



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES
BIOCATALÍTICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

LORENA PAULINA SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Tutor

DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT (Instituto de Biotecnología-UNAM)

Miembros del Comité Tutor

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera (Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre (Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM)

MÉXICO, D. F. mayo, 2014



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.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
1. Partículas pseudovirales.....	8
2. Partículas pseudovirales utilizadas en el proyecto	11
2.1. Rotavirus: Capa de VP6	11
2.2. Poliomavirus murino: VP1	13
2.3. CCMV	15
2.4. Bacteriófago P22	17
3. Citocromos P450	18
3.1. CYPBM3 mutante “21B3”	20
4. Terapia de activación de profármacos vía enzimas	22
5. Encapsulación de enzimas dentro de partículas pseudovirales.....	23
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
Objetivos particulares	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
PROTEINAS VIRALES	28
PLÁSMIDOS (Anexo 1)	28
1. Expresión y purificación del dominio hemo del CYPBM3 “21B3”	28
2. Determinación de la concentración de CYP450 por unión con monóxido de carbono	30
3. Expresión y purificación de VP1	30
4. Transformación de sustratos alternos por el CYPBM3 “21B3”	32
4.1. Transformación de alcoiresorufinas.....	32
4.2. Transformación de fenoles.....	32
5. Transformación de profármacos por el CYPBM3 “21B3”	33
5.1. Determinación de constantes cinéticas para el tamoxifen y el resveratrol.....	34
5.2. Identificación de los productos de transformación para los profármacos tamoxifen y resveratrol	35
6. Transformación de plaguicidas por el CYPBM3 “21B3”	36
6.1. Determinación de constantes cinéticas e identificación de productos para el diclorofen, linuron, paratión y clorpirifos.....	36
7. Incremento de cargas positivas en la superficie del CYPBM3 “21B3”	37

8.	Determinación in silico de la superficie electrostática del CYPBM3 “21B3” y las cápsides virales	37
9.	Ensayos de encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsides derivadas de VP6 de rotavirus ...	38
10.	Ensayos de encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsides derivadas de VP1 del poliomavirus murino	38
11.	Encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsides derivadas de CCMV.....	40
11.1	Medición de actividad en partículas pseudovirales CCMV-CYP	41
12.	Encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsides derivadas del bacteriófago P22	42
12.1.	Clonación del gen CYPBM3 en el vector pETDuet+SP+CP P22.....	42
12.2.	Clonación del gen CYPBM3-SP en el vector pBAD.	43
12.3.	Expresión simultánea del CYPBM3-SP y CP P22.....	44
12.4.	Expresión diferencial del CYPBM3-SP y CP P22.....	45
12.5.	Purificación de cápsides P22	46
12.6.	Número y concentración de CYP-SP por cápside P22	46
12.7.	Determinación de parámetros cinéticos para las partículas pseudovirales P22-CYP ...	48
12.8.	Estabilidad a la temperatura de las partículas pseudovirales P22-CYP	49
12.9.	Perfil de actividad pH y estabilidad a pH ácido de las partículas pseudovirales P22-CYP	49
12.10.	Estabilidad de las partículas pseudovirales P22-CYP a la degradación por proteasas..	50
12.11.	Determinación de átomos de hierro en CYP-SP por ICP-MS.....	50
13.	Molaridad de confinamiento y porcentaje de ocupación de la cápside (CCMV y P22)	51
14.	Análisis de VLPs por microscopio electrónico de transmisión.	51
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
1.	Expresión y purificación del CYPBM3 “21B3”	52
2.	Expresión y purificación de la proteína viral VP1.....	52
3.	Sustratos alternos para la evaluación de la actividad del CYPBM3 “21B3”	53
4.	Transformación de profármacos anticancerígenos por el CYPBM3 “21B3”	55
4.1.	Tamoxifen.....	56
4.2.	Resveratrol	58
5.	Transformación de plaguicidas por el CYPBM3 “21B3”	59
6.	Encapsulación del CYP en cápsides virales.....	63
6.1.	Encapsulación al azar	63
6.2.	Encapsulación por interacciones electrostáticas complementarias	65
6.2.1.	<i>Incremento de cargas superficiales positivas en el CYPBM3</i>	66

6.2.2.	<i>Encapsulación en nanoestructuras de VP1</i>	68
6.2.3.	<i>Encapsulación en nanoestructuras del CCMV</i>	73
7.	Encapsulación <i>in vivo</i> del CYPBM3 en P22-CYP.....	78
	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	89
	BIBLIOGRAFÍA	91
	ANEXOS	99
1.	Plásmidos utilizados en el proyecto doctoral.....	99
2.	Compuestos identificados en la transformación de profármacos por el CYPBM3 “21B3” utilizando LC-MS-MS.	100
3.	Cromatografías de fase reversa en HPLC para la evaluación de la transformación de profármacos por el CYPBM3 “21B3”.	100
4.	Datos de los espectros de masas para cada uno de los productos de la transformación de plaguicidas por el CYPBM3 “21B3”.	102
5.	Determinación de la cantidad de CYP encapsulado en VLPs de CCMV. Análisis por densitometría utilizando el programa ImageJ. SDS-PAGE (12%) teñido con InstantBlue.	103
6.	Secuencia de aminoácidos del CYPBM3 “21B3” fusionado a la proteína de andamiaje del bacteriófago P22.	103
7.	Artículo: Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450	
8.	Artículo: Pesticide transformation by a variant of CYPBM3 with improved peroxygenase activity	

ABREVIATURAS

CYP450 / CYP	Citocromo P450
CYPBM3	Citocromo P450 de <i>Bacillus megaterium</i> 3
CYPBM3 “21B3”	Citocromo P450 de <i>Bacillus megaterium</i> 3 mutante “21B3”
CYP+	Citocromo P450 de <i>Bacillus megaterium</i> 3 mutante “21B3” modificado con cargas positivas en la superficie
VLP	Partícula pseudoviral (<i>Virus-like particle</i>)
CCMV	Virus del moteado clorótico del frijol caupí
CP P22	Proteína de capa del bacteriófago P22
SP	Proteína de andamiaje del bacteriófago P22 (<i>Scaffold protein</i>)
CYP-SP	CYPBM3 “21B3” fusionado a la proteína de andamiaje
M_{conf}	Molaridad de confinamiento (concentración de enzima al interior de la cápside)
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
2,6-DMP	2,6-Dimetoxifenol
PROD	Pentoxiresorufina

RESUMEN

El dominio hemo del citocromo P450 CYPBM3 "21B3" fue encapsulado en nanoestructuras virales. Se aprovechó la gran versatilidad del CYPBM3 para transformar sustratos estructuralmente diversos. El 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) y la pentoxiresorufina sirvieron como sustratos para la caracterización cinética del CYP. El 2,6-DMP es un sustrato cuyo producto es fácilmente detectable por espectrofotometría, y que al igual que el compuesto sin transformar es soluble en agua y de tamaño pequeño, por lo que se asegura la entrada de sustrato y salida de producto por los poros de las nanoestructuras virales una vez que el citocromo fue encapsulado. Por otro lado, la pentoxiresorufina es un sustrato que al ser transformado por el CYP genera un producto fluorescente, con un límite de detección muy bajo, lo que lo hace un ensayo altamente sensible, importante ya que en muchos casos se trabajó con concentraciones bajas de enzima. Así mismo, los profármacos anticancerígenos, tamoxifen (actualmente en uso clínico) y el profármaco emergente resveratrol, pueden ser transformados en los metabolitos activos por el CYPBM3 "21B3". Estos sustratos son relevantes para la potencial aplicación terapéutica de las partículas pseudovirales con CYP encapsulado. Esta variante del CYPBM3 fue capaz también de transformar una serie de plaguicidas, tanto organoclorados como organofosforados. La oxidación de estos compuestos por la enzima genera moléculas más solubles, que generalmente conllevan a un incremento en su biodegradabilidad, actividad que podría ser utilizada con fines ambientales en el campo de la biorremediación.

Para la encapsulación del CYP en cápsides virales se implementaron tres estrategias: encapsulación al azar, encapsulación por cargas complementarias y encapsulación por interacciones específicas entre la fusión CYP-SP y las proteínas de capa virales. La encapsulación al azar, utilizando VLPs derivadas de VP6 de rotavirus y VP1 de poliomavirus murino, no fue exitosa, sugiriendo la necesidad de utilizar una fuerza que dirigiera la internalización del CYP dentro de las cápsides virales.

Para facilitar la interacción entre la enzima y las cápsides virales se diseñó un sistema en el cual el CYP tuviera una carga opuesta al interior de la cápside. Para el caso de VP1 del poliomavirus murino, cuyo interior está cargado negativamente, se generó una variante de la enzima con un incremento de cargas positivas en la superficie. A pesar de haber monitoreado una variedad de relaciones molares VP1 a CYP no se logró la encapsulación del CYP modificado positivamente

(CYP+) en nanoestructuras de VP1. La estrategia de complementariedad de cargas para favorecer la encapsulación de la enzima no es compatible con las condiciones necesarias para ensamblar VP1 en nanoestructuras. El sulfato de amonio además de disminuir la actividad del CYP, probablemente enmascara las cargas tanto de la proteína viral como de la enzima, eliminando la posibilidad de encapsulamiento, esto a pesar de haber disminuido la concentración de sulfato de amonio 5 veces.

En cuanto a la encapsulación del CYP+ en VP6 de rotavirus, debido a que existen cargas negativas tanto dentro de la cápside como fuera de ella, no se puede asegurar que todo el CYP que pudiera interactuar con VP6 esté al interior de las partículas, por esta razón se dejó de trabajar con esta VLP.

Se llevó a cabo con éxito la encapsulación del CYP en partículas pseudovirales derivadas del CCMV por medio de una estrategia de complementariedad de cargas electrostáticas, en donde la superficie negativa del CYP interactuó con el interior positivo de la cápside viral. Se encontraron relaciones molares CCMV-CYP correctas que permitieron la formación de la cápside del CCMV con enzima en su interior. La partícula derivada de la relación molar CCMV a CYP 12:1 es biocatalíticamente activa; aunque con una considerable reducción en la actividad comparada con la enzima libre. Las pérdidas en actividad son relativamente comunes al inmovilizar enzimas; puede ser atribuido a varios factores entre los que se encuentran, restricciones en los movimientos conformacionales de la enzima debido al alto grado de hacinamiento dentro de la cápside, y a problemas difusionales del sustrato hacia el interior de la nanoestructura.

La encapsulación *in vivo* del CYP en cápsides derivadas del bacteriófago P22 también arrojó resultados positivos. Estas partículas fueron caracterizadas estructural, cinética y bioquímicamente, encontrando cápsides correctamente ensambladas con alrededor de 110 CYP por cápside. Las partículas fueron biocatalíticamente activas, con una eficiencia catalítica dos veces menor comparada con el CYP libre. La encapsulación del CYP dentro de esta cápside viral generó un aumento en la estabilidad de la enzima a valores de pH ácido y una mayor estabilidad ante la degradación por proteasas.

INTRODUCCIÓN

La bionanotecnología se enfoca en la investigación y en el desarrollo de nuevos materiales a escala nanométrica, para fines específicos, basados en biomoléculas, tales como ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos. Dentro de estos materiales naturales se encuentran las partículas pseudovirales o VLPs (virus-like particles) que recientemente han recibido gran atención debido al alto potencial que presentan dentro de este campo, en particular en el área de la ciencia de materiales y la nanomedicina (Manchester, 2009).

1. Partículas pseudovirales

Las VLPs se componen únicamente de las proteínas de la cápside viral y a diferencia de los virus, no contienen el material genético natural de éstos, por lo que no son partículas infecciosas. Estas partículas pueden ser utilizadas como andamiajes básicos para el diseño y fabricación de materiales nanoestructurados. Dentro de este contexto algunas de las características que hacen atractivas a las VLPs son las siguientes (Lee, 2009; Strable, 2009): *i)* Presentan arquitecturas altamente ordenadas de dimensiones nanométricas que tienen la capacidad de autoensamblarse. *ii)* Se estima que alrededor de 10^{31} virus habitan la Tierra (Bamford, 2005), dentro de este vasto número existe una gran diversidad tanto de tamaños (17 - 1500 nm en cápsides icosaédricas); como de formas distintas, predominando las cápsides icosaédricas, filamentosas y helicoidales (Fig. 1). *iii)* Cuentan con estructuras monodispersas en tamaño y composición, bajo condiciones particulares de pH y fuerza iónica. *iv)* Poseen áreas superficiales grandes, con una variedad de grupos funcionales expuestos en un alto número de copias, que permiten el acoplamiento de múltiples ligandos, ya sea de la misma molécula o diferentes moléculas. Esta característica los hace moléculas polivalentes, con la capacidad de participar en interacciones colectivamente más fuertes que sus contrapartes con sitios únicos de interacción, aumentando la afinidad de unión con los sitios blanco. *v)* Presentan cavidades que pueden ser utilizadas para encapsular moléculas con diversos fines. *vi)* Debido a su carácter proteico son biocompatibles y biodegradables.

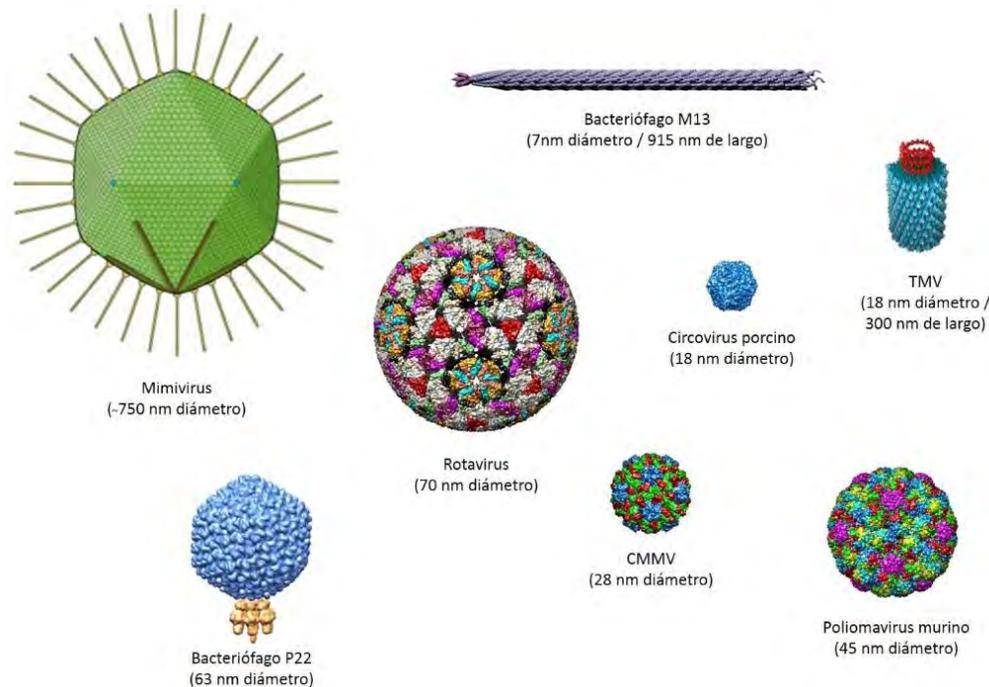


Figura 1. Estructuras tridimensionales de virus con distintas formas y tamaños. CCMV: Virus del moteado clorótico del frijol caupí. TMV: Virus del mosaico del tabaco. Los modelos fueron tomados de la base de datos VIPERdb.

Las nanopartículas virales cuentan con tres interfaces disponibles para ser manipuladas ya sea química o genéticamente: la superficie externa, la interface entre las subunidades proteicas y la cara interna (Douglas, 2006). Esta última se ha utilizado para encapsular diversos materiales como metales (Hooker, 2007), medicamentos (Ren, 2007), DNA (Verma, 2005) y proteínas (Lipin, 2008) con el fin de generar nuevos materiales, catalizadores y sistemas de suministro. El encapsulamiento de proteínas se ha enfocado principalmente en la introducción de proteínas fluorescentes en nanoestructuras proteicas. El modelo más utilizado ha sido la proteína verde fluorescente (GFP) debido a su fácil detección (Günther, 2001; Abbing, 2004; Minten, 2010; O’Neil, 2012). Sin embargo, hoy en día, existen diversos trabajos en los que se han encapsulado enzimas dentro de estos contenedores, generando bionanorreactores con propiedades y capacidades catalíticas diferentes a sus contrapartes sin encapsular.

La encapsulación de proteínas dentro de estos vehículos de origen viral, ofrece una serie de ventajas para sobrepasar las limitaciones que presentan las proteínas como agentes terapéuticos. En primer lugar, las cápsides son vehículos con una alta capacidad de carga aptos para el transporte de cantidades considerables de proteína en su interior. Además, la nanoestructura viral

es capaz de conferir a la proteína encapsulada protección frente a la degradación por proteasas (Fiedler, 2010; O'Neil, 2013), así como una barrera contra el reconocimiento por el sistema inmune (Inoue, 2008). La inmunogenicidad del virus puede ser abatida por distintos métodos, entre los que se encuentran la modificación de epítopes, *self-peptides* (Rodríguez, 2013) y el recubrimiento de la partícula con polímeros como el polietilenglicol (PEG) (Kreppel, 2008). De esta manera se modifica químicamente la cápside y no el biofármaco en cuestión, evitando repercusiones negativas en la actividad biológica de la proteína terapéutica.

Debido a su tamaño, las partículas pseudovirales no pueden ser filtradas y eliminadas por el riñón (umbral de remoción <40 kDa), permaneciendo más tiempo circulando en el organismo (aumento del tiempo de residencia dentro del organismo). Finalmente y de importancia para la terapia contra el cáncer, se ha observado que las partículas en el orden nanométrico (100-500 nm) se acumulan preferentemente dentro de tumores sólidos debido a un fenómeno conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentada (*EPR effect*) (Fig. 2). Esta acumulación se debe a que los vasos sanguíneos promovidos por el tumor y que rodean a éste, presentan una arquitectura desorganizada con una serie de huecos en su estructura (200-800 nm), permitiendo la extravasación de nanopartículas hacia el interior del tejido. Aunado a lo anterior, las partículas son retenidas en estos sitios debido a un drenaje linfático deficiente característico de los tumores (Iyer, 2006; Torchilin, 2011).

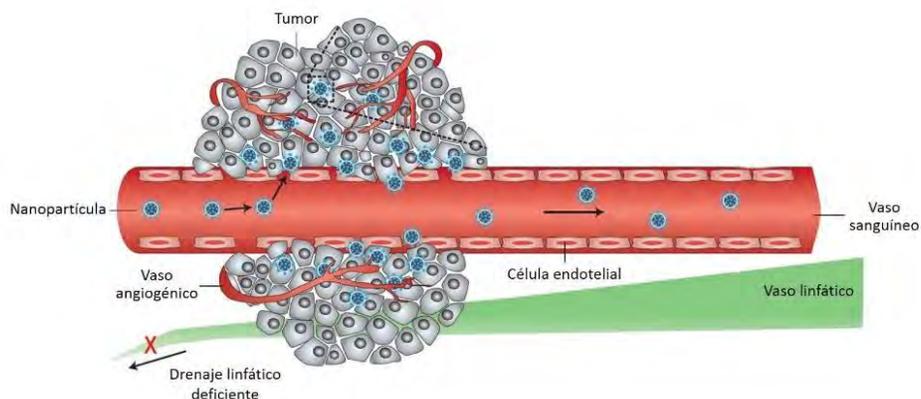


Figura 2. Efecto EPR. Acumulación de nanopartículas en tumores sólidos. Modificada de Peer, 2007.

2. Partículas pseudovirales utilizadas en el proyecto

Para este trabajo hemos utilizado VLPs de cuatro virus distintos que difieren principalmente en su tamaño y el procedimiento de ensamblaje: VP6 de rotavirus, VP1 del poliomavirus murino, la cápside del virus del moteado clorótico del frijol caupí (CCMV) y la capa proteica del bacteriófago P22. Todas ellas tienen la capacidad de auto-ensamblarse *in vitro*; se cuenta con la estructura cristalográfica de las proteínas de capa virales, permitiendo un diseño racional de la encapsulación; se cuenta con un protocolo estandarizado eficiente para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes (Plascencia-Villa, 2009; Chuan, 2008; Minten, 2011b; O'Neil, 2011); y finalmente la estructura ensamblada cuenta con una serie de poros por los que podrán entrar y salir una variedad de moléculas de bajo peso molecular.

2.1. Rotavirus: Capa de VP6

Los rotavirus son virus de alrededor de 100 nm de RNA de doble cadena (dsRNA) y son la principal causa de gastroenteritis severa en niños pequeños. Su estructura es icosaédrica y está formada por tres capas concéntricas de proteína; la capa más interna está compuesta por 120 copias de VP2, seguida de una capa intermedia de 260 trímeros de VP6 y finalmente de una capa externa compuesta de 260 trímeros de la glicoproteína VP7 y 60 proteínas espiculares VP4 (Fig. 3).

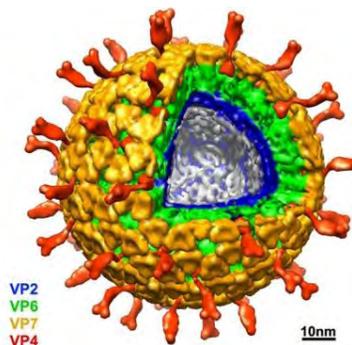


Fig. 3. Representación tridimensional de la estructura del rotavirus (Chen, 2009).

A partir de los rotavirus se pueden obtener distintas partículas pseudovirales, ya sea involucrando las tres capas de proteína VP2/6/7, las dos capas más internas VP2/6, o inclusive sólo la capa

conformada por VP6 ($T=13$). El número de tranigulación (T) describe la relación geométrica entre hexágonos y pentágonos (vértices) en una cápside viral icosaédrica.

VP6 de rotavirus es una proteína de 397 aminoácidos que se pliega en dos dominios distintos. El dominio B, en la base de la molécula, consiste en una serie de α -hélices; mientras que el dominio H situado en parte superior de la molécula, se pliega en una serie de hojas β (Fig. 4A). Los contactos en ambos dominios, aunque principalmente en el dominio H, hacen que las proteínas de VP6 interaccionen fuertemente para formar trímeros, los cuales forman la unidad básica en el ensamblaje de la capa de VP6 en el virus (Mathieu, 2001) (Fig. 4B).

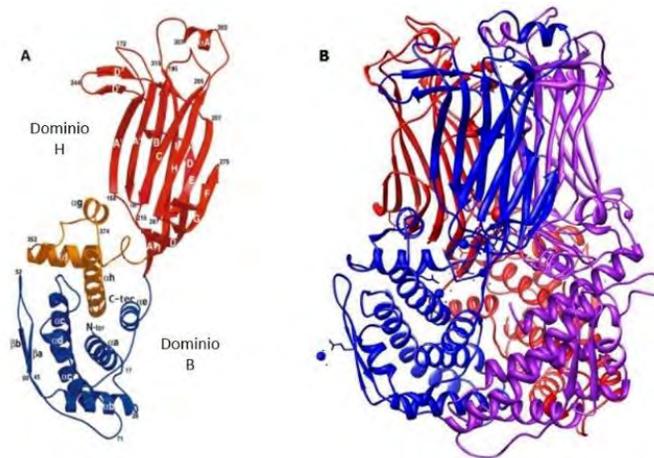


Fig. 4. Estructura tridimensional de la proteína VP6 de rotavirus. A) Representación de la proteína VP6 monomérica. B) Trímero de VP6. (Modificada de Mathieu et al, 2001)

La arquitectura de la partícula viral presenta 132 canales acuosos que atraviesan las dos capas más externas del virus. Existen tres tipos de canales distintos. Los canales tipo I (12 en total) de alrededor de 18 Å de diámetro están localizados en los ejes icosaédricos de orden cinco. Los canales tipo II (60 en total), cercanos a los canales tipo I cuentan con un diámetro en su parte más estrecha de aproximadamente 50 Å. Y finalmente los canales tipo III (60 en total), que tienen un diámetro de alrededor de 55 Å en la superficie del virus, para después estrecharse y finalmente alcanzar su amplitud máxima hacia el interior de la cápside (Li, 2009; Mathieu, 2001; Prasad, 1988).

Las VLPs derivadas de VP6 presentan polimorfismo estructural dependiendo de las condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de iones divalentes en las que se encuentre. Como se puede observar en el diagrama de fase (Fig. 5A), el pH es el parámetro principal que controla el estado de agregación de VP6, al influir sobre el estado de protonación de los residuos de aminoácidos. En el intervalo de pH de 3 a 5.5 se observan mayoritariamente partículas esféricas de 75 nm de diámetro (Fig. 5B); entre pH 5.5 y 7 se observan partículas tubulares de 75 nm de diámetro y varios micrómetros de longitud; mientras que para valores de pH por arriba de 7 se forman nanotubos con un diámetro aproximado de 45 nm con una longitud de alrededor de 1 a 3.5 μm de largo (Plascencia-Villa, 2009). En presencia de iones divalentes (Ca^{2+} o Zn^{2+}) a concentraciones mayores de 100 mM se ha observado la desestabilización de las estructuras tanto de esferas como de nanotubos, encontrando únicamente trímeros, lo que sugiere que VP6 posee sitios de unión de baja afinidad por estos metales que afectan las interacciones intertrímero (Lepault, 2001).

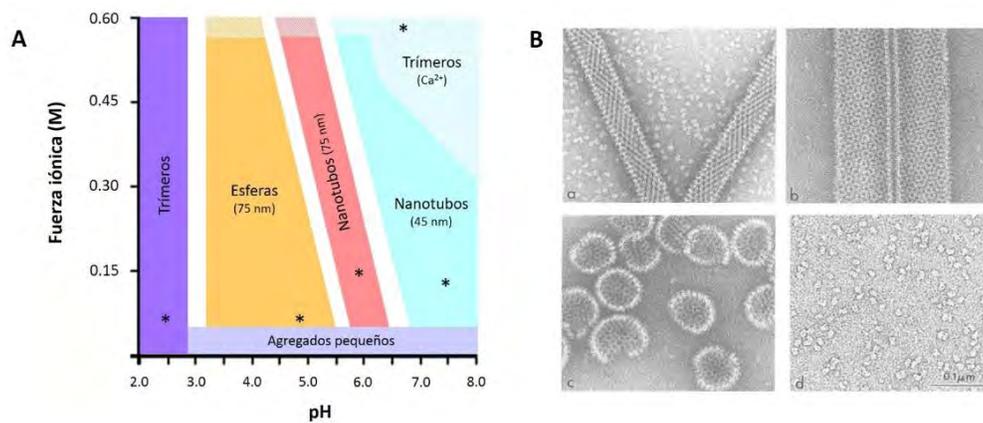


Fig. 5. Polimorfismo estructural en VP6. A) Diagrama de fase del ensamblaje de VP6 bajo distintas condiciones de pH y fuerza iónica. Las áreas blancas representan zonas de poca certeza. Los asteriscos indican las condiciones de pH y fuerza iónica en las que se puede encontrar la nanoestructura reportada en forma pura. B) Microscopía electrónica de **a.** nanotubos de 45 nm, **b.** nanotubos de 75 nm, **c.** esferas y **d.** trímeros en presencia de Ca^{2+} . Modificada de Lepault, 2001.

2.2. Poliomavirus murino: VP1

El poliomavirus murino es un virus sin membrana de doble cadena de DNA y forma icosaédrica, con un diámetro de alrededor de 45 nm (simetría T=7). Está constituido por 360 moléculas de la proteína estructural predominante VP1, las cuales están organizadas en 72 pentámeros; estos pentámeros son la unidad básica en el ensamblaje de la capa viral (Gleiter, 2001). Del total de

pentámeros en la cápside, doce están rodeados por cinco capsómeros (pentavalentes) y 60 están rodeados por seis capsómeros (hexavalentes) (Fig. 6A). VP2 y VP3 son proteínas estructurales minoritarias que se unen a la cara interna de VP1. Por cada pentámero de VP1 se une una VP2 o una VP3. Ambas proteínas, VP2/VP3, comparten la mayoría de su secuencia, con la excepción de un fragmento adicional de 115 aminoácidos que posee VP2 en el N-terminal del polipéptido (Chen, 1998).

La formación de partículas pseudovirales puede llevarse a cabo utilizando tan solo a la proteína VP1. Esta proteína consta de 383 aminoácidos (42.5 kDa) que se pliegan en su mayoría como hojas β , dando como resultado una topología “jelly-roll” (Fig. 6B). Cada monómero de VP1 participa en una red extensa de contactos dentro del pentámero (Stehle, 1997). Existen inclusive una serie de puentes disulfuro intracapsómero (Schmidt, 2000). Los pentámeros (Fig. 6C) se encuentran unidos entre sí a través de la región C-terminal de la proteína estructural; este “brazo” de 63 aminoácidos invade al pentámero vecino formándose una hoja β que mantiene unida a la estructura (Stehle, 1997). En el centro de cada pentámero existe un poro cuyo diámetro más pequeño (12.5 Å) se encuentra cercano a la superficie externa de la estructura (Chen, 1998).

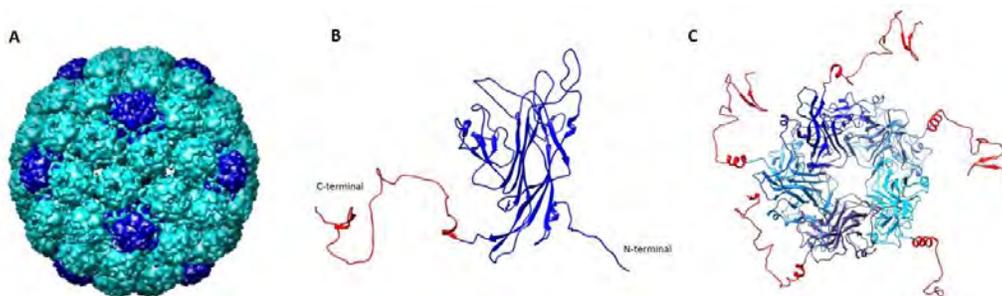


Figura 6. Estructura de la proteína VP1 del poliomavirus murino. A) Arreglo de la cápside VP1, en donde se muestran los capsómeros pentavalentes (azul marino) y hexavalentes (azul claro). B) Monómero de VP1 (PDB = 1SID). En rojo se muestra el brazo de 63 aminoácidos del C-terminal que participa en la unión entre pentámeros. C) Pentámero de VP1, unidad de ensamblaje. Modelos construidos con Chimera 1.8.1

El ensamblaje *in vitro* de los capsómeros de VP1 para formar la VLP es inducido por la presencia de iones calcio, siendo el fenómeno específico para este ion divalente. Se le han atribuido dos roles a estos átomos en el ensamblaje; por un lado, el calcio es capaz de neutralizar la repulsión electrostática de pares de grupos carboxilo cercanos en una estructura proteica permitiendo ciertas interacciones entre las subunidades. Por otro lado, se sugiere que al unirse el calcio a la

proteína se llevaría a cabo un cambio conformacional en VP1 pudiendo favorecer interacciones inter-capsómero. La ausencia de moléculas reductoras de puentes disulfuro y la presencia de sulfato de amonio son componentes importantes también para dar lugar al ensamblaje de la partícula pseudoviral de VP1 (Chuan, 2010).

2.3. CCMV

El CCMV ("*cowpea chlorotic mottle virus*") es un virus de RNA de cadena sencilla que infecta una especie de frijol. Está compuesto por 180 subunidades proteicas idénticas (20 kDa), arregladas en 12 pentámeros y 20 hexámeros que forman una estructura icosaédrica de 28 nm de diámetro. La proteína de capa del CCMV (Fig. 7A), compuesta por 190 aminoácidos, se pliega como barril β (tipo "*jelly roll*"), con los extremos N y C-terminal extendidos. El fragmento C-terminal participa en la formación de dímeros, considerada como la unidad básica del ensamblaje. La cápside es estabilizada por iones de calcio o magnesio cuyo sitio de unión se encuentra entre las subunidades (Speir, 1995).

La unidad asimétrica en el icosaedro está compuesta por tres subunidades: A, B y C (Fig. 7B). Los pentámeros están compuestos exclusivamente por la cadena A; mientras que las subunidades B y C forman los hexámeros (Fig. 7C). Estos últimos complejos se encuentran estabilizados por una estructura tubular conocida como β -hexámero, formado por los "brazos" amino terminales (aminoácidos 27-49) de las subunidades B y C (Fig. 7D) (Speir, 1995).

Los primeros 26 aminoácidos del N-terminal de la proteína de capa (no visibles en la estructura cristalográfica) poseen una fuerte carga positiva debido a la presencia de aminoácidos de carácter básico (6 argininas y 3 lisinas). Estos aminoácidos se encuentran proyectados hacia al interior de la cápside y están involucrados en el empaquetamiento del RNA (Douglas, 2002).

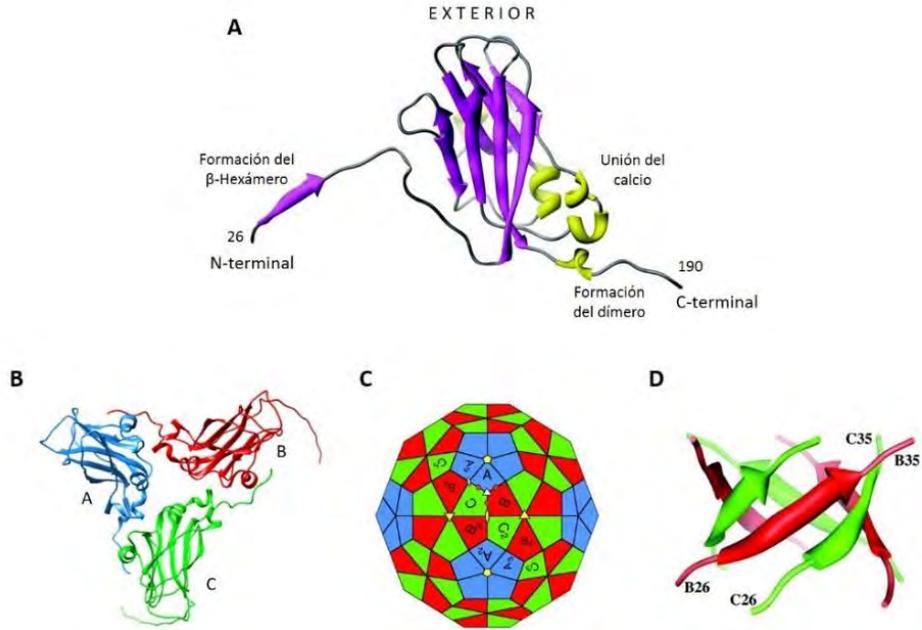


Figura 7. Estructura del CCMV. A) Estructura secundaria y funciones asociadas en una subunidad de la proteína de capa. B) Unidad asimétrica, trímero de subunidades A, B y C. C) Modelo de la cápside del CCMV, en donde se muestra el arreglo de las unidades asimétricas para formar los pentágonos y hexágonos. El triángulo blanco representa el eje semi-múltiplo de 3. D) β -hexámero formado por los aminoácidos 27 al 49 del N-terminal de cada una de las subunidades B y C en un hexámero.

La estructura del virus es compacta y estable a pH ácido y baja fuerza iónica, y puede ser desensamblada a valores de pH mayores a 7 y alta fuerza iónica (1 M NaCl). Sin embargo, un fenómeno interesante surge a pH 7 y ausencia de iones calcio a baja fuerza iónica, en donde la cápside se expande un 10% generando 60 poros en la estructura, de alrededor de 2 nm de diámetro, en el eje semi-múltiplo de tres. Esta expansión, se debe a una repulsión de cargas entre los aminoácidos de carácter ácido que coordinan los iones calcio (Speir, 1995). Bajo estas condiciones, las aberturas generadas en la estructura, permiten el intercambio libre de moléculas entre el medio y el interior de la cápside (Liepold, 2005).

El CCMV presenta una serie de polimorfismos estructurales que dependen principalmente del pH y la fuerza iónica. Bajo condiciones particulares de cada uno de estos parámetros (Fig. 8) es posible generar una variedad de estructuras diferentes: tubulares con distintos diámetros, esféricas ($T=1, 3, 7$), cápsides expandidas, cápsides multicapa y láminas hexagonales (Adolph, 1974; Lavelle, 2009).

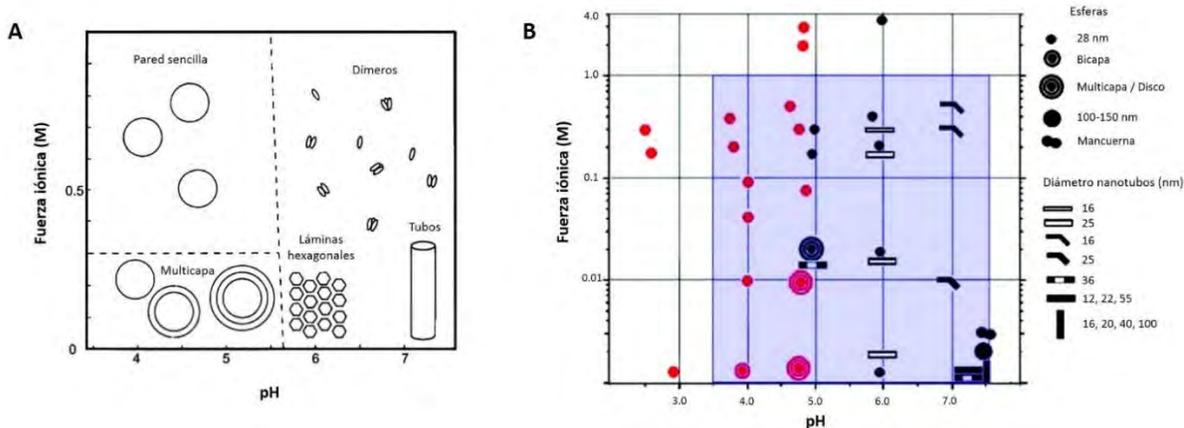


Figura 8. Diagramas de fase para el ensamblaje de VLPs derivadas del CCMV en función del pH y la fuerza iónica. A) Modificado de Butler, 1974. B) Modificado de Lavelle, 2009. Símbolos rojos = ensamblados con amortiguador cacodilato de sodio. Símbolos negros = ensamblados con amortiguador citrato de sodio. El recuadro lila indica las condiciones de ensamblaje consideradas por Bancroft, 1970.

2.4. Bacteriófago P22

El bacteriófago P22 es un virus de doble cadena de DNA que infecta a *Salmonella typhimurium*. La nanoestructura icosaédrica de 58 nm está compuesta por algunas proteínas minoritarias (proteínas de expulsión y del portal) y, por 420 proteínas de capa (coat protein, CP) que se ensamblan con la ayuda de 60 a 300 proteínas de andamiaje (scaffold protein, SP) en una estructura conocida como procápside. La posterior maduración del virus, involucra el empaquetamiento del DNA al mismo tiempo que las proteínas de andamiaje son expulsadas de la estructura (expansión de la cápside); para finalmente ser incorporadas las proteínas de cola, dando como resultado el virus infeccioso (Teshke, 2010).

La partícula pseudoviral derivada de la procápside del P22 sólo requiere de la proteína de cápside y de andamiaje para ensamblarse. La proteína de capa consta de 430 aminoácidos (46.6 kDa) plegados en ocho dominios distintos (Fig. 9A). En ausencia de la proteína de andamiaje, la proteína de capa no se ensambla o, en altas concentraciones, forma esferas T=4 así como estructuras aberrantes en espiral (Teshke, 2010). La procápside está conformada por 72 capsómeros de la proteína de capa, doce de los cuales están formando pentámeros y 60 de ellos hexámeros (Fig.

9B). Estos hexámeros se encuentran distorsionados (Fig. 9C), presentando en el centro un poro con un diámetro que va de los 3 a los 4.5 nm (Thuman-Commike, 1996).

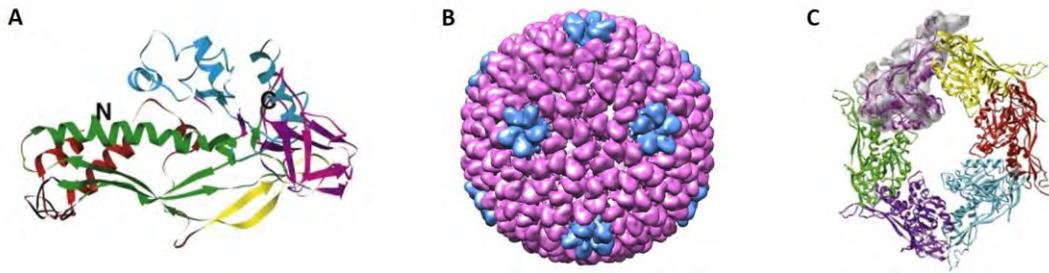


Figura 9. Estructura de la cápside del bacteriófago P22. A) Monómero de la proteína de capa. B) Arreglo de pentámeros (azul) y hexámeros (morado) en la cápside. C) Estructura distorsionada de los hexámeros en P22. Tomadas de Parent, 2010.

El ensamblaje de la procápside procede a través de la copolimerización de las proteínas de capa y de andamiaje. Estas proteínas se van añadiendo, como monómeros o dímeros, a la cápside en crecimiento hasta alcanzar el tamaño y la forma correcta. La proteína de ensamblaje interactúa, con las proteínas de cápside, a través de un fragmento del C-terminal (hélice-asa-hélice-asa), para iniciar y dirigir el ensamblaje de la partícula (Chen, 2011).

3. Citocromos P450

Los citocromos P450 (CYP450 o CYP) comprenden una vasta superfamilia de hemoproteínas capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos tanto endógenos como exógenos (Huttunen, 2008). De manera general, los citocromos encargados de metabolizar compuestos endógenos tienen alta especificidad hacia sus sustratos y están involucrados en la biosíntesis de compuestos; mientras que los CYP450 responsables de metabolizar compuestos xenobióticos, encargados de la detoxificación del organismo, tienen un amplio rango de especificidad (Guengerich, 2002; Huttunen, 2008).

La reacción básica catalizada por estas enzimas es la monooxigenación, en donde un átomo de oxígeno es incorporado a un sustrato. La oxidación puede llevarse a cabo tanto en átomos de

carbono como en heteroátomos (N, S, P, I). Estos citocromos son capaces de llevar a cabo también otro tipo de reacciones como la epoxidación, la N y O-dealquilación, dehalogenación y reacciones tipo peroxidasa, entre otras (Mansuy, 1998; Guengerich, 2001).

Generalmente los CYP450 son parte de un complejo multienzimático, ya que para llevar a cabo la activación de oxígeno molecular (O_2) y la posterior transferencia del átomo de oxígeno al sustrato, es necesario contar con proteínas que faciliten la transferencia de electrones del NADPH (o NADH) al átomo de hierro del hemo del CYP450; la ferredoxina y la citocromo P450 reductasa, son ejemplos de este tipo de proteínas. La monooxigenación de sustratos puede llevarse a cabo también sin la necesidad de NADPH y proteínas de transferencia de electrones, al utilizar otros compuestos donadores de un átomo de oxígeno como el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos, actividad conocida como peroxigenasa (Bernhardt, 1994); sin embargo esta vía, “*peroxide shunt pathway*”, por lo general es poco eficiente para llevar a cabo la catálisis (Fig. 10).

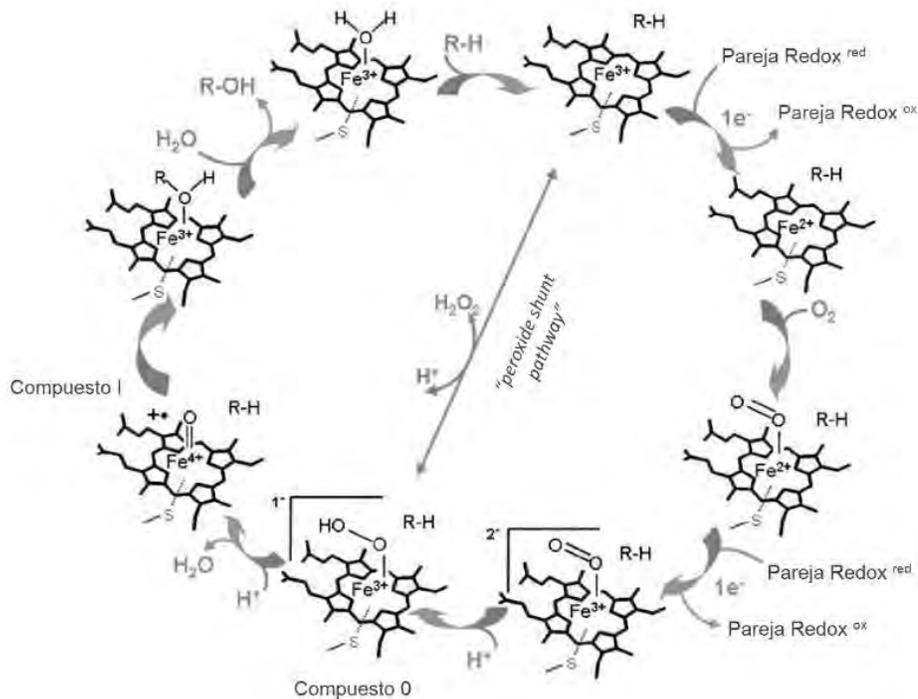


Figura 10. Ciclo catalítico de los CYP450 incluyendo la vía “*peroxide shunt pathway*”. En el primer paso del ciclo, la unión del sustrato ($R-H$) al sitio activo desplaza una molécula de agua (distal), lo que cambia el equilibrio de estado de espín del hemo férrico de bajo a alto espín. Esto conlleva a un incremento positivo en el potencial del hierro, lo que favorece la transferencia de electrones de la pareja redox (ej. NADPH-P450 reductasa) hacia el átomo de hierro generando Fe^{2+} . En este estado el hierro es capaz de unirse al oxígeno y aceptar un segundo electrón. Posteriormente se incorporan dos

átomos de hidrógeno y se rompe el enlace O-O generándose una molécula de agua. La especie intermediaria resultante (compuesto I) posee un radical catiónico en la porfirina del grupo hemo. El compuesto I ataca al sustrato y lleva a cabo la hidroxilación. La salida del producto (R-OH), permite la unión de la molécula de agua al Fe^{3+} para volver a comenzar el ciclo. Modificado Munro, 2007.

Existen más de 270 familias diferentes de CYP450, distribuidas a lo largo de la escala filogenética, presentes tanto en arqueas, bacterias y eucariontes. Los seres humanos contamos con alrededor de 55 a 60 genes que codifican para estos citocromos, se expresan predominantemente en el hígado e intestino y se encuentran a nivel celular asociados a la membrana del retículo endoplásmico. Su papel es fundamental en la biosíntesis de compuestos y en el procesamiento de medicamentos ya sea para activarlos o desactivarlos. De esta capacidad de metabolizar medicamentos radica su importancia médica y en particular su alto potencial como proteínas terapéuticas, ya que son los responsables de la activación de ciertos profármacos, principalmente de carácter quimioterapéutico y antiviral (Huttunen, 2008).

3.1. CYPBM3 mutante "21B3"

El CYPBM3, también conocido como CYP102A1, es un citocromo P450 proveniente de *Bacillus megaterium*, encargado de la hidroxilación de cadenas largas de ácidos grasos en las posiciones subterminales (ω -1 a ω -3). Este citocromo tiene la particularidad de tener en una misma cadena polipeptídica el dominio de transferencia de electrones (citocromo P450 reductasa) y el dominio hemo correspondiente como tal al CYP450 (Axarli, 2005). Esta característica hace de esta enzima uno de los CYP450 más rápidos, capaz de hidroxilar ácidos grasos con una velocidad que excede los 5000 min^{-1} , y llegando a eficiencias catalíticas para el mejor de sus sustratos (ácido araquidónico, C_{20}) de $3000 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, utilizando NADPH y O_2 (Noble, 1999).

Se ha observado que el dominio hemo se puede plegar por sí solo (Fig. 11) y puede llevar a cabo la catálisis utilizando al peróxido de hidrógeno como donador de oxígeno (Cirino, 2003); sin embargo, las actividades catalíticas alcanzadas son muy bajas, requiriendo altas concentraciones de peróxido de hidrógeno que comprometen la integridad de la enzima. Debido a ello, en el 2003 Cirino y Arnold, generaron por medio de evolución dirigida, una mutante del CYPBM3 con actividad peroxigenasa aumentada. Esta mutante, "21B3", presenta 10 mutaciones a nivel de aminoácidos, que aumentaron significativamente la actividad peroxigenasa y que permitieron

disminuir la K_M para el peróxido de hidrógeno de la enzima original, disminuyendo así la destrucción del CYP. Para este trabajo utilizaremos al dominio hemo del CYPBM3 “21B3” como enzima modelo para la encapsulación y caracterización de las partículas pseudovirales biocatalíticas.

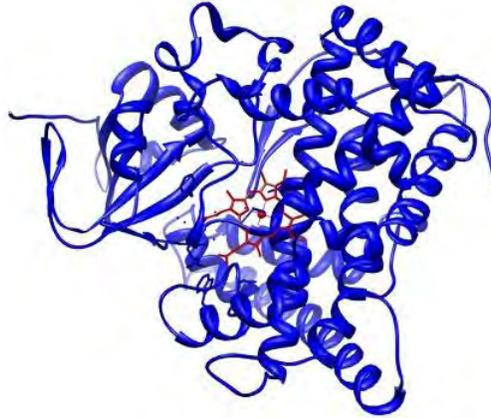


Figura 11. Estructura tridimensional del dominio hemo del CYPBM3. La proteína está compuesta por 472 aminoácidos y un grupo prostético hemo. El ligando proximal del átomo de hierro es un azufre que procede de una cisteína y es característico para todo los CYP450.

Aunque el CYPBM3 es una proteína de origen bacteriano, es estructural y funcionalmente parecido a los citocromos microsomales humanos (Ravichandran, 1993; Anzenbacherová, 2000); con la ventaja de ser un CYP soluble y estable en medio acuoso, además de poder ser producido en grandes cantidades a diferencia de los CYP humanos. Otra característica interesante de este CYP es que presenta una alta plasticidad para poder ser sometido, tanto a mutagénesis sitio dirigida como a evolución dirigida, para obtener variables capaces de transformar una gran variedad de sustratos no naturales tales como alcanos, hidrocarburos poliaromáticos y medicamentos (Whitehouse, 2008; Di Nardo, 2007). Estas propiedades hacen del CYPBM3 una enzima versátil con una serie de ventajas operacionales interesantes para ser usada como enzima modelo para la encapsulación en nanoestructuras virales.

4. Terapia de activación de profármacos vía enzimas

La terapia de activación de profármacos utilizando enzimas exógenas es una estrategia que se ha propuesto para aumentar la eficiencia de ciertos procedimientos médicos, como la quimioterapia, que aunque es uno de los tratamientos más utilizados hoy en día para combatir el cáncer (Al-Lazikani, 2012) presenta serios efectos secundarios. El objetivo final de esta estrategia es la de aumentar la concentración local de fármaco activo en las células tumorales, lo cual incrementaría la eficiencia del medicamento en el tumor y reduciría la toxicidad producida por el fármaco en el resto de las células del hospedero (Hetch, 2000). Esta terapia se lleva a cabo en dos pasos; en el primero, la enzima exógena debe ser dirigida a las células de interés y acumularse en el sitio para posteriormente, en un segundo paso, administrar el profármaco (ya sea de manera dirigida o sistémica), activándose selectivamente en las células blanco.

Se han propuesto, a grandes rasgos, dos métodos para llevar a cabo el suministro de la enzima capaz de activar el profármaco, a las células de interés: suministro de genes, conocidos por sus siglas en inglés como GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*) y suministro de enzimas activas (Xu, 2001).

La terapia génica (GDEPT) involucra la introducción, a células tumorales específicas, de uno o varios genes que codifican para enzimas con la capacidad de transformar profármacos. Estos genes pueden ser suministrados a las células tumorales utilizando distintos vectores, entre los que se encuentran los de tipo viral (Xu, 2001). Hasta la fecha se han desarrollado una variedad de sistemas enzima-profármaco, siendo uno de los más explotados el que está basado en la activación de profármacos por CYP450, que de manera general no se expresan en grandes cantidades en células tumorales y que son capaces de transformar medicamentos anticancerígenos usados clínicamente (Chen, 2002).

Para el caso del suministro de enzimas activas, la terapia basada en anticuerpos, conocida como ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*) ha sido una de las más desarrolladas. La enzima capaz de transformar el profármaco se dirige selectivamente a las células blanco, a través de la conjugación con un anticuerpo, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígenos que se expresan en la superficie de las células tumorales (Niculescu-Duvaz, 1997).

Para ambas estrategias, GDEPT y ADEPT, se han desarrollado sistemas enzima-profármaco que han llegado a ser probados en ensayos clínicos (Dachs, 2005; Francis, 2002); sin embargo hasta la fecha no existe aún ningún tratamiento en uso basado en estas terapias.

5. Encapsulación de enzimas dentro de partículas pseudovirales

La encapsulación de enzimas dentro de partículas pseudovirales se ha realizado principalmente para la producción de bionanorreactores enfocados al estudio de fenómenos de catálisis (Comellas-Aragones, 2007; Fiedler, 2010; Minten, 2011; Patterson, 2012; Patterson, 2012b, O'Neil, 2013; Patterson, 2014), aunque también se ha propuesto su utilización como posibles agentes terapéuticos (Inoue, 2008).

El primer artículo reportado sobre la encapsulación de enzimas en partículas pseudovirales fue en el 2007, en donde Comellas-Aragonès y colaboradores diseñaron un sistema para estudiar el comportamiento cinético de enzimas a nivel individual, basado en la encapsulación de una peroxidasa de rábano blanco en VLPs derivadas del virus CCMV. Por un lado, encontraron que un parámetro que afecta de manera importante la catálisis es el tiempo de difusión del sustrato hacia el interior de la nanoestructura, el cual puede ser manipulado al cambiar el pH en el que se encuentran las cápsides (apertura de poros a $\text{pH} > 7$). Por otro lado, fueron capaces de detectar una serie de fluctuaciones en la transformación de sustrato a producto a través del tiempo; este comportamiento de prendido-apagado que se observa al trabajar con moléculas de enzima individuales, está relacionado con el hecho de que las enzimas presentan una serie de cambios conformacionales a través del tiempo en donde sólo algunas de ellas presentan una alta actividad catalítica (Engelkamp, 2006).

Posterior a este primer trabajo, se ha llevado a cabo la encapsulación de múltiples enzimas (varias de un solo tipo) en distintas VLPs utilizando estrategias diferentes para la encapsulación (Tabla 1). Las altas concentraciones de enzima alcanzadas dentro de las cápsides virales, en el orden milimolar, permiten estudiar fenómenos de catálisis en ambientes hacinados simulando los encontrados a nivel celular, lo que permitiría entender de mejor manera el funcionamiento de estos biocatalizadores dentro de las células.

Tabla 1. Encapsulación de múltiples enzimas del mismo tipo en partículas pseudovirales

Enzima	Cápside	M_{conf} (mM)	Enzimas por cápside	$k_{cat} K_M^{-1}$ respecto a E_{libre}	Método de encapsulación	Ref.
Citosina desaminasa	SV40	ND	ND	Menor (VNR)	Mediante fusión con proteína interna de cápside (<i>in vivo</i>)	Inoue, 2008
Peptidasa E	Bacteriófago Q β	ND	2 -18	Menor 3X (9 enzimas)	Mediante fusión con RNA (<i>in vivo</i>)	Fiedler, 2010
Luciferasa	Bacteriófago Q β	ND	4 – 8	Menor 30X (4 enzimas)	Mediante fusión con RNA (<i>in vivo</i>)	Fiedler, 2010
Pseudozima antártica lipasa B	CCMV	1	1.3 - 4	Mayor (k_{cat})	Mediante fusión con el motivo <i>coiled-coil</i> . (<i>in vitro</i>)	Minten, 2011
Fosfatasa alcalina	Bacteriófago MS2	0.5	3.2 (monómeros)	Igual	Mediante interacciones electrostáticas. Fusión con péptido negativo. (<i>in vitro</i>)	Glasgow, 2012
Alcohol deshidrogenasa	Bacteriófago P22	7.2	249 \pm 13	Menor 1.6X	Mediante fusión con proteína de andamiaje (<i>in vivo</i>)	Patterson, 2012a
CelB glucosidasa	Bacteriófago P22	2.4	87 \pm 3.5 (monómeros)	Igual	Mediante fusión con proteína de andamiaje (<i>in vivo</i>)	Patterson, 2012b
Fosfotriesterasa	Bacteriófago P22	1.1	40 \pm 10 (monómeros)	Menor 600X	Mediante fusión con proteína de andamiaje (<i>in vivo</i>)	O'Neil, 2013

M_{conf} : Molaridad de confinamiento (concentración de enzima al interior de la cápside). ND: No determinado. VNR: Valor no reportado.

A pesar de encontrar para la mayoría de las enzimas encapsuladas un decremento en la actividad, se generan para algunos de estos sistemas nuevas propiedades en el bionanorreactor, como un aumento en la termoestabilidad (Fiedler, 2010; O'Neil, 2013), resistencia a proteólisis (Fiedler, 2010; O'Neil, 2013), protección ante el proceso de liofilización (O'Neil, 2013), reversión de la inhibición por sustrato (Patterson, 2012a) y la disminución a la desnaturalización bajo ciertas condiciones operativas (Comellas-Aragonès, 2007). Para el caso particular de la citosina desaminasa, que convierte el profármaco 5-fluorocitosina al fármaco activo 5-fluorouracil, la cápside del SV40 fue utilizada como vehículo para el suministro de actividad enzimática a células CV-1 (línea celular procedente de riñón de mono), con el fin de sensibilizarlas al tratamiento por el profármaco e inducir la muerte celular (Inoue, 2008).

Recientemente, fue publicado el primer artículo en el que múltiples copias de enzimas distintas fueron encapsuladas en una partícula pseudoviral (bacteriófago P22). Las tres enzimas encapsuladas, CelB glucosidasa, ATP-galactosidasa y ADP-glucocinasa, tienen la particularidad de llevar a cabo una serie de reacciones en cascada en el metabolismo de azúcares de *Pyrococcus furiosus* (Patterson, 2014). Contrario a lo que se esperaba, no se encontró un aumento en la eficiencia de la cascada de reacción; es fundamental poner especial atención en el balance adecuado de los parámetros cinéticos de cada una de las enzimas involucradas, para diseñar un sistema catalítico eficiente. La construcción de metabolones sintéticos a base de la encapsulación de enzimas en partículas pseudovirales, podría generar sistemas catalíticos complejos con diversas aplicaciones prácticas.

En la naturaleza, la encapsulación de enzimas dentro de compartimientos, ya sea en organelos u otros contenedores de origen proteico (Fig. 12), es un mecanismo altamente utilizado a nivel celular, tanto en eucariontes como en procariontes, en donde las enzimas encargadas de llevar a cabo una serie de reacciones consecutivas en una vía metabólica, se encuentran espacialmente separadas de otros componentes en la célula (Kang, 2010). Se sugiere que esta compartimentalización puede aumentar la eficiencia para llevar a cabo la cascada de reacción ya que las enzimas se encuentran co-localizadas en un ambiente de alta concentración local de sustrato, se previene la pérdida de intermediarios poco estables o tóxicos (Tanaka, 2010), y da lugar a que procesos metabólicos incompatibles pueden proceder simultáneamente dentro de la célula (Wörsdörfer, 2011).

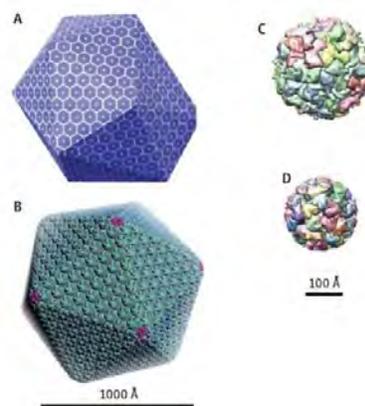


Figura 12. Modelos de microcompartimientos proteicos encontrados en bacterias. A) Microcompartimiento de utilización de etanolamina en *E. coli*. B) Carboxisoma. C) Encapsulina *T. maritima*. D) Lumazina sintasa *B. subtilis*. Modificado de Kang, 2010.

En el presente proyecto encapsularemos al CYPBM3 “21B3”, dentro de partículas pseudovirales con el fin de aprovechar las características de estas nanopartículas como un modelo para el diseño de nanovehículos para el transporte de enzimas con aplicaciones médicas.

HIPÓTESIS

Es posible generar nanopartículas enzimáticamente activas a partir de la encapsulación del CYP450 dentro de cápsides virales.

OBJETIVOS

Obtener y caracterizar nanopartículas virales biocatalíticamente activas

Objetivos particulares

1. Expresar heterológamente y obtener de forma pura el CYPBM3 mutante “21B3” y la proteína viral VP1 del poliomavirus murino.
2. Evaluar la actividad del CYPBM3 “21B3” con diversos sustratos de interés médico y ambiental.
3. Evaluar la formación de partículas pseudovirales derivadas de VP6 de rotavirus, VP1 del poliomavirus murino, CCMV y bacteriófago P22, con biocatalizador encapsulado por medio de distintas estrategias (azar, cargas complementarias, fusión genética).
4. Determinar la capacidad catalítica de las partículas pseudovirales en la transformación de un profármaco utilizado en quimioterapia.
5. Determinar la estabilidad de las partículas pseudovirales biocatalíticas bajo distintas condiciones (pH, temperatura, proteasas).

MATERIALES Y MÉTODOS

PROTEINAS VIRALES

La proteína VP6 pura de rotavirus fue suministrada por la Dra. Laura Palomares (Instituto de Biotecnología, UNAM). La proteína CCMV (*cowpea chlorotic mottle virus*) pura fue suministrada por la Dra. Melissa Koay (Universidad de Twente, Holanda). Las demás proteínas virales fueron producidas en el laboratorio como se describe posteriormente.

PLÁSMIDOS (Anexo 1)

- **pCWori CYPBM3 “21B3”** (resistencia a ampicilina, doble promotor ptac, inducible por IPTG, gen que codifica para el dominio hemo del CYPBM3 mutante “21B3”). Suministrado por la Dra. Frances Arnold, Caltech.
- **pGEX4T2 PyVP1** (resistencia a ampicilina, promotor ptac, inducible por IPTG, gen que codifica para la proteína de capa VP1 del Poliomavirus murino fusionada al gen GST). Suministrado por el Dr. Robert Garcea, University of Colorado.
- **pETDuet CYP-SP + CP P22** (resistencia a ampicilina, promotor T7, inducible por IPTG, gen que codifica para el CYPBM3 “21B3” fusionado a SP₁₄₁₋₃₀₃, un fragmento de la proteína de andamiaje P22, más el gen de la proteína de capa del bacteriófago P22).
- **pBAD CYP-SP** (resistencia a ampicilina, promotor araBAD, inducible por arabinosa, gen que codifica para el CYPBM3 “21B3” fusionado a SP₁₄₁₋₃₀₃, un fragmento de la proteína de andamiaje P22).
- **pRSF CP P22** (resistencia a kanamicina, promotor T7, inducible por IPTG, gen que codifica para la proteína de capa del bacteriófago P22). Suministrado por el Dr. Trevor Douglas, Montana State University.

1. Expresión y purificación del dominio hemo del CYPBM3 “21B3”

Con el fin de llevar a cabo la expresión heteróloga del CYPBM3 “21B3” se transformaron células de *E. coli* DH5α con el plásmido en cuestión. Se siguió el protocolo de expresión y purificación publicado en Cirino y Arnold, 2002 con algunas modificaciones que se explica a continuación.

Se tomó 1 mL de un precultivo de la cepa transformada para inocular un cultivo de 100 mL de medio TB (Terrific Broth) con Amp adicionado con 0.5 mM de Tiamina y elementos traza, se dejó crecer a 35 °C a 150 rpm por 9 horas. En este punto se indujo con 0.5 mM de IPTG y se añadió 1 mM de ácido aminolevulínico. Se dejó crecer por 22 h más a 30 °C a 135 rpm.

Posteriormente el cultivo se centrifugó a 3840 x *g* por 5 min, se resuspendieron las células en amortiguador A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8) y se sonicó la muestra a una potencia del 50% por 2 min, con pulsos de prendido y apagado de 7 s y 9 s, respectivamente. Se centrifugó a 22100 x *g* por 20 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.22 µm.

La purificación se llevó a cabo en un sistema de cromatografía atmosférica EconoSystem de Bio-Rad® utilizando una columna HisTrap HP (Amersham Biosciences®) de 5 mL precargada con níquel. Se siguieron los siguientes pasos:

1. Se equilibró la columna con amortiguador A con un flujo de 5 mL min⁻¹ con 10 volúmenes de columna.
2. Unión del CYP a la columna haciendo pasar el extracto enzimático filtrado a una velocidad de 1.5 mL min⁻¹. Pasar el extracto dos veces.
3. Lavado de proteínas con pegado inespecífico con 50 mM de imidazol con un flujo de 5 mL min⁻¹ por 10 min. Se utilizó una mezcla de amortiguador A y amortiguador B (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8).
4. Elución del CYP utilizando un gradiente de 50 mM a 350 mM de imidazol con un flujo de 3 mL min⁻¹ durante 20 min. Las fracciones se colectaron cada minuto.

Se corroboró la eficiencia de la purificación por medio de una electroforesis SDS-PAGE al 12%.

Las fracciones que contenían la proteína de interés se concentraron por ultrafiltración utilizando un AMICON con una membrana de corte molecular de 10 000 daltones. Posteriormente se hicieron varios lavados con un amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 8 con 10% de glicerol y se concentró la muestra.

Finalmente se midió la concentración de proteína por el método de Bradford, usando los reactivos de Bio-Rad®, y método de unión a monóxido de carbono se evaluó el número de sitios activos.

2. Determinación de la concentración de CYP450 por unión con monóxido de carbono

El ensayo de unión a CO es un ensayo específico para CYP450 ya que esta molécula se une al hierro reducido (Fe^{II}) para formar un complejo que produce un espectro con un máximo de absorción a 450 nm. Con este ensayo se puede determinar la integridad del CYP450, ya que la pérdida en la actividad del CYP está asociada a una pérdida en la banda a 450 nm (Guengerich, 2009).

Se siguió el protocolo descrito por Guengerich *et al.*, 2009. Se diluyeron 400 µL del CYPBM3 en 2 mL de amortiguador Tris-HCl pH 8 y el volumen se dividió en cantidades iguales en dos celdas de plástico, para posteriormente llevara a cabo el blanco (línea base) en un epectrofotómetro Perkin Elmer haciendo un barrido de 400 a 500 nm. Se removió la celda muestra del equipo y se burbujeó lentamente CO dentro de la celda con una pipeta pasteur insertada al fondo de la misma, se contaron alrededor de 60 burbujas (1 burbuja/s). El CO se produjo al poner a reaccionar ácido fórmico con ácido sulfúrico. A continuación se añadieron a ambas celdas alrededor de 1 mg de ditionita de sodio y se disolvió el compuesto por inversión. Finalmente se leyeron las muestras en el espectrofotómetro haciendo el barriso de 400 a 500 nm varias veces hasta que la banda de absorción a 450 nm no cambie (aprox. 10 min). Se anotaron las absorbancias a 450 y 490 nm. Se utilizó un $\epsilon_{450} = 0.091 \text{ nM cm}^{-1}$.

$$[CYP450] = \frac{\Delta Abs_{450} - Abs_{490}}{0.091} \times \text{dilución} = \mu\text{M P450}$$

3. Expresión y purificación de VP1

La expresión de la proteína de cápside viral VP1 de Poliomavirus murino se llevó a cabo en *E. coli* en la cepa BL21 Rossetta 2, utilizando el plásmido pGEX4T2-PyVP1 (donado por el Dr. Robert Garcea, Universidad de Colorado). La expresión y purificación de VP1 se basó en el protocolo publicado por Chuan *et al.*, 2008 con algunas modificaciones explicadas a continuación. Se

transformaron células de *E. coli* BL21 Rossetta 2 con el plásmido en cuestión y se plaquearon en una caja de LB sólido con Amp ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) y Cm ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se tomó 0.5 mL de un precultivo de la cepa transformada para inocular un cultivo de 50 mL de medio LB con Amp y Cm. Se dejó crecer el cultivo a 26°C y 180 rpm por 14 horas (llegar a una $\text{OD}_{600} \approx 4$). Posteriormente se llevó a cabo la inducción con 1 mM de IPTG por 6 horas a 26°C y 180 rpm.

El cultivo se centrifugó a $3840 \times g$ por 5 min, se resuspendieron las células en amortiguador de lisis (40 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5% glicerol; 5 mM DTT) y se sonicó la muestra. Se centrifugó a $22100 \times g$ por 20 min a 4°C . Se recuperó el sobrenadante (extracto total) y se pasó por un filtro de $0.22 \mu\text{m}$.

La purificación de la proteína viral VP1 se llevó a cabo en lote (batch) utilizando la resina glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare Life Sciences) como se describe a continuación.

1. Se equilibró la resina en amortiguador de lisis. A continuación, se incubó el extracto total (proveniente de ≈ 1.8 g de células) con 5 mL de resina por 5 h a 4°C en agitación constante. La resina se sedimentó ($500 \times g$ por 5 min) y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se llevaron a cabo 2 lavados con amortiguador de lisis a 4°C .
2. Se eluyó la fusión VP1-GST incubando la resina con 5 mL de amortiguador de lisis adicionado con 10 mM de glutatión reducido por 10 min a 4°C en agitación constante. La resina se sedimentó y se guardó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más para un total de tres lavados. El sobrenadante con la fusión VP1-GST se concentró por ultrafiltración usando una membrana de 30 o 50 kDa hasta alcanzar un volumen de 5 mL.
3. Se agregaron a la muestra 5 μL de trombina ($1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) (Novagen) y se dejó incubando aproximadamente 16 h a 4°C en agitación constante. Al término de la digestión se llevó a cabo una ultrafiltración para eliminar el glutatión reducido y dejar la muestra en amortiguador de lisis.
4. Se incubó la muestra con 2.5 mL de resina glutatión sefarosa 4B por 3 h a 4°C en agitación constante para unir la GST libre. Posteriormente la resina se sedimentó ($500 \times g$ por 5 min) y se tomó el sobrenadante que contiene la proteína VP1 libre de fusión. Se llevaron a cabo 2 lavados más con amortiguador de lisis a 4°C .

5. Finalmente el sobrenadante se concentró por ultrafiltración. Se hicieron alícuotas de la proteína pura y se almacenó a -20 °C. La proteína purificada VP1 se encuentra formando pentámeros.

4. Transformación de sustratos alternos por el CYPBM3 “21B3”

4.1. Transformación de alcoiresorufinas

Se llevó a cabo la determinación de la transformación enzimática de cuatro alcoiresorufinas por el CYPBM3 “21B3”: Metoxiresorufina (MROD), etoxiresorufina (EROD), pentoxiresorufina (PROD) y benziloxiresorufina (BROD). Las reacciones se llevaron a cabo en 1 mL (50 mM Tris-HCl pH 8) con 5 μ M de sustrato (20 μ M para el caso de BROD) y 0.07 nmoles de CYPBM3. Se inició la reacción al agregar 5 mM de H₂O₂.

Para calcular los parámetros cinéticos utilizando al PROD como sustrato se llevó a cabo la reacción en un volumen de 0.2 mL (50 mM Tris-HCl pH 8) con las siguientes concentraciones de sustrato: 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 25 μ M. La concentración de DMSO (solvente en el que se disuelve PROD) en la reacción fue siempre la misma (1.7%). La cantidad de enzima utilizada por ensayo fue 0.01 nmoles. Se inició la reacción al agregar 5 mM de H₂O₂. La actividad catalítica fue monitoreada por fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación igual a 530 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm usando un fluorímetro Safire con lector de placa (Tecan). El producto de la reacción fue cuantificado usando una curva estándar de resorufina (0.025 - 5 nM). Las constantes catalíticas se obtuvieron por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

Para la determinación de parámetros cinéticos utilizando al CYP modificado positivamente se utilizó una cantidad de enzima igual a 0.03 nmoles.

4.2. Transformación de fenoles

Se hicieron una serie de pruebas iniciales de actividad del CYPBM3 “21B3” con 3 fenoles distintos: p-nitrofenol, 2-metoxifenol y 2,6-dimetoxifenol. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en

amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 8 utilizando 3 mM de sustrato, con 0.1 μM de CYP. Se utilizó 1 mM de peróxido de hidrógeno para iniciar la reacción.

Para calcular los parámetros cinéticos utilizando al 2,6-DMP como sustrato se llevó a cabo la reacción en 1 mL (50 mM Tris-HCl pH 8) con las siguientes concentraciones de fenol: 10, 25, 50, 125, 250 y 500 μM . La reacción se inició al agregar 5 mM de H_2O_2 . La cantidad de enzima utilizada fue 0.18 nmoles. La actividad catalítica fue monitoreada espectrofotométricamente a 468 nm ($\epsilon_{468} = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS. Las constantes catalíticas se obtuvieron por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

Para la determinación de parámetros cinéticos utilizando al CYP modificado positivamente se utilizó una cantidad de enzima igual a 1.5 y 0.7 nmoles.

5. Transformación de profármacos por el CYPBM3 “21B3”

La transformación enzimática de los seis profármacos ensayados fue monitoreada por una cromatografía de fase reversa por HPLC con detector UV/vis (cromatógrafo Agilent serie 1100) utilizando una columna Kinetex C_{18} , 5 μm , 150x4.6 mm (Phenomenex, CA). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.4 a 25 °C por 15 min y fueron iniciadas con 5 mM H_2O_2 . Los sustratos y las reacciones fueron protegidos de la luz.

Tegafur: La mezcla de reacción (0.25 mL) contenía 50 μM de sustrato (stock disuelto en DMSO) y 0.6 nmoles de CYPBM3. El análisis por HPLC se llevó a cabo siguiendo el protocolo publicado por Komatsu (2000). La mezcla de reacción fue extraída un par de veces con acetato de etilo. La fase orgánica fue evaporada bajo un flujo de N_2 para posteriormente resuspender el residuo en 150 μL de la fase móvil (3% CH_3OH : 20 mM NaClO_4 , pH 2.5). La elución de la columna fue llevada a cabo a un flujo de 1.2 mL min^{-1} por 40 min y los productos de la reacción fueron detectados a 270 nm.

Dacarbazina: La mezcla de reacción (0.5 mL) contenía 500 μM de sustrato (stock disuelto en 0.5 M HCl en agua) y 1.2 nmoles de CYPBM3. El análisis por HPLC se llevó a cabo siguiendo el protocolo publicado por Lewis (2011). La reacción fue terminada añadiendo 2 μL ácido perclórico al 70%, la solución fue centrifugada y a continuación se tomó un alícuota del sobrenadante (100 μL) que fue

diluida 1:1 con la fase móvil (75% A y 25% B). La fase móvil A consistió en 10 mM ácido heptanosulfónico, 5% acetonitrilo y 0.1% trietilamina; mientras que la fase móvil B fue 100% acetonitrilo. Se utilizó una elución isocrática a 1 mL min⁻¹ durante 8 min. Los productos de la reacción fueron monitoreados a 267 nm.

Ifosfamida y ciclofosfamida: La mezcla de reacción (1 mL) contenía 5 mM de sustrato y 3 nmoles de CYPBM3. El análisis por HPLC se llevó a cabo siguiendo el protocolo publicado por Martins (2009). La mezcla de reacción fue extraída un par de veces con acetato de etilo. La fase orgánica fue evaporada bajo un flujo de N₂ para posteriormente resuspender el residuo en 200 µL de la fase móvil (77.25% A y 22.75% B). La fase móvil A consistió en 10 mM amortiguador de fosfatos pH 6 y la fase móvil B fue 100% acetonitrilo. La elución de la columna fue llevada a cabo de manera isocrática utilizando 77.25% de fase móvil A y 22.75% de fase móvil B a un flujo de 1 mL min⁻¹ por 10 min. Los productos de la reacción fueron detectados a 195 nm.

Para el tamoxifen y el resveratrol se determinaron las constantes cinéticas variando la concentración de sustrato hasta alcanzar la saturación, como se explica en la siguiente sección.

5.1. Determinación de constantes cinéticas para el tamoxifen y el resveratrol.

Los parámetros cinéticos para estos dos profármacos fueron calculados en base a la desaparición de sustrato monitoreado por HPLC utilizando el mismo cromatógrafo y columna reportados en la sección anterior. Los valores de k_{cat} y K_M se obtuvieron por medio del programa Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc.).

Tamoxifen: Se llevaron a cabo las reacciones en un volumen final de 0.5 mL (100 mM amortiguador de fosfato de potasio pH 7.4; 2 mM ácido ascórbico) con las siguientes concentraciones de sustrato: 20, 40, 80, 140 y 200 µM. La concentración de metanol en la reacción (solvente en el que se disuelve el tamoxifen) fue siempre la misma (1%). La cantidad de enzima utilizada por ensayo fue entre 90 y 225 picomoles. Se iniciaron las reacciones al agregar 5 mM de H₂O₂ y se llevaron a cabo a 25 °C por 5 min. Las reacciones fueron terminadas añadiendo 50 µL de ácido acético para posteriormente ser centrifugadas (3 min a 13 000 rpm) y analizadas por HPLC siguiendo el gradiente de elución indicado en la tabla que se muestra a continuación, con un flujo

de 0.75 mL min⁻¹. La fase móvil A consistió en un amortiguador 10 mM acetato de amonio (pH 3) y la fase móvil B fue 100% acetonitrilo. La disminución del pico de tamoxifen fue monitoreada a 280 nm.

Tiempo (min)	% Solvente B
0	40
10	40
20	65
20.1	40
25	40

Resveratrol: Se llevaron a cabo las reacciones en un volumen final de 0.25 mL (100 mM amortiguador de fosfato de potasio pH 7.4) con las siguientes concentraciones de sustrato: 30, 66, 100, 150 y 200 µM. La concentración de DMSO en la reacción (solvente en el que se disuelve el resveratrol) fue siempre la misma (0.5%). La cantidad de enzima utilizada por ensayo fue 50 picomoles. Se iniciaron las reacciones al agregar 5 mM de H₂O₂ y se llevaron a cabo a 25 °C por 5 min. Las reacciones fueron terminadas añadiendo 250 µL de acetonitrilo para posteriormente ser centrifugadas (3 min a 13 000 rpm) y analizadas por HPLC con un flujo isocrático (0.65 mL min⁻¹) utilizando 25% de acetonitrilo en agua adicionado con 0.01% ácido acético por 15 min. La disminución del pico de resveratrol fue monitoreada a 320 nm.

5.2. Identificación de los productos de transformación para los profármacos tamoxifen y resveratrol

La mezcla de reacción para el análisis de los productos usando al tamoxifen como sustrato contenía: 80 µM tamoxifen, 1.8 nmoles CYP y 5 mM H₂O₂ en 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (volumen final 0.5 mL). La mezcla de reacción para el análisis de los productos usando al resveratrol como sustrato contenía: 100 µM resveratrol, 0.6 nmoles CYP y 5 mM H₂O₂ en 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (volumen final 0.5 mL). Ambas reacciones se llevaron a cabo por 20 min y posteriormente fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Los productos de la reacción fueron analizados por una nanocromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) en un QStar XL QqTOF equipado con una fuente NanoESI y un sistema Agilent capillary HPLC 1100 (resolución de masa 10 000 y precisión de masa 5 ppm para compuestos orgánicos). La muestras fueron eluidas con un gradiente que empezaba con 0.1% de ácido fórmico en agua para terminar en 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo en 25 min y con un flujo de 300 nL min⁻¹. Estos análisis

de espectrometría de masas fueron llevados a cabo por la Unidad de Espectrometría de Masas y Proteómica de la Universidad de Queen's en Kingston, Ontario, Canada.

6. Transformación de plaguicidas por el CYPBM3 "21B3"

La transformación enzimática de los siguientes plaguicidas organoclorados y organofosforados fue ensayada con el CYPBM3: diclorofen, linuron, pentaclorofenol, propanil, 2,4-DB, paratión, diclofentión, clorpirifos, azinfos-metil, tribufos y cumafos. La mezcla de reacción (1 mL) contuvo entre 0.66 y 6.6 nM de enzima y de 85 a 200 μ M de plaguicida, en 50 mM Tris-HCl pH 8 adicionado con 10% de acetonitrilo. Las reacciones se iniciaron al agregar 10 mM H_2O_2 y fueron detenidas 10 min después con la adición de 1 mL de acetonitrilo, para posteriormente ser centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. Las muestras fueron analizadas por una cromatografía de fase reversa en HPLC equipado con una columna C_{18} Hypersil ODS, 5 μ M (100 x 2.1 mm). Las muestras fueron eluidas con un gradiente de 100% agua a 100% metanol a un flujo de 0.5 mL min^{-1} a lo largo de 25 min. La transformación de los plaguicidas fue monitoreada por el decremento en el área del sustrato y estimada usando una curva estándar.

6.1. Determinación de constantes cinéticas e identificación de productos para el diclorofen, linuron, paratión y clorpirifos.

Los parámetros cinéticos para dos organoclorados (diclorofen y linuron) y dos organofosforados (paratión y clorpirifos) fueron determinados variando la concentración de plaguicida hasta alcanzar la saturación. Se utilizó una concentración de 10 mM H_2O_2 . k_{cat} y K_M fueron calculados usando el software EnzFitter (Biosoft, Cambridge, UK).

La mezcla de reacción para el análisis de los productos resultado de la transformación de los 4 sustratos contenía: 200 μ M plaguicida, 6.6 nM de CYP y 10 mM H_2O_2 en 50 mM Tris-HCl pH 8 con 10% acetonitrilo para dar volumen final de 10 mL. Después de 10 min de reacción, la mezcla fue acidificada y extraída con diclorometano. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio. Los productos de la reacción fueron identificados por medio de una cromatografía de gases (Agilent 6890N) acoplada a un espectrómetro de masas (Agilent 5973N).

7. Incremento de cargas positivas en la superficie del CYPBM3 “21B3”

Para llevar a cabo el incremento de cargas superficiales positivas en el CYPBM3 se aminaron los grupos carboxilo presentes en la proteína (69 Asp+Glu) utilizando etilendiamina.

Se intercambió el amortiguador Tris-HCl en el que se encuentra la enzima por un amortiguador libre de grupos amino, 50 mM MES pH 6.7. A continuación, se agrega al CYP un exceso de 50 X de etilendiamina (pH ajustado previamente a 6-7 con HCl) por cada grupo carboxilo presente en el polipéptido. Se agregó inmediatamente después un exceso de 100 X de carbodimida. Se dejó reaccionando por 15 min a temperatura ambiente (no controlada) con agitación constante para posteriormente poner la muestra a 4°C por 16 h. Finalmente se dializó el CYP contra amortiguador 50 mM boratos pH 8 por 24 h a 4°C, con tres cambios de amortiguador. La concentración de CYP se midió por medio del protocolo de BCA, utilizando los reactivos de Thermo Scientific.

Para corroborar la incorporación de grupos amino en el CYPBM3 se llevó a cabo un isoelectroenfoque para determinar el punto isoeléctrico de la enzima. Para ello se tomó una alícuota de la muestra y se dializó contra amortiguador 10 mM boratos pH 8 y se verificó que la concentración de proteína fuera $\geq 1 \text{ mg mL}^{-1}$. La muestra se cargó en un gel PhastGel IEF 3-9 (GE Healthcare Life Sciences) previamente hidratado por 24 h en una solución con 0.25 mL Pharmalyte 3-10 (GE Healthcare Life Sciences) y 3.75 mL agua desionizada. La corrida se llevó a cabo de 0 a 500 V en un equipo PhastSystem (GE Healthcare Life Sciences).

8. Determinación in silico de la superficie electrostática del CYPBM3 “21B3” y las cápsides virales

La carga electrostática de la superficie tanto del CYPBM3 como de las proteínas de cápside de VP6, VP1 y CCMV fue calculada por medio del programa Maestro 9.6 (Schrödinger, Inc.). Se abrió el archivo .pdb en el software para cada proteína para posteriormente dar clic en PrepWiz y determinar el pH. Se llevó a cabo una optimización del sistema. Para visualizar la carga superficial de las proteínas se da clic en *Workspace* y luego en *Surface* para finalmente seleccionar *Poisson-Boltzman Electrostatics*.

9. Ensayos de encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsides derivadas de VP6 de rotavirus

Los nanotubos de VP6 fueron desensamblados agregando a la muestra 500 mM CaCl₂. El desensamblaje procedió por 16 h a temperatura ambiente con agitación constante. Una vez disociada la proteína viral, se agrega una concentración conocida de CYP para posteriormente inducir la formación de nanoestructuras dializando contra amortiguador 30 mM Tris-HCl pH 8, durante 16 h a temperatura ambiente. La encapsulación del CYP se ensayó a diferentes relaciones molares VP6-CYP: 1:9, 1:3, 1:1.5, 5:1; 50:1 y 100:1. La concentración inicial de nanotubos de VP6 para las primeras 4 relaciones molares fue de 0.43 mg mL⁻¹, mientras que para las relaciones molares 50:1 y 100:1 fue de 0.75 mg mL⁻¹. El volumen final de estos ensayos de encapsulamiento fue de 50 µL, por lo que se llevaron a cabo microdiálisis en tubos eppendorf (1.5 mL) con un orificio en la tapa cubierto por una membrana de diálisis de corte molecular 12 kDa (Overall, 1987).

Posteriormente se evaluó la formación de nanoestructuras por medio de una cromatografía de filtración en gel en HPLC utilizando una columna Ultrahydrogel 500, 7.8x300 mm (Waters). Se usó un flujo de 0.9 mL min⁻¹ con amortiguador de corrida 30 mM Tris-HCl pH 8, durante 20 min. La elución de la muestra fue monitoreada a 280 nm. Se colectaron las fracciones cada minuto. A cada fracción se le midió actividad CYP450 utilizando como sustrato PROD (25 µM) e iniciando la reacción con 5 mM H₂O₂. El volumen final de la reacción se llevó a cabo en 200 µL. La actividad catalítica fue monitoreada por fluorescencia como fue explicado en la sección 4.2.

10. Ensayos de encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsides derivadas de VP1 del poliomavirus murino

A la proteína VP1 en forma pentamérica (en amortiguador de lisis) se le agregó una concentración conocida de CYP para posteriormente inducir la formación de nanoestructuras, según lo reportado por Chuan (2008), dializando primero contra amortiguador de ensamblado 1 (0.5 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 5% glicerol, 1 mM CaCl₂, pH 7.6) durante 15 h a 20 °C; y a continuación en amortiguador de ensamblado 2 (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5% glicerol, 1 mM CaCl₂, pH 7.4) por 24 h más a 20°C. La encapsulación del CYP se ensayó a dos diferentes relaciones molares VP1-CYP: 3:1 y 10:1. La concentración inicial de proteína viral fue 0.4 mg mL⁻¹. El volumen final de estos ensayos de encapsulamiento fue de 100 µL, por lo que fueron llevados a cabo en microdiálisis.

Posteriormente se evaluó la formación de nanoestructuras por medio de una cromatografía de filtración en gel utilizando una columna de 5 mL con resina Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences). Se usó un flujo de 0.35 mL min^{-1} utilizando amortiguador de ensamblado 2, durante 20 min. Se utilizó un sistema de cromatografía atmosférica EconoSystem de Bio-Rad®. Se colectaron fracciones cada minuto. A cada fracción se le midió tanto la concentración de proteína por el método de Bradford, usando los reactivos de Bio-Rad®; como la actividad CYP450 utilizando como sustrato PROD ($25 \mu\text{M}$) e iniciando la reacción con $5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$. El volumen final de la reacción se llevó a cabo en $200 \mu\text{L}$. La actividad catalítica fue monitoreada por fluorescencia como fue explicado en la sección 4.2.

Se siguió el mismo protocolo antes detallado para llevar a cabo el ensamblaje de cápsides de VP1, pero ahora utilizando el CYP modificado positivamente, ensayando las siguientes relaciones molares VP1-CYP: 3:1, 5:1 y 10:1. La concentración de proteína viral se mantuvo constante (0.3 mg mL^{-1}).

Al finalizar el ensamblaje, cada una de las muestras se cargó en un filtro para centrifuga Amicon Ultra (0.5 mL) con una membrana de corte de 100 kDa (Merck Millipore) y fue centrifugada por 5 min a $7000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. La muestra fue lavada 5 veces con amortiguador de ensamblaje 2 para eliminar el CYP libre y proteína VP1 desensamblada. Finalmente la muestra se concentró a un volumen de $100 \mu\text{L}$. Se midió la actividad catalítica de cada una de las muestras ($60 \mu\text{L}$) utilizando como sustrato PROD ($25 \mu\text{M}$) e iniciando la reacción con $5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$. El volumen final de la reacción se llevó a cabo en $200 \mu\text{L}$. La actividad catalítica fue monitoreada por fluorescencia como fue explicado en la sección 4.2.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento explicado en el párrafo anterior, pero se disminuyó la concentración de sulfato de amonio en el amortiguador de ensamblado 1 a 0.1 M . Las relaciones molares VP1-CYP ensayadas para estos encapsulamientos fueron: 1:1, 2:1 y 5:1. Se midió la actividad catalítica de cada una de las muestras ($60 \mu\text{L}$) utilizando como sustrato PROD ($25 \mu\text{M}$) e iniciando la reacción con $5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$.

Finalmente se repitió el encapsulamiento con la relaciones molares VP1-CYP 3:1, 5:1 ($0.5 \text{ M (NH}_4)_2\text{SO}_4$) y 1:1 ($0.1 \text{ M (NH}_4)_2\text{SO}_4$). Después de los procesos de diálisis, se purificaron las muestras

por una ultracentrifugación en una solución de cloruro de cesio al 35.3% ($M = 2.098$, $\delta = 1.26 \text{ g cm}^3$). La ultracentrifugación se llevó a cabo utilizando un rotor SW50.1 a 45 000 rpm ($243\,356 \times g$) por 16 h a 4 °C. Posteriormente las bandas se extrajeron del tubo de centrifuga por medio de una jeringa. Las muestras se dializaron contra amortiguador de ensamblado 2 para eliminar el cloruro de cesio, y fueron concentradas a un volumen final de 100 μL por centrífuga 100 kDa. Se midió la actividad catalítica de cada una de las muestras (60 μL) utilizando como sustrato PROD (25 μM) e iniciando la reacción con 5 mM H_2O_2 . Los 40 μL restantes fueron precipitados con 10 % ácido tricloroacético por 16 h, se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 30 min. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 μL de 100 mM Tris-HCl pH 11. Las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12%, se corrió el gel a 15 mA y se tiñió con nitrato de plata.

11. Encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsidas derivadas de CCMV

Las cápsidas vacías del CCMV, a una concentración de 1 mg mL^{-1} , fueron desensambladas por diálisis contra amortiguador de desensamblaje (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl pH 7.2) por 48 h a 4 °C. Una vez disociada la proteína del CCMV se agrega una concentración conocida de CYP para posteriormente inducir la formación de cápsidas del CCMV en el siguiente amortiguador: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , pH 7.2. La diálisis se llevó a cabo por 16 h a 4 °C. La encapsulación del CYP se ensayó a tres diferentes relaciones molares CCMV-CYP: 4:1, 12:1 y 20:1. Para todos los casos la concentración de enzima se mantuvo constante (2.25 μM). El volumen final de estos ensayos de encapsulamiento fue de 50 μL , por lo que se llevaron a cabo microdiálisis. La determinación de la concentración de proteína para el CCMV se lleva a cabo midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando la siguiente ecuación:

$$CCMV_{\text{mg mL}^{-1}} = (Abs_{280})(1197.7) - 24.032$$

La formación de cápsidas con enzima asociada fue evaluada por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando el siguiente amortiguador de corrida: 0.1 M acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH6. Una alícuota (10 μL) de cada ensayo de encapsulación fue mezclada con 3 μL de glicerol al 100% y cargada en el gel. Las muestras se corrieron a 4 °C por 3 h a 65 V para

posteriormente teñir el gel con InstantBlue (Expedeon) por 1 h. El gel se dejó destiñendo en agua por 16 h para mejorar la visualización de las bandas.

Para la caracterización de las VLPs con CYP en su interior se llevó a cabo el encapsulamiento en un volumen de reacción final de 300 μL usando la relación molar CCMV-CYP 12:1. Se usó una concentración de CCMV igual a 27 μM y una concentración de CYPBM3 igual a 2.25 μM . El proceso de formación de cápsides se llevó a cabo como fue descrito anteriormente. Al finalizar el ensamblaje, la muestra se cargó en un filtro para centrifuga Amicon Ultra (0.5 mL) con una membrana de corte de 100 kDa (Merck Millipore) y fue centrifugada por 5 min a 7000 x g a 4 °C. La muestra fue lavada 5 veces con amortiguador de ensamblaje para remover el CYP libre y proteína del CCMV desensamblada. Finalmente la muestra se concentró a un volumen de 50 μL . Una alícuota del encapsulado (5 μL) fue cargada en un gel SDS-PAGE al 12% para verificar la integridad de ambas proteínas, CCMV y CYP; así como para estimar por densitometría la cantidad de CYP encapsulado por cápside de CCMV. La curva de calibración se construyó cargando en el gel de acrilamida distintas concentraciones conocidas de CCMV (1, 5 y 10 μg) y CYPBM3 (0.1, 0.25, 0.5 y 1 μg). Se tomó en cuenta que en promedio cada cápside está compuesta por 180 subunidades ($T=3$).

El diámetro promedio de las VLPs CCMV-CYP fue determinado midiendo el tamaño de las cápsides en las fotografías tomadas por el TEM por medio del software ImageJ (U.S. National Institutes of Health). El diámetro para cada cápside fue calculado como la media geométrica de dos mediciones ortogonales.

11.1 *Medición de actividad en partículas pseudovirales CCMV-CYP*

La determinación de la actividad catalítica de las cápsides del CCMV con CYP en su interior se realizó utilizando al tamoxifen como sustrato. La mezcla de reacción (0.1 mL) contenía 140 μM tamoxifen y alrededor de 58 picomoles de CYP encapsulado en amortiguador 100 mM fosfato de potasio (pH 7.4) adicionado con 2 mM ácido ascórbico. Esta mezcla se dejó incubando en agitación constante por 10 min antes de iniciar la reacción con 5 mM H_2O_2 . La reacción se llevó a cabo por 30 min a 25 °C para finalmente ser detenida al agregar 10 μL de ácido acético. La muestra fue centrifugada y analizada por HPLC como se describió previamente.

12. Encapsulación del CYPBM3 “21B3” en cápsidas derivadas del bacteriófago P22

12.1. Clonación del gen CYPBM3 en el vector pETDuet+SP+CP P22.

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar el gen que codifica para el CYPBM3 con la inserción de los sitios de restricción NcoI y BamHI, para permitir la posterior ligación del gen en el vector pETDuet. Los oligos fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA).

CYPNco1fw	5' AAAAATCATGCCATGGCAATTAAGAAATGCCT 3'
CYPBamH1Reverse	5' AAAAAAGCGGGATCCAGTGCTAGGTGAAGGAA 3'

Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como templado el plásmido pCWori CYPBM3, 10 picomolas de cada oligo y Pfu Ultra DNA polimerasa (Agilent Technologies). La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo	No. Ciclos
95 °C	5'	1
95 °C	30''	35
55 °C	30''	
68 °C	2'	
68 °C	5'	1
10 °C	∞	1

Se comprobó la amplificación del gen (≈ 1400 pb) por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando TAE como amortiguador de corrida. Se utilizó un voltaje de 100 V durante 25 min.

La reacción de PCR se digirió con 1 μ L de DpnI (New England Biolabs) por 2 h a 37 °C para eliminar el plásmido parental. A continuación se limpió la reacción utilizando MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) y se resuspendió el DNA en 40 μ L de agua grado mQ.

El producto de PCR fue digerido con 40 unidades de las enzimas de restricción NcoI y BamHI (New England Biolabs) en el amortiguador indicado por el proveedor (Amortiguador 4). El volumen total de la reacción se llevó a 50 μ L y se incubó a 37 °C por 16 h. El plásmido pETDuet que contiene el

gen del fragmento de la proteína de andamiaje, SP₁₄₁₋₃₀₃, y la proteína de capa del bacteriófago P22, se digirió de la misma manera que el producto de PCR explicado anteriormente. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE. Se cortó la banda correspondiente al vector linearizado y se hizo la extracción de DNA del gel de agarosa utilizando QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

A continuación se llevó a cabo la ligación entre el producto de PCR que codifica para el gen del CYPBM3 y el vector linearizado pETDuet+SP+CP P22 utilizando la enzima T4-DNA ligasa (New England Biolabs) incubando a temperatura ambiente durante 6 h. Se tomó 1 µL de la ligación para transformar 25 µL de células electrocompetentes 10G (Lucigen). Se plaqueron 250 µL de células transformadas en una caja de LB con ampicilina y se dejó crecer por 16 h a 37 °C. Se verificó al presencia de inserto (gen CYPBM3) para 16 colonias por una reacción de PCR de colonia con los oligonucleótidos CYPNco1fw y CYPBamH1Reverse, siguiendo el mismo programa de PCR antes reportado.

Finalmente se pusieron a crecer 3 clonas al azar (con inserto previamente verificado) para purificar plásmido por lisis alcalina utilizando soluciones y columnas de Qiagen (QIAprep Spin Miniprep kit). Los plásmidos se mandaron a secuenciar a Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA) y se comprobó la incorporación correcta del gen CYPBM3 en el vector pETDuet en fase con la proteína de andamiaje dando como resultado el plásmido pETDuet CYP-SP + CP P22.

12.2. *Clonación del gen CYPBM3-SP en el vector pBAD.*

Para clonar el gen del citocromo fusionado al gen de la proteína de andamiaje (CYP-SP) en el vector pBAD, se digirió el plásmido pETDuet CYP-SP + CP P22 con 30 unidades de las enzimas de restricción NcoI y SacI (New England Biolabs) a 37 °C durante 3 h. Se limpió la reacción utilizando MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) y se resuspendió el DNA en 30 µL de agua grado mQ. Posteriormente se incubó la muestra con 2.5 unidades de fosfatasa antártica (New England Biolabs) por 16 h a 37 °C en un volumen final de 30 µL, con el fin de defosfatar el vector pETDuet, aún presente en la mezcla, y así evitar su recircularización. Se llevó a cabo la inactivación de la enzima a 65 °C durante 30 min.

El plásmido pBAD se digirió también con 30 unidades de las enzimas de restricción NcoI y SacI (New England Biolabs) a 37 °C durante 3 h. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE. Se cortó la banda correspondiente al vector linearizado y se hizo la extracción de DNA del gel de agarosa utilizando QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

A continuación se llevó a cabo la ligación entre el gen CYP-SP y el vector linearizado pBAD utilizando la enzima T4-DNA ligasa (New England Biolabs) incubando a temperatura ambiente durante 6 h. Se tomó 1 µL de la ligación para transformar 25 µL de células electrocompetentes 10G (Lucigen). Se plaqueron 250 µL de células transformadas en una caja de LB con ampicilina y se dejó crecer por 16 h a 37 °C. Se verificó la presencia de la construcción CYP-SP para 8 colonias por una reacción de PCR de colonia con los oligonucleótidos CYPNco1fw y CYPBamH1Reverse, siguiendo el mismo programa de PCR antes reportado.

Finalmente se pusieron a crecer 2 clonas al azar (con inserto previamente verificado) para purificar plásmido por lisis alcalina utilizando soluciones y columnas de Qiagen (QIAprep Spin Miniprep kit). Los plásmidos se mandaron a secuenciar a Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA) y se comprobó la incorporación correcta del gen CYP-SP en el vector pBAD, dando como resultado el plásmido pBAD CYP-SP.

12.3. *Expresión simultánea del CYPBM3-SP y CP P22*

El plásmido pETDuet CYP-SP + CP P22 (105 ng) fue transformado en 25 µL de células electrocompetentes BL21 (Lucigen). Al final de 1 hora de recuperación, 20 µL de células fueron plaqueadas en cajas de LB con ampicilina y crecidas por 16 h a 37 °C.

Se siguieron dos esquemas de inducción. Para el primero de ellos, se tomaron 2 mL de un precultivo de la cepa transformada para inocular un cultivo de 250 mL de medio TB (Terrific Broth) con Amp adicionado con 0.5 mM de Tiamina y elementos traza. Se dejó crecer a 37 °C a 180 rpm hasta alcanzar una $OD_{600}=0.8$. En este punto se indujo con 0.5 mM de IPTG y se añadió 1 mM de ácido aminolevulínico. Se dejó crecer el cultivo por 5 h más a 30 °C a 135 rpm. Para el segundo esquema, se tomaron 2 mL de un precultivo de la cepa transformada para inocular un cultivo de 250 mL de medio TB (Terrific Broth) con Amp adicionado con 0.5 mM de Tiamina y elementos

traza. Se dejó crecer a 37 °C por 7 h a 150 rpm. En este punto se indujo con 0.5 mM de IPTG y se añadió 1 mM de ácido aminolevulínico. Se dejó crecer el cultivo por 15 h más a 30 °C a 135 rpm.

Al término de la inducción los cultivos se centrifugaron en frío a 3840 x *g* por 10 min, se resuspendieron las células en amortiguador de lisis (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.6) y se sonicó la muestra. Se centrifugó a 12000 x *g* por 30 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

12.4. *Expresión diferencial del CYPBM3-SP y CP P22*

Se electroporaron los plásmidos pBAD CYP-SP y pRSF CP (30 ng de cada uno) en 25 µL de células competentes BL21 (Lucigen). Al final de 1 hora de recuperación, 20 µL de células fueron plaqueadas en cajas de LB con ampicilina y kanamicina y fueron crecidas por 16 h a 37 °C.

Se expresó primero la proteína del CYP-SP para posteriormente expresar la proteína de capa CP. Se siguieron dos esquemas con distintas concentraciones de inductor. Se llevó a cabo 1 L de cultivo distribuido en 4 matraces con 250 mL cada uno. Se tomaron 2.5 mL de un precultivo de la cepa transformada para inocular cada cultivo de 250 mL de medio TB (Terrific Broth) con Amp y Km adicionado con 0.5 mM de Tiamina y elementos traza. Se dejó crecer a 35 °C a 150 rpm durante 7 h. En este punto se indujo la expresión del CYP-SP con 0.2% L-arabinosa y se añadió 1 mM de ácido aminolevulínico. Se dejaron crecer los cultivos por 16 h más a 30 °C a 120 rpm. Posteriormente se indujo la expresión de la CP adicionando 0.5 mM de IPTG y se crecieron los cultivos por 3 h más a 30 °C y 150 rpm. Para el segundo esquema de inducción se realizó la expresión diferencial como se explicó anteriormente, pero se utilizó 0.125% L-arabinosa y 0.3 mM IPTG para inducir los cultivos.

Al término de la inducción los cultivos se centrifugaron en frío a 3840 x *g* por 10 min, se resuspendieron las células en amortiguador de lisis (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.6) y se sonicó la muestra. Se centrifugó a 12000 x *g* por 30 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

12.5. *Purificación de cápsides P22*

Para la purificación de las cápsides del P22 se ultracentrifugó el sobrenadante (~20 mL por cada 250 mL cultivo), proveniente de la lisis de células, utilizando un colchón de sacarosa al 35% (5 mL) preparado en amortiguador PBS (50 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaCl, pH 7). La ultracentrifugación se llevó a cabo a 215041 $\times g$ (45 000 rpm) durante 50 min a 4 °C utilizando un rotor F50L-8X39 FiberLite Piramoon Technologies, Inc. (Sorvall WX Ultra 80, Thermo Scientific). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en amortiguador PBS (~2.5 mL) utilizando agitación leve y constante a 4 °C.

Posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 $\times g$ por 15 min a 4 °C (remoción de agregados) y se cargó en una columna de filtración en gel HiPrep 16/60 Sefacril S-500 HR (GE Healthcare) utilizando un flujo de 1 mL min⁻¹ de amortiguador PBS. La cromatografía tuvo una duración de 100 min. Las fracciones correspondientes a la elución de las cápsides correctamente ensambladas (con un pico máximo alrededor de los 65 min) fueron colectadas y posteriormente concentradas por medio de una ultracentrifugación (sin colchón de sacarosa) a 45 000 rpm durante 50 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de cápsides en 100 mM Tris-HCl pH 8 utilizando agitación leve y constante a 4 °C.

El tamaño de las cápsides (radio hidrodinámico), la polidispersión de la muestra y la masa absoluta de las cápsides fue determinado por medio de una cromatografía de filtración en gel en HPLC, acoplado a los detectores UV-vis (Agilent), láser multiángulo de dispersión de luz (MALS) Wyatt HELEOS, índice de refracción (RI) Optilab rEX y dispersión cuasielástica de luz (QELS). Se inyectaron 25 μ L de encapsulado P22-CYP en una columna de filtración en gel WTC-0200S (Wyatt Technologies) utilizando un flujo de 0.7 mL min⁻¹ a lo largo de 25 min en amortiguador 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 200 ppm azida de sodio, pH 7.2. La muestra debe de estar a una concentración aproximada de 1 mg mL⁻¹ ($\epsilon_{280}=1.45 \text{ mg}^{-1}\text{mL cm}^{-1}$).

12.6. *Número y concentración de CYP-SP por cápside P22*

El número de enzimas por cápside fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$CYP.SP_{por\ c\acute{a}pside} = \frac{M_{c\acute{a}pside+CYP.SP} - M_{c\acute{a}pside}}{M_{CYP.SP}}$$

Donde $M_{c\acute{a}pside+CYP.SP}$ = Masa absoluta de la cápside con enzima encapsulada (valor determinado experimentalmente por HPLC-MALS-RI). $M_{c\acute{a}pside}$ = 46.6 kDa x 420 subunidades = 19572 kDa. $M_{CYP.SP}$ = 71.5 kDa (calculado teóricamente con el programa Serial Cloner 2.6, Franck Perez, SerialBasics). Usando el número de enzimas por cápside se pudo calcular la concentración de CYP-SP en la muestra de la siguiente manera (Patterson, 2012. Información suplementaria):

$$A_T = A_{CP} + A_{CYP.SP}$$

Donde A_T es la absorbancia total de la muestra a 280 nm, A_{CP} es la contribución de la absorbancia de la proteína de capa y $A_{CYP.SP}$ es la contribución de la absorbancia del CYPBM3 fusionado a la proteína de andamiaje. Para medir la absorbancia total de la muestra se desnaturalizó una alícuota del encapsulado P22-CYP en amortiguador PBS con 6 M cloruro de guanidina y 1 mM β -mercaptoetanol, después de 5 min de incubación se registra la Abs_{280} .

La ecuación anterior puede ser reescrita de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer como:

$$A_T = C_{CP}\epsilon_{CP}l + C_{CYP.SP}\epsilon_{CYP.SP}l$$

Donde C_{CP} y $C_{CYP.SP}$ son las concentraciones de proteína para CP y CYP-SP respectivamente; ϵ se refiere a los coeficientes de extinción para cada una de las proteínas, $\epsilon_{280\ CP} = 44920\ M^{-1}cm^{-1}$ y $\epsilon_{280\ CYP.SP} = 52830\ M^{-1}cm^{-1}$ (calculados teóricamente con el programa ProtParam, Gasteiger, 2005); y l es la distancia que recorre la luz a través de la celda (en este caso = 1 cm).

A continuación se puso la ecuación en términos de una sola variable, $C_{CYP.SP}$, utilizando la relación entre el número de CP y el número de CYP-SP por cápside. Ejemplo (suponiendo que se encapsularon 109.7 CYP-SP por cápside):

$$420\ CP : 109.7\ CYP.SP \qquad 420/109.7 = 3.8$$

$$C_{CP} = 3.8(C_{CYP.SP})$$

$$A_T = 3.8C_{CYP.SP}\epsilon_{CP}l + C_{CYP.SP}\epsilon_{CYP.SP}l$$

Finalmente se calcula la concentración de CYP-SP en la muestra sustituyendo en la ecuación el valor de las constantes ϵ y l , así como el valor calculado experimentalmente para la absorbancia total.

12.7. *Determinación de parámetros cinéticos para las partículas pseudovirales P22-CYP*

Se determinaron las constantes catalíticas (aparentes), k_{cat} y K_M , para el CYP encapsulado en P22 y el CYP libre utilizando como sustrato tanto el 2,6-DMP como el H_2O_2 . Para calcular los parámetros cinéticos utilizando al 2,6-DMP como sustrato se construyeron dos curvas con dos concentraciones de peróxido de hidrógeno diferentes, 5 mM y 60 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en 0.1 mL (50 mM Tris-HCl pH 8) con las siguientes concentraciones de fenol: 10, 25, 50, 125, 250 y 500 μ M. La reacción se inició al agregar 5 mM o 60 mM de H_2O_2 . La cantidad de enzima encapsulada utilizada fue 42.9 picomoles (ensayos con 5 mM H_2O_2) y 21.45 picomoles (ensayos con 60 mM H_2O_2); la cantidad de proteína fue determinada por el ensayo de concentración por unión a CO, específico para CYP450. La actividad catalítica fue monitoreada espectrofotométricamente a 468 nm ($\epsilon_{468} = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) usando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-vis. Las constantes catalíticas se obtuvieron por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

Para la determinación de parámetros cinéticos utilizando al CYP libre se utilizó una cantidad de enzima igual a 27.3 picomoles (ensayos con 5 mM H_2O_2) y 15 picomoles (ensayos con 60 mM H_2O_2).

En cuanto a la determinación de los parámetros cinéticos utilizando al H_2O_2 como sustrato se utilizó una concentración fija de 2,6-DMP igual a 500 μ M para los ensayos de actividad. Las reacciones se llevaron a cabo en 0.1 mL (50 mM Tris-HCl pH 8) con las siguientes concentraciones de peróxido: 1, 2, 5, 10, 20, 40 y 60 mM. La reacción se inició al agregar la cantidad correspondiente de H_2O_2 . La cantidad de enzima encapsulada utilizada fue 42.9 y 21.45 picomoles; la cantidad de proteína fue determinada por el ensayo de concentración por unión a CO, específico para CYP450. La actividad catalítica fue monitoreada espectrofotométricamente a 468 nm ($\epsilon_{468} = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) usando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-vis. Las constantes catalíticas se obtuvieron por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

Para la determinación de parámetros cinéticos utilizando al CYP libre se utilizó una cantidad de enzima igual a 30 y 15 picomoles.

Para determinar la integridad de las partículas pseudovirales P22-CYP ante la presencia de 5 y 60 mM de H₂O₂, se incubaron 115 µg de partículas disueltas en 100 µL (100 mM Tris-HCl pH 8) con las concentraciones de peróxido de hidrógeno antes mencionadas durante 5 min. Posteriormente el diámetro de las cápsides fueron monitoreadas por dispersión dinámica de luz durante 4 min.

12.8. *Estabilidad a la temperatura de las partículas pseudovirales P22-CYP*

Se determinó la estabilidad del CYP encapsulado y la enzima libre midiendo el porcentaje de retención de actividad a distintos tiempos al incubar la proteína a 40 y 50 °C en un baño de agua.

Los tiempos de incubación para cada una de las temperaturas fueron 0, 5, 10, 15 y 30 min. Al cabo de cada tiempo se sacó una alícuota de la muestra, se centrifugó por 1 min a 16 000 x g y se dejó reposar por 10 min para atemperar la muestra antes de medir la actividad. La actividad catalítica se midió en un volumen final de 0.1 mL en amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8 utilizando como sustrato 500 µM 2,6-DMP e iniciando la reacción con 5 mM H₂O₂.

12.9. *Perfil de actividad pH y estabilidad a pH ácido de las partículas pseudovirales P22-CYP*

Para determinar el perfil de actividad a distintos valores de pH para la enzima encapsulada y libre se midió la actividad catalítica a los siguientes pHs: 5 (100 mM acetato de sodio), 6 (100 mM fosfato de potasio), 7, 8 y 9 (100 mM Tris-HCl), 10 (100 mM boratos). La actividad catalítica se midió en un volumen final de 0.1 mL utilizando como sustrato 500 µM 2,6-DMP e iniciando la reacción con 5 mM H₂O₂.

Se determinó la estabilidad del CYP encapsulado y la enzima libre a pH ácido (pH 5 y 6) midiendo el porcentaje de retención de actividad al incubar la proteína a pH 5 y pH 6. Se incubó la muestra (a temperatura ambiente) por 1 y 16 h en amortiguador 100 mM acetato de sodio para pH 5 y

amortiguador 100 mM fosfato de potasio para pH 6. Al cabo de cada tiempo se sacó una alícuota de la muestra y se centrifugó por 3 min a 16 000 x g. La actividad catalítica se midió en un volumen final de 0.1 mL en amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8 utilizando como sustrato 500 μ M 2,6-DMP e iniciando la reacción con 5 mM H₂O₂.

12.10. *Estabilidad de las partículas pseudovirales P22-CYP a la degradación por proteasas*

Para los ensayos de proteólisis, la enzima encapsulada y libre, se trataron con 10 U de tripsina por mg de proteína, incubando por 1 y 20 h a temperatura ambiente. Al cabo de cada tiempo se sacó una alícuota de la muestra y se midió la actividad residual en amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8 utilizando como sustrato 500 μ M 2,6-DMP e iniciando la reacción con 5 mM H₂O₂.

12.11. *Determinación de átomos de hierro en CYP-SP por ICP-MS*

Se determinó la cantidad de hierro y azufre en una muestra de partículas pseudovirales P22-CYP, por medio de una espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, por sus siglas en inglés), con el fin de calcular el número de CYPBM3 con hemo incorporado en la estructura. El azufre se utiliza como referencia para calcular el número de cápsides por litro en la muestra. El número de azufres por cápside es igual a 8401 (23 S por cada CYP-SP y 14 S por cada CP).

Teniendo en cuenta que el límite de detección para el Fe es de 0.03 mg L⁻¹ y el del S es de 0.1 mg L⁻¹, se utilizaron 21.6 mg de encapsulado P22-CYP para estar por arriba del límite de detección para ambos átomos. La muestra fue incubada en ácido nítrico concentrado por 16 h a 70 °C, una vez solubilizada, la muestra se lleva a un volumen final de 50 mL alcanzando una concentración final del 5% HNO₃ en agua mQ. Se preparó también, como control, una muestra con la misma cantidad de amortiguador en el que viene disuelta la proteína, se llevó a un volumen final de 50 mL a una concentración final del 5% HNO₃ en agua mQ. Las muestras se mandaron analizar a Energy Laboratories, Inc. (Billings, MT, EUA).

13. Molaridad de confinamiento y porcentaje de ocupación de la cápside (CCMV y P22)

La concentración de enzima dentro de la cápside, molaridad de confinamiento, se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$M_{conf} = \frac{(Enzimas_{por\ cápside}) \left(\frac{1\ mol}{6.022 \times 10^{23}\ enzymes} \right)}{Volúmen\ interno_{cápside}}$$

El volumen interno de la cápside de CCMV es 4.7×10^{-21} L ($4711\ nm^3$) con un $r_{interno} = 10.4\ nm$; mientras que para el P22 es 5.8×10^{-20} L ($58000\ nm^3$) con un $r_{interno} = 24\ nm$.

El porcentaje de ocupación de la cápside por la enzima se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Ocupación} = \frac{(Enzimas_{por\ cápside})(Volumen_{CYP})}{Volumen\ interno_{cápside}} \times 100$$

El volumen del CYPBM3, $150.5\ nm^3$, fue calculado obteniendo el radio promedio de la proteína ($3.3\ nm$) con la ayuda del software Maestro 9.6 (Schrödinger, Inc.).

14. Análisis de VLPs por microscopio electrónico de transmisión.

Se depositaron $6\ \mu L$ de muestra (alrededor de $100\ \mu g\ mL^{-1}$) en una rejilla de cobre cubierta de Formvar (Electron Microscopy Science). Después de $1\ min$, se removió el líquido remanente con un papel filtro Whatman. Se agregaron $6\ \mu L$ de acetato de uranilo al 2% a la rejilla, después de $1\ min$ se removió el exceso de agente de contraste con papel filtro. Las muestras fueron vistas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 operado a $200\ keV$ y equipado con una cámara digital BioScan 600-W 1x1K montada en la parte superior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Expresión y purificación del CYPBM3 “21B3”

El CYP fue expresado de manera heteróloga en *E. coli* y purificado por cromatografía de afinidad, aprovechando el tag de histidinas presente en el carboxilo terminal de la proteína.

Como se puede observar en el gel de acrilamida, se logró obtener al CYP con un alto grado de pureza (93%), siendo la banda mayoritaria de alrededor de 55 kDa la que corresponde al peso molecular del dominio hemo del CYPBM3 (Fig. 13). En total se lograron obtener alrededor de 5 mg de CYP puro a partir de un cultivo de 100 mL (50 mg L^{-1}).

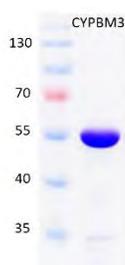


Figura 13. CYPBM3 “21B3” (55 kDa) purificado por cromatografía de afinidad. Gel SDS-PAGE (12%) con tinción de Coomassie.

La cromatografía de afinidad nos permitió en un solo paso la purificación del CYPBM3, siendo la cantidad de enzima producida más que suficiente para llevar a cabo los experimentos posteriores de encapsulación en proteína viral. El CYP producido es soluble y puede ser conservado por un largo periodo de tiempo a -20°C en presencia de 10% de glicerol.

2. Expresión y purificación de la proteína viral VP1

La expresión de la proteína de cápside viral VP1 de Poliomavirus murino se llevó a cabo heterológamente en *E. coli*. La proteína expresada se produce como una proteína de fusión GST-VP1 con la finalidad de facilitar su purificación. Una vez purificada la fusión, se digiere la muestra con trombina y se incuba nuevamente con la resina glutatión sefarosa para obtener VP1 de forma libre (Fig. 14). Con este método se logró simplificar el proceso de obtención de VP1 y remover

prácticamente toda la GST, uno de los contaminantes más abundantes en la purificación de la proteína viral.

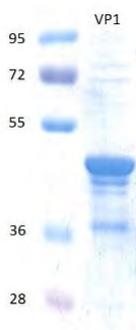


Figura 14. VP1 del poliomavirus murino (42.5 kDa) purificado por cromatografía de afinidad. Se observan bandas de degradación. Gel SDS-PAGE (12%) con tinción InstantBlue.

Al final del proceso de purificación se obtuvo VP1 con una pureza del 72%. En total se lograron obtener alrededor de 0.7 mg de VP1 pura a partir de un cultivo de 100 mL (7 mg L^{-1}). Es importante que inmediatamente después de la purificación se congelen las muestras a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ o se proceda al ensamblaje de las VLPs ya que la proteína se proteolisa rápidamente, generando una banda característica de alrededor de 36 kDa visible en la Fig. 14 (Stubenrauch, 2000).

3. Sustratos alternos para la evaluación de la actividad del CYPBM3 “21B3”

De manera natural la reacción que cataliza el CYPBM3 es la hidroxilación de cadenas de ácidos grasos; sin embargo, la medición de la actividad con estos compuestos es complicada ya que la detección de los productos de transformación requiere de metodologías como el HPLC y la cromatografía de gases que consumen una gran cantidad de tiempo. Es por ello que se hizo una búsqueda de sustratos alternos que pudiera transformar la enzima y cuyo producto fuera fácilmente detectable, ya sea por espectrofotometría UV/vis o por fluorescencia.

Se midió la actividad del CYPBM3 “21B3” con cuatro 7-alcoxi-resorufinas; metoxiresorufina (MROD), etoxiresorufina (EROD), pentoxiresorufina (PROD) y benzilresorufina (BROD), sustratos comunes para los CYP450 y cuyo producto, resorufina, es fluorescente. Se encontró actividad significativa para dos de estos sustratos: PROD y BROD con actividades específicas de $0.00174 (\pm 0.0003)$ y $0.000031 (\pm 7.9 \times 10^{-7}) \text{ } \mu\text{moles } \mu\text{moles}^{-1} \text{ CYP min}^{-1}$ respectivamente (Experimentos llevados a cabo por la Biól. Sandra Hernández del laboratorio del Dr. Javier Espinosa) (Fig. 15A). La

importancia de contar con un sustrato fluorescente radica en que este tipo de ensayos son altamente sensibles, ya que se pueden detectar cantidades muy pequeñas de producto; en particular, la resorufina es un compuesto que produce una gran cantidad de fluorescencia a longitudes de onda altas, por lo que se disminuye la interferencia que puedan generar otros compuestos presentes en el ensayo. Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos para el PROD encontrando una $k_{cat} = 0.0012 (\pm 0.00024) \text{ min}^{-1}$ y una $K_M = 1.37 (\pm 0.12) \mu\text{M}$.

Por otro lado, se evaluó la actividad del CYPBM3 con tres diferentes fenoles que pueden ser transformados por peroxidasa y cuyos productos de reacción pueden ser detectados espectrofotométricamente: 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP), 2-metoxifenol y *p*-nitrofenol (*p*-NO₂). El 2,6-dimetoxifenol fue el único sustrato que pudo ser oxidado por el CYPBM3. El producto de la reacción da como resultado un dímero del 2,6-DMP (3,3',5,5'-tetrametoxi bifeníl-4,4'-diol), que se formó por la unión de dos radicales fenoxilo generados por la oxidación de un electrón (Adelakun, 2012) (Fig. 15B). Este acoplamiento de fenoles, típica de peroxidasa, es una reacción que ha sido descrita para algunos CYP450 (Mansuy, 1998). Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos para este compuesto, encontrando una $k_{cat} = 143.6 (\pm 4.6) \text{ min}^{-1}$ y una $K_M = 24.9 (\pm 3.3) \mu\text{M}$.

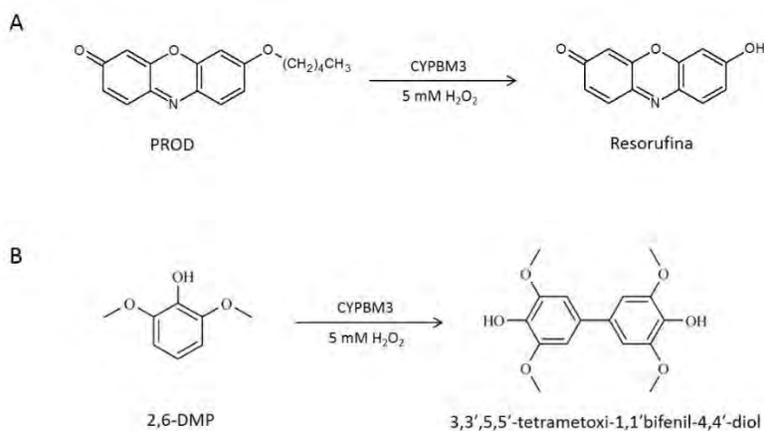


Figura 15. Transformación de compuestos alternos por el CYPBM3 "21B3". A) Reacción con PROD. B) Reacción con 2,6 DMP.

El ensayo espectrofotométrico utilizando al 2,6-DMP como sustrato, presenta una ventaja fundamental comparado con el único otro ensayo colorimétrico reportado para el CYPBM3

(Schwaneberg, 1999), ya que el compuesto a transformar está disponible comercialmente, a diferencia del ácido *p*-nitrofenoxicarboxílico (*p*NCA) que tiene que ser sintetizado en el laboratorio; cabe resaltar que las actividades catalíticas para el 2,6-DMP y *p*NCA, se encuentran en el mismo orden de magnitud (*p*NCA = 430 min⁻¹ utilizando 10 mM H₂O₂; Cirino, 2003).

La fácil obtención de los sustratos y detección de los productos de las reacciones enzimáticas de ambos sustratos con el CYPBM3; así como la capacidad de la enzima mutante para utilizar el peróxido de hidrógeno como la fuente donadora de oxígeno, han generado ensayos altamente prácticos para la detección de actividad para este CYP, que serán útiles para la determinación de actividad en las partículas pseudovirales. Estos sustratos son los suficientemente pequeños (diámetro cinético 2,6-DMP = 7.5 Å; PROD = 6.8 Å) para entrar por los poros de las cápsides virales utilizadas en el proyecto.

De aquí en adelante se decidió trabajar a una concentración de 5 mM de H₂O₂, a pesar de estar por debajo de la K_M reportada para la mutante 21B3. La vida media del CYPBM3 en saturación de peróxido de hidrógeno (60 mM) es muy baja por lo que la medición de los parámetros cinéticos a esta concentración no es confiable. A 5 mM de peróxido se asegura la integridad del CYP y de la cápside viral por el tiempo necesario que toma la medición de la actividad enzimática.

4. Transformación de profármacos anticancerígenos por el CYPBM3 “21B3”

Se evaluó la capacidad del CYP para transformar una serie de profármacos anticancerígenos, con el fin de proponer un uso práctico a las partículas pseudovirales con CYP en su interior bajo el contexto de la terapia de activación de profármacos por medio de enzimas. Los seis profármacos utilizados fueron seleccionados en base a reportes previos de CYP humanos con la capacidad de transformar estos medicamentos (Huttunen, 2008; McFadyen, 2004): tamoxifen, ifosfamida, ciclofosfamida, tegafur, dacarbazina y resveratrol. De los sustratos ensayados, únicamente el tamoxifen y el resveratrol fueron transformados por el CYP (Anexo 3).

Masas y Proteómica, Universidad de Queens, Canadá) (Anexo 2). Los compuestos identificados corresponden al 4-hidroxitamoxifen, 4-hidroxi-*N*-desmetiltamoxifen (endoxifen), *N*-desmetiltamoxifen y dihidroxitamoxifen. Es importante mencionar que el control de tamoxifen con peróxido de hidrógeno (sin enzima) no genera ningún perfil de productos.

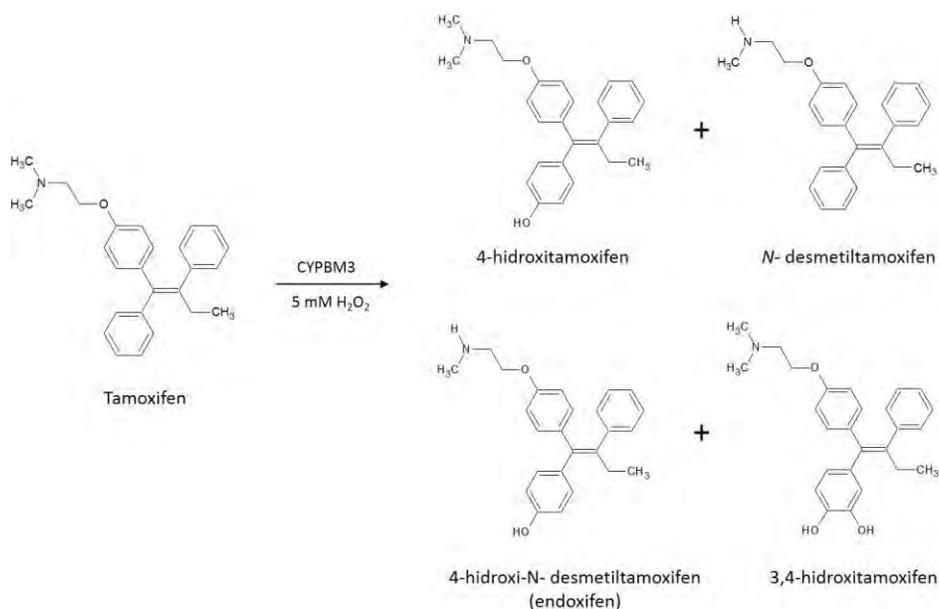


Figura 17. Productos de transformación identificados para la reacción del CYPBM3 “21B3” con el profármaco tamoxifen.

La mutante del CYP que estamos usando como modelo fue capaz de generar los dos fármacos clínicamente activos: 4-hidroxitamoxifen y endoxifen (Johnson, 2004). El *N*-desmetiltamoxifen es un precursor para formar el endoxifen. Finalmente, el compuesto dihidroxilado pudiera tratarse del 3,4-dihidroxitamoxifen, una especie reactiva que puede generar epóxidos y/o quinonas que tienen la capacidad de unirse covalentemente a DNA o proteínas causando un efecto tóxico en las células (Notley, 2002). Este efecto tóxico ayudaría a incrementar la muerte de las células tumorales.

La terapia de activación de profármacos utilizando VLPs con CYP en su interior podría ser especialmente útil para hacer más eficiente el tratamiento de cáncer de mama basado en el tamoxifen debido principalmente a dos razones. La primera está relacionada a que el gen que codifica para el CYP2D6 es altamente polimórfico, por lo que existe una fracción de la población que no puede ser beneficiada con la terapia basada en tamoxifen debido a que son deficientes en la expresión de CYP2D6, el principal responsable en la generación de endoxifen (Ingelman-

Sundberg, 2005); por lo que llevar actividad CYP450 a los tumores de estos pacientes sería de gran beneficio.

La segunda razón es que se ha encontrado que el uso a largo plazo de la terapia con tamoxifen genera daños severos en ciertos tejidos, por lo que su uso se ha limitado a no más de 5 años (Perez, 2007). La activación selectiva del profármaco en el tumor vía CYP-VLPs podría disminuir significativamente las dosis y el tiempo requerido para alcanzar el efecto terapéutico deseado reduciendo así los severos efectos secundarios asociados a otros tejidos.

4.2. Resveratrol

El resveratrol es un compuesto polifenólico producido naturalmente en plantas. Además de su papel como fitoalexina (actividades antimicrobianas y antioxidativas), se le han atribuido una serie de propiedades antiinflamatorias, cardioprotectoras y anticancerígenas, tanto para prevenir el desarrollo del tumor como para tratarlo (Pirola, 2008). Se ha encontrado que un derivado hidroxilado del resveratrol, el picetanol, tiene entre otras muchas actividades biológicas, la capacidad de funcionar como un agente quimioterapéutico más potente que el resveratrol (Lin, 2007). Este compuesto es capaz de suprimir la proliferación de células cancerosas e inducir apoptosis. Estas propiedades hacen al picetanol un fármaco potencial interesante en el tratamiento del cáncer.

El CYPBM3 "21B3" fue capaz de transformar el resveratrol en un producto tetrahidroxilado, probablemente el picetanol (Fig. 18), con una $k_{cat} = 69.8 \pm 11.4 \text{ min}^{-1}$ y una $K_M = 119 \pm 39.8 \text{ }\mu\text{M}$. El producto fue identificado por nanoLC/MSMS (Anexo 2). No se encontró transformación del resveratrol con peróxido de hidrógeno.

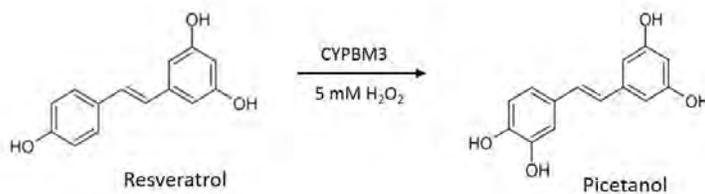


Figura 18. Productos de transformación identificados para la reacción del CYPBM3 "21B3" con el profármaco resveratrol.

Comparado con otras mutantes derivadas del CYPBM3, en donde el picetanol es el único producto de la reacción, este CYP presenta una eficiencia catalítica ligeramente mayor a las encontradas por Kim y colaboradores (2009); debido al incremento de un orden de magnitud en la velocidad de transformación de sustrato, aunque la constante de afinidad también es significativamente mayor; lo que da como resultado un eficiencia catalítica de $0.59 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$.

5. Transformación de plaguicidas por el CYPBM3 "21B3"

El uso excesivo y continuo de plaguicidas ha generado hoy en día un gran número de problemas tanto ambientales como de salud; sería interesante contar con sistemas a base de biocatalizadores con la capacidad de contender con estos problemas.

Pensando en ello, se evaluó la capacidad del CYP para transformar una serie de plaguicidas estructuralmente diversos, de carácter organoclorado y organosforado (Fig. 19).

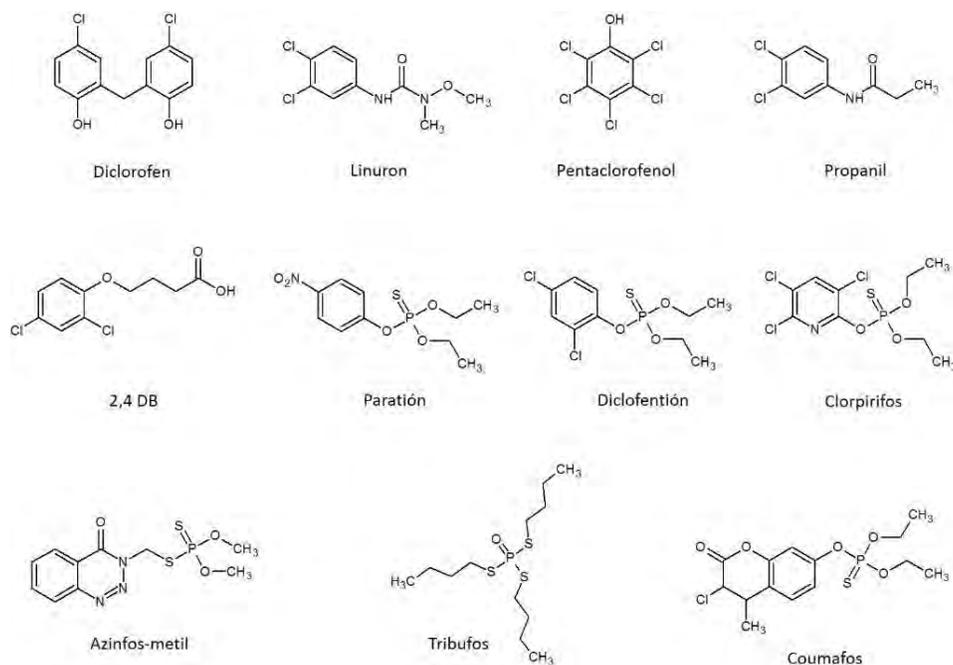


Figura 19. Estructura de los plaguicidas ensayados para la transformación enzimática por el CYPBM3 "21B3". Organoclorados: diclorofen, linuron, pentaclorofenol, propanil y 2,4-DB. Organosforados: paratión, diclofentión, clorpirifos, azinfos-metil, tribufos y coumafos.

Se encontró transformación enzimática para todos los plaguicidas ensayados, con excepción de los organoclorados propanil y 2,4-DB. Las actividades específicas para cada sustrato se reportan en la Tabla 2. De manera general, se observa que el CYPBM3 es capaz de transformar una mayor cantidad de plaguicidas tipo organofosforado y a una tasa mayor, que de plaguicidas organoclorados.

Tabla 2. Actividades específicas para la transformación de plaguicidas por el CYPBM3 "21B3"

	Plaguicida	Concentración del plaguicida (μM)	Actividad específica ($\mu\text{mol sustrato } \mu\text{mol}^{-1} \text{ CYP min}^{-1}$)
<i>Organoclorado</i>	Diclorofen	200	5.8 (± 0.42)
	Linuron	200	0.4 (± 0.12)
	Pentaclorofenol	200	0.1 (± 0.03)
	Propanil	200	ND ^a
	2,4-DB	200	ND ^a
<i>Organofosforado</i>	Paratión	100 ^b	6.4 (± 0.23)
	Diclofentión	85 ^b	3.7 (± 0.06)
	Clorpirifos	200	3.5 (± 0.17)
	Azinfos-metil	100 ^b	2.6 (± 0.07)
	Tribufos	200	1.1 (± 0.02)
	Coumafos	200	0.8 (± 0.01)

^a ND: No detectado. ^b La concentración de sustrato utilizada fue menor a 200 μM debido a la insolubilidad del compuesto en el medio de reacción.

Con el fin de estudiar la eficiencia catalítica del CYP ante estas moléculas contaminantes, se seleccionaron dos sustratos organoclorados, diclorofen y linuron (mayor actividad específica); y dos organofosforados, paratión y clorpirifos (plaguicidas organofosforados más ampliamente utilizados) para determinar sus constantes catalíticas (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros cinéticos para el CYPBM3 "21B3" utilizando plaguicidas organoclorados y organofosforados.

Plaguicida	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	r^2	$k_{\text{cat}} K_M^{-1}$ ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Diclorofen	9.2	64.1	0.97	0.143
Linuron	226.5	468.2	0.98	0.484
Paratión	10.9	59.3	0.99	0.184
Clorpirifos	65.3	59.0	0.90	1.107

La constante de afinidad (K_M) para los plaguicidas ensayados se encuentra alrededor de 60 μM , con excepción de la determinada para el linuron que es considerablemente mayor, y que presenta

también la mayor velocidad de transformación para los cuatro plaguicidas. Sin embargo, la mejor eficiencia catalítica encontrada fue para el organofosforado clorpirifos.

Al comparar la velocidad a la que son transformados estos plaguicidas por el CYPBM3 respecto a otros CYPs, encontramos para el caso específico del linuron, que la enzima utilizada en este trabajo transforma el plaguicida organoclorado a un tasa significativamente mayor ($247 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$) a la reportada para un CYP de planta, cuya actividad específica es de $7.5 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Siminszky, 1999). Comparado con la transformación por CYP humanos, en particular para el CYP2B6 y el CYP2C19, aunque presentan k_{cat} pequeñas, sus valores de K_M también lo son ($0.56 - 2 \mu\text{M}$) (Foxenberg, 2007) alcanzando mejores eficiencias catalíticas que las encontradas para el CYPBM3 “21B3” funcionando con peróxido de hidrógeno.

Se analizaron por una cromatografía de gases acoplada a masas, los productos de reacción para los cuatro plaguicidas estudiados (Fig. 20) (Anexo 4).

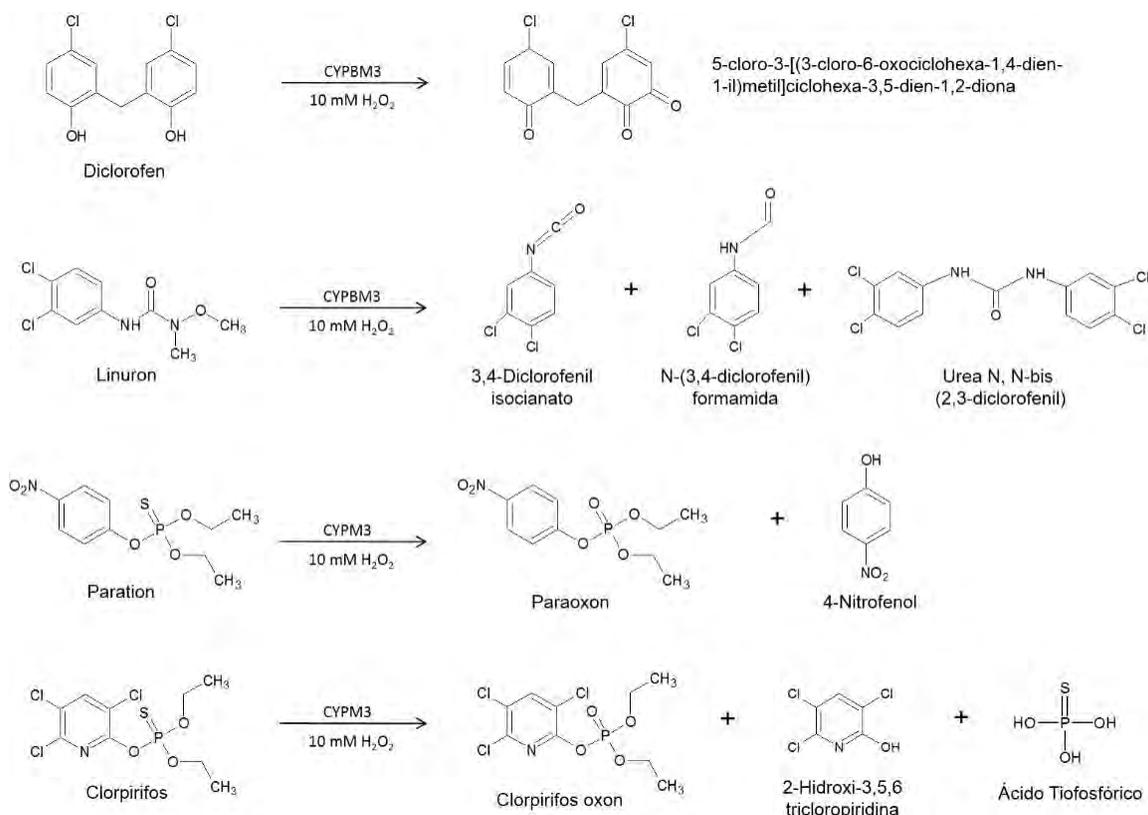


Figura 20. Estructuras de los productos identificados de la transformación de plaguicidas por el CYPBM3 “21B3”

Para la reacción con el diclorofen, se detectó un único producto identificado como 5-cloro-3-[(3-cloro-6-oxociclohexa-1,4-dien-1-il)metil] ciclohexa-3,5-dien-1,2-diona. Este producto no había sido identificado para la transformación enzimática del diclorofen utilizando otras enzimas, como la peroxidasa versátil (Davila-Vazquez, 2005) y la lacasa del hongo *Corioloopsis gallica* (Torres-Duarte, 2009). Una característica en común de la reacción del diclorofen con el CYPBM3 y la peroxidasa versátil es la generación de quinonas en el producto.

En cuanto a los productos de la reacción con linuron fueron identificadas tres moléculas distintas, el 3,4-diclorofenil isocianato, *N*-(3,4-diclorofenil) formamida y urea *N,N* bis (2,3-diclorofenil). Los primeros dos productos demuestran que el CYPBM3 es capaz de romper el enlace C-N; mientras que la formación del producto dimérico fue originado probablemente por el acoplamiento de radicales libres, producto de una reacción tipo peroxidasa. Los productos encontrados con el CYPBM3, utilizando peróxido de hidrógeno como el aceptor final de electrones, fueron diferentes a los reportados para la transformación del linuron por el CYP71A10 de la planta de soya, en donde se llevó a cabo una demetoxilación y una demetilación en el plaguicida organoclorado.

Para ambos compuestos organosforados se encontró el derivado “oxo” del plaguicida, producto de una desulfuración oxidativa, considerada una transformación activante, ya que se genera una molécula con mayor toxicidad. Se detectaron también productos del rompimiento de las moléculas de sustrato llevadas a cabo por una dearilación oxidativa, dando como resultado el 4-nitrofenol procedente del paratión, y el 2-hidroxi-3,5,6-tricloropiridina procedente del clorpirifos. Este rompimiento de la molécula se considera detoxificante ya que se generan productos con menor toxicidad que el plaguicida del cual provienen. Una variedad de isoformas de CYP humanos son capaces también tanto de generar los derivados “oxo” como de romper la molécula (Mutch, 2006).

Es posible que esta enzima no haya podido metabolizar el plaguicida 2,4-DB debido a que se ha observado, que el CYPBM3 no es capaz de transformar ácidos grasos con cadenas menores a 8 carbonos (Schwaneberg, 1999), por lo que la cadena corta de 4 carbonos presente en la molécula no fue sustrato de la enzima. Por otro lado, la inhabilidad del CYPBM3 “21B3” para transformar el propanil, a pesar de contar con una estructura similar al linuron que sí fue metabolizado, pudiera

ser atribuida a que el plaguicida no presenta átomos de nitrógeno terciarios en su estructura, justo en donde encontramos el rompimiento de la molécula del plaguicida.

La generación de productos oxidados por la transformación enzimática de plaguicidas utilizando al CYPBM3 mutante “21B3” podría aumentar la susceptibilidad de estas moléculas contaminantes a ser biodegradadas. La capacidad aumentada de esta mutante del CYPBM3 para actuar como peroxigenasa, la facilidad de su producción, así como el amplio rango de sustratos que puede metabolizar hacen de esta enzima un biocatalizador interesante para fines ambientales.

Resultados publicados en el artículo: Sanchez-Sanchez L, *et al.* (2012). Pesticide transformation by a variant of CYPBM3 with improved peroxxygenase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **102**: 169-174. (Anexo 8)

6. Encapsulación del CYP en cápsides virales

A lo largo del proyecto se implementaron distintas estrategias para encapsular al CYP dentro de cápsides virales. Fueron exitosas la encapsulación *in vitro* por cargas complementarias con el CCMV y la encapsulación *in vivo* en el bacteriófago P22. Aunado a estas estrategias, se explicarán también los otros métodos desarrollados para tratar de incorporar al CYP en el interior de las VLPs en los que no se obtuvieron resultados positivos.

6.1. Encapsulación al azar

La primera aproximación para la incorporación del CYPBM3 en VLPs consistió en una encapsulación sujeta al azar. Para ello las cápsides virales derivadas de VP6 de rotavirus o VP1 del poliomavirus murino fueron desensambladas y re-ensambladas *in vitro* en presencia de enzima usando diferentes relaciones molares de proteína viral a citocromo.

Se hizo un cálculo teórico para determinar la capacidad de carga enzimática que podrían contener las cápsides formadas por VP6 de rotavirus (nanotubo 500 nm) y VP1 del poliomavirus murino, encontrando que estas VLPs pueden resguardar en su interior alrededor de 3200 y 160 CYPBM3 respectivamente, tomando en cuenta un volumen de 150 nm³ (6.6 nm de diámetro) para la

enzima. Con esta estrategia se pretendía utilizar todo el volumen interior disponible, y no sólo la capa más cercana a la superficie interior de la nanoestructura.

Para el caso de la VLP derivada del rotavirus se estudió un rango amplio de relaciones molares VP6 a CYP: 1:9, 1:3, 1:1.5, 5:1, 50:1 y 100:1. Para todos los casos en los que el CYP estaba en exceso y la relación molar 5:1, se encontró una cantidad muy pequeña de nanoestructuras formadas y ninguna actividad asociada a éstas (Fig. 21A). Analizando estos resultados se concluyó que altas concentraciones de CYP respecto a monómeros de VP6 afectaban el ensamblaje de nanoestructuras virales. Para los ensayos de encapsulación a concentraciones bajas de CYP, en donde la proteína viral estaba en exceso, se encontró formación de nanoestructuras (Fig. 21B) pero para ninguno de los dos casos se detectó actividad CYP450 (Fig. 21C).

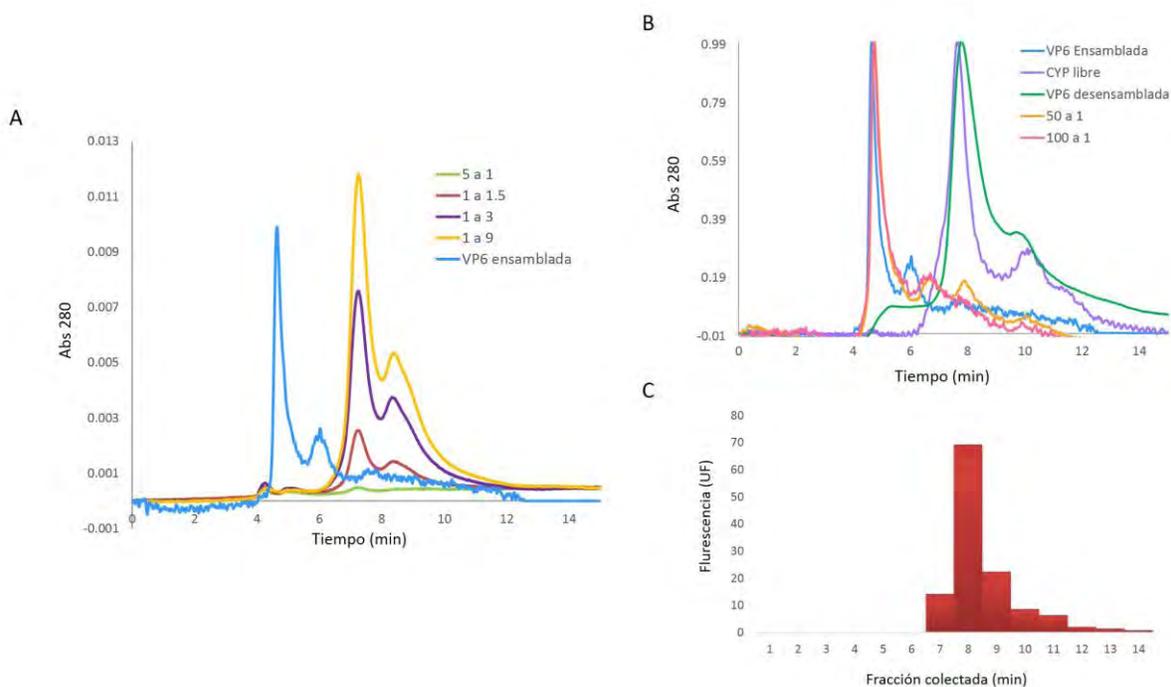


Figura 21. Encapsulación al azar del CYP utilizando VP6 de rotavirus. Cromatografía de filtración en gel en HPLC (Ultrahydrogel 500, $\lambda=280\text{nm}$) para detectar formación de nanoestructuras. A) Detección de ensamblado de nanoestructuras de VP6 utilizando relaciones molares con exceso de CYP (1:9, 1:3 y 1:1.5) y la relación molar 5:1. B) Detección de ensamblado de nanoestructuras de VP6 utilizando relaciones molares con exceso de proteína viral (50:1 y 100:1. C) Detección de actividad CYP (sustrato PROD, $E_x=530\text{ nm}$ y $E_m=585\text{ nm}$) en cada una de las fracciones colectadas por minuto resultado de la cromatografía de filtración en gel para el ensayo VP6 a CYP 50:1. Para el caso de encapsulado 100:1 no se detectó actividad.

Para el caso de la encapsulación del CYP en VP1, se utilizaron las relaciones molares VP1 a CYP de 3:1 y 10:1. La proteína viral se encuentra en exceso para promover el re-ensamblaje de las subunidades en cápsides. Aunque se encontraron nanoestructuras para ambos casos no se detectó actividad CYP450 asociado a estas (Fig. 22).

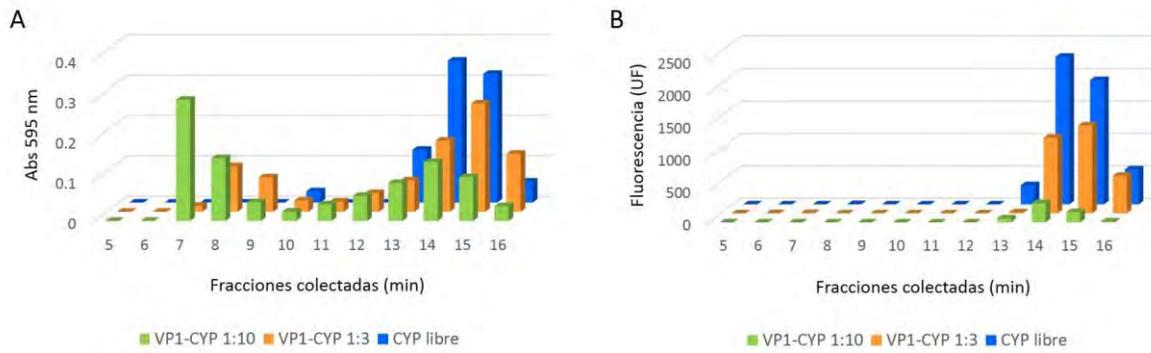


Figura 22. Encapsulación al azar del CYP en VP1 del poliovirus murino. Análisis de las fracciones eluidas de la cromatografía de filtración en gel (Superdex 200) para el CYP libre y las dos relaciones molares VP1-CYP 1:3 y 1:10. A) Medición de la concentración de proteína (Bradford, Abs 525nm) para cada fracción. B) Medición de la actividad CYP450 (sustrato PROD, Ex=530 nm y Em=585 nm) para cada fracción.

A pesar de haber muestreado una variedad de relaciones molares de proteína viral a CYP no se encontró formación de VLPs con CYPBM3 asociado por medio de esta estrategia. En la literatura existe un único ejemplo en el que se logró la incorporación *in vitro* no específica de una enzima, la peróxidasa de rábano blanco, en una partícula pseudoviral derivada del CCMV (Comellas-Aragonés, 2007). Sin embargo, el objetivo de este artículo era encapsular una sola enzima por cápside, con el fin de estudiar fenómenos de catálisis con una única molécula. Debido a los resultados obtenidos y de acuerdo a la literatura, se entiende que para lograr la encapsulación de diversas proteínas dentro de VLPs se necesita una fuerza que dirija la incorporación de éstas al interior de las cápsides virales.

6.2. Encapsulación por interacciones electrostáticas complementarias

A valores de pH cercanos a neutro la proteína VP6 de rotavirus ($pI = 5.8$; Lepault, 2001), el interior de la cápside derivada de VP1 del poliovirus murino y el CYPBM3 “21B3” ($pI = 5.3$, determinado experimentalmente) poseen una carga neta negativa (Fig. 23). Debido a que la carga de la enzima y las cápsides virales es la misma, la interacción electrostática entre ambas no es viable. Esta es

una de las posibles explicaciones para no haber encontrado encapsulación de la enzima por la técnica de atrapamiento al azar.

Para promover la encapsulación del CYP dentro de cápsides virales se implementó una estrategia basada en interacciones electrostáticas complementarias, en donde la superficie del CYP y el interior de las cápsides virales deben poseer cargas opuestas.

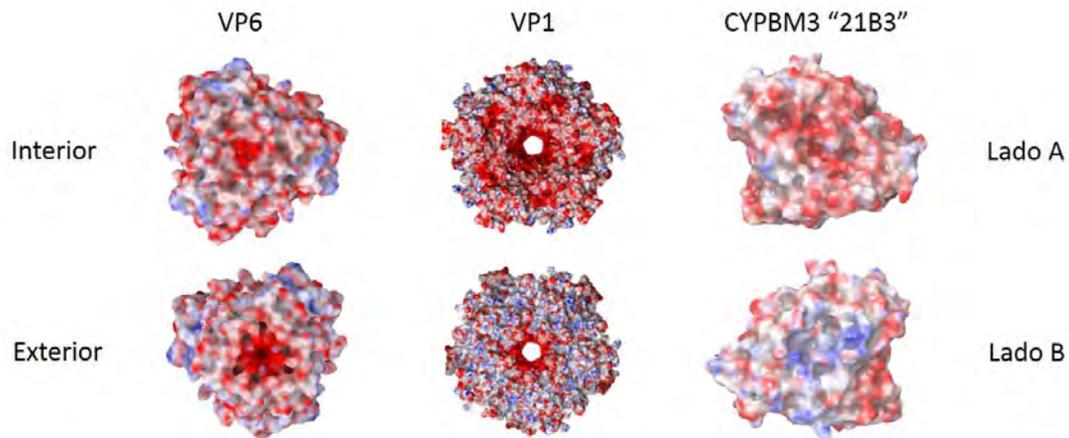


Figura 23. Potencial electrostático de la superficie de VP6 de rotavirus, VP1 del poliomavirus murino y CYPBM3 a pH 8. En rojo se muestran las cargas negativas y en azul las cargas positivas. Los cálculos se llevaron a cabo con el software Maestro 9.3.

Debido a que las cargas negativas están presentes en ambas caras de la VLP derivada de VP6 de rotavirus; no podremos dirigir selectivamente el encapsulamiento del CYP, por lo que se dejará de usar esta partícula viral.

6.2.1. Incremento de cargas superficiales positivas en el CYPBM3

Para favorecer la interacción electrostática entre la enzima y las cápsides virales derivadas de VP1 del poliomavirus murino se modificó la carga superficial del CYP para que a pH neutro o ligeramente básico posea una carga neta positiva, de esta manera podrá interactuar favorablemente con la cara interna negativa de las cápsides de VP1 para formar nanoestructuras biocatalíticamente activas.

La estrategia planteada para incrementar las cargas positivas del CYP consistió en modificar químicamente la enzima aminando los carboxilos presentes en la superficie de ésta por medio de una reacción con etilendiamina (Fig. 24). Esta estrategia nos permite incrementar de manera significativa las cargas positivas (2X) ya que además de generar grupos amino se disminuyen los grupos carboxilo poseedores de cargas negativas.

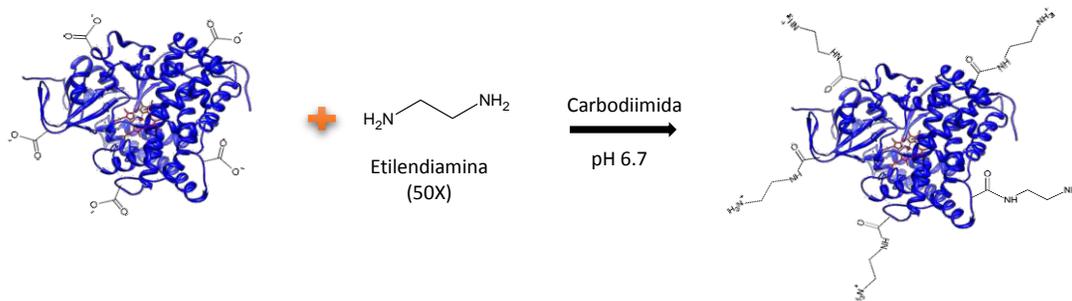


Figura 24. Esquema de la reacción del CYP con etilendiamina para incrementar las cargas positivas en la superficie de la enzima

Se llevó a cabo la reacción a pH 6.7 y se utilizó un exceso de etilendiamina de 50 veces por cada grupo carboxilo en la enzima (69 Asp+Glu totales). Se comprobó la incorporación de grupos amino al CYP por medio de un cambio en el pI de la enzima, ahora igual o mayor a 9 (Fig. 25).

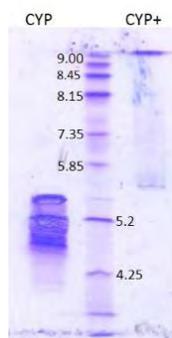


Figura 25. Punto isoeléctrico del CYPBM3 (alrededor de 5.3) y del CYP+ ($pI \geq 9$) por medio de un isoelectroenfoque. Tinción con Coomasie.

Se evaluaron los parámetros cinéticos del CYP modificado positivamente (CYP+) para el sustrato 2,6-DMP y PROD (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las constantes cinéticas para el CYP+ y el CYP nativo

Sustrato	CYP	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M
DMP	Sin modificar	143.6	24.9	5.8
	Modificado +	402.7	44.68	8.99
PROD	Sin modificar	0.0012	1.37	8.76x10 ⁻⁴
	Modificado +	0.0013	4.5	2.89x10 ⁻⁴

*Resultados por duplicado

Para la transformación del DMP, se encontró un aumento en la eficiencia catalítica de 1.5 veces para el CYP+. La modificación superficial de la carga en la enzima no afectó de manera relevante la afinidad por el sustrato, pero si la velocidad en que es transformado. La explicación a este incremento en la actividad no es clara.

Para el sustrato PROD se encontró que la versión modificada positivamente es alrededor de 3 veces menos eficiente para llevar a cabo la transformación del sustrato. A pesar de tener la misma k_{cat} , la constante de afinidad aumentó, lo que nos sugiere una disminución en la facilidad con que llega el PROD, una molécula hidrofóbica, al sitio activo de la enzima.

6.2.2. Encapsulación en nanoestructuras de VP1

Para llevar a cabo la encapsulación del CYP+ dentro de las nanoestructuras de VP1 del poliomavirus murino, se ensamblan los pentámeros de VP1 en presencia de la enzima. Debido a que ahora ambas proteínas tienen cargas complementarias, se espera que interactúen entre sí y se genere una partícula viral con enzima en su interior. En este caso el ensamblaje se promueve al remover el DTT del medio, y al adicionar iones de calcio y sulfato de amonio.

Se ensayaron las siguientes encapsulaciones con distintas relaciones molares VP1-CYP: 3:1, 5:1 y 10:1. La concentración de proteína viral se mantiene constante. Para separar el CYP libre del que haya podido quedar encapsulado, se lavó la muestra haciéndola pasar cinco veces por un centrífugo de corte molecular de 100kDa. Posteriormente se midió la actividad usando como sustrato el PROD, ya que genera un producto cuyo límite de detección es bajo. El único ensamblado con actividad fue el correspondiente a 3:1 (Fig. 26); sin embargo, la actividad encontrada fue mínima. El control para detectar si hay obstrucción de los poros de la membrana

del centración por VP1, VP1 previamente ensamblada más CYP, da negativo, por lo que la actividad detectada podría deberse a una encapsulación.

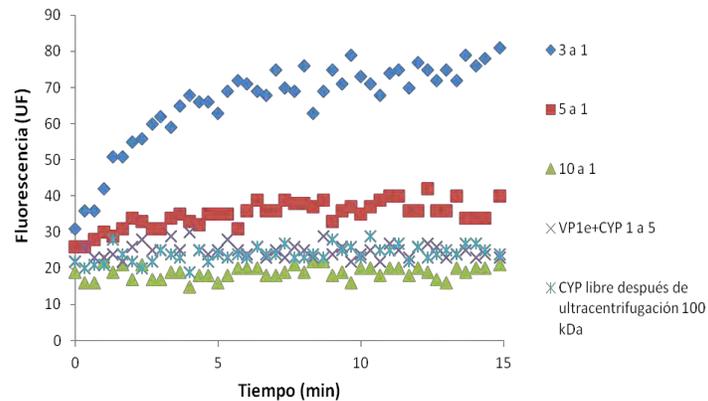


Figura 26. Actividad de los encapsulados VP1-CYP a distintas relaciones molares. El sustrato utilizado fue PROD (Ex=530 nm, Em=585 nm) y 5 mM H₂O₂, amortiguador 50 mM Tris pH 8.

Algo importante a considerar es que el proceso de ensamblaje afecta significativamente la actividad del CYP+. Se encontró un número de recambio total para el CYP+ sometido al tratamiento de ensamblado de 12.5 UF pg⁻¹ min⁻¹; mientras que el CYP+ sin haber pasado por diálisis presentó 175 UF pg⁻¹ min⁻¹. Esta pérdida en actividad probablemente se deba a que la enzima está en contacto con altas concentraciones de sulfato de amonio (0.5 M) por un periodo de 24 h.

Al observar las muestras por TEM, se encuentran nanoestructuras correctamente ensambladas (Fig. 27). Las cápsidas presentan el interior teñido con acetato de uranilo, lo que sugiere poca o nula encapsulación de la enzima.

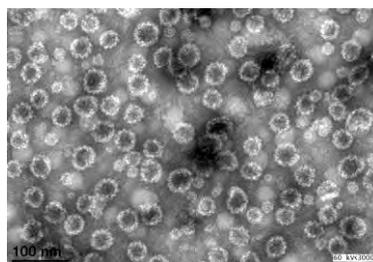


Figura 27. TEM en donde se muestran las VLPs formadas por VP1-CYP del encapsulado 3:1. Tinción negativa con acetato de uranilo (30 000 X).

A pesar de haber generado un sistema de encapsulación basado en complementariedad de cargas en donde el CYP posee una carga opuesta al interior de la cápside de VP1 del poliomavirus murino, no se favoreció de manera importante la incorporación del CYP dentro de las nanoestructuras de VP1. Una posible explicación para no haber encontrado una encapsulación eficiente pudiera estar dada por un enmascaramiento de cargas durante el proceso de ensamblaje, tanto en el CYP como en VP1, debido a las altas concentraciones de sulfato de amonio (0.5 M) en el primer amortiguador de ensamblado; lo cual podría impedir la interacción electrostática entre la enzima y la cápside viral. El sulfato de amonio es necesario en el ensamblaje de VP1 del poliomavirus murino (a pH neutros o mayores) para evitar la repulsión electrostática entre las subunidades haciendo más fuerte la atracción proteína viral-proteína viral (Chuan, 2010).

Debido a lo planteado en el párrafo anterior, se llevaron a cabo experimentos de encapsulación a una menor concentración de sulfato de amonio (0.1 M). Se esperaba que la formación de cápsides se llevara a cabo, ya que la enzima evitaría la repulsión electrostática entre las proteínas virales (negativas) ya que presenta una carga complementaria (positiva) que podría estabilizar la formación de la VLP.

Se llevaron a cabo ensayos de encapsulación con las siguientes relaciones molares VP1 a CYP: 1:1, 2:1 y 5:1 (Fig. 28). Encontramos actividad en la relación molar 1:1, lo que podría deberse a un aumento en la cantidad de enzima encapsulada, comparada con la encontrada al utilizar 0.5 M de sulfato de amonio en el ensamblaje; y/o a un decremento en la inhibición de la actividad del CYP encapsulado, ya que la concentración de sulfato de amonio es menor. Cabe resaltar que se detecta actividad para el control VP1 previamente ensamblada más CYP, lo que nos habla de una posible obstrucción de los poros de la membrana del centricón por parte de VP1, lo que provoca que el CYP libre no pueda salir con facilidad; o a que el CYP se internalizó dentro de la cápside ya formada, fenómeno que se ha reportado para otro sistema de encapsulación de proteínas (Wörsdörfer, 2012). La actividad en este control es alrededor de 2.5 veces menor a la encontrada para el encapsulado 1:1. Para los otros ensamblados con relaciones molares de 2:1 y 5:1 no se observa generación de producto.

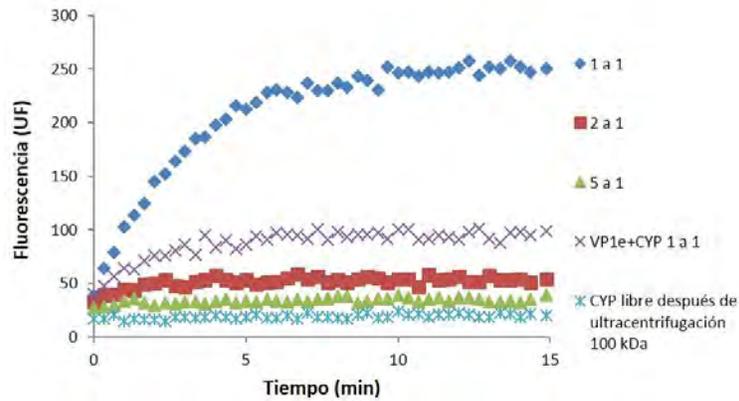


Figura 28. Actividad CYP450 en los ensayos de encapsulación VP1-CYP ensamblados con 0.1 M de sulfato de amonio. El sustrato utilizado fue PROD (Ex=530 nm, Em=585 nm) y 5 mM H₂O₂, amortiguador 50 mM Tris pH 8.

El encapsulado VP1 a CYP 1:1 y el control de ensamblaje únicamente con VP1, utilizando 0.1 M de sulfato de amonio, fueron vistos al TEM (Fig. 29).

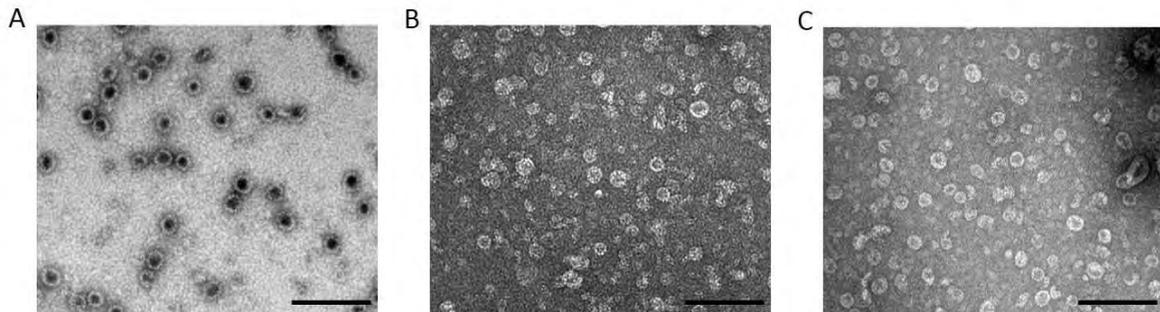


Figura 29. TEM de VLPs ensamblados con distintas concentraciones de sulfato de amonio. A) VP1 ensamblada con 0.5 M (NH₄)₂SO₄. B) VP1 ensamblada con 0.1 M (NH₄)₂SO₄. C) VP1 ensamblada con 0.1 M (NH₄)₂SO₄ y en presencia de CYP 1:1. Tinción negativa con acetato de uranilo (20 000 X). Barra de escala = 200 nm.

Se observa una clara diferencia entre los ensamblados promovidos con distintas concentraciones de sulfato de amonio. Usando 0.5 M de esta sal se observan estructuras muy bien definidas con interiores teñidos; mientras que para los ensamblados con una baja concentración de sulfato de amonio, ya sea con CYP o sin él, se observan algunas cápsides bien estructuradas y otras mal formadas, los interiores de estas VLPs no se ven tan contrastados. La concentración de sulfato de amonio es un factor importante en el ensamblado de VLPs de VP1; aunque al disminuirlo (5 veces) aún se aprecian nanoestructuras esféricas.

Finalmente para corroborar el posible encapsulamiento de CYP en cápsides de VP1, se llevó a cabo un último paso de purificación de las cápsides, para librarse de la enzima libre y proteína viral no estructurada correctamente, para los ensamblados 3:1, 5:1 (0.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y 1:1 (0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), por medio de ultracentrifugación por gradiente de cloruro de cesio. Después de coleccionar las bandas correspondientes a nanoestructuras y concentrar las muestras, se midió la transformación de PROD, encontrando para todos los casos actividad nula CYP450.

Se llevó a cabo un gel SDS-PAGE para verificar la presencia de VP1 así como de CYP que pudiera estar inactivo (Fig. 30). Para las tres preparaciones con distinta relación molar VP1:CYP se observa VP1 (43 kDa) y varios productos de degradación. No se detecta CYP+ (55 kDa) para ninguna de las muestras.

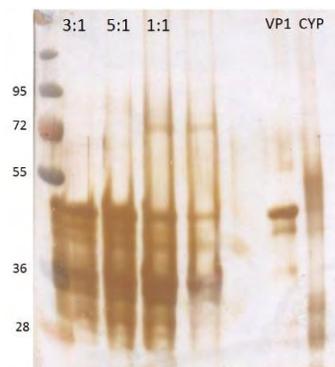


Figura 30. Gel SDS-PAGE donde se muestran los distintos encapsulados, así como los controles de peso molecular para VP1 (43 kDa) y CYP+ (~55 kDa). Tinción con nitrato de plata.

El que no se haya podido encontrar actividad purificando las cápsides por los dos métodos antes mencionados nos habla de una extremadamente baja encapsulación de CYP que sólo pudo ser detectada al manipular muy poco la muestra, caso que sucede al utilizar ultrafiltración, o a posibles falsos positivos dados por obstrucción de poros en la membrana del centrífugo. De cualquier manera, la poca o nula eficiencia de nuestro método de encapsulación por cargas complementarias CYP-VP1 puede deberse a que los iones del sulfato de amonio (aunque se disminuya la concentración de éste), indispensable para promover el ensamblaje de VP1 a valores de pH mayores a 7, enmascara las cargas tanto de la proteína viral como las de la enzima, haciendo imposible la interacción entre estas moléculas. Otro factor que pudiera estar involucrado y que surge de los resultados encontrados en el gel SDS-PAGE, es la estabilidad tanto del CYP+

como de la proteína viral a las condiciones de ensamblaje y purificación, ya que se observan una variedad de bandas de menor peso molecular que indican degradación de ambas proteínas.

No se encontró de manera contundente la incorporación de CYP dentro de las nanoestructuras de VP1 por la estrategia de complementariedad de cargas planteada.

6.2.3. Encapsulación en nanoestructuras del CCMV

La ventaja fundamental al utilizar el CCMV para la encapsulación del CYP, se debe a que el interior de esta cápside se encuentra cargado fuertemente de manera positiva debido a la composición de aminoácidos básicos del N-terminal (Douglas, 2002), por lo que por complementariedad de cargas, el CYP deberá interactuar con la superficie interna de la cápside viral ya que la enzima está cargada negativamente a pH neutro. El N-terminal de la proteína de capa del CCMV utilizado para este trabajo contiene un tag de 6 histidinas, que fue utilizado para la purificación de la proteína. Es importante mencionar que la superficie externa del virus posee carga negativa a pH neutro, por lo que la interacción de la superficie externa del CCMV con el CYP es muy poco probable (Liepold, 2005).

Las VLPs del CCMV fueron desensambladas y re-ensambladas en presencia de CYP. Se llevaron a cabo una serie de ensayos de encapsulación probando las siguientes relaciones molares proteína viral a CYP: 4:1, 12:1 y 20:1. Se mantuvo constante la concentración de enzima para todos los casos (2.25 μ M). Posterior a la diálisis en amortiguador de ensamblado, se elimina el CYP libre por medio de 5 lavados por un centrífugo con membrana de 100 kDa. El control de lavado utilizando CYP libre no presenta actividad detectable.

Para evaluar la formación de nanoestructuras se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para la tres relaciones molares ensayadas, se observa un claro cambio en la movilidad electroforética de las proteínas del CCMV cuando el CYP está presente, lo que sugiere una asociación entre la enzima y las proteínas del virus (Fig. 31A). Este cambio en la migración de las proteínas de capa del CCMV no se observa cuando se somete únicamente a la proteína viral al proceso de ensamblaje.

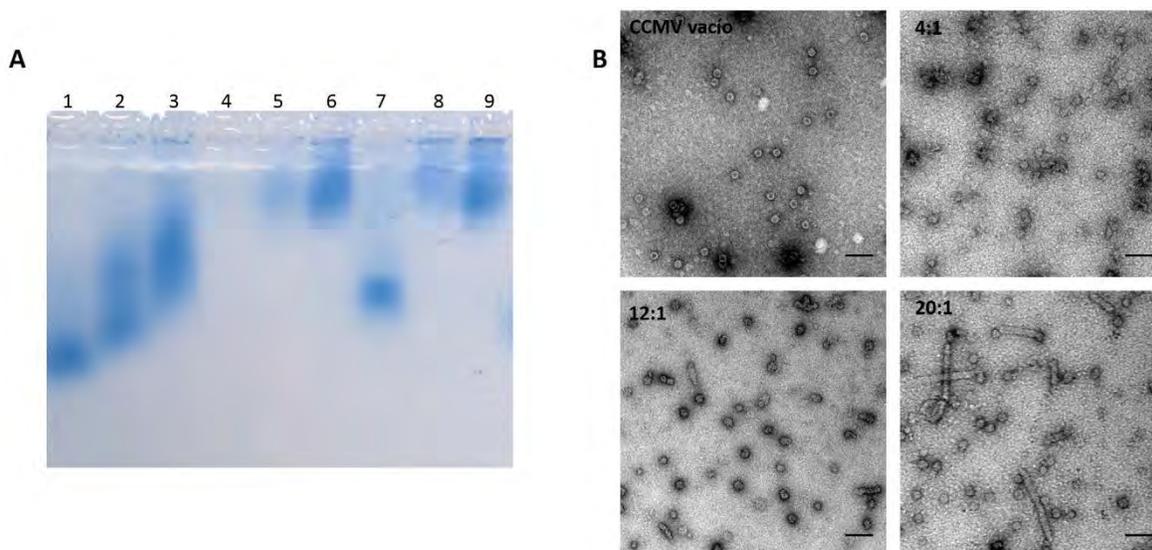


Figura 31. Ensamblados CCMV-CYP. A) Gel de Agarosa al 1% teñido con InstantBlue, en donde se muestran los ensayos de encapsulación con distintas relaciones molares CCMV-CYP. Pozo 1 = 4:1 (9 μM PV CCMV: 2.25 μM CYP); 2 = 12:1 (27 μM PV CCMV: 2.25 μM CYP); 3 = 20:1 (45 μM PV CCMV: 2.25 μM CYP); 4 = 9 μM PV CCMV; 5 = 27 μM PV CCMV; 6 = 45 μM PV CCMV; 7 = CYP libre; 8 = monómeros CCMV; 9 = CCMV VLP vacía. El gel se corrió en amortiguador de acetatos pH6 con 1 mM EDTA, a 60 volts por 2.5 h a 4° C. El gel se corrió del polo negativo al positivo. B) Imágenes de TEM del CCMV vacío (pH 5) y las 3 encapsulaciones CCMV:CYP (pH 7). Tinción negativa con acetato de uranilo. Barra de escala = 50 nm

Se corroboró por microscopía electrónica de transmisión la formación de nanoestructuras para todas las relaciones molares ensayadas. A diferencia de las cápsidas vacías, en donde el interior se tiñó por la entrada de acetato de uranilo (Fig. 31B), las cápsidas en presencia de biocatalizador se encuentran libres de tinción; lo que puede ser resultado de una obstrucción en los poros de la estructura y/o a que el interior no está vacío, sugiriendo una posible encapsulación del CYP.

Además de encontrar cápsidas esféricas para los encapsulados provenientes de las tres relaciones molares examinadas, se observan también para los encapsulados 12:1 y 20:1 la presencia de nanoestructuras tubulares, con una mayor proporción y tamaño cuando se utiliza una concentración inicial de 45 μM de proteína viral.

Las diferencias en la migración de los distintos encapsulados podría ser atribuido a una diferencia en la cantidad de CYP encapsulado para cada relación molar; así como a un incremento en la población de nanotubos como resultado de una mayor concentración inicial de las proteínas de capa del CCMV.

La formación de nanotubos ha sido previamente reportada para VLPs vacías del CCMV bajo condiciones de pH neutro y baja fuerza iónica (Adolph, 1974; Lavelle, 2009), condiciones de ensamblaje similares a las usadas para estos experimentos. Sin embargo, de acuerdo a los diagramas de fase reportados para el ensamblaje del CCMV (Lavelle, 2009), a las condiciones de pH y fuerza iónica utilizados en este trabajo (pH 7.2, 0.05M NaCl), no se reportan estructuras esféricas. El haber encontrado cápsides a pH neutro en las relaciones molares ensayadas PV a CYP, nos sugiere una estabilización de la cápside por la asociación del CYP con la capa interna del CCMV.

Aunque moléculas con carga negativa estabilizan la cápside del CCMV a pH neutro, se ha observado que no todas generan partículas nativas T=3; se pueden inducir, dependiendo de la naturaleza y del tamaño de la molécula que se encapsule dentro del CCMV, una variedad de estructuras de distintos tamaños y formas (Minten, 2011b; Hu, 2008; Mukherjee, 2006).

Se llevó a cabo la caracterización de los ensamblados correspondientes a la relación molar proteína viral del CCMV a CYP de 12:1, ya que se observa una mayoría de cápsides bien definidas y una baja población de nanotubos (Fig. 32A). Las VLPs esféricas tienen un diámetro promedio de 27 ± 2.4 nm; un diámetro muy cercano al del CCMV (28 nm). Por otro lado, se encontró para los nanotubos un diámetro promedio de 20.8 ± 1.7 nm con un largo que está dentro del rango de los 40 a los 170 nm. La mayoría de los nanotubos encontrados se encuentran cerrados en los extremos.

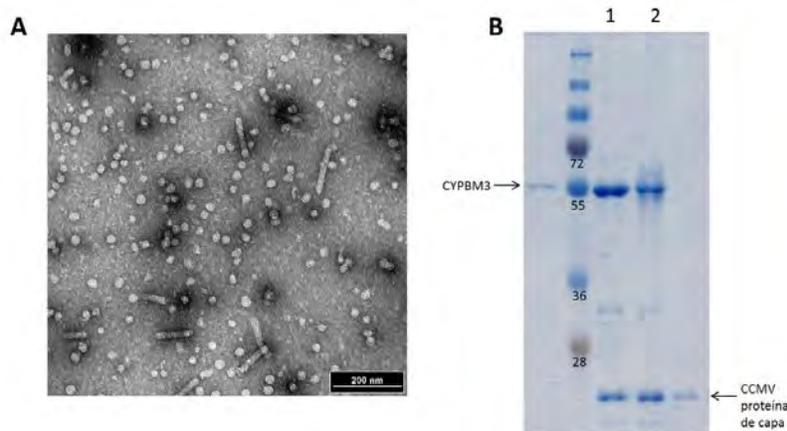


Figura 32. Caracterización estructuras de las partículas CCMV-CYP. A) Cápsides CCMV-CYP 12:1 vistas al TEM. Tinción negativa (20 000 X). B) SDS-PAGE al 12 % del encapsulado CCMV-CYP 12:1. Pozo 1 = CCMV-CYP 12:1, pozo 2 = CCMV-CYP 12:1 en presencia de 5 mM H₂O₂. Anexo 5.

Una evidencia más de la encapsulación de CYP en VLPs del CCMV fue el haber detectado, en un gel SDS-PAGE (Fig. 32B), dos bandas correspondientes a los pesos moleculares de ambas proteínas involucradas. Por medio de un análisis por densitometría se determinó el número de enzimas empaquetadas por cápside, dando como resultado un promedio de 14 CYPBM3 por VLP, correspondiente a una concentración efectiva (molaridad de confinamiento) de 4.9 mM (considerando un volumen interno para el CCMV de 4.7×10^{-21} L).

La ocupación de la cápside del CCMV por la enzima es de alrededor del 45% del volumen disponible. Debido a que la estrategia de encapsulación sólo involucró la interacción de la capa interna con el CYP, es de esperarse que no se pueda llegar al máximo de ocupación calculado teóricamente (31 CYP por cápside); sin embargo, es el mayor número de proteínas encapsuladas reportado para la cápside del CCMV.

Se evaluó la capacidad catalítica de la partícula CCMV-CYP para transformar el sustrato tamoxifen. Las VLPs fueron biocatalíticamente activas, encontrando una actividad específica de 3.58 nmoles nmoles^{-1} CYP min^{-1} para la transformación del profármaco. La actividad específica encontrada es un orden de magnitud más pequeña comparada con la encontrada para el CYP libre ($k_{\text{cat}} = 41.9 \text{ min}^{-1}$). La disminución en la actividad catalítica ha sido reportada para otras proteínas encapsuladas en estos sistemas (Fiedler, 2010; Patterson, 2012a; O'Neil, 2013) y puede ser atribuida a varios factores. Se ha observado que algunas enzimas presentan una disminución en la actividad catalítica en ambientes altamente concentrados en el rango milimolar. La disminución en la actividad podría estar relacionada a una limitación en la libertad de los movimientos para llevar a cabo los cambios conformacionales necesarios para la catálisis, debido al alto grado de hacinamiento dentro de la cápside. En el CYPBM3, las hélices F y G experimentan grandes cambios conformacionales para llevar a cabo la transformación del sustrato (Li, 1999). Otro factor relacionado a la disminución de la actividad se debe a posibles limitaciones en la difusión del sustrato dentro de la cápside. En teoría, a pH neutro, la cápside del CCMV está expandida y contiene 60 poros de 2 nm de diámetro, suficientemente grandes para permitir la entrada y salida de sustratos. Sin embargo, la encapsulación del CYP podría alterar la estructura de estos canales u obstruir parcialmente los poros afectando la tasa de difusión dentro del nanoreactor. Otro factor clave es la orientación del sitio activo de la enzima dentro de la cápside. Si el canal de acceso al sustrato está participando en la interacción con las proteínas de capa del virus podría haber

limitaciones para el paso del sustrato a la cavidad del sitio activo. Debido a una alta proporción de cargas negativas en la cara en la que se encuentra el canal de acceso al sustrato en el CYP, es probable que esta parte de la proteína sea la que esté participando en la unión con la capa interna del CCMV, afectando la entrada del sustrato al sitio activo.

A pesar de la disminución en la velocidad de transformación del tamoxifen obtenida con las cápsides CCMV-CYP (3.58 nmoles nmoles⁻¹ CYP min⁻¹), encontramos que la actividad catalítica es similar a lo reportado para citocromos P450 humanos. El CYP2D6, uno de los citocromos que participa más activamente en metabolizar el tamoxifen, fue capaz de transformar el profármaco en 4-hidroxitamoxifen y *N*-desmetiltamoxifen a una velocidad de 1.17 nmoles nmoles⁻¹ CYP min⁻¹ y 2.6 nmoles nmoles⁻¹ CYP min⁻¹ respectivamente, la actividad fue medida utilizando al NADPH como donador de electrones (Crewe, 2002). Así mismo, el CYP3A4 mostró una velocidad de transformación del tamoxifen a *N*-desmetiltamoxifen de 1.2 nmoles nmoles⁻¹ CYP min⁻¹ (Boocock, 2002). Los reportes de actividad por CYP humanos para la transformación del tamoxifen son limitados y en muchos casos difíciles de extrapolar a las unidades de actividad utilizadas en este trabajo (min⁻¹) (Coller, 2002; Desta, 2004) debido a que la mayoría de las mediciones se reportan en miligramos de proteína total provenientes de microsomas de hígado humano, en donde se encuentran otras proteínas presentes además del CYP.

Finalmente, se evaluó la estabilidad de las partículas a 5 mM de peróxido de hidrógeno, con el fin de asegurar la medición de la actividad del CYP dentro de las cápsides virales. Como se puede observar por TEM (Fig. 33), las VLPs no sufren ninguna perturbación estructural visible; así mismo, la banda correspondiente a la proteína de capa del virus en el gel SDS-PAGE no sufre degradación evidente (Fig. 32B).

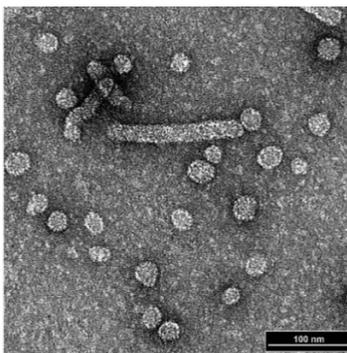


Figura 33. Cápsides CCMV-CYP 12:1 vistas al TEM incubadas con 5 mM H₂O₂. Tinción negativa (40 000 X).

Resultados publicados en el artículo: Sanchez-Sanchez L, *et al.* (2014). Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme and Microbial Technology* **60**: 24-31. (Anexo 7)

7. Encapsulación *in vivo* del CYPBM3 en P22-CYP

Para llevar a cabo la encapsulación del CYPBM3 dentro de la cápside del bacteriófago P22, se fusionó el gen que codifica para la enzima con la secuencia nucleotídica de una versión truncada de la proteína de andamiaje (SP). Este fragmento que comprende el dominio C-terminal de la proteína de andamiaje, y que incluye los aminoácidos 141 a 303, interactúa con las proteínas de capa para catalizar, estabilizar y dirigir la geometría de la formación de la procápside. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen del CYPBM3 mutante 21B3, añadiendo en los extremos los sitios NcoI y BamHI, para posteriormente clonarlo en el vector deseado en fase con el gen truncado de la SP (Anexo 6).

Se utilizaron dos estrategias distintas para la producción de cápsides *in vivo*, la expresión simultánea del CYPBM3-SP y la proteína de capa del bacteriófago P22 (CP P22), y la expresión a distintos tiempos de las dos proteínas. Para la primera estrategia, se utilizó el plásmido pETDuet en el cual ambos genes están bajo el control del mismo promotor. Para la segunda estrategia, los genes fueron clonados en distintos vectores (pBAD-CYPBM3-SP y pRSF-CP P22) para poder inducir los genes de manera diferencial. Para este caso, el gen que codifica para la enzima-SP fue expresado primero para posteriormente llevar a cabo la inducción del gen de la proteína de capa.

La facilidad en el método de purificación que involucra tan solo dos pasos (ultracentrifugación y cromatografía de filtración en gel), resulta en una alta pureza, lo cual es una ventaja importante en la producción de las VLPs derivadas del bacteriófago P22.

Para ambos protocolos, coexpresión y expresión diferencial, se encontraron cápsides correctamente ensambladas con un tiempo de retención, en la cromatografía de filtración en gel, de alrededor de los 65 min; sin embargo, la proporción de cápsides correctamente ensambladas a especies aberrantes, que eluyen a los 45 min de la columna, es diferente para cada caso (Fig. 34). Estas diferencias se deben a que en los distintos protocolos implementados existen diferencias en la expresión, y por ende la concentración de las proteínas CYP-SP y CP P22 así como en la relación

SP/CP P22, estos dos factores influyen de manera importante en el ensamblaje de la cápside P22 (Zlotnick, 2012). Cuando se utiliza únicamente el dominio C-terminal de la SP para promover el ensamblaje, como en nuestro caso, se ha observado un aumento en la cantidad de complejos aberrantes al aumentar la concentración de la SP truncada en la reacción; este fenómeno no se observa al utilizar la proteína de andamiaje completa (Parker, 1998).

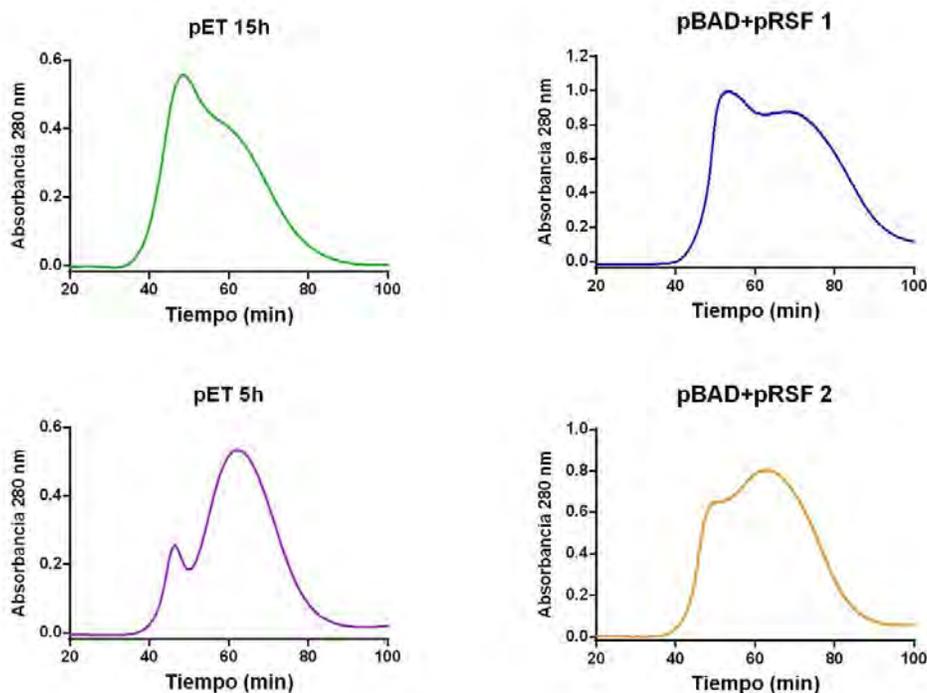


Figura 34. Análisis de la formación de nanoestructuras P22-CYP por cromatografía de filtración en gel. Las estructuras correctamente ensambladas eluyen alrededor de los 65 min; las estructuras aberrantes eluyen alrededor de los 45 min. La elución de proteínas fue monitoreada a $\lambda=280$ nm.

Para el protocolo de coexpresión del CYP-SP y la CP se llevaron a cabo dos experimentos con distintos tiempos de inducción: 5 horas y 15 horas. Para el caso de la expresión por 5 horas, se formaron mayoritariamente estructuras correctamente ensambladas; por el contrario, para la expresión a tiempos largos, se observa una mayoría de especies aberrantes. A pesar de haber encontrado para la inducción a tiempos cortos una mayoría de cápsides correctamente ensambladas, la proporción de CYP activo encontrado en estas partículas, dado por la relación de la concentración por el ensayo de CO entre la encontrada por absorbancia a 280 nm, es baja, tan sólo el 7% del total de CYPBM3 encapsulados pueden participar en la catálisis (Tabla 4). Para la inducción por 15 horas este porcentaje es aún más pequeño (3%). Debido a ello, nos dimos a la

tarea de expresar los genes a diferentes tiempos, expresando primero la fusión CYP-SP, con el fin de favorecer el buen plegamiento de la enzima antes de ser encapsulada.

Para el protocolo de expresión diferencial del CYP-SP y la CP se llevaron a cabo dos experimentos con distintas concentraciones de inductor. Para ambos experimentos se expresa primero el CYP fusionado a la SP troncada utilizando el mismo procedimiento que se lleva a cabo para la expresión de la enzima libre; con la excepción que se utiliza arabinosa como inductor del gen. Para el primer caso, se utilizó 0.2% de L-arabinosa para inducir el gen que codifica para CYP-SP, seguido de la inducción de la CP con 0.5 mM de IPTG. Para el segundo caso, el primer gen se indujo con 0.125% de L-arabinosa, mientras que el segundo gen se indujo con 0.3 mM IPTG. Como se puede observar en los cromatogramas, el segundo esquema de inducción generó una mayor proporción de cápsides correctamente ensambladas, debido probablemente a una relación CYP-SP/CP más adecuada. Con esta estrategia fue posible aumentar el porcentaje de CYPBM3 activo hasta un 35%. A pesar de haber aumentado considerablemente la proporción de CYP activo con esta segunda estrategia, los rendimientos siguen siendo bajos. Probablemente se deba a que no se llevó a cabo una optimización de los niveles de expresión de la enzima utilizando un rango más amplio de concentraciones de L-arabinosa como inductor, con el fin de obtener una mayor proporción de CYP correctamente plegado y activo.

Tabla 4. Número de enzimas por cápside y proporción de CYP activo para cada sistema de expresión.

Sistema de expresión	CYP/ cápside	Concentración de CYP por Abs ₂₈₀ (μM)	Concentración de CYP por ensayo CO (μM)	Relación de la concentración CO/ Abs ₂₈₀
pETDuet 5h	156.0 (±0.4)	123.5	9.2	0.07
pETDuet 15h	122.9 (±1.9)	87.8	2.43	0.03
pBAD+pRSF 1	129.5 (±0.1)	135.32	31.8	0.23
pBAD+pRSF 2	109.7 (±2.8)	123.7	42.9	0.35

Con el fin de entender por qué las dos terceras partes del CYP no están en su conformación catalíticamente activa, se determinó la cantidad de hierro en la muestra, por medio de una espectrometría de masas con fuente de plasma inductivamente acoplado (ICP-MS, por sus siglas en inglés). Se encontró que por cada CYP encapsulado (en la muestra pBAD+pRSF 2) hay un hierro y por consiguiente un grupo prostético hemo. Dado este resultado, es posible que aunque el hemo está presente en la estructura de la enzima, éste se encuentra en un estado de coordinación

diferente al nativo, en donde la coordinación con el ligando axial tiol (proveniente de una cisteína) no está presente. Egawa y colaboradores han identificado en el CYP450_{cam}, intermediarios en el plegamiento en donde existen estados de coordinación no-nativos con el grupo hemo. Estas enzimas, no activas, presentan conformaciones parcialmente plegadas localizadas en un mínimo energético local dentro del paisaje de plegamiento conformacional de la proteína (Egawa, 2004).

El número de CYP por cápsides encontrado para los 4 casos se encuentra en el rango de 156 a 110 enzimas. Se ha reportado previamente que el número de SP que se incorporan a cada cápside depende de la disponibilidad de la proteína en la reacción, siendo el número máximo de SP por partícula dependiente del volumen interno de la cápside y no de un número específico de sitios de unión entre la SP y la proteína de capa (Parker, 1998). Un mínimo de 60 SP, que se unen con gran afinidad a las CP, son las mínimas necesarias para promover el ensamblaje de la procápside (Parker, 2001). Debido a que el CYP es una proteína globular de alrededor de 6.6 nm se entiende que el número máximo de alrededor de 350 SP no se alcance.

Los encapsulados derivados del sistema de expresión diferencial pBAD+pRSF 2 fueron utilizados para caracterizar las partículas estructural y cinéticamente debido a que presentan la mayor proporción de CYP catalíticamente activo. Se produjeron alrededor de 120 mg de partículas P22-CYP por litro de cultivo. Se encontró que las VLPs P22-CYP tienen un promedio de 109.7 (± 2.8) enzimas por cápside lo que se traduce en una concentración local de enzima (molaridad de confinamiento = M_{conf}) de 3.14 mM. Las cápsides cuentan con un tamaño homogéneo (Polidispersión = $1.0 \pm 0.12\%$) con un diámetro de 53.6 nm (± 0.2) determinado por cromatografía de filtración en gel en HPLC acoplado a los detectores de láser multiángulo de dispersión de luz (MALS), de dispersión cuasielástica de luz (QELS) y de índice de refracción (RI) (Fig. 35A). Se comprobó por TEM la presencia de cápsides esféricas correctamente ensambladas con CYP en su interior (Fig. 35B).

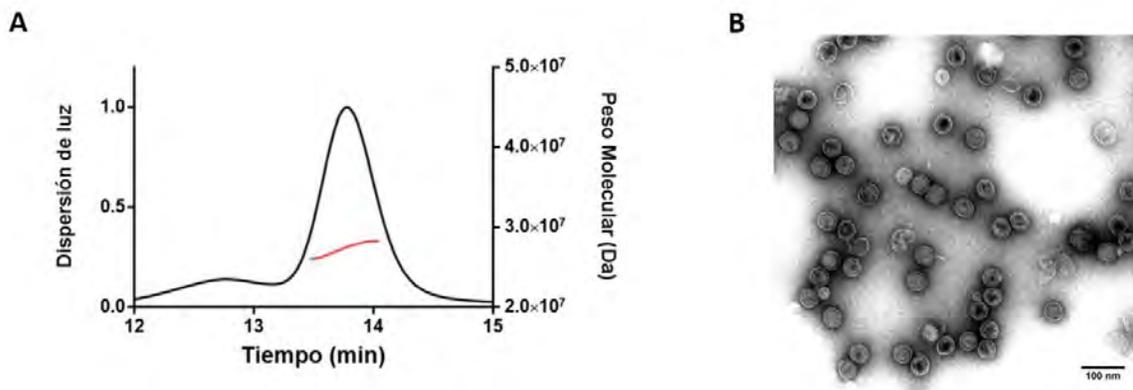


Figura 35. Caracterización estructural de las partículas P22-CYP. A) Análisis del peso molecular y diámetro del encapsulado P22-CYP por cromatografía de filtración en gel (HPLC) acoplada a los detectores MALS-QELS-RI. B) Partículas P22-CYP vistas al TEM. Tinción negativa.

Se evaluó la capacidad catalítica de las cápsides P22 con CYPBM3 en su interior. Se encontró que la enzima encapsulada en ésta VLP fue catalíticamente activa por lo que se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos, utilizando al 2,6-DMP y H_2O_2 como sustratos (Tabla 5). Para los cálculos se tomó en cuenta la concentración de CYP determinada por el ensayo de CO (proteína catalíticamente activa). La enzima encapsulada sigue una cinética Michaelis-Menten al igual que el CYP libre.

Para todos los casos, las V_{max} y K_M determinadas son aparentes, ya que no fue posible llegar a saturación para ninguno de los dos sustratos involucrados. Por un lado, altas concentraciones de peróxido destruyen la enzima por lo que las mediciones de actividad no son viables (después de 5 min a 10 mM de peróxido el CYP se destruye por completo, Cirino, 2003). Por otro lado, para el 2,6-DMP, concentraciones mayores a 500 μM inhiben la actividad del CYP.

Tabla 5. Constantes cinéticas para el CYP libre y encapsulado en P22

	2,6-DMP (5 mM H_2O_2)			2,6-DMP (60 mM H_2O_2)			H_2O_2 (500 μM 2,6-DMP)		
	$V_{max\ app}$ ($\mu mol\ S$ $\mu mol^{-1}\ E$ min^{-1})	$K_M\ app$ (μM)	V_{max}/K_M	$V_{max\ app}$ ($\mu mol\ S$ $\mu mol^{-1}\ E$ min^{-1})	$K_M\ app$ (μM)	V_{max}/K_M	$V_{max\ app}$ ($\mu mol\ S$ $\mu mol^{-1}\ E$ min^{-1})	$K_M\ app$ (mM)	V_{max}/K_M
P22-CYP	127.2 (± 2.3)	51.1 (± 3.2)	2.5	578.1 (± 88.1)	481.2 (± 99.9)	1.2	507.9 (± 37.1)	25.2 (± 4.2)	20.1
CYP libre	143.6 (± 4.6)	24.9 (± 3.3)	5.8	1580 (± 142.6)	733.2 (± 110.8)	2.1	720.5 (± 27.8)	18.5 (± 1.8)	38.9

Para las tres cinéticas calculadas, se observa una disminución en la capacidad del CYP encapsulado para transformar el sustrato (Fig. 36); las eficiencias catalíticas encontradas para P22-CYP son alrededor de dos veces menores que las calculadas para el CYP libre. La encapsulación de la enzima en esta cápside no afectó de manera tan grave la actividad como lo encontrado para el sistema CCMV-CYP, debido posiblemente a un menor hacinamiento de la proteína dentro de la cápside de P22.

Ante un aumento en la cantidad de peróxido (de 5 a 60 mM) es de esperarse un aumento en la velocidad de reacción para ambos casos, enzima libre y encapsulada; sin embargo, no aumentaron en la misma proporción. A 5 mM de peróxido de hidrógeno las $V_{\max \text{ app}}$ son similares; mientras que a concentraciones de peróxido altas, la $V_{\max \text{ app}}$ de la enzima libre aumentó en un orden de magnitud y la encapsulada alrededor de 4.5 veces. La K_M ahora es menor para el CYP encapsulado que para la enzima libre. Este fenómeno en particular, en donde tanto la V_{\max} como la K_M disminuyen ante la encapsulación, se ha reportado para otras enzimas en alto grado de hacinamiento (Patterson, 2012a). Se deberán tomar con precaución estos valores, calculados con 60 mM de peróxido de hidrógeno, ya que la enzima está siendo inactivada en el proceso.

Para el caso de las K_M , estas aumentaron para las dos cinéticas con 2,6-DMP para el CYP encapsulado, lo cual podría explicarse por una limitación en la difusión del sustrato al interior de la cápside. Fenómeno que sucede en menor proporción para la K_M del peróxido, ya que ésta es una molécula pequeña que puede difundir fácilmente. K_M involucra las velocidades de formación del complejo enzima-sustrato, la velocidad de disociación del complejo enzima-sustrato y la velocidad de formación del producto.

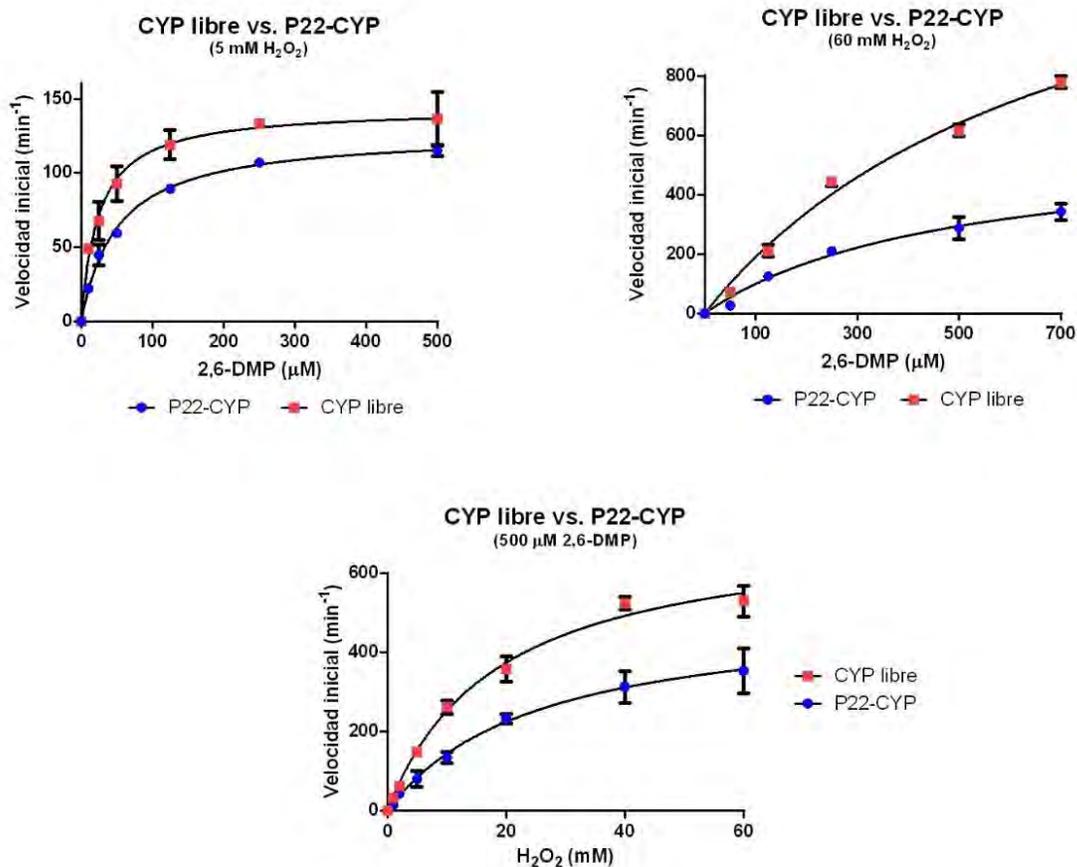


Figura 36. Cinéticas Michealis-Menten que comparan el CYPBM3 "21B3" libre y encapsulado en P22, para el sustrato 2,6-DMP (con 5 y 60 mM H₂O₂) y H₂O₂ (con 500 μM 2,6-DMP)

La pérdida en actividad en el CYP ante el encapsulamiento, también se ha presentado cuando el CYPBM3, ya sea la proteína completa o sólo el dominio hemo, se ha inmovilizado en otro tipo de materiales, como en matrices sol-gel (Maurer, 2003), resinas DEAE (Zhao, 2011) o materiales mesoporosos (Weber, 2010); en donde se reporta un decremento en la actividad específica de entre el 14 y 48 %.

La estabilidad de las cápsides en presencia de 5 y 60 mM de peróxido de hidrógeno fue monitoreada por dispersión dinámica de luz, encontrando que el diámetro de las cápsides no cambia, sugiriendo que las VLPs mantienen su estructura tridimensional a ambas concentraciones de peróxido. Por lo que se asegura la medición de la actividad del CYP dentro de las cápsides.

Debido a que se ha observado que la encapsulación de enzimas en contenedores proteicos confiere nuevas propiedades a éstas, se estudió la estabilidad de la partícula P22-CYP a diversos factores como temperatura, pH, presencia de solventes y resistencia a la degradación por proteasas.

Se evaluó la estabilidad del CYP encapsulado y la enzima libre a dos distintas temperaturas: 40 °C y 50 °C (Fig. 37). Se ha reportado, para otras enzimas, que el encapsulamiento en VLPs, aumenta la estabilidad de éstas a la temperatura (O'Neil, 2013; Fiedler, 2010), una propiedad interesante para la aplicación práctica de estos sistemas. La estabilidad a 40 °C para la enzima libre y la encapsulada es prácticamente la misma, con un ligero aumento en la actividad a los 10 min de incubación para el CYP encapsulado. A 50 °C, la inactivación de la enzima encapsulada fue inclusive más rápida que la encontrada para el CYP libre. Para nuestro caso, la inmovilización del CYP dentro de la cápside viral P22 no confirió un aumento en la termoestabilidad de la enzima.

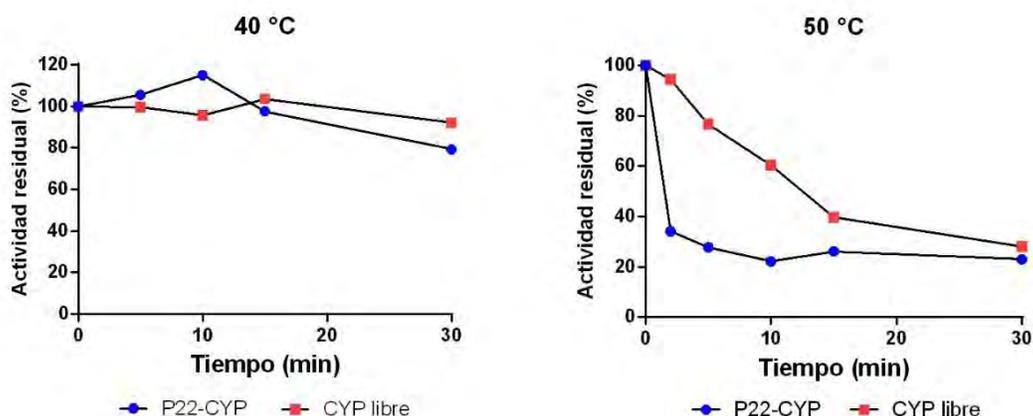


Figura 37. Estabilidad del CYP libre y encapsulado en P22 a 40 °C y 50 °C. La actividad del CYP fue medida con el sustrato 2,6-DMP y 5 mM de H₂O₂. Cada punto en la gráfica fue llevado a cabo por duplicado.

Otro parámetro que afecta de manera considerable la actividad del CYPBM3 es el pH al que se lleva a cabo la reacción. Como se puede observar en el perfil de pH generado para la enzima encapsulada y la libre (Fig. 38), ambas gráficas son muy similares entre sí, con la excepción de la retención del óptimo de actividad por una unidad más de pH (pH 8 y 9) para el caso del P22-CYP.

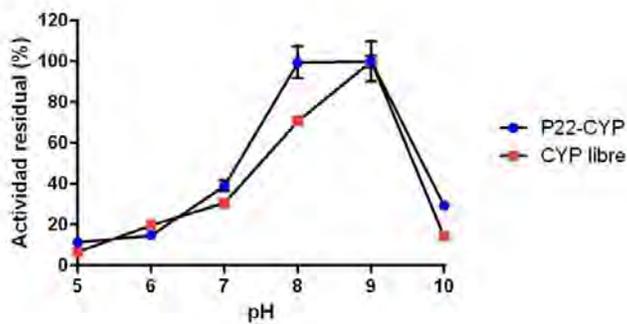


Figura 38. Perfil de actividad a distintos valores de pH para el CYP libre y encapsulado en P22. La actividad del CYP fue medida con el sustrato 2,6-DMP y 5 mM de H₂O₂. Amortiguador acetatos = pH 5; Amortiguador fosfato de potasio = pH 6; Amortiguador Tris-HCl = pH 7, 8, 9; Amortiguador boratos = pH 10.

La actividad del CYPBM3 se ve comprometida a pH ácido debido a la precipitación de la proteína. Con el fin de evaluar si la encapsulación confiere estabilidad al CYP en medios ácidos, se incubó la enzima libre y encapsulada a pH 5 y 6 (Fig. 39). Se observa que al cabo de una hora de incubación a pH 5 el P22-CYP no precipita y retiene el 35% de actividad; mientras que la mayoría de la enzima libre precipita reteniendo la fracción soluble un mínimo de la actividad original (2.9%). Después de 16 horas de incubación, el CYP encapsulado mantiene un 18% de actividad sin rastros de precipitación; mientras que la actividad encontrada en la fracción soluble de la enzima libre es del 1.6%.

Después de incubar por 1 hora al CYP encapsulado a pH 6, no se observa precipitación del P22-CYP ni pérdida en la actividad enzimática. Para el caso del CYP libre se detectó una ligera precipitación de la proteína, la fracción soluble retiene el 75% de la actividad.

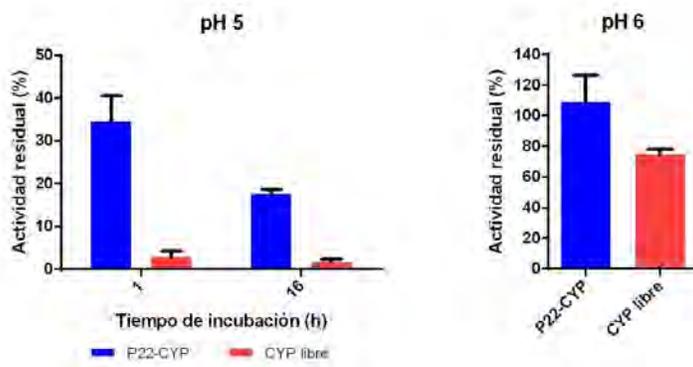


Figura 39. Estabilidad del CYP libre y encapsulado en P22 a pH 5 y 6. La actividad del CYP fue medida con el sustrato 2,6-DMP y 5 mM de H₂O₂. El tiempo de incubación a pH 6 fue de 1 h.

En una primera etapa, la precipitación del CYP libre estaría asociada a que a pH 5 la carga neta de la enzima es cercana a cero ($pI=5.3$). A tiempos cortos de incubación a este pH (15 min) una fracción de la proteína puede ser re-solubilizada en un amortiguador a pH 8 recuperando alrededor del $60 \pm 4.3\%$ de la actividad original. Sin embargo, a tiempos más largos de incubación en pH ácido ($> 1h$), el proceso no es reversible, probablemente debido a una pérdida en la estructura terciaria y secundaria de la enzima que conlleva a la agregación de ésta y a la pérdida casi total de la actividad. Esta pérdida en la actividad se ve disminuida en la enzima encapsulada, en la que se evita la precipitación gracias a la interacción con la capa interna del virus y a un posible cambio en el pI de la fusión CYP-SP. A pesar de no existir agregación del CYP encapsulado, se encuentra una pérdida importante en la actividad de éste. Es posible que aunque la asociación con la cápside evite la precipitación, aun haya cambios en la estructura del CYP que generan una pérdida en la capacidad de llevar a cabo la catálisis.

El aumento en la estabilidad del CYP a pH ácidos resulta interesante para la aplicación práctica de estas partículas en el ámbito terapéutico, ya que generalmente la vía de entrada de éstas VLPs a la célula es por medio de endosomas, cuyo pH es de carácter ácido. Así mismo, este aumento en la estabilidad sería importante para la aplicación en terapia contra el cáncer, ya a que el ambiente extracelular del tumor se encuentra acidificado (pH 6.5-6.9) debido a un incremento en el metabolismo fermentativo (Estrella, 2013).

Debido a la capacidad intrínseca de los virus para resguardar el material que almacenan en su interior, se evaluó la estabilidad del CYP encapsulado y libre en presencia de una proteasa (Fig. 40). Al cabo de una hora de incubación con tripsina, la enzima encapsulada retiene prácticamente toda la actividad (96%); mientras que el CYP libre pierde el 40%. Después de 20 horas de incubación la enzima dentro de la cápside viral retuvo el 38% de la actividad y el CYP libre retuvo tan solo el 18% de su capacidad para transformar el sustrato.

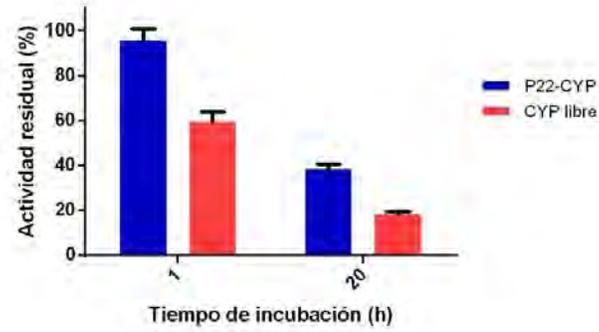


Figura 40. Estabilidad del CYP libre y encapsulado en P22 en presencia de tripsina (10 U). La actividad del CYP fue medida con el sustrato 2,6-DMP y 5 mM de H₂O₂.

Es claro que la cápside del bacteriófago P22 confirió protección contra la degradación por proteasas al CYP en su interior. Este aumento en la estabilidad frente a la degradación es importante para el uso práctico de las VLPs biocatalíticas en el campo terapéutico, ya que se prolongaría el tiempo de vida media de éstas en el cuerpo. Más aún, este incremento en la estabilidad sería de gran beneficio para el caso particular de una terapia contra el cáncer, ya que se sabe que en el microambiente del tumor existe una sobreexpresión de una clase particular de proteasas extracelulares, las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP por sus siglas en inglés). Estas proteasas promueven el desarrollo del tumor debido a que están involucradas en diversos procesos como el crecimiento de células cancerosas, invasión de tejidos, angiogénesis y migración, entre otros. Estos efectos los llevan a cabo al romper una variedad de sustratos componentes de la matriz extracelular (moléculas de adhesión celular); así como proteínas de unión a factores de crecimiento y receptores para tirosina cinasas (Egeblad, 2002).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se llevó a cabo con éxito la encapsulación del CYPBM3 “21B3” en dos partículas pseudovirales, la derivada del CCMV y la del bacteriófago P22, utilizando dos estrategias distintas. Ambas estrategias involucran una fuerza motriz que dirige la incorporación de la enzima al interior de las cápsides de manera selectiva.

Por un lado, cargas electrostáticas complementarias permitieron dirigir la encapsulación del CYP selectivamente hacia el interior de la cápside del CCMV para generar partículas con actividad catalítica, aunque con una reducción en la actividad comparada con la enzima libre. La ventaja fundamental de esta estrategia radicó en que no fue necesaria ninguna modificación química ni genética a ninguna de las proteínas involucradas. Como perspectivas del trabajo sería importante determinar la estabilidad de estos nanoreactores bajo condiciones fisiológicas, con el fin de saber si son viables para poder ser utilizadas como potenciales agentes terapéuticos.

Por otro lado la encapsulación *in vivo* del CYP en cápsides derivadas del bacteriófago P22 generó partículas con una alta capacidad de carga y con una buena retención de actividad catalítica. Es más, la encapsulación del CYP dentro de esta cápside viral generó dos propiedades interesantes en el biocatalizador, una mayor estabilidad a valores de pH ácido y una mayor estabilidad ante la degradación por proteasas; ambas propiedades son importantes para la aplicación potencial de estas VLPs como agentes terapéuticos. Como perspectivas del trabajo sería importante aumentar la proporción de CYP activo dentro de las cápsides, lo cual podría llevarse a cabo optimizando la expresión del CYP-SP, que ahora se encuentra bajo el control de la arabinosa como inductor.

El CYPBM3 “21B3” fue una excelente enzima modelo para probar el principio de encapsulación de actividad CYP450 dentro de partículas pseudovirales, debido a su fácil producción, solubilidad, capacidad de utilizar peróxido de hidrógeno como ventaja operacional, y capacidad de transformar una variedad de sustratos, entre ellos medicamentos anticancerígenos en sus metabolitos activos.

La construcción de nanoreactores, a base de cápsides virales con CYP en su interior, presentan el primer paso en la generación de sistemas para el transporte y suministro de actividad enzimática CYP450, que tienen potencial para ser utilizados para hacer más eficientes las terapias actuales

contra el cáncer. Sin embargo, y como perspectivas del trabajo, para poder desarrollar una terapia para la activación de profármacos *in situ*, es necesario suministrar junto con esta mutante del CYP una enzima que genere cantidades importantes de peróxido, o bien, encapsular el CYPBM3 con el dominio reductasa incluido, con la finalidad de contar con un sistema autosuficiente dentro de la célula que pueda generar el medicamento activo dentro del tumor. En una etapa posterior, la cápside deberá ser funcionalizada para dirigir la nanopartícula a los sitios de interés, acoplado ligandos afines a receptores que se encuentren presentes en células tumorales; así como para contener con su inmunogenicidad, recubriendo la partícula con polímeros biocompatibles.

BIBLIOGRAFÍA

Abbing A, Blaschke U, Grein S, Kretschmar M, Stark CMB, Thies MJW, Walter J, Weigand M, Woith DC, Hess J, Reiser COA. (2004). Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 27410-27421.

Adelakun O, Kudanga T, Green IR, Roes-Hill M, Burton M. (2012). Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. *Process Biochemistry* **47**: 1926-1932.

Adolph KW, Butler PJG. (1974). Studies on the assembly of a spherical plant virus: I. States of aggregation of the isolated protein. *Journal of Molecular Biology* **88**: 327-341.

Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology* **30**: 679-692.

Anzenbacherová E, Bec N, Anzenbacher P, Hudecek J, Soucek P, Jung C, Munro AW, Lange R. (2000). Flexibility and stability of the structure of cytochromes P450 3A4 and BM-3. *European Journal of Biochemistry* **267**: 2916 - 2920.

Axarli I, Prigipaki A, Labrou NE. (2005). Engineering the substrate specificity of cytochrome P450 CYP102A2 by directed evolution: production of an efficient enzyme for bioconversion of fine chemicals. *Biomolecular Engineering* **22**: 81 - 88.

Bamford DH, Grimes JM, Stuart DI. (2005). What does structure tell us about virus evolution? *Current Opinion in Structural Biology* **15**: 655-663.

Bancroft, JB. (1970). The self-assembly of spherical plant viruses. *Advances in Virus Research* **16**: 99-134.

Bernhardt R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalyst. *Journal of Biotechnology* **124**: 128-145.

Boocock DJ, Brown K, Gibbs AH, Sanchez E, Turteltaub KW, White IN. (2002). Identification of human CYP forms involved in the activation of tamoxifen and irreversible binding to DNA. *Carcinogenesis* **23**: 1897-1901.

Brauch H, Mürdter T, Eichelbaum M, Schwab M. (2009). Pharmacogenomics of Tamoxifen Therapy. *Clinical Chemistry* **55**: 1770-1782.

Chen DH, Baker ML, Hryc CF, DiMaio F, Jakana J, Wu W, Dougherty M, Haase-Pettingell C, Schmid MF, Jiang W, Baker D, King JA, Chiu W. (2011). Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of dsDNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**: 1355-1360.

Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, Harrison SC, Grigorieff N. (2009). Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**: 10644-10648.

Chen L, Waxman D. (2002). Cytochrome P450 Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy (GDEPT) for Cancer. *Current Pharmaceutical Design* **8**: 1405-1416.

Chen XS, Stehle T, Harrison S. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO Journal* **17**: 3233-3240.

Chuan YP, Lua LHL, Middelberg APJ. (2008). High-level expression of soluble viral structural protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **134**: 64 - 71.

Chuan YP, Fan Y, Lua LHL, Middelberg APJ. (2010). Virus assembly occurs following a pH- or Ca²⁺-triggered switch in the thermodynamic attraction between structural protein capsomers. *Journal of the Royal Society Interface* **7**: 409-421.

Cirino P, Arnold F. (2003). A Self-Sufficient Peroxide-Driven Hydroxylation Biocatalyst. *Angewandte Chemie International Edition* **42**: 3299-3301.

Coller JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, Nüssler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Mürdter TE. (2002). The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *British Journal of Clinical Pharmacology* **54**: 157-167.

Comellas-Aragones M, Engelkamp H, Claessen VI, Sommerdijk NA, Rowan AE, Christianen PC, Maan JC, Verduin BJ, Cornelissen JJ, Nolte RJ. (2007). A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology* **2**: 635-639.

Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EM. (2002). Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-Desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxitamoxifen. *Drug Metabolism and Disposition* **30**: 869-874.

Dachs GU, Tupper J, Tozer GM. (2005). From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Anticancer Drugs* **16**: 349-359.

Davila-Vazquez G, Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. (2005). Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technology* **36**: 223-231.

Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. (2004). Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: Prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **310**: 1062-1075.

Di Nardo G, Fantuzzi A, Sideri A, Panicco P, Sassone C, Giunta C, Gilardi G. (2007). Wild-type CYP102A1 as a biocatalyst: turnover of drugs usually metabolised by human liver enzymes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **12**: 313-323.

Douglas T, Young M. (2006). Viruses: Making friends with old foes. *Science* **312**: 873-875.

Douglas T, Strable E, Willits D, Aitouchen A, Libera M, Young M. (2002). Protein Engineering of a Viral Cage for Constrained Nanomaterial Synthesis. *Advanced Materials* **14**: 415-418.

Egawa T, Hishiki T, Ichikawa Y, Kanamori Y, Shimada H, Takahashi S, Kitagawa T, Ishimura Y. (2004). Refolding Processes of Cytochrome P450cam from Ferric and Ferrous Acid Forms to the Native Conformation. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 32008-32017.

Egeblad M, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* **2**: 161-174.

Engelkamp H, Hatzakis NS, Hofkens J, De Schryver FC, Nolte RJ, Rowan AE. (2006). Do enzymes sleep and work?. *Chemical Communications*: 935-940.

Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, Johnson J, Gatenby RA, Gillies RJ. (2013). Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Research* **73**: 1524-1535.

Fiedler J, Brown S, Brown SD, Lau JL, Finn MG. (2010). RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie International Edition* **49**: 9648-9651.

Foxenberg RJ, McGarrigle BP, Knaak JB, Kostyniak PJ, Olson JR. (2007). Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. *Drug Metabolism & Disposition* **35**: 189-193.

Francis RJ, Sharma SK, Springer C, Green AJ, Hope-Stone LD, Sena L, Martin J, Adamson KL, Robbins A, Gumbrell L, O'Malley D, Tsiompanou E, Shahbakhti H, Webley S, Hochhauser D, Hilson AJ, Blakey D, Begent RH. (2002). A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours. *British Journal of Cancer* **87**: 600-607.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607.

Gleiter S, Lilie H. (2001). Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Science* **10**: 434-444.

Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, Cheng Q. (2009). Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nature Protocols* **4**: 1245-51.

Guengerich P. (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **14**: 611-650.

Günther C, Schmidt U, Rudolph R, Böhm G. (2001). Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *FASEB Journal* **15**: 1646-1648

Hetch J, Waxman D. (2000). Selection of Cytochrome P450 Genes for Use in Prodrug Activation-Based Cancer Gene Therapy. *Methods in Molecular Medicine* **35**: 77-83.

Hooker J, Datta A, Botta M, Raymond KN, Francis MB. (2007). Magnetic Resonance Contrast Agents from Viral Capsid Shells: A Comparison of Exterior and Interior Cargo Strategies. *Nano Letters* **7**: 2207-2210.

Hoskins JM, Carey LA, McLeod HL. (2009). CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nature Reviews Cancer* **9**: 576-586.

Hu YF, Zandi R, Anavitarte A, Knobler CM, Gelbart WM. (2008). Packaging of a Polymer by a Viral Capsid: The Interplay between Polymer Length and Capsid Size. *Biophysical Journal* **94**: 1428-1436.

Huttunen K, Mähönen N, Raunio H, Rautio J. (2008). Cytochrome P450-Activated Prodrugs: Targeted Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry* **15**: 2346-2365.

Ingelman-Sundberg, M. (2004). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences; evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics Journal* **5**: 6-13.

Inoue T, Kawano MA, Takahashi RU, Tsukamoto H, Enomoto T, Imai T, Kataoka K, Handa H. (2008). Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *Journal of Biotechnology* **134**: 181-192.

Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. (2006). Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* **11**: 812-818.

- Johnson MD, Zuo H, Lee K-H, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen; a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Research Treatment* **85**: 151-159.
- Kang S, Douglas T. (2010). Some enzymes just need a space of their own. *Science* **327**: 42-43.
- Kim DH, Ahn T, Jung HC, Pan JG, Yun CH. (2009). Generation of the Human Metabolite Piceatannol from the Anticancer-Preventive Agent Resveratrol by Bacterial Cytochrome P450 BM3. *Drug Metabolism and Disposition* **37**: 932-936.
- Kreppel F, Kochanek S. (2008). Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide. *Molecular Therapy* **16**: 16-29.
- Lavelle L, Gingery M, Phillips M, Gelbart WM, Knobler CM, Cadena-Nava RD, Vega-Acosta JR, Pinedo-Torres LA, Ruiz-Garcia J. (2009). Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs. *Journal of Physical Chemistry B* **113**: 3813-3819.
- Lee A, Z Niu, Wang Q. (2009). Viruses and Virus-Like Protein Assemblies—Chemically Programmable Nanoscale Building Blocks. *Nano Research* **2**: 349-364.
- Lepault J, Petitpas 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 Journal* **20**: 1498-1507.
- Liepold LO, Revis J, Allen M, Olrtogge L, Young M y Douglas T. (2005). Structural Transitions in Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV). *Physical Biology* **2**: S166–S172.
- Li Z, Baker ML, Jiang W, Estes et al. (2009). "Rotavirus Architecture at Subnanometer Resolution." *Journal of Virology* **83**: 1754-1766.
- Li HY, Poulos TL. (1999). Fatty acid metabolism, conformational change, and electron transfer in cytochrome P-450BM-3. *Biochimica et Biophysica Acta* **1441**: 141-149.
- Lin LL, Lien CY, Cheng YC, Ku KL. (2007). An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **853**: 175-182.
- Lipin DI, Chuan YP, Lua LH, Middelberg AP. (2008). Encapsulation of DNA and non-viral protein changes the structure of murine polyomavirus virus-like particles. *Archives of Virology* **153**: 2027-39.
- Manchester M, Steinmetz N. (2009). Virus and Nanotechnology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **327**: v-vi.
- Mansuy D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cythochromes P450. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* **121**: 5-14.
- 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 Journal* **20**: 1485-1497.
- Maurer SC, Schulze H, Schmid RD, Urlacher V. (2003). Immobilisation of P450BM-3 and an NADP(+) cofactor recycling system: Towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **345**: 802-810.

- McFadyen M, Melvin W, Murray GI. (2004). Cytochrome P450 enzymes: Novel options for cancer therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**: 363-371.
- Minten IJ, Claessen V, Blank K, Rowan AE, Nolte RJ, Cornelissen JJ. (2011). Catalytic capsids: the art of confinement. *Chemical Science* **2**: 358-362.
- Minten IJ, Wilke K, Hendriks LJ, van Hest JC, Nolte RJ, Cornelissen JJ. (2011 b). Metal-Ion-Induced Formation and Stabilization of Protein Cages Based on the Cowpea Cholorotic Mottle Virus. *Small* **7**: 911-919.
- Minten IJ, Nolte RJ, Cornelissen JJ. (2010). Complex assembly behavior during the encapsulation of green fluorescent protein analogs in virus derived protein capsules. *Macromolecular Bioscience* **10**: 539 – 545.
- Mukherjee S, Pfeifer CM, Johnson JM, Liu J, Zlotnick A. (2006). Redirecting the coat protein of a spherical virus to assemble into tubular nanostructures. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 2538-2539.
- Munro AW, Girvan HM, McLean KJ. (2007). Variations on a (t)heme—novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural Product Reports* **24**: 585-609.
- Mutch E, Williams FM. (2006). Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology* **224**: 22-32.
- Niculescu-Duvaz I, Springer CJ. (1997). Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. *Advanced Drug Delivery Reviews* **26**: 151-172.
- Noble MA, Miles CS, Chapman SK, Lysek DA, MacKay AC, Reid GA, Hanzlik RP, Munro AW. (1999). Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochemical Journal* **339**: 371-379.
- Notley L, de Wolf C, Wunsch R, Lancaster R, Gillam E. (2002). Bioactivation of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* **5**: 614-622.
- O'Neil A, Prevelige PE, Douglas T. (2013). Stabilizing viral nano-reactors for nerve-agent degradation. *Biomaterials Science* **1**: 881-886.
- O'Neil A, Prevelige PE, Basu G, Douglas T. (2012). Coconfinement of fluorescent proteins: spatially enforced communication of GFP and mCherry encapsulated within the P22 capsid. *Biomacromolecules* **13**: 3902-3907.
- O'Neil A, Reichhardt C, Johnson B, Prevelige Jr PE, Douglas T. (2011). Genetically Programmed In Vivo Packaging of Protein Cargo and Its Controlled Release from Bacteriophage P22. *Angewandte Chemie International Edition* **50**: 7425-7428.
- Osborne CK. (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine* **339**: 1609-1618.
- Overall CM. (1987). A microtechnique for dialysis of small volume solutions with quantitative recoveries. *Analytical Biochemistry* **165**: 208-214.
- Parent KN, Khayat R, Tu LH, Suhanovsky MM, Cortines JR, Teschke CM, Johnson JE, Baker TS. (2010). P22 coat protein structures reveal a novel mechanism for capsid maturation: stability without auxiliary proteins or chemical crosslinks. *Structure* **18**: 390-401.

Parker MH, Brouillette CG, Prevelige Jr PE. (2001). Kinetic and calorimetric evidence for two distinct scaffolding protein binding populations within the bacteriophage P22 procapsid. *Biochemistry* **40**: 8962-8970.

Parker MH, Casjens S, Prevelige Jr PE. (1998). Functional Domains of Bacteriophage P22 Scaffolding Protein. *Journal of Molecular Biology* **281**: 69-79.

Patterson DP, Schwarz B, Waters RS, Gedeon T, Douglas T. (2014). Encapsulation of an Enzyme Cascade within the Bacteriophage P22 Virus-Like Particle. *ACS Chemical Biology* **9**: 359-365.

Patterson D, Prevelige P, Douglas T. (2012). Nanoreactors by programmed enzyme encapsulation inside the capsid of the bacteriophage P22. *ACS Nano* **6**: 5000-5009.

Patterson D, Shwarz B, El-Boubbou K, Oost J, Prevelige P, Douglas T. (2012 b). Virus-like particle nanoreactors: programmed encapsulation of the thermostable CelB glycosidase inside the P22 capsid. *Soft Matter* **8**: 10158-10166.

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* **2**: 751-760.

Perez EA. (2007). Safety profiles of tamoxifen and the aromatase inhibitors in adjuvant therapy of hormone responsive early breast cancer. *Annals of Oncology* **18** (Suppl. 8): 26-35.

Pirola L, Fröjdö S. (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **60**: 323-332.

Piver B, Fer M, Vitrac X, Merillon JM, Dreano Y, Berthou F, Lucas D. (2004). Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **68**: 773-782.

Plascencia-Villa G, Saniger J, Ascencio JA, Palomares LA, Ramírez OT. (2009). Use of Recombinant Rotavirus VP6 Nanotubes as a Multifunctional Template for the Synthesis of Nanobiomaterials Functionalized With Metals. *Biotechnology and Bioengineering* **104**: 871-881.

Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KL, Lamb JH, Farmer PB, Stanley LA, Burke MD. (2002). The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *British Journal of Cancer* **86**: 774-778.

Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W. (1988). Three-dimensional Structure of Rotavirus. *Journal of Molecular Biology* **199**: 269-275.

Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasermann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. (1993). Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for Microsomal P450's. *Science* **261**: 731-736.

Ren Y, Wong S, Lim L. (2007). Folic Acid-Conjugated Protein Cages of a Plant Virus: A Novel Delivery Platform for Doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry* **18**: 836-843.

Rochat B. (2005). Role of cytochrome P450 activity in the fate of anticancer agents and in drug resistance: focus on tamoxifen, paclitaxel and imatinib metabolism. *Clinical Pharmacokinetics* **44**: 349-366.

Rodriguez PL, Harada T, Christian DA, Pantano DA, Tsai RK, Discher DE. (2013). Minimal self peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles. *Science* **339**: 971-975.

Schmidt U, Rudolph R, Böhm G. (2000). Mechanism of Assembly of Recombinant Murine Polyomavirus-Like Particles. *Journal of Virology* **74**: 1658-1662.

Schwaneberg U, Schmidt-Dannert C, Schmitt J, Schmid R. (1999). A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Analytical Biochemistry* **269**: 359-366.

Siminszky B, Corbin FT, Ward ER, Fleischmann TJ, Dewey RE. (1999). Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1750-1755.

Speir J, Munshi S, Wang G, Baker TS, Johnson JE. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure* **3**: 63-78.

Stehle T, Harrison S. (1997). High-resolution structure of a polyomavirus VP1–oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO Journal* **16**: 5139-5148.

Strable E, Finn MG. (2009). Chemical Modification of Viruses and Virus-Like Particles. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **327**: 1-18.

Stubenrauch K, Bachmann A, Rudolph R, Lilie H. (2000). Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *Journal of Chromatography B* **737**: 77-84.

Tanaka S, Sawaya MR, Yeates TO. (2010). Structure and mechanisms of a protein-based organelle in *Escherichia coli*. *Science* **327**: 81-84.

Teschke C, Parent K. (2010). 'Let the phage do the work': Using the phage P22 coat protein structures as a framework to understand its folding and assembly mutants. *Virology* **401**: 119-130.

Thuman-Commike PA, Greene B, Jakana J, Prasad BV, King J, Prevelige PE Jr, Chiu W. (1996). Three-dimensional structure of scaffolding-containing phage p22 procapsids by electron cryo-microscopy. *Journal of Molecular Biology* **260**: 85-98.

Torchilin V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**: 131-135.

Torres-Duarte C, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R. (2009). Halogenated pesticide transformation by laccase-mediator system. *Chemosphere* **77**: 687-692.

Verma I, Weitzma M. (2005). Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 711-738.

Weber E, Sirim D, Schreiber T, Thomas B, Pleiss J, Hunger M, Glaeser R, Urlacher V. (2010). Immobilization of P450 BM-3 monooxygenase on mesoporous molecular sieves with different pore diameters. *Journal of Molecular Catalysis B* **64**: 29-37.

Whitehouse C, Bell SG, Tufton HG, Kenny RJ, Ogilvie LC, Wong LL. (2008). Evolved CYP102A1 (P450BM3) variants oxidise a range of non-natural substrates and offer new selectivity options. *Chemical Communications* **8**: 966-968.

Wörsdörfer B, Woycechowsky KJ, Hilvert D. (2011). Directed evolution of a protein container. *Science* **331**: 589-592.

Wörsdörfer B, Pianowski Z, Hilvert D. (2012). Efficient in vitro encapsulation of protein cargo by an engineered protein container. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 909-911.

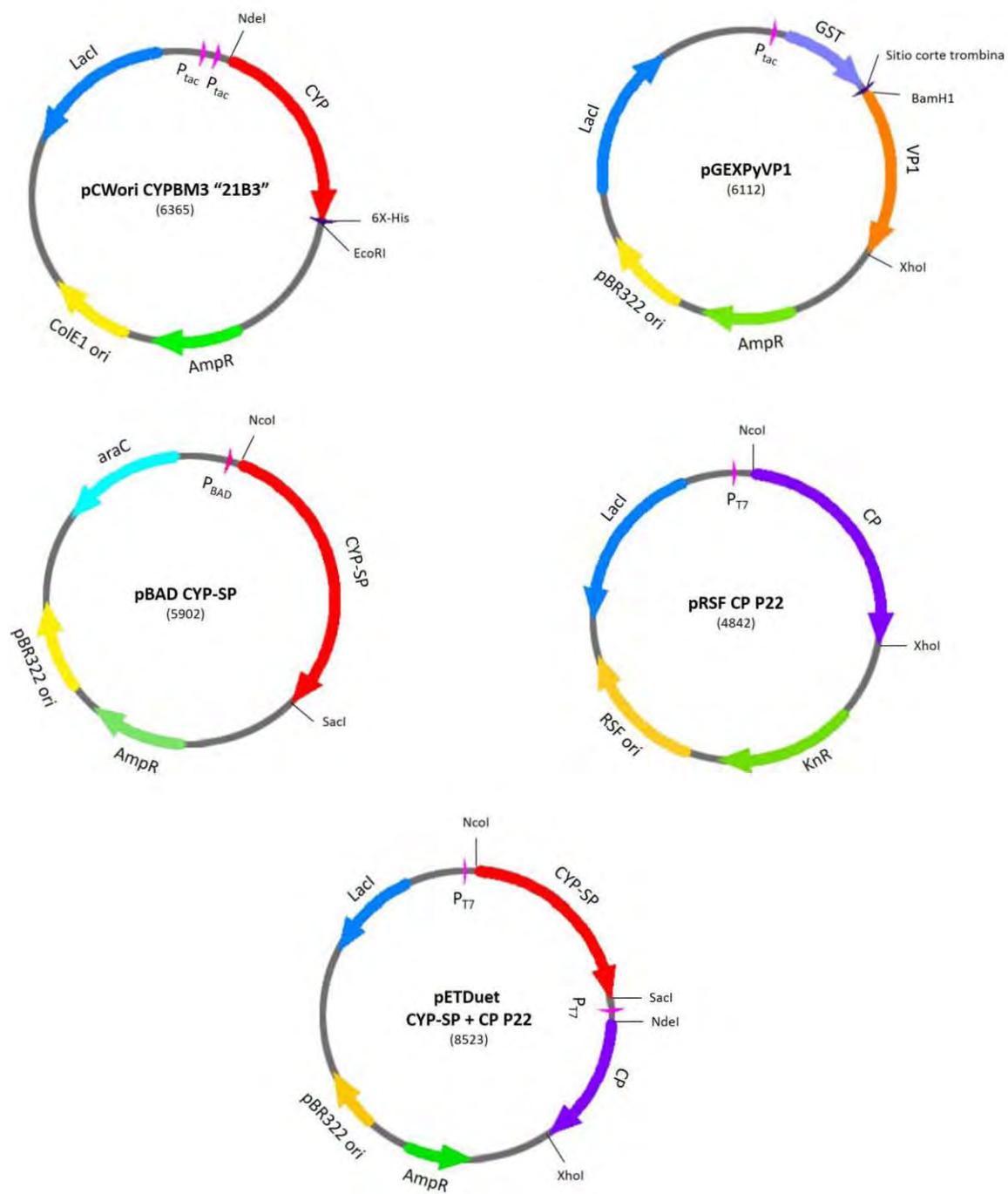
Xu G, McLeod H. (2001). Strategies for Enzyme/Prodrug Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* **7**: 3314-3324.

Zhao L, Gueven G, Li Y, Schwaneberg U. (2011). First steps towards a Zn/Co(III)sep-driven P450 BM3 reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 989-999.

Zlotnick A, Suhanovsky MM, Teschke C. (2012). The energetic contributions of scaffolding and coat proteins to the assembly of bacteriophage procapsids. *Virology* **428**: 64-69.

ANEXOS

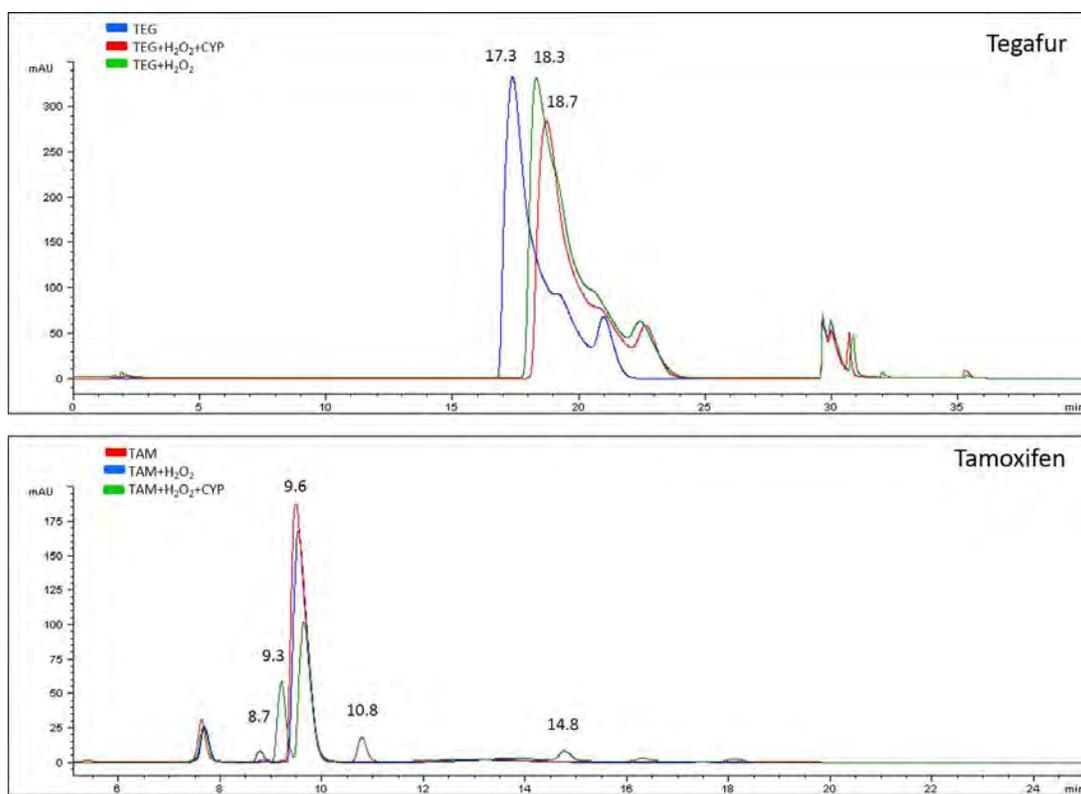
1. Plásmidos utilizados en el proyecto doctoral.

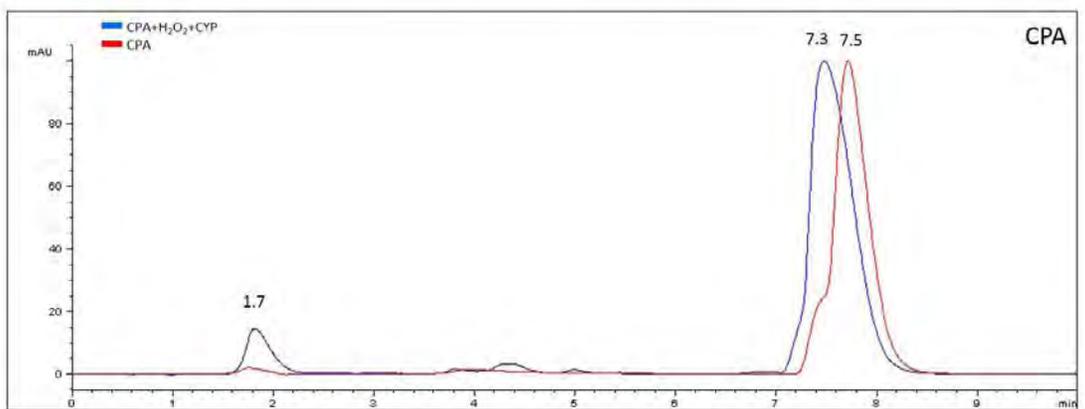
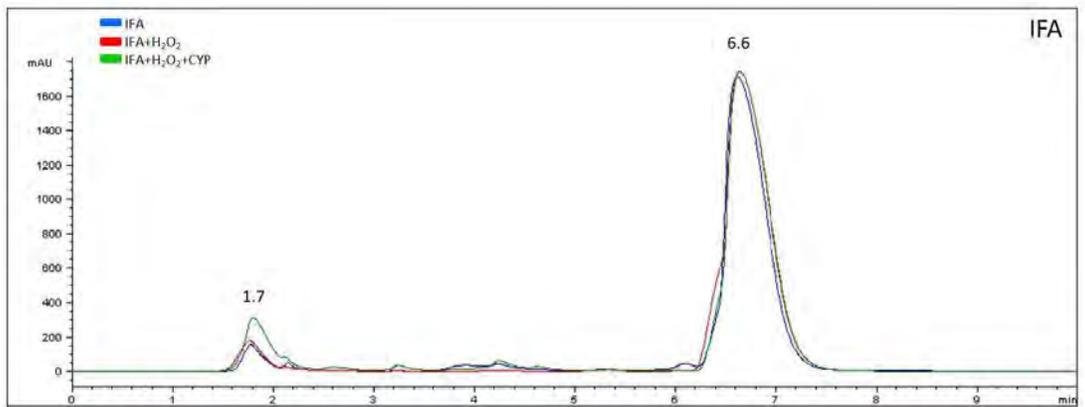
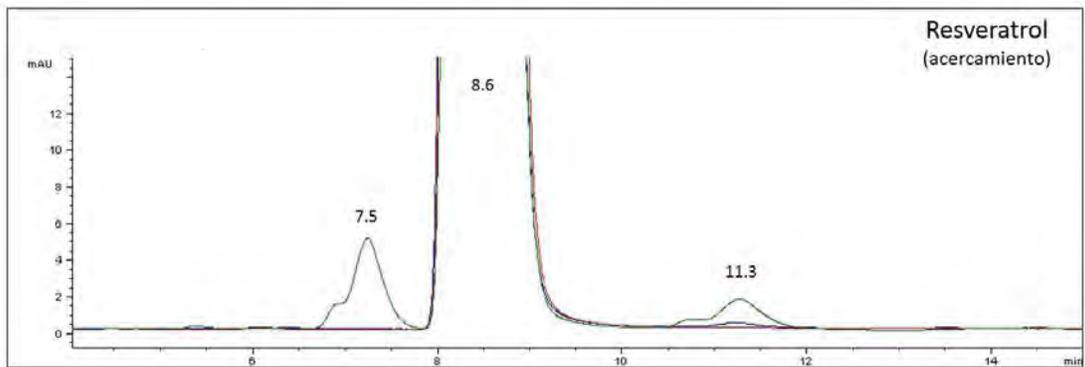
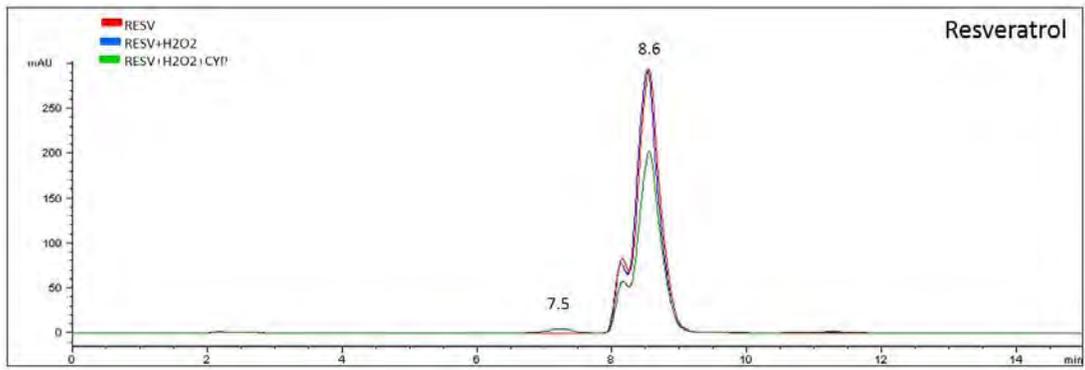


2. Compuestos identificados en la transformación de profármacos por el CYPBM3 "21B3" utilizando LC-MS-MS.

Prófarmaco	Producto	Fórmula	M ⁺
Tamoxifen	4-hidroxitamoxifen	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388.227
	N-demetiltamoxifen	C ₂₅ H ₂₇ NO	358.217
	N-demetil-4-hidroxitamoxifen	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	374.246
	3,4-hidroxitamoxifen	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.222
Resveratrol	Piceteanol	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	245.079

3. Cromatografías de fase reversa en HPLC para la evaluación de la transformación de profármacos por el CYPBM3 "21B3".



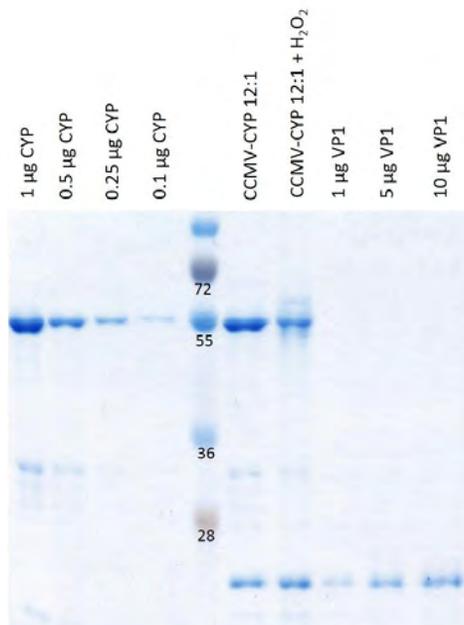


4. Datos de los espectros de masas para cada uno de los productos de la transformación de plaguicidas por el CYPBM3 "21B3".

Plaguicida	Producto	Iones de espectro de masas (m/z) ^a
Diclorofen	5-cloro-3-[(3-cloro-6-oxociclohexa-1,4-dien-1-il)metil] ciclohexa-3,5-dien-1,2-diona	284 (29), 282 (43) [M ⁺], 219 (23), 218 (20), 191 (38), 189 (48), 184 (22), 165 (32), 164 (17), 162 (23), 155 (49), 154 (28), 152 (100), 128 (64), 127 (69), 126 (42), 102 (19), 101 (25), 89 (32), 75 (24), 74 (16), 73 (17), 63 (59), 62 (24), 51 (31), 50 (19)
Linuron	3,4-diclorofenil isocianato	191 (13), 189 (59), 188 (7)[M ⁺], 187 (100), 161 (15), 159 (32), 126 (23), 124 (70), 97 (12), 62 (10), 61 (9)
	N-(3,4-diclorofenil)formamida	191 (53), 189 (78), 187 (23), 163 (75), 162 (21), 161 (100), 135 (18), 133 (18), 126 (38), 125 (16), 124 (33), 101 (24), 99 (34), 91 (15), 90 (34), 73 (18), 63 (26), 61 (20)
	Urea, N,N'-bis (2,3-diclorofenil)	234 (29), 191 (15), 189 (54), 187 (91), 163 (55), 161 (100), 160 (21), 159 (19), 145 (23), 133 (48), 126 (32), 125 (24), 124 (68), 99 (16), 98 (14), 97 (28), 90 (16), 73 (26), 61 (24), 60 (18), 57 (20)
Paratión	Paraoxon	275 (10) [M ⁺], 220 (10), 156 (11), 149 (32), 139 (42), 131 (10), 127 (18), 119 (11), 109 (100), 99 (30), 93 (10), 91 (14), 81 (47), 75 (11), 65 (15), 64 (10), 63 (14)
	4-Nitrofenol	139 (100) [M ⁺], 109 (57), 93 (26), 81 (21), 65 (57), 63 (21), 53 (15), 51 (10)
Clorpirifos	Clorpirifos oxon	298 (58), 270 (29), 262 (35), 242 (42), 201 (26), 199 (56), 197 (62), 170 (35), 169 (27), 109 (100), 91 (37) 81 (56)
	2-Hidroxí-3,5,6-tricloropiridina	201 (26), 199 (77), 197 (100) [M ⁺], 173 (28), 172 (18), 171 (88), 169 (93), 162 (15), 161 (17), 138 (13), 136 (34), 135 (21), 134 (75), 133 (17), 111 (20), 109 (73), 107 (59), 100 (18), 98 (41), 85 (15), 74 (16), 72 (40), 63 (39), 62 (22)
	Ácido tiofosfórico	115 (10), 114 (100) [M ⁺], 86 (6), 85 (12), 84 (5), 58 (6), 56 (11), 55 (5), 54 (15)

^a: Valores en paréntesis indican intensidades relativas. [**M**⁺]: Ión molecular.

5. Determinación de la cantidad de CYP encapsulado en VLPs de CCMV. Análisis por densitometría utilizando el programa ImageJ. SDS-PAGE (12%) teñido con InstantBlue.



6. Secuencia de aminoácidos del CYPBM3 “21B3” fusionado a la proteína de andamiaje del bacteriófago P22.

MAIKEMPQPKTFGELKNLPLLNTDKPVQALMKIADELGEIFKFEAPGRVTRYLSSQRLVKEACDESRFDKNLSQALKFVRDFAGDGLATSW
 THEKNWKKARNILLPSLSQQAMKGYHAMMVDIAVQLVQKWERLNSDEHIEVPEDVTRRLTDLTIGLCGFNYRFNSFYRDQPHPFITSMVR
 ALDEAMNKLQRANPDDPAYDENKRQFQEDIKVMNDLVDKIIADRKASGEQSDLLTHMLHGKDPETGEPLDDENIRYQIITFLIAGHETTS
 GLLTFALYFLVKNPHVLQKAAEEAARVLVDPVPSYKQVKLKYVGMVLNEALRLWPTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDELMVLIPQLH
 RDKTIWGDDEVVEFRPERFENPSAIPQHAFKPFNGQRACIGQQFALHEATLVLGMMMLKHDFEDHTNYELDIEETLTKPEGFVIKAKSKKI
 PLGGIPSPSTGSLVPRGSCRNAVAEQGRKTQEFTQSAQYVEAARKHYDAAEKLNIPDYQEKEDAFMQLVPPAVGADIMRLFPEKSAAL
 MYHLGANPEKARQLLAMDGQSALIELTRLSERLTLKPRGKQISSAPHADQPITGDVSAANKDAIRKQMDAAASKGDVETRYRKLKAKLKGIR
 *