



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PRESENTACIÓN DE TECTONES MOLECULARES
SOBRE PARTÍCULAS TIPO VIRUS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

BRAYAN DE JESÚS LUNA REYES



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES
2017**

C.D.MX.



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.

1. Datos del alumno
Luna
Reyes
Brayan de Jesús
58463589
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
309167914

2. Datos del tutor
Dr.
Ismael
Bustos
Jaimes

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Alejandro
Fernández
Velasco

4. Datos del sinodal 2
Dra.
Gerogina
Garza Ramos
Martínez

5. Datos del sinodal 3
Dr.
Fernando
Fernández
Ramírez

6. Datos del sinodal 4
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

7. Datos del trabajo escrito
Presentación de tectones moleculares sobre partículas tipo virus
79 p
2017

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

“Nadie soportaba esta misión,
hasta que vi a la mochedumbre
cabizbaja ante el espejo de la vida
y la acepté yo.”

Francisco Luna

Agradecimientos

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes, por las enseñanzas y consejos que me dio durante todo el tiempo que estuve bajo su tutela. La templanza y comprensión hacia sus alumnos son cualidades que muy pocas personas poseen.

Al Dr. Alejandro Fernández Velasco, ya que no solo me enseñó las bases de la biología molecular con sus excelentes y muy interesantes clases, sino que mostró interés en este trabajo y fue parte del mismo.

Al Dr. Fernando Fernández Ramírez, quien me ha apoyado más allá de la elaboración del presente escrito. Sin duda su trabajo como docente cambiará para bien la perspectiva de muchos de sus alumnos.

A la Dra. Gerogina Garza Ramos Martínez y a la Dra. Laura Kawasaki Watanabe, por sus importantes observaciones y anotaciones para el desarrollo de este escrito.

Al M. en C. Hugo César Santillán Uribe, quien me apoyó enormemente en el desarrollo experimental y escrito de esta tesis. Sin duda creo que eres una persona muy capaz y solidaria con quien te rodea. La ciencia avanzaría más rápido con más personas como tú.

A la M. en C. Laura Díaz Álvarez, por compartir pláticas científicas y personales con ese humor tan característico. Eres una persona que le da un ambiente distinto al laboratorio, lo cual sin duda más de uno te agradece.

A mis compañeros del grupo de investigación: Fabián, Carla, Carlos, Sac, Areli, Brenda, Paty, Iris, Arturo y Jorge.

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 Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, en especial a Dulce, Eduardo, Cinthia y Lucero, quienes mostraron siempre interés en este trabajo y me alentaron para no desistir en momentos clave.

A todas las personas del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas que de alguna u otra forma aportaron un poco de su conocimiento y tiempo.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a las personas más especiales en mi vida, sin ellas este trabajo no habría sido posible.

A ti mamá que desde pequeño me has llevado por el camino correcto, tus enseñanzas son medulares en mi desarrollo personal y profesional. A ti que me enseñas a apreciar los pequeños detalles de la vida, que crees en mí cuando hasta yo mismo me subestimo, que eres mi mayor ejemplo de trabajo duro y constancia. Aunque al principio no entendías mi decisión por esta carrera, nunca dejaste de apoyarme y caminar a mi lado. Tú más que nadie sabe lo trascendental de este trabajo, las innumerables dificultades que hemos pasado para lograrlo y por supuesto los momentos de dicha que compartimos. Siempre nos fijamos la meta de un título profesional y con base en constante esfuerzo y sacrificios lo hemos logrado. El camino aún es largo y en definitiva tendrá sinsabores, sin embargo, soy un firme creyente de que con tu apoyo y tu cariño nada es imposible. Te amo mamá.

A ti hermano, que eres con quien más me identifico en esta vida. Eres sin duda la persona más inteligente, astuta y sagaz que conozco. A tu modo, siempre tienes la respuesta a las incógnitas que plantea la vida, sabes elegir las batallas y como salir airoso de ellas. Siempre has dicho que la pluma es más poderosa que la espada, no podría estar más de acuerdo. Esa es una de las razones por las que me aferré tanto a este proyecto, que día a día ofrecí todo de mí. En el momento de más incertidumbre experimental bastó una charla breve contigo para tomar la dirección correcta en este trabajo. Juntos caímos en el mismo barco de esta vida y sin duda vamos a buen puerto.

Por último pero no menos importantes a mi Papá Chimi y mi Mamá Vicky, quienes son la base de nuestra familia, los pilares que nos sostienen. Sus consejos siempre son la panacea del alma. Cada comida con ustedes deriva en aprendizaje y alegría. Este triunfo también es de ustedes, que desde su trinchera siempre me han apoyado, no solo moralmente sino en los momentos de apremio en los que más los he necesitado. No puedo estar más agradecido por tenerlos en mi vida.

Índice

Resumen	9
Capítulo 1. Nanotecnología.....	10
Capítulo 2. Virus.....	12
Capítulo 3. Nanopartículas basadas en virus.....	13
3.1 Modificación de la superficie de las VLPs.....	17
3.2 Parvovirus B19.....	18
Capítulo 4. Biología Sintética.....	20
4.1 Interacciones proteína-proteína	25
4.2. Bloques de construcción moleculares.....	28
4.3 Hélices enrolladas (Coiled-coils)	31
Capítulo 5. Lipasas.....	34
Capítulo 6. Justificación, hipótesis y objetivos.....	38
6.1 Justificación.....	38
6.2 Hipótesis.....	38
6.3 Objetivos.....	39
Capítulo 7. Materiales y Métodos.....	40
7.1 Esquema general de trabajo.....	40
7.2 Materiales.....	41
7.2.1 Reactivos químicos.....	41
7.2.2 Instrumentos y equipos.....	42
7.2.3 Cepa utilizada.....	42
7.3 Métodos.....	43
7.3.1 Diseño de las proteínas quiméricas.....	43
7.3.2 Obtención de células transformantes.....	44
7.3.3 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.....	45
7.3.3.1 Sobreexpresión de la proteína recombinante KcLBp1A6H.....	46
7.3.3.2 Determinación de la solubilidad de la proteína recombinante KcLBp1A6H.....	46
7.3.4 Limpieza de cuerpos de inclusión VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.....	47
7.3.4.1 Limpieza de cuerpos de inclusión KcLBp1A6H.....	48
7.3.5 Purificación de las proteínas recombinantes VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.....	48
7.3.5.1 Purificación de la proteína recombinante KcLBp1A6H.....	49
7.3.6 Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs.....	51
7.3.7 Caracterización de lipasa, VLPs y estructuras supramoleculares mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	51
7.3.8 Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica.....	53
7.3.9 Caracterización y purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular.....	54

7.4 Análisis de lipasa, VLPs y de estructuras supramoleculares mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética en gel.....	54
7.5 Análisis de lipasa, VLPs y de estructuras supramoleculares mediante SDS-PAGE.....	55
Capítulo 8. Resultados y Discusión.....	55
8.1 Diseño de las proteínas quiméricas.....	55
8.2 Obtención de células transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	56
8.3 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.....	58
8.4 Sobreexpresión y solubilidad de la proteína recombinante KcLBplA6H.....	59
8.5 Purificación de las proteínas recombinantes.....	60
8.6 Obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.....	62
8.7 Caracterización de lipasa, VLPs y estructuras supramoleculares mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	63
8.8 Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica.....	64
8.9 Purificación de VLPs por SEC y su caracterización mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	67
8.10 Ensayos de interacciones entre VLPs y KcLBplA6H con fragmentos heterodimerizantes y caracterización de especies supramoleculares mediante DLS.....	68
8.11 Caracterización de estructuras supramoleculares mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA).....	71
8.12 Caracterización de estructuras supramoleculares mediante SDS-PAGE.....	73
Capítulo 9. Conclusiones y Perspectivas.....	75
9.1 Conclusiones generales.....	75
9.2 Perspectivas.....	76
Referencias.....	77

Resumen.

La naturaleza emplea una gran variedad de unidades moleculares básicas, como ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares y lípidos. A partir de estas unidades, logra una intrincada red de sistemas y máquinas moleculares. A través de la biología sintética, se puede tener acceso a una gran variedad de componentes, naturales o sintéticos, que en conjunto forman sistemas organizados y funcionales. En este sentido, la biología sintética es una rama de la ciencia que nos permite no solo entender la naturaleza a través del mimetismo, sino también utilizarla como herramienta biotecnológica. En este campo, siguiendo ejemplos naturales, se han desarrollado estructuras llamadas "tectones". Los tectones son componentes moleculares usualmente construidos mediante la polimerización de unidades básicas que son programadas para plegarse y/o ensamblarse, permitiendo la formación de estructuras más complejas.

En la naturaleza existen estructuras supramoleculares de alta complejidad, los virus son un ejemplo de estas superestructuras. Estos son arreglos supramoleculares de proteína, ácidos nucleicos y, en algunas ocasiones, lípidos. Las proteínas forman una cápside que contiene ADN o ARN, lo cual genera progenie infecciosa dentro de células específicas. Debido a esta especificidad, se han convertido en vectores muy prometedores en una amplia variedad de disciplinas, entre las cuales destacan la medicina, la biotecnología y la nanotecnología. Sin embargo, el hecho de que sean patógenos ha limitado en gran medida su uso para los múltiples fines a los que podrían estar destinados. Para evitar la infectividad de los virus, en los últimos años se han desarrollado las partículas tipo virus (VLPs), las cuales están formadas a partir de los componentes estructurales de los virus, pero carecen de su material genético. Son nanopartículas no infecciosas que se autoensamblan y pueden ser de gran utilidad en campos como la medicina y la nanotecnología. Cuentan con una arquitectura molecular bien definida que es casi idéntica a la de los virus, lo cual resulta muy atractivo para la ingeniería molecular por sus múltiples aplicaciones, especialmente en el diseño y fabricación de vacunas, y para la presentación de epítopos inmunogénicos heterólogos y moléculas diana en su superficie.

En este trabajo nos propusimos utilizar una estructura supramolecular basada en VLPs para construir una plataforma a partir de la cual se puedan construir nuevos nanomateriales. Para ello propusimos fusionar tectones heterodimerizantes en la superficie de VLPs derivadas del Eritroparvovirus 1 de primate, comúnmente llamado parvovirus B19 (B19V). Se diseñaron, expresaron, purificaron y caracterizaron, dos quimeras de la principal proteína estructural del B19V, la VP2. Los tectones heterodimerizantes E5 ((EVSALEK)₅) y K5 ((KVSALKE)₅) se fusionaron al extremo N-terminal de esta proteína por manipulación genética. Se sabe que es posible utilizar el extremo N-terminal de la VP2 para presentar proteínas heterólogas en la superficie de las VLPs, por lo que se presume que los tectones quedaron expuestos en la superficie de las partículas. Para probar la funcionalidad de estos tectones heterodimerizantes, se utilizó una lipasa que presenta el tectón K5 en su extremo N-terminal. Nuestros resultados indican que se formó una especie híbrida entre las VLPs quiméricas que presentan el tectón complementario E5 y esta lipasa, por lo tanto una presentación exitosa de los tectones en la superficie de las VLPs.

Capítulo 1. Nanotecnología.

La importancia que han tenido las revoluciones científicas y tecnológicas a lo largo de la historia de la humanidad es innegable. La introducción de nuevas tecnologías en las sociedades ha tenido como consecuencia un cambio de paradigma que han modificado las conductas individuales y colectivas, mismos que provocan un salto intelectual marcado. Es así que las sociedades han transitado procesos profundos de transformación que se han categorizado genéricamente en revoluciones agrícola, industrial, informático- tecnológica, y por último en la biotecnológica. Durante las últimas décadas, la humanidad ha experimentado una nueva revolución científico-tecnológica, la nanotecnología. Este campo emergente representa una promesa atractiva, ya que afectará muchos aspectos de la vida y la sociedad (Castro, 2012).

La vida, desde un punto de vista mecanicista, comprende procesos complejos y desarrollados por estructuras moleculares y supramoleculares, que funcionan de manera conjunta y sincrónica, en un espacio físico tridimensional y temporal definido en cada organismo (Castro, 2012).

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que involucra la creación y utilización de estructuras, sistemas y dispositivos a escala nanométrica. Esta ciencia aplica los principios de ingeniería, electrónica, física, ciencia de materiales y manufacturación a nivel atómico o molecular. La nanociencia trata con estructuras que van desde el tamaño de algunos virus hasta las dimensiones moleculares (Sánchez-Rodríguez, 2012) (Figura 1).

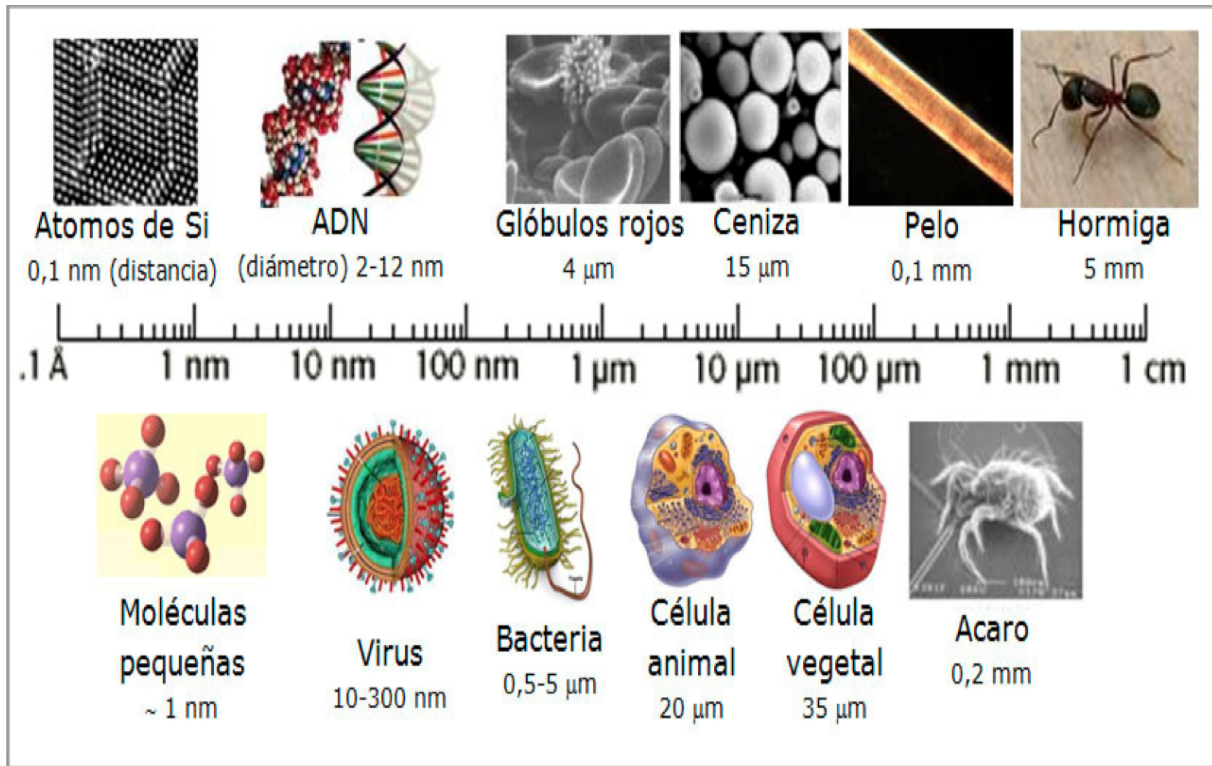


Figura 1. Tamaños y comparaciones de escalas (Castro, 2012).

La nanotecnología ya se encuentra en muchos de los productos que consumimos o usamos diariamente, y comprende diversas áreas, por ejemplo: componentes automotrices y electrónicos, pasando por materiales textiles, fármacos, cosméticos y alimentos, entre otros (Castro, 2012).

La terapia mediante medicamentos con señalizaciones específicas y los métodos para un diagnóstico rápido de patologías, son algunas de las áreas de investigación prioritarias en donde la bionanotecnología podría jugar un papel muy importante o vital, específicamente es aquí donde los virus podrían tener una gran variedad de aplicaciones (Jain, 2005; Sánchez-Rodríguez, 2012). Esta es solo una parte de la nanomedicina, la cual se refiere a las aplicaciones médicas de la nanotecnología y particularmente al desarrollo de nuevos nanomateriales que pueden ser usados para el diagnóstico de enfermedades, así como para su tratamiento (Yildiz, 2011).

Capítulo 2. Virus.

El hecho de que los virus estén sujetos a constante investigación se debe a su variedad y a su potencial patogénico (Sánchez-Rodríguez, 2012). Los virus son complejos supramoleculares naturales que forman nanoestructuras en el rango de 20 a 300 nm de tamaño. Se conocen más de 2400 especies de virus, con morfologías y composiciones bioquímicas extraordinariamente diversas. En su estado nativo, los virus son conjuntos de proteínas, que actúan como contenedores para almacenamiento y transporte de ácidos nucleicos. Tienen ARN o ADN, de una sola cadena o de doble cadena, empaquetados en cápsulas de proteína con estructuras icosaédricas o helicoidales, llamadas cápsides, que cubren y protegen al genoma del virus. En ocasiones, las cápsides están recubiertas por una envoltura lipídica. La cápside se construye a través de interacciones de las subunidades idénticas de proteínas entre sí utilizando interacciones no covalentes. El tamaño de las proteínas encontradas en las estructuras del virus depende del papel de la proteína en la arquitectura del mismo (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Los capsómeros son las unidades de construcción de las cápsides, y pueden estar formados por una o varias copias de una misma subunidad proteica o en algunos casos por distintas subunidades. La organización de los capsómeros le da a la cápside una forma geométrica característica. Esta distribución espacial de las proteínas permite que se forme un arreglo supramolecular homogéneo, en el cual los elementos químicos y estructurales se repiten de manera periódica a lo largo de la cápside viral (Sánchez-Rodríguez, 2012).

Los virus son parásitos intracelulares obligados que se multiplican redirigiendo la maquinaria biosintética de la célula huésped de la producción de componentes celulares a la fabricación de proteínas y ácidos nucleicos requeridos para el ensamble viral. Los virus se replican introduciéndose en una célula huésped, desensamblándose y copiando sus componentes, que luego se ensamblan en nuevas partículas de virus, que a su vez pueden infectar células adicionales (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Los virus envueltos, aquellos que poseen una capa lipoproteica, toman proteínas y lípidos de las células que infectan, las cuales a su vez proveen especificidad al virus para infectar a

una célula en particular (targeting proteins). Los virus que no presentan envoltura lipídica generalmente son llamados "virus desnudos". Para fines biotecnológicos, son mucho más útiles los virus no envueltos debido a que es más fácil su producción en sistemas heterólogos mediante métodos genéticos (Sánchez-Rodríguez, 2012).

Capítulo 3. Nanopartículas basadas en virus.

La nanotecnología viral es un campo emergente en una fase relativamente temprana de desarrollo. Sin embargo, teniendo en cuenta que algunas tecnologías de nanopartículas basadas en virus (VNPs) fueron introducidas hace casi tres décadas, recientemente las VNPs han dado grandes pasos hacia la clínica y su desarrollo se está acelerando. Una razón para esto es que la tecnología de las VNPs ofrece una plataforma altamente versátil, tanto en términos de ingeniería química como en el contexto del desarrollo biomédico y aplicaciones. Un derivado de las VNPs son las partículas tipo virus (VLPs), cuya principal cualidad es la de no ser infecciosas debido a su falta de material genético. Se requiere investigación adicional para desarrollar una comprensión integral del comportamiento de las plataformas VNP/VLP *in vivo*, que facilite el traslado de nanomedicinas basadas en virus desde el laboratorio de investigación hasta la clínica (Yildiz, 2011).

La liberación controlada y dirigida de fármacos es uno de los campos más dominantes y prometedores de la nanomedicina. Nos referimos a sistemas que poseen la capacidad de administrar fármacos o moléculas esenciales durante un periodo prolongado de tiempo a una tasa de liberación controlada, permitiendo niveles constantes en el organismo y/o a su vez, direccionando hacia el sitio de acción. Así pues, es posible la reducción de los efectos secundarios tóxicos del fármaco y logra una terapia más eficiente. El interés en el desarrollo de este campo queda claro al analizar cuál es la mayor problemática de la administración convencional de medicamentos hoy en día: se administra en dosis elevadas debido a una alta dispersión en el organismo, por lo que se vuelve tóxica. Entre los casos más comunes se encuentran la administración oral de antibióticos. Algunas de estas moléculas poseen baja biodisponibilidad lo que requiere una elevada concentración para que sea efectiva la terapia. Sin embargo, administradas por vía oral pueden provocar

irritación a nivel gastrointestinal, hecho que puede ser salvado mediante una liberación controlada. Más grave aún la situación para patologías como cáncer, donde los tratamientos convencionales basados en la quimioterapia discriminan pobremente entre células transformadas y normales, provocando severos efectos secundarios (inmunosupresión, disminución de las series celulares mieloides, etc.) (Castro, 2012).

En este contexto, el diseño de sistemas, y en particular, nanosistemas que optimicen la biodisponibilidad de un fármaco resulta fundamental para abordar la problemática, que permiten controlar principalmente: 1) cuánto fármaco se libera, 2) en qué órganos se realiza la liberación, 3) a qué tipo de célula está dirigido, 4) en qué tiempo se libera el mismo, 5) cuánto tiempo reside en el organismo, y 6) la toxicidad del fármaco dada su baja concentración (Castro, 2012).

La gran ventaja que presentan los nanosistemas para la administración de fármacos es precisamente la dimensión nanométrica de los mismos, que les permite ingresar a una célula por mecanismos diversos y ser dirigidos hacia un blanco intracelular cuando sea requerido. Actualmente, el desarrollo de nanosistemas de liberación controlada y/o dirigida de estas moléculas es una de las áreas con mayor interés tanto para el nivel de investigación como industrial. Esto ha resultado en la apertura de un campo de desarrollo de alta complejidad y lleno de posibilidades de diseño, con una variedad de sistemas que puedan actuar como vectores en el transporte de fármacos, como son nanopartículas biopoliméricas, liposomas, dendrímeros, nanopolvos, nanocristales, etc. En estos sistemas se pueden estructurar la composición de las matrices con diversos materiales y su topología de manera de otorgarle propiedades específicas de actividad (Castro, 2012).

Las VLPs tienen dos superficies distintas (internas y externas) que pueden ser explotadas para generar nanomateriales que muestren múltiples funcionalidades por diseño, con potencial aplicación bionanotecnológica. Las superficies de las VLPs han sido funcionalizadas con una gran variedad de moléculas, incluyendo colorantes fluorescentes, vitaminas, azidas y alquinos, carbohidratos, ácidos nucleicos, polietilenglicol, péptidos, proteínas, partículas conductoras y puntos cuánticos luminiscentes. Las modificaciones

químicas y genéticas de la superficie de las VLPs aumentan las posibilidades de su decoración, confiriendo propiedades químicas únicas que pueden ser utilizadas para la fijación y presentación de diferentes residuos en su superficie externa. Además, el espacio en el interior de la capa de proteína puede ampliar su versatilidad como nanomaterial para encapsular una amplia variedad de moléculas, por ejemplo, para la entrega de genes o fármacos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Los virus han evolucionado naturalmente logrando infectar células hospederas de manera específica con gran eficiencia, y liberar su carga de material genético. Por lo tanto, los virus funcionan como una base ideal para el desarrollo de vehículos específicos de liberación de fármacos en tejidos. El interés de aprovechar al máximo las VNPs y las VLPs ha unido a biólogos, químicos, ingenieros y cualquier cantidad de científicos interesados en la medicina (Yildiz, 2011). Una gran variedad de virus y sus VLPs se han utilizado como plantillas para la fabricación de nanomateriales y para desarrollar aplicaciones tecnológicas, incluyendo biomateriales, vacunas, herramientas catalizadoras y químicas, sistemas de imagenología y materiales electrónicos moleculares. El enorme potencial de las VLPs en el campo de la nanotecnología depende de sus características estructurales. Entre las principales ventajas estructurales están su biocompatibilidad y tamaño. Las VLPs presentan una geometría bien definida y una notable uniformidad, ideal para la fabricación a nanoescala. Además, las VLPs presentan una notable estabilidad en una amplia gama de pHs y temperaturas, así como una alta tolerancia a los disolventes orgánicos. En el campo médico, las VLPs pueden inducir respuestas inmunes similares a sus viriones nativos, pero sin el peligro de infecciones, ya que carecen de material genético viral. Finalmente, es posible producir y aislar VLPs en grandes cantidades por medio de métodos simples, en particular cuando se utilizan sistemas de expresión heterólogos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Las VLPs de virus icosaédricos se han producido con éxito, principalmente con propósitos terapéuticos como son vacunas o vectores para la liberación sitio-específica de genes, proteínas o medicamentos. Diferentes sistemas de expresión han sido utilizados para la producción de las proteínas que conforman las cápsides de diversos virus. Por ejemplo,

líneas celulares de mamíferos y plantas, el sistema baculovirus-células de insecto, varias especies de levaduras como *Sacharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, y bacterias como *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp. (Santi *et al.*, 2006; Grgacic *et al.*, 2006; Schneeman *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2009; Lowin *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2008). Cada uno de estos sistemas tiene sus ventajas y limitaciones, como se muestra en la Tabla 1 (Pattenden *et al.*, 2005).

Tabla 1. Comparación de diversos sistemas de expresión para la producción de VLPs

Sistema de expresión	Ejemplo de VLPs	Comentarios
Bacteria	Poliomavirus, papilomavirus	Sistema de expresión simple y de bajo costo, factible para la producción de proteínas de fagos bacterianos. La eficiencia de expresión es variable y el rendimiento de proteína soluble puede ser bajo. No permite el ensamble de VLPs de virus de mamíferos. No se llevan a cabo modificaciones post-traduccionales.
Levadura	Poliomavirus, papilomavirus, virus de la hepatitis	Sistema de expresión simple y de bajo costo, generalmente permite el ensamble de proteínas estructurales virales en VLPs solubles.
Células de insecto	Poliomavirus, papilomavirus, rotavirus, calicivirus, norivirus	Eficiencia de expresión relativamente baja, por lo que el costo es alto, pero permite el ensamble de las proteínas estructurales virales en VLPs solubles.
Células de mamífero	Retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de Epstein-Barr	Este sistema permite obtener virus nativos. Es un método muy costoso con baja eficiencia. Diversos contaminantes pueden ser incorporados dentro de las partículas. Se pueden obtener diversas modificaciones post-traduccionales.

(Pattenden *et al.*, 2005).

Vale la pena mencionar que las VLPs pueden ser producidas en otros sistemas de expresión, como las plantas transgénicas y no se prevén restricciones para otros sistemas de expresión. La selección del sistema de expresión implica un gran número de factores y la elección final se basará en las circunstancias particulares de la naturaleza de la VLP y su uso deseado. Las VLPs pueden purificarse directamente y utilizarse después de un autoensamble *in vivo* o pueden someterse a un reensamble *ex vivo* para mejorar la eficacia, la homogeneidad del producto y, si se desea, se pueden empaquetar junto con moléculas terapéuticamente activas. Por supuesto, el propósito de las VLPs determina cómo y cuándo deben ser ensambladas y si alguna molécula tiene que estar presente (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

3.1. Modificación de la superficie de las VLPs.

La posibilidad de modificar las superficies de las VLPs permite conferir propiedades que las hacen potencialmente útiles en biotecnología, nanotecnología y aplicaciones electrónicas. En los últimos años, las VLPs han ganado terreno en el campo de la bionanotecnología como plantillas orgánicas para el desarrollo de nuevos biomateriales. La superficie de los virus se ha utilizado como un andamio para la unión selectiva de diferentes moléculas pequeñas. Esto se puede lograr ya sea mediante la modificación genética de los genes virales o por modificación química de diferentes grupos reactivos sobre las partículas de virus (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

La decoración de las VLPs tiene aplicaciones potenciales en dispositivos ópticos, electrónicos y mecánicos para la creación de sensores y catalizadores. El uso de materiales bioorgánicos como plantillas para construir nanoestructuras inorgánicas anisotrópicas ha surgido como un método altamente atractivo en los últimos años, porque la mayoría de los materiales inorgánicos no forman la estructura deseada por sí mismos. Las arquitecturas biomoleculares organizadas, como las VLPs, ofrecen una variedad de morfologías que son lo suficientemente robustas como para tolerar las modificaciones químicas y, por lo tanto, producir nuevos materiales orgánicos/inorgánicos. Los virus filamentosos, como el virus del mosaico del tabaco (TMV), el bacteriófago M13 y el virus fd, han abierto la puerta a nuevos materiales orgánicos/inorgánicos con estructuras y propiedades especiales, que contienen metales, sílice y partículas semiconductoras. Estas estructuras permiten la funcionalidad química combinada del agente de modificación y las ventajas del revestimiento proteico del virus, como la polidispersidad de bajo tamaño y organización líquido-cristalina. Un claro ejemplo es el virus fd filamentosos, que se ha utilizado como molde para la formación de nanomateriales de sílice con morfologías bien definidas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Otro de los multivariados usos de las VLPs, y en especial de las modificadas en su superficie, es la tecnología de imagen. El diseño de VLPs marcadas en su superficie con alguna proteína, aminoácido, fluoróforo u otra partícula de seguimiento fluorescente, es un

método adecuado para cuantificar la biodisponibilidad, la vida media y la accesibilidad tisular de las partículas virales, así como procesos biológicos que involucren farmacocinética o farmacodinamia y que no pueden ser vistos de alguna otra forma, ya que estos nano-acarreadores pueden revelar cómo estas partículas se comportan *in vivo*. (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010; Jain, 2005; Grgacic *et al.*, 2006; Kalnciema, 2012)

3.2. Parvovirus B19.

En este trabajo se utilizará como modelo a las VLPs derivadas del Eritroparvovirus 1 de primate, comúnmente conocido como Parvovirus B19 (B19V). Los parvovirus son agentes que causan diversas enfermedades en muchos mamíferos. El B19V fue descubierto casualmente en 1974 y fue en 1981, que Pattison lo asoció por primera vez a una enfermedad concreta, la crisis de anemia aplásica transitoria (CAT), al encontrar al antígeno B19 o anticuerpos IgM en sueros de pacientes con anemia de células falciformes (Sánchez-Rodríguez, 2012).

El B19V es un pequeño virus icosaédrico, de 18 a 26 nm de diámetro, que pertenece a la familia *Parvoviridae* y es el miembro mejor caracterizado de esta familia que infecta a los humanos. Perteneciente al género *Erythrovirus*, posee ADN de una sola hebra de 5.5 kb, que contiene la información justa para replicarse, empleando enzimas producidas durante la fase S del ciclo de la célula infectada. Este último hecho explica su tropismo por células con replicación activa. Tiene predilección por la serie eritroide, infectando e inhibiendo la actividad mitótica de eritroblastos. El B19V no afecta células madre hematopoyéticas necesarias para la recuperación. Además de células eritroides, puede infectar miocitos cardiacos, leucocitos y otros tipos celulares (Sánchez-Rodríguez, 2012).

La cápside del B19V mantiene empacado a su ADN genómico, el cual codifica para tres proteínas diferentes: dos proteínas estructurales (VP1 y VP2) que son codificadas por marcos de lectura traslapados, y una proteína no estructural (NS1). Esta cápside está formada por 60 subunidades de las proteínas VP1 y VP2; la proteína VP2 conforma un 96% del total de las proteínas de la cápside y tiene un peso molecular de 58 kDa. La

proteína VP1 es idéntica a la proteína VP2, pero con la adición de 227 aminoácidos en el extremo amino terminal, tiene un peso molecular de 84 kDa y representa el 4% remanente del total de las proteínas de la cápside (Kaufmann *et al.*, 2004; Heegaard y Brown, 2002).

El contenido limitado de ADN y la ausencia de una envoltura lipídica hacen que el B19V sea muy resistente a la inactivación térmica. El virus es estable a 56°C por 60 min y también es estable en disolventes orgánicos, provocando que sea ideal su uso en varios métodos de bioconjugación y en aplicaciones nanotecnológicas (Sánchez-Rodríguez, 2012).

En la Tabla 2, Sánchez-Rodríguez (2012) hace una profunda investigación acerca de las VLPs a partir del Parvovirus B19 en el cual nos muestra entre otras cosas que es posible obtener este tipo de partículas utilizando solamente la proteína estructural VP2 como en el caso de los trabajos reportados por Kajigaya en 1991 y Wong en 1994, los cuales presentan la misma morfología y antigenicidad que los viriones nativos.

Tabla 2. Estudios reportados relacionados con la producción de partículas tipo virus a partir de B19V (Sánchez-Rodríguez, 2012).

Estudio	Observaciones	Referencias
Expresión de las proteínas VP1/VP2 en baculovirus	Es factible su uso para la producción de vacunas. Es necesaria la presencia de las dos proteínas para la inducción de los anticuerpos en el huésped.	Bansal <i>et al.</i> , 1991; Sico <i>et al.</i> , 1994
Expresión de la proteína VP2 en baculovirus	Las VLPs presentaron la misma antigenicidad y morfología que los viriones nativos.	Kajigaya <i>et al.</i> , 1991; Wong <i>et al.</i> , 1994
Expresión de la proteína VP2 en <i>Sacharomyces</i>	Este sistema fue factible para producir altas cantidades de partículas solubles, con tamaño y antigenicidad similar a las partículas generadas en baculovirus.	Lowin <i>et al.</i> , 2005
Producción de VLPs PB19-VP2 fluorescentes en baculovirus	Se obtuvieron VLPs fluorescentes que podrían ayudar a elucidar el mecanismo de infección y patogénesis de este virus.	Gilbert <i>et al.</i> , 2005
Expresión de VP2 en <i>E. coli</i>	Se logró la expresión de la proteína VP2, presentando potencial como antígenos, pero no se reportó el ensamble de VLPs.	Lee <i>et al.</i> , 1999
Introducción de una etiqueta de histidinas en el extremo NH ₂ -terminal de la proteína VP1 y VP2, para su expresión en baculovirus	Se obtuvieron VLPs a partir de la proteína VP2 fusionada a la etiqueta de histidinas. Ambas proteínas se pudieron purificar por cromatografía de afinidad. Ambas proteínas tienen un alto potencial como antígenos para el diagnóstico de la infección por PB19.	Michel <i>et al.</i> , 2008
Producción de PB19 VLPs quimeras presentando el antígeno protector (PA) de <i>Bacillus anthracis</i>	Se obtuvieron VLPs quimeras con capacidad de retener la inmunogenicidad del epítipo (PA).	Ogasawara <i>et al.</i> , 2006
Producción de PB19 VLPs quimeras presentando 2 epítipes del virus del dengue	Se obtuvieron VLPs que presentaron una fuerte respuesta inmunológica para estos epítipes al hacer estudios en ratones.	Amexis y Young, 2006

Existen ya varios reportes que indican que el ensamble de VLPs derivadas de B19V puede realizarse *in vitro* a partir de VP2 recombinante expresada en *E. coli* (Sánchez-Rodríguez *et*

al., 2012; Santillán-Uribe *et al.*, 2015; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2016). Esta proteína puede autoensamblarse *in vitro* en nanopartículas bien organizadas. La capacidad de VP2 para formar VLPs a partir de proteínas desnaturalizadas por diálisis, es decir, capsómeros desnaturalizados mediante cambios de pH, hace de este sistema un buen candidato para experimentos de encapsulación de moléculas para aplicaciones biotecnológicas. La estabilidad térmica de estas VLPs puede ser prometedora para su uso en medicina, incluyendo el desarrollo de vacunas. Se requieren, sin embargo, investigaciones adicionales para desarrollar plenamente estas partículas como herramientas en nanociencias. Son muchas las posibles alternativas que se pueden utilizar para aprovechar esta herramienta y llevarla al siguiente nivel en aplicación nanotecnológica, como el diseño de algún liberador de carga o nanomaterial. Dentro del campo de la biología sintética, que converge con la nanotecnología de manera natural, encontraremos algunas de estas posibilidades.

Capítulo 4. Biología Sintética.

La naturaleza emplea una gran variedad de unidades moleculares básicas (ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares y lípidos). Éstos se ensamblan en sistemas y máquinas moleculares intrincadas, y a menudo híbridos. A su vez, éstos actúan en consecuencia de la evolución generando funciones nuevas y mejoradas. Este camino se refleja en la biología sintética, en la que los científicos pueden acceder a una jerarquía multicapa de componentes naturales y sintéticos en varios puntos, que en conjunto forman sistemas funcionales organizados (Bromley *et al.*, 2007). La afirmación de que no existe nada descubierto por el hombre que supere la complejidad y variabilidad de los mecanismos que se observan en los organismos vivos es totalmente válida (Castro, 2012).

En su sentido más amplio, la biología sintética es nuestro intento de entender la naturaleza a través del mimetismo. Este enfoque nos brinda la oportunidad tanto de desarrollar nuevos sistemas biológicos, así como nuevas funciones, y de realizar una prueba rigurosa de nuestra comprensión de la biología y cómo sus diversos componentes se reúnen, interactúan y funcionan (Bromley *et al.*, 2007).

Si tuviéramos que definirla en un sentido más estricto, la biología sintética (conocida también como Synbio, Genómica Sintética o Biología Constructiva) es el diseño y la construcción de partes biológicas nuevas, nuevos dispositivos y sistemas que no existen en el mundo natural. Es también el rediseño de sistemas biológicos existentes para que ejecuten tareas específicas. Los avances en las tecnologías nanoescalares —la manipulación de la materia al nivel de átomos y moléculas— contribuyen a los avances de la biología sintética (ETC group, 2007).

La biología sintética es un área emergente y excitante para la investigación. Abarca muchos enfoques potenciales en la oferta para crear sistemas complejos, funcionales, bioinspirados. Aunque las quimeras genéticas se produjeron desde los 70's, el campo de la biología sintética y sus sistemas con propiedades emergentes, fue lanzado por un par de artículos publicados en el número de la revista *Nature* del 20 de enero de 2002. El primero, escrito por Michael B. Elowitz y Stanislas Leibler, presentaba un oscilador genético sintético. El otro, de Timothy S. Gardner, Charles R. Cantor y James J. Collins, describía un dispositivo de conmutación genético y demostraba que con él era factible modelar, diseñar y construir redes sintéticas de genes a partir de componentes biomoleculares (Schmidt, 2010).

La biología sintética ha experimentado avances rápidos en los últimos años. Inicialmente se centra en la prueba de concepto de los estudios que ilustran nuestra capacidad de escribir código genético a gran escala y demostrar la utilidad de introducir conceptos de ingeniería en la biología, el campo ahora se está moviendo rápidamente hacia las aplicaciones industriales. En particular, se considera que la ingeniería de sistemas de producción microbiana para moléculas pequeñas de alto valor tiene un gran potencial, dirigida a compuestos que van desde sabores y fragancias hasta fármacos clínicamente relevantes. Los fármacos han inspirado algunas de las primeras historias de éxito de la biología sintética por dos razones principales: por un lado, los fármacos de moléculas pequeñas de uso corriente (de la aspirina a la artemisinina) son muy a menudo derivados de productos naturales, de modo que el retorno a la producción microbiana se considera relativamente sencillo. Por otro lado, muchas vías naturales biosintéticas muestran un sorprendente nivel

de modularidad incorporada en muchos niveles, que pueden ser explotados por los enfoques de ingeniería de la biología sintética (Breitling y Takano, 2015).

Klein *et al.* (2014), aprovechó el poder de la biología sintética en la levadura, *S. cerevisiae*, para crear una biblioteca entera de 74 nuevos compuestos químicos enriquecidos para compuestos bioactivos. Utilizando rutas biosintéticas ensambladas al azar de una variedad de fuentes naturales en combinación con una pantalla de actividad interna en las mismas células utilizadas para la producción, fueron capaces de dirigir el proceso de descubrimiento hacia moléculas con propiedades estructurales y biofísicas que cumplen con las reglas tradicionales para la semejanza del fármaco (Breitling y Takano, 2015).

La biología sintética, al igual que todas las disciplinas de ingeniería, se basa en la disponibilidad de poderosas herramientas estandarizadas para todos los pasos a lo largo del ciclo de diseño-construcción-prueba (y aprendizaje). Muchas de las herramientas necesarias, por ejemplo, la síntesis del genoma, montaje y métodos de edición, son habitualmente genéricos. Otros son específicos para el campo de la biología sintética de moléculas pequeñas. Estos comienzan con los métodos para el descubrimiento integral y la anotación de bloques de construcción biosintéticos en los genomas recién secuenciados, como lo ejemplifica el proceso denominado antiSMASH (Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) (Breitling y Takano, 2015).

Otra interesante fuente de bloques biológicos de construcción está prometida por los recientes avances en el diseño computacional *de novo* de enzimas con actividades que anteriormente no estaban disponibles en los sistemas biológicos. Los enfoques de ingeniería enzimática también se benefician de la creciente disponibilidad de secuencias del genoma, que permiten la manipulación guiada por la evolución de las enzimas existentes, por ejemplo, para la especificidad del sustrato alterada en líneas de ensamblaje molecular para policétidos o péptidos no ribosómicos. Por ejemplo, la identificación de los eventos de recombinación subyacentes a un cambio importante en la especificidad del sustrato durante la evolución de una péptido-sintasa no ribosómica, permitió crear variantes enzimáticas que

aceptaban sustratos alternativos, basados en los puntos de recombinación inferidos (Crüsemann *et al.* 2013).

También se pueden aplicar estrategias evolutivas análogas a nivel de la vía, como lo demuestra el reciente diseño racional de las nuevas policétido sintasas funcionales, emulando los procesos evolutivos naturales que subyacen a la diversificación de esta clase biosintética. La producción de moléculas pequeñas, ya sea despertada a partir de la información del genoma u optimizada en un huésped nativo o heterólogo, requiere no sólo la expresión de la ruta biosintética del núcleo, sino también suministro suficiente de precursores y competencia reducida de reacciones alternativas (Breitling y Takano, 2015).

Los ambiciosos objetivos de ingeniería de la biología sintética se están convirtiendo rápidamente en una realidad basada en los avances en nuestra capacidad de editar genomas, identificar y optimizar bloques de construcción biosintéticos, crear rápidamente bibliotecas de caminos y nuevos compuestos y depurar y mejorar los sistemas de ingeniería. La biología sintética se basa en la diversidad de herramientas computacionales, métodos de ingeniería del genoma, tecnologías analíticas y de detección, pero también permite una nueva diversidad a nivel de organismos hospedadores, así como módulos biosintéticos y productos finales bioactivos. Todo esto se reúne en el marco compartido del ciclo de diseño-construcción-prueba de la biología sintética (Breitling y Takano, 2015).

En el corazón de la biología sintética yace la creencia de que todas las partes de la vida pueden producirse sintéticamente (es decir, mediante síntesis química), que pueden diseñarse con ingeniería y ensamblarse para producir organismos funcionales (ETC group, 2007). Dada la elegancia de la estructura y la función en la naturaleza, el desarrollo de sistemas sintéticos biológicos presenta un enorme desafío. La amplitud y el potencial de la ciencia de los péptidos y las proteínas en la biología celular y la bionanotecnología se capturan maravillosamente en textos académicos recientes y en libros de ciencias populares (Bromley *et al.*, 2007).

La ingeniería de proteínas también puede ser muy útil a pequeña escala, por ejemplo, creando bloques de construcción enzimáticos que no se ven afectados por la inhibición del producto final que se suele ver en las enzimas naturales. Otros enfoques para diversificar el conjunto de bloques químicos disponibles se basan en una variedad de enfoques experimentales. Recientemente Walker y colaboradores utilizaron la biología sintética para desarrollar una biblioteca de nuevos bloques de construcción fluorados para biomoléculas. La capacidad de perseguir muchas rutas de diseño en paralelo permitió la exploración de conceptos útiles adicionales, por ejemplo, el uso de andamios de proteínas de ingeniería para optimizar las actividades relativas de las enzimas a lo largo de una vía de producción de diseñador, o la importancia de equilibrio sutil de las actividades enzimáticas a lo largo de un camino para una producción óptima (Walker *et al.*, 2013).

En el área de la nanotecnología basada en péptidos sintéticos se encuentran muchos desafíos, en particular, la decoración de las estructuras con entidades funcionales, los problemas de producción recombinante y de biocompatibilidad, si estos materiales se destinarán para un uso médico regular (Bromley *et al.*, 2007).

Si bien hace pocos años la biología sintética era vista como un concepto de vanguardia, sus ideas y métodos ahora son parte de la corriente principal de la biología molecular y la ingeniería genética, tanto así que ya se debate si sus ambiciosas metáforas de ingeniería son necesarias (Breitling y Takano, 2015).

A lo largo de la evolución, las células han desarrollado sofisticados sistemas de comunicación intercelular que a través de receptores específicos les permiten responder a estímulos externos, locales o incluso muy distantes. Un ejemplo muy claro son los sistemas de transducción que requieren de la formación de complejos multiproteicos. Las interacciones de los diferentes componentes dependen de regiones discretas de las proteínas denominadas dominios de interacción proteica, de los cuáles se han identificados varias docenas. Estas interacciones son altamente específicas y se rigen por principios bioquímicos sencillos, como interacciones entre residuos de aminoácidos polares, hidrofóbicos o con carga (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

Actualmente, se considera que la transducción de señales entre proteínas no ocurre de manera lineal, y que las diferentes moléculas que participan no se reclutan individualmente. Se considera que se requiere de la formación de complejos multiproteicos para que se puedan transmitir las señales. A estas agrupaciones o módulos multiproteicos se les ha denominado transducisomas, pudiendo requerirse de más uno de estos transducisomas en diferentes etapas de un mismo proceso de señalización. En muchos casos, los elementos implicados en la señalización se encuentran anclados entre sí por medio de proteínas que funcionan como adaptadoras o andamios. El estudio de estos complejos multiproteicos ha permitido comprender con mayor claridad cómo ocurre la integración de distintas vías de comunicación intracelular, un concepto conocido desde hace mucho tiempo como interacción cruzada (cross-talk). A las proteínas que tienen varios dominios de interacción se les conoce como andamios o multicontactos, ya que tienen la capacidad de asociarse de manera simultánea con varias proteínas formando un complejo de señalización (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

4.1. Interacciones proteína-proteína.

Las interacciones entre proteínas han sido estudiadas ya desde hace muchos años por medio de diferentes técnicas bioquímicas, moleculares y celulares. Por ejemplo, la co-inmunoprecipitación ha permitido demostrar que las interacciones proteína-proteína se establecen muy rápidamente y en orden secuencial. Un ensayo funcional de las interacciones proteicas como el ensayo de doble híbrido ha permitido corroborar la capacidad que los diferentes dominios tienen para mediar las interacciones proteicas y para determinar la especificidad y la estabilidad de estas interacciones. El ensayo FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) que pone en evidencia la proximidad de dos proteínas, ha permitido cuantificar las afinidades de interacción entre dos o más proteínas. Con ayuda de la técnica de microscopía confocal también ha sido posible observar la formación *in vivo* de complejos proteicos entre dos proteínas marcadas con dos colorantes

fluorescentes de diferente color y mostrar su localización subcelular en respuesta a la estimulación de los receptores (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

Inicialmente, se sugirió que los componentes que integran los complejos proteicos se encuentran dispersos homogéneamente en el citoplasma de la célula y que la asociación entre dos proteínas, llámense 1 y 2, es azarosa, de tal forma que puede no formarse un complejo proteico (Fig. 2A). Por lo tanto, para que se lleve a cabo la interacción entre la proteína 1 y la proteína 2 son necesarias tanto su difusión libre, como su rotación libre. En este proceso el ángulo de aproximación de cada proteína también es determinante para que se pueda dar dicha interacción (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

En la Figura 2 se dan algunos ejemplos de las posibilidades que tienen dos proteínas de formar un complejo proteico. Esto es de manera didáctica y no necesariamente se apega por completo a la realidad, ya que las posibilidades de que esto ocurra en un sistema vivo como una célula son mucho más complejas.

Como se muestra en la Figura 2, en la formación de complejos proteicos es determinante que cada proteína tenga una orientación y una conformación definidas que permita que ambas proteínas interactúen de forma óptima. Se ha postulado que un proceso de difusión dirigida es el que incrementa la probabilidad de que se establezca el anclaje preciso entre ambas proteínas (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

Se propone que este fenómeno ocurre cuando una de las dos proteínas ingresa al campo electrostático de la otra. A este espacio de influencia se le ha denominado región de conducción o “steering region”. Una vez que una proteína se encuentra adentro de este espacio, la probabilidad de interacción entre las dos proteínas se incrementa. Esto ocurre en parte si los ángulos de rotación de cada proteína son más controlados (Fig. 2C). La reorientación que las proteínas 1 y 2 adquieren durante su aproximación se explica con base en la distribución espacial particular, tanto de las cargas positivas como negativas de ambas proteínas (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

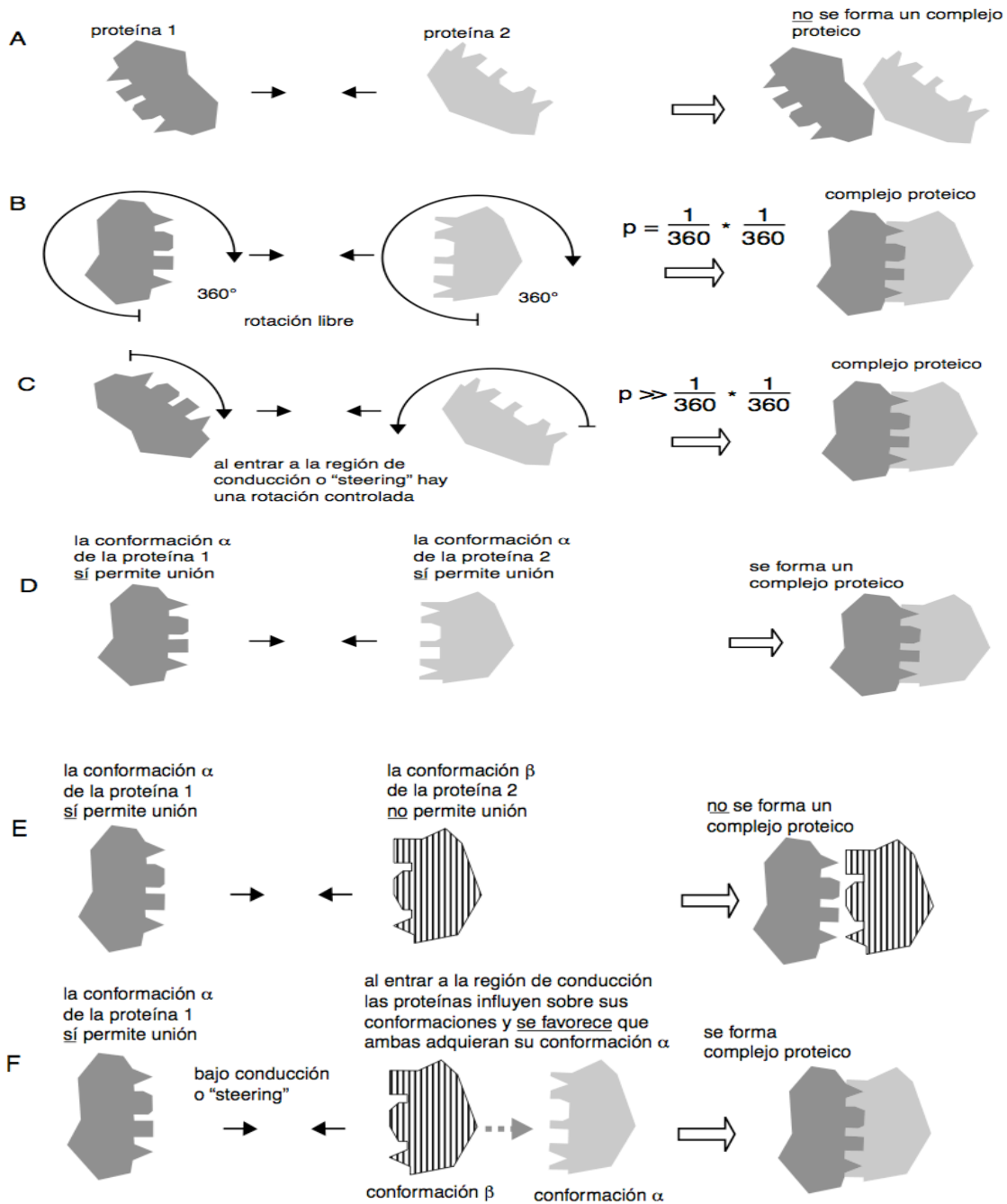


Figura 2. Posibilidades generales de que se forme un complejo proteico. A) Los dominios de las proteínas 1 y 2 no interactúan, por lo tanto no se forma el complejo proteico; B) La rotación libre de las proteínas permite que se encuentren los dos dominios proteicos y que haya una interacción proteína-proteína; C) formación del complejo proteico mediante la creación de una región de conducción o "steering" la cual permitirá una rotación dirigida y será mucho más probable que ocurra este suceso al propuesto por rotación libre; D y F) formación del complejo proteico que se lleva a cabo gracias a la conformación favorable de ambas proteínas, no así en el caso del ejemplo E) en donde una de las proteínas tiene una conformación distinta (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

Algunos de los resultados experimentales en este campo indican que para que se establezca una asociación proteica es indispensable: 1) el rearrreglo estructural de las superficies de interacción con el fin de eliminar cualquier impedimento estérico que desfavorezca la unión, 2) que las cargas positivas y/o negativas de ambas proteínas se localicen en la superficie, 3) que exista una distancia muy pequeña entre ellas, de 5 a 20 Å, y 4) una orientación correcta de los dominios de interacción proteica de las proteínas que interactúan (Zentella-Dehesa y Alcántara-Hernández, 2003).

Con base en las cuatro premisas anteriores, daremos paso a los componentes clave del siguiente trabajo, los cuales llamaremos tectones moleculares. Para conocer la importancia de ellos, tendremos que analizar un poco a estos y otros tantos bloques de construcción moleculares.

4.2. Bloques de construcción moleculares.

La biología sintética tiene componentes potenciales para formar estructuras supramoleculares, los cuales tienen un nivel jerárquico de acuerdo a su complejidad y también responden al grado de divergencia respecto a las entidades naturales a las que imitan, es decir qué tan sintéticos son. En la Figura 3 se pueden apreciar estos dos aspectos en los ejes “y” y “x” respectivamente.

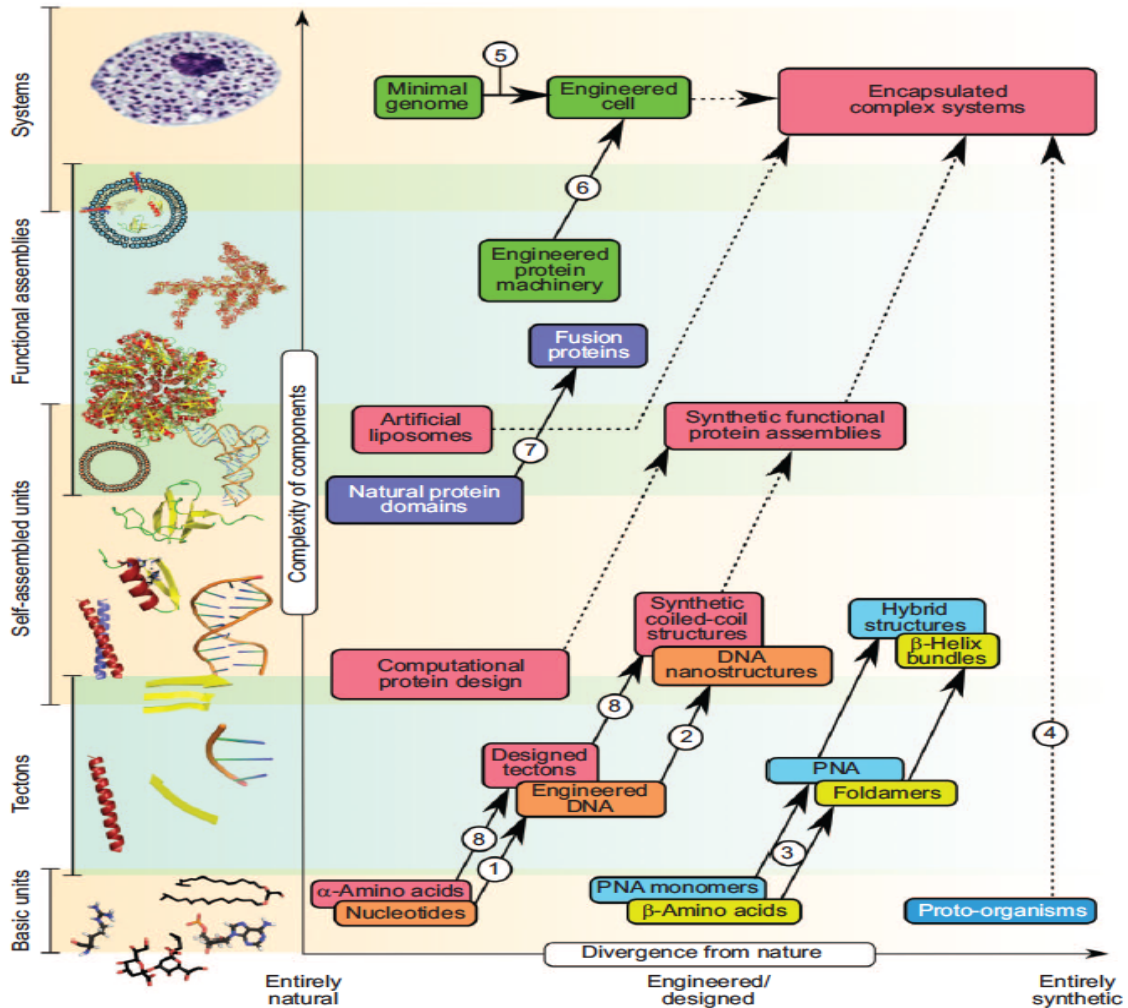


Figura 3. Esquema disciplinario de la biología sintética. Algunas de las rutas actualmente exploradas se mapean de acuerdo con la posición en la jerarquía natural de la que proviene el trabajo y el nivel de divergencia de la naturaleza que se está intentando. Ruta 1: la construcción del ADN de ingeniería, que permite la manipulación en todos los niveles de la jerarquía natural. Ruta 2: el uso de ADN manipulado para producir nuevas nanoestructuras. Ruta 3: el desarrollo de aminoácidos no estándar y pares de bases (PNA, Peptide Nucleic Acids), que luego pueden ser ensamblados en plegadores y análogos de ADN. Ruta 4: la creación de sistemas genéticos alternativos. Ruta 5: producir genomas mínimos (cromosomas sintéticos) y trasplantarlos en huéspedes procariotas. Ruta 6: añadir nuevas funciones a los organismos vivos manipulando la maquinaria celular. Ruta 7: la fusión de proteínas para producir conjuntos con funciones novedosas. Ruta 8: el uso de la síntesis de péptidos para crear bloques de construcción programables que pueden ensamblarse en componentes de proteínas funcionales. Los ejes se proporcionan simplemente como una guía cualitativa; no se implica ninguna relación lineal u otra (Bromley *et al.*, 2007).

En un extremo, está la síntesis de cromosomas enteros, que pueden ser trasplantados en células huésped para crear nuevos organismos vivos mínimos. En un nivel intermedio, grupos funcionales o cascadas de biomoléculas naturales (ácidos nucleicos y proteínas) pueden ser manipulados en células para obtener nuevos fenómenos y funciones. En otro nivel más abajo en esta jerarquía, pueden usarse bloques de construcción crudos, pero

naturales (nucleótidos y aminoácidos) para diseñar polímeros. Éstos se pueden programar para crear componentes biomoleculares auto-ensamblados y funcionales, que a su vez pueden ser combinados para crear sistemas funcionales. Para extraer más de los sistemas naturales, los enfoques semi- y totalmente sintéticos de la biología pueden usarse para crear componentes interactivos y, por lo tanto, sistemas funcionales.

La biología natural consiste en albergar, transferir y traducir la información genética, proporcionando la moneda universal de la energía biológica, y las proteínas de encapsulación hacen prácticamente todo lo que se requiere. Además, los péptidos y las proteínas se pueden ahora confeccionar de manera fiable, rápida y barata, ya sea de forma sintética o recombinante. La amplitud y el potencial de la ciencia de los péptidos y las proteínas en la biología celular y la bionanotecnología se capturan maravillosamente en textos académicos recientes y en libros de ciencias populares (Bromley *et al.*, 2007).

Por las razones mencionadas en el párrafo anterior, la ruta que tomaremos como base para este trabajo es la 8, la cual corresponde al uso de la síntesis de péptidos para crear bloques de construcción programables que pueden ensamblarse en componentes de proteínas funcionales. Hemos adoptado el término tectón de la química supramolecular, donde se utiliza para describir componentes moleculares programados y bloques de construcción a escala nanométrica. Para los caminos basados en ácidos nucleicos, un tectón sería un oligonucleótido corto que contiene la información requerida para el ensamblaje adicional en hélices bicatenarias u otras estructuras secundarias (Bromley *et al.*, 2007).

Las combinaciones de tectones conducen al siguiente nivel de jerarquía a lo largo del eje y de la Figura 2, unidades autoensambladas. Para los oligonucleótidos, el par de bases entre tectones conduce a estructuras basadas en una doble hélice, que pueden ser usadas como base para programar el ensamblaje de nanoestructuras discretas y materiales extendidos (Figura 3, trayectoria 8) (Bromley *et al.*, 2007).

En estos aspectos, nuestra definición de tectón describe algo más específico que un elemento simple de la estructura secundaria del polipéptido. Tectón implica que el polímero

ha sido programado para plegarse localmente (en una estructura secundaria) y que tiene características adicionales para dirigir el ensamblaje adicional a estructuras prescritas de orden superior. De manera similar, aunque las definiciones de unidades auto-ensambladas y conjuntos funcionales incluyen las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, se pretende que impliquen algo más que esto. En estos casos, están destinados a abarcar no sólo estructuras naturales, sino también conjuntos de nuevo diseño, por ejemplo, fibras similares a proteínas fabricadas a partir de tectones novedosos y conjuntos y materiales híbridos (Bromley *et al.*, 2007).

En combinación con nuevas enzimas y un mecanismo de encapsulación, se puede trazar un camino completo desde unidades básicas de construcción natural hasta las entidades sintéticas y funcionales de tipo celular (Bromley *et al.*, 2007).

4.3. Hélices enrolladas (Coiled-coils).

El sistema de hélices enrolladas, también llamado “coiled-coils”, es un excelente punto de partida para el diseño de tectones peptídicos y unidades autoensambladas por varias razones. En primer lugar, a pesar de un patrón de repetición subyacente similar en sus secuencias, los motivos en espiral muestran una sorprendente riqueza en estructura y función. En segundo lugar, hay mucha más sutileza en sus relaciones secuencia-estructura que para algunos de los otros motivos antes mencionados. En tercer lugar, las reglas de diseño de proteínas dilucidadas hasta el momento han conducido a una variedad de diseños exitosos en espiral, aunque, al igual que con la mayoría de los esfuerzos de diseño de proteínas, las rutas a estos éxitos no siempre han sido sencillas y directas. Finalmente, las estructuras de tectón helicoidal pueden ser funcionalizadas mediante aminoácidos "de repuesto", expuestos a disolventes (Bromley *et al.*, 2007).

Su tamaño relativamente pequeño, además de su estructura bien definida, convierte a estas hélices enrolladas en un sistema muy atractivo para la ingeniería de proteínas y aplicaciones biotecnológicas, como la construcción de anticuerpos miniaturizados, el

control de la oligomerización del dominio de la proteína de señalización, y la orientación específica de GFPs hacia las proteínas del citoesqueleto (De Crescenzo *et al.*, 2003).

Las hélices enrolladas tienen roles ubicuos en una amplia gama de procesos mecanobiológicos naturales, tales como la transcripción, el transporte, la actividad enzimática, la señalización, la estructura de proteínas citoesqueléticas, proteínas motoras y proteínas de fusión vírica (De Crescenzo *et al.*, 2003). Avances recientes en el diseño de proteínas *de novo* han facilitado nuevas aplicaciones y funcionalidades que involucran este sistema peptídico. Esto se debe a que el autoensamble de copolímeros de bloques basados en péptidos está generalmente impulsado por la propensión de los péptidos a formar estructuras terciarias tridimensionales bien definidas (Hamed *et al.*, 2015).

Las propiedades estructurales de las hélices enrolladas se han caracterizado extensamente a partir de numerosas estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución. Las hélices pueden estar alineadas de una manera paralela o antiparalela. Las hélices que componen la estructura de la bobina en espiral están definidas por una heptada repetitiva (denotada abcdefg) en la que los residuos hidrófobos ocupan las posiciones a y d y se empaquetan de una manera característica, formando un núcleo hidrofóbico. Muchos estudios enfatizaron el papel de los residuos cargados (típicamente en las posiciones e y g) en el control de la especificidad de la oligomerización y abrieron el camino al diseño *de novo* de hélices enrolladas heterodiméricas (De Crescenzo *et al.*, 2003).

De Crescenzo y colaboradores (2003) diseñaron un sistema de hélices enrolladas heterodiméricas formado por dos péptidos, denominados hélice E y hélice K, y demostraron que este motivo de heterodimerización es prometedor no sólo para la expresión de proteínas y como marcador de purificación, sino también como un dominio de dimerización universal para aplicaciones de biosensor. La estabilidad y afinidad del sistema hélice E/hélice K se ha modificado con éxito variando la propensión R-helicoidal (serina vs. alanina), la hidrofobicidad de los residuos en el núcleo del complejo heterodimerizante en espiral (valina vs. isoleucina) y la longitud de la cadena, la cual resultó ser más estable con 35 residuos, es decir, con 5 heptadas repetitivas.

El modelo descrito se muestra en la Figura 4, la cual nos muestra el heterodímero hélice E/hélice K, señalando las posiciones y los aminoácidos que ocupan cada una de ellas. También nos muestra las interacciones del núcleo hidrofóbico, así como las asociaciones electrostáticas de las posiciones e y g, las cuales también dan nombre al heterodímero.

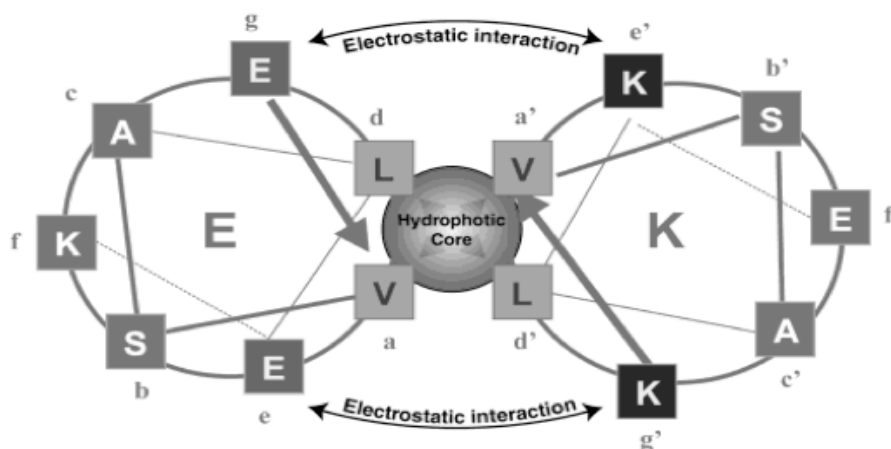


Figura 4. Sistema heterodimerizante desarrollado por De Crescenzo y colaboradores (2003).

Las interacciones estabilizadoras primarias son las interacciones hidrofóbicas en el núcleo, las atracciones electrostáticas a través de la intercara, y la propensión helicoidal. Se eligieron valina y leucina para las posiciones a y d, ya que se sabe que forman un núcleo hidrófobo altamente estable. Se utilizaron las interacciones electrostáticas en las posiciones e y g para controlar la especificidad del heterodímero frente a la formación de homodímeros, un enfoque explotado con éxito en secuencias tanto naturales como *de novo*. Una hebra de la hélice E, tiene ácido glutámico (que es preferible al ácido aspártico debido a su mayor propensión helicoidal) en todas las posiciones e y g, mientras que la hélice K complementaria tiene lisina en todas las posiciones e y g (Figura 4). De esta manera, los dos homodímeros se desestabilizan por repulsiones electrostáticas y el heterodímero hélice E/hélice K se estabiliza por atracción electrostática. La serina se colocó en la posición b para aumentar la solubilidad. Aunque la serina tiene una baja propensión helicoidal, es el residuo polar más pequeño sin carga que puede aumentar la solubilidad mientras que mínimamente interactúa con las otras cadenas laterales. Para compensar, la posición c estaba ocupada con alanina, el residuo aminoácido con mayor propensión helicoidal.

Aunque nominalmente es un residuo hidrófobo, la alanina tiene la cadena lateral más pequeña, lo que debería desalentar la agregación (De Crescenzo *et al.*, 2003).

La generación de una serie de hélice enrolladas heterodiméricas hélice E/hélice K de longitud variable y, por consiguiente, una amplia gama de estabilidades y afinidades, proporciona una flexibilidad considerable en el diseño de aplicaciones basadas en estas hélices en espiral. Por ejemplo, se podría usar una única proteína hélice E5 en varias aplicaciones que requieren diferentes grados de estabilidad de la hélice enrollada, simplemente variando la longitud de la hélice K. Esto permitiría cambiar su función entre purificación e inmovilización (De Crescenzo *et al.*, 2003). El sistema hélice E/hélice K es entonces muy favorable para los fines de nuestro estudio. Para el presente trabajo se tomó como base este diseño para la creación de las proteínas quiméricas, las cuales estarán presentes en el extremo de la proteína VP2 del B19V y su contraparte, una lipasa de *Bacillus pumillus*.

Capítulo 5. Lipasas.

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3.) son enzimas que catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces éster que se encuentran presentes en los triacilglicéridos. Los productos de esta reacción son ácidos grasos libres y glicerol. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la lipasa y de sus condiciones de actividad, también pueden obtenerse como productos mono- o diglicéridos con diferencias en las posiciones finales de esterificación (Santillán-Urbe, 2012).

En ausencia de agua, las lipasas también pueden catalizar reacciones de esterificación, transesterificación (alcohólisis), interesterificación y acidólisis a partir de alcoholes, ésteres y ácidos; además de la síntesis de amidas (aminólisis) y tioésteres partiendo de ácidos, aminas y tioles (Santillán-Urbe, 2012).

La actividad lipolítica que presentan las lipasas depende del área que posee la interface lípido-agua por unidad de volumen. A esta relación se le ha denominado “concentración de

interface” y es una forma de determinar la concentración de sustrato disponible para la catálisis. La concentración de interface refleja la acción de la enzima en esta región y está estrechamente relacionada con que la lipasa requiera de permanecer en la fase acuosa para posteriormente adsorberse en la interface y así interactuar con el sustrato (Santillán-Uribe, 2012).

La distribución de las enzimas lipolíticas en la naturaleza es extensa, quizás como consecuencia de que este tipo de enzimas presentan actividades que resultan esenciales para muchos organismos. Las lipasas se encuentran presentes en animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, las lipasas de origen microbiano son las más utilizadas en aplicaciones biotecnológicas y en la síntesis orgánica, principalmente aquellas que son obtenidas a partir de levaduras y bacterias (Santillán-Uribe, 2012).

El patrón común de plegamiento de todas las lipasas es una estructura α/β hidrolasa (Figura 5). Este patrón consta de una hoja β central que típicamente cuenta con 8 hebras paralelas, excepto la segunda que es anti paralela. Las secciones $\beta 3$ a $\beta 8$ están conectadas por hélices α que se encuentran unidas a cada lado de la hoja β central. En las familias de las lipasas bacterianas cuya estructura se encuentra descrita, se ha encontrado el mismo patrón de plegamiento, pero también se sabe que existen algunas diferencias características de cada familia en cuanto a la longitud y arquitectura de la cadena polipeptídica (Santillán-Uribe, 2012).

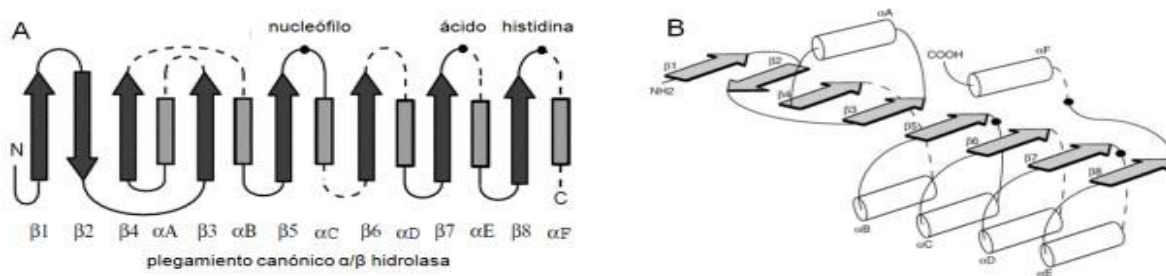


Figura 5. Patrón de plegamiento de las lipasas. A) Plegamiento canónico de hidrolasa. B) Topología de la estructura secundaria. La posición de los residuos catalíticos se muestra con círculos sólidos. La línea punteada indica que son asas de longitud variable (Santillán-Uribe, 2012).

Las lipasas poseen la capacidad de catalizar reacciones de hidrólisis sobre los enlaces éster presentes en los acilglicerolos. En sistemas acuosos, cuando la hidrólisis del sustrato ocurre por completo se liberan ácidos grasos y glicerol como productos. Sin embargo, cuando el medio de reacción es de carácter orgánico, las reacciones que se ven favorecidas son las de esterificación, alcoholólisis, aminólisis o tiólisis (Santillán-Uribe, 2012). En la Tabla 3 se pueden observar algunas de las muchas aplicaciones que tienen las lipasas en el campo de la industria.

Tabla 3. Aplicaciones industriales de las lipasas. (Santillán-Uribe, 2012)

Industria	Aplicación
De las grasas y Oleoquímica.	Elaboración de grasas de "diseño" ó "estructuradas" (Betapol®); obtención de productos sustitutos como grasa de cacao, mantequillas, margarinas; producción de biodisel.
De los polimeros.	Elaboración de poliésteres aromáticos, poliésteres biodegradables y aditivos para combustibles (1-butil oleato).
Textil	Para la remoción de algunos lubricantes incorporados a las telas; mejora de los procesos de deslavado de la mezclilla; modificación enzimática de fibras sintéticas.
De los detergentes	Adición a detergentes para mejorar su eficacia, permitiendo una reducción del gasto energético y la carga ambiental.
Farmacéutica, Cosméticos y Médica	Síntesis de precursores y resolución de mezclas racémicas; fabricación de ingredientes emolientes (isopropil miristato, isopropil palmitato, 2-etilhexil palmitato) y retinoides; como herramientas de diagnóstico y biosensores.
Alimentos	Como aditivos para modificar o generar compuestos que imparten el sabor y aroma (síntesis de ésteres a partir de ácidos grasos de cadena corta y alcoholes).
Papel y celulosa.	La adición de lipasas permite la obtención de un mayor rendimiento, mejora la blancura del papel, incrementa la vida útil de la maquinaria y reduce los residuos contaminantes

En este trabajo utilizamos la lipasa de *Bacillus pumilus* cepa GMA1, aislada originalmente en Los Azufres, Michoacán, México. Esta cepa produce una lipasa que muestra preferencia por los ácidos grasos de cadena corta como sustrato (Alcántara-Sol, 2009).

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 (BplA) es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis* (BslA) (Bustos-Jaimes, 2010). Esta última se sintetiza como pro-enzima, presentando un péptido señal de 31 aminoácidos que se pierde durante la secreción al medio extracelular. En su

forma madura, estas lipasas poseen 181 residuos de aminoácidos y tienen un peso aproximado de 19.5 kDa (Santillán-Uribe, 2012).

A partir de los datos cristalográficos de la BslA (Van Pouderooyen *et al.*, 2001) se ha modelado la estructura de BplA por homología. Para ello se ha considerado el alto porcentaje de similitud que existe entre ambas proteínas (80%) (Bustos-Jaimes, 1998). La estructura se muestra como una molécula globular con un plegamiento α/β hidrolasa mínimo con solo 6 hebras- β paralelas flanqueadas por 5 hélices- α .

La triada catalítica está constituida por los residuos de Ser77, Asp133 e His156. Los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 forman la cavidad oxianiónica y están en posiciones muy similares a las encontradas en otras lipasas cuya estructura es conocida. El dominio correspondiente a la tapa del sitio activo no se encuentra presente, por lo que los residuos catalíticos se encuentran expuestos al disolvente.

En un trabajo previo de nuestro grupo (Torres-Morales, 2016), el extremo N-terminal de la BplA fue fusionado al péptido hélice K5. La proteína fue caracterizada y se demostró que retenía su actividad lipolítica. En este trabajo utilizamos esta construcción para demostrar que las VLPs de B19V, con el péptido hélice E5 expuesto en su superficie, fueran capaces de formar una interacción estable con esta lipasa quimérica.

Capítulo 6. Justificación, hipótesis y objetivos.

6.1 Justificación.

En las últimas décadas, los virus han sido utilizados con motivos biomédicos y nanotecnológicos. El parvovirus B19 es un modelo bionanotecnológico prometedor, ya que puede formar partículas tipo virus con base en una sola proteína la cual se puede modificar en el extremo N-terminal sin que esto influya en su potencial de formar VLPs. Esto permite la introducción de sistemas catalíticos o dominios proteicos con fines biomédicos, de reconocimiento nanotecnológico o de construcción de biomateriales. De la misma manera, al ser un virus que infecta al ser humano cuenta con células blanco preexistentes lo cual además le da un enorme potencial en el área de la nanotecnología de imagen. El uso de péptidos pequeños expuestos en la superficie de la cápside es favorable para todas las características antes mencionadas y no presenta factores negativos en cuanto a estructura y funcionalidad de las VLPs. Por otra parte, la presentación de péptidos heterodimerizantes en su superficie, le agregaría funciones interesantes para el diseño de nanomateriales y la liberación de fármacos. Se decidió utilizar la lipasa de *B. pumilus* ya que se demostró previamente que el tectón K5 no elimina su capacidad hidrolítica.

6.2 Hipótesis.

Es posible presentar tectones proteicos funcionales en la superficie de partículas tipo virus del parvovirus B19 mediante la fusión de estos tectones en el extremo N-terminal de la proteína VP2, seguida de su expresión, purificación y ensamble *in vitro*. La única forma posible de obtener estructuras supramoleculares mediante el sistema hélice E5/hélice K5 es que ambos se encuentren debidamente expuestos en la superficie, tanto de las VLPs como de la proteína lipasa.

6.3 Objetivos.

Objetivo principal.

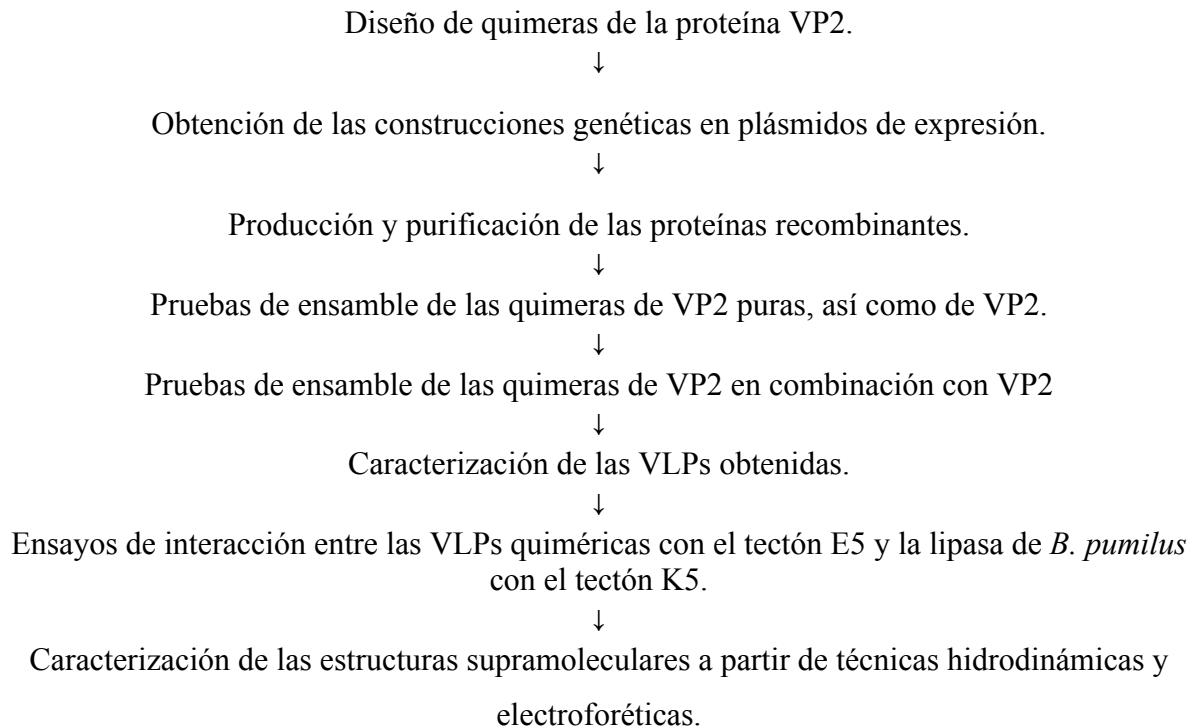
- Construir y estudiar las propiedades estructurales de VLPs que presenten los tectones hélice E y hélice K en sus superficies.

Objetivos particulares.

- Diseñar las quimeras E5 y K5 fusionadas a la proteína estructural VP2.
- Expresar y purificar las proteínas quiméricas y VP2.
- Ensamblar VLPs con cada una de las quimeras.
- Ensamblar VLPs mixtas (quimeras y VP2).
- Caracterizar las especies formadas por dispersión dinámica de luz, gradientes de Cloruro de Cesio y análisis electroforético.
- Demostrar la presentación de tectones en la superficie externa de las VLPs mediante la formación de estructuras supramoleculares con la lipasa quimérica.

Capítulo 7. Materiales y Métodos.

7.1. Esquema general de trabajo.



7.2. Materiales.

7.2.1. 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-β-D-1-tiogalactopiranosido (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

7.2.2. Instrumentos y equipos.

Instrumento o equipo	Marca
Balanza analítica <i>BP 221S</i>	Sartorius
Baño refrigerante	Hofer Scientific Instruments
Centrífuga superveloz refrigerada <i>RC 6+</i>	Thermo Scientific-Sorvall
Centrífuga refrigerada <i>5702 R</i>	Eppendorf
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Waters
Electroporador MicroPulser™	Bio Rad
Espectrofotómetro <i>CARY 400</i>	Varian
Fuente de Poder <i>PS 500XT</i>	Hofer Scientific Instruments
Micro centrífuga refrigerada <i>5418</i>	Eppendorf
Micro pipetas (5, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf / Gilson
Microscopio de fuerza atómica	Veeco Instruments Inc.
Potenciómetro <i>pH 700</i>	Oakton
Sonicador <i>CPX 750</i>	Cole Parmer
Trans-iluminador UV <i>T1203</i>	Sigma
Termomixer confort	Eppendorf
Ultra centrífuga <i>Optima™ XL-100K Class S</i>	Beckman
Vortex	
Zetasizer µV	Malvern Instruments

7.2.3. Cepa utilizada.

Cepa	Genotipo	Fuente y referencia
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r^b m^b) gal dcm (λcIts857 ind Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Novagen (Studier y Moffatt, 1986)

7.3. Métodos.

7.3.1. Diseño de las proteínas quiméricas.

El diseño *in silico* de las proteínas quiméricas heterodimerizantes las cuales aquí se refieren como E5-VP28H, K5-VP28H y KcLBplA6H (Figuras 6 a 8) se realizó gracias a la información disponible sobre la estructura cristalográfica del B19V (Kaufmann *et al.*, 2004) en el Protein Data Bank (PDB 1S58); las secuencias de las hélices E5 y K5 reportadas por De Crescenzo *et al.*, (2003) y para el caso de BplA el trabajo de Bustos-Jaimes y colaboradores (2010) sobre su clonación y expresión. Las tres proteínas quiméricas cuentan con el sistema de hélices enrolladas E o K, lo que significa que cada una posee el fragmento de la hélice complementaria del mismo, para el caso de BplA se le asignó el fragmento de hélice complementario correspondiente a K, con la misma longitud que la quimérica de VP2 (K5). Todas las proteínas quiméricas poseen una secuencia espaciadora en el extremo N-terminal, ya sea de la proteína VP2 o de la lipasa. Para que los fragmentos del sistema de hélices enrolladas tuvieran más movilidad al ser expuestos en la superficie de la cápside al formar VLPs, se les agregó una secuencia espaciadora constituida por residuos de aminoácidos de Serina y Glicina (GGSGGSGGSGG). Para terminar, las proteínas que cuentan con la proteína VP2 tienen una etiqueta de 8 residuos de Histidinas ya que el proceso de purificación se dio por cromatografía de afinidad. En este trabajo no se realizó la síntesis de los genes correspondientes a las proteínas quiméricas, se obtuvo gracias a un laboratorio externo, el cual clonó cada uno de los genes de forma independiente en los plásmidos pET22b+ que nos fueron entregados.

```
MGEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKGGSGGSGGMTSVNSAEASTGAGGGGSPVKSMWSEGATFSANSVT  
CTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTIS  
EIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKLLAS  
EESAFYVLEHSSFLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMP  
GPLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGVSPQYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRF  
PNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIF  
LKILPQSGPIGGIKSMGITTLLVQYAVGIMTVMTFKGLRKRATGRWNPQGVYPPHAAGHLPHYVLYDPTATDAKQHRRHGFEK  
PEELWTAKSRVHPLEHHHHHHHHH
```

Figura 6. Secuencia de aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína E5-VP28H. En rojo la secuencia que corresponde al fragmento E5-; en azul la secuencia del espaciador, en negro la secuencia que corresponde a VP2, y en café la etiqueta de ocho residuos de Histidina.

MGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGGSGGSGGMSVNSAEASTGAGGGGNSPVKSMWSEGATFSANSV
TCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTI
SEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGGQDQLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLAS
EESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDGLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMF
GPLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTIRLPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRF
PNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPQIF
LKILPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIMTVMTFKLGRLKATGRWNPQGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRHGFEEK
PEELWTAKSrvHPLEHHHHHHHHH

Figura 7. Secuencia de aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína K5-VP28H. En rojo la secuencia que corresponde al fragmento K5-; en azul la secuencia del espaciador, en negro la secuencia que corresponde a VP2, y en café la etiqueta de ocho residuos de Histidina.

MGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGGSGGSGGMAEHNPPVVMVHGIGGASYNFFSIKSYLVGGQWD
RNQLYAIDFIDKTGNRRNNGPRLSRFVKDVLDTGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGDKIENVVTIGGANGLVSSRALP
GTDPNQKILYTSVYSSADLIVVNSLRLIGARNVLIHGVGHIGLLTSSQVKGYIKEGLNGGGQNTNLEHHHHHHH

Figura 8. Secuencia de Aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína KcLBp1A6H. En rojo la secuencia que corresponde al fragmento K5-; en azul la secuencia del espaciador, en negro la secuencia que corresponde a Lipasa, y en café la etiqueta de seis residuos de Histidina.

7.3.2. Obtención de células transformantes.

Las proteínas de interés se obtuvieron mediante el uso de células transformantes de *E. coli* BL21 (DE3) de acuerdo al siguiente protocolo:

Protocolo:

1. Se partirá de plásmidos deshidratados por lo que a cada uno de ellos se le agrega un volumen de 10 µL de agua destilada y estéril.
2. Las células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) se deben mantener en un congelador que se encuentra a -70°C en tubos de 50 µL, las cuales se extraerán del mismo para este procedimiento. En cada caso se colocan 2 µL de la solución de agua destilada y estéril que contiene los plásmidos en tubos independientes. Las células se deben mantener en baño de hielo, teniendo un especial cuidado en ello.
3. El contenido de la mezcla entre las células competentes y los plásmidos se colocará todo el contenido en una celda para el posterior proceso de electroporación. Para ello, la celda se coloca en la ranura del dispositivo electroporador y previa selección de las condiciones se realiza el pulso eléctrico. Resulta altamente recomendable que la celda se coloque en un ambiente frío previamente (de 10 a 15 min antes), para que se mantenga de esa manera durante el procedimiento.
4. Se recupera el contenido de la celda y se coloca en un tubo Eppendorf con capacidad de 1.5 mL. Posteriormente se adicionan 500 µL de medio SOC y el tubo se coloca durante 1 hora en la incubadora con agitación orbital a 250 r.p.m. y a 37°C de temperatura. El procedimiento funciona de igual manera si en lugar de medio SOC se utiliza medio LB.
5. Pasado el tiempo de recuperación se procede a inocular una placa Petri con medio sólido LB-Amp utilizando 50 µL de las células. El uso de perlas de vidrio favorece la distribución de las colonias en el medio de cultivo de la caja y es más factible la obtención de colonias aisladas. Las placas se dejan en una incubadora invirtiendo la posición y manteniendo una temperatura de 37°C durante 12 horas.
6. Después del tiempo indicado se procede a seleccionar colonias aisladas para el posterior proceso de sobreexpresión de las proteínas de interés.

Una vez completado el anterior protocolo, se procede a verificar la sobreexpresión de las proteínas de interés, por lo cual 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 ratificar 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 viales de conservación con glicerol (glicerol). Este método de conservación consiste en una nueva serie de pre inóculos en 10 mL de medio de cultivo LBamp, los cuales alcanzarán una DO_{600} de 0.6 (12 horas aproximadamente a 37°C en agitación orbital), se toma una muestra y se les agrega glicerol en una proporción de 50% v/v. Los inóculos recién obtenidos deben mantenerse a -70°C hasta que sean utilizados.

7.3.3. Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

Para la sobreexpresión de estas proteínas se tomó como referencia el protocolo de Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2012), al cual se le han hecho pequeñas modificaciones, sobre todo en el caso de K5-VP28H. El protocolo es el siguiente:

1. Preparar 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. Incubar el tubo con medio de cultivo a 37°C y con agitación orbital a 250 r.p.m. durante 12 horas.
2. Inocular un matraz con capacidad de 1 litro que contenga 400 ml de medio LB-Amp adicionando los 10 mL de preinóculo obtenidos previamente. Se incuba durante 3 horas a una temperatura de 37°C y con agitación orbital de 250 r.p.m.
3. Para escalar la generación de biomasa se inocula un matraz con capacidad de 2 litros que contenga 1 litro de medio LB-Amp con los 410 ml de medio de cultivo obtenidos previamente y se incuba a 37°C y con agitación orbital a 250 r.p.m.
4. Al inicio de la fase exponencial (DO_{600} de 0.6 a 0.8) se añaden 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 modifican las condiciones de incubación para establecer una temperatura de 30°C y agitación orbital de 250 r.p.m. durante un periodo de tiempo de 16 a 20 horas. En el caso de la proteína quimérica K5-VP28H la temperatura empleada durante la etapa de sobreexpresión es de 37 °C. y se recomienda que el periodo de incubación sea de 20 a 24 horas.
5. Obtener la biomasa por centrifugación a 5000 r.p.m. por 20 minutos a 10°C y determinar la presencia de las proteínas quiméricas mediante SDS-PAGE.
6. La biomasa recuperada es re-suspendida en solución salina (0.9% m/v) con la finalidad “limpiar”, lo que significa retirar el medio de cultivo remanente. Posteriormente la biomasa se centrifuga nuevamente a 5000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y se resuspende nuevamente en solución salina. Es recomendable realizar dos ciclos de limpieza. Finalmente, la biomasa es re-suspendida en 100 mL de la solución salina y se mantiene en congelación a -70°C hasta su tratamiento para comenzar el protocolo de purificación.

7.3.3.1. Sobreexpresión de la proteína recombinante KcLBplA6H.

Las condiciones requeridas para favorecer la expresión de las proteínas recombinantes fueron descritas por Mora (2008). Sin embargo, el protocolo empleado en este trabajo contiene pequeñas modificaciones, las cuales describe detalladamente Santillán-Uribe, (2012) y otras recomendaciones del mismo autor, que fueron necesarias para compensar las diferencias existentes, no solo en el esquema de trabajo, sino de la misma construcción proteica.

Protocolo:

1. Preparar un preinóculo (10 mL de medio LBamp) a partir de 100 μ L de las células que se encuentran en glicerol (50% v/v) a -70°C . Incubar a 37°C y con agitación orbital a 250 r.p.m. durante toda la noche (aproximadamente 12 h).
2. Inocular un matraz con capacidad de 1 litro que contenga 200 mL de medio LBamp, para ello se adicionan los 10 mL de preinóculo obtenidos previamente. Se incuba durante 2 h a 37°C y con agitación orbital a 250 r.p.m.
3. Para escalar la generación de biomasa se inocula un matraz con capacidad de 1 L que contenga 500 mL de medio de cultivo LBamp con los 210 mL de medio de cultivo obtenidos previamente y se incuba a 37°C y con agitación orbital a 250 r.p.m.
4. Al inicio de la fase exponencial (DO_{600} de 0.6 a 0.8) se añade el agente inductor (IPTG), el cual debe tener una concentración final de 0.5 mM. Se mantienen las condiciones de incubación durante 4 h más.
5. Obtener la biomasa por centrifugación a 5000 r.p.m. por 15 min a una temperatura de 10°C y determinar la presencia de las proteínas quiméricas mediante SDS-PAGE.
6. La biomasa recuperada es re-suspendida en solución salina (0.9% m/v) con la finalidad “limpiar”, lo que significa retirar el medio de cultivo remanente. Posteriormente la biomasa se centrifuga nuevamente a 5000 r.p.m. durante 20 min a 4°C y se resuspende nuevamente en solución salina. Es recomendable realizar dos ciclos de limpieza. Finalmente, la biomasa es re-suspendida en 100 mL de la solución salina y se mantiene en congelación a -70°C hasta su tratamiento para comenzar el protocolo de purificación.

7.3.3.2. Determinación de la solubilidad de la proteína recombinante KcLBplA6H.

Para determinar si la proteína recombinante KcLBplA6H se mantiene en la parte soluble o se va a cuerpos de inclusión, se sigue el siguiente protocolo:

Protocolo:

1. Tomar una fracción del medio de cultivo de 10 mL, descongelarla gradualmente en baño de hielo y agregar 20 mL del amortiguador de lisis/lavados (Anexo).
2. Someter a dos ciclos de sonicación de 5 min, con pulsos de 20 s de duración por 10 s de reposo, esperar un periodo de 5 min entre cada uno de ellos.
3. Posteriormente centrifugar a 15000 rpm por 20 min. Analizar una muestra de la fracción soluble y del precipitado por SDS PAGE.

7.3.4. Limpieza de cuerpos de inclusión VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

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 que tienen como estructura base 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 lo establecido por Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2012) y con pequeñas modificaciones provenientes de Le y colaboradores (2008).

Protocolo:

1. Descongelar la biomasa a temperatura ambiente y recuperar las células mediante centrifugación durante 15 min a 8000 r.p.m. y 4°C. Es recomendable utilizar un baño con agua a 25°C
2. La biomasa recuperada es resuspendida en 25 mL de solución amortiguadora A (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0). Posteriormente la biomasa se recupera de nuevo por centrifugación durante 15 min a 8000 r.p.m. y a 4°C.
3. Las células recuperadas son resuspendidas empleando 40 mL de solución amortiguadora B (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% v/v Tritón-X100, pH 8.0). La siguiente etapa consiste en realizar una lisis celular y para ello se emplea un equipo de ultrasonido. Son necesarios dos ciclos con duración de 10 min cada uno. Cada ciclo con pulsos de 20 s y pausas de 10 s empleando una potencia de 60 a 80 W. El producto de la lisis se centrifuga durante 20 min a 8000 r.p.m. y 4°C. Se desecha el sobrenadante y se recuperan los cuerpos de inclusión.
4. Se realiza un ciclo de lavado de cuerpos de inclusión empleando 40 mL de solución amortiguadora B y el equipo de ultrasonido. En esta ocasión sólo es necesario realizar un ciclo con duración de 10 min. Cada ciclo con pulsos de 20 s y pausas de 10 s empleando una potencia de 60 a 80 W.
5. La suspensión de cuerpos de inclusión es sometida a centrifugación durante 40 min a 10000 r.p.m. y a una temperatura de 4°C. Se desecha el sobrenadante y se conserva la fracción insoluble.
6. La fracción obtenida en el paso anterior se solubiliza empleando 50 mL la solución amortiguadora C (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 2 mM DTT, 6 M Gdn-HCl, pH 6.3). Para incrementar la solubilidad de las proteínas, todas las fracciones se mantienen en incubación durante un periodo mínimo de 12 h a 37°C y en agitación orbital de 250 r.p.m. Los agregados de proteína y remanentes de la pared celular pueden retirarse mediante centrifugación a 10000 r.p.m. durante 10 min. A partir de este momento se procede a la etapa de purificación de proteínas. Es preferible que no pase mucho tiempo entre este paso y el proceso de purificación. Sin embargo, los cuerpos de inclusión solubilizados pueden permanecer a temperatura ambiente por varios días.

7.3.4.1. Limpieza de cuerpos de inclusión KcLBplA6H.

Aunque en el caso de KcLBplA6H se encontró una pequeña proporción de proteína soluble, la mayor cantidad de la misma se hallaba en cuerpos de inclusión. Al igual que el anterior protocolo empleado para la limpieza de los cuerpos de inclusión, se desarrolló con base en lo establecido por Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2012) y con pequeñas modificaciones provenientes de Le y colaboradores (2008), así como algunas otras consideraciones que se tomaron para esta construcción.

Protocolo:

1. Descongelar la biomasa a temperatura ambiente y recuperar las células mediante centrifugación durante 20 min a 6000 r.p.m. y 4°C. Es recomendable utilizar un baño con hielo y posteriormente agua a 25°C
2. La biomasa recuperada es resuspendida en 30 mL de solución amortiguadora A (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0).
3. Someter cada fracción de biomasa a 4 ciclos de 5 pulsos en el sonicador, cada pulso con duración de 20 s y una potencia de 80-80 W. Entre cada ciclo es necesario esperar 4-5 min y mantener el extracto a 4°C.
4. El producto de la lisis se centrifuga durante 20 min a 15000 r.p.m. y 4°C.
5. Posteriormente la biomasa se recupera de nuevo por centrifugación durante 15 min a 8000 r.p.m. y a 4°C.
6. La fracción obtenida en el paso anterior se solubiliza empleando 50 mL la solución amortiguadora C (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 2 mM DTT, 6 M Gdn-HCl, pH 6.3). Para incrementar la solubilidad de las proteínas, todas las fracciones se mantienen en incubación durante un periodo mínimo de 12 h a 37°C y en agitación orbital de 250 r.p.m. Los agregados de proteína y remanentes de la pared celular pueden retirarse mediante centrifugación a 10000 r.p.m. durante 10 min. A partir de este momento se procede a la etapa de purificación de proteínas.

7.3.5. Purificación de las proteínas recombinantes VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

Como se muestra en las secuencias descritas anteriormente, todas las proteínas cuentan con una etiqueta de Histidinas en el extremo C-terminal, para motivos de este trabajo, dicha 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.

Protocolo

1. Utilizar una columna para cada una de las proteínas quiméricas y realizar todo el proceso de manera independiente ya que esto reduce la probabilidad de contaminación entre ellas. Los sistemas empleados poseen un volumen de columna equivalente a 20 mL y su funcionamiento depende de la gravedad. Generalmente se utilizan de 5 g de la resina Protino[®] Ni-TED para ocupar dicho volumen.
2. El proceso comienza al equilibrar la matriz de la columna, para esto se emplean 30 mL de la solución amortiguadora A_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 2.5 % v/v Glicerol, pH 7.5).
3. Adicionar a la columna de 3 a 5 ml de la solución de cuerpos de inclusión solubilizados y se procede a colectar el volumen muerto que en este sistema equivale a 10 mL. Después de colectar el volumen muerto es recomendable colectar el frente de elución.
4. Posteriormente, adicionar a la columna 20 mL de la solución amortiguadora B_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 7.5).
5. Cuando el flujo de la solución B_p que se encuentra presente en el reservorio esté por terminar se deberán agregar al sistema 20 mL de la solución amortiguadora C_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 15 mM Imidazol, pH 7.5).
6. De igual manera que en el paso anterior, cuando el flujo de la solución C_p que se encuentra presente en el reservorio esté por terminar se deberán agregar al sistema 15 mL de la solución amortiguadora D_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5).
7. Cuando la solución D_p que se encuentra presente en el reservorio esté por terminar se deberán agregar al sistema 10 mL de la solución amortiguadora E_{pu} (50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 7.5).
8. Finalmente, cuando la solución E_p esté por concluir su paso por el reservorio, se adicionan 30 mL de la solución amortiguadora de elución o F_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 0.3 M Imidazol, pH 7.5). Simultáneamente se debe comenzar a cuantificar el volumen muerto (10 mL) y a partir de ese momento recuperar el volumen correspondiente a la proteína de interés en fracciones (6) de 5 mL aproximadamente.
9. Analizar las fracciones coleccionadas mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Juntar las fracciones donde la cantidad y pureza de la proteína sean elevadas y concentrar empleando unidades de filtración Amicon[®] Ultra-15 Ultracel-50K con un límite nominal de peso molecular equivalente a 50,000 Dalton.
10. Finalmente, para eliminar la presencia de Imidazol y preservar a las proteínas en condiciones apropiadas para su posterior uso durante los ensambles se debe realizar el cambio de la solución amortiguadora F_p por una solución amortiguadora denominada R_p (20 mM Tris-HCl, 0.15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM de DTT, Gdn-HCl 5 M, pH 8).
11. Después de someter la resina a tres ciclos de purificación es recomendable su regeneración. Para ello es necesario atender las especificaciones del fabricante (Anexo 2).

7.3.5.1. Purificación de la proteína recombinante KcLBplA6H.

Al igual que en la limpieza de cuerpos de inclusión, en el caso de la construcción KcLBplA6H se desarrolló un protocolo similar al de las otras dos construcciones, con pequeñas modificaciones de forma. El protocolo con el que se purificó esta proteína se muestra a continuación:

Protocolo:

1. El sistema empleado posee un volumen de columna equivalente a 20 mL y su funcionamiento depende de la gravedad. Generalmente se utilizan de 5 g de la resina Protino[®] Ni-TED para ocupar dicho volumen.
2. El proceso comienza al equilibrar la matriz de la columna, para esto se emplean 30 mL de la solución amortiguadora A_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 2.5 % v/v Glicerol, pH 7.5).
3. Adicionar a la columna de 3 a 5 mL de la solución de cuerpos de inclusión solubilizados y se procede a colectar el volumen muerto que en este sistema equivale a 10 mL. Después de colectar el volumen muerto es recomendable colectar el frente de elución.
4. Posteriormente, adicionar a la columna 20 mL de la solución amortiguadora D_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5).
5. Finalmente, cuando la solución D_p esté por concluir su paso por el reservorio, se adicionan 30 mL de la solución amortiguadora de elución o F_p (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, 0.3 M Imidazol, pH 7.5). Simultáneamente se debe comenzar a cuantificar el volumen muerto (10 mL) y a partir de ese momento recuperar el volumen correspondiente a la proteína de interés en fracciones (6) de 5 mL aproximadamente.
6. Para eliminar la presencia de Imidazol y preservar a las proteínas en condiciones apropiadas para su posterior uso se debe realizar el cambio, mediante diálisis, de la solución amortiguadora F_p por una solución amortiguadora denominada G_p (10 mM Glicina, pH 12).
7. Después de someter la resina a tres ciclos de purificación es recomendable su regeneración. Para ello es necesario atender las especificaciones del fabricante (Anexo 2).

La cuantificación de proteína en el caso de E5-VP28H y K5-VP28H 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 R_p. Todos los puntos de la curva fueron preparados por triplicado, con un volumen final de 1000 μL y concentraciones desde 100 μg/mL hasta 1 mg/mL. Las muestras fueron preparadas de manera simultánea y bajo las mismas condiciones empleadas para la curva.

La concentración de la lipasa conservada en glicina fue determinada mediante el método del ácido bicinónico (BCA). Este método fue tomado de Santillán-Urbe 2012 y requiere de preparar una curva patrón empleando las soluciones que se indican en el Anexo 3. A continuación se muestra el protocolo para determinar la concentración de esta proteína.

Protocolo:

1. Preparar en tubos eppendorf (1.5 mL) las soluciones que corresponden a las muestras y a cada uno de los puntos de la curva según se indica en el Anexo 3. (Por triplicado)
2. Agitar cada tubo en el vortex por 10 segundos e incubar a 37°C durante 35-40 minutos.
3. Después del periodo de incubación se colocan todos los tubos en baño de hielo para detener el progreso de la reacción.
4. Determinar la absorbancia que presentan los puntos de la curva y las muestras a una longitud de onda de 562 nm. Se empleó el espectrofotómetro CARY 400 (Varian).
5. Con los valores obtenidos se construye la curva patrón y por interpolación se determina la concentración de las muestras.

7.3.6. Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs.

En el apartado 7.1 en donde se plantea el esquema general de trabajo, muestra la disposición de hacer múltiples ensayos para la obtención de VLPs a partir de una proteína y VLPs a partir de dos proteínas utilizando combinaciones y proporciones definidas entre las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H. Las condiciones para que ocurriera el ensamble de proteínas y como consecuencia de ello la obtención de VLPs se llevaron a cabo mediante la diálisis del agente desnaturizante frente a alguno de dos tipos de solución amortiguadora: PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y PBS_{Arg} (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.2 M Arginina, pH 7.4). El proceso de diálisis mediante membrana ocurrió durante un periodo de cuarenta horas como tiempo mínimo y una temperatura de 4°C. Para este proceso fue de vital importancia conocer la concentración de la proteína en los sistemas de diálisis. 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 R_p, como lo sugieren Sánchez-Rodríguez (2012) y trabajos anexos.

7.3.7. Caracterización de lipasa, VLPs y estructuras supramoleculares mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

La dispersión o la difusión de la luz es un fenómeno mediante el cual la radiación electromagnética, al chocar con pequeñas partículas de tipo coloidal o incluso molecular, es desviada en su dirección de propagación, de forma aparentemente caótica, en cada uno de los núcleos de dispersión, por tener un índice de refracción diferente al del medio. La medida de la luz dispersada da lugar a técnicas muy útiles en la determinación de la concentración de sustancias en suspensiones, así como la caracterización de la forma y del tamaño de las partículas coloidales y macromoleculares (Cuadros-Moreno, 2014).

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic Light Scattering"), es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros. (Cuadros-Moreno, 2014).

El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento Browniano, y por lo tanto del tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein.

La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles, la luz dispersada se mide en intervalos de tiempo, pudiéndose observar que la intensidad fluctúa alrededor de un valor medio, como consecuencia del movimiento aleatorio de las partículas. Este comportamiento puede racionalizarse a través de la denominada función de auto correlación que representa el promedio de los valores de la intensidad de luz medida a diferentes valores del intervalo de tiempo.

El análisis de las partículas tipo virus, la lipasa y las estructuras supramoleculares motivo de este trabajo se llevó a cabo en un equipo para DLS del 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. 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, de igual manera se incorporó al tratamiento de las muestras con proteínas que formaran VLPs a 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) como se describe más adelante, no fueron filtradas con los cartuchos descritos en este apartado. Cada muestra fue analizada mediante cinco ciclos, cada ciclo constituido de diez determinaciones con un intervalo de diez segundos entre cada determinación.

7.3.8. Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica.

En la separación isopícnica las partículas son separadas con base en su densidad, el tamaño solo afecta la velocidad con la que las partículas alcanzan su posición isopícnica. Estas separaciones se llevan a cabo en un gradiente de densidad en el que las partículas se mueven hasta el punto en el que su densidad es la misma que el medio. Esta técnica requiere un tercer componente (normalmente una sal de cesio), de bajo peso molecular y elevada densidad. Cuando se centrifuga la disolución, las sal, o en este caso el Cloruro de Cesio, se redistribuye y alcanza un equilibrio, formando, un gradiente de concentración que es menos denso en la parte superior y más denso en el fondo del tubo obteniéndose como resultado un gradiente de densidad. 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. Después del ensamble, las partículas tipo virus fueron separadas en gradientes continuos de Cloruro de Cesio, ya que los componentes de cada muestra (agregados, intermediarios y VLPs) pueden ser separados según su densidad, por lo tanto, permite constatar la formación de VLPs.

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_{gd} (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 centrifuga 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_{gd} y posteriormente 500 μ L de la solución que contiene la proteína que forma las VLPs. El proceso de ultracentrifugación se llevó a cabo empleando un rotor Beckman del tipo 60 Ti en un equipo Optima™ XL-100K Class S, de la misma marca. Las condiciones del proceso fueron de un periodo de tiempo de diez horas y cuarenta y cinco minutos a 55,000 r.p.m. con una temperatura de 20°C. Las bandas generadas por efecto de la formación del gradiente fueron recuperadas y sometidas a un proceso de diálisis.

7.3.9. Caracterización y purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular.

Este proceso se llevó a cabo gracias a la ayuda del Q.A. Hugo César Santillán Uribe, quien utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de la marca Waters, esto con el propósito de separar las VLPs recién formadas de especies intermediarias y agregados de proteína, ya que para el sistema de complementariedad de hélices enrolladas es de gran importancia. La columna que se utilizó fue empacada con la fase estacionaria denominada Sephacryl S-500 HR (diámetro de poro de 50 nm). Se utilizó la solución amortiguadora PBS_{Arg} (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.2 M Arginina, pH 7.4) como fase estacionaria. 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.

7.4. Análisis de lipasa, VLPs y de estructuras supramoleculares mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel.

Los ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA, por sus siglas en inglés) 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 este trabajo se emplearon los ensayos EMSA para poder identificar la presencia de interacciones entre VLPs y la proteína lipasa complementaria mediante el sistema de hélice enrolladas. Dicha interacción propicia la formación de nuevas estructuras con características supramoleculares y diferente perfil de movilidad electroforética. El análisis mediante EMSA se realizó en un gel constituido por dos capas. La capa inferior que solo fungió como soporte mecánico para el gel se preparó a partir de una solución de agarosa al 2 % m/v, mientras que la capa superior se preparó a partir de una solución de

agarosa al 0.5 % m/v. En ambos casos se empleó la solución amortiguadora de corrida TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 9.0) para solubilizar la agarosa. Los pozos solo se formaron en la capa superior del gel. Cada muestra fue obtenida a partir de 600 μ L de VLPs, o el equivalente de volumen en proporción con la construcción de lipasa y fueron concentradas hasta un volumen de 25 μ L. A esos 25 μ L de VLPs (o de la mezcla según sea el caso) se le adicionaron 15 μ L de amortiguador de carga (20% glicerol, 0.2% azul de bromo fenol, 120 mM Tris-base) y se cargaron 30 μ L de muestra en el gel.

7.5. Análisis de lipasa, VLPs y de estructuras supramoleculares mediante SDS-PAGE.

Para corroborar los ensayos descritos en el apartado anterior y como una prueba alterna de las interacciones entre las estructuras supramoleculares de partículas tipo virus (VLPs) y la lipasa que contienen los tectones moleculares complementarios correspondientes, se analizaron las fracciones de la parte superior mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Capítulo 8. Resultados y Discusión.

8.1. Diseño de las proteínas quiméricas.

Los diseños de las proteínas quiméricas se hicieron a través de la fusión de las secuencias de aminoácidos de los tectones hélice E5 o hélice K5 (De Crescenzo *et al.*, 2003), al extremo N-terminal de la proteína VP2 (GenBank ABB13534) (Figura 9). Los genes para las quimeras fueron sintetizados químicamente y clonados en el vector de expresión pET22b(+), por un laboratorio externo (Epoch Life Science Inc.). La proteína KcLBp1A6H se había construido previamente por un método similar (Torres-Morales, 2016) (Figura 9).

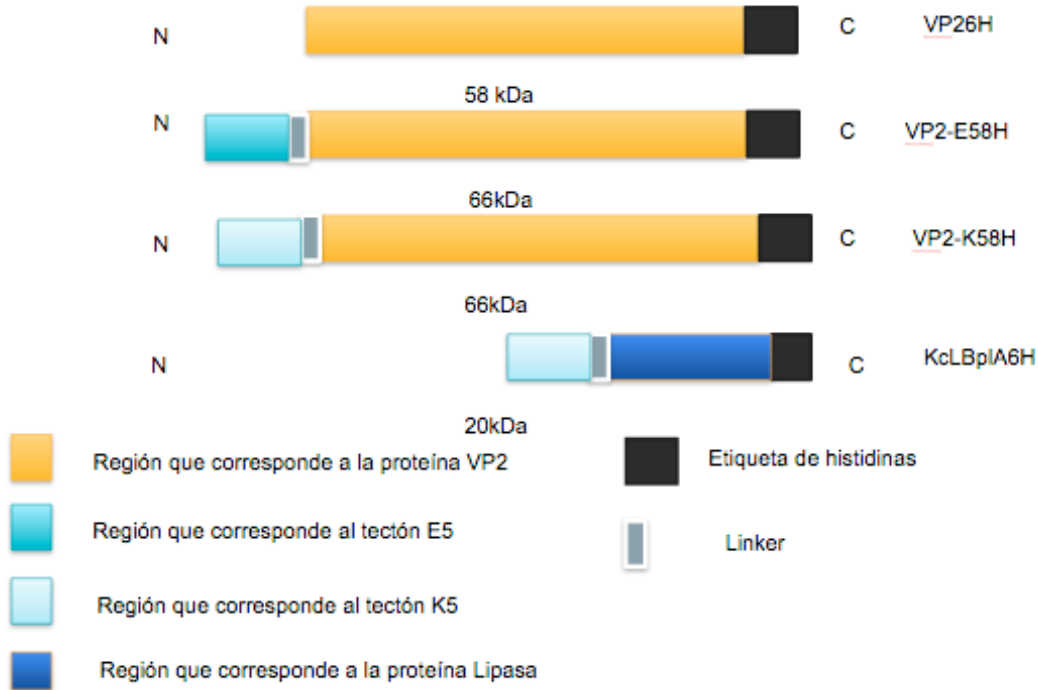


Figura 9. Representación gráfica lineal de las proteínas motivo de este trabajo.

Las proteínas quiméricas E5-VP28H, K5-VP28H y KcLBplA6H comparten tres características estructurales: 1) Los sistemas heterodimerizantes constituidos por fragmentos complementarios se encuentran ubicados en la región que corresponde al extremo N-terminal de la proteína; 2) Todos los diseños cuentan con una secuencia espaciadora constituida por residuos de Glicina y Serina. Esta secuencia espaciadora une al componente del sistema heterodimerizante con la secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína VP2, o a la lipasa en el caso de KcLBplA6H, y le brinda movilidad a la región del extremo N-terminal; 3) En la región que corresponde al extremo C-terminal se encuentra incorporada una etiqueta de residuos de Histidina que facilitará la etapa de purificación.

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

Los plásmidos obtenidos comercialmente (Fig. 10) se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Este procedimiento comenzó a partir de los plásmidos concentrados y deshidratados. Para tener la certeza de que las células transformantes

contenían el plásmido adecuado se realizó una purificación, digestión y análisis de los plásmidos. Los plásmidos purificados se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI* y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 11).

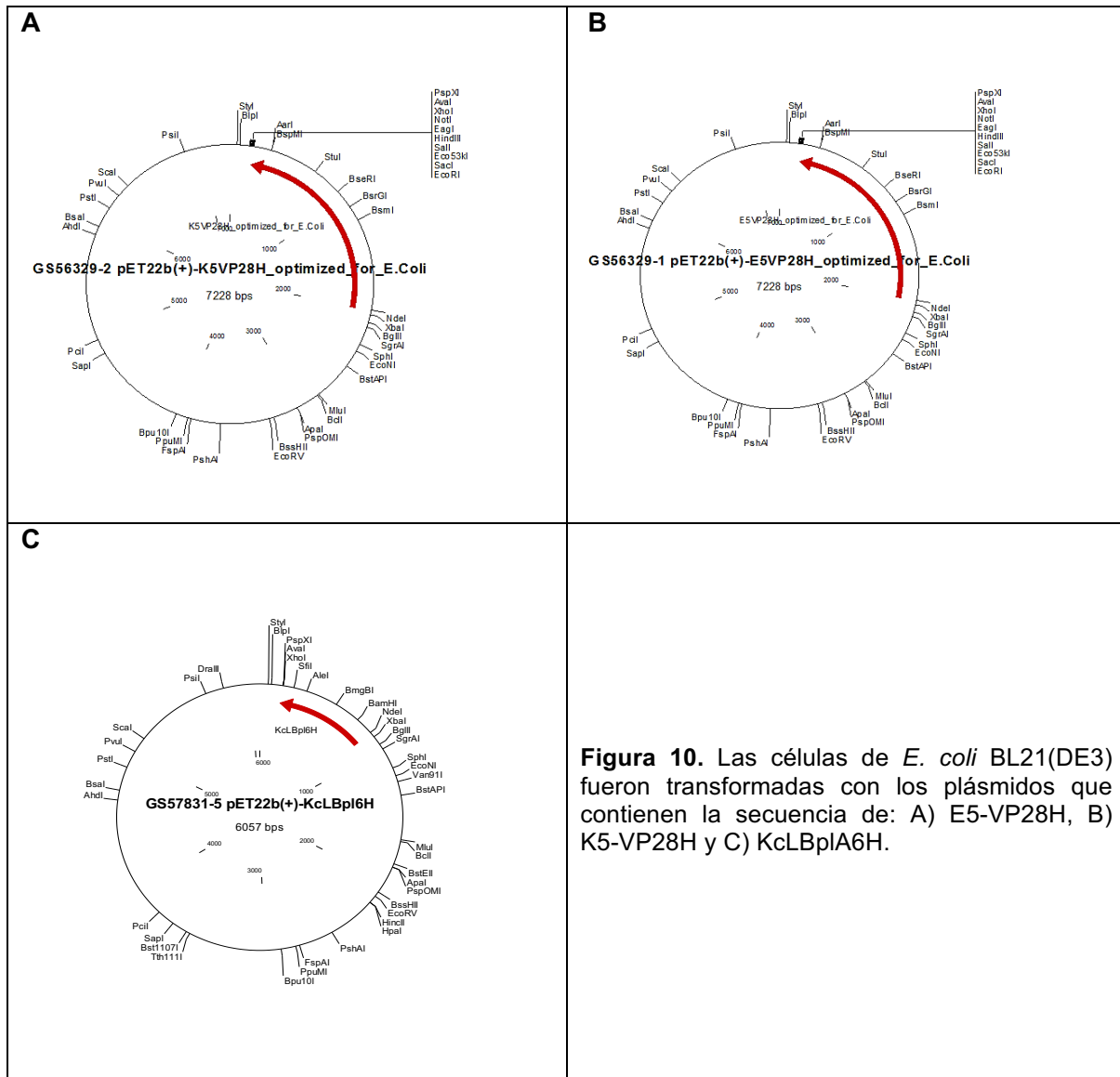


Figura 10. Las células de *E. coli* BL21(DE3) fueron transformadas con los plásmidos que contienen la secuencia de: A) E5-VP28H, B) K5-VP28H y C) KcLBpIA6H.

El protocolo que se muestra en la sección de métodos constó de tres etapas principales: electroporación, recuperación y crecimiento. Posteriormente se realizó la selección de colonias aisladas a partir de placas de Petri con Medio LBamp. Una vez completado el anterior protocolo, se procedió a verificar la sobreexpresión de las proteínas de interés, por

lo cual se realizó una serie de ensayos empleando 10 mL de medio de cultivo LB-Amp e IPTG como agente inductor en una concentración final de 0.25 mM (Fig. 12). Después de ratificar la presencia de las proteínas quiméricas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) se procedió a elaborar “gliceroles”. Este método de conservación consiste en una nueva serie de pre inóculos en 10 mL de medio de cultivo LBamp, los cuales alcanzaron una DO_{600} de 0.6 (12 h a 37°C con agitación orbital a 200 r.p.m.), a los cuales se les agrega glicerol en una proporción de 50% v/v. Los inóculos recién obtenidos se mantuvieron a -70°C hasta que fueron utilizados.

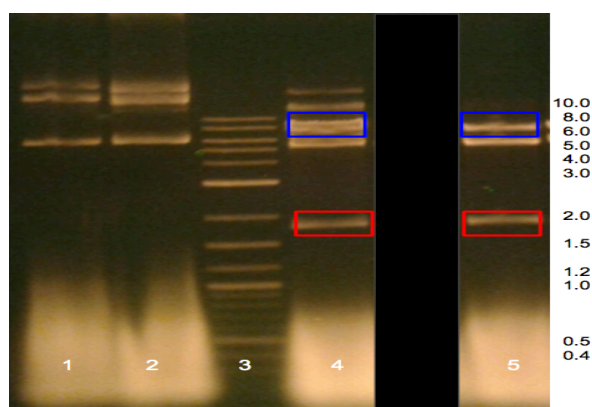


Figura 11. Análisis del perfil de plásmidos purificados y digeridos con enzimas de restricción NdeI y EcoRI por electroforesis en gel de agarosa. 1) y 2) carriles control sin enzimas de restricción; 3) marcador de peso molecular; 4) plásmido digerido de la proteína E5-VP28H (VP28H azul y E5 rojo); 5) plásmido digerido de la proteína K5-VP28H (VP28H azul y K5 rojo)

8.3. Sobreexpresión de las proteínas recombinantes VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

Para obtener cada una de las proteínas recombinantes se dio seguimiento al protocolo descrito en la sección 7.3.3. El agente inductor fue IPTG en una concentración final de 0.25 mM. Los mejores resultados para la sobreexpresión de estas proteínas se dieron a una temperatura de 30°C y agitación orbital de 250 r.p.m. durante un periodo de tiempo de 16 a 20 horas para VP26H y E5-VP28H. En el caso de la proteína quimérica K5-VP28H la temperatura empleada durante la etapa de sobreexpresión fue de 37°C y con un periodo de incubación de 20 a 24 h. Una vez que concluyó el tiempo de inducción se tomó una muestra de 500 μ L de medio de cultivo, el cual se centrifugó para obtener una pequeña porción de

células y así ratificar la sobreexpresión de las mismas. Estas células se lisaron para su análisis mediante SDS-PAGE. El peso molecular esperado para la proteína VP26H es de 58 kDa, mientras que para las proteínas E5-VP28H y K5-VP28H es de 66 kDa.

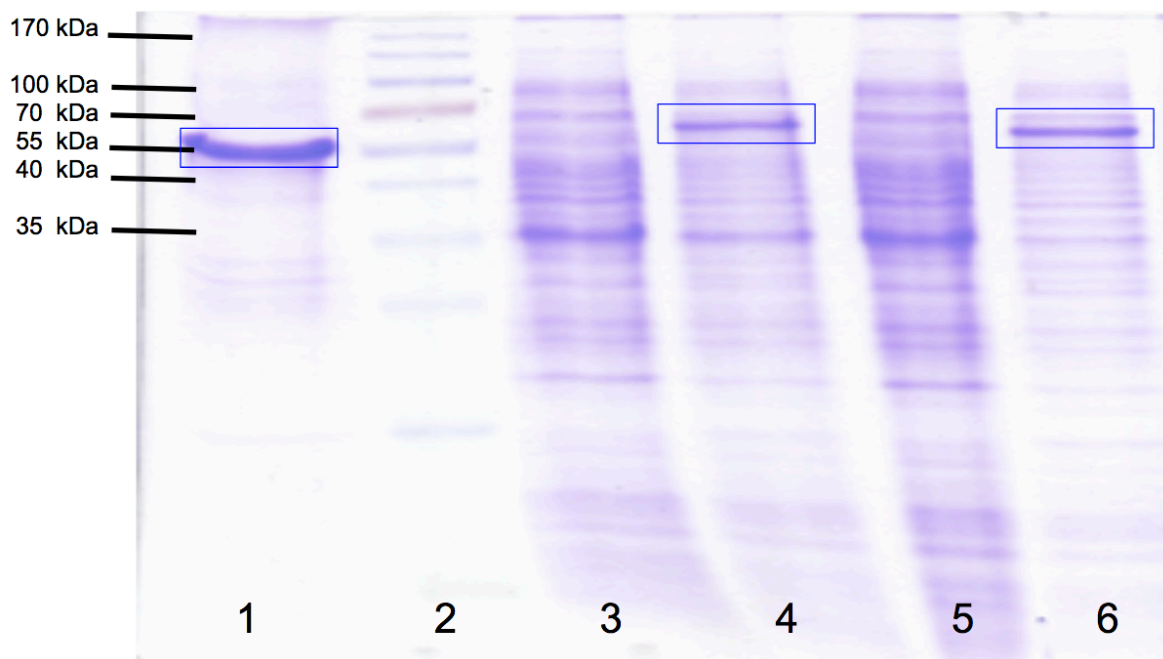


Figura 12. Análisis del perfil de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12.5%). 1) Proteína VP26H purificada; 2) marcador de peso molecular; 3) lisados celulares de E5-VP28H antes de la inducción; 4) lisados celulares con sobreexpresión de la proteína E5-VP28H; 5) lisados celulares de K5-VP28H antes de la inducción; 6) lisados celulares con sobreexpresión de la proteína K5-VP28H. Las proteínas de interés se encuentran señaladas dentro de los rectángulos azules, los pesos moleculares concuerdan con lo esperado.

8.4. Sobreexpresión y solubilidad de la proteína recombinante KcLBplA6H.

En el caso de esta proteína recombinante se siguió el protocolo del apartado 7.3.3.1 de la sección de métodos. Al igual que en las proteínas anteriores el agente inductor fue IPTG, sin embargo, la concentración final fue de 0.5 mM. Los mejores resultados para la sobreexpresión de esta proteína se dieron a una temperatura de 37°C y agitación orbital de 250 r.p.m. durante un periodo de 4 h. El procedimiento para determinar la solubilidad de esta construcción se muestra en el apartado 7.3.3.2, el cual de igual manera se corroboró mediante SDS-PAGE (Fig. 13). El peso molecular de esta proteína (24 kDa) concuerda con lo reportado por Torres-Morales (2016), por otro lado y como se ve en los carriles 4 y 5 de

esta figura, la mayor parte de la proteína se va a cuerpos de inclusión.

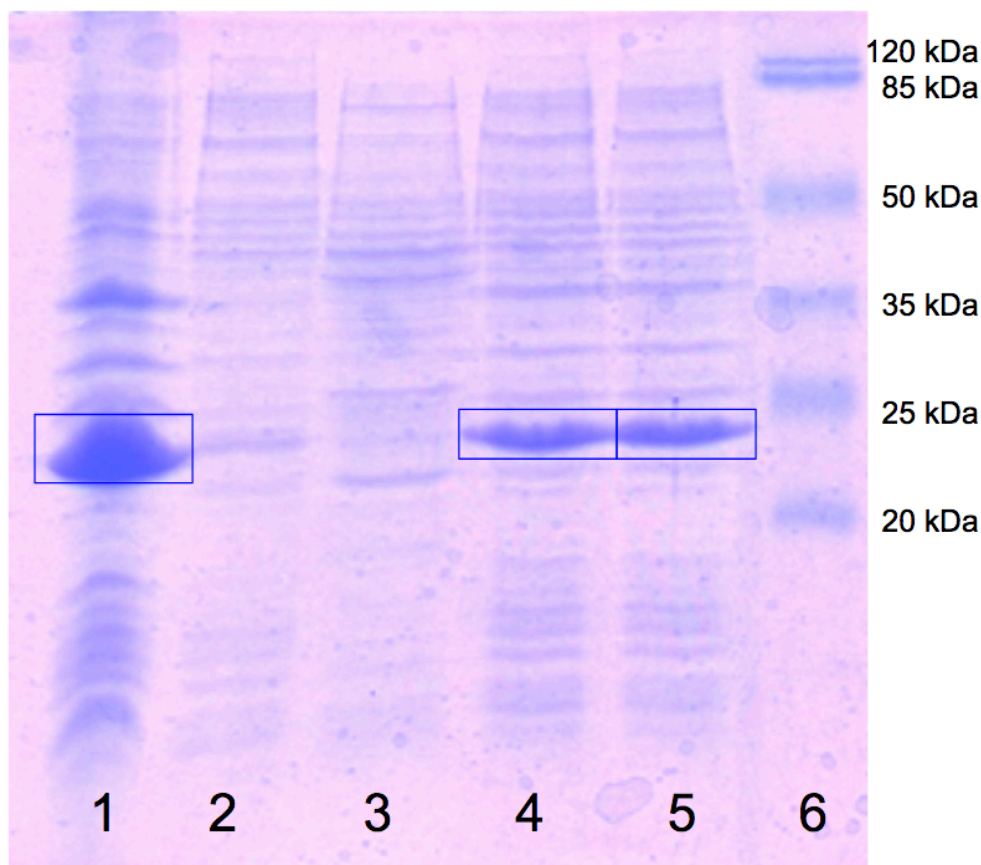


Figura 13. Análisis por SDS-PAGE (12.5%) de la presencia de la proteína KcLBpIA6H en la fracción soluble o insoluble de los extractos celulares. 1) lisados celulares con sobreexpresión de la proteína KcLBpIA6H; 2) y 3) Fracción soluble de la proteína KcLBpIA6H; 4) y 5) Cuerpos de inclusión de la proteína KcLBpIA6H 6) Marcador de peso molecular. La proteína de interés se encuentra señalada en el rectángulo azul.

8.5. Purificación de las proteínas recombinantes.

En el caso de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H, el proceso de limpieza y solubilización de cuerpos de inclusión que se describe en la sección 7.3.4 fue necesario por su estado de agregación y la presencia de otros componentes celulares. Gracias a la etiqueta de Histidinas que posee cada construcción, fue posible su purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos. De igual manera, su presencia y pureza se siguió mediante SDS-PAGE (Fig. 14). Las fracciones producto de la purificación se

juntaron y concentraron mediante centrifugación a 4400 r.p.m. en unidades de filtración con un límite nominal de peso molecular equivalente a 50 kDa. En el caso de la proteína KcLBplA6H, ésta se purificó aunque no se obtuvieron resultados tan favorables (Fig. 15). Consideramos que este grado de pureza es aceptable para nuestros propósitos, ya que tanto Sánchez-Rodríguez (2012) como Torres-Morales (2016) obtuvieron resultados similares con los cuales pudieron probar las cualidades tanto de VP2 como de KcLBplA6H respectivamente.

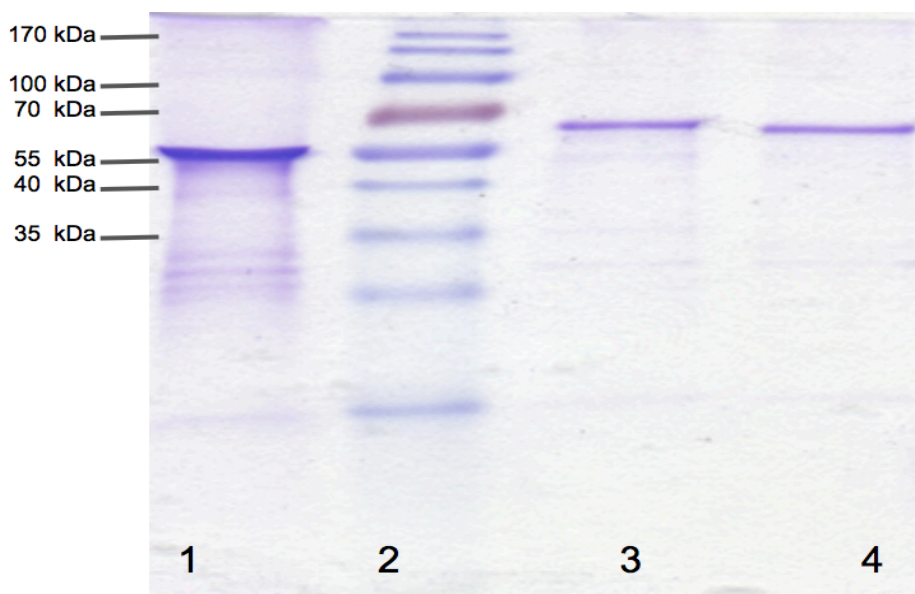


Figura 14. Análisis por SDS-PAGE (12.5%) de las proteínas quiméricas purificadas. 1), Proteína VP26H purificada; 2) marcador de peso molecular; 3) proteína E5-VP28H purificada; 4) Proteína K5-VP28H purificada.

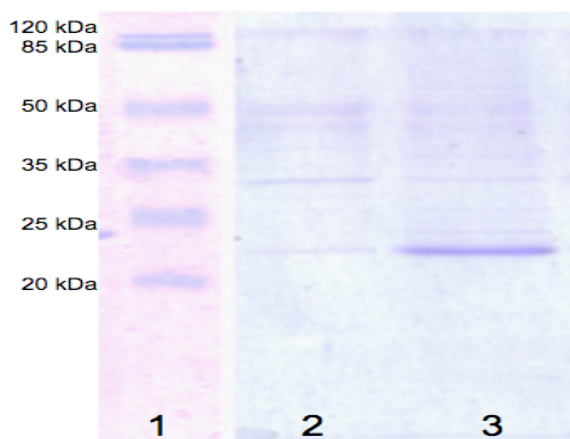


Figura 15. SDS-PAGE (12.5%). 1) Marcador de peso molecular; 2) Fracción soluble de la proteína KcLBplA6H; 3) Proteína KcLBplA6H purificada

En la Tabla 4 se muestran detalles de los rendimientos alcanzados por cada una de las proteínas. El rendimiento de las proteínas E5-VP28H y K5-VP28H es menor en comparación al que muestra Sánchez-Rodríguez y col. (2012), excepto el de la proteína VP26H, el cual es muy similar al reportado en este trabajo. Ya que los rendimientos de las proteínas quiméricas resultaron por debajo de lo esperado, se tuvo que repetir el proceso hasta que se alcanzara la cantidad de proteína deseada para los ensayos de ensamble de partículas tipo virus y su uso posterior para los fines de este trabajo.

Tabla 4. Resultados de los rendimientos obtenidos después de la purificación de las proteínas VP26H, E5-VP28H, K5-VP28H y KcLBplA6H

Proteína	Concentración final (mg / mL)	Volumen de proteína obtenido (mL)	Rendimiento (mg/L)
VP26H	4.03 ±0.12	20	57.16
E5-VP28H	1.63 ±0.04	15	17.34
K5-VP28H	1.54 ±0.01	15	16.38
KcLBplA6H	1.15 ±0.05	15	24.29

8.6. Obtención de VLPs a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H.

Está ampliamente demostrado que la proteína VP2 es capaz de adquirir su estructura terciaria y cuaternaria *in vitro* al retirar los agentes desnaturalizantes (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Santillán-Uribe *et al.*, 2015; Morán-García *et al.*, 2016), lo que significa que formará partículas tipo virus características. Sin embargo, el hecho de que a la secuencia se le hayan añadido los aminoácidos correspondientes a los tectones y al espaciador, reduce la certeza de su correcto plegamiento y por lo tanto crea una incertidumbre sobre su formación en estructuras supramoleculares. En este sentido, se decidió mezclar la proteína silvestre con las dos proteínas quiméricas en proporciones que permitieran formar VLPs, así pues, se combinaron en las proporciones 9:1, 5:1, 4:1 y 1:1 de VP26H a quimera. Dichas combinaciones se hicieron de manera molar y ajustando la concentración de proteína bajo ese criterio y el establecido por Sánchez Rodríguez (2012), en donde nos muestra las condiciones favorables para el ensamble de la proteína silvestre de VP2.

Ya que la formación de las partículas tipo virus fue favorable en cada una de las proporciones, se decidió ensamblar VLPs con 100 % de proteína quimérica, lo cual al resultar favorable se tomó para continuar con los siguientes pasos de caracterización, ya que se pretende tener la mayor cantidad de tectones expuestos en la superficie de la cápside.

El protocolo que se muestra en la sección 7.3.6 describe la manera de obtener partículas tipo virus a partir de las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H, principalmente consiste en quitar el agente desnaturizante por medio de diálisis frente a PBS_{Arg}. El proceso de diálisis tuvo una duración de 42 h a una temperatura de 4°C. Si el tiempo de diálisis sobrepasa las 45 h las tres proteínas tienden a agregarse con bastante rapidez (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Santillán-Uribe *et al.*, 2015; Morán-García *et al.*, 2016). Cabe aclarar que esta agregación no corresponde al ensamblaje ordenado de cápsides, sino a la formación de cúmulos insolubles.

8.7. Caracterización de lipasa, VLPs y estructuras supramoleculares mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

Después del tiempo estimado para que se formen las cápsides al retirar el agente desnaturizante, las VLPs fueron analizadas por dispersión dinámica de luz. Para esto se tomaron las muestras y se filtraron en cartuchos con tamaño de poro de 2 µm y posteriormente con cartuchos con tamaño de poro de 0.22 µm.

Los viriones del B19V 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 todos los casos de proteínas quiméricas de VP2 y de la misma proteína silvestre se formaron especies ligeramente más grandes al tamaño descrito para las VLPs (Fig. 16), esto se debe a la inclusión tanto de la etiqueta de histidinas como los tectones. De igual manera se hizo la caracterización de la proteína quimérica de lipasa. Como se mencionó anteriormente la lipasa de *B. pumilus* GMA1 (BplA) es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis* (BslA) (Bustos-Jaimes, 1998), para la cual hay datos cristalográficos que nos dicen que tiene una forma globular con dimensiones de 35, 36 y 42 Å y generalmente existen dos moléculas de lipasa en una unidad asimétrica, lo que duplica los tamaños descritos para esa

población (Van Pouderoyen *et al.*, 2001), lo cual igualmente concuerda con la figura 16. Los diagramas de la distribución de las cuatro proteínas se muestran a continuación, por motivos prácticos solo se muestran las condiciones de 100 % en cada una de las proteínas.

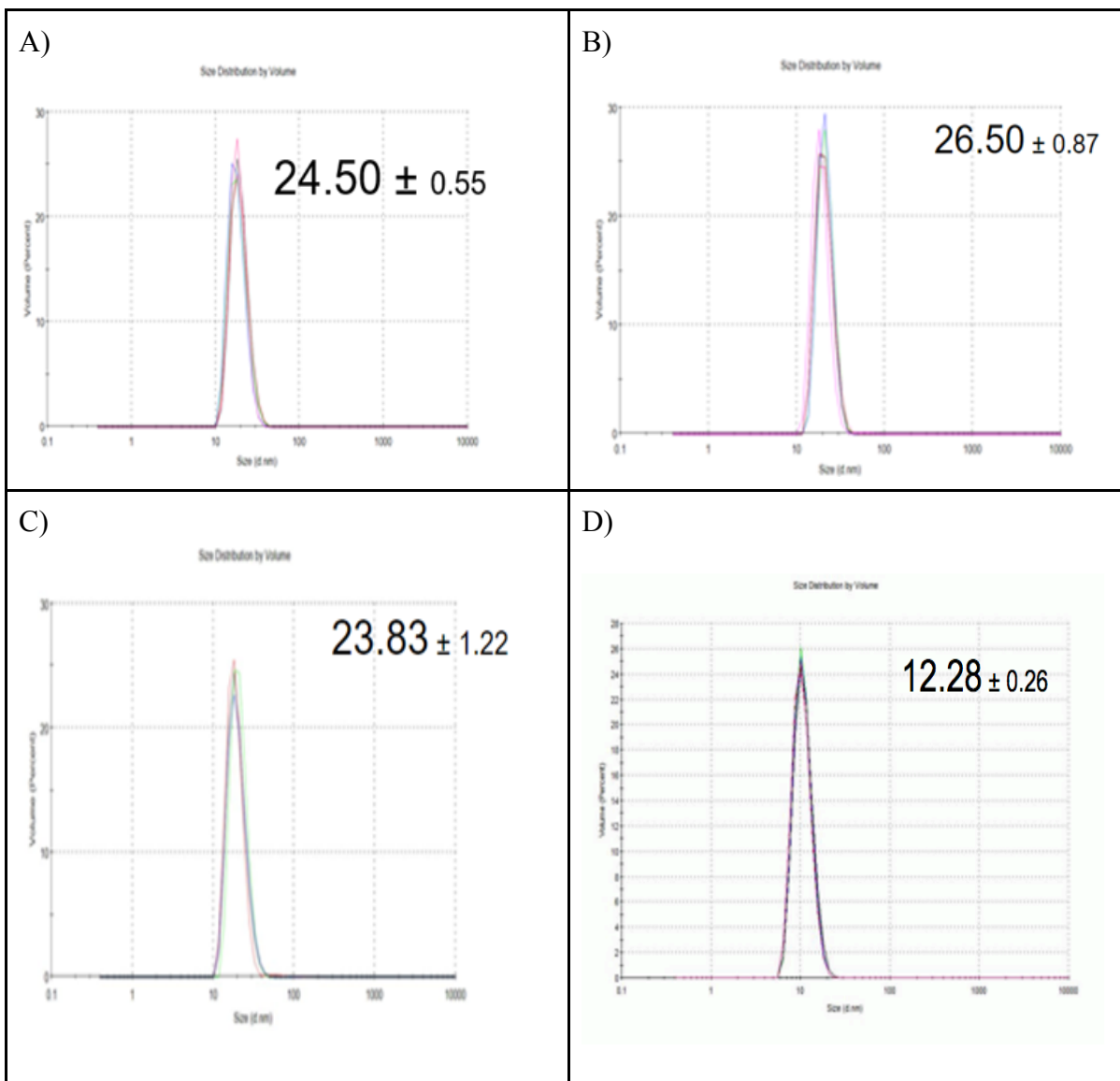


Figura 16. Análisis por DLS de las muestras obtenidas a partir de las proteínas quiméricas de VP2 y la proteína quimérica de lipasa en el siguiente orden: A) VP26H, B) E5-VP28H, C) K5-VP28H y D) KcLBplA6H.

8.8. Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica.

Las partículas tipo virus que se sometieron al proceso de caracterización mediante dispersión dinámica de luz también fueron caracterizadas por ultracentrifugación

isopícnica, esto con el fin de corroborar mediante una metodología distinta a la encontrada por DLS. El gradiente de densidad se llevó a cabo en una solución que contiene Cloruro de Cesio como se describe en la sección de métodos.

En las Figuras 17 a 19, se muestran los resultados de la centrifugación isopícnica para la proteína VP26H y distintas mezclas de la misma con las proteínas quiméricas. Las bandas que corresponden a las VLPs fueron recuperadas y analizadas mediante SDS-PAGE.

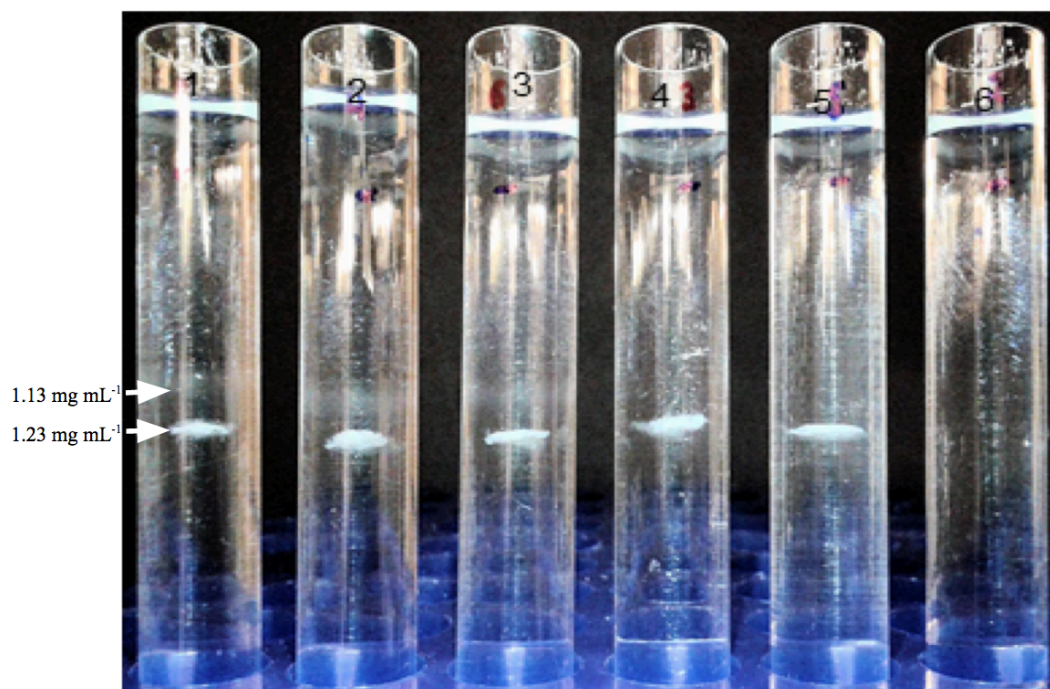


Figura 17. Gradiente de Cloruro de Cesio. Análisis de partículas tipo virus que fueron previamente caracterizadas por DLS, las cuales en el caso de las proteínas quiméricas tiene una proporción 9:1 y 5:1 de VP26H:quimera. Tubo 1, VP26H; tubo 2, VP26H:E5-VP28H 5:1; tubo 3, VP26H:E5-VP28H 9:1; tubo 4 VP26H:K5-VP28H 5:1; tubo 5, VP26H:K5-VP28H 9:1; tubo 6, blanco.

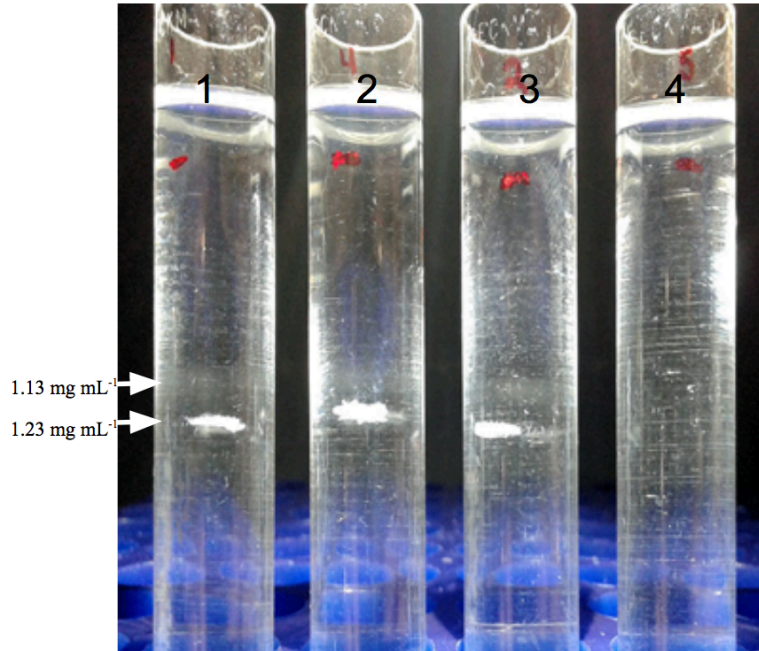


Figura 18. Gradiente de Cloruro de Cesio. Análisis de partículas tipo virus que fueron previamente caracterizadas por DLS, las cuales en el caso de las proteínas quiméricas tiene una proporción 5:1 con respecto a la proteína silvestre. Tubo 1) VP26H, Tubo 2) E5-VP28H, Tubo 3) K5-VP28H, y Tubo 4) Blanco.

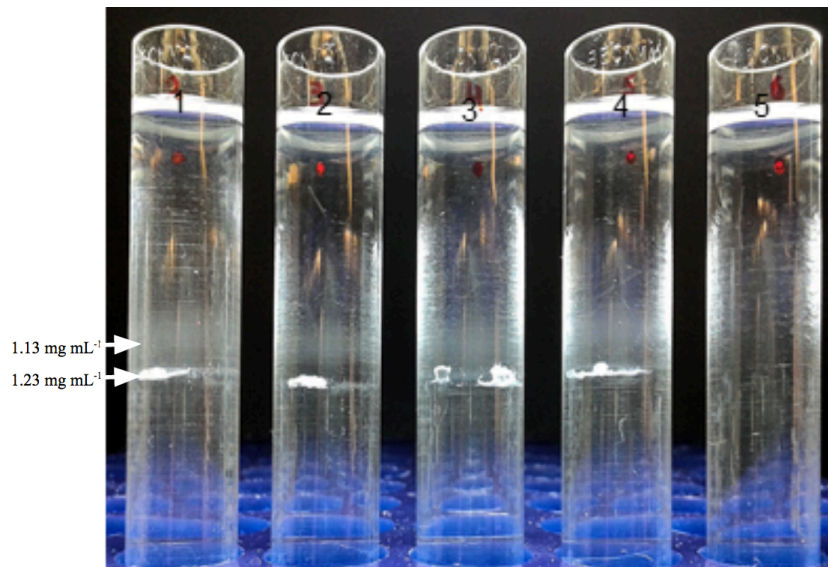


Figura 19. Gradiente de Cloruro de Cesio. Análisis de partículas tipo virus que fueron previamente caracterizadas por DLS, las cuales en esta medición todas las muestras contienen un 100% de proteína silvestre o quimérica según sea el caso Tubo 1), VP26H sin arginina; Tubo 2), VP26H con arginina 2x; Tubo 3) E5-VP28H; Tubo 4), K5-VP28H; Tubo 5), Blanco.

En cada una de las figuras (17, 18 y 19) se puede registrar un patrón general de dos bandas o dos zonas de densidad, la cuales tienen valores de 1.13 mg mL^{-1} y 1.23 mg mL^{-1} aproximadamente. Estas zonas de densidad ya han sido reportadas en trabajos previos como los de Sánchez Rodríguez (2012), en los cuales se reporta que la zona superior (1.13 mg mL^{-1}) corresponde mayoritariamente a especies intermediarias, los cuales también son llamados capsómeros; la zona inferior y claramente más marcada (1.23 mg mL^{-1}) corresponde a partículas tipo virus. Es muy importante señalar en este punto que, mediante esta técnica de purificación o separación de partículas, no existen diferencias con lo reportado en trabajos anteriores, por lo tanto, los tectones moleculares no representan impedimentos significativos en el ensamble de las cápsides, ya sea en mezcla con la proteína VP26H o en como proteína quimérica al 100%.

8.9. Purificación de VLPs por SEC y su caracterización mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

Con el propósito de separar y aislar a las partículas tipo virus de las especies intermediarias y tener un mejor control para experimentos posteriores, se realizó una etapa cromatográfica preparativa inmediatamente después de la diálisis. Con el fin de obtener una mayor cantidad de proteína soluble, se decidió modificar el amortiguador PBS agregándole L-Arginina en una concentración de 0.2 M, como lo sugieren trabajos anteriores (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2016), los cuales demuestran que el fenómeno de agregación es notoriamente menor en presencia de este aminoácido. Las muestras fueron filtradas con cartuchos que poseen un tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y purificadas en un equipo de HPLC equipado con una columna empacada con la resina de exclusión por tamaño Sephacryl S-500 HR (Fig. 20). Las muestras fueron colectadas en fracciones de 2 mL cada una. Cada fracción fue analizada mediante dispersión dinámica de luz para poder determinar la presencia de partículas tipo virus, tanto de las proteínas quiméricas como de la proteína VP26H. Los tiempos de retención para cada uno de los tipos de VLPs obtenidas son: 30 min para las VLPs de VP26H; 31 min para las VLPs de E5-VP28H y 33 min para las VLPs de K5-VP28H. Aunque los tiempos son ligeramente distintos, no son significativos para los

objetivos de este trabajo. El análisis por DLS se hizo para corroborar la separación de las muestras que contenían las VLPs y las que solo contenían intermediarios.

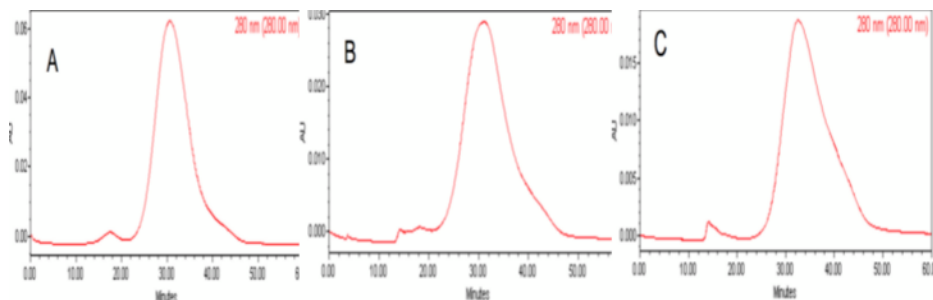
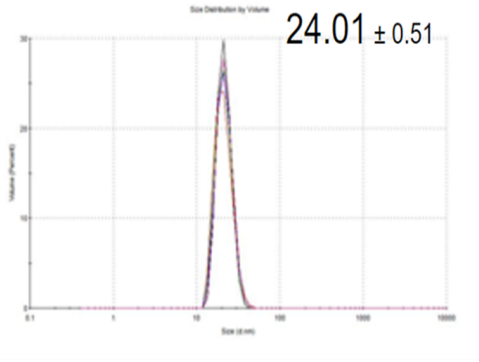


Figura 20. Perfil cromatográfico para aislar: A) VLPs de VP26H; B) VLPs de E5-VP28H; C) VLPs de K5-VP28H. Se obtuvieron mediante purificación en columna de exclusión por tamaño Sephacryl S500 (SEC).

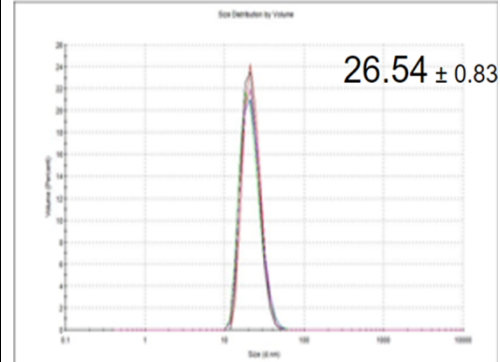
8.10. Ensayos de interacciones entre VLPs y KcLBp1A6H con fragmentos heterodimerizantes y caracterización de especies supramoleculares mediante DLS

Los ensayos de interacciones se realizaron a partir de las VLPs que fueron obtenidas mediante la columna preparativa de exclusión, y posteriormente caracterizadas por DLS. Se tomaron las proteínas VP26H, E5-VP28H y K5-VP28H, las cuales mediante incubación se pusieron a interactuar con la proteína KcLBp1A, de igual forma se sometieron al mismo proceso cada una por separado. El proceso de incubación se realizó a 30°C con agitación orbital de 600 r.p.m. durante un periodo de 60 min. Los parámetros fueron asignados de acuerdo a observaciones experimentales de las 4 proteínas, las cuales tienden a agregarse fácilmente aún en presencia de L-Arginina. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y se utilizó la dispersión dinámica de luz para su caracterización (Fig. 21).

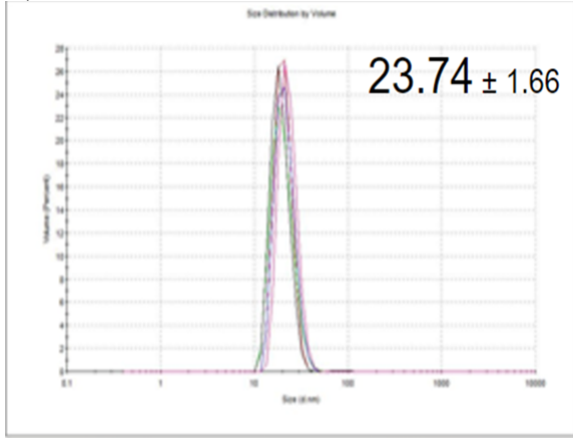
A)



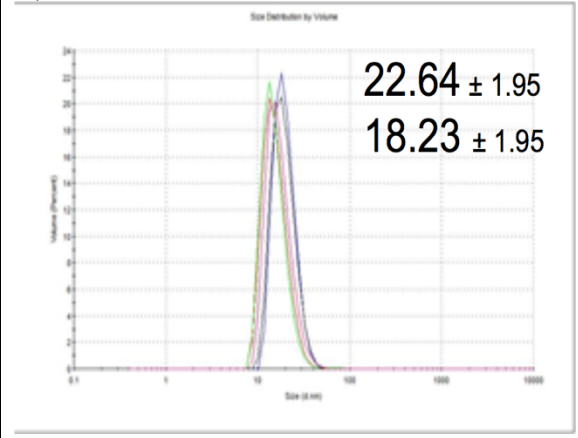
B)



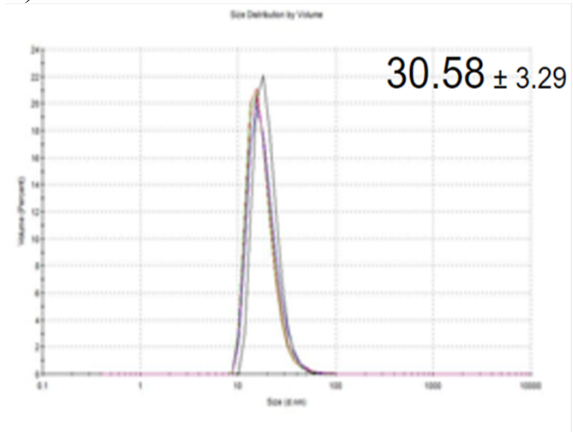
C)



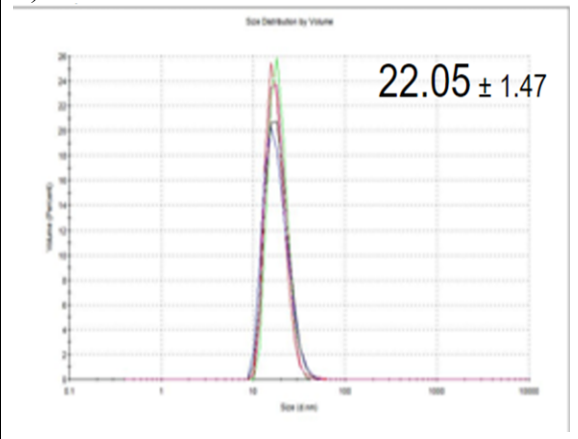
D)



E)



F)



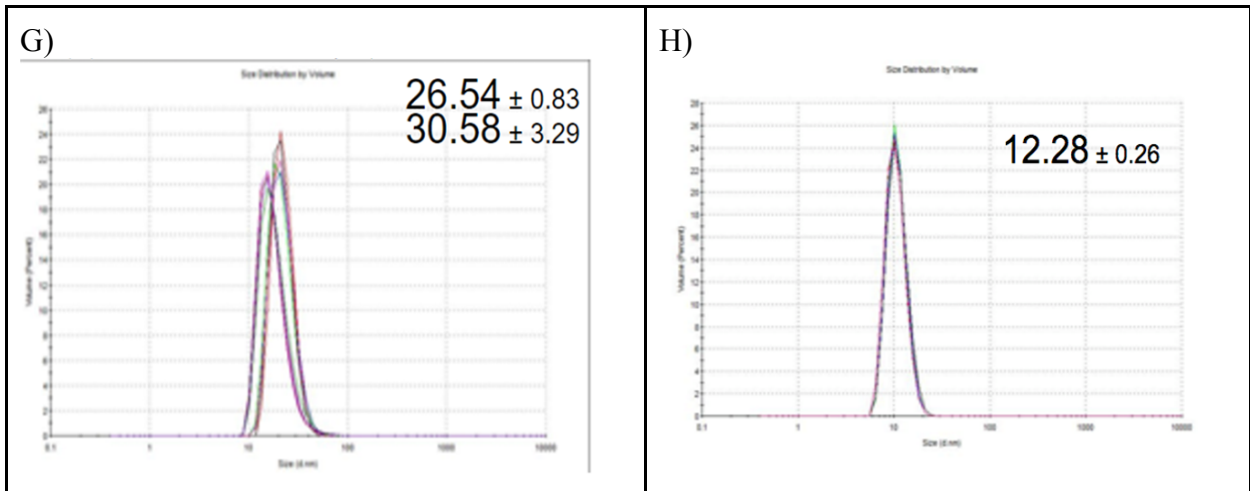


Figura 21. Análisis por DLS. Ensayos de interacciones entre las proteínas que forman VLPs y la lipasa quimérica con el tectón K5. A) VP26H 100%; B) E5-VP28H 100%; C) K5-VP28H 100%; D) VP26H:KcLBpIA proporción 1:1; E) E5-VP28H:KcLBpIA proporción 1:1; F) K5-VP28H:KcLBpIA proporción 1:1; G) Superposición de los gráficos B y E; H): KcLBpIA 100%.

En los paneles A, B y C de la Figura 21 podemos observar que el proceso de incubación no causó ningún efecto en el tamaño de las cápsides, tampoco influyó en su descomposición en capsómeros o en agregados de proteína, por lo cual podemos afirmar que los parámetros especificados no influyen de ninguna manera con la integridad de la proteína, de igual manera la L-Arginina empleada contribuyó de manera significativa con este resultado. Así pues, se pueden tomar estos tres diseños de ensayo como un control negativo en el incremento del radio hidrodinámico para las interacciones con la proteína quimérica de lipasa.

En la Figura 21-D se pueden observar dos especies: la distribución característica de la proteína VP26H y una distribución un poco más pequeña de la misma proteína. Al no formarse ninguna otra especie de menor o mayor tamaño podemos afirmar dos cosas: 1) no fue posible una interacción de estas dos proteínas hacia la formación de una estructura supramolecular mayor y 2) la integridad de las proteínas se vio afectada para ambas proteínas, no hubo capsómeros o agregados por parte de VP26H y la concentración de la proteína KcLBpIA6H se vio afectada al grado de no presentar lecturas de picos visibles en esta muestra. El punto número 1 es un resultado esperado debido a que la proteína VP26H no posee la contraparte del tectón hélice K5 (hélice E5) y la lipasa es mucho menor a la de

las quimeras de VP26H y se vuelve poco significativa al mezclarlas en proporción molar 1:1.

En la Figura 21-E podemos observar una distribución de partículas superior a las reportadas con anterioridad. Con este resultado podemos inferir que hubo interacciones efectivas entre E5-VP28H y KcLBplA6H. Para corroborar lo antes expuesto en cuanto al tamaño, se realizó una superposición de gráficos, los cuales se muestran en la imagen G, en donde se puede ver claramente que son dos especies diferentes. El número de interacciones por cápside es imposible de dilucidar mediante este método, sin embargo, la distribución característica de KcLBplA6H no fue reportada por el dispersor. El tamaño característico de esta última proteína se muestra en la Figura 21-H.

Finalmente, la Figura 21-F nos muestra la distribución particular de K5-VP28H, la cual no se vio afectada por la incubación con la proteína KcLBplA6H. Aunque esta es la proteína quimérica de VP2 más propensa a la agregación, tampoco mostró rastros de ella o de una posible descomposición en capsómeros. Un dato curioso fue que la distribución de las especies de lipasa quimérica también desapareció en estas lecturas. La razón para este resultado es incierta, aunque podría deberse a que la masa de la lipasa es mucho menor a la de las quimeras de VP26H y se vuelve poco significativa al mezclarlas en proporción molar 1:1, como ya se había expuesto en la figura 21-D.

8.11. Caracterización de estructuras supramoleculares mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA)

Una técnica alternativa para determinar la interacción entre los complejos heterodimerizantes fueron los ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA), los cuales típicamente se utilizan para detectar complejos proteína-ácido nucleico. Sin embargo, para un estudio cualitativo de interacciones como es el caso, es totalmente funcional, ya que es una tecnología que sirve para la caracterización de sistemas interactivos en general (Hellman y Fried, 2007).

En la Figura 22 se presenta el resultado del EMSA. Los carriles mostrados se cargaron de la siguiente forma de izquierda a derecha: 1) VP26H, 2) E5-VP28H, 3) K5-VP28H, 4) y 5) Interacciones entre las proteínas E5-VP28H y KcLBplA6H, 6) y 7) Mezclas entre las proteínas K5-VP28H y KcLBplA6H y 8) KcLBplA6H.

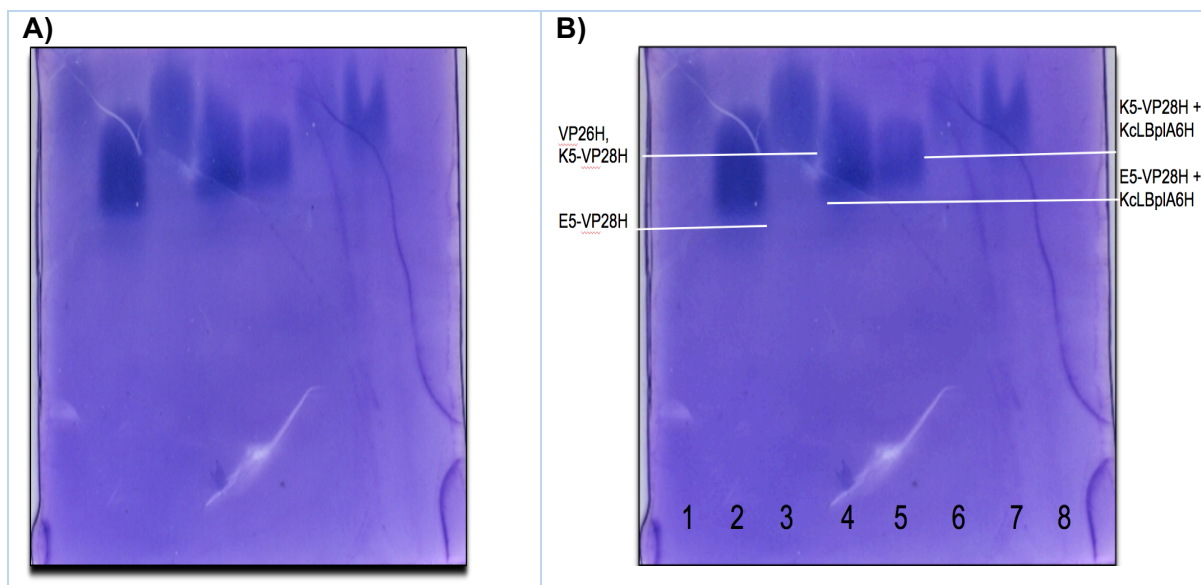


Figura 22. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA) para interacciones entre proteínas quiméricas de VP2 y proteína quimérica de lipasa. En el panel A) se muestra sin ninguna indicación, mientras que en el B) se muestran las distancias recorridas por cada una de las proteínas así como los carriles de la siguiente manera: 1) VP26H, 2) E5-VP28H, 3) K5-VP28H, 4) y 5) Interacciones entre las proteínas E5-VP28H y KcLBplA6H, 6) y 7) Interacciones entre las proteínas K5-VP28H y KcLBplA6H y 8) KcLBplA6H.

En orden de menor a mayor distancia de migración las proteínas formadoras de VLPs se encuentran de la siguiente forma: K5-VP28H = VP26H < E5-VP28H. La proteína quimérica de lipasa se trató bajo las mismas condiciones que las anteriores, sin embargo, no quedó prácticamente nada de volumen en la parte superior del centrifugón. Por este motivo, se hidrataron las paredes del cartucho de centrifugación y se cargó en igual cantidad que las otras tres proteínas. Debido a lo mencionado anteriormente, el carril número 8 no muestra un patrón de movilidad electroforética.

Al haber definido los patrones de migración de los carriles 1, 2, 3 y 8 podemos analizar los

4 restantes. En los carriles 4 y 5, los cuales contienen a las proteínas E5-VP28H y KcLBplA6H, se ve claramente que su perfil de movilidad electroforética es distinto al presentado por la proteína E5-VP28H al 100%. Podemos observar que migran una distancia menor con respecto a esta proteína y una distancia mayor al mostrado por las proteínas K5-VP28H y VP26H. Este resultado nos muestra que hay interacciones efectivas entre las proteínas E5-VP28H y KcLBplA6H por efecto de los tectones heterodimerizantes. Específicamente, el tectón K5 puede contrarrestar las cargas del tectón E5 y, a través de la interacción entre las VLPs y la lipasa, aumentar el tamaño de las partículas, provocando una disminución en la distancia de migración de estas “VLPs decoradas”. Este resultado es consistente con las mediciones de DLS. Esta es una prueba cualitativa, lo cual nos impide saber con exactitud el número total de interacciones efectivas que se dan en cada caso.

Por otra parte, en los carriles 6 y 7 se encuentra las muestras a partir de las proteínas K5-VP28H y KcLBplA6H. El patrón de migración es igual al de la proteína K5-VP28H, lo cual nos indica que no hubo una interacción efectiva entre los tectones (en este caso no complementarios) y que la proteína KcLBplA6H se perdió durante el proceso de centrifugación, así como ocurrió en el carril número 8 el cual en este caso nos sirve como un control negativo de la interacción. Estos datos son consistentes con los datos reportados en la literatura y los obtenidos mediante dispersión dinámica de luz. Para corroborar lo mostrado en los resultados del apartado anterior, se corrieron muestras de la parte superior y se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 23). Este análisis da una confirmación más de la interacción de los tectones complementarios en las estructuras supramoleculares de VLPs y de la Lipasa.

8.12. Caracterización de estructuras supramoleculares mediante SDS-PAGE

En el primer carril de la figura 23 se puede observar la proteína VP26H, en el segundo carril se puede observar la proteína VP26H y es notable la ausencia de la proteína quimérica de lipasa, lo cual es consistente con los datos obtenidos por el DLS (figura 21-D). En el carril número 3 se puede observar

la Proteína E5-VP28H y en el cuarto carril la presencia de esta misma con la presencia de la proteína lipasa, la cual concuerda con el peso molecular mostrado en el carril número 5.

Con los datos mostrados en la Figura 23 y los mostrados mediante DLS y EMSA, podemos asegurar una interacción entre la proteína E5-VP28H y la proteína KcLBp1A6H por efecto de los tectones heterodimerizantes, ya que las otras proteínas quiméricas formadoras de VLPs (K5-VP28H y VP26H) no formaron estructuras supramoleculares mayores en ninguno de los ensayos mostrados, siendo consistentes en todos ellos.

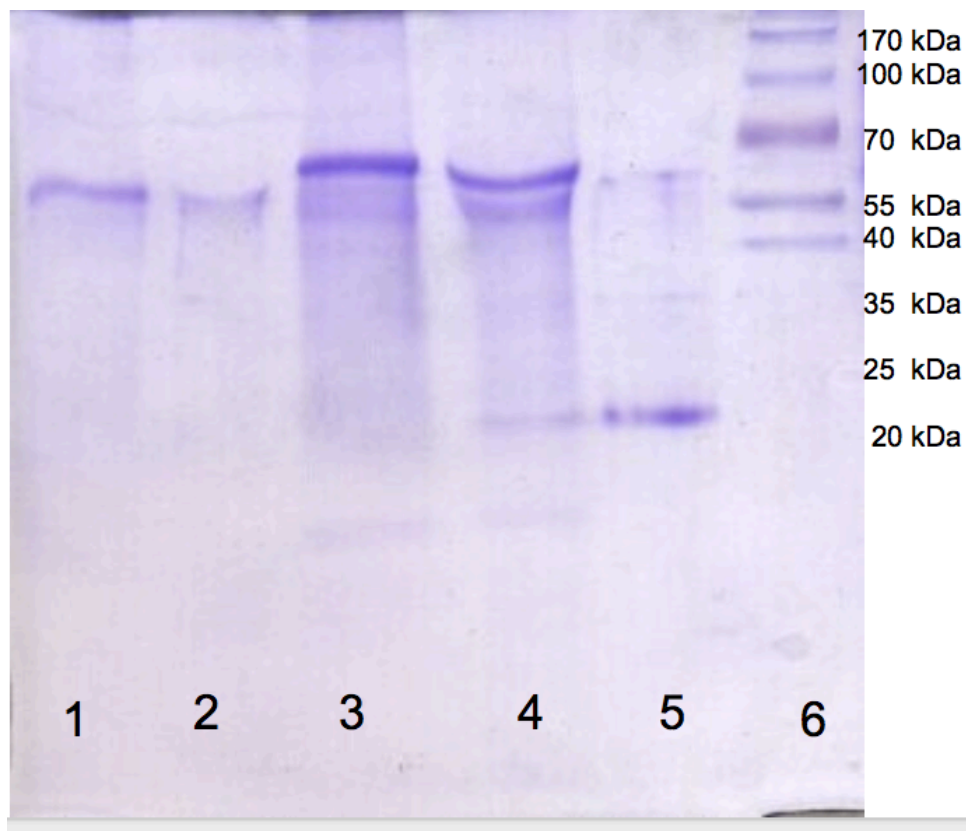


Figura 23. Análisis por SDS-PAGE de interacción entre las proteínas formadoras de VLPs con la proteína quimérica de lipasa. 1), Proteína VP26H; 2) Proteína VP26H en interacción con la proteína lipasa; 3) Proteína E5-VP28H; 4) Proteína E5-VP28H en interacción con la proteína KcLBp1A6H; 5) Proteína KcLBp1A6H y 6) Marcador de peso molecular.

Capítulo 9. Conclusiones y Perspectivas

9.1. Conclusiones Generales

Las proteínas E5-VP28H y K5-VP28H forman cuerpos de inclusión cuando son expresadas en *E. coli*, consistentemente con lo observado para VP26H. De igual manera es posible su purificación mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes.

La mayor parte de la proteína KcLBp1A6H forma cuerpos de inclusión cuando es expresada en *E. coli*, y es posible su purificación mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes.

Es posible llevar a cabo el ensamble de partículas tipo virus *in vitro* a partir de las proteínas quiméricas E5-VP28H y K5-VP28H. Los tectones moleculares no son impedimento para que se lleve a cabo este proceso.

La L-Arginina juega un papel fundamental en la solubilidad de las proteínas que forman VLPs, aunque en el caso de la quimera KcLBp1A6H no fue un factor determinante para evitar la agregación de la proteína, la cual se dio de manera casi inmediata.

Las VLPs ensambladas exclusivamente con la quimera E5-VP28H fueron capaces de establecer interacciones con la proteína KcLBp1A6H. Esto demuestra que el tectón hélice E5 está en la superficie de las VLPs y forman complejos con su complemento heterodimerizante, hélice K5, presente en la proteína KcLBp1A6H. La formación de estos complejos se da en condiciones cercanas a las fisiológicas, lo que es biotecnológicamente prometedor.

9.2. Perspectivas

Es importante tener certeza del número de proteínas quiméricas de KclBplA6H que interactúan por cada cápside con motivos de farmacocinética o farmacodinamia. Medir la estequiometría de unión entre las VLPs y la lipasa sería de mucha utilidad. Se podría evaluar parcialmente esta estequiometría por la actividad de la lipasa inmovilizada sobre las VLPs, así como por métodos densitométricos. También se podrían titular ambas proteínas por medio de western-blot cuantitativo y a partir de ese dato establecer la relación de abundancias de ambas proteínas.

Con el objetivo de futuras aplicaciones biotecnológicas, sería necesario medir la energía de unión entre las VLPs y la enzima lipasa. Esto podría realizarse mediante calorimetría isotérmica de titulación.

Se podría ampliar la aplicación de VLPs con este sistema de hélice enrolladas con más proteínas o moléculas que sean de interés nanotecnológico o con propiedades antigénicas de virus distintos al B19V, ya que es un prototipo de andamiaje muy prometedor.

Es importante demostrar la aplicación nanotecnológica del presente trabajo en alguna línea celular o modelo, que permita demostrar la utilidad del sistema de hélices enrolladas para acarrear proteínas unidas a las VLPs.

Referencias.

- Bakota EL, Aulisa L, Galler KM, Hartgerink JD (2011): *Enzymatic cross- linking of a nanofibrous peptide hydrogel*. Biomacromolecules, 12:82-87.
- Breitling R. & Takano E. (2015). *Synthetic biology advances for pharmaceutical production*. Current Opinion in Biotechnology 35, 46-51.
- Bromley H.E., Channon E., Moutevelis E. & Woolfson D. (2007). *Peptide and protein building blocks for synthetic biology: from programming biomolecules to self-organized biomolecular systems*. ACS Chem. Biol. 3, 38–50.
- Brune K.D., Leneghan D.B., Brian I.J., Ishizuka A.S., Bachmann M.F., Draper S.J., Biswas S. & Howarth M. (2016). *Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization*. Sci. Rep. 6, 19234.
- Bustos-Jaimes I., Mora-Lugo R., Calcagno M. & Farrés A., (2010). *Kinetic studies of Gly28:Ser mutant form of Bacillus pumillus lipase: Changes of Kcat and thermal dependence*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics. Volume 1804. Issue 12. Pages 2222-2227. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.09.001>
- Castro G. y Britto F. (2012). *Nanotecnología, hacia un nuevo portal científico-tecnológico*. Laboratorio de Nanobiomateriales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Revista Química viva, Número 3, año 11.
- Clark KB, Lin SC, Humphrey C, et al (2009). *Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells*. Virology; 387: 267-72.
- Crüsemann M., Kohlhaas C., Piel J.(2013) *Evolution-guided engineering of nonribosomal peptide synthetase adenylation domains*. Chem Sci.;4:1041–1045.
- Cuadros-Moreno A., Casañas Pimentel R., San Martín-Martínez E., Yañes Fernández J. (2014). *Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas*. Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol. 8, No. 4, Dec. 2014
- De Crescenzo G., Litowski R., Hodges S. & O'Connor-McCourt D. (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 42, 1754–1763.
- Domeradzka N., Werten M., Wolf F. and de Vries R. (2016). *Protein cross-linking tools for the construction of nanomaterials*. Current Opinion in Biotechnology 39: 61-67.
- Environmental Health Perspectives, Noticias de Salud Ambiental. *La biología sintética: Las implicaciones de un nuevo campo para la salud ambiental*. Salud Pública de México. Volúmen 52, número 3, mayo-junio 2010.
- ETC group: grupo de acción sobre erosión, tecnología y concentración. *Ingeniería Genética Extrema: Una introducción a la biología sintética*. Enero de 2007. Publicación disponible en: www.etcgroup.org. Traducción al español de Ramón Vera Herrera.
- Gilbert L., Toivola J., White D., Ihalainen T., Smith W., Lindholm L., Vuento M. & Oker-Blom C. (2005). *Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 331, 527–535.
- Grgacic EVL, Anderson DA.(2006). *Virus-like particles: Passport to immune recognition*. Methods; 40: 60-5.
- Hamed, E., Ma, D., & Keten, S. (2015). *Effect of Polymer Conjugation Site on*

Stability and Self-Assembly of Coiled Coils. BioNanoScience, 5(3), 140-149. DOI: 10.1007/s12668-015-0172-y

- Heegaard E. & Brown K., (2002) *Human Parvovirus B19*. Clinical Microbiology Reviews. 15(3). 485-505. DOI: 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>
- Jain RK. (2005). *Antiangiogenic Therapy for Cancer: Current and Emerging Concepts*. Oncology (Willinston Park). 7-16
- Jain RK. (2005). *Normalization of Tumor Vasculature: An emerging Concept in Antiangiogenic Therapy*. Science. Vol. 307, Issue 5706, pp. 58-62. DOI: 10.1126/science.1104819
- Kalnciema I., Skrastina D., Ose V., Pumpens P., Zeltins A. (2012) *Potato Virus Y-Like Particles as a New Carrier for the Presentation of Foreign Protein Stretches*. Mol. Biotechnol. 52. 129-139. DOI 10.1007/s12033-011-9480-9
- Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG (2004). *The structure of human parvovirus B19*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(32):11628-11633. doi:10.1073/pnas.0402992101.
- Klein J., Heal J.R., Hamilton W.D.O., Bousseghoune T., Tange T.O., Delegrange F., Jaeschke G., Hatsch A., Heim J. (2014). *Yeast synthetic biology platform generates novel chemical structures as scaffolds for drug discovery*. ACS Synth Biol. ;3:314–323.
- Koho T., Ihalainen T.O., Stark M., Uusi-Kerttula H., Wieneke R., Rahikainen R., Blazevic V., Marjomäki V., Tampé R., Kulomaa M.S. & Hytönen V.P. (2015). *His-tagged norovirus-like particles: A versatile platform for cellular delivery and surface display*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 96, 22–31.
- López E. y Solares S. (2014). *El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones*. Revista 28 de la Universidad del Valle de Guatemala. Artículo invitado.
- Lowin T, Raab U, Schroeder J, Franssila R, Modrow S. (2005). *Parvovirus B19 VP2-proteins produced in Saccharomyces cerevisiae: comparison with VP2-particles produced by baculovirus-derived vector*. J Vet Med B; 52: 348-52.
- Montero L. de Guevara H., Métodos: *Centrifugación*. Archivo pdf. Publicación Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf>.
- Morán-García, A.C., Rivera-Toledo, E., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Gómez, B., Bustos-Jaimes, I. (2016). *Peptide presentation on primate erythroparvovirus 1 virus-like particles: in vitro assembly, stability and immunological properties*. Virus Res. 224, 12-18. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.08.007.
- Mukherjee S, Thorsteinsson MV, Johnston LB, DePhillips PA, Zlotnick A. (2008). *A quantitative description of in vitro assembly of human papilloma virus 16 virus-like particles*. J Mol Biol; 381: 229-37.
- Pattenden LK, Middelberg APJ, Niebert M, Lipin DI. (2005) *Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles*. Trends Biotechnol; 23: 523-9.
- Piluso S, Cassell HC, Gibbons JL, Waller TE, Plant NJ, Miller AF, Cavalli G. (2013). *Site-specific, covalent incorporation of Tus, a DNA-binding protein, on ionic-complementary self-assembling peptide hydrogels using transpeptidase Sortase A as a conjugation tool*. Soft Matter, 9:6752-6756.
- Sánchez-Rodríguez S. (2012). *Estudio del ensamblado y estabilidad de capsómeros*

y cápsides del Parvovirus B19. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Sánchez-Rodríguez S., Münch-Anguiano L. and Bustos-Jaimes I.(2010), *Advances in the Development of Virus-Like Particles as a Tool in Medicine and Nanoscience*. Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México Current Chemical Biology, 2010, 4, 231-243
- Sánchez-Rodríguez S., Münch-Anguiano L., Echeverría O., Vázquez-Nin G., Mora-Pale M., Dordick JS. & Bustos-Jaimes I. (2012). *Human Parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability*. Biochimie 94, 870–878.
- 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. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.02.024.
- Santi L, Huang Z, Mason H. (2006) *Virus-like particles production in green plants*. Methods; 40: 66-76.
- Santillán-Uribe H. C., (2012). *Estudio de la enantioselectividad hidrolítica de la lipasa de Bacillus pumilus*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schmidt C.W. (2010) *La biología sintética. Las implicaciones de un nuevo campo para la salud ambiental*. Environmental Health Perspectives. Noticias de Salud Ambiental. Salud Pública de México. Vol. 52. No.3. A118-A123.
- Schneemann A, Young MJ. (2003) *Viral assembly using heterologous expression systems and cell extracts*. Adv Protein Chem; 64: 1-36.
- Walker M.C., Thuronyi B.W., Charkoudian L.K., Lowry B., Khosla C., Chang M.C.Y. (2013). *Expanding the fluorine chemistry of living systems using engineered polyketide synthase pathways*. Science;341:1089–1094. [PubMed]Exploiting the natural modularity of natural product biosynthesis for the creation of a library of new chemicals.
- Yildiz, I., Shukla, S., & Steinmetz, N. F. (2011). *Applications of viral nanoparticles in medicine*. Current Opinion in Biotechnology, 22(6), 901–908. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.020>
- Zentella Dehesa A y Alcántara Hernández R., (2003). *Importancia de los dominios de interacción proteica en la formación de complejos en los sistemas de transducción*. Revista de Educación Bioquímica. 22(3): 117-129