos periódicos de las nanopartículas es evidente en la **Figura 29-A-B**, en las cuales se observan diversas partículas con resolución a nivel atómico. En el detalle mostrado en la **Figura 29-C** se muestra la distribución atómica proyectada de las nanopartículas, donde se indica que estas poseen distancias interplanares de 2.03 y 2.15 Å, que son características de las estructuras cristalinas de oro [79, 97].

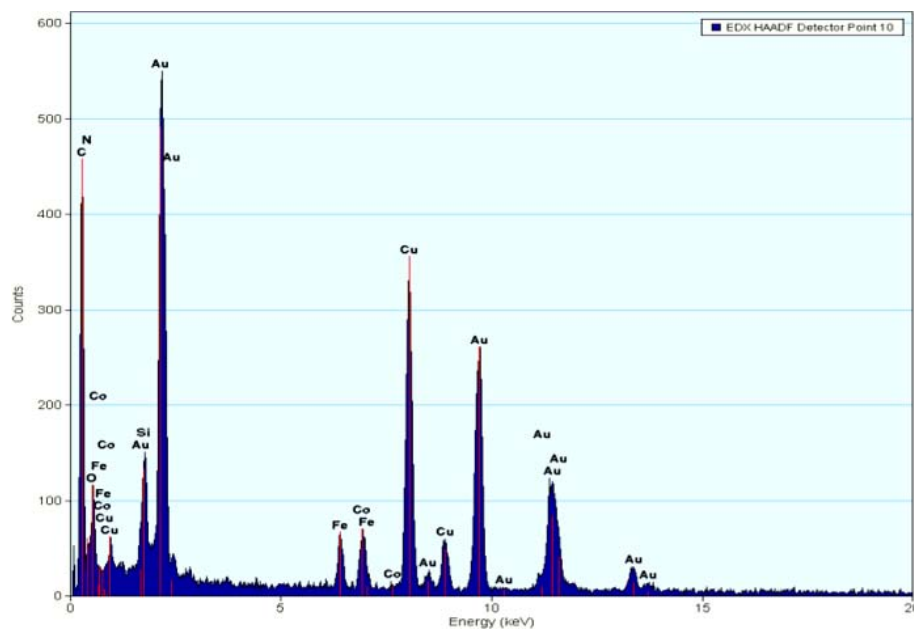


**Figura 29.** Microscopía HRTEM VP6 funcionalizada con oro. (A) Micrografía HR-TEM. (B) Micrografía HR-TEM. (C) Detalle de HR-TEM señalada en (A) indicando distancias interplanares, (D) Patrón FFT de región detallada en (C).

El patrón FFT es un arreglo de puntos luminosos permite hacer el estudio de la estructura atómica de la muestra, presentando su arreglo geométrico característico. La determinación del patrón FFT de la región señalada en la **Figura 29-A** indicó que corresponde a una estructura cristalina característica de cuboctaedro visto desde el eje [0,1,1] [24, 31]. Además de esta

estructura, también se puede distinguir la presencia de nanopartículas con otras configuraciones tales como de decaedro.

El análisis de la composición química de la muestra fue determinado a partir de la detección de los rayos X emitidos que se generan al bombardearla con el haz de electrones. La composición elemental de la muestra obtenida del espectro EDX confirmó la presencia de oro en valencia cero, así como de carbono, nitrógeno, oxígeno, cobre y hierro de la proteína VP6 y la rejilla de microscopía. En la **Figura 30** se indican los picos característicos para Au, C, N, y O.



**Figura 30.**

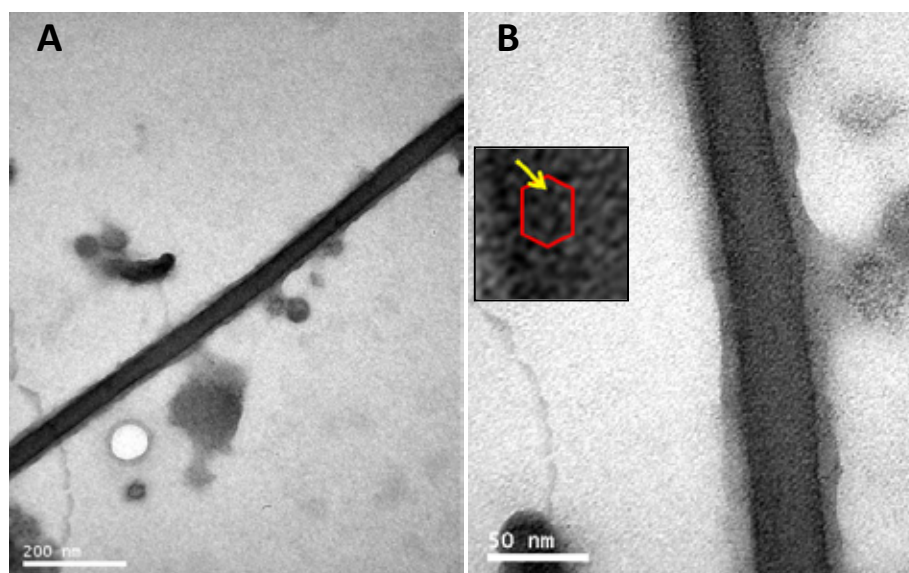
Análisis elemental por EDX-HAADF de tubos de VP6 funcionalizados con oro. Espectro de dispersión de energía por rayos X de una región transversal de nanotubo VP6 funcionalizado.

#### **6.5.4. Funcionalización de VP6 con platino (Pt).**

Las nanopartículas de Pt se caracterizan por su color café-negro y tienen diversas aplicaciones como catalizadores y en dispositivos electrónicos. Durante los procesos de síntesis estas se caracterizan por su tendencia a formar estructuras irregulares o coalescer al prepararlas a partir de la reducción de compuestos Pt(II) o Pt(IV). Con el objetivo de obtener nanopartículas de tamaños y formas específicas en las diferentes metodologías se controla la relación de precursor/agente estabilizador y el tipo de reductor.

Además de los polímeros orgánicos, los polifosfatos, el citrato de sodio y mezclas de citrato de sodio con hidróxido de sodio han sido utilizados como agentes estabilizadores en nanopartículas de Pt preparadas a partir de la reducción de complejos Pt (II) [63, 86]. La funcionalización de los tubos de VP6 con platino Pt (II) y citrato de sodio como reductor suave, además de causar un cambio en el diámetro de los nanotubos (de 75 a 45 nm), mineralizó la superficie exterior de los tubos proteicos con una capa delgada de metal, tal como ocurrió con plata y oro (Figura 31).

En la Figura 31-A se aprecia que la reacción no provocó desensamblaje de la proteína, ya que se observaron nanotubos funcionalizados de más de 1  $\mu\text{m}$  de largo. En algunas regiones puede distinguirse la morfología de los arreglos hexaméricos del templado (Figura 31-A).



**Figura 31.** Microscopía de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con platino. (A) Funcionalización con 1mM  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  y citrato de sodio como reductor, 85000x (B) Funcionalización con 1mM  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  y citrato de sodio como reductor, 250000x. Recuadro mostrando arreglo hexagonal y con flecha zona electrodensa.

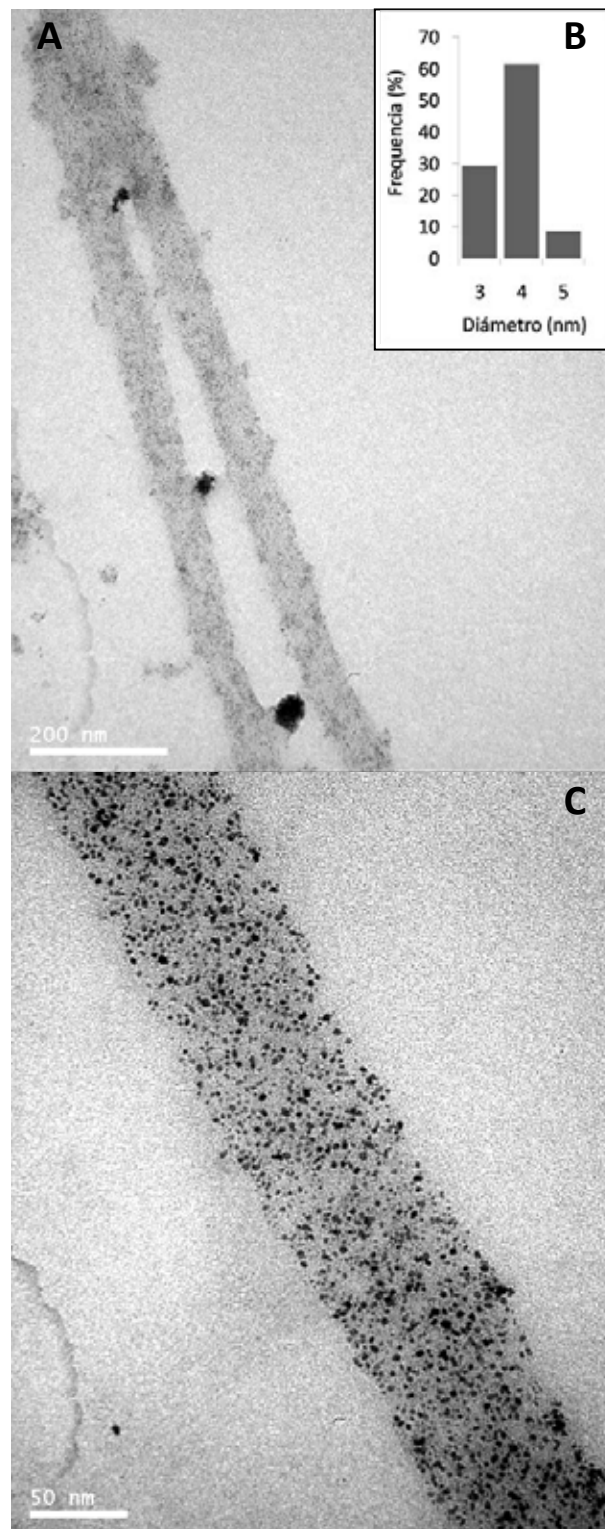
Las reacciones de síntesis de nanopartículas de Pt utilizando citrato de sodio como agente reductor y estabilizador generalmente producen materiales de 2-4 nm de diámetro [63, 86]. Utilizando tubos de VP6 como templado se producen nanopartículas dentro de este intervalo o incluso con diámetros menores, ya que con el microscopio electrónico no fue posible distinguir agregados discretos debido al límite de resolución del microscopio electrónico.

La reacción de síntesis utilizando un reductor fuerte desde el inicio, provoca una rápida reducción de iones Pt (II) produciendo nanopartículas pequeñas y estables que presentan caras [1,1,1], que están presentes en nanopartículas con estructura de tetraedro y octaedros [63, 86]. Estas caras son catalíticamente activas y puede continuar la reducción de más iones Pt (II) en sus superficies hasta formar octaedros de mayor diámetro o estructuras cúbicas, por lo que los agentes estabilizadores juegan un papel importante ya que pueden evitar este crecimiento para obtener preferentemente nanopartículas tetraédricas pequeñas [63, 86]. Usualmente en las reacciones de síntesis se producen nanopartículas de platino de diferentes formas, pero con el predominio de alguna.

Utilizando Pt (II) con NaBH<sub>4</sub> para funcionalizar tubos de VP6 se produjeron nanopartículas esféricas con diámetro promedio de 3.29 ± 0.55 nm. Se observó que las nanopartículas estuvieron distribuidas en toda la superficie exterior de los nanotubos de VP6 (Figura 32), por lo que el templado viral sirvió como agente estabilizador evitando la formación de nanopartículas esféricas de mayor tamaño o cúbicas. La distribución de tamaño de las nanopartículas fue compacta ya que el 99% estuvo entre 3 y 5 nm. El TMV modificado con platino puede formar nanopartículas de 2.5-5 nm o de 7-15 nm, pero en ambos casos se ha observado acumulación de nanopartículas en agregados [15, 16, 89].

La distribución de tamaño de las nanopartículas de platino obtenidas con tubos de VP6 fue similar a la reportada en funcionalizaciones utilizando como templados His, el péptido HRE y bacteriófagos M13 genéticamente modificados (diámetro de 3-4 nm) [78]. Además, la distribución fue homogénea sobre toda la superficie y sin agregados; en contraste con TMV, los nanotubos de VP6 son hasta seis veces más largos.

En comparación, los métodos de síntesis por reducción química utilizan diferentes agentes estabilizadores, tales como los polielectrolitos, poliestiren-β-poli (ácido metacrílico), poliestiren-β-(óxido etileno), poli-[vinilamina]-(N-vinilisobutirilamida), poliamidoamina y algunos surfactantes no iónicos, además de utilizar KBH<sub>4</sub> o NaBH<sub>4</sub> como reductores fuertes para producir nanopartículas en el intervalo de 2 a 5 nm [63, 86].

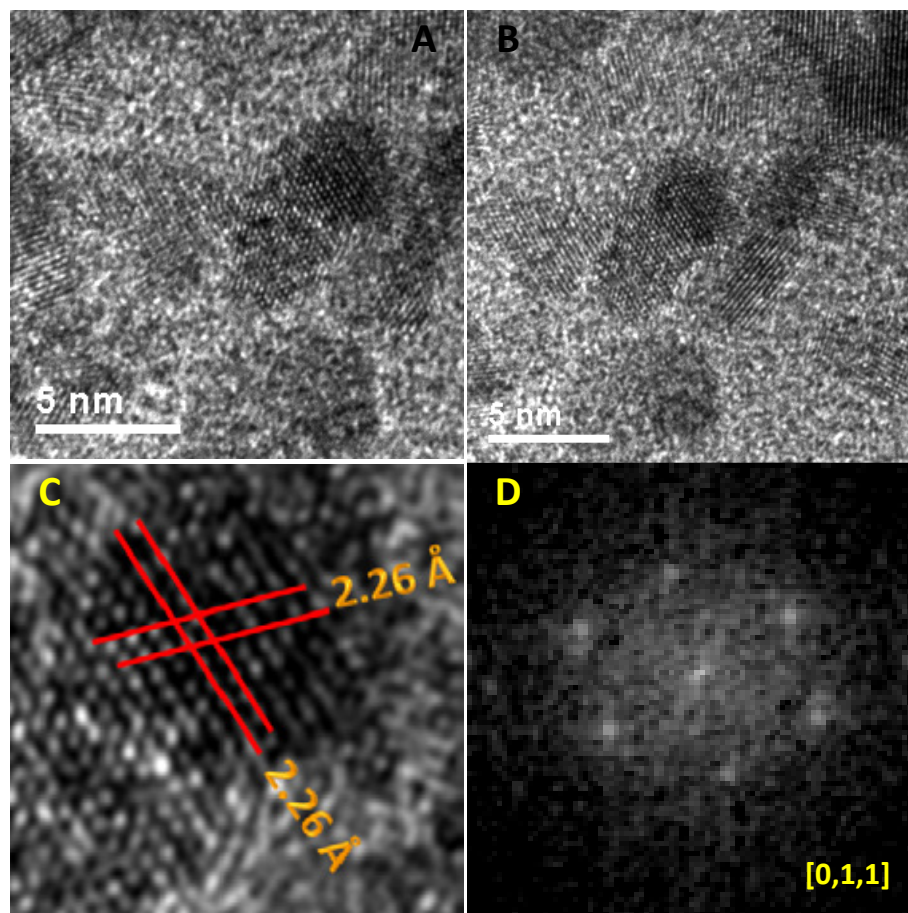


**Figura 32.**

Microscopía de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con platino. (A) Funcionalización con 1mM  $K_2PtCl_4$  y citrato de sodio como reductor, 85000x (B) Distribución de tamaño de nanopartículas en (C). (C) Funcionalización con 1mM  $K_2PtCl_4$  y  $NaBH_4$  como reductor, 250000x.



La distribución de tamaño (3-5 nm) fue confirmada mediante HR-TEM, aunque se observó agregación de las nanopartículas de platino probablemente debido al alto voltaje del haz de electrones (**Figura 33-A-B**). Los átomos de platino forman estructuras cristalinas con formas semiesféricas, se determinó que las nanopartículas poseían una distribución atómica con distancias interplanares de 2.26 Å, este dato es correspondiente a Pt en estado cristalino (**Figura 33-C**) [22, 27].



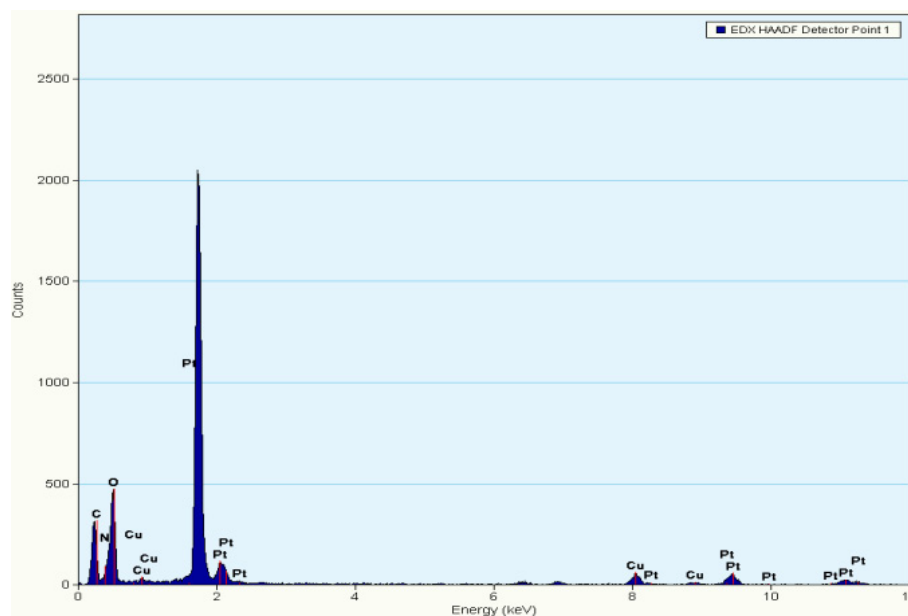
**Figura 33.**

**Microscopia HR-TEM de tubos de VP6 funcionalizados con platino. (A)** Micrografía HRTEM, **(B)** Detalle de HRTEM indicando distancias interplanares, **(C)** Patrón FFT de región detallada en **(B)**, **(D)** Espectro de dispersión de energía por rayos X.

Se ha observado que las reacciones de síntesis de nanopartículas de Pt coloidales a temperatura ambiente producen principalmente nanopartículas con estructuras cúbicas, tetraédricas y octaedros [27, 63, 86, 97]. En este caso, las mediciones del patrón FFT indicaron que el arreglo espacial simétrico entre los puntos de difracción corresponde a una estructura del tipo tetradecaedro, el arreglo de los puntos luminosos son típicos de monocristales con una orientación [0,1,1] respecto al haz de electrones (**Figura 33-C-D**) [22, 27, 31, 97]. En

comparación, las nanopartículas de platino obtenidas con los tubos de VP6 poseen tamaño y distribución similares a las que han sido sintetizadas en presencia del peptido HRE y TMV [12, 15, 16, 78, 89].

El espectrómetro de dispersión de energía acoplado al HR-TEM detecta los rayos X emitidos por la muestra a ser bombardeada por el haz de electrones y produce un pulso eléctrico que es proporcional a la energía del rayo X característico, del número e intensidad de los rayos X se puede determinar la composición química de la muestra. En este caso, la composición elemental de los tubos de VP6 funcionalizados con platino determinada por HR-TEM y EDX confirmó la presencia de Pt en estado cristalino, así como los elementos correspondientes del templado orgánico (C, N, O), además de Cu presente en la rejilla de microscopía (Figura 34).



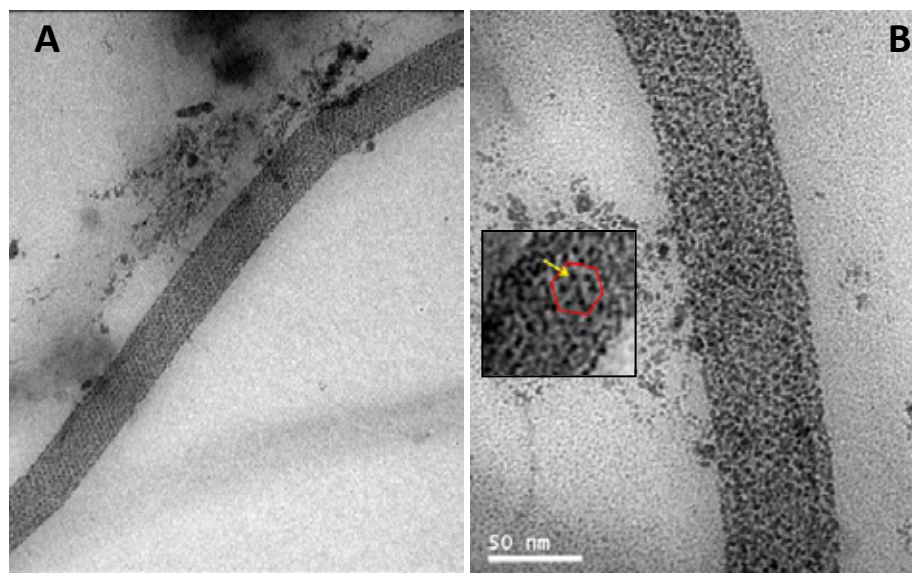
**Figura 34.** Análisis elemental por EDX-HAADF de tubos de VP6 funcionalizados con platino. Espectro de dispersión de energía por rayos X región transversal de nanotubo VP6 funcionalizado.

### 6.5.5. Funcionalización de VP6 con paladio (Pd).

El paladio es un metal que posee actividad catalítica, así como diversas aplicaciones en el área de electrónica como sistemas magnéticos para almacenamiento o sistemas para almacenamiento de hidrógeno. En principio, las rutas de síntesis de nanopartículas de Pd son las mismas que las utilizadas para oro y platino. La forma, el tamaño y distribución de las

nanopartículas Pd depende del tipo de precursor y reductor usados. La reducción de Pd(II) con citrato lleva a la formación de soluciones con un color café característico [86, 98].

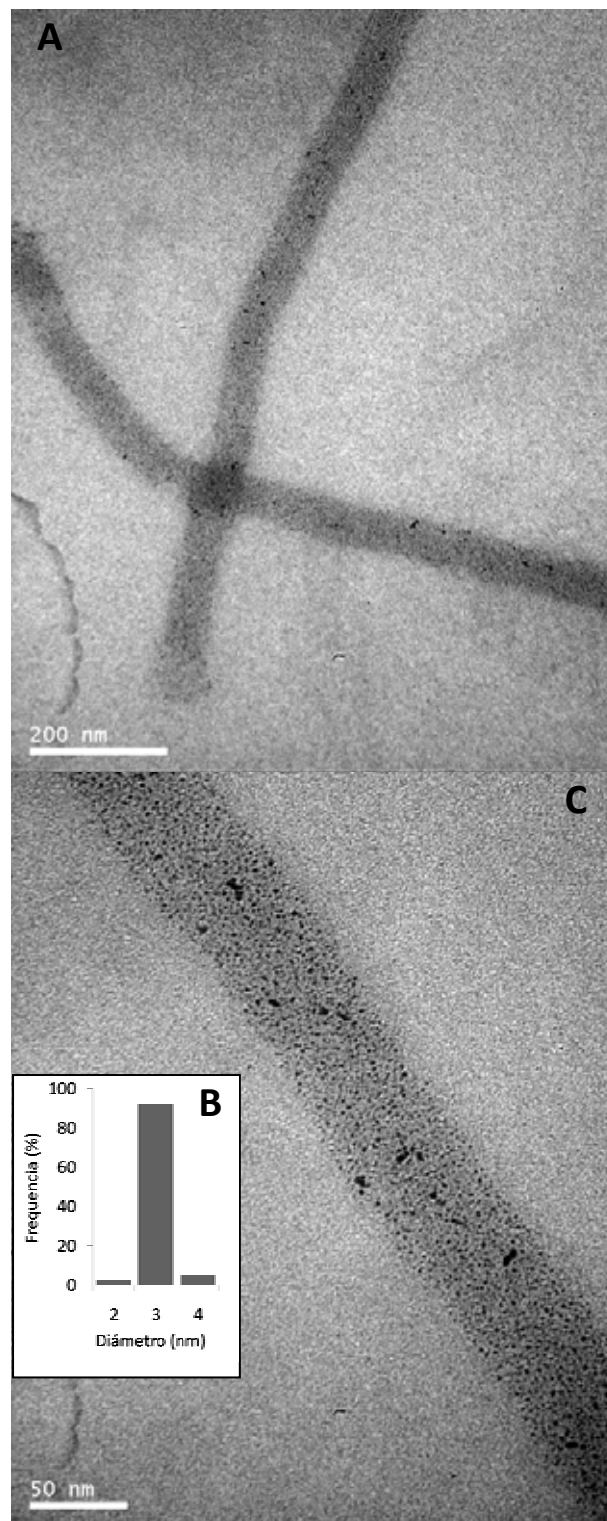
Los nanotubos funcionalizados con paladio Pd (II) y citrato de sodio mostraron la formación de depósitos o clusters metálicos sobre toda la superficie, permitiendo distinguir la morfología y detalles estructurales del arreglo hexagonal de las subunidades de VP6 (Figura 35). Este patrón es similar al que se obtiene al hacer la tinción negativa con acetato de uranilo de los tubos de VP6, pero se diferencia en el hecho de que el uranilo únicamente se deposita sobre la proteína previamente fijada, en cambio la mineralización con Pt se realiza en solución por lo que ocurre sobre toda la superficie externa.



**Figura 35.** Microscopía de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con paladio. (A) Funcionalización con 1mM Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y citrato de sodio como reductor, 85000x (B) Funcionalización con 1mM Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y citrato de sodio como reductor. Recuadro mostrando detalle de arreglo hexagonal y con flecha zona electrodensa.

La síntesis de nanopartículas Pd es particularmente complicada. La síntesis utilizando reductores suaves y CTAB, SDS o poli-oxietileno isooctil fenil éter, como estabilizadores produce nanopartículas polidispersas de 2.7 hasta 20 nm de diámetro [86, 98]. Con objetivo de obtener nanopartículas pequeñas monodispersas de entre 1-4 nm se han utilizado reductores fuertes y diferentes polímeros como los polielectrolitos, poliestirenos modificados, poliamidoamina, algunos surfactantes y detergentes, que estabilizan las nanopartículas y ayudan a su solubilidad [86, 98].





**Figura 36.**

**Microscopia de transmisión electrónica VP6 funcionalizada con paladio. (A)** Funcionalización con 1mM  $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor, 85000x **(B)** Funcionalización con 1mM  $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor, 250000x **(C)** Distribución de tamaño de nanopartículas en **(B)**.

Al tener el templado viral de tubos de VP6, la reacción de síntesis utilizando el reductor fuerte y 1 mM de precursor Pd (II) produjo nanopartículas de Pd pequeñas monodispersas con diámetro promedio de  $2.43 \pm 0.36$  nm (**Figura 36**).

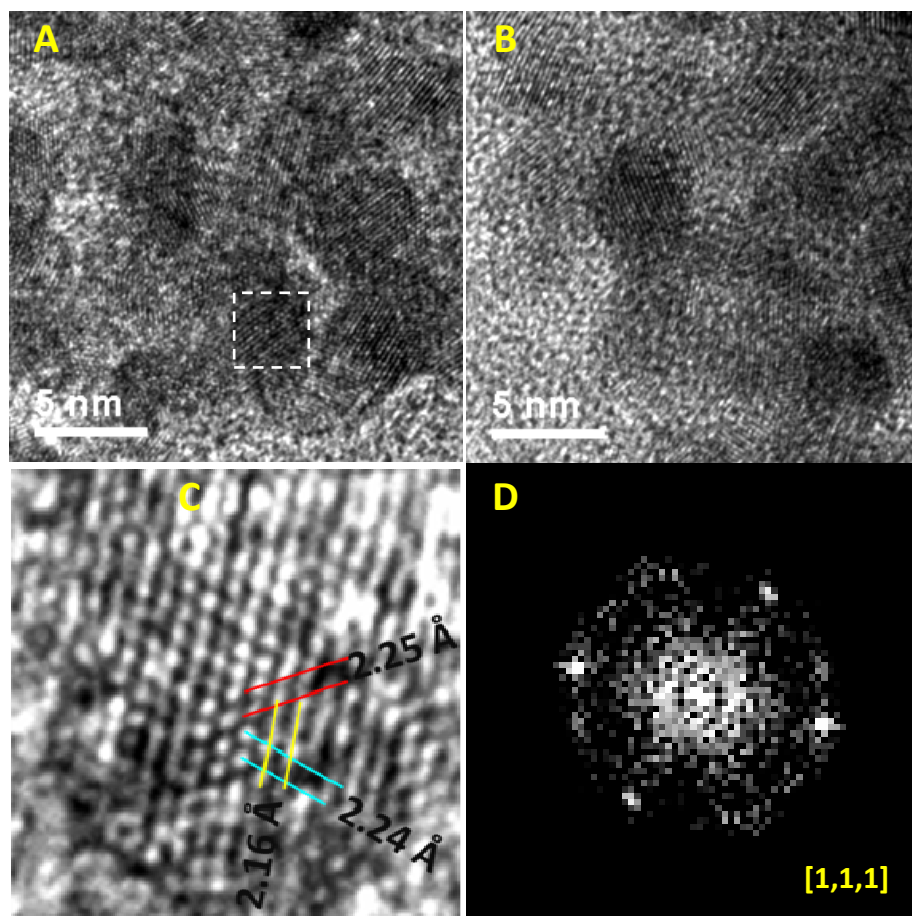
En comparación con los metales utilizados previamente (Ag, Au y Pt), el paladio siguió un patrón diferente en la formación de agregados metálicos sobre la superficie de los tubos, probablemente debido a la afinidad de VP6 por este precursor. Utilizando concentraciones mayores de Pd (II) (2 o 3 mM) y  $\text{NaBH}_4$ , se vieron de igual forma nanopartículas pequeñas de 2-4 nm pero conjugadas sobre toda la superficie externa de los tubos de VP6.

Al utilizar templados biológicos tales como el TMV (1Cys), proteínas de flagelos bacterianos genéticamente modificados o  $\beta$ -tubulina, es posible formar pequeñas nanopartículas de paladio (2-3 nm) con espaciamiento y arreglos o patrones definidos por las biomoléculas, similares a las obtenidas con VP6 [**4, 35, 47**]. Las nanopartículas de Pd en este intervalo de tamaño son altamente estables en solución, por lo que pueden ser útiles para catalizar diferentes tipos de reacciones.

Al igual que con las nanopartículas de platino, mediante HR-TEM se observó agregación de las nanopartículas de paladio probablemente debido al alto voltaje del haz de electrones (**Figura 37-A-B**). Pese a ello, la distribución de tamaño (3-5 nm) fue consistente a lo observado por TEM.

En la imagen de microscopia de alta resolución de la sección marcada en la **Figura 37-A**, se realizó la medición de las distancias interplanares de las nanopartículas de paladio. Los resultados indicaron que las estructuras cristalinas poseen átomos distribuidos en arreglos simétricos con distancias interplanares de 2.16 y 2.24 Å, que son característicos de estructuras cristalinas de paladio [**27, 31, 32, 97**].

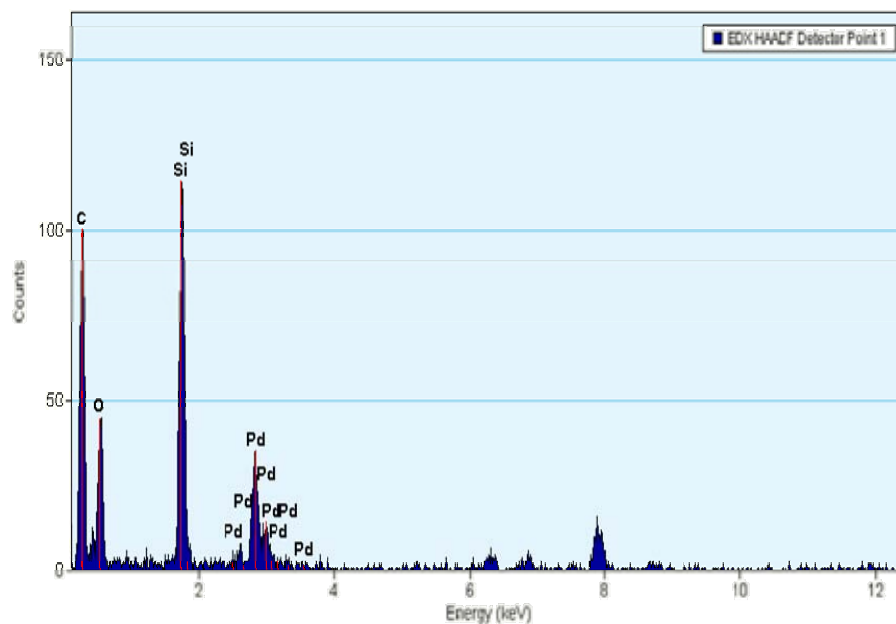
El patrón FFT de la **Figura 37-C** mostró que la nanopartícula de paladio posee un arreglo hexagonal con estructura cristalina del tipo cubo-octaedro y en particular que es vista desde una orientación [1,1,1] (**Figura 37**) [**24, 31, 32**]. Este análisis demuestra que las nanopartículas poseen arreglos geométricos, y que los parámetros de la organización y distancias corresponden a materiales con estructuras cristalinas de paladio.



**Figura 37.**

Microscopia HRTEM de tubos de VP6 funcionalizados con paladio. (A) Micrografía HRTEM, (B) Detalle de HRTEM indicando distancias interplanares, (C) Patrón FFT de región detallada en (B), (D) Espectro de dispersión de energía por rayos X.

El análisis elemental de la proteína VP6 funcionalizada con Pd por medio del espectro de dispersión de energía por rayos X (EDX), así como por microscopia electrónica de barrido y transmisión (STEM) confirmaron el estado cristalino y pureza de las nanopartículas de Pd conjugadas a tubos de VP6 (Figura 38). En el espectro de dispersión de energía por rayos X de una región transversal de un tubo de VP6 funcionalizado se indican los picos característicos de C, O, Pd, Cu y Si, este último elemento podría ser por contaminación de la muestra o que por falta de resolución y traslape, que este pico correspondiera con algún otro elemento presente en la muestra.



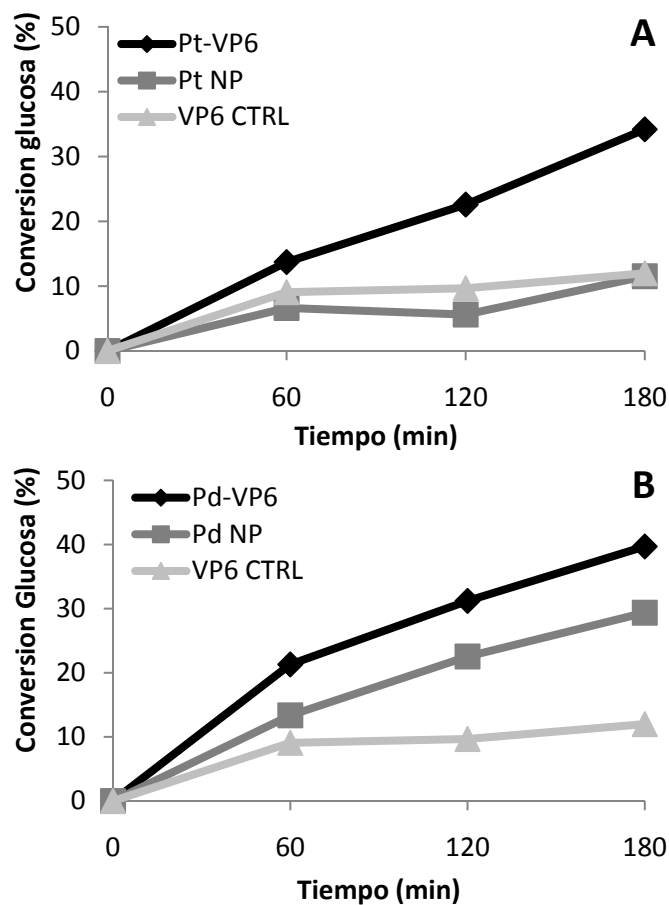
**Figura 38.** Análisis elemental por EDX-HAADF de tubos de VP6 funcionalizados con paladio. Espectro de dispersión de energía por rayos X región transversal de nanotubo VP6 funcionalizado.

#### **6.5.6. Actividad catalítica de los tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas.**

Las nanopartículas metálicas poseen propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas únicas que dependen de su tamaño, forma y organización. En particular las nanopartículas de Pt y Pd tienen gran variedad de aplicaciones a nivel catalítico, en reacciones de síntesis química y remediación ambiental [1, 9, 47]. Por ejemplo, el Pd se ha utilizado en reacciones catalíticas para reducción de colorantes (azul de metileno, safranina, fluoresceína, 2,7-diclorofluoresceína, eosina y rosa de bengala) o hidrogenación. Con la finalidad de determinar la capacidad catalítica de los tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas de platino y paladio, se utilizó una reacción en la cual ocurre oxidación de glucosa a ácido glucónico en medio acuoso en presencia de oxígeno. Se utilizó esta reacción modelo debido a que las nanopartículas de platino, paladio, iridio, osmio, rodio y rutenio son utilizadas como catalizadores no enzimáticos para detectar glucosa por medio de oxidación electrocatalítica [1, 9].

En la **Figura 39** se muestra el porcentaje de conversión de glucosa a través del tiempo de reacción, que fue determinado por la diferencia de los valores de glucosa inicial a de la glucosa remanente medida en cada punto. Como controles se usaron la proteína VP6 pura, así como las nanopartículas de Pt y Pd sintetizadas sin tener la proteína VP6 como templado.

En la reacción control que contiene la proteína VP6 sin funcionalizar, se observó que ocurre cerca del 10% de conversión de la glucosa después de 3 h (**Figura 39**). Las nanopartículas de Pt sintetizadas sin tubos de VP6 solamente fueron capaces de alcanzar solamente un 10-12% de conversión de la glucosa al igual que el control de proteína VP6, mientras que los tubos de VP6 conjugados con nanopartículas de platino lograron oxidar un 33-35% de la glucosa después de 3 h de reacción (**Figura 39-A**). En comparación, las nanopartículas de Pd sintetizadas sin proteína VP6 lograron oxidar 29 % de la glucosa presente. Los nanotubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas de Pd fueron más eficientes en la reacción de oxidación de glucosa, ya que en el mismo periodo de reacción de 3 h lograron convertir un 39-40% (**Figura 39-B**).



**Figura 39.**

**Propiedades catalíticas de los tubos de VP6 funcionalizados con platino y paladio.** Línea negra: nanotubos funcionalizados con nanopartículas, línea gris oscuro: nanopartículas sin proteína VP6, línea gris claro: proteína VP6 sin funcionalizar. Promedio de cinéticas por duplicado.

Se observó que las nanopartículas metálicas sintetizadas sin proteína viral tienden a aglomerarse, en cambio los complejos formados por tubos de VP6 conjugados con las

nanopartículas de Pt y Pd se mantienen en solución. Esto permite tener mayor área reactiva, además de que la proteína VP6 sirve como agente estabilizador de las nanopartículas metálicas, demostrando su potencial utilidad como catalizadores no enzimáticos.

#### **6.5.7. Conductividad de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas.**

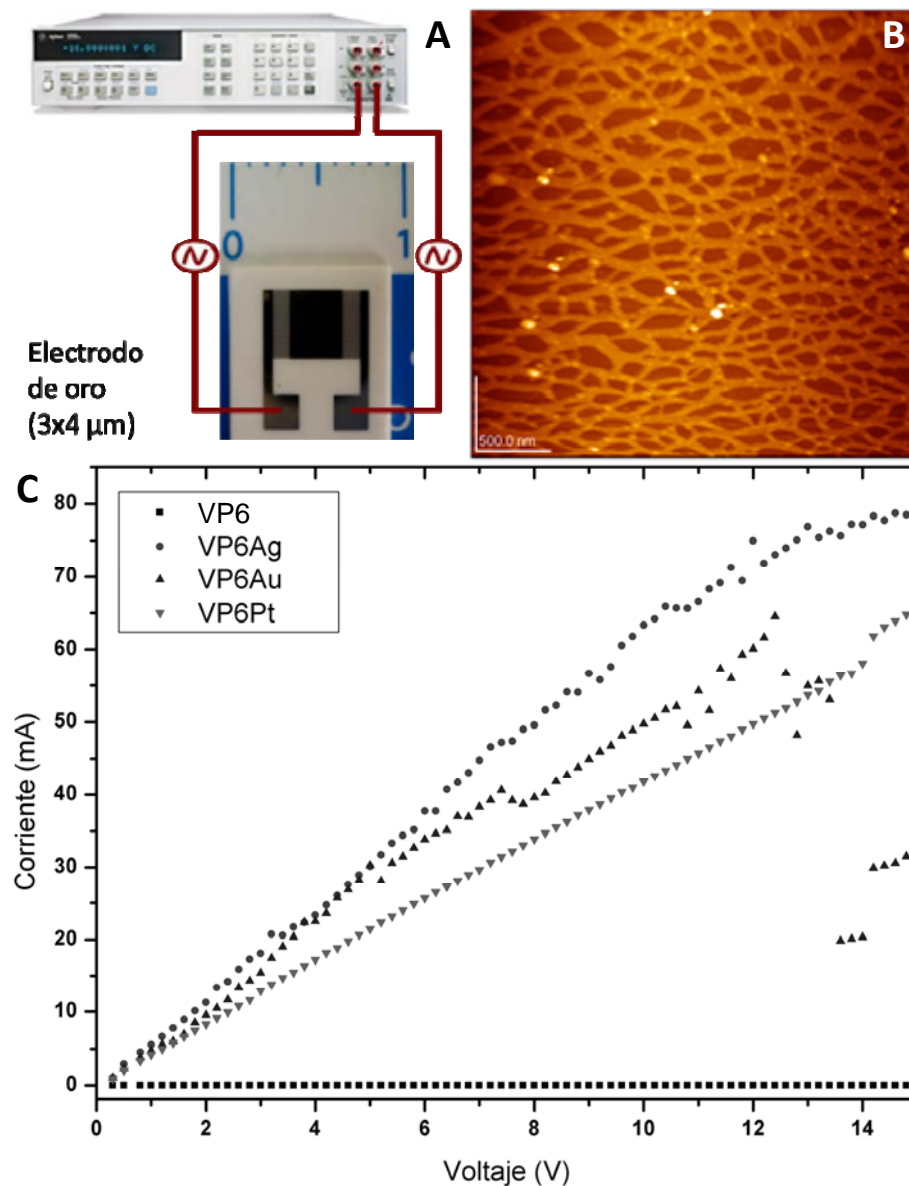
Para la fabricación de nanoestructuras multifuncionales con geometrías complejas útiles como nanoelectrónicos y nanosensores se ha utilizado el ADN, así como diversas proteínas, péptidos y virus (TMV) como templados biomoleculares [75]. Estas biomoléculas se autoensamblan en estructuras bien definidas, pero la conductividad de estas estructuras es limitada, lo cual es una desventaja en aplicaciones como dispositivos bioelectrónicos [95]. La capacidad de conducción de las bioestructuras es mejorada o incorporada por medio de la conjugación con nanopartículas, tal como fue el caso de los tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas metálicas. De tal forma, los nanotubos pueden formar superficies o capas conductoras híbridas (proteína VP6/nanopartículas metálicas) potencialmente útiles como dispositivos bioelectrónicos.

Se evaluó la capacidad de conducción eléctrica de los nanotubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas de plata, oro y platino. Para ello, los nanotubos se montaron sobre un circuito al que se le aplicaron diferentes voltajes para determinar el flujo de electrones conducido (medido como amperaje) (Figura 40-A). En la Figura 40-B se muestra una micrografía obtenida por microscopía de tunelamiento, en la que se observa que los tubos de VP6 forman una superficie entrelazada de tubos sobre el circuito. La morfología y diámetro de los tubos de VP6 corresponde con las observaciones hechas por microscopía de tunelamiento [71].

En la Figura 40-C se muestran los perfiles de corriente o intensidad eléctrica-voltaje ( $I$ - $V$ ), donde se representa el voltaje (V) contra corriente eléctrica (mA). Como control de referencia se utilizaron los tubos de VP6 sin funcionalizar, los cuales no mostraron señal de conductividad en el intervalo de 0-15 V. Los tubos de VP6 conjugados con plata mostraron un perfil lineal de conductividad en el intervalo 0-23 V, sin caídas en la conductividad. El perfil  $I$ - $V$  de los tubos de VP6 funcionalizados con oro mostró un perfil lineal hasta 12 V, donde se observó una caída debido al calentamiento del circuito; la corriente se recuperó posteriormente al aumentar el voltaje. Los tubos de VP6 conjugados con platino, al igual que los funcionalizados con plata,



mostraron un perfil I-V lineal en el intervalo 0-15 V. Los materiales nanoestructurados de paladio no presentan conductividad [76], por lo que no se realizó la medición de conductividad a los tubos de VP6 funcionalizados con paladio. Los valores de conductividad observados son mayores del doble de los reportados para ADN y fibras amiloides funcionalizadas con nanopartículas metálicas [76].



**Figura 40.** Conductividad de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas. (A) Circuito de oro utilizado para medir conductividad. (B) Microscopía de tunelamiento de sección de 2.86 μm x 2.86 μm de superficie del circuito. (C). Gráfica de conductividad voltaje (V)-corriente (mA), (■) Tubos de VP6 sin funcionalizar, (●) Tubos de VP6 funcionalizados con plata, (▲) Tubos de VP6 funcionalizados con oro, (▼) Tubos de VP6 funcionalizados con platino. Apoyo técnico de Dr. Edgar Álvarez Zauco (Fac. de Ciencias UNAM) y MC Andrés Rodríguez (Instituto de Ciencias Nucleares UNAM).

La gran capacidad de conducción de corriente eléctrica de los tubos de VP6 funcionalizados con metales es debido a la distancia entre las nanopartículas que favorece la conductividad entre los agregados metálicos, así como el acoplamiento metal-metal entre el electrodo de Au y los nanotubos entrelazados en su superficie, además de el propio ensamblaje y acomodo de los nanotubos. Lo anterior es consistente con lo que ha sido observado en filamentos de proteínas que forman nanoalambres conductores [75, 95]. Los tubos de VP6 funcionaron como excelentes templados para la síntesis de nanopartículas metálicas que poseen propiedades conductoras, por lo que pueden ser potencialmente útiles en la fabricación de dispositivos bioelectrónicos, sensores inclusive sistemas de almacenamiento de energía y materiales optoelectrónicos.

#### **6.5.8. Funcionalización de partículas pseudovirales VP2/VP6 con nanopartículas metálicas.**

Las partículas virales icoseedricas tienen diversas aplicaciones dentro del área de nanociencias y nanotecnología, particularmente como templados o moldes en la síntesis de nanopartículas, como sistemas de entrega de medicamentos en forma tejido-específico, dispositivos de diagnóstico, nanosensores, imagenología, nanojaulas y nanocontenedores [14, 23, 44].

Se demostró que la proteína VP6 es capaz de dirigir la síntesis y ensamblaje de nanopartículas metálicas, esto al estar ensamblada en forma tubular. En presencia de la proteína estructural VP2 de rotavirus, la proteína VP6 se ensambla en la superficie de VP2 formando partículas rotavirales de dos capas [7, 20, 40, 54, 65].

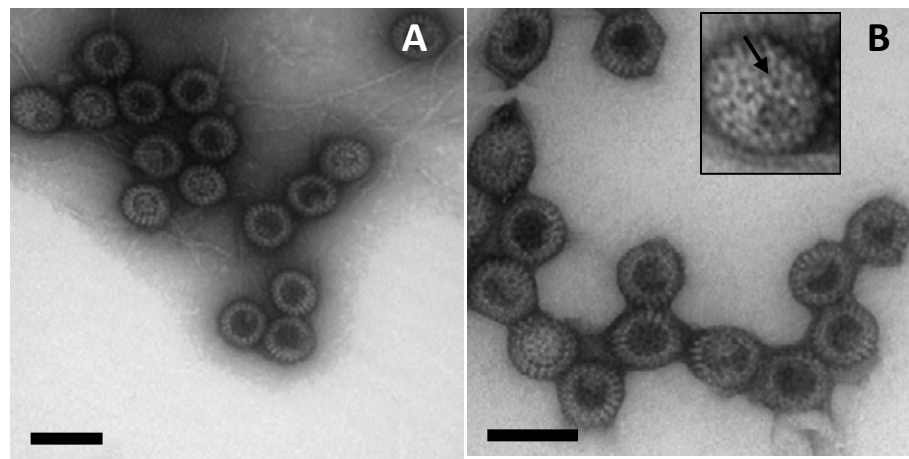
La proteína VP6 funcionalizada con nanopartículas al estar en forma icosaedrica tendrá otros usos y aplicaciones, y potencialmente otras propiedades de las que puede tener al estar ensamblada en forma tubular. Con el objetivo de analizar si es posible realizar la funcionalización de las partículas rotavirales VP2/VP6 se realizó su producción recombinante, purificación así como funcionalización y análisis por medio de microscopia de transmisión electrónica.

Las partículas pseudovirales de rotavirus formadas por las proteínas VP2-VP6 fueron producidas por medio del sistema células de insecto-baculovirus. Se infectaron células HighFive al inicio del cultivo con dos baculovirus recombinantes, uno que codifica para VP2 (bacVP2) cepa RF y el segundo bacVP6 que codifica para VP6 cepa SA11, ambos a una MDI=0.1 ufp/cel [51, 55].



Al igual que en el caso de la producción de VP6 en forma tubular el cultivo se cosechó a las 96 hpi. Para la purificación de VP2/VP6 se siguió el mismo esquema de purificación que consiste en etapas continuas de ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular. El producto final fue caracterizado por medio de microscopía de transmisión electrónica y dispersión dinámica de luz.

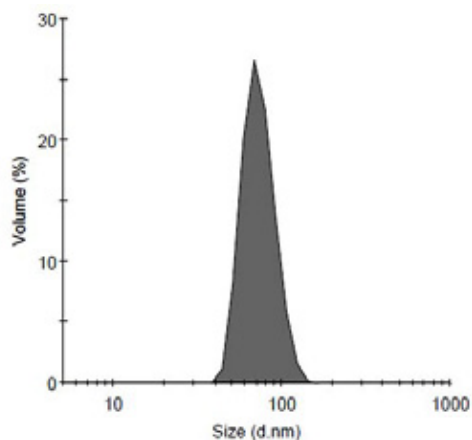
Por medio de TEM se observó que las partículas pseudovirales VP2/VP6 poseen morfología idéntica a las partículas de rotavirus de doble capa, en las cuales se aprecia el arreglo en pentámeros y hexámeros de las subunidades de trímeros proyectándose en la superficie (**Figura 41**) [7, 40, 41].



**Figura 41.** Caracterización por TEM de partículas pseudovirales VP2/VP6. (A) Microscopía de transmisión electrónica, 250000x (B) Detalle de micrografía a 250000x y recuadro indicando arreglo hexagonal. Barra 100 nm.

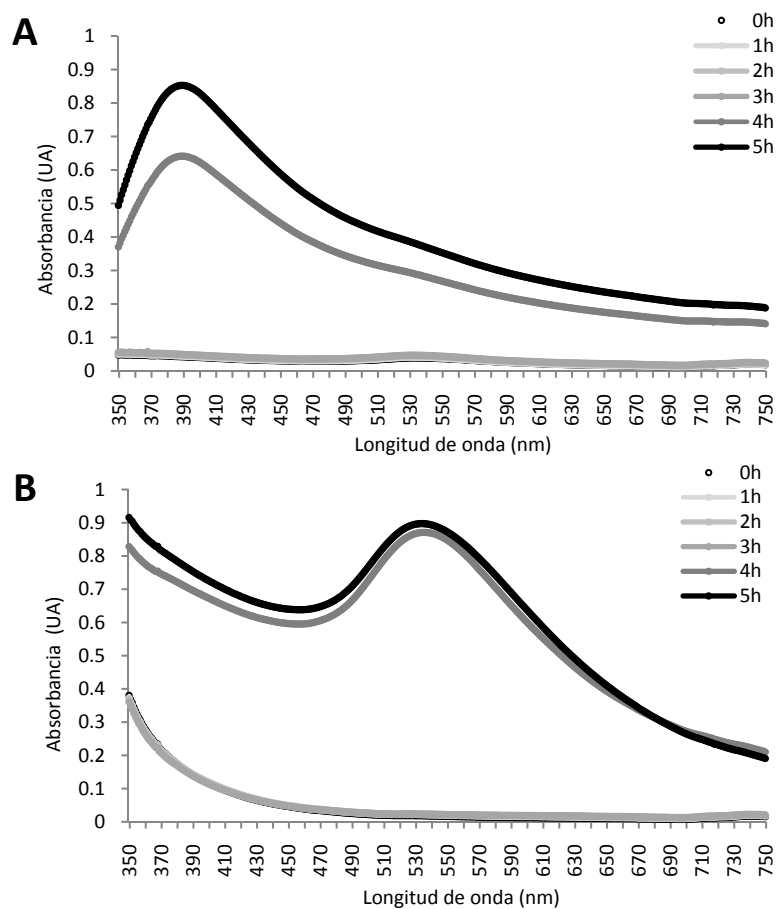
La distribución de tamaño por medio de dispersión dinámica de luz indicó que las partículas pseudovirales tienen un diámetro promedio de 73.3 nm (**Figura 41**). Esto corresponde al diámetro promedio de las partículas VP2/VP6 de  $70 \pm 1.3$  nm que fue determinado por medio de microscopía electrónica [41].

Estas partículas VP2/VP6 recombinantes son susceptibles a la reacción de funcionalización de VP6 en forma similar a como fue demostrado con los tubos VP6, esto es debido a que los sitios de unión de metales quedan expuestos en la superficie externa de las partículas al no estar presentes las proteínas VP7 y VP4.



**Figura 42.**  
 Distribución de tamaño de partículas pseudovirales VP2/VP6. Distribución de tamaño por DLS, media: 73.32 nm.

Se realizó la funcionalización con los precursores iónicos de plata ( $0.5 \text{ mM AgNO}_3$ ) y oro ( $1 \text{ mM HAuCl}_4$ ) utilizando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor en las mismas condiciones utilizadas para las reacciones de funcionalización de los tubos VP6.



**Figura 43.**  
 Espectros de absorción UV-Vis de reacciones de funcionalización de partículas pseudovirales VP2/VP6. **(A)** Espectros de absorción durante la funcionalización con plata. **(B)** Espectros de absorción durante la funcionalización con oro.

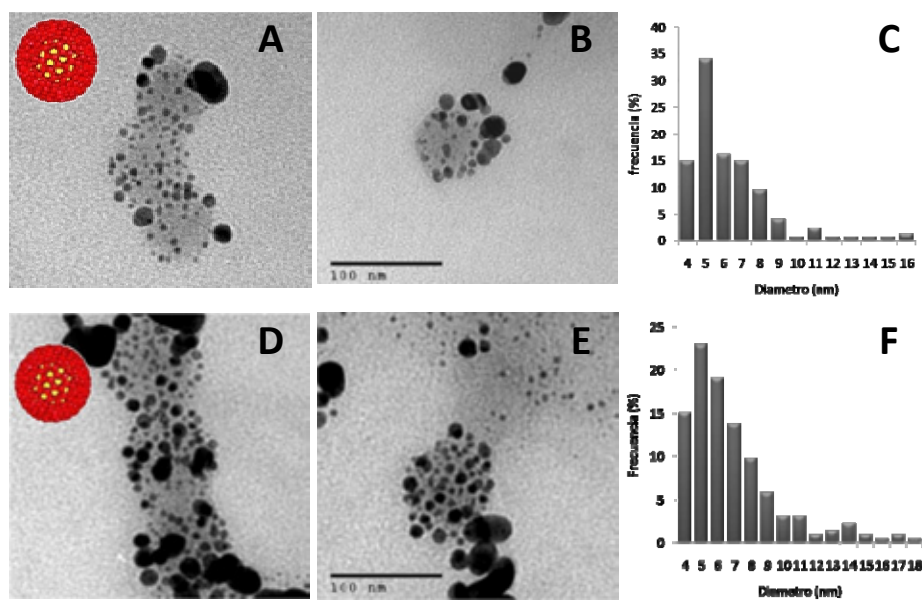
El espectro de absorción de las partículas pseudovirales VP2/VP6 funcionalizadas con plata mostró una resonancia de plasmón centrada en 390 nm (**Figura 43-A**), en los tubos VP6 el máximo ocurre a 430 nm. Este punto está en concordancia con los valores obtenidos al utilizar los aminoácidos His y Cys, el péptido HRE, imidazol y glutatión, que se centran entre 390-480 nm [77, 78].

Los espectros UV-Vis de la funcionalización utilizando Au se muestran en la **Figura 43-B**. La resonancia de plasmón de oro ocurrió a 535 nm, este valor corresponde al observado en las reacciones de funcionalización de tubos de VP6 con oro que fue de 530 nm, al igual que las nanopartículas de oro conjugadas a péptidos ricos en histidina en 524 nm [77, 78].

La funcionalización de las partículas pseudovirales de VP2/VP6 con plata produjo nanopartículas esféricas conjugadas en la superficie externa con un diámetro promedio de 5.8 nm, presentando una distribución de tamaño de entre 4 a 10 nm, y algunas nanopartículas de hasta 16 nm (**Figura 44-A-B-C**). En comparación, bajo estas mismas condiciones de reacción la funcionalización de los tubos VP6 produjo nanopartículas con diámetro promedio de 4.1 nm con una distribución restringida entre 3-9 nm.

En el caso de las partículas pseudovirales funcionalizadas con oro, las nanopartículas sintetizadas tienen un diámetro promedio de 6.5 nm, la mayoría en el intervalo de 4 a 10, aunque se lograron observar algunas nanopartículas de hasta 16 nm, por lo que fueron polidispersas (**Figura 44-D-E-F**). La proteína VP6 ensamblada en forma tubular produce nanopartículas de oro con un diámetro promedio de 9 nm, con una distribución estrecha de entre 7-10 nm.

Las reacciones de funcionalización de las partículas pseudovirales no provocaron ningún tipo de desensamblaje de partículas VP2/VP6 o cambios de morfología de VP6. Lo que es evidente es que debido a su tamaño pequeño las pseudopartículas tienden a formar agregados donde hay varias partículas formando cumulos.



**Figura 44.** Microscopia de transmisión electrónica de partículas pseudovirales VP2/VP6 funcionalizadas. (A y B) Funcionalización con plata (0.5 mM  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor). (C) Distribución de tamaño de nanopartículas de plata. (D y E) Funcionalización con oro (1mM  $\text{HAuCl}_4$  y  $\text{NaBH}_4$  como reductor). (F) Distribución de tamaño de nanopartículas de oro. Como referencia se incluye modelo de partícula VP2/VP6 (color rojo).

#### 6.5.9. Funcionalización de VP6 con nanopartículas magnéticas.

Las nanopartículas magnéticas compuestas de aleaciones de cobalto o hierro y platino, paladio u oro son de gran interés al tener aplicaciones como dispositivos de almacenamiento de información de alta densidad [12, 14, 23, 43, 89].

Las nanopartículas magnéticas se sintetizan por diversas metodologías, entre ellas la co-precipitación (reducción química), descomposición térmica, por microemulsiones y síntesis hidrotérmica [43]. A excepción de la co-precipitación, el resto de los métodos de síntesis requiere el uso de solventes orgánicos, altas temperaturas (100-320°C), altas presiones y tiempos de reacción de varias horas o días, pero tienen la ventaja de producir nanopartículas de tamaño y formas controlados y monodispersas. La síntesis por co-precipitación es simple, a temperatura ambiente y en medio acuoso, pero no se tiene gran control sobre el tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas.

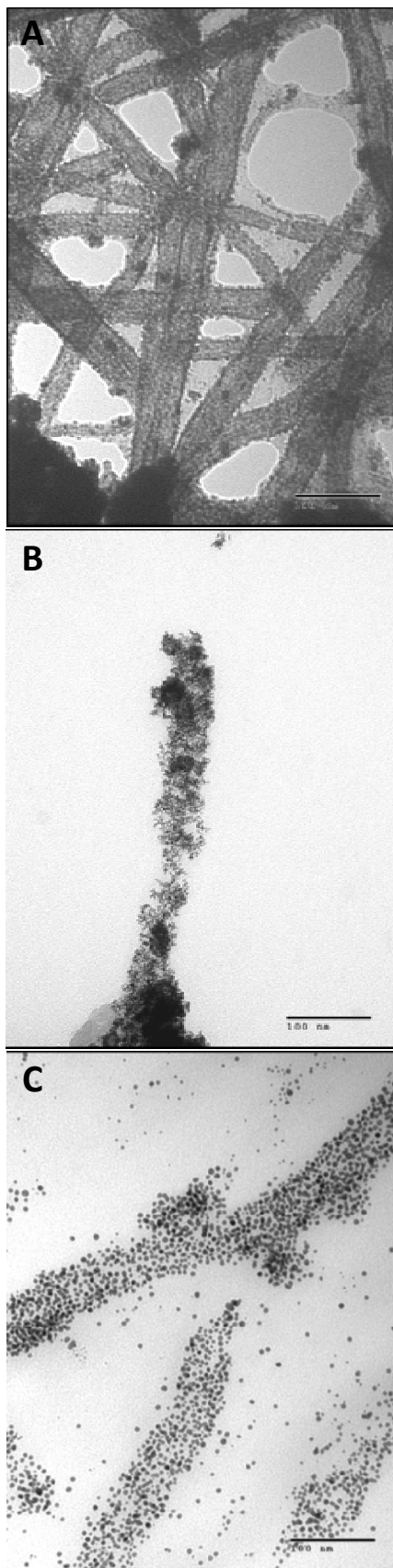
Para solventar las limitantes de la síntesis por reducción química se utilizan agentes protectores o estabilizantes para evitar aglomeración o precipitación, por ejemplo polímeros orgánicos, sílice o carbono, que además pueden ayudar a prevenir la oxidación de las nanopartículas magnéticas.

En este trabajo se realizó la síntesis de nanopartículas magnéticas utilizando los tubos de VP6 como agentes estabilizadores o protectores. Se utilizaron diferentes mezclas de metales para obtener nanopartículas magnéticas conjugadas utilizando el método desarrollado para la síntesis de nanopartículas metálicas.

En la **Figura 45** se muestran nanotubos funcionalizados con las mezclas equimolares Fe-Pt, Co-Pt y Co-Au. Mediante microscopia de transmisión electrónica se observó que la superficie externa de los nanotubos fue completamente funcionalizada con nanopartículas de Fe-Pt (**Figura 45-A**), mientras que en los casos de las reacciones de funcionalización con Co-Pt y Co-Au se sintetizaron nanopartículas discretas esféricas de  $\sim 3$  y 5 nm de diámetro, respectivamente (**Figura 45-B-C**). En ninguno de los casos se observó desensamblaje de los tubos debido a la reducción química de los precursores, aunque si reducción del diámetro del templado en los casos de FePt y CoPt.

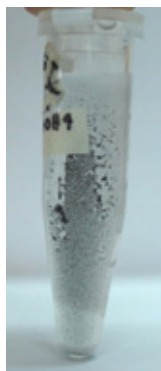
El uso de metales nobles es debido a que estos ayudan a proteger la nanopartículas magnéticas evitando su oxidación [21, 43]. Generalmente, las nanopartículas magnéticas bimetálicas quedan estructuradas con un centro constituido mayoritariamente por Co o Fe, que está cubierto por una capa del metal noble (Au, Pt o Ag).

La síntesis de nanopartículas bimetálicas utilizando el bacteriófago M13 genéticamente modificado ha resultado en la formación de una capa de nanopartículas de FePt (4 nm de diámetro) que cubren la superficie externa del virus, similar a lo obtenido con los nanotubos VP6 [12, 14, 23, 49]. También ha sido posible sintetizar nanoalambres de las mezclas Co-Pt y Fe-Pt en la cavidad interna del virus TMV pero su longitud puede variar entre 15-100 nm [16, 43]. El uso de péptidos con afinidad específica ha producido nanopartículas de CoPt de 3.5 nm de diámetro solubles y estables [49], con morfología similar a la obtenida usando VP6 como templado. El uso de templados virales sin afinidad por este tipo de precursores resulta en la formación de agregados amorfos [49]. Lo que se busca es la formación de capas delgadas o de nanopartículas magnéticas discretas que pueden ser utilizadas como dispositivos de almacenamiento de información o nanobaterías.



**Figura 45.** Microscopía de transmisión electrónica de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas magnéticas. (A) Mezcla Fe-Pt, (B) Mezcla Co-Pt, (C) Mezcla Co-Au.

Las propiedades magnéticas de los nanobiomateriales sintetizados fueron analizadas al someter por 1 min las muestras a un campo magnético de samario/cobalto (Magnetic Separation Stand, Promega). Las proteínas funcionalizadas con CoAu, CoPt y FePt mostraron una acumulación en la pared del tubo eppendorf localizada junto al magneto después de pocos segundos debido a la atracción magnética ejercida por el sistema de separación (**Figura 46**). Las proteínas funcionalizadas con nanopartículas metálicas de un solo elemento: Co, Pt y Fe, no mostraron atracción hacia el campo magnético, aún después de varios minutos.



**Figura 46.**

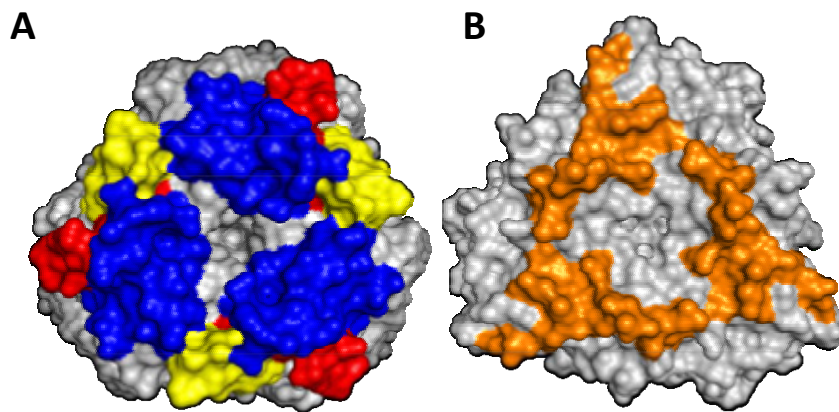
**Propiedades magnéticas de tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas magnéticas.** Tubos de VP6 funcionalizados con mezcla Co-Pt después de 1 min en el Magnetic Separation Stand (Promega).

### **6.6. Estructura del trímero VP6.**

La proteína VP6 fue funcionalizada con diversos metales, las observaciones por medio de microscopía electrónica indicaron que bajo las condiciones de reacción utilizadas la deposición ocurría en la superficie externa de los tubos. Para entender o elucidar como ocurre este proceso de deposición-funcionalización, se realizó un análisis a nivel estructural del trímero de VP6. Además, este análisis arroja información que puede utilizarse para optimizar condiciones de reacción, así como plantear nuevas rutas de funcionalización.

Actualmente se dispone de conocimiento detallado de la estructura de rotavirus gracias a datos de difracción de rayos X, microscopía electrónica, criomicroscopía y modelamiento. Al estar ensamblada en forma tubular, el trímero tiene diversas regiones expuestas hacia el exterior: loop A'-A'' (168-177), loop B-C (194-205) y la hélice  $\alpha$ A (295-317) o hacia el interior: hélice  $\alpha$ b (31-39) y loop  $\beta$ b- $\alpha$ c (59-73) (**Figura 47**).

Estas regiones no están implicadas en la formación de los trímeros por lo que su modificación química o genética no afectará su capacidad de ensamblarse en macroestructuras tubulares [2, 7, 50]. Cada subunidad de VP6 posee cinco sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , un sitio de unión a  $\text{Zn}^{2+}$  y un sitio para  $\text{Cl}^-$  [18, 40, 50]. Tres subunidades de VP6 (A, B y C) forman la estructura del trímero que es coordinado y estabilizado por estos iones por la formación y estabilización de interacciones intra e intertrímeros [39, 50, 102]. Adicionalmente, durante la determinación y refinamiento de la estructura atómica de VP6 se determinó que posee diversos sitios de unión de iones  $\text{Pt}^{2+}$  y  $\text{Hg}^+$  [50]. **Figura 48-A.**



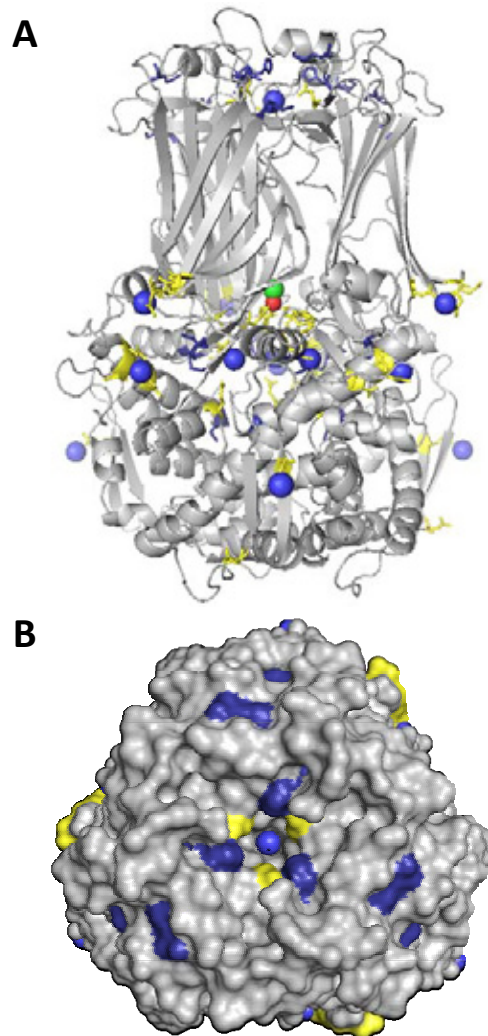
**Figura 47.**

**Modelo de trímero VP6.** (A) Representación en superficie de las regiones expuestas hacia el exterior: loop A'-A'' (168-177) en amarillo, loop B-C (194-205) en rojo y hélice  $\alpha\text{A}$  (295-317) en azul. (B) Regiones expuestas hacia el interior: hélice  $\alpha\text{B}$  (31-39) y loop  $\beta\text{b-}\alpha\text{c}$  (59-73) en naranja. Archivo PDB 1QHD [50].

Durante el ensamblaje de partículas virales todos estos sitios están comprometidos al localizarse en la cavidad intertrímero, en regiones intratrímeros o regiones de interacción con VP7 [39, 40]. Pero al ensamblarse en forma de tubos, en las regiones expuestas hacia el exterior (**Figura 47-A**) se tiene expuesto el sitio de unión de iones coordinado por N250 y Y248, y el residuo His316 que une iones  $\text{Hg}$  (I) y  $\text{Hg}$  (II) (**Figura 48-B**).

El probable sitio de unión de iones metálicos que está disponible para realizar la deposición y funcionalización de VP6 con precursores metálicos iónicos está localizado en la parte superior en el centro del trímero (**Figura 48-B**).





**Figura 48.**

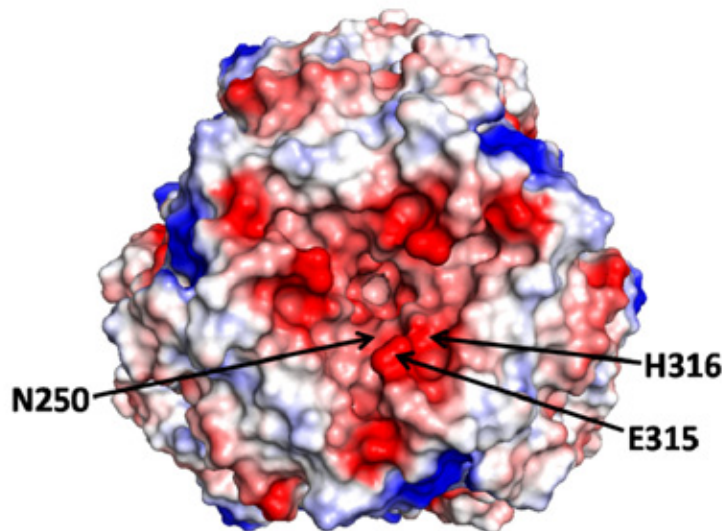
**Localización de sitios de unión de iones.** (A) Trímero VP6 mostrando sitios de unión de iones. (B) Vista superior del trímero en volumen con sitios de unión de iones. Azul iones calcio, verde ion cloro y rojo ion zinc. En amarillo residuos que unen iones Ca, Zn y Cl. En azul residuos que unen iones Pt (II), Hg (I) y Hg (II).

**Ca<sup>2+</sup> 1:** en la base del trímero coordinado por N250 y Y248. **Ca<sup>2+</sup> 2:** dentro de la cavidad interna en la base, coordinado por E340, E134 y D337. **Ca<sup>2+</sup> 3:** exterior en la base del trímero, coordinado por D62 y Q47. **Ca<sup>2+</sup> 4:** exterior a la mitad del trímero, coordinado por D286 y N266. **Ca<sup>2+</sup> 5:** exterior en la base del trímero, coordinado por E379, D380, Q383 y Q268. **Pt(II)** coordinado por M295, M300, M342 y M394. **Hg (I)** coordinado por C197, H316 y C331. **Hg (II)** coordinado por H316.

Archivo PDB 1QHD [50] modelado con PyMOL 1.1.

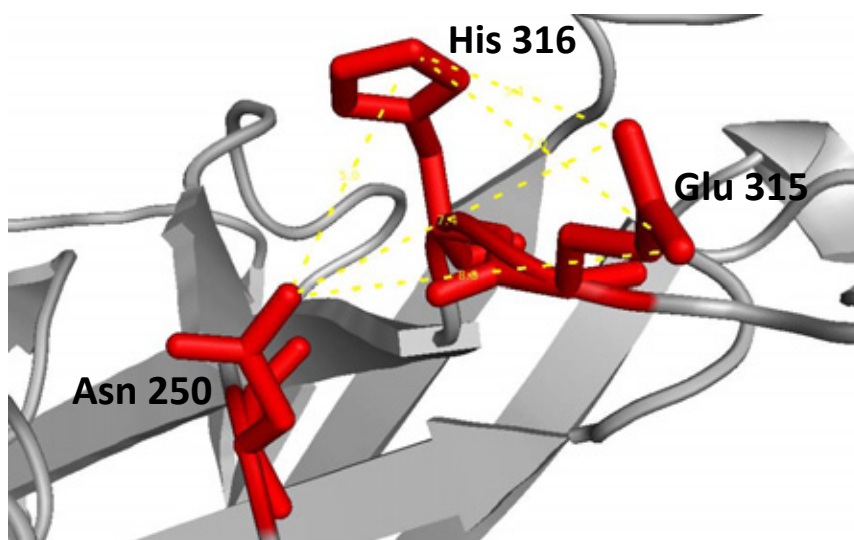
La deposición de precursores iónicos se da a través de interacciones electrostáticas complementarias de cargas [12, 15, 45]. A partir de la estructura cristalográfica de VP6, utilizando el método Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) con los servidores H<sup>++</sup> y PDB2PQR, se determinó el potencial electrostático de VP6 [13, 26]. En la Figura 49 se muestra la estructura del el trímero VP6 indicando el potencial electrostático. El potencial negativo en la cavidad central de VP6 es debido a los aminoácidos asparagina (N250), ácido glutámico (E315) e

histidina (H316) que están correctamente orientados hacia el exterior e interactúan con el solvente, por lo que pueden servir como sitios de unión de iones metálicos (**Figura 49**).



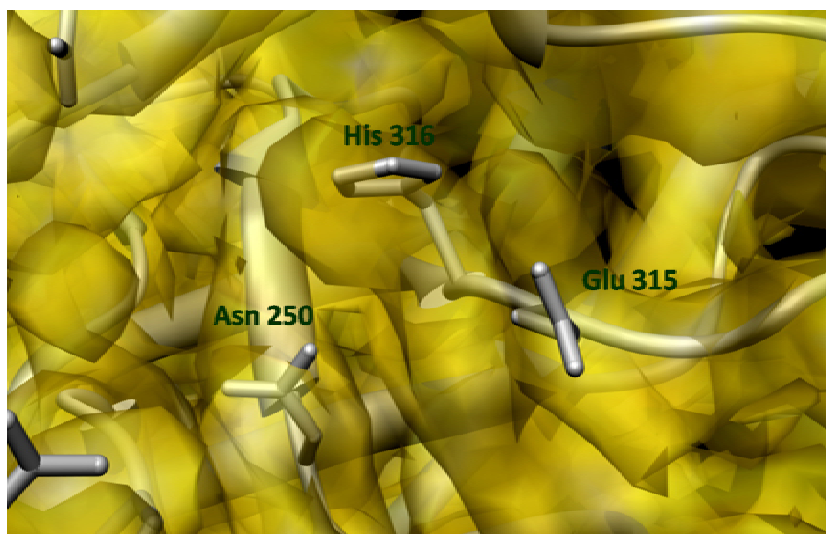
**Figura 49.** Potencial electrostático del trímero VP6. El potencial electrostático negativo es representado por color rojo y potencial positivo en azul. Con flechas se indica la localización de los aminoácidos N250, E315 y H316. Cálculos realizados con H<sup>+</sup> y PDB2PQR [13, 26, 50], modelado con PyMOL 1.1.

En conjunto estos aminoácidos poseen una conformación y arreglo similar al de algunas metaloproteínas, del tipo Glu-Xxx-His [25, 29, 42, 88, 96]. Al estar localizados entre 5 y 8 Å de distancia entre ellos serán capaces de unir y estabilizar diferentes iones metálicos a través de interacciones electrostáticas (**Figura 50**), sirviendo como primeros sitios de nucleación para la funcionalización y formación de nanopartículas conjugadas en la superficie de los tubos de VP6.



**Figura 50.** Sitio de unión de iones en VP6. Distancias entre aminoácidos en angstroms (Å) determinadas en archivo PDQ 1QHD [50] con PyMOL 1.1.

En la **Figura 51** se aprecia la orientación de los aminoácidos N250-E315-H316 en la estructura cristalográfica de VP6 sobrelapada con el mapa de electrones del trímero VP6, confirmando la orientación y distancia entre estos aminoácidos en el sitio de unión de iones metálicos.



**Figura 51.**

**Sitio de unión de iones en VP6.** Estructura cristalográfica de VP6 sobrelapada en mapa de electrones del trímero de VP6. Archivos PDB 1QHD, EMDB 1461 [8, 50].

Los grupos carboxilos de los residuos ácidos (Asp y Glu), así como histidina y cisteína están involucrados en el direccionamiento, morfología y crecimiento anisotrópico de nanopartículas de plata debido a su gran afinidad por los iones Ag [12]. La nucleación ocurre por unión selectiva de iones en sitios específicos de carga opuesta en la superficie de la proteína y en simulaciones por medio de dinámica molecular se determinó que los aminoácidos Asp, Glu, Arg y Asn poseen la mayor afinidad por Au, Ag y Pd por medio de interacciones cooperativas al estar localizados entre 5-8 Å [15, 28]. La base de datos *Heavy-atom database system* ([www.hatodas.harima.riken.go.jp/](http://www.hatodas.harima.riken.go.jp/)) confirma esta información, ya que los residuos His y Glu, así como Met y Cys son los sitios potenciales de unión de metales Ag, Au, Pt y Pd más frecuentes encontrados en los procesos de derivatización de proteínas [83].

## CAPÍTULO 7

# CONCLUSIONES

Se planteó la utilización de la proteína VP6 de rotavirus como plataforma para la producción de nanobiomateriales híbridos y se demostró su versatilidad como templado para la síntesis nanotubos y partículas pseudovirales VP2/VP6 conjugados con nanopartículas metálicas sintetizadas *in situ* mediante reducción química.

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria, en este caso la utilización de las proteínas estructurales de rotavirus como plataforma para sintetizar nanomateriales logró la integración de diversos aspectos de las áreas de bioprocesos (cultivo celular, producción y purificación de proteínas recombinantes), bioquímica (caracterización de proteínas, análisis estructural) y ciencias de materiales (síntesis de nanopartículas, caracterización por microscopía electrónica y espectroscopía, catálisis). En conjunto, dichas disciplinas nos ayudan a entender los aspectos concernientes al proceso de síntesis y ensamblaje de nanopartículas utilizando como templado biológico VP6.

Los tubos de VP6 son estructuras estables, autoensamblables y no replicantes, además de que se logró expresarlos recombinantemente mediante el SCIBV en grandes cantidades, se realizó su purificación en cantidad suficiente y con alta calidad y pureza por medio de un protocolo que es técnica y económicamente viable en gran escala.

La subunidad trimérica VP6 posee potencial electrostático negativo en la cavidad de la parte superior, esta región está expuesta al medio de reacción y sirve potencialmente como sitio de deposición de los precursores metálicos iónicos, y al adicionar los agentes reductores sirven como sitios de anclaje y estabilización de las nanopartículas metálicas.

Los nanotubos de VP6 son ensamblajes supramoleculares o macromoléculas con arquitectura tridimensional bien definida y constante. Utilizando un agente reductor suave (citrato de sodio) se logra la formación de una capa inorgánica continua de Ag, Au o Pt en condiciones de equilibrio produciendo nanotubos híbridos. Cambiando a un agente reductor fuerte ( $\text{NaBH}_4$ ) se

obtienen nanobiomateriales híbridos con nanopartículas metálicas discretas de 3-9 nm de diámetro conjugadas en la superficie externa.

Las nanopartículas metálicas son producidas al utilizar residuos específicos que coordinan la nucleación, crecimiento, organización y transformación de compuestos inorgánicos, sintetizando materiales integrados discretos o estructuras altamente organizadas bajo condiciones de equilibrio, lo que algunos autores denominan *autoensamblaje integrativo*.

Los nanobiomateriales sintetizados a partir de la proteína multifuncional VP6 poseen nuevas propiedades con potenciales aplicaciones en diversas áreas: biomedicina, ciencias de materiales, bioelectrónicos, catálisis, entre otros.

## CAPÍTULO 8

# PRODUCTOS GENERADOS

### ***Artículos arbitrados.***

[1]. Rodríguez-Galván A, Heredia A, **Plascencia-Villa G**, Ramírez OT, Palomares LA, Basiuk VA. 2008. **Scanning tunneling microscopy of VP6 viral protein self-assembled into nanotubes and nanospheres.** *J Scann Probe Microsc*, 3(1):25-31.

[2]. **Plascencia-Villa G**, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramírez OT. 2009. **Use of recombinant rotavirus VP6 as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals.** *Biotechnol Bioeng* 104: 871-881.

[3]. **Plascencia-Villa G**, Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. 2009. **Recombinant rotavirus structural proteins as a platform for production of hybrid nanobiomaterials.** En preparación.

### ***Solicitud de patente PCT.***

Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, **Germán Plascencia Villa**, Laura Alicia Palomares Aguilera, Yimy Alexander Mena Méndez, José Manuel Saniger Blesa. **Use of viral multimeric proteins as templates for the construction of nanobiomaterials.** *Pub. No. WO/2009/157746. International Application No. PCT/MX2008/000080.*

### ***Presentaciones en congresos nacionales e internacionales.***

[1]. **Germán Plascencia-Villa**, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2007. Síntesis de nanomateriales usando como templado la proteína VP6 de rotavirus. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Michoacán, México. Poster.

[2]. **Germán Plascencia-Villa**, José M. Saniger, Laura A. Palomares and Octavio T. Ramírez. 2007. Synthesis of nanobiomaterials using recombinant rotavirus VP6 protein as template for chemical deposition and functionalization. ECI Biochemical Engineering XV. Québec City, Québec, Canadá. Poster.

- [3]. Laura A. Palomares, Jimmy A. Mena, **Germán Plascencia-Villa**, Octavio T. Ramírez. 2007. Following rotavirus-like particle production and assembly and disassembly kinetics: Towards the production of nanomaterials. ECI Biochemical Engineering XV. Québec City, Québec, Canadá. Oral.
- [4]. Laura A. Palomares, Jimmy A. Mena, José M. Saniger, **Germán Plascencia-Villa**, Octavio T. Ramírez. 2007. Integrated process monitoring and developing for the production of synthetic viral structures: from cell culture to purified nanoparticles. 8th PEACe Conference on Protein Expression in Animal Cells. Angra dos Reis, Brasil. Oral.
- [5]. Octavio T. Ramírez, **Germán Plascencia-Villa**, Jimmy A. Mena, José M. Saniger, Laura A. Palomares. 2008. Designing production strategies for new bionanomaterials in insect cells. ECI Cell Culture Engineering XI. Coolum, Queensland, Australia. Oral.
- [6]. **Germán Plascencia-Villa**, José M. Saniger, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2008. Hybrid nanobiomaterials synthesized using recombinant rotavirus structural proteins. 3rd Mexican Workshop on Nanostructured Materials. Cd. de México, México. Oral.
- [7]. **Germán Plascencia-Villa**, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2008. Hybrid nanobiomaterials synthesized using recombinant rotavirus structural proteins as templates. Pan American Advanced Studies Institute (PASI) on Microscopy Techniques for Nanomaterials. Cancún, Q. Roo, México. Poster.
- [8]. Laura A. Palomares, José M. Saniger, **Germán Plascencia-Villa**, Octavio T. Ramírez. 2008. Use of rotavirus-like particles for the production of bionanomaterials. 1st International Congress on Biotechnology and Bioengineering. Cd. de México, México. Oral.
- [9]. **Germán Plascencia-Villa**, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2008. Uso de las proteínas virales como sistema alternativo en la nanotecnología. 3er Congreso Ciencias Naturales-Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags., México. Oral.
- [10]. Octavio T. Ramírez, **Germán Plascencia-Villa**, José M. Saniger, Laura A. Palomares. 2008. Producción de partículas pseudovirales por el sistema células de insecto-baculovirus para la

síntesis de nanomateriales novedosos. NanoMex '08 Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología. Cd. de México, México. Oral.

[11]. **Germán Plascencia-Villa**, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2009. Síntesis y caracterización de partículas pseudovirales de rotavirus funcionalizadas con nanopartículas. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Gro., México. Oral.

[12]. **Germán Plascencia-Villa**, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2009. Propiedades multifuncionales de la proteína VP6 de rotavirus como templado para sintetizar nanobiomateriales. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Gro., México. Oral.

[13]. **Germán Plascencia-Villa**, José M. Saniger, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2009. Multifunctional properties of structural proteins of rotavirus as templates for synthesis of nanobiomaterials. ECI Biochemical Engineering XVI. Burlington, Vermont, EEUU. Poster.

[14]. **Germán Plascencia-Villa**, José M. Saniger, Jorge A. Ascencio, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. 2009. El uso de nanotubos de la proteína recombinante VP6 de rotavirus como templado multifuncional para la síntesis de nanobiomateriales funcionalizados con metales. NanoMex '09 Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología. Ensenada, Baja California, México. Oral.

[15]. Octavio T. Ramírez, Jimmy A. Mena, Laura A. Palomares, **Germán Plascencia-Villa**, Ricardo Castro-Acosta. 2010. Up-and-down processing challenges for the production of virus-like particles to be used as recombinant vaccines. ECI Cell Culture Engineering XII. Alberta, Canadá. Oral.

### ***Artículos de divulgación.***

[1]. **Germán Plascencia-Villa**, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramirez. Biotecnología para domesticar virus. La Unión de Morelos (30 de marzo de 2009), Suplemento de la Academia de Ciencias de Morelos, 26-27.



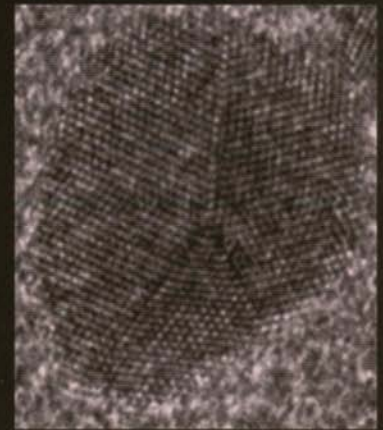
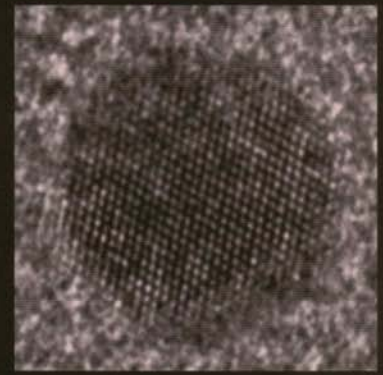
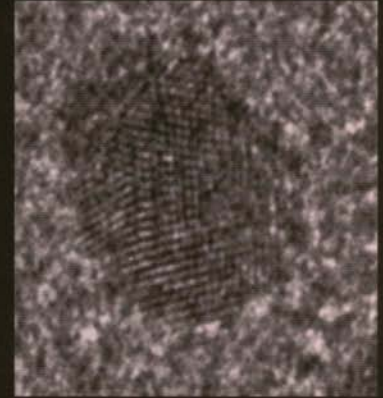
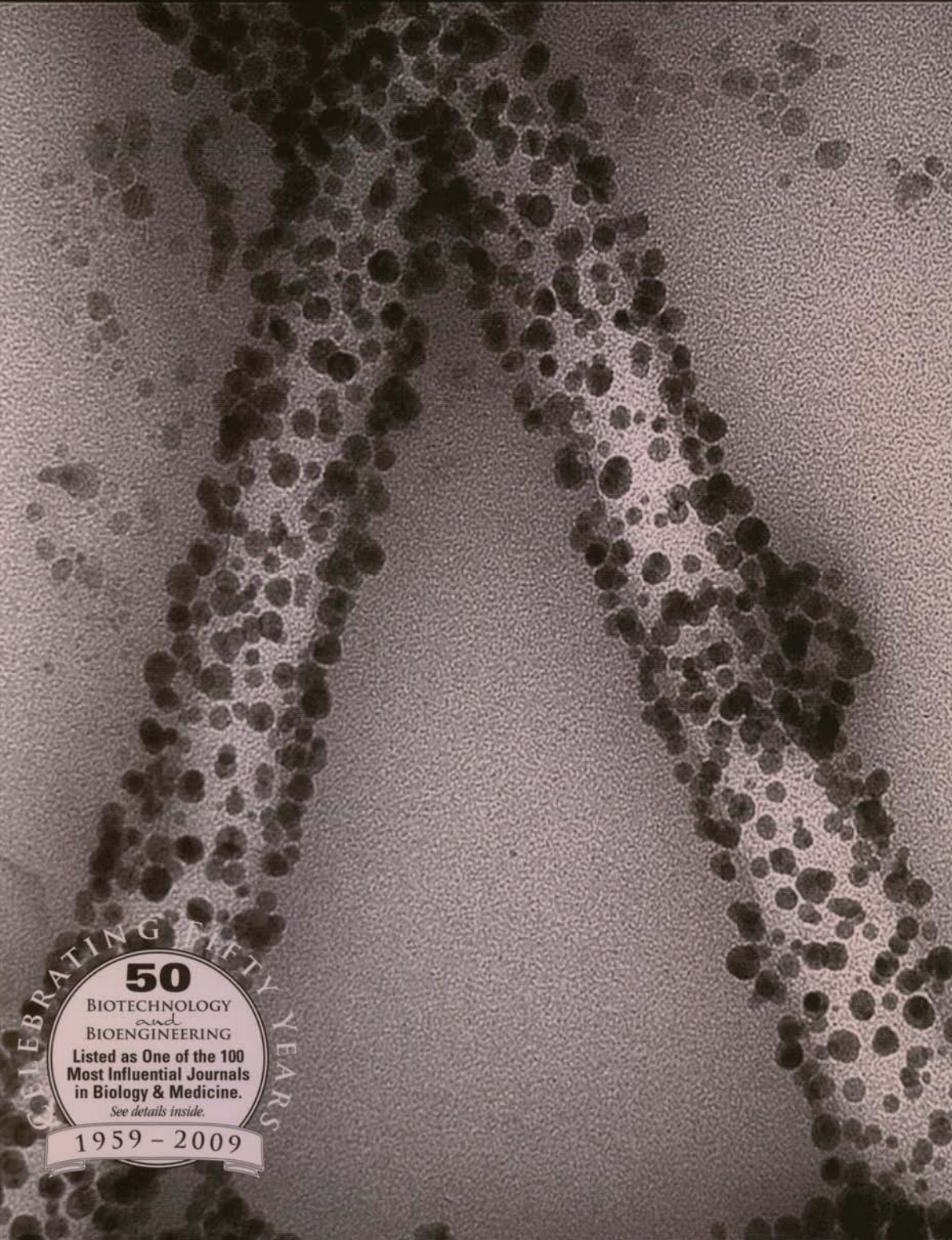
[2]. **Germán Plascencia-Villa**, Laura A. Palomares, Octavio T. Ramírez. Utilidad de los virus en nanotecnología. La Unión de Morelos (6 de abril de 2009), Suplemento de la Academia de Ciencias de Morelos, 27-28.

[3]. **Germán Plascencia-Villa**. Crean tecnología viral. Diario de Morelos (28 de abril de 2009), Sección Magazine Ciencia, 6-7.

[4]. **Germán Plascencia-Villa**. Nanotecnología molecular con virus. 2009. Hypatia 31, 2009.

# BIOTECHNOLOGY *and* BIOENGINEERING

VOLUME 104 NUMBER 5 DECEMBER 1, 2009



CELEBRATING FIFTY YEARS

**50**  
BIOTECHNOLOGY  
*and*  
BIOENGINEERING  
Listed as One of the 100  
Most Influential Journals  
in Biology & Medicine.  
*See details inside.*

1959 - 2009



# Use of Recombinant Rotavirus VP6 Nanotubes as a Multifunctional Template for the Synthesis of Nanobiomaterials Functionalized With Metals

Germán Plascencia-Villa,<sup>1</sup> José M. Saniger,<sup>2</sup> Jorge A. Ascencio,<sup>3</sup>  
Laura A. Palomares,<sup>1</sup> Octavio T. Ramírez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, CP 62250, Cuernavaca, Morelos,  
México; telephone: 52-777-329-1646; fax: 52-777-313-8811;

e-mail: laura@ibt.unam.mx, tonatiuh@ibt.unam.mx

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico,  
Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico

<sup>3</sup>Grupo de Materiales, Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de  
México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Received 6 April 2009; revision received 16 July 2009; accepted 27 July 2009

Published online 4 August 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bit.22497

**ABSTRACT:** The structural characteristics and predefined constant size and shape of viral assemblies make them useful tools for nanobiotechnology, in particular as scaffolds for constructing highly organized novel nanomaterials. In this work it is shown for the first time that nanotubes formed by recombinant rotavirus VP6 protein can be used as scaffolds for the synthesis of hybrid nanocomposites. Rotavirus VP6 was produced by the insect cell-baculovirus expression vector system. Nanotubes of several micrometers in length and various diameters in the nanometer range were functionalized with Ag, Au, Pt, and Pd through strong (sodium borohydride) or mild (sodium citrate) chemical reduction. The nanocomposites obtained were characterized by transmission electron microscopy (TEM), high-resolution TEM (HRTEM) with energy dispersive spectroscopy (EDS), dynamic light scattering, and their characteristic plasmon resonance. The outer surface of VP6 nanotubes had intrinsic affinity to metal deposition that allowed in situ synthesis of nanoparticles. Furthermore, the use of preassembled recombinant protein structures resulted in highly ordered integrated materials. It was possible to obtain different extents and characteristics of the metal coverage by manipulating the reaction conditions. TEM revealed either a continuous coverage with an electrodense thin film when using sodium citrate as reductant or a discrete coverage with well-

dispersed metal nanoparticles of diameters between 2 and 9 nm when using sodium borohydride and short reaction times. At long reaction times and using sodium borohydride, the metal nanoparticles coalesced and resulted in a thick metal layer. HRTEM-EDS confirmed the identity of the metal nanoparticles. Compared to other non-recombinant viral scaffolds used until now, the recombinant VP6 nanotubes employed here have important advantages, including a longer axial dimension, a dynamic multifunctional hollow structure, and the possibility of producing them massively by a safe and efficient bioprocess. Such characteristics confer important potential applications in nanotechnology to the novel nanobiomaterials produced here.

Biotechnol. Bioeng. 2009;104: 871–881.

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

**KEYWORDS:** nanobiomaterials; nanotubes; recombinant viral protein; viral assemblies; self-assembled multimeric structures; multifunctional materials; rotavirus; metal nanoparticles

## Introduction

The use of biological assemblies as scaffolds for the manufacture of organized nanomaterials and devices has advantages over traditional nanotechnology approaches and widely expands the properties and applications of the new nanobiomaterials obtained. Biological molecules have self-assembly capacity, are environmentally friendly, are less expensive to produce than inorganic nanomaterials, and are highly ordered, symmetrical, homogeneous structures with various sizes and shapes (Douglas and Young, 2006; Fischlechner and Donath, 2007). Different biomolecules,

Correspondence to: L.A. Palomares and O.T. Ramírez

Contract grant sponsor: CONACyT-Morelos

Contract grant number: MOR-2004-C02-058

Contract grant sponsor: CONACyT-Salud

Contract grant number: 2007-C01-69911

Contract grant sponsor: PAPIIT UNAM

Contract grant number: 206407; 224409

Contract grant sponsor: CONACyT

Contract grant number: 171180

including nucleic acids, proteins, peptides, and viral particles have been used as building blocks for nanotubes, nanowires, nanocrystals, nanobatteries, or memory devices, demonstrating their utility as a new platform for nanometric-scale materials with advanced functions (Dujardin et al., 2003; Nam et al., 2006; Shenton et al., 1999). Of these, viral assemblies, which are complex highly ordered structures of nanometric scale, are natural nanomaterials.

Although complete native helical viruses (rod-shaped or filamentous bacteriophages) have been used as scaffolds for metal deposition and synthesis of inorganic and metallic nanomaterials (Dujardin et al., 2003; Gazit, 2007; Knez et al., 2004; Mao et al., 2004; Slocik et al., 2005), they have disadvantages. The most important is that their size depends on the organization and assembly of the viral subunits and size of the genetic material contained within. Thus, the dimensions of native viruses used as scaffolds limit the size and shape of the nanomaterials obtained, which are often inadequate for nanotechnological applications. For example, the maximum lengths that can be achieved using TMV and M13 bacteriophage as nanomaterials are only about 300 and 880–950 nm, respectively (Khalil et al., 2007). Some efforts to overcome such a limitation include a genetically engineered M13 phage designed to obtain long nanostructures through leucine zipper interactions and the conjugation of functionalized virus assemblies with polymers (Nam et al., 2008; Sweeney et al., 2006; Yoo et al., 2008). Another disadvantage of native viruses is their complex structure that contains several proteins and nucleic acids that make their manipulation difficult. In contrast, hollow viral assemblies can expand the range of applications of this type of scaffolds. Moreover, the use of native viruses to support nanomaterial synthesis requires that the outer viral proteins have specific affinity for inorganic materials. This is often not the case, as viruses lack inherent properties for organizing functional components into integrated nanocomposites (Cölfen and Mann, 2003). To overcome this problem, viruses have been engineered to display specific amino acid residues and peptides that interact with inorganic materials for deposition of nanoparticles (Lee et al., 2006; Mao et al., 2004). An additional drawback is that the use of native viruses requires special protocols and manufacturing facilities with containment levels that prevent undesirable exposures to humans and the environment.

Biological molecules with self-assembly capacity and predetermined hierarchical organization in the nanoscale, but of several micrometers in length, devoid of genetic material and with multifunctional binding properties would be ideal as a new platform for the synthesis of complex integrated nanomaterials. Such molecules will retain the desirable features of native virus but without their limitations. A protein with these characteristics is rotavirus VP6, proposed in this work as a multifunctional biological template. Rotavirus is a member of the *Reoviridae* family with segmented, double-stranded RNA (dsRNA). Its capsid contains three concentric protein layers with icosahedral symmetry. The inner layer is formed by 120 copies of VP2,

the intermediate layer consists of 260 trimers of VP6 covered by the external layer of VP7 glycoprotein and 60 spikes of VP4 (Affranchino and Gonzalez, 1997; Charpilienne et al., 2002). Rotavirus is an important pathogen that causes severe gastroenteritis. Studies of the structural rotaviral proteins for the development and production of vaccines and diagnostics have been performed (Affranchino and Gonzalez, 1997; Charpilienne et al., 2002; Mena et al., 2005, 2006).

Rotavirus structural proteins have the capacity for in vivo and in vitro self-assembly into structures with different properties. When recombinantly expressed, VP2, VP6, and VP7 self-assemble to form virus-like particles (VLPs) (Crawford et al., 1994). Assembly of VLPs requires the core formed by VP2, but when VP6 is expressed alone, it can form semi-spherical or tubular structures (Lepault et al., 2001; Mena et al., 2006). VP6 exhibits polymorphism and can assemble into trimers, spheres, or nanotubes of several micrometers in length with 75 or 45 nm in diameter, depending on pH, ionic strength, and protein concentration (Lepault et al., 2001; Mathieu et al., 2001; Mena et al., 2006; Ready and Sabara, 1987). The protonation state of VP6, determined by pH, determines its type of assembly. Spherical or semi-spherical particles are observed under acidic pH (3.5–5.5), whereas nanotubes of 75 or 45 nm in diameter are obtained at pH between 5.5 and 7 and above pH 7, respectively (Lepault et al., 2001; Ready and Sabara, 1987). In the complete rotavirus capsid, VP6 is in close contact with both the inner and the outer protein layers. However, when VP6 acquires a tubular architecture, the domains that interact with both layers are free to interact with the environment and other chemical species present. The specific structural characteristics, self-assembly capacity, and versatile structure of VP6 make this protein ideal for obtaining nanotubes that can constitute multifunctional scaffolds for construction of organized nanoparticle-based nanobiomaterials with novel functions and characteristics. Such scaffolds and their production process are safe to humans and the environment, as they do not contain the genetic material of rotavirus.

## Materials and Methods

### Cell Culture, Recombinant Protein Production, and Purification

HighFive insect cells cultured in Sf-900II medium (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) were infected at  $0.5 \times 10^6$  cell/mL with a recombinant baculovirus (*AcMNPV*) that contains the rotavirus VP6 gene (strain SA11) at a multiplicity of infection of 0.1 pfu/cell. Culture supernatant was collected 96 h post-infection and VP6 nanotubes were purified by ion exchange chromatography (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham, Pittsburgh, PA) followed by size exclusion chromatography (HW-65F, TOSOH Bioscience, San Francisco, CA). VP6 nanotubes, resuspended in deionized water and quantified using the Bradford assay, had a purity

above 98%, as determined by densitometry of SDS–PAGE gels (data not shown).

### Characterization of Viral Assemblies

The size distribution of purified recombinant rotavirus VP6 nanotubes was obtained by dynamic light scattering (Zetasizer Nano, Malvern, Worcestershire, UK, provided by Dr. A. Moreno, UNAM) at 25°C. Viral assemblies were characterized on an EM900 Zeiss transmission electron microscope at 80 kV. High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) and elemental composition analysis were performed on a Philips Tecnai F20 microscope with an acceleration voltage of 200 kV scanning (STEM) system, including high angle annular dark field (HAADF) and energy dispersive spectroscopy (EDS), which allows a resolution of 1.5 Å and line scan mode. Fast Fourier transforms (FFT) were used to identify structures, based on the corresponding frequencies. VP6 nanotubes were deposited onto a 200-mesh formvar carbon-coated copper grid (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). Unfunctionalized VP6 nanotubes were stained with 1% uranyl acetate. Nanoparticle size distribution in functionalized samples was determined from micrographs analyzed with ImageJ 1.37v (NIH, Bethesda, MD). Nanoparticle formation was monitored by UV–Vis spectroscopy in a DU650 Spectrometer (Beckman, Fullerton, CA). Scans from 300 to 750 nm were performed to detect peaks of maximum absorbance corresponding to the surface plasmon resonance of metal nanoparticles. Quantitative electrostatics calculations in VP6 were performed with  $H^{++}$  and PDB2PQR (Dolinsky et al., 2004; Gordon et al., 2005) using the VP6 PDB file (1QHD). VP6 structure was analyzed and modeled with PyMOL v1.1 (DeLanoScientific LCC, Palo Alto, CA).

### Functionalization of Viral Assemblies

Viral assemblies were independently functionalized with four different metals by mixing 25 µg/mL of VP6 nanotubes with 0.5–1 mM of the metal precursors. The metal precursors used were: silver nitrate, AgNO<sub>3</sub>; gold (III) chloride trihydrate, HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O; potassium tetrachloroplatinate (II), K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> or bis(acetonitrile) dichloropalladium(II), Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (all from Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). Mixtures were maintained at room temperature for 3 h protected from light. Metal ions were then reduced to their metallic state by adding an equimolar amount of reducing agent (sodium citrate or sodium borohydride, NaBH<sub>4</sub>), incubated for one additional hour with NaBH<sub>4</sub> or for 9 h with sodium citrate, and washed twice by centrifugation (10 min at 10,000g).

### Catalytic Activity of Functionalized VP6 Nanotubes

One millimolar of Pd or Pt nanoparticles conjugated to VP6 nanotubes was used as catalyst for the oxidation of 5 g/L of

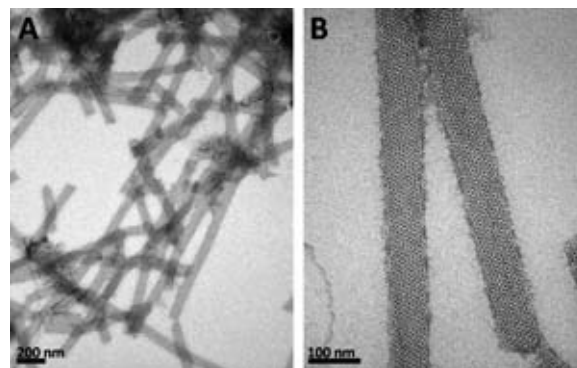
glucose to gluconic acid at 45°C for 3 h in a 20 mM sodium bicarbonate, 5 mM sodium carbonate, pH 8 buffer, in an agitated cell sparged with air. This method is a modification of the assay described by Acres and Budd (1971). Glucose concentration was measured every hour using a YSI 2700 Biochemistry Analyzer (YSI Life Sciences, Yellow Spring, OH). Unfunctionalized VP6 nanotubes and Pd or Pt nanoparticles synthesized in the absence of VP6 nanotubes were used as controls.

## Results and Discussion

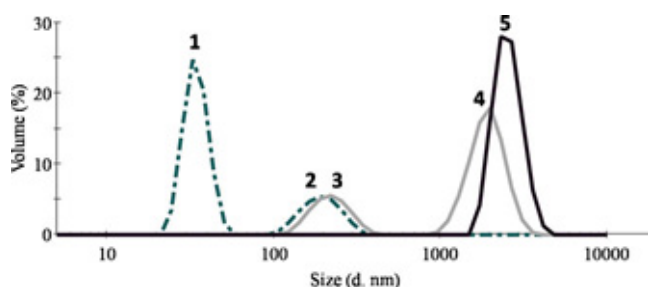
### Production and Characterization of Recombinant Rotavirus VP6

When VP6 is overexpressed in the IC-BEVS, it self-assembles into intracellular fibrillar structures composed of bundles of VP6 nanotubes traversing the cytoplasm that can be easily recovered and purified (Mena et al., 2006). Transmission electron microscopy of purified VP6 nanotubes stained with uranyl acetate (Fig. 1) revealed the quasi-hexagonal surface lattice structure previously reported (Lepault et al., 2001). Uranyl acetate accumulated along the edges, as expected for a tubular structure. VP6 nanotubes had several micrometers in length and a constant diameter of 75 nm with straight ends. The other structural and non-structural proteins of rotavirus and the dsRNA genome were absent and are not required for *in vivo* self-assembly or stability during purification of tubular VP6 (Lepault et al., 2001; Mena et al., 2006).

The size distribution by volume of purified recombinant VP6 nanotubes, analyzed by dynamic light scattering, had two populations (Fig. 2, gray line). The first (peak 3) corresponded to 25.7% of the total volume distribution and had a mean hydrodynamic radius of 224 nm, assuming a spherical particle shape, and the second (peak 4) to 74.3% of the total volume, with a size distribution ranging from 995 to 3,580 nm and a mean hydrodynamic radius of 1,940 nm



**Figure 1.** Electron micrographs of unfunctionalized VP6 nanotubes. The sample was negatively stained with uranyl acetate. **A:** 30,000× and **(B)** 140,000×.



**Figure 2.** Size distribution by dynamic light scattering. Typical volume distribution of unfunctionalized (gray line) and silver-functionalized (black line) VP6 nanotubes. A control reaction of silver reduction without the protein scaffold is also shown (dashed line). The size in the x-axis refers to the diameter assuming a spherical particle shape. Numbers identify each peak according to text. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

(Fig. 2). From analysis of TEM micrographs, it can be concluded that the second population corresponds to VP6 nanotubes. The smallest population was probably formed by VP6 aggregates, as no other protein was detected in gel electrophoresis of VP6 preparations (data not shown). Recombinant rotavirus VP6 nanotubes produced and purified were longer than any other viral assembly previously used as template for the synthesis of nanomaterials. They were over sixfold longer than TMV (300 nm in length) and over twofold longer than M13 bacteriophage (800–900 nm) (Dujardin et al., 2003; Khalil et al., 2007; Mao et al., 2004; Tseng et al., 2006). The organization of nanostructures across extended length scales has been a particularly relevant challenge in the design of integrated materials with advanced functions, still not satisfactorily solved (Cölfen and Mann, 2003). However, as demonstrated here, such limitations can be overcome with rotavirus VP6 preassembled into nanotubes. Furthermore, VP6 nanotubes are hollow, which can importantly expand the range of applications of this type of scaffolds, as specific cargo can be packaged within the tubes for either delivery to predetermined targets or for modifying fundamental properties of the nanocomposite itself.

### Functionalization of Recombinant Rotavirus VP6

Metal functionalization of VP6 nanotubes will expand their applicability in nanotechnology as a multifunctional template. Previous studies have shown that protein functionalization by direct conjugation with metal nanoparticles occurs due to the high affinity of certain amino acids for chelating metal ions, which serve as nucleation sites for the synthesis of functional inorganic metal nanoparticles. The indole group in Trp, polar (Lys, Arg, His, Asp, and Glu), and sulfur-containing (Cys and Met) amino acids have high affinity to metals through electrostatic attractions, especially at pH close to the  $pK_a$  of their side chains. Binding properties depend on amino acid charge and the precise

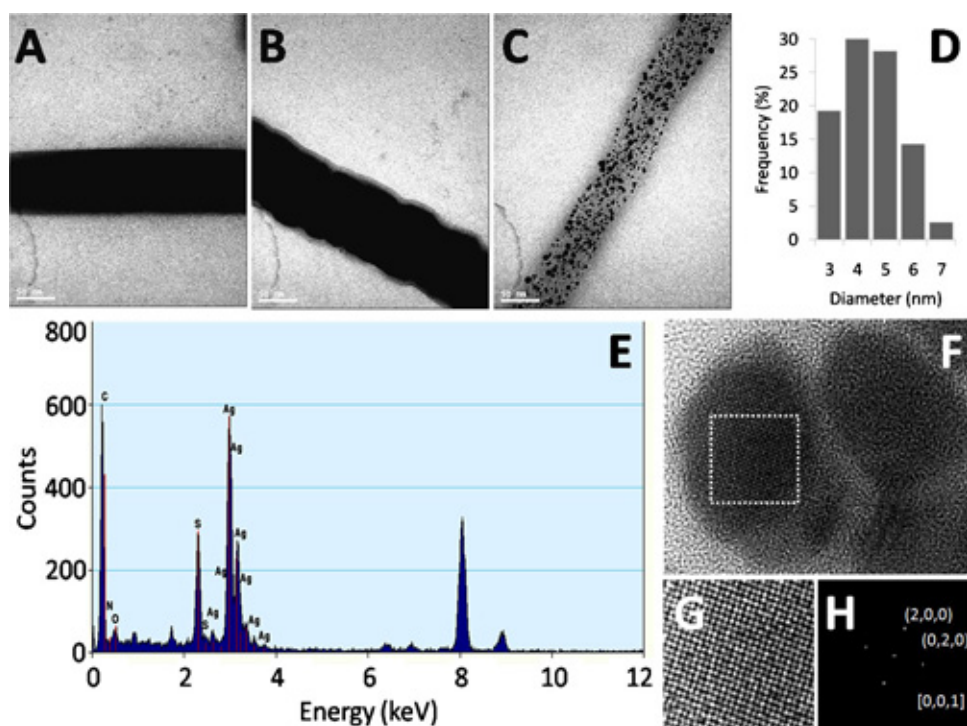
position of neighboring side groups, which can have spatial arrangements with high affinity, specificity, and binding strength for inorganic materials (Pelle et al., 2005; Willett et al., 2005). The side chains of amino acids passivate, stabilize, and organize the size and structure of metal nanoparticles directly conjugated onto them (Burt et al., 2004). The metals chosen for functionalization of VP6 nanotubes were silver, gold, platinum, and palladium, as they have a wide range of nanotechnological applications (Dickerson et al., 2008; Dujardin et al., 2003; Fischlechner and Donath, 2007; Gazit, 2007; Tseng et al., 2006).

### Functionalization With Silver

Functionalization with silver resulted in either complete or discrete specific decoration of the outer surface of nanotubes with metallic silver deposits (Fig. 3). Addition of the silver salt and the reductant changed the pH from 6.5 to 5 and increased the ionic strength of the solution (4 mM). Such conditions did not result in tube disassembly, but did change tube diameter from 75 to 45 nm (Figs. 1B and 3), as could be expected from the report by Lepault et al. (2001). The various silver coverage extents observed in Figure 3 were obtained by controlling the concentration of metal precursor, time of reaction, and the reducing agent used. It should be noted that samples for electron microscopy shown in Figure 3 and subsequent figures were not stained with uranyl acetate, so the images obtained were the result of metal deposition, as the electro density of proteins is not sufficient to absorb the electron beam in TEM. The mild reducing agent (sodium citrate) caused complete coverage of the outer nanotube surface with an electrodense continuous thin layer that did not have a discrete-particle structure at the resolution limit of the TEM used (Fig. 3A). Such fine continuous coating was probably due to a limited citrate activity at room temperature that could not extensively reduce silver ions. The UV–Vis absorption spectra of the nanobiomaterials obtained with silver and sodium citrate did not show a plasmon peak (Fig. 4A), but only a slight increase in absorbance. This suggests that the silver nanoparticles obtained were below 2 nm in diameter (Burt et al., 2004).

Using the same concentration of silver ions (1 mM) but sodium borohydride as reducing agent resulted in a metal deposition pattern different to that obtained when the mild reductant was employed. In particular, the metallic clusters started to grow over the outer surface of nanotubes immediately after the addition of the reducing agent and served as nucleation sites for additional deposition of Ag(I) ions by autocatalytic growth, resulting in the formation of discrete silver nanoparticles with a broad size distribution (Fig. 3B). As the reaction progressed, silver nanoparticles coalesced, forming a continuous metal overlay over the protein tube. The diameter of completely functionalized silver nanotubes (including the metal layer) was around 80 nm. When the strong reducer (sodium borohydride)





**Figure 3.** VP6 nanotubes functionalized with silver. None of the samples were stained, thus electrodense (opaque) zones correspond to metal deposits. **A:** Using 1 mM  $\text{AgNO}_3$  and sodium citrate as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **B:** Using 1 mM  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{NaBH}_4$  as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **C:** Using 0.5 mM  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{NaBH}_4$  TEM 250,000 $\times$ . **D:** Size distribution of silver nanoparticles in (C) analyzed with ImageJ 1.37v, NIH. **E:** EDS, **(F)** HRTEM of silver nanoparticles attached to nanotubes. **G:** Detail in (F). **H:** FFT of (G). [Color figure can be seen in the online version of this article, available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

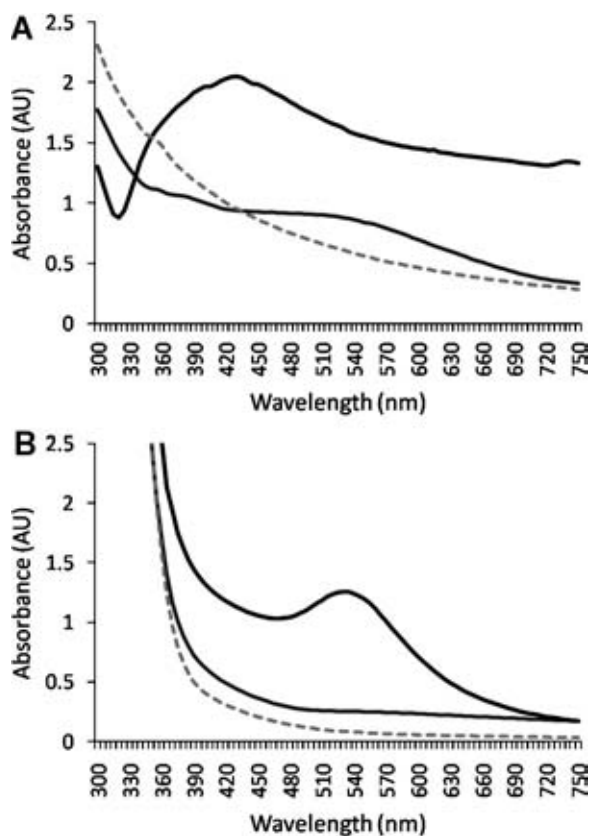
and 0.5 mM  $\text{AgNO}_3$  were used, discrete metal nanoparticles were synthesized in situ and directly conjugated to the tubes. The elemental analysis of the formed clusters as determined by HAADF (data not shown) resulted in a strong contrast due to  $Z^2$  differences, confirming the elemental analysis (José-Yacamán et al., 2001a). EDS demonstrated the existence of Ag metal atoms (Fig. 3E). Silver nanoparticles were attached to the outer tube surface and had an average diameter of 4.1 nm with a size distribution from 3 to 7 nm (Fig. 3C and D). HRTEM images were used to determine the atomistic structure of the silver nanoparticles (Fig. 3F). Nanoparticles had rounded surfaces with fcc-like atomic arrays that were similar to previous reports of Ag bio-synthesized particles (Tavera-Davila et al., 2009), as can be distinguished in the selected area (Fig. 3G). The FFT showed that particles were observed from the [0, 0, 1] axis (Fig. 3H). UV-Vis absorption spectra confirmed that metal nanoparticles in nanotubes contained zero-valence silver, as a plasmon peak with a maximum absorbance at 430 nm was observed (Fig. 4A) (Slocik and Wright, 2003).

Dynamic light scattering analysis (Fig. 2, black line) confirmed that VP6 nanotubes did not disassemble during chemical deposition and synthesis of metal nanoparticles. Functionalized nanobiomaterials typically had a single size distribution with a mean diameter of 2.5  $\mu\text{m}$  (considering an equivalent spherical shape). The smallest population observed in the sample of unfunctionalized nanotubes

(peak 3) was not observed after functionalization, probably because it was removed during the centrifugation washing steps. As controls, reactions were performed in the absence of VP6 nanotubes. Metal aggregates synthesized without protein nanotubes as template had two populations with mean diameters of 34 and 197 nm (Fig. 2, dashed line). The absence of these populations in the reactions with VP6 nanotubes indicates that metal clusters were attached to the nucleation sites on the viral assemblies used as templates.

### Functionalization With Gold

VP6 nanotubes functionalized with gold are shown in Figure 5. Dynamic light scattering and TEM showed that nanotube size was maintained after treatment, as occurred after silver functionalization (data not shown). When citrate was used as reducing agent, a complete gold coverage of the outer surface of the tube was obtained, similar to that obtained with silver and citrate as reducing agent (Fig. 5A). However, the diameter of gold-covered VP6 nanotubes remained in 75 nm. In contrast, the diameter of nanotubes changed from 75 to 45 nm and a regular discrete coating with monodispersed spherical gold nanoparticles (mean diameter of 9 nm) across the entire outer surface of the protein structure was obtained after 3 h of deposition and one additional hour of incubation with sodium borohydride



**Figure 4.** UV-Vis absorbance spectra scan from 300 to 750 nm. **A:** VP6 nanotubes functionalized with AgNO<sub>3</sub> or **(B)** HAuCl<sub>4</sub>. The resonance plasmon for Ag<sup>0</sup> had a maximum at 430 nm and for Au<sup>0</sup>, 530 nm. Dashed line, spectra at the beginning of the functionalization reaction. Black line, sodium borohydride. Gray line, sodium citrate.

(Fig. 5B). Gold nanoparticles had a narrow size distribution, as 84% had diameters between 7 and 10 nm (Fig. 5C). It is possible that the metal-binding sites on VP6 surface directed the synthesis of gold nanoparticles and avoided aggregation and coalescence. A representative HRTEM image and a line scan of gold nanoparticles (line indicated in the inset) are shown in Figure 5D and E, confirming the elemental composition of nanoparticles. Common Au nanoparticle configurations can be observed and are indicated in Figure 5E. A selected area shows a fcc-like particle at the [0, 1, 1] orientation with hexagonal contrast and interplanar spacing of 2.03 and 2.15 Å. Its corresponding FFT shows frequencies of [1, 1, 1] and [2, 0, 0], characteristic of gold (Fig. 5F and G). A multiple-twin particle is also shown. This is the lowest energy configuration of gold nanoparticles. Frequencies of [1, 1, 1] were found by FFT, which correspond to a decahedral configuration at the fivefold orientation (Ascencio et al., 1998). UV-Vis absorption spectra of nanotubes functionalized with gold and sodium borohydride as reducing agent exhibited plasmon resonance with a peak at 530 nm (Fig. 4B), which corresponds to Au<sup>0</sup> nanoparticles conjugated to a histidine-rich peptide (Slocik and Wright, 2003). The absorption spectra of nanobioma-

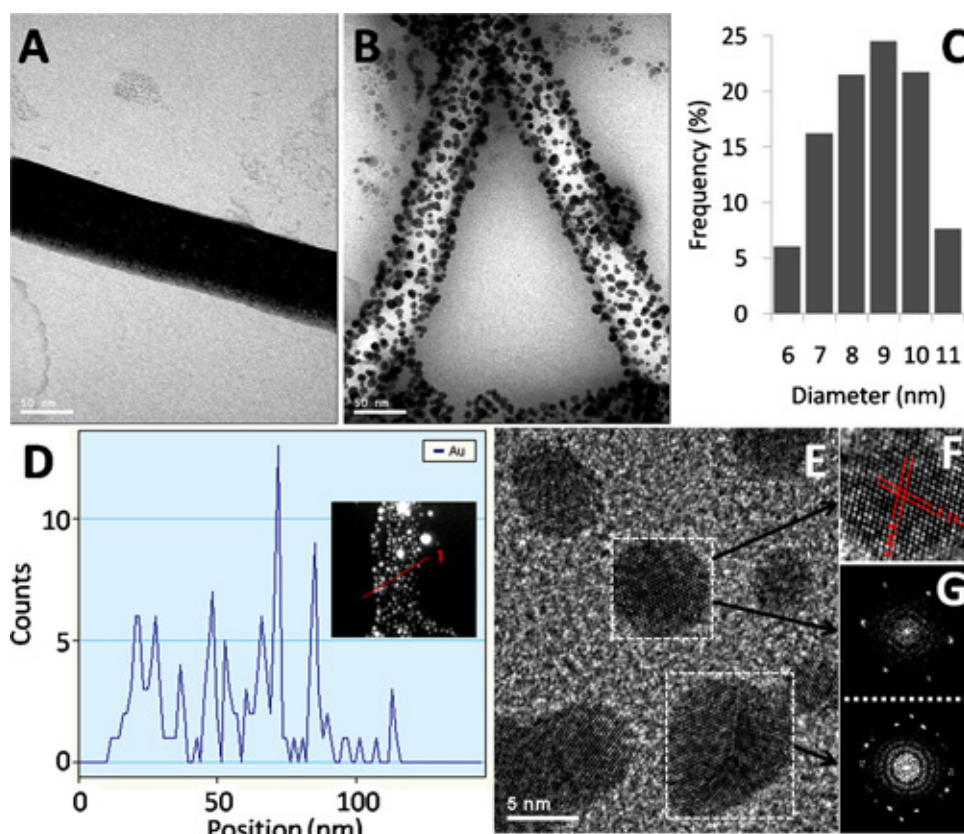
terials functionalized with gold using citrate as reducing agent showed only a slight increment in absorption but did not exhibit a plasmon peak due to the small size of metal clusters (Fig. 4B).

### Functionalization with Platinum and Palladium

Potassium tetrachloroplatinate (II) (K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>) was used for functionalizing VP6 nanotubes. Dynamic light scattering showed that tube structure was maintained after treatment (data not shown). When reducing with citrate, once again a continuous fine film coating was observed along the surface of 45 nm nanotubes (Fig. 6A). With sodium borohydride, a discrete coverage with platinum particles (mean diameter of ~3 nm) and uniformly distributed in the tube surface was obtained (Fig. 6B). Pt nanoparticles had a narrow size distribution, with 99% of the particles with diameters between 3 and 5 nm (Fig. 6C). Elemental composition of platinum functionalized nanotubes was confirmed by EDS spectrum (Fig. 6D). HRTEM confirmed the size distribution of nanoparticles (Fig. 6E) and showed the presence of multiple small particles with dot arrays (Fig. 6F). The FFT of image shown in Figure 6F matches with the well-understood tetrakaidecahedron atomistic structure at the [0, 1, 1] orientation for an fcc-like metal cluster (Ascencio et al., 1998). Pt nanoparticles of similar size and distribution have been previously observed in the presence of the HRE peptide and TMV as templates (Dickerson et al., 2008; Dujardin et al., 2003; Slocik and Wright, 2003). VP6 nanotubes remained in 75 nm after functionalization with sodium borohydride, and no disassembly occurred.

The synthesis of palladium nanoparticles and palladium-functionalized nanomaterials are of interest for their electronic and catalytic properties (Dujardin et al., 2003; Gazit, 2007; Knez et al., 2004) and their chemical selectivity, which is especially suitable for fuel cell devices (Esparza et al., 2005). The size and distribution of nanoparticles synthesized using Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as precursor also depended on the reducing agent used. With citrate, the outer surface of the tube was decorated with metal deposits that allowed the visualization of the tube lattice structure (Fig. 7A). The appearance of functionalized nanotubes was similar to unfunctionalized nanotubes stained with uranyl acetate (Fig. 1). With borohydride, tiny monodisperse palladium nanoparticles (92% had a diameter of ~3 nm) were synthesized over the outer tube surface (Fig. 7B and C). As in previous cases, the diameter of nanotubes was modified during the functionalization reaction, shifting from 75 to 45 nm but maintaining their length. However, palladium had different deposition patterns into metallic clusters compared to the other metal ions tested. Small and discrete metal clusters were observed regularly distributed over the VP6 nanotube, following the underlying protein lattice. We cannot explain such a difference but could be related to the affinity and electrostatic interactions of VP6 with Pd (II) ions. Similar arrangements of small Pd clusters





**Figure 5.** VP6 nanotubes functionalized with gold. **A:** Using 1 mM HAuCl<sub>4</sub> and sodium citrate as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **B:** Using 1 mM HAuCl<sub>4</sub> and sodium borohydride as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **C:** Size distribution of gold nanoparticles in (B) as determined with ImageJ 1.37v, NIH. **D:** Line scan of an inclined section of a gold functionalized nanotube. **E:** HRTEM of nanoparticles attached to (B). **F:** Selected area in (E). **G:** FFT of particles in selected areas in (E). [Color figure can be seen in the online version of this article, available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

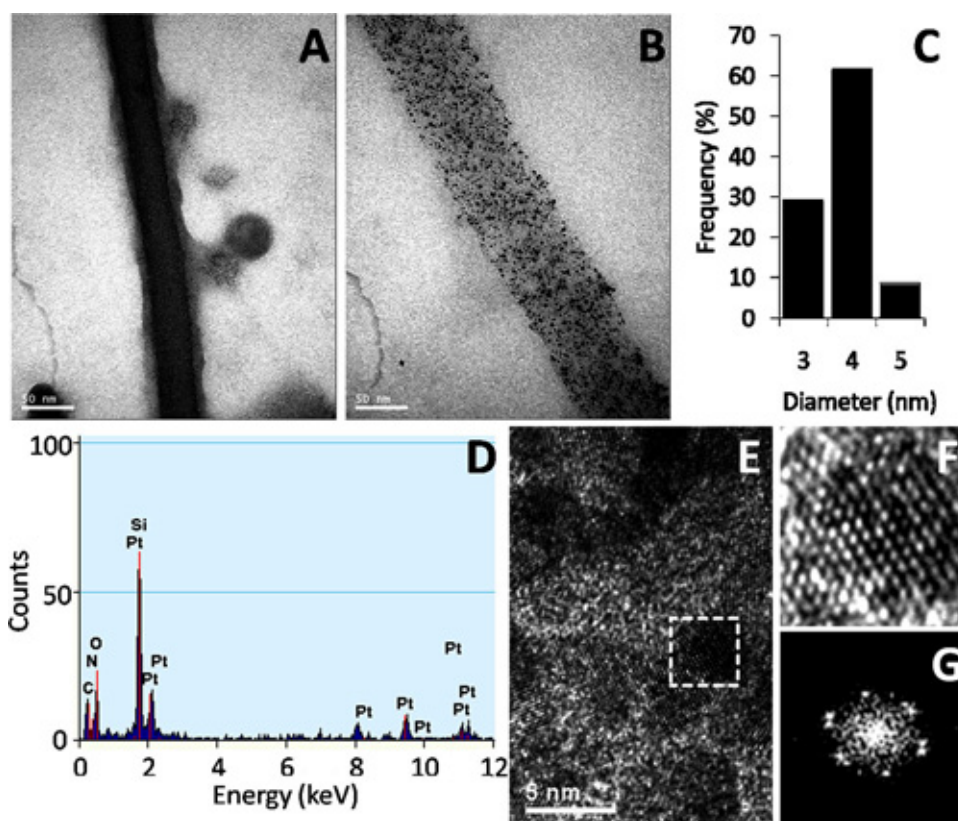
have been previously obtained on the surface of genetically modified TMV capsids (Knez et al., 2004). EDS analysis confirmed that metal nanoparticles conjugated over the protein template were composed of Pd<sup>0</sup> (Fig. 6D). HRTEM images (Fig. 6E) and the FFT from a selected area (Fig. 6F and G) denote the hexagonal array of the Pd nanoparticles with interplanar lattice distances of (1, 1, 1) and (2, 0, 0) (2.24 and 2.16 Å, respectively), similar to previously reported Pd particles (José-Yacamán et al., 2001b). FFT from the selected area corresponding to a single nanoparticle denoted the hexagonal array and interplanar lattice distances of the (1, 1, 1) and (2, 0, 0) (2.24 and 2.16 Å, respectively). In contrast to silver and gold nanoparticles, VP6 nanotubes functionalized with Pt and Pd clusters did not show a distinguishable absorption peak corresponding to surface plasmon resonance. Slocik and Wright (2003) attributed the absence of a distinguishable plasmon band for platinum due to its electronic and dielectric properties. In addition, colloidal metals, such as paladium and platinum, do not exhibit a defined plasmon peak (Yang et al., 2004).

The catalytic properties of Pd and Pt nanoparticles were tested in a model reaction of glucose oxidation to gluconic acid (Acres and Budd, 1971; Chen et al., 2009). Oxidation with Pt- and Pd-functionalized VP6 nanotubes as catalysts

resulted in the conversion of 34 and 40% of glucose, respectively, after 180 min (Fig. 8). In comparison, reaction controls with metallic nanoparticles produced under the same conditions as functionalized nanotubes, but without the protein template, only resulted in the conversion of 11% and 29% of glucose, for Pt and Pd, respectively. Reactions with unfunctionalized VP6 tubes resulted in conversion of 11% of glucose. These results demonstrate the superiority of functionalized VP6 nanotubes as catalysts.

### Metal-Binding Sites in Rotavirus VP6 Nanotubes

Reaction conditions led to the functionalization of VP6 nanotubes with all metals tested (silver, gold, platinum, and palladium), highlighting the multifunctional properties of this protein. Functionalization occurred through in situ metal nanoparticle synthesis directly over the protein surface and resulted in bio-inorganic hybrid nanomaterials. All metal clusters attached to VP6 nanotubes were stable, as several washing steps did not dislodge them, and the reducing agents did not cause peptide bond cleavage or disassembly of the metastable viral assembly. All these observations indicate that the interaction between VP6 and metals was strong.

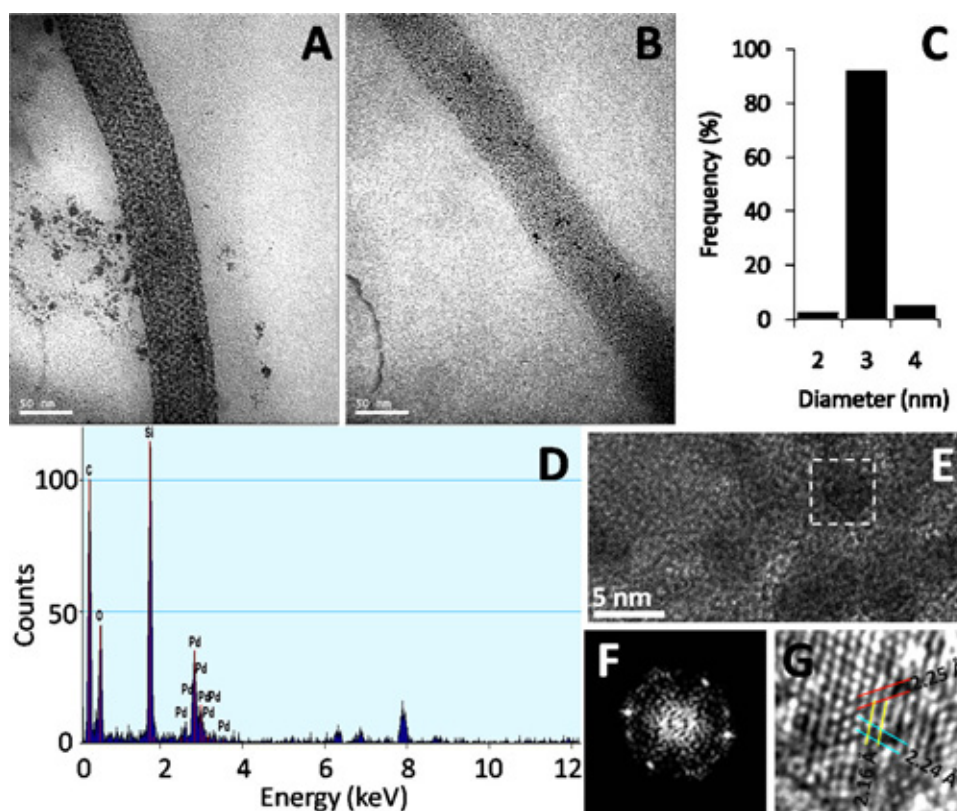


**Figure 6.** VP6 nanotubes functionalized with platinum. **A:** Using 1 mM  $K_2PtCl_4$  and sodium citrate as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **B:** Using 1 mM  $K_2PtCl_4$  and sodium borohydride as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **C:** Size distribution of platinum nanoparticles shown in panel B as determined with ImageJ 1.37v, NIH. **D:** EDS. **E:** HRTEM of particles attached to (B). **F:** Detail in (E). **G:** FFT of (F). [Color figure can be seen in the online version of this article, available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

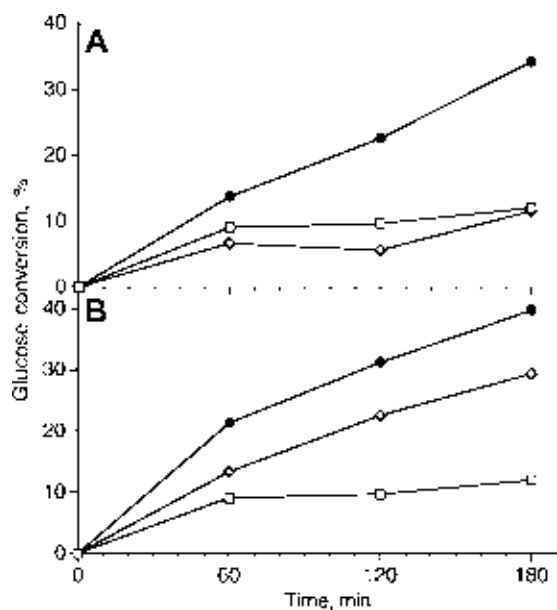
Information about the metal-binding sites in VP6 nanotubes can be predicted from analysis of the available crystallographic structures of the VP6 trimer and cryomicroscopy reconstructions (Mathieu et al., 2001; Zhang et al., 2008). VP6 folds into two domains (H and B), both implicated in trimer stabilization and intertrimer contacts (Lepault et al. 2001; Mathieu et al., 2001; Petitpas et al., 1998). Most of the potential metal-binding sites located in the monomer subunit are not exposed to the environment when VP6 is assembled into nanotubes or spheres. All micrographs obtained in this work showed that VP6 nanotubes were only functionalized on their outer surface, where a single metal-binding site is exposed. The lack of functionalization on the inner side of the nanotubes is probably due to its neutral electrostatic potential and the absence of adequately located polar amino acids, as determined by computational analysis of the atomic structure of VP6 (Fig. 9) (Dolinsky et al., 2004; Gordon et al., 2005; Mathieu et al., 2001). The most probable metal-binding site in the outer surface of nanotubes is located on the top of the central cavity of the VP6 trimer, which has a negative electrostatic potential at the functionalization conditions used in this work (Fig. 9) (Dolinsky et al., 2004; Gordon et al., 2005; Mathieu et al., 2001). The central cavity is located in the H domain, where three polar amino acids,

asparagine (N250), glutamic acid (E315), and histidine (H316), located in the  $\alpha$ A helix, are correctly oriented to the solvent to bind metal ions (Fig. 9). N250, E315, and H316 have a conformational structure and arrangement similar to the inverted metal-binding motifs of some metalloproteins (Gomis-Rüth, 2003; Hooper, 1994; Lombardi et al., 2000). The distance of less than 7 Å between the amino acid side chains makes them capable of binding and stabilizing different metal ions through hydrogen bonds or electrostatic interactions in the first reaction step. These side chains also serve as protecting agents to passivate, stabilize, and organize the metal nanoparticles after the reducing agent is added. This structural information correlates with data obtained from other proteins and peptides with hydrophilic domains and negative potential of histidine-rich sequences alternated with acidic residues that possess affinity for cationic metal ions. Amino acid residues are involved in the effective binding and control for in situ growth and organization of nanoparticles with the addition of external reducing agents (Crookes-Goodson et al., 2008; Dickerson et al., 2008; Peelle et al., 2005; Slocik and Wright, 2003; Slocik et al., 2005).

The deduced sequence of reaction steps involved in the functionalization of VP6 nanotubes is the following: First, the metallic precursor is deposited in the external side of the

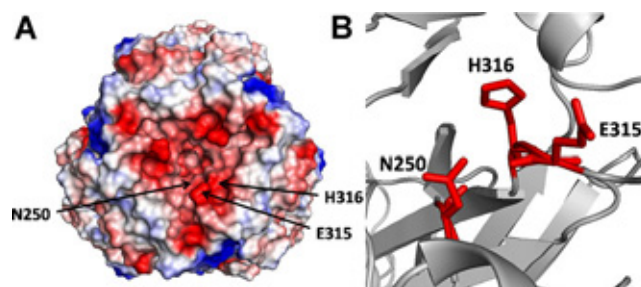


**Figure 7.** VP6 nanotubes functionalized with palladium. **A:** Using 1 mM Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and sodium citrate as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **B:** Using 1 mM Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and sodium borohydride as reducing agent, TEM 250,000 $\times$ . **C:** Size distribution of palladium nanoparticles shown in panel B as obtained by image analysis with ImageJ 1.37v, NIH. **D:** EDS. **E:** HRTEM of Pd nanoparticles attached to VP6 nanotubes. **F:** FFT of selected area in (E). **G:** Detail in (E) [Color figure can be seen in the online version of this article, available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)].



**Figure 8.** Glucose conversion to gluconic acid catalyzed by nanotubes functionalized with: **(A)** Pt and **(B)** Pd. Open squares, unfunctionalized VP6 nanotubes; open diamonds, suspended nanoparticles; closed circles, functionalized nanotubes.

tube through electrostatic interactions between the metal precursor and the side chains of N250, E315, and H316 polar amino acids in the trimer. In this step a continuous, thin film is formed around the nanotubes (Figs. 3A, 5A, and 6A). In the second step, metallic ions are reduced by the reducing agent and nucleation sites form along the external wall of



**Figure 9.** Top view of surface modeling of the VP6 trimer. **A:** Electrostatic properties are represented with red and blue for negative and positive potentials, respectively. Arrows indicate the location of amino acids possibly implicated in metal ion binding: asparagine (N250), glutamic acid (E315), and histidine (H316) at the external surface of VP6 nanotubes. **B:** Amplification of the proposed metal-binding region. Modeling made with PyMOL 1.1 DeLanoScientific LCC.

**Table I.** Functionalized nanobiomaterials synthesized with VP6 nanotubes.

| Metal     | Reducing agent    | Tube diameter | Characteristics of functionalized nanobiomaterials   |
|-----------|-------------------|---------------|--|
| Silver    | Citrate           | 45 nm         | Continuous film  |
|           | NaBH <sub>4</sub> | 45 nm         | Discrete nanoparticles of 3–9 nm diameter (0.5 mM AgNO <sub>3</sub> ) or complete coverage with metal clusters. Diameter of functionalized tube ~80 nm (1 mM AgNO <sub>3</sub> ) |
| Gold      | Citrate           | 75 nm         | Continuous film  |
|           | NaBH <sub>4</sub> | 45 nm         | Discrete metal nanoparticles of 6–11 nm diameter   |
| Platinum  | Citrate           | 45 nm         | Continuous film  |
|           | NaBH <sub>4</sub> | 75 nm         | Discrete nanoparticles of 3–5 nm diameter  |
| Palladium | Citrate           | 45 nm         | Continuous film  |
|           | NaBH <sub>4</sub> | 45 nm         | Discrete nanoparticles of 2–4 nm diameter  |

the nanotubes. In the third step, additional reduction of metal ions occurs and metallic nanoparticles grow at the nucleation sites. In the case of silver, a fourth step results in the coalescence of nanoparticles and complete coverage of VP6 nanotubes with a relatively thick metal coating. All such reactions did not change the structure of the VP6 nanotubes, as the proposed binding residues are not involved in inter or intratrimer contacts (Charpilienne et al., 2002). The three metal-binding sites that are in close proximity in the VP6 trimer (7.9 Å) have the ability to further increase metal affinity (Peelle et al., 2005). This explains why the various transition metals tested here, each with different charges and characteristics, were able to efficiently bind to VP6 nanotubes. Furthermore, it indicates that other transition metals could also efficiently bind to VP6 nanotubes.

## Conclusions

A new biotechnological approach to produce novel nanometric materials based on recombinant protein assemblies is presented here. Recombinant VP6 nanotubes, in contrast to other viral scaffolds used until now in nanotechnological applications, are longer, hollow, lack nucleic acids, can self-assemble *in vitro*, and have a dynamic multifunctional structure with high affinity to metal deposition for *in situ* synthesis of nanoparticles. By manipulating the concentration of ionic metal precursor, reaction time, and type of reducing agent (mild or strong), it was possible to obtain different functionalization patterns, summarized in Table I. It was possible to obtain either a very fine continuous coating on the outer surface of VP6 nanotubes, a coating with segregated metal nanoparticles, or a complete coverage with a relatively thick metallic layer.

In comparison with traditional nanotechnology processes, functionalization of VP6 did not require harsh reaction conditions, as reactions occurred in short times (4–9 h) in aqueous media at room temperature with few by-products. An important advantage of the nanotubes used here is that VP6 can be recombinantly produced, which allows the fast and easy production of large amounts of protein with a high purity, avoiding the presence of nucleic acids or other materials that can interfere in certain applications. Therefore, no handling of viable viruses is

involved, eliminating the safety concerns of using complete virus as scaffolds. Altogether, the processes described here constitute a safe and environmental friendly platform for nanomaterial synthesis.

In all conditions tested, VP6 nanotubes remained assembled and retained their original length (in the range of 1–3 μm). VP6 is a versatile polymorphic protein that reversibly changes its shape as a consequence of its protonation state. Accordingly, nanotube diameter changed in some functionalization reactions as pH decreased and ionic strength increased in the reaction environment. This allowed the production of nanotubes with various diameters and several micrometers in length. Functionalization resulted in high-quality (monodisperse metallic deposits) homogeneous materials. The new multifunctional materials obtained with recombinant VP6 have properties with novel potential applications in many diverse fields, including medical, pharmaceutical, materials, and electronic nanodevices, among others, in applications such as catalysis, drug delivery, diagnostics, electronics, optics, and magnetics.

This work was financially supported by CONACyT-Morelos (MOR-2004-C02-058), CONACyT-Salud (2007-C01-69911), and PAPIIT UNAM (206407 and 224409). G.P.V. was supported by CONACyT 171180. Technical support was provided by Electron Microscopy Unit (IBT-UNAM), A.R. Pastor, G. Zavala, and V. Hernández. Helpful discussions with Drs. R. Sánchez, J.A. Mena, R. Zanella, and R. Redón and experimental assistance in HR-TEM by Dr. A. Medina from IIM, U. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo are also acknowledged.

## References

- Acres GJK, Budd AER. 1971. Catalytic oxidation of glucose. US Patent 3,607,922.
- Affranchino JL, Gonzalez SA. 1997. Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6. *J Gen Virol* 78:1949–1955.
- Ascencio JA, Gutiérrez-Wing C, Espinosa ME, Marín M, Tehuacanero S, Zorrilla C, José-Yacamán M. 1998. Structure determination of small particles by HRTEM imaging: Theory and experiment. *Surf Sci* 396: 349–368.
- Burt JL, Gutierrez-Wing C, Miki-Yoshida M, Jose-Yacamán M. 2004. Noble-metal nanoparticles directly conjugated to globular proteins. *Langmuir* 20:11778–11783.
- Charpilienne A, Lepault J, Rey F, Cohen J. 2002. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol* 76:7822–7831.



- Chen XM, Cai ZM, Lin ZJ, Jia TT, Liu HZ, Jiang YQ, Chen Z. 2009. A novel non-enzymatic ECL sensor for glucose using palladium nanoparticles supported on functional carbon nanotubes. *Biosens Bioelectron* 24:3475–3480.
- Cölfen H, Mann S. 2003. Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. *Angew Chem Int Ed* 42:2350–2365.
- Crawford SE, Labbé M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* 68:5945–5952.
- Crookes-Goodson WJ, Slocik JM, Naik RR. 2008. Bio-directed synthesis and assembly of nanomaterials. *Chem Soc Rev* 37:2403–2412.
- Dickerson MB, Sandhage KH, Naik RR. 2008. Protein and peptide-directed synthesis of inorganic materials. *Chem Rev* 108:4935–4978.
- Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. 2004. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32:W665–W667.
- Douglas T, Young M. 2006. Viruses: Making friends with old foes. *Science* 312:873–875.
- Dujardin E, Peet C, Stubbs G, Culver JN, Mann S. 2003. Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates. *Nano Lett* 3:413–417.
- España R, Ascencio JA, Rosas G, Sánchez Ramírez JF, Pal U, Perez R. 2005. Structure, stability and catalytic activity of chemically synthesized Pt, Au, and Au-Pt nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 5:2133–2137.
- Fischlechner M, Donath E. 2007. Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew Chem Int Ed* 46:3184–3191.
- Gazit E. 2007. Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires. *FEBS J* 274:317–322.
- Gomis-Rüth FX. 2003. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol* 24:157–202.
- Gordon JC, Myers JB, Folta T, Shoja V, Heath LS, Onufriev A. 2005. H<sup>+</sup>: A server for estimating pK<sub>a</sub>s and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res* 33:W368–W371.
- Hooper NM. 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* 354:1–6.
- José-Yacamán M, Ascencio JA, Lui HB, Gardea-Torresdey J. 2001a. Structure, shape and stability of nanometric sized particles. *J Vaccum Sci Technol B* 19:1091–1103.
- José-Yacamán M, Marín-Almanzo M, Ascencio JA. 2001b. High resolution TEM studies on palladium nanoparticles. *J Mol Cat A* 173:61–74.
- Khalil AS, Ferrer JM, Brau RR, Kottmann ST, Noren CJ, Lang MJ, Belcher AM. 2007. Single M13 bacteriophage tethering and stretching. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4892–4897.
- Knez M, Sumser M, Bittner AM, Wege C, Jeske H, Martin TP, Kern K. 2004. Spatially selective nucleation of metal clusters on the tobacco mosaic virus. *Adv Funct Mater* 14:116–124.
- Lee SK, Yun DS, Belcher AM. 2006. Cobalt ion mediated self-assembly of genetically engineered bacteriophage for biomimetic Co-Pt hybrid material. *Biomacromolecules* 7:14–17.
- Lepault J, Patitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA. 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO J* 20:1498–1507.
- Lombardi A, Summa CM, Geremia S, Randaccio L, Pavone V, DeGrado WF. 2000. Retrostructural analysis of metalloproteins: Application to the design of a minimal model for diiron proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6298–6305.
- Mao C, Solis DJ, Reiss BD, Kottmann ST, Sweeney RY, Hayhurst A, Georgiou G, Iverson B, Belcher AM. 2004. Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. *Science* 303:213–217.
- Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV, Cohen J, Rey FA. 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion. *EMBO J* 20:1485–1497.
- Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. 2005. Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *J Chromatogr B* 824:267–276.
- Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. 2006. Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol* 122:443–452.
- Nam KT, Kim DW, Yoo PJ, Chiang CY, Meethong N, Hammond PT, Chiang YM, Belcher AM. 2006. Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science* 312:885–888.
- Nam KT, Wartena R, Yoo PJ, Liao FW, Lee YJ, Chiang YM, Hammond PT, Belcher AM. 2008. Stamped microbattery electrodes based on self-assembled M13 viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17227–17231.
- Peelle BR, Krauland EM, Wittrup KD, Belcher AM. 2005. Design criteria for engineering inorganic material-specific peptides. *Langmuir* 21:6929–6933.
- Petitpas I, Lepault J, Vachette P, Charpilienne A, Mathieu M, Kohli E, Pothier P, Cohen J, Rey FA. 1998. Crystallization and preliminary X-ray analysis of rotavirus protein VP6. *J Virol* 72:7615–7619.
- Ready KF, Sabara M. 1987. In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein. *Virology* 157:189–198.
- Shenton W, Douglas T, Young M, Stubbs G, Mann S. 1999. Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. *Adv Mater* 11:253–256.
- Slocik JM, Wright DW. 2003. Biomimetic mineralization of noble metal nanoclusters. *Biomacromolecules* 4:1135–1141.
- Slocik JM, Naik RR, Stone MO, Wright DW. 2005. Viral templates for gold nanoparticle synthesis. *J Mater Chem* 15:749–753.
- Sweeney RY, Park EYP, Iverson BL, Georgiou G. 2006. Assembly of multimeric phage nanostructures through leucine zipper interactions. *Biotechnol Bioeng* 95:539–545.
- Tavera-Davila L, Liu HB, Herrera-Becerra R, Canizal G, Balcazar M, Ascencio JA. 2009. Analysis of Ag nanoparticles synthesized by bio-reduction. *J Nanosci Nanotechnol* 9:1785–1791.
- Tseng RJ, Tsai C, Ma L, Ouyang J, Ozkan CS, Yang Y. 2006. Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 1:72–77.
- Willett RL, Baldwin KW, West KW, Pfeiffer LN. 2005. Differential adhesion of amino acids to inorganic surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7817–7822.
- Yang CC, Wan CC, Lee CL. 2004. Palladium nanoparticles. In: Nalwa HS, editor. *Encyclopedia of nanosciences and nanotechnology*. Valencia: ASP, pp. 397–413.
- Yoo PJ, Nam KT, Belcher AM, Hammond PT. 2008. Solvent-assisted patterning of polyelectrolyte multilayers and selective deposition of virus assemblies. *Nano Lett* 8:1081–1089.
- Zhang X, Settembre E, Xu C, Dormitzer PR, Bellamy R, Harrison SC, Grigorieff N. 2008. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1867–1872.

# Scanning Tunneling Microscopy of Rotavirus VP6 Protein Self-Assembled into Nanotubes and Nanospheres

Andrés Rodríguez-Galván<sup>1</sup>, Alejandro Heredia<sup>1,2</sup>, Germán Plascencia-Villa<sup>3</sup>,  
 Octavio T. Ramírez<sup>3</sup>, Laura A. Palomares<sup>3</sup>, and Vladimir A. Basiuk<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, C.U., 04510 México, D. F., Mexico*

<sup>2</sup>*Department of Ceramics and Glass Engineering and Center for Research in Ceramic and Composite Materias (CICECO), University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal*

<sup>3</sup>*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal. 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico*

Scanning tunneling microscopy (STM) is a powerful tool for imaging the surfaces and morphologies of biological samples, capable of providing detailed structural information on the molecular, submolecular and atomic scale. In the present work, we employed STM technique to study the morphology of self-assembled VP6 protein at the surface of highly oriented pyrolytic graphite (HOPG), and compared their STM images to those obtained by transmission electron microscopy (TEM). VP6, composed of trimer structural units, exhibits a high performance in its self-assembly, displaying two types of nanostructures, namely nanotubes and nanospheres. High-resolution STM images of nanotubes, nanospheres and their building block, VP6 trimer, were obtained. STM results provided interesting structural details even under ambient conditions. Some measurements are in agreement with data obtained previously from X-ray diffraction and electron cryomicroscopy analysis. At the same time, differences in the operation principles of STM and TEM techniques, as well as in the environmental conditions to which samples are exposed, give rise to some differences in the structural characteristics obtained.

**Keywords:** Viral Protein, VP6, Self-Assembly, Nanotubes, Nanospheres.

## 1. INTRODUCTION

The ability of biomolecules to spontaneously organize into sophisticated and highly ordered nanostructures is of interest from different points of view.<sup>1,2</sup> One of the most promising approaches in bionanosciences is the incorporation/deposition of biological structures into/onto different inorganic templates, in order to design new bionanomaterials, biosensors and other nanodevices.<sup>3</sup> Although this approach is relatively new, it has a rich history and an active update as a new area of research. Within this area, tubular and spherical nanoassemblies have attracted a constantly growing research interest, due to the fact that they possess inner and outer surfaces potentially suitable for chemical and/or biochemical functionalization.<sup>4</sup> In a few most recent examples,

biomolecules such as DNA, peptides and proteins were employed for the fabrication of novel nanohybrid structures.<sup>5–9</sup> In the case of DNA, some obstacles for the use as a building block were found, in particular, the fact that it is composed of a small number of similar monomers (four mononucleotides) limiting the functionalization with inorganic components.<sup>6</sup> In contrast, proteins have a higher chemical diversity (being built up of 20 amino acids) and furthermore, they also can be isolated relatively easily, structurally characterized and modified through the expression of specific peptide sequences by genetic engineering.<sup>8</sup>

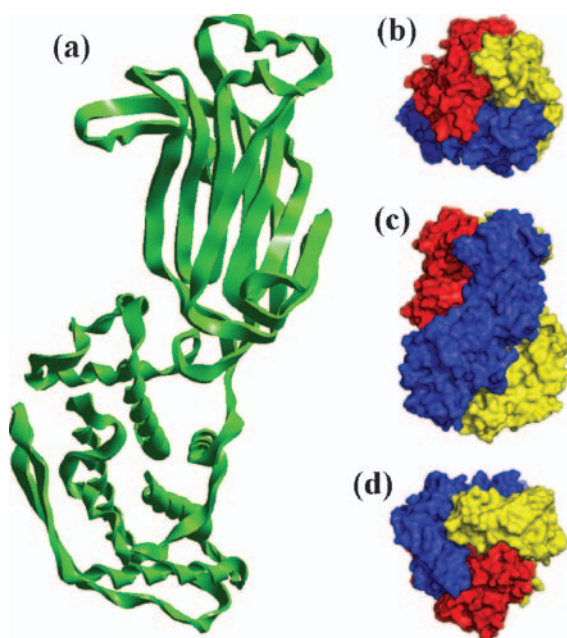
A number of research reports on the fabrication of novel hybrid nanomaterials employ the combination of self-assembled proteins with a variety of inorganic materials.<sup>3,5–7,9</sup> In most cases, the protein building blocks allow for the formation of only one type of nanostructure, which is either tubular or spherical. *In vitro* self-assembly of viral capsid proteins can offer the simultaneous

\*Author to whom correspondence should be addressed.

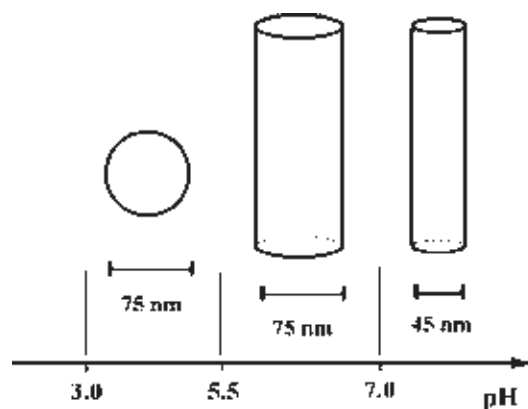
formation of both types of nanostructures. A higher scalability and lower cost of simultaneous production of tubes and spheres from the same building block is especially attractive from the industrial point of view.

Rotaviruses are multishelled, nonenveloped, icosahedrally symmetric viruses, with a capsid composed of three protein layers.<sup>10</sup> The outer layer is composed by VP7 and VP4 proteins, the middle layer by the protein VP6, and the inner layer by the protein VP2. Among them, the rotavirus protein VP6<sup>11</sup> can be considered as one of the best candidates for large-scale production. The crystal structure of VP6 was reported by Mathieu et al.<sup>11a</sup> The ribbon diagram of the VP6 subunit is shown in Figure 1(a). The latter forms a tight trimer (Figs. 1(b–d)) with two distinct domains, namely, a distal  $\beta$ -barrel domain and a proximal  $\alpha$ -helical domain, which interact with the virion's outer and inner layer, respectively.<sup>11a</sup> In the overall fold, the three subunits wrap about a central 3-fold axis, incorporating a central  $Zn^{2+}$  ion located on the 3-fold molecular axis (not shown).

The VP6 trimer exhibits a high performance in its self-assembly, displaying two types of nanostructures, tubes and spheres,<sup>11b</sup> which can be isolated in substantial amounts.<sup>12</sup> The overall assembly process is pH dependent, being inhibited by a low pH (<3.0) and/or by a high concentration (>100 mM) of divalent cations, such as  $Ca^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ . At a low ionic strength and pH higher than 7.0, tubular particles with diameters of  $\sim 45$  nm form; at pH between 5.5 and 7.0, the tubes have diameters



**Fig. 1.** (a) Ribbon diagram of the VP6 subunit. Space-filling model of the VP6 trimer, where the subunits are shown with different colors: (b) top, (c) front and (d) bottom view. The structures were constructed from the refined coordinates of VP6 deposited in the Protein Data Bank (access code **1qhd**).



**Fig. 2.** The effect of pH (at a low ionic strength) on the shape and size of VP6 self-assembled nanostructures.

of  $\sim 75$  nm; whereas in the pH range of 3.0 to 5.5 the protein assembles into spherical structures with diameters of ca. 75 nm (as schematically shown in Fig. 2). The technique of infecting insect cells with a recombinant baculovirus, which contains the VP6 gene, in combination with ion exchange and size exclusion chromatography purification can be employed for obtaining the assembled VP6 with yields over 98%.<sup>12</sup> The VP6 nanospheres and nanotubes were analyzed<sup>11b,12</sup> by transmission electron microscopy (TEM). In this way, useful information was obtained on the three dimensional structure of both types of tubes (of 45 and 75 nm diameter).<sup>11b</sup>

Scanning probe microscopic techniques, in particular scanning tunneling microscopy (STM), proved to be a powerful tool for imaging the surfaces and morphologies of biological samples, capable of providing a detailed structural information on the molecular, submolecular and atomic scale.<sup>13,14</sup> In the present work, we employed STM technique to study the morphology of self-assembled VP6 protein at the surface of highly oriented pyrolytic graphite (HOPG), and compared their STM images to those obtained by TEM. Differences in the principles of operation of the various microscopy techniques as well as in the environmental conditions to which samples are exposed can yield different structural characteristic results.

## 2. EXPERIMENTAL DETAILS

### 2.1. Preparation of VP6

HighFive<sup>®</sup> insect cells (Invitrogen) were cultivated in SF900II-SFM medium (GIBCO-Invitrogen). To produce VP6 nanotubes, cells were infected with a recombinant baculovirus (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) that contains the VP6 gene (strain SA11) at a multiplicity of infection (MOI) of 1 pfu/cell. Culture supernatant was harvested 96 hours post-infection and recombinant VP6 was purified by ultrafiltration (Amicon Bioseparations), ion exchange chromatography

(Q-Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) and size exclusion chromatography (Toyopearl HW65F, TOSOH Biosciences) as described in Plascencia-Villa *et al.*,<sup>12c</sup> obtaining over 98% of assembled VP6. Nanospheres and nanotubes of different diameters were prepared by adjusting pH values.<sup>11b</sup>

## 2.2. Transmission Electron Microscopy

The structure and morphology of self-assembled VP6 was characterized by transmission electron microscopy (a JEM 1011 instrument from JEOL, operated at 80 kV), after staining with 1% uranyl acetate.

## 2.3. STM Sample Preparation and Measurements

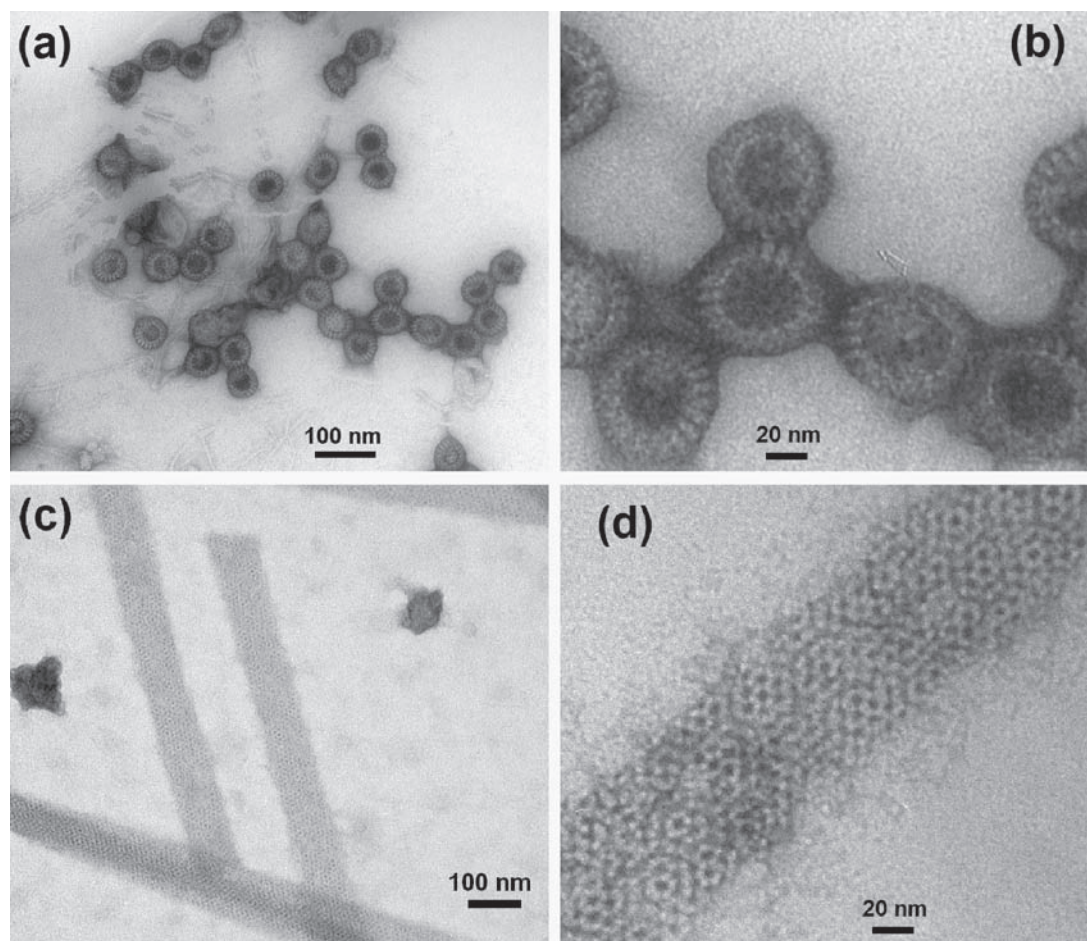
The VP6 tubes or spheres (75 mg/ml concentration) were deposited onto HOPG supports for STM through deposition of the solution by drop casting or spin coating. As expected, the drop casting method covered the surface with an excessive amount of aggregated protein, complicating the imaging of well-defined assemblies. In contrast, spin coating was found to be the most suitable deposition

method, providing good quality images of isolated tubes and spheres of VP6.

STM imaging was performed on a JSPM-5200 instrument from JEOL (Japan) in constant current mode at room temperature in open air, using freshly cut Pt-Ir wire tips. The conditions of voltage ( $V_s$ ) and current ( $I_t$ ) were optimized for each particular sample. The WinSPM software by JEOL and the Nanotec Electronica WSxM<sup>®</sup> Scanning Probe Microscopy software<sup>15</sup> was used for the cross section analysis.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The morphology of purified VP6 nanospheres and nanotubes were characterized by TEM. Their representative TEM images are shown in Figure 3 at different magnifications. VP6 nanospheres were empty icosahedral particles with a diameter of ca. 70 nm. The arrangement of VP6 trimers can be seen in the exterior of the particle. VP6 nanotubes had a diameter of ca. 75 nm, organized arrangements of VP6 trimers can be observed in the tube surface. It should be noted that these VP6 assemblies lack the inner structural protein VP2. One should also point to an



**Fig. 3.** Representative TEM images of VP6 nanospheres (a, b) and nanotubes of 75 nm diameter (c, d) at different magnifications.



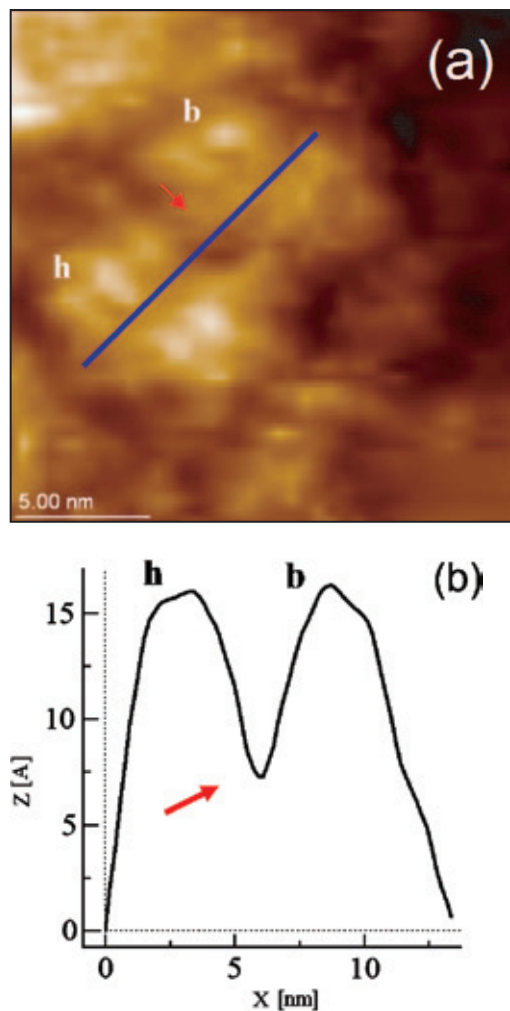
interesting difference between the two nanoassemblies: while VP6 nanospheres are very well shaped with contrasting edges, nanotubes always exhibit somewhat diffuse edges. This is especially clearly seen in Figures 3(b, d), and might imply some difficulties for STM determination of the VP6 nanotube diameter.

STM technique detected a variety of possible VP6 morphologies including both nanospheres and nanotubes, as well as irregularly shaped aggregates formed on HOPG surface. These aggregates can be a result of disassembly of VP6 nanotubes, as we have observed in TEM images (data not shown). According to the results of X-ray crystallographic structure determination,<sup>11a</sup> the building block for nanoassemblies is a VP6 trimer (Fig. 1) with a length of about 9.5 nm, a triangular base with a cross-section of ca. 6.0 nm and a head with a roughly hexagonal cross-section of ca. 4.5 nm. Also, there is a cavity in the center of the trimer. TEM technique cannot resolve either of the morphological details mentioned above, whereas STM is capable of providing more information. In particular, the image shown in Figure 4(a) is consistent with the VP6 trimer morphology (or an assembly of two trimers). A typical unit exhibited a width of about 9 nm and a height of ca. 1.6 nm for its base, 8-nm width and ca. 1.0 nm height for its head (the base and head are shown in Fig. 4 as b and h, respectively); the length estimate gave about 12 nm. Thus, the dimensions found from STM measurements are slightly larger as compared to those from the X-ray structure determination.<sup>11a</sup> Nevertheless these discrepancies can be explained by STM tip convolution as well as by hydration of the protein molecules. The cavity manifested itself as a hollow in the center of the trimer, marked with the red arrow in Figure 4.

We first studied by STM VP6 nanotubes, which is the most common morphology of VP6 protein. The tubular structures exhibited an apparent width of 40–65 nm, a non-uniform height varying between 5 and 35 nm, and a length of hundreds of nanometers to a few micrometers. This variable height does not coincide with any of the measurements previously reported for VP6 tubes. It is possible that sample treatment distorted the tubes. Straight isolated, non-aggregated tubes were mostly found, such as those shown in Figure 5; although in a few cases we also observed bundles of tubular structures. On one hand, VP6 tubes have a good affinity to HOPG surface, that is, the physisorption is a generally favorable process, which generates well dispersed nanotubes. On the other hand, the physisorption can be concluded to be relatively weak, for two reasons:

- (i) it preserves the tubular structure of viral capsid;<sup>16</sup> and
- (ii) we observed that the tubes were relatively easily displaced by the STM tip during scanning.

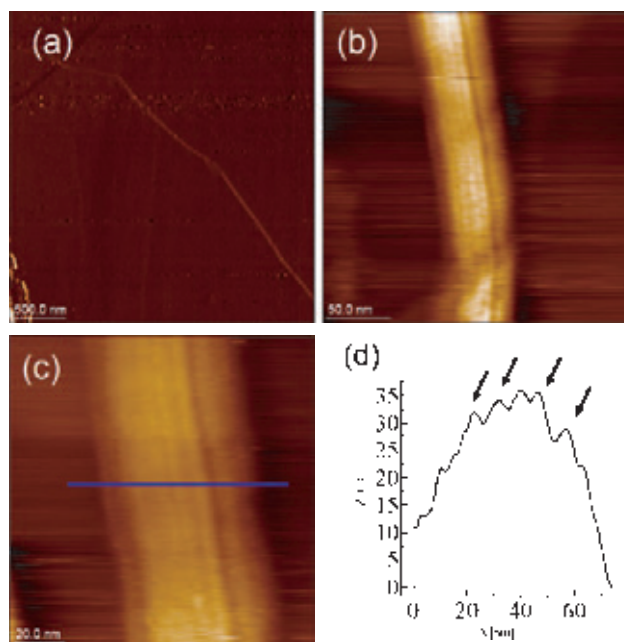
Figure 5(c) shows an STM image of a typical isolated tube. Its estimated width is about 65 nm, whereas its apparent height obtained from the cross section analysis



**Fig. 4.** (a) STM image of protein VP6 trimer ( $19.1 \times 19.1$  nm scan size; sample bias voltage  $V_s = 0.801$  V; tunneling current  $I_t = 1.23$  nA). (b) Cross-section view of VP6 trimer along the blue line in (a). The red arrow indicates the cavity.

(Fig. 5(d)) is ca. 35 nm. The width is generally consistent with the one obtained from TEM imaging, being closer to 75 nm diameter. It is possible that the discrepancy (more likely, 10 nm with respect to the 75 nm diameter of wider tubes; less likely, 20 nm with respect to the 45 nm diameter of narrower tubes) is a direct consequence of the diffuse nanotube edges observed by TEM (Fig. 3(d)), which introduce a significant uncertainty in the width determination by STM. With respect to the height of 35 nm, it is underestimated even as compared to the smallest TEM value of 45 nm. This phenomenon can probably be attributed to poor conductive properties of the protein sample.<sup>17</sup>

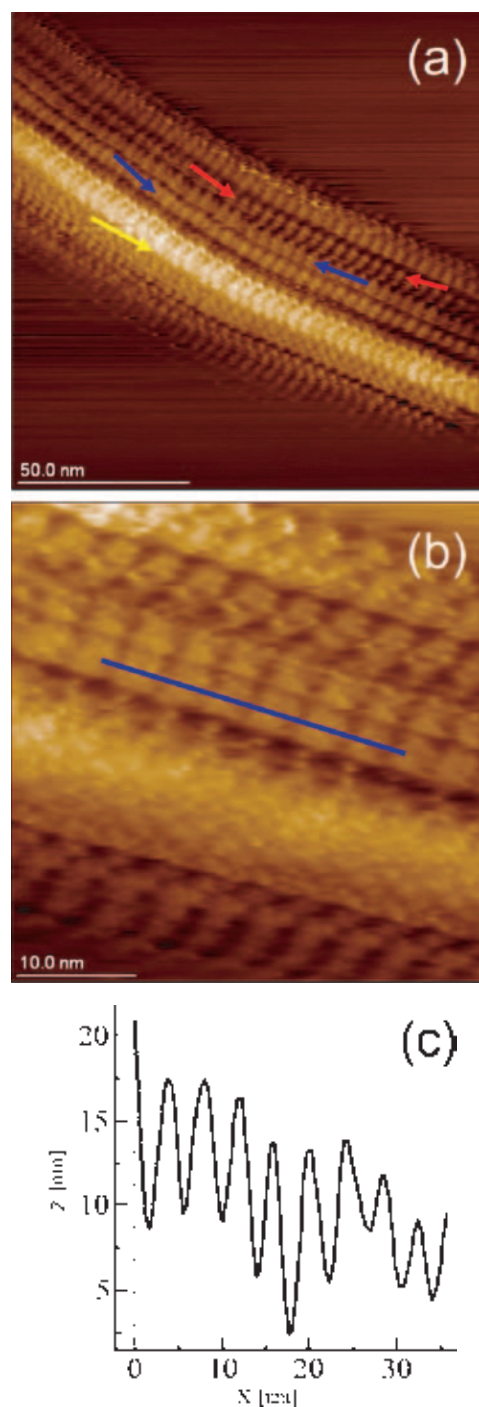
Further analysis of structural details of these individual tubes revealed a longitudinal groove pattern, which is clearly seen in Figures 5(b, c). Interestingly, the cross section analysis in perpendicular direction to the tube axis (Fig. 5(d)) found a good correlation of the pattern periodicity (arrows in Fig. 5(d)) with the width of the head of



**Fig. 5.** STM images of VP6 nanotubes: (a) a few  $\mu\text{m}$ -long tube with three relatively straight sections ( $2.86 \times 2.86 \mu\text{m}$  scan size; sample bias voltage  $V_s = 1.37 \text{ V}$ ; tunneling current  $I_t = 1.34 \text{ nA}$ ); (b, c) a straight section of nanotube at higher magnifications ( $235.9 \times 235.9 \text{ nm}$  and  $119.9 \times 119.9 \text{ nm}$  scan size, respectively;  $V_s = 0.271 \text{ V}$ ;  $I_t = 2.08 \text{ nA}$ ). (d) Cross-section view of the tube shown in (c) along the blue line.

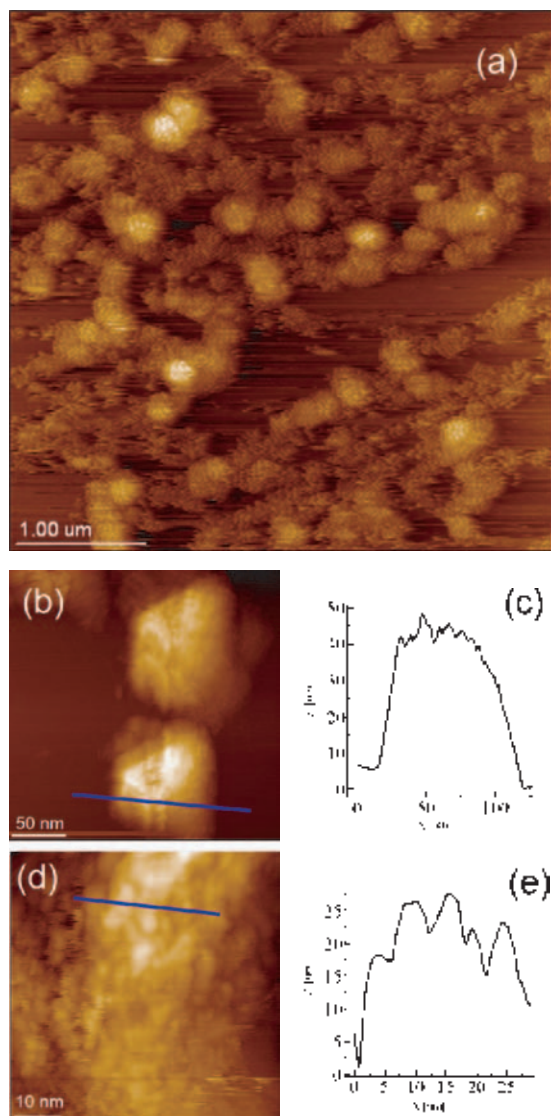
VP6 trimers (that is, ca.  $4.5 \text{ nm}$ ), which protrude toward the exterior of nanotube.<sup>11</sup>

STM is capable of providing even higher-resolution images, in which not only the longitudinal pattern, but also a transversal fine structure can be characterized. Figure 6 shows examples of such high-resolution images obtained for a VP6 nanotube of ca.  $65 \text{ nm}$  diameter. As in the previous case (Figs. 5(b, c)), the longitudinal groove pattern is clearly present, and the trimers can be easily observed. The transversal pattern is also evident here, though the longitudinal one remains dominant. The boundary between structural elements is generally clear throughout the images, although the fine structure is not equally resolved for different sites of the nanotube. We can discard an effect attributable to structural deformation or tip-sample interaction, because no remnants of disrupted parts of the sample were detected, nor distortion of the image was observed.<sup>18,19a</sup> The phenomenon of spontaneous contrast inversion<sup>19</sup> can be invoked; the red and blue arrows in Figure 6(a) point to the negative and positive contrast parts, respectively, and the yellow arrow indicates the region of high contrast. The highest-resolution image in Figure 6(b) helps to estimate the size of each resolved structural unit to be about  $5.0 \text{ nm}$  (see also the cross section in Fig. 6(c)), which is in a good agreement with the estimate of  $4.5 \text{ nm}$  from Figures 5(b–d). In both STM images (Figs. 6(a, b)) one can appreciate a helical arrangement, which is a typical feature of VP6 nanotubes.<sup>11b</sup> At the same time, the quasi-hexagonal lattice of VP6 trimers cannot be



**Fig. 6.** (a, b) High-resolution STM images showing the arrangement of VP6 trimers in nanotube, and (c) cross-section profile of the tube shown in (b) along the blue line. STM parameters: (a)  $139.7 \times 139.7 \text{ nm}$  scan size, sample bias voltage  $V_s = 0.223 \text{ V}$ , tunneling current  $I_t = 1.22 \text{ nA}$ ; (b)  $40.1 \times 40.1 \text{ nm}$  scan size,  $V_s = 0.183 \text{ V}$ ,  $I_t = 1.06 \text{ nA}$ .

observed, apparently because of imperfections of the STM tip employed together with the thermal drift under ambient temperature in our measurements. Furthermore, one has to remember that the 3D structures reported elsewhere<sup>11</sup> were determined from electron cryomicroscopy analysis, which



**Fig. 7.** STM images for VP6 nanospheres. (a) Spheres of ca. 200 nm diameter ( $4.17 \times 4.17 \mu\text{m}$  scan size; sample bias voltage  $V_s = -1.062$  V; tunneling current  $I_t = 0.094$  nA); (b) spheres of ca. 100 nm diameter ( $250.8 \times 250.8$  nm scan size;  $V_s = 0.552$  V;  $I_t = 1.00$  nA); (c) cross-section profile of the upper sphere in (b) along the blue line; (d) high-resolution image of a single nanosphere ( $56.8 \times 56.8$  nm scan size,  $V_s = 0.522$  V,  $I_t = 1.00$  nA); (e) cross-section view of the sphere shown in (d) along the blue line.

averages the structure of a large number of molecules in a crystal (greatly minimizes flattening, thereby better preserving the structure of objects) at high relative humidity. On the contrary, the VP6 nanotubes in the present study are single nanoassemblies, analyzed under ambient conditions and low relative humidity. In addition, the samples were adsorbed on a highly hydrophobic surface, which is likely to induce a notable structural deformation<sup>20</sup> onto the hollow tubes. Thus, the STM conditions are very different as compared to the cryomicroscopy environment, under which the VP6 nanotubes were originally characterized.

Finally, the second, spherical type of VP6 nanoassemblies was studied. As shown in Figure 7, we observed spherical structures of variable sizes (diameters between 100 and 500 nm), being the most typical nanostructures (Fig. 7(a)) of a diameter of about 200 nm and a height of about 50 nm. Such nanostructures were found along with smaller particles, which apparently are partially assembled spheres and other VP6 aggregates. Another common dimensions of the spherical nanostructures are ca. 100 nm in diameter and 45 nm in height (Figs. 7(b, d)), with their rugged texture resembling the external surface morphology of Vaccinia virus as imaged by atomic force microscopy.<sup>18</sup> As a whole, the VP6 spherical nanostructures were observed as particles of heterogeneous shape and size, without exhibiting a clear surface pattern, as it is seen from the cross section profile in Figures 7(c, e). From the latter cross section analysis, the size of their structural elements was estimated to be around 5 nm, which is in good agreement with the crystal structure data for VP6 protein.<sup>11a</sup> In addition, the presence of structural defects is obvious in the high-resolution images of nanospheres.

The lack of structural order on the surface of VP6 spherical structures can be explained by the fact that VP6 spheres are labile particles assembled through relatively weak protein–protein interactions,<sup>10</sup> and, on the other hand, it is well known that the structure (conformation) of proteins can be considerably influenced by the adsorption on hydrophobic surfaces.<sup>20</sup> Therefore, it is possible that the VP6 collapsed into disc-like assemblies, rather than remained as well-shaped spheres, on the hydrophobic surface of HOPG.

#### 4. CONCLUSIONS

In the present study, we reported the characterization of nanotubes and nanospheres assembled from VP6 viral protein using scanning tunneling microscopy. High-resolution STM images of nanotubes, nanospheres and their building block, VP6 protein trimer, were obtained. Our results show that STM measurements provided structural details even under ambient conditions. Some measurements are in agreement with data obtained previously from X-ray diffraction and electron cryomicroscopy analysis. Furthermore, it is possible to easily induce changes in the physico-chemical environment resulting in structural changes at the nanoscale. We expect that the results reported open new perspectives for STM characterization of self-assemblies of proteins and other organic molecules. As a possible direction for future work, we envision the application of the VP6 nanoassemblies as templates for the design of new metal/protein nanohybrids.

**Acknowledgments:** Financial support from the National Autonomous University of Mexico (grants DGAPA-IN100107 and IN-224409) and from the



National Council of Science and Technology of Mexico (grants CONACYT-U48863-R and CONACYT-Morelos MOR-2004-c02-058) is greatly appreciated. The authors thank Drs. A. Lecona and H. Lanz (INSP, Mexico) for providing access to the transmission electron microscope. Andrés Rodríguez-Galván and Germán Plascencia-Villa are grateful to CONACYT for their fellowships.

## References and Notes

1. E. D. Levy, E. B. Erba, C. V. Robinson, and S. A. Teichmann, *Nature* 453, 1262 (2008).
2. (a) K. Van Workum and J. F. Douglas, *Macromol. Symp.* 227, 1 (2005); (b) K. Van Workum and J. F. Douglas, *Phys. Rev. E* 73, 031502 (2006); (c) R. M. Pidaparti, K. Murugesan, and H. Yokota, *J. Comput. Theor. Nanosci.* 3, 643 (2006); (d) Y. Zhou, *Recent Patents Nanotechnol.* 1, 21 (2007).
3. (a) H. S. Nalwa (ed.), *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA (2008), Vol. 2; (b) D. Cui, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1298 (2007); (c) S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* 21, 1171 (2003); (d) N. C. Seeman and A. M. Belcher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6451 (2002).
4. C. R. Martin and P. Kohli, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2, 29 (2003).
5. G. P. Whyburn, Y. Li, and Y. Huang, *J. Mater. Chem.* 18, 3755 (2008).
6. D. Gottlieb, S. A. Morin, S. Jin, and R. T. Raines, *J. Mater. Chem.* 18, 3865 (2008).
7. (a) R. J. Tseng, C. Tsai, L. Ma, J. Ouyang, C. S. Ozkan, and Y. Yang, *Nature Nanotechnol.* 1, 72 (2006); (b) J. C. Zhou, Y. Gao, A. A. Martinez-Molares, X. Jing, D. Yan, J. Lau, T. Hamasaki, C. S. Ozkan, M. Ozkan, E. Hu, and B. Dunn, *Small* 4, 1507 (2008).
8. D. J. Evans, *J. Mater. Chem.* 18, 3746 (2008).
9. S. Behrens, W. Habicht, K. Wagner, and E. Unger, *Adv. Mater.* 18, 284 (2006).
10. S. Libersou, X. Siebert, M. Ouldali, L. F. Estrozi, J. Navaza, A. Charpilienne, P. Garnier, D. Poncet, and J. Lepault, *J. Virol.* 82, 2844 (2008).
11. (a) M. Mathieu, I. Petitpas, J. Navaza, J. Lepault, E. Kohli, P. Pothier, B. V. V. Prasad, J. Cohen, and F. A. Rey, *EMBO J.* 20, 1485 (2001); (b) J. Lepault, I. Petitpas, I. Erk, J. Navaza, D. Bigot, M. Dona, P. Vachette, J. Cohen, and F. A. Rey, *EMBO J.* 20, 1498 (2001).
12. (a) J. A. Mena, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, *J. Biotechnol.* 122, 443 (2006); (b) J. A. Mena, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, *J. Chromatogr. B* 824, 267 (2005); (c) G. Plascencia-Villa, J. A. Mena, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, manuscript in preparation.
13. (a) K. S. Birdi, *Scanning Probe Microscopes: Applications in Science and Technology*, CRC Press, Boca Raton, FL (2003), Chap. 4; (b) C. Bai, *Scanning Tunneling Microscopy and its Applications*, Springer, Berlin (2000), Chap. 8.
14. (a) W. L. Deng, Z. W. Xiao, W. Wang, and A. D. Q. Li, *J. Phys. Chem. B* 111, 6544 (2007); (b) M. Wang, S. Bugarski, and U. Stimming, *Small* 4, 1110 (2008).
15. (a) I. Horcas, R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, and A. M. Baro, *Rev. Sci. Instrum.* 78, 013705 (2007); (b) <http://www.nanotec.es>.
16. M. Knez, M. P. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, D. M. P. Hoffmann, K. Kuhnke, and K. Kern, *Langmuir* 20, 441 (2004).
17. D. Alliata, L. Andolfi, and S. Cannistraro, *Ultramicroscopy* 101, 231 (2004).
18. Y. Kuznetsov, P. D. Gershon, and A. McPherson, *J. Virol.* 82, 7551 (2008).
19. (a) E. Shapir, J. Yi, H. Cohen, A. B. Kotlyar, G. Cuniberti, and D. Porath, *J. Phys. Chem. B* 109, 14270 (2005); (b) S. A. Campbell, J. R. Smith, H. Jungblut, and H. J. Lewerenz, *J. Electroanal. Chem.* 599, 313 (2007).
20. D. T. Kim, H. W. Blanch, and C. J. Radke, *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York (2004), Vol. 4, p. 3041.

Received: 5 November 2008. Revised/Accepted: 20 January 2009.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual

Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional

**WO 2009/157746 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
30 de diciembre de 2009 (30.12.2009)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*B82B 1/00* (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)  
*B82B 3/00* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/MX2008/000080
- (22) Fecha de presentación internacional:  
24 de junio de 2008 (24.06.2008)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** [MX/MX]; 9° Piso de la Torre Rectoría, Ciudad Universitaria, Delegación Coyocacán, México, D.F. C.P. 04510 (MX).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RAMÍREZ REIVICH, Octavio Tonatiuh** [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca CP 62210, Morelos (MX). **PLASCENCIA VILLA, Germán** [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca CP 62210, Morelos (MX). **PALOMARES AGUILERA, Laura Alicia** [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca CP 62210, Morelos (MX). **MENA MÉNDEZ, Yimy Alexander** [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca CP 62210, Morelos (MX). **SANIGIER Blesa, José Manuel** [ES/MX]; Centro de Ciencias, Aplicadas Y Desarrollo Tecnológico, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyocacán, C.P. 04510, Mexico, Distrito Federal (MX).
- (74) Mandatario: **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**; Subdirección Jurídica de Propiedad Intelectual, Edificio "B", 3er. Piso, Zona Cultural, Ciudad Universitaria, Delegación Coyocacán, CEP-04510, México, D.F. (MX).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaraciones según la Regla 4.17:**
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
  - sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))
  - sobre divulgaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad (Regla 4.17(v))
- Publicada:**
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: USE OF VIRAL MULTIMERIC PROTEINS AS TEMPLATES FOR CONSTRUCTION OF NANOBIO MATERIALS

(54) Título: USO DE PROTEÍNAS MULTIMÉRICAS VIRALES COMO TEMPLADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE NANOBIO MATERIALES

(57) Abstract: In the present invention there is described a method for production of nanomaterials and the nanomaterials themselves, comprising recombinant viral multimeric proteins assembled in functionalised macrostructures (in particular nanotubes or nanospheres). Said recombinant viral multimeric proteins are produced in a recombinant manner and functionalised through chemical modifications of the surface thereof with a range of functionalising agents. Methods are described for the production, purification, functionalisation and characterisation of the recombinant viral multimeric proteins. Such nanobiomaterials have uses and applications in fields such as nanosciences, nanomaterials, biotechnology, biomedicine, diagnosis, chemistry, physics, mechanics and optics.

(57) Resumen: En la presente invención se describe un método para la producción de nanomateriales y a los nanomateriales mismos, que comprenden Proteínas Multiméricas Virales Recombinantes ensambladas en macroestructuras (particularmente nanotubos o nanoesferas) funcionalizadas. Estas Proteínas Multiméricas Virales Recombinantes son producidas de forma recombinante, y funcionalizadas mediante modificaciones químicas de su superficie, con una gama de agentes funcionalizantes. Se describen los métodos para la producción, purificación, funcionalización y caracterización de las Proteínas Multiméricas Virales Recombinantes. Estos nanobiomateriales tienen usos y aplicaciones en campos tales como las nanociencias, nanomateriales, biotecnología, biomedicina, diagnóstico, química, física, mecánica y óptica.

WO 2009/157746 A1

## CAPÍTULO 9

# REFERENCIAS

- [1]. Acres GJK, Budd AER. **Catalytic oxidation of glucose**. *US Patent 3,607,922* 1971.
- [2]. Affranchino JL, González SA. **Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6**. *J Gen Virol* 1997, 78: 1949-1955.
- [3]. Arvizo RR, De M, Rotello VM. **Proteins and nanoparticles: covalent and noncovalent conjugates**. In: Markin CA and Niemeyer CM, editors. **Nanobiotechnology II**. Weinheim: Wiley-VCH 2007, 65-78.
- [4]. Behrens S, Rhan K, Habicht W, Böhn KJ, Rösner H, Dinjus E, Unger E. **Nanoscale particle arrays induced by highly ordered protein assemblies**. *Adv Mater* 2002, 14: 1621-1625.
- [5]. Bromley KM, Patil AJ, Perriman AW, Stubbs G, Mann S. **Preparation of high quality nanowires by tobacco mosaic virus templating of gold nanoparticles**. *J Mater Chem* 2008, 18: 4796-4801.
- [6]. Burt JL, Gutiérrez-Wing C, Miki-Yoshida M, José-Yacamán M. **Noble-metal nanoparticles directly conjugated to globular proteins**. *Langmuir* 2004, 20: 11778-11783.
- [7]. Charpilienne A, Lepault J, Rey F, Cohen J. **Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity**. *J Virol* 2002, 76: 7822-7831.
- [8]. Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, Harrison SC, Grigorieff N. **Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM**. *PNAS* 2009, 106: 10644-10648.
- [9]. Chen XM, Cai ZM, Lin ZJ, Jia TT, Liu HZ, Jiang YQ, Chen Z. **A novel non-enzymatic ECL sensor for glucose using palladium nanoparticles supported on functional carbon nanotubes**. *Biosens Bioelectron* 2009, 24: 3475-3480.
- [10]. Chuan YP, Fan YY, Lua L, Middelberg AP. **Quantitative analysis of virus-like particle size and distribution by field-flow fractionation**. *Biotechnol Bioeng* 2008, 99: 1425-1433.
- [11]. Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B, Rey FA. **The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses**.

- Cell* 2005, 120:761-772.
- [12]. Dickerson MB, Sandhage KH, Naik RR. **Protein and peptide-directed synthesis of inorganic materials.** *Chem Rev* 2008, 108: 4935-4978.
- [13]. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. **PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzman electrostatics calculations.** *Nucleic Acids Res* 2004, 32: W665-W667.
- [14]. Douglas T, Young M. **Viruses: making friends with old foes.** *Science* 2006, 312: 873-875.
- [15]. Dujardin E, Mann S. **Synthesis and assembly of nanoparticles and nanostructures using bio-derived templates.** In: Markin CA and Niemeyer CM, editors. **Nanobiotechnology II.** Weinheim: Wiley-VCH 2007, 39-63.
- [16]. Dujardin E, Peet C, Stubbs G, Culver JN, Mann S. **Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates.** *Nano Lett* 2003, 3: 413-417.
- [17]. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Lara HH, José-Yacamán M. **Interaction of silver nanoparticles with HIV-1.** *J Nanobiotechnology* 2005, 3: 6.
- [18]. Erk I, Huet JC, Duarte M, Duquerroy S, Rey F, Cohen J, Lepault J. **A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus.** *J Virol* 2003, 77: 3595-3601.
- [19]. Estes MK, Crawford SE, Penaranda ME, Petrie BL, Burns JW, Chan WK, Ericson B, Smith GE, Summers MD. **Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system.** *J Virol* 1987, 61: 1488-1494.
- [20]. Estes MK, Kapikian AZ. **Rotaviruses.** In: Knipe DM and Howley PM, editors. **Fields Virology**, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins 2007: 1918-1974.
- [21]. Ferrer D, Blom DA, Allard LF, Mejía S, Pérez-Tijerina E, José-Yacamán M. **Atomic structure of three-layer Au/Pd nanoparticles revealed by aberration-corrected scanning transmission electron microscopy.** *J Mater Chem* 2008, 18: 2442-2446.
- [22]. Ferreira PJ, Shao-Horn Y. **Formation mechanism and TEM characterization of Pt single crystal nanoparticles in proton exchange membrane fuel cells.** *Microsc Microanal* 2007, 13: 606-607.
- [23]. Fischlechner M, Donath E. **Viruses as building blocks for materials and devices.** *Angew*

- Chem Int Ed* 2007, 46: 3184-3193.
- [24]. Fultz B, Howe JM. **Indexed powder diffraction patterns.** In: Fultz B, Howe JM, editors **Transmission electron microscopy and diffraction of materials.** 3rd edition. Heidelberg, Germany: Springer 2007, 691-692.
- [25]. Gomis-Rüth FX. **Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases.** *Mol Biotechnol* 2003, 24: 157-202.
- [26]. Gordon JC, Myers JB, Folta T, Shoja V, Heath LS, Onufriev A. **H<sup>+</sup>: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules.** *Nucleic Acids Res* 2005, 33: W368-W371.
- [27]. Guo S, Dong S, Wang E. **Three-dimensional Pt-on-Pd bimetallic nanodendrites supported on graphene nanosheet: facile synthesis and used as an advanced nanoelectrocatalyst for methanol oxidation.** *ACS Nano* 2010, 4: 547-555.
- [28]. Heinz H, Farmer BL, Pandey RB, Slocik JM, Patnaik SS, Pachter R, Naik RR. **Nature of molecular interactions of peptides with gold, palladium, and Pd-Au bimetal surfaces in aqueous solution.** *J Am Chem Soc* 2009, 131: 9704-9714.
- [29]. Hooper NM. **Families of zinc metalloproteases.** *FEBS Lett* 1994, 354: 1-6.
- [30]. Huang Y, Chiang CY, Lee SK, Gao Y, Hu EL, De Yoreo J, Belcher AM. **Programmable assembly of nanoarchitectures using genetically engineered viruses.** *Nano Lett* 2005, 5: 1429-1434.
- [31]. José-Yacamán M, Ascencio JA, Liu HB, Gardea-Torresdey JG. **Structure shape and stability of nanometric sized particles.** *J Vac Sci Technol* 2001, 19: 1091-1103.
- [32]. José Yacamán M, Marín-Almazo M, Ascencio JA. **High resolution TEM studies on palladium nanoparticles.** *J Mol Cat A* 2001, 173: 61-74.
- [33]. Kadlec J, Loureiro S, Abrescia NG, Stuart DI, Jones IM. **The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines.** *Nat Struct Mol Biol* 2008, 15: 1024-1030.
- [34]. Khalil AS, Ferrer JM, Brau RR, Kottmann ST, Noren CJ, Lang MJ, Belcher AM. **Single M13 bacteriophage tethering and stretching.** *PNAS* 2007, 104: 4892-4897.
- [35]. Knez M, Sumser M, Bittner AM, Wege C, Jeske H, Martin TP, Kern K. **Spatially selective nucleation of metal clusters on the tobacco mosaic virus.** *Adv Funct Mater* 2004, 14:



- 116-124.
- [36]. Lee SK, Yun DS, Belcher AM. **Cobalt ion mediated self-assembly of genetically engineered bacteriophage for biomimetic Co-Pt hybrid material.** *Biomacromolecules* 2006, 7:14-17.
- [37]. Lee SW, Mao C, Flynn CE, Belcher AM. **Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses.** *Science* 2002, 296: 892-895.
- [38]. Lee YJ, Yi H, Kim WJ, Kang K, Yun DS, Strano MS, Ceder G, Belcher AM. **Fabricating genetically engineered high-power lithium-ion batteries using multiple virus genes.** *Science* 2009, 324:1051-1055.
- [39]. Lepault J, Patitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA. **Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus.** *EMBO J* 2001, 20: 1498-1507.
- [40]. Li Z, Baker ML, Jiang W, Estes MK, Prasad BV. **Rotavirus architecture at subnanometer resolution.** *J Virol* 2009, 83:1754-1766.
- [41]. Libersou S, Siebert X, Ouldali M, Estrozi LF, Navaza J, Charpilienne A, Garnier P, Poncet D, Lepault J. **Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity.** *J Virol* 2008, 82:2844-2852.
- [42]. Lombardi A, Summa CM, Geremia S, Randaccio L, Pavone V, DeGrado WF. **Retrostructural analysis of metalloproteins: application to the design of a minimal model for diiron proteins.** *PNAS* 2000, 97: 6298-6305.
- [43]. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. **Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application.** *Angew Chem Int Ed* 2007, 46: 1222-1244.
- [44]. Manchester M, Steinmetz NF. **Viruses and nanotechnology.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2009, 327: v-vi.
- [45]. Mann S. **Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions.** *Nat Mater* 2009, 8: 781-792.
- [46]. Mann S, Archibald DD, Didymus JM, Douglas T, Heywood BR, Meldrum FC, Reeves NJ. **Crystallization at inorganic-organic interfaces: biominerals and biomimetic synthesis.** *Science* 1993, 261: 1286-1292.

- [47]. Manocchi AK, Horelik NE, Lee B, Yi H. **Simple, Readily Controllable Palladium Nanoparticle Formation on Surface-Assembled Viral Nanotemplates.** *Langmuir* 2009, en prensa.
- [48]. Mao C, Flynn CE, Hayhurst A, Sweeney R, Qi J, Georgiou G, Iverson B, Belcher AM. **Viral assembly of oriented quantum dot nanowires.** *PNAS* 2003, 100: 6946-6951.
- [49]. Mao C, Solis DJ, Reiss BD, Kottmann ST, Sweeney RY, Hayhurst A, Georgiou G, Iverson B, Belcher AM. **Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires.** *Science* 2004, 303: 213-217.
- [50]. Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV, Cohen J, Rey FA. **Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion.** *EMBO J* 2001, 20: 1485-1497.
- [51]. Mena JA. **Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudopartículas virales en el sistema de células de insecto-baculovirus.** Tesis de Doctorado IBt-UNAM, 2007.
- [52]. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. **Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay.** *Biotechniques* 2003, 34: 260-264.
- [53]. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. **Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography.** *J Chromat B* 2005, 824: 267-276.
- [54]. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. **Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system.** *J Biotechnol* 2006, 122: 443-452.
- [55]. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. **Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles.** *BMC Biotechnol* 2007, 7: 39.
- [56]. Morenweiser R. **Downstream processing of viral vector and vaccines.** *Gene Ther* 2005, 12: S103-S110.
- [57]. Murphy A, Roy P. **Manipulation of the bluetongue virus tubules for immunogen delivery.** *Future Microbiol* 2008, 3: 351-359.
- [58]. Nam KT, Kim DW, Yoo PJ, Chiang CY, Meethong N, Hammond PT, Chiang YM, Belcher AM. **Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery**

- electrodes.** *Science* 2006, 312: 885-888.
- [59]. Nam KT, Lee YJ, Krauland EM, Kottmann ST, Belcher AM. **Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds.** *ACS Nano* 2008, 2: 1480-1486.
- [60]. Nam YS, Shin T, Park H, Magyar AP, Choi K, Fantner G, Nelson KA, Belcher AM. **Virus-templated assembly of porphyrins into light-harvesting nanoantennae.** *J Am Chem Soc* 2010, [Epub ahead of print].
- [61]. Nam KT, Wartena R, Yoo PJ, Liao FW, Lee YJ, Chiang YM, Hammond PT, Belcher AM. **Stamped microbattery electrodes based on self-assembled M13 viruses.** *PNAS* 2008, 105:17227-17231.
- [62]. Nie Z, Petukhova A, Kumacheva E. **Properties and emerging applications of self-assembled structures made from inorganic nanoparticles.** *Nat Nanotech* 2010, 5: 15-25.
- [63]. Okura I. **Nobel metal nanocolloids.** In: Nalwa HS, editor. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.** Valencia: ASPBS 2004: 41-48.
- [64]. Palomares LA, López S, Ramírez OT. **Strategies for manipulation the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells.** *Biotech Bioeng* 2002, 78: 635-644.
- [65]. Palomares LA, Ramírez OT. **Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: the case of rotavirus-like particles.** *Biochem Eng J* 2009, 45: 158-167.
- [66]. Pérez-Luna VH, Aslan K, Betala P. **Colloidal gold.** In: Nalwa HS, editor. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.** Valencia: ASPBS 2004: 27-49.
- [67]. Pedro L, Soares SS, Ferreira GN. **Purification of bionanoparticles.** *Chem Eng Technol* 2008, 31: 815-825.
- [68]. Ready KF, Buko KM, Whippey PW, Alford WP, Bancroft JB. **The structure of tubes of bovine rotavirus nucleocapsid protein (VP6) assembled *in vitro*.** *Virology* 1988, 167:50-55.
- [69]. Ready KF, Sabara M. ***In vitro* assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein.** *Virology* 1987, 157: 189-198.
- [70]. Ready KF, Sabara M, Babiuk LA. ***In vitro* assembly of the outer capsid of bovine rotavirus is calcium-dependent.** *Virology* 1988, 167: 269-273.

- [71]. Rodríguez-Galván A, Heredia A, Plascencia-Villa G, Ramírez OT, Palomares LA, Basiuk VA. **Scanning tunneling microscopy of VP6 viral protein self-assembled into nanotubes and nanospheres.** *J Scann Probe Microsc* 2008, 3: 25-31.
- [72]. Sanghvi AB, Miller KP, Belcher AM, Schmidt CE. **Biomaterials functionalization using a novel peptide that selectively binds to a conducting polymer.** *Nat Mater* 2005, 4: 496-502.
- [73]. Saugar I, Luque D, Oña A, Rodríguez JF, Carrascosa JL, Trus BL, Castón JR. **Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch.** *Structure* 2005, 13:1007-1017.
- [74]. Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. **Viruses and their uses in nanotechnology.** *Drug Dev Res* 2006, 67: 23-41.
- [75]. Slack J, Arif BM. **The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function.** *Adv Virus Res* 2007, 69: 99-165.
- [76]. Slocik JM, Kim SN, Whitehead TA, Clark DS, Naik RR. **Biotemplated metal nanowires using hyperthermophilic protein filaments.** *Small* 2009, 18: 2038-2042.
- [77]. Slocik JM, Naik RR, Stone MO, Wright DW. **Viral templates for gold nanoparticle synthesis.** *J Mater Chem* 2005, 15: 749-753.
- [78]. Slocik JM, Wright DW. **Biomimetic mineralization of noble metal nanoclusters.** *Biomacromolecules* 2003, 4: 1135-1141.
- [79]. Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. **Biological applications of gold nanoparticles.** *Chem Soc Rev* 2008, 37: 1896-1908.
- [80]. Strable E, Finn MG. **Chemical modification of viruses and virus-like particles.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2009, 327: 1-21.
- [81]. Strauss DM, Gorell J, Plancarte M, Blank GS, Chen Q, Yang B. **Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products.** *Biotechnol Bioeng* 2009, 102: 168-175.
- [82]. Strauss DM, Lute S, Tebaykina Z, Frey DD, Ho C, Blank GS, Brorson K, Chen Q, Yang B. **Understanding the mechanism of virus removal by Q sepharose fast flow chromatography during the purification of CHO-cell derived biotherapeutics.** *Biotechnol Bioeng* 2009, 104: 371-380.

- [83]. Sugahara M, Asada Y, Ayama H, Ukawa H, Taka H, Kunishima N. **Heavy-atom Database System: a tool for the preparation of heavy-atom derivatives of protein crystals based on amino-acid sequence and crystallization conditions.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2005, 61: 1302-1305.
- [84]. Sweeney RY, Iverson BL, Georgiou G. **Assembly of multimeric phage nanostructures through leucine zipper interactions.** *Biotechnol Bioeng* 2006, 95: 539-545.
- [85]. Tamerler C, Sarikaya M. **Molecular biomimetics: nanotechnology and bionanotechnology using genetically engineered peptides.** *Phil Trans R Soc A* 2009, 367: 1705-1726.
- [86]. Tan Y, Li Y, Zhu D. **Noble metal nanoparticles.** In: Nalwa HS, editor. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.** Valencia: ASPBS 2004: 9-40.
- [87]. Tavera-Davila L, Liu HB, Herrera-Becerra R, Canizal G, Balcazar M, Ascencio JA. **Analysis of Ag nanoparticles synthesized by bioreduction.** *J Nanosci Nanotechnol* 2008, 8: 1-7.
- [88]. Thilakaraj R, Raghunathan K, Anishetty S, Pennathur G. **In silico identification of putative metal binding motifs.** *Bioinformatics* 2007, 23: 267-271.
- [89]. Tseng RJ, Tsai C, Ma L, Ouyang J, Ozkan CS, Yang Y. **Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles.** *Nat Nanotechnol* 2006, 1: 72-77.
- [90]. Tsukamoto R, Muraoka M, Seki M, Tabata H, Yamashita I. **Synthesis of CoPt and FePt<sub>3</sub> nanowires using the central channel of tobacco mosaic virus as a biotemplate.** *Chem Mater* 2007, 19: 2389-2391.
- [91]. Ueno T. **Functionalization of viral protein assemblies by self-assembly reactions.** *J Mater Chem* 2008, 18: 3741-3745.
- [92]. Vicente T, Peixoto C, Carrondo MJ, Alves PM. **Purification of recombinant baculoviruses for gene therapy using membrane processes.** *Gene Ther* 2009, 16: 766-775.
- [93]. Whaley SR, English DS, Hu EL, Barbara PF, Belcher AM. **Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly.** *Nature* 2000, 405: 665-668.
- [94]. Wiley B, Sun Y, Mayers B, Xia Y. **Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver.** *Chem Eur J* 2005, 11: 454-463.
- [95]. Welte L, Calzolari A, Di Felice R, Zamora F, Gómez-Herrero J. **Highly conductive self-**

- assembled nanoribbons of coordination polymers.** *Nat Nanotechnol* 2010, 5: 110-115.
- [96]. Xing G, DeRose VJ. **Designing metal-peptide models for protein structure and function.** *Curr Opin Chem Biol* 2001, 5: 196-200.
- [97]. Xue B, Chen P, Hong Q, Lin J, Tan KL. **Growth of Pd, Pt, Ag and Au nanoparticles on carbon nanotubes.** *J Mater Chem* 2001, 11, 2378–2381.
- [98]. Yang CC, Wang CC. **Palladium nanoparticles.** In: Nalwa HS, editor. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.** Valencia: ASPBS 2004: 397-413.
- [99]. Yoo PJ, Nam KT, Belcher AM, Hammond PT. **Solvent-assisted patterning of polyelectrolyte multilayers and selective deposition of virus assemblies.** *Nano Lett* 2008, 8: 1081-1089.
- [100]. Yoo PJ, Nam KT, Qi J, Lee SK, Park J, Belcher AM, Hammond PT. **Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces.** *Nat Mater* 2006, 5: 234-240.
- [101]. Zhang S. **Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly.** *Nat Biotech* 2003, 21: 1171-1178.
- [102]. Zhang X, Settembre E, Xu C, Dormitzer PR, Bellamy R, Harrison SC, Grigorieff N. **Near-atomic resolution using cryomicroscopy and single-particle reconstruction.** *PNAS* 2008, 105: 1867-1872.
- [103]. Zhao Y, Thorkelsson K, Mastroianni AJ, Schilling T, Luther JM, Rancatore BJ, Matsunaga K, Jinnai H, Wu Y, Poulsen D, Fréchet JM, Alivisatos AP, Xu T. **Small-molecule-directed nanoparticle assembly towards stimuli-responsive nanocomposites.** *Nat Mater* 2009, 8(12): 979-985.

## CAPÍTULO 10

# PERSPECTIVAS

Existen otros compuestos inorgánicos de interés para la fabricación de dispositivos nanoelectrónicos además de los utilizados en este proyecto. Entre estos destacan el silicio, níquel, cobre, cadmio, fierro y cobalto. Por lo que ya determinada la utilidad de las bioestructuras formadas por las proteínas VP6 y VP2/VP6 como templado, es factible utilizar estos templados biológicos para la síntesis de diferentes nanomateriales con otros precursores inorgánicos.

Se demostró que los tubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas de Pt y Pd poseen capacidad catalítica, queda por realizar un análisis detallado de las propiedades catalíticas de estos materiales híbridos. Tal como evaluar otros sustratos, temperaturas de reacción, concentración de sustratos, para determinar las constantes catalíticas de las proteínas de rotavirus conjugadas con nanopartículas metálicas. También se demostró que los tubos de VP6 funcionalizados son materiales conductores, por lo que esta área queda abierta para realizar una caracterización de sus posibles usos y aplicaciones como dispositivos bioelectrónicos y como sensores.

Además de las técnicas utilizadas en este proyecto puede realizarse otro tipo de caracterización. Entre otros, por medio de espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia Raman e infrarroja, además de espectroscopia por rayos X. Esto para identificar los posibles mecanismos de conjugación de las nanopartículas con el templado proteico. Continuando con la caracterización por microscopia, queda pendiente realizar la microscopia de fuerza atómica (AFM) y de escaneo electrónico (SEM) para tener un panorama global de la morfología de los tubos de VP6 funcionalizados.

La proteína VP6 mostró afinidad intrínseca por distintos precursores metálicos, formando nanopartículas o capas electrodensas localizadas hacia el exterior de los tubos y partículas virales esféricas. No fue necesario realizar modificaciones genéticas para lograr la

funcionalización, pero para lograr conjugar ciertos precursores sería necesario hacer ingeniería de proteínas para incluir residuos o regiones que tengan gran afinidad. Estos podrían localizarse hacia el exterior o interior de las macroestructuras formadas por VP6 para lograr sintetizar otro tipo de nanomateriales (nanoalambres y nanopartículas encapsuladas).

La reacción de funcionalización utilizada fue por reducción química en medio acuoso, siguiendo con este método de síntesis podrán utilizarse otros reductores y precursores metálicos para determinar si es posible sintetizar nanomateriales integrados con características novedosas. Además, pueden probarse otros métodos de funcionalización, por ejemplo: por radiación UV, sonicación, electroquímicos y autoreducción, ampliando la multifuncionalidad demostrada de las proteínas de rotavirus como templado para sintetizar nanobiomateriales.