



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría en Ciencias Bioquímicas**

MODIFICACIÓN DE LAS PROPIEDADES COLOIDALES DE  
PARTÍCULAS TIPO VIRUS DE PARVOVIRUS B19

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
ERICK EDUARDO BAUTISTA GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES  
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. RUY PÉREZ MONTFORT  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ciudad de México, octubre, 2019



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.

ESTE TRABAJO CONTÓ CON RECURSOS DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT), UNAM, (IN200316 E IN205119).

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA POR LA QUE BECA QUE SE ME OTORGÓ DURANTE LOS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

TAMBIÉN SE AGRADECE EL EXCELENTE APOYO TÉCNICO DE LA M. EN C. LAURA ÁLVAREZ AÑORVE Y DE LA DRA. ISABEL VELÁZQUEZ LÓPEZ DURANTE MI ESTANCIA EN EL LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

## Dedicatoria y Agradecimientos

Agradezco a mis padres, por el apoyo incondicional que me han otorgado durante toda mi vida y que con su ejemplo me inspiran a cumplir con las metas que me propongo. Gracias por su amor, consejos e infinita paciencia.

Al Dr. Ismael Bustos, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por la tutela que me brindó, así como el excelente apoyo académico y comprensión.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Ruy Pérez Montfort y Dr. Roberto Arreguín por su colaboración, críticas constructivas y tiempo que dedicaron al desarrollo de este proyecto.

A todos mis compañeros del laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas que con su amabilidad ayudan a crear un excelente ambiente de trabajo.

Y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido formar parte de ella y por todo lo que me ha otorgado la mejor universidad del país.

*¿Qué puede ser más importante que las ciencias de la vida para cualquier ser inteligente que tenga la fortuna de estar vivo?*

*Isaac Asimov*

## Contenido

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Nanotecnología.....	3
1.2 Partículas tipo virus (VLPs).....	4
1.3 Autoensamble de proteínas .....	5
1.4 VLPs de Parvovirus B19 .....	6
1.5 Modificación de proteínas .....	9
1.5.1 Mutación de residuos.....	10
1.5.2 Modificación química .....	11
1.6 Estabilidad de VLPs .....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos particulares.....	15
5. METODOLOGÍA .....	16
5.1 Esquema general de la metodología.....	16
5.2 Análisis <i>in silico</i> de la carga superficial de la proteína VP2. ....	17
5.3 Transformación bacteriana.....	18
5.4 Verificación de la presencia del plásmido en las células transformadas .....	18
5.5 Prueba de expresión de la proteína VP2neg .....	19
5.6 Escalamiento del cultivo.....	20
5.7 Recuperación de cuerpos de inclusión .....	20
5.8 Electroforesis para verificar la existencia de VP2neg .....	21

5.9	Purificación de la proteína VP2neg por cromatografía de afinidad.....	21
5.10	Pruebas de ensamble de VLPs de proteína VP2neg .....	22
5.11	Análisis por dispersión dinámica de luz (DLS) .....	22
5.12	Generación de nuevas mutantes mediante mutagénesis dirigida .....	23
5.13	Producción de ensamblados de VP2wt.....	24
5.14.	Succinilación de lisinas reactivas de VLPsWT .....	26
5.15	Fragmentación de VP2 y VP2mod como comprobación de la modificación química .....	27
5.15.1	Fragmentación con ácido iodosobenzoico (IBA).....	27
5.15.2	Fragmentación con ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (NTCB) .....	27
5.15.3	Fragmentación con bromuro de cianógeno (CNBr) .....	27
5.16	Análisis de VP2 y VP2mod mediante espectrometría de masas MALDI-TOF .....	28
5.17	Cuantificación de residuos modificados por el método de la ninhidrina .....	28
5.18.	Pruebas de estabilidad.....	29
5.18.1	Estabilidad en el tiempo .....	29
5.18.2	Estabilidad por temperatura .....	30
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
6.1	Análisis de la carga superficial .....	31
6.2	Expresión de la proteína VP2neg.....	34
6.3	Purificación de la proteína VP2neg .....	35
6.4	Pruebas de ensamble .....	37
6.4.1	Ensamble a pH 4 .....	37
6.4.2	Ensamble a pH 6.3 .....	38
6.4.3	Ensamble a pH 7.4 .....	38
6.4.4	Ensamble a pH 8.5 .....	39

6.4.5 Cambio de pH 4→7 .....	40
6.5 Producción de variantes de VP2neg .....	42
6.6 Mutagénesis dirigida del plásmido pET22b-VP2neg.....	45
6.7 Pruebas de ensamble E344K.....	46
6.8 Modificación química de VLPs con anhídrido succínico.....	49
6.9. Fragmentación de VP2wt y VP2mod .....	54
6.10 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF .....	57
6.11 Cuantificación de residuos modificados mediante el ensayo de la ninhidrina .....	58
6.12 Pruebas de estabilidad.....	60
6.12.1 Estabilidad en el tiempo .....	60
6.12.2 Estabilidad por temperatura .....	61
7 CONCLUSIONES .....	65
7.1 Conclusión general .....	65
7.2 Conclusiones particulares .....	65
8 PERSPECTIVAS .....	66
9 REFERENCIAS .....	67

## RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs) son macromoléculas de gran interés biomédico debido a su utilidad como vacunas y acarreadores de moléculas o fármacos. Desde el año 2010 se han logrado producir VLPs de parvovirus B19 en sistemas heterólogos y se han logrado funcionalizar con distintas biomoléculas, aunque un problema de estas VLPs se encuentra en su solubilidad y estabilidad ya que tienden a agregarse con facilidad.

Este trabajo explora la posibilidad de mejorar la estabilidad térmica y en el tiempo al modificar la carga superficial de las partículas mediante dos métodos: la producción de VLPs a partir de proteína VP2 con 7 residuos mutados (K por E) y la modificación química de VLPsWT con anhídrido succínico.

En ambas aproximaciones se intentó dar una carga negativa a la proteína mediante la modificación de 7 residuos lisina que se encuentran en la superficie de la proteína y que contribuyen en gran manera a la carga positiva de la proteína.

Se encontró que la proteína con 7 mutaciones es incapaz de ensamblar en VLPs y por tal motivo, las pruebas de estabilidad únicamente se llevaron a cabo en las VLPs modificadas químicamente.

La estabilidad térmica se probó al someter VLPsWT y modificadas a una rampa de temperatura de 20 a 90° C y la estabilidad en el tiempo se comprobó al monitorear su tamaño durante 4 h en PBS con 0.4 M de GuHCl. Se encontró que las partículas modificadas químicamente pierden su tamaño promedio después de 4 h a 20 °C, en comparación con VLPsWT que bajo las mismas condiciones pierden el tamaño promedio después de 1 h. Por otro lado, al someter VLPsWT y Mod a la rampa de temperatura, las VLPsMod resisten hasta 30 minutos a 60° C mientras que una VLPWT únicamente lo hace durante los primeros 5 minutos a 30° C.

Mediante un ensayo con ninhidrina se encontró que en promedio se modifican 3 residuos por monómero de proteína VP2, aunque el número podría ser menor debido a la accesibilidad al solvente de las lisinas.

Estos resultados sugieren que es posible modificar la estabilidad térmica de las VLPs al cambiar su carga superficial, aunque cabe señalar que durante todo el proceso de modificación química ocurren pérdidas de hasta 90% de proteína por lo que se requiere encontrar un mejor método para la obtención de VLPs con estas características.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Nanotecnología

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que se encarga de la producción y la manipulación de materiales en la escala de entre 1 y 100 nanómetros. A esta escala los materiales tienen propiedades que no se aprecian en sus análogos macroscópicos, lo que se traduce en comportamientos únicos del punto de fusión, conductividad y reactividad. Además, mientras más pequeño sea el tamaño de la estructura, el área superficial del material aumenta drásticamente, lo que permite una mayor interacción entre el nanomaterial y su ambiente (Sullivan et al., 2014). Estos aspectos han hecho que se considere a la nanotecnología como una tecnología que traerá grandes revoluciones y avances en sus campos de aplicación, que van de la industria electrónica hasta la medicina y la ingeniería molecular (Jordan et al., 2012).

Actualmente existe una gran variedad de nanomateriales con potenciales aplicaciones en la medicina, entre las que se encuentran nanopartículas metálicas, liposomas, puntos cuánticos y las partículas tipo virus (VLPs, por sus siglas en inglés). Sin embargo, una de las cuestiones principales que hay que resolver es la relativa a su seguridad clínica. Hasta el momento se desconocen los efectos de muchos nanomateriales sobre la salud. Informes recientes sugieren que algunos nanomateriales pueden llegar a generar especies reactivas de oxígeno, que son tóxicas para las células cuando se producen en grandes cantidades. Igualmente, se ha visto que algunas nanopartículas metálicas (como el  $\text{TiO}_2$ ) producen inflamación del tejido pulmonar cuando se inhalan (Nel et al., 2006). Por esta razón es que los nanomateriales inorgánicos no siempre pueden utilizarse como vehículos de entrega de compuestos o como agentes de diagnóstico. Sin embargo, los nanomateriales de origen biológico como las VLPs no presentan este problema, lo cual las convierte en candidatas aptas para su aplicación en biomedicina. En este aspecto, esta rama de la nanotecnología se conoce como bionanotecnología, que hace uso de distintas técnicas biotecnológicas para su aplicación en sistemas nanotecnológicos. Cabe señalar que existe una diferencia entre bionanotecnología

y nanobiotecnología puesto que ésta última hace uso de nanomateriales de origen no orgánico (nanotubos de carbono, puntos cuánticos, nanopartículas metálica, etc.) para su aplicación en sistemas biológicos (Gómez-Peña, 2019).

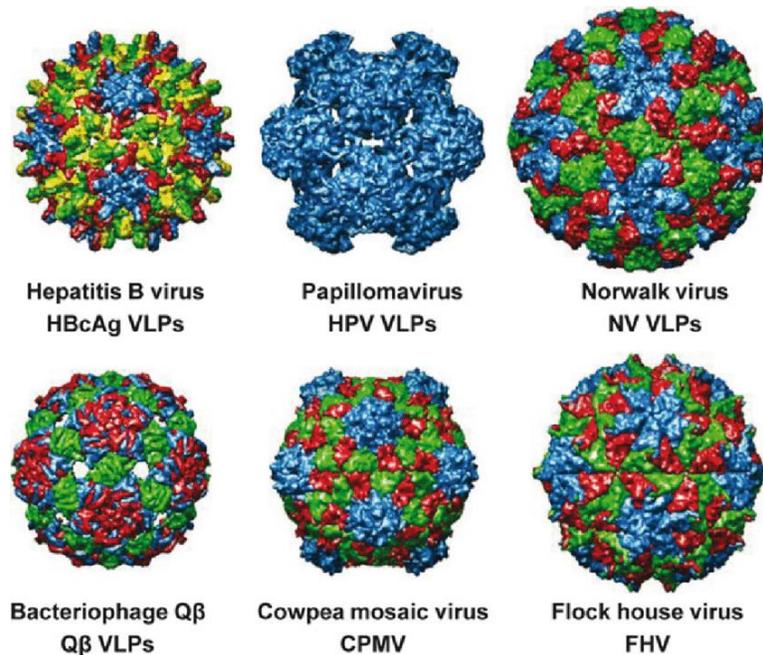
## 1.2 Partículas tipo virus (VLPs)

Las VLPs son estructuras proteicas con múltiples subunidades capaces de autoensamblarse, y cuya forma es idéntica a las cápsides de los virus de las cuales derivan. Se diferencian de los virus nativos en que no contienen material genético, y por lo tanto no son infecciosas y tampoco pueden autorreplicarse (Rodríguez-Limas et al., 2013).

Aunque se conoce la existencia de estas partículas desde principios de la década de 1960, no fue sino hasta principios del año 2000 cuando cobraron importancia debido a sus características que permiten su uso biomédico (Yan et al, 2015) ya que se ha demostrado su utilidad como vacunas contra enfermedades como la hepatitis B, la hepatitis E y el papiloma humano, y su uso de forma comercial ha ido en aumento desde el año 2010 (Zeltins, 2013).

Además de su uso en vacunas, otra aplicación potencial de las VLPs es el transporte y entrega de distintos compuestos (ADN, fármacos o nanopartículas). Esto se logra por medio de modificaciones químicas o genéticas de la superficie exterior o de las cavidades internas de las VLPs que facilitan el acoplamiento de dichos compuestos, así como su transporte hacia una célula blanco (Rodríguez-Limas et al., 2013).

De acuerdo con datos publicados en el año 2013, se sabe que se han obtenido VLPs de al menos 110 virus pertenecientes a 35 familias diferentes (Zeltins, 2013). En la **Figura 1** se observan algunos modelos estructurales de virus, a partir de los cuales es posible obtener partículas tipo virus. Debido a esta gran variedad de estructuras y a la versatilidad que tienen como acarreadores, las VLPs se han convertido en una opción interesante para aplicaciones biotecnológicas y médicas.



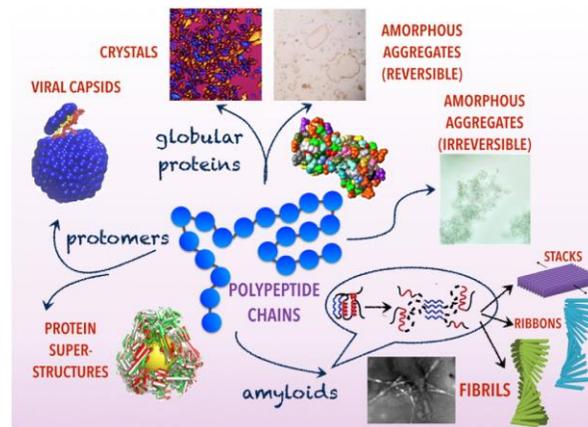
**Figura 1.** Modelos de VLPs y algunos virus utilizados para producir VLPs (Bárcena & Blanco, 2013)

### 1.3 Autoensamble de proteínas

El autoensamble de proteínas es un proceso complejo, ya que bajo distintas condiciones una proteína puede ensamblarse en estructuras diferentes. Algunas proteínas (como las VLPs) se ensamblan espontáneamente mediante mecanismos de nucleación y crecimiento en el cual se forma un núcleo crítico (se define como el intermediario más pequeño con más de 50% de probabilidades de crecer y formar una cápside completa) y posteriormente se agregan subunidades hasta completar la cápside (Perlmutter & Hagan, 2016). Para que este proceso ocurra espontáneamente es necesario que la cápside completa se encuentre en un estado de menor energía libre en comparación con las subunidades libres y como en la mayoría de las interacciones proteína-proteína, la formación de cápsides es resultado de fuerzas hidrofóbicas, electrostáticas, de Van der Waals y enlaces de hidrógeno. Cabe señalar que por lo general no hay interacciones covalentes involucradas en el ensamble de cápsides (Hagan, 2015).

Por otro lado, algunas proteínas (como las fibras  $\beta$ -amiloides) inician su proceso de autoensamble cuando ocurre un cambio conformacional perjudicial que inicia la

agregación (McManus et al., 2016) e incluso en algunos casos, como el de la hemoglobina, una mutación puntual puede provocar que las proteína se polimerice (Eaton & James, 1990). La **Figura 4** muestra las distintas estructuras que puede adquirir una proteína mediante el autoensamble.



**Figura 2.** Distintos ensamblajes que puede formar una proteína. Pueden formarse desde agregados amorfos hasta estructuras cristalinas o súper estructuras. (McManus et al., 2016).

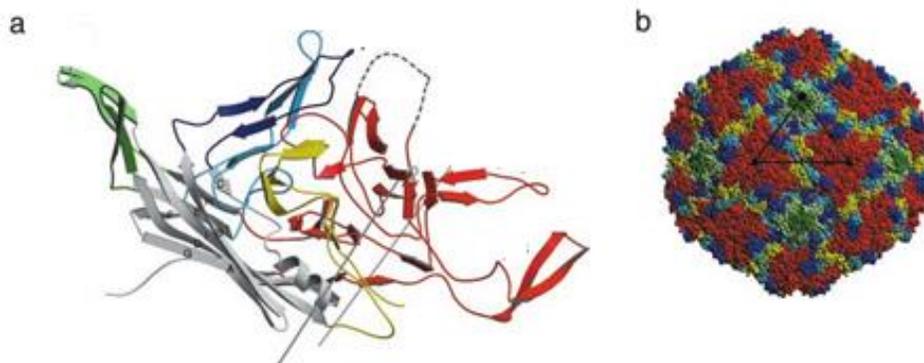
Entender los procesos por los cuales ocurre el autoensamble y la agregación de proteínas es de gran importancia para la optimización de procesos industriales y fisiológicos. Por ejemplo, se sabe que la agregación de proteínas es responsable de causar enfermedades como el Alzheimer (debido a la formación de agregados amiloides) o la anemia falciforme (debido a la polimerización de la hemoglobina). En la producción de proteínas a nivel industrial, la agregación puede dificultar los procesos de purificación o impedir su almacenamiento a largo plazo, así como su uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico (McManus et al., 2016).

#### 1.4 VLPs de Parvovirus B19

Los parvovirus son causantes de un gran número de enfermedades en mamíferos. Por muchos años, se consideró que solo el parvovirus B19 (B19V) infectaba humanos (Sico et al., 2002). Ahora se conocen al menos tres miembros más de la familia de los parvovirus capaces de infectar humanos, el bocavirus (HBoV), el

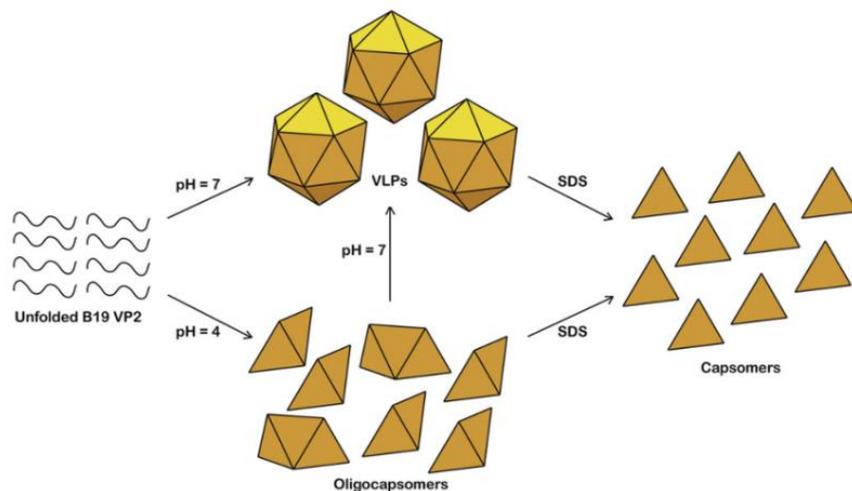
bufavirus (BuV) y el parvovirus 4 (PARV4) (Qiu et al., 2017). El B19V es un virus que fue descubierto en 1975, no envuelto, cuyo cromosoma es de DNA de cadena sencilla. Se sabe que este virus provoca la enfermedad de eritema infeccioso en infantes, así como artritis y miocarditis en adultos (Lowin et al., 2005). Las VLPs de B19V inicialmente cobraron interés debido a su posible utilización como vacuna contra la infección de este virus, pero en años recientes se ha visto su potencial como transportadores de moléculas para aplicaciones biotecnológicas (Santillán-Uribe et al., 2015).

Se sabe que la cápside del B19V está formada por dos subunidades estructurales, VP1 y VP2, con pesos moleculares de 83 kDa y 58 kDa respectivamente, que son subunidades estructuralmente idénticas, con la diferencia de que VP1 tiene 227 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal (Kaufmann et al., 2004). La cápside del virus silvestre contiene 60 subunidades de las proteínas estructurales, en una composición de 95% VP2 y solo 5% de VP1. Cuando VP1 y VP2 se expresan simultáneamente, son capaces de formar cápsides idénticas al virus silvestre. Sin embargo, se ha visto que VP1 no es necesaria para el ensamble de las cápsides, ya que la proteína VP2 es capaz de formar cápsides completas, con la misma forma estructural y de tamaño similar al virus nativo (Sico et al., 2002). En la **Figura 2a** se muestra el modelo de VP2 en su representación de caricatura, mientras que la **Figura 2b** muestra el modelo 3D del B19V.



**Figura 3.** a) Modelo en listones de la proteína VP2, b) Modelo 3D de la estructura del B19V (Kaufmann et al., 2004).

Los sistemas de expresión de las VLPs de B19V son variados e incluyen células de insecto (Gilbert et al., 2005), levaduras (Lowin et al., 2005) y *E. coli* (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). En este proyecto se utiliza el sistema de *E. coli*, en el cual, de acuerdo con lo reportado, la proteína VP2 se expresa en forma de cuerpos de inclusión en un lapso de aproximadamente 12 h. A diferencia de otras VLPs, se ha visto que su ensamble en VLPs se puede lograr al someter la proteína a procesos de desnaturalización con cloruro de guanidinio (GuHCl) 6 M a pH 7. En la **Figura 3** se observa un esquema de cómo se forman las VLPs a partir de la proteína VP2 desnaturalizada, así como la formación de capsómeros y oligocapsómeros que finalmente dan como resultado una cápside completa.



**Figura 4.** Representación esquemática de las VLPs de B19 ensambladas a partir de VP2 desnaturalizada con GuHCl (Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

También se ha demostrado que las VLPs de parvovirus B19 pueden funcionalizarse con péptidos u otras moléculas (Santillán-Urbe et al., 2015). Sin embargo, tienden a agregarse con mucha facilidad durante y después de su ensamble, lo cual evita que se aproveche toda el área superficial de las partículas, disminuye la eficiencia de las moléculas acopladas a las VLPs, ocasiona la pérdida de proteína durante los procesos de purificación, y en general dificulta su manejo mientras se trabaja con ellas.

La **Tabla 1** muestra algunas características de la proteína VP2 como el número de residuos, el punto isoeléctrico (6.53) y la carga total (-6). Si se lograra disminuir la

agregación de las VLPs al cambiar la carga de la proteína, mejorarían su función como acarreadores. En este aspecto se ha sugerido el uso de L-Arginina para mejorar la solubilidad de las partículas ensambladas a pH 7.4 y pH 8.5 debido a la interacción entre el grupo guanidinio de la L-Arginina y los residuos triptófano de las cadenas laterales de la proteína. Sin embargo, la arginina no hace más estable a la proteína, sino que apantalla los efectos de agregación por medio de su grupo guanidinio al interactuar con los residuos ácidos y aromáticos responsables de la agregación hidrofóbica y de interacciones electrostáticas no deseadas (Shah & Shaikh, 2015), evitando así la agregación de VLPs durante y después de su ensamble (Sánchez-Rodríguez et al., 2016) pero no modifica la resistencia intrínseca de las VLPs a la agregación ya que la vida media de las partículas antes de que pierdan su tamaño promedio de aproximadamente 25 nm sigue siendo relativamente baja (aproximadamente 72 h a 4 °C).

**Tabla 1.** Características de la proteína VP2.

	<b>VP2</b>
Número de residuos	561
Peso molecular (Da)	61639.35
Punto isoeléctrico teórico	6.53
Número de residuos cargados negativamente (Asp + Glu)	50
Número de residuos cargados positivamente (Arg + Lys)	42
Carga total	-6

### 1.5 Modificación de proteínas

Del estudio de proteínas nativas, se ha encontrado una relación directa entre la carga neta de una proteína y su solubilidad. Por ejemplo, una proteína es menos soluble cuando se encuentra en su punto isoeléctrico. Asimismo, se ha visto que se

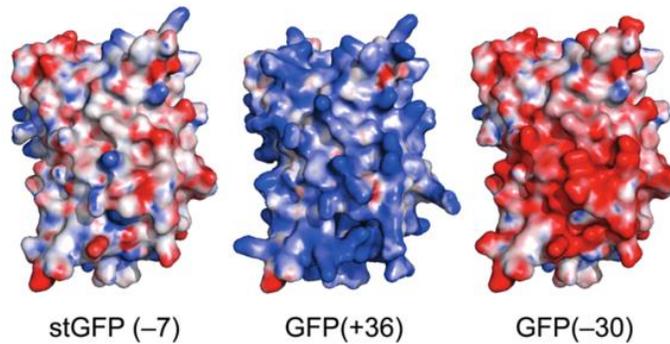
puede alterar la función de una proteína al cambiar su carga (Gitlin et al., 2006). En algunos estudios se ha propuesto que la solubilidad y resistencia a la agregación de ciertas proteínas puede incrementarse al modificar la carga superficial de la proteína, dándole una carga neta diferente a la que presenta naturalmente y sin que haya desnaturalización o pérdida de la función (Lawrence et al., 2007).

Existen dos métodos para lograr un cambio en la carga intrínseca de una proteína, mediante la mutación de residuos o mediante la modificación química.

### **1.5.1 Mutación de residuos**

En la **Figura 5** se muestran dos proteínas GFP “supercargadas”, de acuerdo con lo reportado por Lawrence et al. (2007). Las proteínas supercargadas conservaron su fluorescencia y se necesitó una mayor temperatura, en comparación con la GFP nativa, para lograr su desnaturalización.

Este tipo de modificaciones suele hacerse mediante mutagénesis sitio específica que permite la introducción de cambios a nivel del gen. Este método puede usarse para cambiar, insertar o eliminar uno o más residuos, e incluso segmentos enteros de una proteína mediante métodos de ADN recombinante. Para esta técnica suelen utilizarse oligonucleótidos sintéticos que contienen la mutación de interés y que son complementarios a la región blanco, con la excepción del sitio específico que introduce la mutación. Los oligonucleótidos hibridan con el DNA blanco y se sintetiza la cadena completa mediante el uso de una DNA polimerasa. El producto mutado se amplifica mediante PCR y posteriormente se utiliza para transformar células que contendrán el vector modificado (Cavicchioli et al., 2006).

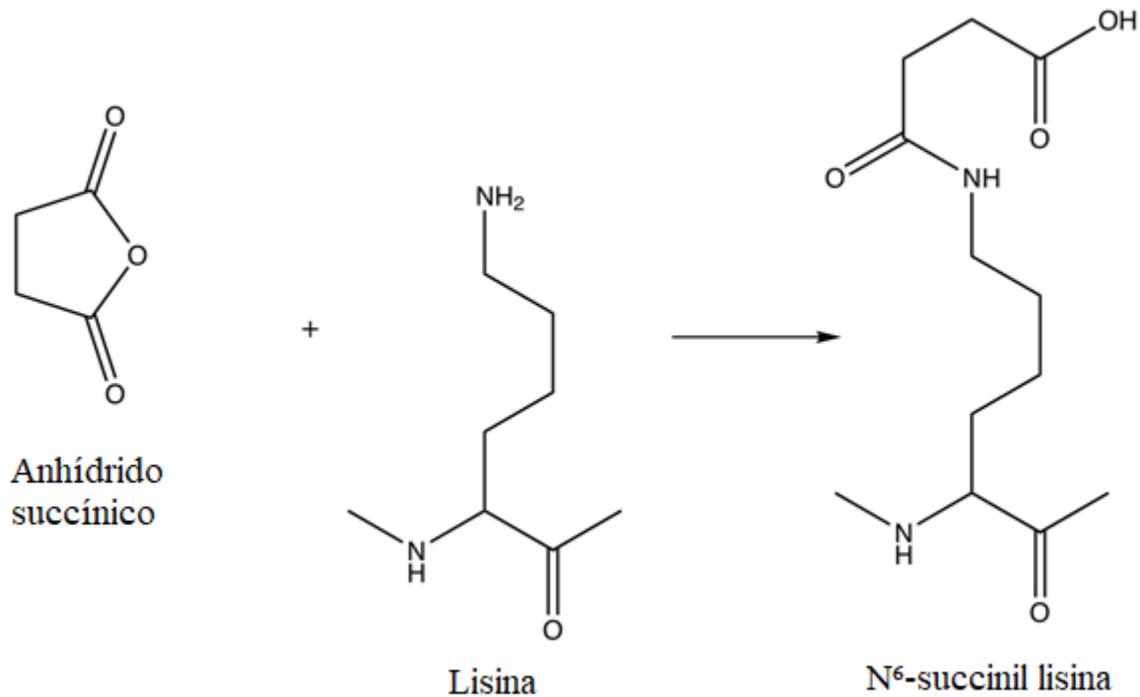


**Figura 5.** Proteínas GFP supercargadas. (Lawrence et al., 2007). De izquierda a derecha se muestran la proteína silvestre, la proteína supercargada positivamente, y finalmente la proteína supercargada negativamente.

### 1.5.2 Modificación química

Entre las técnicas que se han desarrollado en los últimos años para la modificación de proteínas, la modificación química sigue siendo de gran utilidad para el estudio de su estructura y función, así como de las modificaciones postraduccionales de las mismas (Prakash & Mazumdar, 2009). Existe en la literatura un gran número de modificaciones que pueden hacerse a los residuos de una proteína que pueden resumirse en la siguiente clasificación: Alquilaciones, acilaciones, reducciones, oxidaciones y sustitución de anillos aromáticos (Feeney et al., 1982).

Una ventaja que tiene la modificación respecto a la mutación de residuos es que la modificación se hace cuando la partícula ya está ensamblada por lo que se descarta que las subunidades no interaccionen entre sí, interaccionen de formas desconocidas, o que no ensamblen en una partícula completa. El método que se eligió es el de la succinilación mediante anhídrido succínico, ya que se sabe que las lisinas contribuyen a la carga positiva de la proteína y que la modificación química de las lisinas mediante anhídrido succínico cambian la carga positiva de la cadena lateral por una carga negativa (Zink, Wyrobnik, Prinz, & Schmid, 2016). La **Figura 6** muestra la reacción de la lisina con el anhídrido succínico.



**Figura 6.** Reacción de succinilación de las lisinas (Lundblad, 2014)

## 1.6 Estabilidad de VLPs

En la literatura se encuentran algunos casos en los que se busca modificar y mejorar la estabilidad y la plasticidad de estas partículas, esto es, la capacidad de tolerar mutaciones en su secuencia (Matthews, 2013). Así por ejemplo en el año 2015 Lu y colaboradores lograron mejorar la resistencia al desensamble de VLPs de virus de Hepatitis B al introducir aminoácidos no naturales en su secuencia y posteriormente añadir enlaces disulfuro en su superficie para mejorar su estabilidad estructural (Lu et al, 2015).

Por otro lado, el equipo de Abidin modificó un epítipo de la proteína VP1 del poliomavirus. Añadieron, dos residuos aspartato en los extremos hidrofóbicos del epítipo y con ello lograron obtener pentámeros solubles de proteína VP1 que posteriormente utilizaron para producir VLPs (Abidin et al, 2015).

Por último, cabe señalar las condiciones que afectan la estabilidad de las proteínas. Desde un punto de vista bioquímico la solubilidad de las proteínas depende de la

secuencia de residuos y cómo algunos residuos específicos se encuentran en la superficie de la proteína y expuestos al solvente. Sin embargo, desde un punto de vista coloidal y fisicoquímico, la solubilidad de las proteínas depende de factores como las propiedades del solvente, la presencia de excipientes o la temperatura (Garidel, 2013). La evaluación de las propiedades coloidales de las VLPs (solubilidad, agregación y precipitación) suele hacerse mediante dispersión dinámica de luz, dispersión estática de luz, movilidad electroforética, cromatografía y mediante la medición de absorbancia y de turbidez de las partículas en solución.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se ha visto que en algunos casos se puede mejorar la estabilidad de proteínas mediante la modificación de las cargas superficiales. Se piensa que se pueden mejorar las propiedades coloidales de las VLPs de B19V al aplicar alguno de estos métodos y así disminuir la agregación de las VLPs. Esto permitiría que se aproveche mejor el área superficial, que funcionen como transportadores más eficientes y que su manejo sea más sencillo.

De manera general, en este proyecto se planeó modificar 7 residuos expuestos en la superficie de las VLPs de B19V para modificar la carga superficial que, hipotéticamente, ayudará a evitar la formación de agregados de estas partículas. Si se demuestra que la proteína se ensambla en VLPs y que se obtiene una mejor solubilidad y estabilidad, se habrá logrado un avance en la producción de VLPs que funcionen como transportadores más eficientes.

### 3. HIPÓTESIS

Al modificar la carga superficial de la proteína VP2 de B19V mediante la mutación o modificación química de 7 residuos expuestos al solvente, sus partículas tipo virus reducirán su inestabilidad coloidal que las conduce a la formación de flóculos, mejorando así su estabilidad.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

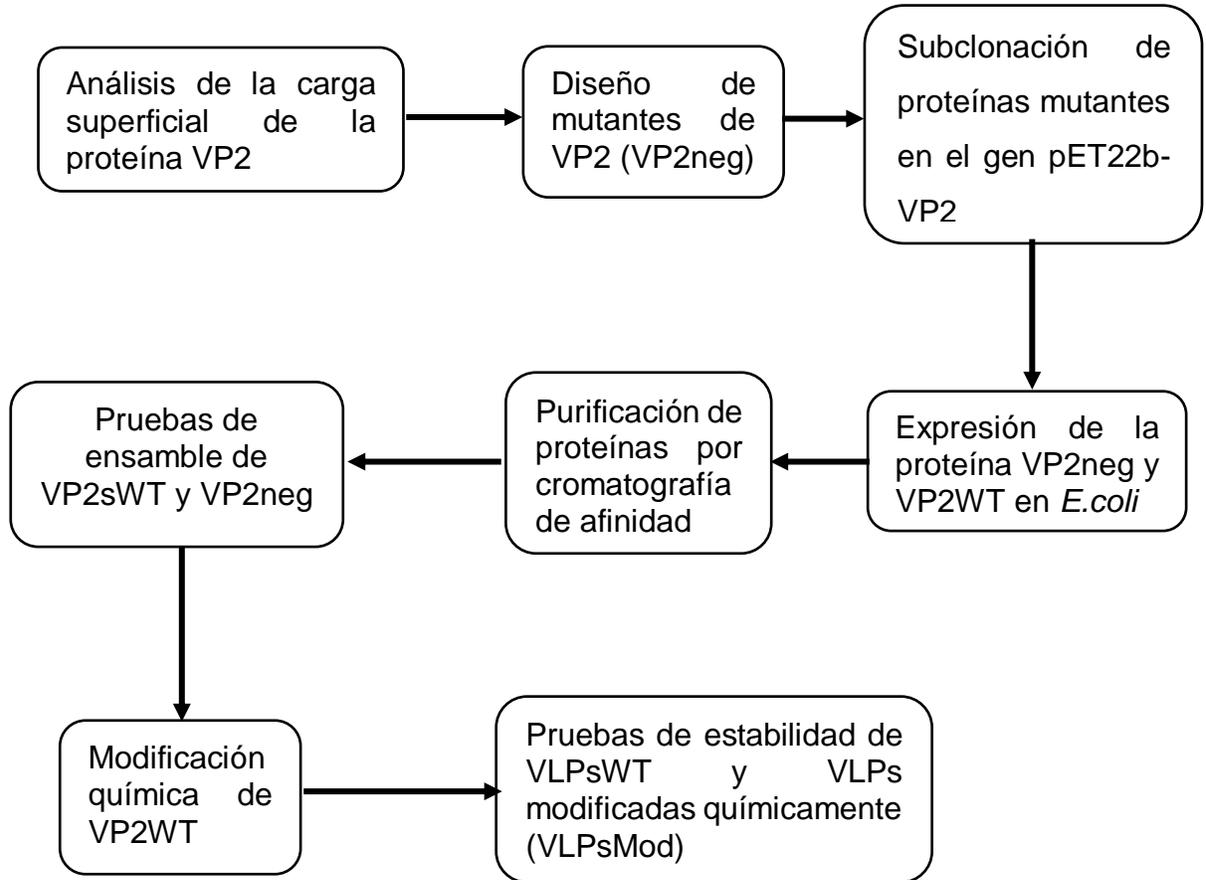
Obtener VLPs de B19V con carga eléctrica superficial diferente a la de una VLPwt y estudiar su estabilidad en función del tiempo y la temperatura.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Determinar cuáles y cuantos residuos es necesario cambiar para modificar la carga superficial de las VLPs.
- Adquirir las construcciones de ADN que incluyan las mutaciones propuestas.
- Expresar la proteína mutante en *E. coli* y conseguir su purificación.
- Determinar la capacidad de formación de VLPs a partir de proteína VP2 mutante.
- Cambiar la carga eléctrica superficial de la proteína VP2wt mediante modificación química.
- Verificar la estabilidad de las VLPs modificadas mediante dispersión dinámica de luz.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Esquema general de la metodología



**Figura 7.** Esquema general del desarrollo experimental.

## 5.2 Análisis *in silico* de la carga superficial de la proteína VP2.

Para facilitar el análisis de las partículas tipo virus de B19 y dado que la estructura del parvovirus B19 es icosaédrica (60 subunidades organizadas en 20 trímeros o 4 capsómeros de 15 subunidades), se tomó como modelo de estudio un capsómero representativo de la VLP de 15 subunidades VP2. Este modelo computacional se analizó visualmente mediante el programa “PyMol”. Para el análisis de la carga se utilizó la herramienta de APBS incluida en el programa. Esta herramienta toma en cuenta la superficie accesible al solvente y calcula la carga al resolver la ecuación de Poisson-Boltzmann para el potencial electrostático de moléculas o sistemas complejos a pH constante. Los resultados del análisis se muestran en mapas de color, donde el color rojo indica densidad de carga negativa y el azul densidad de carga positiva.

Al estudiar visualmente el potencial superficial del capsómero, se observaron zonas susceptibles de modificar y el análisis de las modificaciones de los residuos se hizo con ayuda de la herramienta de mutagénesis dirigida incluida en PyMol. Después de hacer los cambios correspondientes, se utilizó nuevamente la herramienta APBS para comparar el potencial electrostático de la proteína VP2.

Dado que la proteína nativa de VP2 presenta mayoritariamente carga negativa en su superficie de -6 por monómero de VP2, se decidió modificar a los residuos cargados positivamente para modificar la menor cantidad de residuos y así obtener una carga neta uniforme en la superficie de la VLP.

Una vez que se determinaron los residuos a modificar, se adquirió el gen de VP2 cargado negativamente (VP2neg) a una empresa externa (Epoch Life Science Inc.) que se encargó de sintetizarlo. Se tomó en cuenta los codones necesarios para su expresión en *E. coli* y con sitios de corte entre *NdeI* y *XhoI*. Esta construcción se clonó entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* del vector de expresión pET22b(+) generando que la proteína traducida esté fusionada a una etiqueta de 6 His en su extremo C-terminal. Al plásmido resultante se le denominó pETVP2neg.

### **5.3 Transformación bacteriana**

Se utilizó el plásmido pETVP2neg para transformar células *E. coli* BL21(DE3). Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de plásmido hidratado con agua destilada a 200  $\mu\text{L}$  de células electrocompetentes, cuidando no tocar el fondo del tubo debido a que las células electrocompetentes son muy sensibles al calor.

Se dejó reposar el tubo un minuto en baño de hielo y posteriormente se decantó el contenido en una celda de electroporación. La celda se colocó en el equipo de electroporación y se le dio un pulso eléctrico de 1.8 kV durante 1 ms para lograr la entrada del plásmido al interior de las células. Luego se retiró la celda del equipo y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de medio Luria-Bertani (LB) a la celda, el contenido se decantó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se colocó el tubo de microcentrífuga en incubación a 37 °C durante una hora.

Posteriormente, se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de células transformadas en una caja Petri con agar LB adicionado de ampicilina ( $\text{LB}_{\text{Amp}}$ ) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se incubó la placa a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se verificó que las células crecieran en colonias aisladas.

### **5.4 Verificación de la presencia del plásmido en las células transformadas**

Se seleccionaron dos colonias, las cuales se inocularon en tubos de ensayo con 10 mL de medio líquido  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ . Los tubos se dejaron en incubación a 37 °C durante toda la noche. Una vez que las células en el tubo alcanzaron una densidad óptica aceptable, se procedió a purificar el plásmido en las células para su uso posterior y como reserva. Se siguió el procedimiento del equipo QIAprep (QIAGEN N.V.), en el cual se decantó el contenido de los tubos de ensayo en tubos Falcon y se centrifugaron a 4400 rpm (1667 x g) durante 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 250  $\mu\text{L}$  de amortiguador P1 y el pellet resuspendido se transfirió a tubos de microcentrífuga. Posteriormente se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de amortiguador P2 y se mezcló el contenido por inversión. Luego se centrifugaron los tubos a 13000 rpm (14550 x g) durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó en una mini

columna de purificación del kit y ésta se centrifugó durante un min a 13000 rpm (14550 x g). El líquido eluido se desechó y se lavó la columna con 350 µL de amortiguador PE y se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm (14550 x g). Nuevamente se desechó el líquido eluido y se centrifugó la columna durante 1 min. Después se colocó la columna en un tubo microcentrífuga de 1.5 mL y se agregaron 30 µL de agua desionizada. Se dejaron reposar los tubos durante un minuto y luego se centrifugaron durante un min a 13000 rpm (14550 x g). Los tubos se almacenaron a 4 °C. Se verificó la existencia de plásmido en las células transformadas mediante una digestión hecha con amortiguador 2.1 (New England Biolabs), BSA 1X y las enzimas de restricción específicas para el plásmido pETVP2neg, *NdeI* y *XhoI*. Las enzimas se agregaron en último lugar para evitar su desnaturalización y pérdida de actividad. Se centrifugó el tubo y se colocó en incubación a 37 °C durante 40 min. Al término de la digestión, se preparó un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE 1X para correr una electroforesis. Se montó el sistema y se cargaron los pozos. La electroforesis se corrió a 85 V durante hora y media. Al término de la electroforesis se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio durante 20 min. Se observó el gel con ayuda de un transiluminador UV.

### **5.5 Prueba de expresión de la proteína VP2neg**

Se colocó una colonia de bacterias transformadas en 10 mL de medio LB<sub>Amp</sub>, una vez que se alcanzó una densidad óptica adecuada se agregaron 0.6 mg de IPTG para alcanzar una concentración final de 0.25 mM. El tubo se colocó en agitación a 200 rpm y 30 °C. Se hizo un monitoreo de la inducción respecto al tiempo al tomar muestras de 1 mL del cultivo cada hora durante 4 horas y una muestra más del cultivo dejado en agitación durante toda la noche. Después de tomar todas las muestras, éstas se centrifugaron durante 10 min a 4400 rpm (3000 x g), se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 100 µL de agua + 30 µL de amortiguador de carga. Posteriormente, las muestras se sometieron a baño María en ebullición durante quince minutos y se cargaron 10 µL de cada muestra en un

gel de poliacrilamida al 12% para análisis por SDS-PAGE. Se corrió la electroforesis a 150 V durante 2 h.

## **5.6 Escalamiento del cultivo**

Después de verificar la expresión de la VP2neg en tubos de 10 mL, se procedió a hacer un escalamiento a 250 mL de medio de cultivo. Primero se colocó una colonia de bacterias transformadas en un tubo con 10 mL de medio LB<sub>Amp</sub> y se dejó en agitación a 220 rpm y 37 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, se agregó el contenido del tubo dejado en agitación a un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB<sub>Amp</sub> y se colocó bajo las mismas condiciones que el tubo anterior durante dos horas. Después, a un matraz de 1 L de capacidad con 250 mL de medio LB<sub>Amp</sub> se le agregó el contenido del matraz de 500 mL y se dejó en agitación a 220 rpm y 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica 0.7. Una vez que se alcanzó la densidad óptica adecuada, se agregaron 18 mg de IPTG para alcanzar una concentración final de 0.25 mM y se colocó en agitación a 220 rpm y 30 °C durante toda la noche.

## **5.7 Recuperación de cuerpos de inclusión**

Posteriormente se centrifugó el medio de cultivo a 5000 rpm (4250 x g) a 4 °C en una botella de centrifugación de 500 mL durante 20 min. Después de centrifugar se colocó la botella de centrifugación en baño de hielo, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 mL de solución de NaCl al 0.9%. Luego se centrifugó nuevamente a 5000 rpm (4250 x g) durante 20 min y se repitió el lavado con solución de NaCl dos veces más.

Después se centrifugaron nuevamente las células, se desechó el sobrenadante de solución salina y se resuspendió el pellet en 25 mL de amortiguador A de lavado de cuerpos de inclusión (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5). Luego se vertió la solución de células en un vaso de precipitados y se sometió a sonicación

mediante ciclos de 10 s ON/10 s OFF durante 30 min. Al término de la sonicación se decantó el contenido del vaso a un frasco de centrifugación y se centrifugó durante 20 min a 8000 rpm (7650 x g).

El sobrenadante se recolectó y guardó en un tubo Falcon de 50 mL (Tubo 1) mientras que el pellet obtenido se resuspendió en 50 mL de amortiguador B (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Tritón X-100 2%, pH 7.5). Nuevamente se llevó la solución a sonicación durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 8000 rpm (7650 x g) durante 20 min. El sobrenadante se guardó para su posterior análisis (Tubo 2) y se repitió el paso anterior con amortiguador B (Tubo 3).

Por último, el extracto se centrifugó una vez más a 8000 rpm (7650 x g) durante 20 min, el sobrenadante se almacenó en un tubo Falcon y el pellet se resuspendió en amortiguador de solubilización (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 6 M, DTT 1 mM pH 8) y se colocó en agitación a 220 rpm a 37 °C durante toda la noche (Tubo 4).

## **5.8 Electroforesis para verificar la existencia de VP2neg**

Dado que el GuHCl interfiere en la electroforesis SDS-PAGE, se dializó una muestra de 50 µL del tubo 4 en agua para eliminar al GuHCl. Posteriormente, a unas muestras de 50 µL de cada tubo se agregaron 30 µL de amortiguador de carga, se colocaron en baño María a ebullición durante 15 min y luego se analizó por SDS-PAGE.

## **5.9 Purificación de la proteína VP2neg por cromatografía de afinidad**

Se utilizó una columna con 15 mL de resina Protino Ni-TED (Macherey Nagel), pre-equilibrada con 60 mL de amortiguador de solubilización sin DTT (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 6 M, pH 8). Se agregó una muestra de 40 mL de proteína solubilizada, a un flujo de 2 mL/min. Una vez que la muestra pasó por la columna se agregaron 120 mL de amortiguador de solubilización para lavar la columna. Por último, se recuperó la proteína de la columna al añadir 45 mL de amortiguador de

elución ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 6 M, Imidazol 250 mM). La proteína se almacenó en un tubo Falcon y una muestra se analizó por SDS-PAGE.

Se cambió el amortiguador de elución (Imidazol 250 mM) por amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 1mM, DTT 1 mM, GuHCl 5 mM pH 8).

La concentración de la proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA), con el uso de una curva patrón de albúmina solubilizada en amortiguador de replegamiento. La absorbancia se midió a 562 nm y la concentración se ajustó a 0.75 mg/mL.

### **5.10 Pruebas de ensamble de VLPs de proteína VP2neg**

Se ha reportado que las mejores condiciones para obtener VLPs a partir de proteína VP2 es mediante diálisis en amortiguador PBS (NaCl 250 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 7.4) a una fuerza iónica de 0.25 M y que se puede mejorar la solubilidad de la proteína VP2 al agregar L-Arg al amortiguador durante la diálisis (Sánchez-Rodríguez et al., 2016). En este trabajo, además de estudiar la condición anterior, se evaluaron otros valores de pH (4, 6.3, 7.4 y 8.5) a 0.25 M de fuerza iónica y sin agregar arginina, ya que la proteína VP2neg no presentó problemas de agregación durante las pruebas.

Se dializaron muestras de 1 mL de proteína VP2neg (0.7 mg/mL) durante 48 h con cambio de amortiguador a las 24 h, a pH 4 se utilizó amortiguador de acetatos (20 mM), amortiguador PBS a pH 6.3 y 7.4, por último, a pH 8.5 se utilizó amortiguador Tris-HCl (20 mM).

### **5.11 Análisis por dispersión dinámica de luz (DLS)**

Se utilizó el equipo Zetasizer  $\mu\text{V}$  (Malvern Instruments, UK) para determinar el tamaño de las partículas obtenidas durante la diálisis. Las muestras se filtraron con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ , se tomaron 300  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se colocaron en una celda

de 500  $\mu\text{L}$ . Se fijó la temperatura a 20°C, con índice de refracción de 1.33 y viscosidad a 1.0031, conforme a lo reportado para VLPsWT (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Se tomaron 10 mediciones para cada muestra, con 10 segundos de descanso entre mediciones.

### 5.12 Generación de nuevas mutantes mediante mutagénesis dirigida

Se crearon nuevas mutantes de VP2neg con 6 mutaciones en lugar de 7. Uno de los residuos que se había mutado con anterioridad se regresó a su estado nativo, se crearon tres variantes de la VP2neg, E300K, E344K y E396K mediante mutagénesis dirigida. Se siguió el protocolo de Agilent Technologies, QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit.

El plásmido pET22b-VP2neg (ADN templado) se obtuvo mediante lisis alcalina y extracción con fenol-cloroformo a partir de bacterias *E. coli* que contenían el plásmido de interés. La concentración del plásmido se determinó con ayuda del espectrómetro NanoDrop (ThermoFisher, Massachusetts, USA)

Se diseñaron los cebadores de la **Tabla 2** para la mutagénesis y su síntesis se encargó a Sigma-Aldrich.

Las muestras se prepararon en tubos de PCR de 200  $\mu\text{L}$ , a los cuales se añadió ADN molde (10 y 20 ng), 125 ng de los iniciadores correspondientes, 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción 10x, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP<sub>mix</sub> y se llevó a un volumen de 50  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Por último, se agregaron 3 unidades de PfuUltra DNA polimerasa y se colocaron en el termociclador con el programa que se muestra en la **Tabla 3**. Una vez que se obtuvieron los productos de PCR, se agregaron 10 unidades de enzima DpnI para eliminar el ADN templado, se incubaron los tubos de reacción 1 h a 37 °C y luego la enzima se inactivó al calentar las muestras durante 20 min a 80 °C. Por último, los productos de PCR se analizaron por electroforesis.

**Tabla 2.** Iniciadores utilizados para la mutagénesis dirigida. Se muestra en negritas el codón modificado.

Nombre del iniciador	Secuencia	T <sub>m</sub> (°C)
FVP2neg_E300K	GCACCGAAA <b>AA</b> GGCGATTCCAGC	74.8
RVP2neg_E300K	GAATCGCCTTTTTCGGTGCTTACAG	70.8
FVP2neg_E344K	GACACCGACA <b>AAG</b> TACGTTACC	60.9
RVP2neg_E344K	GTAACGTAC <b>CTT</b> GTCGGTGTCC	60.9
FVP2neg_E396K	CCGAAC <b>AA</b> AGGTACTCAGCAG	63.7
RVP2neg_E396K	GAGTACCTTTGTTTCGGGAAATAGG	64.5

**Tabla 2.** Programa de PCR utilizado para la mutagénesis dirigida.

Número	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	30 s
2	Desnaturalización	95	30 s
3	Hibridación de secuencias iniciadoras	55	1 min
4	Elongación	68	1 min/kb= 20 min
5	Repetir paso 2 19 veces	-	-
6	Fin	4	-

Se transformaron células de *E. coli DH5α* con los productos de PCR para posteriormente hacer extracción de plásmido y secuenciar al mismo. También se transformaron células de *E. coli BL21(DE3)* para poder expresar a la proteína modificada. Se hicieron pruebas de ensamble bajo distintas condiciones para la variante VP2neg\_E344K.

### 5.13 Producción de ensamblajes de VP2wt

Se obtuvieron células de *E. coli BL21(DE3)* con el plásmido que codifica para VP2wt, se hizo una prueba de expresión bajo las condiciones reportadas por Sánchez-Rodríguez et al. (30 °C, 0.25 mM IPTG) y una vez que se determinó que

la proteína se expresaba bajo esas condiciones se procedió a escalar el cultivo a 1 L. El procedimiento de obtención y lavado de cuerpos de inclusión de la proteína VP2wt fue el mismo que el que se siguió para la proteína VP2neg. En cambio, la purificación en cromatografía de afinidad fue diferente y se siguió el método empleado por Santillán-Urbe (2017) que se muestra a continuación:

Se equilibró la columna de afinidad Protino Ni-TED con 30 mL de solución A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, 2.5% v/v Glicerol, pH 7.5). Posteriormente se agregaron 20 mL de proteína VP2wt solubilizada y se recolectaron 10 mL de volumen muerto para después recolectar el frente de elución. Luego se agregaron 20 mL de solución B (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, pH 7.5). Justo antes de terminarse la solución B del reservorio de la columna se agregaron 20 mL de solución C (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, 15 mM Imidazol, pH 7.5) para posteriormente agregar 15 mL de solución D (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5). Después de que la solución D pasó por el reservorio se agregaron 20 mL de solución E (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, pH 7.5) y por último se agregaron 30 mL de solución F (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, 300 mM Imidazol, pH 7.5). Inmediatamente después de agregar la solución F se recolectaron 10 mL de volumen muerto para después comenzar a recolectar fracciones de 5 mL de proteína eluída.

Al igual que en el caso de la VP2neg, las fracciones de proteína wt se analizaron mediante SDS-PAGE para encontrar aquellas que tuvieran la mayor cantidad de proteína y mayor nivel de pureza. Dichas fracciones se juntaron y concentraron mediante tubos de filtración Amicon con tamaño de corte de 50 kDa, en este paso se sustituyó el amortiguador de la proteína por amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 1mM, DTT 1 mM, GuHCl 5 mM, pH 8).

La concentración de la proteína se cuantificó bajo las mismas condiciones que la VP2neg, mediante un ensayo con BCA, curva de calibración de albúmina y medición a 562 nm.

Para los ensambles se colocó 1.5 mL de VP2wt purificada en una membrana de diálisis y se colocó en amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10

mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, pH 7.4) con 0.2 M de L-Arg en agitación constante, según lo reportado por Santillán-Urbe (2017) . Se hizo cambio de amortiguador a las 24 h y el tiempo total de diálisis fue de 48 h. Al término de la diálisis se analizaron los ensambles mediante dispersión dinámica de luz para comprobar que tuvieran el tamaño adecuado.

#### **5.14. Succinilación de lisinas reactivas de VLPsWT**

Una vez que se obtuvieron los ensambles de VP2wt, se procedió a cambiar el amortiguador en el que se encontraban ( $\text{PBS}_{0.2 \text{ M Arg}}$ ) dado que la arginina podría interferir en la reacción de succinilación. Se cambió el PBS con arginina por PBS con diferentes concentraciones de GuHCl, se analizó bajo que concentración de GuHCl las VLPs permanecen ensambladas y una vez determinada los subsecuentes cambios de amortiguador se hicieron bajo las mismas condiciones

Después del cambio de amortiguador se agregó una cantidad de anhídrido succínico igual a 20 veces exceso molar respecto a los residuos lisina presente en los ensambles. Esta reacción tiende a bajar el pH, por lo cual se ajustó el pH con 0.4 M NaOH. Una vez que la reacción terminó (esto es, cuando ya no hubo cambio de pH) se incubó la proteína durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se midió en el DLS para verificar que hubiera partículas de tamaño adecuado. Después se colocó a dializar una muestra de 50  $\mu\text{L}$  de proteína contra  $\text{dH}_2\text{O}$  y se comparó su tamaño respecto a VP2wt mediante SDS-PAGE. La proteína restante se sometió a fragmentación química para comparar sus fragmentos respecto a los de VP2wt con el fin de encontrar diferencias en su tamaño que indiquen la correcta succinilación de las lisinas reactivas.

## **5.15 Fragmentación de VP2 y VP2mod como comprobación de la modificación química**

Se fragmentaron muestras de VP2wt y VP2Mod con el fin de comparar el peso de los fragmentos resultantes y así comprobar la modificación química.

### **5.15.1 Fragmentación con ácido iodobenzoico (IBA)**

Se siguió el protocolo desarrollado por Fontana et al. (1983), para lo cual la proteína VP2mod fue liofilizada y resuspendida en 200  $\mu$ L de ácido acético al 80% con 4 M de GuHCl. Posteriormente se agregó 1 mg de IBA y se incubó a temperatura ambiente durante 20 h.

### **5.15.2 Fragmentación con ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (NTCB)**

Se siguió en este trabajo es el de un solo paso para ello se preparó una solución de 1 M Glicina y 4 M GuHCl, se liofilizó la proteína y se resuspendió en 200  $\mu$ L de la solución anterior. Inmediatamente se agregaron 10 mg de NTCB y se ajustó el pH a 10 con NaOH. La proteína se incubó a 37 °C durante 16 h.

### **5.15.3 Fragmentación con bromuro de cianógeno (CNBr)**

Se liofilizó la proteína y se resuspendió en 200  $\mu$ L de ácido fórmico al 70%. Se añadió un pequeño cristal de CNBr y se incubó durante 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

Una vez concluido los procesos de fragmentación, se colocaron a dializar muestras de 50  $\mu$ L contra  $dH_2O$  y se analizaron mediante SDS-PAGE para verificar su fragmentación.

## 5.16 Análisis de VP2 y VP2mod mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Los análisis se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM, con apoyo del Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros. Se utilizó un espectrómetro de masas Bruker Microflex MALDI acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (TOF), el cual separa los iones y relaciona el tiempo que tarda la muestra en llegar al detector con sus valores de  $m/z$ . Para volatilizar las muestras se utilizaron matrices de ácido sinapínico (SA), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y SA:DHB 1:1 en proporción 1/5 muestra/matriz para ambas muestras.

## 5.17 Cuantificación de residuos modificados por el método de la ninhidrina

Se utilizó una modificación del protocolo descrito por Sun et al. (Sun et al., 2006). Se disolvieron 100 mg de ninhidrina y 15 mg de Hidrindantina en 3.75 mL de DMSO, posteriormente se añadieron 1.25 mL de amortiguador de ácido acético y acetato de sodio. Se tomaron muestras de 500  $\mu\text{L}$  de proteína y se les añadió 375  $\mu\text{L}$  de la disolución de ninhidrina a cada una, e inmediatamente se llevaron a incubación en baño María a 80  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron las muestras en hielo y se agregó 1 mL de etanol al 50% para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 570 nm. Se utilizó amortiguador  $\text{PBS}_{0.4\text{ M GuHCl}}$  con reactivo de ninhidrina como blanco y una curva patrón de glicina (0 a 2.7  $\mu\text{moles}$ ) para la cuantificación del número de lisinas modificadas.

De acuerdo con la ecuación (1), es posible encontrar los moles de proteína que se encuentran en la muestra.

$$\text{moles de proteína} = \frac{[\text{proteína}] (V)}{MW_{\text{proteína}}} \quad (1)$$

Donde,  
 $[\text{proteína}] = \text{concentración de la proteína en mg/ml}$   
 $V = \text{Volumen}$

$MW = \text{peso molecular de la proteína}$

Además, puede obtenerse la razón de moles de grupos amino libres respecto a los mmoles de proteína, es decir  $\frac{\text{moles } NH_2}{\text{moles proteína}}$  para cada muestra que indica el número de grupos amino libres. En la ecuación 2 se observa que, si en cada muestra hay la misma cantidad de moles, entonces puede obtenerse el número de grupos amino que no se modificaron en las VLPs.

*Si moles WT = moles Mod:*

$$\frac{\frac{\text{moles } NH_{2WT}}{\text{moles WT}}}{\frac{\text{moles } NH_{2Mod}}{\text{moles Mod}}} = \frac{\text{moles } NH_{2WT} (\text{moles Mod})}{\text{moles WT} (\text{moles } NH_{2Mod})} = \frac{\text{moles } NH_{2WT}}{\text{moles } NH_{2Mod}} \quad (2)$$
$$= \frac{\text{grupos amino libres en las VLPsWT}}{\text{grupos amino libres en las VLPsMod}}$$

*= proporción de residuos no modificados respecto a los modificados.*

Es posible determinar el número de residuos modificados a partir de la proporción de residuos no modificados si se conoce el total de residuos que pueden modificarse

## 5.18. Pruebas de estabilidad

Se comprobó la estabilidad de las VLPs al medir mediante DLS el tiempo que tardan en perder su tamaño promedio (entre 22 y 26 nm), ya sea que el tamaño aumente (agregación) o que disminuya (desensamble), bajo las condiciones en las que se lleva a cabo la modificación con anhídrido succínico (PBS 0.4 M GuHCl, pH 7.4, 20 °C) y también al someterlas a temperaturas entre los 20 y 90 °C.

### 5.18.1 Estabilidad en el tiempo

Se tomaron muestras de 300 µL de VLPs, ensambladas con VP2wt o con VP2mod, en amortiguador PBS con 0.4 M de GuHCl, pH 7.4 y se monitoreó su tamaño por DLS durante 4 h a 20 °C.

### **5.18.2 Estabilidad por temperatura**

Se tomaron muestras de 300  $\mu$ L de VLPs modificadas y no modificadas, y se sometieron a una rampa de temperatura de 20 a 90  $^{\circ}$ C, se midió el tamaño por DLS por cada aumento de 10  $^{\circ}$ C. Para verificar que las partículas conservan su tamaño a dichas temperaturas, y no solo durante las mediciones, se monitoreó el tamaño de las partículas a una temperatura fija durante 35 min.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis de la carga superficial

Después de inspeccionar visualmente la superficie del oligocapsómero de proteína VP2, se encontró que la carga superficial es principalmente negativa (**Figura 8a**) aunque también existen regiones de carga positiva. Dado que se observan menos regiones de carga positiva, se decidió modificar los residuos que las componen con el fin de obtener una carga homogénea negativa en la superficie de la proteína. De otra forma, si se quisiera obtener una proteína con carga superficial homogénea positiva, se requeriría un mayor número de residuos modificados. En la **Tabla 4** se muestran los 11 residuos que se encontraron en las zonas de carga positiva, estos residuos se encuentran en la superficie de la proteína, aunque cabe señalar que no todos se encuentran completamente expuestos al solvente. Se reemplazaron los 11 residuos *in silico* por residuos glutamato con ayuda de la herramienta de mutagénesis dirigida de PyMol.

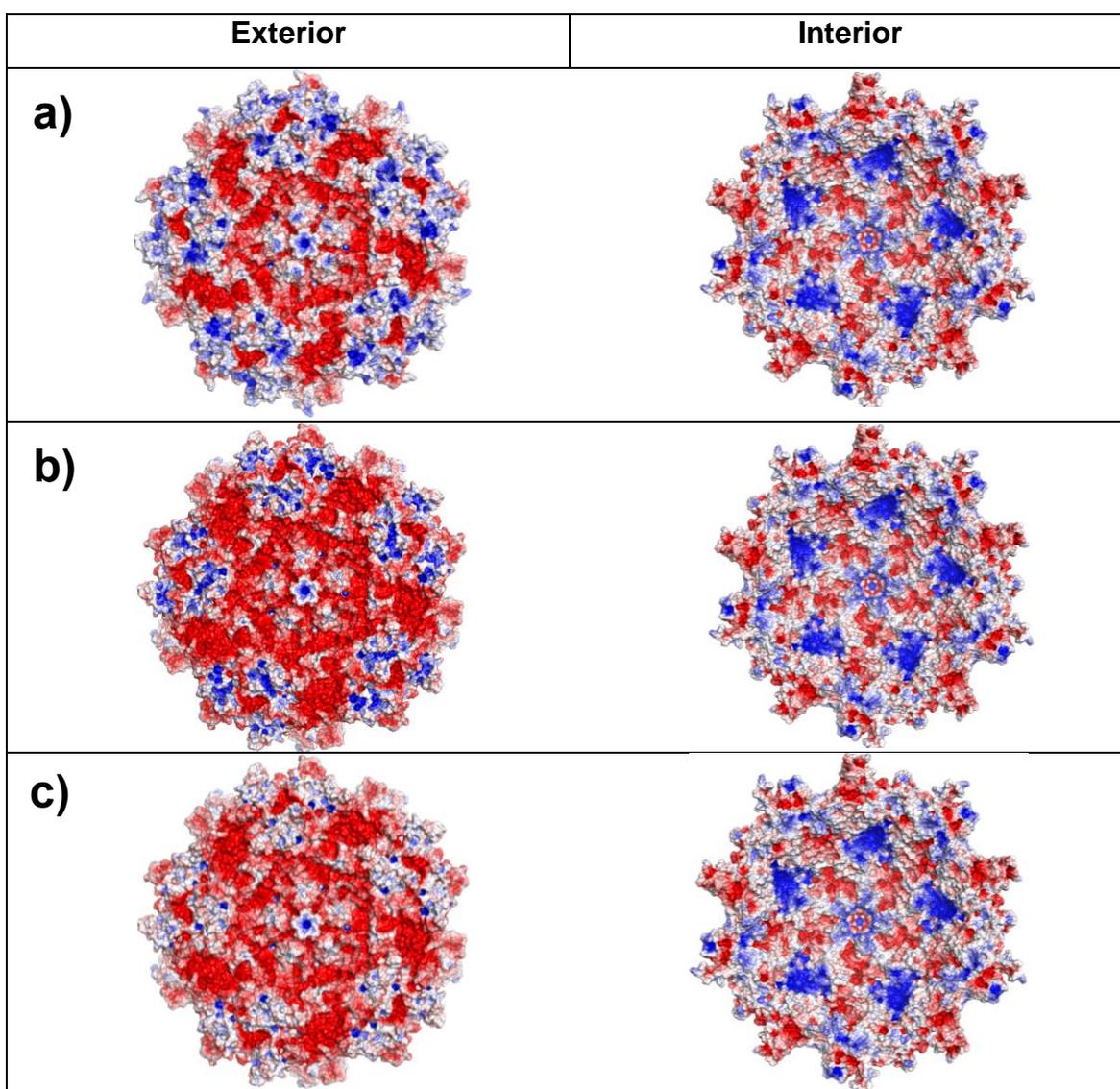
**Tabla 3.** Residuos inicialmente propuestos para modificar en la proteína VP2

Residuo	Número
Lys	70, 300, 344, 365, 396, 471 y 531
Asn	66, 323 y 395
Gln	399

Al hacer las modificaciones correspondientes, la carga negativa aumentó sobre la superficie de la proteína. Cabe aclarar que no se obtuvo una carga homogénea en toda la superficie de la proteína, ya que como se observa en la **Figura 8b**, todavía hay zonas neutras y de carga positiva, aunque en comparación con la proteína wt se observa que el cambio es lo suficientemente significativo, ya que como se muestra en la tabla 4, la carga total de la proteína VP2 pasa de -6 a -22 y este cambio podría modificar su solubilidad. Dado que se sabe que incluso una mutación en una proteína puede alterar en gran manera sus propiedades y comportamiento, se decidió reducir el número de residuos modificados de 11 a 7, con el fin de reducir

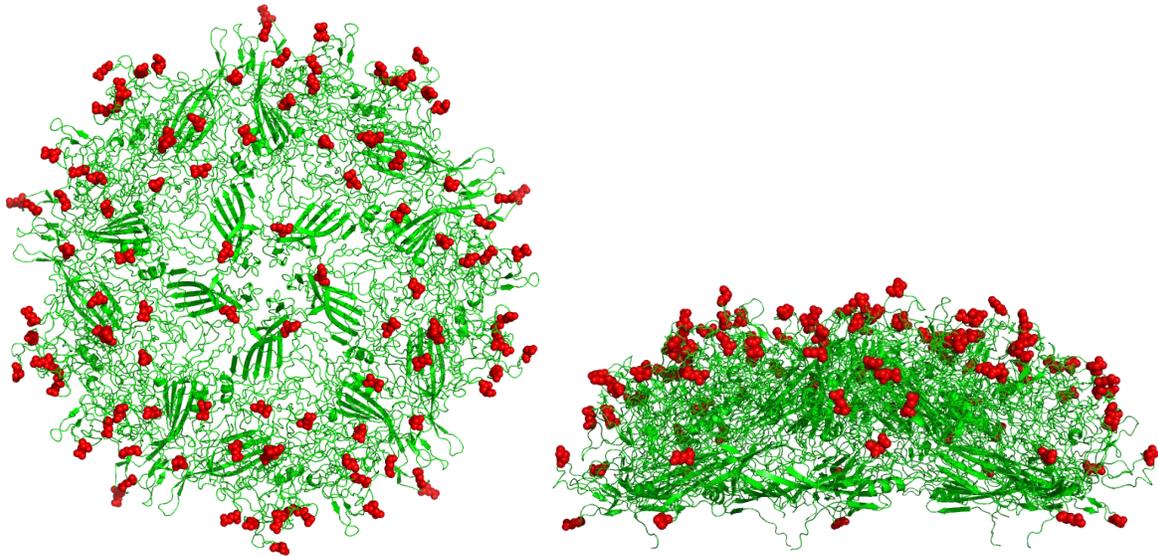
el riesgo de obtener resultados no deseados en el plegamiento o comportamiento durante la formación de ensamblajes de VLPs.

Se encontró que, para generar una superficie con carga relativamente homogénea y negativa, son necesarias 7 modificaciones. Los 7 residuos que finalmente se modificaron fueron Lys, correspondientes a los residuos 70, 300, 344, 365, 396, 471 y 531. Cabe señalar que los 7 residuos modificados se encuentran altamente expuestos al solvente. También se observa en columna derecha de la **Figura 8** que la carga interior del oligocapsómero permanece igual en todos los casos.



**Figura 8.** Carga superficial de un oligocapsómero de VP2. La columna izquierda muestra la superficie externa y en la columna derecha se observa la superficie interna a) Oligocapsómero sin mutaciones, b) Oligocapsómero con 11 mutaciones y c) Oligocapsómero con 7 modificaciones

En la **Figura 9** se observa la representación en listones del capsómero de VP2, con los residuos modificados en distintos colores. Se muestra que los residuos elegidos están en la superficie externa del oligocapsómero.



**Figura 9.** a) Vista superior del oligocapsómero de VP2 con 7 modificaciones y b) Vista lateral del oligocapsómero. Los residuos modificados se muestran en colores distintos.

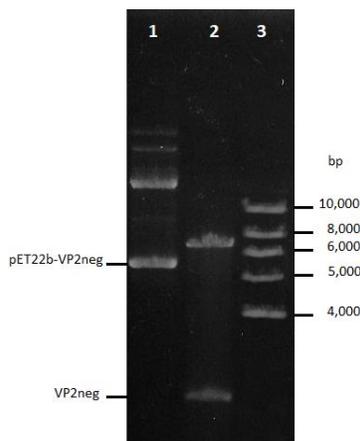
Con ayuda del servidor “PeptideMass” de ExPasy Tools, se obtuvieron algunas propiedades teóricas de la VP2 y de la VP2neg. En la **Tabla 5** se observa la comparación entre VP2 nativa y VP2neg. Se observa que el peso molecular varía en aproximadamente 6.63 Da y la carga neta, resultado de sumar todos los aminoácidos cargados (Asp, Glu, Arg y Lys), pasa de -6 en la proteína nativa a -22 en la VP2neg.

**Tabla 4.** Propiedades de la proteína VP2 comparadas con las de la VP2neg. Se muestra el peso molecular, punto isoeléctrico, número de residuos cargados y la carga total de las proteínas.

	<b>VP2</b>	<b>VP2neg</b>
Número de aminoácidos	561	561
Peso molecular (Da)	61639.35	61645.98
Punto isoeléctrico teórico	6.53	5.60
Número de residuos cargados negativamente (Asp + Glu)	50	57
Número de residuos cargados positivamente (Arg + Lys)	42	35
Carga total	-6	-22

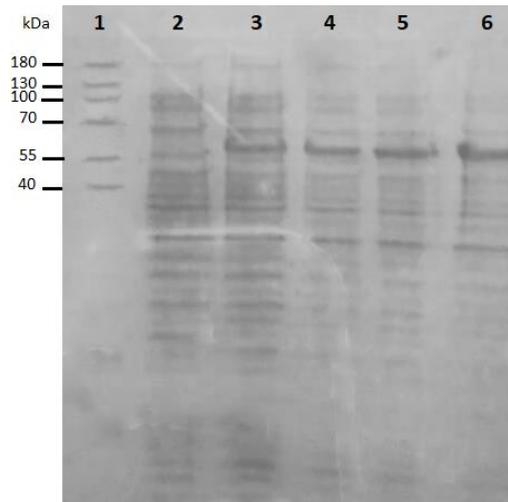
## 6.2 Expresión de la proteína VP2neg

Una vez que se obtuvo el plásmido sintetizado pETVP2neg y que se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con dicho plásmido, se verificó la existencia del plásmido en las células mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los resultados de la electroforesis se muestran en la **Figura 10**. Se observa en el carril 3 que aparece la banda correspondiente a VP2 (1663 pb).



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa, se muestra en **1)** Plásmido sin digerir, **2)** plásmido digerido y **3)** Marcador de peso molecular.

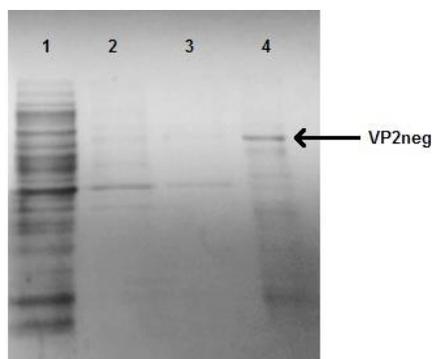
Posteriormente, se procedió a expresar la proteína VP2neg en las células de *E. coli*, se tomaron muestras de la inducción cada hora y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los resultados de la electroforesis se muestran en la **Figura 11**. Aunque el marcador de peso molecular no se distingue con claridad, la proteína VP2neg (58 kDa) se observan con claridad.



**Figura 11.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de la prueba de expresión en *E. coli* BL21(DL3). **1)** Marcador de peso molecular; **2)** Muestra sin inducir; **3)** 1 h de inducción; **4)** 2 h de inducción; **5)** 3 h de inducción y **6)** 12 h de inducción.

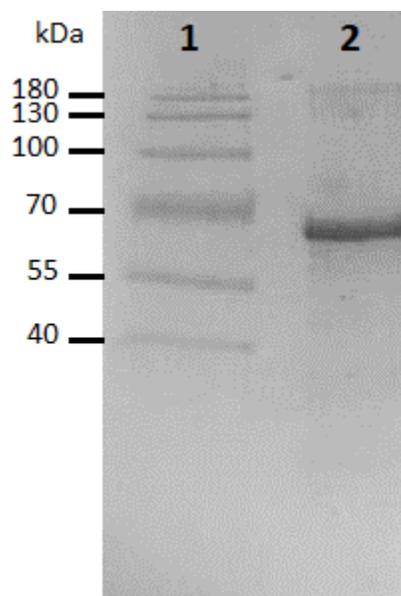
### 6.3 Purificación de la proteína VP2neg

En la **Figura 12** se muestra el análisis por electroforesis del lavado de cuerpos de inclusión. Se observa que la banda para VP2 aparece únicamente en la muestra solubilizada con GuHCl (carril 4). De dicha imagen se obtiene que la VP2neg también se expresa en forma de cuerpos de inclusión.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de la recuperación de cuerpos de inclusión. 1) Sobrenadante de células lisadas, 2) Primer lavado con buffer B, 3) Segundo lavado con buffer B y 4) Proteína solubilizada con GuHCl y posteriormente dializada.

Una vez que se purificó la proteína VP2neg mediante cromatografía de afinidad, (centricones). se tuvo que reconcentrar mediante tubos de ultrafiltración Millipore con tamaño de corte de 50 kDa para que fuera visible en la SDS-PAGE. La **Figura 13** muestra a la proteína VP2neg en el carril 2, se observa que la banda corresponde al tamaño deseado (58 kDa). Por último, el rendimiento promedio de proteína purificada fue de 25 mg por cada litro de cultivo.



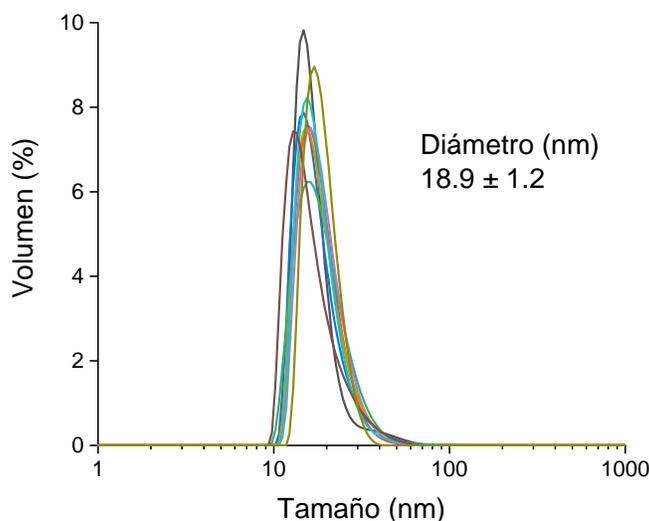
**Figura 13.** Proteína VP2 concentrada mediante tubos de ultrafiltración. 1) Marcador de peso molecular, 2) Proteína purificada.

## 6.4 Pruebas de ensamble

En las figuras 14 a 18 se muestran los resultados obtenidos por DLS después de dializar 1 mL de muestra durante 48 h. Se muestran las gráficas en orden ascendente, del pH más ácido (pH 4) al más básico (pH 8.5). Se hicieron 10 mediciones por muestra con 10 segundos de espera entre mediciones. Cada color en las gráficas representa una medición.

### 6.4.1 Ensamble a pH 4

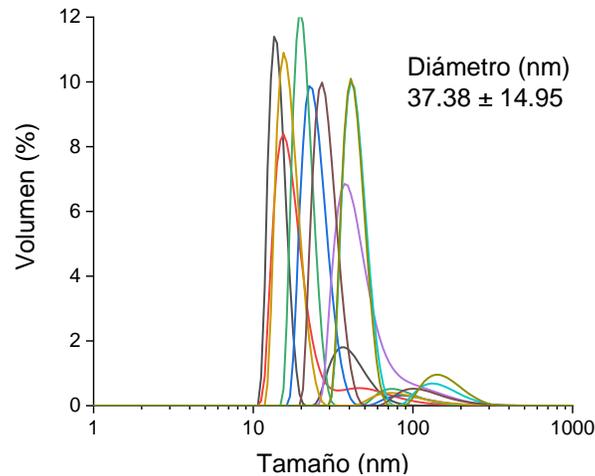
En la **Figura 14** se muestra el tamaño de las partículas obtenidas al dializar 1 mL de muestra en amortiguador de acetatos a pH 4. Se observa que hay varias especies en la muestra, aunque las especies mayoritarias tienen tamaños de entre 15 a 17 nm. Lo anterior indica que la muestra no es monodispersa y que es posible que bajo estas condiciones lo que se obtiene son oligocapsómeros de VLPs.



**Figura 14.** Análisis por DLS de las partículas dializadas en amortiguador de acetatos a pH 4. Tamaño promedio  $18.9 \pm 1.2$  nm

### 6.4.2 Ensamble a pH 6.3

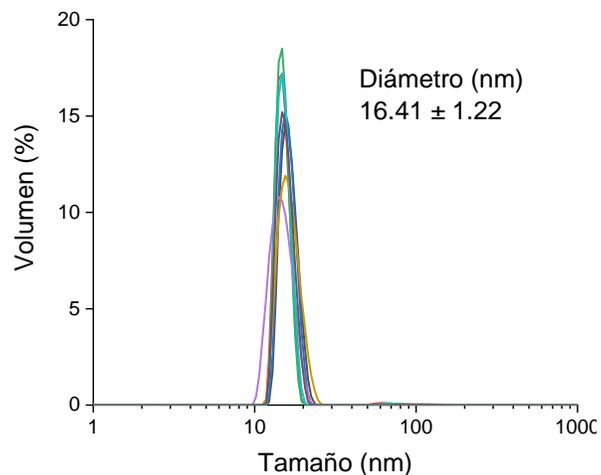
La **Figura 15** muestra el tamaño de las partículas obtenidas a pH 6.3 en amortiguador PBS. Nuevamente se observan un gran número de especies de distintos tamaños. Las especies mayoritarias tienen tamaños que van de los 12 a los 16 nm. Sin embargo, también se observan agregados de partículas de 30, 60 y algunos mayores a los 100 nm. No se observaron partículas del tamaño deseado. Es posible que los agregados se hayan formado debido a que el amortiguador se encuentra muy cerca del límite de amortiguamiento del PBS (pH 5.8-7.8), lo cual facilita que se formen agregados de proteína al haber variaciones de pH.



**Figura 15.** Análisis por DLS de las partículas obtenidas a pH 6.3 en amortiguador PBS. Tamaño promedio  $37.38 \pm 14.95$  nm

### 6.4.3 Ensamble a pH 7.4

En la **Figura 16** se muestra que a pH 7.4 las especies mayoritarias de partículas tienen diámetros que van de los 10 a 17 nm. Aunque hay partículas del tamaño deseado (25 nm), éstas representan menos del 1% del total de partículas en la muestra. Al igual que en los casos anteriores, se propone que las partículas observadas pueden ser oligocapsómeros de proteína VP2neg.

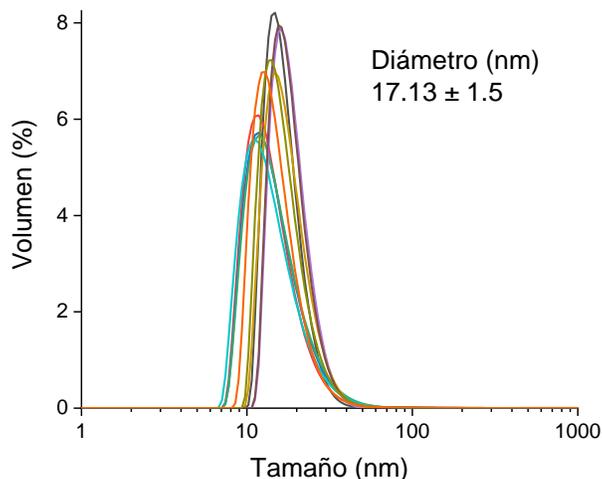


**Figura 16.** Distribución por volumen de las partículas obtenidas a pH 7.4 en amortiguador PBS. Tamaño promedio  $16.41 \pm 1.22$  nm

#### 6.4.4 Ensamble a pH 8.5

A pH 8.5, se obtuvieron resultados similares a los del ensamble a pH 7.4, ya que tal y como se muestra en la **Figura 17**, las especies mayoritarias tienen tamaños entre 12 y 17 nm, con porcentajes más bajos de otras especies de mayor tamaño.

Aunque se ha propuesto que las partículas observadas corresponden a oligocapsómeros intermedios de la formación de VLPs, también es probable que las subunidades de VP2 interactúen entre ellas de formas distintas a las esperadas que dan como resultado estructuras diferentes a las de las VLPs.

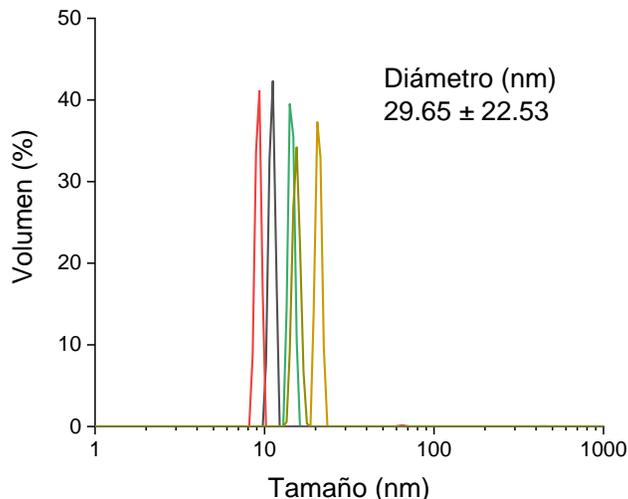


**Figura 17.** Análisis por DLS de la muestra de VP2 dializada a pH 8.5 en amortiguador Tris-HCl. Tamaño promedio  $17.13 \pm 1.5$  nm

#### 6.4.5 Cambio de pH 4→7

Dado que se ha visto que es posible obtener VLPs completas a partir de oligocapsómeros al pasar de pH 4 a 7, se decidió hacer una última prueba de ensamble bajo estas condiciones. Se dializó 1 mL de VP2neg durante 48 h en amortiguador de acetatos a pH 4 (con cambio de amortiguador a las 24 h), posteriormente se colocó la muestra en amortiguador PBS a pH 7.4 durante 18 h y luego se analizó por DLS para determinar si con este tratamiento es posible obtener VLPs del tamaño deseado.

La **Figura 18** muestra el tamaño de las partículas obtenidas, las cuales tuvieron diámetros de 10 a 12 nm. Aunque al hacer el cambio de pH se observó que la proteína comenzó a precipitarse, no se observaron agregados de gran tamaño en las mediciones del DLS.



**Figura 18.** Prueba de ensamble mediante el cambio de pH de la muestra (pH 4 → pH 7.4). Tamaño promedio 29.65 nm ± 22.53 nm

De los análisis por DLS de las pruebas de ensamble se concluye que no es posible obtener VLPs completas a partir de la proteína VP2neg. Es posible que la proteína no ensamble en VLPs debido a que las subunidades VP2neg interactúan entre ellas de forma diferente a la esperada debido a la nueva distribución de carga, por ejemplo, que la superficie exterior negativa sea atraída por la carga positiva del interior, dando como resultado subunidades VP2neg superpuestas una sobre otra.

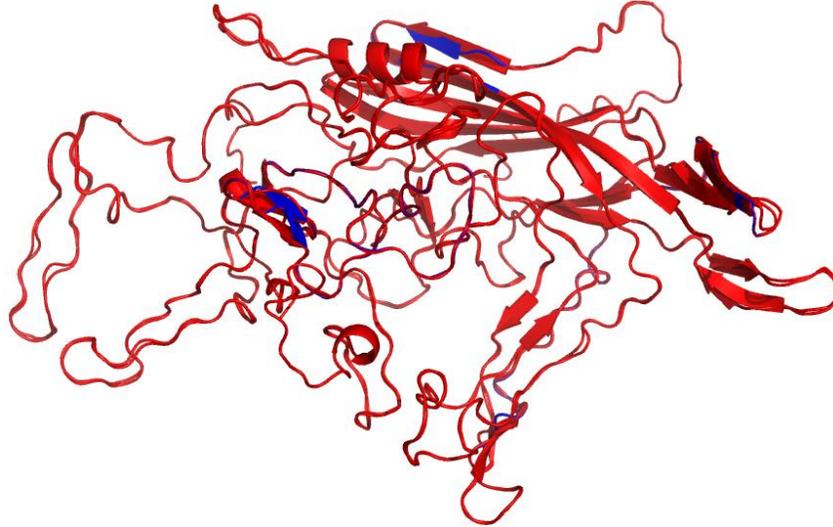
Esto es poco probable ya que, de ser así, se observarían partículas con tamaño superior al de una VLP.

Por otro lado, es posible que la fuerza de repulsión dada por la carga negativa de la proteína sea tan grande que impida que las subunidades interaccionen entre sí. Al considerar los datos de la **Tabla 5** se tiene que la carga por monómero de VP2neg es de -22, dando un total de -1320 en una VLPneg, esto es una carga negativa 3.6 veces mayor en comparación con una VLPwt (carga neta de -360). Dado que es la primera vez que se trata de modificar la carga de esta proteína, no se cuentan con los datos para determinar cuál es el límite en el carga antes de que la proteína sea incapaz de ensamblar en VLPs y dado que se obtienen partículas de diferentes tamaños, puede deberse a que al inicio la fuerza de repulsión no impide el ensamble pero conforme se añaden subunidades de VP2 al ensamble, la fuerza electrostática aumenta, hasta llegar a un punto en el que es imposible que se agregue otra subunidad al ensamble.

Por último, otra razón que se ha considerado es que, al introducir las 7 mutaciones a la VP2, se haya alterado la estructura tridimensional de la proteína, con la cual no es posible obtener VLPs. Debido a esto y por falta de tiempo para hacer pruebas experimentales, se decidió utilizar el servidor ITASSER de predicción de estructuras de proteínas, para obtener una aproximación de la estructura de la proteína VP2neg. Cabe señalar que sólo se proporcionó la secuencia de la VP2neg para este análisis, sin que se tomara como templado a la de la VP2 silvestre.

En la **Figura 19** se muestra el alineamiento de la VP2 (en color rojo) con el modelo de mayor aproximación (en color azul, C-score= 1.46) que produjo ITASSER. Aunque hay pequeñas diferencias en la estructura secundaria, la estructura tridimensional es muy similar en comparación con la VP2wt. Dado que la predicción de la estructura de proteínas recurre a modelos probabilísticos, comparaciones y métodos indirectos, es probable que ésta no sea la estructura real de la VP2neg por lo que no se descarta que la VP2neg no se pliegue adecuadamente. Por tal motivo se decidió analizar nuevamente la superficie del oligocapsómero de VP2 en PyMol para determinar si algún residuo mutado podría estar impidiendo que se lleve a cabo

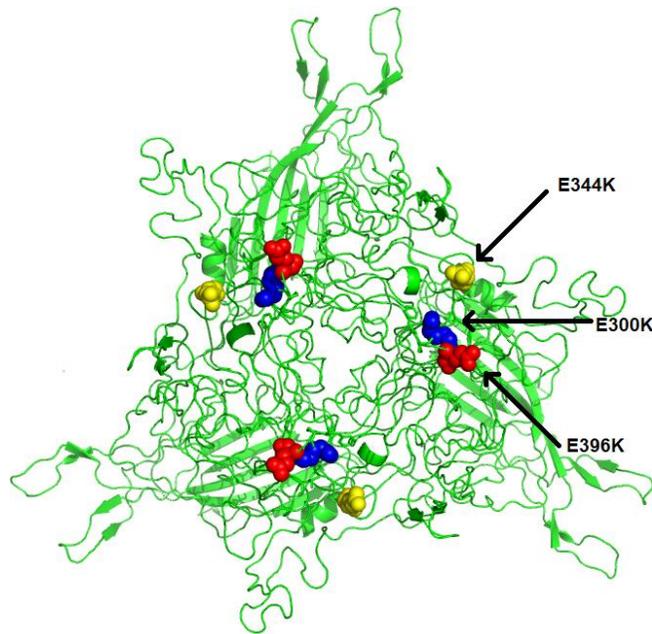
el ensamble en VLPs. El objetivo es tratar de revertir alguna mutación para reducir la carga negativa en la superficie de la proteína a la vez que se evite el mal plegamiento de esta.



**Figura 19.** Alineamiento de la VP2 (rojo) con el modelo obtenido en ITASSER (azul). Las diferencias más significativas se encuentran en la estructura secundaria ya que algunas hélices y hojas  $\beta$  son de distinto tamaño.

### 6.5 Producción de variantes de VP2neg

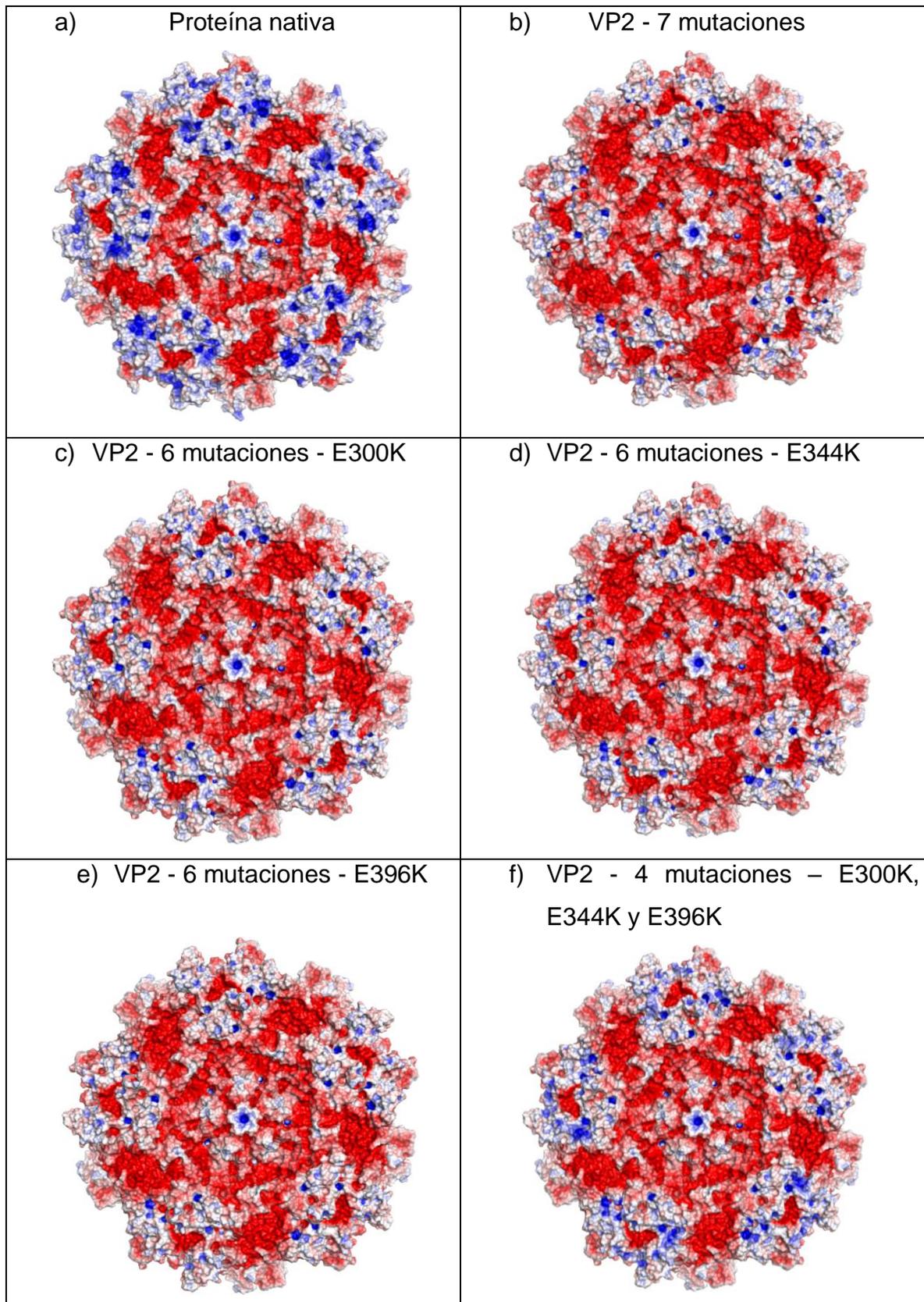
Al analizar nuevamente los residuos que se mutaron para la creación de la VP2neg, se encontró que tres residuos (300, 344 y 396) se encuentran cerca de las intercaras y se encuentran relativamente cerca entre sí. En la **Figura 20** se muestra la localización de dichos residuos. Se propone que para reducir la fuerza de repulsión entre subunidades se muten los residuos 300, 344 y 396, a su estado original (Lys), de esta forma, además de eliminar la carga negativa, se reducirían las interacciones en las intercaras que evitan el ensamble en VLPs debido a la cercanía que existe entre dichos residuos.



**Figura 20.** Trímero de VP2 visto en PyMol, se muestran los residuos 300,344 y 396 que se proponen para regresar a su estado original.

Con base en lo anterior, se planeó producir nuevas variantes de la proteína VP2neg, una por cada residuo sustituido y otra variante, en la que los tres residuos hayan sido sustituidos.

La **Figura 21** muestra la carga superficial del oligocapsómero de VP2, con 6 mutaciones en lugar de 7, asimismo en el panel f se muestra al oligocapsómero con 4 mutaciones. Estas variantes de VP2neg se planean obtener mediante el método de mutagénesis dirigida.

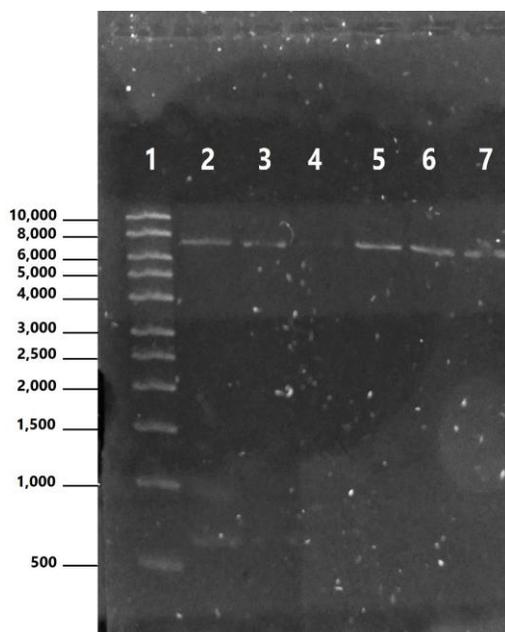


**Figura 21.** Carga superficial en la superficie exterior del oligocapsómero de VP2, **a)** Proteína nativa **b)** Proteína con 7 mutaciones, **c, d y e)** variantes de VP2neg con 6 mutaciones y, **f)** Proteína con 4 mutaciones.

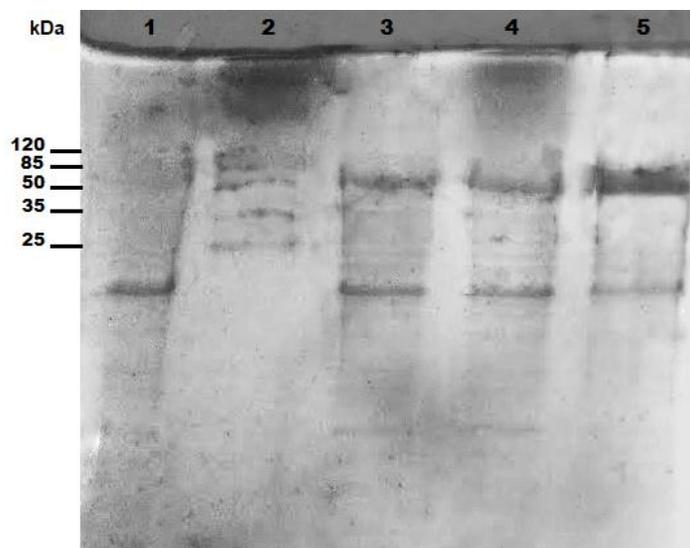
## 6.6 Mutagénesis dirigida del plásmido pET22b-VP2neg

Se encontró que bajo las condiciones de la **Tabla 3** se obtuvieron productos de PCR del tamaño adecuado (7026 pb). Los productos de PCR obtenidos se muestran en la **Figura 22**. Con los productos de PCR de los carriles 2, 5 y 6 se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  que tienen características adecuadas para la clonación del plásmido que facilitan su purificación.

A partir del producto del carril 5, correspondiente a la mutación E344K se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) y se hizo una prueba de expresión de la posible proteína mutada que se muestra en la **Figura 23**. Se observa que la proteína se expresa adecuadamente, pero hace falta comprobar mediante secuenciación que la mutación propuesta esté realmente implementada en el plásmido.



**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa. Productos de PCR obtenidos mediante el método de mutagénesis dirigida. 1) Marcador de peso molecular, 2) E300K – 10 ng, 3) E300K – 20 ng, 4) E344K – 10 ng, 5) E344K – 20 ng, 6) E396K – 10 ng, 7) E396K – 20 ng.



**Figura 23.** SDS-PAGE. Prueba de expresión de la proteína E344K. **1)** Cultivo sin inducir, **2)** Marcador de peso molecular, **3)** 2 horas de inducción, **4)** 3 horas de inducción, **5)** 16 h de Inducción.

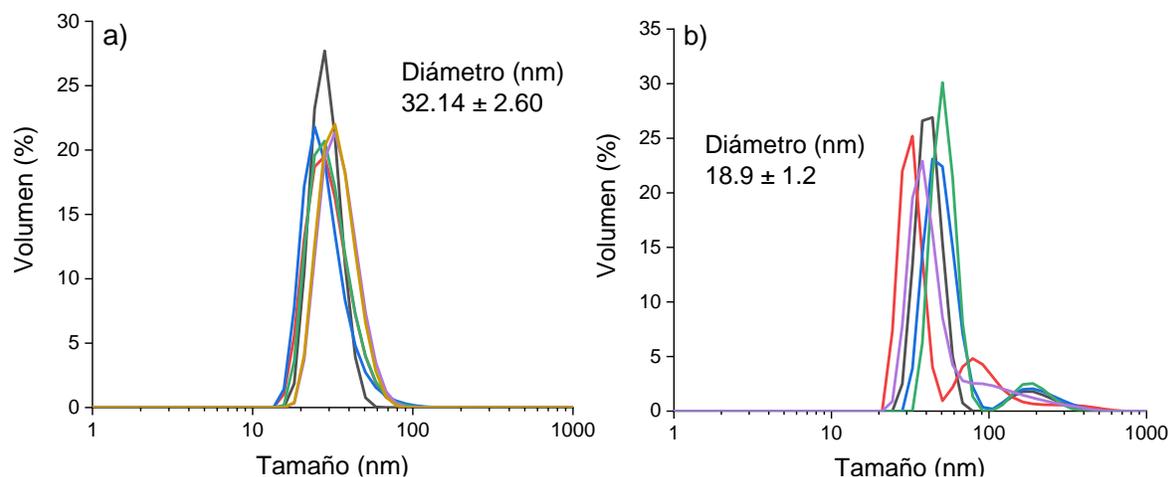
Se decidió probar la capacidad de estas variantes de VP2neg para formar VLPs antes de mandarlas a secuenciar.

### 6.7 Pruebas de ensamble E344K

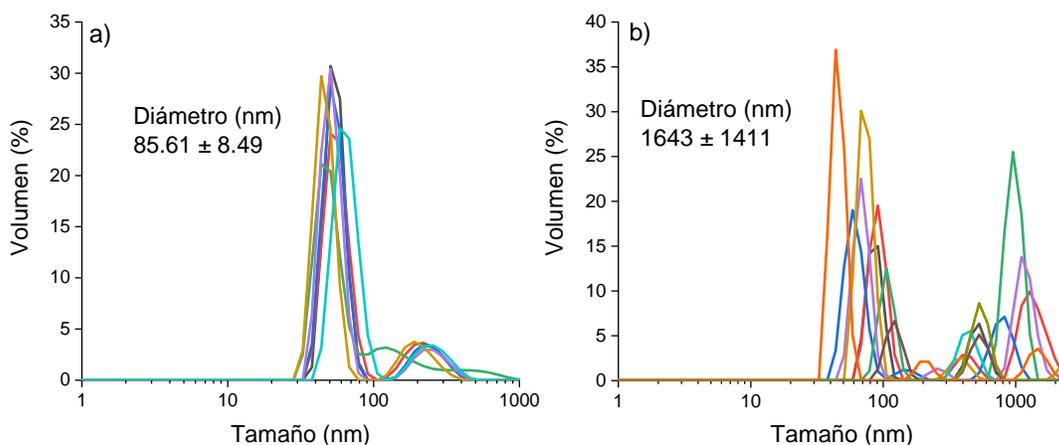
Primeramente, se probaron las condiciones de ensamble utilizadas para VP2neg (0.7 mg/ml VP2, diálisis vs PBS sin Arginina, pH 7.4). Se midió una muestra en el DLS a las 24 y a las 48 h. La **Figura 24a** muestra las mediciones en el DLS de la prueba de ensamble a las 24 h. Se observa que las especies mayoritarias tienen tamaños de aproximadamente 26 nm, lo cual motivó a creer que la VP2 E344K formaba cápsidas completas. Dado que a las 24 h es posible que la diálisis no haya terminado de eliminar al GuHCl, se siguió con la diálisis 24 h más y se volvió a medir una muestra en el DLS.

La **Figura 24b** muestra el análisis por DLS de las VP2 E344K a las 48 h de diálisis, dados los resultados anteriores se esperaba encontrar partículas de tamaño adecuado, pero tal como se muestra en la figura, se observaron especies de tamaño superior a 50 nm.

Se repitió la prueba de ensamble y se volvió a medir en el DLS a las 24 y a las 48 h. En esta segunda prueba, como se observa en la **Figura 25a**, se encontró que a las 24 h se forman agregados mayores a 40 nm, este resultado difiere con lo visto en la primera prueba. A las 48 h también hubo cambios significativos respecto a los vistos anteriormente, la **Figura 25b** muestra una gran cantidad de especies de tamaños superior a las 40 nm, algunas partículas incluso miden 1  $\mu\text{m}$ .

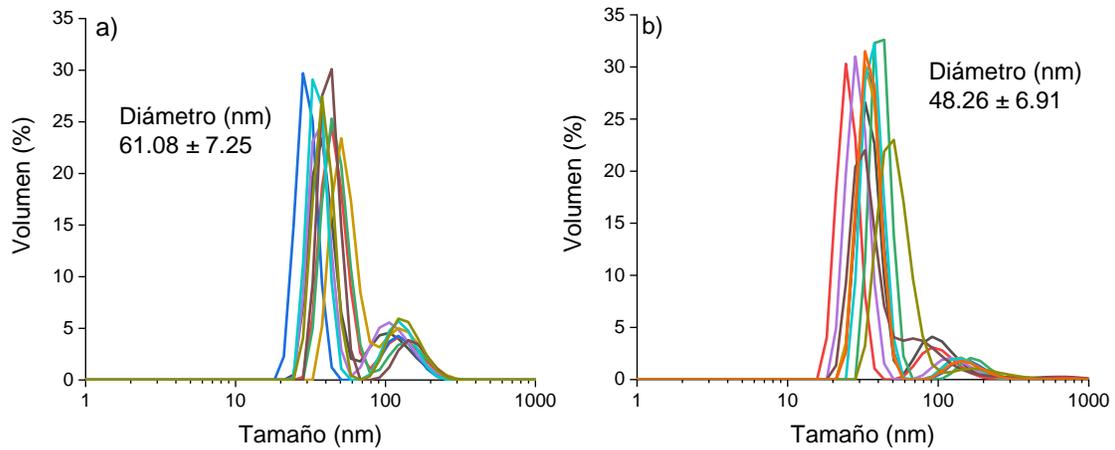


**Figura 24.** Primera prueba de ensamble de VP2neg\_E344K. Mediciones por DLS. **a)** 24 h de diálisis, tamaño promedio  $32.14 \pm 2.60$  nm y **b)** 48 h de diálisis, tamaño promedio  $61.82 \pm 5.79$  nm



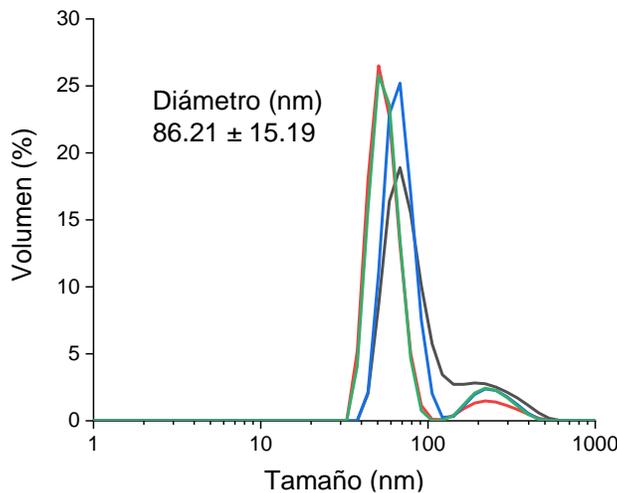
**Figura 25.** Segunda prueba de ensamble de VP2neg\_E344K. Mediciones por DLS. **a)** 24 h de diálisis, tamaño promedio  $85.61 \pm 8.49$  nm y **b)** 48 h de diálisis, tamaño promedio  $1643 \pm 1411$  nm.

Se probaron concentraciones menores de proteína para evitar la formación de agregados, pero tal como se muestra en la **Figura 26**, tampoco se obtuvieron partículas de tamaño adecuado.



**Figura 26.** Prueba de ensamble de VP2neg\_E344K. 48 h de diálisis contra PBS pH 7.4 Mediciones por DLS. **a)** 0.2 mg/ml, tamaño promedio  $61.08 \pm 7.25$  nm y **b)** 0.4 mg/ml, tamaño promedio  $48.26 \pm 6.91$  nm

Por último, se hizo una prueba de ensamble en PBS con el doble de NaCl (0.27 M). De acuerdo con la **Figura 27**, tampoco se encontraron partículas de tamaño adecuado.



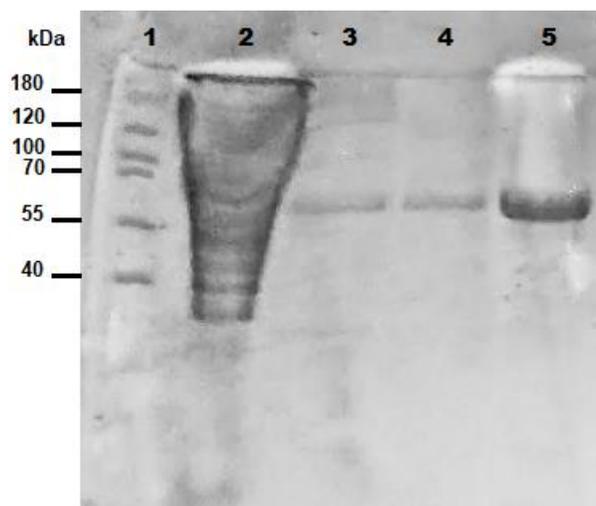
**Figura 27.** Prueba de ensamble VP2neg\_E344K. 48 diálisis contra PBS 0.247 M NaCl, tamaño promedio  $86.21 \pm 15.19$  nm

A partir de los resultados anteriores se deduce que la proteína VP2neg\_E344K se encuentra en un estado metaestable ya que, a pesar de someterse a las mismas condiciones de ensamble, se obtuvieron resultados diferentes al de VP2neg. Aunque se trató de reducir la agregación de la proteína tampoco se obtuvieron

partículas correspondientes a VLPs. Como se ha visto en la introducción de este trabajo, se sabe que pequeñas variaciones en las condiciones a las que se somete a la proteína pueden producir grandes cambios en el autoensamble. Queda claro que es poco probable que se puedan controlar las condiciones de esta proteína para que produzcan resultados repetibles por lo que se decidió dejar de probar nuevas condiciones. Aunado a esto, dados estos resultados y al tiempo que se requeriría para probar las otras variantes de la VP2neg, se decidió no mandar a secuenciar estas variantes, así como dejar a un lado el método de mutación de residuos y comenzar con las modificaciones química de la VP2wt.

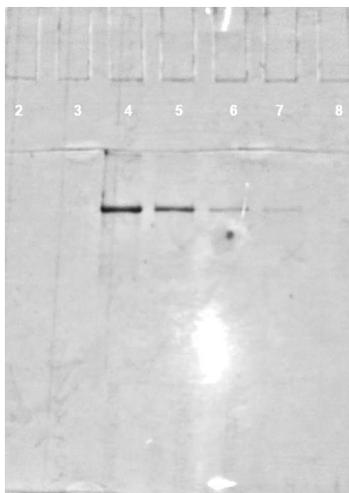
### 6.8 Modificación química de VLPs con anhídrido succínico

Se hizo una prueba de expresión a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) con plásmido que codifica para VP2wt (30° C, 0.25 mM de IPTG). Una vez que se observó que la proteína se expresó adecuadamente, se escaló el cultivo a un volumen de 1 L. Después de obtener los cuerpos de inclusión de la proteína se hicieron los lavados de los mismo tal y como se describe en la metodología. La **Figura 28** muestra los resultados de SDS-PAGE que se obtuvieron para cada lavado de los cuerpos de inclusión. La proteína VP2wt se observa en el carril 5, correspondiente a la solubilización de los cuerpos de inclusión.



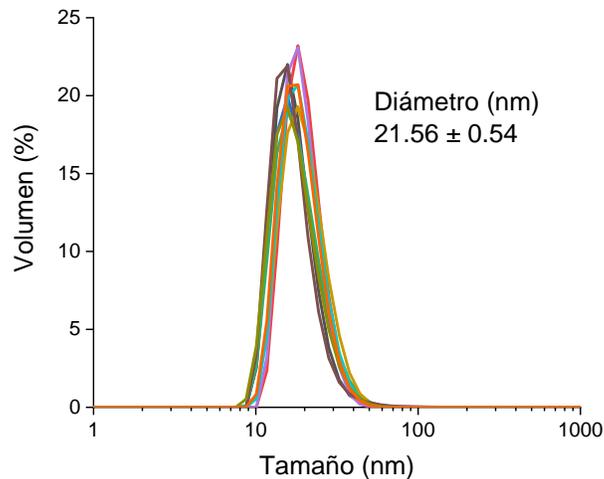
**Figura 28.** SDS-PAGE. Lavado de cuerpos de inclusión de VP2wt. **1)** Marcador de peso molecular, **2)** Sobrenadante células lisadas, **3)** Primer lavado, **4)** Segundo lavado, **5)** Proteína solubilizada.

Se purificó por columna de afinidad un volumen de la proteína solubilizada en GuHCl tal y como se describe en el apartado de la metodología. En la **Figura 29** se observa que las fracciones correspondientes a VP2wt tienen una pureza adecuada para hacer pruebas de ensamble. Se juntaron las fracciones 3, 4 y 5, se concentraron y se cambió la solución de elución en la que se encontraban por amortiguador de repliegamiento.



**Figura 29.** SDS-PAGE. Fracciones obtenidas de la purificación de VP2wt. **2)** Fracción 1, **3)** Fracción 2, **4)** Fracción 3, **5)** Fracción 4, **6)** Fracción 5, **7)** Fracción 6, **8)** Fracción 7.

Con la proteína en amortiguador de solubilización y llevada a una concentración de 0.7 mg/mL se hicieron pruebas de ensamble en amortiguador PBS con 0.2 M de L-Arg. Transcurridas 48 h de diálisis, se analizaron 300  $\mu$ L de proteína por DLS a 20  $^{\circ}$ C, 10 mediciones de 10 segundos cada una, con un intervalo de 10 s entre cada una de ellas. La **Figura 30** muestra la distribución de tamaños obtenidos respecto al volumen de la muestra. Se observa que en todas las mediciones el tamaño para las especies mayoritarias fue similar, siendo el menor de aproximadamente 21 nm y el mayor de 24.5 nm. Estos tamaños concuerdan con los reportados para las VLPS de B19V

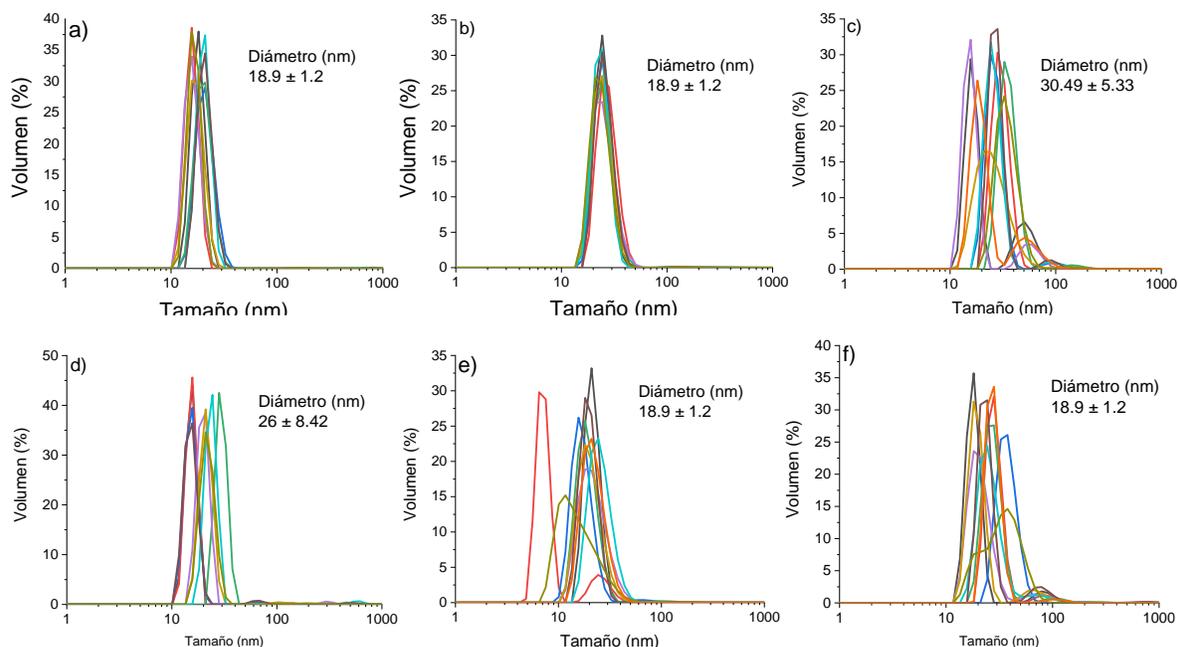


**Figura 30.** Análisis por DLS de los ensambles de VP2wt. 42 h de diálisis en PBS con 0.2 M de Arginina, tamaño promedio  $21.56 \pm 0.54$  nm

Dado que se encontraron partículas del tamaño adecuado se procedió a hacer la modificación química con anhídrido succínico tal y como se describe en el apartado de metodología de este trabajo.

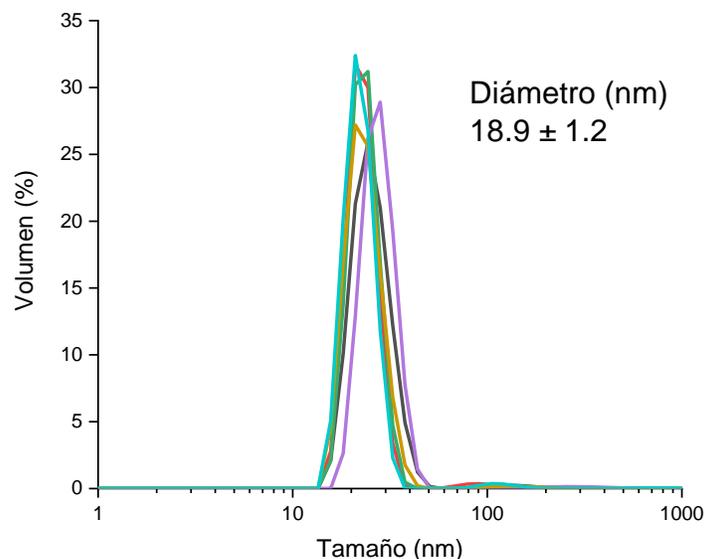
Al término de las 48 h de diálisis se cambió el amortiguador  $\text{PBS}_{\text{Arg}}$  por  $\text{PBS}_{\text{GuHCl}}$ . Se probaron 3 concentraciones de GuHCl, 0.2 M, 0.4 M y 0.8 M para determinar en qué condiciones la VP2WT permanece ensamblada y sin agregarse significativamente. La **Figura 31** muestra las mediciones por DLS de ensambles de VP2 a los cuales se les cambió el amortiguador. De las tres concentraciones de GuHCl utilizadas, a 0.4 M se encontraron partículas del tamaño adecuado (**Figura 31b**) mientras que a 0.2 M hay especies mayoritarias que van de los 15 a los 21 nm. Por otro lado, a una concentración de 0.8 M de GuHCl se encontró una distribución de partículas de 15 a 100 nm. Esto concuerda con lo reportado por Aguilar-Morales (2014), que indicó que cuando las VLPs se someten a concentraciones superiores a 0.5 M de GuHCl, las VLPs se agregan durante las primeras horas y posteriormente se estabilizan en una distribución monodispersa cuyo tamaño es de 15 a 18 nm. Por esta razón, se volvieron a medir los ensambles en amortiguador  $\text{PBS}_{\text{GuHCl}}$  transcurridas 24 h. Tal como se ve en las **Figuras 31d a 31f**, hubo ligeros cambios en los tamaños de las especies, pero en general se conservaron los tamaños observados inicialmente. De

estos datos, se obtiene que la mejor condición para el cambio de amortiguador es PBS 1X con 0.4 M de GuHCl.



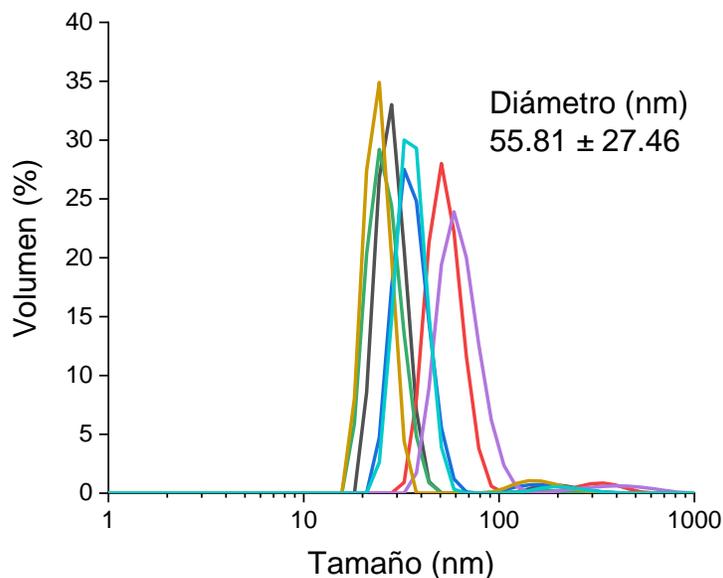
**Figura 31.** Ensamblados de VP2wt inmediatamente después del cambio de amortiguador  $PBS_{Arg}$  por  $PBS_{GuHCl}$ : **a)** 0.2 M GuHCl, tamaño promedio  $18.81 \pm 3.28$  nm **b)** 0.4 M GuHCl, tamaño promedio  $25.18 \pm 0.62$  nm **c)** 0.8 M GuHCl, tamaño promedio  $30.49 \pm 5.33$  nm ; y después de 24 h: **d)** 0.2 M GuHCl, tamaño promedio  $26 \pm 8.42$  nm **e)** 0.4 M GuHCl, tamaño promedio  $21.53 \pm 5.34$  nm y **f)** 0.8 M GuHCl, tamaño promedio  $31.38 \pm 6.21$  nm

Una vez determinadas las condiciones óptimas para evitar la interferencia de la arginina en la modificación química, se hizo la modificación con anhídrido succínico de acuerdo con lo reportado en la metodología de este trabajo. En cuanto la reacción terminó, se midieron los ensamblados nuevamente en el DLS y se verificó su tamaño. La **Figura 32** muestra estos resultados y se observa que hay especies de tamaño adecuado, pero también de menor y mayor tamaño. Esto puede ser debido al cambio de carga que experimentan las VLPs ya que es probable que la modificación no sea uniforme, sino que hay algunas partículas con mayor o menor carga y que esto favorezca que se agreguen o desensamblen.



**Figura 32.** Ensamblados de VP2wt modificados químicamente con anhídrido succínico. Se observan especies de tamaño adecuado, pero también de menor y mayor tamaño. Tamaño promedio  $21.74 \pm 2.93$  nm

Dado que se obtuvieron partículas de tamaño adecuado después de la modificación química, se dializó contra  $\text{PBS}_{\text{GuHCl}}$  durante 24 h para tratar de eliminar las especies agregadas y se volvió a medir la muestra por DLS. La **Figura 33** muestra que después de la diálisis hay partículas de tamaño adecuado, pero también se encuentran especies de mayor tamaño. Esto es un indicio de que el amortiguador  $\text{PBS}_{\text{GuHCl}}$ , puede no ser adecuado para mantener a las VLPs durante periodos prolongados de tiempo. Por este motivo, se decidió cambiar nuevamente el amortiguador  $\text{PBS}_{\text{GuHCl}}$  por amortiguador PBS sin L-Arg para verificar si las VLPsMod permanecen estables en ausencia de L-Arg. Sin embargo, las partículas se agregaron y la distribución de especies medidas por DLS fue altamente polidispersa (datos no mostrados). Cabe señalar que al cambiar el amortiguador  $\text{PBS}_{\text{GuHCl}}$  por  $\text{PBS}_{\text{Arg}}$ , las VLPsMod no se agregaron, pero las VLPsWT mostraron alta polidispersidad al medirse por DLS, razón por la cual para que los experimentos de estabilidad fueran comparables, se desarrollaron en amortiguador  $\text{PBS}_{\text{GuHCl}}$ .



**Figura 33.** Medición por DLS, VP2mod en PBS 0.4 M GuHCl, 24 h después de la modificación química. Tamaño promedio  $55.81 \pm 27.46$  nm

Se espera que cada lisina modificada produzca un aumento de peso de la proteína de aproximadamente 100 Da. Por lo que se trató de observar esta diferencia de peso mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

La secuencia de residuos de la proteína VP2 cuenta con 26 residuos lisina, de los cuales 7 se encuentran altamente expuestos al solvente en la superficie externa de la VLP, mientras que el resto se encuentran cerca de las intercaras o en la cara interna de la cápside. Es muy probable que no todas las lisinas de la superficie externa hayan sido modificadas con anhídrido succínico,

### 6.9. Fragmentación de VP2wt y VP2mod

La fragmentación de la proteína VP2wt y VP2Mod se llevó a cabo con los reactivos IBA, NTCB y CNBr con el fin de encontrar diferencias en el peso de sus fragmentos al analizarse por electroforesis en gel de poliacrilamida y así verificar que la modificación se haya hecho correctamente.

El uso de IBA como agente de fragmentación se propuso desde 1981, se sabe que es capaz de hacer cortes específicos en el lado del carboxilo de los residuos de

triptófano bajo condiciones ácidas (80% ácido acético) y desnaturalizantes ( 4 M GuHCl) (Fontana et al., 1983).

Por otro lado, Degani et al. reportaron en 1974 que los residuos de cisteína pueden cianilarse mediante la acción del NTCB a pH 8 y que posteriormente puede inducirse la fragmentación de proteínas en los residuos cianilados mediante un cambio de pH (de 8 a 9). Estudios más recientes han encontrado que todo el proceso puede hacerse en un solo paso en presencia de agentes como la glicina o el amonio que promueven la fragmentación y a un pH mayor o igual a 9 (Tang & Speicher, 2004)

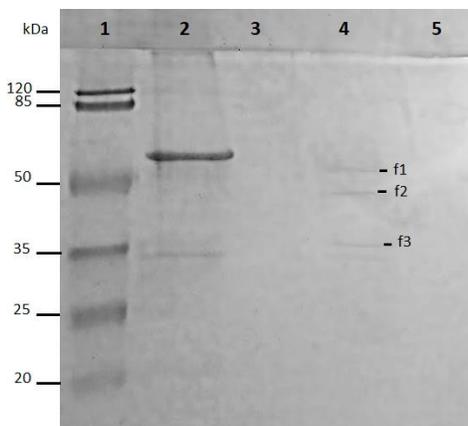
Por último, el CNBr es un reactivo que se ha utilizado por muchos años en la hidrólisis de polipéptidos, corta residuos metionina con una gran especificidad. Este método es conocido por su alta eficiencia (90-100%) y dado que los residuos metionina son poco abundantes en las proteínas, los fragmentos que suelen producirse son de gran tamaño (Andreev et al., 2010)

**Tabla 5.** Reactivos utilizados para fragmentas las proteínas, así como la posición de los sitios de corte

Reactivo	Número ideal de cortes	Posición de los sitios de corte
<b>IBA</b>	9	25, 87, 177, 340, 415, 427, 447, 503 y 545
<b>NTCB</b>	5	37, 63, 74, 149 y 244
<b>CNBr</b>	12	1, 24, 81, 151, 230, 252, 289, 389, 410, 473, 486 y 490

La **Tabla 6** muestra el número de cortes ideal que puede hacer cada reactivo. Cabe destacar que a pesar de haber concentrado la proteína (se pasó de 1 mL a 200 µL), las bandas que se obtuvieron para VP2wt fueron muy tenues mientras que para VP2mod no se pudieron observar en el gel. De protocolos encontrados en la literatura se observa que por lo general se utilizan cantidades relativamente grandes de proteína ( $\geq 3$  mg) (Shilpashree et al, 2015) para observar los fragmentos por SDS-

PAGE. Aun así, en la **Figura 35** se observan dos bandas de tamaño inferior al de la VP2wt (f2 y f3) en el carril que corresponde a la fragmentación de la proteína con NTCB, también se observa en el mismo carril una banda muy cercana al peso de VP2wt que puede ser proteína remanente sin fragmentar (f1). Por otro lado, en los carriles correspondientes a la fragmentación con IBA y CNBr no se encontró ninguna banda.



**Figura 35.** SDS-PAGE de las pruebas de fragmentación con IBA y NTCB. Carril 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) VP2wt sin fragmentar, 3) Fragmentación con IBA, 4) Fragmentación con NTCB y 5) Fragmentación con CNBr

Aunque se trataron de optimizar las condiciones de fragmentación al aumentar la cantidad de proteína agregada a cada pozo, así como el tiempo de reacción y las concentraciones de los reactivos, no se obtuvieron bandas visibles. Esto podría ser debido a la pérdida de proteína durante su manejo, ya que como se muestra en la **Tabla 7**, durante la manipulación de la proteína ocurren pérdidas y el procedimiento en el cual se pierde mayor cantidad de proteína es durante el cambio de amortiguador de PBS 0.2 M Arg por PBS 0.4 M GuHCl, el cual es necesario para hacer la modificación química. Una posible explicación de esta pérdida es que, debido al gran tamaño de las VLPs, se agrupan en el fondo del tubo de ultrafiltración de donde es difícil extraerlas o que se adhieran al filtro del tubo.

Dado que no se pudo verificar la modificación química por medio del análisis de fragmentos por electroforesis, se decidió utilizar otras técnicas como la espectrometría de masas y ensayos colorimétricos.

**Tabla 6.** Pérdida de proteína durante su manipulación.

Procedimiento	Proteína perdida (%)
Purificación por columna de afinidad	---
Cambio de amortiguador (Replegamiento)	10-15%
Filtración por 0.22 µm	20-30%
Cambio de amortiguador (PBS GuHCl)	70-80%

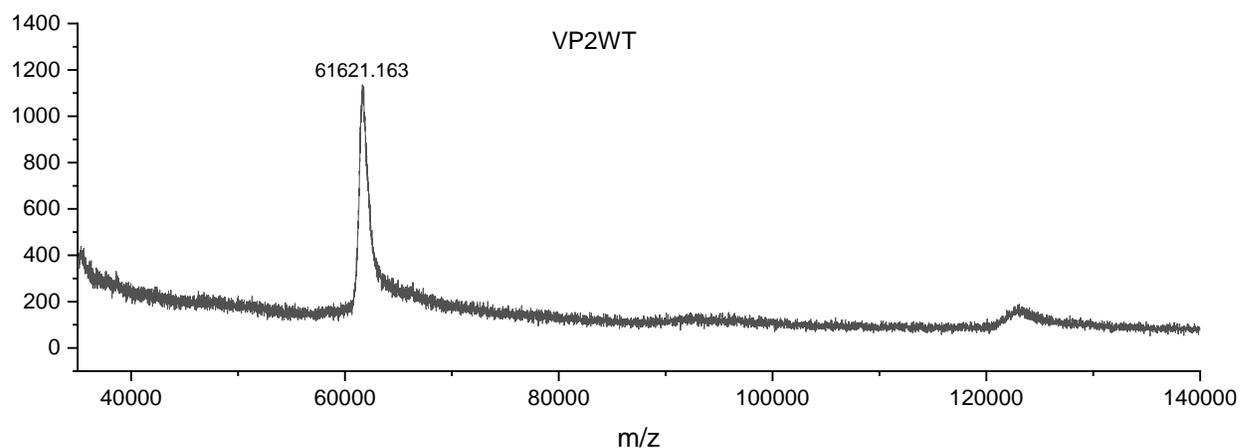
### 6.10 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF consiste en una técnica de ionización suave mediante la cual un láser calienta rápidamente a la matriz y la vaporiza junto con la muestra, durante este proceso la muestra se ioniza debido a las moléculas de matriz que interaccionan con ella. La forma más común de ionización por MALDI es aquella en la cual cada analito porta una sola carga positiva (Guerrera & Kleiner, 2005).

La **Figura 36** muestra el espectro correspondiente a la proteína VP2wt en el que se observa un pico de 61621.16 Da, este pico tiene una diferencia de 18.19 Da respecto al valor teórico de 61639.35 Da. Es posible que esta diferencia de peso se deba a la calibración del equipo dado que la diferencia de peso es menor que la de un aminoácido.

No se logró obtener el espectro de la proteína VP2mod ya que la proteína no se volatilizó bajo ninguna de las condiciones utilizadas. Esto es interesante porque ambas proteínas se encontraban bajo las mismas condiciones de pH y solvente, siendo la única diferencia la modificación química con anhídrido succínico. Una posible explicación es que, al cambiar la carga de la VLP, la partícula ahora tenga una mayor afinidad hacia la placa de metal que se utiliza para colocar la muestra durante el análisis, lo cual evita que la muestra se volatilice y que por lo tanto no se

obtengan resultados. Con base en el resultado anterior puede inferirse que algo ha cambiado en las VLPs modificadas químicamente y se considera como un indicio de que la proteína fue modificada correctamente. Sin embargo, es necesario comprobar directamente que la modificación de la proteína VP2wt ha ocurrido, por lo cual se decidió utilizar otro método para su detección.



**Figura 36.** Espectro de VP2wt. Análisis por MALDI-TOF, Matriz SA, Relación 1:10 Muestra:Matriz

### 6.11 Cuantificación de residuos modificados mediante el ensayo de la ninhidrina

Se sabe desde hace tiempo que la ninhidrina reacciona con los grupos amino para formar un cromóforo conocido como púrpura de Ruhemann. Esta reacción se utiliza principalmente en la industria alimentaria y la farmacéutica en la determinación y caracterización de aminoácidos, péptidos, proteínas y otros compuestos de utilidad.

En la literatura científica se ha documentado el uso de este método en la determinación del contenido de lisinas en distintas proteínas. Friedman et al. (1984) determinaron el contenido de lisinas en harinas de maíz al utilizar ninhidrina y un amortiguador de dimetil sulfóxido y acetato de litio (Hsieh et al, 1995)

En este trabajo se utilizó el método de Friedman y los resultados se muestran como el promedio de tres ensayos independientes. Se encontró que en 40  $\mu$ L de VLPs a una concentración de 0.065 mg/mL (42.18 pmoles de proteína) hay en promedio 92.8

µmoles de grupos amino libres en la muestra de VLPsWT y 36.76 µmoles en la muestra de VLPsMod.

Dado que la concentración de las muestras se igualó antes de hacer el ensayo, se puede utilizar la ecuación 2 y se obtiene que:

$$\frac{\text{grupos amino libres en las VLPsWT}}{\text{grupos amino libres en las VLPsMod}} = \frac{92.8 \text{ mmoles NH}_2\text{WT}}{36.76 \text{ mmoles NH}_2\text{Mod}} = 2.5244 \quad (3)$$

El resultado de la ecuación 3 indica la proporción de residuos no modificados respecto a los modificados. Entonces, si se considera que hay 7 residuos lisina por monómero de VP2 que se encuentran altamente expuestos al solvente, se obtiene que:

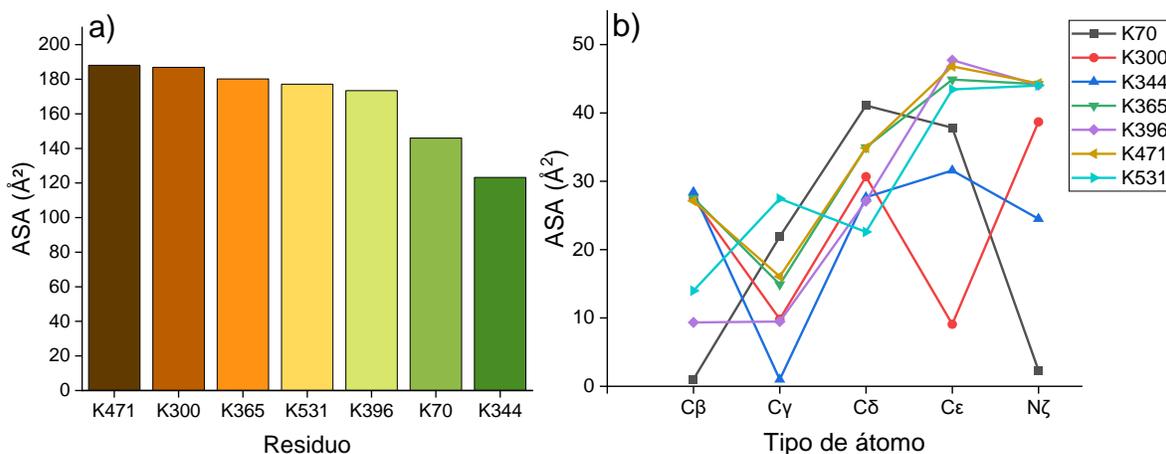
$$\frac{\# \text{ total de residuos que pueden modificarse}}{\text{proporción de residuos wt/mod}} = \frac{7}{2.5244} = 2.7729$$

$\approx 3 \text{ residuos modificados}$

Por lo tanto, de la ecuación 4 se obtiene que en promedio hay 3 residuos modificados en cada monómero de VP2, suponiendo que todos los residuos lisina reaccionaron con la ninhidrina. En caso contrario, el número de residuos modificados podría ser menor, de 1 o 2 residuos modificados por monómero. Es importante señalar que, aunque se obtuvo el número de residuos modificados, se desconoce cuáles son sus posiciones en la secuencia de la proteína y si en todos los casos se modifican los mismos residuos o son diferentes para cada lote de VLPs. Por estos motivos es que se decidió hacer un análisis *in silico* con ayuda del servidor GETAREA (Fraczkiewicz & Braun, 1997) que permite calcular el área accesible al solvente (ASA, por sus siglas en inglés) en macromoléculas. Una mayor exposición al solvente indica una mayor probabilidad de interactuar con los elementos que se encuentren en éste y, por lo tanto, es posible deducir cuáles residuos tienen mayor probabilidad de haberse modificado químicamente.

La **Figura 37** muestra los resultados del análisis del ASA para la proteína VP2. En el panel a se observa el ASA de cada residuo y se obtiene que los 3 residuos Lys más expuestos al solvente son los K471, K300 y K365. Sin embargo, al hacer un

análisis átomo por átomo (panel b) se observa que los grupos amino reactivos con menos posibilidades de reaccionar son los K70, K300 y K344. Dado que el anhídrido succínico reacciona con los grupos amino reactivos se considera que el análisis por tipo de átomo es más preciso y se deduce que los 4 residuos con mayor probabilidad de modificarse son K531, K471, K465 y K365.



**Figura 37.** Análisis del área accesible al solvente (ASA) de los residuos lisina sobre la superficie exterior de la proteína VP2. **a)** Análisis por residuo y **b)** Análisis por átomo.

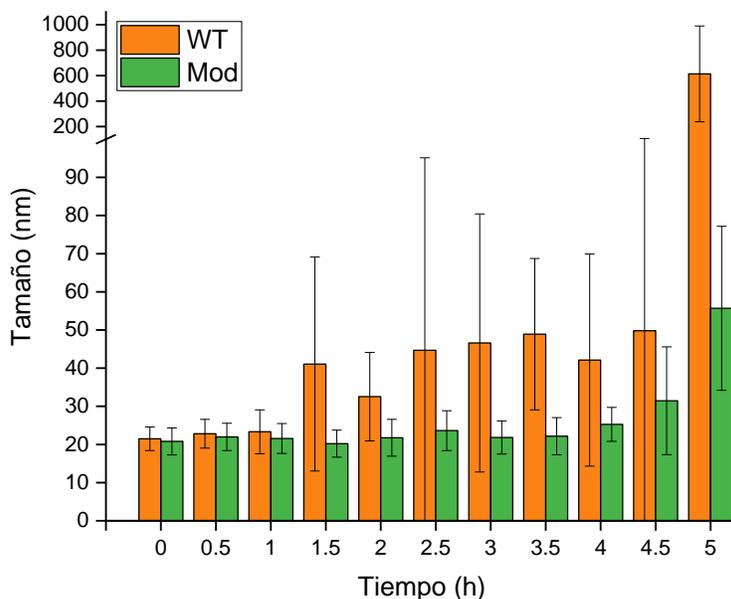
## 6.12 Pruebas de estabilidad

### 6.12.1 Estabilidad en el tiempo

El protocolo de modificación química de las VLPs, indica que se debe cambiar el amortiguador PBS<sub>0.2 M Arg</sub> en el que se encuentran originalmente los ensamblajes de por PBS<sub>0.4 M GuHCl</sub>, con el fin de evitar que el anhídrido succínico reaccione con la Arginina del amortiguador. Dado que el GuHCl es un potente agente caotrópico, es de esperar que incluso a bajas concentraciones ( $\leq 1$  M) afecte la estabilidad de las VLPs. Por este motivo se decidió monitorear el tamaño de las VLPs durante varias horas justo después de modificarlas con anhídrido succínico para determinar si las VLPsMod resisten más tiempo el efecto del GuHCl.

La **Figura 38** muestra los resultados del monitoreo del tamaño de las VLPsWT y VLPsMod. Se observa que, durante la primera hora, tanto las VLPsWT como las VLPsMod tienen el tamaño adecuado para una VLP, pero a partir de la siguiente media hora, el tamaño de las VLPsWT comienza a aumentar mientras que las

VLPsMod conservan su tamaño hasta la cuarta hora. Después de la cuarta hora el tamaño de las VLPsMod sobrepasó los 30 nm, aunque también hubo especies con tamaño inferior a 20 nm.



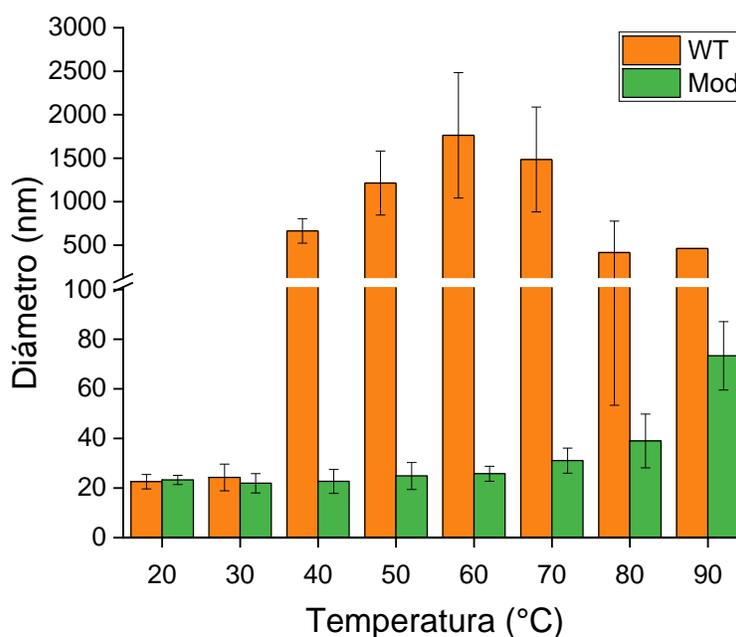
**Figura 38.** Estabilidad en el tiempo de VLPsWT y VLPsMod (PBS 0.4 M GuHCl, pH 7.4 y 20 °C). Datos obtenidos por DLS.

### 6.12.2 Estabilidad por temperatura

Además de la estabilidad en el tiempo, se sometieron muestras de VLPsWT y VLPsMod a una rampa de temperatura de 20 a 90 °C para encontrar el valor al cual se agregan. La **Figura 39** muestra el tamaño de las partículas por cada aumento de 10 °C. Se observa que las VLPsWT conservan su tamaño hasta los 30 °C mientras que a temperaturas superiores se observan especies con tamaños que rebasan los 1000 nm. También se encontró que las VLPsWT tienden a agregarse conforme aumenta la temperatura, esto a pesar de que pareciera que a partir de los 80 °C los agregados comienzan a disociarse, cuando en realidad a esta temperatura las VLPs forman agregados tan grandes que comienzan a precipitarse y son visibles a simple vista. Es decir, las mediciones de VLPsWT a 80 y 90 °C en realidad corresponden a remanentes de agregados cuyo tamaño no es lo suficientemente grande para que comiencen a precipitarse y por lo tanto estas últimas mediciones no son fiables,

razón por la cual no se muestra la desviación estándar de las partículas a 90 °C ya que se obtuvo una distribución altamente polidispersa, con tamaños de 1 a 100 nm.

Por otro lado, se observa que las VLPsMod mantuvieron un tamaño adecuado (20-25 nm.) hasta aproximadamente los 60 °C. A temperaturas superiores tienden a agregarse, pero no superan los 100 nm. Es probable que la carga negativa añadida a la superficie de la VLPs impida que se formen agregados de gran tamaño como en el caso de las VLPsWT.



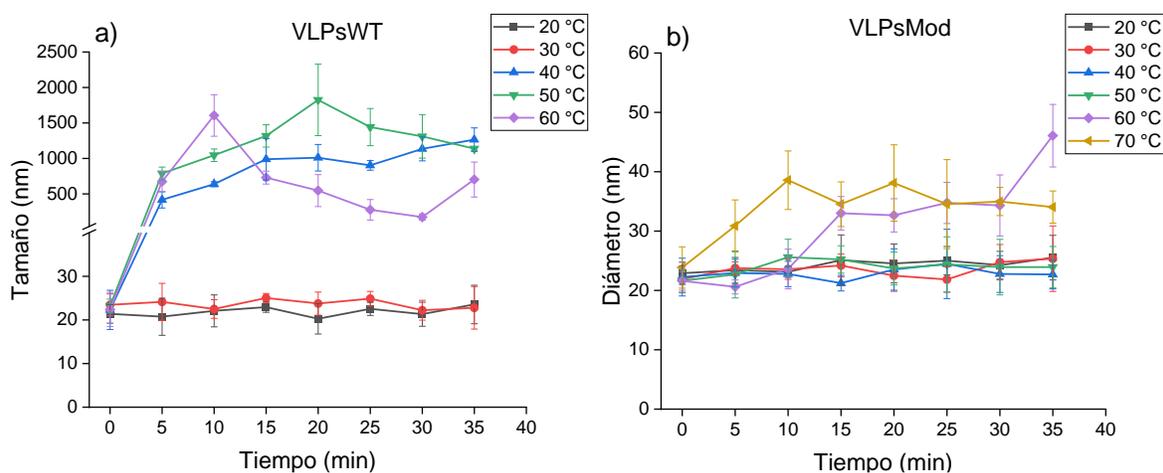
**Figura 39.** Estabilidad por temperatura de VLPsWT y VLPsMod. Rampa de temperatura de 20 a 90 °C. Datos obtenidos por DLS

Dado que la rampa de temperatura expone a las VLPs a cada valor de temperatura únicamente mientras se hacen las mediciones (además de los dos minutos de reposo después de elevar la temperatura), es probable que su comportamiento sea diferente cuando se mantiene la temperatura durante más tiempo. Por esta razón, se decidió someter a cada muestra de VLPs a una temperatura entre 20 y 70 °C durante 35 min y verificar si el tamaño de las partículas corresponde a lo observado en la rampa de temperatura.

La **Figura 40** muestra el efecto de la temperatura sobre las VLPs en un periodo de 35 min. Se observa en el panel a) que las VLPsWT son estables a 20 y 30 °C, pero a partir de los 40 °C se agregan durante los primeros cinco minutos y su tamaño sobrepasa los 500 nm. Hay que señalar que sólo se muestran los datos de 20 a 60 °C, ya que a 70 °C los agregados comienzan a precipitarse como se observó en la rampa de temperatura.

Por otro lado, la **Figura 40b** muestra el efecto de la temperatura sobre las VLPsMod, se observa que las partículas conservan su tamaño hasta una temperatura de 50 °C durante todo el periodo de tiempo. Sin embargo, a 60 °C comienzan a agregarse después de 10 min y a 70 °C la agregación ocurre en los primeros 5 min.

En ambos casos los datos concuerdan en su mayoría con lo reportado en la rampa de temperatura. La diferencia más significativa se encuentra en el tamaño de las VLPsMod a 60 °C. De la **Figura 39** se observa que a 60 °C las VLPsMod conservan su tamaño, pero la **Figura 40** muestra que después de 10 min a dicha temperatura las partículas se agregan y su tamaño sobrepasa los 30 nm.



**Figura 40.** Efecto de la temperatura durante 35 minutos sobre **a)** VLPsWT y **b)** VLPsMod. Análisis por DLS de 20 a 70 °C.

Se ha visto que las VLPsMod presentan mayor estabilidad por temperatura en comparación con las VLPsWT. También que a partir de los 70 °C las VLPsMod comienzan a agregarse, pero estos no son de gran tamaño como en el caso de las

VLPsWT. Si además se considera que las VLPsMod resisten la agregación durante más tiempo en presencia de GuHCl y también al cambiar el amortiguador PBS<sub>GuHCl</sub> por PBS<sub>Arg</sub> después de la modificación química, se concluye que fue posible alterar las propiedades de las VLPs al cambiar la carga superficial. Cabe señalar que, aunque se determinó el número de lisinas modificadas, no se comprobó cuales fueron exactamente. Y, aunque se cumplió el objetivo del proyecto, el tratamiento al que se someten las VLPs durante la modificación es bastante agresivo y se pierde una gran cantidad de proteína (de 70% a 80% al finalizar la modificación química), razón por la cual es posible que la técnica de modificación química con anhídrido succínico no sea viable para la producción de VLPs a mayor escala. Sin embargo, podrían determinarse mediante huella peptídica (Peptide Mass Fingerprinting o PMF, por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en la fragmentación de la proteína de interés mediante proteasas con especificidad de corte y una vez obtenidos los fragmentos se analizan mediante espectrometría de masas y se comparan las masas medidas con bases de datos de secuencias peptídicas (Saraswathy & Ramalingam, 2011). Al identificar aquellos fragmentos con peso diferente al de las bases de datos o al compararse con los fragmentos de VP2wt podría deducirse en que parte de la secuencia se encuentran los residuos modificados químicamente y con base en ello, construir nuevas mutantes y verificar su competencia para formar VLPs.

## 7 CONCLUSIONES

### 7.1 Conclusión general

Es posible modificar la estabilidad de agregación por temperatura y en el tiempo de las VLPs de B19V al modificar químicamente VLPsWT con anhídrido succínico. Se comprobó que las VLPs modificadas tienen mayor estabilidad en el tiempo y por temperatura respecto a las VLPsWT.

### 7.2 Conclusiones particulares

- La proteína VP2neg con las mutaciones K70E, K300E, K344E, K365E, K396E, K471E y K531E es incapaz de formar VLPs completas
- Dado el resultado anterior, una alternativa para generar VLPs con carga superficial diferente a la de una VLPwt es, mediante el uso de anhídrido succínico.
- La reacción con anhídrido succínico produce en promedio 3 o menos residuos modificados por monómero de VP2.
- Se intuye del análisis del área superficial de los residuos lisina de la proteína VP2 que el K531, K471, K465 y el K365 son los más propensos a modificarse, aunque cabe aclarar que esto no se determinó experimentalmente y por lo tanto los resultados podrían ser diferentes.
- Las VLPs modificadas químicamente resisten el doble de temperatura que las VLPsWT antes de que comiencen a agregarse, así como 4 veces más tiempo en presencia de 0.4 M de GuHCl
- Se considera que el proceso de modificación de las VLPs es bastante agresivo ya que hay mucha pérdida de proteína (80-90% al finalizar la modificación química) y se producen subespecies no deseadas.

## 8 PERSPECTIVAS

Si se quiere determinar exactamente cuáles son los residuos que se modifican químicamente, una posible solución es el análisis de la proteína modificada mediante huella peptídica. Dado que el peso de la proteína aumenta en 100 Da por residuo modificado, podría determinarse la secuencia de los fragmentos cuyo peso difiera del encontrado en bases de datos, y así determinar la posición exacta del residuo modificado. Con base en lo anterior podría volverse a sintetizar un gen con las mutaciones adecuadas y se podría evaluar la competencia de estas nuevas mutantes para formar VLPs. De esta forma se evitaría todo el proceso de modificación química que conlleva pérdidas de hasta 90% de la proteína y se tendría la seguridad de que la nueva carga superficial de las VLPs es constante.

## 9 REFERENCIAS

- Abidin, R. S., Lua, L. H. L., Middelberg, A. P. J., & Sainsbury, F. (2015). Insert engineering and solubility screening improves recovery of virus-like particle subunits displaying hydrophobic epitopes. *Protein Science*, 24, 1820–1828. <https://doi.org/10.1002/pro.2775>
- Aguilar Morales, D. R. (2014). *Modificación de asas superficiales de la proteína VP2: Efectos en la formación de partículas tipo virus* (Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004>.This
- Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., & Grishin, E. V. (2010). Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. *Analytical Biochemistry*, 407(1), 144–146. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.023>
- Bárcena, J., & Blanco, E. (2013). *Design of Novel Vaccines Based on Virus-Like Particles or Chimeric Virions*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8>
- Cavicchioli, R., Curmi, P. M. G., & Siddiqui, K. S. (2006). 17 Proteins from Psychrophiles. 35(05). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(05\)35017-3](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(05)35017-3)
- Eaton, W. A., & James, H. (1990). Sick cell hemoglobin polymerization. *Advances in Protein Chemistry*, 40. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60287-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60287-9)
- Fontana, A., Dalzoppo, D., Grandi, C., & Zambonin, M. (1983). Cleavage at Tryptophan with o-Iodosobenzoic Acid. *Methods in Enzymology*, 91(1979).
- Fraczkiewicz, R., & Braun, W. (1997). Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules - Fraczkiewicz - 1998 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library. *Onlinelibrary.Wiley.Com*, 19(3). Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199802\)19:3%3C319::AID-JCC6%3E3.0.CO%5Cn2-W/abstract%5Cnpapers2://publication/uuid/5F874541-F97F-4E6C-AA85-D3D93FC3BDB9](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-987X(199802)19:3%3C319::AID-JCC6%3E3.0.CO%5Cn2-W/abstract%5Cnpapers2://publication/uuid/5F874541-F97F-4E6C-AA85-D3D93FC3BDB9)
- Friedman, M., Pang, J., & Smith, G. A. (1984). *Lysine in Food Proteins*. 49.
- Garidel, P. (2013). Protein Solubility from a Biochemical, Physicochemical and Colloidal Perspective. Retrieved August 20, 2019, from <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/152568-Protein-Solubility-from-a-Biochemical-Physicochemical-and-Colloidal-Perspective/>
- Gilbert, L., Toivola, J., White, D., Ihalainen, T., Smith, W., Lindholm, L., ... Oker-Blom, C. (2005). Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(2), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.208>
- Gitlin, I., Carbeck, J. D., & Whitesides, G. M. (2006). Why are proteins charged? Networks of charge-charge interactions in proteins measured by charge ladders and capillary

- electrophoresis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(19), 3022–3060. <https://doi.org/10.1002/anie.200502530>
- Gómez-Peña, B. (2019). *Bionanotecnología con nanopartículas virales*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guerrera, I. C., & Kleiner, O. (2005). Application of Mass Spectrometry in Proteomics. *Bioscience Reports*, 25(1–2), 71–93. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2849-x>
- Hagan, M. F. (2015). Modeling viral capsid assembly. *Adv Chem Phys*, 1–68. <https://doi.org/10.1002/9781118755815.ch01.Modeling>
- Hsieh, C. L., Hsiung, K. P., & Su, J. C. (1995). Determination of lysine with ninhydrin-ferric reagent. *Analytical Biochemistry*, Vol. 224, pp. 187–189. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1027>
- Jordan, C. C., Kaiser, I. N., & Moore, V. C. (2012). Nanotechnology Patent Survey : Who Will Be the Leaders in the Fifth Technology Revolution ? *Nanotechnology Law and Business*, 9(Fall), 122–133.
- Kaufmann, B., Simpson, A. A., & Rossmann, M. G. (2004). The structure of human parvovirus B19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32), 11628–11633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0402992101>
- Lawrence, M. S., Phillips, K. J., & Liu, D. R. (2007). Supercharging proteins can impart unusual resilience. *Journal of the American Chemical Society*, 129(33), 10110–10112. <https://doi.org/10.1021/ja071641y>
- Lowin, T., Raab, U., Schroeder, J., Franssila, R., & Modrow, S. (2005). Parvovirus B19 VP2-proteins produced in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison with VP2-particles produced by baculovirus-derived vectors. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(7–8), 348–352.
- Lu, Y., Chan, W., Ko, B. Y., Vanlang, C. C., & Swartz, J. R. (2015). Assessing sequence plasticity of a virus-like nanoparticle by evolution toward a versatile scaffold for vaccines and drug delivery. *112*(40), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510533112>
- Lundblad, R. L. (2014). The Modification of Amino Groups. In *Chemical Reagents for Protein Modification* (Fourth Edi, p. 684).
- Matthews, J. M. (2013). Plasticity at Protein–Protein Interaction Interfaces. In G. C. K. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin: Springer.
- McManus, J. J., Charbonneau, P., Zaccarelli, E., & Asherie, N. (2016). The physics of protein self-assembly. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 22, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.02.011>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* (New York, N.Y.), 311(5761), 622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>

- Perlmutter, J. D., & Hagan, M. F. (2016). Mechanisms of Virus Assembly. *Annu Rev Phys Chem*, (1), 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214-121637>.Mechanisms
- Prakash, H., & Mazumdar, S. (2009). Succinylation of cytochrome c investigated by electrospray ionization mass spectrometry : Reactive lysine residues. *International Journal of Mass Spectrometry*, 281, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2008.12.013>
- Qiu, J., Söderlund-Venermo, M., & S. Young, N. (2017). Human Parvoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 43–113. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-16>
- Robert E Feeney, R. B. Y., & Geoghegan, K. F. (1982). Chemical Modification of Proteins : An overview. *Advances in Chemistry*, 198, 3–55.
- Rodríguez-Limas, W. A., Sekar, K., & Tyo, K. E. J. (2013). Virus-like particles: The future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1089–1093. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.008>
- Sánchez-Rodríguez, Sandra P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Mora-Pale, M., Dordick, J. S., & Bustos-Jaimes, I. (2012). Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie*, 94(3), 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.006>
- Sánchez-Rodríguez, Sandra Paola, Morán-García, A. del C., Bolonduro, O., Dordick, J. S., & Bustos-Jaimes, I. (2016). Enhanced assembly and colloidal stabilization of primate erythrovirus 1 virus-like particles for improved surface engineering. *Acta Biomaterialia*, 35, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.02.024>
- Santillán-Uribe, H. C. (2017). *Construcción y caracterización de estructuras supramoleculares basadas en el parvovirus B19*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santillán-Uribe, J. S., Valadez-García, J., Morán-García, A. del C., Santillán-Uribe, H. C., & Bustos-Jaimes, I. (2015). Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Research*, 201, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.011>
- Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting ( PMF ). In *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* (pp. 185–192). <https://doi.org/10.1533/9781908818058.185>
- Shah, D., & Shaikh, A. R. (2015). *Interaction of arginine , lysine , and guanidine with surface residues of lysozyme : implication to protein stability*. (March), 37–41. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1013158>
- Shilpashree, B. G., Arora, S., Chawla, P., Vakkalagadda, R., & Sharma, A. (2015). Succinylation of sodium caseinate and its effect on physicochemical and functional properties of protein. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1270–1277.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.008>

- Sico, C., White, S., Tsao, E., & Varma, A. (2002). Enhanced kinetic extraction of parvovirus B19 structural proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3), 250–256. <https://doi.org/10.1002/bit.10509>
- Sullivan, M. P., McHale, K. J., Parvizi, J., & Mehta, S. (2014). Nanotechnology. *Bone & Joint Journal*, 96-B(5).
- Sun, S. W., Lin, Y. C., Weng, Y. M., & Chen, M. J. (2006). Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2–3), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.006>
- Tang, H. Y., & Speicher, D. W. (2004). Identification of alternative products and optimization of 2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid cyanylation and cleavage at cysteine residues. *Analytical Biochemistry*, 334(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.08.008>
- Yan, D., Wei, Y., Guo, H., & Sun, S. (2015). *The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles*. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7000-8>
- Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 92–107. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>
- Zink, J., Wyrobnik, T., Prinz, T., & Schmid, M. (2016). *Physical, Chemical and Biochemical Modifications of Protein-Based Films and Coatings: An Extensive Review*. <https://doi.org/10.3390/ijms17091376>