



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA QUIMERA FORMADA POR LA
PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19 Y LA LIPASA DE
*Bacillus pumilus***

TESIS

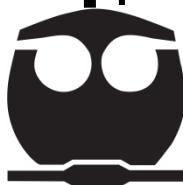
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ISABEL ALEJANDRA GUTIÉRREZ LANDA

MÉXICO, D.F.

AÑO 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ**

VOCAL: **Profesor:** **JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO**

SECRETARIO: **Profesor:** **ISMAEL BUSTOS JAIMES**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **VERÓNICA DOMÍNGUEZ VALDEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

SUSTENTANTE :

ISABEL ALEJANDRA GUTIÉRREZ LANDA

Este trabajo contó con recursos del programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM (Proyectos IN202710 e IN215613). Igualmente contamos con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyectos CB-2008-01-99857 y CB-2010-01-151189).

Además conté con una beca otorgada por PAPIIT, UNAM (Proyecto IN215613) para el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

TABLA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Virus y nanotecnología viral.....	3
1.2. Las nanopartículas virales (VNPs) como herramientas biotecnológicas	5
1.3. Partículas tipo virus (VLPs).....	6
1.4. Ejemplos de VPNs como herramientas biotecnológicas	7
1.5. Virus como andamios para enzimas.....	11
1.6. Parvovirus B19. Estructura	16
1.7. Lipasa BplA	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general.....	24
4.2. Objetivos particulares	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1. Expresión y purificación de la lipasa de <i>B. pumilus</i> (BplA)	26
5.2. Cambios estructurales seguidos por espectroscopía de fluorescencia	26
5.3. Determinación de la capacidad de plegamiento autónomo de BplA	26
5.4. Diseño de la proteína VP2-307BplA	27
5.6. Purificación de la proteína VP2-307BplA.....	28
5.7. Análisis por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	30
5.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	30
5.9. Pruebas de actividad enzimática.....	30
5.10. Determinación de la concentración de proteína	31
5.11. Centrifugación isopícnica mediante gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl)	31

5.12. Velocidades específicas de las fracciones recuperadas después de la centrifugación isopícnica mediante los gradientes de CsCl.....	32
5.13. Estabilidad térmica	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. Cambios estructurales seguidor por espectroscopía de fluorescencia	33
6.2. Determinación de la capacidad de plegamiento autónomo de BpIA	36
6.3. Diseño de la proteína quimérica VP2-307BpIA.....	37
6.4. Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	41
6.5. Análisis por AFM	46
6.6. Análisis de la actividad específica de las estructuras formadas sólo por la proteína Q (VP2-307BpIA) y aquellas formadas por la combinación de VP2 y Q en proporción 4:1 (M).....	48
6.7. Centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl.....	54
6.8. Actividades específicas de las especies separadas en la centrifugación isopícnica.....	56
6.9. Estabilidad térmica.....	57
6.10 Análisis global	60
7. CONCLUSIONES	62
8. PERSPECTIVAS.....	63
9. REFERENCIAS	64



TABLA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
aa	Aminoácidos
Abs ₄₁₀	Absorbancia a 410 nm
ACN	Acetonitrilo
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AFU	Unidad de plegamiento autónomo
AAV-2	Virus adeno-asociado 2
BCA	Ácido bicinconínico
BpIA	Lipasa A de <i>B. pumilus</i> GMA1
BSA	Albúmina sérica bovina
BsIA	Lipasa A de <i>B. subtilis</i>
CCMV	Virus del moteado clorótico del caupí
CP	Proteína de la cápside
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DLS	Dispersión dinámica de luz
GndHCl	Cloruro de guanidinio
HSV-1	Virus del herpes simple humano tipo I
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB amp	Medio LB con ampicilina
M	En los ensayos, hace referencia a la muestras compuesta por las proteínas VP2 y VP2-307BpIA en proporción 4:1
MHV	Virus de la hepatitis del ratón
MVM	Virus diminuto del ratón
PdI	Índice de polidispersidad
PVX	Virus X de la papa
Q	Proteína quimérica VP2-307BpIA. En los ensayos, hace referencia a las muestras compuestas exclusivamente por esta proteína.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SCM	Centro de masa espectral
TMV	Virus del mosaico del tabaco
U	Unidades de actividad enzimática, definidas como la cantidad de μmol de producto generado por minuto
v _i	Velocidad inicial
VLP	Partícula tipo virus
VNP	Nano partícula viral
wt-VP2	VP2 silvestre
4-NF	4-nitrofenol
4-NFA	4-nitrofenol acetato



RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs) son estudiadas como bloques de construcción y herramientas para la nanotecnología. Sus aplicaciones abarcan desde la electrónica y la construcción de materiales, hasta la medicina. Dentro de estas aplicaciones se encuentran los llamados nano-acarreadores de enzimas (ENCs), que son plataformas virales (andamios o templetes) donde las enzimas son dispuestas dentro o fuera de una partícula viral confiriéndole un posicionamiento más eficiente si se compara con la enzima libre. En el presente trabajo, se construyó una molécula “quimérica” a partir de la proteína estructural VP2, del Parvovirus B19, y la lipasa de *Bacillus pumilus*. Resultados previos en nuestro grupo demuestran que es posible obtener VLPs *in vitro* a partir de sólo una de las dos proteínas estructurales de la cápside del Parvovirus B19 (VP2). Otros resultados han demostrado que algunas asas superficiales de VP2 pueden ser elongadas sin eliminar la competencia de esta proteína para plegarse correctamente y formar VLPs. Una de las asas más notables de VP2 es la formada por los residuos 300 a 314. Esta asa no muestra densidad electrónica en la estructura cristalina, permitiendo concluir que no es partícipe en contactos vitales para la estructura de la cápside, por lo que podría ser modificada con insertos más grandes, inclusive con una enzima completa. En este trabajo se construyó el gen para la proteína quimérica VP2-307BpIA a través de la inserción de la secuencia que codifica para BpIA, entre los nucleótidos que codifican para los residuos 307 y 308 en el gen *vp2*.

Nuestros resultados demostraron que la proteína quimérica se ensambla en partículas de menor tamaño que las VLPs y que, cuando la proteína quimérica se mezcla con VP2 silvestre, sí se puede incorporar en VLPs.

La inserción de BpIA en VP2 no eliminó la capacidad de esta última para organizarse y estructurarse; BpIA retuvo actividad catalítica aunque fue menor a la que posee en su forma libre. La estabilidad de la actividad enzimática frente a la temperatura aumentó considerablemente cuando la quimera se encuentra dispuesta en las estructuras formadas con VP2 o sola.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus y nanotecnología viral

“Virus” es un término que generalmente tiene una connotación negativa, y es porque a lo largo del tiempo se han estudiado como patógenos con el propósito de entender los procesos de infección y enfermedad. Sin embargo, de modo relativamente reciente, se ha cambiado el enfoque y, en la actualidad, son estudiados como bloques de construcción y herramientas para la nanotecnología; es así que los virus son empleados como plataformas, en otras palabras, son utilizados como templates o andamios para el diseño de modernos nanomateriales. Una amplia variedad de plataformas virales han sido estudiadas y empleadas para aplicaciones que abarcan desde la electrónica y la construcción de materiales, hasta la medicina (Steinmetz *et al.*, 2011).

La denominada “nanotecnología viral” es una disciplina emergente y altamente interdisciplinaria ya que se encuentra en la interface entre la virología, la química y la ciencia de materiales (Donath *et al.*, 2007; Steinmetz *et al.*, 2011).

Los virus se pueden definir como agentes infecciosos carentes de metabolismo propio que solamente se replican en células vivas. Después de entrar en la célula hospedera son capaces de controlar la maquinaria transcripcional/traducciona de ésta para la producción de sus constituyentes: proteínas y material genético. Los biopolímeros virales se autoensambla en viriones funcionales (partículas virales maduras) listas para infectar otras células. El genoma del virus puede estar hecho de diferentes tipos de ácidos nucleicos (ADN, de cadena doble o cadena sencilla; ARN, de cadena doble y cadena sencilla en sentido +/-). Éste contiene las secuencias genéticas que codifican las proteínas estructurales del virus y también las secuencias cuya función es controlar el metabolismo celular, redirigiéndolo hacia una eficiente replicación del virus (Donath *et al.*, 2007).



A continuación se exponen las razones por las que éstos agentes infecciosos se han convertido en herramientas biotecnológicas (Donath *et al.*, 2007; Sang-Yup *et al.*, 2011; Steinmetz *et al.*, 2011):

- i. El tamaño que poseen, el cual varía desde algunas decenas hasta varias centenas de nanómetros, lo que los sitúa en la escala nanométrica.
- ii. Son sistemas monodispersos con un alto grado de simetría y polivalencia, situación que les confiere dimensiones y estructuras precisas en la escala nanométrica; la uniformidad de su cápside así como el número de grupos funcionales los hace ideales para su uso como andamios.
- iii. Son estructuras excepcionalmente estables y resistentes.
- iv. Se pueden producir en grandes cantidades con relativa facilidad.
- v. La información genética de las secuencias de proteínas que conforman la cápside ha estado disponible por años, por lo tanto las propiedades de los virus pueden ser diseñadas a través de ingeniería genética.
- vi. El hecho de que su genoma esté organizado en módulos (estructural y de replicación) combinado con la habilidad de que los elementos sintetizados pueden autoensamblarse brinda enormes posibilidades para hacer ingeniería basada en biología molecular.
- vii. Mediante la introducción de fragmentos de ácidos nucleicos en el genoma viral, la cantidad de virus con superficies modificadas que se puede producir es incalculable.
- viii. Son biocompatibles y biodegradables, lo que los hace candidatos muy prometedores para uso *in vivo*.

Los virus se han utilizado ampliamente en el tratamiento contra plagas (de insectos y patógenos bacterianos) y en tratamientos alternativos a los antibióticos (Karp, 2009); también para reparar genes defectuosos o transferir genes terapéuticos (terapia génica), para generar vacunas modernas, o en el desarrollo de terapias contra el cáncer. Estas aplicaciones dependen de la entrega, eficiente y específica, a las células o tejidos objetivo, ya que en esto recae su eficacia y seguridad (Kaufmann *et al.*, 2012).



1.2. Las nanopartículas virales (VNPs) como herramientas biotecnológicas

Los virus han evolucionado a lo largo del tiempo para infectar células con gran eficiencia, y entregar su “carga” (material genético). Es esta naturaleza la que los hace ideales para el desarrollo de vehículos específicos para entrega de fármacos o reactivos específicos para imagen (Figura 1).

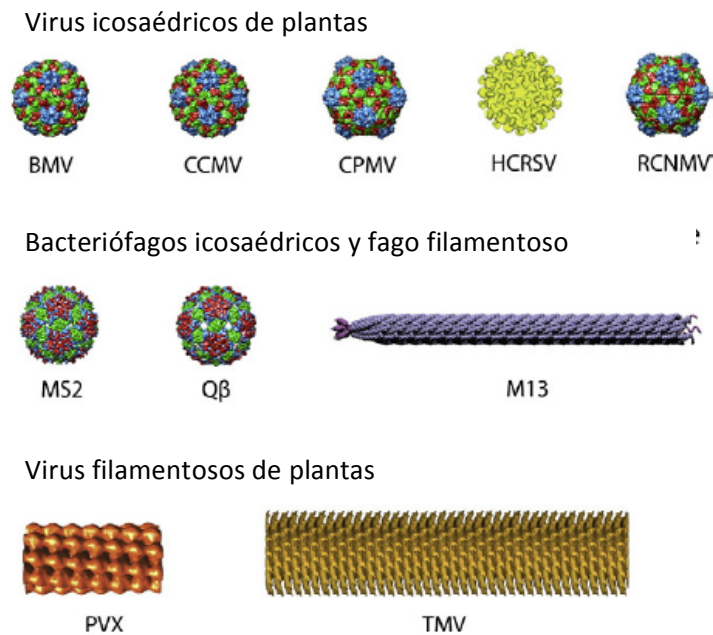


Figura 1. Muestra representativa de VNPs desarrolladas actualmente para su aplicación en medicina. Virus icosaédricos: Virus del mosaico del bromo (*Brome mosaic virus*, BMV), virus del moteado clorótico del caupí (*Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV), virus del mosaico del caupí (*cowpea mosaic virus*, CPMV), virus de la mancha anular clorótica del hibiscus (*hibiscus chlorotic ringspot virus*, HCRSV), Virus del moteado necrótico del trébol rojo (*Red clover necrotic mottle virus*, RCNMV). Bacteriófagos icosaédricos: MS2 y Qβ y el fago filamentosos M13. Virus filamentosos de plantas: Virus X de la papa (*Potatoe X virus*, PVX), Virus del mosaico del tabaco, (*tobacco mosaic virus*, TMV). (Modificada de Steinmetz, 2010).

Las VNPs conforman la base de una amplia gama de aplicaciones biomédicas que incluye prevención de enfermedades, diagnóstico y tratamiento. Se pueden usar modificaciones químicas y genéticas para generar numerosas funcionalidades, por ejemplo, añadiendo medicamentos, toxinas, reactivos para imagen, epítopos y péptidos de reconocimiento y/o direccionamiento específico en la superficie, interna o externa, de la partícula (Figura 2). El encapsulamiento y autoensamble



puede ser usado para llenar las cavidades de éstas partículas con diversas cargas útiles. Estas posibilidades les confieren muchas ventajas sobre las partículas sintéticas.

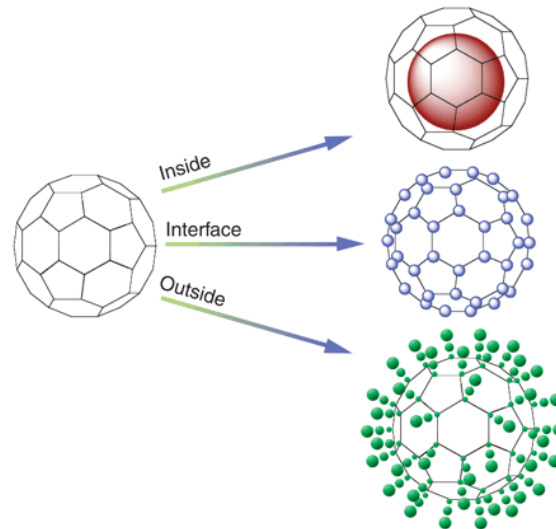


Figura 2. Esquema de las tres interfaces disponibles para la manipulación química y genética en la arquitectura de cápsidas virales. La superficie exterior, la interior y la interfase entre subunidades han sido utilizadas para la construcción de materiales multivalentes y multifuncionales (Tomada de Douglas *et al.*, 2006).

1.3. Partículas tipo virus (VLPs)

De particular interés entre las VNPs se encuentran las llamadas partículas tipo virus (*virus like particles*, VLPs) (Donath *et al.*, 2007; Steinmetz, 2010). Las VLPs se pueden definir como agregados moleculares que guardan una gran similitud estructural con los virus de los que proceden al estar conformadas por alguna o todas las proteínas de la cápside viral; no poseen material genético por lo que no tienen la capacidad de infectar. Sin embargo, al estar compuestas por las proteínas de la cápside viral, se conservan las propiedades de reconocimiento específico de dichas proteínas. Estas partículas se producen cuando las secuencias genéticas de las proteínas que conforman la cápside se insertan en plásmidos y se expresan en un hospedero adecuado.



Las propiedades de los virus pueden ser modificadas cambiando las secuencias del genoma viral, por ejemplo para presentar péptidos ajenos en sus proteínas estructurales. Mediante estas modificaciones se puede lograr que las VNPs tengan un espectro más reducido o más específico de hospederos para funcionar como acarreadores de fármacos y genes. Sin embargo aún es difícil identificar las regiones de la cápside que pueden acomodar péptidos ajenos sin afectar el ensamble de las VLPs (Takahashi *et al.*, 2008).

Los llamados “virus quiméricos” o “quimeras” son virus que contienen componentes genéticos y/o estructurales de diferentes serotipos, especies o familias de virus. Las quimeras pueden ser generadas ya sea por el intercambio de secuencias génicas de regulación, secuencias de proteínas completas o partes de las mismas, o insertando el genoma completo de virus pequeños en virus más grandes. Los virus quiméricos han sido utilizados en investigación básica para contribuir al entendimiento de los ciclos de vida de los virus, factores de virulencia y mecanismos de transformación (Kaufmann *et al.*, 2012).

Los virus y sus componentes funcionales brindan una enorme variedad de posibles plataformas para desarrollo de la nanotecnología (Koudelka *et al.*, 2010).

1.4. Ejemplos de VPNs como herramientas biotecnológicas

Los virus pueden ser vistos como un material novedoso renovable y además poseen características únicas como el tamaño nanométrico, alto grado de simetría y polivalencia, baja polispersidad, producción eficiente y de bajo costo, y biocompatibilidad (Koudelka *et al.*, 2010).

Una de las aplicaciones más importantes de las VNPs es como andamios o templetas, ya que finalmente son moléculas orgánicas que poseen propiedades químicas. En consecuencia se han empleado una gran variedad de reacciones químicas de bioconjugación para la unión de diversas moléculas a los virus. Los grupos reactivos que se aprovechan para la construcción de sistemas utilizando



estas partículas son lisinas, tirosinas, grupos carboxilo y cisteínas expuestas, ya sea que se encuentren naturalmente en los virus o que se introduzcan mediante ingeniería genética (Koudelka *et al.*, 2010).

En un estudio llevado a cabo por Szuchmacher y colaboradores (2004) emplearon como andamio al Virus del mosaico del caupí (Cowpea Mosaic Virus, CMV) para generar tres patrones tridimensionales distintos de partículas de oro de 5 y 2 nm. La cápside del CMV tiene un diámetro promedio de 28.4 nm y está compuesta por 60 copias idénticas de la subunidad asimétrica. De las cualidades mencionadas anteriormente para las VNPs, en este trabajo se ilustra la factibilidad y flexibilidad de estos sistemas proteínicos; la subunidad no presenta cisteínas que al plegarse se encuentren expuestas en la superficie (se necesita el grupo funcional tiol para llevar a cabo la adición de las partículas de oro), por lo que mediante ingeniería genética se hicieron varias mutaciones puntuales para generar la polivalencia necesaria para cada diseño (Figura 3). Vale la pena resaltar que debido a la simetría y repetitividad de la estructura, una sola adición a la proteína producirá 60 grupos tiol reactivos. Debido a que cada cápside viral es tanto geométrica como químicamente idéntica, las nano partículas de oro se unen en sitios específicos sobre los virus para producir patrones bien definidos. Desde 1999 se encuentran disponibles los datos cristalográficos a una resolución de 2.8 Å (Lin *et al.*, 1999), con los que fueron posibles los diseños de los modelos y cápsides a construir.

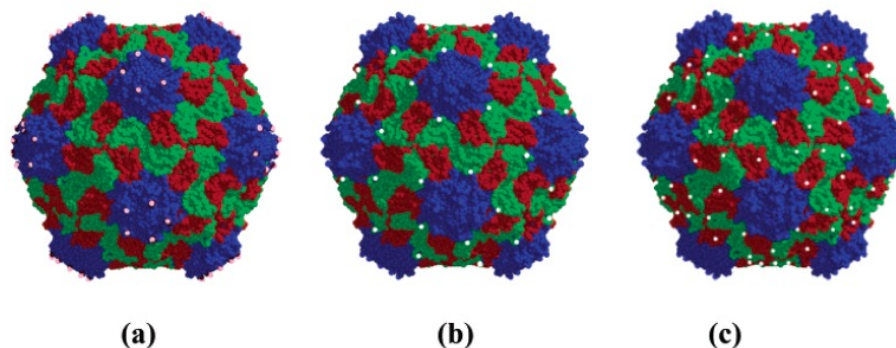


Figura 3. Modelos de las mutaciones CMV generados usando los datos cristalográficos. La localización de las cisteínas que se colocaron tras la mutación sobre la cápside del CMV está resaltada en color claro. (Tomada de Szuchmacher *et al.*, 2004).



Con la posibilidad de alterar la ubicación de las cisteínas a insertar se puede controlar la distancia de éstas en la superficie de la partícula lo que permite el diseño de nano-dispositivos como circuitos electrónicos o sensores mediante la generación de puntos reactivos en sitios apropiados para acomodar moléculas de diferentes tamaños o receptores. Estos sistemas demuestran que es posible diseñar andamios modificando tanto el número, como la posición o distancia de los grupos reactivos (Figura 4). Lo anterior es ejemplo de lo que al principio de esta sección se señaló como “precisión en la escala nanométrica”.

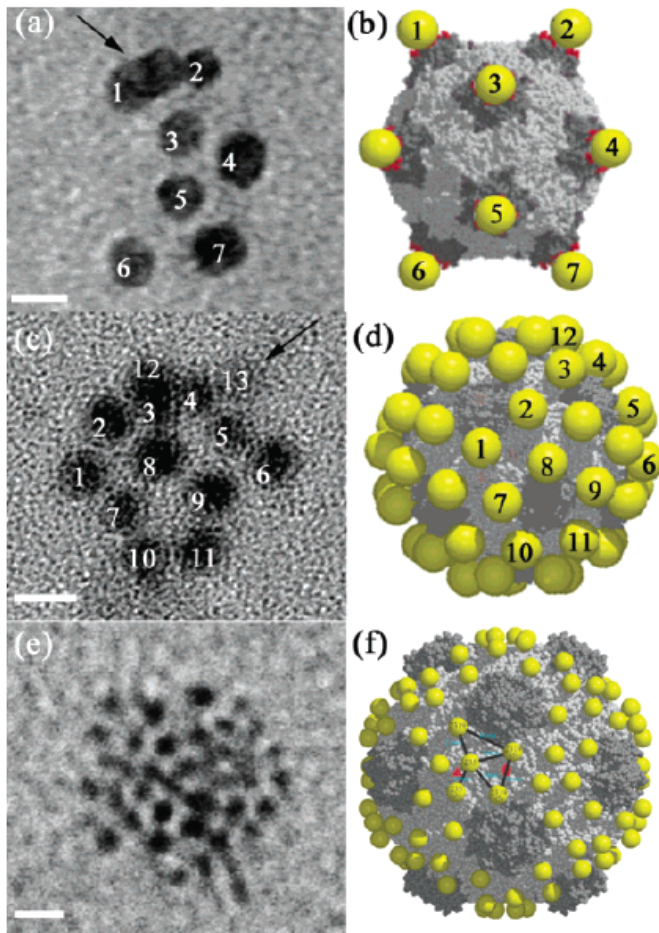


Figura 4. Las barras claras representan 5 nm de longitud. (a) Imagen de microscopía electrónica (TEM) de una muestra de la mutante del panel “(a)” de la figura 3 sin tinción. Se observan 8 nanopartículas de oro unidas a una cápside de la mutante referida que se encuentra aislada. (b) Modelo de la mutante referida, la cual posee una partícula de oro por cada eje de orden 5. (c) Imagen de TEM de una cápside mutante correspondiente al panel “(b)” de la figura 3 sin tinción. Se observan 13 nanopartículas de oro unidas a una mutante aislada. (d) Modelo de la mutante anterior con partículas de oro unidas en todos los sitios reactivos. (e) Imagen TEM de una mutante aislada sin tñir correspondiente al modelo “(c)” de la figura 3. Se observan 42 partículas de oro de 2 nm de diámetro unidas a la partícula. La clara forma esférica de la VNP se denota gracias al gran número de partículas de oro unida a ella. (f) Modelo de la mutante anterior que exhibe partículas de oro unidas en todos los sitios diseñados para tal propósito. (Modificada de Szuchmacher *et al.*, 2004).

Siguiendo esta línea, el uso de VNPs para la fabricación de nanomateriales híbridos (virus-Inorgánicos/orgánicos) ha sido principalmente el fungir como templetas. Las primeras investigaciones en este campo fueron reportadas a finales de los noventa y consistieron en el uso de VNPs del virus del moteado clorótico



del caupí (chlorotic cowpea mottle virus, CCMV), utilizando la cápside icosaédrica para crear un microambiente para que iones de paratungstato y decavanadiato cristalizaran para formar nanopartículas metálicas. Por otra parte, el virus del mosaico del tabaco (tobacco mosaic virus, TMN) fue utilizado para fabricar nanotubos metálicos (CdS y PbS) que expusieran partículas metálicas en su superficie. Otra aplicación de los virus como templete fue para óxidos metálicos funcionales (semiconductores), con lo que se pueden fabricar semiconductores uniformes o nanomateriales fotoelectrónicos (Lee *et al.*, 2011). Una revisión completa de estos dispositivos, así como de sus aplicaciones fue hecha por Lee y colaboradores (2011).

Otra aplicación tan atractiva como prometedora de las VNPs es en el campo de la imagen para investigación básica, diagnóstico y tratamiento (Bronstein, 2011). Las VNPs ofrecen la posibilidad de entregar reactivos de imagen y fármacos a sitios precisos, generando imágenes con alto contraste y permitiendo el tratamiento con dosis más concentradas de fármacos minimizando al mismo tiempo los efectos adversos. Las VNPs pueden ser modificadas con fluoróforos orgánicos para imágenes ópticas, con complejos de gadolinio (Gd) para imágenes de resonancia magnética nuclear, y con puntos cuánticos (quantum dots, QDs) o nanopartículas metálicas para la detección mediante métodos espectroscópicos (Steinmetz, 2010).

El campo de la medicina es en donde quizá se han desarrollado más aplicaciones de las VNPs. El desarrollo de vacunas es una de las áreas en donde se está trabajando; prueba de ello es que en la actualidad se tienen ya comercialmente disponibles las vacunas contra la hepatitis B y el virus del papiloma humano. Además en estos sistemas existe la posibilidad de presentar más de un epítipo al sistema inmunológico situación que ayudaría a la creación y desarrollo de vacunas más eficientes (Ludwing *et al.*, 2007).



1.5. Virus como andamios para enzimas

Dada la eficiencia con la que la célula lleva a cabo las reacciones metabólicas mediadas por enzimas, se infiere que la clave es la organización y se ha encontrado en los virus una herramienta para imitarla. Virus de plantas, bacteriófagos y VLPs han sido empleados para el confinamiento de enzimas, terapia basada en fagos (fagoterapia), procesamiento de materia prima, y estudios cinéticos de una sola molécula (Cardinale *et al.*, 2012).

Las aplicaciones más avanzadas requieren un control posicional de las enzimas en micro y nanoarreglos a resolución atómica. Los llamados nano-acarreadores de enzimas (enzyme nano-carriers, ENCs) son andamios o templates donde las enzimas son dispuestas dentro o fuera de un objeto nanométrico confiriéndole un posicionamiento más eficiente sobre un soporte si se compara con la enzima libre. Acoplar enzimas a estructuras protéicas altamente ordenadas, como lo son los virus, es una forma atractiva de alcanzar este posicionamiento y control (Cardinale *et al.*, 2012).

Como ya se mencionó, entre las VNPs que se utilizan como ENCs se encuentran bacteriófagos, virus de mamíferos, virus de plantas y VLPs. Aquí sólo se mencionarán los ejemplos correspondientes a las VLPs de acuerdo a la revisión hecha por Cardinale y colaboradores (2012).

- i. La enzima, luciferasa y/o la peptidasa E, se encapsuló en VLPs del virus Q β en un proceso dirigido por el RNA dentro de la bacteria infectada. Se construyó un plásmido en el cual se introdujeron dos dominios de unión en el mRNA de la proteína de la cápside (CP). Uno de los dominios interactúa con los residuos de la cara interna de la partícula y el otro (diseñado *in vitro*) es un segmento de RNA de unión específico para un péptido rico en arginina (Rev). Un segundo plásmido fue utilizado, para expresar la enzima a encapsular a la cual se le añadió en el extremo amino la secuencia Rev. Después de transformar con ambos plásmidos y expresar en células de *E.*



- coli*, se obtuvieron VLPs con la enzima marcada con la secuencia Rev encapsulada (Figura 5, panel i) (Fiedler *et al.*, 2010).
- ii. Acoplamiento con la estrategia “*coiled-coil*” entre VLPs y enzimas. Se emplean dos dominios de enrollamiento peptídico complementarios, uno cargado positivamente (K-coil) y el otro negativamente (E-coil), fueron fusionados respectivamente a la proteína de la cápside (CP) del CCMV y a la EGFP. Ambas quimeras fueron expresadas en bacterias y ensambladas *in vitro* en VLPs que contenían la enzima (Figura 5, panel ii) (Minten *et al.*, 2009; 2010; 2011).
 - iii. El encapsulamiento de la EGFP se realizó mediante el ensamble *in vivo* de VLPs del bacteriófago P22 de *Salmonella typhimuriam* en dos pasos. En el primer paso se forma una protocápside con la participación de las proteínas de andamio (SP) y la proteína de la cápside (CP). En el segundo paso ocurre un rearrreglo estructural perdiéndose las SP y dando lugar a una cápside madura e icosaédrica. Para el encapsulamiento se hizo una construcción genética en la cual se incluyó la secuencia de la proteína a encapsular (en este caso EGFP, en la imagen “P”) en un extremo de la secuencia para la proteína SP y entre ambas la secuencia para el corte específico con trombina. Se conservó la secuencia para la CP. Se permitió el ensamble *in vivo* de la protocápside, estructura con la EGFP encapsulada y fija a la SP. Con tratamiento térmico se indujo el rearrreglo conformacional y el empleo de trombina permitió la liberación de SP, resultando en una VLP madura con EGFP encapsuladas (Figura 5, panel iii) (O’Neil *et al.*, 2011).

Quizá la idea más ambiciosa es lograr el uso combinado de autoensamblaje y la reproducción para la construcción de un sistema catalítico. En 2007, Carette y colaboradores reportaron un soporte enzimático con estas características basado en el virus X de la papa (Potato Virus X, PVX). Bajo el argumento de que en la naturaleza las enzimas involucradas en una ruta metabólica están agrupadas espacialmente con el fin de establecer un proceso de cascada eficiente, se propone que el diseño de soportes que contengan a todas las



enzimas de una vía metabólica pueden mejorar el flujo de metabolitos a través de la ruta en cuestión. Hasta ahora en los soportes diseñados por el hombre se ha logrado un control insipiente sobre la distribución de los sitios catalíticos, punto de vital importancia en el diseño de procesos catalíticos de muchos pasos. Por las características ya mencionadas los virus representan una posibilidad. Si la cápside y la enzima no inhiben mutuamente la función de la otra, un sistema catalítico basado en una VNP puede ser desarrollado. Otro punto a resaltar es que el soporte, al estar compuesto de múltiples copias de la CP, tendría la cualidad intrínseca de tener múltiples sitios catalíticos. Además, debido al “poder” replicativo de los virus, se podrían tener múltiples copias de partículas activas en poco tiempo. Lo anterior ofrece la idea atractiva de producir en un solo paso ambos, el biocatalizador y el soporte (Carette *et al.*, 2007).

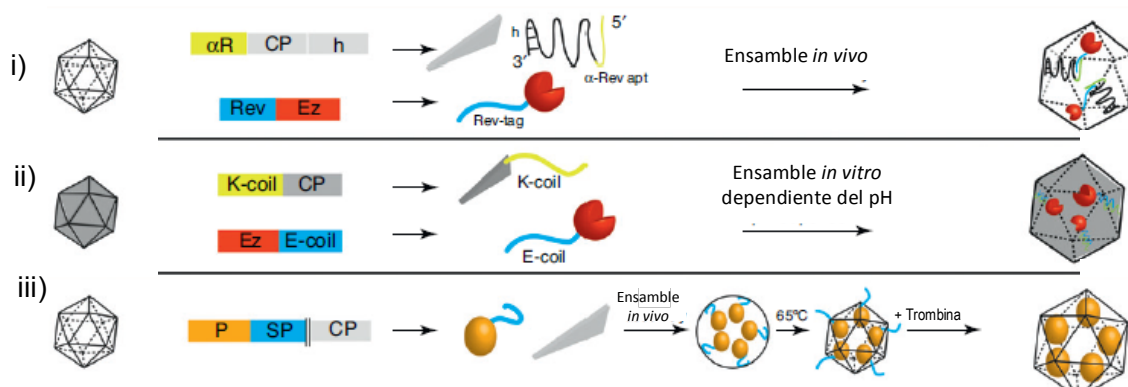


Figura 5. Estrategias de acoplamiento de enzimas a VLPs. Cada panel está descrito en el texto (Modificada de Cardinale *et al.*, 2012).

El modelo empleado en este estudio fue el PXV (*potato X virus*) que tiene una morfología tipo bastón de aproximadamente 500 nm de largo y 13 nm de diámetro. La cápside de este virus está compuesta por 1,270 copias de la CP, cada una con un peso de 25 kDa. Para la construcción no sólo se acoplaron los genes de la CP (25 kDa) y la lipasa (CALB, 33 kDa), sino que se introdujo la secuencia específica



2A (proveniente del virus de la enfermedad de boca y pezuña “*foot-and-mouth*”) para separar ambos genes, esto con el propósito de interrumpir, algunas veces, la traducción de la enzima. Así se generan proteínas que incluyen a CALB y la CP sin la enzima adicionada (Figura 6) (Carette *et al.*, 2007). Como resultado obtuvieron una estructura viral con algunas lipasas inmovilizadas en la superficie.

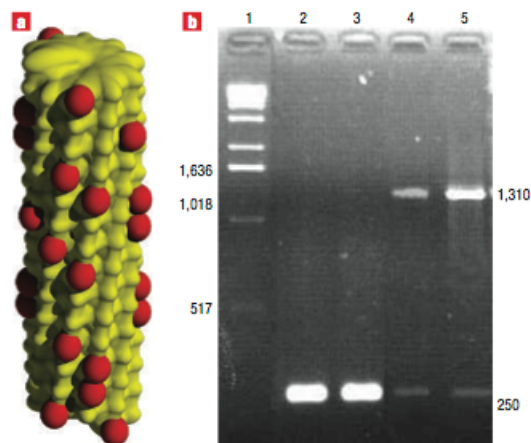


Figura 6. Partículas virales decoradas. (a) Representación esquemática de una partícula viral PXV (amarillo) decorada con moléculas de la enzima CALB (rojo) (b) Análisis de los productos de RT-PCR obtenidos de plantas inoculadas; los números indican el número de nucleobases. De izquierda a derecha: línea 1, marcador de peso, 2 y 3, hojas inoculadas y sistémicas, respectivamente, con el virus PVX nativo; líneas 4 y 5, hojas inoculadas y sistémicas, respectivamente, con el virus PVX-2A-CALB (Tomada Carette *et al.*, 2007).

A la hora de construir quimeras, la principal consideración al emplear las inserciones permisivas tiene que ver con el tamaño del péptido (Donath *et al.*, 2007). Se han obtenido VLPs quiméricas con insertos de diversas longitudes y naturalezas expuestos en la superficie, principalmente neurotransmisores (5 aminoácidos, aa), epítomos (entre 8 y 15 aa) y proteínas completas (GFP, 27 kDa, 239 aa) (Johnson *et al.*, 1999). Cabe señalar que los reportes de inserciones de proteínas completas se han dado sólo en los extremos (C y N terminales) y los virus son relativamente grandes, por ejemplo el TMV es de 300 nm de largo, el PXV cuenta con 500 nm de largo (donde se insertó GFP), el TBSV tiene 32 nm de diámetro (Kumar S., *et al.*, 2009) y el CPMV cuenta con 50 nm de diámetro.



Existe un reporte de inserción de una proteína completa en la VLP hecha con la proteína VP1 del virus del poliovirus. Con el objetivo de analizar la posibilidad de insertar dominios funcionales en la superficie de VLPs formadas por la proteína VP1 del virus del poliovirus, se construyó una proteína de fusión (quimera) con la CP VP1 y la dihidrofolato reductasa (DHFR) como un sistema modelo de actividad enzimática. En este trabajo, la DHFR fue insertada en un asa superficial debido a que los extremos C y N terminales de VP1 son funcionalmente importantes para la formación de la partícula y se encuentran en el interior de la misma. Por otro lado, el asa elegida sobresale notoriamente de la superficie del virus. Se diseñó un “linker” o péptido de unión de Ser-Gly con una longitud de entre ocho y nueve aminoácidos por lado para conectar VP1 con DHFR, de este modo se permitió el diseño flexible de cinco DHFR en la superficie del pentámero de VP1. Las conclusiones obtenidas de los experimentos apuntan que es posible insertar una enzima funcional en la superficie de VP1-VLPs del virus del poliovirus. La inserción de la DHFR no eliminó la capacidad de VP1 para formar VLPs, ya que DHFR-VP1 es capaz de formarlas aunque la población predominante constó de partículas con una distribución de tamaño entre 20 nm y 40 nm; además de que se observaron partículas con tamaño de 50 nm (tamaño reportado para las VLPs formadas por la proteína silvestre, wt-VP1) aunque se recalca que tendió a favorecer el ensamble de partículas más pequeñas. Por último, la estabilidad térmica de la proteína quimérica es menor cuando se compara con la wt-DHFR (Gleiter *et al.*, 1999).

Ejemplos de desarrollo y aplicaciones hay muchos, y en palabras de Cardinale y colaboradores: “Nuestra creatividad bien podría ser la única limitación del potencial uso de las cápsidas virales” (Cardinale *et al.*, 2012).



1.6. Parvovirus B19. Estructura

Dentro de la inmensa variedad que compone a los virus encontramos a los Parvovirus que se distinguen por ser pequeños (entre los virus), densos y resistentes.

Como grupo, los parvovirus tienen un diámetro que oscila entre los 18 y 28 nm, son de forma esférica y su material genético consta de una sola cadena de DNA; son virus que no cuentan con envoltura lipídica y su cápside está compuesta por entre dos y cuatro especies de proteínas (Gilbert *et al.*, 2005).

Las cápsides del Parvovirus B19 están formadas por 60 subunidades de proteína y, además de proteger y contener al DNA, cumple con funciones de reconocimiento y entrada a la célula, de transporte intracelular y debe liberar el DNA para el proceso infeccioso. Estas partículas se distinguen por ser estables a la presencia de solventes orgánicos, resistir en un intervalo de pH de 3 a 9, y tolerar una temperatura de 56°C por 60 min (Kerr *et al.*, 2002). Entre los parvovirus existe similitud estructural en la superficie interna de la cápside mientras que en la superficie externa se tienen diferencias importantes. En este sentido el Parvovirus B19 es estructuralmente más similar al virus adeno-asociado-2 (AAV-2). Un aspecto común entre las cápsides icosaédricas de los parvovirus es que son altamente resistentes a muchos agentes fisicoquímicos, haciéndolas muy resistentes a la inactivación. Ha sido demostrado que las cápsides del Virus diminuto del ratón (MVM) y del AAV solamente se desensamblan a temperaturas por encima de los 70-75°C (Ros *et al.*, 2005).

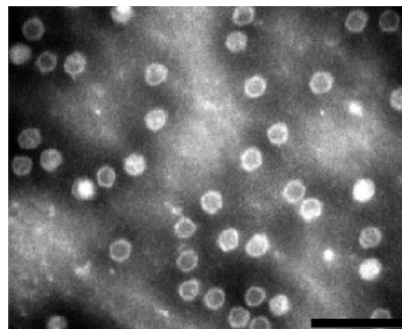
El Parvovirus B19 fue por mucho tiempo el único miembro de la familia *Parvoviridae* reconocido como patógeno para el hombre. Es el responsable del llamado eritema infeccioso o quinta enfermedad aunque en algunos casos, se le ha relacionado con otros síntomas como artropatías, fallas críticas en la producción de células rojas, hidropesía fetal, aborto, miocarditis o hepatitis (Kaufmann *et al.*, 2004).



El Parvovirus B19 tienen un diámetro aproximado de 26 nm, no es envuelto y su DNA genómico puede estar tanto en sentido positivo como en sentido negativo formado por 5,600 bases. El peso molecular del virión y de las partículas vacías (sin material genético) es de 5.5 a 6.2×10^6 y 4.2×10^6 g/mol respectivamente, y tiene una densidad de 1.30 a 1.32 g/mL (en CsCl). La cápside de los virus nativos posee forma icosaédrica, con número $T=1$, y ejes de simetría de orden 2, 3 y 5; está formada de dos proteínas, VP1 y VP2, con pesos moleculares de 83,000 Da y 58,000 Da, respectivamente. Ambas proteínas son muy similares, VP2 se encuentra formando el 95% de la cápside y difiere de VP1 en que ésta posee una llamada región única de 227 aminoácidos en el extremo amino terminal. Esta región se localiza principalmente fuera del virión y por lo tanto accesible a la unión de anticuerpos.

Las proteínas de la cápside del Parvovirus B19 han sido expresadas en células de ovario de hámster Chino o en células de insecto usando Baculovirus como vector. En ambos casos, las proteínas virales se auto ensamblan espontáneamente en cápsides vacías (Figura 7). Estas cápsides, que contienen VP1 y VP2 o solamente VP2, son morfológica e inmunológicamente similares a las partículas infecciosas.

Figura 7. Micrografía mostrando partículas virales del PB19 en una magnificación de 250, 000 X. La barra corresponde a 100 nm. (Heegard *et al.*, 2002)



En el 2004 se logró resolver la estructura del Parvovirus B19 a una resolución de 3.5 Å a partir de VLPs formadas exclusivamente con VP2 (Kaufmann *et al.*, 2004).



El plegamiento de VP2, como el de la mayoría de las subunidades que forman las cápsides de los virus de procariontes y eucariontes, consiste en un barril β con topología “jelly roll”, es decir, un grupo de nueve hebras β antiparalelas, dispuestas en dos conjuntos en el estándar BIDGA y CHEF. Estos forman las dos hojas sándwich que es la base principal del barril β , que presenta las secuencias más conservadas entre los parvovirus. Cinco asas, BC, DE, EF, GH, y HI, se extienden hacia fuera del el corazón de VP2 y constituyen la parte mayoritaria de la superficie exterior de la cápside (Figura 8) (Kaufmann *et al.*, 2004).

En ésta cápside se distinguen como subunidades estructurales: doce pentámeros, veinte trímeros y sesenta monómeros. La unidad fundamental para el estado de asociación son los trímeros. En vivo, el ensamblado de algunos parvovirus puede proceder a través de un intermediario trimérico (Carreira *et al.*, 2004).

Como antecedentes del uso de VLPs de Parvovirus B19, destaca la producción en células de insectos de VLPs quiméricas modificadas en el extremo amino terminal de la proteína VP2 y en una de sus asas superficiales (residuo 293; segmento GH). Los epítomos que se incorporaron a la VP2 provinieron del virus del herpes simple humano (HSV-1), y del virus de la hepatitis murina (MHV). Tanto las VLPs modificadas en extremo amino como en el asa, produjeron una respuesta y protección contra el reto viral. También ha sido posible obtener VLPs quiméricas recombinantes que transportan epítomos específicos del virus del dengue 2 (Proteína E, Dominio III: 352-368 y 386-397), en el extremo amino terminal de la proteína VP2. Y en otro estudio se obtuvieron VLPs que portaban epítomos del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), en este caso se reportó que estas partículas, administradas por vía intranasal, inducen una respuesta de células T citotóxicas y anticuerpos IgG e IgA (Amexis *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 1994; Sedlik *et al.*, 1999).

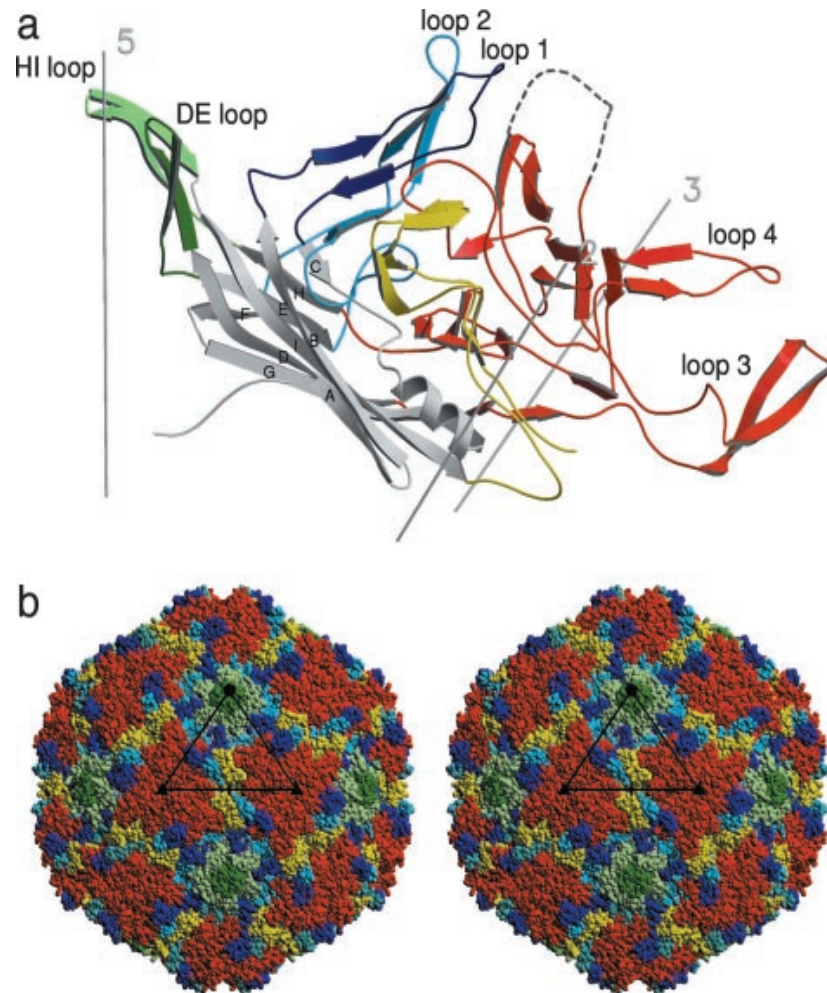


Figura 8. Estructura secundaria del parvovirus B19. (a) VP2 representada en diagrama de arcoíris. Las hebras que componen el barril β (gris) están marcadas secuencialmente de la A a la I. Las asas superficiales que conectan las hebras del barril están marcadas por color: azul oscuro, asa BC; verde oscuro, asa DE; azul claro, asa EF; rojo, asa GH; verde claro, asa HI; amarillo, los aminoácidos del extremo carbonilo. El asa desordenada (aminoácidos 301-313) (línea punteada) fue modelada basándose en la correspondiente asa del AAV-2. (b) Topología de la superficie del B19. Las asas superficiales están coloreadas de acuerdo al diagrama de arcoíris. El asa desordenada fue omitida (Modificada de Kaufmann *et al.*, 2004).

Leona Gilbert y colaboradores reportaron la construcción de VLPs quiméricas del Parvovirus B19, colocando en el extremo amino terminal de VP2 una proteína relativamente grande, la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Obtuvieron partículas muy similares en tamaño a las VLPs nativas del Parvovirus B19 (Figura 9) y con un promedio de nueve dominios de EGFP dispuestos en la superficie de estas partículas. Estas VLPs representan una novedosa herramienta para el



estudio de las propiedades biológicas del B19; al mismo tiempo proponen a este sistema como agente terapéutico y lo proyecta como plataforma para el desarrollo de un método de diagnóstico simple y rápido basado en fluorescencia (Gilbert *et al.*, 2005).

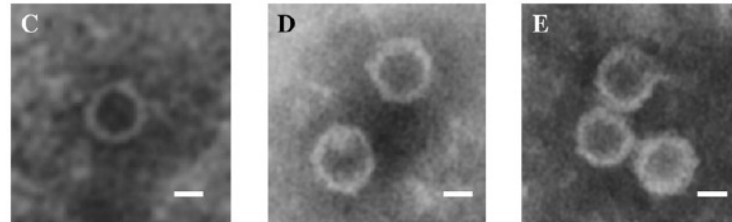


Figura 9. Comparación de micrografías electrónicas de VLPs sometidas a tinción negativa formadas a partir de exclusivamente VP2 (C), VP1/VP2 (wild-type) (D) y EGFP-VP2 (E). Las partículas obtenidas a partir de las diferentes proteínas son similares morfológicamente. (Modificada de Gilbert *et al.*, 2005).

El Parvovirus B19 es un modelo interesante para estudios de nanotecnología y biomedicina debido a sus propiedades: 1) Se pueden formar VLPs con una sola proteína (VP2, PDB 1S58; 2) Esta proteína puede ser modificada en su extremo N-terminal sin perder su potencial para formar cápsides; 3) Gran potencial de aplicación ya que es un virus que infecta a humanos; 4) Dada su relativa sencillez estructural, es un sistema ideal para desarrollar modelos de asociación de capsómeros. (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).



1.7. Lipasa BplA

Los biocatalizadores han adquirido un creciente interés no sólo debido a su carácter eficiente y ecológicamente amigable en síntesis orgánica, sino también por la selectividad y las condiciones suaves que implican su utilización. La biocatálisis involucra el uso de catalizadores naturales como son las enzimas, para llevar a cabo transformaciones de compuestos orgánicos. Las lipasas (hidrolasas de triacilgliceroles, EC 3.1.1.3) son ampliamente utilizadas en la industria química, alimentaria, de cuero y de detergentes (Bustos-Jaimes *et al.*, 2010). Siendo las enzimas comerciales más importantes, su producción es de bajo costo y se dispone de ellas con relativa facilidad; además proveen alta enantioselectividad para un amplio rango de sustratos y son estables en solventes orgánicos (Kaur *et al.*, 2012).

Otra característica que hace a las lipasas altamente empleadas es que, pese a que son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster carboxílicos de triacilgliceroles produciendo ácidos grasos y glicerol, en condiciones de baja actividad acuosa poseen la habilidad para llevar a cabo la reacción inversa, permitiendo la síntesis de ésteres (esterificación), a partir de alcoholes y ácidos grasos libres, también pueden realizar reacciones de alcoholisis o transesterificación, a partir de alcoholes y ésteres (Gupta *et al.*, 2004; Jaeger *et al.*, 1997).

La lipasa producida por la cepa de *Bacillus pumilus* GMA1 tiene preferencias por ácidos grasos de cadena corta como sustratos. La actividad de esta enzima ha sido caracterizada frente a distintas condiciones fisicoquímicas, encontrándose valores de temperatura y pH óptimos interesantes para usos industriales (en extractos parcialmente purificados se reportaron valores de temperatura y pH óptimos de 50°C y 10 respectivamente) (Bustos, 1995).

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 (BplA) es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis* (BslA) (Bustos, 1998). Ambas lipasas tienen 181 residuos de amino ácidos en sus formas maduras y un peso molecular de 19.5 kDa. A partir de los datos



cristalográficos de BslA (Van Pouderooyen, *et al.*, 2001) se ha modelado la estructura de la lipasa BplA tomando en cuenta la enorme identidad de secuencia que hay entre ambas proteínas (Figura 10). Se trata de una molécula globular con un plegamiento clásico α/β hidrolasa con 6 hebras β paralelas flanqueadas por 6 hélices α . La triada catalítica corresponde a los residuos de Ser77, Asp133 e His156 y los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 forman la cavidad oxianiónica y están en posiciones muy similares a las encontradas en otras lipasas de estructura conocida (Mora, 2008).

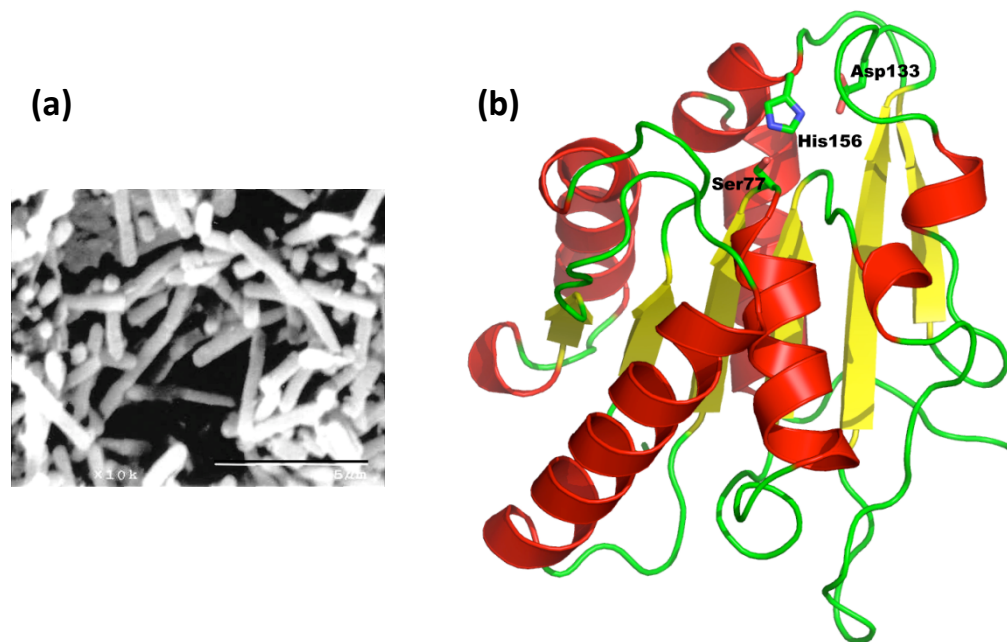


Figura 10. (a) Micrografía de la cepa de *Bacillus pumilus* GMA1 visto a 10,000x. La línea de escala representa 5 μm (Autor: Q.A. Patricia Wong, Tomada de Likhatcheva, 2009). (b) Modelo estructural de la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp133 e His156. (Tomada de Mora, 2008).



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el panorama de la nanobiotecnología viral la comprensión de las estructuras virales está lejos de ser completa. Las posibilidades son infinitas y la necesidad de modelos para el estudio y creación de herramientas biotecnológicas es primordial.

En el empleo de VLPs como andamios para la presentación de péptidos, el tamaño de los insertos es la principal consideración para la creación de quimeras; la pregunta que surge es la posibilidad de insertar péptidos completos en la superficie de una superestructura, como lo es una VLP, para que éstos desempeñen funciones específicas.

En este sentido el Parvovirus B19 es un modelo interesante porque se pueden formar VLPs con una sola proteína la cual puede ser modificada en su extremo N-terminal sin perder su potencial para formar cápsides; tiene gran potencial de aplicación ya que es un virus que infecta a humanos y dada su relativa sencillez estructural, es un sistema ideal para desarrollar modelos de asociación de capsómeros. Por otro lado, se han logrado ensamblar VLPs de éste virus con inserciones en asas superficiales, situación que confiere, por ejemplo, la ventaja de la polivalencia y la posibilidad de emplearlo como andamio.

En este proyecto nos proponemos estudiar la competencia de la VLP del Parvovirus B19 para incorporar proteínas completas y presentarlas en su superficie para desempeñar una función catalítica específica.



3. HIPÓTESIS

Es posible incorporar proteínas en una asa superficial de una superestructura proteica, como lo es una cápside viral o una VLP, y que la proteína insertada conserve su función, siempre que el plegamiento de dicha proteína no requiera asistencia. Asumiendo que la lipasa de *B. pumilus* no requiere asistencia en su plegamiento, su incorporación en la asa 300-314 de la proteína VP2 del Parvovirus B19 permitirá obtener una quimera capaz de ensamblarse *in vitro* en VLPs con actividad de lipasa o esterasa, demostrando así que estas VLPs tienen potencial como nano-acarreadores de enzimas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar el potencial de las VLPs derivadas de la proteína VP2 del Parvovirus B19 como nano-acarreador de la BpIA.

4.2. Objetivos particulares

- a) Determinar si la lipasa de *B. pumilus* se pliega *in vitro* sin asistencia.
- b) Diseñar una proteína quimérica que contenga la lipasa de *B. pumilus* en una asa superficial de la proteína VP2 del Parvovirus B19.
- c) Expresar a la proteína quimérica en *E. coli* y purificarla.
- d) Determinar el efecto de la inserción en VP2 sobre la actividad enzimática de BpIA, después del replegamiento.
- e) Determinar si la proteína quimérica replegada tiene competencia para formar VLPs.
- f) Evaluar la estabilidad térmica a 40°C de la proteína quimérica con respecto a la proteína silvestre BpIA.



5. METODOLOGÍA

Esquema general

A continuación se muestra un diagrama de bloques que representa la estrategia general seguida durante el trabajo experimental.

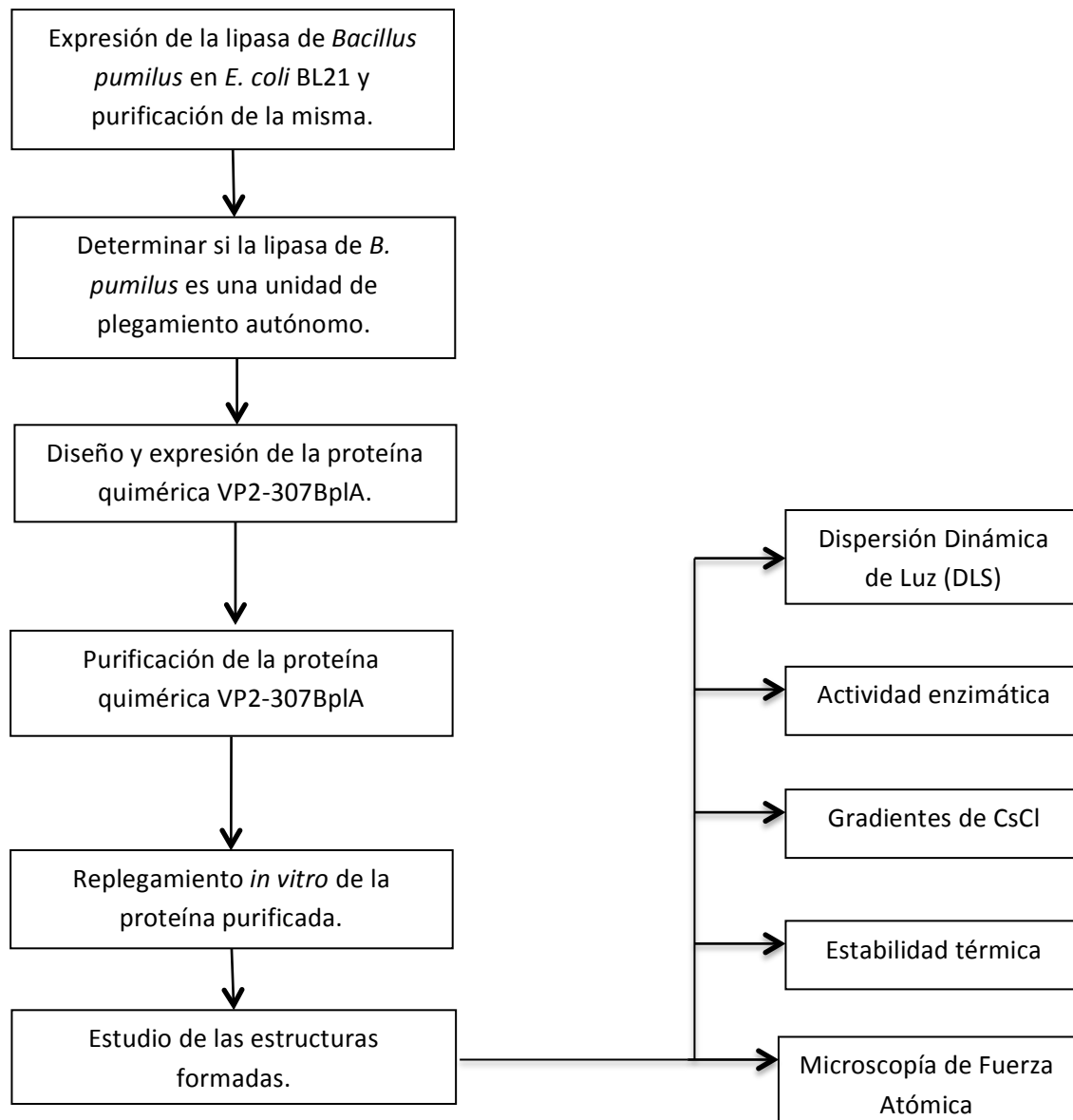


Figura 11. Esquema general del procedimiento experimental



5.1. Expresión y purificación de la lipasa de *B. pumilus* (BpIA)

La lipasa de *B. pumilus* se expresó y purificó como se ha descrito previamente (Bustos-Jaimes *et al.*, 2010). En resumen, esta lipasa se expresa en células de *E. coli* BL21(DE3) y se purifica por cromatografía de afinidad por una etiqueta de histidinas. La proteína se concentra y se conserva a -20°C en glicerol al 50% en amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 6.3. La pureza de la proteína se analizó mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

5.2. Cambios estructurales seguidos por espectroscopía de fluorescencia

Para seguir el desplegamiento de la BpIA se siguieron los cambios en la fluorescencia producidos por un agente caotrópico. Se incubaron muestras de la lipasa de *B. pumilus* a diferentes concentraciones del agente desnaturizante cloruro de guanidinio (GndHCl) (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 M GndHCl) a 25°C y pH 6.3 durante 12 h. Para el ensayo, se ajustó la concentración de proteína a 0.3 mg/mL. La excitación se hizo a 290 nm y se colectó el espectro de emisión entre 300 y 420 nm. El centro de masa espectral (spectral center of mass, SCM) se calculó con la fórmula:

$$SCM = \frac{\sum \lambda_{i-j} * IF_{i-j}}{\sum IF_{i-j}}$$

5.3. Determinación de la capacidad de plegamiento autónomo de BpIA

Del experimento anterior se tomó la muestra que había estado incubada en 6 M GndHCl y se dializó en una membrana de celulosa con un tamaño de corte de 14,000 Da, en amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7.4) durante 36 h con dos cambios de amortiguador (uno cada 12 h aproximadamente). Se preparó una celda de 1 mL de capacidad con



100 μ L de la proteína recuperada de la diálisis y 850 μ L de PBS; la reacción se dispara con la adición de 50 μ L de una solución previamente preparada de 4-Nitrofenilacetato (4-NFA) 10 mM disuelto en acetonitrilo (ACN). Se midió el cambio en la absorbancia a 410 nm (Abs_{410}) cada 10 s durante 3 min en un espectrofotómetro (CARY 400, Varian) a 25°C. Se repitió el ensayo con BpIA que no fue desnaturalizada. El blanco fue PBS con ACN al 5 % (v/v) y como control se midió la hidrólisis espontánea del 4-NFA.

5.4. Diseño de la proteína VP2-307BpIA

Se diseñó el gen que codifica para esta proteína a través de un análisis estructural, energético y evolutivo para la selección del sitio de inserción de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína BpIA (Aguilar-Morales, 2014). La secuencia de la BpIA (GenBank EU552794) se flanqueó con un codón de Gly en cada extremo y se insertó entre los residuos 307 y 308 de la proteína VP2. A la proteína quimérica resultante se le incluyó una etiqueta de seis histidinas en el carboxilo terminal. La secuencia de proteína se tradujo a DNA considerando el uso de codones de *E. coli*. El gen fue sintetizado químicamente y clonado en el vector de expresión pET22b(+) bajo la regulación del promotor T7. El plásmido resultante, pET22b-VP2-BPL307, se usó para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3).

5.5. Escalamiento de la expresión de la proteína VP2-307BpIA

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET22b-VP2-BPL307 fue inoculada en un tubo con 10 mL de medio LB amp y se dejó incubando toda la noche a 37°C y 250 rpm. Con este tubo se inoculó un matraz de 250 mL de capacidad con 100 mL de medio LB amp que se dejó incubando durante 4 h a las mismas condiciones. Posteriormente con este matraz se inoculó un matraz de 2 L de capacidad con 0.5 L de medio LB amp que se indujo con una concentración final de 0.25 mM de IPTG una vez que alcanzó una densidad óptica de 0.6



(medida a 600 nm). El matraz se incubó durante 24 h a una temperatura entre 22-25°C y con agitación orbital de 125 rpm.

5.6. Purificación de la proteína VP2-307BpIA

La purificación de la proteína VP2-307BpIA se llevó a cabo como se ha descrito previamente para VP2 (Sánchez Rodríguez, 2012) con algunas adaptaciones. Después de la inducción las células se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min y el pellet se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.3 M, pH 6.3). Las células se lisaron empleando lisozima a 37°C por 15 min, posteriormente se sonicaron (Ultrasonic Processor, 500 watt) utilizando pulsos de 9 s con pausas de 9 s durante 15 min en un baño de hielo. Después de la lisis, la muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min a 4°C. El pellet con los cuerpos de inclusión se dispersó en 40 mL de amortiguador de lisis. La purificación se dividió en tres etapas: 1) Limpieza de cuerpos de inclusión, 2) Solubilización de los cuerpos de inclusión y 3) Purificación de la proteína VP2-307BpIA por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes.

1) Limpieza de cuerpos de inclusión

Se realizaron varios lavados de los cuerpos de inclusión con el fin de incrementar la pureza de la proteína. El pellet dispersado en amortiguador de lisis fue sonificado en pulsos de 9 s y pausas de 9 s por aproximadamente un minuto y posteriormente centrifugado a 8000 rpm durante 10 min. El pellet se dispersó en 40 mL de amortiguador de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.3 M, urea 3 M, Tritón X-100 al 2%; pH 6.3), se volvió a sonificar con el mismo esquema y a centrifugar a 8000 rpm durante 10 min. Este lavado se repitió 2 veces y posteriormente se realizó otro con el mismo amortiguador, pero adicionado con 3 mM de DTT. Para el último lavado se utilizó amortiguador de lisis, con el objetivo de eliminar el exceso de urea, detergente y de agente reductor en la muestra. El pellet se recuperó por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min.



2) Solubilización de cuerpos de inclusión

El pellet recuperado después de los lavados fue solubilizado con 80 mL de amortiguador de solubilización (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.3 M, DTT 2 mM, GndHCl 5 M, pH 6.3). La muestra se sonicó por 3 min y posteriormente se dejó en agitación a 180 rpm durante 24 h a 37°C. Los agregados de proteína que no se alcanzaron a solubilizar fueron eliminados por centrifugación a 13000 rpm durante 30 min.

3) Purificación final mediante cromatografía de afinidad

La purificación de la proteína VP2-307BpIA se realizó mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes. Se utilizó una columna empacada con 20 mL de resina protino Ni-TED (Macherey Nagel), pre-equilibrada con el amortiguador de solubilización, pero sin la presencia de DTT. Se corrieron muestras de 15 mL a un flujo de 2 mL/min. Después de pasar la muestra, la columna fue lavada con 30 mL de amortiguador de solubilización sin DTT y con 30 mL del mismo amortiguador, pero adicionado con imidazol 20 mM. La proteína se eluyó con 30 mL de amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50 mM, 0.3 M NaCl, GndHCl 5 M, Imidazol 300 mM; pH 6.3). Se colectaron fracciones de 5 mL y alícuotas de 100 μL de cada fracción fueron dializadas y analizadas por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían a la proteína pura fueron colectadas y concentradas con cartuchos de ultrafiltración con tamaño de corte de 50 kDa (Millipore).

Posteriormente se cambió el amortiguador de solubilización por amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, 1 mM de DTT, GndHCl 5 M, pH 8). La concentración final de proteína, se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Se utilizó una curva patrón de albúmina solubilizada en el amortiguador de replegamiento. La concentración de proteína se ajustó entre 0.7-1.15 mg/mL y se almacenó a temperatura ambiente, hasta su posterior uso.



5.7. Análisis por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Para determinar el tamaño de partícula se hicieron análisis de DLS en un equipo Zetasizer μ V. Para el análisis se ultrafiltraron 500 μ L de proteína recién salida de la diálisis en PBS con cartuchos de 0.22 μ m. El índice de refracción y viscosidad se fijaron como 1.33 y 1.003 cP respectivamente a 25°C (los del agua). A cada muestra analizada se le realizaron 10 corridas con 10 medidas de 10 segundos cada una. Para definir el tamaño se realizó un promedio de las 10 corridas realizadas para cada muestra.

5.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para el análisis de las partículas, se utilizaron 20 μ L de muestra dializada y filtrada (filtro de 45 μ m) esparcida sobre una mica *Highest Grade V1 Mica 12 mm* (Ted Pella Inc.); la muestra se secó al vacío (Savant SpeedVac SC110) por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados: primero con 20 μ L de PBS (filtrado 0.22 μ m) y el segundo con 20 μ L de agua desionizada filtrada (0.22 μ m). Una vez lavada, la muestra se secó de la misma forma mencionada. La mica fue montada sobre un disco magnético, el cual se colocó sobre la base para la observación de la muestra.

La muestra se visualizó en modo tapping-aire y se utilizaron sondas *Hi'Res-C19/Cr-Au* (MikroMasch) con un diámetro de 1 nm, frecuencia de resonancia de aproximadamente 65 kHz y una fuerza 0.5 N/m. Los barridos se hicieron con una calidad de imagen de 512 pixeles a una velocidad de 0.3 Hz.

5.9. Pruebas de actividad enzimática

Se tomaron 2.5 mL de proteína a 1.13 mg/mL y se dializaron contra 50 mL de PBS durante 36 horas con dos cambios de amortiguador (uno cada 12 h). Una vez



dializada se ajustó el volumen a 3 mL con PBS. La prueba de actividad se realizó como se describió para BpIA en el numeral 5.3 de esta misma sección con la diferencia de que el tiempo de colecta de datos fue de 5 min; adicionalmente se ensayó de esta manera a VP2. Cada determinación se hizo por duplicado. Debido a que las proteínas VP2 y VP2-307BpIA son insolubles a pH 7.4 en ausencia de GndHCl, existe turbidez en las muestras de estas proteínas. Para evaluar el efecto que este hecho tiene en el ensayo, también se determinó el cambio de Abs_{410} contra tiempo para ambas proteínas en ausencia de sustrato. Con el objeto de relacionar la Abs_{410} con la concentración del producto de la hidrólisis, se elaboró una curva patrón de éste, el 4-Nitrofenol (4-NF), en PBS y 5% de ACN, en un intervalo de concentración de 0 a 200 μ M. La medición se realizó a 25°C.

5.10. Determinación de la concentración de proteína

De la proteína dializada para los ensayos se determinó su concentración por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smit *et al.*, 1985). Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en un intervalo de 0 a 0.8 mg/mL. Como ya se ha mencionado, en ausencia de GndHCl la proteína VP2-307BpIA forma partículas y agregados que no se mantienen en solución, al igual que VP2, por lo que existe turbidez. Por esta razón también se analizó la turbidez a 600 nm tanto para BSA como para las muestras.

5.11. Centrifugación isopícnica mediante gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl)

Se preparó un amortiguador a pH 7.4, con la siguiente composición: 50 mM de fosfatos, 10 mM de EDTA, 0.5% Tritón X-100. Posteriormente se mezclaron exactamente 79.2 mL de este amortiguador con 40.8 g de CsCl para tener una solución de 1.33 g/mL (solución de CsCl). Se colocaron 3.5 mL de la solución de CsCl en un tubo de centrifuga de 5 mL (Ultra-Clear, Beckman 11 x 60 mm) y sobre



ésta, procurando no mezclar, se adicionaron 0.5 mL de proteína dializada a una concentración entre 0.5 y 0.7 mg/mL. La ultracentrifugación se realizó con un rotor SW 60Ti (Beckman) a 60,000 rpm durante 9 h, a 20°C y sin ningún perfil de frenado por parte del equipo.

5.12. Velocidades específicas de las fracciones recuperadas después de la centrifugación isopícnica mediante los gradientes de CsCl

Las fracciones observadas se recuperaron y dializaron con PBS durante 48 h con tres cambios de amortiguador. Se les determinó la actividad específica en los términos descritos en esta misma sección y se verificó la composición de las mismas mediante electroforesis SDS-PAGE.

5.13. Estabilidad térmica

Se determinó la estabilidad térmica de las proteínas BpIA y VP2-307BpIA. En el caso de BpIA se incubó por 12 h en GndHCl 6 M a temperatura ambiente, para después ser dializada con PBS durante 36 h con dos cambios de amortiguador. De la misma forma se dializó VP2-307BpIA tanto para generar muestra formada exclusivamente por VP2-307BpIA como para obtener muestra en proporción 4:1 de VP2/VP2-307BpIA. Para el ensayo se ajustó la concentración de proteína a 1 mg/mL en el caso de estas dos últimas muestras y a 0.005 mg/mL para BpIA. Se tomaron 600 µL de cada muestra y se incubaron a 40°C y 500 rpm (Termomixer Confort, Eppendorf). Se tomaron 50 µL de cada muestra a los 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos de incubación. Inmediatamente se lleva a cabo el ensayo descrito para determinar actividad enzimática de BpIA utilizando 50 µL de 4-NFA 15 mM en ACN y 650 µL de PBS, a 25°C por 4 minutos. El blanco consistió en PBS con ACN al 6.7%. Todas las mediciones se corrigieron por el efecto de hidrólisis espontánea del sustrato.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cambios estructurales seguidos por espectroscopía de fluorescencia

El objetivo de este proyecto es insertar una proteína en VP2 y evaluar cómo este hecho afecta a ambas partes: VP2 y la proteína insertada. Así lo que se pretende probar es si VP2 conserva su capacidad para ensamblarse *in vitro* en VLPs presentando o sirviendo como andamio a otra proteína, y si esta otra proteína conserva y/o cumple una función determinada. En este sentido, el modelo elegido para esta inserción fue BpIA porque es relativamente pequeña, 181 residuos de aminoácidos (Figura 12), y ésta enzima tiene un arreglo espacial conveniente, ya que ambos extremos, el amino y el carbonilo, se ubican en un mismo lado, el cual es opuesto al sitio catalítico. Asumiendo que se logra presentar en una VLP, los extremos de la secuencia de BpIA estarían de cara a la superficie de la partícula y la triada catalítica expuesta al medio (Figura 12). Otra ventaja es que su actividad enzimática se puede ensayar en las condiciones en que VP2 se ensambla y se mantiene como VLP, y la detección de ésta se puede evaluar por un método simple, como es la detección de la aparición del compuesto colorido 4-NF proveniente de la hidrólisis del 4-NFA.

En el entendido de que la función de una proteína es inherente a su correcto plegamiento, es decir a su estructura terciaria, la proteína elegida para ser insertada debe ser capaz de adquirirla sin asistencia, es decir, se debe comportar como una unidad de plegamiento autónomo (AFU, por sus siglas en inglés); BpIA al ser una enzima presenta actividad sólo si se encuentra plegada correctamente, por ello el primer ensayo de este trabajo fue determinar si BpIA se comporta como una AFU.

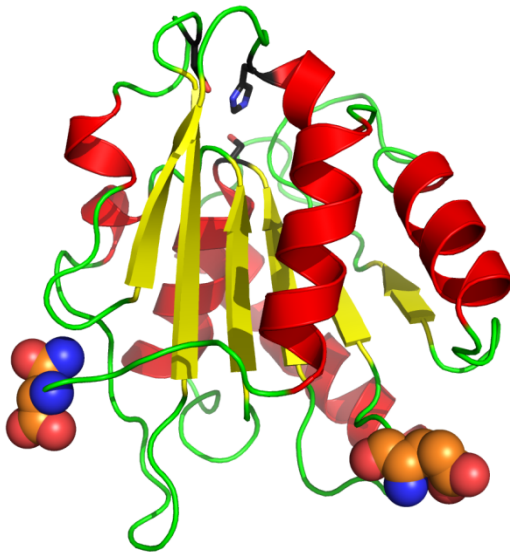
Como se ha descrito antes (Sánchez Rodríguez, 2012) VP2 se recupera en los cuerpos de inclusión por lo que la purificación se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes (5 M de GndHCl). Es por eso que se evaluaron los cambios estructurales en la lipasa de *B. pumilus* provocados por GndHCl.



(a)

1	AEHNPVVMVH	GIGGASYNFF	SIKSYLVGQG	WDRNQLYAID
41	FIDKTGNNRN	NGPRLSRFVK	DVLDKTGAKK	VDIVAHSMGG
81	ANTLYYIKNL	DGGDKIENVV	TIGGANGLVS	SRALPGTDPN
121	QKILYTSVYS	SADLIVVNSL	SRLIGARNVL	IHGVBHIGLL
161	TSSQVKGYIK	EGLNNGGQNT	N	

(b)



(c)

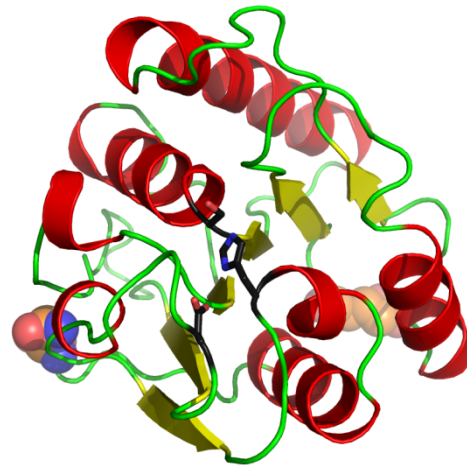


Figura 12. Lipasa de *Bacillus pumilus* (BpIA). (a) Secuencia de los 181 aminoácidos que conforman a BpIA (EU552794, *GenBank*), se resalta el único triptófano en la posición 31). (b) Modelo en tres dimensiones; los extremos (representados en radios de Van der Waals) se encuentran del mismo lado de la proteína, el cual es opuesto a los residuos que forman el sitio catalítico: Ser77, Asp133 e His156 (en negro). (c) Rotación de 90° del panel b.

En la secuencia se puede ver que BpIA solamente cuenta con un triptófano en la posición 31 (Trp31) (Figura 12: panel a). Adicionalmente este Trp31 se encuentra en una bolsa hidrofóbica, no expuesto al medio, sino enterrado en la estructura de la proteína, como se muestra en su homóloga BsIA en la que este residuo está conservado (Figura 13).

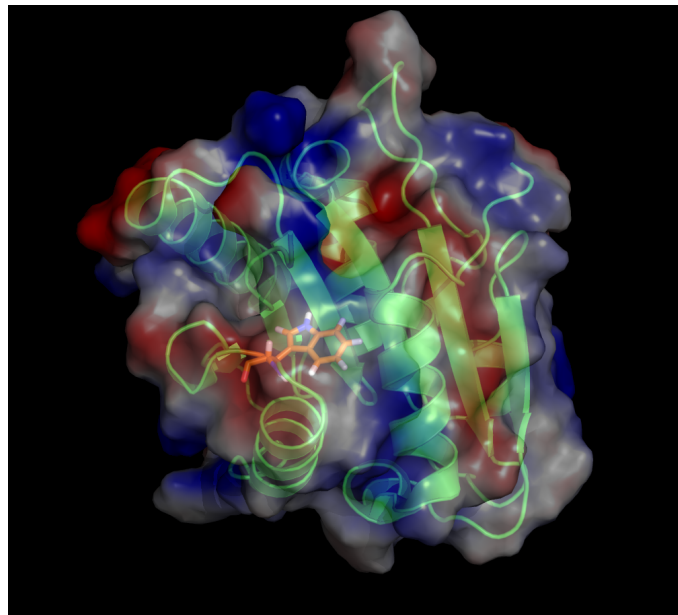


Figura 13. Representación tridimensional de la lipasa A de *B. subtilis* (BsIA). En la imagen se aprecia la estructura secundaria delimitada por la superficie de la proteína; en color anaranjado se destaca la ubicación y orientación del Trp31 que se encuentra hacia el núcleo de la proteína y dentro de una bolsa hidrofóbica.

Utilizando como reportero de los cambios estructurales de la proteína a este aminoácido se excitó cada muestra a 290 nm después de la incubación en diferentes concentraciones de GndHCl y se recolectó el espectro de emisión de 300 a 420 nm. De esta forma se monitoreó el cambio en el centro de masa espectral (SCM) (Figura 14).

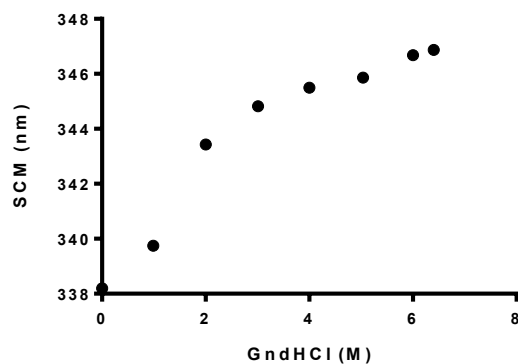


Figura 14. Corrimiento del centro de masa espectral cuando BplA es sometida a 12 h de incubación en diferentes concentraciones de GndHCl.



Como puede verse en la gráfica, al aumentar la concentración del agente desnaturizante es mayor el desplazamiento del SCM. Este desplazamiento se produce hacia mayores longitudes de onda, a la zona del rojo (efecto batocrómico), lo que está asociado a la exposición de Trp a un medio más polar, como lo es el solvente. De acuerdo a la gráfica, a altas concentraciones de GndHCl el desplazamiento del SCM es considerable (10 nm) por lo que la exposición del Trp31 al medio acuoso demuestra que la proteína BpIA ha perdido, al menos parcialmente, su estructura terciaria.

6.2. Determinación de la capacidad de plegamiento autónomo de BpIA

Una vez lograda la desnaturización, la proteína se dializó exhaustivamente con el propósito de eliminar al agente desnaturizante y verificar si ésta recupera actividad enzimática, señal inequívoca de que BpIA es capaz de plegarse adquiriendo su conformación espacial nativa.

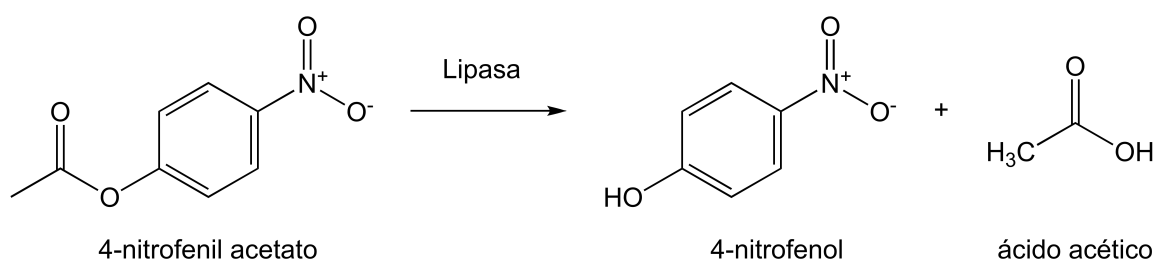


Figura 15. Reacción de hidrólisis del 4-NFA por lipasas (Modificada de Santillán, 2012).

En la Figura 16 se presenta la comparación entre la Abs₄₁₀ asociada a la aparición del 4-nitrofenol, compuesto colorido que se desprende una vez que se hidroliza el enlace éter del sustrato 4-NFA (Figura 15). Al comparar la curva correspondiente a la hidrólisis espontánea del 4-NFA y la curva del desempeño de la proteína BpIA control, se demuestra que el sustrato se hidroliza por acción enzimática. En la



gráfica se demuestra que hay actividad enzimática por parte de BpIA (5.34×10^{-4} Abs₄₁₀/s) que fue desnaturalizada y posteriormente replegada (dializada), y que esta actividad es prácticamente idéntica a la exhibida por la BpIA que no fue desnaturalizada (5.51×10^{-4} Abs₄₁₀/s).

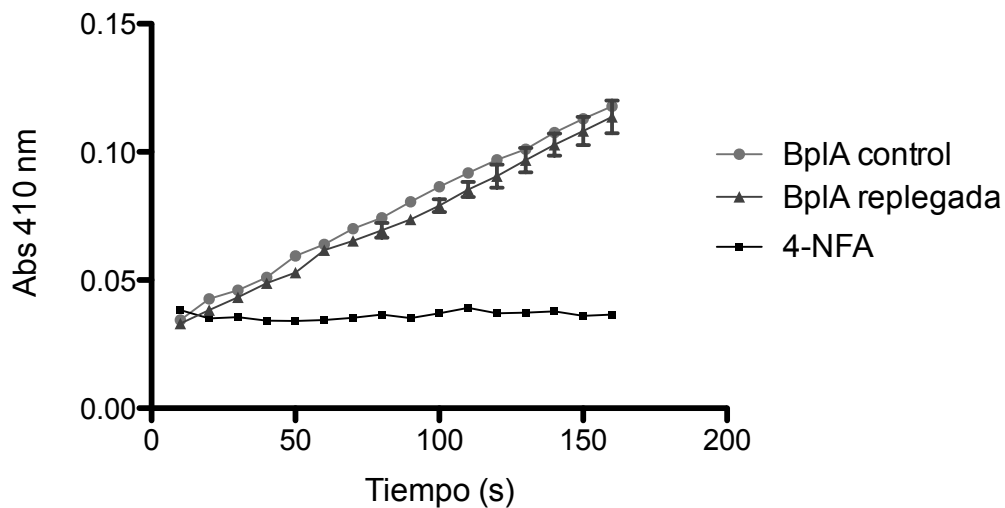


Figura 16. Comparación de la hidrólisis del 4-NFA por BpIA que no fue desnaturalizada (control), BpIA incubada en 6 M de GndHCl y replegada por diálisis, e hidrólisis espontánea del 4-NFA.

De este experimento se concluye que BpIA se pliega eficientemente *in vitro* comportándose como una AFU, situación que la convierte en un modelo idóneo para la inserción en VP2.

6.3. Diseño de la proteína quimérica VP2-307BpIA

El empleo de VLPs de Parvovirus B19 como herramienta biotecnológica no es nuevo (Gilbert *et al.*, 2005), el común denominador de estos trabajos es que las inserciones se han hecho en el extremo N-terminal de la proteína VP2 y se han obtenido partículas morfológicamente similares a las VLPs formadas exclusivamente de VP2.



Una de las metas del grupo de trabajo al emplear al Parvovirus B19 como modelo experimental, es encontrar sitios susceptibles de ser modificados sin comprometer la estabilidad estructural de las VLPs para presentar péptidos en su superficie. En un trabajo previo se estudió el efecto de la modificación de asas superficiales de la proteína VP2 en la formación de VLPs del Parvovirus B19 (Aguilar Morales, 2014); Como criterios de selección de las asas a modificar se consideraron las siguientes características: exposición superficial, movilidad térmica (factores B altos), que las secuencias no presenten aminoácidos que participen en contactos en las intercaras de subunidades, y que preferentemente exista una evidencia evolutiva de modificaciones en las secuencias y longitudes de esas asas (alineamiento con secuencias de virus relacionados). Los aspectos anteriores pueden englobarse en tres criterios: uno estructural, uno energético y el tercero evolutivo.

De los resultados obtenidos, destaca el asa definida por los residuos 300 a 314, la cual no es posible analizar bajo los dos primeros criterios debido a que no presenta estructura cristalográfica. Cuando se determinó la estructura del Parvovirus B19, Kaufmann y colaboradores (2004) encontraron densidad electrónica en la mayoría de los 554 residuos de la proteína VP2, excepto por dieciocho aminoácidos localizados en el extremo N terminal y los trece residuos comprendidos entre las posiciones 301 a 313 (Figura 17). Lo anterior sucede porque al patrón generado durante la difracción de rayos X no es posible asignarle una posición a estos átomos debido a que durante la cristalización este fragmento de la proteína cristalizó en diferentes posiciones en las diferentes moléculas de

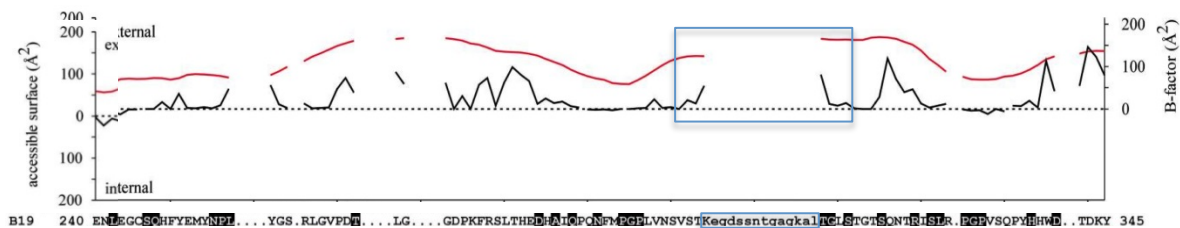


Figura 17. Gráfica del área superficial accesible (ASA) en la cápside (línea inferior) y el promedio del factor de temperatura, factor B, (línea superior) para cada residuo ubicado en la posición 240-345 de la VP2 del B19. En los recuadros se señala la ausencia de valores en los residuos 301 a 313 que corresponden a la punta de un asa superficial adyacente al eje de orden tres de la cápside icosaédrica (Modificada de Kaufmann *et al.*, 2004).



VP2. Este comportamiento habla de la ausencia de interacciones entre los aminoácidos de este fragmento de la proteína y el resto de la cápside y con ello de la alta movilidad de esta asa superficial.

El ser un asa tan móvil implica que los aminoácidos que la conforman no deben tener contactos con elementos de otros monómeros del capsómero y tampoco deben establecer contactos con elementos de otros capsómeros. Así, se puede suponer que no son contactos vitales para la formación y estabilidad de la cápside.

El criterio evolutivo se basó en los alineamientos con secuencias de las proteínas de cápside de virus relacionados, tomando como referencia el análisis realizado por Kaufmann y colaboradores en 2004. Sobre el supuesto de que los alineamientos con pocas variaciones reflejan regiones conservadas, que posiblemente cumplen una función o estabilizan, se consideró que las asas que son codificadas por estas regiones no serían adecuadas para modificar. Bajo este análisis, el asa 300-314 mostró ser más corta o más larga respecto a sus homólogas en otros virus. Aguilar Morales (2014) reportó la construcción y expresión de una quimera de la proteína VP2 que en entre los residuos 305-306 contiene un fragmento de 57 aminoácidos de la proteína F del virus sincicial respiratorio (VSR). Este fragmento incluye a la región antigénica IV de este virus, que ha sido descrita como un epítipo lineal. En ese trabajo se lograron obtener VLPs a partir de esa proteína quimérica.

En nuestro caso, el gen que codifica para la proteína quimérica que incluye a la lipasa de *B. pumilus* en el asa 300-314, *vp2-307bpla*, se diseñó incluyendo un codón de Gly después del codón que codifica para el residuo 307 de la proteína VP2. A continuación se incluyó la secuencia de desoxirribonucleótidos que codifica para la lipasa de *B. pumilus*, nuevamente se incluyó un codón que codifica para Gly, y finalmente se insertó la secuencia nucleotídica que codifica para el fragmento 308-561 del gen *vp2*, incluyendo la etiqueta de seis histidinas (Figura 18). Los residuos de Gly que flanquean la secuencia de la lipasa tienen como objetivo facilitar su acoplamiento con la VP2 mediante la reducción de impedimentos estéricos en la zona de la inserción. Se optimizó el uso de codones



para su expresión en *E. coli* y se adicionaron secuencias de restricción para las enzimas *NdeI* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente. El gen fue sintetizado químicamente (Epoch Life Science Inc.) y clonado en el vector de

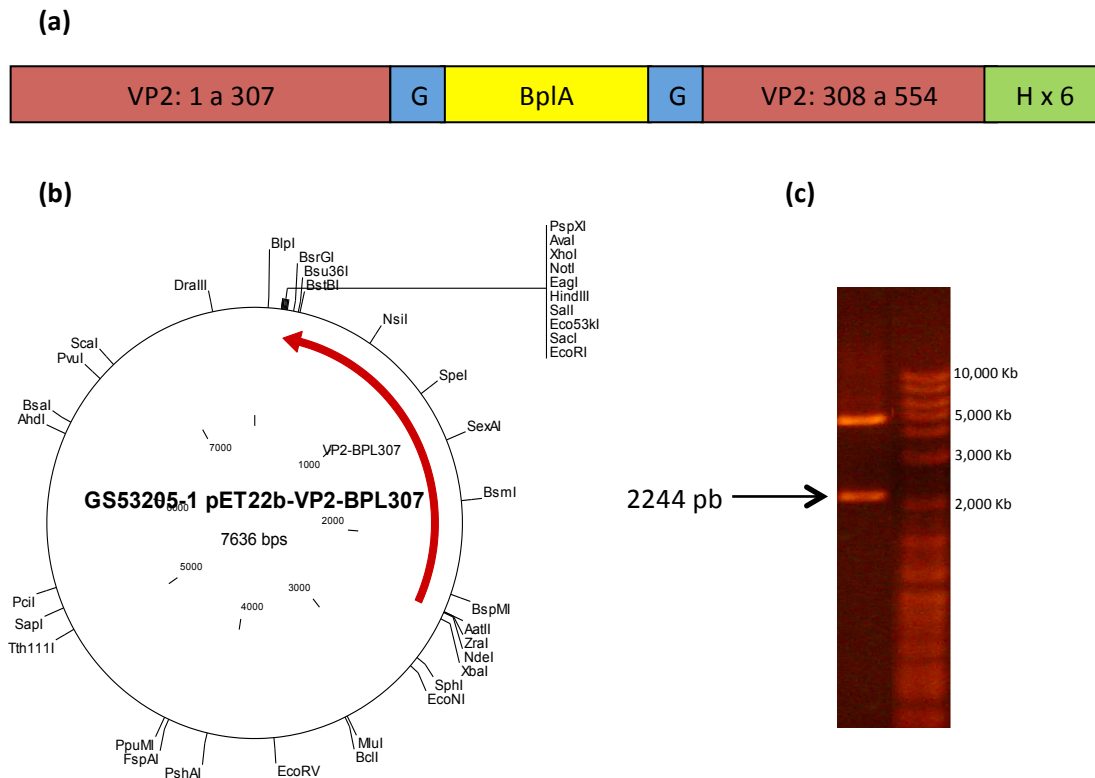


Figura 18. (a) Esquema de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2-307BpIA, la etiqueta de histidinas se encuentra en el extremo carboxilo terminal. (b) Plásmido pET22b-VP2-BPL307. En rojo está señalado el gen *vp2-307bpla* que codifica para la proteína química VP2-307BpIA. Este plásmido incluye las secuencias de restricción para las enzimas *NdeI* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3' respectivamente del gen. (c) Digestión del plásmido pET22b-VP2-BPL307 con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*. Carril izquierdo, señalado el gen *vp2-307bpla* de 2244 pb. Carril de la derecha marcador de peso molecular. La banda adicional que se observa corresponde al resto del plásmido pET22b-VP2-BpL307 después de la digestión.

expresión pET22b(+) bajo la regulación del promotor T7. El plásmido resultante, pET22b-VP2-BLP307, se usó para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3) (Figura 18, panel b).



Después de la expresión, la separación de los cuerpos de inclusión, los lavados y solubilización de los mismos, fue posible purificar la proteína VP2-307BpIA por medio de cromatografía de afinidad, de la misma forma como se ha reportado anteriormente para VP2 (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE (Figura 19). Como puede notarse, tanto la expresión, el lavado de los cuerpos de inclusión y la purificación son más eficientes cuando se produce VP2 que cuando se expresa VP2-307BpIA.

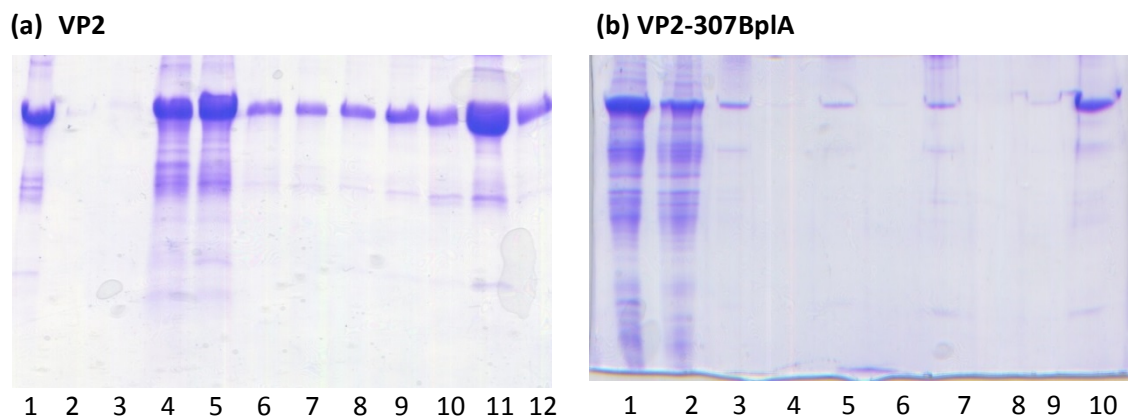


Figura 19. Comparación del proceso de purificación de las proteínas VP2 y VP2-307BpIA. Panel (a) VP2: Carril 1 cuerpos de inclusión lavados y solubilizados; 2-3 frente; 4-8 lavados; 9-12 elución. Panel (b) VP2-307BpIA: carril 1, cuerpos de inclusión lavados y solubilizados; 2 frente; 3-6 lavados; 7-9 elución; 10 concentrado de las fracciones de elución.

6.4. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Una vez que se elimina el agente desnaturante, VP2 tiene la capacidad de ensamblarse por sí sola *in vitro* en partículas tipo virus. Después del ensamble la muestra se analiza por DLS para estimar el tamaño de las partículas en suspensión. El tamaño esperado para VLPs formadas *in vitro* a partir de VP2 es de 18 a 23 nm (Sánchez Rodríguez, 2012). Se analizó por DLS la proteína VP2-307BpIA, a la que en lo sucesivo llamaremos Q, por “Quimera”, para acortar su nombre.



Dado que VP2 es una muestra conocida y confiable en el grupo de trabajo, en todos los casos se ensayó como control del ensamble. El tamaño de partícula que se tiene para VP2 por DLS es de 22.14 ± 5.57 nm medido por intensidad con un índice de polidispersidad (Pdl) promedio de 0.3.

El análisis por DLS de Q mostró una población muy heterogénea, ya que reporta un índice de polidispersidad (Pdl) de 0.5, y tamaños menores a los esperados teniéndose un promedio de 15 nm (Figura 20).

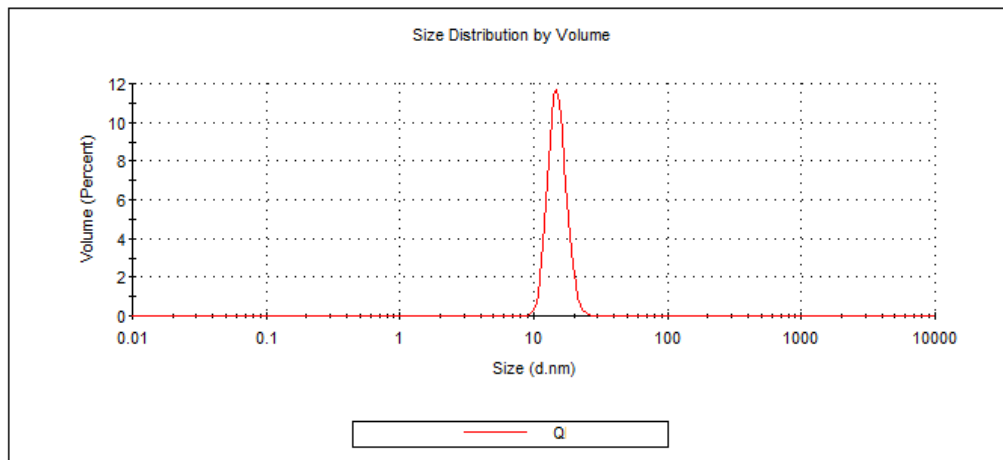


Figura 20. Análisis por DLS de la proteína VP2-307BpIA (Q) después de someterla a las condiciones de replegamiento y ensamble usados para VP2. De acuerdo a la gráfica se tiene un tamaño de partícula de 15 ± 2.4 nm y un Pdl de 0.5.

Estos datos sugieren que Q no tiene la capacidad de formar VLPs como VP2, pero dada la forma de la gráfica la muestra se pliega en unidades con cierta organización. Si bien las modificaciones en el sitio de inserción permitieron previamente la formación de VLPs (Aguilar Morales, 2004), para el caso que ocupa este trabajo, la inserción es de 181 aminoácidos, que es el triple de lo reportado previamente. Este inserto heterólogo, en contraste con lo previamente reportado, debe adquirir estructura terciaria. De acuerdo a la estructura de las VLPs de Parvovirus B19, tres de estas inserciones deben estar muy cercanas en la estructura de cada capsómero, posiblemente generando un impedimento estérico (Figura 21).



Otra posibilidad es que el hecho de tener a BpIA cause cierta deformación en el capsómero de VP2, alterando sitios críticos para la correcta asociación de los capsómeros y esto evitar la asociación entre los mismos.

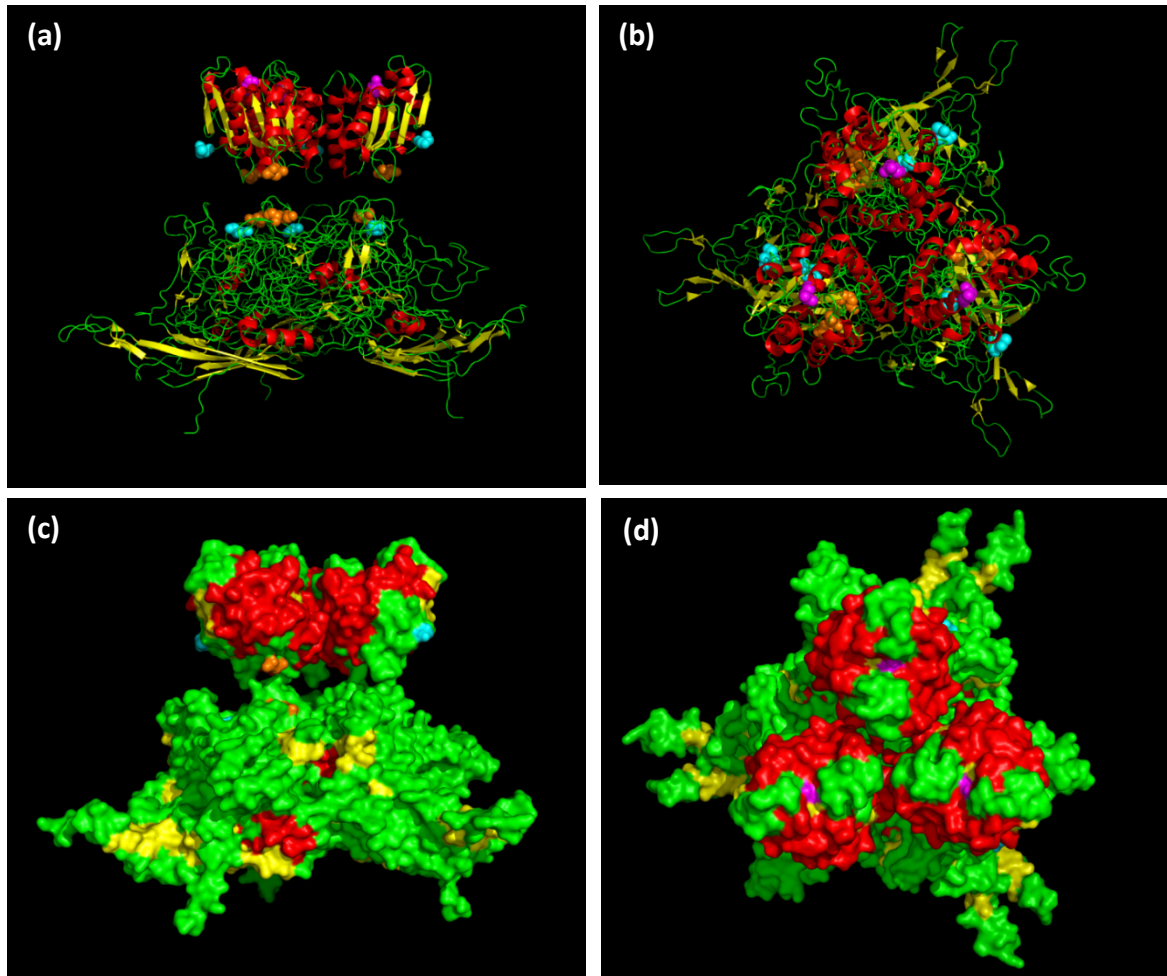


Figura 21. Modelo del acomodo de un capsómero de VP2-307BpIA (Q). **(a)** Vista de perfil, en la parte superior tres proteínas BpIA con los extremos amino y carboxilo marcados como esferas de Van der Waals en anaranjado y azul; la Ser77 del sitio catalítico está señalada en magenta. En la parte inferior del mismo panel se encuentra un capsómero formado por tres cadenas de VP2, los colores de los extremos en BpIA corresponden a los sitios de inserción. **(b)** Rotación de 90° del panel (a), se aprecian los sitios catalíticos expuestos a la superficie. **(c)** y **(d)** Panel a y b respectivamente en representación de superficie.

Con el resultado anterior no se puede afirmar que Q no tiene la capacidad de formar VLPs, o que la inserción de BpIA anula la competencia de VP2 para ensamblarse en VLPs y por tanto que es imposible que BpIA sea presentada en una VLP. Por la forma de la gráfica, se observa una muestra polidispersa pero con



una población dominante, lo que indica que VP2 se organiza y adquiere cierta estructura, cuyos tamaños son mayores a los esperados para monómeros.

Dado lo anterior se decidió intentar formar partículas eliminando el componente del impedimento estérico haciendo una mezcla de VP2 y Q en proporción 4:1 respectivamente, a esta mezcla le llamaremos M en lo sucesivo. Con esta proporción, teóricamente se tendrían 12 cadenas de Q por cada VLP (60 subunidades en total). Si consideramos que el capsómero de estas cápsides es un trímero, tener 12 moléculas de Q y 48 moléculas de VP2 para formar 20 capsómeros de 3 subunidades, implica que estadísticamente tendremos menos de una Q por capsómero. Esto en principio evitaría parte del impedimento estérico que creemos que induce estrés estructural en los capsómeros y que evita su asociación con otros capsómeros.

Se analizaron los ensambles y se encontró que para M el tamaño es de 25.49 ± 8.33 nm y el Pdl de 0.3; la muestra formada exclusivamente por Q muestra tamaños de 18.44 ± 3.56 nm con un Pdl 0.6. La Tabla 1 y la figura 22 sintetizan los datos aquí mencionados así como el resultado de la medición por volumen; adicionalmente se incluyen los mismos parámetros para el estándar de 20 nm que incluye el equipo.

Muestra	Intensidad	Volumen	Pdl
VP2	22.14 ± 5.57	18.65 ± 4.86	0.3
M	25.49 ± 8.33	18.89 ± 5.91	0.3
Q	18.44 ± 3.56	16.83 ± 3.88	0.6
Estándar	20.96 ± 6.13	17.43 ± 4.49	0.2

Tabla 1. Tamaño de partícula promedio por muestra en nanómetros. El valor reportado por intensidad es la medición más exacta del equipo. Se incluyen las mediciones por volumen porque el gráfico analizado por volumen es más ilustrativo.

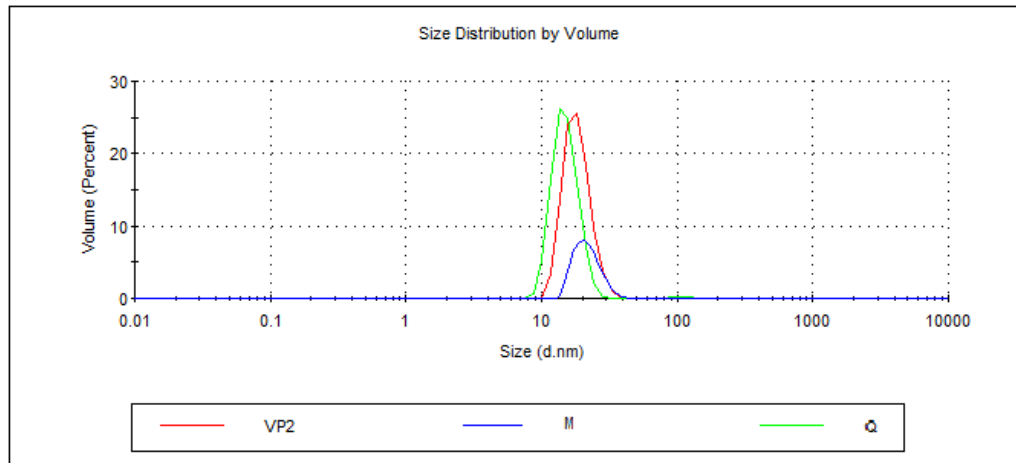


Figura 22. Comparación de los tamaños de las muestras VP2 (rojo), M (azul) y Q (verde) analizadas por DLS y vistas por volumen. Se tiene un tamaño de 18 nm, 21 nm y 14 nm respectivamente.

El tamaño de partícula que presenta M es ligeramente mayor, como se esperaba, a la partícula formada por VP2, por lo que es válido suponer que en la muestra M se encuentran VLPs ensambladas y con Q incorporada en éstas. Por otro lado, el tamaño de Q sola es menor, y aunque podría estar dentro del rango de tamaño para una VLP ensamblada, se encuentra en el límite inferior situación que sugiere que Q no está ensamblando VLPs, sino alguna estructura menor.

La polidispersidad de las muestras, es decir, la homogeneidad en el tamaño de la o las especies presentes en una muestra, para VP2 y M es muy aceptable si se compara con el estándar de látex y el ideal que estaría por debajo de 0.1 (Malvern, Zetasizer μ V user manual). Además no se debe dejar de lado la variabilidad asociada al sistema teniendo en cuenta el dinamismo de éste y la complejidad del proceso de ensamble. Q reporta un Pdl de 0.6 lo que corresponde a una muestra muy polidispersa donde se tienen poblaciones de especies en un amplio rango de tamaños y donde un análisis acumulativo no es del todo certero, por lo que no sería válido acotar el tamaño en un promedio.

La suposición que sí se puede formular de la Tabla 1 al comprar los tamaños de VP2 y M es que Q (VP2-307BpIA) en conjunto con VP2, en proporción 4:1 (VP2:VP2-307BpIA), permite el adecuado plegamiento y arreglo necesario para formar estas súper estructuras incorporando a BpA en una VLP.



Muy probablemente Q no está ensamblando en VLPs como las que se esperarían, pero tiene un orden. Ya sea el impedimento estérico de la inserción de B1pA en VP2, la deformación de zonas vitales para el ensamblado/asociación de capsómeros, o la combinación de ambas, es suficiente para impedir que VP2 adopte su conformación “natural”, que le permite formar una estructura icosaédrica con tamaños entre los 18 y los 24 nm. Sin embargo, la tendencia a asociarse de forma ordenada no se pierde de manera que se observan poblaciones dominantes dentro de la muestra.

Cabe destacar que el número reportado aquí es el promedio del análisis de 14, 11 y 17 muestras que se trataron independientemente y como se indica en la metodología de VP2, M y Q respectivamente.

6.5. Análisis por AFM

La microscopía de fuerza atómica (AFM) mostró que en las tres muestras existen estructuras de proteína organizada (Figura 23 a 25). Para el caso de VP2 (Figura 23) la forma y el tamaño de la partícula coincide con los datos de DLS y los esperados. Para el caso de la muestra M, las partículas observadas mostraron un mayor tamaño, como se esperaba, aunque la morfología no fue tan regular (Figura 24). En el caso de la muestra formada sólo por la proteína Q (VP2-307Bp1A) se observó una mayor heterogeneidad, en la que predominan estructuras más pequeñas que lo esperado para una VLP, en el orden de 9 a 15 nm. No se observó una morfología regular, puesto que las partículas encontradas tenían una forma más bien alargada (Figura 25).

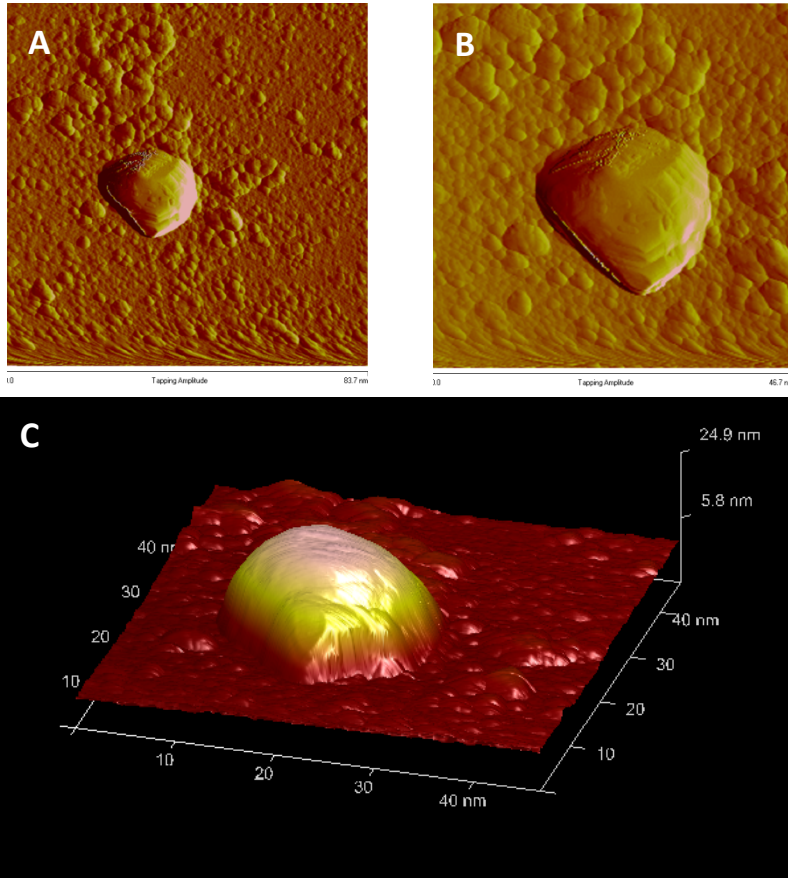


Figura 23. Micrografía obtenida por AFM de una partícula formada por VP2. (A) Campo donde se observa una partícula aislada de VP2, la base del panel corresponde a 83.7 nm **(B)** Acercamiento de (A); la base del panel corresponde a 46.7 nm. **(C)**Reconstrucción tridimensional; se tiene de diámetro 22.08 nm y una altura de 25.40 nm. (Cortesía Med. Cir. José Sebastián Santillán Uribe, 2014).

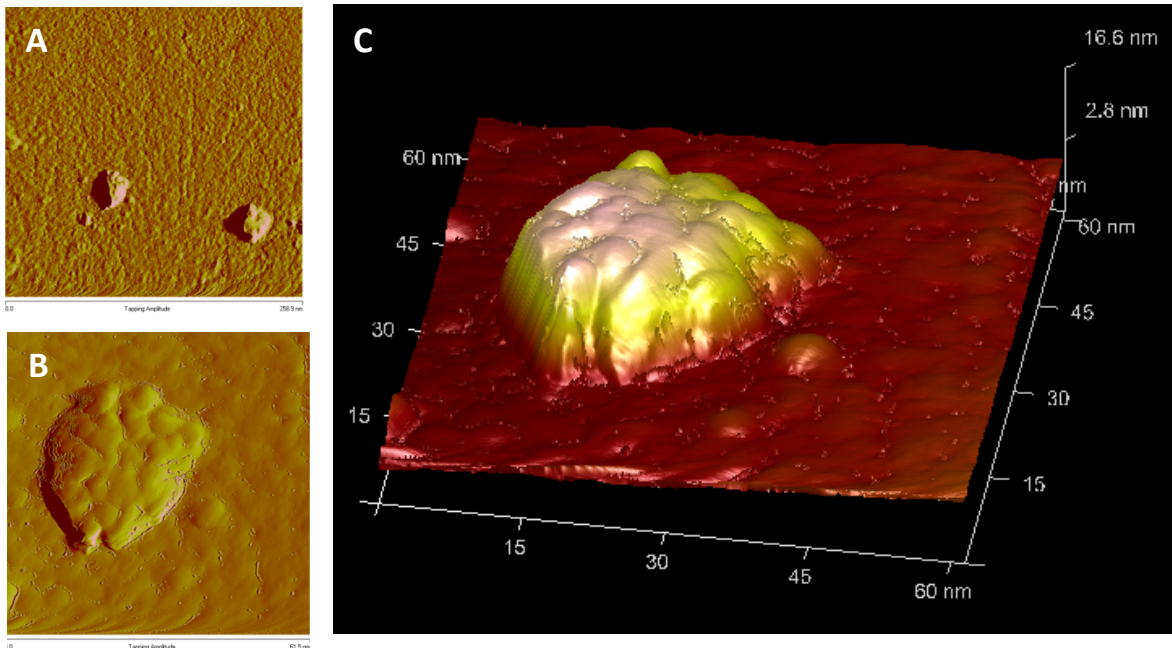


Figura 24. Micrografía obtenida por AFM de una partícula en la muestra M. (A) Campo donde se observan dos partículas aisladas; la base del panel corresponde a 258.9 nm **(B)** Acercamiento a una de las partículas de (A); la base del panel corresponde a 61.5 nm. **(C)** Reconstrucción tridimensional; se tiene un largo y ancho de 26.02 nm y 27.04 nm respectivamente, y una altura de 16.60 nm. (Cortesía Med. Cir. José Sebastián Santillán Uribe, 2014).

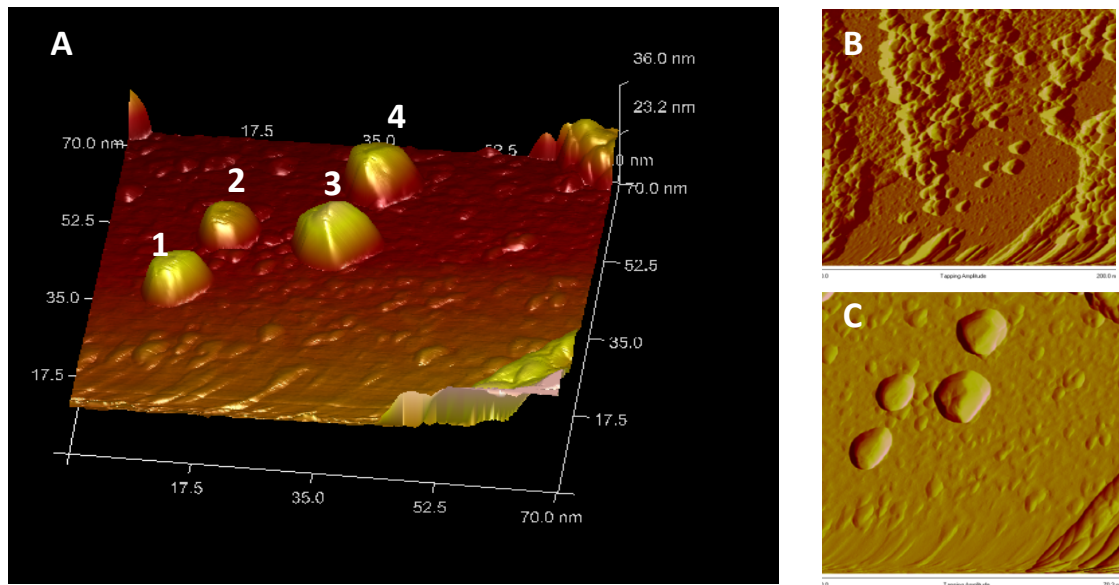


Figura 25. Micrografía obtenida por AFM de la muestra Q. (A) Reconstrucción tridimensional; se tiene tamaño para cada partícula como diámetro y altura respectivamente: (1) 9.43 nm y 27.1 nm.; (2) 8.85 nm y 24.8 nm; (3) 12.24 nm y 31.1 nm; (4) 11.20 nm y 26.80 nm. **(B)** Campo representativo de la muestra; la base del panel corresponde a 200.0 nm **(C)** Acercamiento a cuatro partículas observadas en (B); la base del panel corresponde a 70.3 nm. (Cortesía Med. Cir. José Sebastián Santillán Uribe, 2014).

6.6. Análisis de la actividad específica de las estructuras formadas sólo por la proteína Q (VP2-307BpIA) y aquellas formadas por la combinación de VP2 y Q en proporción 4:1 (M)

Con el propósito de evaluar cómo afecta la actividad hidrolasa de BpIA el hecho de estar insertada en VP2 se diseñó el ensayo descrito en la sección de metodología en el que se determina la velocidad inicial (v_i) del proceso de formación del 4-NF por acción de la enzima y se relaciona con la cantidad de proteína (Actividad específica).

A continuación se presenta el tratamiento de los datos ejemplificado para uno de los ensayos realizados, como se especificó en la metodología, cada muestra se trabaja independientemente y por duplicado; v_i corresponde a la pendiente del ajuste lineal hecho a la gráfica de Abs_{410} contra tiempo (min).



Muestra	Abs ₄₁₀	
	v _i (Abs ₄₁₀ /min)	R ²
4 NFA	0.0017	0.9664
VP2	0.0027	0.9728
	0.0020	0.9863
M I	0.0243	0.9993
	0.0235	0.9982
M II	0.0311	0.9973
	0.0316	0.9996
Q I	0.0797	0.9994
	0.0719	0.9986
Q II	0.1203	0.9996
	0.1109	0.9996

Tabla 2. Velocidades iniciales de las proteínas ensayadas y coeficiente de correlación lineal. Cada ensayo fue hecho por duplicado con una repetición.

Las v_i de cada muestra se promedian y se corrigen con el promedio de las v_i del sustrato y del control VP2 (Tabla 2). El efecto de la turbidez se consideró despreciable ya que representa una v_i de -0.0002.

Para determinar la Abs₄₁₀/μmol 4-NF se elaboró una curva patrón del producto de la hidrólisis del sustrato empleado en los ensayos para obtener las velocidades iniciales y responsable de la absorción a 410nm (Figura 26).

La pendiente de esta curva tiene unidades de Abs₄₁₀*L/μmol_{4-NF} y al dividir por el volumen del ensayo (0.001 L) se tiene (m_{CP}):

$$m_{CP} = 11.8 \frac{Abs_{410}}{\mu mol_{4-NF}}$$



Este valor permite relacionar las v_i determinadas para cada proteína en el experimento con el 4-NF y calcular las unidades U definidas como la cantidad de μmol de 4-NF liberado por la muestra en un minuto (Tabla 3).

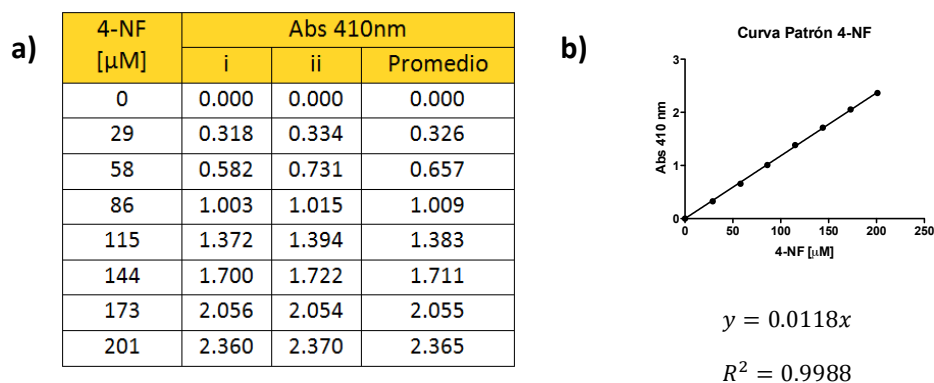


Figura 26. Curva Patrón 4-NF. (a) Datos crudos. (b) Representación gráfica de (a). Los círculos negros representan cada punto y la línea continua el ajuste lineal. Debajo se anotan los parámetros obtenidos de éste análisis.

Muestra	v_i $\left(\frac{Abs_{410}}{min}\right)$	m_{CP} $\left(\frac{Abs_{410}}{\mu mol_{4-NF}}\right)$	$U = \frac{v_i}{m_{CP}}$ $\left(\frac{\mu mol_{4-NF}}{min}\right)$	U (Corrección por 4-NFA)
4-NFA	0.002	11.8	1.81×10^{-2}	0.00
MI	0.024	11.8	2.03×10^{-3}	1.84×10^{-3}
MII	0.031	11.8	2.66×10^{-3}	2.48×10^{-3}
QI	0.076	11.8	6.42×10^{-3}	6.24×10^{-3}
QII	0.116	11.8	9.80×10^{-3}	9.62×10^{-3}
BpIA	0.055	14.1	3.90×10^{-3}	3.76×10^{-3}

Tabla 3. Cálculo de las unidades U. En la primera columna se encuentran las v_i calculadas para cada muestra en el ensayo. La U se calcula dividiendo la v_i entre la m_{CP} . La corrección se hace por la hidrólisis del sustrato debida al medio de reacción. El valor reportado en la última columna es el empleado para calcular la actividad específica de cada muestra.



Por otro lado se mide la concentración de proteína en cada muestra por la técnica del BCA utilizando como patrón BSA. La Figura 27 recopila los datos de éste procedimiento.

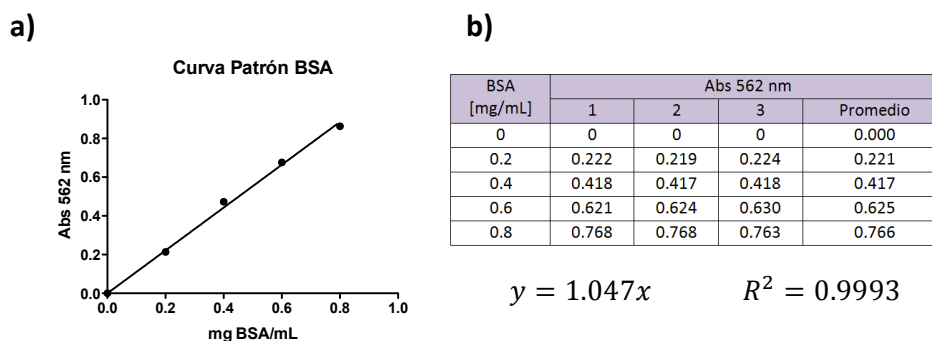


Figura 27. Determinación de la concentración de proteína. (a) Curva Patrón de BSA y ajuste lineal para la determinación de la concentración de proteína por el método del BCA. (b) Datos crudos. Debajo se anotan los parámetros obtenidos para la interpolación de las absorbancias de las muestras.

Con éstos datos, se calcula la actividad específica expresada en U (μmol $_4\text{-NF}/\text{min}$) por miligramo de enzima y por μmol de sitio catalítico (Tabla 4). La actividad específica expresada en U/mg de proteína puede resultar útil al evaluar dos enzimas de masas molares similares o bien donde el enfoque o aplicación se facilite al expresar una comparación en unidades de masa. Dado que uno de los sistemas evaluados es la combinación de VP2 y Q (VP2-307BpIA) y las masas molares de BpIA y VP2-307BpIA son tan dispares (21498.1 g/mol y 81204.2 g/mol respectivamente) la actividad específica expresada en U/mg de proteína no ofrece información relevante ya que lo que se pretende es evaluar la eficiencia de BpIA dispuesta en VP2 como indicador de qué tanto afecta su plegamiento este hecho. Es por ello que el análisis se enfoca en la actividad específica por mol de sitio catalítico. Como referente se ensayó BpIA recombinante libre.



Muestra	U $\left(\frac{\mu\text{mol}_{A-NF}}{\text{min}}\right)$	Proteína (mg de enzima)	U/mg enzima	U/ μmol sitio catalítico (U/ μmol)
MI	1.84×10^{-3}	0.014	0.131	11.0
MII	2.48×10^{-3}	0.017	0.145	12.0
QI	6.24×10^{-3}	0.060	0.104	8.5
QII	9.62×10^{-3}	0.069	0.139	11.3
BpIA	3.76×10^{-3}	0.0004	9.400	202.0

Tabla 4. Actividades específicas. Comparación entre actividades específicas para las dos muestras ensayadas, M y Q, con su duplicado (I y II). BpIA es la lipasa silvestre ensayado como referente de activad. Para M se consideró que de la proteína total, sólo el 20% corresponde a la enzima VP2-307BpIA.

El resultado expresado en la última columna de la Tabla 4 es el empleado para hacer la comparación y el análisis de la eficiencia de la proteína.

La Tabla 5 sintetiza el resultado de los ensayos realizados para Q (VP2-307BpIA) sola y como mezcla con VP2. Se tiene que la actividad específica para la muestra formada exclusivamente por la proteína Q es de 15.80 ± 6.45 U/ μmol y para la muestra conformada por VP2:VP2-307BpIA en proporción 4:1 respectivamente es de 20.87 ± 9.53 U/ μmol .

U/ μmol Q		
Ensayo	M	Q
1	11.0	8.5
2	12.0	11.3
3	18.3	14.8
4	19.3	13.2
5	30.47	25.46
6	34.17	21.56

Tabla 5. Actividades específicas. Actividades específicas determinadas para la proteína VP2-307BpIA en dos sistemas: sola (Q) y en mezcla con VP2 (M). Cada renglón representa una determinación diferente e independiente.



De acuerdo al análisis por DLS, en la muestra M probablemente hay formación de VLPs, mientras que en la muestra Q no. Los resultados de actividad específica aquí reportados sugieren que la proteína VP2-307BpIA, en cuanto a catálisis, se desempeña de forma muy similar independientemente de si se encuentra dispuesta una VLP o en intermediarios de formación.

Hasta este punto del trabajo, esa es una hipótesis que no se puede comprobar, porque los datos de DLS mostraron poblaciones en un amplio rango de tamaños que corresponden a un amplio rango de especies en las que se puede encontrar intermediarios de formación, VLPs y agregados. Es por ello que para poder asignar la responsabilidad de la actividad enzimática es necesario separar esta mezcla de especies y determinar actividad específica a las fracciones.

En un análisis global, se tiene que para Q (VP2-307BpIA) la actividad específica es de 18.33 ± 3.7 U/ μ mol cifra que es 11 veces menor a la actividad reportada por la lipasa de *B. pumilus* en su estado nativo (202 U/ μ mol). La repercusión en la catálisis se debe a que al estar insertada en VP2 se le está restringiendo la movilidad a la proteína, evitando o entorpeciendo cambios conformacionales importantes para el proceso; además de que este hecho la hace insoluble lo que podría repercutir en la difusión del sustrato al sitio catalítico. Tampoco se debe dejar de lado que VP2 tiene la capacidad de organizarse en estructuras complejas. Si bien, con una inserción de la magnitud de BpIA, no es posible obtener cápsides virales completas (al menos en el caso de Q), esto no implica la ausencia de intermediarios u otras estructuras en el intento por organizarse y formar una partícula tipo virus. Así, esta organización acerca a las proteínas lo suficiente para que surja impedimento estérico entre ellas y que éste repercuta en la catálisis.

Si bien la actividad específica es incipiente para la proteína diseñada y construida en este proyecto, no es así el hecho de que tiene actividad y que en combinación con proteína silvestre ofrece la posibilidad de construir una estructura tan compleja como interesante.



6.7. Centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl

Como lo sugiere el análisis por DLS, al someter a diálisis tanto a la proteína Q (VP2-307BpIA) como a la mezcla compuesta de VP2 y VP2-307BpIA (M) para que ensamble en VLPs se obtiene una mezcla polidispersa cuyos elementos difieren en tamaño. Los tamaños de éstos varían desde los observados previamente para trímeros (capsómeros), VLPs y agregados.

Al realizar los ensayos de actividad esterasa a estas dos muestras, M y Q, surge la incógnita sobre cuál o cuáles especies, de esta mezcla, son responsables de la actividad enzimática. También es válido preguntarse si en la muestra M, cuya relación VP2:VP2-307BpIA es 4:1, en la población que exhibe los tamaños asociados a cápsides verdaderamente se encuentra incorporada VP2-307BpIA y por tanto qué especies le confieren la actividad que reporta la muestra M.

Con el objeto de separar ésta mezcla se realizó una centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl. Como resultado se observó para VP2 (control) la formación de una banda definida que corresponde a las cápsides ensambladas; en la parte superior a ésta se observa una banda difusa en donde se encuentran los intermediarios de formación, es decir, aquellas estructuras que no llegaron a ensamblarse en VLPs (Figura 28). En esta banda se encuentran principalmente capsómeros u oligocapsómeros (Sánchez Rodríguez, 2012).

Se observó que la muestra M presenta ambas bandas, tanto la de intermediarios como la correspondiente a VLPs. En cambio en la muestra Q sólo se aprecia una banda definida cuya ubicación, con respecto a VP2, se encuentra por debajo de la banda difusa (intermediarios) y por arriba de la banda de las partículas ensambladas. Este hecho confirma lo interpretado por DLS: M muy probablemente está formando VLPs de tamaño similar a las formadas exclusivamente por VP2, mientras que Q no está formando VLPs pero las estructuras en las que se organiza son más densas que los capsómeros de VP2.

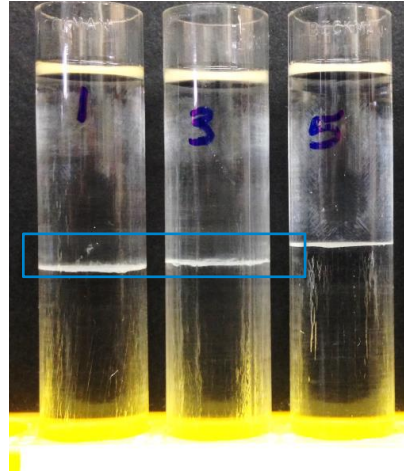


Figura 28. Gradientes de CsCl. De izquierda a derecha: VP2 (control), VP2:VP2-307BpIA en relación 4:1 (M) y VP2-307BpIA (Q). En VP2 la banda inferior corresponde a las cápsides ensambladas y la superior, difusa, a los intermediarios (recuadro). En M se observan estas dos bandas y en Q sólo se observa una banda definida de menor densidad con respecto a las bandas definidas de VP2 y Q.

Se recuperaron éstas bandas y se dializaron durante 48 h contra PBS con cambios cada 12 h con el propósito de retirar el CsCl. El análisis por SDS-PAGE permite concluir que para la muestra M, tanto en la fracción más densa como en la banda difusa se encuentran ambas proteínas (Figura 29), es decir, la proteína VP2-307BpIA es capaz de incorporarse en una VLP cuando se encuentra en una proporción 4:1 (VP2:VP2-307BpIA).

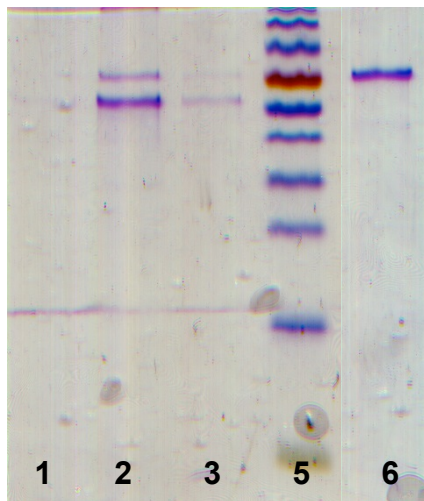


Figura 29. SDS-PAGE de las bandas recuperadas una vez separadas las muestras por Gradientes de CsCl. Carril 1 y 3, bandas superiores observadas para la muestra M en el gradiente, correspondientes a los intermediarios. Carril 2, banda inferior observada para la muestra M, correspondiente a las partículas ensambladas. Carril 5 única banda observada para la muestra Q. Carril 4, marcador de peso molecular (en orden descendente): 170, 130, 100, 70, 55, 40, 30, 25, 15 y 10 kDa.



6.8. Actividades específicas de las especies separadas en la centrifugación isopícnica

Durante la formación del gradiente se separan, en función de su densidad, los diferentes componentes de la muestra (VLPs, agregados, intermediarios). Se distinguen dos bandas y se sabe que la inferior corresponde a las cápsides y la superior a los intermediarios de formación (Sánchez Rodríguez, 2012). Con el objetivo de discernir si los intermediarios de formación o las cápsides ensambladas son las o la entidad con actividad enzimática se procedió a evaluar la actividad específica de cada banda recuperada del gradiente de CsCl.

En este punto no se lograron obtener resultados que fueran útiles para el análisis cuantitativo ya que una vez que se recupera la banda de proteína del gradiente de CsCl, pese a que se dializa exhaustivamente para reducir al mínimo la cantidad de CsCl presente en la muestra, y se pone a la proteína en las condiciones en las que se han venido realizando los ensayos, el comportamiento de esta proteína es agregativo y se vuelve difícil manejar y trabajar con ella. Por ello y de forma cualitativa se reporta en ésta sección que ambas fracciones (banda superior e inferior de la muestra M en el gradiente de CsCl) presentan actividad enzimática, al igual que la banda que se recupera de Q. Lo anterior podría permitir afirmar que en cualquier estructura –hablando de cápsides, capsómeros o monómeros– donde se incorpora la proteína VP2-307BpIA, ésta presenta actividad enzimática.

Esta situación, la agregación posterior a la centrifugación isopícnica, es uno de los obstáculos que tratamos de superar porque dentro de los objetivos del proyecto está el de responder qué estructuras son las responsables de la actividad enzimática. Lo anterior es importante porque la actividad enzimática es un reportero de plegamiento y en el diseño de VLPs quiméricas el plegamiento de los insertos determina la funcionalidad y con ello la aplicación de la herramienta diseñada.

En la muestra compuesta exclusivamente por Q (VP2-307BpIA), sólo se observa una banda al someter la muestra a gradientes continuos de CsCl, esto es contrario

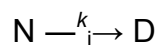


a los análisis por DLS que mostraron un amplio rango de poblaciones presentes. El hecho de que no se resuelvan más bandas no quiere decir que no estén ahí, sino que su densidad es similar y en consecuencia una separación por densidad no puede resolverlas.

6.9. Estabilidad térmica

Una de las hipótesis planteadas al hacer esta quimera fue que estando BpIA dispuesta en el andamio que representa VP2, ésta incrementaría su resistencia a la desnaturalización térmica. El Parvovirus B19 puede permanecer hasta 60 min a una temperatura de 56°C sin perder la estructura (Gilbert *et al.*, 2005). En el experimento diseñado en este trabajo se comparó la actividad enzimática de la lipasa de *B. pumilus* en su forma silvestre y cuando se encuentra incorporada en VP2, ya sea en las estructuras formadas exclusivamente por Q (VP2-307BpIA) o por la mezcla en relación 4:1, VP2:VP2-307BpIA, (M). La pérdida de actividad está asociada con la pérdida de estructura de la proteína a causa de la temperatura.

Para calcular la constante de velocidad de inactivación se consideró que la enzima sólo tiene dos estados, el nativo N (enzima con actividad) y el desnaturalizado D (enzima sin actividad). El paso de N a D está gobernado por la constante de velocidad k_i :



La velocidad de este proceso depende tanto de la constante de velocidad de inactivación como de la concentración de la enzima nativa (reacción de primer orden):

$$v = k_i [N]$$

La velocidad también puede expresarse en términos de la aparición de la enzima desnaturalizada en el tiempo:

$$d[D]/dt = k_i [N]$$



Esto también puede expresarse en función de la desaparición de la enzima nativa:

$$-d[N]/dt = k_i[N]$$

El signo menos hace referencia a que la concentración de la enzima nativa va disminuyendo a medida que ésta se va desnaturalizando. Despejando obtenemos la ecuación anterior obtenemos:

$$-d[N]/[N] = k_i dt$$

Al integrar esta ecuación diferencial tenemos que:

$$\int (-d[N]/[N]) = k_i \int dt$$

Resolviendo esta ecuación entre los límites 0 y t :

$$-\ln(N_t/N_0) = k_i t$$

Pasamos el signo negativo para el otro lado de la ecuación:

$$\ln(N_t/N_0) = -k_i t$$

En este caso consideramos que la concentración de la enzima inicial está dada por la actividad enzimática en el $t = 0$ ya que la enzima nativa es la que tiene actividad y la concentración de la enzima nativa en cualquier tiempo t está dada por la actividad residual medida a ese tiempo. Por lo tanto tenemos que:

$$\ln(\text{Act}_t/\text{Act}_0) = -k_i t$$

Para obtener el valor de k_i se graficó el valor de $\ln(\text{Act}_t/\text{Act}_0)$ contra el tiempo, y la pendiente de esa gráfica tiene el valor de $-k_i$.

De acuerdo a lo observado (Figura 30) la proteína Q (VP2-307BpIA) tiene la misma estabilidad térmica si está en las estructuras organizadas sólo por ella o en combinación con VP2. La k_i calculada fue de 0.012 y 0.011 min^{-1} para M y Q



respectivamente. Donde sí se observa diferencia significativa es con respecto a BpIA libre, para la que se calculó una k_i de 0.080 min^{-1} , casi 7 veces más rápida que la de esta enzima dispuesta en VP2.

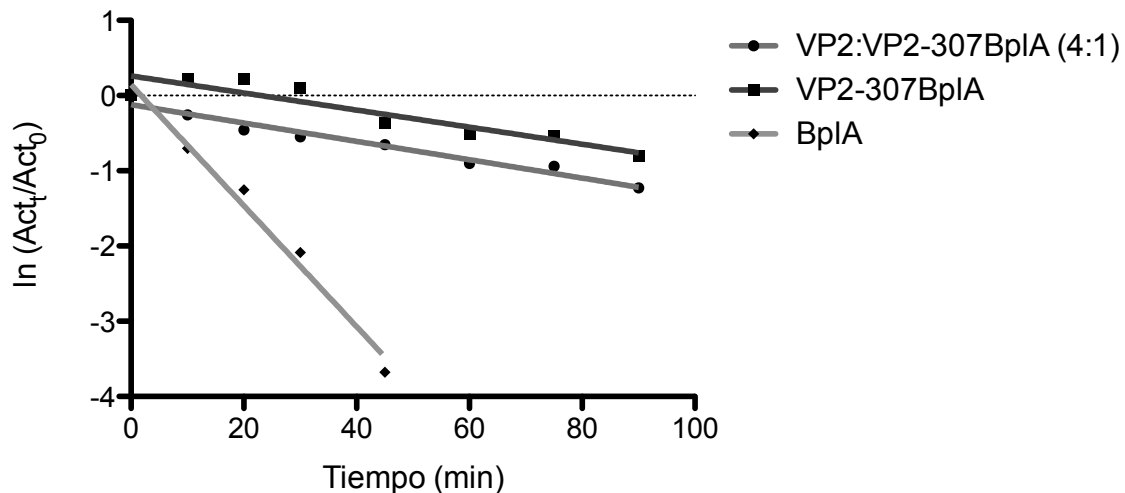


Figura 30. Comparación de la estabilidad térmica a 40°C . Las líneas continuas corresponden al ajuste lineal. La pendiente de estas rectas equivale a $-k_i$.

Lo anterior quiere decir que BpIA pasa al estado desnaturalizado más rápido de lo que lo hace la misma enzima una vez que está insertada en VP2. Este hecho demuestra que el estar en VP2 le confiere estabilidad térmica.

De acuerdo al análisis hecho durante la selección del sitio para hacer la inserción, los aminoácidos de éste no mostraban sostener interacciones importantes con el resto de la proteína VP2; la inserción de BpIA implica 181 residuos de aminoácido que bien podrían establecer interacciones con aminoácidos vecinos o cercanos de la propia cadena VP2 o de otro monómero en las estructuras que se estén organizando.

Visto de esta forma, estas interacciones pueden estar restringiendo la movilidad de BpIA, hecho que repercutiría negativamente, como se observó, en la catálisis ya que se estarían impidiendo o entorpeciendo ciertos arreglos y cambios conformacionales en la estructura terciaria de BpIA. Sin embargo, el



establecimiento de estas interacciones representa energía adicional que se debe brindar al sistema durante el proceso de desplegamiento de la proteína por acción de la temperatura, situación que retrasaría el desplegamiento, la desnaturalización y con ello la pérdida de actividad.

Se tiene un aumento significativo en la estabilidad, cualidad importante para las enzimas. La repercusión en la catálisis se explica porque se le está restringiendo la movilidad a la proteína, y como lo demuestra el aumento en la estabilidad, también se le está restringiendo la flexibilidad. Es así que se puede suponer que las estructuras formadas por Q (VP2-307BpIA), sola o en combinación con VP2, son rígidas y quizá sea ésta la razón que entorpece o no permite la formación de estructuras superiores como lo son las VLPs.

6.10 Análisis global

Los análisis por DLS, centrifugación isopícnica en CsCl y AFM indican que la proteína Q (VP2-307BpIA) no es capaz de formar VLPs. La principal razón es que quizá debido a la inserción de BpIA se perturbe la conformación de regiones o dominios primordiales para la asociación de capsómeros.

Sin embargo, pese a la magnitud de la alteración en la constitución de VP2 (la inserción de un péptido completo en medio de la secuencia de VP2) podemos afirmar que ésta inserción no fue capaz de abolir la capacidad de VP2 para organizarse y estructurarse; prueba de ello es que se observaron partículas con tamaño y morfología similar a la esperada para una VLP en la muestra constituida por la combinación de VP2 y Q; también, la ubicación de la única banda presentada en el gradiente de CsCl, indica que las estructuras formadas por Q son menos densas que las VLPs de VP2, pero son más densas que los intermediarios, por lo que es válido suponer que la proteína efectivamente se organiza y adquiere estructura. Otro argumento en este punto lo proporciona el análisis de las bandas observadas en el gradiente de CsCl para la muestra M ya que éste demostró que tanto en intermediarios como en cápsides se encuentra la proteína Q incorporada.



En cuanto a el efecto en BpIA, pese a la restricción de movilidad que se le está imponiendo, el sitio es lo suficientemente móvil y flexible para permitir el adecuado plegamiento de BpIA y con ello la función para la que está siendo insertada. La repercusión en la eficiencia de la catálisis puede atribuirse principalmente a la restricción de la movilidad y flexibilidad de la enzima. Otros factores que pudieran contribuir son el impedimento estérico, que ciertos dominios de BpIA interaccionen con otros residuos de VP2 provocando cambios conformacionales en la lipasa o bien que contribuyan al aumento de la rigidez, y por último, que al estar insertada en VP2, BpIA adquiere un carácter insoluble generando fenómenos en la interfase que entorpezcan la catálisis, dificultando la interacción con el sustrato por ejemplo.

La baja en la actividad enzimática se compensa por el aumento en la estabilidad térmica, consecuencia también atribuible a las interacciones establecidas entre BpIA y VP2, principalmente en el aumento de la rigidez, que está asociado al aumento en la estabilidad estructural.

No deja de ser sorprendente lo interesante del sitio de inserción en VP2, que permite adiciones considerables y al mismo tiempo el plegamiento del fragmento insertado. El trabajo aquí presentado confirma y proyecta a la cápside del B19 formada a partir de VP2 como un nano-acarreador con potenciales usos biotecnológicos y biomédicos.



7. CONCLUSIONES

La proteína BpIA se comporta como una unidad de plegamiento autónomo por lo que es un modelo adecuado para el estudio del potencial de VLPs del Parvovirus B19 como nanoacarreador de enzimas.

La proteína VP2-307BpIA no tiene competencia para formar VLPs en sistemas formados exclusivamente por ésta proteína. Sin embargo, la inserción de BpIA en VP2 no impide la incorporación de VP2-307BpIA en VLPs y con ello la presentación de BpIA en la superficie de una partícula.

La combinación VP2:VP2-307BpIA en relación 4:1 permite obtener VLPs con BpIA dispuesta en la superficie y con actividad contra el 4-NFA.

La incorporación de BpIA en VP2 repercute en la eficiencia en la catálisis disminuyéndola, posiblemente debido a la restricción en la movilidad y flexibilidad de la proteína.

La incorporación de BpIA en la superficie de VP2 también repercute en la estabilidad térmica, la cual aumenta significativamente.

La proteína VP2 del Parvovirus B19 es competente para la creación de nanoacarreadores ya que permite inserciones interesantes en la asa superficial formada por los aminoácidos 300 a 314.



8. PERSPECTIVAS

Optimizar el proceso de purificación para obtener un mayor grado de pureza.

Estudiar las condiciones de ensamblado de VLPs. Experimentar en otras condiciones, que tal vez no sean las ideales para VP2 pero sí mejoren la eficiencia del ensamble para VP2-307BpIA.

Estudio del mecanismo de ensamblado. Relacionar etapas de este proceso con condiciones fisicoquímicas para tener un mayor control e incrementar su eficiencia.

Diseño de “linkers” o secuencias bisagra, bajo la premisa de que aumentan movilidad y flexibilidad, en este caso a BpIA, para incrementar la actividad enzimática. En este punto, trabajar con mutaciones en BpIA o evolución dirigida de la región de unión entre VP2-BpIA.

Mejorar la eficiencia de la actividad catalítica trabajando sobre el dominio de BpIA, con mutaciones y/o evolución dirigida.

Estudiar el efecto sobre la catálisis y el ensamble de VLPs al ensayar más proporciones para la combinación VP2:VP2-307BpIA con el propósito de aumentar simultáneamente la eficiencia en ambos puntos.

Se ha propuesto ensayar los gradientes con sacarosa o histodenz que podrían resolver mejor las muestras y además, por no ser iónicos, no alterar la proteína de modo tal que se pueda ensayar una vez separada por el gradiente para hacer estudios posteriores a la centrifugación isopícnica.



9. REFERENCIAS

1. Aguilar Morales Diana Raquel. (2014). Modificación de asas superficiales de la proteína VP2: Efectos en la formación de partículas tipo virus. Tesis de Maestría, UNAM.
2. Amexis G y Young N. (2006). Brief Report. Parvovirus B19 Empty Capsids as Antigen Carriers for Presentation of Antigenic Determinants. *J. Infec. Dis.*, **194**, 951-966.
3. Arpino JAJ, Rizkallah JP y Dafydd D. (2012). Crystal Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein to 1.35 Å resolution reveals alternative conformations for Glu222. *PLoS ONE*, **7**, e47132.
4. Bronstein ML. 2011. Virus-Based Nanoparticles with Inorganic Cargo: What does the future hold? *Small*, **12**, 1609-1618.
5. Brown C, Welling S, Feulbrief M. Van Lent J y Spaan W. (1994). Chimeric Parvovirus B19 capsid for the presentation of foreign epitopes. *Virology*. **198**, 477-488.
6. Bustos I. (1995). Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo. Tesis de Licenciatura, UNAM.
7. Bustos I. (1998). Análisis del gen que codifica para la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Tesis de Maestría, UNAM.
8. Bustos-Jaimes I, Mora-Lugo R, Calcagno LM y Farrés A. (2010). Kinetic studies of Gly28: Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: Changes in k_{cat} and thermal dependence. *BBA-Proteins Proteom*. **1804**, 2222-2227
9. Carreira A, Menéndez M, Reguera J, Almendral JM y Mateu G. (2003). *In Vitro* Disassembly of a Parvovirus Capsid and Effect on Capsid Stability of Heterologous Peptide Insertions in Surface Loops. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6517-6525.
10. Cardinale D, Carette N, Michon T. (2012). Virus scaffolds as enzyme nano-carriers. *Trends Biotechnol.*, **7**, 369-376.
11. Carette N, Engelkamp H, Akpa E, Pierre JS, Cameron RN, Christianen CMP, Maan CJ, Thies CJ, Weberskrch R, Rowan EA, Nolte JMR, Michon T y Van Hest CMJ. (2007). A virus-based biocatalyst. *Nat. Biotechnol.*, **2**, 226-229.
12. Donath E y Fischlechner M. (2007). Viruses as Building Blocks for Materials and Devices. *Angew. Chem. Int.*, **46**, 3184-3193.



13. Douglas T y Young M. (2006). Viruses: Making Friends with Old Foes. *Science*, **312**, 873-875.
14. Fiedler JD, Brown DS, Lau LJ y Finn MG. (2010). RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9648-9651.
15. Gilbert L, Toivola J, White D, Ihalainen T, Smith W, Lindholm L, Vuento M, Oker-Blom C. (2005). Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun.*, **331**, 527-535.
16. Gleiter S, Stubenrauch K, Lilie H. (1999). Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.*, **8**, 2562-2569.
17. Gupta R, Gupta N y Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microb. Biotechnol.*, **64**, 763-781.
18. Jaeger K-E, Schneidinger B, Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra BW, Schimossek K, Zonta A, Reetz MT. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *J. Mol. Cat. B: Enzim.*, **3**, 3-12.
19. Johnson J, Lin T y Lomonosoff G. (1997). Presentation of Heterologous Peptides on Plant Virus: Genetics, Structure and Function. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **35**, 67-86.
20. Karp G. (2009). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos*. Quinta edición. México D.F.: Mc Graw Hill Educación.
21. Kaufmann KJ y Nettelbeck MD. (2012). Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond. *Trends Mol. Med.*, **18**, 365-376.
22. Kaur K y Chimni SS. (2012). Lipase mediated highly enantioselective kinetic resolution of β -hydroxy sulfides. Guru Nanak Dev University, Department of Chemistry, Amritsar, India. Biocat2012 Hamburgo. September 2-6, 2012. Federal Ministry of Education and Research.
23. Kerr RJ, Cotmore FS, Bloom EM, Linden RM y Parrish RC. (2006). *Parvoviruses*. Hodder Arnold.
24. Koudelka JK y Manchester M. (2010). Chemically modified viruses: principles and applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14**, 810-817.
25. Kumar S, Ochoa W, Singh P, Hsu C, Schneemann A, Manchester M, Olson M y Reddy V. (2009). Tomato bushy stunt virus (TBSV), a versatile platform for polyvalent display of antigenic epitopes and vaccine design. *Virology*, **388**, 185-190.



26. Likhatcheva María. 2009. Caracterización cinética de la Hidrólisis de Benzil-4-nitrofenil carbonato con la lipase recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de Licenciatura, UNAM.
27. Lin T, Chen Z, Usha R, Stauffacher CV, Dai J, Schmidt T, Johnson JE. (1999). The Refined Crystal Structure of Cowpea Mosaic Virus at 2.8 Å Resolution. *Virology*, **265**, 20-34.
28. Ludwig C. and Wagner R. (2007). Virus-like particle-universal molecular toolboxes. *Curr. Opin. Biotech.*, **18**, 537-345.
29. Minten IJ, Claessen VI, Blanck K, Rowan AE, Nolte RJM y Cornelissen JJLM. (2011). Catalytic capsids: the art of confinement. *Chem. Sci.*, **2**, 358-362.
30. Minten IJ, Hendriks JAL, Nolte RJM y Cornelissen JJLM. (2009). Controlled encapsulation of multiple proteins in virus capsids. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**. 17771-17773.
31. Minten IJ, Nolte RJM y Cornelissen JJLM. (2010). Complex assembly behavior during the encapsulation of green fluorescent protein analogs in virus derived protein capsules. *Macromol. Biosci.*, **10**, 539-545.
32. Mora, R. (2008). Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de Maestría, UNAM.
33. O'Neil A, Reichhardt C, Johnson B, Prevelige PE y Douglas T. (2011). Genetically programmed *in vivo* packaging of protein cargo and its controlled release from bacteriophage P22. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**, 7425-7428.
34. Takahashia R, Kaneshashic S, Inouea T, Enomotoa T, Kawanoa M, Tsukamotoa H, Takeshitaf F, Imaid T, Ochiyaf T, Kataokae K, Yamaguchia Y y Handaa H. (2008). Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. *J. Biotechnol.*, **135**, 385-392.
35. Ros C, Baltzer C, Mani B, Kempf C. (2005). Parvovirus uncoating *in vitro* reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology*, **345**, 137-147.
36. Sánchez-Rodríguez S., Münch-Anguiano L., Mora-Pale M., Dordick J. y Bustos-Jaimes I. 2012. Human parvovirus B19 virus-like particles: *In vitro* assembly and stability. *Biochimie*, **94**, 870-878.
37. Sánchez Rodríguez SP. (2012). Caracterización de partículas tipo virus de la proteína VP2. Tesis de Doctorado, UNAM.



38. Sang-Yup L, Jung-Sun L y Michael TH. (2012). Synthesis and Application of Virus-Based Hybrid Nanomaterials. *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 16-30.
39. Sedlik C, Dridi A, deriaud E, Sron F, Rueda P, Sarraseca J y Sasal J. (1999). Intranasal Delivery of Recombinant Parvovirus-Like Particles Elicits Cytotoxic T-Cell and Netralizing Antibody Responses. *J. Virol.*, **73**, 2739-2744.
40. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner, FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ y Klenk DC. (1985). Measurement of protein with bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, pp.76-85.
41. Steinmetz FN. (2010). Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine: NBM*, **6**, 634-641.
42. Steinmetz FN y Manchester M. (2011). Viral nanoparticles: Tools for Materials Science and Biomedicine. 1ra Ed., *Pan Stanford*, Singapore.
43. Szuchmacher BA, Soto MC, Wilson DC, Cole DJ, Kim M, Gnade B, Chatterji A, Ochoa FW, Lin T, Johnson EJ and Ratna RB. (2004). Cowpea Mosaic Virus as a Scaffold for 3-D Patterning of Gold Nanoparticles. *Nano Letters*, **4**, 867-870.
44. Van-Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger KE y Dijkstra BW. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.*, **309**, 215-26.