



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL ASA 300-314 DE LA PROTEÍNA VP2  
EN PARTÍCULAS TIPO VIRUS DEL PARVOVIRUS B19**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**RICARDO ARTURO SOTO ROMÁN**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES  
FACULTAD DE MEDICINA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA  
*INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA***

**DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG  
*INSTITUTO DE QUÍMICA***

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD MX, MAYO DE 2017**



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.



---

---

## “PRESENTACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL ASA 300-314 DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS DEL PARVOVIRUS B19”

### RECONOCIMIENTO

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Ismael Bustos Jaimes en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera  
Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig  
Dr. Ismael Bustos Jaimes

Instituto de Biotecnología, UNAM  
Instituto de Química, UNAM  
Facultad de Medicina, UNAM

Este trabajo contó con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, Proyecto IN200316).

Durante los estudios de maestría me fue otorgada una beca por parte de CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Leticia Haydeé Ramírez Silva	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Ruy Enrique Pérez Monfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM



---

---

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa de estudios, es un honor pertenecer a esta enorme institución. Agradezco tanto haber tenido la oportunidad de continuar aprendiendo con excelentes profesores, alumnos tan dedicados y ver más allá del conocimiento que adquirí en mi ciudad natal.
- Al Dr. Ismael Bustos por compartirme su área de investigación y su creatividad, por dejarme aprender tanto; por su confianza, apoyo y paciencia en el desarrollo de este trabajo.
- A todos mis compañeros y amigos del grupo “VLPero” por sus consejos, aportaciones y sugerencias durante dos años, en especial en los seminarios. ¡Tantas cosas que aprendimos juntos!
- A todos los que integran el LFQIP, a todos los doctores por su paciencia, buenos comentarios y críticas constructivas hacia nuestro proyecto. A mis compañeros del LFQIP por hacer del laboratorio un espacio de convivencia y de amistad, por sus consejos y un agradecimiento especial a aquellos que me brindaron su apoyo en algún momento para el desarrollo de este trabajo.
- A mi comité tutorial, a las doctoras Laura Palomares y Nuria Sánchez por enriquecer nuestro proyecto con su experiencia en el área. ¡Mejor comité no pude tener! Agradezco su extraordinaria colaboración y recomendaciones a lo largo de estos dos años.



## DEDICATORIA

Esta tesis es el resultado del esfuerzo de dos años, tiempo en el que aprendí tantas cosas, más de las que he aprendido en toda mi vida. Al principio, sufrí con mi inmadurez y mi falta de experiencia, pero al final crecí como persona y eso tiene un valor enorme. Conocí a excelentes compañeros y profesores que me compartieron su experiencia y el día de hoy puedo decir que soy alguien distinto, mejor preparado y con muchas ganas de seguir aprendiendo. Y toda esta dicha quiero dedicársela a las personas más importantes en mi vida:

A mi familia, mis padres y hermano, porque a pesar de estar lejos durante este tiempo, estuvieron siempre cerca de mi demostrándome su cariño, su amor y su apoyo incondicional en este reto. ¡Gracias a ustedes soy el que soy ahora!

A Mario, por ser mi compañero en este viaje llamado vida, por su apoyo y cariño incondicional. Por todos esos momentos en los que caí y me ayudó a levantarme. Agradezco todas esas veces que me acompañaste al laboratorio y que estuviste en los momentos más difíciles. Gracias por tus regaños y felicitaciones que me permitieron llegar hasta el día de hoy.

A mis amigos de toda la vida, Ileana y Efrén, por su apoyo y consejos, por hacer la vida estudiantil más ligera y más divertida. Por hacerme saber que no estoy solo en este camino. ¡Los quiero tanto!

A todas las personas y amigos que me han ayudado y acompañado desde el día que llegué a esta ciudad y que han hecho mucho más fácil este arduo trayecto para conseguir mis sueños.



## TABLA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
aa	Aminoácidos
Abs <sub>410</sub>	Absorbancia a 410 nm
ACN	Acetonitrilo
AFM	Microscopia de fuerza atómica
BpIA	Lipasa A de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
BSA	Albúmina sérica bovina
DLS	Dispersión dinámica de luz
ECNs	Nano-acarreadores de enzimas
GFP	Proteína verde fluorescente
GndHCl	Cloruro de guanidinio
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1tiogalactopiranosido
LB	Medio LB con ampicilina
PdI	Índice de polidispersidad
Q <sub>F</sub>	Proteína quimérica VP2-307GFP
QL	Proteína quimérica VP2-307BpIA
Q <sub>SF</sub>	Proteína quimérica VP2-307sfGFP
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
sfGFP	Proteína verde fluorescente variedad "Superfolder"
wtGFP	Proteína verde fluorescente silvestre
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
U	Unidades de actividad enzimática, definidas como la cantidad de $\mu$ mol de producto generado por minuto
VLP	Partícula tipo virus
VP2	Proteína VP2 silvestre
4-NF	4-nitrofenol
4-NFA	4-nitrofenil acetato



# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
1.1 Nanotecnología y nanomedicina.....	9
1.2 Virus como herramientas nano-biotecnológicas.....	10
1.3 Partículas tipo virus (VLPs).....	12
1.4 El Parvovirus B19 como modelo de estudio para la producción de VLPs .....	14
1.5 Proteína verde fluorescente (GFP) .....	17
1.6 Lipasa A de <i>Bacillus pumilus</i> (BpIA) .....	21
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
4.1 Objetivos particulares.....	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
5.1 Diseño y expresión de las proteínas VP2, Q <sub>L</sub> y Q <sub>F</sub> en <i>Escherichia coli</i> .....	27
5.2 Purificación de las proteínas VP2, Q <sub>L</sub> y Q <sub>F</sub> .....	29
5.2.1 Lisis celular .....	29
5.2.2 Limpieza y solubilización de los cuerpos de inclusión .....	30
5.2.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad .....	30
5.3 Diseño, expresión y purificación de una nueva proteína quimérica Q <sub>F</sub> .....	31
5.4 Ensamble in vitro de las VLPs a partir de las proteínas VP2, Q <sub>F</sub> , Q <sub>SF</sub> y Q <sub>L</sub> solubilizadas en condiciones desnaturalizantes. ....	33
5.5 Caracterización de las VLPs ensambladas .....	34
5.5.1 Dispersión dinámica de luz (DLS) .....	34
5.5.2 Microscopia de fuerza atómica (AFM) .....	34
5.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	35
5.5.4 Centrifugación isopícnica en gradientes continuos de CsCl .....	35
5.6 Determinación de actividad enzimática de la proteína Q <sub>L</sub> .....	36
5.7 Medición de fluorescencia en VLPs de la proteína Q <sub>SF</sub> .....	36



<b>6. RESULTADOS</b> .....	37
<b>6.1 Diseño de la proteína Q<sub>SF</sub></b> .....	37
<b>6.2 Expresión y purificación de las proteínas VP2, Q<sub>F</sub>, Q<sub>SF</sub> y Q<sub>L</sub></b> .....	39
<b>6.3 Ensamble de VLPs y análisis por dispersión dinámica de luz (DLS)</b> .....	44
<b>6.4 Análisis por centrifugación isopícnica</b> .....	55
<b>6.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM)</b> .....	58
<b>6.6 Análisis de la actividad específica de las partículas de ensamble de Q<sub>L</sub> y las partículas híbridas VP2:Q<sub>L</sub>, antes y después de los gradientes de CsCl</b> .....	60
<b>6.7 Medición de fluorescencia de las VLPs formadas por la proteína Q<sub>SF</sub></b> .....	64
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	65
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	67
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68





## RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs) son nanopartículas biológicas generadas a partir de proteínas estructurales de los virus, las cuales forman cápsides que no contienen material genético y, por lo tanto, no son infectivas. Estas partículas han sido utilizadas para estudiar los mecanismos de infección viral, para la producción de vacunas y en la ingeniería de nanomateriales.

El principio de las aplicaciones de las VLPs reside en su capacidad para funcionar como bloques de construcción y andamios. Esta propiedad les permite también emplearse como nano-acarreadores de enzimas (ENCs), de tal manera que sea posible la presentación de enzimas de interés al interior o al exterior de estas partículas, lo cual le confiere algunas ventajas con respecto a la enzima libre.

Como antecedente en el grupo de trabajo, se demostró que es posible obtener VLPs *in vitro* a partir de la proteína VP2 del Parvovirus B19 (recientemente renombrado Eritroparvovirus 1 de Primate). Además, se ha logrado la elongación de algunas de sus asas sin comprometer la competencia de la proteína para formar VLPs. El asa formada por los residuos 300-314 es de particular interés, ya que no forma interacciones críticas para la estabilidad de la cápside.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de esta asa para presentar proteínas que no requieren asistencia en su plegamiento. Se utilizaron como modelos a la lipasa de *Bacillus pumilus* (BpIA) y a dos variantes de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (GFP y sfGFP). Se construyó el gen para las proteínas quiméricas Q<sub>L</sub>, Q<sub>F</sub> y Q<sub>SF</sub> a través de la inserción de la secuencia que codifica para BpIA, GFP y sfGFP, respectivamente, entre los nucleótidos que codifican para los residuos 307 y 308 en el gen *vp2*. Los resultados demostraron que se pueden obtener VLPs de mayor diámetro que el de VP2 silvestre a partir de estas proteínas quiméricas. La inserción de las proteínas modelo en VP2 no afectó la capacidad de esta última para estructurarse. La fluorescencia de sfGFP se mantuvo aun estando incorporada en VP2 y en condiciones desnaturizantes (GndHCl 3M y urea 8 M) y BpIA retuvo actividad catalítica y mejoró su estabilidad.

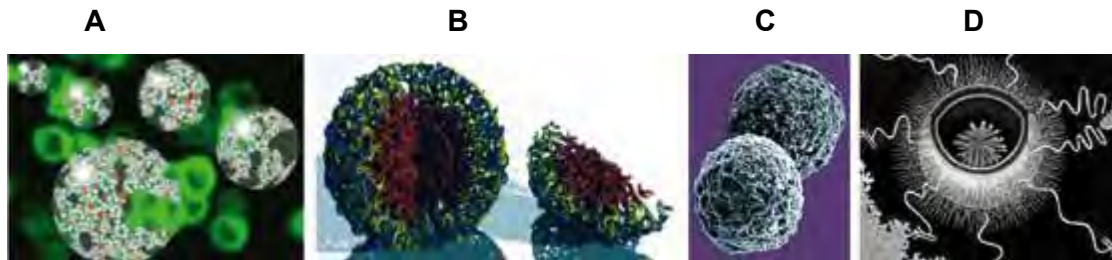


## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Nanotecnología y nanomedicina

La nanotecnología se define como toda aquella tecnología que se relaciona con nuevos materiales, sistemas y procesos que operan a una escala de 100 nm o menos, y supone la manipulación de materiales y la creación de estructuras y sistemas a escala de átomos y moléculas. En su ámbito se incluyen disciplinas como la física, la química, la ingeniería, la robótica, la biología, la medicina y las ciencias ambientales. Algunos ejemplos de las aplicaciones de la nanotecnología en sus distintas ramas son la fabricación de dispositivos nanoelectrónicos, catalizadores nanoestructurados, biosensores y detectores, y nanosistemas para la administración de fármacos.

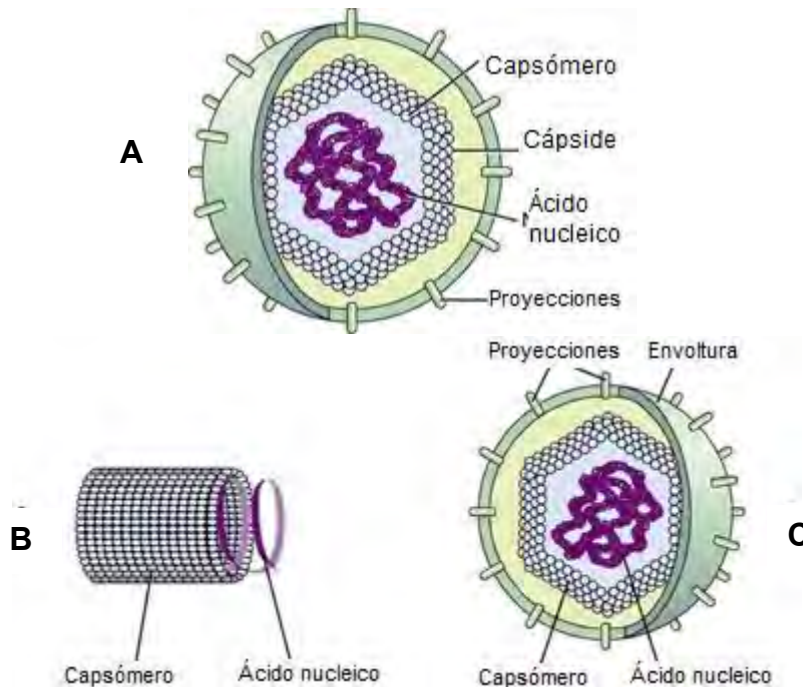
La nanomedicina es la rama de la nanotecnología que se perfila como la de mayor proyección en un futuro próximo debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. Se ha propuesto como una posible solución para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos a través de nanoestructuras que transporten el fármaco hasta la zona dañada y que se liberen solamente en respuesta a un estímulo cuando han reconocido esa zona. Para ello, es importante mantener el fármaco inactivo mientras se transporta por el cuerpo pero que a su vez retenga sus propiedades fisicoquímicas de acción. Se han propuesto una gran variedad de nanoestructuras como nanopartículas, nanocápsulas, dendrímeros, liposomas, micelas, etcétera, para la administración de fármacos (Figura 1). Estos nanosistemas son muy útiles, ya que permiten la dosificación mínimamente invasiva del fármaco, además de que pueden atravesar las membranas celulares y poros, y se pueden diseñar para ser específicos en tejidos y órganos (Lechuga, 2011).



**Figura 1.** Estructuras utilizadas en nanotecnología para el transporte de fármacos. **A)** Nanopartículas **B)** Dendrímeros **C)** Nanocápsulas poliméricas **D)** Liposomas (Lechuga, 2011). Los dendrímeros comprenden un conjunto de polímeros nanométricos cuya estructura está ramificada y en capas, en la que cada rama posee grupos libres para funcionalizar la superficie del dendrímero (Abbasi *et al*, 2014). Los liposomas son estructuras vesiculares formadas por bicapas lipídicas concéntricas cuyo interior es un medio acuoso. Tienen potencial para la liberación de fármacos u otras moléculas bioactivas (Ruano, 2013).

## 1.2 Virus como herramientas nano-biotecnológicas

Los virus son agentes infecciosos que no tienen metabolismo propio y se replican solo en organismos hospederos. Se componen normalmente de cubiertas proteicas conocidas como cápsides, las cuales envuelven al material genético del virus (Figura 2) (Bronstein, 2011). Los virus varían ampliamente en tamaño y forma, son estructuras extraordinariamente pequeñas cuyo tamaño oscila entre los 28 nm de los poliovirus a los 300 nm de los poxvirus. Por el arreglo de su cápside pueden considerarse como ensamblajes supramoleculares naturales. Los capsómeros son las unidades de construcción de las cápsides y pueden estar formados por una o varias copias de una misma subunidad proteica o en algunos casos de más de una subunidad. La organización de los capsómeros le da a la cápside una forma geométrica característica. Esta distribución espacial de las proteínas permite que se forme un arreglo supramolecular homogéneo, en el cual sus elementos químicos y estructurales se repiten de manera periódica a lo largo de la cápside viral (Cann, 2007).



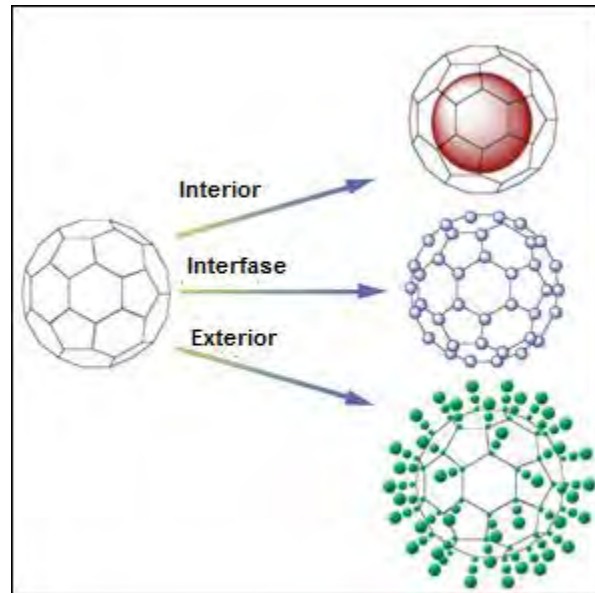
**Figura 2. A)** Estructura general de un virus. **B)** Virus no envuelto **C)** Virus envuelto (Modificado de VanMeter y Hubert, 2015).

En cuanto a su replicación, después de entrar en la célula hospedera, los virus son capaces de controlar la maquinaria de transcripción y traducción de aquella para la producción de sus proteínas y material genético. Los biopolímeros virales se autoensamblan en viriones funcionales (partículas virales maduras) listas para infectar otras células. El genoma del virus puede estar hecho de diferentes tipos de ácido nucleico (ADN, de cadena doble o cadena sencilla; ARN, de cadena doble y cadena sencilla en sentido +/-). Éste contiene las secuencias genéticas que codifican para las proteínas estructurales del virus y también las secuencias cuya función es controlar el metabolismo celular, redirigiéndolo hacia una eficiente replicación del virus (Fischlechner & Donath, 2007).

Por su tamaño, la mayoría de los virus se encuentran en el rango de estudio de la nanotecnología (<100 nm) por lo que pueden considerarse nanopartículas orgánicas. Los virus poseen características particulares, como una estructura modular, simetría y capacidad de autoensamblaje; además, las estructuras virales exhiben patrones simples y geométricos que buscan minimizar la energía empleada para su construcción. Por lo tanto, los virus pueden ser explotados con propósitos



específicos en diversas áreas de la nanomedicina y ciencias de los materiales (Figura 3) (Caballero y Chávez, 2010).



**Figura 3.** Regiones de la cápside viral de interés nanotecnológico. La superficie externa, la superficie interna y la interface entre subunidades, todas ellas han sido utilizadas para la construcción de nanopartículas virales multivalentes y multifuncionales. (Modificado de Douglas & Young, 2006).

### 1.3 Partículas tipo virus (VLPs)

Las cápsides se ensamblan a partir de muchas moléculas de una o varias proteínas distintas en un proceso aparentemente espontáneo. En 1957, Fraenkel-Conrat y Williams descubrieron que las partículas virales pueden formarse *in vitro* a partir de sus subunidades purificadas sin información adicional que dirija este ensamble, lo que indica que la partícula viral es un estado de mínima energía y por lo tanto representa el ordenamiento preferido para los componentes involucrados. Las partículas virales se mantienen ensambladas gracias a la interacción de fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas establecidas entre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Esta posibilidad de ensamblar virus ha llevado a crear partículas tipo virus (VLPs), las cuales consisten en contenedores no infecciosos carentes de material genético, ya que éste se puede reemplazar con un amplio repertorio de



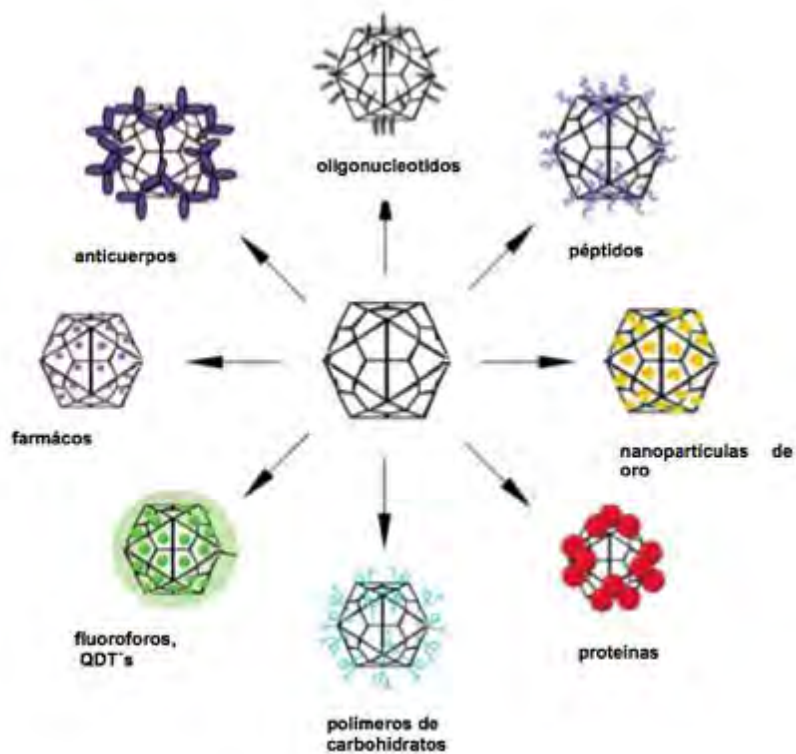
cargamentos sintéticos. También es posible modificar a las proteínas que constituyen a las cápsides a través de ingeniería genética o de forma química, lo cual hace las VLPs atractivas para aplicaciones en materiales y farmacéuticas (Caballero y Chávez, 2011).

Las VLPs se obtienen a partir de organismos recombinantes vía la expresión de los genes clonados correspondientes. Existen cuatro características muy importantes que permiten la construcción de VLPs recombinantes. En primer lugar, los ácidos nucleicos que codifican para las proteínas que constituyen a la cápside y otros péptidos de interés pueden sintetizarse a partir de sus secuencias presentes en bases de datos. En segundo lugar, los péptidos de interés pueden insertarse o añadirse a la proteína estructural base sin afectar el autoensamble de la misma. En tercer lugar, las VLPs pueden obtenerse a partir de hospederos heterólogos y por último, estas VLPs recombinantes tienen ventajas importantes sobre los virus silvestres, así como propiedades funcionales similares o incluso mejores. Los sistemas de expresión más comunes para la producción de VLPs son los de bacterias, levaduras e insectos. Los sistemas de expresión en plantas y animales se utilizan cuando se requieren VLPs con propiedades específicas (Zeltins, 2012). Las VLPs quiméricas son partículas que poseen componentes genéticos y/o estructurales de diferentes especies o familias de virus. Se pueden generar por el intercambio de secuencias génicas de regulación, de proteínas completas o parte de ellas. Estas VLPs quiméricas permiten estudiar los ciclos de vida de los virus, los factores de virulencia y sus mecanismos de infección y transformación (Kaufmann *et al.*, 2012).

Las VLPs tienen diversas aplicaciones: se pueden emplear como vectores para transportar moléculas unidas químicamente a la superficie, o como base para el encapsulamiento y la liberación específica de moléculas con importancia farmacológica como son medicamentos, ácidos nucleicos, genes, y nanopartículas magnéticas, entre otros. La superficie de las cápsides se puede modificar con una gran variedad de moléculas para otorgarles una función específica, tales como vitaminas, carbohidratos, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, anticuerpos,



partículas de oro o magnéticas, y moléculas fluorescentes (Figura 4) (Steinmetz *et al.*, 2006).



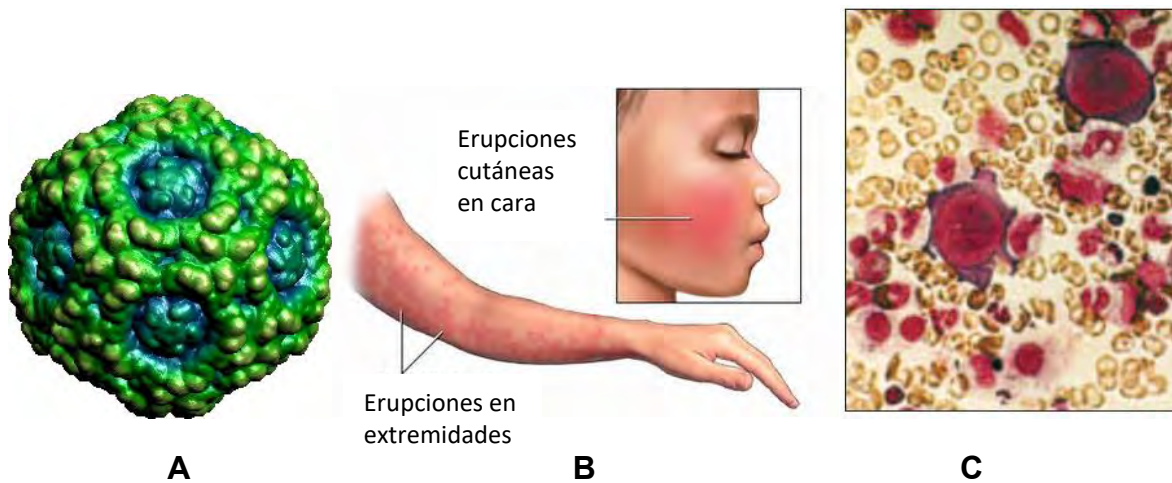
**Figura 4.** Diversidad molecular de las cápsides virales en la producción de VLPs (Singh *et al.*, 2006).

#### 1.4 El Parvovirus B19 como modelo de estudio para la producción de VLPs

Los parvovirus son virus pequeños que presentan un diámetro entre los 18-26 nm, son icosaédricos, no presentan envoltura y contienen una cadena de ADN monocatenario. Infechan roedores, perros, gatos y otros animales. El Parvovirus Humano B19 (B19V), recientemente renombrado Eritroparvovirus 1 de Primate, pertenece al género Parvovirus de la familia Parvoviridae. La partícula viral mide entre 22-26 nm de diámetro, su cromosoma consta una cadena sencilla de ADN de 5600 pb aproximadamente, y su cápside tiene 60 copias de proteínas estructurales (Figura 5). Es un virus muy estable, resistente a la inactivación física, ya que es termoestable a 56 °C durante 60 minutos. El B19V es el agente etiológico del eritema infeccioso o quinta enfermedad, la cual puede causar muerte fetal y anemia



en pacientes inmunocomprometidos. Además, se ha demostrado que causa infección en miocardio, células epidérmicas y células precursoras eritroides (Romero-Cabello, 2007).



**Figura 5. A)** Estructura del B19V **B)** El B19V es el agente etiológico del eritema infeccioso **C)** El B19V tiene predilección por eritroblastos circulantes (Romero-Caballero, 2007).

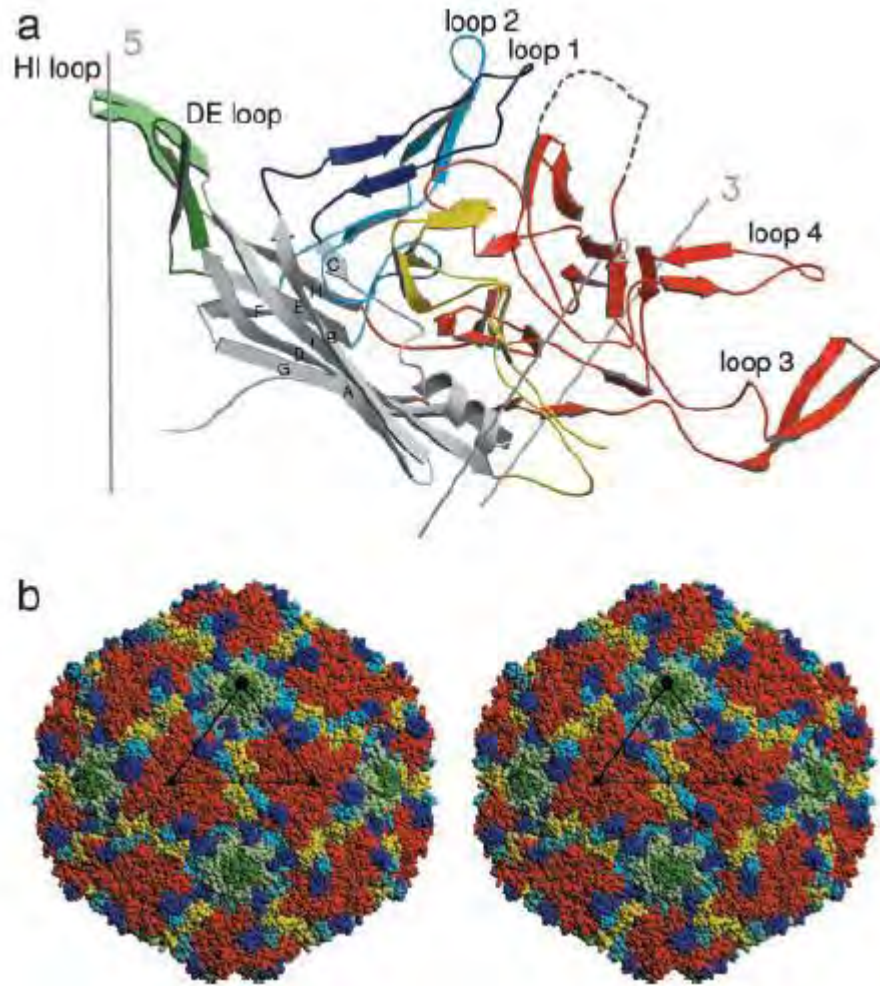
Desde un punto de vista estructural, el B19V es un excelente modelo para estudiar el ensamble de virus icosaédricos, la estabilidad de las cápsides y su desensamble. Las cápsides del B19V se forman por 60 subunidades de sólo dos proteínas, VP1, con una abundancia del 5% y un peso molecular de 84 KDa, y VP2, presente en un 95% y con un peso de 58 KDa. Ambas proteínas son idénticas en secuencia, excepto por una secuencia extra de 227 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína VP1. Las VLPs del B19V se han producido por expresión heteróloga simultánea de VP1 y VP2, así como por la expresión heteróloga de VP2 exclusivamente, tanto en células de insecto como en levaduras (Brown *et al.*, 1991). Estas VLPs se han utilizado de manera exitosa como acarreadores de epítomos inmunogénicos del virus del dengue (Amexis *et al.*, 2006), herpes simple y del virus de hepatitis murina, lo cual demuestra su potencial para aplicaciones biomédicas (Brown *et al.*, 1994).

Desde hace algunos años se ha comprobado que la proteína VP2, expresada en células de mamífero e insecto, es capaz de autoensamblarse en ausencia de ADN o de la proteína VP1, y las VLPs derivadas de ello conservan la mayoría de sus





propiedades fisicoquímicas y antigénicas. La VP2 posee una estructura de barril- $\beta$  antiparalelo de ocho hebras, las cuales se unen por medio de cuatro asas o “loops”. Las hebras  $\beta$  se hallan en una conformación de “jelly roll” y presentan la región de secuencia más conservada entre los parvovirus (Figura 6) (Kaufmann *et al.*, 2004).



**Figura 6. a.** Estructura terciaria de la proteína VP2 del B19V mostrando elementos de estructura secundaria **b.** Imagen estereoscópica de la topografía superficial del B19V (Kaufmann *et al.*, 2004).

En trabajos recientes (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012) se ha comprobado y estudiado el ensamble *in vitro* y a pH neutro de subunidades de VP2 del B19V en partículas tipo virus. Se ha propuesto que el modelo de ensamble se da por el arreglo de tres subunidades de VP2 que forman un capsómero y 20 de éstos a su vez constituyen a la cápside completa de 60 subunidades. Los resultados además

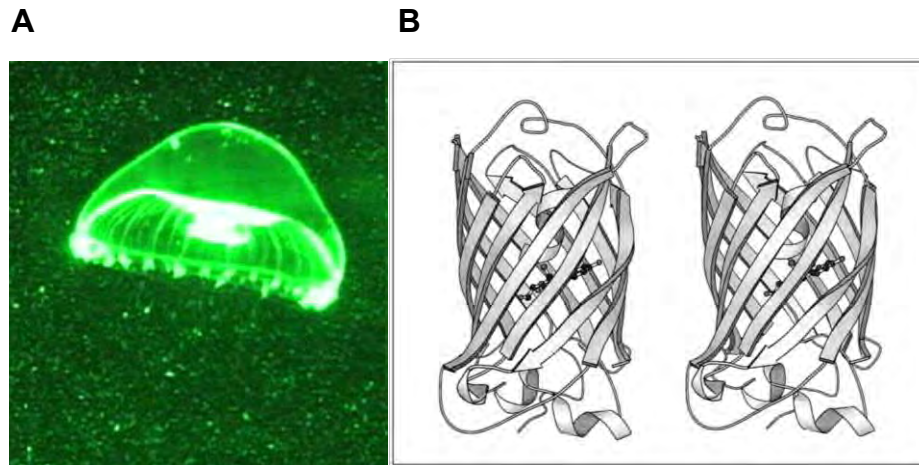


demonstraron que las VLPs derivadas de B19V son estables a 37°C y que el ensamble a pH ácidos y básicos genera principalmente especies intermediarias en lugar de cápsidas completas. El uso de VLPs derivadas del B19V se ha realizado con éxito y prueba de ello destaca la producción en sistema de baculovirus de VLPs quiméricas modificadas en el extremo N-terminal de la proteína VP2 y en una de sus asas superficiales, insertando epítomos del virus de herpes simple humano y del virus de la hepatitis murina. Estas VLPs modificadas generaron una respuesta inmune y protección contra el reto viral.

En este proyecto deseamos introducir proteínas completas en un asa superficial del B19V y probar su ensamble y plegamiento *in vitro*. Como modelos de proteínas heterólogas se utilizaron a la proteína verde fluorescente (GFP) y a la lipasa A de *Bacillus pumilus* (BpIA).

### **1.5 Proteína verde fluorescente (GFP)**

La proteína verde fluorescente (GFP) presente en la medusa *Aequorea victoria* es una proteína monomérica soluble que emite fluorescencia a una longitud de onda de 508 nm cuando es excitada con luz ultravioleta (Reid y Flynn, 1997). Es una proteína de 238 aminoácidos y de peso molecular variable entre los 30 y 27 KDa. Su estructura terciaria se forma por 11 hebras beta que constituyen un cilindro y una hélice alfa en el centro (Figura 7). La constitución de la subunidad de la GFP nativa es dependiente de la concentración; la proteína es monomérica en soluciones diluidas (menores a 2 mg/mL) y dimérica a concentraciones mayores a 5 mg/mL (Chalfie, 1995).



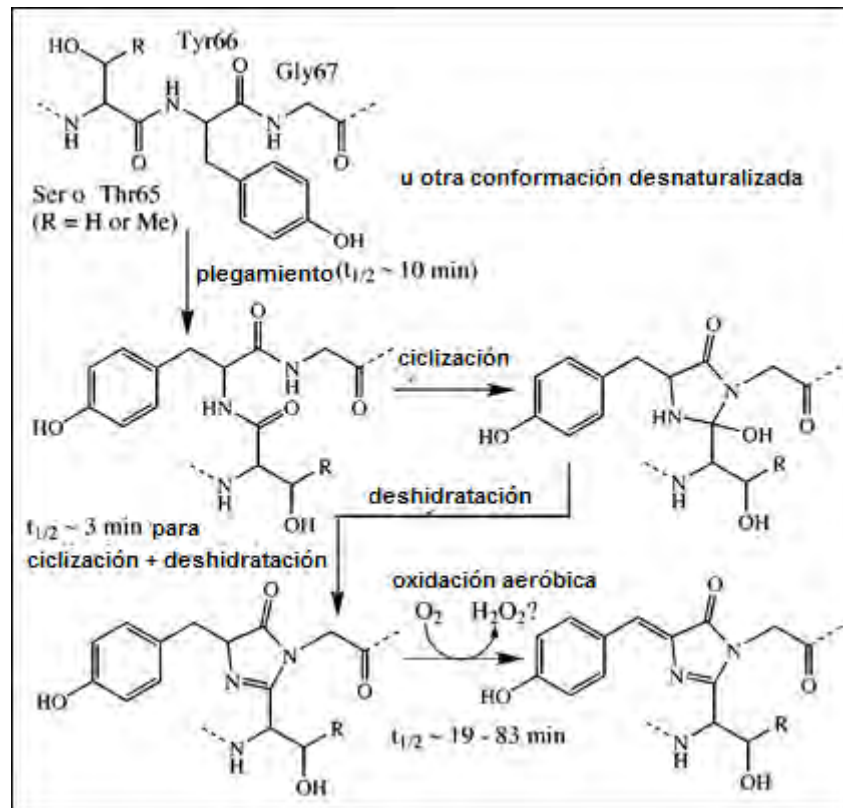
**Figura 7. A.** *Aequorea victoria*, organismo productor de GFP (Costello *et al.*, 2008) **B.** Estructura tridimensional de la GFP (Tsien, 1998).

El gen que codifica para esta proteína ha sido clonado y se utiliza habitualmente como marcador en biología molecular. Los descubrimientos relacionados a la GFP se dieron en conjunto por tres investigadores, Shimomura, Chalfie y Tsien, quienes participaron escalonadamente en dilucidar la estructura y función de la proteína. El Dr. Shimomura descubrió y estudió las propiedades de la GFP, el Dr. Chalfie, usando técnicas de biología molecular, logró introducir el gen que codificaba para la GFP en el ADN del gusano transparente *C. elegans*, e inició la era de la GFP como marcador de procesos en células y organismos. Finalmente, el Dr. Tsien modificó la estructura de la proteína para producir moléculas que emiten luz a distintas longitudes de onda, extendiendo la paleta de colores de las proteínas (Pérez y Becu-Villalobos, 2009).

La emisión de fluorescencia se debe a la presencia de un cromóforo con una estructura de anillo de imidazolona, específicamente una *p*-hidroxibencilidenoimidazolinona formada a partir de los residuos 65-67, los cuales corresponden a Ser-Tyr-Gly en la proteína silvestre. En la Figura 8 se indica el mecanismo actual aceptado para la formación del cromóforo. En primer lugar, la GFP se pliega en su conformación nativa, luego la imidazolinona se forma por un ataque nucleofílico de la amida proveniente de la Gly67 sobre el carbonilo del residuo 65, seguida de una deshidratación. Finalmente, el oxígeno molecular deshidrogena el enlace  $\alpha$ - $\beta$  del



residuo 66 para integrar su grupo aromático al sistema de dobles enlaces conjugados de la imidazolinona.

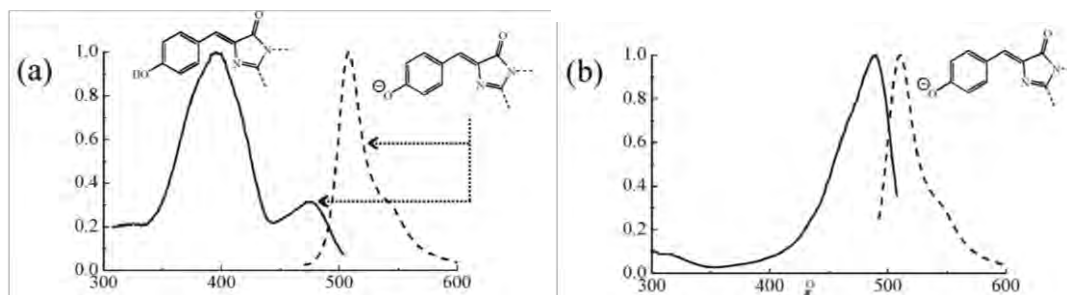


**Figura 8.** Mecanismo propuesto para la biosíntesis intramolecular del cromóforo de la GFP (Modificado de Tsien, 1998).

De acuerdo a su cromóforo, se han identificado siete clases distintas de GFP, las cuales difieren en la mutación de alguno de los aminoácidos que participan en la formación del cromóforo, así como en el rearrreglo intramolecular de átomos y electrones, y por lo tanto dan como resultado espectros de excitación y emisión distintos (Figura 9).



Mutación	Nombre común	$\lambda_{exc}$ ( $\epsilon$ )	$\lambda_{em}$ (QY)	Rel. fl. @ 37°C
<b>Clase 1 - "Wild-type"</b>				
None or Q80R	Wild type	395–397 (25–30) 470–475 (9.5–14)	504 (0.79)	6
F99S, M153T, V163A	Cycle 3	397 (30) 475 (6.5–8.5)	506 (0.79)	100
<b>Clase 2 - Anión fenolato</b>				
S65T	EGFP	489 (52–58)	509–511 (0.64)	12
F64L, S65T		488 (55–57)	507–509 (0.60)	20
F64L, S65T, V163A		488 (42)	511 (0.58)	54
S65T, S72A, N149K, M153T, I167T	Emerald	487 (57.5)	509 (0.68)	100
<b>Clase 3 - Fenol neutro</b>				
S202F, T203I	H9	399 (20)	511 (0.60)	13
T203I, S72A, Y145F	H9–40	399 (29)	511 (0.64)	100
<b>Clase 4 - Fenolato con un sistema de electrones pi (proteínas amarillo fluorescentes)</b>				
S65G, S72A, T203F	10C Q69K	512 (65.5)	522 (0.70)	6
S65G, S72A, T203H		508 (48.5)	518 (0.78)	12
S65G, V68L, Q69K, S72A, T203Y		516 (62)	529 (0.71)	50
S65G, V68L, S72A, T203Y	10C	514 (83.4)	527 (0.61)	58
S65G, S72A, K79R, T203Y	Topaz	514 (94.5)	527 (0.60)	100
<b>Clase 5 - Grupo indol en el cromóforo (proteínas cian fluorescentes)</b>				
Y66W	W7	436	485	—
Y66W, N146I, M153T, V163A		434 (23.9) 452	476 (0.42) 505	61
F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A		434 (32.5) 452	476 (0.4) 505	80
S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A	W1C	435 (21.2)	495 (0.39)	100
<b>Clase 6 - Grupo imidazol en el cromóforo (proteínas azul fluorescentes)</b>				
Y66H	BFP	384 (21)	448 (0.24)	18
Y66H, Y145F	P4–3	382 (22.3)	446 (0.3)	52
F64L, Y66H, Y145F	EBFP	380–383 (26.3–31)	440–447 (0.17–0.26)	100
<b>Clase 7 - Grupo fenil en cromóforo</b>				
Y66F		360	442	—



**Figura 9.** Tabla: Las 7 clases de GFP de acuerdo a la estructura de su cromóforo. a) Espectro de absorción y emisión de GFP silvestre. b) Espectro de absorción y emisión de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) (Modificada de Tsien, 1998).



La GFP es una proteína muy versátil y se utiliza en diversos campos como la microbiología, ingeniería genética, fisiología, e ingeniería ambiental. Permite ver procesos previamente invisibles, como el desarrollo de neuronas, la diseminación de células cancerosas o la contaminación de agua con arsénico y metales pesados, entre otros (Pérez y Becu-Villalobos, 2009).

Asimismo, esta proteína se ha empleado en la producción de VLPs. Como antecedente está el encapsulamiento de la EGFP mediante el ensamble in vivo de VLPs del bacteriófago P22 de *Salmonella typhimurium* en dos pasos: formación de una protocápside y rearreglo estructural acoplado a trombina para formar una cápside madura (O'Neil *et al.*, 2011).

Por otro lado, Leona Gilbert y colaboradores insertaron la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) en el extremo amino terminal de la VP2 y se ensambló en VLPs fluorescentes. Por microscopía electrónica se comprobó que estas VLPs eran muy similares en tamaño comparadas con los virus silvestres del parvovirus B19. Además, se observaron al menos 9 dominios de EGFP asociados con estas VLPs en la superficie. Las VLPs fluorescentes tuvieron la capacidad de internalizarse en células cancerosas y transportarse al núcleo a través de la red de microtúbulos (Gilbert *et al.*, 2005).

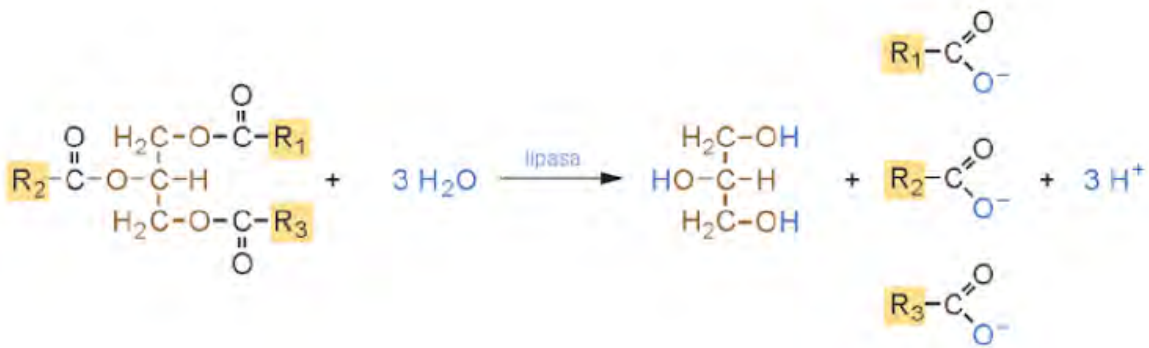
### **1.6 Lipasa A de *Bacillus pumilus* (BpIA)**

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los triacilgliceroles. Los productos de esta reacción son ácidos grasos libres y glicerol (Figura 10). En ausencia de agua, las lipasas también pueden llevar a cabo la reacción inversa, la esterificación, alcoholólisis, síntesis de amidas y tioésteres.

La lipasa A de *Bacillus pumilus* (BpIA) es una enzima de 181 residuos de aminoácidos en su forma madura y tiene un peso molecular de 19.5 KDa. Esta enzima es homóloga a la lipasa de *Bacillus subtilis*, de la cual se conoce su estructura cristalográfica, lo que permitió a Mora (2008) hacer un modelo estructural por homología. Su estructura consiste en una molécula globular de plegamiento clásico  $\alpha/\beta$  hidrolasa con 6 hebras- $\beta$  paralelas flanqueadas por 5 hélices- $\alpha$  (Figura



11). La triada catalítica la componen 3 residuos: Ser77, Asp133 e His156. Los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 constituyen la cavidad oxianiónica y los residuos catalíticos se encuentran expuestos al disolvente debido a la ausencia de la tapa del sitio activo (Santillán, 2012). La lipasa de *B. pumilus* es mesófila y tiene preferencia por ácidos grasos de cadena corta (Alcántara-Sol, 2009).



**Figura 10.** Reacción catalizada por lipasas (Muller, 2008).

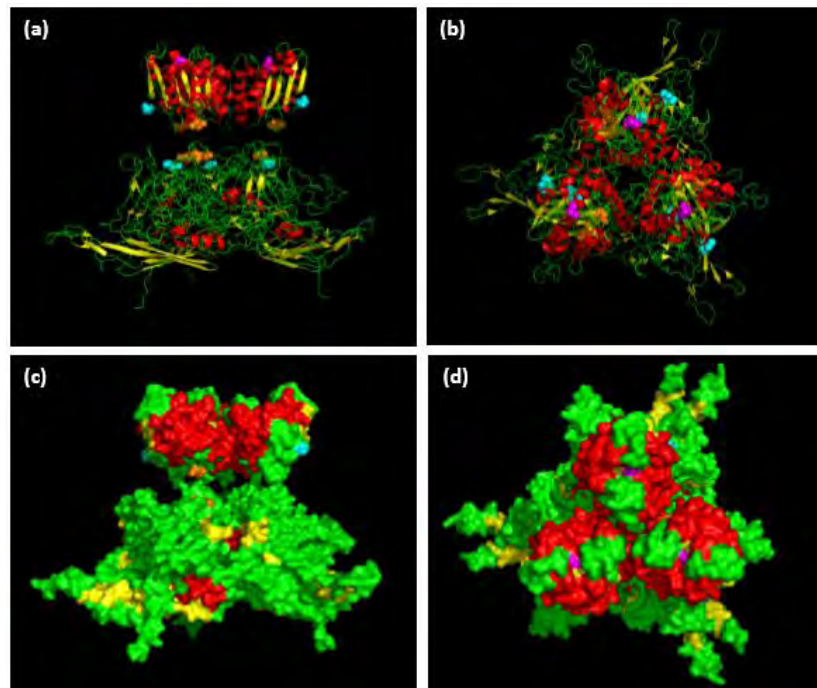


**Figura 11.** Estructura tridimensional de la proteína BpIA. Se indica el sitio catalítico de la enzima, formado por Ser77, Asp133 e His156 (Mora, 2008).



La importancia de las lipasas reside en su enorme potencial biotecnológico derivado de su estabilidad en disolventes orgánicos, que no requieren cofactores para llevar a cabo su actividad, su alta enantioselectividad y la alta especificidad por el sustrato. Por estas razones, las lipasas demuestran ser sumamente versátiles incluso fuera de los sistemas biológicos tradicionales (Bustos-Jaimes *et al.*, 2009).

Recientemente, se estudió la proteína quimérica generada a partir de VP2 y BpIA (QL), en la cual BpIA se encuentra insertada en el asa 300-314 de VP2 (Gutiérrez-Landa, 2014). En este trabajo se comprobó la actividad catalítica de dicha proteína quimérica y se obtuvieron partículas tipo virus a partir de mezclas de ella y VP2 silvestre. Sin embargo, la proteína por sí sola no fue capaz de formar VLPs. Gracias al plegamiento autónomo de BpIA, esta lipasa es un modelo adecuado para el estudio del potencial de VLPs del B19V como nanoacarreador de enzimas (Figura 12).



**Figura 12.** Modelo teórico de un capsómero de la proteína QL. (a) Vista de perfil, en la parte superior tres proteínas BpIA, 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. (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 (Gutiérrez-Landa, 2014).





## 2. JUSTIFICACIÓN

El Parvovirus B19 es un modelo interesante para estudios de nanotecnología debido a sus propiedades ya comprobadas. No sólo es posible construir partículas tipo virus a partir de una sola proteína estructural (VP2), sino que también esta proteína puede modificarse en su extremo N terminal sin que pierda su potencial para formar cápsides.

Además, la proteína VP2 posee otras regiones de interés para la modificación molecular tales como las asas, debido a que estos sitios, expuestos al solvente, no tienen una conformación espacial definida que pueda interferir en el plegamiento final de la VP2. Como caso específico se encuentra el asa 300-314 que por su tamaño y movilidad se ha considerado para la inserción de proteínas pequeñas de interés como la lipasa A de *B. pumilus* (BpIA).

En este proyecto el propósito es profundizar en el trabajo realizado con la BpIA y probar una proteína de mayor tamaño como la proteína verde fluorescente (GFP). La presentación de proteínas en asas implica restricciones en los grados de libertad del movimiento durante el replegamiento debido a la unión en dos sitios a la cadena peptídica de VP2. Una vez plegada, se considera que las proteínas presentadas son entrópicamente más estables que si se encontrara unida a uno solo sitio, como al extremo N-terminal de la VP2. Esto permitirá observar si las VLPs del B19V pueden ser utilizadas como nano acarreadores de estas proteínas en su superficie.



### 3. HIPÓTESIS

Se ha comprobado que la proteína BpIA no requiere asistencia para su plegamiento (Gutiérrez- Landa, 2014), que la formación del cromóforo de GFP es espontánea (Hsu *et al.*, 2009) y que el asa 300-314 de la proteína VP2 del B19V puede modificarse para su funcionalización. La incorporación de BpIA y GFP en esta asa producirá proteínas quiméricas que, bajo diversas condiciones fisicoquímicas (pH, fuerza iónica, concentración de arginina), tendrán la capacidad de ensamblarse *in vitro* en VLPs, a partir de las proteínas solubilizadas y desnaturalizadas en cloruro de guanidinio. Además, estas VLPs conservarán sus funciones de hidrólisis para la BpIA y de fluorescencia para la GFP.



## 4. OBJETIVOS

Estudiar el potencial de las partículas tipo virus derivadas de la proteína VP2 del Parvovirus B19 como nano-acarreadores de proteínas de interés.

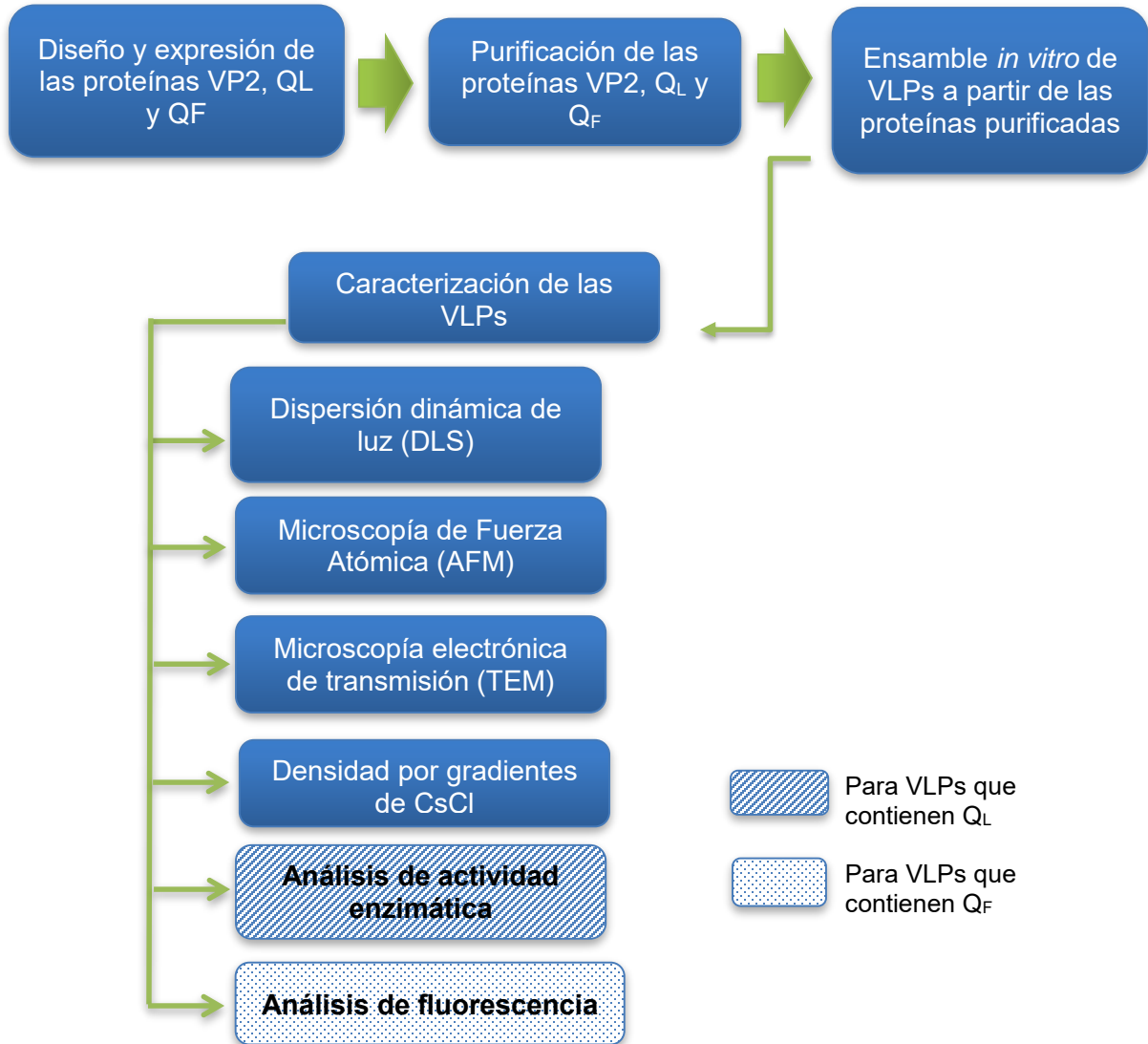
### 4.1 Objetivos particulares

- Diseñar una proteína de fusión que contenga la GFP en el asa superficial 300-314 de la proteína VP2 del B19V.
- Purificar las proteínas VP2 y quiméricas.
- Evaluar la competencia de auto ensamble de las quimeras solas y en mezcla con la proteína VP2.
- Caracterizar por distintos métodos fisicoquímicos a las VLPs obtenidas
- Demostrar que las proteínas insertadas se plegaron de forma similar a las proteínas en forma libre.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 13 se muestra un esquema general de la metodología seguida durante el desarrollo del proyecto experimental.



**Figura 13.** Esquema general del procedimiento experimental.

### 5.1 Diseño y expresión de las proteínas VP2, QL y Q<sub>F</sub> en *Escherichia coli*

En estudios previos dentro del grupo se analizaron las interacciones de las diversas asas expuestas en la superficie de las VLPs formadas por la VP2 del B19V. Un asa

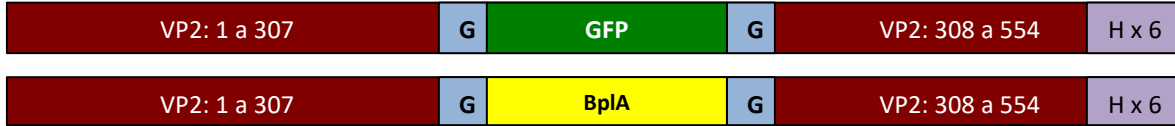


superficial sobresaliente es la formada por los residuos 300 a 314. En realidad, de todos los residuos de esta asa, los únicos que pudieron interpretarse en la densidad electrónica para construir la estructura cristalográfica fueron el primero y el último. La falta de densidad electrónica es un reflejo de la alta flexibilidad de esta asa y de su poco compromiso con la formación de intercaras que participan en la construcción de la cápside. Esto ha dado pie a la inserción de péptidos en dicho sitio sin afectar la formación de VLPs. Las secuencias de las proteínas quiméricas VP2-BpIA307 (de ahora en adelante Q<sub>L</sub>) y VP2-GFP307 (de ahora en adelante Q<sub>F</sub>) se construyeron mediante la inserción de las proteínas BpIA y GFP, respectivamente, entre los residuos 307 y 308 de la VP2. Así mismo, se añadió en cada caso una etiqueta de 6 histidinas (His) en el extremo C-terminal (Figura 14). La secuencia de estas proteínas se utilizó para la construcción de la secuencia de nucleótidos y la posterior síntesis de esta secuencia. El gen sintético se subclonó entre los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* del vector de expresión pET22b(+). La proteína VP2 se produce a partir del mismo vector y con la misma estrategia de purificación utilizada en trabajos previos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

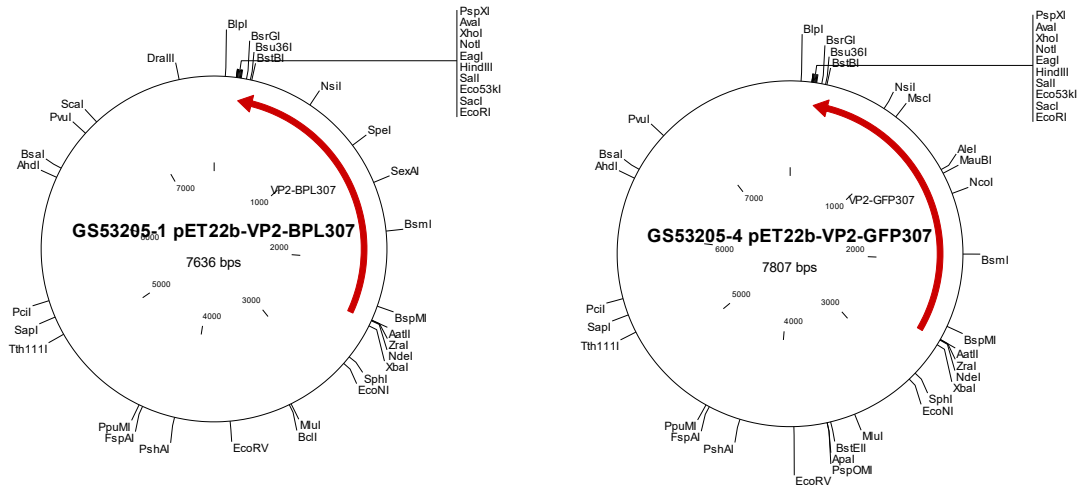
Después de transformar los plásmidos *pET22b-VP2*, *pET22b-VP2-BPL307* y *pET22b-VP2-GFP307* en *E. coli* BL21 (DE3), las células transformadas se inocularon en un tubo con medio LB y ampicilina (amp) 100 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Con este tubo se inoculó un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB adicionado con ampicilina y se incubó durante 4 h a las mismas condiciones. A continuación, con este matraz se inoculó un matraz de 2 L de capacidad con 1 L de medio LB adicionado con ampicilina y se dejó incubando por 4 h a las condiciones anteriores. Transcurrido este tiempo, el cultivo se indujo con IPTG a una concentración final de 0.25 mM, y finalmente se incubó durante 17 h a 30 °C con agitación orbital de 150 rpm.



a)



b)



**Figura 14. a)** Esquema de las construcciones de las proteínas VP2-GFP307 ( $Q_F$ ) y VP2-BplA307 ( $Q_L$ ). Las secuencias de GFP y BplA están insertadas en el asa 300-314 de VP2 y flanqueadas por una glicina de cada lado. La etiqueta de histidinas se encuentra en el extremo carboxilo terminal. **b)** Plásmidos pET22b-VP2-BPL307 y pET22b-VP2-GFP307. En rojo están señalados los genes *vp2-bpla307* y *vp2-gfp307* que codifican para las proteínas homónimas. Estos plásmidos poseen las secuencias de restricción para las enzimas *NdeI* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3', respectivamente de los genes.

## 5.2 Purificación de las proteínas VP2, $Q_L$ y $Q_F$

### 5.2.1 Lisis celular

La purificación de VP2,  $Q_L$  y  $Q_F$  se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Sánchez Rodríguez, 2012) con algunas adaptaciones. Después de la inducción, las células fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 20 min, el botón celular se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM,



pH 6.3) y se incubó con lisozima a 37 °C durante 15 min. Después las células se lisaron por sonicación empleando pulsos de 20 s con pausas de 10 s, durante 15 min en un baño de hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 20 min a 4 °C. Las tres proteínas formaron cuerpos de inclusión, lo cual es común en la expresión de proteínas virales en sistemas heterólogos bacterianos. El botón, con los cuerpos de inclusión, se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis y la purificación se dividió en tres pasos: Limpieza de cuerpos de inclusión, solubilización de los cuerpos de inclusión y purificación por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes.

### **5.2.2 Limpieza y solubilización de los cuerpos de inclusión**

Para cada proteína, el botón resuspendido en el amortiguador de lisis se sonicó durante 1 min y después se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min. El botón obtenido se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lavado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, urea 3 M, Tritón X-100 al 2%, pH 6.3) y se volvió a sonicar durante 1 min y a centrifugar a 8000 rpm durante 10 min. Este lavado se repitió 2 veces más y enseguida se realizó uno más con el mismo amortiguador, pero adicionando DTT a una concentración final de 3 mM. Para el lavado final se utilizó amortiguador de lisis con el propósito de eliminar el exceso de urea, detergente y agente reductor de las muestras. Los sedimentos se recuperaron por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min y posteriormente se solubilizaron con 40 mL de amortiguador de solubilización ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, DTT 2 mM, GndHCl 5 M, pH 6.3) y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

### **5.2.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad**

La purificación de las proteínas se realizó mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes. Para ello se empleó una columna empacada con 15 mL de resina protino Ni-TED (Macherey-Nagel) pre-equilibrada con amortiguador de solubilización sin DTT a pH 6.3 para VP2 y a pH 7.5 para QL y QF. Se corrieron muestras de 5 mL y enseguida la columna se lavó con 50 mL de amortiguador de

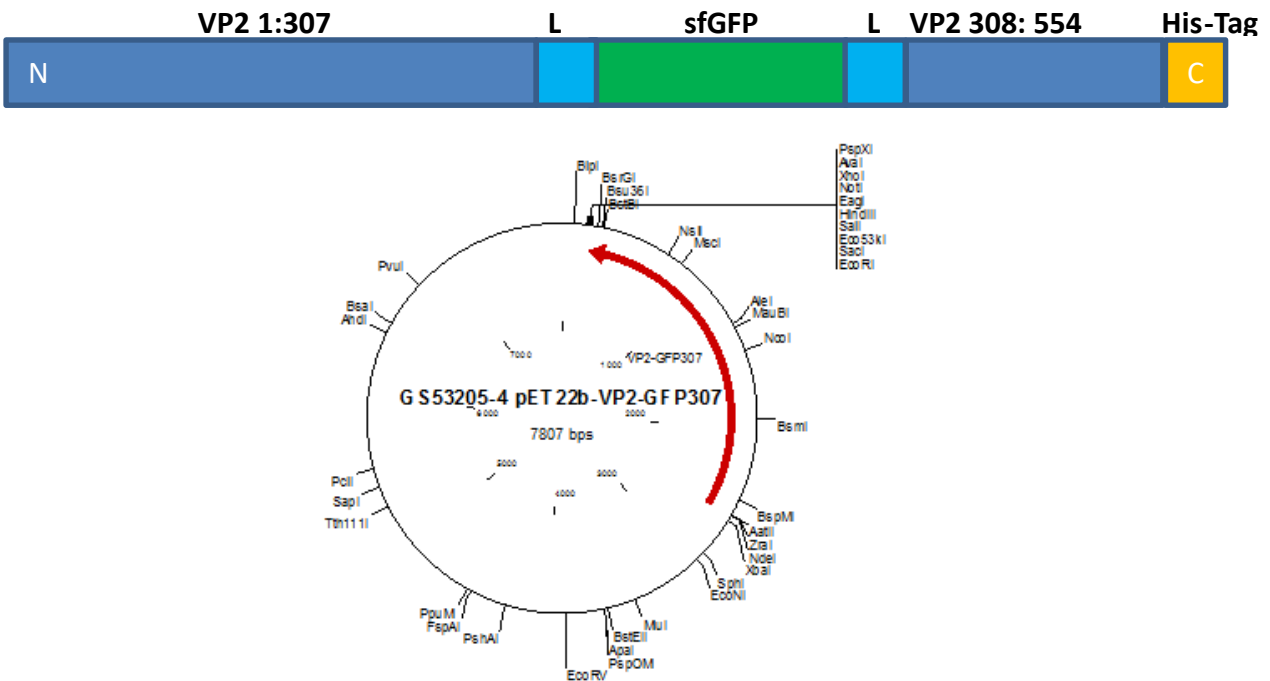


solubilización sin DTT y con 30 mL del mismo amortiguador, pero adicionado con imidazol 20 mM. A continuación, las proteínas se eluyeron con 30 mL de amortiguador de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, GndHCl 5 M, imidazol 300 mM; pH 6.3 para VP2 o pH 7.5 para Q<sub>L</sub> y Q<sub>F</sub>). Se colectaron fracciones de 5 mL y alícuotas de 100 µL de cada fracción fueron dializadas y analizadas por SDS-PAGE. Las fracciones correspondientes a la proteína pura se colectaron y concentraron con cartuchos de ultrafiltración con tamaño de corte de 50 kDa. En esta etapa también se eliminó el imidazol y se cambió el amortiguador de solubilización por amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, GndHCl 5 M, pH 8). A continuación, se determinó la concentración final de proteína midiendo la absorbancia a 280 nm. Se utilizó una curva patrón de albumina sérica solubilizada en amortiguador de replegamiento. Las proteínas se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

### **5.3 Diseño, expresión y purificación de una nueva proteína quimérica Q<sub>F</sub>**

Con el propósito de generar partículas tipo virus fluorescentes, se diseñó una nueva construcción para la proteína quimérica Q<sub>F</sub> ya que ésta no presentó fluorescencia después de la inducción en *E. coli*. Para ello se eligió la variante GFP “superfolder” (sfGFP; PDB ID: 3B2P) la cuál presenta ciertas modificaciones en la secuencia de aminoácidos que mejoran su plegamiento y su expresión. Se diseñó una proteína quimérica de VP2 y sfGFP (de ahora en adelante Q<sub>SF</sub>) insertada en el asa 300-314 de VP2 (Figura 15). A la construcción se le añadió un par de secuencias de acoplamiento (*linkers*) (GGSGGSGGSGG) que flanquean a la secuencia de sfGFP en las posiciones 307 y 308 de VP2. Además, la construcción cuenta con una etiqueta de histidinas en el C-terminal de VP2 para purificar por cromatografía de afinidad. La construcción se insertó en un vector pET22b(+) y se realizó la transformación del mismo en células competentes de *E. coli* BL21(DE3).





**Figura 15. A)** Esquema de la secuencia de aminoácidos de la proteína  $Q_{SF}$ . L corresponde a los *linkers* de secuencia: GGSGGSGGSGG. **B)** Mapa del plásmido pET22b-VP2-sfGFP307. En rojo está señalados el gen *vp2-sfgfp307* que codifican para la proteína sfGFP307. Este plásmido posee las secuencias de restricción para las enzimas *NdeI* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3', respectivamente del gen *vp2-sfgfp307*.

A continuación, se realizó el escalamiento y expresión de la proteína  $Q_{SF}$  siguiendo el mismo protocolo para  $Q_F$  y  $Q_L$ . La inducción se realizó a 30 °C durante 16 h con IPTG a una concentración final de 0.25 mM.

Los cuerpos de inclusión de  $Q_{SF}$  se purificaron de acuerdo al protocolo descrito para VP2,  $Q_L$  y  $Q_F$ , excepto que la solubilización de los mismos se realizó con amortiguador de GndHCl 5 M y en otro con urea 8 M.

En seguida, se realizó la purificación paralela con ambos desnaturizantes por cromatografía de afinidad. Se añadieron de 3 – 5 mL de cuerpos de inclusión, solubilizados y clarificados por centrifugación a la columna siguiendo los siguientes dos protocolos:



UREA 8 M	CLORURO DE GUANIDINIO 3 M
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Equilibrar columna con amortiguador de solubilización pH 8 (Urea 8 M)</li><li>2. Añadir muestra</li><li>3. Recolectar frente y añadir amortiguador de solubilización pH 8.</li><li>4. Recolectar fracción y añadir amortiguador de elución con 15 mM de imidazol</li><li>5. Recolectar fracción y añadir amortiguador de elución con 500 mM de imidazol.</li><li>6. Recolectar fracciones</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Equilibrar columna con amortiguador A (GndHCl 3 M, Glicerol 2.5 %, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.3 M pH 7.5)</li><li>2. Añadir muestra</li><li>3. Recolectar frente y añadir amortiguador B (GndHCl 3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.3 M pH 7.5)</li><li>4. Recolectar fracción y añadir amortiguador C (GndHCl 3 M, Imidazol 15 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.3 M pH 7.5)</li><li>5. Recolectar fracción y añadir amortiguador D (GndHCl 3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1 M pH 7.5)</li><li>6. Recolectar fracción y añadir amortiguador E (GndHCl 3 M, Imidazol 500 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.3 M pH 7.5)</li></ol>

#### 5.4 Ensamble *in vitro* de las VLPs a partir de las proteínas VP2, Q<sub>F</sub>, Q<sub>SF</sub> y Q<sub>L</sub> solubilizadas en condiciones desnaturizantes.

Se realizó el ensamble de las VLPs *in vitro* por medio de la diálisis para la eliminación del agente desnaturizante. Se utilizaron muestras con proteína VP2 pura y con las quiméricas (puras y en proporciones con VP2) a una concentración de proteína total de 0.7 mg/mL y volumen final de 1.5 mL de acuerdo a las proporciones indicadas en la Tabla 1. Para los ensambles con VP2, Q<sub>L</sub> y Q<sub>F</sub> se utilizaron muestras concentradas de proteína pura y solubilizada en GndHCl 5 M, mientras que para los de Q<sub>SF</sub> se emplearon cuerpos de inclusión solubilizados en GndHCl 3M y urea 8 M. Las muestras se dializaron a 4 °C en 50 mL de amortiguador PBS-Arg (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, L-Arginina 0.2 M, pH 7.4) realizando tres cambios de amortiguador cada 12 h.



**Tabla 1.** Proporciones de proteínas empleadas para realizar las pruebas de ensamble.

VLPs	Proporción	Moléculas de sfGFP o BpIA esperadas sobre la superficie
VP2	100 %	0
Q <sub>F</sub>	100 %	60
Q <sub>SF</sub>	100 %	60
Q <sub>L</sub>	100 %	60
VP2:Q <sub>F</sub> o VP2:Q <sub>L</sub>	4:1	12
	9:1	6

## 5.5 Caracterización de las VLPs ensambladas

Las partículas ensambladas fueron analizadas y caracterizadas por cuatro técnicas que permitieron identificar su tamaño, densidad y morfología: Dispersión dinámica de luz (DLS), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), Microscopía electrónica de transmisión (TEM), y por centrifugación isopícnica en gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl).

### 5.5.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Para determinar el tamaño de partícula se hizo un análisis de DLS. Para ello se utilizó el equipo Zetasizer  $\mu$ V estableciendo el índice de refracción y la viscosidad a 1.33 y 1.003 cP, respectivamente (Harvey et al., 1998). La temperatura de análisis se fijó a 20 °C y se empleó una celda de 500  $\mu$ L. Para realizar el análisis, se ultrafiltraron las muestras de la diálisis con membranas de 2.0 y 0.22  $\mu$ M. A cada muestra analizada se le realizaron 10 determinaciones con 5 mediciones de 5 segundos cada una. Para definir el tamaño de las partículas se realizó un promedio de las determinaciones obtenidas en las distintas mediciones.

### 5.5.2 Microscopia de fuerza atómica (AFM)

Para el análisis de las partículas por AFM, se utilizaron 10  $\mu$ L de muestra dializada y filtrada (filtro de 45  $\mu$ m) esparcida sobre una mica Highest Grade V1 Mica 12 mm



(Ted Pella Inc.). Previamente, la muestra se secó al vacío por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados: primero con 20  $\mu\text{L}$  de PBS (filtrado 0.22  $\mu\text{m}$ ) y el segundo con 20  $\mu\text{L}$  de agua desionizada filtrada (0.22  $\mu\text{m}$ ). 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 air” y se utilizaron sondas HiResC19/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 realizaron con una calidad de imagen de 512 pixeles a una velocidad de 0.3 Hz.

### **5.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para el análisis por TEM se realizó tinción negativa. Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra filtrada (0.22  $\mu\text{m}$ ) sobre una rejilla de cobre cubierta con formvar durante 5 min. Posteriormente el exceso de muestra fue retirado con ayuda de papel filtro por la orilla de la rejilla. La rejilla se dejó secar por 1 min. Posteriormente se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de ácido fosfotúngstico al 3% (pH 7) durante 3 min. Enseguida se eliminó el exceso de colorante pasando papel filtro por la orilla de la rejilla. Después de la tinción se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de agua filtrada (0.45  $\mu\text{m}$ ), se dejó reposar durante 1 min y se retiró el exceso de la misma. Finalmente, las rejillas se dejaron secar a temperatura ambiente y las muestras fueron examinadas en un microscopio de transmisión electrónica (JEOL JEM 12000 EII). Las micrografías fueron tomadas a magnificaciones entre 40,000 y 50,000 X.

### **5.5.4 Centrifugación isopícnica en gradientes continuos de CsCl**

Seguido del ensamble, las VLPs se separaron por centrifugación isopícnica en gradiente continuo de CsCl, ya que después de la diálisis la muestra contiene distintos componentes, como las VLPs, agregados, e intermediarios de ensamble. Para ello se preparó una solución de CsCl de 1.33 g/mL de densidad, mezclando 40.8 g de CsCl más 79.2 mL de amortiguador de gradiente (50 mM de fosfatos con



10 mM de EDTA y 0.5% de Tritón X-100, pH 7.4). Enseguida 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 posteriormente 500  $\mu$ L de la muestra procurando no mezclar. Como control se utilizó un tubo que contiene la solución de CsCl y 500  $\mu$ L de PBS. A continuación, la ultracentrifugación se realizó a 55,000 rpm (243500 x g) con un rotor 60Ti (Beckman) durante 10 h y 43 min a 20 °C. Se determinó la densidad de las bandas más intensas midiendo la distancia a la que se desplazaron y empleando el tubo control. Las bandas obtenidas en el gradiente se recuperaron y se dializaron (100  $\mu$ L contra 50 mL de amortiguador PBS-Arg pH 7.4) durante 48 h a 4 °C para eliminar el CsCl, realizando 3 cambios de amortiguador. Finalmente, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

### **5.6 Determinación de actividad enzimática de la proteína Q<sub>L</sub>**

Con el objetivo de evaluar la actividad esterasa de la proteína Q<sub>L</sub> se preparó una celda de 1 mL de capacidad con 100  $\mu$ L de las proteínas recuperadas de la diálisis de ensamble y analizadas por DLS de Q<sub>L</sub> y las proporciones 4:1 y 9:1 y 890  $\mu$ L de PBS (pH 7.4). La reacción se disparó con la adición de 10  $\mu$ L de una solución de 4 nitrofenilacetato (4-NFA) 10 mM disuelto en acetonitrilo (ACN). Enseguida se midió el cambio de absorbancia a 410 nm ( $Abs_{410}$ ) durante 10 minutos en un espectrofotómetro (CARY 400, Varian) a 25 °C. El blanco fue PBS/ACN 5% con PBS-Arg 0.2 M y como control se midió la hidrólisis espontánea del 4-NFA. Este mismo procedimiento se repitió para medir la actividad a las bandas con Q<sub>L</sub> recuperadas de los gradientes de CsCl.

### **5.7 Medición de fluorescencia en VLPs de la proteína Q<sub>SF</sub>**

Después de la diálisis con PBS-Arg, las muestras que contienen a la proteína Q<sub>SF</sub> se visualizaron con luz UV y se comprobó que eran fluorescentes. Luego de la ultracentrifugación se recuperaron las bandas, el CsCl se eliminó por diálisis al equilibrio contra amortiguador PBS-Arg, y se analizó su fluorescencia. Para ello, se colocaron 500  $\mu$ L de proteína microfiltrada en una celda para fluorómetro (ISS PC1)



y se midió su espectro de emisión de 490 a 600 nm, excitando la muestra a una longitud de onda de 485 nm.

## 6. RESULTADOS

En este proyecto se propuso utilizar a la proteína verde fluorescente y a la lipasa de *B. pumilus* como modelos para demostrar que el asa 300-314 de la proteína VP2 de B19V puede acomodar proteínas plegadas y funcionales, y a la vez mantiene su capacidad de autoensamble en VLPs para producir nanoacarreadores. La literatura científica indicaba que la inserción de eGFP en el extremo N-terminal de VP2 del B19V no afecta el ensamble de VP2 en VLPs *in vivo* (Gilbert, 2005). Igualmente, el trabajo de nuestro grupo mostraba que la proteína de fusión VP2-BpIA307 (BpIA insertada en el asa 300-314 de VP2) mantiene su actividad catalítica (Gutiérrez-Landa, 2014).

### 6.1 Diseño de la proteína Q<sub>SF</sub>

Luego de corroborar que la proteína Q<sub>F</sub> no presentaba fluorescencia después de la expresión en *E. coli*, se diseñó una nueva construcción utilizando la secuencia de la GFP “superfolder” (sfGFP; PDB ID: 3B2P). En comparación con la variante utilizada hasta el momento, la sfGFP posee las mutaciones de la proteína verde fluorescente mejorada “eGFP” (F64L, S65T), además tiene las llamadas mutaciones “cycle 3” (F99S, M153T y V163A), y seis nuevas mutaciones (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V y A206V) (Figura 16).

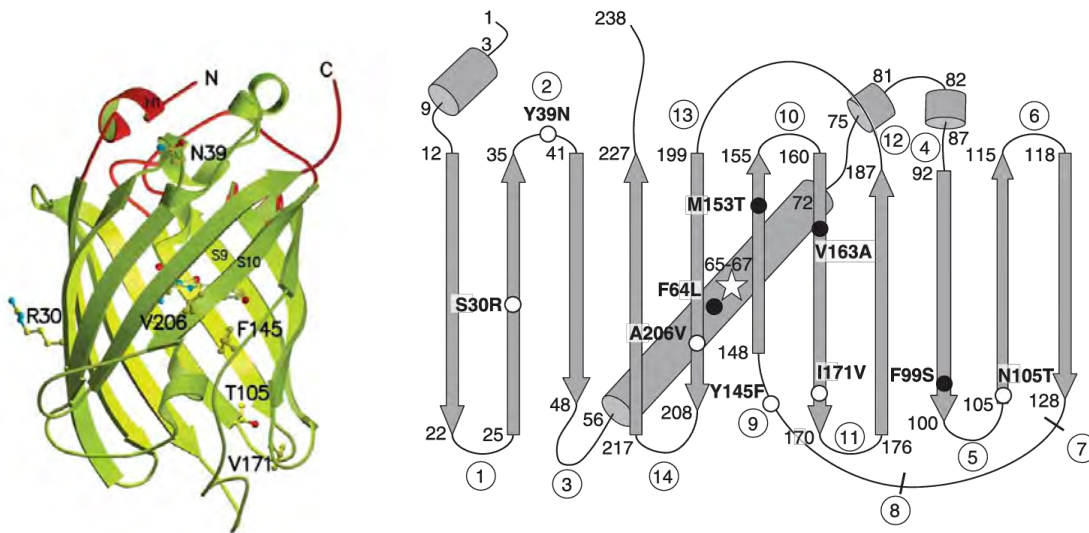
Se ha reportado que las mutaciones que probablemente estén involucradas en el plegamiento mejorado de sfGFP son S30R y Y39N (Figura 17). Se propone que S30R es responsable de la formación de una red electrostática extendida que involucra a los residuos E115, R122, E17, R30 y E32, lo cual favorece el rápido plegamiento de las hebras beta a las que pertenecen. Por otra parte, la mutación Y39N permite la formación de un puente de hidrógeno entre el oxígeno de la cadena lateral de D36 y el grupo NH de la cadena lateral de N39, lo cual refuerza el asa,



mejorando posiblemente la formación de la estructura de la hélice alfa y el giro entre la segunda y tercera hebras beta.

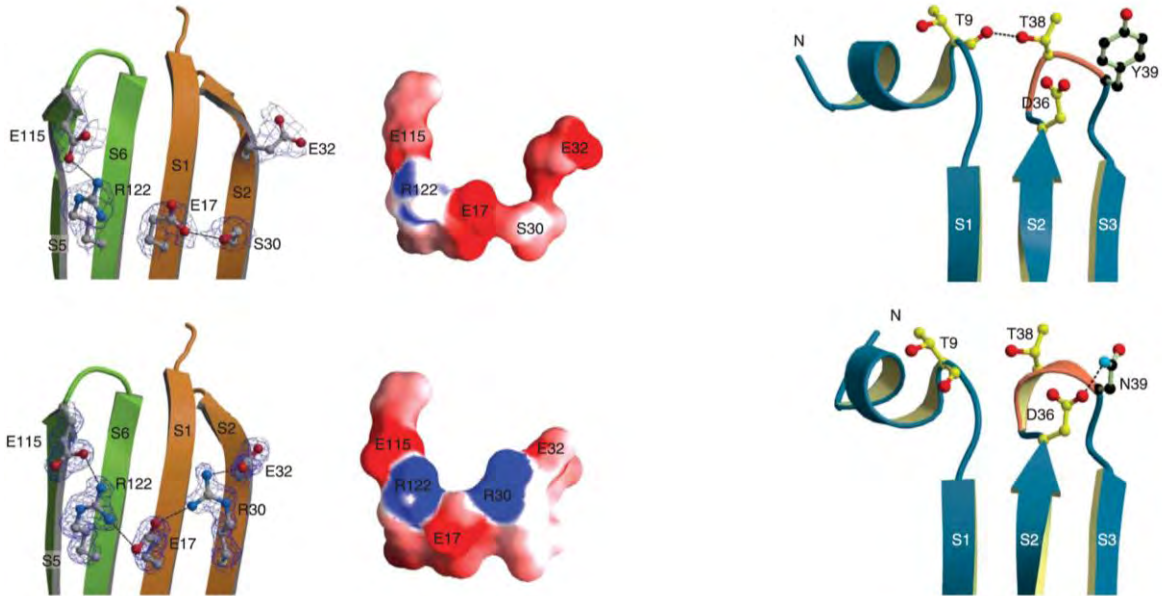
### SuperfolderGFP PDB: 2B3P

```
MRKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVR GELEGDATNG KLTLKFICTT  
GKLPVPWPTL VTTLIYGVQC FARYPDHMKQ HDFFKSAMPE GYVQERTISF  
KDDGTTYKTRA EVKFEGDTLV NRIELKGIDF KEDGNILGHK LEYNFNSHNV  
YITADKQKNG IKANFKIRHN VEDGSVQLAD HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY  
LSTQSVLSKD PNEKRDHMLV LEFVTAAGIT HGMDELYK
```

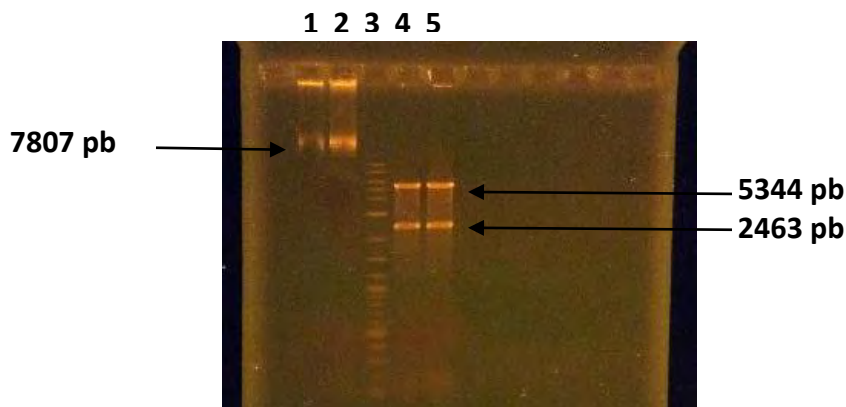


**Figura 16.** Secuencia y estructura de la proteína sfGFP. Al igual que la wild-type GFP (wtGFP), la secuencia consiste de 238 aminoácidos y forma un barril beta con cromóforo TYG. En la secuencia se indican las mutaciones de mejoramiento (amarillo), las “cycle 3” (azul) y las mutaciones adicionales por evolución dirigida (rojo). Además, estas mutaciones se muestran en la topología de la sfGFP, en la que también se señala el cromóforo al centro (estrella). (Modificado de Pédelacq *et al.*, 2006).

A partir de esta información se diseñó la proteína quimérica de Q<sub>SF</sub> insertando la secuencia de sfGFP en el asa 300-314 de VP2. La construcción se insertó en un vector pET22b(+) y se realizó la transformación del mismo en células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Para verificar la integridad de la secuencia VP2sfGFP307, se realizó una digestión del plásmido obtenido (Figura 18).



**Figura 17.** Estructura de las mutaciones S30R y Y39N en el plegamiento de wtGFP (arriba) y sfGFP (abajo). (Modificado de Pédelacq *et al.*, 2006).



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido no digerido (carriles 1 y 2) y el plásmido digerido con las enzimas *EcoRI* y *NdeI* (carriles 4 y 5). Marcador de peso molecular (carril 3).

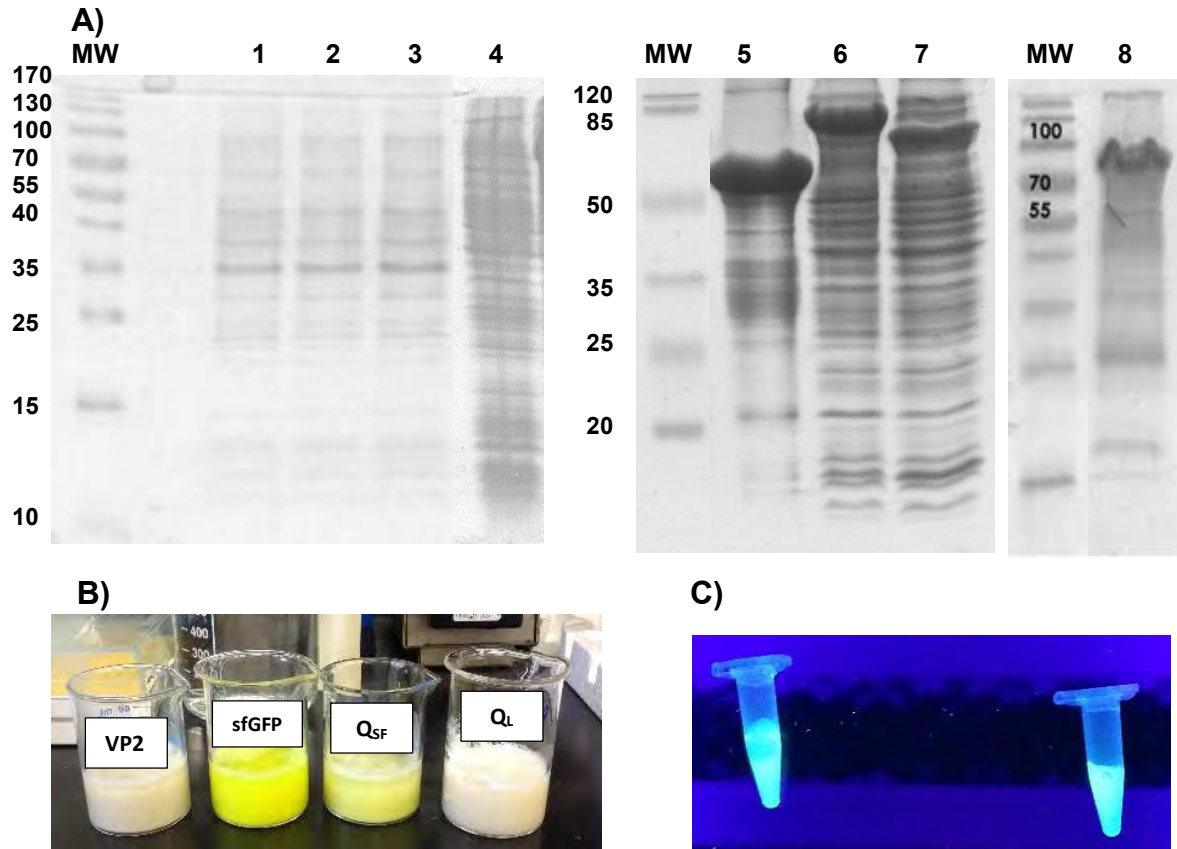
## 6.2 Expresión y purificación de las proteínas VP2, Q<sub>F</sub>, Q<sub>SF</sub> y Q<sub>L</sub>

Los plásmidos con las distintas construcciones se usaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Luego de la inducción con IPTG, se realizó un





análisis por SDS-PAGE para comprobar la expresión de las proteínas VP2, Q<sub>F</sub>, Q<sub>SF</sub> y Q<sub>L</sub> a las condiciones de temperatura y agitación orbital establecidas (Figura 19A). La proteína VP2 tiene una masa molecular aproximada de 63 KDa, Q<sub>L</sub> de 81.2 KDa, mientras que Q<sub>F</sub> y Q<sub>SF</sub> pesan 90 KDa. A diferencia de la proteína Q<sub>F</sub>, Q<sub>SF</sub> presenta fluorescencia desde la expresión en *E. coli*, lo cual sugiere que el plegamiento de sfGFP es superior al de la variante de GFP en Q<sub>F</sub> (Figura 19B).



**Figura 19. A)** Perfil electroforético (SDS-PAGE) de las proteínas de fusión expresadas en células de *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos que contienen los genes correspondientes. **Células sin inducir:** VP2 (carril 1), VP2-GFP307 (Q<sub>F</sub>) (carril 2), VP2-BlpA307 (Q<sub>L</sub>) (carril 3) y VP2-sfGFP307 (Q<sub>SF</sub>) (carril 4). **Células después de la inducción con IPTG:** VP2 (carril 5), VP2-sfGFP307 (Q<sub>SF</sub>) (carril 6), VP2-BlpA307 (Q<sub>L</sub>) (carril 7) y VP2-GFP307 (Q<sub>F</sub>) (carril 8). **B)** Expresión de las proteínas VP2, Q<sub>SF</sub> y Q<sub>L</sub> (se muestra la proteína sfGFP como control de fluorescencia). **C)** Cuerpos de inclusión dializados de la proteína Q<sub>SF</sub> vistos en transiluminador de UV. Q<sub>SF</sub> recupera la fluorescencia completamente después de eliminar el agente desnaturizante (derecha: contenía GndCl 3M, izquierda: contenía urea 8 M).



Todas las proteínas se expresaron mayoritariamente en cuerpos de inclusión, por lo que su purificación se tuvo que realizar en condiciones desnaturalizantes. Como agente desnaturalizante se utilizó GndHCl 5 M para solubilizar los cuerpos de VP2, Q<sub>L</sub> y Q<sub>F</sub>, aunque también se demostró que una concentración de 3 M es suficiente para desnaturalizar y purificar estas proteínas.

Los cuerpos de inclusión de Q<sub>SF</sub> se purificaron de acuerdo al protocolo descrito para VP2, Q<sub>L</sub> y Q<sub>F</sub> y se solubilizaron en amortiguador de GndHCl 5 M. Sin embargo, al realizar una diálisis de los cuerpos de inclusión de Q<sub>SF</sub> solubilizados se observó que la fluorescencia no se recuperaba a esta concentración de GndHCl. Al igual que las otras tres proteínas, se optó por emplear GndHCl 3M para solubilizar los cuerpos de inclusión de Q<sub>SF</sub> a pesar de que la proteína sfGFP no se desnaturaliza por completo en esta condición. Estudios cinéticos de la proteína GFP mostraron la presencia de una barrera energética muy alta en la desnaturalización con GndHCl, sugiriendo la formación de un intermediario estable, parcialmente desnaturalizado, cuya fluorescencia es menor a la del estado nativo (Huang *et al.*, 2007).

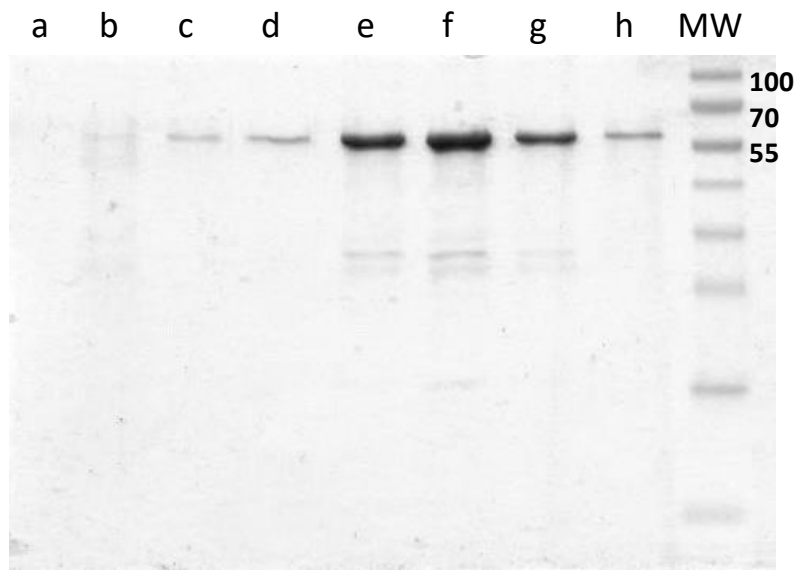
Al mismo tiempo se eligió probar con urea 8 M y en ambos casos se mantuvo la fluorescencia de la proteína quimérica Q<sub>SF</sub> antes y después de las diálisis de los cuerpos de inclusión (Figura 19C). Se ha sugerido que las mutaciones realizadas a la sfGFP (principalmente S30R y Y39N) son las responsables de su alta resistencia a la desnaturalización por urea (Pedelacq *et al.*, 2006). A comparación de las otras tres proteínas, Q<sub>SF</sub> tiende a presentarse en la fracción soluble, lo cual se pudo comprobar durante los lavados de los cuerpos de inclusión.

La purificación de las cuatro proteínas se llevó a cabo en tres pasos consecutivos: lavado de los cuerpos de inclusión, solubilización de los mismos y purificación por medio de cromatografía de afinidad. En este último paso se obtuvieron las fracciones donde estaban las proteínas de interés y se analizaron por SDS-PAGE (Figuras 20-22). Las cuatro proteínas presentaron bandas inespecíficas en la purificación, sobre todo para las quiméricas Q<sub>L</sub>, Q<sub>F</sub> y Q<sub>SF</sub>. Esto sugiere que estas proteínas tienen interacciones con otros polipéptidos de menor tamaño. Por otra parte, VP2 también presentó un patrón de bandas inferiores el cual se repitió en todas las pruebas de purificación realizadas. En trabajos anteriores (Sánchez-

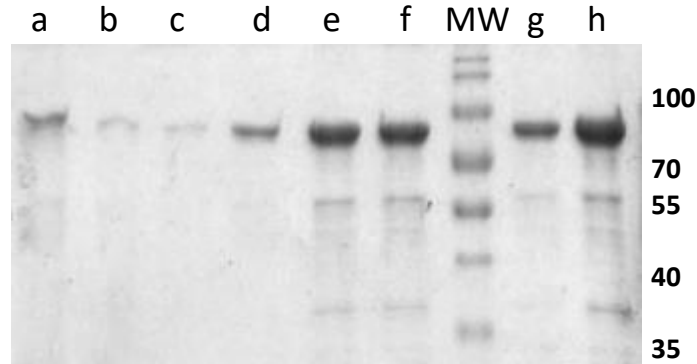


Rodríguez, 2012) se discute que estas bandas indican la degradación natural de la proteína VP2. Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado más sobre ello ya que esto no afecta el desarrollo de experimentos posteriores.

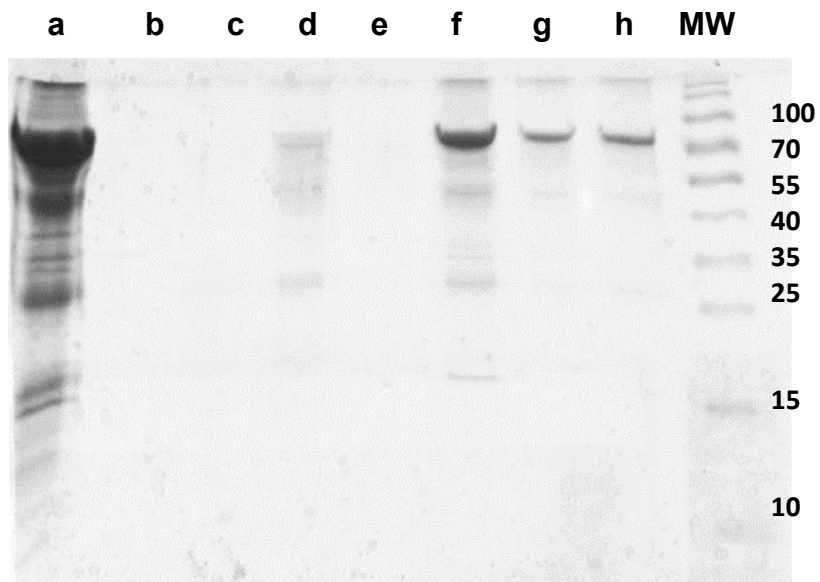
A continuación, las fracciones con la proteína pura se recolectaron y concentraron eliminando el imidazol y cambiando a amortiguador de replegamiento (Figura 23). En el caso de la proteína Q<sub>SF</sub>, no fue posible purificarla por medio de cromatografía de afinidad debido a que en las condiciones ensayadas la proteína presentó poca o nula afinidad a la columna con resina protino Ni-TED y eluyó inmediatamente en los primeros frentes de la cromatografía. Por esta razón, los siguientes experimentos se realizaron a partir de cuerpos de inclusión fluorescentes, lavados pero sin posteriores pasos de purificación.



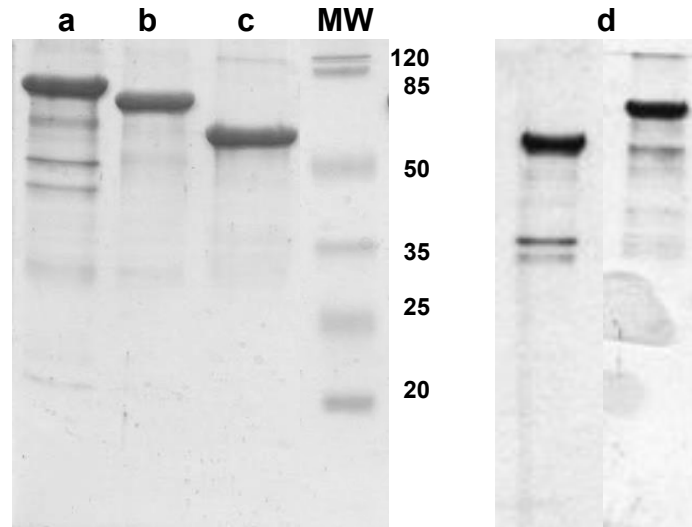
**Figura 20.** SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad de la proteína VP2. **a)** Frente; **b)** Lavado con amortiguador de solubilización pH 6.3; **c)** Elución con amortiguador de solubilización con imidazol 20 mM; **d-h)** Fracciones de la elución con amortiguador de solubilización con imidazol 300 mM.



**Figura 21.** SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad de la proteína Q<sub>F</sub>. **a)** Frente; **b)** Elución con amortiguador de solubilización sin DTT; **c)** Elución con amortiguador de solubilización con imidazol 20 mM; **d-h)** Fracciones de la elución con amortiguador de solubilización con imidazol 500 mM.



**Figura 22.** SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad de la proteína Q<sub>L</sub>. **a)** Cuerpos de inclusión; **b-d)** Lavados con amortiguador de solubilización; **e-h)** Fracciones de la elución con amortiguador de solubilización con imidazol 300 mM.



**Figura 23.** Proteínas concentradas y purificadas. **a)**  $Q_{SF}$  (cuerpos de inclusión lavados); **b)**  $Q_L$  (en amortiguador de replegamiento); **c)** VP2 en amortiguador de replegamiento; **d)**  $Q_F$  en amortiguador de replegamiento (derecha) comparada con VP2 (izquierda).

Una vez purificadas  $Q_F$ ,  $Q_L$  y VP2 en condiciones desnaturalizantes y cambiadas al amortiguador de replegamiento, se determinó su concentración midiendo absorbancia a 280 nm y empleando una curva patrón de BSA.

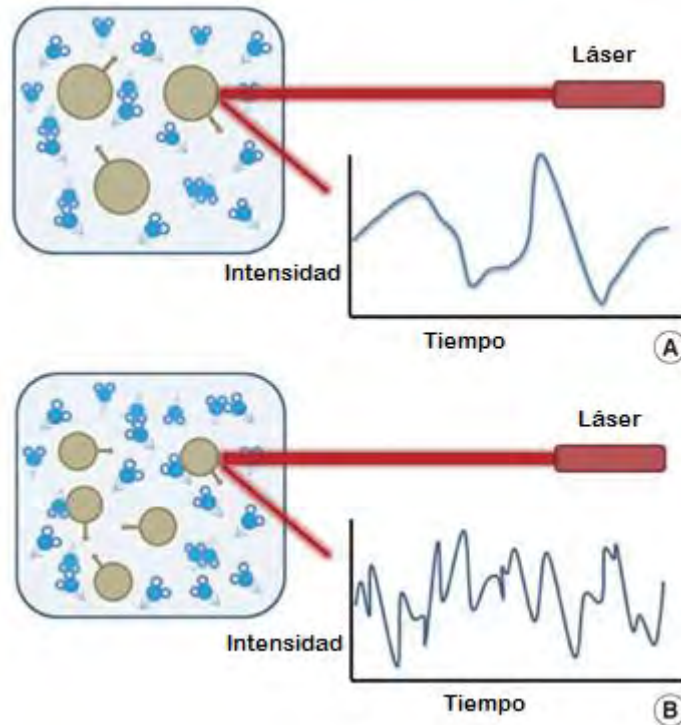
### 6.3 Ensamble de VLPs y análisis por dispersión dinámica de luz (DLS)

Al eliminar el agente desnaturalizante (GndHCl) por diálisis, la proteína VP2 tiene la capacidad de ensamblarse por sí sola *in vitro* para formar partículas tipo virus con diámetro entre los 18 y 26 nm. Se evaluó la capacidad de auto ensamble de las proteínas quiméricas  $Q_F$ ,  $Q_{SF}$  y  $Q_L$  y de las mezclas con VP2 mediante la diálisis con amortiguador PBS-Arginina. Se ha comprobado que la arginina a concentraciones entre 0.1 y 1.0 M puede ayudar al replegamiento de diversas proteínas recombinantes que se obtienen a partir de cuerpos de inclusión. Se ha sugerido que la L-Arg actúa como un supresor de la agregación y precipitación de proteínas a través de la interacción entre el grupo guanidinio de la L-Arg y los triptófanos de las proteínas (Tsumoto *et al.*, 2004).

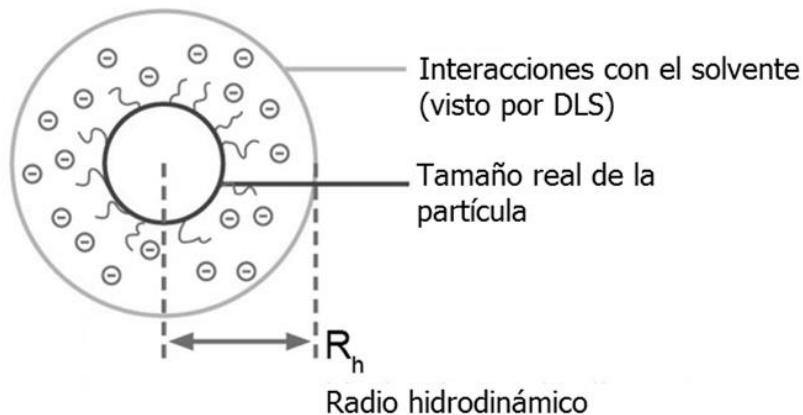


Después de determinar la concentración de proteína por el método de BSA, se hicieron pruebas de ensamble con proteína VP2 (como control positivo), Q<sub>L</sub> y Q<sub>F</sub> exclusivamente (100%) así como pruebas con proporciones VP2:Q<sub>L</sub> 4:1 y 9:1. Se utilizó una concentración de proteína total de 0.7 mg/mL y volumen final de 1.5 mL. Para los ensambles con la proteína Q<sub>SF</sub> se emplearon directamente los cuerpos de inclusión solubilizados en amortiguador de GndHCl 3M (o en urea 8 M) diluyendo 1 mL de los mismos con 0.5 mL de amortiguador de solubilización. De igual manera se realizó un ensamble de 12 h con proteína Q<sub>SF</sub> presente en la fracción soluble de la lisis celular.

A continuación, las muestras se dializaron en 50 mL de amortiguador de fosfatos a pH 7.4 con L-Arg 0.2 M y realizando tres cambios de amortiguador cada 12 h. Para determinar el tamaño de partícula se hizo un análisis por dispersión dinámica de luz (DLS). También conocida como dispersión de luz cuasi elástica (QELS), la DLS es una técnica no invasiva para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región submicrométrica. Su fundamento es el movimiento browniano de las partículas o moléculas en suspensión, el cual causa que la luz se disperse en diferentes intensidades (Malvern Instruments, 2017) (Figura 24). Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento Browniano, y por lo tanto el tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein, la cual relaciona la difusividad con el número de Avogadro ( $6.02 \times 10^{23}$  partículas), la viscosidad de la solución, la temperatura y el radio de la partícula (Sharma & Yashonath, 2007). Entre mayor sea el tamaño de la partícula, menor es la velocidad de difusión. El tamaño de partícula está dado en términos del radio hidrodinámico, el cual se define como el radio de una esfera hipotética que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula examinada. El radio hidrodinámico se presenta debido a la interacción de las partículas con el solvente, por lo que el tamaño de las mismas aparente y corresponde al de una partícula solvatada o hidratada (Figura 25).



**Figura 24.** Fluctuación hipotética de la luz dispersada en DLS de **A)** partículas pequeñas y **B)** partículas grandes. A mayor tamaño de partícula se genera una mayor dispersión de la intensidad de la luz en términos de tiempo (Modificado de Kim *et al*, 2014).



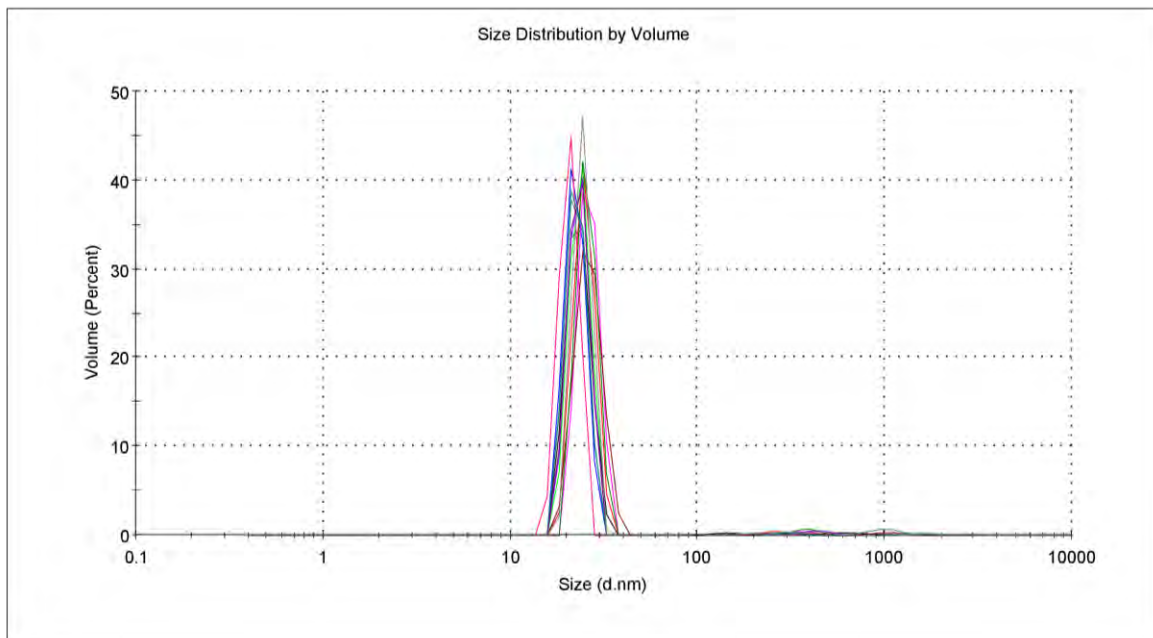
**Figura 25.** Comparación del tamaño real y el aparente de una partícula debido al radio hidrodinámico (Modificado de Fritsch GmbH, 2017).

Los resultados de DLS se reportan en distribución por volumen, la cual muestra el volumen total de partículas por tamaño. Se reporta además el índice de polidispersidad (PDI), el cual muestra el grado de variación en el tamaño de partícula



indicando si hay pocas o múltiples especies en una muestra. Valores de Pdl cercanos a 0 indican una distribución monodispersa, así como valores cercanos a la unidad indican que en la muestra hay una gran variedad de tamaños (Lancheros *et al.*, 2014). También se incluye el valor Z, el cual corresponde a la media ponderada (por intensidad) del tamaño hidrodinámico en un conjunto de partículas medido por DLS.

De acuerdo a los resultados se obtuvieron posibles ensambles en el rango de 18-26 nm para la proteína VP2 100% (Figura 26) y las proporciones 4:1 y 9:1 de Q<sub>L</sub> (Figura 27). En el caso de VP2 y la proporción 9:1 de Q<sub>L</sub>, se obtuvieron valores de polidispersidad menores a 0.5, sugiriendo que no existe una población de especies tan variada. Sin embargo, el valor Z es alto para VP2 y la proporción 4:1 de Q<sub>L</sub> lo cual sugiere que las proteínas tienden a agregarse.

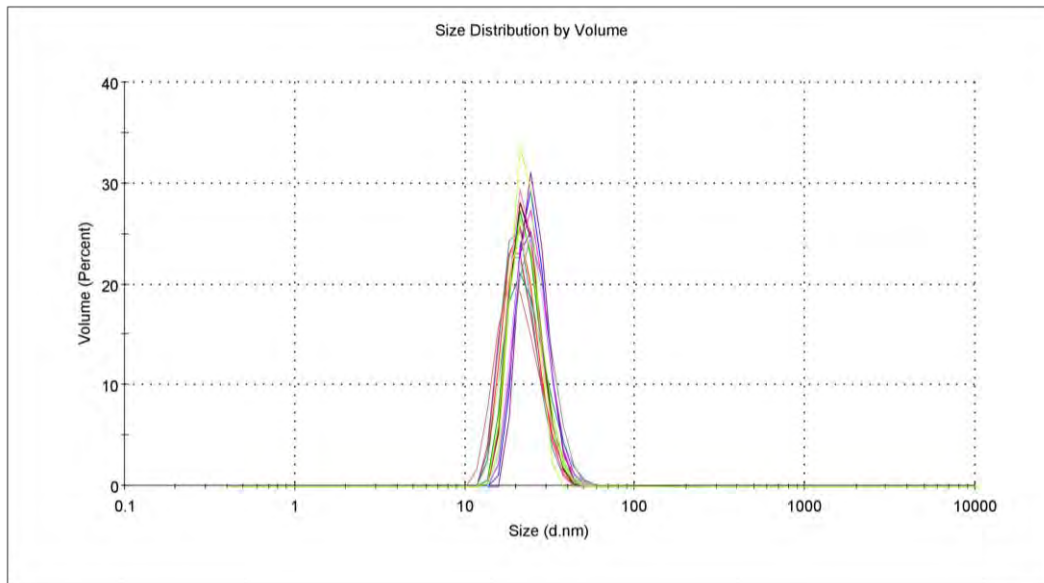


**Figura 26.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína VP2 silvestre por diálisis. Distribución por volumen. Tamaño promedio de picos correspondientes a VLPs: 24.36 nm. Z = 185 nm. Índice de polidispersidad: 0.413.

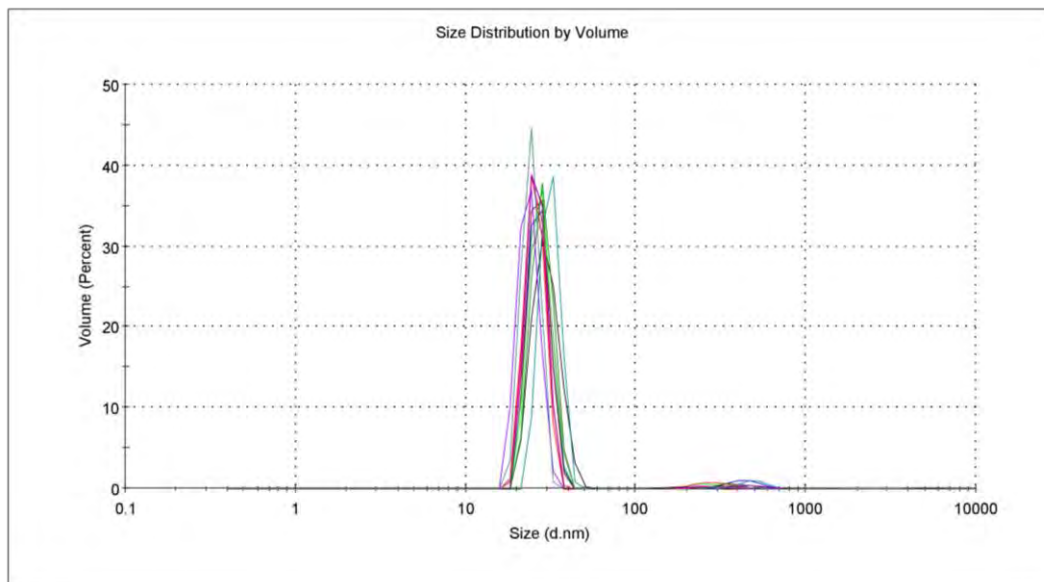




A)



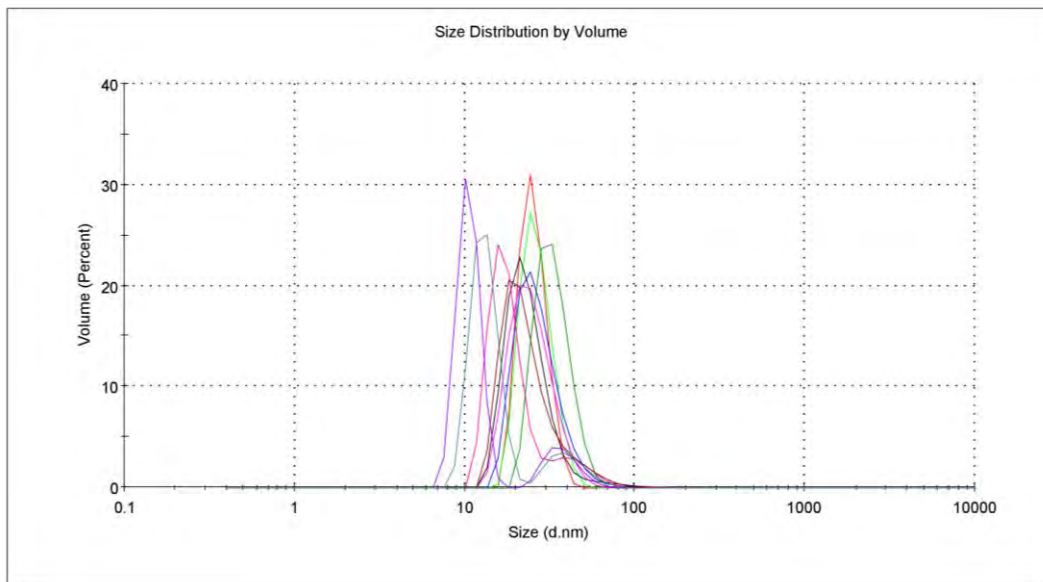
B)



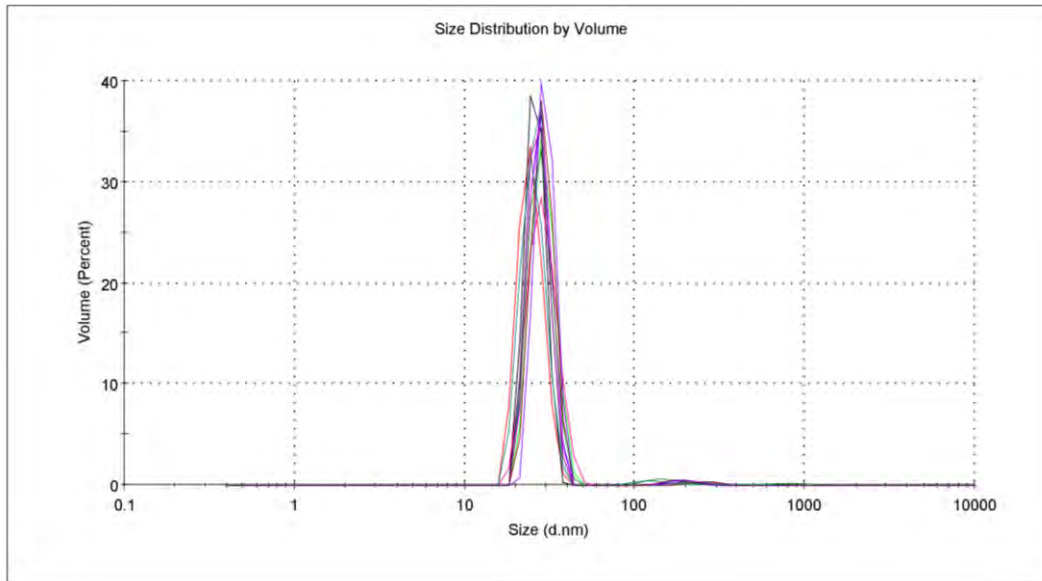
**Figura 27.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína  $Q_L$  en proporción con VP2 por diálisis. Distribución por volumen. **A)** VP2: $Q_L$ , 9:1. Tamaño promedio de picos correspondientes a VLPs: 24.36 nm.  $Z=25.45$  nm. Índice de polidispersidad: 0.275; **B)** VP2: $Q_L$ , 4:1. Tamaño promedio de picos correspondientes a VLPs: 28.21 nm.  $Z = 295.4$  nm. Índice de polidispersidad: 0.756.



Para los ensambles con QL exclusivamente, a las 48 h se obtuvo una gran variedad de especies como se había reportado anteriormente (Gutiérrez-Landa, 2014) (Figura 28). Por este motivo se realizó un cambio extra de amortiguador (de 12 h) y al volver a analizarse se observaron partículas con tamaños de 26 a 30 nm (Figura 29). Esto sugiere que se necesita más tiempo o al menos un cambio de amortiguador más para que la proteína QL se repliegue correctamente y se estructure en VLPs, en comparación con la proteína VP2, que en las mismas condiciones se repliega más rápidamente e incluso después de las 48 h comienza a agregarse aún en presencia de L-Arg. A pesar de que este cambio de amortiguador es esencial para observar partículas en el intervalo del tamaño de las VLPs de B19V, el dejar la diálisis más de 60 h propicia la agregación y la formación de especies de mayor tamaño, así como el crecimiento bacteriano en las muestras.



**Figura 28.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína QL a las 48 h (especies de 10.96 – 51.73 nm y agregados). Distribución por volumen.  $Z = 36.43$  nm. Índice de polidispersidad: 0.32.

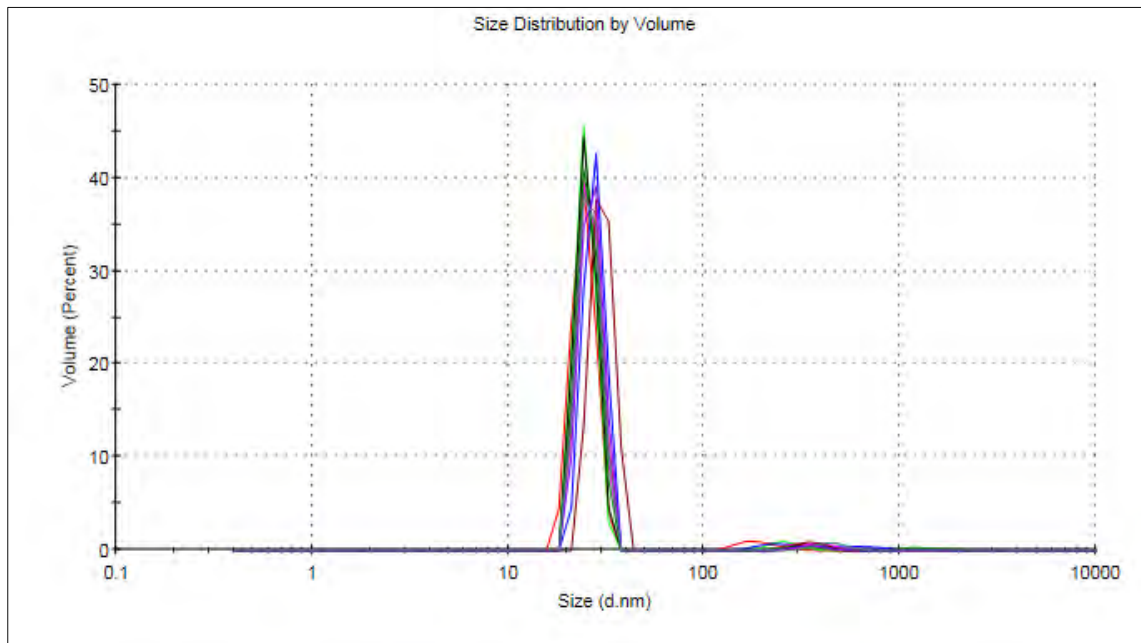


**Figura 29.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína  $Q_L$  a las 60 h (especies de 25.85 – 30.40 nm en picos correspondientes a VLPs). Distribución por volumen.  $Z = 123.1$  nm. Índice de polidispersidad: 0.464.

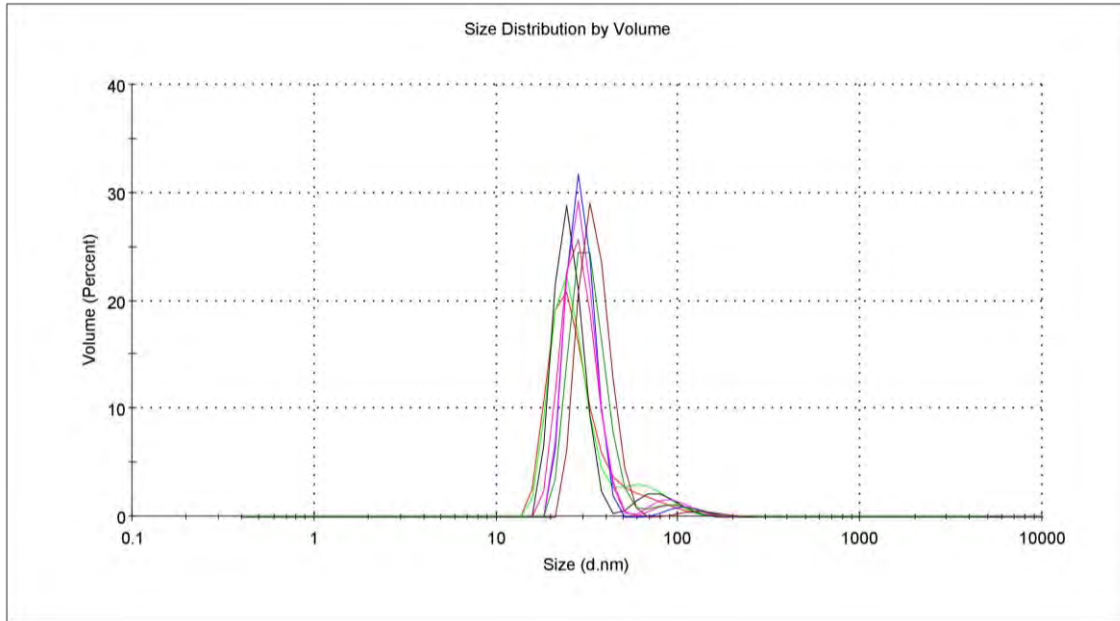
En el caso de ensambles exclusivos con  $Q_F$  el DLS mostró partículas desde 22 a 31 nm para especies correspondientes a VLPs, así como agregados (Figura 30). Esto sugiere que  $Q_F$  por sí sola se estructura en VLPs de tamaño superior a las formadas exclusivamente de VP2, pero que también hay un porcentaje de moléculas de  $Q_F$  libres o que se constituyen como oligocapsómeros. Para el ensamble de  $Q_{SF}$  a partir de agente desnaturizante (urea o guanidinio) se obtuvieron partículas con tamaños superiores de los 28 nm, así como una gran variedad de especies (Figuras 31 y 32). Esto implica que  $Q_{SF}$  por sí sola es capaz de formar partículas con tamaños superiores a las de VP2 y a las de  $Q_F$ . A pesar de que ambas proteínas,  $Q_F$  y  $Q_{SF}$ , contienen a la GFP, la diferencia en los tamaños detectados por DLS pueden deberse a dos motivos. En primer lugar,  $Q_{SF}$  posee conectores (“linkers”) más largos que los de  $Q_F$  por lo que la GFP podría estar más expuesta en la superficie que la variante GFP de  $Q_F$ . En segundo lugar, como se explicará más adelante, al ser fluorescentes las partículas de  $Q_{SF}$  se detectan por DLS con un tamaño ligeramente mayor que las de VP2 y  $Q_F$ . En el caso de la proteína  $Q_{SF}$  de la fracción soluble, es decir, la obtenida después de la lisis celular y presente en el sobrenadante de los



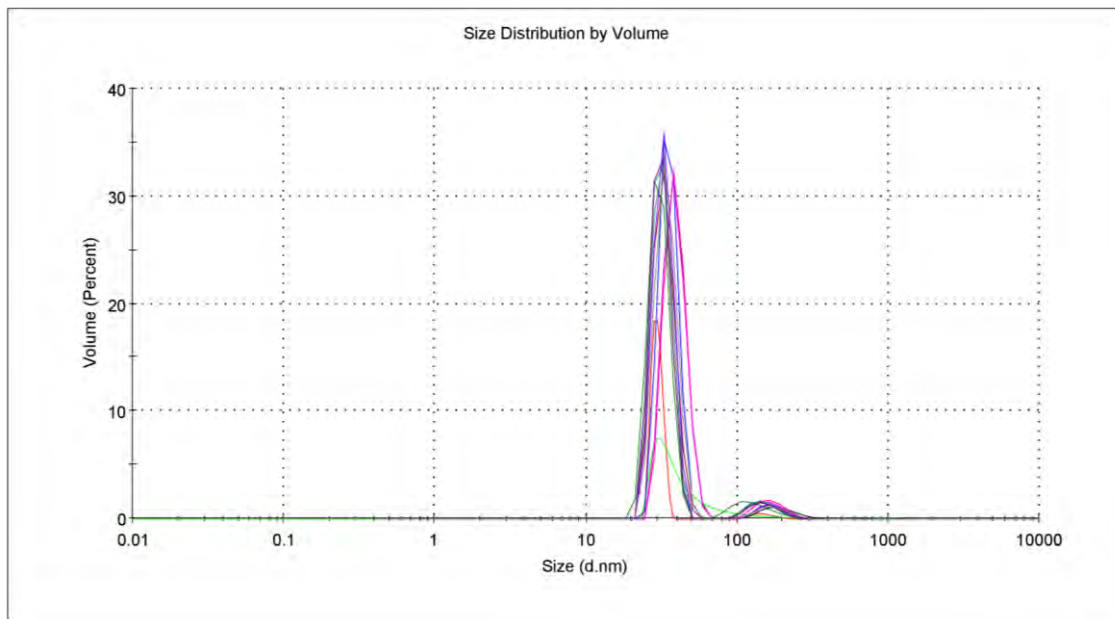
lavados de los cuerpos de inclusión, no se observaron partículas con el tamaño esperado, sino una variedad de posibles intermediarios y agregados (Figura 33). A diferencia de las muestras anteriores, la de  $Q_{SF}$  se encuentra parcialmente desnaturalizada con urea 3 M y tritón al 3%, e incluso prácticamente en estado nativo ya que es fluorescente. La diálisis se realizó únicamente con un cambio de amortiguador PBS-Arg de 12 h debido a la agregación persistente. Por este motivo es necesario estudiar más a fondo el ensamble a partir de esta proteína y evaluar qué condiciones se requieren para que las VLPs sean las especies predominantes y no los intermediarios (capsómeros y oligocapsómeros) y agregados.



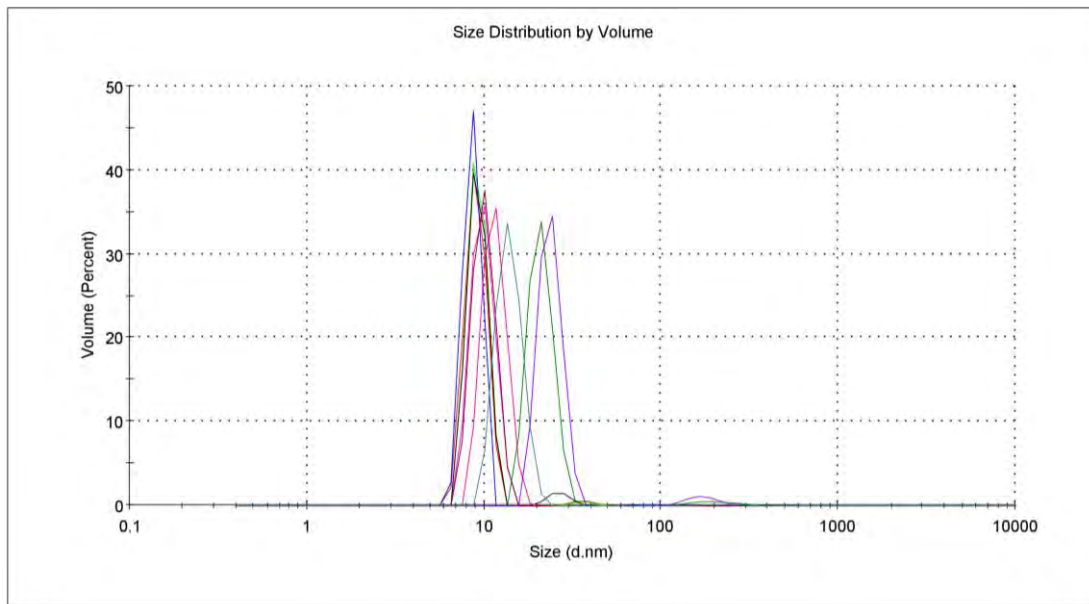
**Figura 30.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína  $Q_F$  por diálisis. Distribución por volumen. Tamaño promedio: 27.7 nm.  $Z = 102.4$  nm. Índice de polidispersidad: 0.346.



**Figura 31.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína  $Q_{SF}$  por diálisis. Distribución por volumen.  $Q_{SF}$  (a partir de cuerpos de inclusión en GndCl 3M). Tamaño promedio de los picos correspondientes a VLPs: 34.04 nm.  $Z = 65.66$  nm. Índice de polidispersidad: 0.30.

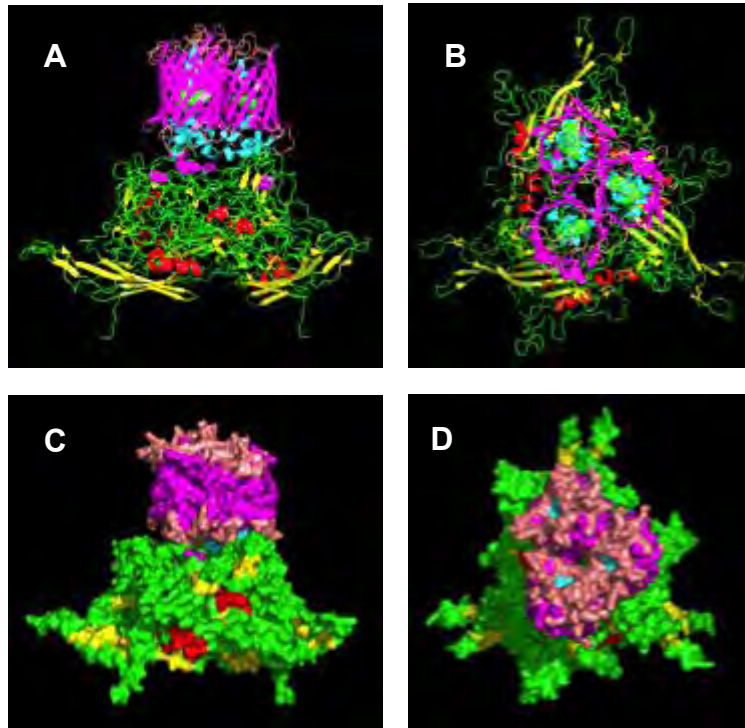


**Figura 32.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína  $Q_{SF}$  por diálisis. Distribución por volumen.  $Q_{SF}$  a partir cuerpos de inclusión en urea 6 M. Tamaño promedio de los picos correspondientes a VLPs: 38.02 nm.  $Z = 116.6$  nm. Índice de polidispersidad: 0.327.



**Figura 33.** Dispersión dinámica de luz de las especies obtenidas durante el ensamble de las VLPs de la proteína  $Q_{SF}$  de la fracción soluble por diálisis. Distribución por volumen. Tamaño de especies predominantes: 9.2–24.5 nm.  $Z = 131.4$  nm. Índice de polidispersidad: 0.612.

Las diferencias en tamaño entre las partículas de  $Q_F$ ,  $Q_{SF}$  y  $Q_L$  con el de la VLP formada exclusivamente de VP2 se deben al acomodo de las moléculas de GFP (o sfGFP) y BpIA sobre la superficie de la partícula viral (Figuras 12 y 34). En teoría, se espera que las VLPs formadas exclusivamente con proteína quimérica sean más grandes que las formadas sólo por VP2. Considerando los tamaños de la estructura terciaria de GFP y BpIA, las VLPs quiméricas podrían llegar a medir entre 8 y 10 nm de diámetro, respectivamente, más que las VLPs formadas exclusivamente de VP2.



**Figura 34.** Modelo teórico del ensamble de un capsómero de  $Q_{SF}$ . **A)** Vista de perfil, en la parte superior tres proteínas GFP donde se indica con esferas verdes los cromóforos al interior del barril  $\beta$ . En la parte inferior del mismo panel se encuentra un capsómero formado por tres cadenas de VP2, las esferas moradas corresponden a los extremos de las asas 300-314 de VP2. **B)** Rotación de  $90^\circ$  del panel A donde se aprecian los cromóforos de GFP y el eje de simetría del capsómero viral al centro. **C y D.** Paneles A y B en representación de superficie.

Si bien las partículas virales formadas exclusivamente de  $Q_F$  mostraron cierta organización estructural, no se observó fluorescencia en ellas de forma directa ni por métodos espectroscópicos. Debido a que la fluorescencia es un indicador sensible del plegamiento correcto de la GFP, se estableció, en primer lugar, que la proteína  $Q_F$  perdió irreversiblemente su estructura terciaria debido a las condiciones desnaturizantes a las que fue sometida durante la purificación. En segundo lugar, se consideró que el impedimento estérico que causa la fusión de GFP a VP2 en el asa 300-314 utilizando separadores muy cortos (una glicina de cada extremo) fue un factor determinante para el plegamiento ineficiente de GFP durante la expresión génica o por replegamiento. Por otro lado, los ensambles de  $Q_{SF}$  continuaron

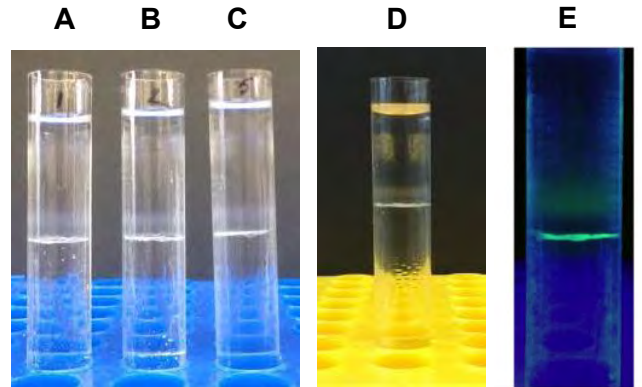


presentando fluorescencia después de la diálisis, por lo cual se decidió realizar la caracterización de estas partículas y no las de Q<sub>F</sub>.

#### 6.4 Análisis por centrifugación isopícnica

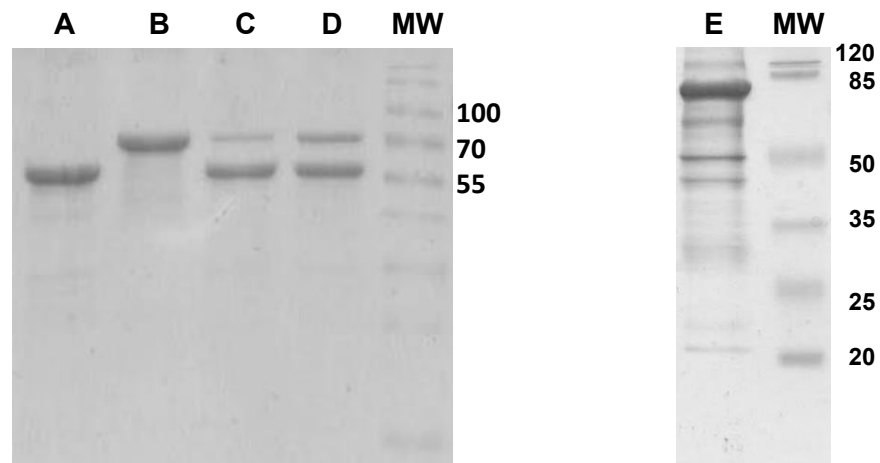
Las especies de ensamble de las proteínas VP2, Q<sub>L</sub> y Q<sub>SF</sub> se analizaron por centrifugación isopícnica en un gradiente de CsCl (Figura 35). Se observaron dos bandas principales en cada uno de los gradientes. Se ha establecido con anterioridad que la banda superior y de menor densidad corresponde a especies intermediarias (monómeros, capsómeros, oligocapsómeros) mientras que la banda inferior, de mayor densidad y más opaca se relacionan con la presencia de VLPs. La banda de VLPs de VP2 migró a una densidad de 1.28 g/mL, como ha sido descrito previamente para estas partículas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Las partículas ensambladas en las proporciones 4:1 y 9:1 de Q<sub>L</sub> tuvieron un comportamiento y densidades similares a las de VP2, mientras que para las partículas compuestas exclusivamente de Q<sub>L</sub>, la banda presentó una densidad aproximada de 1.30 g/mL. Por otro lado, la muestra de ensamble con Q<sub>SF</sub> presentó una banda inferior mayoritaria con una densidad de 1.31 g/mL. La diferencia de densidades en el gradiente, por mínima que sea, muestra que la densidad de las VLPs quiméricas es mayor a la de las VLPs formadas exclusivamente de VP2 debido a la adición de las proteínas sfGFP y BpIA en la superficie. Esta diferencia también se observa entre ambas VLPs formadas exclusivamente por proteína quimérica, en donde las de Q<sub>SF</sub> tienen una densidad mayor y es correspondiente al mayor tamaño y peso de la proteína sfGFP en comparación con BpIA.





**Figura 35.** Análisis por centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl. **A)** VP2 (control); **B)** QL; **C)** VP2: QL, 4:1; **D)** VP2: QL, 9:1; **E)** Q<sub>SF</sub>, de cuerpos de inclusión en GndHCl 3 M, vista en luz UV. Las bandas superiores y difusas corresponden a intermediarios, mientras que las bandas inferiores y más densas corresponden a VLPs.

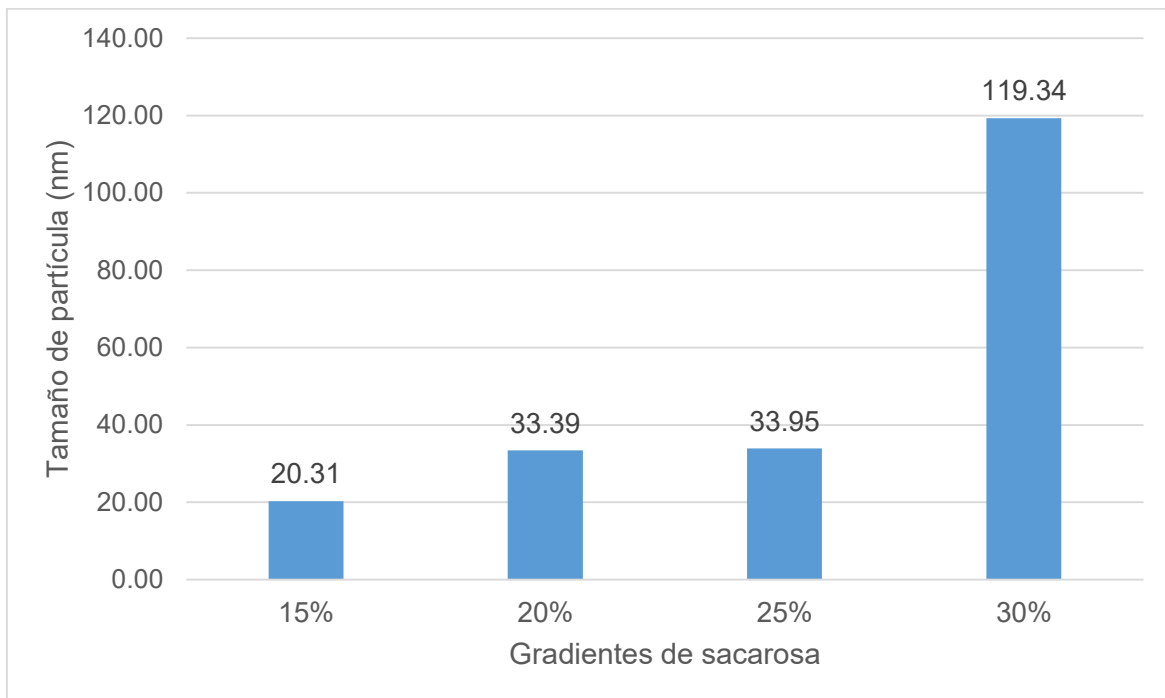
A continuación, se recuperaron las bandas correspondientes a VLPs de cada uno de los gradientes y se dializaron contra PBS-Arg con el propósito de retirar el CsCl. Al realizar el análisis por SDS-PAGE (Figura 36) se observó que la proteína QL es capaz de incorporarse en una VLP cuando se encuentra en las proporciones 4/1 y 9/1 con VP2. Por otro lado, se observó que la banda correspondiente a partículas de Q<sub>SF</sub> contiene también a otras proteínas, lo cual sugiere que Q<sub>SF</sub> pudiera estar interactuando con ellas y de esta manera interfiriendo con su purificación.



**Figura 36.** SDS-PAGE de las bandas inferiores recuperadas en el gradiente de CsCl de QL y sus proporciones con VP2. **A)** VP2; **B)** QL; **C)** VP2:QL, 9:1; **D)** VP2:QL, 4:1; **E)** Q<sub>SF</sub>; MW. Marcador de peso molecular.



Con el propósito de purificar la proteína  $Q_{SF}$  desde el ensamble, se realizó una centrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa. Se prepararon distintas diluciones de sacarosa, desde 5% hasta 35% (m/v) en PBS pH 7.4. Se colocaron 0.5 mL de cada una de las diluciones en un tubo de ultracentrífuga comenzando por la de mayor densidad y al final se colocaron 0.5 mL de la muestra de  $Q_{SF}$  dializada. A continuación, se realizó la centrifugación a 35000 rpm ( $243500 \times g$ ) durante 4 h a  $4^\circ C$ . Al final de la centrifugación se recolectaron las fracciones necesarias, se dializaron contra PBS para retirar la sacarosa y se analizaron por DLS y SDS-PAGE. A pesar de que la centrifugación isopícnica no favoreció la purificación de  $Q_{SF}$  si permitió separar especies de acuerdo a su tamaño, encontrándose por DLS partículas en promedio de 33.39 nm y 33.95 nm en las fracciones correspondientes al 20 y 25% de sacarosa, respectivamente (Figura 37).



**Figura 37.** Tamaño promedio de acuerdo a DLS de las partículas en las fracciones del gradiente de sacarosa de  $Q_F$  después de la diálisis.



---

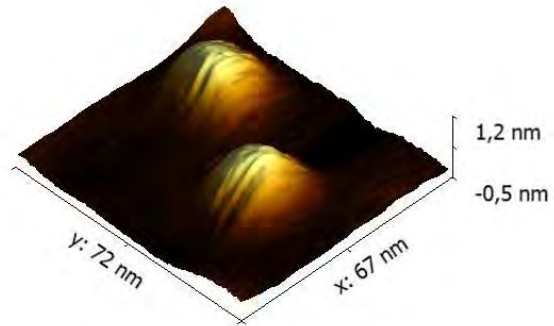
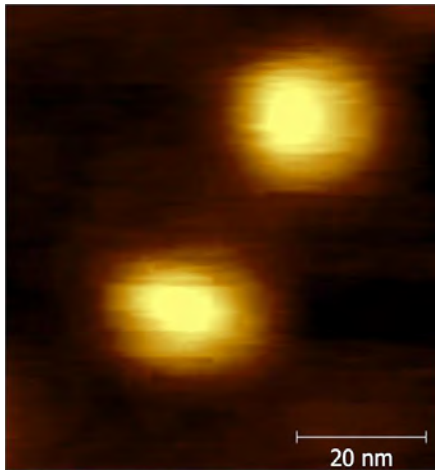
---

## 6.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

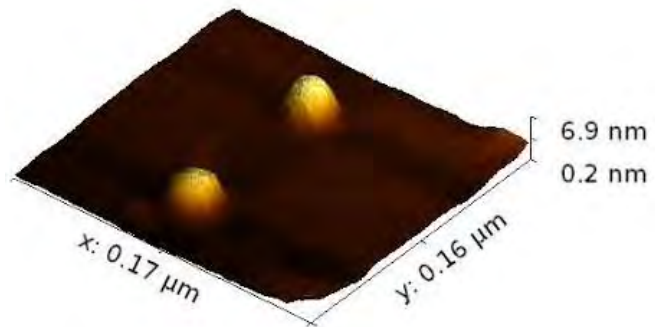
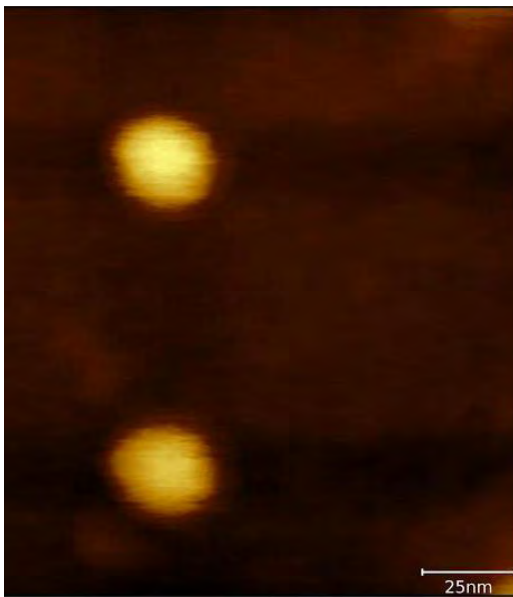
De acuerdo a los resultados de AFM en las muestras de  $Q_L$  y  $Q_{SF}$ , existe proteína estructurada en VLPs. Anteriormente se ha demostrado por AFM que las VLPs de VP2 tienen un diámetro de 22.1 nm (Gutiérrez-Landa, 2014). Por AFM, para las muestras de diálisis de  $Q_L$ , se observaron partículas irregulares con dimensiones entre los 22.6 y 29.0 nm de diámetro, mientras que para las de  $Q_{SF}$  se visualizaron partículas ligeramente mayores y más regulares entre 27.6 y 28.5 nm de diámetro (Figura 38). Por TEM fue más difícil obtener imágenes nítidas de las VLPs. Se observó lo que parece ser proteína no estructurada y algunas partículas irregulares a una amplificación de 50000 X, con tamaños arriba de los 25 nm. Es posible que en estos casos no todas las proteínas desplegadas en la superficie estén plegadas correctamente, lo que podría generar esa apariencia irregular (Figura 39).



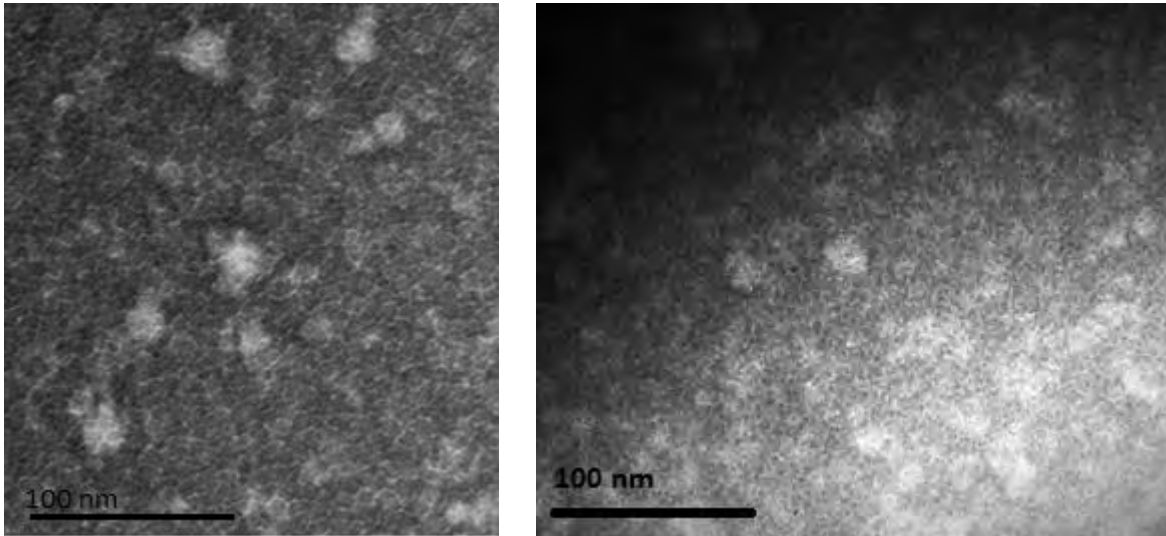
A)



B)



**Figura 38.** Micrografía obtenida por AFM de dos partículas en las muestras de  $Q_L$  y  $Q_{SF}$  (exclusivamente). **A)** Partículas de  $Q_L$  y su reconstrucción tridimensional. La partícula superior tiene un diámetro de 25.1 nm y la partícula inferior de 26.0 nm. **B)** Partículas de  $Q_{SF}$  y su reconstrucción tridimensional. La partícula superior tiene un diámetro de 28.5 nm y la partícula inferior de 27.6 nm.



**Figura 39.** Microscopia electrónica de las muestras con ensambles después de la diálisis de  $Q_L$  (izquierda) y  $Q_{SF}$  (derecha) a una magnificación de 50000 X.

### **6.6 Análisis de la actividad específica de las partículas de ensamble de $Q_L$ y las partículas híbridas VP2: $Q_L$ , antes y después de los gradientes de CsCl**

Para evaluar cuantitativamente la actividad catalítica de la proteína  $Q_L$  se diseñó el ensayo mencionado en la sección de metodología, con el cual se determinó la velocidad inicial ( $v_i$ ) de la reacción de formación del 4-nitrofenol (4-NF) por acción de la enzima sobre el 4-nitrofenil acetato (4-NFA), y se relacionó con la cantidad de proteína (actividad específica). Cada muestra se analizó con dos repeticiones.

Las pendientes resultantes al graficar la absorbancia contra el tiempo corresponden a las velocidades iniciales de cada muestra y se corrigieron al restar la pendiente de la hidrólisis espontánea del sustrato (Tabla 2). Enseguida se determinó la  $Abs_{410}/\mu\text{mol}$  de 4-NF para lo cual se elaboró una curva patrón 4-NF y el valor de la pendiente se utilizó para relacionar las velocidades iniciales,  $v_i$ , de cada muestra con el 4-NF y de esta forma calcular las unidades enzimáticas (U). Las U se definen como la cantidad en  $\mu\text{mol}$  de 4-NF producido por minuto. Por otro lado, se determinó la concentración de proteína presente en las muestras dializadas a 280 nm empleando una curva patrón de BSA.



**Tabla 2.** Cálculo de las unidades enzimáticas (U) para las especies de Q<sub>L</sub> después de la diálisis (ensamble).

Muestra	$v_i^*$ $\left(\frac{Abs_{410}}{min}\right)$	Pendiente m $\left(\frac{Abs_{410}}{\mu mol_{4-NF}}\right)$	U $\left(\frac{\mu mol_{4-NF}}{min}\right)$	U** $\left(\frac{\mu mol_{4-NF}}{min}\right)$
4-NFA	0.0247	10.3	$2.398 \times 10^{-3}$	0
Q <sub>L</sub> (100%)	0.1454	10.3	$1.412 \times 10^{-2}$	$1.172 \times 10^{-2}$
VP2:Q <sub>L</sub> 4:1	0.0499	10.3	$4.850 \times 10^{-3}$	$2.452 \times 10^{-3}$
VP2:Q <sub>L</sub> 9:1	0.0388	10.3	$3.767 \times 10^{-3}$	$1.369 \times 10^{-3}$

\* Es el promedio de dos repeticiones; \*\* Corregido por la hidrólisis espontánea del 4-NFA.

Con estos datos, se calculó la actividad específica expresada en U por miligramo de enzima y por  $\mu\text{mol}$  de sitio catalítico (Tabla 3). Nos resulta útil expresar la actividad específica en U/mg de proteína cuando se evalúan dos enzimas que tienen masas molares similares. Sin embargo, esto no resulta muy práctico al evaluar las muestras que contienen mezclas de VP2 y Q<sub>L</sub> ya que las masas molares de BpIA y Q<sub>L</sub> son muy diferentes entre sí (21498.1 g/mol y 81204.2 g/mol, respectivamente). Por lo tanto, es más conveniente analizar la actividad específica por  $\mu\text{mol}$  de sitio catalítico y de esta forma evaluar cómo se afecta la eficiencia de BpIA al estar fusionada al asa 300-314 de VP2. Anteriormente se ha descrito la actividad enzimática de BpIA recombinante libre con el propósito de comparación (202 U/ $\mu\text{mol}$ ).

**Tabla 3.** Actividades específicas. Comparación entre las actividades específicas de las muestras de Q<sub>L</sub> y las proporciones VP2/Q<sub>L</sub>. Se indica el ensayo de la lipasa BpIA libre como referencia de la actividad (Gutiérrez-Landa, 2014).

Muestra	U $\left(\frac{\mu mol_{4-NF}}{min}\right)$	Proteína (mg de enzima)	Actividad específica (U/mg)	U/ $\mu\text{mol}$ de sitio catalítico
Q <sub>L</sub> (100%)	$1.172 \times 10^{-2}$	0.100	0.117	$9.50 \pm 1.44$
VP2:Q <sub>L</sub> 4:1	$2.452 \times 10^{-3}$	0.0205	0.120	$9.74 \pm 0.62$
VP2:Q <sub>L</sub> 9:1	$1.369 \times 10^{-3}$	0.0124	0.110	$8.93 \pm 0.22$
BpIA	$3.760 \times 10^{-3}$	0.0004	9.400	$202.0 \pm 0.45$



Los resultados anteriores muestran que la actividad específica de  $Q_L$ , independientemente de las proporciones con VP2, se encuentra en el intervalo de 9 y 10  $U/\mu\text{mol}$ . Sin embargo, este resultado depende bastante de las condiciones de ensamble y del tiempo de almacenamiento de la proteína. Cuando la determinación de actividad enzimática se realiza inmediatamente después de la purificación de la proteína es posible obtener mejores actividades (30.3, 22.5 y 22.0  $U/\mu\text{mol}$ , VP2: $Q_L$  9:1, VP2: $Q_L$  4:1 y  $Q_L$  100%, respectivamente). Así mismo, se ha reportado que cuando la diálisis se lleva a cabo en ausencia de L-Arg, la actividad específica de  $Q_L$  es de  $18.3 \pm 3.7 U/\mu\text{mol}$  de sitio catalítico (Gutiérrez-Landa, 2014). Estos resultados sugieren que independientemente de las condiciones de ensamble la actividad enzimática de la proteína  $Q_L$  es mucho menor que la actividad reportada por la lipasa de *B. pumilus* en su estado libre. Se pueden discutir dos razones principales por las que la catálisis se afecta. En primer lugar, el hecho de que BpIA esté insertada en VP2 repercute en la libertad de movimiento de la proteína, lo cual puede afectar en la correcta formación del sitio catalítico o la dinámica de los cambios conformacionales que permiten su actividad. Anteriormente la poca solubilidad de VP2 también era un factor que afectaba la actividad enzimática de  $Q_L$ . Sin embargo, aún en presencia de L-Arg, que hace más soluble a VP2, la actividad no mejoró. En segundo lugar, las proteínas VP2 y  $Q_L$  son capaces de formar otras estructuras (algunas más complejas) además de VLPs, como son los intermediarios de ensamble y agregados. Estas estructuras podrían generar impedimento estérico en el acomodo libre de BpIA y afectar negativamente la catálisis.

Hasta aquí, los resultados de actividad específica sugieren que la catálisis de la proteína  $Q_L$  se desempeña de manera muy similar independientemente del estado en el que se encuentre la proteína, ya sea como VLPs que tengan a la BpIA en superficie o como intermediarios de formación. En este punto, la actividad enzimática se está analizando a partir de la mezcla total de productos de la diálisis y que, de acuerdo a los datos de DLS, en ella existen especies de diferentes tamaños y características (intermediarios, VLPs y agregados). Por tal motivo es



necesario separar de esta mezcla aquella fracción correspondiente a VLPs y corroborar que éstas son responsables de la actividad enzimática de la muestra. Para ello se analizó la actividad enzimática de las especies correspondientes a VLPs aisladas de los gradientes de CsCl (Tablas 4 y 5). Anteriormente, la actividad de las especies de Q<sub>L</sub> separadas por centrifugación no pudo determinarse cuantitativamente debido a la agregación de VP2 en condiciones no desnaturalizantes; en este estudio se decidió determinarla tomando ventaja de que la solubilidad se favorece utilizando L-Arg en el amortiguador PBS.

**Tabla 4.** Cálculo de las unidades enzimáticas (U) de las especies de Q<sub>L</sub> después de la separación por especies (gradientes de CsCl).

Muestra	$v_i^*$ $\left(\frac{Abs_{410}}{min}\right)$	Pendiente m $\left(\frac{Abs_{410}}{\mu mol_{4-NF}}\right)$	U $\left(\frac{\mu mol_{4-NF}}{min}\right)$	U** $\left(\frac{\mu mol_{4-NF}}{min}\right)$
4-NFA	0.0247	10.3	$2.398 \times 10^{-3}$	0
Q <sub>L</sub> (100%)	0.2988	10.3	$2.901 \times 10^{-2}$	$2.661 \times 10^{-2}$
VP2:Q <sub>L</sub> 4:1	0.1010	10.3	$9.806 \times 10^{-3}$	$7.408 \times 10^{-3}$
VP2:Q <sub>L</sub> 9:1	0.0652	10.3	$6.330 \times 10^{-3}$	$3.932 \times 10^{-3}$

\* Es el promedio de dos repeticiones; \*\* Corregido por la hidrólisis espontánea del 4-NFA.

**Tabla 5.** Actividades específicas. Comparación entre las actividades específicas de las muestras de Q<sub>L</sub> y las proporciones VP2/Q<sub>L</sub>.

Muestra	U $\left(\frac{\mu mol_{4-NF}}{min}\right)$	Proteína (mg de enzima)	Actividad específica (U/mg)	U/ $\mu$ mol de sitio catalítico
Q <sub>L</sub> (100%)	$2.661 \times 10^{-2}$	0.532	0.050	$4.06 \pm 0.07$
VP2:Q <sub>L</sub> 4:1	$7.408 \times 10^{-3}$	0.091	0.081	$6.57 \pm 0.84$
VP2:Q <sub>L</sub> 9:1	$3.932 \times 10^{-3}$	0.055	0.071	$5.76 \pm 0.58$

De acuerdo a estos resultados se puede observar que la actividad enzimática se ve afectada después de los gradientes de CsCl, ya que es difícil disgregar por completo la proteína aún después de eliminar el CsCl por diálisis con PBS-Arg. Estos agregados, al igual que en la determinación anterior, son responsables de evitar la



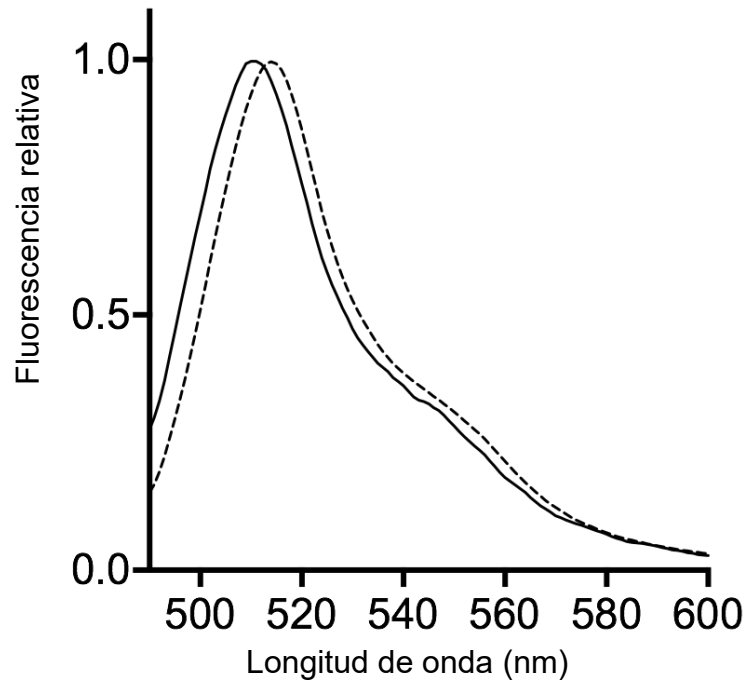


correcta formación del sitio catalítico o de interactuar con ellos haciéndolos inactivos o menos activos.

Por otra parte, como puede observarse (Tabla 5), las VLPs formadas exclusivamente de  $Q_L$  son las más afectadas en cuanto a catálisis. En teoría, en estas VLPs existe una mayor cantidad de moléculas de BpIA en superficie, lo cual podría crear un impedimento estérico entre ellas, principalmente en los tres dominios correspondientes a BpIA que se exponen por capsómero en el ensamble (de acuerdo al modelo teórico) (Figura 12).

### **6.7 Medición de fluorescencia de las VLPs formadas por la proteína $Q_{SF}$**

La evidencia del plegamiento correcto de la GFP es su fluorescencia. Como pudo observarse a lo largo del proyecto, la proteína  $Q_{SF}$  presentó fluorescencia desde la expresión en *E. coli*, aun estando en cuerpos de inclusión, lo cual no sucedió con  $Q_F$  a pesar de su rendimiento y expresión aceptables. El reto de la proteína  $Q_{SF}$  consistió en que la fluorescencia se mantuviera aún en condiciones desnaturalizantes y después del ensamble en VLPs. De forma cualitativa esto se logró en todas las etapas experimentales, y para corroborar la fluorescencia de las VLPs de  $Q_{SF}$  se midió el espectro de emisión de la proteína recuperada por gradientes de CsCl. Al excitar el cromóforo a una longitud de onda de 450 nm, se obtuvo un espectro de emisión muy parecido al de la proteína sfGFP libre, cuyo pico máximo se encuentra a los 508 nm, y además presenta un hombro desplazado hacia el rojo (Figura 40).



**Figura 40. A)** Espectro de emisión de las VLPs ensambladas con la proteína Q<sub>SF</sub> (línea continua) y de la proteína sfGFP libre (línea punteada).

## 7. CONCLUSIONES

- Se logró expresar una nueva quimera de VP2 con una variante de la GFP en el asa 300-314 de la proteína VP2 del B19V. Esta proteína presenta fluorescencia desde su expresión indicando que al menos el cromóforo se pliega y que la formación de cuerpos de inclusión no altera significativamente el plegamiento alrededor del cromóforo.
- La pérdida de fluorescencia de la proteína Q<sub>SF</sub> en GndHCl es irreversible al menos en las condiciones ensayadas con VP2.
- A pesar de no lograr la purificación de Q<sub>SF</sub> en las condiciones ensayadas, se observa la formación de partículas tipo virus al propiciar el ensamble a partir



de cuerpos de inclusión de acuerdo con el análisis de DLS y Microscopía de Fuerza Atómica.

- Los resultados sugieren que la presencia de espaciadores de mayor tamaño flanqueando a la proteína insertada en el asa 300-314 de VP2, así como la selección de una variante de la GFP cuyo plegamiento es muy rápido, permitieron que esta nueva quimera presente fluorescencia.
- Se confirmó la hipótesis de que la proteína BpIA funciona como una unidad de plegamiento autónomo y que esto puede servir como un modelo para el estudio del potencial de VLPs del B19V como nano acarreador de enzimas.
- El análisis de DLS sugiere que Q<sub>L</sub>, por sí sola, es capaz de formar partículas tipo virus de tamaños ligeramente mayores a las de VP2.
- La proteína Q<sub>L</sub> es también capaz de formar VLPs en presencia de VP2 en proporciones 9:1 y 4:1 (VP2:Q<sub>L</sub>) de acuerdo con las bandas de VLPs obtenidas por centrifugación isopícnica que contienen a ambas proteínas.
- La proteína Q<sub>L</sub> mantiene la actividad esterasa (contra 4-NFA como sustrato) una vez renaturalizada y ensamblada en VLPs que contienen exclusivamente a esta proteína y con VP2 en las relaciones 4:1 y 9:1 (VP2:Q<sub>L</sub>), aunque es entre 11 y 20 veces menos activa que la BpIA libre. Es probable que esta disminución se deba a la restricción en la movilidad y flexibilidad de la proteína causada por la inserción de BpIA en VP2.
- La proteína VP2 del B19V es competente para el diseño de partículas nano acarreadoras ya que permite la presentación de proteínas de tamaño considerable en el asa superficial formada por los aminoácidos 300 a 314.



---

---

## 8. PERSPECTIVAS

- Encontrar un método de purificación eficiente para la proteína Q<sub>SF</sub> y estudiar el ensamble en proporción con la proteína VP2. Es posible que presentar una etiqueta de afinidad en el extremo N-terminal funcione adecuadamente.
- Realizar estudios de estabilidad para las VLPs de la proteína Q<sub>SF</sub> evaluando la pérdida de la fluorescencia del cromóforo y compararla con la estabilidad de la proteína sfGFP libre.
- Uso de espaciadores más largos en la quimera Q<sub>L</sub> (como los de la proteína Q<sub>SF</sub>), para intentar incrementar la actividad enzimática.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 247.

Alcántara, M. (2009). Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano. Tesis de Maestría UNAM.

Amexis, G., Young, N.S., (2006). Parvovirus B19 empty capsids as antigen carriers for presentation of antigenic determinants of dengue 2 virus, *J Infect Dis*. 194. 790-794.

Andrews, B.T., Schoenfish, A.R., Roy, M., Waldo, G., Jennings, P.A., (2007). The rough energy landscape of superfolder GFP is linked to the chromophore. *J mol Biol*. 373. 476-490.

Bronstein ML. (2011). Virus-Based Nanoparticles with Inorganic Cargo: What does the future hold? *Small*, 12, 1609-1618.

Brown, C.S., VanLent, J.W., Vlak, W., Spaan, J. (1991). Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J Virol*. 65. 2702-2706.

Brown, K.E., Young, N.S., Johnson, M.L. (1994). Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection, *Crit Rev Oncol Hematol*. 16.1-31.

Bustos-Jaimes, I., Hummel, W., Eggert, T., Bogo, E., Puls, M., Weckbecker, A., Jaeger, K.-E. (2009). A high-throughput-screening method for chiral alcohols and its application to determine enantioselectivity of lipases and esterases. *Chem Cat Chem* 1 (4), 445-448.

Caballero-Hernández, D. y Chávez-Guerrero, L. (2010). "Virus, materiales naturales: aplicaciones en nanotecnología". *Ingenierías*. 13, 16-22.

Cann A.J. (2007). *Principles of Molecular Virology*. 4ª Edición. Elsevier.

Chalfie, M. (1995). "Green Fluorescent Protein". *Photochemistry and Photobiology*. 62, 651-656.

Costello, J. H., Colin, S. P., & Dabiri, J. O. (2008). Medusan morphospace: phylogenetic constraints, biomechanical solutions, and ecological consequences. *Invertebrate Biology*, 127(3), 265-290.



Douglas T, Young M. (2006). Viruses: making friends with old foes. *Science* 312. 873–75.

Fischlechner, M., Donath, E. (2007). Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew Chem Int.* 46. 3184–3193.

Fritsch GmbH (2017). Diámetro hidrodinámico. Idar-Oberstein, Alemania. Recuperado de <http://www.fritsch.es>

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.

Gutiérrez-Landa, I. (2014). Estudio de la quimera formada por la proteína VP2 del Parvovirus B19 y la lipasa de *Bacillus pumilus*. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Harvey A.H., Gallagher J.S., Levelt Sengers J.M.H. (1998). Revised Formulation for the Refractive Index of Water and Steam as a Function of Wavelength, Temperature and Density. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 27: 761-774.

Huang, J., Craggs, T., Christodoulou, J., Jackson, S. (2007). Stable Intermediate States and High Energy Barriers in the Unfolding of GFP. *J. Mol. Biol.* 370. 356-371.

Hsu ST, Blaser G, Jackson SE. (2009). The folding, stability and conformational dynamics of beta-barrel fluorescent proteins. *Chem Soc Rev.* 38:2951–2965.

Kauffman B., Simpson A.A., Rossman M.G. (2004). The Structure of Human Parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11628-11633

Kaufmann KJ y Nettelbeck MD. (2012). Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond. *Trends Mol. Med.*, 18, 365-376.

Kim, H., Seo, J., Kim, T., Lee, B. (2014). Nanometrology and its perspectives in environmental research. *Environmental Health and Toxicology.* 29, 1-9.

Lancheros, R., Beleño, J., Guerrero, C. Godoy-Silva, R. (2014). Producción de Nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-acetilcisteína (NAC). *Univ. Sci.* 19 (2). 161-168.

Lechuga, L. (2011). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología a la salud. 9ª edición del Curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana. 98 – 112.

Malvern Instruments (2017). Size: What is the z-average? Malvern, UK. Recuperado de <http://www.malvern.com>



Mora, R. (2008). Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de Maestría, UNAM.

Muller-Esterl, W. (2008). Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. Reverte.

O'Neil A, Reichhardt C, Johnson B, Prevelige PE y Douglas T. (2011). Genetically programme in vivo packaging of protein cargo and its controlled release from bacteriophage P22. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 50, 7425-7428.

Pédelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T., Waldo, G. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 24 (1): 79-88.

Pérez-Millán, M., Becu-Villalobos, D. (2009). La Proteína Verde Fluorescente Ilumina la Biociencia. *MEDICINA*. 69. 370-74.

Reid, B.G., Flynn, G.C. (1997). Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*. 36(22):6786-91

Romero-Cabello, R. (2007). Microbiología y Parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Ed. Médica Panamericana. p. 267.

Ruano – Aldeano, M. (2013). Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.

Sánchez-Rodríguez, S. (2012). Estudio del ensamblado y estabilidad de capsómeros y cápsides del Parvovirus B19. Tesis de Doctorado. UNAM.

Sánchez-Rodríguez, S., Munch-Anguiano, L., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G. Mora-Pale, M., Dordick, J., Bustos-Jaimes, I. (2012). Human Parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochemie*. 94. 870-78.

Santillán-Urbe, H. (2012). Estudio de la enantioselectividad hidrolítica de la lipasa de *Bacillus pumilus*. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Sharma, M., Yashonath, S. (2007). Size Dependence of Solute Diffusivity and Stokes-Einstein Relationship: Effect of van der Waals Interaction. *Diffusion Fundamentals*. 7. 1-15.

Singh P., Destito G., Scheemann A., Manchester M. (2006). Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J. Nanobiotech*. 4 (2).



---

---

Steinmetz N.F., Lomonossoff G.P., Evans D.J. (2006). Cowpea mosaic virus for material fabrication: adressable carboxylate groups on a programable nanoscaffold. *Langmuir*, 22. 3488-3490.

Tsien, R. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem.* 67. 509-44.

Tsumoto K., Umetsu, M., Hara M., Ashish K., Goda S., Adschiri T., Kumagai I. (2003). How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. *J. Biol. Chem.* 278. 8979 – 8987.

VanMeter, K.C.; Hubert, R.J. (2015). *Microbiology for the Healthcare Professional*. 2ª edición. ELSEVIER.

Zeltins, A. (2013). Construction and Characterization of Virus-like Particles: A Review. *Mol Biotechnol.* 53. 92-107.