



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS
SUPRAMOLECULARES BASADAS EN EL PARVOVIRUS B19**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
HUGO CÉSAR SANTILLÁN URIBE**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. ISMAEL BUSTOS JAIMES
Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina
Dr. Miguel Antonio Costas Basín
Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Química
Dr. Ismael Bustos Jaimes
Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina**

Ciudad de México. Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

PRESIDENTE	Pérez Montfort Ruy
VOCAL	González Segura Lilian
VOCAL	Arreguín Espinosa de los Monteros Roberto Alejandro
VOCAL	Basiuk Evdokimenko Vladimir
SECRETARIO	Sánchez Puig Nuria Victoria

ESTE TRABAJO CONTÓ CON RECURSOS DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT), UNAM, IN200316.

DURANTE LOS ESTUDIOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA FUI BENEFICIADO CON UNA BECA OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT).

Quiero agradecer al Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional y al grupo Farmacéutico Neolpharma por haber galardonado este trabajo con el Premio a la Innovación en Bionano: Ciencia y Tecnología Cinvestav Neolpharma 2016.

Agradecimiento a la Dra. Isabel Velázquez López por todo el apoyo técnico otorgado durante mi estancia en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas.

Agradecimiento a la M. en C. Laura Álvarez Añorve por el apoyo otorgado mediante la elaboración de geles de poliacrilamida y medios de cultivo durante mi estancia en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas.

Dedicado a mi familia
Muchas Gracias por todo el apoyo

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Ismael Bustos Jaimes por la gran oportunidad que me otorgó para trabajar nuevamente bajo su tutela. Espero que este nuevo logro compartido sea uno de muchos por venir.

Al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco por mostrar un interés genuino durante el desarrollo de este proyecto y por todas esas palabras que me dijo en los momentos de incertidumbre.

Al Dr. Miguel Antonio Costas Basín por las muchas sugerencias que ayudaron a que este proyecto se concretara.

A todos los miembros del jurado por las observaciones y contribuciones que enriquecieron este escrito.

A la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez por el esfuerzo y el gran compromiso que muestra en cada una de las actividades que realiza. Muchas gracias por mantener y defender sus loables convicciones.

A la Dra. Areli Morán García y a la M. en C. Mayra Patricia Alcántara Sol por compartir sus conocimientos y experiencia.

A todos mis colegas del grupo de investigación: Arturo, Brayan, Fabián, Angélica, Iris, Carla, Sac Nicté, Erick, Carlos y Maribel.

A todos mis colegas del LFQIP: Alejandro, Agustín, Renán, Tania, Dana, Karla, Andrea, Aarón, Ricardo, Diego, Sergio R., Menandro, Susana, Brian y a Hugo L.

A la M.C. Josefina Valadez García. Muchas gracias por todas esas horas de tu vida.

Al M. en C. Jorge Ángel Marcos Víquez por su compañerismo y por todo el apoyo que me brindó para desarrollar este proyecto. Gracias por todas las cualidades que hacen de ti una gran persona.

A la M. en C. Laura Díaz Álvarez por compartir sus conocimientos, experiencias, tés, colaciones, medio de transporte, etc. Me ha resultado muy grato descubrir toda esa generosidad que hay dentro en ti.

Al M. en C. Jesús Banda por la templanza que compartes ante los vicios de nuestro mundo.

A todas mis amistades por continuar siendo tolerantes conmigo. Julio, Rocío, Liliana, Sandra, Daniela, Marcos, muchas gracias por enriquecer mi camino.

Índice

Resumen	1
Abreviaturas usadas	2
Capítulo 1 Introducción	4
Capítulo 2 Hipótesis y Objetivos	15
Capítulo 3 Materiales y Métodos	16
• Esquema general de trabajo	16
• Materiales	17
• Métodos	20
• Diseño de las proteínas quiméricas	20
• Obtención de células transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	22
• Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H	23
• Limpieza de cuerpos de inclusión	24
• Purificación de las proteínas recombinantes	25
• Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs	26
• Caracterización de VLPs y estructuras supramoleculares mediante DLS	27
• Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica	28
• Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular	29
• Análisis de VLPs y de estructuras supramoleculares mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel	29
• Análisis de VLPs y de estructuras supramoleculares por microscopía de fuerza atómica.	30
Capítulo 4 Resultados y Discusión	31
• Diseño de las proteínas quiméricas	31
• Obtención de células transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	33
• Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H	33
• Purificación de las proteínas recombinantes VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H	34
• Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs	36
• Ensamble de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H	37
○ Caracterización de VLPs y estructuras supramoleculares mediante DLS	37
○ Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica	41
• Ensamble de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H	41
○ Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica	42
○ Caracterización de VLPs mediante DLS	45
○ Purificación de VLPs por SEC y su caracterización mediante DLS	46

○ Ensayos de interacciones entre VLPs con fragmentos heterodimerizantes complementarios y caracterización de especies supramoleculares mediante DLS.	48
○ Caracterización de estructuras supramoleculares mediante EMSA	51
○ Caracterización de estructuras supramoleculares mediante AFM	53
Capítulo 5 Conclusiones y Perspectivas	55
Bibliografía	56

Resumen

Las partículas tipo virus (VLPs) son, por sí mismas, nanomateriales biológicos de gran interés por sus múltiples aplicaciones. Entre las que más destacan se encuentra su capacidad para funcionar como vacunas, su efectividad para acarrear moléculas con actividades biológicas bien definidas y por su eficiencia en la entrega de dichas moléculas a células y tejidos específicos. Las VLPs son complejos supramoleculares que están constituidos por los elementos estructurales de los virus, pero que a diferencia de éstos, carecen de material genético en su interior. La periodicidad que muestran los elementos estructurales de estas partículas, sugiere que podrían ser utilizadas para la construcción de estructuras más complejas capaces de desarrollar múltiples funciones de manera simultánea. Hipotéticamente, se podrían obtener arreglos supramoleculares basados en este tipo de partículas que sean capaces de transportar moléculas de interés terapéutico y que a la vez cuenten con elementos de marcaje celular como fluoróforos o proteínas fluorescentes los cuales permitan dar seguimiento a la entrega sitio-específica de éstas moléculas. En este sentido, el reto consiste en asociar específicamente estas VLPs sin que se produzca una agregación generalizada que derive en la obtención de un biomaterial fuera de la escala nanométrica. Para tal fin, propusimos el desarrollo de un sistema que permita unir VLPs, el cual está basado en un conjunto de moléculas heterodimerizantes denominadas tectones. Estas moléculas poseen un plegamiento definido y la capacidad para asociarse específicamente con otros tectones. La fusión de estos fragmentos heterodimerizantes con los elementos estructurales de las VLPs, podría conferir a éstas, una nueva capacidad para asociarse específicamente. Nuestra hipótesis consistió en suponer que la asociación específica y controlada de VLPs generaría nuevas partículas supramoleculares, a las que llamamos “multi-VLPs”. En este trabajo logramos obtener VLPs que presentaban tectones heterodimerizantes en su superficie. Estas VLPs, que fueron obtenidas a partir de proteínas quiméricas, se pusieron en contacto para promover su interacción y así poder obtener multi-VLPs. El análisis de las nuevas partículas obtenidas mediante técnicas hidrodinámicas, electroforéticas y microscópicas demostró la existencia de estas multi-VLPs, un nuevo nanobiomaterial. El potencial que tienen estos materiales nanobiotecnológicos puede impactar directamente en el desarrollo de nuevas tecnologías, particularmente aquellas que son aplicables en el área de la salud. Las multi-VLPs podrían ser utilizadas como sondas para imagenología o para el transporte de enzimas, fármacos y ácidos nucleicos al interior de células, tejidos u órganos. Las múltiples moléculas y funciones que sean incorporadas a estas partículas podrían ser entregadas de manera simultánea, con la finalidad de obtener una acción farmacológica coordinada.

Abreviaturas usadas

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
B19V	Eritroparvovirus I de Primate / Parvovirus B19
BCA	Ácido Bicinconínico
BiFC	Complementación Bimolecular Fluorescente
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CPMV	Virus del Mosaico del Cauquí
CsCl	Cloruro de Cesio
Cven-VP28H	Proteína quimérica que contiene el fragmento C de la proteína venus
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
dsDNA	Ácido Desoxirribonucleico de Doble Cadena
DTT	1,4-Dithiotreitol
DO ₆₀₀	Densidad Óptica obtenida a una longitud de onda de 600nm
E5-VP28H	Proteína quimérica que contiene le hélice E5
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EMSA	Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética
Gdn-HCl	Clorhidrato de Guanidina
HBV	Virus de la Hepatitis B
HPV L1	Virus del Papiloma Humano L1
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados
IPTG	Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido
K5-VP28H	Proteína quimérica que contiene le hélice K5
KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potasio Monobásico
LB	Medio para cultivo Luria-Bertani
LB-Amp	Medio para cultivo Luria-Bertani con Ampicilina (50 µg/mL)
mRNAs	Ácidos Ribonucleicos Mensajeros
NaCl	Cloruro de Sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de Sodio monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sodio dibásico
NaOH	Hidróxido de Sodio
NHS	N-hidroxisuccinimida
Nven-VP28H	Proteína quimérica que contiene el fragmento N de la proteína venus

PBS	Solución amortiguadora fosfatos-salina
PBS _{Arg}	Solución amortiguadora fosfatos-salina con L-Arginina (0.2 M)
PBS2x _{Arg}	Solución amortiguadora fosfatos-salina (2x) con L-Arginina (0.2 M)
PDB	Banco de Datos para Proteínas
PV1	Poliovirus serotipo 1
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
siRNAs	Ácidos Ribonucleicos Pequeños de Interferencia
NiSO ₄	Sulfato de Níquel
SV-40	Virus 40 Vacuolado del Simio
Tris-HCl	Clorhidrato de 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
VLPs	Partículas Tipo Virus
VP1	Proteína Viral 1
VP1u	Región Única de VP1
VP2	Proteína Viral 2
VP26H	Proteína Viral 2 recombinante
VP6	Proteína Viral 6

Capítulo 1. Introducción

En el campo de la investigación biomédica, existe un interés creciente en el desarrollo de nanomateriales que sean biocompatibles. Esta tendencia, se debe en parte, a que los nanomateriales sintéticos son nuevos y en consecuencia se sabe poco sobre su toxicidad y sobre los efectos adversos que se puedan derivar de su uso (Liu et al., 2013; Chu et al., 2014). Por otro lado, en la naturaleza existen nanopartículas constituidas por las mismas moléculas que predominan en las entidades biológicas, quizás las partículas más conspicuas sean los virus. Los virus pueden considerarse como ensamblajes supramoleculares nucleoproteicos que se transformaron en nanomáquinas biológicas capaces de autorreplicarse dentro de una célula y de propagarse entre células y organismos (Mateu, 2011). Históricamente los virus han sido vistos y tratados como enemigos, ya que producen enfermedades en los humanos, así como en plantas y animales de los que se obtienen bienes de consumo. Los mecanismos que participan en el ciclo de infección de diversos virus han sido elucidados y nos han ilustrado sobre la diversidad de estrategias que estas partículas usan para la entrega de material genético y su replicación. Estas estrategias de entrega sitio-específica han generado interés en diversos grupos de investigación que buscan desarrollar novedosas terapias génicas (Hoffman et al., 2016; Rohovie et al., 2016).

Mediante el uso de la ingeniería genética, ha sido posible producir partículas virales infecciosas y partículas tipo virus (VLPs) en hospederos heterólogos. En la literatura existen diversas definiciones para las VLPs, aquí nos referimos a partículas derivadas de los componentes estructurales de los virus y que carecen de material genético. De este modo, las VLPs no son infecciosas ya que no pueden completar su ciclo reproductivo,

pero conservan las propiedades de reconocimiento molecular que les imparten tropismo y les permiten ingresar a las células (Zhao et al., 2014).

La expresión heteróloga de los componentes estructurales de los virus ha permitido la obtención de VLPs en grandes cantidades. Este avance ha hecho posible tanto la cristalización de las VLPs y la elucidación de su estructura a nivel atómico, como el desarrollo de aplicaciones médicas. Cabe destacar que las VLPs suelen conservar las propiedades inmunogénicas de los viriones naturales. Esta propiedad ha sido utilizada para la creación de vacunas basadas en este tipo de partículas. Entre los ejemplos más representativos se encuentran las vacunas contra el virus del papiloma humano y contra diversas variantes del virus de la influenza. Incluso, es posible desplegar péptidos inmunogénicos provenientes de virus y bacterias patógenos en la superficie de las VLPs. Esta estrategia se utiliza con el fin de que estas últimas funcionen como sistemas de transporte y protección de los determinantes inmunogénicos. En este sentido, también existen casos en los cuales se han logrado desarrollar vacunas que generan protección contra los agentes patógenos de los que se tomaron los epítomos inmunogénicos originalmente (Sánchez-Rodríguez et al., 2010; Zhao et al., 2014).

En cuanto a la ciencia de materiales, las VLPs tienen propiedades de gran interés como andamios para la síntesis de nuevas estructuras. Estas partículas son monodispersas y polivalentes, es decir, su tamaño es poco variable y, al estar compuestas de múltiples unidades de las mismas proteínas, los grupos reactivos en su superficie se repiten periódicamente con precisión nanométrica. Los residuos de lisina, cisteína o tirosina son comúnmente usados como sitios químicamente reactivos. Continuando con esta línea, mediante manipulación genética se han creado proteínas mutantes con residuos de lisina o cisteína que quedan expuestos en las regiones accesibles de la cápside vírica. Posteriormente, estos residuos, tanto en el exterior como en el interior de la cápside, pueden ser sujetos de conjugación con moléculas que poseen diferentes propiedades químicas (Blum et al., 2005). En consecuencia, las VLPs pueden ser usadas 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, siRNAs, mRNAs, genes, péptidos, proteínas,

anticuerpos, nanopartículas magnéticas, quantum dots y otros dispositivos desarrollados para la obtención de imágenes médicas (Steinmetz et al., 2006). Las modificaciones químicas y genéticas de la superficie de las VLPs, les confieren propiedades únicas que pueden ser usadas para la incorporación y presentación de todos estos tipos de moléculas (Fischelechner y Donath, 2007; Singh et al., 2006a). Es posible conjugar ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) con los residuos de lisina, mientras que la maleimida, que es un reactivo específico para grupos tiol, puede modificar a los residuos de cisteína (Singh et al., 2006b). Entre los virus mejor caracterizados se encuentra el CPMV (virus del mosaico del caupí). Se ha reportado la modificación específica del CPMV mediante la interacción selectiva de las lisinas con fluoresceína, NH-ésteres, isotiocianato y biotina. El CPMV presenta un residuo de lisina en cada unidad asimétrica, dando un total de 60 residuos modificados por partícula (Wang et al., 2002a). Varios grupos de investigación han modificado genéticamente al CPMV para producir partículas que puedan ser derivatizadas o que participen en la formación de redes conductoras de electricidad a escala nanométrica (Blum et al., 2005, Wang et al., 2002b). En su estado natural, este virus no presenta residuos de cisteína en la superficie, por lo que ha sido modificado genéticamente para que los presente en posiciones específicas y así lograr insertar nanopartículas de oro. Estas partículas modificadas pueden llevar al desarrollo de dispositivos eléctricos con aplicación en catálisis redox, reconocimiento molecular, biosensores amperométricos y dispositivos nanoelectrónicos como son las baterías moleculares (Blum et al., 2005).

Los virus representan un sistema o vector natural altamente especializado en la protección, transporte e internalización de material genético. En conjunto, estas características pueden favorecer el desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Estas partículas tipo virus pueden ser excelentes alternativas para el desarrollo de vectores que entreguen y permitan la liberación de agentes xenobióticos al interior de células objetivo, ya sea con fines terapéuticos o de diagnóstico. La regularidad y periodicidad que presentan los elementos estructurales de las cápsides virales favorecen que los dominios que participan en la unión con su receptor sean funcionalmente idénticos, mejorando con ello la activación de los mecanismos que participan en el reconocimiento

a nivel molecular. Las proteínas de las cápsides virales generalmente poseen dominios que están constituidos por residuos de aminoácidos básicos que se encuentran orientados hacia el espacio interior de la partícula. Estos residuos forman interacciones iónicas específicas con el material genético, ayudando a estabilizar y favorecer su empaquetamiento. Bajo este principio, también podrían ser incorporadas diversas moléculas como polímeros, proteínas, plásmidos y nanopartículas que posean una carga apropiada y compatible con la superficie interna de las VLPs. Obtener rendimientos que sean elevados durante el proceso de re-ensamble sería importante para favorecer el encapsulamiento de estas moléculas y por lo tanto para la obtención de una gran cantidad de partículas funcionalizadas.

Las proteínas que participan en la formación de cápsides virales pueden ser recuperadas por varios métodos. La elección de la estrategia a seguir dependerá de las características intrínsecas de cada proteína. Estas pueden recuperarse en forma monomérica y posteriormente ensamblarse para formar cápsides, o aprovechar la formación de las partículas al interior de la célula para posteriormente separarlas del resto de las proteínas y demás componentes celulares. Para el ensamble de las partículas virales *in vitro*, es necesario estudiar y definir las condiciones específicas que permiten obtener buenos rendimientos. Se ha reportado que el ensamble puede estar controlado por diversos factores como son la fuerza iónica, la temperatura, el pH, la concentración de proteína, la presencia de agentes reductores, agentes quelantes, iones divalentes o de algún otro aditivo como el glicerol o la L-arginina. Por ejemplo, el ensamble de las VLPs del poliovirus (PV1) puede ser inducido por la adición de calcio y por una elevada fuerza iónica (Casini et al., 2004). En otro estudio se ha demostrado que el ensamble del papilomavirus humano L1 (HPV L1) se inicia por la remoción de agentes reductores como el DTT, esta condición permite la formación de puentes disulfuro entre los capsómeros que participan en la formación de la cápside (Li et al., 1998). Por el contrario, bajo ciertas condiciones se podría evitar el ensamble, como en el caso particular de la proteína VP1 del poliomavirus SV-40, que permanece en forma de pentámeros a pH y fuerza iónica fisiológica, mientras que a pH 5 se ensambla en estructuras tubulares.

También se ha demostrado que es posible el ensamblaje de VLPs a partir de cuerpos de inclusión que fueron solubilizados en presencia de agentes desnaturizantes como la urea y el cloruro de guanidinio. Por otro lado, se ha reportado que muchos aditivos como la arginina, el glicerol y el NaCl podrían suprimir la agregación de las proteínas durante su replegamiento (Arakawa et al., 2003; Umetsu et al., 2003). Por ejemplo, bajo condiciones apropiadas la proteína VP6 del rotavirus puede ser renaturalizada y posteriormente autoensamblarse para formar VLPs, todo ello sin provocar su agregación (Zhao et al., 2011). En otro estudio, durante el desarrollo de quimeras del virus de la hepatitis B (HBV), se demostró que la proteína quimérica HBcAg forma cuerpos de inclusión y que estos pueden replegarse y autoensamblarse en VLPs a partir de una solución de urea 6 M (Zhang et al., 2007).

Otro modelo de estudio que resulta interesante son las VLPs del eritroparvovirus I de primate, también conocido como parvovirus B19 (B19V). La proteína estructural VP2 de este virus, posee la capacidad para replegarse y autoensamblarse a partir de su estado desnaturizado, cuando éste es ocasionado por la presencia de agentes desnaturizantes y bajo condiciones controladas de pH, fuerza iónica y temperatura (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Las VLPs del B19V compuestas únicamente por esta proteína han sido cristalizadas y su estructura resuelta (PDB 1S58) (Kaufmann et al., 2004) (Figura 1.1). El análisis estructural mediante microscopía de transmisión electrónica de las partículas producidas por replegamiento *in vitro*, indica que son similares a las VLPs y viriones generados *in vivo* (Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

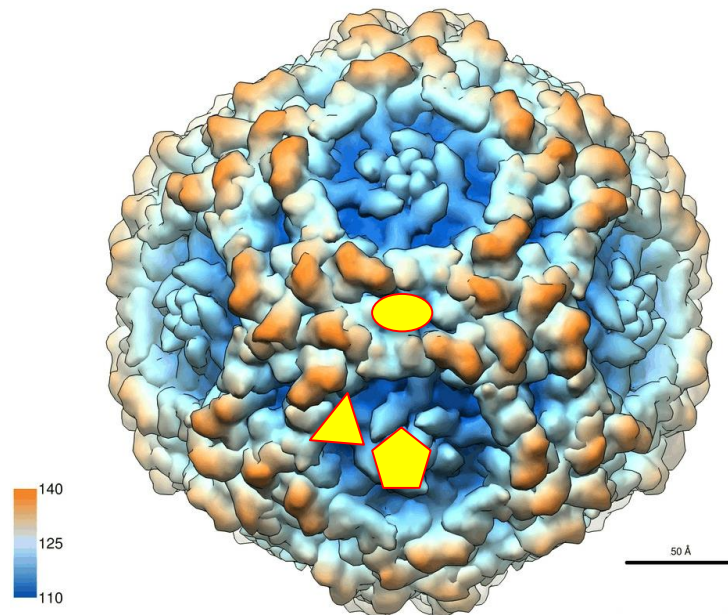


Figura 1.1 Estructura cristalográfica de VLPs de B19V formadas exclusivamente con proteína VP2 (PDB 1S58) (Kaufmann et al., 2004). Se observan al menos tres tipos de ejes de simetría, de orden 2 (óvalo), de orden 3 (triángulo), y de orden 5 (pentágono). La escala muestra la distancia que existe entre el centro geométrico del modelo y la superficie de la partícula (Å).

Se ha reportado el encapsulamiento de dsDNA heterólogo en VLPs de B19V mediante un proceso sencillo en el que se adiciona el material genético durante la etapa de formación de las VLPs (Sánchez-Rodríguez et al., 2015). Esta capacidad para encapsular moléculas seguramente es extrapolable a otras moléculas de interés biomédico y nanotecnológico. Otra ventaja que ofrecen estas partículas es su naturaleza modular. Cada cápside o VLP está compuesta de 60 subunidades de la proteína VP2, dispuestas en 20 capsómeros triméricos. El virión nativo contiene un 5% de la proteína VP1 la cual es idéntica a la proteína VP2 a excepción de un fragmento adicional que está constituido por 227 residuos de aminoácidos los cuales están localizados en la región que corresponde al extremo N-terminal, ésta región es llamada "región única de VP1" (VP1u) y posee actividad intrínseca de fosfolipasa tipo A2.

De este modo, la proteína VP2 y el fragmento de VP1 idéntico a VP2 participan en la conformación de la partícula viral. Distintos grupos mencionan que la región VP1u del B19V permanece dentro de la cápside viral hasta que, por otros eventos moleculares, ésta es expuesta en la superficie a través del poro que se encuentra en el eje de simetría de orden 5 (Figura 1.1) (Gallinella, 2013). Aunque existe debate sobre la localización de esta región en el virión, hay reportes en la literatura que indican que los extremos N-terminales de VP1 o VP2 modificados por ingeniería genética pueden ser expuestos sobre la superficie de las VLPs que contienen dichas proteínas quiméricas (Gilbert et al., 2005; Kaufmann et al., 2008). En el caso de las partículas ensambladas *in vitro*, también se ha confirmado que las extensiones fusionadas al extremo N-terminal de la proteína VP2 quedan expuestas en la superficie de las VLPs (Morán-García et al., 2016). La modularidad de las VLPs y su capacidad de ensamblaje *in vitro* permiten la presentación de péptidos y proteínas en la superficie de partículas constituidas por quimeras de VP2 o mezclas de estas quimeras y la misma proteína VP2 (Figura 1.2).

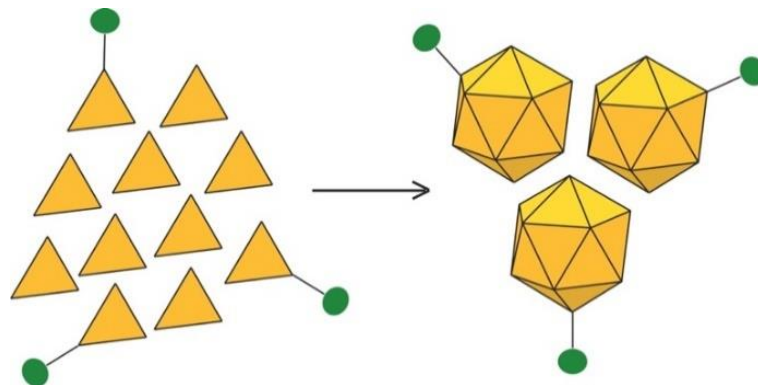


Figura 1.2. Ensamblaje *in vitro* de VLPs híbridas a partir de la mezcla de proteína VP2 de B19V y una quimera de la misma proteína. En este esquema, la fracción quimérica se representa como un círculo que, después del ensamblado, quedaría expuesto en la superficie de las VLPs

En este trabajo propusimos utilizar VLPs de B19V para producir nuevos nanomateriales biocompatibles. Deseamos probar que podemos construir nuevos nanobiomateriales funcionalizando las VLPs con elementos desarrollados en el campo de la biología sintética o de los biosensores que dan lugar a la formación de dímeros estables. Esta capacidad heterodimerizante permitiría asociar VLPs de forma específica en nuevas estructuras supramoleculares (Figura 1.3).

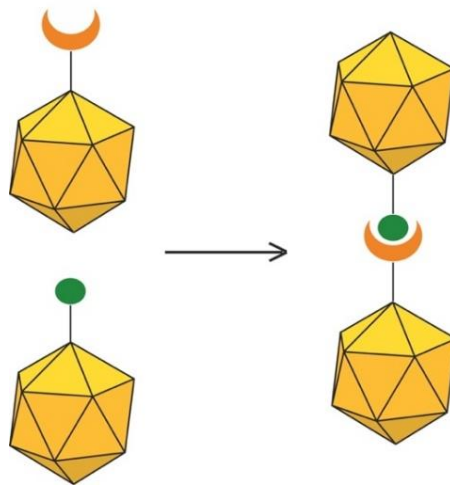


Figura 1.3. Ensamble *in vitro* de partículas complejas (multi-VLPs) a partir de dos VLPs híbridas previamente ensambladas. Considerando que el círculo y la media luna sean capaces de interactuar con gran afinidad, la interacción ocurrirá *in vitro* en condiciones controladas. El producto es una partícula cuyo tamaño y propiedades estructurales serán distintas a las partículas híbridas de las que se partió.

En la bioquímica y la biología sintética se han desarrollado diversos elementos estructurales llamados tectones. Estos tectones son capaces de participar en la construcción de estructuras biológicas complejas a partir de interacciones de alta especificidad. Existen diversos péptidos capaces de participar en la generación de biomateriales por distintos tipos de interacción, como los péptidos beta-anulares o las hélices enrolladas, muchos de ellos capaces de formar heterodímeros de alta afinidad (Bromley et al., 2009; Gradišar y Jerala, 2010; Matsuura, 2013; Ramakers et al., 2014). El par de hélices enrolladas E-coil/K-coil (Figura 1.4) es uno de los más conocidos (Litowski y Hodges, 2002; De Crescenzo et al., 2003).

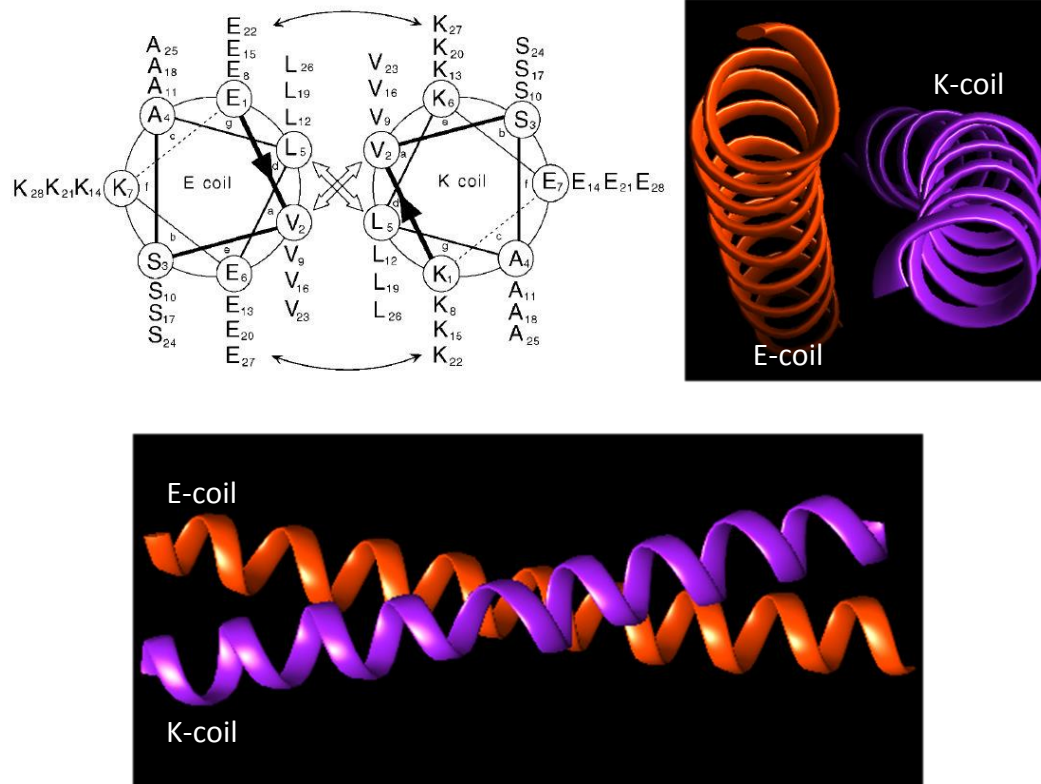


Figura 1.4. Representación helicoidal de un heterodímero E-coil / K-coil, con cuatro repeticiones de las heptadas correspondientes a cada péptido. Las flechas vacías indican interacciones hidrófobas entre las dos hélices. Las flechas enteras indican las interacciones iónicas entre los pares E/K (Glu/Lys) que rodean el núcleo hidrófobo (Litowski y Hodges, 2002).

También existen otros elementos biocompatibles que podrían ser utilizados para formar heterodímeros a pesar de que no existen reportes de su uso con este fin. Un ejemplo de este tipo de sistemas es el conformado por las proteínas fluorescentes utilizadas durante los análisis de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) (Kodama y Hu, 2010). En estos análisis se utilizan dos fragmentos de una misma proteína fluorescente con la intención de monitorear *in vivo* interacciones de tipo proteína-proteína. Cuando estos fragmentos se encuentran distantes uno del otro, carecen de fluorescencia. Sin embargo, cuando hay cercanía y se suscita la complementariedad entre ellos, la proteína nuevamente fluoresce (Figura 1.5).

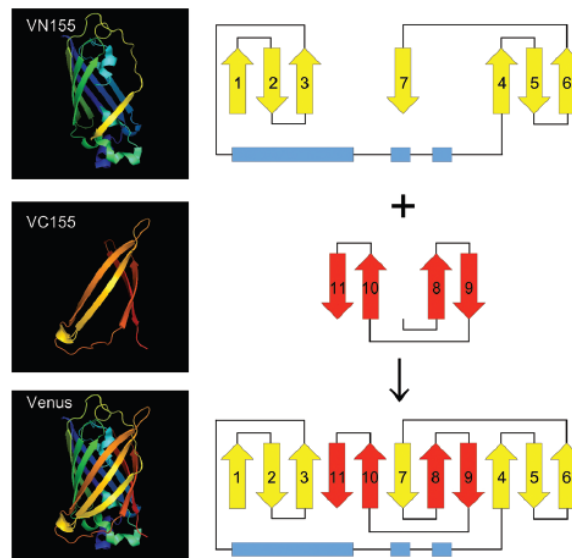


Figura 1.5. Modelo tridimensional y topología estructural de la proteína fluorescente venus. En color amarillo el fragmento N que corresponde a la región donde se ubica el extremo N-terminal de la proteína venus y en color rojo el fragmento C que corresponde a la región donde se ubica el extremo C-terminal de la misma proteína (Kodama y Hu, 2010).

Si se logran construir estas estructuras supramoleculares, es posible que en un futuro cercano se pueda aprovechar la modularidad de las VLPs para diseñar y obtener agrupaciones específicas de estas partículas con distintas funcionalidades. Estas, a su vez, podrán estar asociadas a compuestos de interés biomédico o biotecnológico que se encuentren dentro y/o fuera de las partículas (Figura 1.6). Cabe destacar que este principio sería aplicable a todas aquellas VLPs capaces de ensamblarse *in vitro*, lo cual permitiría incluso obtener partículas complejas a partir de VLPs de distintos virus, con distintos tamaños y diferentes propiedades químicas en la superficie y en su interior. Estos nuevos materiales podrían ser utilizados como vectores complejos para la entrega sitio-específica y simultánea de fármacos, proteínas y ácidos nucleicos a cada célula o tejido que así lo requiera, tanto para fines médicos como de investigación. Pareciera que el número de combinaciones, la diversidad de contenidos y la cantidad de superficies que pueden ser funcionalizadas es lo suficientemente grande para estudiar un gran número de procesos celulares y/o para atacar aquellas patologías cuya etiología se conozca a nivel molecular.

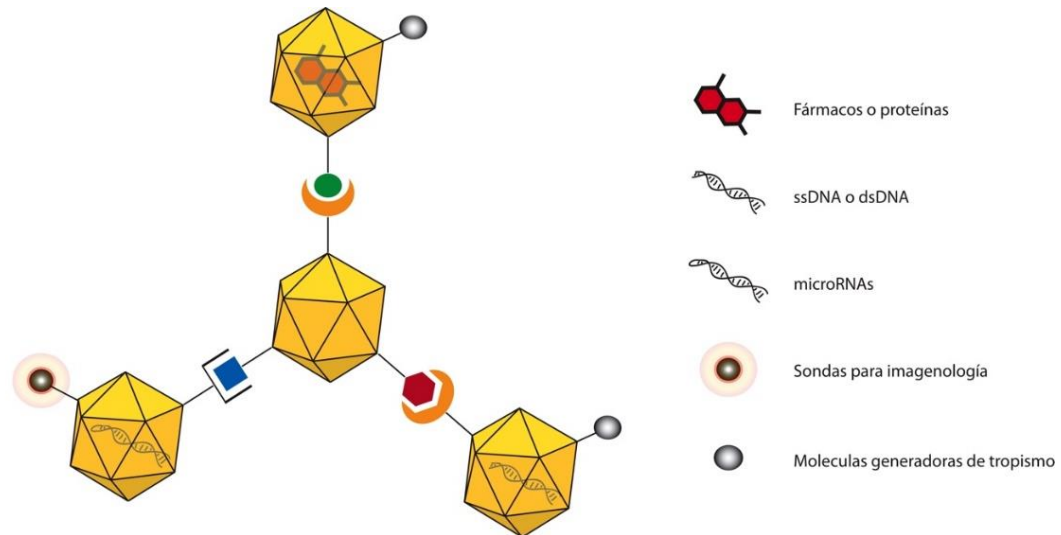


Figura 1.6. Caricatura de una partícula compleja formada a partir de VLPs híbridas con distintos contenidos en función del uso que se le quiera dar. La estrategia propuesta en este proyecto podría generar partículas de este tipo en un futuro no lejano.

En este trabajo seguimos dos estrategias para la formación de multi-VLPs; fusionamos fragmentos de la proteína fluorescente venus (Kodama y Hu, 2010) a los extremos N-terminales de la proteína VP2 para formar al menos un heterodímero de VLPs mediado por esta proteína, y en una segunda aproximación fusionamos los tectones E5 y K5, también en el extremo N-terminal de la proteína VP2, con el fin de obtener nuevas partículas supramoleculares a partir de VLPs formadas con estas quimeras.

Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- La presentación de elementos heterodimerizantes en la superficie de VLPs, permitirá la asociación específica entre este tipo de partículas y la obtención de un nanobiomaterial con nuevas características supramoleculares.

Objetivo general

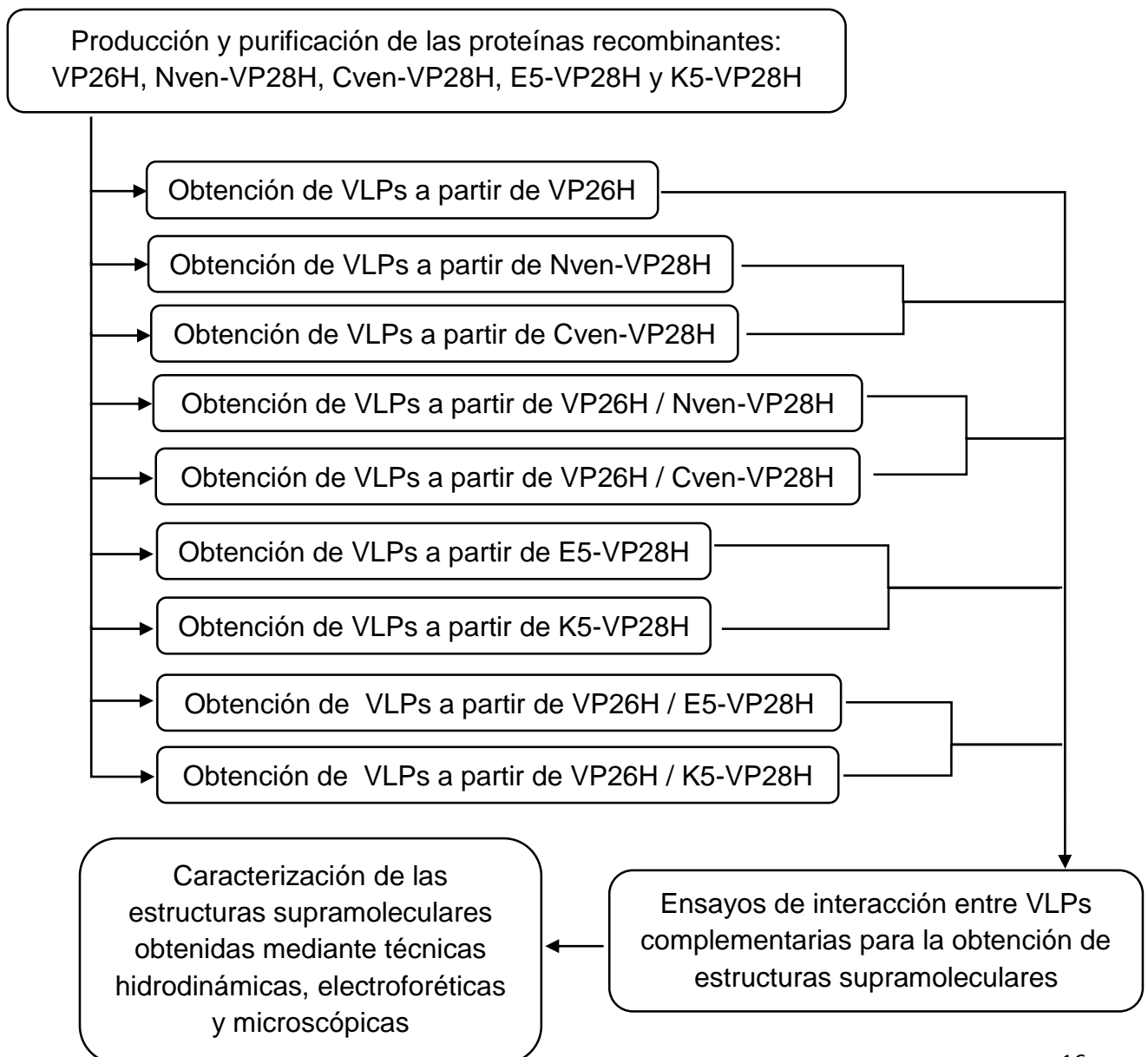
- Construir nuevos biomateriales a través de interacciones específicas entre elementos heterodimerizantes presentados en la superficie de VLPs.

Objetivos particulares

- Producir y purificar VP2 y las quimeras de esta proteína fusionadas a elementos heterodimerizantes.
- Ensamblar VLPs a partir de VP2 y a partir de las quimeras diseñadas, así como mezclas de VP2 con cada quimera.
- Obtener arreglos supramoleculares a partir de las VLPs ensambladas, mediante interacciones específicas producidas a través de fragmentos heterodimerizantes complementarios.
- Caracterizar los arreglos supramoleculares obtenidos mediante técnicas hidrodinámicas, electroforéticas y microscópicas.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1 Esquema general de trabajo



3.2 Materiales

3.2.1 Reactivos químicos

Reactivo	Marca
Acetato de Potasio	Sigma
Ácido acético glacial	Sigma
Ácido bicinconínico (BCA)	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	Sigma
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	Sigma
Agar LB (Luria-Bertani)	Difco
Agarosa UltraPure™	Invitrogen
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Azul brillante R-250	Sigma
Bromuro de Etidio	Sigma
Clorhidrato de Guanidina (GdnHCl)	J.T. Baker
Cloruro de Cesio (CsCl)	Sigma
Cloruro de Potasio (KCl)	Sigma
Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma
Dodecilsulfato de Sodio (SDS)	Sigma
Etanol	Sigma
Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma
Fosfato de Sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Sigma

Fosfato de Sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	Sigma
Glicerol	Gibco BRL
Hidróxido de Sodio (NaOH)	Sigma
Imidazol	Fluka
Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)	Sigma
L-Arginina	Sigma
Medio LB (Luria-Bertani)	Sigma
Metanol	Química Delta
Membrana para diálisis	Sigma
Matriz para cromatografía de afinidad	Protino™ Ni-TED
Matriz para cromatografía de exclusión molecular	Sephacryl S-500 HR
Sulfato de Níquel (NiSO ₄)	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma
Tritón X-100	Sigma
Urea	Sigma
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Sigma
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

3.2.2 Instrumentos y equipos

Instrumento o equipo	Marca
Balanza analítica <i>BP 221S</i>	Sartorius
Baño refrigerante	Hoefer Scientific Instruments
Centrífuga refrigerada <i>RC 6+</i>	Thermo Scientific-Sorvall

Centrífuga refrigerada 5702 R	Eppendorf
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Waters
Electroporador MicroPulser™	Bio Rad
Espectrofotómetro CARY 400	Varian
Fuente de Poder PS 500XT	Hoefer Scientific Instruments
Micro centrífuga refrigerada 5418	Eppendorf
Micro pipetas (5, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf / Gilson
Microscopio de fuerza atómica	Veeco Instruments Inc.
Potenciómetro pH 700	Oakton
Sonicador CPX 750	Cole Parmer
Trans-iluminador UV T1203	Sigma
Termomixer confort	Eppendorf
Ultra centrífuga Optima™ XL-100K Class S	Beckman
Vortex	
Zetasizer µV	Malvern Instruments

3.2.3 Cepa utilizada

Cepa	Genotipo	Fuente y referencia
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F</i> ⁻ <i>ompT</i> ⁻ <i>hsdS_B</i> (<i>rb</i> ⁻ <i>mb</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (<i>λ</i> <i>clts857 ind Sam7 nin5 lacUV5-T7</i> <i>gene1</i>)	Novagen [Studier y Moffatt, 1986]

3.3 Métodos

3.3.1 Diseño de las proteínas quiméricas

La incorporación de los dos sistemas heterodimerizantes constituidos por fragmentos complementarios se realizó mediante el diseño *in silico* de las construcciones que corresponden a las proteínas quiméricas Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H (Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4). Para ello se emplearon como referencia las estructuras cristalográficas 1S58 de la proteína VP2 del parvovirus B19 (Kaufmann et al., 2004) y 1MYW de la proteína amarilla fluorescente “venus” (Rekas et al., 2002), ambas previamente depositadas en el PDB (Protein Data Bank); además de las secuencias de las hélices E5 y K5 reportadas por De Crescenzo y colaboradores (2003). Las dos construcciones que incorporan el sistema venus cuentan de manera independiente con los fragmentos complementarios N- y C-terminal de la proteína venus. Por otro lado, las dos construcciones restantes que cuentan con el sistema “*coiled-coils*” poseen de manera independiente cada uno de los fragmentos complementarios que constituyen las hélices E5 y K5. Las cuatro proteínas quiméricas poseen una secuencia espaciadora en la región que corresponde al extremo N-terminal de la proteína VP2. Esta secuencia, que está constituida por ocho a doce residuos de los aminoácidos Glicina y Serina se concibió con la finalidad de favorecer la movilidad de los fragmentos complementarios una vez que se encuentren expuestos en la superficie de las VLPs. Finalmente, cada una de las cuatro construcciones cuenta con una etiqueta formada por ocho residuos de Histidina cuya finalidad es facilitar el proceso de purificación por cromatografía de afinidad. La síntesis de los genes que corresponden a las cuatro proteínas quiméricas fue realizada por un laboratorio externo (Epoch Life Science Inc.). El proveedor del servicio también clonó cada uno de los genes por separado y de manera independiente en el plásmido pET22b+.

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGELEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTLGYGLQCFARY
 PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNSH
 NYYITAGSGSGSGSGSGGMTSVNSAEASTGAGGGGSPVKSMSWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYK
 VFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSAPDALTVTISEIAVKDVT
 DKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLAS
 EESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHED
 HAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGAINAISHG
 QTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQL
 WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLLVQYAVGIMTVTMTFKLGLRKATG
 RWNPPQGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRRHGFEEKPEELWTAKS RVHPLEHHHHHHHHH

Figura 3.1. Secuencia de aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína Nven-VP28H. En color azul la secuencia que corresponde al fragmento N-venus; en color verde la secuencia del espaciador, en color negro la secuencia que corresponde a VP2 y en color café la etiqueta de ocho residuos de Histidina.

MDKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDMVLEFVTA
 AGITLGMDELYKGGSGSGSGSGGMTSVNSAEASTGAGGGGSPVKSMSWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYD
 PEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSAPDALTVTISEI
 AVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISG
 DSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFR
 SLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGI
 NAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRALH
 YESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLLVQYAVGIMTVTMTFKLGLR
 KATGRWNPPQGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRRHGFEEKPEELWTAKS RVHPLEHHHHHHHHH

Figura 3.2. Secuencia de aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína Cven-VP28H. En color amarillo la secuencia que corresponde al fragmento C-venus; en color verde la secuencia del espaciador, en color negro la secuencia que corresponde a VP2 y en color café la etiqueta de ocho residuos de Histidina.

MGEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKGGSGSGGMTSVNSAEASTGAGGGGNSPVKSMWSEGA
TFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQ
HLIENYGSAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGGQDTLAPELPIWVYF
PPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNP
LYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRP
GPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQQYT
DQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITT
LVQYAVGIMTVMTFKLGRLKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGFEEKPEELWTAKS
RVHPLEHHHHHHHH

Figura 3.3. Secuencia de aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína E5-VP28H. En color morado la secuencia que corresponde al fragmento E5-; en color verde la secuencia del espaciador, en color negro la secuencia que corresponde a VP2 y en color café la etiqueta de ocho residuos de Histidina.

MGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGGSGSGGMTSVNSAEASTGAGGGGNSPVKSMWSEGATFSANS
VTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQH
LIENYGSAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSK
KLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQP
QNFMPGPLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRP
GPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQQYT
DQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITT
LVQYAVGIMTVMTFKLGRLKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGFEEKPEELWTAKS
RVHPLEHHHHHHHH

Figura 3.4. Secuencia de aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína K5-VP28H. En color amarillo la secuencia que corresponde al fragmento K5-; en color verde la secuencia del espaciador, en color negro la secuencia que corresponde a VP2 y en color café la etiqueta de ocho residuos de Histidina.

3.3.2 Obtención de células transformantes de *E. coli* BL21(DE3)

Para la obtención de las células transformantes de *E. coli* BL21 (DE3) que permitió la posterior producción de las proteínas de interés se empleó el siguiente protocolo:

Protocolo

1. Se partió de plásmidos deshidratados, por lo que se procedió a adicionar a cada uno de ellos un volumen de 10 μ L de agua destilada y estéril.
 2. Los tubos que contienen 50 μ L de células electro-competentes de *E. coli* BL21 (DE3) se deben extraer del congelador que se encuentra a -70°C . En cada caso se colocaron 2 μ L de las soluciones que contienen los plásmidos en tubos independientes, cuidando en todo momento que las células se encuentren en baño de hielo.
 3. Una vez que las células competentes y los plásmidos fueron mezclados, se procedió a colocar todo el contenido en una celda para el proceso de electroporación. Para ello, la celda se colocó en la ranura del dispositivo electroporador y previa selección de las condiciones (Ec2 2.5 kV) se activó el equipo para generar el pulso eléctrico. Es recomendable que la celda se mantenga fría durante el procedimiento.
 4. Se recuperó el contenido de la celda y se colocó en un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 mL. Posteriormente se adicionaron 500 μ L de medio SOC y el tubo se colocó durante 1 hora en la incubadora con agitación orbital a 250 r.p.m. y 37°C de temperatura.
 5. Después de la etapa de recuperación se procedió a inocular una placa Petri con medio sólido LB-Amp utilizando 50 μ L de las células. Es recomendable utilizar perlas de vidrio para distribuir el medio de cultivo y así favorecer la obtención de colonias aisladas. Las placas se introducen a la incubadora invirtiendo la posición y manteniendo una temperatura de 37°C durante 12 h.
 6. Al día siguiente se procedió a seleccionar colonias aisladas para verificar la sobreexpresión de las proteínas de interés.
-

Para verificar la sobreexpresión de las proteínas de interés se realizó una serie de ensayos empleando 10 mL de medio de cultivo LB-Amp e IPTG como agente inductor en una concentración de 0.25 mM. Después de constatar la presencia de las proteínas quiméricas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), se procede a elaborar una nueva serie de inóculos preparados a partir de glicerol y de medio de cultivo con una DO_{600} de 0.6 (50% v/v). Los inóculos recién obtenidos se almacenaron a -70°C hasta que fueron utilizados.

3.3.3 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H

Las condiciones de sobreexpresión para la proteína VP26H fueron reportadas por Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2012). Estas condiciones fueron empleadas como referencia para desarrollar el protocolo que se utilizó para obtener la sobreexpresión de las proteínas VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H y E5-VP28H. El protocolo se detalla a continuación:

Protocolo

1. Se preparó un preinóculo (10 mL de medio LB-Amp) a partir de 100 μ L de las células que se encuentran en glicerol (50% v/v) a -70°C . El tubo con medio de cultivo se incubó a 37°C y con agitación orbital a 220 r.p.m. durante 12 h.
 2. Se inoculó un matraz con capacidad de 1 litro que contenía 400 ml de medio LB-Amp adicionando los 10 mL de preinóculo obtenidos previamente. Se incubó durante 3 h a una temperatura de 37°C y con agitación orbital de 220 r.p.m.
 3. Para escalar la generación de biomasa se inoculó un matraz con capacidad de 2 litros que contenía 1 litro de medio LB-Amp con los 410 ml de medio de cultivo obtenidos previamente y se incubó a 37°C y con agitación orbital a 220 r.p.m.
 4. Al inicio de la fase exponencial (DO_{600} de 0.6 a 0.8) se añadieron 1410 μ L de una solución de IPTG 0.25 M. La concentración final de agente inductor en el medio de cultivo debe ser de 0.25 mM. Inmediatamente se modificaron las condiciones de incubación para establecer una temperatura de 30°C y agitación orbital de 150 r.p.m. durante un periodo de tiempo de 16 h. En el caso de la proteína quimérica K5-VP28H la temperatura empleada durante la etapa de sobreexpresión es de 37°C .
 5. Posteriormente se recuperó la biomasa por centrifugación a 5000 r.p.m. por 20 min a 10°C y se determinó la presencia de las proteínas quiméricas mediante SDS-PAGE.
 6. La biomasa recuperada fue re-suspendida en solución salina (0.9% m/v) con la finalidad de retirar el medio de cultivo remanente. Posteriormente la biomasa se centrifugó nuevamente a 5000 r.p.m. durante 20 min a 5°C y se resuspendió nuevamente en solución salina. Es recomendable realizar dos ciclos de limpieza. Finalmente, la biomasa fue re-suspendida en 100 mL de la solución salina y se mantuvo en congelación a -70°C hasta su tratamiento para comenzar el protocolo de purificación.
-

3.3.4 Limpieza de cuerpos de inclusión

En trabajos previos (Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Sánchez-Rodríguez et al., 2015; Santillán-Uribe et al., 2015) se describe que la proteína VP26H y otras proteínas quiméricas basadas en la proteína VP2 tienden a formar cuerpos de inclusión durante la etapa de sobreexpresión en *E coli*. Esta tendencia continuó para todas las proteínas quiméricas empleadas en este trabajo. El protocolo empleado para la limpieza de los cuerpos de inclusión se desarrolló con base en trabajos anteriores (Le et al., 2008; Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

Protocolo

1. Se descongeló la biomasa empleando un baño con agua a 25°C y se recuperaron las células mediante centrifugación durante 15 min a 8000 r.p.m. y 5°C .
2. La biomasa recuperada fue resuspendida en 25 mL de solución amortiguadora ALCl (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0). Posteriormente la biomasa se recuperó de nuevo por centrifugación durante 15 min a 8000 r.p.m. y 5°C .

3. Las células recuperadas fueron resuspendidas empleando 40 mL de solución amortiguadora B_{LCI} (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% v/v Tritón-X100, pH 8.0). La siguiente etapa consistió en realizar la lisis celular y para ello se empleó un equipo sonicador. Fueron necesarios dos ciclos con duración de 10 min cada uno. Cada ciclo con pulsos de 20 s y pausas de 20 s empleando una potencia de 60 a 80 W. El producto de la lisis se centrifugó durante 20 min a 8000 r.p.m. y 5°C. Se descartó el sobrenadante y se recuperaron los cuerpos de inclusión.
4. Se realizó un ciclo de lavado de cuerpos de inclusión empleando 40 mL de solución amortiguadora B_{LCI} y el equipo sonicador. En esta ocasión sólo fue necesario realizar un ciclo con duración de 10 min. Cada ciclo con pulsos de 20 s y pausas de 20 s empleando una potencia de 60 a 80 W.
5. La suspensión de cuerpos de inclusión fue sometida a centrifugación durante 40 min a 10000 r.p.m. y 5°C. Se descartó el sobrenadante y se conservó la fracción insoluble.
6. La fracción obtenida previamente se solubilizó empleando 50 mL la solución amortiguadora C_{LCI} (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 2 mM DTT, 6 M Gdn-HCl, pH 6.3) para el caso de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H; en el caso de las fracciones insolubles de las proteínas Nven-VP28H y Cven-VP28H, se emplean 50 mL de la solución amortiguadora D_{LCI} (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 2 mM DTT, 3 M Gdn-HCl, pH 6.3). Para incrementar la solubilidad de las proteínas, todas las fracciones se mantuvieron en incubación durante 12 h a 30°C y agitación orbital de 200 r.p.m. Los agregados de proteína y remanentes de la pared celular fueron retirados mediante centrifugación a 10000 r.p.m. durante 20 min. Posteriormente, las soluciones de proteínas se almacenaron a temperatura ambiente hasta comenzar la etapa de purificación.

3.3.5 Purificación de las proteínas recombinantes

Todas las proteínas recombinantes que se emplearon para el desarrollo de este trabajo están provistas de una etiqueta constituida por residuos de Histidina que se encuentra localizada en el extremo C-terminal. Esta característica favorece su purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). La matriz que se utilizó durante el proceso (Protino[®] Ni-TED) cuenta con iones de Níquel inmovilizados en su estructura que presentan elevada afinidad por los residuos de Histidina. El protocolo empleado se muestra a continuación:

Protocolo

1. Para reducir la probabilidad de contaminación entre proteínas es conveniente utilizar una columna para cada una de ellas y realizar todo el proceso de manera independiente. Los sistemas empleados poseen un volumen de columna equivalente a 20 mL y su funcionamiento depende de la gravedad. Generalmente se utilizan de 4 a 6 g de la resina Protino[®] Ni-TED para ocupar dicho volumen.
2. La matriz de la columna fue equilibrada empleando 30 mL de la solución amortiguadora A_{pu} (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 2.5 % v/v Glicerol, pH 7.5).
3. Se adicionaron a la columna 5 mL de la solución de cuerpos de inclusión solubilizados y se procedió a colectar el volumen muerto que en éste sistema equivale a 10 mL. Después de colectar el volumen muerto es recomendable colectar el frente de elución.
4. La siguiente etapa consistió en adicionar a la columna 20 mL de la solución amortiguadora B_{pu} (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 7.5).

-
5. Cuando la solución B_{pu} que se encontraba presente en el reservorio estaba por terminarse se agregaron al sistema 20 mL de la solución amortiguadora C_{pu} (50 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 15 mM Imidazol, pH 7.5).
 6. Cuando la solución C_{pu} que se encontraba presente en el reservorio estaba por terminarse se agregaron al sistema 15 mL de la solución amortiguadora D_{pu} (50 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5).
 7. Cuando la solución D_{pu} que se encontraba presente en el reservorio estaba por terminarse se agregaron al sistema 10 mL de la solución amortiguadora E_{pu} (50 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 7.5).
 8. Finalmente, cuando la solución E_{pu} estuvo por concluir su paso por el reservorio, se adicionan 30 mL de la solución amortiguadora F_{pu} (50 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 0.3 M Imidazol, pH 7.5). Simultáneamente se comenzó a cuantificar el volumen muerto para que cuando éste haya alcanzado los 10 mL que le corresponden, se comience a colectar la proteína de interés en fracciones de 4 mL aproximadamente.
 9. Se analizaron las fracciones coleccionadas mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las fracciones donde la cantidad y pureza de la proteína fueron elevadas se juntaron y concentraron empleando unidades de filtración Amicon® Ultra-15 Ultracel-50K con un límite nominal de peso molecular equivalente a 50,000 Dalton.
 10. Finalmente, después de haber concluido el proceso de concentración de la proteína se realizó el cambio de la solución amortiguadora F_{pu} por una solución amortiguadora denominada G_{pu} (20 mM Tris-HCl, 0.15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM de DTT, Gdn-HCl 5 M, pH 8). Este cambio de la solución amortiguadora busca eliminar la presencia de Imidazol y preservar a las proteínas en condiciones apropiadas para su posterior uso durante los ensambles.
-

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm. Se empleó como referencia una curva de calibración obtenida a partir de disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA) solubilizadas en la solución amortiguadora G_{pu} . Todos los puntos de la curva fueron preparados por triplicado, con un volumen final de 1000 μ L y concentraciones desde 100 μ g/mL hasta 1 mg/mL. Las muestras fueron preparadas de manera simultánea y bajo las mismas condiciones empleadas para la curva.

3.3.6 Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs

Como se plantea en el esquema general de trabajo, se realizaron múltiples ensayos para la obtención de VLPs monoproteicas y VLPs diproteicas a partir de combinaciones y proporciones definidas entre las proteínas VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H. Todos los ensayos donde se alcanzaron las condiciones para que ocurriera el ensamble de proteínas y la subsecuente obtención de VLPs se llevaron a cabo mediante la diálisis del agente desnaturizante frente a alguno de tres tipos de solución

amortiguadora: PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4); PBS_{Arg} (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.2 M L-Arginina, pH 7.4); PBS2x_{Arg} (274 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄, 4 mM KH₂PO₄, 0.2 M L-Arginina, pH 7.4). El proceso de diálisis ocurrió durante un periodo de 40 h y a una temperatura de 5°C. El contenido de los sacos de diálisis se preparó a partir de soluciones cuya concentración de proteína era conocida. En todos los casos se ajustó la concentración de proteína a 0.7 mg/mL y un volumen final de 1.5 mL empleando para ello solución amortiguadora G_{pu}.

3.3.7 Caracterización de VLPs y estructuras supramoleculares mediante DLS

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), es una técnica hidrodinámica que puede ser empleada para determinar el perfil de la distribución de tamaño y masa que presentan algunos materiales en solución. Dentro de las principales aplicaciones se pueden encontrar la caracterización de polímeros, micelas, carbohidratos, proteínas y nanopartículas. Con base en esto, las partículas tipo virus y los arreglos supramoleculares obtenidos durante el desarrollo de este trabajo se analizaron en un equipo para DLS modelo Zetasizer μ V (Malvern Instruments). Los parámetros del análisis se fijaron en 1.33 para el índice de refracción, 1.003 cP para la viscosidad y 20°C para la temperatura. Se utilizó una celda de cristal con capacidad para contener un volumen de 500 μ L. Los volúmenes de muestra analizados se fijaron en 300 μ L con una concentración de proteína de 0.2 a 0.4 mg/mL.

Las muestras que fueron analizadas por esta técnica se sometieron a diferentes tratamientos. En la primera etapa del proyecto donde se trabajó con las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H, las muestras fueron filtradas con cartuchos de tamaño de poro de 2 μ m y posteriormente con cartuchos de tamaño de poro de 0.22 μ m, todo ello previo al análisis por DLS. En la segunda etapa del proyecto donde se trabajó con las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H se incorporó al tratamiento de las muestras una etapa cromatográfica preparativa previa a la caracterización por DLS. Todas las muestras

que fueron tratadas por cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés) ya no fueron filtradas con los cartuchos descritos previamente. Cada muestra fue analizada mediante cinco ciclos, cada ciclo constituido de 10 determinaciones con un intervalo de 10 s entre cada determinación.

3.3.8 Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica

La centrifugación isopícnica es una técnica que permite separar moléculas y/o partículas con base en la densidad que éstas poseen al encontrarse en un medio continuo. El equilibrio entre la fuerza centrífuga y la fuerza de difusión provocan que los analitos se concentren en la región del gradiente donde su densidad se iguala con la densidad de la solución que los rodea. Durante el proceso *in vitro* que se emplea para la obtención de VLPs a partir de la proteína VP26H existen fenómenos asociados a las características intrínsecas de la proteína VP2 que favorecen la agregación de la proteína y de las VLPs recién formadas. Esta técnica permite constatar la formación de VLPs ya que gracias a ella es posible distinguir y separar a las VLPs de las especies intermediarias y de los agregados de proteína.

Los gradientes continuos se formaron a partir de una solución de CsCl con densidad de 1.33 mg/mL. Para preparar esta solución se utilizaron 40.8 g de CsCl que fueron solubilizados en 79.22 mL de la solución amortiguadora de gradiente A_{gra} (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, 0.5% v/v de Tritón X-100, pH 7.4). En cada tubo para centrífuga con capacidad para contener 5 mL de solución (Ultra-Clear Beckman 11 x 60 mm) se colocaron 3.5 mL de la solución amortiguadora A_{gra} y posteriormente 500 μ L de la solución que contiene a las VLPs. El proceso de ultracentrifugación se llevó a cabo empleando un rotor del tipo 60 Ti en un equipo Optima™ XL-100K Class S, ambos de la marca Beckman. Las condiciones del proceso se fijaron en 55,000 r.p.m. a una temperatura de 20°C y durante un periodo de tiempo de 10 h y 45 min. Las bandas generadas por efecto de la formación del gradiente fueron recuperadas y sometidas a un proceso de diálisis previa a la caracterización.

3.3.9 Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular

Durante la segunda etapa del proyecto en la que se trabajó con las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H para la obtención de VLPs cuya complementariedad se basara en el sistema “*coiled-coils*” se decidió implementar un mecanismo para separar las VLPs recién formadas de especies intermediarias y agregados de proteína. Para este propósito se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de la marca Waters. La columna que se utilizó fue empacada con la fase estacionaria denominada Sephacryl S-500 HR. Se utilizó la solución amortiguadora PBS_{Arg} (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.2 M L-Arginina, pH 7.4) como fase móvil. El flujo de la etapa preparativa se mantuvo en 0.5 mL/min y se utilizó un detector UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 280 nm para dar seguimiento al progreso de la purificación. A partir del minuto 16 se inició la colección de las muestras en fracciones de 2.0 mL cada una, posteriormente cada una de éstas fue analizada mediante DLS para detectar la presencia de VLPs y confirmar el aislamiento de las mismas.

3.3.10 Análisis de VLPs y de estructuras supramoleculares mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel

En este trabajo se emplearon los ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA, por sus siglas en inglés) para poder identificar la presencia de interacciones entre VLPs con características complementarias. Dicha interacción propicia la formación de nuevas estructuras con características supramoleculares y perfil de movilidad electroforética diferentes. El análisis mediante EMSA se realizó en un gel constituido por dos capas. La capa inferior que sólo fungió como soporte mecánico para el gel se preparó a partir de una solución de agarosa al 1 % m/v, mientras que la capa superior se preparó a partir de una solución de agarosa al 0.4% m/v. En ambos casos se empleó la solución amortiguadora de corrida GAE (40 mM Glicina, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 9.0) para solubilizar la agarosa. Los pozos sólo se formaron en la capa superior del gel. Cada muestra fue obtenida a partir de 600 µL de VLPs y fueron concentradas hasta un volumen

de 25 μL . A esos 25 μL de VLPs se le adicionaron 15 μL de amortiguador de carga (20% glicerol, 0.2% azul de bromo fenol, 120 mM Tris-base) y se cargaron 30 μL en el gel.

3.3.11 Análisis de VLPs y de estructuras supramoleculares por microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una poderosa herramienta que permite caracterizar materiales con dimensiones en la escala nanométrica. Las muestras que fueron analizadas por ésta técnica se filtraron empleando unidades de la marca Millipore con tamaño de poro de 0.22 μm . Se colocaron 30 μL de la solución remanente en la superficie de un disco de mica grado V1 de 12 mm de diámetro (Ted Pella Inc.). Posteriormente las muestras se llevaron a sequedad en condiciones de presión reducida y temperatura de 25°C. Con el propósito de eliminar los cristales formados por la presencia de sales en las soluciones amortiguadoras empleadas durante el proceso de ensamble, se realizaron dos ciclos subsecuentes de limpieza con agua desionizada que previamente fue filtrada con cartuchos de 0.22 μm . Finalmente, las muestras fueron llevadas nuevamente a sequedad en condiciones de presión reducida y una temperatura de 25°C y la mica fue adherida a un disco magnético. Los análisis se llevaron a cabo en un microscopio de sonda de barrido Innova™ (Veeco Instruments Inc.) que cuenta con una sonda de barrido de alta resolución HiRes-C19/Cr-Au (MikroMasch). Estas sondas tienen un radio de punta de 1 nm, constantes de fuerza promedio de 0.5 N/m y una media de frecuencias de resonancia de 65 kHz. Todas las imágenes fueron generadas utilizando el modo táctil.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Diseño de las proteínas quiméricas

Como se describe en el apartado de métodos, los diseños de las proteínas quiméricas se realizaron con el apoyo de los modeladores computacionales PyMOL y UCSF Chimera. Las secuencias e información estructural se obtuvieron de la base de datos del PDB y a partir de los datos reportados por Rekas y col. (2002) y De Crescenzo y col. (2003). Las proteínas quiméricas Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H comparten tres características estructurales: a) Los sistemas heterodimerizantes constituidos por fragmentos complementarios se encuentran ubicados en la región que corresponde al extremo N-terminal de la proteína; b) Todos los diseños cuentan con una secuencia espaciadora constituida por residuos de los aminoácidos Glicina y Serina. Esta secuencia espaciadora une al componente del sistema heterodimerizante con la secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína VP2 y le brinda movilidad a la región del extremo N-terminal; c) En la región que corresponde al extremo C-terminal se encuentra incorporada una etiqueta de residuos de Histidina que facilitará la etapa de purificación (Figura 4.1).

Después de concluir la etapa de diseño para la obtención de las proteínas quiméricas Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H, la información de las secuencias fue enviada a un laboratorio externo (Epoch Life Science, Inc.) para que éste llevase a cabo la síntesis química y la clonación de forma independiente en vectores pET22b+ (Figura 4.2).

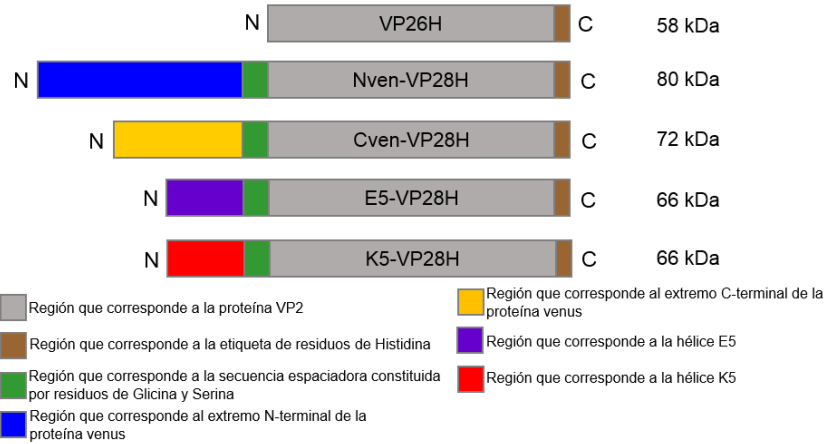


Figura 4.1 Diagramas de las construcciones que corresponden a las proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo. En el extremo superior derecho se indica la masa molecular teórica.

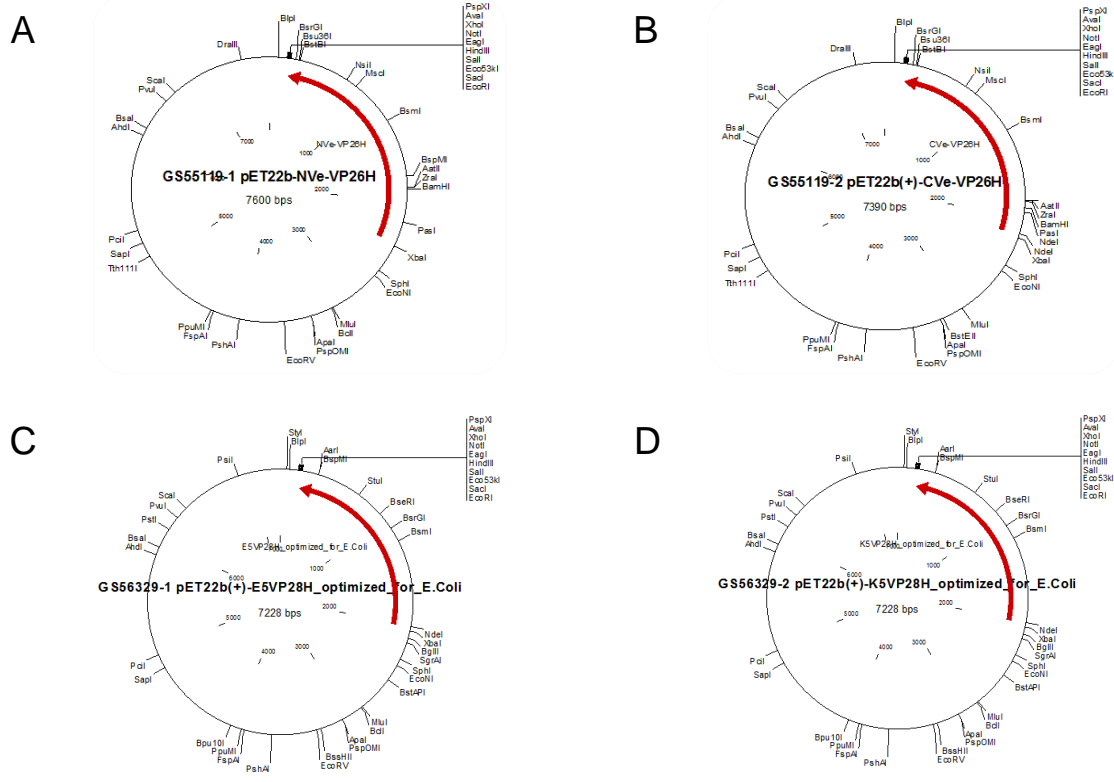


Figura 4.2. Plásmidos que fueron empleados para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) y que contienen la secuencia para la expresión de las proteínas quiméricas: A) Nven-VP28H; B) Cven-VP28H; C) E5-VP28H y D) K5-VP28H.

4.2 Obtención de células transformantes de *E. coli* BL21(DE3)

Después de concretar las etapas de electroporación, recuperación y crecimiento, se realizó la selección de colonias aisladas a partir de placas de Petri con Medio LB-Amp. La sobreexpresión de las proteínas de interés se verificó mediante una serie de ensayos empleando 10 mL de medio de cultivo LB-Amp e IPTG como agente inductor en una concentración de 0.25 mM. Después de constatar la presencia de las proteínas quiméricas mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, se procedió a elaborar una nueva serie de inóculos. Estos fueron preparados a partir de glicerol y de medio de cultivo con una DO_{600} de 0.6 (50% v/v). Los inóculos recién obtenidos se almacenaron a -70°C hasta que fueron utilizados.

4.3 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H

Para obtener cada una de las proteínas recombinantes se dio seguimiento al protocolo descrito en la sección 3.3.3. En todos los casos se empleó IPTG como agente inductor en una concentración final de 0.25 mM. El periodo de inducción transcurrió a 30°C y 150 rpm para las proteínas VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y a 37°C con agitación orbital de 150 rpm para la proteína K5-VP28H ya que bajo estas condiciones se obtuvieron mejores niveles de sobreexpresión. En todos los casos el tiempo de inducción fue de 16 h. Una vez que concluyó el periodo de inducción se muestrearon los medios de cultivo para obtener una pequeña cantidad de células y comprobar el nivel de sobreexpresión alcanzado. Para ello se realizó un análisis de los lisados celulares mediante SDS-PAGE. En el panel A de la Figura 4.3 se puede apreciar que ocurrió la sobreexpresión de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H. Las masas moleculares de 58 kDa, 80 kDa y 72 kDa respectivamente, corresponden con lo esperado. En el panel B de la Figura 4.3 se puede apreciar que ocurrió la sobreexpresión de las proteínas E5-VP28H y K5-VP28H. Las masas moleculares de éstas últimas corresponden a los 66 kDa estimados. A pesar de que los niveles de sobreexpresión de las proteínas E5-VP28H y K5-VP28H

son ligeramente inferiores en comparación a las otras tres proteínas recombinantes, resultaron suficientes para el desarrollo del proyecto.

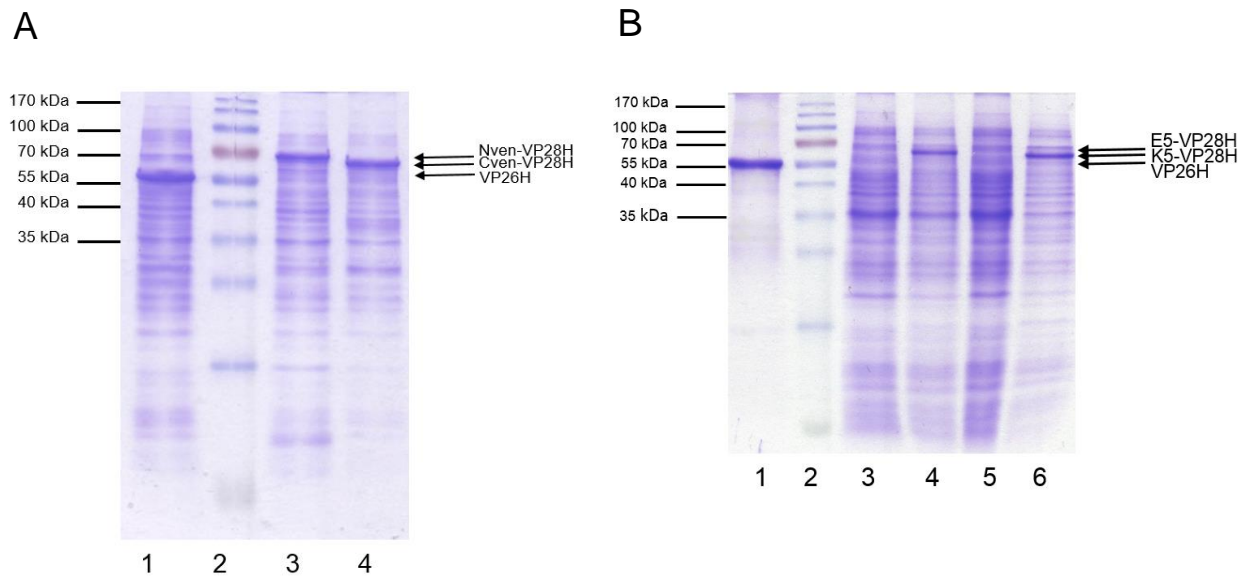


Figura 4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida obtenidos bajo condiciones desnaturalizantes donde se muestra la sobreexpresión de las proteínas de interés. A) Carril 1 sobreexpresión de la proteína VP26H; carril 2 marcador de peso molecular; carril 3 sobreexpresión de la proteína Nven-VP28H; carril 4 sobreexpresión de la proteína Cven-VP28H. B) Carril 1 Proteína VP26H Purificada; carril 2 marcador de peso molecular; carril 3 lisados celulares previa inducción para obtener E5-VP28H; carril 4 sobreexpresión de la proteína E5-VP28H; carril 5 lisados celulares previa inducción para obtener K5-VP28H; Carril 6 sobreexpresión de K5-VP28H.

4.4 Purificación de las proteínas recombinantes VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H

La etapa de purificación para cada una de las cinco proteínas recombinantes comenzó después de concluir con el proceso de limpieza y solubilización de cuerpos de inclusión que se describe en la sección 3.3.4. Esta purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados. Se realizó el seguimiento de la presencia y nivel de pureza de las proteínas de interés mediante SDS-PAGE. Aquellas fracciones donde la cantidad y nivel de pureza fue elevado se juntaron y concentraron

mediante centrifugación a 4000 r.p.m. en unidades de filtración con un límite nominal de peso molecular equivalente a 50 kDa. Los resultados de la etapa de purificación se muestran en la figura 4.4. En los cinco casos se logró obtener un grado de pureza que es aceptable para los objetivos que se plantearon.

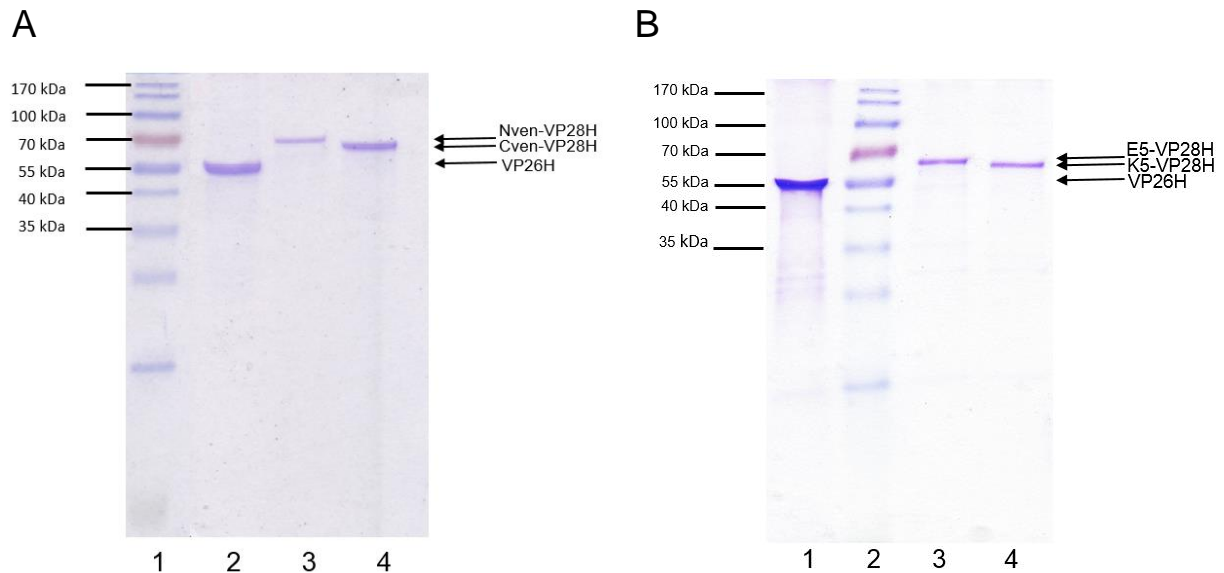


Figura 4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida obtenidos bajo condiciones desnaturalizantes donde se muestra el nivel de pureza de las proteínas de interés. A) Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, proteína VP26H purificada; carril 3, proteína Nven-VP28H purificada; carril 4, proteína Cven-VP28H purificada. B) Carril 1, Proteína VP26H purificada; carril 2, marcador de peso molecular; carril 3, proteína E5-VP28H purificada; carril 4, K5-VP28H purificada

En la tabla 4.1 se reúnen los datos del rendimiento alcanzado para cada proteína. El rendimiento de la proteína VP26H es consistente con los datos reportados por Sánchez-Rodríguez y col. (2012). El rendimiento de las proteínas Nven-VP28H y Cven-VP28H es similar al obtenido para la proteína VP26H, hecho que facilitó la obtención de proteína para realizar las siguientes etapas experimentales. El rendimiento de las proteínas E5-VP28H y K5-VP28H es menor en comparación al que presentaron las tres proteínas previamente mencionadas. Sin embargo, la cantidad de proteína que se obtuvo a partir de varios ciclos de producción resultó suficiente para alcanzar los objetivos planteados.

En la literatura existe un número creciente de trabajos que destacan el potencial que poseen los sistemas basados en hélices súper-enrolladas (De Crescenzo, et al., 2003; Le, et al., 2008; Thomas, et al., 2013; Assal, et al. 2015). Sin embargo, en algunos de ellos también se enfatizan las dificultades, inconvenientes y limitantes asociadas a los procesos de síntesis química y a las múltiples etapas de purificación que resultan indispensables para su obtención (Winkler y Tian, 2015; Riahi et al., 2016). Sin lugar a duda, las características que poseen las proteínas quiméricas E5-VP28H y K5-VP28H son únicas. Y a pesar de que de alguna forma resultan menos favorecidas para su producción en *E. coli* (si las comparamos con la proteína VP26H), su sobreexpresión y purificación pueden considerarse como un paso importante para el desarrollo de novedosos nanomateriales biocompatibles.

Tabla 4.1. Datos obtenidos a partir del cálculo del rendimiento alcanzado después de la purificación de las proteínas VP26H, Nven-VP28H, Cven-VP28H, E5-VP28H y K5-VP28H

Proteína	Concentración final (mg / mL)	Volumen de proteína obtenido (mL)	Rendimiento (mg proteína / litro de medio de cultivo)
VP26H	4.03 ±0.12	17	56.67
Nven-VP28H	4.79 ±0.22	11	43.59
Cven-VP28H	4.57 ±0.03	12	45.38
E5-VP28H	1.63 ±0.04	21	28.45
K5-VP28H	1.54 ±0.01	19	24.32

4.5 Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs

Los trabajos desarrollados por Sánchez-Rodríguez y col. (2012), Santillán-Urbe y col. (2015), y Morán-García y col. (2016) demuestran que la proteína VP26H y algunas otras proteínas quiméricas basadas en la proteína VP2 poseen la capacidad de replegarse en ausencia de agentes desnaturizantes y de autoensamblarse dando paso a la formación de VLPs. A partir de éste párrafo, los resultados obtenidos serán divididos en dos secciones para su análisis. La primera sección corresponderá a los resultados alcanzados a partir del trabajo desarrollado con las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H. La segunda sección contendrá el análisis de los resultados generados a partir del trabajo desarrollado con las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

4.5.1 Ensamble de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H

Como se describe en la sección 4.3.6, la obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H se llevó a cabo mediante la diálisis del agente desnaturizante frente a la solución amortiguadora PBS. El proceso de diálisis tuvo una duración de 40 h a una temperatura de 5°C. Las combinaciones y proporciones que se utilizaron en esta etapa se resumen en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Combinaciones y proporciones empleadas durante los experimentos de ensamble para la obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H.

	Combinación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	VP26H	Nven-VP28H	Cven-VP28H	VP26H:Nven-VP28H 19:1	VP26H:Cven-VP28H 19:1	VP26H:Nven-VP28H 17:3	VP26H:Cven-VP28H 17:3	Nven-VP28H:Cven-VP28H 1:1
Cantidad máxima de fragmentos heterodimerizantes que podrán quedar expuestos en la superficie	0	60	60	3	3	9	9	60

4.5.1.1 Caracterización de VLPs y estructuras supramoleculares mediante DLS

Después de haber concluido con la etapa de diálisis, todas las soluciones que contienen VLPs fueron filtradas con cartuchos que poseen un tamaño de poro de 2 µm y posteriormente con cartuchos de tamaño de poro de 0.22 µm. Esta etapa de filtración se aplicó con el propósito de reducir la presencia de agregados constituidos por partículas tipo virus y por especies intermediarias del proceso de ensamble. Los diagramas de la distribución de especies presentes en cada una de las soluciones se muestran en la figura 4.5.

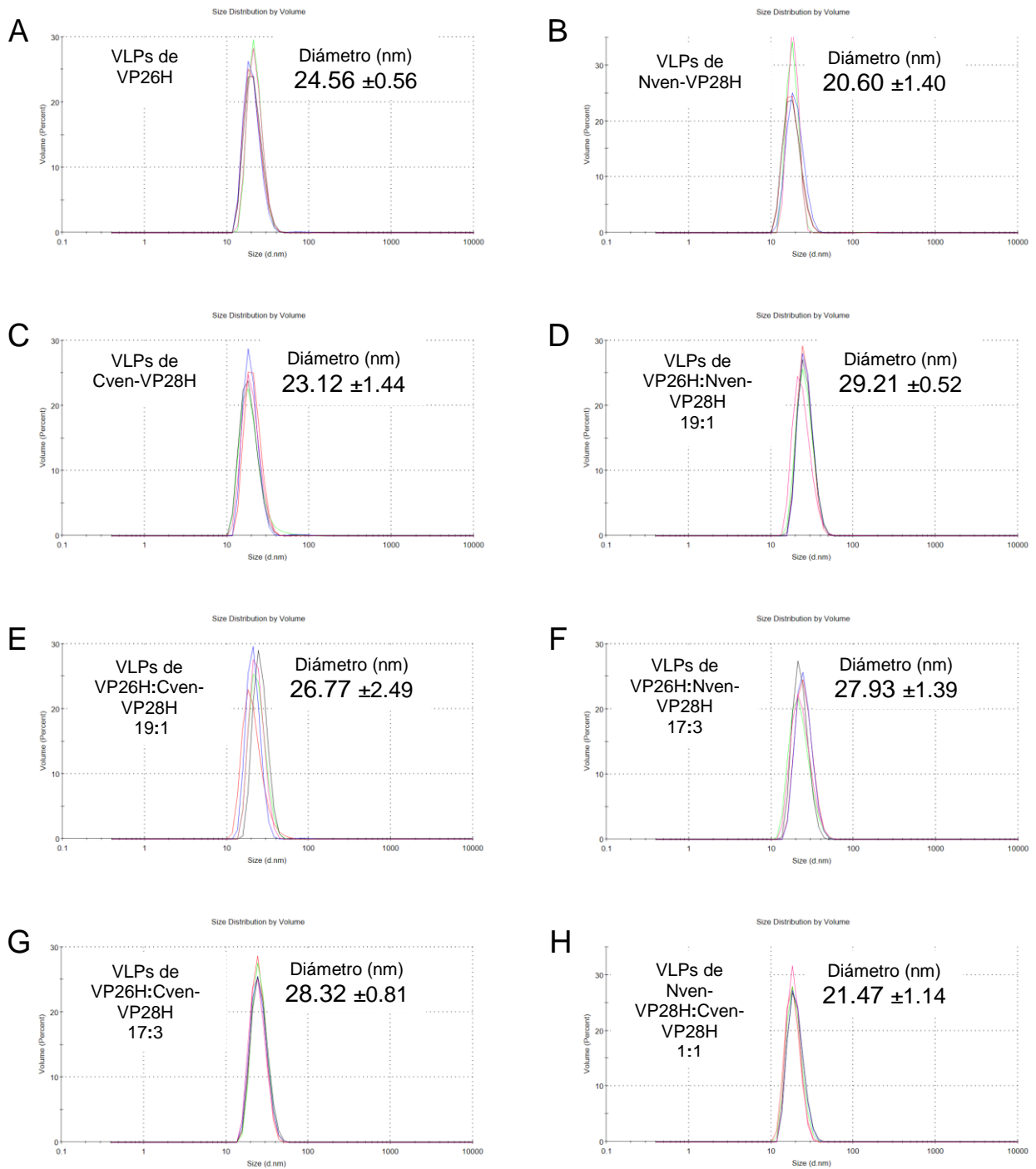


Figura 4.5. Análisis por DLS de las muestras obtenidas a partir de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H según las combinaciones y proporciones descritas en la tabla 4.2.

Tabla 4.3. Datos obtenidos a partir de la caracterización mediante DLS de las combinaciones empleadas durante los experimentos de ensamble para la obtención de VLPs empleando las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H.

	Combinación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	VP26H	Nven-VP28H	Cven-VP28H	VP26H:Nven-VP28H 19:1	VP26H:Cven-VP28H 19:1	VP26H:Nven-VP28H 17:3	VP26H:Cven-VP28H 17:3	Nven-VP28H:Cven-VP28H 1:1
Diámetro de las partículas obtenidas (nm)	24.56 ±0.56	20.60 ±1.40	23.12 ±1.44	29.21 ±0.52	26.77 ±2.49	27.93 ±1.39	28.32 ±0.81	21.47 ±1.14

Los viriones del eritroparvovirus I de primate y las VLPs obtenidas a partir de las proteínas que constituyen la cápside de éste, poseen un tamaño que oscila entre los 18 y 24 nm (Brown et al., 1991; Heegaard y Brown, 2002; Sánchez-Rodríguez et al., 2012 y 2015; Morán-García et al., 2016). En la tabla 4.3 se reúnen los resultados del análisis de las partículas que fueron obtenidas a partir de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H. Las combinaciones 1, 2 y 3, cuyas VLPs son monoproteicas, poseen diámetros de 24.56 ± 0.56 , 20.60 ± 1.40 y 23.12 ± 1.44 nm, respectivamente. Las combinaciones 4 y 6 cuyas VLPs son diproteicas poseen diámetros de 29.21 ± 0.52 y 27.93 ± 1.39 nm. Si comparamos estas dimensiones con dimensiones de las VLPs presentes en las combinaciones 1 y 2, podemos observar un incremento de hasta 8 nm. Este incremento puede ser el resultado de la exposición de los fragmentos heterodimerizantes del sistema venus en la superficie de las VLPs. Por otro lado, las combinaciones 5 y 7 cuyas VLPs poseen diámetros de 26.77 ± 2.49 y 28.32 ± 0.81 nm, respectivamente, siguen la tendencia mostrada por aquellas partículas tipo que virus obtenidas a partir de dos proteínas diferentes. Finalmente, la combinación 8, que posee VLPs obtenidas a partir de una proporción 1:1 de las proteínas Nven-VP28H y Cven-VP28H, presenta dimensiones similares a las obtenidas en los casos de las VLPs monoproteicas. Es probable que, dada la cantidad máxima de fragmentos heterodimerizantes (hasta 60) que pueden quedar expuestos, exista impedimento para que la región N-terminal de cada una de las proteínas quiméricas Nven-VP28H y Cven-VP28H que constituyen las VLPs converja en el eje de

simetría de orden 5 de la partícula tipo virus. Esta situación podría derivar en que la región N-terminal no quede expuesta en la superficie, dando como resultado tamaños de partículas como los que se observan para las combinaciones 1, 2, y 3. Particularmente en el caso de las combinaciones 2 y 3, donde también se esperaba un incremento en el tamaño de partícula. En conjunto, estos resultados indican que las combinaciones y proporciones empleadas en esta etapa dan como resultado la obtención de VLPs cuyos tamaños corresponden con los valores reportados en la literatura.

Las VLPs que se formaron a partir de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H fueron utilizadas para realizar los ensayos de interacciones entre partículas cuyos fragmentos heterodimerizantes eran complementarios. Los resultados obtenidos a través de la caracterización por DLS no mostraron la presencia de especies supramoleculares con un tamaño superior al característico de las VLPs. Por otro lado, también se realizaron análisis cualitativos mediante espectroscopía de fluorescencia para determinar la existencia de interacciones entre los fragmentos complementarios del sistema “venus”. Los espectros de emisión obtenidos no mostraron un aumento significativo en la señal (resultados no mostrados).

En conjunto, estos resultados indican que hasta el momento no se han encontrado las condiciones propicias para que ocurran las interacciones entre las VLPs obtenidas a partir de las proteínas VP26H, Nven-VP28H y Cven-VP28H. Es probable que la orientación que adquiere cada uno de los fragmentos complementarios una vez que quedan expuestos en la superficie de las VLPs juegue un papel determinante en el nivel de restricción que posee el sistema que se propone. Si este es el caso, no será suficiente que los fragmentos heterodimerizantes queden expuestos con un elevado grado de libertad, sino que además tendrán que adoptar una conformación y distribución espacial muy específica para que se suscite la interacción que se busca. También será necesario poner especial atención en la compatibilidad del sistema “venus” con cada una de las etapas del proceso para la obtención de este tipo de VLPs y replantear las estrategias utilizadas con el propósito de recabar mayor información que permita dilucidar las condiciones necesarias para obtener las estructuras supramoleculares que se desean obtener.

4.5.1.2 Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica

En análisis subsecuentes se utilizaron las partículas previamente obtenidas para realizar una caracterización más exhaustiva. Se realizaron análisis mediante ultracentrifugación isopícnica (resultados no mostrados) donde se confirmó la presencia de VLPs a partir de las proteínas empleadas en esta primera etapa del proyecto. Las bandas que corresponden a las VLPs fueron recuperadas y analizadas mediante SDS-PAGE. Se constató que las partículas estaban constituidas por las proteínas quiméricas empleadas durante el proceso de ensamble y que las proporciones que guardaban entre sí, correspondía con lo establecido en la tabla 4.3.

4.5.2 Ensamble de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H

En la sección 3.3.6, se describe el protocolo empleado para la obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H. Éste se llevó a cabo mediante la diálisis del agente desnaturizante frente a tres diferentes soluciones amortiguadoras (PBS, PBS_{Arg} y PBS_{2XArg}). El proceso de diálisis tuvo una duración de cuarenta horas a una temperatura de 5°C. Las combinaciones y proporciones que se utilizaron en esta etapa se resumen en la tabla 4.4. Las dos primeras condiciones de diálisis que fueron empleadas para la obtención de VLPs (frente a PBS y PBS_{Arg}) se definieron con base en lo reportado por Sánchez-Rodríguez y col. (2012). La tercera condición (diálisis frente a PBS_{2XArg}) se utilizó con la intención de disminuir la repulsión que puede ocurrir cuando las hélices que poseen las mismas características de carga (E5 o K5) convergen en el eje de simetría de orden cinco durante el proceso de ensamble de VLPs. Por otro lado, también se buscó reducir cierto nivel de afinidad que pudiera existir entre la región que corresponde a las hélices (E5 o K5) y alguna zona de la superficie interna de las VLPs. Aunque resulta extremadamente complejo poder predecir el efecto que tendrá el incremento en la fuerza iónica de la solución amortiguadora sobre la estructura de cada una de las proteínas quiméricas y posteriormente sobre el ensamble de estas proteínas para la obtención de VLPs, es plausible suponer que dicho incremento podría modificar algunos de los eventos que están relacionados con la cantidad de hélices que quedan expuestas en la superficie de cada una de las partículas obtenidas.

Tabla 4.4. Combinaciones y proporciones empleadas durante los experimentos de ensamble para la obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

	Combinación							
	9	10	11	12	13	14	15	16
	VP26H	E5-VP28H	K5-VP28H	VP26H:E5-VP28H 5:1	VP26H:K5-VP28H 5:1	VP26H:E5-VP28H 9:1	VP26H:K5-VP28H 9:1	VP26H:E5-VP28H:K5-VP28H 1:1:1
Diálisis frente a PBS	•			•	•	•	•	
Diálisis frente a PBS _{Arg}	•			•	•			•
Diálisis frente a PBS _{2xArg}	•	•	•					
Cantidad máxima de fragmentos heterodimerizantes que podrán quedar expuestos en la superficie	0	60	60	10	10	6	6	10

4.5.2.1 Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica

Se realizó la caracterización de las VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica según lo descrito en la sección 3.3.8. El segundo conjunto de combinaciones analizadas mediante esta técnica fueron las obtenidas de la diálisis frente a la solución amortiguadora PBS. La figura 4.6 muestra los gradientes de Cloruro de Cesio obtenidos después de la etapa de centrifugación. En ella se puede apreciar la presencia de dos bandas, este patrón es consistente con lo reportado por Sánchez-Rodríguez, 2012. La banda superior y de menor densidad (1.14 mg mL^{-1}) concentra a las especies intermediarias. Por otro lado, la región donde se observa la banda inferior (1.24 mg mL^{-1}) concentra a las VLPs obtenidas después que concluyó el proceso de ensamble.

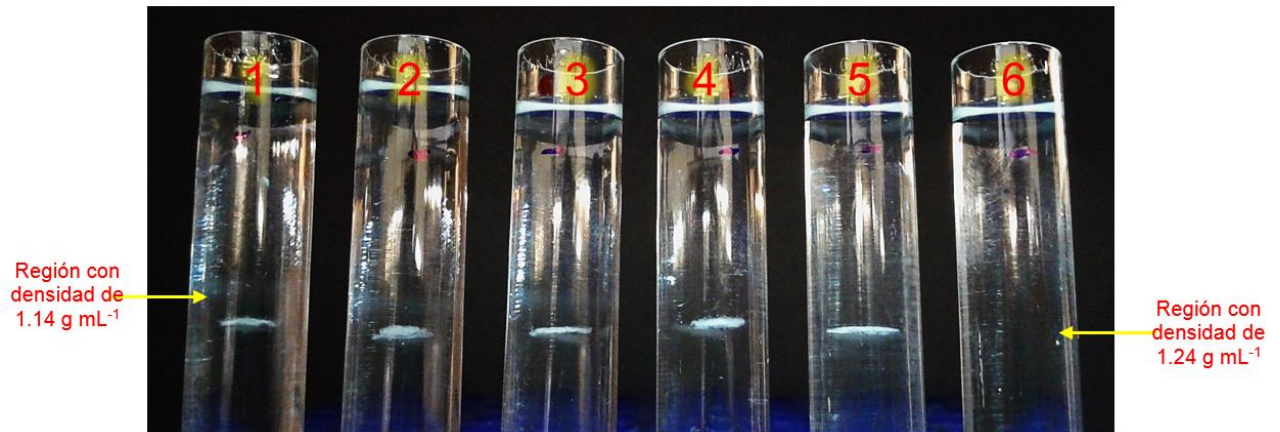


Figura 4.6. Gradiente de cloruro de Cesio. Análisis de las VLPs obtenidas mediante la diálisis frente a la solución amortiguadora PBS. Tubo 1) VP26H; tubo 2) VP26H:E5-VP28H 9:1; tubo 3) VP26H:K5-VP28H 9:1; tubo 4) VP26H:E5-VP28H 5:1; tubo 5) VP26H:K5-VP28H 5:1; tubo 6) Control sin la presencia de proteína.

El tercer grupo de combinaciones analizadas mediante la formación de gradientes continuos de Cloruro de Cesio corresponde a las partículas que fueron obtenidas después de dializar el agente desnaturizante frente a la solución PBS_{Arg}. La incorporación de L-Arginina a la solución amortiguadora tiene el propósito de incrementar la solubilidad de las proteínas presentes en solución y reducir los fenómenos de agregación asociados al replegamiento de la proteína VP26H. Sánchez-Rodríguez y col. (2016) establecieron que una concentración 0.2 M de L-Arginina es suficiente para incrementar la solubilidad de la proteína VP26H y también para reducir la agregación de las VLPs que ya se encuentran formadas. Todas las condiciones del análisis se conservaron y los resultados se muestran en la figura 4.7. Los tubos 1 y 2 de la figura 4.7 muestran la presencia de partículas localizadas en dos regiones del gradiente. Este patrón de bandas es característico y está asociado a la diferencia que existe entre las densidades que poseen las especies intermediarias respecto a las VLPs. El incremento en la solubilidad de las proteínas por la presencia de L-Arginina propicia que la banda de menor densidad (1.16 g mL^{-1}) se perciba más difusa en comparación a los patrones de bandas que se muestran en los gradientes de la figura 4.6 cuyos ensambles fueron obtenidos frente a la solución PBS. Este fenómeno podría explicarse si consideramos que existe una distribución de especies más amplia. Es decir, en la banda que se percibe más difusa coexisten especies intermediarias

de diferentes tamaños. Por otro lado, la banda inferior cuya densidad es de 1.23 mg/mL corresponde a las VLPs que fueron obtenidas después de concluir el proceso de diálisis. El tubo 3 muestra el gradiente obtenido a partir de la combinación 16. En este caso, las partículas fueron obtenidas a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H. Eventualmente la presencia de las tres proteínas al interior de la bolsa diálisis debió favorecer la obtención de VLPs y de estructuras supramoleculares basadas en las mismas. Sin embargo no fue posible distinguir la presencia de estas estructuras, lo cual no significa que no estuvieran presentes en esa región del gradiente. Ya que la densidad de cada una de las VLPs que participan en la formación de estructuras supramoleculares se mantendrá sin cambios, será prácticamente imperceptible su presencia dentro de la región donde se concentran las VLPs que no participan en estos nuevos arreglos. Al parecer ésta técnica carece de la resolución necesaria para poder caracterizar las nuevas especies formadas. Finalmente, los tubos número 4 y 5 cuyas proporciones de proteína corresponden a las combinaciones 12 y 13 respectivamente, muestran que bajo las condiciones de diálisis frente a la solución PBS_{Arg} , es factible obtener VLPs que puedan participar o que estén participando en la formación de las estructuras supramoleculares.

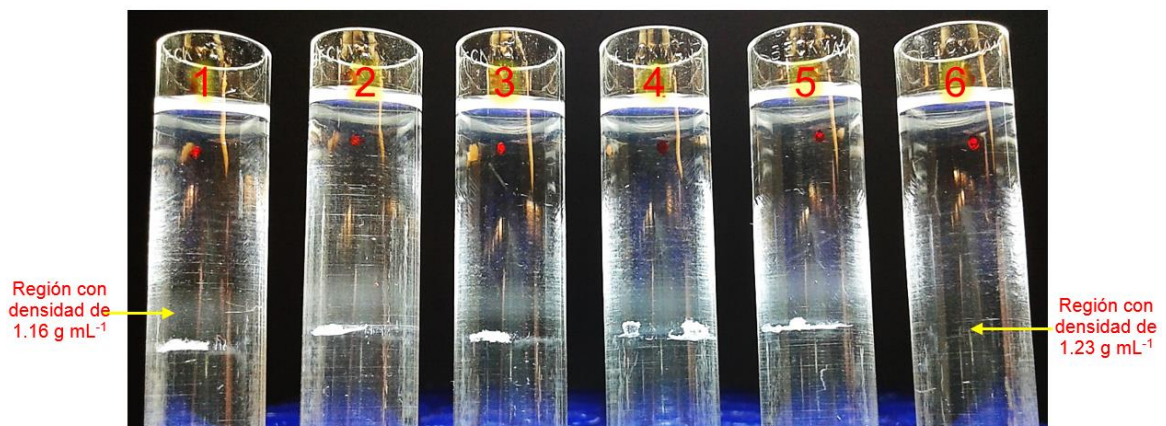


Figura 4.7. Gradiente de cloruro de Cesio. Análisis de las VLPs obtenidas mediante la diálisis frente a la solución amortiguadora PBS (tubo 1) y PBS_{Arg} (tubos 2 al 6). Tubo 1, VP26H; tubo 2, VP26H; tubo 3, VP26H:E5-VP28H:K5-VP28H 1:1:1; tubo 4, VP26H:E5-VP28H 5:1; tubo 5, VP26H:K5-VP28H 5:1; tubo 6, control sin la presencia de proteína.

4.5.2.2 Caracterización de VLPs mediante DLS

Para corroborar la información obtenida mediante los gradientes de CsCl, las combinaciones 9, 12, 13, 14, 15 y 16 fueron analizadas de forma paralela mediante DLS. Todos los ensambles de proteína que fueron obtenidos mediante la diálisis frente a la solución amortiguadora PBS. Las muestras fueron filtradas por cartuchos con tamaño de poro de 2 μm y posteriormente con cartuchos con tamaño de poro de 0.22 μm . Las condiciones del análisis y los parámetros programados en el equipo pueden consultarse en la sección 5.3.7. Los perfiles de la distribución de especies mostraron la presencia de partículas tipo virus en todos los casos. Estos resultados indican que bajo todas condiciones de ensamble utilizadas en este trabajo es factible la obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H. Los resultados se concentran en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Datos obtenidos mediante la caracterización por DLS a partir de las combinaciones y proporciones empleadas durante los experimentos de ensamble para la obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

	Combinación					
	9	12	13	14	15	16
	VP26H	VP26H:E5-VP28H 5:1	VP26H:K5-VP28H 5:1	VP26H:E5-VP28H 9:1	VP26H:K5-VP28H 9:1	VP26H:E5-VP28H:K5-VP28H 1:1:1
Diálisis frente a PBS	●	●	●	●	●	
Diámetro de las partículas obtenidas (nm)	21.69 ±0.92	20.82 ±0.55	19.06 ±0.64	24.15 ±1.86	22.36 ±0.73	
Diálisis frente a PBS _{Arg}	●	●	●			●
Diámetro de las partículas obtenidas (nm)	20.12 ±0.74	23.07 ±0.62	21.94 ±1.20			24.03 ±1.43

4.5.2.3 Purificación de VLPs por SEC y su caracterización mediante DLS

Para descartar que las especies intermediarias y los agregados de proteína pudieran interactuar con los fragmentos heterodimerizantes expuestos en la superficie de las VLPs, se realizó una etapa cromatográfica preparativa con la intención de separar y aislar a las VLPs. La cromatografía de exclusión molecular se aplicó a las soluciones que corresponden a las combinaciones 9, 10 y 11. Estas soluciones que contienen VLPs monoproteicas fueron obtenidas después de dializar el agente desnaturizante frente a la solución amortiguadora PBS2x_{Arg}. Posteriormente fueron filtradas con cartuchos que poseen un tamaño de poro de 0.45 µm y analizadas en un equipo de HPLC. Para el este análisis se utilizaron las condiciones que se describen en la sección 3.3.9. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 4.6. Las muestras fueron colectadas en fracciones con un volumen de 2 mL cada una. Cada fracción fue analizada mediante dispersión dinámica de luz para poder determinar la presencia de VLPs. Los tiempos de retención para cada uno de los tipos de VLPs obtenidas son: 30 minutos para las VLPs de VP26H; 31 minutos para las VLPs de E5-VP28H y 33 minutos para las VLPs de K5-VP28H. Las pequeñas diferencias en los tiempos de retención no son significativas.

Todas las fracciones que mostraban la presencia de VLPs se conservaron para realizar ensayos de interacciones entre partículas complementarias. Por otro lado, las fracciones cuyos perfiles de distribución de especies indicaban la presencia de especies intermediarias o agregados de proteína fueron descartadas. Los resultados del análisis por DLS se muestran en la tabla 4.6.

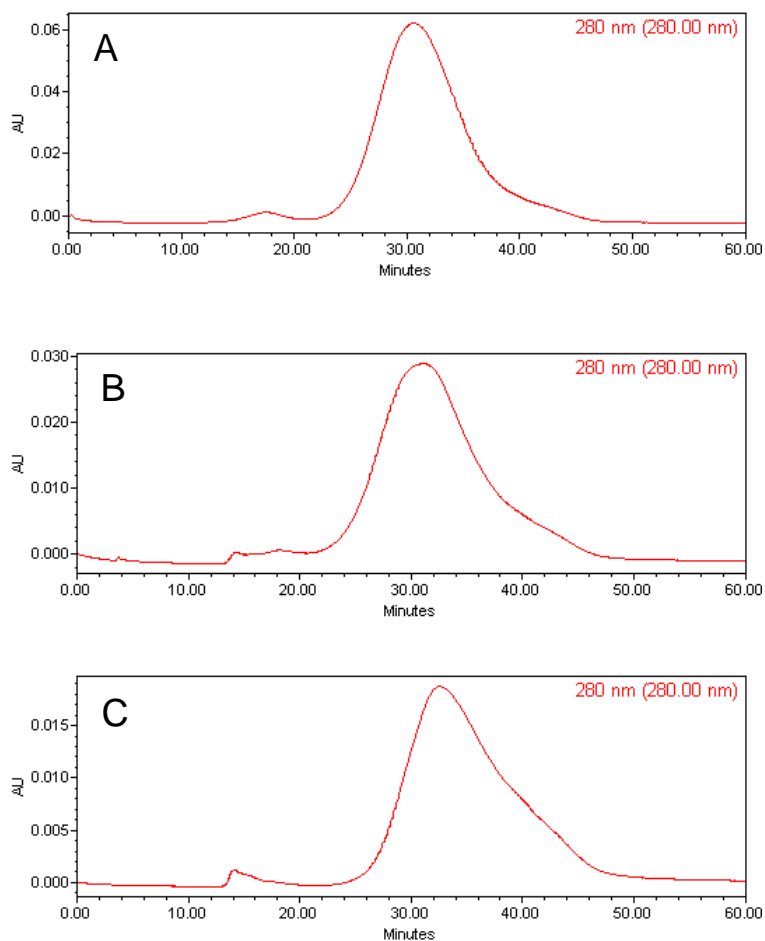


Figura 4.6. Cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular. Etapa preparativa empleada para aislar VLPs. A) VLPs de VP26H; B) VLPs de E5-VP28H; C) VLPs de K5-VP28H.

Tabla 4.6. Datos obtenidos de la caracterización mediante DLS de las VLPs aisladas por cromatografía de exclusión molecular.

	Combinación		
	9	10	11
	VP26H	E5-VP28H	K5-VP28H
Diálisis frente a PBS2XArg	●	●	●
Diámetro de las partículas obtenidas (nm)	22.51 ±1.11	23.41 ±0.49	22.92 ±1.46

4.5.2.3 Ensayos de interacciones entre VLPs con fragmentos heterodimerizantes complementarios y caracterización de especies supramoleculares mediante DLS

Los ensayos de interacciones se realizaron a partir de las VLPs que previamente fueron aisladas mediante SEC. El proceso de incubación se realizó a 25°C con agitación orbital de 600 r.p.m. durante un periodo de 120 min. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y fue caracterizado mediante DLS. Las características de las combinaciones y proporciones se reúnen en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Combinaciones y proporciones de VLPs empleadas durante los ensayos de interacciones para la formación de estructuras supramoleculares.

I	II	III	Agitación orbital a 600 r.p.m., a 25°C durante 120 min
VLPs Obtenidas a partir de VP26H	VLPs Obtenidas a partir de E5-VP28H	VLPs Obtenidas a partir de K5-VP28H	
IV	V	VI	VII
Interacción entre VLPs obtenidas a partir de VP26H y VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1)	Interacción entre VLPs obtenidas a partir de VP26H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1)	Interacción entre VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 2:1)	Interacción entre VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1)

Los resultados de los ensayos I, II y III (tabla 4.8) indican que las VLPs monoproteicas no presentan cambios significativos en sus dimensiones después de la etapa de incubación. Esto significa que las interacciones que ocurren entre VLPs del mismo tipo no derivan en la formación de nuevos arreglos multi-VLPs. Por otro lado, como era de esperarse, los resultados obtenidos de la caracterización realizada a los ensayos IV y V después de la etapa de incubación, muestran que tampoco existen interacciones específicas y

permanentes entre las VLPs constituidas por la proteína VP26H y VLPs obtenidas a partir de la proteína E5-VP28H o VLPs obtenidas a partir de la proteína VP26H y VLPs obtenidas a partir de la proteína K5-VP28H (figura 4.7 A y B; tabla 4.8). Finalmente, la caracterización por DLS que fue realizada a las muestras obtenidas a partir de las combinaciones VI y VII, confirma que la formación de estructuras multi-VLPs sólo ocurre mediante la interacción entre fragmentos heterodimerizantes complementarios. En la figura 4.7 C se puede apreciar que después de la etapa de incubación prevalece un conjunto de especies que no existía inicialmente. Cuando las VLPs de E5-VP28H y las VLPs de K5-VP28H son combinadas en proporción 2:1, las multi-VLPs que se forman mayoritariamente alcanzan un tamaño cercano a 50 nm. Estas dimensiones son consistentes con el supuesto de que la unión ocurre entre varias VLPs. En la figura 4.7 D se muestran las especies formadas cuando se combinan VLPs de E5-VP28H y VLPs de K5-VP28H en proporción 1:1 respectivamente. Las partículas obtenidas bajo estas condiciones poseen dimensiones cercanas a los 40 nm, lo cual podría ser indicio de que también se encuentran interactuando varias VLPs. En este caso, se puede apreciar que un cambio en la proporción de VLPs disponibles para interactuar ocasiona que las dimensiones de los arreglos obtenidos sean inferiores en comparación a las que fueron mezcladas en proporción 2:1. Un aspecto muy interesante de estos arreglos multi-VLPs es que su formación parece ocurrir mediante un mecanismo auto-limitante. Este hecho es relevante porque a diferencia de lo que suele ocurrir cuando se realizan ligeras modificaciones a un sistema tan complejo, las multi-VLPs que se obtuvieron no presentan un elevado nivel de polidispersidad, ni tienden a participar en fenómenos de agregación con mayor rapidez que las VLPs por sí mismas.

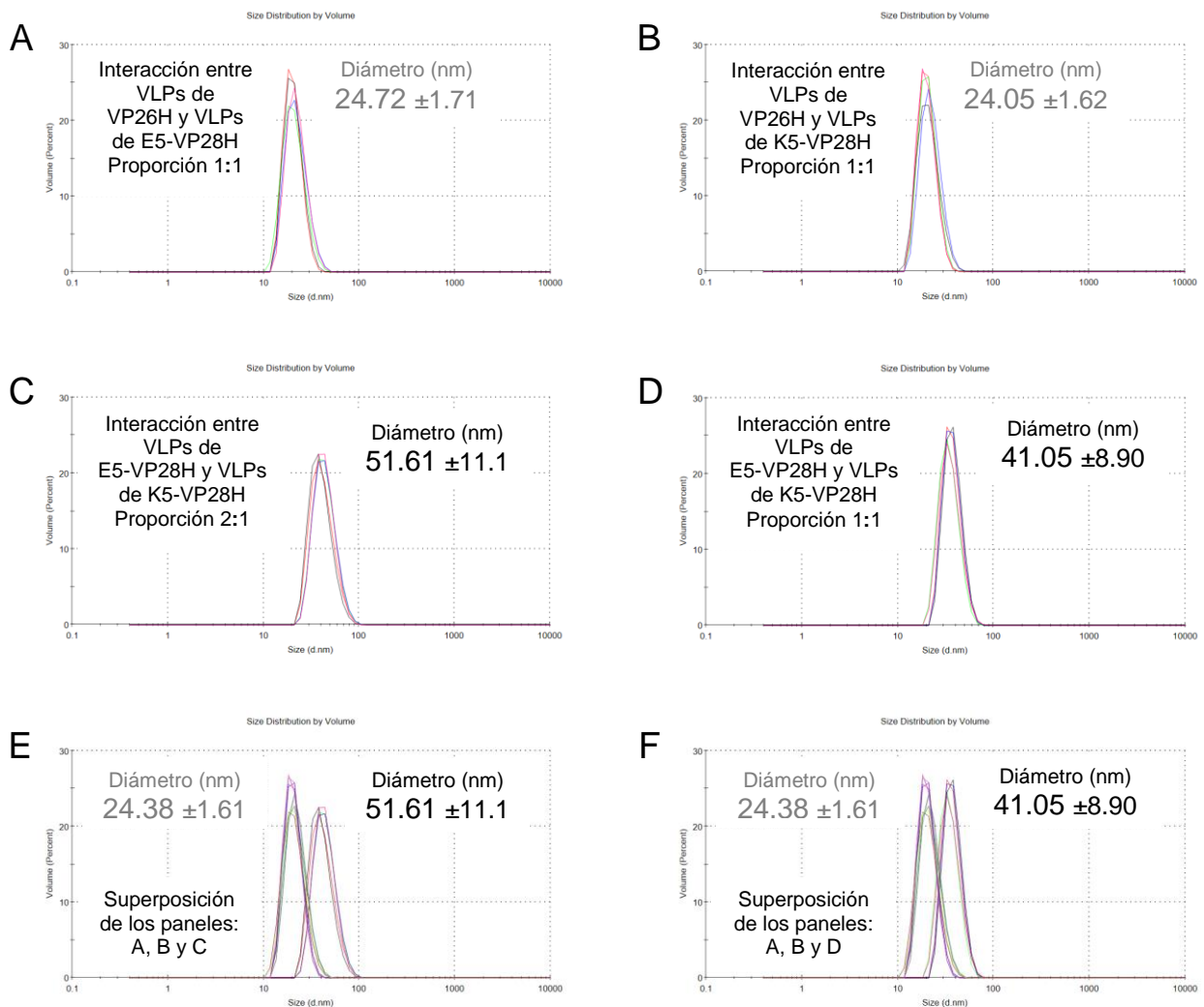


Figura 4.7. Análisis mediante DLS de los ensayos de interacciones entre VLPs para la formación de estructuras supramoleculares. A) Interacción entre VLPs obtenidas a partir de VP26H y VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1); B) Interacción entre VLPs obtenidas a partir de VP26H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1); C) Interacción entre VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 2:1); D) Interacción entre VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1); E) Superposición de los paneles A, B y C; F) Superposición de los paneles A, B y D.

Tabla 4.8. Datos obtenidos a partir de la caracterización mediante DLS de los ensayos de interacciones entre VLPs para la formación de estructuras supramoleculares.

	I	II	III	
	VLPs Obtenidas a partir de VP26H	VLPs Obtenidas a partir de E5-VP28H	VLPs Obtenidas a partir de K5-VP28H	
Dimensiones antes de la etapa de incubación (nm)	22.51 ±1.11	23.41 ±0.49	22.92 ±1.46	
Dimensiones después de la etapa de incubación (nm)	23.90 ±0.40	26.38 ±1.37	21.25 ±0.86	
	IV	V	VI	VII
	Interacción entre VLPs obtenidas a partir de VP26H y VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1)	Interacción entre VLPs obtenidas a partir de VP26H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1)	Interacción entre VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 2:1)	Interacción entre VLPs obtenidas a partir de E5-VP28H y VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H (Mezcladas en proporción 1:1)
Dimensiones antes de la etapa de incubación (nm)	22.96 ±1.46	22.71 ±1.24	23.16 ±1.06	23.08 ±1.24
Dimensiones después de la etapa de incubación (nm)	24.72 ±1.71	24.05 ±1.62	51.61 ±11.1	41.05 ±8.90

4.5.2.4 Caracterización de estructuras supramoleculares mediante EMSA

Los ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA) suelen utilizarse para detectar complejos proteína-ácido nucleico. Sin embargo, los principios básicos que rigen esta tecnología subyacen a una amplia gama de análisis cualitativos y cuantitativos para la caracterización de sistemas interactivos (Hellman y Fried, 2007). En la figura 4.8 se muestra la imagen de un gel de agarosa donde se realizó un EMSA. En el carril número 1 se colocaron VLPs constituidas por la proteína VP26H, las cuales fungieron como referencia. En el carril número 2 se colocaron VLPs obtenidas a partir de la proteína E5-

VP28H, estas partículas migran a mayor distancia a través del gel en comparación con las VLPs de la proteína VP26H. Por otro lado, las partículas que están formadas por la proteína K5-VP28H (colocadas en el carril número 3) migran menos que los dos tipos de partículas anteriores. Es de esperarse que las multi-VLPs presenten una movilidad distinta a la que se observa para las VLPs que no se encuentran formando estructuras supramoleculares. Tal es el caso de los patrones que se observan en los carriles número 4 y 5. En estos carriles se colocaron las especies obtenidas después de incubar las combinaciones VI y VII respectivamente (tabla 4.7). En ambos casos se observa que la movilidad de las multi-VLPs se ve considerablemente reducida respecto a las VLPs de E5-VP28H pero también es ligeramente mayor respecto a la movilidad de las VLPs obtenidas a partir de K5-VP28H. De no haber interacción entre estos dos tipos de VLPs, se esperaría que éstas se desplazaran de acuerdo a sus movilidades individuales. En principio, la interacción entre los fragmentos heterodimerizantes E5 y K5 propiciaría que las cargas presentes en su estructura se contrarresten. Sin embargo, este fenómeno sólo se suscitará cuando las interacciones sean efectivas. Es decir, si sabemos que cada una de las VLPs cuenta con 60 fragmentos heterodimerizantes en su estructura y asumimos que las especies supramoleculares obtenidas están constituidas por al menos dos VLPs y hasta un máximo de siete VLPs, existirá un número importante de fragmentos heterodimerizantes que no estarán participando en interacciones efectivas. Esta situación debería favorecer que la movilidad de las partículas por efecto de su carga no se vea alterada considerablemente. Entonces, la única forma de explicar el cambio en la movilidad electroforética de las multi-VLPs respecto a las VLPs que las constituyen es considerar dos circunstancias. La primera de ellas es que las VLPs de E5-VP28H y las VLPs de K5-VP28H que se encuentran interactuando, tratan de migrar cada una hacia polos opuestos. En el carril número tres se observa que las VLPs de K5-VP28H prácticamente no migran hacia el polo positivo, pero tampoco migran hacia el cátodo ya que la carga neta de la región que corresponde a la proteína VP26H contrarresta la fuerza que impulsa a las VLPs de K5-VP28H hacia éste polo. En el carril número 2 se aprecia que las VLPs constituidas por la proteína E5-VP28H alcanzan mayor cercanía con el ánodo respecto a las conformadas por la proteína VP26H, era de esperarse que si se incrementa considerablemente el número de cargas negativas presente en las VLPs,

éstas migrarían una distancia que resultase proporcional. Ya que la diferencia en la distancia que recorrió cada uno de estos dos tipos de partículas es pequeña, se debe considerar que la migración se encuentra limitada por el tamaño de poro que posee el gel de agarosa. Precisamente, este efecto de retención es la segunda circunstancia que contribuye de forma importante para que las multi-VLPs migren más que las VLPs de K5-VP28H pero considerablemente menos que las VLPs de E5-VP28H. Las dimensiones que poseen éstas estructuras multiméricas (40-50 nm) provocarán la disminución de su desplazamiento a través del gel.

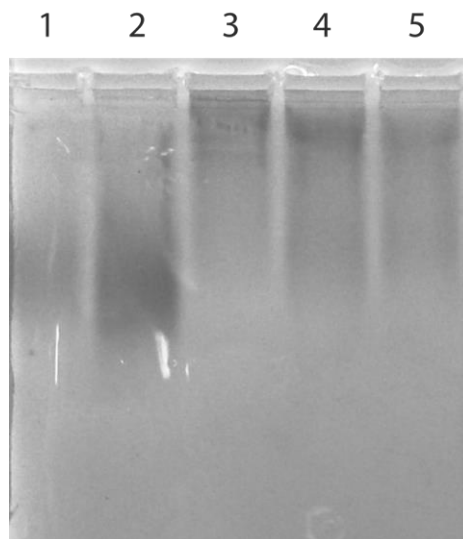


Figura 4.8. Análisis de multi-VLPs por movilidad electroforética en gel de agarosa. Carril 1, VLPs de VP26H; carril 2, VLPs-E5; carril 3, VLPs-K5; carril 4, partículas producidas por la interacción de VLPs-E5 y VLPs-K5 en proporción 2:1; carril 5, partículas producidas por la interacción de VLPs-E5 y VLPs-K5 en proporción 1:1.

4.5.2.5 Caracterización de estructuras supramoleculares mediante AFM

Se realizó la caracterización mediante AFM de las multi-VLPs obtenidas por efecto de la interacción entre VLPs complementarias mezcladas en proporción 2:1 (figura 4.9). En el panel A se muestra la micrografía obtenida a partir de VLPs constituidas por la proteína VP26H. En ella se observa un cuerpo circular característico de los virus icosaédricos. En el panel B se muestra la imagen de un campo típico donde se observan dos estructuras

alargadas. La morfología de estas estructuras alargadas dista mucho de lo que generalmente se obtiene después de analizar VLPs formadas a partir de la proteína VP26H. Si consideramos que cada VLP posee un diámetro aproximado de 23 nm y que el eje longitudinal de la estructura que corresponde al perfil 2 (paneles C y D) mide 45 nm aproximadamente, podemos inferir que se trata de un dímero de VLPs. Por otro lado, las características que posee el arreglo que corresponde al perfil 1 (paneles C y D) sugieren que se trata de un multímero constituido por al menos tres componentes. En este caso, el eje longitudinal obtenido mediante un trazo arbitrario y el posterior análisis de altura, indican que las VLPs no se encuentran orientadas y distribuidas en el mismo plano de referencia y que en conjunto alcanzan dimensiones que oscilan entre 55 y 60 nm.

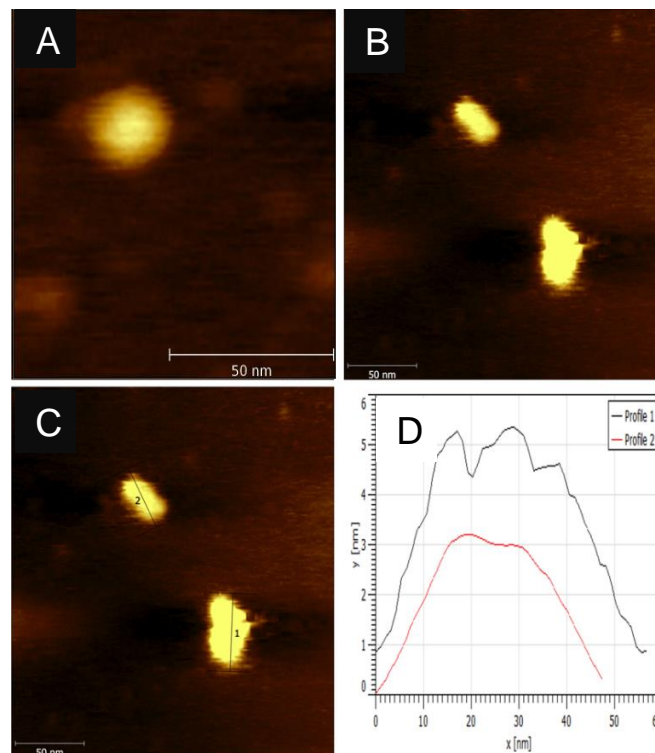


Figura 4.9. Análisis de altura mediante AFM realizado a las multi-VLPs. A) Micrografía de las VLPs obtenidas a partir de VP26H (modo tapping), la barra corresponde a 50 nm; B) Micrografía de multi-VLPs obtenidas a partir de la combinación VI (modo tapping), la barra corresponde a 50 nm; C) Ejes longitudinales trazados arbitrariamente sobre las estructuras observadas en el panel B, la barra corresponde a 50 nm; D) Perfil de altura generado a partir de los ejes longitudinales trazados en el panel C.

Capítulo 5. Conclusiones y Perspectivas

5.1 Conclusiones

- Se demostró que es posible expresar y purificar proteínas recombinantes basadas en la fusión de la proteína VP2 con los fragmentos heterodimerizantes de los sistemas “venus” y “coiled-coils”.
- Las proteínas quiméricas diseñadas poseen la capacidad para replegarse y para participar en la formación de VLPs monoproteicas y diproteicas obtenidas a partir de diferentes combinaciones y proporciones.
- Las VLPs obtenidas a partir de las proteínas E5-VP28H y K5-VP28H poseen la capacidad de interactuar selectivamente para formar nuevos nanobiomateriales (multi-VLPs).

5.2 Perspectivas

- Explorar nuevas condiciones con la finalidad de obtener multi-VLPs en las que participen un mayor número de elementos.
- Cuantificar el número de fragmentos heterodimerizantes que quedan expuestos en la superficie de las VLPs con el objetivo de controlar el nivel de organización que adquieren estas novedosas estructuras supramoleculares.
- Obtener multi-VLPs que sean poli-funcionales mediante la incorporación de nuevas proteínas quiméricas en la estructura de este material.
- Utilizar otro conjunto de tectones con la finalidad de obtener nuevos elementos que permitan la formación de estructuras supramoleculares más complejas.

Bibliografía

- Arakawa, T. Tsumoto, K. (2003). The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 148-152.
- Assal, Y., Mizuguchi, Y., Mie, M., Kobatake, E. (2015). Growth factor tethering to protein nanoparticles via coiled-coil formation for targeted drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 26(8):1672–1677. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00266
- Blum, A.S., Soto, C.M., Wilson, C.D., et al., (2005). An engineered virus as a scaffold for three-dimensional self-assembly on the nanoscale. *Small* 1, 702-706.
- Bromley, E.H., Sessions, R.B., Thomson, A.R., Woolfson, D.N. (2009). Designed alpha-helical tectons for constructing multicomponent synthetic biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 928-930.
- Brown, C.S., Van Lent, J. W. M., Vlak, J. M., Spaan, W. J. M. (1991). Assembly of Empty Capsids by Using Baculovirus Recombinants Expressing Human Parvovirus B19 Structural Proteins. *Journal of Virology*; 65(5) 2702–2706.
- Casini, G.L., Graham, D., Heine, D., Garcea, R. L., Wu, D.T. (2004). In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology* 325, 320-327.
- Chu, L., Wang, S., Li, K., Xi, W., Zhao, X., Qian, J. (2014). Biocompatible near-infrared fluorescent nanoparticles for macro and microscopic in vivo functional bioimaging. *Biomed. Opt. Express* 5, 4076-4088.
- De Crescenzo, G., Litowski, J., Hodges, R., O'Connor-McCourt, M. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*. 2003 Feb 18; 42(6): 1754–1763. doi: 10.1021/bi0268450
- Fillebeen, C., Wilkinson, N., Pantopoulos, K. (2014). Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for the Study of RNA-Protein Interactions: The IRE/IRP Example. *J. Vis. Exp.* (94), e52230, doi:10.3791/52230 (2014).
- Fischlechner, M., Donath, E. (2007). Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 384-393.

-
- Fortier, C., De Crescenzo, G. Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials* 2013 Jan; 34(4) 1344–1353. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047.
 - Gallinella, G. (2013). Parvovirus B19 achievements and challenges. *ISRN Virol.* 2013, ID 898730, 33 pags.
 - Gilbert, L., Toivola, J., White, D., Ihalainen, T., Smith, W., Lindholm, L., et al. (2005). Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 331, 527-535.
 - Gradišar, H., Jerala, R. (2010). De novo design of orthogonal peptide pairs forming parallel coiled-coil heterodimers. *J. Pept. Sci.* 17, 100-106.
 - Heegaard, E. D., & Brown, K. E. (2002). Human Parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 485–505. <http://doi.org/10.1128/CMR.15.3.485-505.2002>
 - Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nature Protocols*, 2(8), 1849–1861. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
 - Hoffman, D. B., Böker, K. O., Schneider, S., Eckermann, E. F., Schuder, A., Komrakova, M., Sehmisch, S., Gruber, J. (2016). *In Vivo* siRNA delivery using JC virus-like particles decreases the expression of RANKL in rats. *Molecular Therapy—Nucleic Acids* (2016) 5, e298; doi:10.1038/mtna.2016.15
 - Kaufmann, B., Chipman, P.R., Kostyuchenko, V.A., Modrow, S., Rossmann, M.G. (2008). Visualization of the externalized VP2 N termini of infectious human parvovirus B19. *J. Virol.* 82, 7306-7312.
 - Kaufmann, B., Simpson, A. A., & Rossmann, M. G. (2004). The structure of human parvovirus B19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32), 11628–11633. <http://doi.org/10.1073/pnas.0402992101>
 - Kodama, Y., & Hu, C.D. (2010). An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio. *Biotechniques*. 2010 Nov;49(5):793-805. [doi: 10.2144/000113519](http://doi.org/10.2144/000113519).
 - Le, P.U., Lenferink, A.E., Pinard, M., Baardsnes, J., Massie, B., O'Connor-McCourt, M.D. (2009). Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. *Protein Expr. Purif.* 2009 Apr; 64 (2):108-117. doi: 10.1016/j.pep.2008.11.005.
 - Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K., Garcea, R.L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* 72, 2160-2167.

-
- Litowski, J.R., Hodges, R.S. (2002). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.* 277, 37272-37279.
 - Liu, Y., Zhao, Y., Sun, B., Chen, C. (2013). Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Acc. Chem. Res.* 46, 702-713.
 - Mateu, M.G. (2011). Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Engineering, Design & Selection* Vol. 24 No. 1–2 pp. 53–63, 2011.
 - Matsuura, K. (2013). Rational design of self-assembled proteins and peptides for nano- and micro-sized architectures. *RSC Adv.* 4, 2942-2953.
 - Morán-García, A.C., Rivera-Toledo, E., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Gómez, B., Bustos-Jaimes, I. (2016). Peptide presentation on primate erythrovirus 1 virus-like particles: in vitro assembly, stability and immunological properties. *Virus Res.* 224, 12-18.
 - Ramakers, B.E.I., van Hest, J.C.M., Löwik, D.W.P.M. (2014). Molecular tools for the construction of peptide-based materials. *Chem. Soc. Rev.* 43, 2743-2756.
 - Rekas, A., Alattia, J.R., Nagai, T., Miyawaki, A., Ikura, M. (2002). Crystal structure of venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity. *J. Biol. Chem.* 2002 Dec 27; 277(52), 50573–50578.
 - Riahi, N., Cappadocia, L., Henry, O. et al. (2016). Soluble expression, purification and functional characterization of a coil peptide composed of a positively charged and hydrophobic motif. *Amino Acids* (2016) 48: 567. doi:10.1007/s00726-015-2113-z
 - Rohovie, M.J., Nagasawa, M., Swartz J.R. (2017). Virus like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioengineering & Translational Medicine* (2017); 2: 43–57.
 - Sánchez-Rodríguez, S.P., Enríquez-Avila, J.V. Soto-Fajardo, J.M., Peña-Montes, C., Bustos-Jaimes, I. (2015). In vitro encapsulation of heterologous dsDNA into human parvovirus B19 virus-like particles. *Mol. Biotech.* 57, 309–317
 - Sánchez-Rodríguez, S.P., Münch-Anguiano, L., Bustos-Jaimes, I. (2010). Advances in the development of virus-like particles as tools in medicine and nanoscience. *Curr. Chem. Biol.* 4, 231-243.
 - Sánchez-Rodríguez, S.P., Morán-García, A.C., Bolonduro, O., Dordick, J.S., Bustos-Jaimes, I. (2016). Enhanced assembly and colloidal stabilization of primate erythrovirus 1 virus-like particles for improved surface engineering. *Acta Biomater.* 35, 206-214.

-
- Sánchez-Rodríguez, S.P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O.M., Vázquez-Nin, G.H., Mora-Pale, M., Dordick, J.S., Bustos-Jaimes, I. (2012). Human parvovirus B19 virus-like particles: in vitro assembly and stability. *Biochimie* 94 (3), 870–878.
 - Santillán-Uribe, J.S., Valadez-García, J, Morán-García, A. del C., Santillán-Uribe, H.C., Bustos-Jaimes, I. (2015). Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Res.* 2015 Apr 2; (201), 1-7
 - Singh, P., Destito, G., Scheemann, A., Manchester, M. (2006a). Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J. Nanobiotech.* 4, 2.
 - Singh, P., González, M.J., Manchester, M. (2006b). Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Develop. Res.* 67, 23-41.
 - Steinmetz, N.F., Lomonosoff, G.P., Evans, D.J. (2006). Cowpea mosaic virus for material fabrication: addressable carboxylate groups on a programmable nanoscaffold. *Langmuir* 22, 3488-3490.
 - The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
 - Thomas, F., Boyle, A.L., Burton, A.J., Woolfson, D.N. (2013). A set of de novo designed parallel heterodimeric coiled coils with quantified dissociation constants in the micromolar to sub-nanomolar regime. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 5161-5166.
 - Umetsu, M., Tsumoto, K., 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.
 - Wang, Q., Kaltgrad, E., Lin, T., Johnson, J.E., Finn, M.G. (2002a). Natural supramolecular building blocks: wild-type cowpea mosaic virus. *Chem. Biol.* 9, 805-811.
 - Wang, Q., Lin, T., Johnson, J., Finn, M. (2002b). Natural supramolecular building blocks: cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem. Biol.* 9, 813-819.
 - Winkler, D.F., Tian, K. (2015) Investigation of the automated solid-phase synthesis of a 38mer peptide with difficult sequence pattern under different synthesis strategies. *Amino Acids* 47(4):787–794. doi:10.1007/s00726-014-1909-6
 - Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C. C., Pettersen, E. F., ..., Ferrin, T. E. (2012). UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An Integrated Modeling System. *Journal of Structural Biology* 179 (3), 269–278. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.006>.
 - Zhang, Y., Song, S., Liu, C., Wang, Y., Xian, X., He, Y., Wang, J., Liu, F., Sun, S. (2007). Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in E. coli: Formation of virus-like particles

and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and antitumor effect in vivo. *Cell. Immunol.* 247, 18-27.

- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.X., Mitter, N., Yu, C., Middelberg, A.P. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32, 327-337.
- Zhao, Q., Chen, W., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, Z. (2011). Self-assembled virus-like particles from rotavirus structural protein VP6 for targeted drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 22, 346-352.