



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Presentación del péptido SpyTag sobre la
superficie de partículas tipo virus como un
sistema de acoplamiento de proteínas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS FRANCISCO COFFEEN CRUZ

TUTOR:

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Coffeen
Cruz
Carlos Francisco
5535047564
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311095317
2. Datos del tutor
Dr.
Ismael
Bustos
Jaimes
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Georgina Regina
Garza Ramos
Martínez
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Alejandro Daniel
Fernandez
Velasco
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Saúl
Gómez
Manzo
7. Datos del trabajo escrito
Presentación del péptido SpyTag sobre la superficie
de partículas tipo virus como un sistema de
acoplamiento de proteínas
60 p
2018



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



AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Ismael Bustos por ser un excelente tutor, le agradezco mucho el apoyo, la confianza y la libertad que me dio para trabajar en el laboratorio. Así como también por todas las cosas que aprendí durante este proyecto.
- A los doctores que integran el laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, por darme su apoyo y asesoramiento en cualquier duda que tuviera. De igual manera, por siempre estar al pendiente de que hubiera un ambiente de trabajo agradable en el laboratorio.
- A los doctores que formaron parte de mi jurado: Dra. Georgina Garza, Dr. Alejandro Fernández, Dra. Laura Kawasaki y Dr. Saúl Gómez, por sus comentarios y sugerencias que permitieron desarrollar de una mejor manera este trabajo.
- A la Dra. Maribel Cayetano por la gran ayuda y asesoramiento que me brindó a lo largo de todo este trabajo. Le agradezco el haberme enseñando las técnicas necesarias para poder desempeñarme de la mejor manera en el proyecto.
- A todos mis compañeros del laboratorio que hicieron mi estancia más agradable y me brindaron sus consejos y recomendaciones en todo momento.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por haberme dado la oportunidad de aprender y de vivir esta experiencia única.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A mis padres quienes siempre me dieron su cariño y apoyo incondicional. Gracias por su confianza y por siempre creer en mí, porque esto me ha permitido explorar y aventurarme para cumplir mis metas.
- A mis hermanas Karla y Lilian por ser como una guía para mí y siempre estar en las buenas y en las malas. Gracias por demostrarme todo ese cariño, así como por apoyarme en cada instante.
- A mis amigos Adrián, Ana, Carla, Coral, Damián, Diego, Lucero Mariana y Rodrigo y a los demás Magnolios; por haber hecho de estos cuatro años uno de los mejores momentos de mi vida.
- A mis compañeros del grupo de investigación de VLPs: Brayan, Carla, Erik, Fabián, Hugo, Iris, Jorge, Maribel, Oscar y Sac por los buenos y malos momentos que compartimos en el laboratorio. Y por la ayuda que siempre me brindaron en los momentos que la necesitaba.
- A Karla Torres, por el amor y la inspiración que me diste para conseguir muchas de mis metas. Gracias por ser una pieza clave en mi vida.
- A Santiago, por todos los buenos momentos, las experiencias y las aventuras que pasamos en la carrera. Gracias por tu confianza y amistad.
- Finalmente un agradecimiento general a todos mis amigos, dentro y fuera de la carrera. No quiero omitir a nadie, así que muchas gracias a todos los que me han demostrado que puedo contar con ellos; gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado y por el apoyo que me han dado.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. JUSTIFICACIÓN.....	28
3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVOS.....	29
• Objetivo general.....	29
• Objetivos parciales.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
• Esquema general de trabajo	30
• Materiales	31
• Diseño y creación de la proteína quimérica VP2-Spytag.....	34
• Obtención de células transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	40
• Sobreexpresión de la proteína recombinante VP2-Spytag.....	42
• Obtención de la proteína VP2-SpyTag en cuerpos de inclusión.....	42
• Purificación de la proteína recombinante VP2-SpyTag.....	43
• Ensamble y caracterización de VLPs (VP2-Spytag) mediante DLS.....	45
• Reacción de acoplamiento entre VLPs (VP2-Spytag) y la proteína quimérica SpyCatcher- α - glucosidasa.....	45
• Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular.....	46
• Caracterización de la interacción entre las VLPs (VP2-Spytag) y la proteína quimérica SpyCatcher- α -glucosidasa.....	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
• Diseño y construcción de la proteína quimérica VP2-Spytag.....	48
• Obtención de células transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	48
• Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante VP2-Spytag.....	51
• Ensamble y caracterización de VLPs (VP2-Spytag) mediante DLS.....	52
• Acoplamiento entre VLPs (VP2-SpyTag) y la proteína quimérica SpyCatcher- α - glucosidasa.....	53
7. CONCLUSIONES GENERALES.....	57
8. CONCLUSIONES PARCIALES.....	57
9. PERSPECTIVAS.....	58
10. REFERENCIAS.....	59
11. ANEXOS.....	64

RESUMEN

Uno de los campos de investigación que más ha crecido en las últimas décadas son los trabajos con las partículas tipo virus, o VLPs por sus siglas en inglés, las cuales han generado gran interés debido al éxito que tienen los virus como vectores de entrega de material genético a otros organismos. Las VLPs son estructuralmente idénticas a un virus infeccioso. Se diferencian por ser estructuras huecas, las cuales solo están conformadas por las proteínas de la cápside, pero no contienen el material genético del virus. Desde el punto de vista de la biología sintética, las VLPs se consideran como nanocontenedores con capacidad para encapsular biomoléculas o nanomateriales sintéticos. Es así que los virus se utilizan como moldes para el diseño y la fabricación de nanopartículas funcionales, las cuales, al tener como base esta estructura viral diseñada y perfeccionada por procesos evolutivos, presentan características robustas, que de otro modo serían difíciles de obtener en construcciones sintéticas.

Uno de los virus utilizados frecuentemente para la experimentación con sistemas basados en VLPs, es el eritroparvovirus B19, el cual, al ser un virus de interés clínico, ha sido bastante estudiado. Su cápside tiene una estructura icosaédrica formada por 60 subunidades, de las cuales el 95% corresponde a la proteína viral 2 (VP2; 58 kDa), mientras que el 5% restante corresponde a la proteína viral 1 (VP1; 83 kDa). Al igual que en otros representantes de la familia Parvovirinae, la proteína VP1 consiste de la secuencia completa de VP2 más una región adicional en su extremo amino terminal, conocida como región única, la cual tiene 227 aminoácidos. Esta región única, al igual que el extremo amino terminal de la proteína VP2, puede estar expuesta en la superficie de las VLPs dando lugar a la presentación de moléculas heterólogas en su superficie. Esta estrategia de presentación de proteínas en la superficie de las VLPs está limitada por la capacidad de dichas moléculas de coplegarse con la proteína VP2 y retener su capacidad de autoensamble en VLPs. En algunos casos se han utilizado interacciones no covalentes para lograr la conjugación de elementos heterólogos con las VLPs. Sin embargo, esta estrategia tiene sus propias limitaciones fisicoquímicas, como son la constante de disociación de estos elementos al equilibrio y cómo se comportarían de forma dinámica en un sistema natural.

La finalidad de este proyecto es diseñar una cápside derivada del eritroparvovirus B19, a la cual se le puedan unir otras proteínas de manera covalente, específica y con una interacción que se pueda dar en un amplio intervalo de condiciones. En estudios previos se ha observado que la fusión genética de un péptido a la proteína VP2 tiene la ventaja de no de alterar de manera significativa la función y la estructura de esta. Es así que el sistema de interacción SpyTag-SpyCatcher representa una excelente herramienta para la funcionalización de las VLPs. Este sistema está compuesto por un péptido corto (SpyTag), el cual forma un enlace isopeptídico al encontrarse con su proteína complementaria (SpyCatcher). Este sistema de interacción péptido-proteína es una herramienta simple y poderosa para la bioconjugación y la extensión de las aplicaciones que se le puedan dar a las VLPs. En este trabajo, se fusionó el péptido SpyTag al extremo N-terminal de la proteína VP2 y se estudió la competencia de esta proteína para ensamblar VLPs, así como la competencia del SpyTag para acoplarse a su contraparte, el SpyCatcher.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La biología sintética y los virus

En los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas en las áreas de la biología sintética y la nanobiotecnología han permitido generar grandes avances en otras áreas de investigación científica, ya que estas se han visto como herramientas versátiles que nos permiten afrontar las problemáticas actuales de una mejor manera. Por un lado tenemos a la biología sintética, que se enfoca en el diseño y construcción de nuevas biomoléculas, como enzimas, material genético, células o el rediseño de sistemas biológicos ya existentes (Keasling, 2005); por otro lado, la nanobiotecnología funciona como un complemento de la biología sintética, el cual nos permite experimentar y aplicar estos sistemas o estructuras de escala nanométrica en campos como la medicina, la química, la biología e incluso la industria (Maine et al., 2014).

Lo que distingue a estas áreas de investigación de las demás, es que se enfocan en el diseño y construcción de nuevos componentes centrales (DNA, RNA o proteínas) a partir de sistemas biológicos preexistentes, los cuales pueden ser modelados, comprendidos y diseñados para ajustarse a un criterio de funcionamiento específico. Esto, a su vez, permite el ensamblaje de componentes pequeños en sistemas integrados de mayor tamaño y complejidad que ayuden a resolver problemas específicos. Desafortunadamente, al provenir de sistemas biológicos, tenemos la complicación de que estos no tienen un comportamiento lineal y son poco predecibles. Por esta razón, se sigue buscando comprender de mejor forma las interacciones de todas sus partes en sistemas interconectados de mayor complejidad. En consecuencia, es necesario organizar la enorme cantidad de detalles físicos, químicos y biológicos a través de un conjunto de reglas de diseño que regulen la información y ayuden a controlar la complejidad de los sistemas (Keasling, 2005).

Los virus son un modelo de estudio que ha generado un creciente interés para estas áreas en los últimos años. Esto tiene que ver tanto con sus implicaciones patogénicas como con sus posibles aplicaciones a otros campos de la ciencia. En investigaciones recientes, se ha observado que las cápsides virales se pueden utilizar para varios fines. Por ejemplo, la producción de nuevas vacunas más eficientes, el diseño de nanoacarreadores tejido-específicos, e incluso para la formación de nanobloques direccionales que sirvan para la construcción de nuevos nanomateriales. Igualmente, los virus pueden ser usados como plataformas programables que, a través del diseño de proteínas y la ingeniería genética, puedan desempeñar alguna función nueva (Wang et al., 2002; Douglas et al., 2002; Zeltins, 2012). La versatilidad de estos sistemas se debe, en parte, a que las cápsides virales tienen una amplia variedad de tamaños y formas, que permiten utilizarlas en función de los requerimientos específicos de cada proyecto.

Es así que, para poder trabajar con virus, debemos entender sus estructuras proteicas y las características de cada una de estas. Los virus pueden ser vistos como ensamblajes supramoleculares, formados a partir de una cubierta proteica o cápside que contiene en su interior el genoma viral. A partir del punto anterior, los virus se comienzan a diferenciar entre sí por variaciones en la estructura de sus cápsides y por el material genético que contienen, el cual puede ser DNA o RNA de cadena sencilla o doble. En algunos casos se ha visto que el tamaño y la estructura de la cápside está en función de la longitud del genoma que alberga (Lucas & Knipe, 2002).

La extensa variedad de cápsides virales que podemos encontrar, depende de la simetría que presentan sus capsómeros, los cuales son las unidades estructurales de las cápsides. Los capsómeros, a su vez, suelen estar conformados de varias subunidades proteicas que pueden ser idénticas o diferentes entre sí. Según los tipos de subunidades de las cuales está conformado un capsómero, se pueden obtener diferentes simetrías que dan lugar a los distintos tipos de cápsides (Prasad & Schmid, 2012).

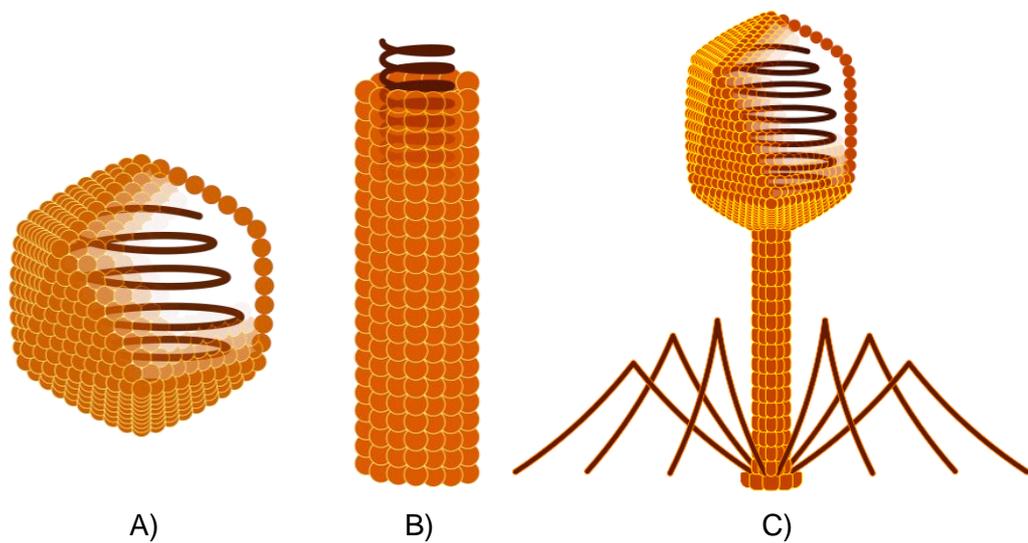


Figura 1. Tipos de cápsides virales. Cápside icosaédrica (A), cápside helicoidal (B) y cápside compleja (C). Imágenes modificadas a partir del trabajo de Anderson Brito. La imagen modificada está registrada bajo una licencia CC BY-SA 3.0.

Uno de los tipos de cápsides que podemos encontrar son las que presentan simetría helicoidal (Figura 1B), en ellas, los capsómeros se unen alrededor de un eje central y forman una estructura con forma de varilla. Como ejemplo tenemos a las familias Rhabdovirus (Ge et al., 2010) y Tobamovirus; estos últimos se conocen como virus del mosaico del tabaco y en ellos se ha observado la presencia de un genoma ordenado a lo largo de la cápside, el cual se guía por la forma helicoidal de esta (Namba & Stubbs, 1986). Es interesante hacer notar que el tamaño de esta clase de virus suele estar relacionado directamente con la longitud total de su genoma.

Otro tipo de cápsides que podemos encontrar son las icosaédricas (Figura 1A), las cuales suelen ser más complejas que las helicoidales y tienen más variantes. Los virus que presentan esta estructura, deben tener obligatoriamente una simetría del tipo 5-3-2, la cual hace referencia a los ejes de simetría que se requieren para formar la cápside (Figura 2). Por lo tanto, un ensamblaje de este tipo consta de 12 vértices de simetría rotacional pentavalente, 20 caras triangulares con una simetría trilateral y 30 bordes con simetría bilateral. A grandes rasgos, estos virus tienen forma esférica que varía en tamaño según el número y el tipo de subunidades que

los conforman; por cuestiones estructurales el número mínimo de subunidades que puede tener un virus icosaédrico es de 60. A pesar de lo anterior, se sabe que existen otros virus (Figura 1C) con estructuras de mayor complejidad que presentan más de 60 subunidades y que para poder alcanzar su estructura icosaédrica, suelen tener genes extra en su genoma para proteínas estructurales de andamiaje o accesorias (Prasad & Schmid, 2012).

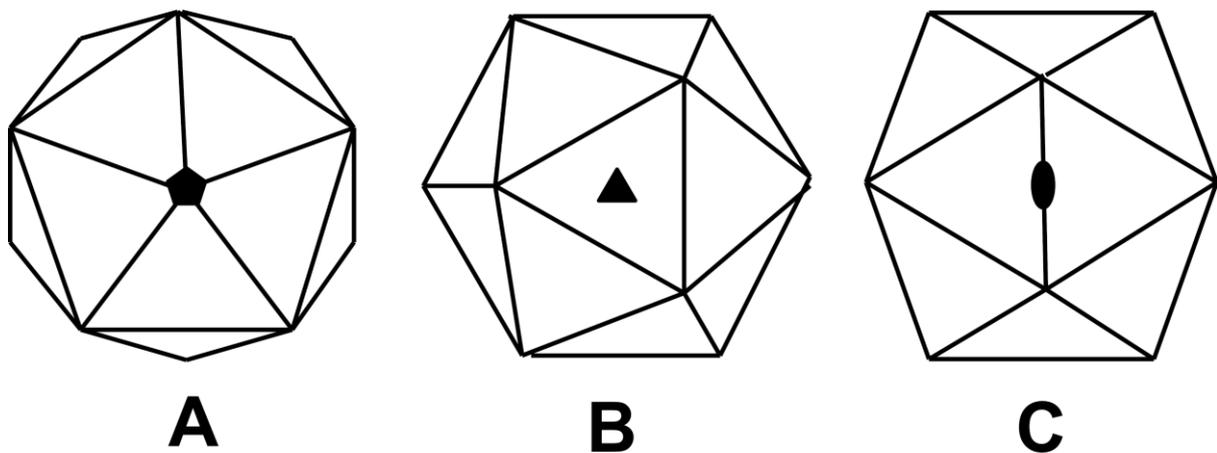


Figura 2. Ejes de simetría de un virus icosaédrico. Los ejes de simetría pentavalente (A), trilateral (B) y bilateral (C) se muestran en cada cápside respectivamente (Prasad & Schmid, 2012).

Además de los tipos de cápsides ya mencionados, también podemos encontrar virus que presentan una membrana lipídica en su superficie, la cual se conoce como envoltura viral y es obtenida de las células que estos invaden. Este tipo de virus tienen la capacidad de infectar a las células de una forma más eficiente que otros, ya que puede fusionar su membrana con la del hospedero y de esta forma entrar sin ningún problema (Lucas & Knipe, 2002). Lo anterior es logrado gracias a glicoproteínas en su envoltura, las cuales presentan dominios de unión específicos a receptores celulares determinados de algún tipo de tejido. Esto ayuda a desestabilizar la membrana de hospedero y a introducir su material genético. Estos virus pueden ser tanto helicoidales como icosaédricos (Cosset & Lavillette, 2011).

De lo anterior, podemos hacernos una idea de la gran variedad de virus que se pueden encontrar y utilizar para experimentación. Sin embargo, en el ámbito de la nanobiotecnología se suele trabajar con virus sin envoltura viral o “desnudos”, los cuales son más fáciles de manejar ya que su producción a través de sistemas heterólogos suele ser más sencilla. De otra forma, si la estructura presenta una membrana lipídica, el ensamble y desensamble de la cápside viral suele presentar limitantes y complicaciones para su manejo.

1.2 Las VLPs y sus principales aplicaciones

Uno de los campos de investigación que más ha crecido en las últimas décadas son los trabajos con las partículas tipo virus, o VLPs por sus siglas en inglés, las cuales han generado interés debido al éxito que tienen los virus como vectores de entrega de material genético a otros organismos. Estas estructuras, idénticas a un virus infeccioso, se diferencian por ser estructuras huecas, las cuales solo están conformadas por la cápside, pero no contienen el material genético del virus (Zeltins, 2012). Esto los vuelve un modelo seguro y práctico para la investigación ya que no se requieren las mismas medidas de bioseguridad que requiere un laboratorio que trabaja virus con potencial patogénico.

Debido al gran parecido de las VLPs con los virus nativos, y a que estas no poseen características de autorreplicación, en investigaciones actuales se han observado buenos resultados en el desarrollo de vacunas en base a VLPs. Estas vacunas han presentado mejores resultados que aquellas compuestas por subunidades proteicas recombinantes. Las cuales suelen generar una mala inmunogenicidad, debido al plegamiento incorrecto de la proteína, o a una presentación deficiente de ésta al sistema inmune. En contraste, las vacunas en base a VLPs suelen ser potentes inmunógenos, ya que contienen una superficie de arreglos proteicos repetitivos correctamente plegados y presentan estructuras conformacionales muy similares a los virus nativos (Liu et al., 2012). En varios estudios se ha demostrado que estas vacunas generan una alta respuesta humoral e inmune mediada por la activación de células B, así como también causan una mayor producción de anticuerpos, todo esto sin la necesidad de adicionar adyuvantes inmunológicos a la vacuna (Storni et al., 2002; Liu et al., 2012).

Además, las vacunas basadas en VLPs, como ya se mencionó anteriormente, no presentan peligro alguno para los animales o los seres humanos ya que no tienen material genético dentro de ellas y por tanto no tienen la capacidad de autorreplicarse e infectar a otras células.

Sin embargo, la aplicación de las VLPs no termina ahí. También se ha demostrado que funcionan como agentes efectivos para el transporte de DNA o RNA para procedimientos de terapia génica. La gran mayoría de las VLPs son capaces de almacenar y entregar material genético exógeno a células humanas, con lo cual se puede llegar a regular la expresión de un gen determinado como una forma de tratamiento más directo y eficiente para algunos tipos de enfermedades genéticas, incluso de otras enfermedades virales. Cabe recalcar que los virus nativos suelen tener tropismos sobre diferentes tipos de tejidos, los cuales no siempre son de interés para la terapia génica. Es así que, para poder ocupar uno de estos virus como vector de entrega, se tienen que realizar ciertas modificaciones en su estructura e incluso se llegan a ocupar sistemas de acoplamiento proteico anexos que permitan modificar su tropismo hacia el tipo de célula de interés (Chen et al., 2010; Deng et al., 2015; Hoffmann et al., 2016).

Es por esto que actualmente la terapia génica se enfoca más en las VLPs como vectores de entrega que en otros sistemas como son los liposomas sintéticos. Esto se debe a que, a pesar de que los liposomas y las VLPs presentan limitaciones, estas últimas tienen una mayor flexibilidad en su construcción y en su especificidad por tejidos. Las VLPs son susceptibles a modificaciones químicas en su estructura para mejorar su tropismo hacia un tejido específico, así como para reducir respuestas inmunológicas no deseadas después de un uso continuo como tratamiento, lo que les confiere una enorme ventaja sobre otros vectores (Seow & Wood, 2009).

Finalmente, tenemos que además de las aplicaciones anteriores, las VLPs también han funcionado como modelos para el diseño de nuevos nanomateriales de última generación. La fuerza y la selectividad de las interacciones proteína-proteína, los vuelven excelentes sistemas enlazantes entre nanopartículas y nanocables para generar estructuras más ordenadas y con la capacidad de tener distintas funciones.

Estos materiales biohíbridos pueden funcionar como biosensores, nanocircuitos, sistemas recolectores de luz e incluso nanobaterías. Uno de los nanomateriales en base a VLPs que más ha atraído la atención de los investigadores son los biosensores, los cuales se han desarrollado para la detección de DNA o de proteínas de interés médico. Estos han demostrado tener respuestas con especificidad y sensibilidad muy altas, además de actuar en tiempo real, lo cual los vuelve ideales para situaciones en donde una población esté bajo un riesgo crítico por alguna pandemia (Soto & Ratna, 2010).

Existen modelos de estructuras funcionalizadas tipo nanocable que presentan cambios en la conductancia de su superficie proteica, la cual está acoplada a sistemas de silicio dopados con boro (SiNWs por sus siglas en inglés), esto ha mostrado tener una detección ultrasensible de moléculas proteicas, DNA, e incluso del estímulo e inhibición de señales neuronales de forma muy eficiente (Wang et al., 2005; Patolsky et al., 2006). No es difícil pensar que estos modelos se pueden acoplar a VLPs del tipo helicoidal, las cuales a su vez proporcionen un tropismo específico mejorando el funcionamiento de estos sistemas para tratamientos más específicos.

Lamentablemente la producción de VLPs no es una tarea sencilla y suele tener bastantes desafíos a lo largo de su proceso de producción. Generalmente estas partículas son producidas a través de sistemas de expresión heterólogos, en los cuales a pesar de la alta eficiencia del proceso de autoensamblaje dentro de sistemas eucarióticos, tienen una alta probabilidad de incorporar elementos celulares no deseados dentro su interior. Esto puede causar inmunogenicidad e incrementar la variabilidad de cada lote de producción, por lo cual es necesaria la eliminación de posibles contaminantes para poder utilizarlos con fines biomédicos y biotecnológicos. Para esto se les debe dar un tratamiento post-expresión, en donde se desensamblan las VLP, para luego purificar a las proteínas estructurales del virus y finalmente reensamblar las partículas (Pattenden et al., 2005).

Estos pasos adicionales de desmontaje y reensamblaje también son necesarios si se busca encapsular una molécula de interés dentro de la cápside. Desafortunadamente esto limita la producción de diversas VLPs, ya que algunas

son difíciles de volver a ensamblar *in vitro*. Se ha observado que, en algunos casos, el proceso de reensamblaje *in vitro* de las cápsides a partir de sus capsómeros, puede favorecer un plegamiento incorrecto y la agregación de estos. Esto es debido a que no se cuenta con la ayuda de proteínas de andamiaje que favorezcan su correcto plegamiento, ya que únicamente se encuentran en los sistemas *in vivo* (Parent & Teschke, 2007).

1.3 Los parvovirus y el eritroparvovirus B19

A pesar de que los factores que afectan el ensamblaje de las VLPs pueden ser diferentes de un virus a otro, se ha observado que aquellos más simples, como los parvovirus, suelen ser más fáciles de manejar y de reensamblar para fines prácticos. Los virus que pertenecen a esta familia presentan cápsides icosaédricas muy pequeñas y relativamente simples, con DNA lineal de cadena sencilla, y sin envoltura lipídica, lo cual facilita su ensamble y desensamble en sistemas *in vitro* (Berns, 1990). Los parvovirus se clasifican en dos subfamilias: Parvovirinae, que infecta a vertebrados, y Densovirinae, que infecta a los artrópodos. Los miembros de la subfamilia Parvovirinae se dividen además en cinco géneros, cuatro de los cuales son autónomos (parvovirus, amdovirus, betaparvovirus y erytrovirus), es decir, se propagan en células infectadas sin un ayudante. El quinto género es dependovirus, que no puede completar su ciclo de replicación en ausencia de un virus auxiliar, generalmente adeno o herpes no relacionado (Kobiler et al., 2012).

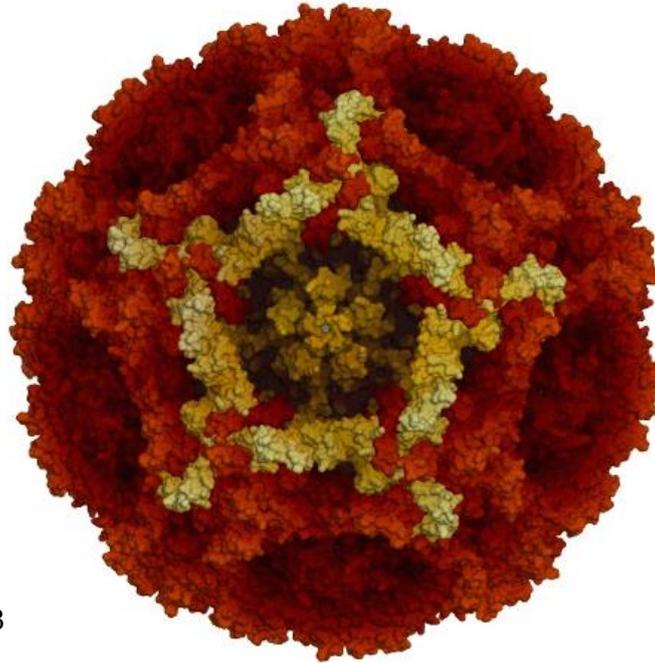
Los parvovirus autónomos son candidatos muy buenos para usarse en forma de VLP, ya que infectan a una gran variedad de mamíferos, entre ellos los humanos, por lo que también son de los parvovirus mejor caracterizados. Las cápsides de estos virus están compuestas por 2 proteínas: VP1 y VP2, las cuales tienen secuencias idénticas excepto por una secuencia adicional en el extremo amino terminal en VP1. En casos muy particulares, la proteína VP2 puede sufrir un corte cerca de su extremo amino terminal; esto lleva a la formación de la proteína VP3, la cual es necesaria para el ensamble final de la cápside (Agbandje et al., 1995; Rogo et al., 2014). Sin embargo, se ha demostrado que se pueden construir VLPs perfectamente funcionales únicamente con la proteína VP2 (Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Santillán-Urbe et al., 2015).

Otra ventaja de los parvovirus es el tamaño de sus cápsides, ya que al tener un diámetro de entre 20 y 26 nm pueden entrar hasta el núcleo celular a través de sus poros, los cuales permiten el paso de moléculas con un diámetro menor a 39 nm. De hecho, el nombre parvovirus es un neologismo formado por las palabras latinas *parvus* (pequeño) y *virus* (veneno). De esta manera, la entrega de su material genético es más directa y eficiente, siendo este un factor importante si se los quisiera utilizar como terapia génica. No obstante, se sabe que, para poder entrar al núcleo, las cápsides requieren de la secuencia adicional que tiene la proteína VP1, la cual se ha visto que es fundamental para este proceso (Kobiler et al., 2012).

El mecanismo de infección celular que tienen los parvovirus autónomos, es a través de endocitosis mediada por un receptor. Una vez internalizados, estos virus circulan a través del sistema endosomal/lisosomal. Al no tener una envoltura lipídica, su cápside no puede escapar del sistema endosomal mediante la fusión de membranas. En su lugar, los parvovirus tienen un dominio PLA2 en la secuencia adicional de la proteína VP1, el cual tiene actividad de fosfolipasa que permite el escape de las cápsides al citoplasma celular. La activación de esta fosfolipasa se da gracias al bajo pH endosomal, lo cual genera un cambio conformacional en la cápside que permite la salida del extremo amino terminal de la proteína VP1 (Farr et al., 2005; Mani et al., 2006). Una vez en el citoplasma, la secuencia adicional externalizada desempeña una segunda función ya que también cuenta con 4 motivos que funcionan como señales de localización nuclear. Estos motivos se unen a un adaptador nuclear (importina α) el cual a su vez se une con un segundo adaptador (importina β), lo cual desencadena la importación nuclear de sus cápsides (Lombardo et al, 2002; Harbison, et al 2008).

Uno de los parvovirus utilizados frecuentemente para la experimentación con sistemas basados en VLPs es el eritroparvovirus B19 (EB19), el cual, al ser un virus de interés clínico, ha sido muy estudiado. Su cápside tiene una estructura icosaédrica formada por 60 subunidades, de las cuales el 95% es la proteína viral 2 (VP2; 58 kDa) y el otro 5% es la proteína viral 1 (VP1; 83 kDa) (Fig. 3). Al igual que otros representantes de la familia Parvovirinae, su proteína VP1 consiste de la secuencia completa de VP2 más una región adicional en su extremo amino terminal, conocida como región única, la cual tiene 227 aminoácidos. A pesar de que la

proteína VP1 se encuentra en menor porcentaje en la cápside, su región única representa la parte inmunodominante del virus, ya que se ha visto que a largo plazo la respuesta inmune celular genera una gran cantidad de anticuerpos contra epítopes de esta región (Heegaard & Brown, 2002; Ozawa & Young, 1987; Rogo et al, 2014).



PDB – 1s58

Figura 3. Estructura del eritroparvovirus humano B19. En la imagen se muestra la conformación de un eje de simetría 5, el cual está compuesto por 5 capsómeros (marcados en color amarillo), los cuales a su vez están conformados por 3 subunidades de la proteína VP2.

La proteína VP2 del EB19 tiene una estructura de barril β antiparalelo, compuesta por ocho láminas conectadas por grandes asas que se proyectan en la superficie externa y de esta forma determinan su topografía y estructuras específicas en los ejes de simetría de 5, 3 y 2. En estudios previos se ha propuesto que al estar ensamblada la cápside del virión, es posible que el extremo amino terminal de la proteína VP2, quede expuesto en la superficie adyacente al poro que se forma en el eje de simetría de orden cinco (Figura 4). Esta posición simétrica de la proteína VP2, nos sugiere que es espacialmente posible que todos los extremos amino terminal en estas zonas, sean externalizados al mismo tiempo (Kaufmann et al., 2008).

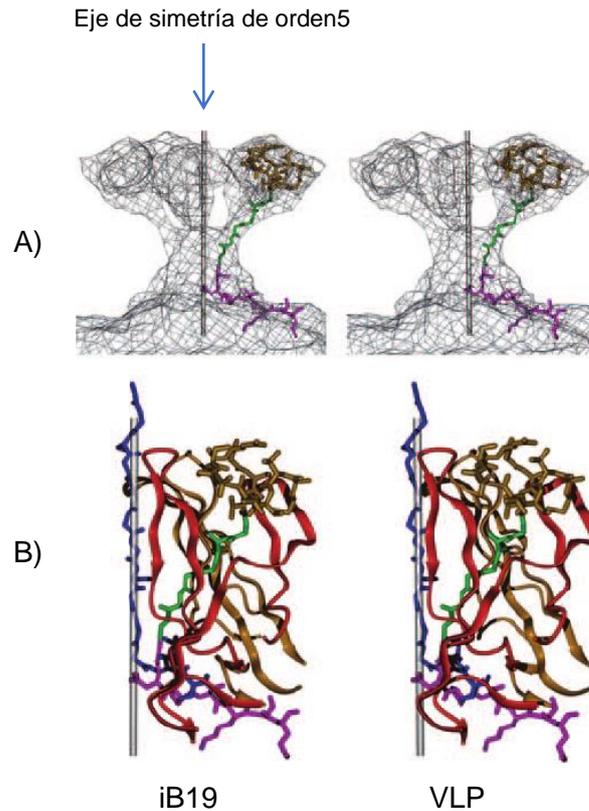


Figura 4. Diferencia en la externalización del extremo amino terminal entre un parvovirus B19 (iB19) y una VLP en base a VP2. A) Vista estereoscópica de las densidades diferenciales positivas encontradas cerca del eje de simetría de orden cinco. La densidad observada en las iB19 correspondería al extremo N-terminal de la proteína VP2, que en el virión quedarían proyectadas al exterior a través de un poro en este eje. B) Residuos 1 a 24 (verde/morado/café) del extremo N-terminal de VP2, ubicado entre dos moléculas de VP2 (oro y rojo). Los residuos 28 a 41 (azul) del N-terminal del virus diminuto del ratón (MMV) se muestran para comparación (Kaufmann et al., 2008).

Por otra parte, la región única de la proteína VP1, es fundamental para la internalización del EB19 a las células eritroides. Como ya se mencionó, en otros parvovirus estudiados se ha visto que el extremo amino terminal de la VP1 se encuentra al interior de la cápside y que la expansión de los poros en los ejes de simetría de orden cinco, facilitan la externalización de este; lo anterior se produce por el entorno endosomal acidificado durante el tráfico intracelular de la cápside (Farr et al., 2005; Harbison et al., 2008; Mani et al., 2006). Sin embargo, la literatura actual sugiere que la externalización del amino terminal de la VP1 de EB19 se da de

una forma muy diferente a la de otras especies. En un principio la cápside se une a un glicosfingolípido globósido (Gb4Cer), el cual se ha identificado como un receptor celular para EB19. Este receptor se une a la región formada por los aminoácidos 577 a 677, que están presentes en las proteínas de la cápside VP1 y VP2, lo cual genera un cambio conformacional en la cápside que permite la salida de la región única de la proteína VP1. Subsecuentemente se cree que la región conformada por los aminoácidos 5 a 80 en la región única, se unen a un co-receptor (la integrina $\alpha 5\beta 1$), el cual activa el proceso de endocitosis de la cápside (Bönsch et al, 2010; Leisi et al, 2013, 2016; Nasir et al, 2014; Rogo et al, 2014; Weigel-Kelley et al., 2003).

1.4 Funcionalización de las partículas tipo virus

Al tener como modelo a un virus con características adecuadas para la producción de VLPs y como un vector infeccioso eficiente, se pueden desarrollar nanopartículas funcionales basadas en estos sistemas. A excepción de los proyectos de producción de vacunas, en la mayoría de los casos, el primer aspecto a considerar es a dónde será dirigida la nanopartícula y qué función desempeñará en ese sitio. Para desarrollar y funcionalizar las nanopartículas basadas en virus (VNPs por sus siglas en inglés) existen dos opciones: elegir un virus que por su origen evolutivo esté diseñado para infectar el tejido de interés, lo cual puede agilizar enormemente el trabajo, pero puede a su vez tener la complicación de que ese virus en específico sea difícil de producir y de trabajar. Por otra parte, está la opción de elegir un virus con buenas características para infectar, que pueda producirse en sistemas *in vitro* y con el que sea más fácil de trabajar. Esta última opción, aunque suele ser más lenta y en algunos casos presenta otras complicaciones, permite obtener VNPs más dinámicas, las cuales una vez desarrolladas se pueden modificar con mayor facilidad para darles diversos usos (Cardinale et al., 2012; Ma et al., 2012; Pokorski & Steinmetz, 2010).

Desde el punto de vista de la biología sintética, las VLPs se consideran como nanocontenedores con capacidad para encapsular biomoléculas o nanomateriales sintéticos. Es así que los virus se utilizan como moldes para el diseño y la

fabricación de las VNPs, las cuales, al tener como base esta estructura viral diseñada y perfeccionada por procesos evolutivos, presentan características robustas que de otro modo serían difíciles de obtener en construcciones sintéticas. Su naturaleza, confiere a las VNPs propiedades de autoensamblaje, morfología predecible, poblaciones monodispersas, alta simetría y buena estabilidad en amplios intervalos de pH y temperatura. Aprovechando estas características únicas, las VNPs se pueden rediseñar para la fabricación de nanopartículas funcionalizadas más eficientes (Cardinale et al., 2012; Ma et al., 2012). Recientemente la atención se ha centrado en las técnicas empleadas para modificar la estructura proteica de la cápside y con esto a su vez modificar la función de la nanopartícula. Esto ha llevado al desarrollo de diferentes sistemas de interacción entre proteínas, los cuales permiten el acoplamiento de diversos nanomateriales (Mateu, 2011; Pokorski & Steinmetz, 2010; Smith et al., 2013).

Al principio, la funcionalización de las VLPs comenzó por técnicas químicas de bioconjugación, en donde gracias a los avances en la química de péptidos, se optó por tomar un enfoque covalente. Las reacciones más comunes para modificar a las proteínas virales involucran a las cadenas laterales que presentan residuos de lisina, cisteína, ácido glutámico, ácido aspártico y tirosina, los cuales proporcionan grupos reactivos que permiten formar enlaces covalentes biocompatibles. Estos residuos son accesibles a la química de la *N*-hidroxisuccinimida (NHS), a la adición de Michael a maleimidas, y la activación con carbodiimida. Con estas técnicas químicas de bioconjugación se pueden unir ácidos nucleicos, polímeros y pequeñas moléculas a las superficies internas y externas de las cápsides virales (Pokorski & Steinmetz, 2010; Sapsford et al., 2013; Smith et al., 2013).

La bioconjugación directa a residuos canónicos en su ubicación natural se ha demostrado con éxito en muchas VNPs. Sin embargo, las ubicaciones naturales de los residuos silvestres, pueden no satisfacer las necesidades de una aplicación en términos de densidad de residuos, accesibilidad superficial, ubicación terciaria y reactividad competitiva. A pesar de que esto representa una gran desventaja para la técnica, este problema se puede solucionar mediante la eliminación o la inserción genética de aminoácidos específicos en las ubicaciones deseadas (Smith et al., 2013). No obstante, el desarrollo de otras técnicas químicas ha permitido la

diversificación de la nanotecnología viral, ayudando a que ciertos componentes funcionales como fármacos, reactivos de direccionamiento y otras biomoléculas, se puedan adherir a la superficie de las VNPs. Esto nos sirve como un complemento para el desarrollo de dispositivos "inteligentes" para usos médicos e industriales (Sapsford et al., 2013).

Tiempo después, con los avances en las técnicas de biología molecular, la funcionalización de las VNPs se enfocó hacia la fusión genética de la proteína viral con otras proteínas de interés que le pudieran otorgar una función específica a la cápside. Esta técnica permitió construir nuevas proteínas mediante la inserción de la secuencia de un péptido o proteína heteróloga, en un asa o uno de los extremos amino o carboxilo terminales expuestos en alguna de las proteínas de la cápside, a través de ingeniería genética. Como resultado, se pueden obtener VNPs unidas de manera covalente a nuevos péptidos o proteínas, y sin las complicaciones e incluso limitaciones que llega a presentar la bioconjugación química. Estas nuevas proteínas creadas mediante el diseño genético se conocen como quimeras proteicas, debido a que surgen de la unión de dos proteínas preexistentes que ya tienen una función por separado (Brune et al., 2016; Mateu, 2011 y 2016).

La fusión genética si bien ha tenido tanto o más éxito que la bioconjugación química, sigue siendo un enfoque de prueba y error que consume mucho tiempo para poder llegar a un resultado aplicable. A pesar de ser una técnica muy eficiente sigue teniendo varios problemas ya que, en la mayoría de los casos, cuando se fusiona directamente la cápside a otras proteínas puede haber un mal plegamiento de la proteína heteróloga o de la proteína de la cápside. Este plegamiento erróneo afecta el ensamblaje o la estabilidad de la VNP, así como también puede causar una conformación no nativa de la proteína unida, de modo que su actividad es reducida o simplemente desaparece. Otro desafío importante con la fusión genética, es que una o ambas proteínas pueden tener diferentes modificaciones postraduccionales, por lo que el huésped óptimo para la expresión de cada una será diferente (bacteria, levadura, línea celular de mamífero o planta); esto terminará causando que una de las proteínas no tenga un plegamiento correcto y por lo tanto se pierda su actividad (Brune et al., 2016; Mateu, 2016). En otros casos también sucede que, por las condiciones de producción y purificación de la proteína viral, se compromete el

plegamiento de la proteína a la cual está unida, lo cual lleva en algunas ocasiones a que esta termine perdiendo completamente su actividad (Bustos-Jaimes et al., 2017).

Finalmente, se ha observado en algunos casos que, al unir directamente una proteína viral con otra proteína, se puede favorecer la agregación de esta quimera. Esto lleva a una producción complicada y a un rendimiento muy bajo que termina por volver poco viable el proyecto. Por lo tanto, se ha encontrado que la funcionalización de las VNPs a través de la fusión genética es más exitosa cuando se utilizan pequeños péptidos, con el fin de evitar interacciones perjudiciales que puedan afectar la función deseada que se le quiera dar. Actualmente se ha demostrado que en algunos casos es preferible, e incluso necesario, expresar por separado la VLP y la proteína de interés, para que posteriormente, ambas proteínas se unan entre sí mediante algún sistema de interacción (Brune et al., 2016).

1.5 Sistema de interacción SpyTag-SpyCatcher

Actualmente, una de las opciones más eficientes para extender las posibles aplicaciones de una proteína, es mediante la adición de etiquetas de péptidos. La fusión genética de un péptido con una proteína de interés suele permitir una purificación, detección e inmovilización más eficiente. Por otro lado, tienen la ventaja de que se pueden unir a regiones sitio específicas de la proteína de interés de forma precisa y sin mucha complicación. Además, debido a su tamaño reducido, es muy difícil que afecten de alguna manera la función o la estructura de la proteína adjunta (Veggiani et al., 2014). Desafortunadamente el repertorio de péptidos como una herramienta para unir proteínas no es muy amplio, y si bien existen varios sistemas ya desarrollados como las inteínas o el "dock and lock", que permiten cumplir con esta función, suelen tener interacciones no muy estables que pueden perderse en sistemas *in vivo* (Chang et al., 2007; Rossi et al., 2012; Shah & Muir, 2014).

No obstante, el continuo desarrollo de nuevas tecnologías para la ingeniería de proteínas ha generado una gran variedad de moléculas que pueden ser diseñadas y producidas para aplicaciones en las áreas de la biología sintética y la

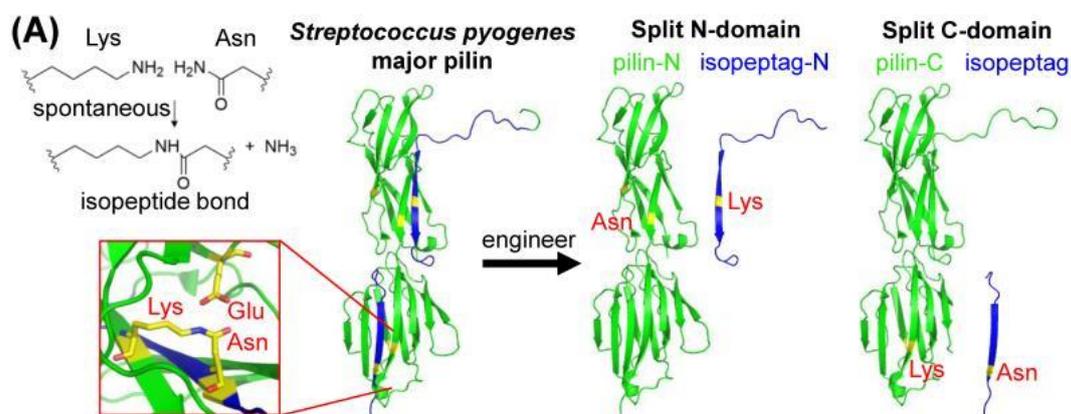
nanobiotecnología. Un factor esencial para estos avances radica en que muchas proteínas naturales tienen sus propiedades funcionales ubicadas en dominios discretos, que pueden ser manipulados como módulos moleculares, y explotados como bloques de construcción para el diseño de estructuras artificiales con funciones múltiples.

Este es el caso del sistema de interacción para proteínas SpyTag-SpyCatcher, el cual surgió a partir de la búsqueda de un sistema de interacción que formara enlaces isopeptídicos que confirieran una mayor estabilidad. Un enlace isopeptídico es aquel que se da entre las cadenas laterales de los aminoácidos y nos genera un enlace amida; este se forma entre el grupo amino de una lisina y el grupo carboxilo de un glutamato o aspartato. El origen de este sistema comenzó varios años atrás, al descubrir que algunas bacterias Gram positivas, al igual que las Gram negativas, tienen pili en su membrana celular. Estos pili, a diferencia de los que presentan las bacterias Gram negativas, están formados por subunidades proteicas que se unen de forma covalente. Así mismo, se descubrió que los isopeptidos intramoleculares presentes en estas estructuras les confieren una mayor estabilidad proteolítica, térmica y de pH (Reddington & Howarth 2015; Telford et al., 2006). Posteriormente se descubrió que, en la subunidad mayor de la proteína pilina de *Streptococcus pyogenes*, estos enlaces isopeptídicos se daban de forma espontánea, lo cual representaba una nueva ventana de oportunidades para el desarrollo de sistemas de unión entre proteínas (Kang et al., 2007).

A partir de este punto, se comenzaron a desarrollar complejos péptido-proteína que pudieran reconstituirse espontáneamente y formar un enlace isopeptídico. Las primeras pruebas comenzaron dividiendo un fragmento de alguno de los dos dominios (N o C) de la subunidad mayor de la pilina de *S. pyogenes*. Para poder llevar a cabo este enlace isopeptídico espontáneo, se requiere de una triada catalítica (Asp, Glu y Lys), la cual debe estar presente entre el fragmento que se cortó y la subunidad restante (Figura 5A) (Zakeri et al., 2012). Una vez que se supo que este sistema funcionaba, se desarrolló una versión más pequeña y rápida, la cual surgió a partir del dominio CnaB2 de la proteína de unión a fibronectina FbaB, de *S. pyogenes* (Figura 5B). Este dominio inicialmente se dividió en un complejo de péptido-proteína, el cual fue modificado mediante la eliminación de residuos

hidrófobos expuestos en su superficie, y a su vez, se mejoró la interacción en la interfaz de unión. Con esto se obtuvo el complejo de interacción SpyTag (compuesto por 13 aminoácidos) y SpyCatcher (compuesto por 116 aminoácidos), el cual demostró tener una rápida tasa de reconstitución (Figura 5C) (Reddington & Howarth 2015; Veggiani et al., 2014).

Este nuevo sistema realmente presenta varias ventajas en comparación a otros sistemas de interacción entre proteínas, ya que sigue reaccionando entre sí de manera eficiente con varios valores de pH (5-8), con diferentes soluciones amortiguadoras, a diferentes temperaturas (4 a 37 °C) e incluso al estar en contacto con detergentes no iónicos. Este sistema no contiene residuos de cisteínas en ninguna de sus estructuras, por lo que es difícil que pueda tener algún problema de plegamiento al momento de su producción, y así mismo se evita que pueda interactuar y comprometer la estabilidad de la proteína adjunta a la que esté unida. En función de lo anterior y del amplio rango de valores de pH sobre los cuales puede reaccionar el sistema, facilita su uso en el citosol, el núcleo, fuera de la célula, pero también en el pH bajo de los endosomas y lisosomas. Es así que la reconstitución tiene una buena especificidad en *E. coli* y células de mamíferos, lo que permite el acoplamiento de proteínas de manera intracelular y extracelular (Reddington & Howarth 2015; Zakeri et al., 2012).



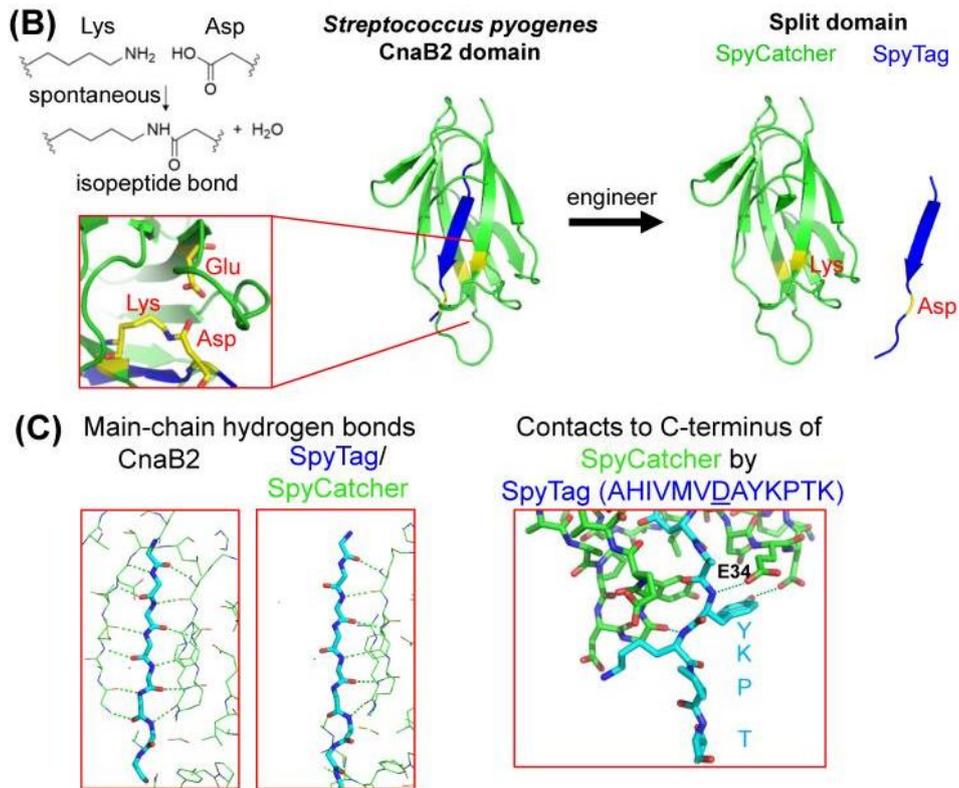


Figura 5. Proceso de construcción del sistema de interacción SpyTag-SpyCatcher. A) Primeras pruebas de interacción con la subunidad mayor de la pilina de *S. pyogenes*. B) Desarrollo de un sistema más pequeño y rápido (SpyTag-SpyCatcher), a partir del dominio CnaB2 de la proteína de unión a fibronectina FbaB, de *S. pyogenes*. C) Análisis cristalográfico donde se compara la estructura del sistema SpyTag-SpyCatcher con el dominio parental (Imagen tomada de Veggiani et al., 2014).

Finalmente, la robustez que presenta el sistema en cuanto a la formación espontánea de enlaces isopeptídicos en diversas condiciones, se debe a que el acoplamiento del péptido y la proteína asociada crea un microambiente aislado de la superficie. Por medio del análisis cristalográfico del sistema SpyTag/ SpyCatcher, se sabe que la proteína reconstituida tiene regiones adicionales de flexibilidad en comparación con el dominio parental, así como patrones de enlaces de hidrógeno generados en parte por la mutación que se le realizó al SpyCatcher (Figura 5C). Lo anterior se cree que influyó en la facilidad de acoplamiento y en la unión más rápida de este sistema (Li et al., 2014).

Por todo lo anterior, podemos ver que el sistema de interacción SpyTag-SpyCatcher representa una herramienta excelente para la funcionalización de las VLPs, ya que

es capaz de reconocerse con alta especificidad y posteriormente formar el mismo enlace isopeptídico, haciendo posible la unión irreversible en condiciones biológicas. Este sistema además presenta otras ventajas, ya que la interacción se da en un amplio rango de condiciones y únicamente requiere adicionar una etiqueta (*tag*) peptídica a la proteína viral, lo cual generalmente no afecta su estructura y estabilidad.

En este proyecto, deseamos acoplar una quimera de la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (desarrollada previamente en el laboratorio) en la superficie de VLPs de EB19 ensambladas *in vitro*. En trabajos anteriores del laboratorio (Soto, 2017), se descubrió que esta enzima es capaz de degradar glucógeno y almidón, lo cual nos lleva a pensar que presenta una actividad catalítica muy similar a la α -glucosidasa humana. Esto la vuelve un buen candidato para tratamiento de reemplazo enzimático en humanos con enfermedades lisosomales relacionadas con la ausencia de esta enzima, ya que su producción en sistemas heterólogos es más fácil y eficiente que el de la enzima humana. Las enfermedades de almacenamiento lisosomal, son enfermedades metabólicas hereditarias, que se caracterizan por una acumulación anormal de diversos compuestos en las células del cuerpo como resultado de deficiencias enzimáticas. En el caso particular de la enfermedad de Pompe, los individuos que la presentan tienen una α -glucosidasa mutada que no tiene actividad catalítica, por lo cual el glucógeno de sus células comienza a acumularse. Esto lleva a problemas relacionados con debilidad muscular progresiva, tono muscular disminuido (hipotonía) y un tipo de enfermedad cardíaca conocida como miocardiopatía hipertrófica (Clarke, 2006; Leslie & Bailey, 2007). Por lo cual, al desarrollar VLPs funcionalizadas con esta enzima, se podría desarrollar en un futuro un tratamiento dirigido y con mayor eficiencia para tratar esta enfermedad.

2. Justificación

La presentación de proteínas en la superficie de partículas tipo virus (VLPs) es un proceso que permite la inclusión de las propiedades de las proteínas presentadas a un sistema polivalente como son las cápsides virales. Esto convierte a las VLPs en potenciales vacunas y acarreadores de actividades enzimáticas con fines biomédicos y biotecnológicos. Sin embargo, el acoplamiento de las proteínas en cuestión implica, en algunos casos, condiciones de reacción y/o plegamiento incompatibles con la formación de la estructura biológica activa. Por esta razón, en estos casos es necesario obtener las VLPs por un método diferente a la proteína que se desea presentar en su superficie. Existen diversos sistemas de acoplamiento entre proteínas que permiten la conjugación de funciones biológicas en una sola estructura. Sin embargo, la gran mayoría están limitados por tener interacciones débiles y en algunos casos afectan la estabilidad estructural de sus componentes proteicos. Recientemente se ha descrito la formación de enlaces isopeptídicos intermoleculares en una proteína adhesina de *Streptococcus pyogenes*. Dicha proteína ha sido modificada por ingeniería genética para convertirla en dos fragmentos que conservan la capacidad de formar dicho enlace sin estar covalentemente unidas. A dicho sistema se le ha denominado SpyTag/SpyCatcher, que es capaz de reconocerse con alta especificidad y posteriormente formar el mismo enlace isopeptídico, haciendo la unión irreversible en condiciones biológicas.

En el caso particular de nuestro proyecto, deseamos acoplar la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en la superficie de VLPs de EB19 ensambladas *in vitro*. El ensamble de las partículas virales implica pasos de desnaturalización de proteína que resultan irreversibles para la enzima de *S. cerevisiae*. Por este motivo proponemos fusionar la α -glucosidasa con el fragmento SpyCatcher, y por otro lado fusionar el fragmento SpyTag con la proteína VP2 de parvovirus B19. La fusión de SpyTag-VP2 no debería causar problemas de plegamiento ya que el SpyTag es muy pequeño (13 residuos). Por otro lado, el SpyCatcher, que es de mayor tamaño (116 residuos), presenta estructura terciaria que se puede formar en *E. coli*. La expresión de la quimera SpyCatcher- α -glucosidasa en *E. coli* genera una enzima activa que debería ser capaz de interactuar con el SpyTag presentado en la superficie de las VLPs del EB19 ensambladas *in vitro*.

3. HIPÓTESIS

Al acoplar el péptido SpyTag en el extremo amino terminal de la proteína VP2 del parvovirus B19, se obtendrá una proteína quimérica capaz de participar en el ensamble de VLPs. Estas partículas presentarán el péptido SpyTag en la superficie y serán capaces de reaccionar con una quimera formada por la enzima α -glucosidasa y la proteína SpyCatcher.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

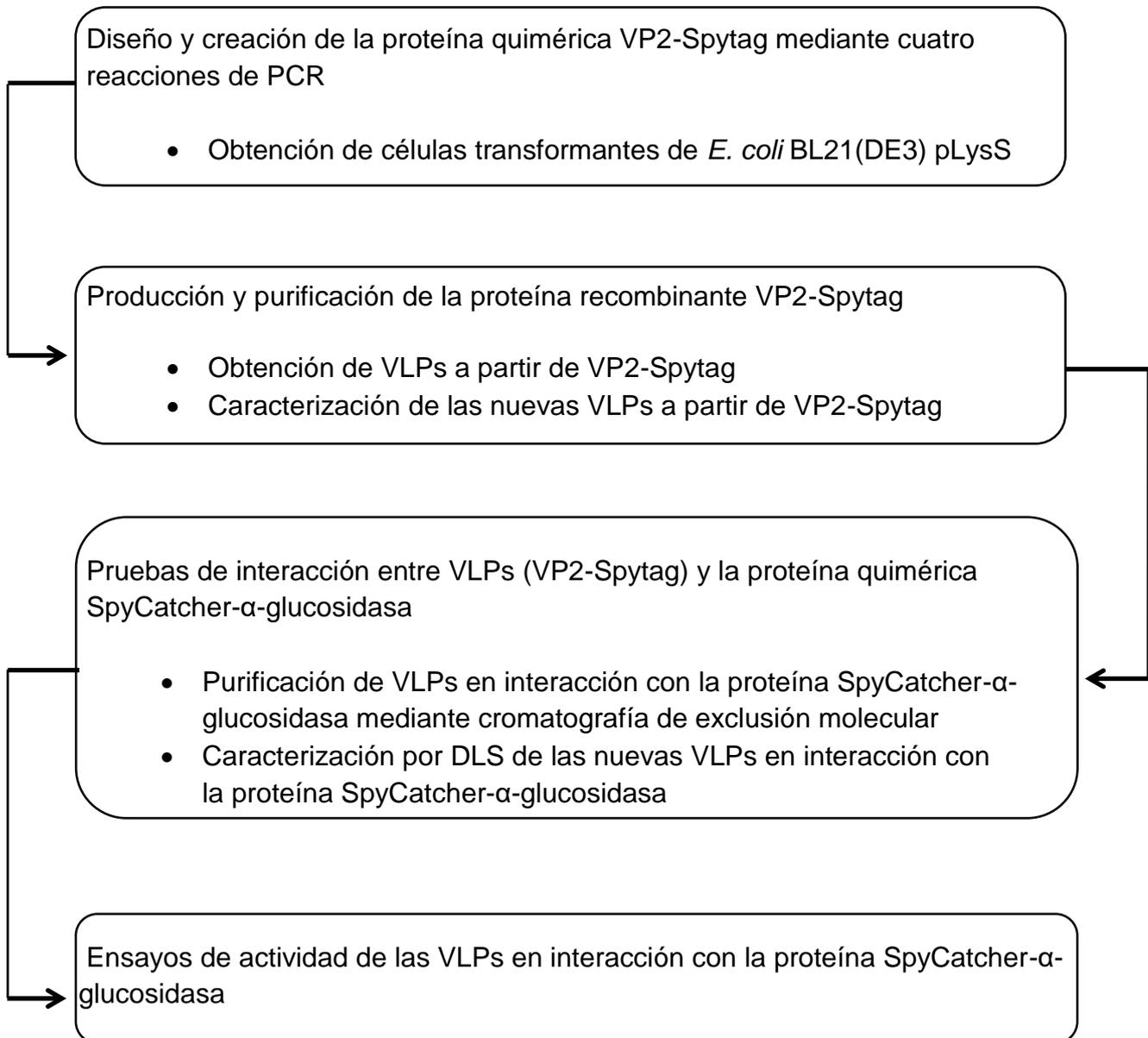
Construir VLPs del parvovirus B19 que desplieguen el péptido SpyTag en la superficie y demostrar su funcionalidad para conjugar estas partículas con proteínas recombinantes que contengan a la proteína SpyCatcher.

Objetivos particulares

- Agregar la secuencia que codifica para el péptido SpyTag al extremo 5' del gen de la proteína VP2 mediante PCR.
- Expresar el gen quimérico VP2-SpyTag en *E. coli*, y purificar la proteína quimérica.
- Ensamblar VLPs con la proteína VP2-SpyTag purificada y caracterizarlas por métodos hidrodinámicos.
- Probar que el péptido SpyTag acarreado por las VLPs es funcional mediante su conjugación con la proteína quimérica formada por la α -glucosidasa de *S. cerevisiae* y la proteína SpyCatcher.
- Caracterizar las partículas conjugadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Esquema general de trabajo



5.2 Materiales

Reactivos químicos

Reactivo	Marca
Acetato de Potasio	Sigma
Ácido acético glacial	Sigma
Ácido clorhídrico	Sigma
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	Sigma
Agar bacteriológico	Sigma-Aldrich
Agarosa UltraPure™	Invitrogen
Albumina	Sigma
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Bromuro de Etidio	Sigma
Clorhidrato de Guanidina (GdnHCl)	J.T. Baker
Cloroformo	Sigma
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	Thermo Scientific™
Cloruro de Potasio (KCl)	Sigma
Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma
Cutsmart (Amortiguador para digestión enzimática)	New England Biolabs
Dimetil Sulfóxido (DMSO)	Sigma
DNA Polimerasa de alta fidelidad (HFP)	Thermo Scientific™
dNTP Mix	Thermo Scientific™
Dodecilsulfato de Sodio (SDS)	Sigma
Etanol	Sigma
Fenol saturado de amortiguador	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
Glucosa	Sigma
Hidróxido de Sodio (NaOH)	Sigma
Imidazol	Fluka
Isopropanol	Sigma
Isopropil 1-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)	Sigma
L-Arginina	Sigma
DNA Ligasa de T4	New England Biolabs
Lisozima	Sigma
Medio LB (Luria-Bertani)	Sigma
Metanol	Quimica Delta
Membrana para diálisis	Sigma
Matriz para cromatografía de afinidad	Protino™ Ni-TED
Matriz para cromatografía de exclusión molecular	Sephacryl S-500 HR
RNAasa	Thermo Scientific™
Sulfato de Níquel (NiSO ₄)	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Sigma
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich

Instrumentos y equipo

Instrumento o equipo	Marca
Amicon Ultra-15 (30 kDa)	Millipore
Balanza analítica BP 221S	Sartorius
Centrifuga refrigerada RC 6+	Thermo Scientific Instruments
Centrifuga refrigerada 5702 R	Eppendorf
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Waters
Espectrofotómetro CARY 400	Varian
Fuente de poder PS 500XT	Hofer Scientific Instruments
Microcentrífuga refrigerada 5418	Eppendorf
Micro pipetas (1, 2.5, 10, 100, 200, 1000)	Eppendorf/Gilson
Potenciometro pH 700	Oakton
Sonicador CPX 750	Cole Parmer
Speed Vac SC110	Savant
Trans-iluminador UV T1203	Sigma
Termociclador T100™	BIO RAD
Termomixer confort	Eppendorf
Vortex	Gilson
Zetataiser μ V	Malvern Instruments

Cepas utilizadas

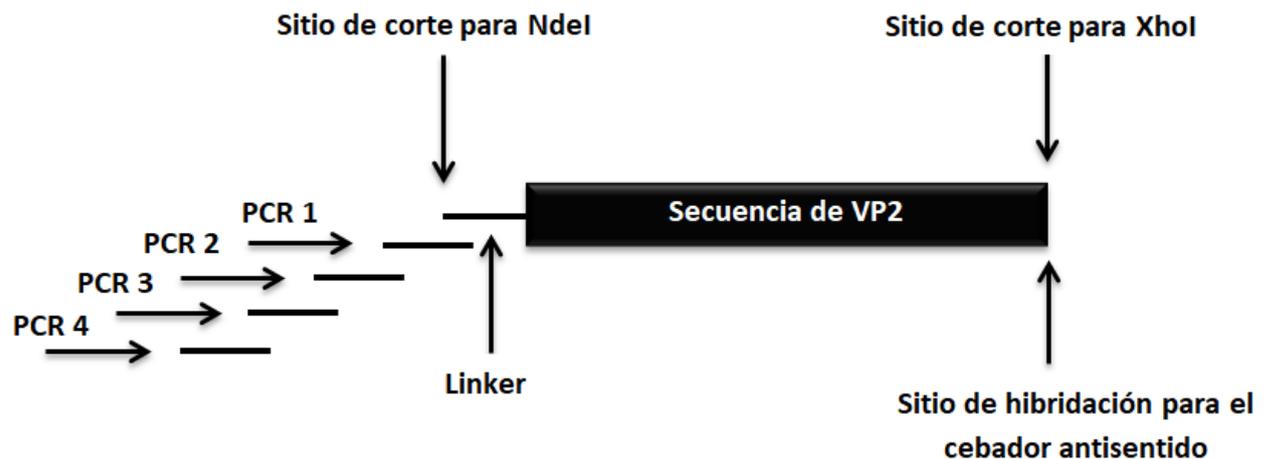
Cepa	Genotipo	Referencias
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3), pLysS, Cmr.	-Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) <i>J. Mol. Biol.</i> 189, 113–30. -Davanloo, P. <i>et al.</i> (1984) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 81, 2035–9.
<i>E. coli</i> DH5α	F- 80dlacZ M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	-Woodcock, D.M., Crowther, D.M., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W., <i>Nucl. Acids Res.</i> (1989) 17, 3469-347

5.3 Métodos

5.3.1 Diseño y construcción de la proteína quimérica VP2-SpyTag

La incorporación de la secuencia que codifica para el péptido SpyTag en el extremo 5' del gen de la proteína VP2 se realizó mediante 4 PCRs (Figura 6). A través del diseño *in silico*, se mandaron a sintetizar cinco cebadores (Tabla 1), con los cuales se fueron adicionando los nucleótidos que conforman la secuencia del péptido SpyTag. Para esto se utilizaron como referencia las secuencias del péptido SpyTag (Zakeri et al., 2012) y de la proteína VP2(L), con la cual se trabaja en el laboratorio. La proteína VP2(L) es básicamente la proteína VP2 del parvovirus B19 con un espaciador (GGSGGSGGSGG) que se le agregó en el extremo 5' de la secuencia. Así mismo, esta proteína contiene en su extremo carboxilo terminal una etiqueta de histidinas (6x His-Tag) utilizada para facilitar su purificación mediante columnas His-trap.

A)



Nuevo sitio de corte para NdeI



B)

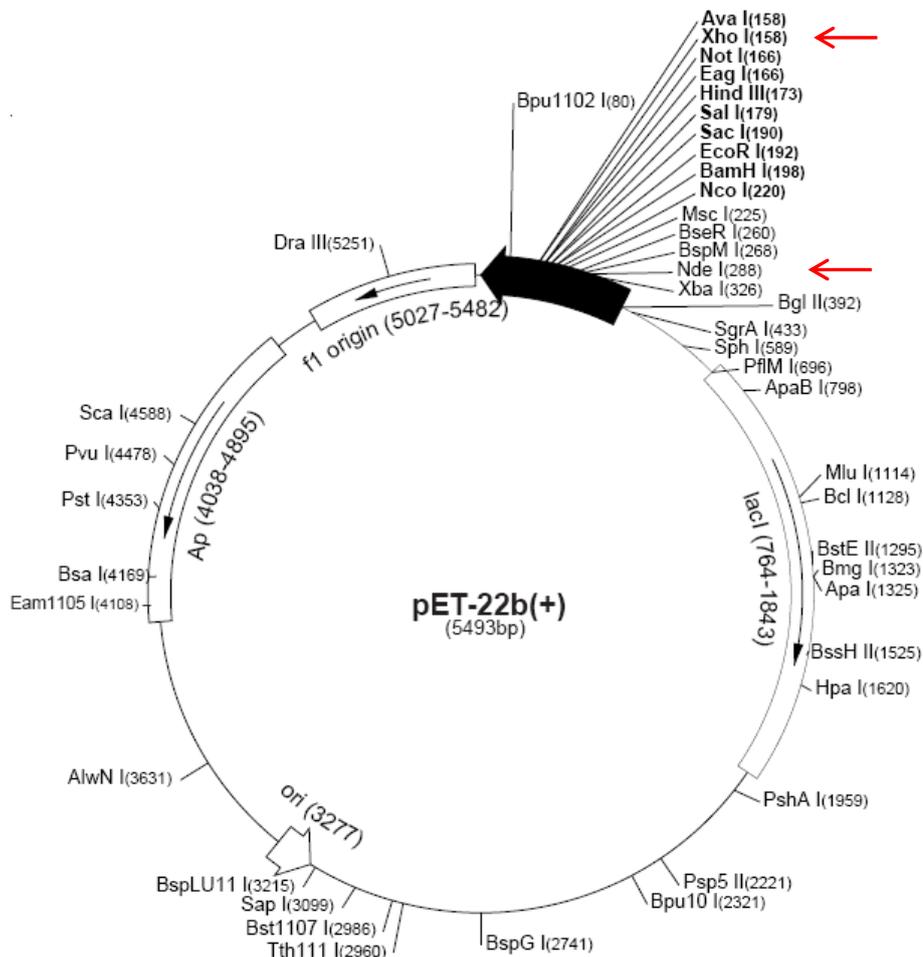
Figura 6. Proceso de formación del gen VP2/SpyTag. A) Secuencia original de VP2(L) a la cual se le realizaron los 4 PCRs. B) Secuencia terminada del gen VP2/SpyTag con un nuevo sitio de corte para *NdeI*.

Tabla 1. Secuencias de los cinco cebadores (Uno antisentido y cuatro sentido) que se utilizaron para realizar las PCRs. Los nucleótidos de color azul conforman la estructura del SpyTag y los de color rojo dan lugar a la nueva secuencia de corte para *NdeI*

Cebador antisentido	Cebador sentido	PCR
5'- GACTCGAGCGGGTGTACGCGAG - 3'	5'-CAAACCTACGAAAGGTGGTTCTG-3'	1
	5'-GTGGATGCCTACAAACCTACGAAAG-3'	2
	5'-CATCGTGATGGTGGATGCCTAC-3'	3
	5'-TACATATGCCACATCGTGATG-3'	4

Para obtener el templado sobre el cual se realizaron las reacciones de PCR se realizó la extracción del DNA plasmídico de una colonia de *E. coli* DH5 α , la cual contenía al vector pET-22b(+) con el gen que codifica para la proteína VP2(L). Para esto se utilizó

el Kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep de Jena Bioscience, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Una vez que se obtuvo el DNA plasmídico purificado se procedió a cortar el vector con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, las cuales solo tienen un sitio de corte dentro del vector (Figura 7), con lo cual se liberó el gen de la proteína VP2 y al mismo tiempo se obtuvo el vector linealizado. Posteriormente se purificó tanto el inserto como el vector mediante el Kit de extracción por gel de agarosa (Jena Bioscience), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.



A)

B)

Reactivo	Concentración
H2O	13 μ L
Vector pET-22b(+) con inserto	3 μ L
Amortiguador cutsmart	2 μ L
Enzima de corte <i>XhoI</i>	1 μ L
Enzima de corte <i>NdeI</i>	1 μ L
Volumen final	20 μ L

Figura 7. A) Mapa del vector pET-22b(+). Las flechas en rojo indican los sitios de corte utilizados para liberar el inserto. B) Composición de la mezcla de reacción para la digestión enzimática del vector con las enzimas *NdeI* y *XhoI*.

Para incorporar la secuencia del péptido SpyTag en el gen de la proteína VP2, se utilizó el inserto purificado como templado para la primera reacción de PCR, para esto se emplearon las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
H ₂ O	39 µL
10X amortiguador para <i>Pfu</i> con MgSO ₄	5 µL (200 µM de MgSO ₄)
dNTP mix (10 mM c/u)	1 µL (200 µM de c/u)
Cebador sentido (PCR1)	2 µL (0.5 µM)
Cebador antisentido	2 µL (0.5 µM)
Templado	0.5 µL
<i>Pfu</i> DNA polimerasa	0.5 µL (1.25 unidades)
Volumen final	50 µL

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Alineamiento	60°C	1 min	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	1 min	1

El producto obtenido de la reacción se analizó en un gel de agarosa (1%) para comprobar que se hubiera amplificado correctamente el gen de interés; debido a que el número de nucleótidos agregados era muy pequeño, esperábamos que tuviera un tamaño similar al gen de VP2(L) (1700 bp).

Para la segunda PCR, se utilizó como molde el producto obtenido del primer PCR y se llevó a cabo la reacción con las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
H ₂ O	39 µL
10X amortiguador para <i>Pfu</i> con MgSO ₄	5 µL (200 µM de MgSO ₄)
dNTP mix (10 mM c/u)	1 µL (200 µM de c/u)
Cebador sentido (PCR2)	2 µL (0.5 µM)
Cebador antisentido	2 µL (0.5 µM)
Templado (PCR 1)	0.5 µL
<i>Pfu</i> DNA polimerasa	0.5 µL (1.25 unidades)
Volumen final	50 µL

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Alineamiento	60°C	1 min	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	1 min	1

El producto obtenido de la reacción se analizó en un gel de agarosa (1%) para comprobar si se amplificó nuestro gen de interés. Para la tercera PCR, se utilizó como molde este producto (obtenido del segundo PCR) y se llevó a cabo la reacción con las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
H ₂ O	39 µL
10X amortiguador para <i>Pfu</i> con MgSO ₄	5 µL (200 µM de MgSO ₄)
dNTP mix (10 mM c/u)	1 µL (200 µM de c/u)
Cebador sentido (PCR3)	2 µL (0.5 µM)
Cebador antisentido	2 µL (0.5 µM)
Templado (PCR 2)	0.5 µL
<i>Pfu</i> DNA polimerasa	0.5 µL (1.25 unidades)
Volumen final	50 µL

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Alineamiento	63°C	1 min	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	1 min	1

El producto obtenido de la reacción se analizó en un gel de agarosa (1%) para comprobar si se amplificó nuestro gen de interés. Para el cuarto PCR se utilizó como molde este producto (obtenido del tercer PCR), se lo cuantificó, se diluyó a una

concentración de (8 ng/μL) y se llevó a cabo la reacción con las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
H ₂ O	32 μL
10X amortiguador sin MgSO ₄	5 μL
dNTP mix (10 mM c/u)	2 μL (80 μM de c/u)
DMSO (al 50%)	5 μL (5%)
MgSO ₄	3 μL (1.5 mM)
Cebador sentido (PCR4)	1 μL (0.25 μM)
Cebador antisentido	1 μL (0.25 μM)
Templado (PCR 3)	0.5 μL (4 ng)
Polimerasa de alta fidelidad (HFP)	0.5 μL (1.25 unidades)
Volumen final	50 μL

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	20 s	
Alineamiento	70°C	30 s	
Extensión	70°C	2 min	25
Extensión final	70°C	5 min	1

Una vez que se obtuvo el producto del cuarto PCR, se le realizó una digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* para generar los extremos cohesivos necesarios para su ligación con el vector. Posteriormente se purificó mediante el Kit de extracción por gel de agarosa (Jena Bioscience), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Una vez obtenido el fragmento purificado, se llevó a cabo la reacción de ligación con el vector linealizado (purificado previamente en esta metodología), bajo las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
DNA Ligasa de T4 (400 unidades/μL)	1 μL (400 unidades)
Amortiguador para DNA ligasa (10X)	1 μL
Vector pET-22b(+)	0.5 μL
Inserto (VP2/SpyTag)	7.5 μL
Volumen final	10 μL

La reacción se dejó durante 12 horas aproximadamente a una temperatura de 4° C.

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

Para la obtención de células transformantes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, se optó por transformar primero en *E. coli* DH5 α , ya que suelen dar mejores resultados para la transformación, para esto se siguió el siguiente protocolo:

Protocolo de transformación de células quimiocompetentes

1. Se tomó un tubo con 50 μ L de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α , almacenadas a -70°C y se colocaron en hielo. En condiciones de esterilidad se les agregaron 10 μ L del vector ligado y se incubaron en hielo por 30 min.
2. Una vez que pasó el primer tiempo de incubación, las células se pusieron a incubar inmediatamente en un termomixer previamente calentado a 42°C por 90 s para generar el choque térmico.
3. Después de esta segunda incubación se volvió a poner en hielo el tubo por 2 min y nuevamente en condiciones de esterilidad se le agregaron 250 μ L de medio LB.
4. Una vez mezclado el medio con las células se procedió a incubar el tubo a 37°C por 1.5 h con agitación orbital a 250 r.p.m.
5. Después de esta etapa de recuperación se procedió a inocular las células en placas de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL), para lo cual se pusieron 25 μ L del medio con células en cada caja y se lo distribuyó mediante perlas de vidrio estériles para favorecer la obtención de colonias aisladas.
6. Las cajas se colocaron en la incubadora y se dejaron creciendo por 16 h a 37°C. Una vez que pasó el tiempo de incubación se observaron las cajas que presentaron colonias y se las colocó en el cuarto frío a 5°C para retrasar su crecimiento.

Una vez que se obtuvieron colonias puras de las células transformantes, se procedió a obtener su DNA plasmídico para comprobar que estas tuvieran realmente el vector de interés y de esta forma poder transformar las células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Para esto se siguió el siguiente protocolo:

Protocolo de purificación de DNA plasmídico (fenol/cloroformo)

1. De las cajas obtenidas, se seleccionaron varias colonias aisladas y se las puso a crecer en tubos de 10 mL con medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. En este punto se tomaron 3 mL del cultivo para preparar tubos con glicerol al 30% (concentración final) para su almacenamiento a -70°C.

2. Del mismo cultivo se tomó 1 mL y se centrifugó en un tubo eppendorf de 1.5 mL a 9000 r.p.m. durante 1 min, se descartó el sobrenadante y sobre este mismo tubo se puso otro mL del cultivo y se volvió a centrifugar (Este paso se repitió una vez más).
3. Al pellet obtenido se lo resuspendió en 100 μ L de una solución para lisis celular, compuesta por 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCL pH 8, 10 mM de EDTA y 5 mg/mL de lisozima. Ya mezclado se incubó a 37°C durante 30 min.
4. Una vez que pasó el tiempo de incubación, se le adicionaron 200 μ L de una solución recién preparada de NaOH 0.2 M y SDS al 4%. Se utilizó un vortex para homogenizar la solución y se la puso a incubar en hielo durante 10 min.
5. Después de que transcurrieron los 10 min se le agregaron 150 μ L de una solución 5 M de acetato de potasio (pH 5) y nuevamente se puso a incubar por otros 10 min.
6. Para separar el DNA plasmídico de los restos celulares, se centrifugó la muestra a 14000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Al final se tomaron 400 μ L del sobrenadante y se los puso en un tubo nuevo.
7. A este sobrenadante se le agregaron 200 μ L de fenol saturado de amortiguador y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente, de igual forma se le agregaron 200 μ L de cloroformo y se mezcló suavemente. Para separar el DNA plasmídico de proteínas y otros restos celulares se volvió a centrifugar como en el paso 6.
8. Una vez que terminó la centrifugación se formaron dos fases, la fase superior que es la fase acuosa, es la que contiene el DNA plasmídico. De ésta, se tomó el mayor volumen posible tratando de no revolverla con la otra fase.
9. Para poder precipitar el DNA plasmídico de ésta fase, se mezcló con un volumen igual de isopropanol en un tubo nuevo y se lo dejó incubando a 5°C por 3 h.
10. Posteriormente se recolectó el DNA plasmídico mediante centrifugación (14000 r.p.m. durante 15 min) a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se lo lavó con etanol al 80%; este paso se repitió otras 2 veces. Por último, el DNA se secó al vacío en el equipo de liofilización Speed Vac.
11. Finalmente, se resuspendió el DNA plasmídico en 25 μ L de agua desionizada estéril y se le agregó 0.5 μ L de RNAsa para eliminar cualquier resto de RNA que pudiera tener. Se incubó por 1 h a 37°C antes de guardarlo.

Con el DNA plasmídico ya purificado se procedió a realizar una prueba de digestión para comprobar que nuestro vector realmente contenía el inserto de interés, nuevamente se utilizaron las enzimas *Xho*I y *Nde*I y se incubaron a 37°C por 3 h, el producto obtenido se corrió en un gel de agarosa (1%) y se analizó en un transiluminador UV T1203. Una vez que se comprobó cuáles fueron los plásmidos que liberaron el inserto, se eligió uno para realizar la transformación de las células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Para esto se siguió el protocolo de transformación mencionado arriba. De las cajas obtenidas se eligió una colonia

aislada, a la cual se le extrajo su DNA plasmídico mediante el Kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep de Jena Bioscience y se envió a secuenciar para comprobar que no había ninguna mutación en la secuencia (Laragen Inc.).

5.3.3 Sobreexpresión de la proteína recombinante VP2-SpyTag

Las condiciones empleadas para la sobreexpresión de la proteína VP2-SpyTag se basaron en las reportadas por Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2012). El protocolo utilizado con algunas modificaciones se presenta a continuación:

Protocolo de sobreexpresión de la proteína recombinante VP2-Spytag

1. Se preparó un primer inóculo en 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) a partir de una colonia aislada de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, la cual fue previamente secuenciada. El tubo con medio de cultivo se incubó a 37°C, con agitación orbital de 220 r.p.m. durante 12 h.
2. El inóculo se transfirió a un matraz con capacidad de 500 mL que contenía 100 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37°C, con agitación orbital de 220 r.p.m. hasta que alcanzó su fase exponencial ($DO_{600} = 0.6$ a 0.8).
3. Una vez que este nuevo inóculo alcanzó la densidad óptica requerida, se transfirió a un matraz con capacidad de 2 L que contenía 500 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37°C, con agitación orbital de 220 r.p.m. hasta que alcanzó nuevamente su fase exponencial ($DO_{600} = 0.6$ a 0.8).
4. En este punto se le agregaron 500 µL de una solución de IPTG 250 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína. La concentración final de IPTG en el medio fue de 0.25 mM. El matraz se dejó en incubación durante 12 h más.
5. Transcurrido el tiempo de inducción se procedió a recuperar la biomasa por centrifugación a 6000 r.p.m. a 5°C por 15 min. Se tomó una muestra pequeña para determinar la presencia de la proteína mediante SDS-PAGE.
6. El pellet celular se resuspendió nuevamente en una solución de NaCl al 0.9% (m/v) para eliminar el medio de cultivo remanente de las células. La biomasa se volvió a centrifugar como en el paso 5. Este proceso se repitió otras 2 veces.

5.3.4 Obtención de la proteína VP2-SpyTag en cuerpos de inclusión

Debido a que la proteína VP2-SpyTag es muy similar en su estructura a la proteína silvestre de VP2 y a que en trabajos previos (Sánchez-Rodríguez et al., 2012;

Santillán-Uribe et al., 2015) se demostró que esa proteína y otras quimeras forman cuerpos de inclusión, se decidió emplear un protocolo de limpieza de cuerpos de inclusión basado en trabajos anteriores (Santillán, 2017):

Protocolo de limpieza y solubilización de la proteína VP2-SpyTag

1. Con el pellet obtenido del protocolo anterior, se resuspendió en 30 mL de solución amortiguadora A_{LCI} (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0). Posteriormente este se volvió a centrifugar a 8000 r.p.m. durante 15 min a 5°C.
2. El pellet obtenido se resuspendió en 40 mL de solución amortiguadora B_{LCI} (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% v/v Triton-X100, pH 8.0). En esta solución se procedió a realizar la lisis celular mediante sonicación. Se realizaron dos ciclos de 10 min cada uno, con pulsos de 20 s y pausas de 20 s empleando una potencia de 60 a 80 W. Entre un ciclo de sonicación y otro, se centrifugaron los cuerpos de inclusión a 8000 r.p.m. durante 15 min a 5°C y el pellet se volvió a resuspender en solución amortiguadora B_{LCI} para realizar la siguiente sonicación.
3. La solución con cuerpos de inclusión obtenida se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 20 min a 5°C. El pellet que se obtuvo se resuspendió en 30 mL de solución amortiguadora C_{LCI} (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 6 M Gdn-HCl, 2 mM DTT, pH 6.3), con lo cual se logró solubilizar los cuerpos de inclusión. Para aumentar la eficiencia de este proceso se incubó a 30°C, con agitación orbital de 220 r.p.m. durante 12 h.
4. Por último, para eliminar los remanentes de proteína agregada se volvió a centrifugar la solución a 10000 r.p.m. durante 20 min a 5°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

5.3.5 Purificación de la proteína recombinante VP2-SpyTag

La purificación de la proteína VP2-SpyTag se realizó mediante cromatografía de afinidad, para lo cual se utilizó una matriz Protino™ Ni-TED que cuenta con iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). En este caso la proteína VP2-SpyTag cuenta con una etiqueta de histidinas en su extremo carboxilo terminal, lo cual permitió su interacción con los iones de níquel presentes en la matriz.

Las columnas de purificación empleadas funcionan a través de gravedad y cuentan con un volumen de 20 mL. Estas se suelen mantener en una solución de etanol (al 20% v/v) para evitar posibles contaminaciones por bacterias u hongos, ya que en

ocasiones pueden quedar proteínas atrapadas. Por esto mismo, después de varios ciclos de purificación son desempacadas, lavadas y regeneradas para mantener su correcto funcionamiento. El protocolo para equilibrar la matriz y purificar de la proteína fue el siguiente:

Protocolo de purificación de la proteína VP2-SpyTag

1. Se pasó un volumen de 50 mL de H₂O a la columna para limpiar la matriz de la solución de etanol al 20%. Después se le pasó un volumen de 30 mL de una solución amortiguadora A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 3 M Gdn-HCl, Glicerol 5% v/v, pH 7.5) para equilibrar la columna.
2. Ya equilibrada la columna se pasó un volumen de 5 mL de la solución con la proteína solubilizada VP2-SpyTag.
3. Una vez que ésta entró a la columna, se le adicionó un volumen de 20 mL de una solución amortiguadora B (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 7.5) para distribuir a la proteína a través de toda la matriz.
4. Posteriormente se pasó un volumen de 20 mL de una solución amortiguadora C (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 3 M Gdn-HCl, Imidazol 30 mM, pH 7.5) para favorecer la liberación de proteínas que pudieran unirse a la matriz por tener residuos de histidinas.
5. Una vez que la solución C entró a la columna, se adicionó un volumen de 5 mL de la solución amortiguadora D (50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 7.5).
6. Finalmente, cuando la solución D entró a la columna, se adicionó un volumen de 30 mL de la solución amortiguadora E (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 3 M Gdn-HCl, Imidazol 300 mM, pH 7.5), con la cual se eluyó la proteína de interés. Para esto se recolectó un volumen muerto de 10 mL y después se comenzó a recolectar el volumen restante en fracciones (seis en total).
7. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE para saber en cuales se encontraba nuestra proteína y descartar las demás. Las fracciones que tenían a la proteína se juntaron en un tubo Falcon de 40 mL y posteriormente se las concentró mediante un Amicon Ultra-15 (30 kDa) para filtración con centrifuga.
8. Una vez que se obtuvo la proteína concentrada y con un mayor grado de pureza, se le cambió el amortiguador E por el R (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 M Gdn-HCl, 1 mM DTT), nuevamente mediante el uso de un Amicon Ultra-15 (30 kDa).

Con la proteína en el nuevo amortiguador, se pudo determinar su concentración por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm. Se usó como referencia una curva de calibración obtenida a partir de disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA) solubilizada en la solución amortiguadora R. Todos los puntos de la curva fueron preparados por triplicado, con un volumen final de 1000 µL.

5.3.6 Ensamble y caracterización de VLPs (VP2-Spytag) mediante DLS

Para permitir el ensamble de las cápsides virales a partir la proteína VP2-Spytag, esta se tuvo que dializar frente a un amortiguador PBS_{Arg} (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 200 mM L-Arginina, pH 7.4), para eliminar el agente desnaturizante (Gdn-HCl). Para eso se diluyó la proteína purificada con más solución R y se la llevó a una concentración de 0.7 mg/mL, en un volumen final de 1.5 mL. La muestra se dejó en diálisis durante un periodo total de 40 h a una temperatura de 5°C, con agitación.

Para caracterizar los ensambles obtenidos y comprobar que realmente se hayan formado VLPs, estos fueron analizados en un equipo Zetasizer μ V (Malvern instruments) para dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés). La dispersión dinámica de luz es una técnica basada en los principios del movimiento browniano y el efecto Doppler, mediante los cuales se determina el tamaño y la masa de las partículas que se encuentran en suspensión. Los parámetros para el análisis fueron fijados 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 vidrio con capacidad para un volumen de 500 μ L. Antes de analizar las muestras en el DLS se pasaron por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.45 μ m y después por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.22 μ m.

5.3.7 Reacción de acoplamiento entre VLPs (VP2-Spytag) y la proteína quimérica SpyCatcher- α -glucosidasa

Las condiciones empleadas para la reacción de acoplamiento entre las VLPs (VP2-Spytag) y la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa se basaron en las reportadas por Zakeri y colaboradores (2012). La reacción se llevó a cabo en solución amortiguadora PBS_{Arg} (pH 7.4) a 25°C durante 1 hora. Para eso se mezcló la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa con las VLPs (VP2-Spytag) en concentraciones iguales y se las llevó a un volumen final de 1.5 mL en un tubo Eppendorf. La interacción se puso a incubar en el equipo Thermomixer confort (Eppendorf) en las condiciones ya mencionadas.

5.3.8 Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular

A lo largo de todo el proceso de obtención de VLPs, así como de la interacción con la proteína quimérica SpyCatcher- α -glucosidasa, se fueron acumulando especies intermediarias, agregados proteicos e incluso proteínas sin interaccionar en la solución donde tenemos las partículas de interés. Es así que se decidió purificar las VLPs unidas al sistema SpyCatcher- α -glucosidasa para poder obtener una población homogénea de partículas, lo cual permitió caracterizar la interacción del sistema de una forma más precisa y confiable. Para esto se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) de la marca Waters, el cual permite ir separando las partículas en la solución de acuerdo a su tamaño. La columna que se utilizó fue empacada con una matriz Sephacryl S-500 HR, a la cual como una etapa preparativa se le pasó la solución amortiguadora PBS_{Arg} con un flujo constante de 0.5 mL/min para equilibrarla. Al mismo tiempo se utilizó un detector UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 280 nm para poder seguir el proceso de exclusión molecular.

Una vez que la matriz estaba equilibrada, se inyectó la muestra y se dejó corriendo el equipo a un flujo constante de 0.5 mL/min durante 30 min, después de ese tiempo comenzó a coleccionar las muestras en fracciones de 2 mL cada una. Finalmente, en función del gráfico obtenido por la absorbancia de las muestras, se midió de forma cualitativa la actividad enzimática de cada una de las fracciones donde se podría encontrar nuestra interacción. Para esto se utilizó un sustrato cromogénico: 4-nitrofenil- α -glucopiranosido (pNPG), el cual genera una coloración amarilla en la solución cuando es hidrolizado por la enzima α -glucosidasa. Las fracciones que presentaron actividad, se analizaron mediante DLS y se eligió la fracción con el tamaño más cercano al teórico.

5.3.9 Caracterización de la interacción entre las VLPs (VP2-Spytag) y la proteína quimérica SpyCatcher- α -glucosidasa

Para caracterizar la interacción entre las VLPs (VP2-SpyTag) y las proteínas SpyCatcher- α -glucosidasa se hicieron tres análisis. Uno fue mediante DLS, donde se determinó el tamaño de las nuevas partículas y se lo comparó contra el tamaño de las VLPs solas. Los parámetros que se fijaron para el análisis, fueron los mismos que se utilizaron en la caracterización de las VLPs sin interaccionar. De igual manera antes de analizar las muestras en el DLS se pasaron por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.45 μ m y después por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.22 μ m.

También se las analizó a través de SDS-PAGE, con lo cual se compararon los pesos moleculares de las proteínas. Debido a que el enlace isopeptídico entre el sistema SpyTag-SpyCatcher es un enlace covalente, se comparó el peso de la proteína VP2-SpyTag sin interactuar contra la proteína VP2-SpyTag unida a SpyCatcher- α -glucosidasa, así mismo se comparó el peso de la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa sin interactuar.

Por último, se determinó la actividad catalítica de la enzima SpyCatcher- α -glucosidasa presente en la superficie de las VLPs. Las partículas se pusieron a interactuar con el sustrato cromogénico pNPG, el cual se analizó con el espectrofotómetro CARY 400 (Marca Varian), ajustado a una longitud de onda de 405 nm para poder seguir la formación del producto y con esto medir su actividad volumétrica. A su vez se comparó con la actividad catalítica de la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa sin interactuar para ver si existían cambios en su actividad. Para esto se establecieron las condiciones de la reacción en el siguiente protocolo:

Protocolo de cuantificación de la actividad catalítica

1. La reacción de interacción entre las VLPs (VP2-SpyTag) y la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa se hizo de acuerdo a la metodología mencionada previamente en esta tesis. Se usó una concentración 16 nM de las VLPs y una concentración 98.5 nM de la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa.
2. De esta interacción se tomaron 400 μ L y se los llevó a un volumen final de 1 mL, la concentración final de la enzima α -glucosidasa con la que se trabajó en ambos análisis fue 39.4 nM.
3. Se preparó una solución stock de pNPG 15 mM en amortiguador PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4). Para cuantificar la actividad volumétrica de la enzima se utilizó una concentración 5 mM del sustrato (pNPG)
4. Se blanqueó con el amortiguador PBS pH 7.4
5. La reacción se inició mediante la adición del sustrato. Las celdas de reacción se leyeron en el espectrofotómetro CARY a 30°C y 405 nm por un periodo de 10 min.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Diseño y construcción de la proteína quimérica VP2-Spytag

Para construir el gen que codifica para la proteína VP2-Spytag se tuvo que extraer, digerir y purificar por separado el vector de clonación pET-22b(+) y el gen de la proteína VP2(L), con los cuales ya se contaba en el laboratorio. En la figura 8A, podemos ver que ambos fragmentos presentaron los tamaños esperados (~5400 bp y ~1700 bp respectivamente). Con el gen de la proteína VP2(L) purificado, se realizaron 4 PCRs, a través de las cuales se fue adicionando la secuencia del péptido SpyTag (alrededor de 11 nucleótidos por reacción). La última PCR fue la única que presentó complicaciones para su obtención, por lo cual se tuvieron que probar varias condiciones hasta llegar a las mencionadas previamente en la metodología. En la figura 8B, se puede observar el producto obtenido del cuarto PCR, el cual, al no haber tenido un aumento significativo en el número de pares de bases, esperábamos que tuviera un tamaño similar al gen VP2(L). Sin embargo, también se puede observar que la reacción produjo un barrido inespecífico, el cual suponemos que se debió a la formación de dímeros entre los cebadores. Por lo anterior, en la última reacción de PCR fue necesario utilizar DMSO (se ha visto que ayuda a evitar la hibridación entre cebadores), ya que de otra manera no se obtenía ningún producto de la amplificación. Debido a esta condición, se favoreció la amplificación de productos inespecíficos, lo cual generó una disminución en la amplificación de nuestro gen de interés.

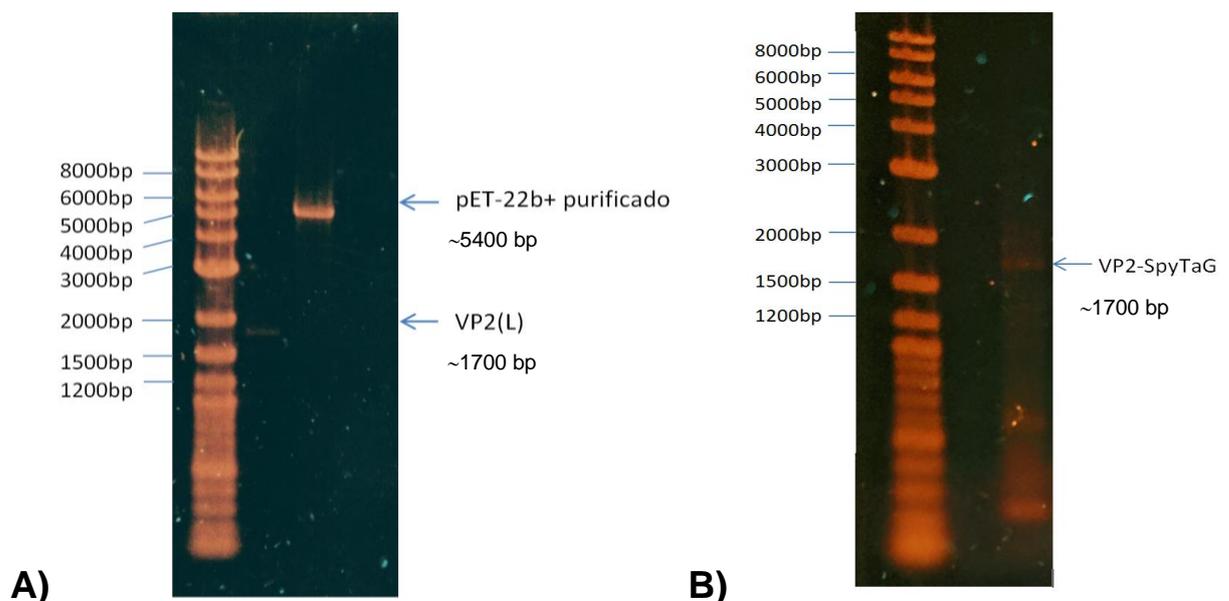
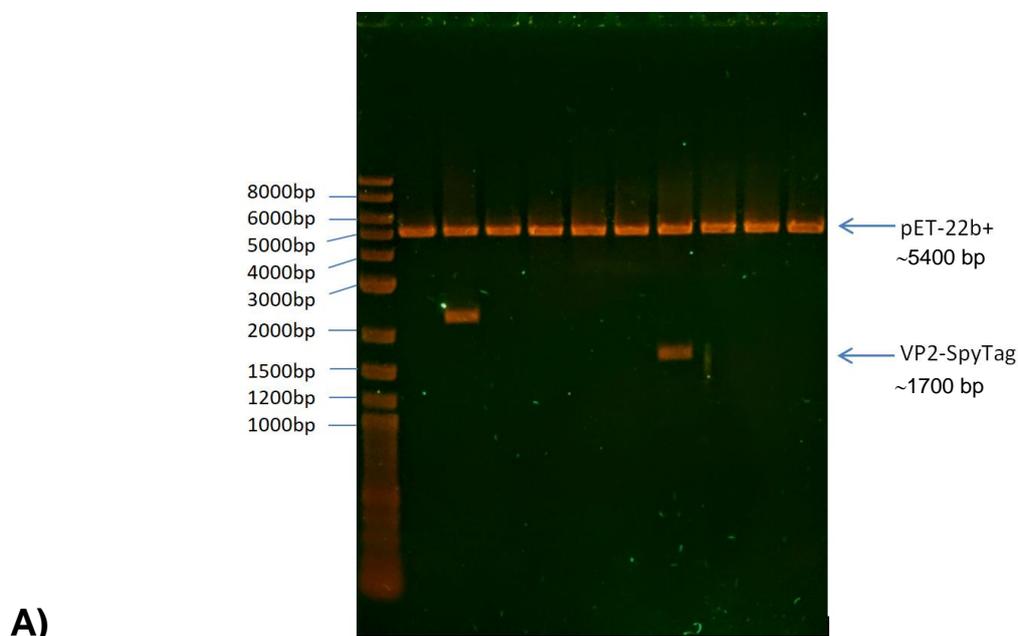


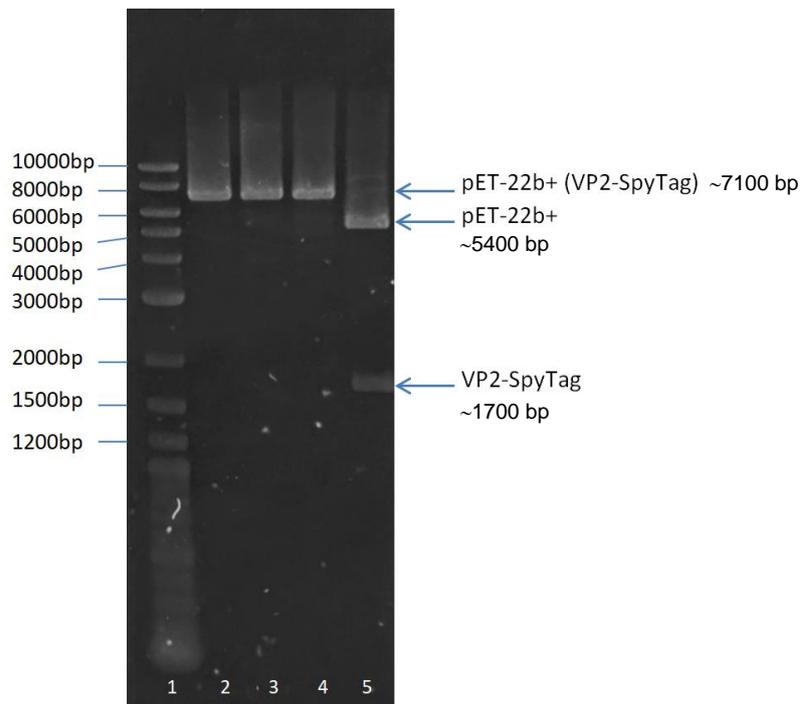
Figura 8. A) Purificación del vector pET-22b(+) y del inserto que contiene al gen VP2(L). Carriles de izquierda a derecha: Marcador de tamaño, inserto con el gen VP2(L), vector pET-22b(+). B) Análisis del producto obtenido del PCR 4. Carriles de izquierda a derecha: Marcador de tamaño, producto final del PCR 4.

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

Una vez que se obtuvo el gen purificado de la proteína VP2-SpyTag, se llevó a cabo la construcción del vector pETVP2-SpyTag, al insertar este nuevo gen entre los sitios *Nde*I y *Xho*I del vector de expresión pET-22b(+) mediante ligación como se describió previamente. Para producir la proteína VP2-SpyTag se decidió utilizar como sistema de expresión la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. No obstante, debido a las complicaciones que tuvo el cuarto PCR y al bajo rendimiento obtenido, se optó por transformar la reacción de ligación primero en células de *E. coli* DH5 α , las cuales suelen tener una mayor tasa de transformación. De las colonias obtenidas, se eligieron 10 al azar para ser analizadas. Para comprobar en qué colonias estaba presente el gen de interés, se realizó una digestión al DNA plasmídico de cada una de ellas con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I. Como se observa en la Figura 9A, de las 10 colonias, solamente la colonia 7 liberó un inserto con el tamaño del gen esperado (1700 bp aproximadamente). A partir de esta colonia se realizaron los siguientes experimentos.

Posteriormente para comprobar que efectivamente se trataba de nuestro inserto, se linealizó el vector con 3 enzimas de digestión diferentes (Figura 9B). La secuencia que une al gen de VP2 con los nucleótidos que codifican para el SpyTag contiene un sitio de restricción para *Bam*HI, el cual también fue construido por PCR. Comprobar la presencia de este sitio nos daría información preliminar de la identidad de la construcción, ya que el vector pET-22b(+) digerido con *Nde*I y *Xho*I no tiene este sitio de restricción. En consecuencia, la digestión del DNA plasmídico con cualquiera de estas enzimas por separado nos tendría que generar un DNA linealizado que presentara el tamaño esperado (~7100 bp).





B)

Figura 9. Análisis de las colonias obtenidas de *E. coli* DH5α con el pET-VP2SpyTag. Carriles de izquierda a derecha: Marcador de tamaño, pET-VP2SpyTag digerido con *NdeI* y *XhoI* de colonias transformadas 1-10. B) Digestión para comprobar la liberación del inserto de interés (colonia 7). De izquierda a derecha: Carril 1 marcador de tamaño, carril 2 pET-VP2SpyTag digerido con *NdeI*, carril 3 pET-VP2SpyTag digerido con *XhoI*, carril 4 pET-VP2SpyTag digerido con *BamHI*, carril 5 pET-VP2SpyTag digerido con *NdeI* y *XhoI*.

Una vez que se obtuvieron células transformantes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, se les extrajo el DNA plasmídico y se mandó a secuenciar para confirmar que la proteína con la que se iba a trabajar no presentaba ninguna mutación en su secuencia. La secuenciación se hizo utilizando el cebador universal para el promotor T7. En la figura 10 se comparó la secuencia original de nucleótidos que codifican para el péptido SpyTag con la secuencia obtenida mediante secuenciación. Ambas secuencias son idénticas, lo cual nos asegura que teníamos la secuencia correcta y que no había riesgo de que la proteína tuviera problemas estructurales o de interacción con su sistema complementario SpyCatcher.

Secuencia de nucleótidos del gen SpyTag	Secuencia de aminoácidos del péptido SpyTag
GCCACATCGTGATGGTGGATGCCTACAAACC TACGAAA	AHIVMVDAYKPTK

TCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCCCACATCGTGATGGTGGATGCCTACAAACCTACGAAAGGTGGTTCTGGTGGATCCGGCGGTAGCGGTGGTATGACCAGCGTTAACTC
TGCGGAAGCGTCTACTGGTGCAGGCGGTGGCGGTTCTAACCCAGTGAAAAGCATGTGGAGCGAAGGCGC
AACCTTTTCTGCTAACTCTGTAACCTGCACTTTCTCTCGCCAGTTCCTGATTCGGTACGACCCAGAACA
TCACTATAAGGTGTTTTCTCCAGCGGCTTCTTCCTGTCACAACGCGTCCGGCAAAGAAGCGAAGGTATG
CACCATCTCCCCGATTATGGGTTACTCTACCCCGTGGCGCTACCTGGACTTCAACGCGCTGAACCTGTT
CTTCTCCCCACTGGAATTTTCAGCATCTGATTGAGAACTATGGTTCTATCGCTCCGGACGCACTGACTGT
GACCATCTCTGAAATCGCGGTGAAAGACGTAACCGATAAGACTGGTGGCGGTGTACAGGTGACTGACTC
TACCACTGGCCGTCTGTGCATGCTGGTAGACCATGAGTACAAATACCCGTACGTTCTGGGCCAAGGTCA
AGACACTCTGGCTCCGGAAGTCCGATTTGGGTGTACTTTCCACCGCAATACGCCTATCTGACTGTGGG
TGATGTTAACACTCANGGTATTAGCGGTGATTCGAAGAACTGGCGTCTGANGAATCCGCATTCTACGT
GCTGGAGCATTCCAGCTTTCAGCTGCTGGGTACTGGTGGCACCAGCAACTATGTCTTACAAGTTTCCGCC
AGTGCCACCNGAAAACCGGGAAGGCTGTAGCCAGCATTTTCNACGANATGTACAACCC

Figura 10. Secuencia del cromatograma del gen que codifica a la proteína VP2-SpyTag. Los nucleótidos marcados en verde indican la secuencia que codifica para el péptido SpyTag, los nucleótidos marcados en amarillo indican la secuencia que codifica para el espaciador y finalmente los nucleótidos marcados en rojo indican la secuencia que codifica el inicio de la proteína VP2. Subrayados se encuentran los sitios de restricción para *NdeI* (CATATG) y *BamHI* (GGATCC). La secuencia ATG en el sitio de restricción para *NdeI* es también el codón de inicio de la proteína quimérica.

6.3 Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante VP2-Spytag

La sobreexpresión de la proteína VP2-SpyTag se hizo mediante la adición de IPTG al cultivo de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, en una concentración 0.25 mM. Si bien la proteína tuvo una buena sobreexpresión (Figura 11, carril 3), como se ha reportado previamente en otros trabajos del laboratorio, esta proteína se fue a cuerpos de inclusión (Bustos-Jaimes et al., 2017; Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Santillán et al., 2015). Para la obtención y recuperación de la proteína a partir de los cuerpos de inclusión, se usó el mismo protocolo de solubilización que utilizamos para la proteína VP2. Es interesante hacer notar que nos dio muy buenos resultados, ya que desde que estaba solubilizada la proteína (Figura 11, carril 4), no presento tantas impurezas como otras quimeras de VP2 con las que se trabaja en el laboratorio. Finalmente, en los últimos dos carriles de la Figura 11, podemos observar la comparación entre la proteína antes y después de ser purificada.

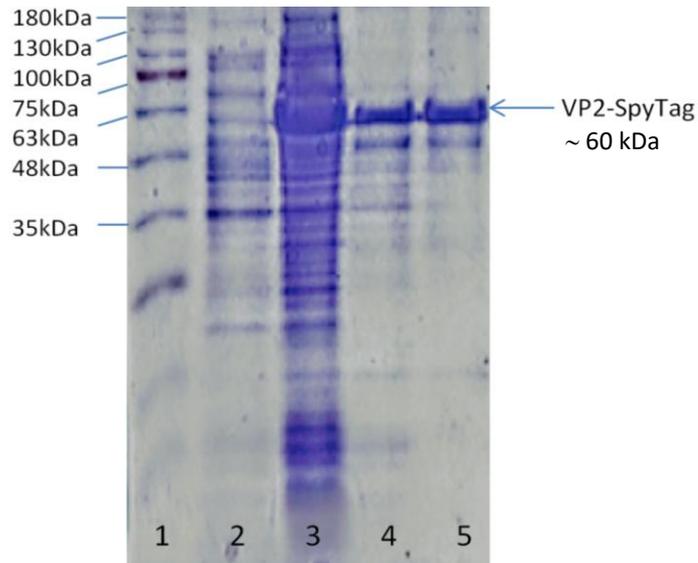


Figura 11. A) Análisis de sobreexpresión y purificación de la proteína VP2-SpyTag. De izquierda a derecha: Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 antes de la inducción, carril 3 después de la inducción, carril 4 cuerpos de inclusión solubilizados y carril 5 VP2-SpyTag purificada.

6.4 Ensamble y caracterización de VLPs (VP2-Spytag) mediante DLS

Con la proteína VP2-SpyTag pura, se probó su competencia para formar VLPs. Para favorecer el ensamble, se eliminó gradualmente el agente desnaturante (Gdn-HCl) mediante diálisis en amortiguador PBS_{Arg}, que tiene 0.2 M de L-Arginina, la cual ayudó a evitar la agregación de las VLPs formadas y nos permitió tener un mejor rendimiento. Los ensambles obtenidos se analizaron mediante DLS, y estos resultados fueron comparados con los reportados por Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2012 y 2016), debido a que la proteína VP2-SpyTag es muy similar a la VP2. En la figura 12, se observa que las VLPs (VP2-SpyTag) presentan tamaños muy cercanos a los reportados (20 a 23 nm). Estas VLPs son un poco más grandes que las reportadas, lo cual probablemente se deba a que el péptido SpyTag, al quedar expuesto en la superficie de las cápsides, contribuye a un ligero aumento en el radio hidrodinámico de las partículas.

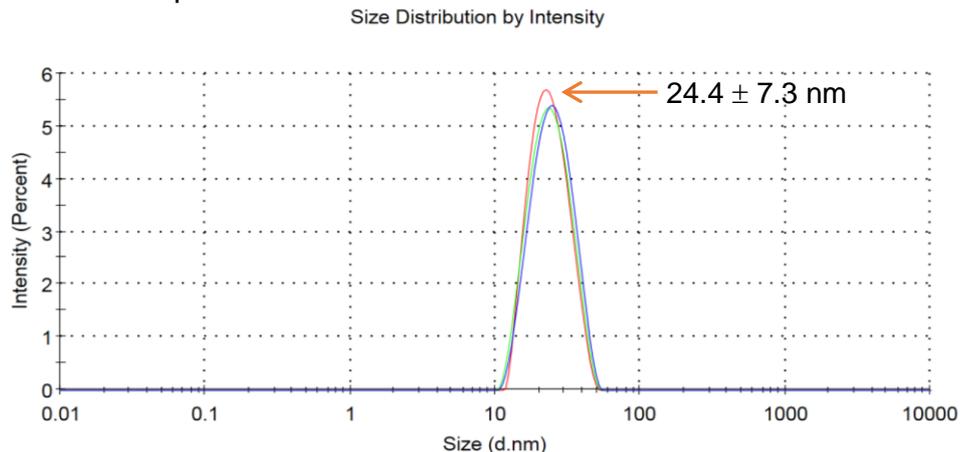


Figura 12. Distribución de tamaños por intensidad de las VLPs (VP2-SpyTag) obtenido mediante DLS.

6.5 Acoplamiento entre VLPs (VP2-SpyTag) y la proteína quimérica SpyCatcher- α -glucosidasa

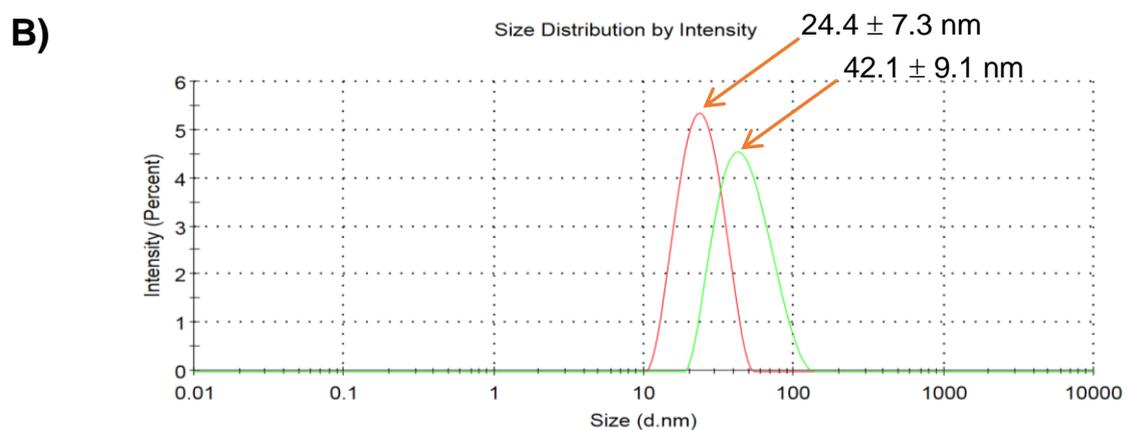
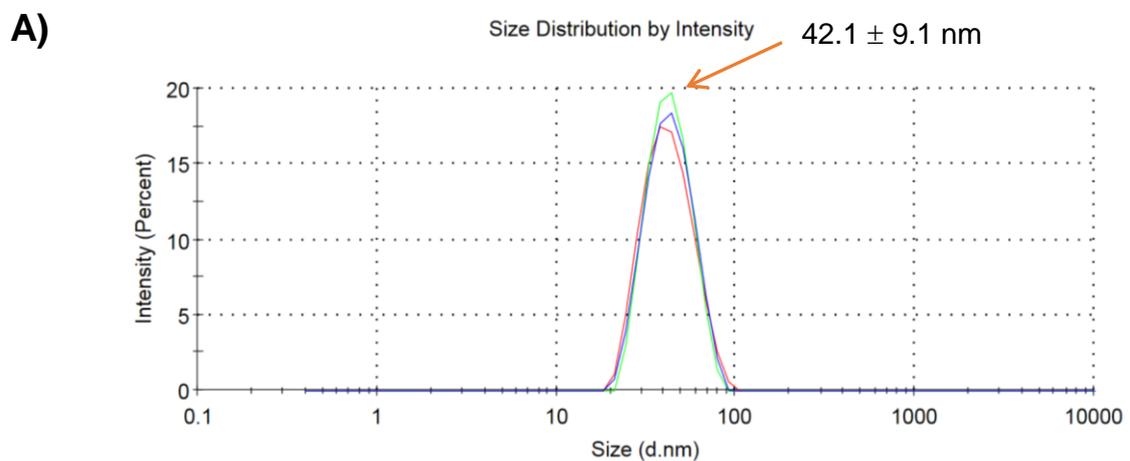
Las VLPs formadas a partir de la proteína VP2-SpyTag se pusieron en contacto con la quimera SpyCatcher- α -glucosidasa en las condiciones descritas en la sección de métodos. Debido a que durante todo el proceso de obtención de VLPs se va acumulando un conjunto de proteínas no deseadas, se optó por purificar las cápsides unidas con la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa mediante cromatografía de exclusión molecular con ayuda de un equipo de HPLC (Waters), para posteriormente poder realizar una caracterización más precisa y confiable. Para determinar el tamaño de las nuevas VLPs, se caracterizó por separado el tamaño de la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa mediante DLS (Anexo1). Al tener los tamaños de ambos sistemas proteicos por separado y asumiendo que estas VLPs presentarían el complejo SpyCatcher- α -glucosidasa a lo largo de toda su superficie, se calculó de manera teórica que la interacción podría tener un tamaño aproximado de entre 40 y 50 nm, ya que al considerar el tamaño de la enzima (~10.4 nm), esperábamos que las partículas tuvieran un aumento aproximado de 20 nm en su diámetro (10 nm de cada lado de la partícula).

Como se puede observar en la figura 13A, las VLPs unidas con la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa, presentaron un tamaño aproximado de 45 nm, el cual entra en el rango previamente calculado. Para asegurarnos que realmente se trataba de las nuevas cápsides y que ese era su tamaño aproximado, se les realizó una prueba cualitativa de actividad, donde además se comprobó que la enzima α -glucosidasa seguía presentando actividad después de la unión. En la figura 13B, se comparó la diferencia de tamaños entre las VLPs sin interaccionar y las VLPs en interacción con la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa, estas últimas tienen casi el doble del diámetro de las cápsides sin interaccionar.

Para analizar la eficiencia de acoplamiento entre el sistema VP2-SpyTag y SpyCatcher- α -glucosidasa y a su vez obtener el peso molecular aproximado de la interacción, se le corrió un SDS-PAGE donde se comparó con los pesos moleculares de ambas proteínas sin interaccionar (Figura 13C). De esta forma, se comprobó que solo algunas proteínas de la cápside interaccionan con el sistema SpyCatcher. Lo anterior probablemente se deba a que los extremos amino terminales las proteínas VP2 (región donde se encuentra unido el SpyTag), quedan expuestos únicamente en los poros que se forman en los ejes de simetría 5 de cada cápside (Kaufmann et al., 2008). También es probable que se haya agotado la quimera SpyCatcher- α -

glucosidasa, ya que aparentemente desaparece del gel (queda una banda al nivel de otras impurezas). Estas dos razones ocasionan que quede un gran porcentaje de proteína VP2-SpyTag sin reaccionar. Por otra parte, la interacción presenta un peso molecular aproximado de 135 kDa, el cual corresponde a la suma de los pesos aproximados de ambas proteínas antes de la reacción.

En cuanto a la actividad enzimática de las VLPs, se ha observado en trabajos anteriores (Bustos-Jaimes et al., 2017) que la proteína VP2 unida a alguna enzima de interés, si bien forma VLPs, el dominio correspondiente a las enzimas puede perder parcial o totalmente su actividad catalítica o función. Lo anterior suele deberse a que la proteína VP2, como ya se mencionó, se va a cuerpos de inclusión, por lo que requiere ser solubilizada y purificada en condiciones desnaturalizantes, que no son adecuadas para el correcto plegamiento de todas las proteínas. Así, algunas enzimas unidas a la proteína VP2, no logran alcanzar su conformación nativa después de ser desnaturalizadas. De aquí la gran importancia de tener un sistema como el SpyTag-SpyCatcher para producir y purificar por separado las enzimas de interés.



C)

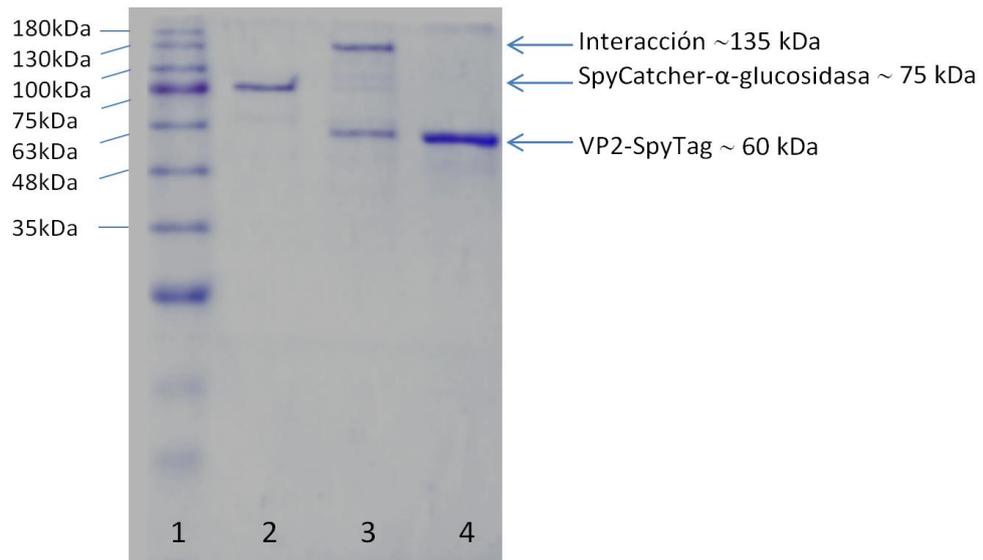


Figura 13. A) Distribución de tamaños por intensidad obtenido mediante DLS de las VLPs (VP2-SpyTag) en interacción con la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa B) Distribución de tamaños por intensidad donde se comparan los tamaños de las VLPs unidas (trazo verde) y no unidas con la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa (trazo rojo). C) Análisis por SDS-PAGE de las especies obtenidas. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, proteína SpyCatcher- α -glucosidasa; carril 3, V2-SpyTag en interacción con el SpyCatcher- α -glucosidasa; carril 4, proteína VP2-SpyTag.

Inicialmente se comprobó, mediante un ensayo cualitativo, que las VLPs acopladas a la α -glucosidasa tenían actividad catalítica, también se les realizó una prueba cuantitativa para determinar si este nuevo sistema realmente nos permite producir VLPs funcionales sin afectar negativamente a la actividad enzimática. La medición de la actividad se comparó con la actividad de la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa bajo las mismas condiciones de reacción y, como podemos ver en la Tabla 2, tanto la α -glucosidasa unida a VLPs, como la α -glucosidasa libre presentaron actividad. En los dos casos se usó la misma cantidad de enzima en moles para el ensayo enzimático. La actividad volumétrica se mantiene en el mismo orden de magnitud, e inesperadamente es tres veces mayor en la enzima unida a las VLPs que en la enzima libre. Si consideramos la masa total de proteína después de la reacción de conjugación de las VLPs con la enzima, claramente disminuye la actividad específica debido a la masa de proteína que aportan las VLPs y el sistema de acoplamiento. En este ensayo, se agregó la enzima en la concentración requerida frente a un exceso de VLPs previamente purificadas mediante HPLC, para asegurarnos que esta interactuara en su totalidad con las partículas y en función de lo anterior se realizaron las pruebas. La eficiencia de la unión se verificó por SDS-PAGE, encontrando que la fracción correspondiente a la α -glucosidasa-SpyCatcher libre desapareció de la mezcla de reacción.

Claramente se requiere un análisis más detallado, donde se compare la cinética enzimática de la enzima acoplada a las VLPs con la forma libre de la α -glucosidasa, al igual que sus estabilidades, para confirmar que existe una mejora significativa en alguna de ellas. No obstante, nuestros resultados han demostrado que es posible el uso de la tecnología SpyCatcher-SpyTag para acoplar enzimas de difícil plegamiento a las VLPs del EB19 ensambladas *in vitro*. Esto representa una gran ventaja para la producción de VNPs, las cuales no solo serían partículas funcionalizadas, sino que podrían funcionar con una enorme cantidad de enzimas de interés biomédico o comercial.

Tabla 2. Determinación de la actividad catalítica de la enzima α -glucosidasa a una concentración 39.4 nM contra pNPG 5 mM a 30 °C, en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.

Condiciones	SpyCatcher α -glucosidasa	VLPs con α -glucosidasa*	VLPs con α -glucosidasa**
Actividad volumétrica (μ moles/mL min)	0.0042 \pm 0.001	0.0124 \pm 0.005	0.0124 \pm 0.005
Actividad específica (μ moles/mg min)	0.50 \pm 0.04	1.47 \pm 0.12	0.18 \pm 0.12

*Para este valor solo se consideró la concentración de la enzima SpyCatcher α -glucosidasa.

**Para este valor se consideró la suma de las concentraciones de las VLPs y del SpyCatcher α -glucosidasa.

CONCLUSIONES GENERALES

- Es posible ensamblar VLPs *in vitro* utilizando únicamente a la proteína VP2-SpyTag. Esto se puede realizar bajo las mismas condiciones de producción que las VLPs conformadas por la proteína VP2.
- Las VLPs conformadas por la proteína la VP2-SpyTag presentaron el péptido SpyTag en su superficie, por lo cual se pudieron desarrollar cápsides funcionalizadas con la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa en su superficie. Además, se comprobó que estas partículas funcionalizadas, si tuvieron actividad catalítica.
- El sistema de interacción SpyTag-SpyCatcher logró resolver el problema de producción de enzimas que no se repliegan después de ser expuestas a condiciones desnaturalizantes, ya que permitió producir por separado a la proteína de interés y después acoplarla a las VLPs.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Se logró sintetizar exitosamente el gen de la proteína VP2-SpyTag mediante las cuatro reacciones de PCR. Así mismo, la expresión y purificación de la proteína VP2-SpyTag no tuvo ningún inconveniente, fue muy similar al de la proteína VP2.
- La prueba de actividad catalítica si bien no fue una cinética completa, nos dio indicios de que es posible que las enzimas unidas a las VLPs, presenten una mayor actividad catalítica que las enzimas libres.
- La enzima α -glucosidasa no presentó problemas de plegamiento o actividad evidentes al estar fusionada con el sistema SpyCatcher.
- La reacción de acoplamiento no presentó ninguna complicación, se llevó a cabo con buena eficiencia en las condiciones con las que trabajamos normalmente a las VLPs.
- La actividad de la proteína SpyCatcher- α -glucosidasa no se vio afectada negativamente por su acoplamiento a las VLPs de EB19.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar cinéticamente las enzimas acopladas a las VLPs de EB19 y determinar su estabilidad al almacenamiento y en condiciones de reacción de interés biológico.
- Con la finalidad de reducir las complicaciones para la funcionalización de las VLPs, se podría utilizar en un futuro el sistema SpyLigase. Este sistema actúa como una enzima que une a dos péptidos (SpyTag y Ktag), lo cual reduce el riesgo de las complicaciones en el plegamiento de la proteína adjunta que pudiera generar el SpyCatcher. O simplemente para desarrollar VLPs más compactas en su estructura.
- Con este nuevo sistema será necesario probar otras enzimas para comprobar que efectivamente no pierden su actividad, lo cual ayudará a aumentar el repertorio de opciones que se podrían tener para funcionalizar a las VLPs.
- Un paso muy importante ahora que ya se pueden desarrollar nanopartículas funcionalizadas o VNPs, será empezar a realizar pruebas en líneas celulares para ver el comportamiento que tienen dentro estos sistemas. Así mismo, sería interesante empezar a funcionalizar las VNPs con péptidos u otras proteínas, que les den un tropismo específico hacia algún tipo de tejido.
- Ahora que ya se podrán construir distintas estructuras funcionalizadas, será necesario empezar a investigar más sobre la capacidad de encapsulamiento de éstas y se tendrá que encontrar la manera de hacer este proceso más eficiente y selectivo.

REFERENCIAS

- Agbandje M., Parrish C. & Rossmann M. (1995) The structure of parvoviruses. *Seminars in Virology*. Volume 6, pp 299-309.
- Berns K. (1990) Parvovirus replication. *Microbiological Reviews*. Volume 54(3), pp 316–329.
- Bönsch C., Zuercher C., Lieby P., Kempf C., & Ros C. (2010). The Globoside Receptor Triggers Structural Changes in the B19 Virus Capsid That Facilitate Virus Internalization. *Journal of Virology*, Volume 84(22), pp 11737–11746. doi:10.1128/JVI.01143-10
- Brune K., Leneghan D., Brian I., Ishizuka A., Bachmann M., Draper S., Biswas S. & Howarth M. (2016) Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Scientific Reports* 6, Article number: 19234 doi:10.1038/srep19234.
- Bustos-Jaimes I., Soto-Román R., Gutiérrez-Landa I., Valadez-García J., Segovia-Trinidad C. (2017). Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19. *J. Biotechnol.* Volume 263, pp 55-63. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.09.014.
- Cardinale D., Carette N. & Michon T. (2012) Virus scaffolds as enzyme nano-carriers. *Trends Biotechnol*, Volume 30, pp. 369-376 doi:10.1016/j.tibtech.2012.04.001
- Cosset F. L. & Lavillette D. (2011) Cell Entry of Enveloped Viruses. *Advances in Genetics*. Volume 73, pp 121-183. doi: 10.1016/B978-0-12-380860-8.00004-5
- Chang C., Rossi E. & Goldenberg D. (2007) The Dock and Lock Method: A Novel Platform Technology for Building Multivalent, Multifunctional Structures of Defined Composition with Retained Bioactivity. *Clinical Cancer Research*. Volume 13, pp 5586-5591 doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1217
- Chen L., Wang M., Ou W., Fung C., Chen P., Chang C., Huang W., Wang J., Lin P. and Chang D. (2010) Efficient gene transfer using the human JC virus-like particle that inhibits human colon adenocarcinoma growth in a nude mouse model. *Gene Therapy*, pp 1033–1041; doi:10.1038/gt.2010.50.
- Clarke J. (2006) *Lysosomal Storage Disorders*. National Organization for Rare Disorders (NORD), Genetic Metabolic Disease Program, Toronto, Canada.
- Deng Y., Zeng J., Su H., Qu Q. (2015) Recombinant VLP-Z of JC Polyomavirus: A Novel Vector for Targeting Gene Delivery. *Intervirology*. Volume 58(6), pp 363-368 doi:10.1159/000443832.
- Douglas T., Strable E., Willits D., Aitouchen A., Libera, M. & Young, M. (2002), Protein Engineering of a Viral Cage for Constrained Nanomaterials Synthesis. *Adv. Mater.* Volume 14: pp 415–418. doi:10.1002/1521-4095(20020318)14:6<415::AID-ADMA415>3.0.CO;2-W
- Farr G., Zhang L. & Tattersall P. (2005) Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Volume 102: pp 17148-53; doi: 10.1073/pnas.0508477102.

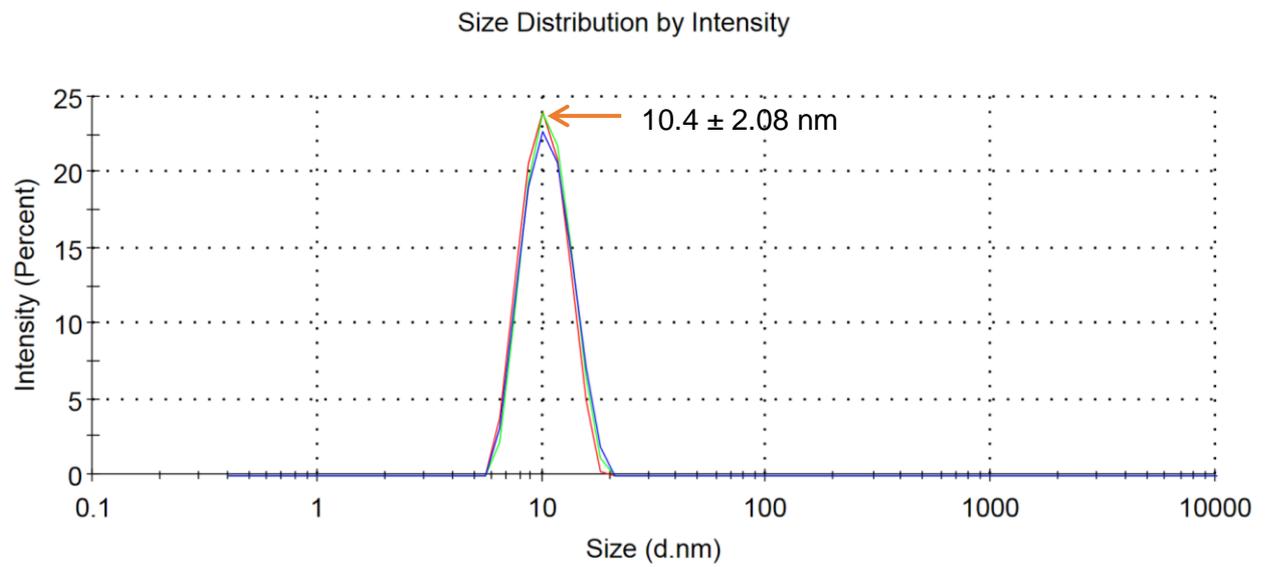
- Ge P., Tsao J., Schein S., Green T., Luo M., Zhou Z. (2010) Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science*; Volume 327(5966), pp 689-93. doi: 10.1126/science.1181766.
- Harbison C., Chiorini J. & Parrish C. (2008): The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.* Volume 16, pp 208–214. doi:10.1016/j.tim.2008.01.012
- Heegaard E. & Brown K. (2002). Human Parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews.* Volume 15(3), pp 485–505. doi:10.1128/CMR.15.3.485-505.2002
- Hoffmann D., Böker K., Schneider S., Eckermann-Felkl E., Schuder A., Komrakova M., Sehmisch S., Gruber J. (2016). In Vivo siRNA Delivery Using JC Virus-like Particles Decreases the Expression of RANKL in Rats. *Molecular Therapy Nucleic Acids.* Volume 5(3). doi:10.1038/mtna.2016.15.
- Kang H., Coulibaly F., Clow F., Proft T. & Baker E. (2007) Stabilizing Isopeptide Bonds Revealed in Gram-Positive Bacterial Pilus Structure. *Science*, Volume 318, pp. pp1625-1628. doi:10.1126/science.1145806.
- Kaufmann B., Chipman P., Kostyuchenko V., Modrow S. & Rossmann M. (2008) Visualization of the Externalized VP2 N Termini of Infectious Human Parvovirus B19. *Journal of virology*, pp 7306–7312. doi:10.1128/JVI.00512-08.
- Kaufmann B., Simpson A., & Rossmann M. (2004). The structure of human parvovirus B19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Volume 101, pp 11628–11633. doi:10.1073/pnas.0402992 101.
- Keasling J. (2005) The promise of synthetic biology. *The Bridge*; Volume 35, pp 18–21.
- Kobiler O, Drayman N, Butin-Israeli V, Oppenheim A. (2012)Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus.* Volume 3(6), pp 526-539. doi:10.4161/nucl.21979.
- Leisi R., DiTommaso C., Kempf C., & Ros C. (2016). The Receptor-Binding Domain in the VP1u Region of Parvovirus B19. *Viruses.* Volume 8(3), pp 61. doi:10.3390/v8030061
- Leisi R., Ruprecht N., Kempf C., & Ros, C. (2013). Parvovirus B19 Uptake Is a Highly Selective Process Controlled by VP1u, a Novel Determinant of Viral Tropism. *Journal of Virology.* Volume 87(24), pp 13161–13167. doi:10.1128/JVI.02548-13
- Leslie N. & Bailey L. (2007) Pompe Disease. [Updated 2017 May 11]. In: Adam M., Ardinger H., Pagon R., et al., editors. *GeneReviews®.* University of Washington, Seattle.
- Li L., Fierer J., Rapoport T., & Howarth M. (2014). Structural Analysis and Optimization of the Covalent Association between SpyCatcher and a Peptide Tag. *Journal of Molecular Biology,* Volume 426(2), pp 309–317. doi:10.1016/j.jmb.2013.10.021
- Liu F., Ge S., Li L., Wu X., Liu Z., & Wang, Z. (2012). Virus-like particles: Potential veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science.* Volume 93, pp 553–559. doi:10.1016/j.rvsc.2011.10.018
- Lombardo E., Ramírez J., Garcia J., & Almendral J. (2002) Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J. Virology*; Volume 76, pp 7049-59; doi:10.1128/JVI.76.14. 7049-7059.2002.

- Lucas W. & Knipe D. (2002) Viral Capsids and Envelopes: Structure and Function. Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. Harvard Medical School, Boston, USA. doi:10.1002/9780470015902.a0001091.pub2
- Ma Y., Nolte R.J. & Cornelissen J.J. (2012) Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advances Drug Delivery, Review*, pp. 811-825. doi:10.1016/j.addr.2012.01.005
- Maine E., Thomas V., Bliemel M., Murira A. & Utterback J. (2014) The emergence of the nanobiotechnology industry. *Nature Nanotechnology*. Volume 9, pp 2–5 doi:10.1038/nnano.2013.288
- Mani B., Baltzer C., Valle N., Almendral J., Kempf C. & Ros C. (2006) Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J. Virol*. Volume 80, pp 1015–1024. doi: 10.1128/JVI.80.2.1015-1024.2006
- Mateu M. (2011) Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Engineering, Design and Selection*. Volume 24, pp 53-63, doi:10.1093/protein/gzq069
- Mateu M. (2016) Assembly, Engineering and Applications of Virus-Based Protein Nanoparticles. In: Cortajarena A., Grove T. (eds) *Protein-based Engineered Nanostructures*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 940. pp 83-120. doi:10.1007/978-3-319-39196-0_5
- Nasir W., Nilsson J., Olofsson S., Bally M. & Rydell G. (2014) Parvovirus B19 VLP recognizes globoside in supported lipid bilayers. *Virology*; Volume 456(457), pp 364-369. doi: 10.1016/j.virol.2014.04.004.
- Namba K. & Stubbs G. (1986) Structure of tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution: implications for assembly. *Science*. Volume 231(4744), pp 1401-6.
- Ozawa K. & Young N. (1987) Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol*. Volume 61, pp 2627–2630.
- Parent K. & Teschke C. (2007) GroEL/S substrate specificity based on substrate unfolding propensity. *Cell Stress Chaperones*. Volume 12(1), pp 20–32. doi:10.1379/CSC-219R.1
- Pattenden K., Middelberg P., Niebert M. & Lipin D. (2005) Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotechnol*. Volume 23 (10), pp. 523-529. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.07.011
- Patolsky F., Timko B., Yu G., Fang Y., Greytak A., Zheng G., Lieber C. (2006) Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-density nanowire transistor arrays. *Science*, Volume 313(5790), pp 1100–1104. doi: 10.1126/science.1128640
- Pokorski J.K., & Steinmetz N. (2011) The Art of Engineering Viral Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*. Volume 8(1), pp 29–43. doi:10.1021/mp100225y
- Prasad B., & Schmid M. (2012). Principles of Virus Structural Organization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Volume 726, pp 17–47. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9_3
- Reddington S. & Howarth M. (2015) Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. *Current Opinion in Chemical Biology*. Volume 29, pp 94-99. doi:10.1016/j.cbpa.2015.10.002

- Rogo L., Mokhtari-azad T., Kabir M. & Rezaei F. (2014) Human parvovirus B19: A review. *Acta virológica*. Volume 58, pp 199 – 213. doi:10.4149/av_2014_03_199
- Rossi E., Goldenberg D. & Chang C. (2012) The Dock-and-Lock Method Combines Recombinant Engineering with Site-Specific Covalent Conjugation To Generate Multifunctional Structures. *Bioconjugate Chem.* Volume 23(3), pp 309–323. doi:10.1021/bc2004999
- Sánchez-Rodríguez S., Münch-Anguiano L., Echeverría O., Vázquez-Ninb G., Mora-Pale M., Dordick J., Bustos-Jaimes I. (2012) Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie* Volume 94, pp 870-878. doi: 10.1016/j.biochi.2011.12.006.
- Sánchez-Rodríguez S., Morán-García A., Bolonduroa O., Dordick J. & Bustos-Jaimes I. (2016) Enhanced assembly and colloidal stabilization of primate erythroparvovirus 1 virus-like particles for improved surface engineering. *Acta Biomaterialia*. Volume 35, pp 206-214. doi:10.1016/j.actbio.2016.02.024
- Santillán J., Valadez J., Morán A., Santillán H., Bustos-Jaimes I. (2015) Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Research*. Volume 201, pp 1-7. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.011.
- Santillan H. (2017). Construcción y caracterización de estructuras supramoleculares basadas en el parvovirus B19 (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Sapsford K., Algar W., Berti L., Gemmill K., Casey B., Oh E., Stewart M. & Medintz I. (2013) Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chemical Reviews*. Volume 113(3), pp 1904-2074. doi:10.1021/cr300143v.
- Sasmal P., Carregal-Romero S., Han A., Streu C., Lin Z., Namikawa K., Elliott S., Köster R., Parak W. & Meggers E. (2012) Catalytic azide reduction in biological environments. *ChemBioChem* 13, 1116–1120. doi: 10.1002/cbic.201100719
- Seow Y. & Wood M. (2009). Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. *Molecular Therapy*, Volume 17, pp 767–777. doi: 10.1038/mt.2009.41.
- Soto I. (2017) Producción, caracterización y replegamiento de una α -glucosidasa quimérica de *Saccharomyces cerevisiae* expresada en *Escherichia coli*. (Tesis de pregrado). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México.
- Soto C. & Ratna B. (2010). Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 21, pp 426–438. doi:10.1016/j.copbio.2010.07.004.
- Shah N. & Muir T. (2014). Inteins: Nature's Gift to Protein Chemists. *Chemical Science* (Royal Society of Chemistry) pp 446–461. doi:10.1039/C3SC52951G
- Storni T., Lechner F., Erdmann I., Bächli T., Jegerlehner A., Dumrese T, Kündig T, Ruedl C. & Bachmann M. (2002) Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J. Immunol.* Volume 168, pp 2880–2886. doi:10.4049/jimmunol.168.6.2880
- Telford J., Barocchi M., Margarit I., Rappuoli R., Grandi G. (2006) Pili in gram-positive pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. Volume 4(7), pp 509-19. doi: 10.1038/nrmicro1443
- Veggiani G., Zakeri B., & Howarth M. (2014). Superglue from Bacteria: Unbreakable Bridges for Protein Nanotechnology. *Trends in Biotechnology*, Volume 32(10), pp 506–512. doi:10.1016/j.tibtech.2014.08.001

- Wang Q., Lin T., Tang L., Johnson J. & Finn M. (2002) Icosahedral Virus Particles as Addressable Nanoscale Building Blocks. *Angewandte Chemie International Edition*, Volume 41, pp 459–462. doi:10.1002/1521-3773(20020201)41:3<459::AID-ANIE459>3.0.CO;2-O
- Wang W., Chen C., Lin K., Fang Y. & Lieber C. (2005). Label - free detection of small-molecule–protein interactions by using nanowire nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Volume 102(9), pp 3208–3212. doi:10.1073/pnas.0406368102
- Weigel-Kelley K., Yoder M. & Srivastava A. (2003) $\alpha 5\beta 1$ integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of $\beta 1$ integrin for viral entry. *American Society of Hematology*. Volume 102, pp 3927-393. doi:10.1182/blood-2003-05-1522
- Zakeri B., Fierer J., Celik E., Chittock E., Schwarz-Linek U., Moy V. , & Howarth M. (2012). Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 109(12), pp E690–E697. doi:10.1073/pnas.1115485109
- Zeltins A. (2012) Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Mol Biotechnol*. pp 53-92. doi:10.1007/s12033-012-9598-4

ANEXO



Anexo 1. Distribución de tamaños por intensidad de la enzima α -glucosidasa-SpyCatcher obtenido mediante DLS.