



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DEL AUTOENSAMBLAJE CON ADN DE UNA PROTEÍNA
VIROMIMÉTICA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ERNESTO CÁZARES VARGAS

TUTOR: DR. ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DEL AUTOENSAMBLAJE CON ADN DE UNA PROTEÍNA
VIROMIMÉTICA.**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ERNESTO CÁZARES VARGAS



Ciudad de México, Enero 2020

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Vocal	Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal	Dr. Ismael Bustos Jaimes
Vocal	Dr. Gustavo Zelada Guillén
Secretario	Dra. Martha Verónica Escárcega Bobadilla

ASESOR

Dr. Armando Hernández García

SUSTENTANTE

Q. Ernesto Cázares Vargas

Una tesis que se autoensamble...

Agradecimientos

En el presente trabajo quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número de becario 626245, por el apoyo económico brindado durante los semestres (2018-1 al 2019-2) para la elaboración de este proyecto de tesis.

A la UNAM y al Instituto de Química por darme la oportunidad y privilegio de estudiar una maestría en ciencias. Agradezco a mi supervisor Armando Hernández por la guía que me brindó durante el proyecto. Me alegra haberlo elegido como asesor. Su energía y entusiasmo siempre me impresionaron. A Renko de Vries también quiero agradecer por la ayuda mostrada y por la confianza que tiene en mi.

A Vicente Cázares y Martha Vargas, gracias por todo el amor y el apoyo que me han brindado en este trayecto llamado vida. Hasta el día de hoy me siguen enseñando a ser una persona íntegra y que el trabajo duro trae sus recompensas. Todo lo que soy no sería posible sin ustedes, ¡este logro también es suyo!

A Fernando Cázares y Brenda Cázares, que le han dado alegría a mi vida. Me complace compartir momentos de risas o juegos. No hay mejor privilegio que tener un hermano con quién siempre contar. A Juan Carlos Benítez por compartir varios momentos y espero que esto le sirva de ejemplo en su vida.

A Isabel Martínez, que en los días más oscuros tú has sido la Luna que ilumina mi camino. Hay una cosa que todos buscan y nosotros la encontramos. Juntos, todos nuestros sueños se cumplirán amor.

A mis amigas de toda la vida Paulina Barrera, Diana Tlatelpa y Deni Bustos, amistades como esta perduran a través de los años. Confío plenamente que seguiremos presentes en los mejores momentos de nuestras vidas.

A mis amigos de la carrera Aldo Facundo, Walls Xavier, Manolo Roque, Yolo Bañales, Dieguito Acevedo, Vai Padilla, Isaac Huidobro y Cristina Ocampo que aunque la vida nos han separado, nosotros nos encargaremos de volvernos a encontrar. Recordar a nuestro amigo Aldo como la gran persona que fue y sé que él siempre estará acompañándonos.

A mis amigos del laboratorio, David Moreno, Claudia Moctezuma, Eddie Guillermo, Gustave Eric, Carlos Calcines y Carle Cal, sus aportaciones a mi trabajo así como su amistad fueron gran motivación para sacar este proyecto adelante. Sin duda, las horas en el laboratorio fueron más divertidas a su lado.

Lista de abreviaturas

AA	Intensidad de fotones medidos por el fluoróforo aceptor después de su excitación.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ALE_x	Excitación alternada por láser.
A_{nr}	Relajación no-radiativa del fluoróforo aceptor.
A_{rad}	Relajación radiativa del fluoróforo aceptor.
Biotina-PEG-NHS	Biotina - polietilenglicol - hidroxisuccinimida.
C₄S₀B	Proteína <i>de novo</i> con los bloques <i>C₄</i> y <i>B</i> .
C₄S₄B	Proteína <i>de novo</i> con los bloques <i>C₄</i> , <i>S₄</i> y <i>B</i> .
C₄S₁₀B	Proteína <i>de novo</i> con los bloques <i>C₄</i> , <i>S₁₀</i> y <i>B</i> .
C₄S₁₄B	Proteína <i>de novo</i> con los bloques <i>C₄</i> , <i>S₁₄</i> y <i>B</i> .
C₄S_nB	Proteína <i>de novo</i> con los bloques <i>C₄</i> , <i>S_n</i> y <i>B</i> .
C	Centígrados.
CC	Concentración crítica.
CCMV	Virus del moteado clorótico del caupí.
Cy3	Cianina 3.
Cy5	Cianina 5.
D	Distancia entre los fluoróforos donador y aceptor.
Da	Dalton.
DA	Intensidad de fotones medidos por el fluoróforo aceptor después de la excitación del donador.
DD	Intensidad de fotones medidos por el fluoróforo donador después de su excitación.
D_{ex}	Excitación del donador.
D_{nr}	Relajación no-radiativa del donador.

D_{rad}	Relajación radiativa del donador.
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble hélice.
DTT	Ditiotreitol.
E^*	Eficiencia no corregida de FRET.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EMSA	Ensayo del cambio de la movilidad electroforética.
BrEt	Bromuro de etidio.
F_{BrEt}	Fluorescencia del BrEt en solución acuosa.
$F_{DNA-BrEt}$	Fluorescencia del complejo DNA con BrEt.
F_{obs}	Fluorescencia de la muestra.
FR	Fluorescencia relativa.
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster.
Fw	Directo.
g	Gramos.
h	Hora.
H_e	Entalpía de elongación.
K	Kelvin.
K_a	Constante de nucleación.
K_e	Constante de elongación.
kDa	Kilodalton.
L	Litros.
M	Concentración molar.
MALDI-TOF	Ionización mediante láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo.
MeOH	Metanol.
MGY	Medio mínimo de glicerol
min	Minutos.
mL	Mililitros.
MM	Medio mínimo de metanol.
mM	Concentración milimolar.
μM	Concentración micromolar.

MOPS	3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico.
ms	Milisegundos.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NHS-PEG	Hidroxisuccinimida - polietilenglicol.
mW	Milivatio.
nm	Nanómetros.
ms	Milisegundo.
NP	Cociente molar NH_3/PO_4 .
pb	Pares de base.
PBS	Amortiguador fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDB	Banco de datos de estructuras experimentales de proteínas (<i>Protein data bank</i>).
pH	Potencial de hidrógeno.
PIFE	Aumento de la fluorescencia inducido por una proteína.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
R₀	Radio de Förster
RNA	Ácido ribonucleico.
Rv	Reverso.
s	Segundo.
S	Suplementaria.
S*	Estequiometría no corregida de FRET.
S₀	Estado basal.
S₁	Estado excitado.
S₂	Estado excitado.
SAXS	Dispersión de rayos X de ángulo reducido.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
smFRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster de molécula única.
T	Temperatura.

TIRF	Fluorescencia de reflexión interna total.
TIRFM	Microscopio de fluorescencia de reflexión interna total.
t	Tiempo.
Δ	Diferencia entre dos cantidades.
Φ	Grado de agregación.

Aminoácidos

A	Alanina.
R	Arginina.
N	Asparagina.
D	Ácido aspártico.
C	Cisteína.
F	Fenilalanina.
G	Glicina.
Q	Glutamina.
E	Ácido glutámico.
H	Histidina.
I	Isoleucina.
L	Leucina.
K	Lisina.
M	Metionina.
P	Prolina.
S	Serina.
Y	Tirosina.
T	Treonina.
W	Triptófano.
V	Valina.

Lista de figuras

1.1	Representación gráfica de los mecanismos de autoensamblaje	4
1.2	Medición del grado de agregación del sistema en función de la temperatura obtenido por datos espectroscópicos	5
1.3	Descripción del proceso de FRET mediante el diagrama de Jablonksi	6
1.4	Descripción del mecanismo de FRET	8
1.5	Triple hélice del colágeno	10
1.6	Estructura del bloque de seda	11
1.7	Virus del TMV	12
1.8	Ilustración de la proteína C_4S_0B	13
1.9	Esquema e imágenes de AFM de proteínas diseñadas encapsulando un DNA de 2600 pb	14
3.1	Condiciones de reacción para la PCR	22
3.2	Curva de calibración para la proteína $C_4S_{10}B$	23
3.3	Descripción del microscopio de reflexión total interna utilizado para experimentos de molécula única	30
3.4	Resultados simulados de un experimento de smFRET	32
3.5	Esquema de las moléculas de DNA marcadas con los fluoróforos . . .	33
4.1	Espectro de absorbancia normalizado de las proteína $C_4S_{10}B$ en función de su concentración.	36
4.2	Concentración crítica de autoensamblaje de las proteínas C_4S_nB . . .	37

4.3	Efecto de la longitud del molde de DNA en la interacción con C_4S_0B o $C_4S_{10}B$	40
4.4	Relación del tamaño del bloque S_n en la interacción $C_4S_nB - DNA$.	41
4.5	Efecto de la temperatura en la interacción $C_4S_nB - DNA$	43
4.6	Cinética de la interacción $C_4S_{10}B$ con DNA	44
4.7	Evaluación del efecto PIFE-FRET con el DNA y C_4S_nB	46
4.8	Dependencia del balance de carga del complejo $C_4S_{10}B - DNA$ en la intensidad de luz dispersada.	47
4.9	Determinación del mecanismo de autoensamblaje de la proteína C_4S_nB	49
4.10	Determinación del mecanismo de autoensamblaje del DNA con $C_4S_{10}B$	50
4.11	Imágenes obtenidas por AFM de las nanoestructuras formadas por el autoensamblaje de $C_4S_{10}B$	52
4.12	Dependencia de la longitud de la nanopartícula con la concentración .	53
4.13	Imágenes de AFM de $C_4S_{10}B$ a diferentes temperaturas	54
4.14	Imágenes de AFM del virus artificial	56
4.15	Imágenes tomadas por AFM de las diferentes topologías de un plásmido	57
4.16	Imágenes de AFM de las partículas viromiméticas formadas de la interacción $C_4S_nB - DNA$ utilizando las diferentes topologías	58
4.17	Imagen de AFM que muestra la partícula formada $C_4S_{14}B$ con plásmido lineal	59
4.18	Espectros de emisión normalizados en función del tiempo	61
4.19	Cuadros esquemáticos representativos de los canales DexDem, DexAem y AexAem	62
4.20	Funciones de distribución de la distancia relativa (D^*) del DNA solo y el complejo $DNA - C_4S_{10}B$	63
4.21	Ensayo del desplazamiento del BrEt al medio acuoso debido a la interacción del DNA con C_4S_nB	65
7.1	Secuencia de aminoácidos de la proteína C_4S_0B	72

7.2	Secuencia de aminoácidos de la proteína C_4S_4B	73
7.3	Secuencia de aminoácidos de la proteína $C_4S_{10}B$	73
7.4	Secuencia de aminoácidos de la proteína $C_4S_{14}B$	73
7.5	SDS-PAGE de C_4S_nB	74
7.6	Espectros de masas MALDI-TOF de las proteínas C_4S_nB	75
7.7	Espectros de absorbancia en función de la concentración de C_4S_nB	76
7.8	EMSA del efecto del tamaño del molde de DNA en la interacción $C_4S_0B - DNA$	77
7.9	EMSA del efecto del tamaño del molde de DNA en en la interacción $C_4S_{10}B - DNA$	78
7.10	EMSA del efecto del bloque S_n en la interacción de la proteína con el DNA de 2000 pb	79
7.11	EMSA del efecto del bloque S_n en la interacción de la proteína con el DNA de 10 pb	80
7.12	EMSA de la dependencia de la temperatura en la interacción $C_4S_{10}B - DNA$	81
7.13	EMSA de la dependencia de la temperatura en la interacción $C_4S_0B - DNA$	82
7.14	EMSA de la dependencia del tiempo en la interacción $C_4S_{10}B - DNA$	83
7.15	Espectros de emisión del DNA con los fluoróforos Cy3-Cy5 con C_4S_nB	84
7.16	Espectros de emisión del DNA con el fluoróforos Cy3 con C_4S_nB	85
7.17	Parámetros termodinámicos del ensamblaje de $C_4S_{10}B$ obtenidos del ajuste al modelo de nucleación elongación	86
7.18	Mapa del plásmido p-redox.	87
7.19	Secuencia del plásmido p-redox.	88
7.20	Espectros de emisión normalizados que reflejan el cambio estructural del DNA debido a su interacción con $C_4S_{10}B$	89

7.21	Histogramas de smFRET para el DNA con los fluoróforos separados por 28 pb	90
7.22	Histogramas de smFRET para el DNA con los fluoróforos separados por 24 pb	90
7.23	Histogramas de smFRET para el DNA con los fluoróforos separados por 18 pb	91
7.24	Histogramas de smFRET para el DNA con los fluoróforos separados por 14 pb	91
7.25	Histogramas de smFRET para el DNA con los fluoróforos separados por 24 pb con la proteínas $C_4S_{10}B$ o C_4S_0B	92
7.26	Espectros de emisión del desplazamiento del bromuro de etidio intercalado en el DNA debido a la unión con C_4S_nB	93

Lista de ecuaciones

1.1 Eficiencia de FRET	7
1.2 Eficiencia de relativa de FRET	8
1.3 Distancia relativa del proceso FRET	9
3.1 Proporción molar de carga	20
3.2 Ecuación de Hill	21
3.3 Modelo de nucleación-elongación, régimen de elongación	25
3.4 Modelo de nucleación-elongación, régimen de nucleación	26
3.5 Modelo de nucleación-elongación, grado de cooperatividad del sistema	26
3.6 Parámetro de estequiometría no corregido	31
3.7 Fluorescencia relativa del ensayo de desplazamiento de BrET	34

Resumen

Los virus son sistemas biológicos derivados del autoensamblaje de unidades de proteína de la cápside con su material genético. Estos son capaces de entrar a las células y desensamblarse para entregar material genético de manera eficiente. Mediante una aproximación *bottom – up*, varios grupos han creado proteínas *de novo* (proteínas que no existen de manera natural) capaces de mimetizar algunas funciones de los virus como la unión a DNA/RNA. Sin embargo, no se comprende el proceso de autoensamblaje de estas proteínas *de novo* con DNA.

En esta tesis se estudia el autoensamblaje de la proteína *de novo* C_4S_nB con el DNA para formar partículas tipo rodillo. Se examinó la interacción $C_4S_nB - DNA$ y los factores que la afectan como el tamaño de molde de DNA, la longitud del bloque S_n de la proteína, concentración, temperatura y cinética mediante las técnicas en el ensamble de dispersión de luz, fluorescencia y EMSA, así como con la técnica de molécula única de microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés). Además, se estudió la conformación del DNA una vez condensado en la partícula tipo rodillo utilizando FRET en el ensamble y su aproximación de molécula única. Finalmente, se evalúa al complejo $C_4S_nB - DNA$ como sistema de encapsulamiento

de una molécula orgánica (bromuro de etidio, BrEt) en términos de fluorescencia. La interacción $C_4S_nB - DNA$ presentan una dependencia con la longitud del bloque S_n , así como del tamaño del molde de DNA. El efecto de la temperatura en el grado de agregación de las moléculas se midió con dispersión de luz para C_4S_nB y $C_4S_nB - DNA$ ajustando a un mecanismo tipo nucleación-elongación. Los resultados de FRET molécula única mostraron la unión inespecífica de C_4S_nB al DNA debido al bloque B. El ensayo de encapsulación del BrEt muestra a las proteínas C_4S_0B y C_4S_4B como las que mejor encapsulan a esta molécula orgánica. Estos resultados aumentan el entendimiento del proceso de autoensamblaje del complejo $C_4S_nB - DNA$ para formar partículas viromiméticas (que mimetizan virus) y ayudarán a mejorar el diseño de C_4S_nB para que tenga una mayor funcionalidad.

Índice general

Agradecimientos	II
Lista de abreviaturas	IV
Lista de figuras	VIII
Lista de ecuaciones	XII
Resumen	XIII
1 Introducción	1
1.1 Virus	1
1.2 Autoensamblaje	4
1.3 Fluorescencia	6
1.3.1 Transferencia de energía de resonancia de Förster	6
1.3.2 FRET de molécula única	8
1.4 Diseño de proteínas viromiméticas	9
1.4.1 Dominio de colágeno	9
1.4.2 Dominio de seda	11
1.4.3 Diseño <i>de novo</i> de C_4S_nB inspirado en el TMV	12
1.5 Antecedentes de la proteína viromimética C_4S_nB	13

2	Objetivo	17
2.1	Objetivos particulares	17
3	Materiales y métodos	18
3.1	Materiales	18
3.2	Expresión de $C_4S_{10}B$	19
3.3	SDS-PAGE y espectrometría de masas	20
3.4	Proporción molar de carga, NP	20
3.5	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética	21
3.6	PCR	22
3.7	Cuantificación de la concentración de proteína	23
3.8	Determinación de concentración crítica de las proteínas	24
3.9	Determinación de la constante de disociación por ensayo de fluorescencia, efecto PIFE-FRET	24
3.10	Dispersión de luz	25
3.10.1	Modelo de nucleación-elongación	25
3.11	Microscopía de fuerza atómica	27
3.12	Transferencia de energía por resonancia de Förster	28
3.12.1	Construcción de nucleótidos marcados fluorescentemente	28
3.12.2	FRET en el ensamble	28
3.12.3	Microscopio de reflexión total interna empleado para smFRET	29
3.12.4	Excitación alternada por láser	31
3.12.5	Preparación de las muestras	32
3.13	Ensayo de intercalación del bromuro de etidio	34

4	Resultados	35
4.1	Expresión y purificación de la proteína $C_4S_{10}B$	35
4.2	Efecto de la concentración en el autoensamblaje medido por uv-vis	36
4.3	Determinación de la interacción proteína-DNA y los factores que la afectan	39
4.3.1	Efecto de la longitud del molde de DNA	39
4.3.2	Efecto del tamaño del bloque de autoensamblaje	41
4.3.3	Efecto de la temperatura y cinética en la interacción C_4S_nB con DNA	43
4.3.4	Ensayo de fluorescencia PIFE-FRET para determinar la constante de interacción	45
4.3.5	Efecto del balance de carga en la intensidad de la luz para la partícula viromimética	47
4.4	Mecanismo de autoensamblaje	48
4.4.1	Mecanismo de autoensamblaje utilizando DNA como molde	50
4.5	Observación de las partículas tipo virus	52
4.5.1	Relación de la concentración de la proteína y su tamaño	52
4.5.2	Coensamblaje de la proteína $C_4S_{10}B$ con DNA	56
4.5.3	Efecto de emplear diferentes topologías de DNA en el autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$	57
4.6	Estudio de la condensación del DNA	60
4.7	Evaluación del encapsulamiento del bromuro de etidio del complejo $DNA - C_4S_nB$	65

5 Conclusiones	67
6 Perspectivas	70
7 Información suplementaria	72
7.1 Secuencia de proteínas recombinantes C_4S_nB	72
7.2 Caracterización de las proteínas recombinantes C_4S_nB mediante SDS-PAGE y MALDI-TOF MS	74
7.3 Espectros de absorbancia	76
7.4 EMSA del efecto de la longitud del molde de DNA en la interacciones $C_4S_nB - DNA$	77
7.5 EMSA de la dependencia de la longitud del bloque S_n en las interacciones proteína-DNA	79
7.6 EMSA del efecto de la temperatura en las interacción $C_4S_{10}B - DNA$	81
7.7 EMSA del efecto de la cinética en las interacción $C_4S_{10}B - DNA$. .	83
7.8 Espectros normalizados del efecto PIFE-FRET	84
7.9 Espectros de emisión del efecto PIFE	85
7.10 Parámetros del modelo de nucleación-elongación	86
7.11 Mapa del plásmido	87
7.12 Secuencia del plásmido	88
7.13 Espectros de emisión de FRET en función del tiempo	89
7.14 Histogramas de los experimentos de smFRET	90
7.15 Espectros de emisión del ensayo de bromuro de etidio	93

Capítulo 1

Introducción

1.1. Virus

Los virus son el derivado del autoensamblaje de unidades de proteínas en cápsides que encapsulan su material genético. Son capaces de autoensamblarse de manera espontánea en un ambiente concurrido como el interior de una célula y son sistemas altamente efectivos en entregar material genético a una célula. Además, dependiendo del virus y las condiciones (como pH y fuerza iónica), estos se forman utilizando o no su material genético como molde [1].

En el 2011, Elrad y Hagan [2] propusieron con base en sus estudios computacionales que el ensamblaje de la cápside procede vía 2 diferentes mecanismos:

1. Mecanismo *en masse*, donde varias subunidades de proteína se adsorben en un molde de manera desordenada seguido de un rearrreglo cooperativo que forma una cápside ordenada.
2. Mecanismo de nucleación-elongación, en el que un núcleo de proteínas interacciona con el material a encapsular y da paso a la fase de elongación donde múltiples subunidades de proteína se adicionan a la creciente cápside.

El mecanismo a seguir será dictado por el juego de las fuerzas de interacción entre los bloques de construcción del virus, interacciones proteína-proteína y proteína-material encapsulado, así como de las condiciones de la solución (pH y fuerza iónica). Mientras que en el mecanismo *en masse* la interacción proteína-material encapsulado es la que prevalece, en el de nucleación-elongación la interacción proteína-proteína es la que domina. Además, en las simulaciones se ha logrado cambiar de un mecanismo *en masse* a uno de nucleación-elongación aumentando la fuerza iónica de la solución en un mismo sistema [2, 3].

Recientemente, estudios experimentales han demostrado que ambos mecanismos son viables. Empleando la dispersión de rayos X de ángulo reducido (SAXS, por sus siglas en inglés) en tiempo real se siguió el ensamblaje de las proteínas cápside de la cápside del virus SV40 con su RNA, donde la ausencia de intermediarios sugieren que el ensamblaje procede vía nucleación-elongación [4]. Mientras que con la misma técnica, Chevreuril [5] mostró evidencia de que el ensamblaje del virus CCMV se da por un mecanismo *en masse*. Incluso utilizando fluorescencia de correlación de molécula única realizado por Borodavka [6], se sugiere un mecanismo *en masse*. Cabe mencionar que la técnica mide el radio hidrodinámico en función del tiempo y carece de información de las especies presentes. Otras técnicas para el estudio del ensamblaje de virus han sido la dispersión de luz [7, 8] y la microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) [9].

El entendimiento de los virus nos ha permitido aplicarlos en cuestiones médicas a través de los años. Por ejemplo, algunos virus naturales han logrado ser transformados para servir como vacunas como estrategia contra las enfermedades virales [10].

En años recientes, su estudio va enfocado en modificar a los virus para aplicarlos como partículas capaces de entregar fármacos o material genético a células específicas e incluso emplearlos como nanoreactores [11]. Es un enfoque atractivo el utilizar solamente la cápside de los virus para entregar material de interés a células, ya sea encapsulándolo en su interior o uniéndolo químicamente al exterior [12]. Sin embargo, se debe ser cauteloso ya que al unir moléculas en el exterior de la cápside por métodos químicos o incluso por la modificación de la secuencia de aminoácidos

puede derivar en la pérdida de la funcionalidad del virus. Aunado a esto, existen limitaciones estructurales y mecánicas que deben ser tomados en cuenta [12]. Las cápsides de los virus se ensamblan en estructuras definidas, limitando el espacio de almacenamiento para moléculas o ácidos nucleicos. Además, se ha demostrado por experimentos de molécula única que el encapsulamiento de material genético no viral conlleva, en algunos casos, a la formación de estructuras aberrantes de estos sistemas [6] lo que complicaría su uso en terapia genética.

Las principales estrategias para crear partículas acarreadoras de material derivados de virus o inspirados en ellos son la *top – down* y *bottom – up*. La aproximación *top – down* consiste en la modificación química de los virus naturales para diferentes aplicaciones. La estrategia *bottom – up* es una alternativa a largo plazo donde se desarrollan proteínas *de novo* (proteínas que no existen de en la naturaleza pero están inspiradas en ella y se sintetizan a partir de técnicas de DNA recombinante) que sirvan como bloques de construcción y se autoensamblen en partículas que mimeticen a los virus, pero que no impliquen sus riesgos. A continuación se describirá el autoensamblaje y los factores que lo afectan.

1.2. Autoensamblaje

El autoensamblaje se describe como la formación espontánea de macromoléculas mediante interacciones no covalentes entre sus bloques de construcción. En el caso de los virus, las proteínas de la cápside y el material genómico (DNA o RNA) funcionan como los bloques de construcción que se ensamblan por interacciones tipo ion-ion, ion-dipolo, puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo y van der Waals. Además, en medio acuoso, el efecto hidrofóbico juega un papel determinante en el plegamiento de las supraestructuras biológicas. Para entender y crear macroestructuras con mayor funcionalidad, el entendimiento de las interacciones que lo conllevan, así como el tipo de mecanismo, es vital [13, 14].

Los dos tipos de mecanismos principales por los cuales se lleva a cabo el autoensamblaje homogéneo son el isodésmico y el cooperativo (figura 1.1). El mecanismo isodésmico se caracteriza por la formación reversible de un enlace no covalente K que es idéntico en todos los pasos del ensamblaje. Mientras el mecanismo cooperativo ha sido descrito como una variación del isodésmico. Este consiste en dos etapas, la primera etapa es la de nucleación que está gobernada por la constante

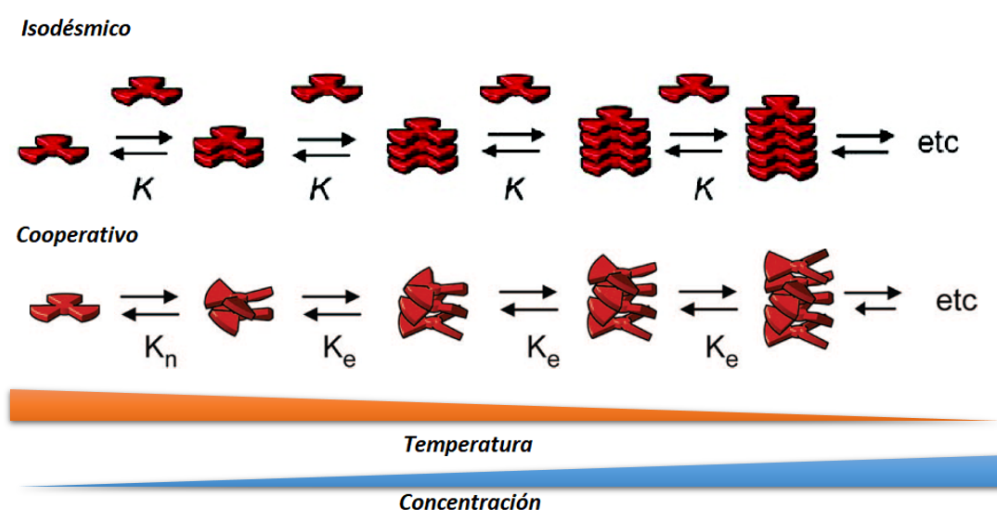


Figura 1.1: Representación gráfica de los bloques de construcción y los tipos de mecanismos de autoensamblaje, así como su dependencia con la temperatura y concentración. Imagen tomada de [13].

K_a , en esta etapa el bloque de construcción interacciona no covalentemente con otros bloques para formar un núcleo y, en seguida, da paso a la segunda etapa, en la cual se elonga la partícula, con una constante característica K_e mayor a la primer constante en energía [15, 16].

El tipo de mecanismo de autoensamblaje de estos sistemas es comúnmente estudiado empleando mediciones dependientes de la concentración y temperatura. Ambos pueden dar pruebas de la transición entre estados [13].

Finalmente, existen modelos teóricos para ajustar estas mediciones y discernir si se trata de un mecanismo isodésmico o cooperativo (figura 1.2) [13, 15, 16].

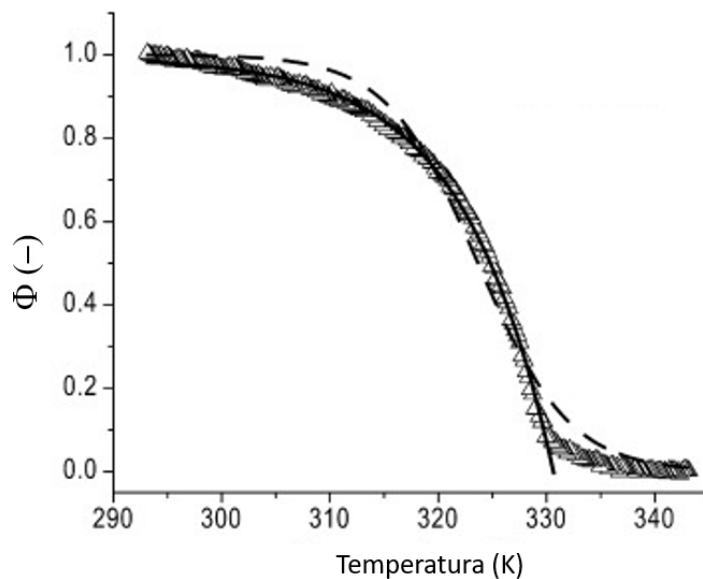


Figura 1.2: Medición del grado de agregación del sistema en función de la temperatura obtenido por datos espectroscópicos. Los datos fueron normalizados y ajustados a los modelos de temperatura de los mecanismos cooperativo (—) e isodésmico (- - - -). Imagen tomada de Smulders [15].

1.3. Fluorescencia

A través de los años se han empleado técnicas de espectroscopia de fluorescencia para estudiar en el ensamble las interacciones de las proteínas así como su mecanismo. Actualmente, basado en la fluorescencia de moléculas únicas, se ha podido examinar a estos sistemas biológicos desde una perspectiva detallada accediendo a información que antes no era posible [17]. En esta sección se describirá de manera breve la técnica de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés) y su aproximación en molécula única smFRET (por sus siglas en inglés) que son esenciales en este trabajo.

1.3.1. Transferencia de energía de resonancia de Förster

La técnica de FRET se basa en el proceso físico que sucede cuando un fluoróforo excitado (donador, D) transfiere energía no-radiante a otro fluoróforo (aceptor, A). Este proceso puede ser descrito por un diagrama de Jablonsky mostrado en la figura 1.3.

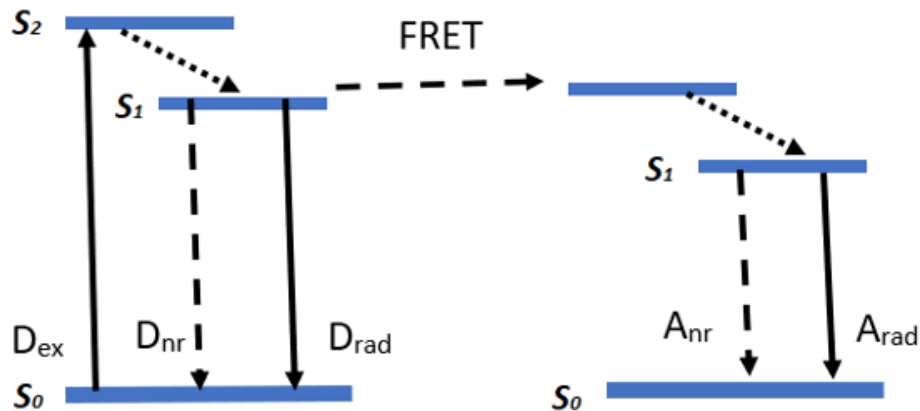


Figura 1.3: Descripción del proceso de FRET mediante el diagrama de Jablonski. Donde S_0 es el estado basal y S_2 , S_1 son los estados excitados. D_{ex} , D_{nr} y D_{rad} son la excitación del donador, su relajación no-radiativa y su emisión de un fotón respectivamente. Mientras A_{nr} es la relajación no-radiativa del aceptor y A_{rad} es su emisión de un fotón.

El diagrama de Jablonski es un diagrama de energía que representa con líneas horizontales a los estados electrónicos de las moléculas o átomos. S_0 representa al estado basal de energía mientras S_1 y S_2 son estados excitados de energía. Cuando un fluoróforo donador es excitado con un fotón de una fuente externa, este va del estado basal S_0 al estado excitado S_2 (D_{ex} , línea sólida). Posteriormente, un proceso de conversión interna no-radiativa lleva al donador al estado S_1 (línea punteada). Una relajación no-radiativa (D_{nr} , línea discontinua) o la emisión del fotón (D_{rad} , línea sólida) llevará de vuelta al donador al estado basal. Sin embargo, en la presencia de un fluoróforo aceptor, el donador puede transferir energía no-radiativa en un proceso conocido como FRET (línea discontinua) y llevar al aceptor a un estado excitado (S_1 o S_2) para que, finalmente, decaiga de manera no-radiativa (A_{nr} , línea discontinua) o emitiendo un fotón (A_{rad} , línea sólida) [18].

En FRET, la proporción de energía transferida entre el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor depende fuertemente de la distancia que hay entre ellos (figura 1.4). Esto lo convierte en una técnica útil para el estudio dinámico conformacional del DNA mientras interactúa con una proteína [19, 20]. La eficiencia en la transferencia de energía está dada por la ecuación 1.1:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + D^6} \quad (1.1)$$

donde D es la distancia entre los fluoróforos y R_0 es el radio de Förster que describe la distancia donador aceptor en la que la eficiencia de FRET es del 50%. El radio de Förster dependerá de las propiedades de los fluoróforos y de la orientación relativa del momento dipolar del donador con respecto al del aceptor [17, 19]. Esta definición de FRET se engloba las mediciones realizadas en un ensamble y de molécula única. Sin embargo, cuando utilizamos el término smFRET, nos referimos específicamente a las mediciones de molécula única. En la próxima sección se describirá la aproximación de smFRET.

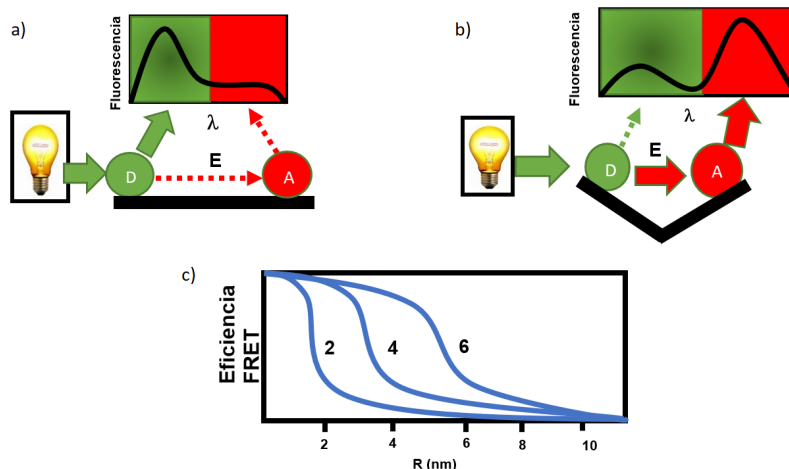


Figura 1.4: Descripción del mecanismo de FRET a) Los fluoróforos están separados por una distancia donde hay poca transferencia de energía, b) Los fluoróforos se acercan a una distancia que aumenta la transferencia de energía.. c) Relación entre la eficiencia de FRET y la distancia entre fluoróforos ($R_0 = 2, 4, 6$ nm).

1.3.2. FRET de molécula única

FRET de molécula única (smFRET, por sus siglas en inglés) es una técnica bien establecida que mide la distancia entre dos fluoróforos con alta resolución espacial (nanométrica) y temporal (milisegundos) [17]. Aquí, se comparan las intensidades de la luz medida en el canal del donador, después de su excitación (DD), con la intensidad de la luz medida en el canal del aceptor después de la excitación del donador (DA). Con estos parámetros se calcula la proporción E^* para cada molécula en cada cuadro de tiempo empleando la ecuación 1.2.

$$E^* = \frac{DA}{DD + DA} \quad (1.2)$$

Donde E^* es la eficiencia de FRET no corregida. Para calcular la eficiencia exacta E , una serie de correcciones necesita ser aplicada [17].

A partir de la eficiencia no corregida (E^*) es posible calcular las distancias relativas (D^* , ecuación 1.3) empleando el radio de Förster del par de fluoróforos (R_0).

$$D^* = R_0 \left(\left(1 - \frac{1}{E^*} \right) - 1 \right)^{1/6} \quad (1.3)$$

1.4. Diseño de proteínas viromiméticas

Basados en la aproximación *bottom – up* varios grupos de investigación han desarrollado proteínas *de novo* capaces de encapsular material genético. Estas son capaces de imitar algunas propiedades de los virus (viromiméticas). Baker y su equipo [21], basados en cálculos computacionales, modelaron y sintetizaron una proteína capaz de autoensamblarse en una cápside y encapsular el RNA de manera inespecífica. Mientras Hilvert [22], insertó un módulo de unión a RNA a una proteína de cápside no viral logrando el reconocimiento específico a una secuencia de RNA.

En esta tesis se abordará el estudio de la proteína C_4S_nB desarrollada por de Vries [23]. Esta proteína es capaz de interactuar y condensar DNA en partículas tipo rodillo.

Para el diseño de C_4S_nB se aprovechó que el autoensamblaje de proteínas a nanoestructuras no es exclusivo de los virus, sino que juega un papel fundamental en todo proceso biológico. Inspirados en dominios de proteínas naturales como el colágeno y la seda, se crearon secuencias de estructuras capaces de adoptar una función específica. El combinar estas secuencias de estructuras (derivados del colágeno o seda) en una proteína múltiples funciones también se mezclan. A continuación, se describirán las proteínas fibrosas del colágeno y la seda con sus respectivas modificaciones para entender mejor a la proteína C_4S_nB desarrollada.

1.4.1. Dominio de colágeno

El colágeno es una proteína abundante en los seres humanos. Este se localiza en huesos, tendones, piel, ligamentos, etc. Se han encontrado más de 25 diferentes tipos de colágeno en los vertebrados y cada uno está cercanamente relacionado.

El dominio del colágeno se caracteriza por la secuencia altamente repetida de aminoácidos $(Gly - X_{aa} - Y_{AA})_n$, a pesar que X_{aa} y Y_{AA} pueden ser cualquier aminoácido existe un predominio de prolinas. Muchos de estas prolinas (y lisinas)

son hidroxiladas como modificación postraducciona [24]. En el caso del colágeno tipo I, este forma cadenas polipeptídicas que se enlazan en triple hélices (figura 1.5). Estas triple hélices al ser calentadas en ácido se desensamblan y forma un gel [25]. En el 2001, Werten [26] sintetizó en *Pichia pastoris*, una proteína inspirada en la gelatina con propiedades hidrofílicas y no degradable. Esta proteína es una repetición de la secuencia $(Gly - X_{aa} - Y_{aa})_n$ encontrada en el colágeno pero ahora X_{aa} y Y_{aa} están ocupados por aminoácidos hidrofílicos y no cargados. En solución adopta la conformación *random coil* como en el estado desnaturalizado. La proteína estudiada en esta tesis toma como punto de partida la proteína diseñada por Werten que se abrevia como bloque "C".

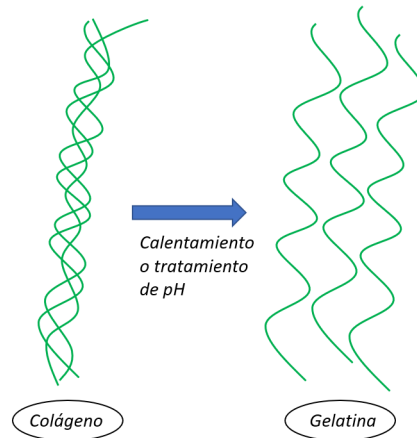


Figura 1.5: Triple hélice del colágeno que cuando se calienta o recibe tratamiento de pH se desensambla y forma un gel.

1.4.2. Dominio de seda

La seda está compuesta por arreglos de proteínas fibrilares y juega un papel clave en arañas y gusanos de seda, también es explotada por humanos en la industria textil. Se sabe que estas proteínas adoptan una estructura de hoja β que se autoensambla para formar fibras (figura 1.6a) [24]. La secuencia de este dominio depende de la especie que la sintetiza. En el gusano *Bombyx mori* se encuentra como un polipéptido rico en glicina y alanina (figura 1.6b) [27]. Varios grupos de investigación se han basado en esta secuencia de estructura para diseñar y producir proteínas capaces de autoensamblarse. La proteína descrita en los siguientes capítulos contiene la secuencia $(GAGAGAGX)_n$ donde X es una glutamina. En otras investigaciones [28], la posición X ha sido tomada por ácido glutámico, histidina o lisina. Lo que permite tener un autoensamblaje regulado por el pH de la solución.

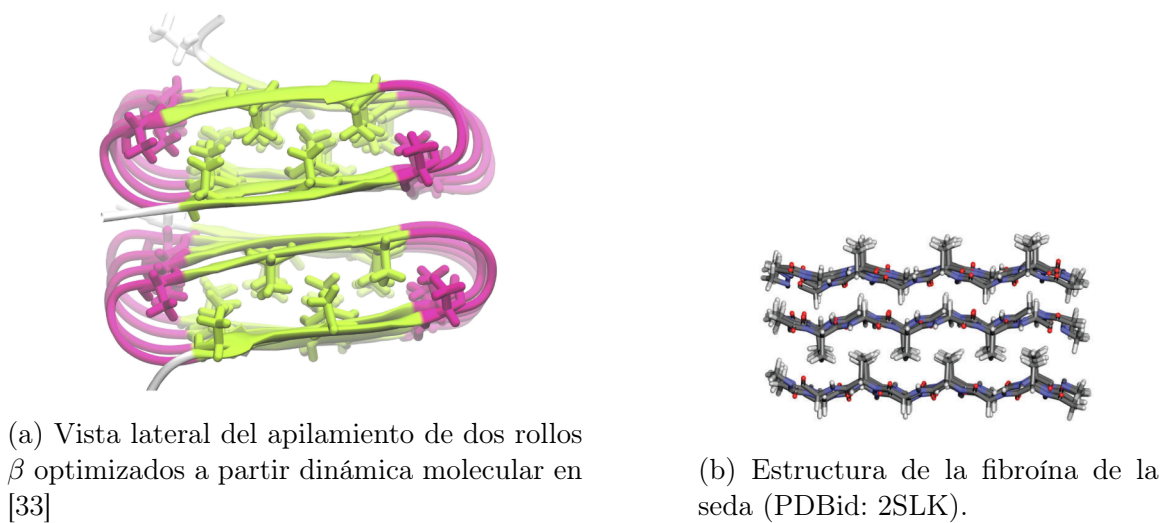


Figura 1.6: Estructura del bloque de seda.

1.4.3. Diseño *de novo* de C_4S_nB inspirado en el TMV

La proteína C_4S_nB consta de tres bloques C_4 , S_n y B que se basaron en propiedades fisico-químicas del virus del mosaico del tabaco (TMV, por sus siglas en inglés) descrito a continuación.

El TMV consta de una proteína que se autoensambla en un núcleo de proteínas que reconocen específicamente una secuencia de RNA (figura 1.7a), posteriormente otros núcleos de proteína interactúan con este núcleo de ensamblaje (figura 1.7b) y da paso a la elongación de la partícula formando una partícula tipo rodillo (figura 1.7c) [29] .

Al examinar a la proteína del TMV, se pueden extrapolar tres propiedades fisico-químicas principales que permiten la formación de la partícula viral.

1. Estabilidad coloidal de la partícula, así como protección contra el ambiente.
2. Interacción y unión a una secuencia específica de RNA.
3. Cooperatividad (interacción proteína-proteína) que conlleva al autoensamblaje de la partícula.

Inspirados en estas tres propiedades de las proteínas del virus TMV, se diseñó la proteína *de novo* C_4S_nB que es capaz de cumplir estas tres propiedades en cada uno de sus tres diferentes bloques (C_4 , S_n y B).

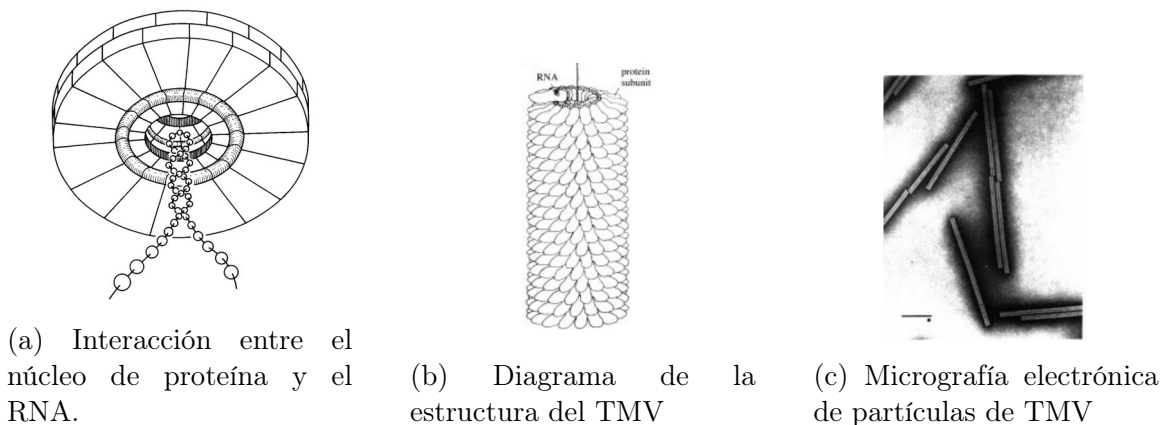


Figura 1.7: Virus del TMV. Imágenes adaptadas de Klug [29].

1.5. Antecedentes de la proteína viromimética

C_4S_nB

En el 2012, de Vries tomó las propiedades 1 y 2 (estabilidad coloidal y unión al DNA) de la proteína del TMV para diseñar la proteína C_4S_0B bimodular (figura 1.8) capaz de interactuar con DNA [30]. El primer bloque, " C_4 ", es la repetición de cuatro veces el bloque C (descrito en la sección 1.4.1) inspirado en el colágeno y que en conjunto consta de aproximadamente 400 aminoácidos hidrofílicos, este confiere estabilidad

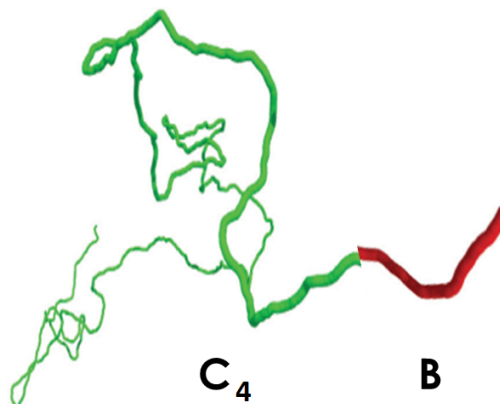


Figura 1.8: Ilustración de la proteína C_4S_0B , En verde esta el módulo C_4 , mientras en rojo se encuentra el B

coloidal a la partícula. El segundo bloque es S_0 y representa la ausencia del bloque de autoensamblaje. El bloque " B " es una secuencia de 12 lisinas que a pH fisiológico median la interacción electrostática con los fosfatos del DNA.

Posteriormente, a la proteína descrita anteriormente se le añadió un tercer bloque, S_n (con $n \geq 4$) para que esta adquiriera la tercera propiedad del TMV, la cooperatividad (interacción proteína-proteína). Este bloque consiste en n repeticiones de un octapéptido GAGAGAGQ y está inspirado en la seda (descrito en la sección 1.4.2).

La proteína C_4S_nB es capaz de interactuar y condensar al DNA de manera cooperativa cuando $n \geq 10$ (figura 1.9) [23], formando así, nanopartículas tipo rodillo similares a la del virus del mosaico del tabaco. Este desarrollo decisivo significó tener la capacidad para obtener partículas tipo virus utilizando múltiples bloques de proteínas funcionales de baja complejidad y/o DNA como bloques de construcción.

Estas cuatro proteínas diseñadas C_4S_0B , C_4S_4B , $C_4S_{10}B$ y $C_4S_{14}B$ son relativamente nuevas, por lo que cuentan con pocos estudios experimentales, teóricos y computacionales. En esta sección nos referiremos a ellos para un mejor panorama.

En el ámbito teórico, Punter y colaboradores [31], estudiaron el ensamblaje de $C_4S_{10}B$ resolviendo de manera numérica las ecuaciones de cinética pertinentes y comparándolas con resultados experimentales de AFM. Además, mostraron el efecto de la concentración de la proteína sobre los sitios de unión libre de un molde, indicando la existencia de encapsulamiento parcial en un régimen de exceso de sitios de unión libre respecto a la $C_4S_{10}B$.

Computacionalmente, Zhao [32] estudió al bloque S_{10} utilizando dinámica molecular. Mediante un modelo de precisión atómica y el campo de fuerza ff12SB con agua TIP3P obtuvieron una estructura de rollo β estabilizada por puentes de hidrógeno. Posteriormente, Zhao [33] examinó la interacción de dos bloques S_{10} y cómo estos se desensamblan mediante un mecanismo paso a paso, es decir, hebra por hebra.

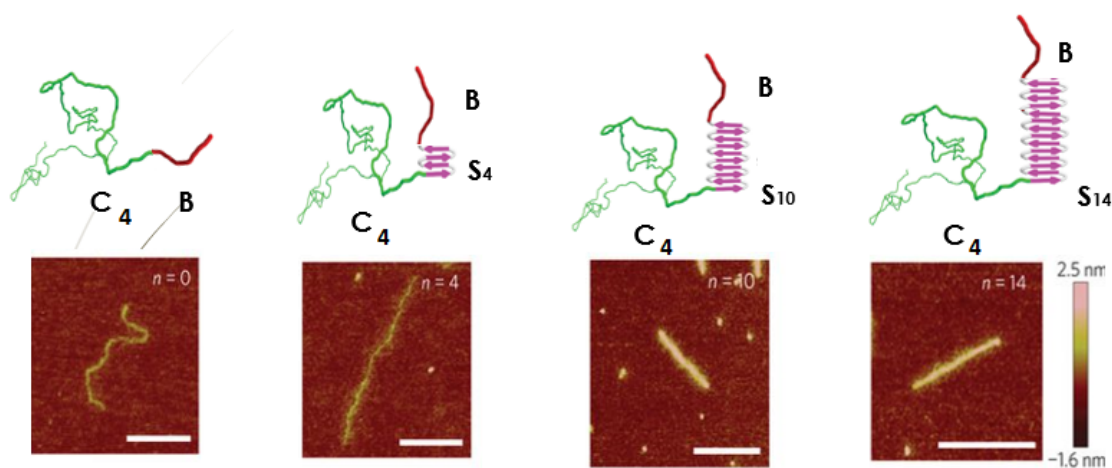


Figura 1.9: Esquema e imágenes de AFM de proteínas diseñadas encapsulando un DNA de 2600 (pares de base, pb). Figuras tomadas de Hernández [23]. La barra de escala corresponde a 300 nm.

Experimentalmente, se estudió el autoensamblaje de las proteínas con dispersión de luz [34]. Se determinó que estas se autoensamblan en partículas tipo rodillo sin la necesidad de DNA como molde a una concentración crítica (CC) de $60 \mu\text{M}$ y $15 \mu\text{M}$ para $C_4S_{10}B$ y $C_4S_{14}B$ respectivamente. Además, se siguió la cinética de ensamblaje de $C_4S_{10}B$ a diferentes concentraciones donde se vio que se alcanza el equilibrio a las 12 horas.

Mientras tanto, la interacción $DNA - C_4S_0B$ fue estudiada mediante dispersión de luz y se demostró que la partícula formada por la proteína C_4S_0B y el DNA se disocia a concentraciones mayores de 200 mM de NaCl [30].

Hernandez-Garcia [23] evaluó por varias técnicas el coensamblaje de C_4S_nB con DNA. Las técnicas que destacan son AFM y potencial Z. Mediante imágenes de AFM se demuestra que las proteínas con el bloque S_n con $n \geq 10$ son capaces de condensar al DNA a un tercio de su longitud original. En tanto, midiendo el potencial Z en solución, se exhibe la existencia de dos especies cuando la concentración de proteína no es tan alta respecto al DNA.

Cingil [35] estudió el mecanismo de formación de las cápsides virales utilizando la proteína $C_4S_{10}B$ y un polímero sintético que cambia su espectro de luminiscencia en función de su arreglo espacial. Con sus resultados propone que, a un balance de carga cercano a 1, el coensamblaje de $C_4S_{10}B$ y el polímero se lleva a cabo mediante un mecanismo de adsorción de Langmuir y un posterior reacomodo de las proteínas debido a la cooperatividad. Además, cuando el balance de carga es mayor a 1 (régimen de exceso de proteína) aparece un mecanismo en competencia debido a la interacción proteína-proteína. Aunque Cingil [35] proclama elucidar el mecanismo de formación de una partícula viral, surge la duda si el mecanismo sería diferente al utilizar DNA como molde debido a las diferentes interacciones que tendrían los distintos bloques de construcción, puesto que los virus encapsulan material genético. Las diferencias entre estos dos moldes (DNA y el polímero sintético) son notorias y van desde sus propiedades mecánicas (longitud de persistencia), el tamaño del molde, hasta entre la diferencia en la densidad electrónica del oxígeno del grupo fosfato del DNA y del grupo carboxílico del polímero.

Recientemente, Marchetti [36] reveló el mecanismo de coensamblaje de $C_4S_{10}B$ con DNA. Utilizando pinzas ópticas (experimento de molécula única) siguió en tiempo real cómo varios núcleos de proteínas independientes se ensamblan a un DNA. Sugiriendo un mecanismo cooperativo. Este mecanismo contrasta el expuesto por Cingil [35] lo cual puede deberse a la diferencia de la interacción de los moldes descrita anteriormente (DNA y polímero sintético).

Willems [37] modificó la proteína $C_4S_{10}B$ cambiando el bloque C_4 inspirado en el colágeno por uno basado en la elastina (proteína fibrilar), lo que causó que la proteína ya no condensará al DNA.

Finalmente, Jekhmane probó que la proteína $C_4S_{10}B$ es capaz de proteger al DNA de ataque enzimático y transfectar con baja eficacia a células mamarias [38].

Como se aprecia, estas proteínas diseñadas por de Vries [30, 23] todavía tienen un amplio margen de mejora para llegar a tener aplicaciones médicas (por ejemplo, a diferencia de su análogo natural, carecen de especificidad). No obstante, al ser proteínas construidas a partir de bloques se le pueden ir añadiendo otros para que adquieran nuevas y mejores funciones. Para realizarlo tal cosa, se necesita un mejor entendimiento de las interacciones que conllevan al autoensamblaje, así como de su mecanismo.

Capítulo 2

Objetivo

Incrementar el entendimiento molecular y estructural del mecanismo de autoensamblaje de las proteínas *de novo* C_4S_nB viromiméticas con DNA con la finalidad de mejorar el diseño y la posible aplicación de las proteínas viromiméticas.

2.1. Objetivos particulares

1. Expresar y purificar la proteína recombinante $C_4S_{10}B$ en *Pichia pastoris*.
2. Estudiar la interacción $C_4S_nB-C_4S_nB$ o $C_4S_nB - DNA$ así como los factores que la afectan mediante absorbancia, EMSA, dispersión de luz y fluorescencia.
3. Estudiar el proceso de autoensamblaje de la proteína viromimética con y sin DNA empleando dispersión de luz.
4. Estudiar la conformación del DNA en la nanoestructura final de la partícula autoensamblada con la proteína con AFM y FRET.
5. Evaluar la capacidad del complejo $DNA - C_4S_nB$ como sistema de encapsulación.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Materiales

Las proteínas C_4S_0B , C_4S_4B , $C_4S_{10}B$, $C_4S_{14}B$ (secuencia en información suplementaria, figuras S. 7.1, S. 7.2, S. 7.3, S.7.4) fueron producidas y purificadas en la Universidad de Wageningen (para detalles en el procedimiento consultar Hernández-García [23]). Se corroboró la integridad de las mismas por MALDI-TOF MS y SDS-PAGE. Parte de los experimentos emplean proteína $C_4S_{10}B$ producida y purificada por un procedimiento descrito más adelante. Los DNA marcados fluorescentemente se ordenaron a IBA, Alemania. Mientras el DNA de 2000, 1000, 100, 50, 10 pb NoLimitsTM, los nucleótidos empleados para la PCR, la solución para teñir DNA SYBR safeTM, el amortiguador de carga para DNA 6x, la solución para teñir proteínas PageBlueTM, el amortiguador TAE 50x, la DNA Polimerasa DreamTaqTM, la agarosa, el ditiotreitól (DTT) fueron adquiridos con ThermoFischer. La acrilamida se consiguió con Bio-rad. La enzima de restricción EcoRI se compró a Promega. El kit miniprep de DNA fue conseguido a través de Sigma-Aldrich. El kit de purificación de banda fue comprado Zymo Research. Los compuestos $NaH_2PO_4 \bullet H_2O$ y $Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$ grado analítico se adquirieron con Merck y se utilizaron para preparar el amortiguador fosfato (10 mM y pH 7.4).

3.2. Expresión de $C_4S_{10}B$

La proteína $C_4S_{10}B$ se expresó en el laboratorio inoculando 1 mL de banco de una cepa recombinante de levadura *Pichia pastoris* que contenía el gen artificial que codifica para su secuencia de aminoácidos en 300 mL de MGY. Después de 4 días de crecimiento se induce la producción de la proteína centrifugando el inóculo (20 °C, 8 min, 6000 x g) y cambiando a 1 L de medio de MM añadiendo MeOH cada 12 horas por tres días. Durante la fermentación la proteína es secretada al medio y posteriormente se centrifuga la solución (10,000 x g, 4 °C, 20 min y colectando el sobrenadante) para que en un medio libre de células se inicie la purificación. En el medio libre de células se precipitaron las sales añadiendo EDTA 10 mM, 1 mM PMSF, NaOH hasta pH = 8.0 y centrifugando (10,000 x g, 4 °C, 20 min y colectando el sobrenadante). En seguida, la proteína fue precipitada selectivamente de la solución mediante fraccionamiento con sulfato de amonio al 50 % de saturación e incubada a 4°C por una noche con una subsecuente centrifugación (13,000 x g, 4 °C, 30 min). La pastilla se resuspendió en 100 mL de agua grado Milli-Q[®] y se incubó otra noche al 50 % de saturación de sulfato de amonio y se centrifugó (30,000 x g, 4 °C, 10 min). La pastilla se resuspendió en 15 mL de agua grado Milli-Q[®], en seguida se añadió acetona y NaCl a una concentración final de 40 % (v/v) y 50 mM, respectivamente. Se centrifugó (15,000 x g, 10 min) para remover lo insoluble y la concentración final de la acetona en el sobrenadante se llevó al 80 % (v/v). Se mezcló vigorosamente en un vortex hasta formar un precipitado y se retiró el sobrenadante luego de un centrifugado (5,000 x g, 10 min). El precipitado se secó y se resuspendió en agua grado Milli-Q[®] para dializar extensivamente con una membrana con tamaño de corte de 14 kDa y después se liofilizó. La pureza de la proteína se corroboró mediante gel SDS-PAGE y MALDI-TOF MS.

3.3. SDS-PAGE y espectrometría de masas

Muestras de proteínas (10 μL , 2 g/L) se mezclaron con amortiguador de carga para DNA 6x (adquirido con ThermoFischer) y se colocaron en un termobloque que estaba a 99 °C, por 10 minutos. Se cargaron las muestras, además de un marcador de peso molecular, en un gel concentrador al 4% (acrilamida) combinado con un gel separador al 10% (acrilamida) preparado con agua destilada (2447 μL), 1.5 M Tris pH 8.8 (1250 μL), SDS 10% (50 μL), acrilamida/bisacrilamida 40% (1250 μL), TEMED (10 μL) y persulfato de amonio 10% (50 μL). Se separaron por electroforesis durante 90 minutos a 70 V con amortiguador tanque (10x; 1 L de agua destilada, Trizma base 30.3 g, glicina 144 g, SDS 10 g). Los geles se tiñeron con solución de tinte PageBlue proteinTM siguiendo el protocolo del fabricante. Los espectros de masas se midieron en el espectrómetro de masas MALDI-TOF Microflex marca Bruker. Las muestras estaban a una concentración de 1-2 g/L. Se utilizó como matriz ácido sinapínico en relación 1/5 muestra/matriz y se prepararon por el método de secado de gota.

3.4. Proporción molar de carga, NP

El término NP se refiere a la proporción molar de carga eléctrica que hay en la solución debido a la interacción proteína-DNA. Se define como la proporción molar entre la carga positiva del NH_3^+ de las lisinas del bloque B de la proteína y el grupo PO_4^- cargado negativamente del DNA.

$$NP = \frac{n^0 \text{NH}_3^+}{n^0 \text{PO}_4^-} \quad (3.1)$$

Se aprecia en la ecuación 3.1 que cuando el $NP < 1$ existe un exceso de sitios de unión en relación a la proteína, mientras que cuando $NP = 1$, la solución esta en un balance de cargas. Este término se puede visualizar como la estequiometría de cargas que existe entre la proteína y el DNA.

3.5. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética

Los ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se llevaron a cabo para determinar la interacción proteína-DNA y los factores que la afectan como son temperatura, tiempo de incubación, tamaño del módulo de autoensamblaje y tamaño del molde del DNA (empleando DNA NoLimitsTM de 2000, 1000, 100, 50 y 10 pb o ensamblados por PCR para longitudes de 539 y 367 pb (procedimiento descrito posteriormente). Las muestras se prepararon en el siguiente orden: La concentración final deseada de C_4S_nB se calentó previamente a 70 °C por 10 minutos y se dejó incubando por una noche (a menos que se indique lo contrario) con a una solución de 2 ng/ μ L de DNA aforada a 10 μ L en amortiguador fosfato (10 mM a un pH = 7.4) y con 1 mM de DTT. Luego, dependiendo de la longitud del DNA las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 5 - 20 % (muestras menores a 200 pb) o un gel de agarosa al 1 % (mayores a 200 pb). Los geles fueron teñidos con solución de tñido de DNA Syber safeTM y escaneados mediante un sistema de documentación de imagen para, posteriormente, analizar las intensidades de las bandas con el software ImageJTM. La relación N/P para la unión al 50 % de DNA (K_{Dapp}) de la proteína se calculó ajustando las intensidades de DNA libre a la variación de la ecuación de Hill (ecuación 3.2).

$$\theta = \frac{1}{1 + \frac{K_{Dapp}}{[C_4S_nB]}^N} \quad (3.2)$$

Donde N es la constante de Hill, θ es la fracción unida y $[C_4S_nB]$ se refiere a la concentración de la proteína libre en la disolución, esta se asume que es igual a la concentración total de la proteína debido a que en los geles no se aprecia unión de C_4S_nB a bajas concentraciones, mientras a altas concentraciones se puede ver que se encuentra en un régimen de exceso la proteína y se puede considerar mínima la fracción unida al DNA.

3.6. PCR

Para la PCR se empleó una disolución aforada a 50 μL con agua Mili-Q que contenía de DNA polimerasa DreamTaqTM (con amortiguador DreamTaqTM, 2 mM MgCl_2 y 0.2 mM dNTP, más DNA polimerasa DreamTaqTM), iniciadores Fw y Rv (descritos posteriormente) a 0.2 μM cada uno. Mientras como molde de DNA se utilizó el plásmido p-redox a 0.625 ng/ μL (Mapa del DNA molde en figura S.7.18 y secuencia en figura S. 7.19). Para construir los DNA de 539 y 367 pb se usaron los iniciadores Rv 5' - GCAACACGTTTTGCAACCTGTTTG - 3' y 5' - CACCACCACAACCACCACCG - 3' respectivamente.

Mientras el mismo iniciador Fw se empleó para ambos casos 5' - GCCGAGCGCGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG - 3'.

Para construir el DNA de 732 pb se utilizó el iniciador Fw 5' - GCCGAGCGCGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG - 3' y el iniciador Rv 5' - TCAGTGAGCGAGGAAGCGGA - 3'. Estos se corrieron en una rampa de temperatura mostrada en la figura 3.1 con el termociclador T100TM de Bio-Rad. Finalmente, las construcciones de DNA se corrieron en un gel con marcador de peso molecular que corroboró el tamaño esperado (732, 539 y 367 pb) y se purificaron de banda de agarosa.

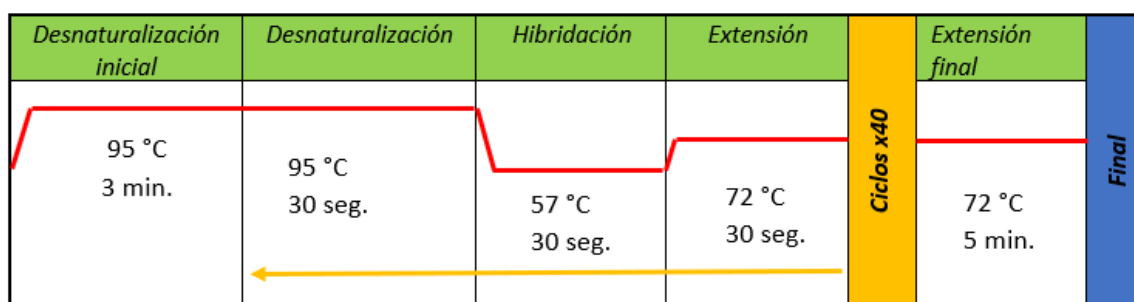


Figura 3.1: Condiciones de reacción para la PCR.

3.7. Cuantificación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de la concentración de la proteína se realizó una curva de calibración disolviendo cada una de las proteínas liofilizadas en amortiguador fosfatos (10 mM, pH = 7.4) con 1 mM de DTT. Se utilizaron 6 concentraciones en cada proteína y se calculó la curva de calibración a una $\lambda = 230$ nm. Los espectros de absorción fueron adquiridos mediante el equipo NanoDrop One de ThermoFischer. A continuación, en la figura 3.2 se muestra como ejemplo la curva de calibración de la proteína $C_4S_{10}B$.

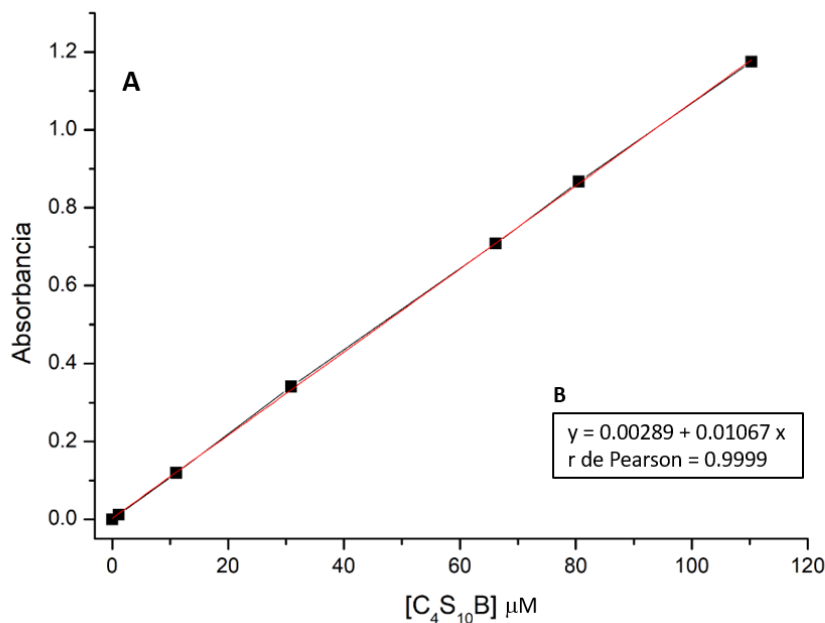


Figura 3.2: Curva de calibración para la proteína $C_4S_{10}B$. A) Curva de absorbancia en función de la concentración. B) Ajuste de los datos a la ecuación de la recta por regresión lineal de Pearson mediante el software Origin Pro 8.5TM.

3.8. Determinación de concentración crítica de las proteínas

Para la determinación de la concentración crítica (concentración de cambio de fase) de cada una de las proteínas se pesó y disolvió la proteína en cuestión, a varias concentraciones, en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH = 7.4). Se dejó incubando por una noche y posteriormente se obtuvieron los espectros de absorbancia empleando el equipo NanoDrop One de ThermoFischerTM. Los datos se analizaron con MatlabTM.

3.9. Determinación de la constante de disociación por ensayo de fluorescencia, efecto PIFE-FRET

El ensayo de fluorescencia se llevó a cabo empleando DNA de 50 pares de base marcado con el par de fluoróforos FRET Cy3-Cy5 a una distancia de 12 pb. Para construir este DNA se ensambló el nucleótido Fw con secuencia 5' - ACG CAG GCT CGT T/iCy3/CC AGA ATT CCT ATC TAG CAT ATG AGC GCA TCG CTA AG - 3' con el nucleótido Rv 5' - CTT ACC GAT GCG CTC ATA TGC TAG AT/iCy5/A GCA ATT CTG GAA CGA GCC TGC GT - 3' en proporciones equimolares y usando una rampa de temperatura de 95 °C a -4 °C disminuyendo 5 °C cada 10 min. Además se comprobó el ensamble con un gel de acrilamida en el que no se visualizaron intermediarios. Las disoluciones se prepararon de la siguiente forma: La construcción de DNA con el par FRET a una concentración final de 10 nM se mezcló con concentraciones variables de C_4S_nB (la proteína fue previamente calentada por 10 minutos a 70 °C por 10 minutos). Todas las disoluciones se realizaron en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH = 7.4), posteriormente, dejarlas incubar por una noche. Los espectros de emisión se adquirieron mediante el Fluorímetro Varian Cary EclipseTM excitando a 530 nm. Se obtuvo la proporción de intensidad 665 nm / 565 nm de los espectros de emisión en función de la concentración de C_4S_nB y se ajustó a la función sigmoideal de Boltzmann con Origin Pro 8.5TM.

3.10. Dispersión de luz

Las mediciones de dispersión de luz se llevaron a cabo en un Zetasizer NanoZS® (Instrumento Malvern™, UK). Equipado con un láser de ion He-Ne de 4 mW que emite a 633 nm. En los experimentos una muestra de proteína recién disuelta en amortiguador de fosfatos (pH = 7.4, 10 mM y 1 mM de DTT) se calentó o enfrió a una velocidad de 0.5 °C/min entre 10 - 95 °C y se midió reiteradamente la intensidad de luz dispersada (*derived count rate*) realizando un promedio de diez corridas de 10 s cada una, a un ángulo de dispersión de 173°. Al medir la dispersión en este ángulo el láser no tiene que pasar por toda la muestra, esto reduce dispersión múltiple donde la luz dispersada por una partícula es dispersada por otras partículas y por tanto se obtiene una mejor señal ruido [39].

3.10.1. Modelo de nucleación-elongación

La intensidad de luz dispersada que se obtuvo durante la adquisición de las curvas de temperatura, se normalizó para obtener el grado relativo de agregación como función de la temperatura. Posteriormente, los datos se ajustaron a un modelo de nucleación-elongación desarrollado por van der Schoot [40] basado en el de Oosawa y Kasia [41], este modelo se aplica a estructuras supramoleculares que se forman espontáneamente por agregación reversible de uno o más tipos de moléculas. En el modelo de van der Schoot [40], las curvas normalizadas muestran dos fases que se modelan de manera independiente. En el régimen de elongación, cuando $T < T_e$ (cuando la temperatura es menor a la temperatura de elongación) el grado de agregación ϕ_n se ajustó con la ecuación 3.3.

$$\phi_n = \phi_{SAT} [1 - e^{\frac{-h_e}{RT_e}(T-T_e)}] \quad (3.3)$$

Donde h_e es la entalpía de elongación y T_e la temperatura de elongación (dependiente de la concentración). Mientras el parámetro ϕ_{SAT} es solo para normalizar el grado relativo de agregación ϕ_n/ϕ_{SAT} .

El régimen de nucleación $T > T_e$ se modeló empleando la ecuación 3.4.

$$\phi_n = \phi_{SAT} [\sqrt[3]{K_a} \exp\left[(-1 + \frac{2}{3\sqrt[3]{K_a}}) \frac{h_e}{RT_e^2} (T - T_e)\right]] \quad (3.4)$$

donde K_a es una constante de activación adimensional. En ésta se refleja el grado de cooperatividad del sistema. Una menor cooperatividad se expresa en valores mayores de K_a asociado a un núcleo de menor tamaño. Todo esto se describe cuantitativamente mediante la ecuación 3.5.

$$\langle N_n(T_e) \rangle = \frac{1}{K_a^{1/3}} \quad (3.5)$$

donde $\langle N_n(T_e) \rangle$ es la longitud promedio del núcleo a la T_e dada. Este modelo ha sido utilizado para describir el ensamblaje espontáneo y reversible de conglomerados supramoleculares que se forman con uno o más bloques de construcción.

3.11. Microscopía de fuerza atómica

En el análisis mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) se utilizó el instrumento digital Nanoscope V equipado con punta de nitruro de silicio (Bruker[®], MA, USA) con una constante de resorte de $0.4\text{--}0.35\text{ Nm}^{-1}$ en modo de imagen ScanAsystTM. Las imágenes se recolectaron a $0.488\text{--}0.977\text{ Hz}$ y $1024\text{ muestras/linea}$. El procesamiento y análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software NanoScope Analysis 1.20TM., con aplanamiento de primer orden en todas las imágenes.

Para obtener las imágenes de proteína sola se varió su concentración, mientras que para las imágenes del complejo proteína-DNA se emplearon entre $1\text{--}5\text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA y se llevó al NP deseado con la proteína en amortiguador de fosfatos (10 mM , $\text{pH } 7.4$), con 1 mM de DTT. El DNA utilizado fue el ensamblado por PCR de 732 pb (descrito anteriormente) y el plásmido de 2675 pb (obtenido por técnicas convencionales de biología molecular y separando cada una de sus diferentes topologías por purificación por banda de agarosa). Se depositaron $5\ \mu\text{L}$ de la muestra en cuestión en una superficie de silicio y después de 5 minutos de incubación se realizó un lavado con 1 mL de agua grado Milli-Q[®]. Finalmente, se secaron las muestras con aire y se obtuvieron las imágenes. En caso que la imagen se viera saturada, se diluía la muestra previamente 10 veces . El análisis estadístico de los datos recabados se llevó a cabo con el software Nanoscope AnalysisTM y MatlabTM.

3.12. Transferencia de energía por resonancia de Förster

3.12.1. Construcción de nucleótidos marcados fluorescentemente

Para los experimentos de FRET y smFRET se prepararon 4 diferentes construcciones de DNA con los fluoróforos ATTOTM647N y ATTOTM550 a distancias de 14, 18, 24 o 28 pb. Se utilizó como molde para la secuencia Fw el nucleótido 5' - (Biotina) TAA CCA AAA GAA TAA AAA ACA AAC ACX GAC CAC AGG ACA CAC GGA TTG TCG ACC GAC CAG AGA CCA AAA AGA CTT TTA CT - 3'. Modificado en la posición 5 con biotina y en la posición 27 con ATTOTM647N. Mientras la secuencia del nucleótido Rv 5' - AGT AAA AGT CTT TTT GGT CTC TGG TCG GTC GAC AAT CCG TGT GTC CTG CTG TGG TCA GTG TTT GTT TTT TAT TCT TTT GGT TA - 3' se modificó en las posiciones 40, 36, 29 o 25 con ATTOTM550 respectivamente. Para el ensamblaje de las 4 diferentes construcciones estos nucleótidos se mezclaron en cantidades equimolares, se calentaron con un termobloque ajustado a una temperatura de 95 ° C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por una noche.

3.12.2. FRET en el ensamble

Se mezcló $C_4S_{10}B$ 3 μ M en un amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 7.4) con cada una de las diferentes construcciones de DNA 10 nM descritas anteriormente. Los espectros a través del tiempo se adquirieron con el fluorímetro VarianTM Cary Eclipse[®]. Se excitó con luz a $\lambda = 540$ nm (ancho de banda, 10 nm) y se registró el espectro de emisión de 555-750 nm (ancho de banda, 5 nm). Se calculó el cociente de la intensidad del espectro de emisión 665 nm / 565 nm en función del tiempo.

3.12.3. Microscopio de reflexión total interna empleado para smFRET

El microscopio de reflexión interna de fluorescencia (TIRFM) utilizado fue construido por el laboratorio de la Universidad de Wageningen (Países Bajos) y cuenta con 4 canales de excitación por láser (alternados) y tres canales de emisión. Se puede utilizar para estudios de smFRET en combinación con ALEx (descrito posteriormente) para detectar cientos de moléculas únicas en paralelo. A continuación se discutirán las características esenciales del equipo para entender los experimentos (figura 3.3).

- a) La figura 3.3 A muestra un esquema de cómo una caja láser en la trayectoria excitación provee secuencias bien definidas de iluminación roja (R) y verde (V). El láser es enfocado a través de los lentes hacia el plano focal posterior del objetivo con el fin de crear un campo evanescente que excite a los fluoróforos fijados a la superficie del vidrio. La fluorescencia de estos es colectada por el mismo objetivo y filtrada espacialmente con una apertura rectangular, luego es visualizada en diferentes regiones de la cámara CCD.
- b) La figura 3.3 B describe como en la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total el láser se enfoca en el plano focal posterior del objetivo de tal manera que la luz del láser se refleja en la interfase vidrio/agua. Con esto se creará un campo evanescente con una intensidad que cae exponencialmente en función de la distancia (100 nm). Por lo tanto, solo un pequeño volumen contiguo de vidrio es iluminado.
- c) La figura 3.3 C es una ilustración de los cuadros esquemáticos obtenidos después de la excitación del donador (cuadro verde) y de la excitación directa del aceptor (cuadro rojo) mediante este diseño de microscopio. La fluorescencia de las partículas individuales son asociadas a través del campo de visión y los puntos individuales resultan en un conteo de fotones que puede ajustarse a diferentes modelos; además, la intensidad de fluorescencia de cada punto en el campo de visión origina trayectorias de tiempo para cada molécula.

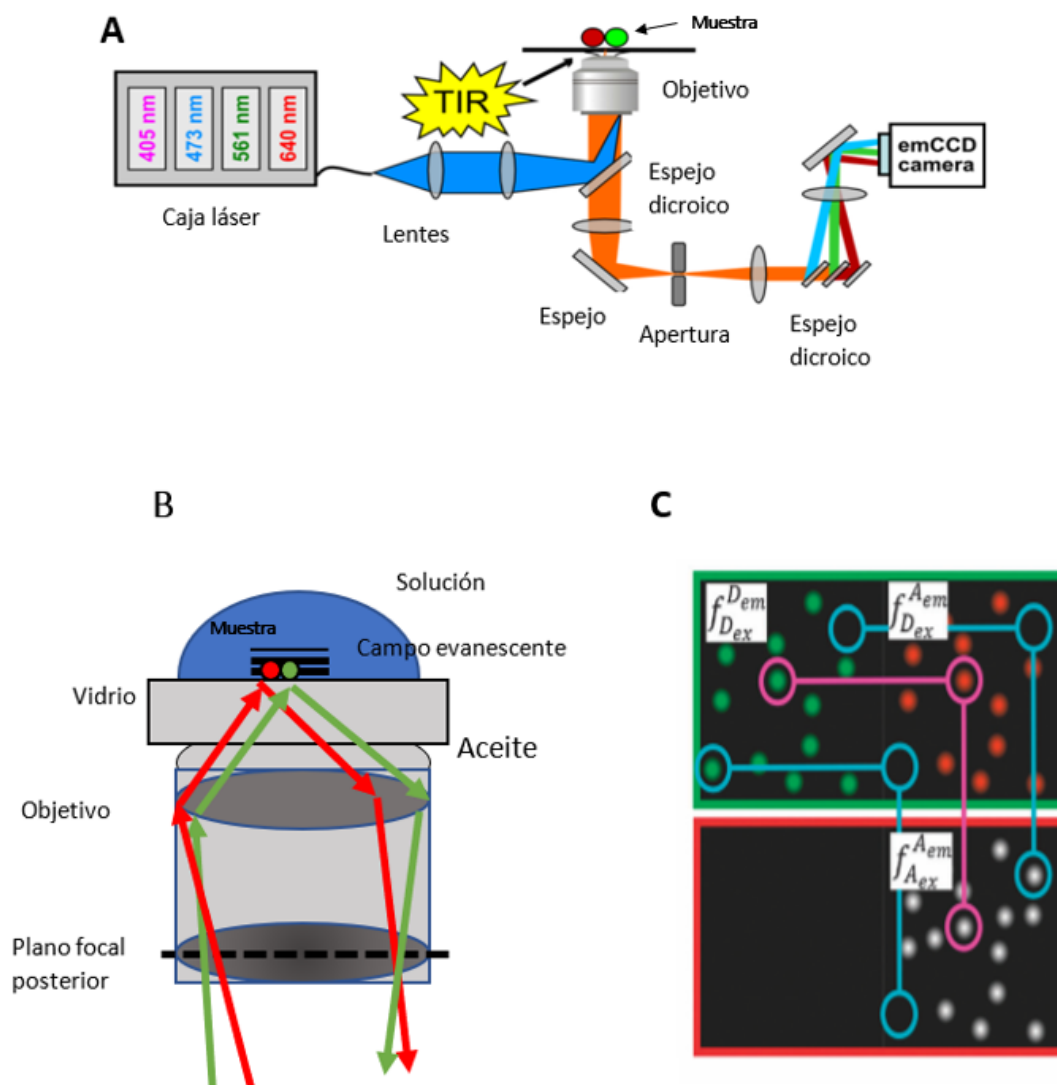


Figura 3.3: Descripción del microscopio de reflexión total interna utilizado para experimentos de molécula única. a) Esquema del TIRFM b) Esquema del proceso de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF, por sus siglas en inglés), c) Ilustración de los resultados obtenidos con el TIRFM.

3.12.4. Excitación alternada por láser

ALEx son las siglas en inglés de la excitación alternada por láser. Esta técnica se combina con smFRET permitiendo la detección del fluoróforo donador (DD) (y su subsecuente transferencia de energía, DA), así como la excitación directa del aceptor (AA) posibilitando la verificación de la presencia de los dos fluoróforos en la molécula. Además, la detección del aceptor después de su directa excitación permite introducir el nuevo parámetro llamado estequiometría S^* (no corregido) y que está definido en la ecuación 3.6.

$$S^* = \frac{DD + DA}{DD + DA + AA} \quad (3.6)$$

Donde DD y AA es la intensidad de los fotones emitidos del fluoróforo donador y aceptor después de su directa excitación, respectivamente. Mientras DA es la intensidad de fotones emitidos por el fluoróforo aceptor debido a la transferencia de energía del fluoróforo donador. En la figura 3.4, se muestra un esquema de un DNA marcado con los fluoróforos donador y aceptor su representación gráfica en un histograma 2 D. El eje Y es el parámetro S^* y el eje X la eficiencia de FRET no corregida, graficando de esta manera los datos obtenidos del FRET nos permite separar claramente especies que no se pueden distinguir en una gráfica de solo E^* . Por ejemplo, una población que erróneamente se identificó como con una eficiencia baja de FRET puede que en realidad este compuesta de moléculas cuyo aceptor ya este apagado.

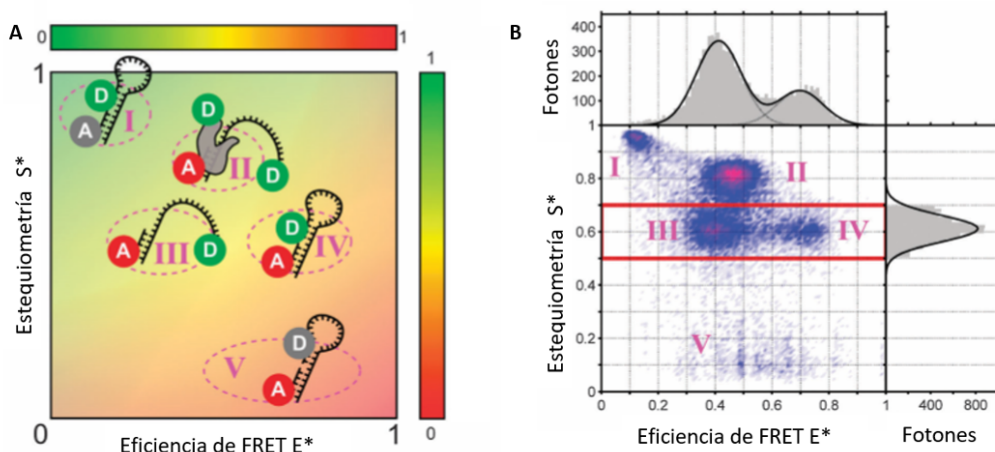


Figura 3.4: Resultados simulados de un experimento de smFRET A) Esquema de diferentes construcciones de DNA con sus respectivos fluoróforos. B) Resultados graficados en un histograma 2 D de las diferentes construcciones de DNA (mostradas a la izquierda). La región I corresponde a una construcción con el donador emitiendo fluorescencia y sin el aceptor, la región II es una molécula que contiene dos donadores y un aceptor, la región III y IV (tienen la misma estequiometría, es decir, la misma cantidad de fluoróforos en la molécula) pero debido a que la distancia entre estos fluoróforos es diferente se pueden distinguir entre una población con alta y baja eficiencia de FRET. La región V representa una molécula con el aceptor emitiendo fluorescencia y sin el donador emitiendo. Imagen obtenida de Hohlbein [17].

3.12.5. Preparación de las muestras

Las mediciones se realizaron fijando las construcciones de DNA a un cubreobjetos sometido a un tratamiento descrito a continuación. El cubreobjetos tuvo un tratamiento térmico de 500 °C por una hora (rapidez de calentamiento de 90 °C/h y enfriamiento de 150 °C/h). Para no contaminar el cubreobjetos es importante sostenerlo en todo momento de los costados. Se modificó químicamente la carga de la superficie del cubreobjetos (a una carga positiva, grupo amino) sumergiéndolo con 50 mL de acetona y 1 mL de Vectabond[®] (mezcla de aminos-silanos, Vector laboratories) por 5 minutos y se desecha la solución. Se realizan 3 lavados de 50 mL de acetona y otros 3 de agua con una incubación de 1 minuto antes de desechar. Se secan con nitrógeno y se colocan canastillas (CW-8R-1.0, diámetro 8- 6mm X 1 mm profundidad, 15-30 μ L, no estéril, obtenidas de GRACE bio-labs) verificando que no haya burbujas. Cada canastilla se incuba con una solución de 400 μ L amortiguador

MOPS (50 mM, pH 7.5, filtrado), 80 mg de NHS-PEG (P.M. 5000 Da, Laysan Bio) y 3 mg de biotina-PEG-NHS (P.M. 5000 Da, Laysan Bio), en este paso se da la reacción del grupo amino que se encuentra en la superficie reacciona con el grupo ester del NHS (por lo que se fija el PEG o PEG-biotina). Después de 3 horas de incubación cada carril de la canastilla se lava con amortiguador PBS. Para el experimento, se incubó neutraavidina (0.02 mg/mL) en la canastilla por 1 minuto seguido de la incubación de 3-5 minutos por las diferentes construcciones de DNA a concentración 100 pM (un esquema es presentado en la figura 3.5). Se realizó una medición de smFRET. Luego se dejó incubando una noche con la proteína y se realizó en seguida la siguiente medición. Finalmente, se removió la proteína del complejo para realizar una medición final del DNA solo (con el fin de verificar su estabilidad).

Se obtuvieron las imágenes de las moléculas de DNA mediante el microscopio descrito anteriormente de una solución que consistía de 12.5 μL a 3 μM de C_4S_nB en amortiguador fosfato (20 mM, pH 7.4), 11.5 μL 2 mM Trolox (apagador del estado triplete), 0.7 μL de glucosa (40%) y 0.5 μL de Gloxy (mezcla de glucosa oxidasa, glucosa catalasa). Esta solución se selló con un cubreobjetos y se utilizó ALEx con una potencia de 1.5 mW para el laser verde (561 nm) y de 0.75 mW en el rojo (640 nm), alternándose cada 50 ms y adquiriendo 1000 cuadros por película. Los datos fueron analizados mediante el software MatlabTM.

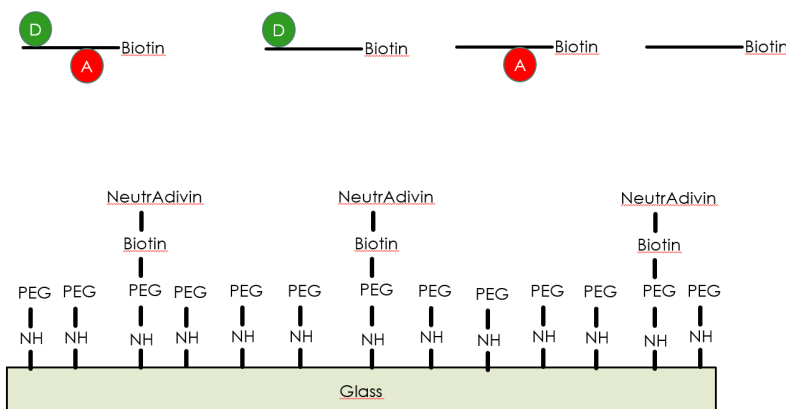


Figura 3.5: Esquema de las moléculas de DNA marcadas con los fluoróforos. Así como del vidrio posterior al tratamiento, donde se aprecia que la neutraavidina funciona como puente entre el vidrio y la construcción de DNA.

3.13. Ensayo de intercalación del bromuro de etidio

Las mediciones se llevaron a cabo utilizando el fluorímetro VarianTM Cary Eclipse[®]. Las muestras fueron excitadas con luz a $\lambda = 482$ nm (ancho de banda de 10 nm) y registrando el espectro de emisión de 550 a 800 nm (ancho de banda de 5 nm). El bromuro de etidio (BrEt) se disolvió en amortiguador fosfato 10 mM a pH 7.4 a concentración de 500 nM final. Posteriormente se añadió DNA de 2000 pb a una concentración final de 180 nM y se dejó incubar una noche. A medida que el BrEt se intercala en el DNA este aumenta su fluorescencia debido al ambiente hidrofóbico que rodea a las moléculas. Las disoluciones de DNA con BrEt intercalado posteriormente fueron tituladas con C_4S_nB a un volumen final de cada disolución de 80 μ L. La fluorescencia relativa (F.R) se calculó como el valor absoluto de la variable descrita por la ecuación 3.7

$$F.R. = \frac{F_{obs} - F_{BrEt}}{F_{DNA-BrEt} - F_{BrEt}} \quad (3.7)$$

Donde F_{obs} es la fluorescencia de la muestra, $F_{DNA-BrEt}$ la fluorescencia del complejo DNA con bromuro intercalado (NP 0) y F_{BrEt} la fluorescencia del BrEt en solución acuosa.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Expresión y purificación de la proteína $C_4S_{10}B$

Mediante un gel SDS-PAGE y MALDI-TOF MS se verificó la pureza de las proteínas C_4S_nB . En el gel de SDS-PAGE (figura S. 7.5) el peso molecular de C_4S_nB no corresponden al valor esperado. Este hecho ya había sido observado por Hernandez-Garcia [23] y se sugirió que la movilidad reducida en el gel era debido al bloque C_4 . Mientras el peso molecular medido por MALDI-TOF (figura S.7.6) está en concordancia con el peso teórico de C_4S_nB . Los espectros de MALDI-TOF de C_4S_nB se encuentran en el rango de las masas teóricas esperadas C_4S_0B ($P.M._{teo} = 38,407.8$ y $P.M._{exp} = 38,422.6$), C_4S_4B ($P.M._{teo} = 41,331.8$ y $P.M._{exp} = 41,321.56$), $C_4S_{10}B$ ($P.M._{teo} = 44,749.2$ y $P.M._{exp} = 44,786.76$), $C_4S_{10}B$ ($P.M._{teo} = 44,749.2$ y $P.M._{exp} = 44,675.84$), $C_4S_{14}B$ ($P.M._{teo} = 47,027.5$ y $P.M._{exp} = 47,008.83$).

4.2. Efecto de la concentración en el autoensamblaje medido por uv-vis

En esta sección se estudió el autoensamblaje de las cuatro proteínas en función de la concentración mediante uv-vis. De estudios previos se conocía que las proteínas $C_4S_{10}B$ y $C_4S_{14}B$ se autoensamblan en partículas tipo rodillo en concentraciones por encima de la concentración crítica (CC) [30]. En la figura 4.1 se muestra el espectro de absorbancia de $C_4S_{10}B$ a diferentes concentraciones (los espectros de absorción de las proteínas C_4S_0B , $C_4S_{14}B$ y $C_4S_{14}B$ se encuentran en la figura suplementaria 7.7).

Claramente, se observa un desplazamiento del máximo en el espectro de absorción (efecto batocrómico) al aumentar la concentración de las diferentes proteínas. Este efecto batocrómico se ha observado en moléculas orgánicas que forman oligómeros [43, 44], así como al cambio de fase en surfactantes (como el SDS) entre el estado

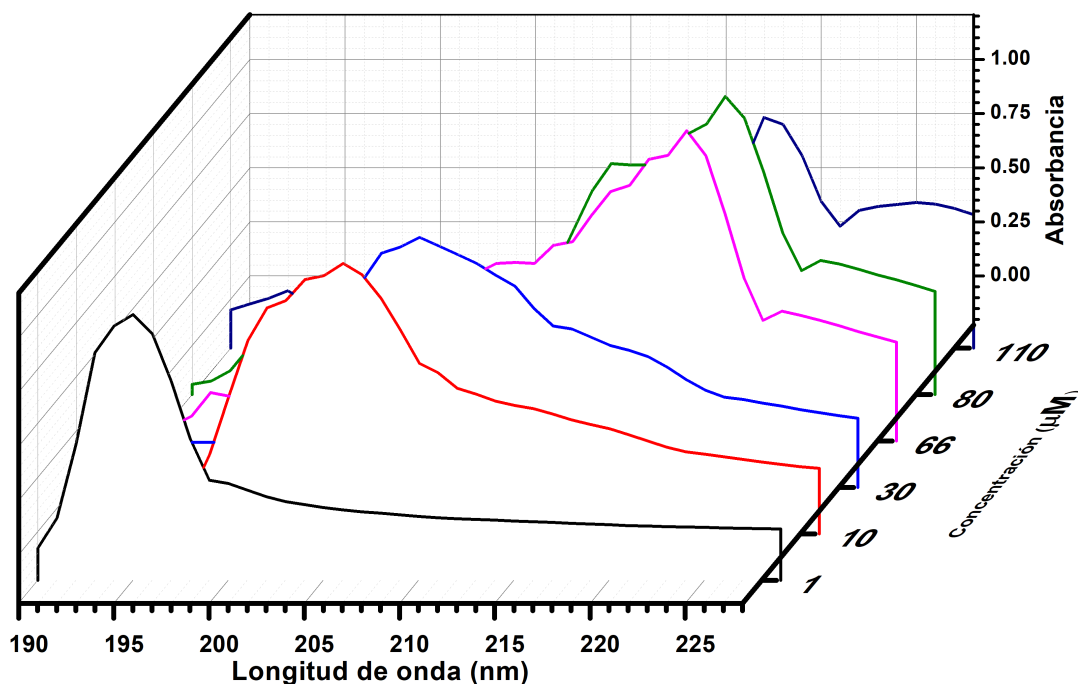


Figura 4.1: Espectro de absorbancia normalizado de la proteína $C_4S_{10}B$ en función de su concentración.

monomérico y micelar [45].

Para una visión más clara sobre cómo afecta el efecto batocrómico en nuestro sistema, se graficó la diferencia del máximo en función de la concentración de las diferentes proteínas (figura 4.2), se puede apreciar un cambio abrupto en el efecto batocrómico que se puede asociar con una concentración crítica de cambio de fase en todas las proteínas. La CC de $C_4S_{10}B$ y $C_4S_{14}B$ marca el cambio de fase entre monómeros a partículas tipo rodillo, si atendemos a los resultados de los experimentos de AFM mostrados posteriormente (sección 4.5.1, pag. 52). Así mismo, la CC de C_4S_0B y C_4S_4B pudiera deberse a una oligomerización dependiente de la concentración.

Las concentraciones críticas de las cuatro proteínas se encuentran en el rango de micromolar. Para el caso de $C_4S_{10}B$ y $C_4S_{14}B$, la CC sigue la misma tendencia

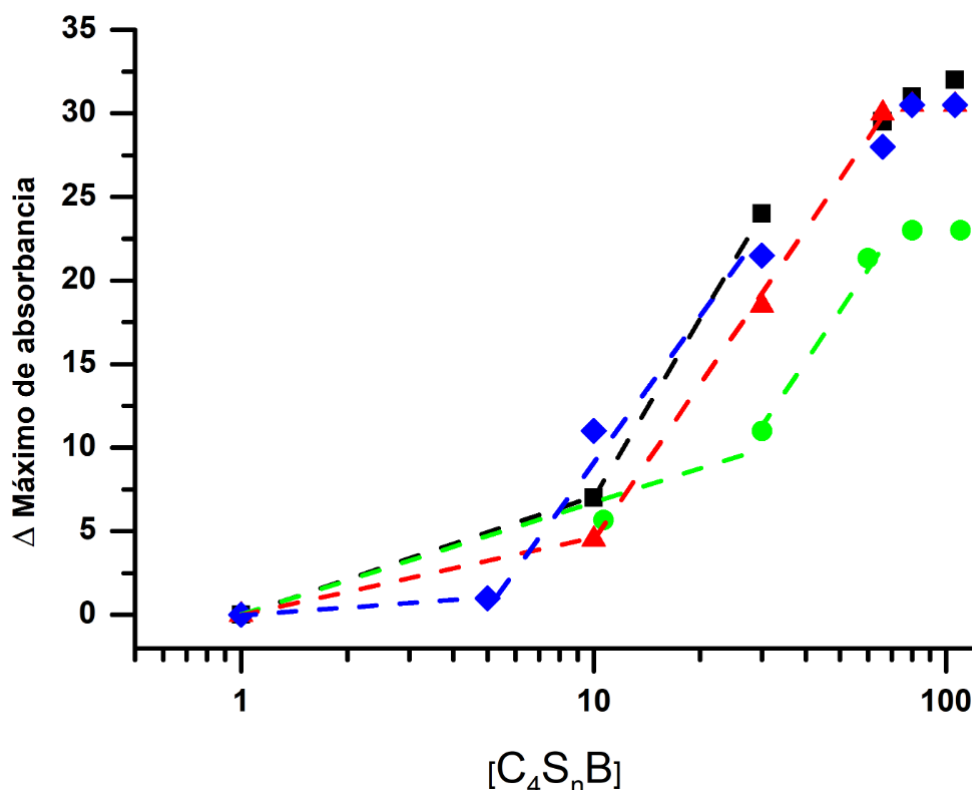


Figura 4.2: Concentración crítica de autoensamblaje de las proteínas: C_4S_0B (■), C_4S_4B (▲), $C_4S_{10}B$ (●), $C_4S_{14}B$ (◆) El símbolo es mayor a la incertidumbre en la medición. El experimento fue realizado 3 veces.

mostrada en experimentos de dispersión de luz hechos por Armando [30]. Además, los resultados evidencian un efecto de la longitud del bloque " S_n " en la CC de las proteínas. Aunque en primera instancia uno esperaría que a mayor tamaño del bloque de autoensamblaje " S_n " menor fuera la CC de C_4S_nB , la falta de esta tendencia puede deberse a que las proteínas C_4S_0B (CC = $10 \mu M$) y C_4S_4B (CC = $10 \mu M$) no forman partículas tipo rodillo, mientras que las proteínas con el bloque " S_n " donde $n \geq 10$ si lo hacen. Esto provoca un coste energético en la formación de las partículas tipo rodillo y, por ende, la proteína $C_4S_{10}B$ tiene una mayor CC ($30 \mu M$). Por su parte, la proteína $C_4S_{14}B$ tiene la menor CC ($5 \mu M$) debido a su mayor interacción hidrofóbica por el bloque " S_{14} ".

4.3. Determinación de la interacción proteína-DNA y los factores que la afectan

En esta sección se intentará entender con mayor profundidad la interacción proteína-DNA mediante diversas técnicas como son el cambio en la movilidad electroforética (EMSA), dispersión de luz y fluorescencia.

4.3.1. Efecto de la longitud del molde de DNA

El efecto de la longitud del molde en la interacción proteína con DNA se estudió mediante la técnica EMSA. Los geles se muestran en las figuras S.7.8, S. 7.9). En la figura 4.3 se muestra el balance de carga (o la concentración micromolar entreparéntesis) necesaria de C_4S_0B o $C_4S_{10}B$ para unir al 50% de DNA como función de la longitud del DNA. Para ambas proteínas se observa que la concentración necesaria para unir al 50% de DNA es de $0.5 \mu M$ para moldes de DNA mayores a 250 pb. Además, un cambio notable en la interacción ocurre cuando el tamaño del DNA es menor a 100 pb. A pesar que se podría argumentar que la diferencia de afinidad se debe a la diferencia de la matriz que hay en un gel de agarosa (DNA > 250 pb) que a la de un gel de acrilamida (DNA < 100 pb), esto se descarta al observar la misma tendencia en los DNA < 100 pb (que se analizan en la misma matriz de acrilamida). La dependencia de la longitud podría sugerir un mecanismo de nucleación-elongación en el que es necesario formar un núcleo crítico de proteínas unidas al DNA antes de comenzar la elongación de la partícula (este mecanismo se corrobora más adelante utilizando dispersión de luz, sección 4.4.1 página 50). La interacción proteína-DNA y su dependencia en el tamaño del molde de DNA queda esclarecida al comparar la concentración de C_4S_nB al 50% de unión de los DNA de 2000 y 10 pb. Con la proteína $C_4S_{10}B$ (cuadro negro) se requirió alcanzar una concentración casi 4 veces mayor para unir al 50% de DNA 10 pb, en comparación con su unión al de 2000 pb. C_4S_0B contrasta todavía más este hecho necesitando casi 10 veces más concentración, para la comparación correspondiente. Al comparar la unión de C_4S_0B y $C_4S_{10}B$ con

DNA al 50 % del molde de 10 pb se infiere que el tamaño del bloque S_n afecta en la interacción proteína-DNA (tema que es estudiado más a fondo en la siguiente sección). En el virus del CCMV se ha encontrado que la interacción entre la proteína de cápside con el RNA [46, 47] disminuye al decrementar el tamaño del molde de RNA, en este caso se ha sugerido que se debe a una cuestión de mecanismo o la necesidad de una proporción específica de masa de proteína/RNA.

En la figura 4.3 también se expone el balance de carga (NP) necesario para unir C_4S_nB con el 50 % de DNA. Se muestra que para los moldes de DNA mayores a 250 pb el balance de carga necesario para unir al DNA al 50 % es de 0.5, es decir, en un régimen de exceso en los sitios de unión de DNA. Mientras para moldes de DNA menores a 100 pb el NP de unión al 50 % es mayor a 2 (régimen de exceso de proteína).

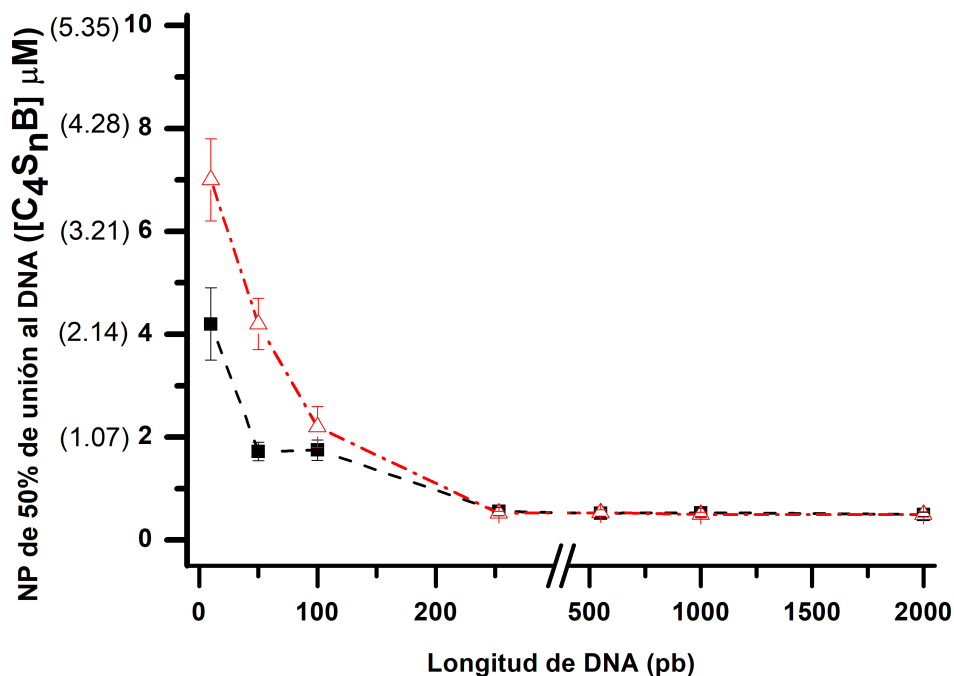


Figura 4.3: Efecto de la longitud del molde de DNA en la interacción con C_4S_0B (Δ) y $C_4S_{10}B$ (\blacksquare). La línea punteada es solo una guía para los ojos. La incertidumbre está en NP y está calculada como la desviación estándar de tres experimentos

4.3.2. Efecto del tamaño del bloque de autoensamblaje

Una vez establecida la dependencia del tamaño del molde en la interacción proteína-DNA, surgió la pregunta de cuál era el efecto de la longitud del bloque S_n en esta interacción. Mediante la técnica EMSA se dio a la tarea de responder dicha pregunta (los geles se muestran en las figuras S. 7.10, S.7.11). El balance de carga para unir al 50 % de DNA (y entre paréntesis la concentración de la proteína C_4S_nB) en función del tamaño del bloque S_n se muestra en figura 4.4 en la que se observa que la concentración necesaria para unir al 50 % de DNA en función del bloque S_n muestra la misma tendencia para los dos diferentes tamaños de DNA (10 pb y 2000 pb). Cabe resaltar que para unir el DNA de 10 pb al 50 % (figura 4.4, ■) todas las proteínas necesitan concentraciones mayores a $1 \mu\text{M}$ o visto desde el NP, se requiere un régimen de exceso de proteína. Por el contrario, para que C_4S_nB una al DNA de 2000 pb al 50 % (figura 4.4, Δ) las concentraciones son menores a $1 \mu\text{M}$ o en terminos

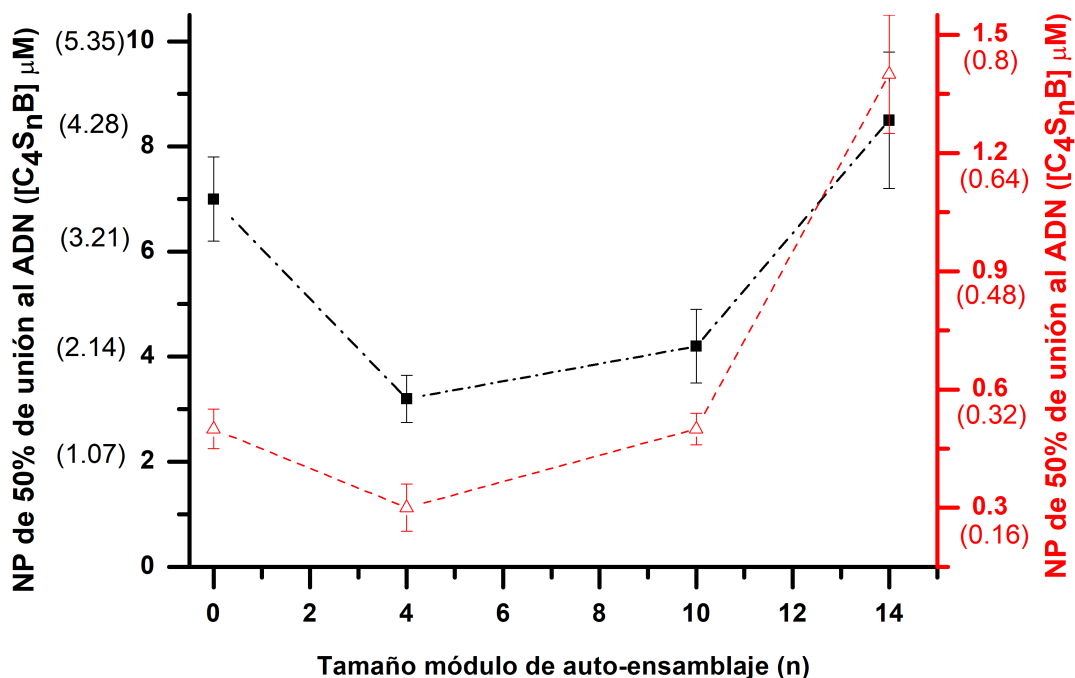


Figura 4.4: Relación del tamaño del bloque S_n en la interacción $C_4S_nB - DNA$ para los moldes de DNA de 2000 pb (Δ) y 10 pb (\blacksquare). La incertidumbre es de los datos de NP y está calculada como la desviación estandar de 3 experimentos.

del balance de carga (NP), en un régimen de exceso de DNA.

A pesar que no se esperaba ningún cambio en la interacción $C_4S_nB - DNA$ al variar el bloque de autoensamblaje (S_n) debido a que el bloque de unión proteína-DNA (B) es idéntico en las cuatro proteínas, estos resultados muestran la existencia de un segundo mecanismo en competencia, sugiriendo una interacción proteína-proteína dependiente del tamaño del bloque S_n , donde a mayor longitud del bloque S_n mayor será la interacción proteína-proteína y, por ende, menor la interacción con el DNA. Aunado a esta hipótesis se encuentran los experimentos de potencial Z realizados por Hernandez-Garcia [23], en los que el complejo $C_4S_{10}B - DNA$ exhibe la coexistencia en solución de dos especies a un NP menor a 7.

4.3.3. Efecto de la temperatura y cinética en la interacción C_4S_nB con DNA

El efecto de la temperatura y la cinética en las interacción proteína-DNA también se investigó empleando la técnica EMSA (geles en figuras S. 7.12, S. 7.13. Se examinó la dependencia de la interacción $C_4S_nB - DNA$ con la temperatura de una muestra de C_4S_0B o $C_4S_{10}B$ a temperatura ambiente o calentada previamente a 70 °C y se mezcló con una solución de DNA. El NP al 50 % de unión calculado a partir de los geles se muestra en la figura 4.5. Se observa que al calentar cualquiera de las dos proteínas disminuye la concentración necesaria para unir al DNA al 50 %. Este cambio se relaciona con la ecuación de vant Hoff, si suponemos que la entalpía de reacción es independiente en este intervalo de la temperatura entonces se puede calcular que $\Delta H > 0$, sin embargo no se sabe si este cambio es debido a la interacción a alta temperatura o a un cambio estructural de la proteína. Experimentos de dispersión de luz en función a la temperatura mostrados más adelante (sección 4.4.1, página 50) exhiben una disociación de la partícula tipo rodillo a una temperatura mayor a 95 °C por lo que a esa temperatura no se podría considerar constante la entalpía de reacción.

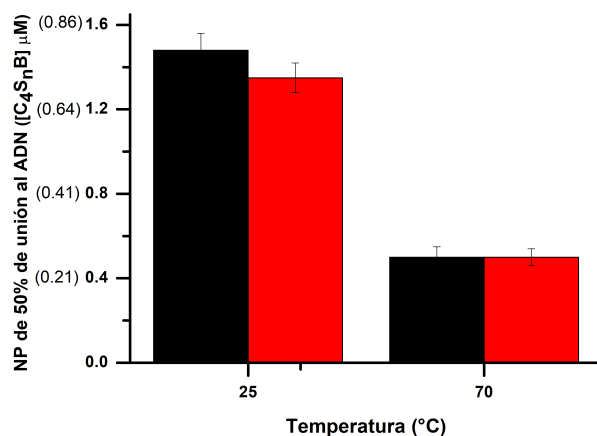


Figura 4.5: Efecto de la temperatura en la interacción $C_4S_nB - DNA$. Utilizando la proteína C_4S_0B (■) o $C_4S_{10}B$ (■) con DNA de 2000 pb. La incertidumbre está dada en NP.

En la figura 4.6 se examina el balance de carga para unir al 50 % de DNA depende del tiempo y se encuentra en equilibrio a los 60 minutos. Estos datos fueron calculados a partir de los gels mostrados en figura S. 7.14.

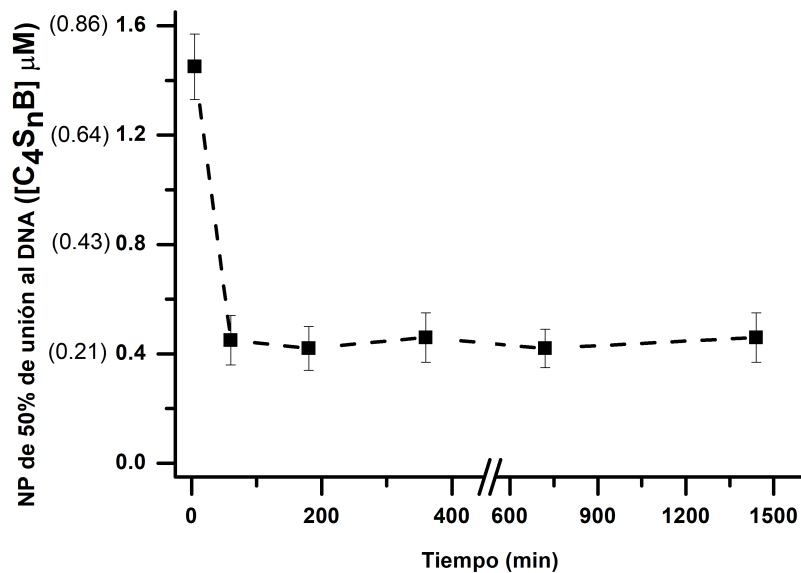


Figura 4.6: Cinética de la interacción $C_4S_{10}B$ con DNA de 2000 pb. La incertidumbre está dada en NP.

4.3.4. Ensayo de fluorescencia PIFE-FRET para determinar la constante de interacción

En esta sección se estudió la interacción proteína DNA mediante una técnica fluorescente. Los espectros de emisión están en las figuras S. 7.15. La proporción de la intensidad de los espectros de emisión 665 nm / 565nm como función del balance de carga y entre paréntesis la concentración de C_4S_nB se muestra en la figura 4.7. La proporción de la intensidad de los espectros de emisión 665 nm / 565 nm puede ser vista como una medida de la energía transferida del fluoróforo Cy3 al Cy5 cuando se excita Cy3 con luz. Al inspeccionar la figura 4.7 se muestra que la proporción de la intensidad 665 nm / 565 nm al inicio es de 0.3 para todas las proteínas y esta proporción se mantiene constante hasta que el balance de carga NP es mayor a 1 (cuando existe un régimen de exceso de proteína). Un notable incremento en la proporción de la intensidad 665 nm / 565 nm se observa para las proteínas con $n \geq 4$ en el bloque S_n . Para explicar estos resultados es importante mencionar que todos los fluoróforos tienen dos diferentes estados conformacionales, cis y trans que se encuentran en equilibrio. En el caso de Cy3, estos estados conformacionales absorben y emiten luz con diferente eficiencia (también existen fluoróforos que sus dos estados absorben y emiten de luz con la misma eficiencia). Cuando este equilibrio es restringido espacialmente por una molécula, en este caso la proteína C_4S_nB el fluoróforo Cy3 incrementa su fluorescencia (efecto PIFE). Además, un cambio conformacional del DNA al interactuar con C_4S_nB podría entrar en juego disminuyendo la distancia entre los fluoróforos y, por ende, aumenta la fluorescencia del emisor (efecto FRET). Este proceso se conoce como PIFE-FRET y se describe a mayor profundidad por Ploetz [19]. Con todo lo anterior, se infiere que la proteína con el bloque S_0 no restringe al fluoróforo Cy3. Esto se corroboró utilizando una construcción de DNA que solo tuviera el marcador Cy3 (figura S. 7.16) mezclada con C_4S_0B o $C_4S_{10}B$, en donde se evidenció que $C_4S_{10}B$ ejerce un aumento en la fluorescencia mientras C_4S_0B no, por lo tanto, se puede afirmar que el bloque S_n es el responsable del efecto PIFE. En tanto, se mostrará más adelante (sección 4.6, página 60) que también existe un efecto

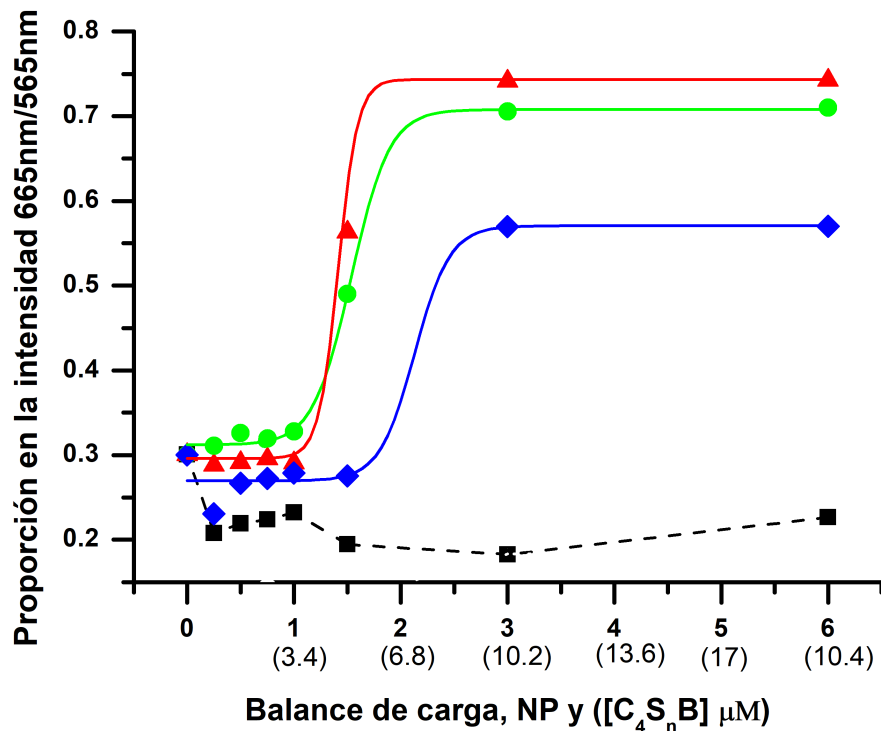


Figura 4.7: Evaluación del efecto PIFE-FRET midiendo la proporción de la intensidad 565/665 del DNA marcado fluorescentemente con las cuatro proteínas: a) C_4S_0B (■), b) C_4S_4B (▲), c) $C_4S_{10}B$ (●) d) $C_4S_{14}B$ (◆). Las líneas continuas representan el ajuste de Boltzmann (función sigmoide). La línea punteada solo es una guía para los ojos.

FRET relacionado a este proceso provocado por el bloque B de unión inespecífica.

Por último, de la figura 4.7 se tomó el valor al 50 % del ajuste de Boltzman (líneas sólidas) y se relacionó como una constante de interacción de las proteínas por el DNA (para las proteínas donde $n \geq 4$ en el bloque S_n); Con esto se puede concluir que la longitud del bloque S_n afecta en la interacción con DNA ($K_{S_{14}} > K_{S_{10}} > K_{S_4}$). Reafirmando el efecto del tamaño del bloque S_n visto anteriormente mediante la técnica EMSA.

4.3.5. Efecto del balance de carga en la intensidad de la luz para la partícula viromimética

Aunado a los estudios de interacción, se evaluó el efecto del balance de carga de $C_4S_{10}B - DNA$ en la intensidad de la dispersión de luz. En general, la figura 4.8 muestra la existencia de dos fases en el proceso de autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$. La primera fase es cuando el NP es menor a 1 (exceso de DNA) y muestra la pendiente más acentuada; esta fase probablemente se deba a una etapa de nucleación entre la proteína con el DNA. Mientras que la segunda fase se da a $NP > 1$ (régimen de exceso de proteína) y sería ocasionada por la elongación de la partícula. Las suposiciones realizadas de las interacciones que se conllevan en cada fase serán confirmadas más adelante.

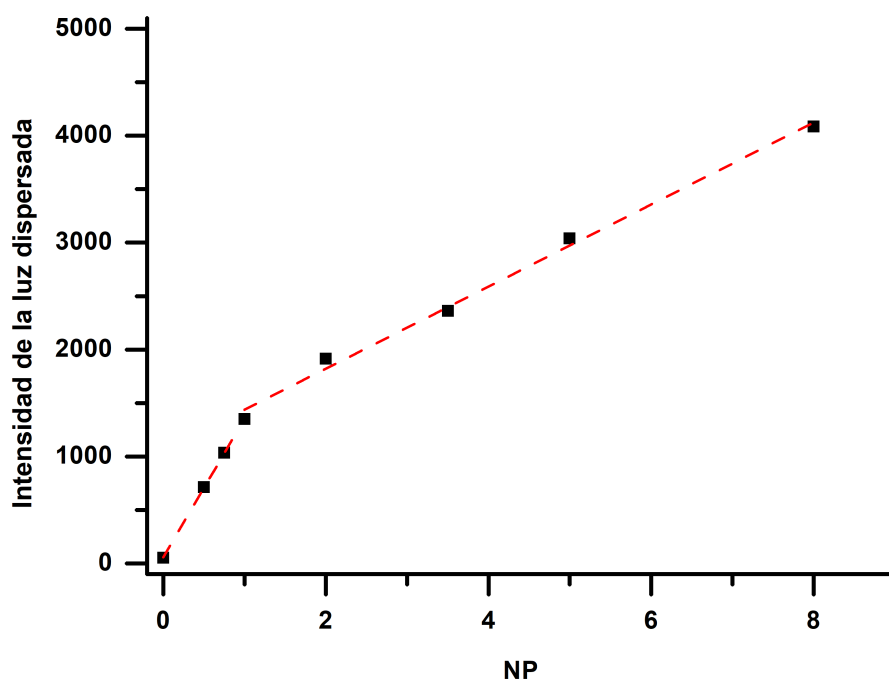


Figura 4.8: Dependencia del balance de carga del complejo $C_4S_{10}B - DNA$ en la intensidad de luz dispersada.

4.4. Mecanismo de autoensamblaje

En esta sección se elucida el tipo de mecanismo de auto- y desensamblaje de la proteína $C_4S_{10}B$, así como el tipo de mecanismo de coensamblaje con DNA. Para este fin se realizaron rampas de temperatura y se midió la dispersión de luz. La literatura sugiere el método de rampas de temperatura como el más viable para determinar el tipo de mecanismo de ensamblaje debido a que experimentalmente es más sencillo adquirir una gran cantidad de datos que conlleven a la determinación del tipo de mecanismo [15, 16].

Mecanismo de autoensamblaje

El mecanismo de auto- y des- ensamblaje de $C_4S_{10}B$ se estudió mediante dispersión de luz estática y dinámica (figura 4.9). Una disolución de la proteína a $88 \mu\text{M}$ (superior a la concentración crítica, CC) se sometió a una rampa de temperatura partiendo de 85°C y enfriando lentamente a 10°C (figura 4.9, \blacksquare). En este gráfico se aprecia que el grado de agregación aumenta conforme se baja la temperatura. En seguida, la solución se calentó a la misma velocidad de enfriamiento hasta 350 K (figura 4.9, \square), pero a pesar de utilizar la misma velocidad, se observa que las curvas de enfriamiento y calentamiento no cambian de fase a la misma temperatura, presentando un fenómeno de histéresis en el autoensamblaje y desensamblaje de $C_4S_{10}B$.

El grado de agregación se ajusta al modelo de nucleación-elongación de Van der Schoot [40] (parámetros en la figura S. 7.17). En este modelo se asume una etapa de nucleación a temperaturas mayores que T_e y una etapa de elongación a temperaturas menores que T_e . Debido a que las interacciones del autoensamblaje son guiadas por interacciones no covalentes, en este caso, la interacción proteína-proteína sería mediada por el bloque hidrofóbico S_{10} , se asume que el cambio de temperatura es capaz de llevar a la proteína de un estado de nucleación a un estado de elongación de manera reversible.

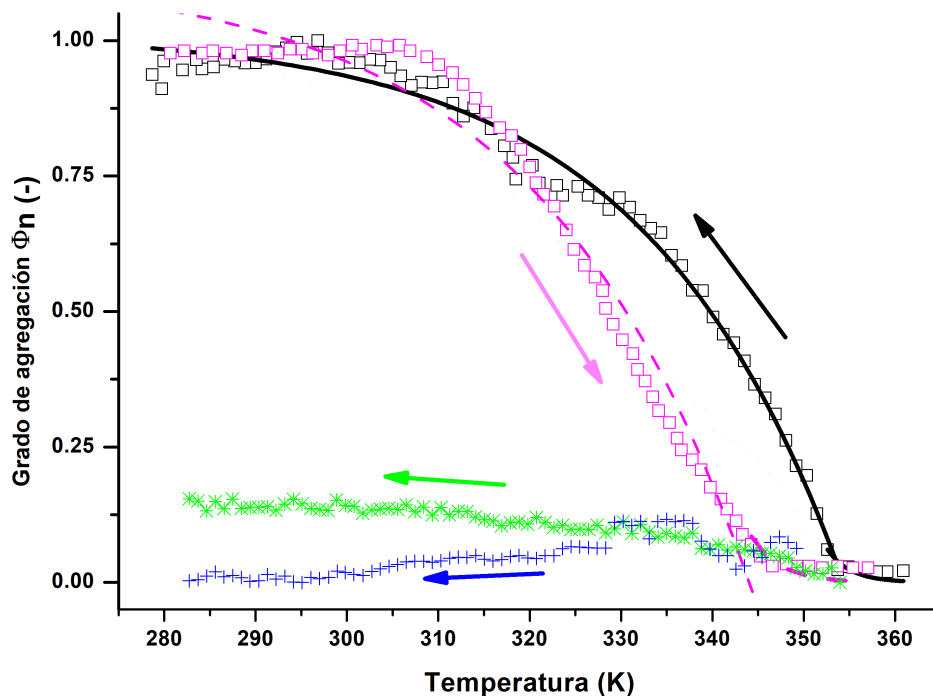


Figura 4.9: Efecto de la temperatura en el grado de agregación adquirido por dispersión de luz de la proteína $C_4S_{10}B$ a una concentración $88 \mu\text{M}$ (encima de la concentración crítica). Autoensamblaje (\square) y desensamblaje (\square). Los datos de calentamiento y enfriamiento se ajustaron a un modelo de nucleación-elongación (línea punteada rosa y sólida negra). Las proteínas $C_4S_{10}B$ a $10 \mu\text{M}$ (debajo de la concentración crítica, $+$) y C_4S_0B (carente del bloque de autoensamblaje S_n , $*$) a $88 \mu\text{M}$ también se muestran. Las flechas indican la dirección de la rampa de temperatura.

En la misma figura 4.9 se compara el grado de agregación de la proteína $C_4S_{10}B$ a $88 \mu\text{M}$ (encima de su CC) con los de la proteína $C_4S_{10}B$ a concentración $10 \mu\text{M}$ (debajo de su CC) y de C_4S_0B a $88 \mu\text{M}$ (carente del bloque de autoensamblaje). Con esto se comprueba que el autoensamblaje de la proteína $C_4S_{10}B$ depende de la concentración y temperatura, debido a que al estar a una concentración debajo de su CC ($10 \mu\text{M}$) no se forman partículas tipo rodillo y la proteína C_4S_0B a $88 \mu\text{M}$ se usó como testigo ya que carece del modulo S_n que media el autoensamblaje.

4.4.1. Mecanismo de autoensamblaje utilizando DNA como molde

Se estudió el tipo de mecanismo de autoensamblaje que sigue $C_4S_{10}B$ (a $10 \mu M$, debajo de la CC) utilizando como molde DNA ($10 nM$) midiendo el efecto de la temperatura en el grado de agregación mediante dispersión de luz estática y dinámica (figura 4.10). Los datos se ajustaron al modelo de nucleación-elongación de van der Schoot (ecuaciones 3.3 y 3.4, página 25; los parámetros se encuentran en la figura S. 7.17) en donde la formación de la partícula empleando la proteína $C_4S_{10}B$ y DNA como molde se llevaría a cabo por este tipo de mecanismo.

Se muestra que el tipo de mecanismo que sigue el autoensamblaje de $C_4S_{10}B$ (sección anterior) y el complejo $C_4S_{10}B - DNA$ es de nucleación-elongación. En este tipo de mecanismo es necesaria la formación de un núcleo crítico para que inicie la etapa de elongación. Este núcleo crítico en el autoensamblaje de $C_4S_{10}B$ estará compuesto de varias proteínas asociadas, mientras en el autoensamblaje de $C_4S_{10}B -$

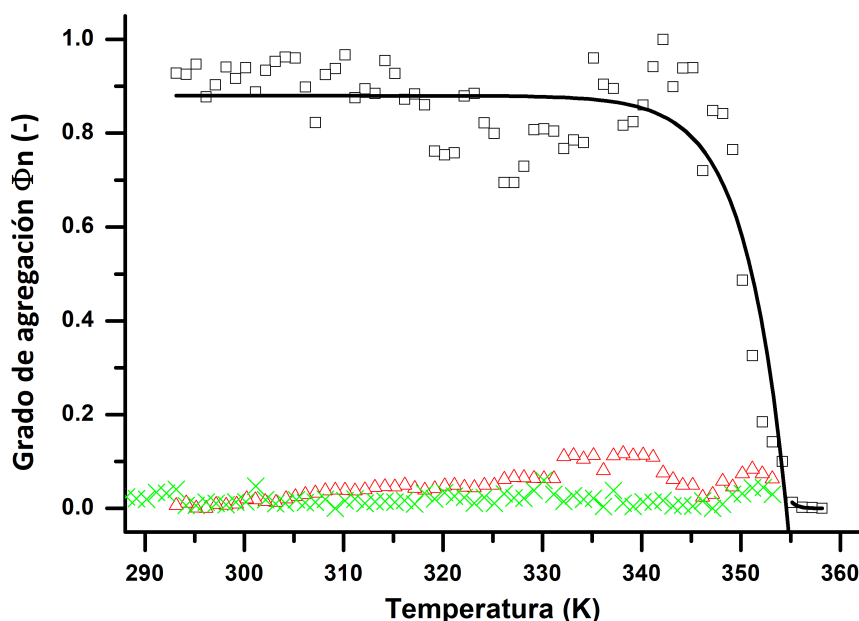


Figura 4.10: Efecto de la temperatura en el grado de agregación medido por dispersión de luz de la proteína $C_4S_{10}B$ ($10 \mu M$, debajo de CC) con DNA ($10 nM$) (□). Comparación con los datos de la proteína $C_4S_{10}B$ a $10 \mu M$ (Δ) o DNA $10 nM$ (×)

DNA el núcleo constará de proteínas interaccionando con el *DNA*. Este hecho se demuestra al comparar el grado de agregación del *DNA* o proteína solas (rojo y verde respectivamente) con el del complejo $C_4S_{10}B - DNA$ (negro). Incluso al comparar los parámetros termodinámicos (figura S. 7.17) del autoensamblaje de $C_4S_{10}B$ con los de $C_4S_{10}B - DNA$ se muestra que la constante de activación (K_a) es mayor para este último, indicando un menor grado de cooperatividad en este proceso. Por lo tanto, el número de proteínas (figura S. 7.17) que necesita el núcleo para dar inicio al autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$ es menor que el que necesita $C_4S_{10}B$. Así mismo, al comparar la entalpía de elongación de los 2 diferentes procesos de autoensamblaje, se observa que se favorece el crecimiento de la partícula del complejo $C_4S_{10}B - DNA$ respecto a $C_4S_{10}B$.

Estos experimentos muestran un mecanismo de tipo nucleación-elongación para $C_4S_{10}B - DNA$ que concuerda con los experimentos realizados mediante pinzas ópticas de Marchetti [36]. Por otro lado, contrastan con el mecanismo propuesto por Cingil [35]. Sin embargo, esto no quiere decir que el mecanismo propuesto por Cingil sea erróneo, ya que a diferencia del estudio realizado por Marchetti y el presentado en este trabajo, Cingil encapsuló un polímero sintético (con grupos carboxilo y anillos aromáticos) en lugar de un *DNA*. Esto indica como el ensamblaje espontáneo de macroestructuras depende del fino balance entre las interacciones de sus bloques de construcción y cómo la modificación de alguno de estos bloques puede desencadenar cambios en el tipo de mecanismo de ensamblaje.

En retrospectiva, en la figura 4.10 se evidenció que la interacción individual de cada uno de estos dos bloques de construcción ($C_4S_{10}B$ y *DNA*) a bajas concentraciones no tienen la fuerza suficiente para crear un ensamble, pero en conjunto sí.

Cabe mencionar que en otras aproximaciones del experimento se intentó utilizar otras concentraciones de $C_4S_{10}B$ y *DNA*, sin embargo, la sensibilidad de la técnica no permitió tener mediciones confiables. La siguiente pregunta sería ver cómo afecta al autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$ la modificación del bloque de construcción *DNA* al utilizar diferentes topologías del mismo (circular, lineal y superenrollado). Este tema se examinará en la siguiente sección.

4.5. Observación de las partículas tipo virus

4.5.1. Relación de la concentración de la proteína y su tamaño

Mediante imágenes obtenidas por AFM se observa que existe relación entre la concentración de la proteína $C_4S_{10}B$ y la longitud de la nanopartícula (figura 4.11), tal como lo había mostrado anteriormente Cázares y colaboradores [34].

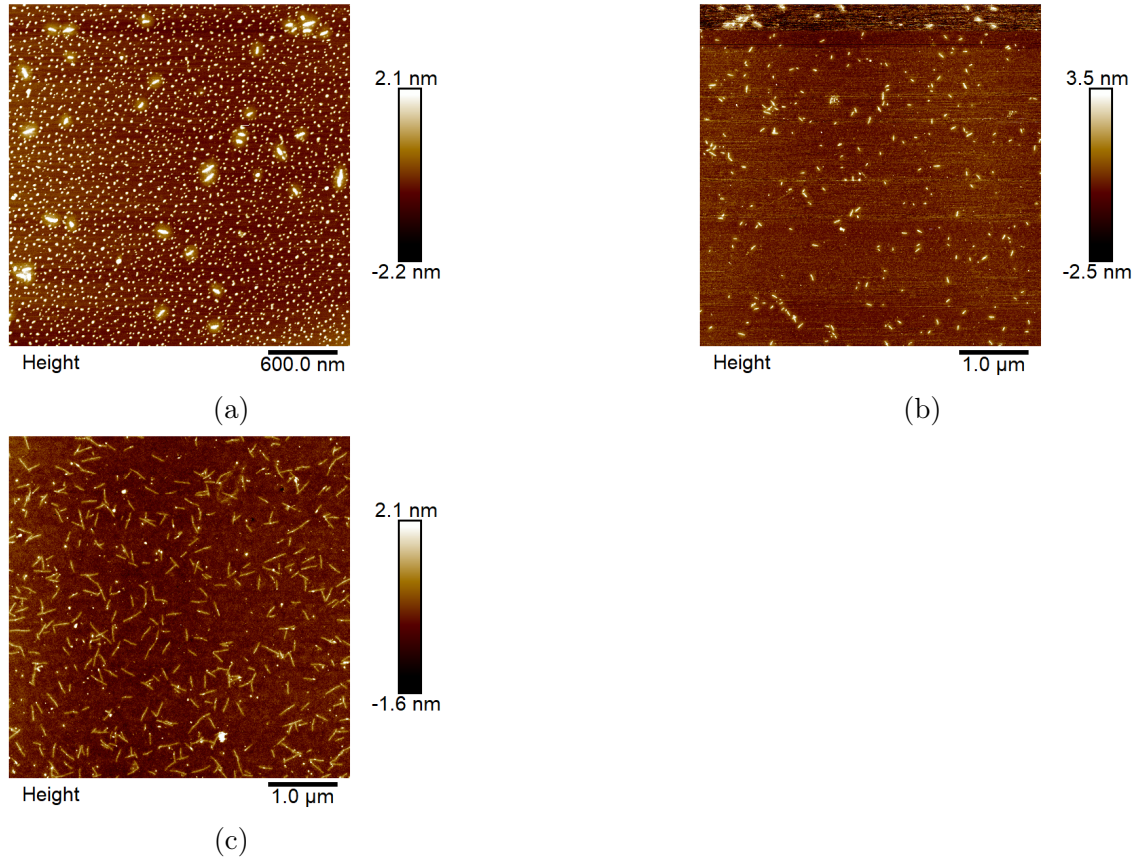


Figura 4.11: Imágenes obtenidas por AFM de las nanoestructuras formadas por el autoensamblaje de $C_4S_{10}B$ en función de su concentración a) 500 nM b) 10 micromolar y c) 55 micromolar

En la figura 4.12a se muestran las distribuciones del tamaño de la nanopartícula en función de la concentración de la proteína $C_4S_{10}B$. Mientras en la figura 4.12b se observa el efecto de la concentración en el pico máximo de la distribución de tamaño. La diferencia de estas funciones de distribución con respecto a las reportadas por Cázares [34], puede deberse a la histéresis del proceso de autoensamblaje (como se mostró en las curvas de temperatura), ya que aunque las muestras se equilibraron por 24 horas, igual que lo realizado por Cázares [34], en su investigación este autor partió de varias soluciones a las concentraciones deseadas (provocando que $C_4S_{10}B$ se ensamblara), mientras en esta investigación se inició de una disolución stock a una concentración de $110 \mu\text{M}$ (encima de CC), en la que las nanopartículas estaban ya ensambladas. Esta disolución se diluyó a las concentraciones deseadas provocando que las nanopartículas tuvieran que desensamblarse y, por ende, se observan nanopartículas de considerable longitud incluso debajo de la CC.

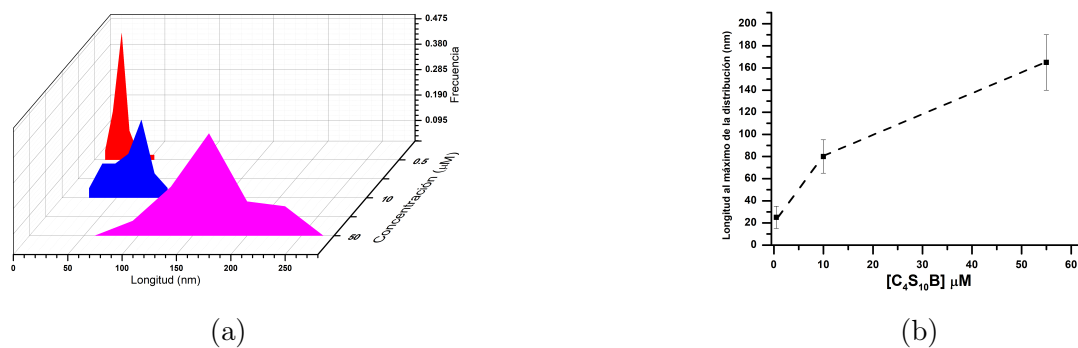


Figura 4.12: Dependencia de la longitud de la nanopartícula con la concentración. a) Funciones de distribución de la longitud de las nanopartículas formadas por el autoensamblaje de $C_4S_{10}B$ para las concentraciones 500 nM, 10 μM y 55 μM . b) Posición del pico máximo de la distribución de longitud en función con la concentración.

Efecto de la temperatura en el grado de agregación de $C_4S_{10}B$ medido por AFM

Para examinar la relación de la temperatura en la longitud de la partícula se obtuvieron imágenes por AFM de la proteína $C_4S_{10}B$ a $10 \mu\text{M}$ a temperatura ambiente (figura 4.13a) y a 75°C (figura 4.13b). En la figura 4.13c se muestra distribución del tamaño de la nanopartícula en función de la la temperatura. En estas se nota una disminución en la función de la distribución del tamaño de la nanopartícula al aumentar de 25°C a 75°C que se sugiere es por una menor agregación de las proteínas ya que estas interactúan entre ellas por por fuerzas hidrofóbicas. Incluso si se toma

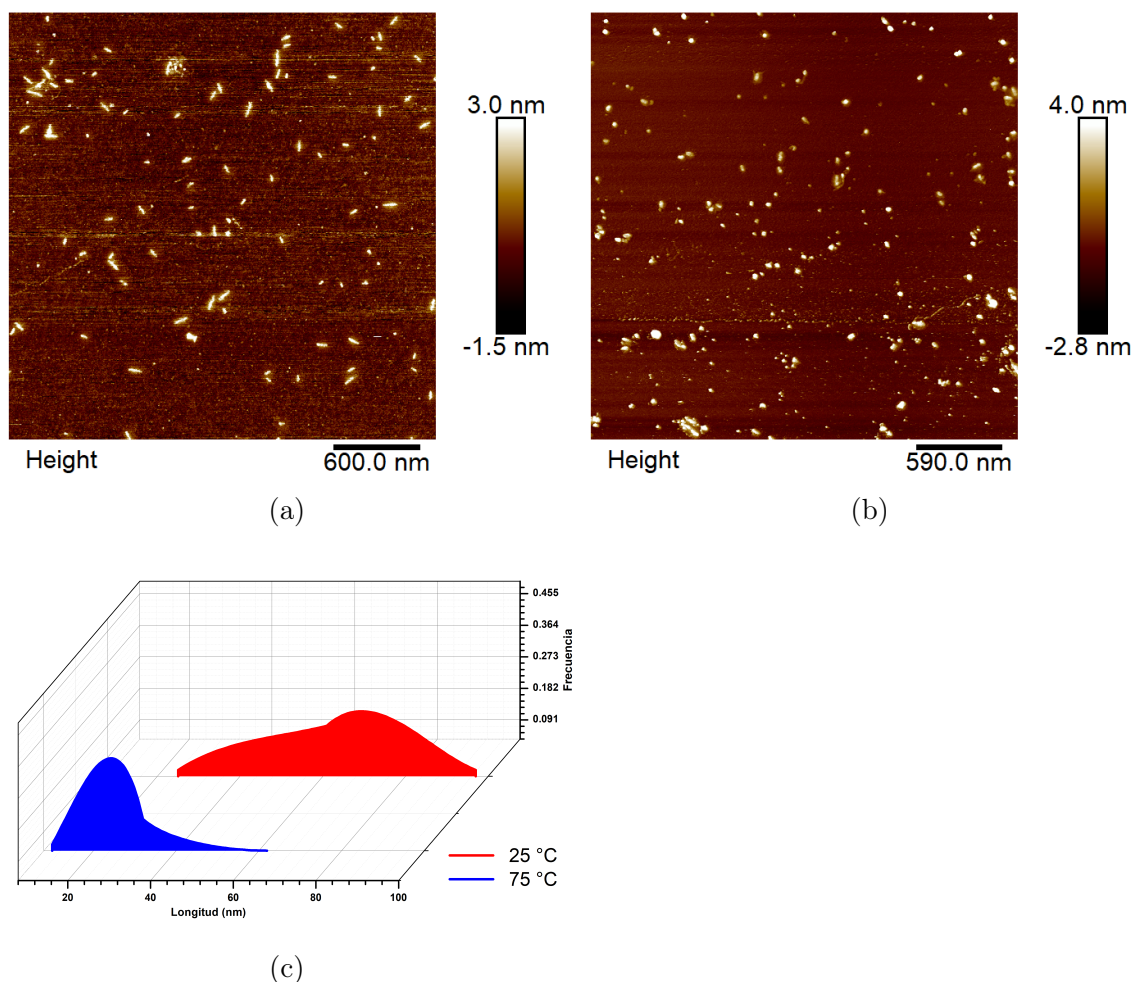


Figura 4.13: Desensamblaje de $C_4S_{10}B$ a $10 \mu\text{M}$ por la temperatura. Imágenes de AFM a temperatura a) 20°C b) 70°C . c) Distribución de la longitud de la partícula en función de la temperatura.

el pico máximo de la distribución a 25 °C y se divide entre el pico máximo de la distribución a 75 °C se calcula que la partícula reduce 3 veces su longitud. Estos datos contrastan con lo encontrado en las curvas de temperatura (sección 4.4, figura 4.9) donde no se observó un grado de agregación significativo de la proteína $C_4S_{10}B$ a 10 μM . Sin embargo, esto seguramente se debe a que se partió de una disolución stock 80 μM (encima de la CC) provocando que la partícula tuviera que desensamblarse a través de dilución.

Cabe señalar que este proceso de histéresis en el ensamblaje ha sido encontrado en virus naturales [12], en los que se observó que el proceso de desensamblaje necesita mayor energía que el de ensamblaje.

4.5.2. Coensamblaje de la proteína $C_4S_{10}B$ con DNA

En esta sección se obtuvieron imágenes mediante AFM para recapitular las propiedades de interacción y condensación del dsDNA lineal utilizando $C_4S_{10}B$ mostradas por Hernández-García [23]. Para este fin, se obtuvieron primero imágenes del dsDNA lineal (figura 4.14a) de 732 pb y de la partícula viromimética obtenida por el coensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$ (figura 4.14b). Se ratificó la formación de partículas tipo rodillo y se cuantificó la distribución de la longitud del dsDNA lineal y las partículas tipo rodillo (figura 4.14c). Al dividir los picos máximos de cada función de distribución se confirmó que la proteína $C_4S_{10}B$ condensa el DNA lineal en un factor de 3 veces, aproximadamente.

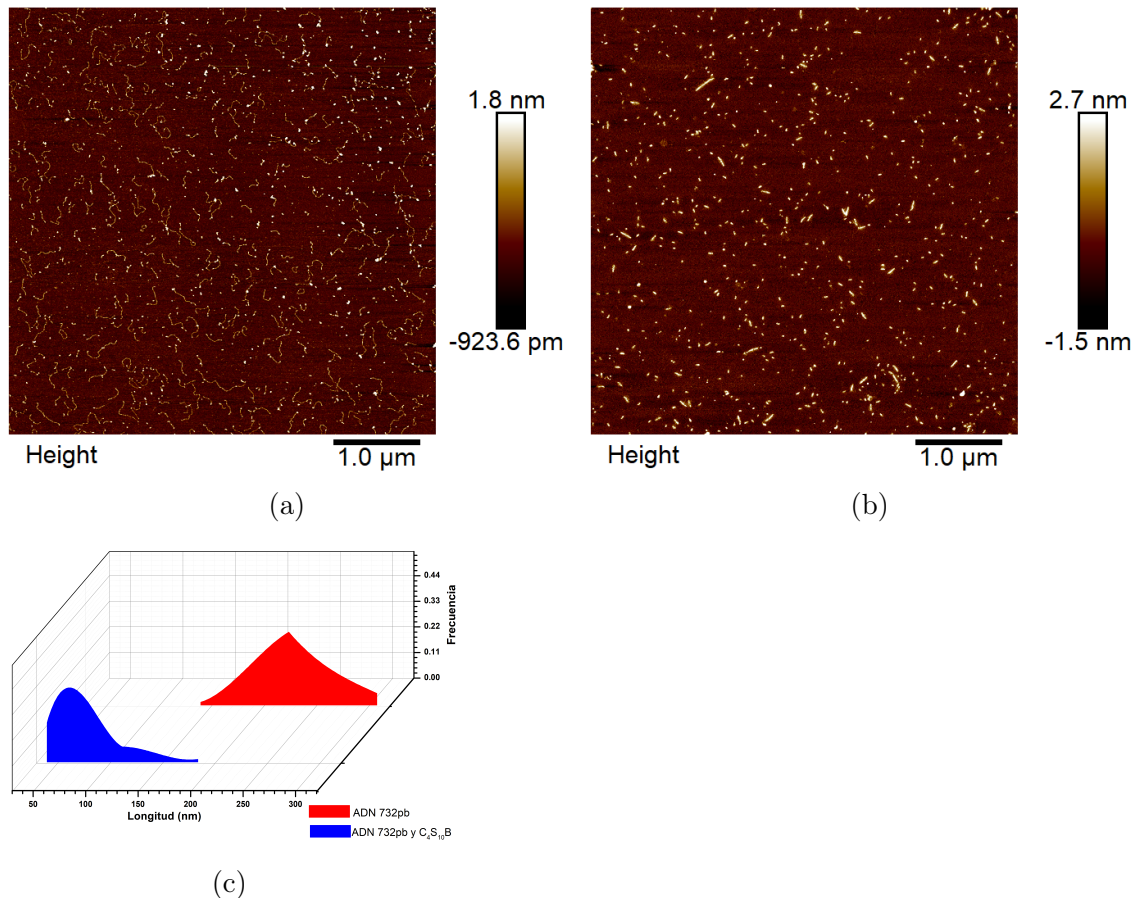


Figura 4.14: Coensamblaje del virus artificial. Imágenes de AFM de a) dsDNA lineal de 732 pb, b) Partícula tipo rodillo formada por la interacción DNA y $C_4S_{10}B$ (NP 6), c) Funciones de distribución de la longitud del DNA solo (rojo) y con $C_4S_{10}B$ (azul).

4.5.3. Efecto de emplear diferentes topologías de DNA en el autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$

Una pregunta interesante era cómo afectaría el empleo de diferentes topologías del DNA al ensamblaje de la partícula tipo virus ¿Se seguirían observando partículas tipo rodillo lineales? Para responder esta pregunta se estudió el autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$ con cada una de las tres diferentes topologías de un plásmido de 2645 pb: lineal, circular y superenrollado adquiriendo imágenes de AFM. Primero se obtuvieron imágenes de las moléculas en las tres diferentes topologías (figura 4.15)

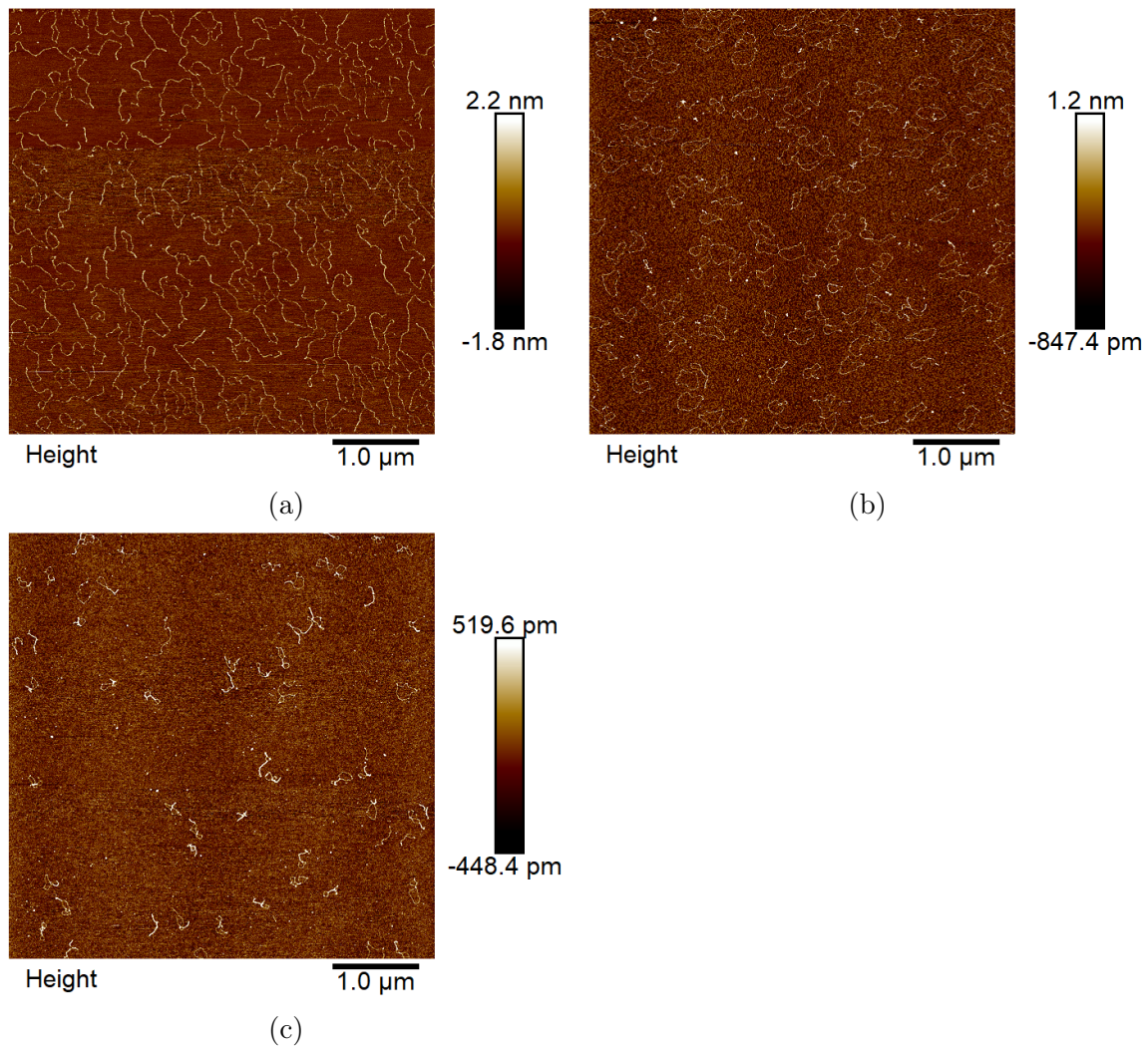


Figura 4.15: Imágenes tomadas por AFM de las diferentes topologías del plásmido a) Lineal, b) Circular, C) Superenrollada.

y, posteriormente, de las partículas formadas por coensamblaje con $C_4S_{10}B$ a NP 6 (figura 4.16). De las imágenes obtenidas, se aprecia que variar la topología del DNA no cambia la estructura final de las partículas formadas. A pesar de que en estas imágenes, pareciera que las partículas no han alcanzado el equilibrio, debido que se visualizan fragmentos de DNA sin interactuar con $C_4S_{10}B$ (figura 4.16d). Para descartar que el autoensamblaje no llegó al equilibrio se incubaron las muestras por días y se observó el mismo resultado.

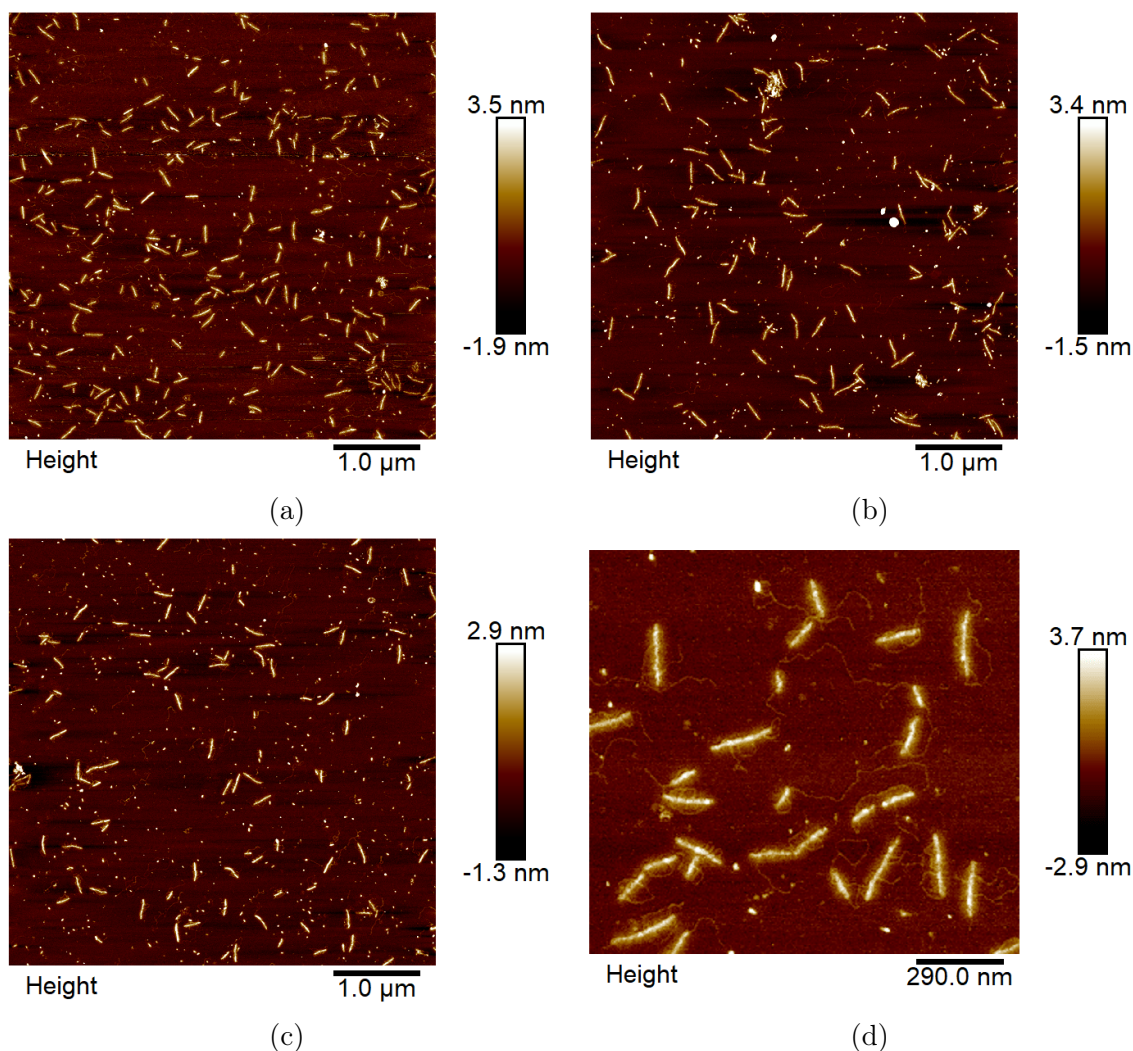


Figura 4.16: Imágenes de AFM de las partículas viromiméticas formadas de la interacción $C_4S_nB - DNA$. Los complejos de $C_4S_{10}B$ con cada una de las tres diferentes topologías del plásmido p-redox a) Lineal, b) Circular, c) Superenrollado y d) Acercamiento de la imagen de AFM de las partículas viromiméticas formadas de la interacción $C_4S_{10}B$ con plásmido p-redox lineal.

Este fenómeno, en el que $C_4S_{10}B$ no se une por completo al DNA puede deberse a alguna contaminación por parte del plásmido que impide la condensación del mismo. Para verificar esta hipótesis se realizó el mismo procedimiento incubando el plásmido lineal con $C_4S_{14}B$ (figura 4.17) y se observó la misma tendencia. Estos resultados aunados con la verificación de la condensación del DNA lineal de 732 pb con $C_4S_{10}B$ (sección anterior) sustentan la hipótesis que el DNA plasmídico contiene alguna contaminación (por ejemplo, sales que compiten con la interacción electrostática para que se de el autoensamblaje). Debido a lo expuesto anteriormente, los resultados no dan una respuesta clara de la pregunta planteada al inicio de la sección. Una propuesta a futuro es cambiar el método de purificación del DNA en sus diferentes topologías.

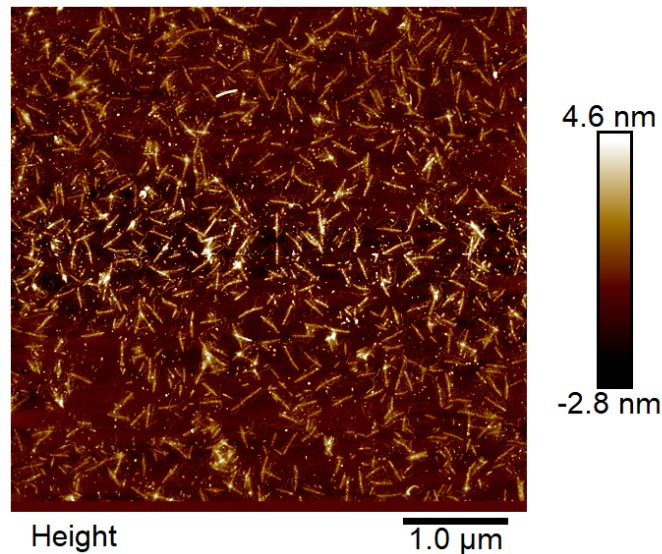


Figura 4.17: Partículas formada por $C_4S_{14}B$ con plásmido lineal

4.6. Estudio de la condensación del DNA

A partir de experimentos de AFM realizados por Hernández [23] y reproducidos aquí se conocía que $C_4S_{10}B$ y $C_4S_{14}B$ fueron capaces de interaccionar y condensar hasta $1/3$ de su longitud original al DNA, por lo que el DNA tiene que sufrir un cambio estructural para reducir su longitud en la partícula tipo virus. Para obtener una mayor comprensión del empaquetamiento del DNA en la partícula viromimética se realizaron experimentos de FRET y smFRET utilizando una construcción de DNA lineal de 80 pb marcada con los fluoróforos ATTOTM550 (donador) y ATTOTM647N (aceptor) separados por 14, 18, 24 ó 28 pares de base (4.76, 6.12, 8.16 ó 9.52 nm, respectivamente).

Inicialmente se obtuvieron los espectros de emisión de cada una de las cuatro construcciones de DNA al interaccionar con $C_4S_{10}B$ a través del tiempo para corroborar que existía un cambio conformacional en el ensamble. Un espectro representativo se muestra en la figura 4.18, los demás espectros se encuentran en la figura S. 7.20.

En estos espectros de emisión se verificó el cambio de la fluorescencia a 665 nm a través del tiempo debido al cambio conformacional del DNA inducido por $C_4S_{10}B$. En el gráfico insertado de la figura 4.18 se ve que este cambio conformacional del DNA (la proporción de la intensidad 665 nm / 565 nm) alcanza el equilibrio a las 15 horas de incubación para las condiciones dadas.

Aunque se podría intentar extraer más datos de estas gráficas como la eficiencia de FRET para posteriormente calcular las distancias y finalmente obtener un modelo estructural, esto es impedido por el desconocimiento del patrón exacto del etiquetado con los fluoróforos y, por ende, no tener certeza de qué todas las moléculas incurren en el proceso de FRET.

Con el fin de obtener un modelo de alta resolución espacial (nanómetros) y temporal (milisegundos) del empaquetamiento del DNA debido al autoensamblaje de $C_4S_{10}N - DNA$ se empleó la técnica de smFRET. En la figura 4.19 se muestra una imagen representativa de los cuadros esquemáticos obtenidos al excitar el donador,

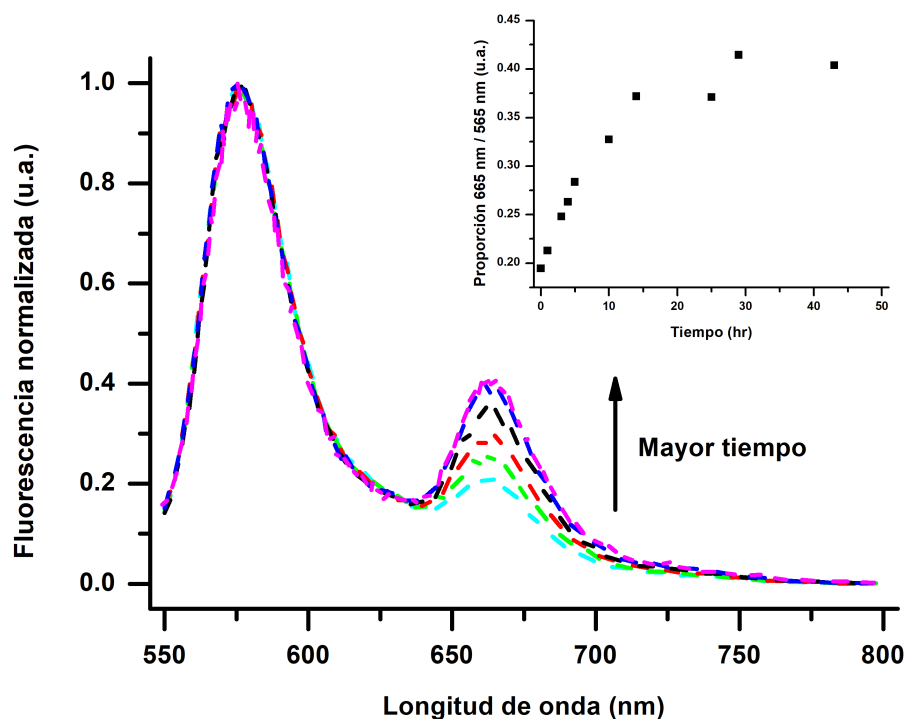


Figura 4.18: Espectros de emisión normalizados que reflejan el cambio estructural de fluorescencia cuando el DNA con distancia entre sus fluoróforos de 9.52 nm interacciona con $C_4S_{10}B$ a través del tiempo. La línea punteada color cian es el espectro a tiempo cero mientras la azul al tiempo final. El gráfico insertado refleja la proporción en la intensidad 665 nm/565 nm a través del tiempo.

luego de su subsecuente transferencia de energía al aceptor (cuadro verde), así como de la excitación directa del aceptor (cuadro rojo). Estos cuadros esquemáticos son solo un ejemplo de los mil cuadros obtenidos para cada experimento. En las figuras S.7.21, S.7.22, S.7.23 y S.7.24 se muestran los histogramas de eficiencia de FRET no corregidas (E^*) y estequiometría (S^*) obtenidas a partir de los análisis de los respectivos cuadros esquemáticos para cada construcción de DNA, $C_4S_{10}N - DNA$ y DNA (con la proteína removida mediante lavados).

A partir de las eficiencias de FRET no corregidas (E^*) se obtuvo la distribución de distancia relativa D^* (figura 4.20) empleando la ecuación 1.3 (página 8). Para obtener las distancias exactas una serie de correcciones deben realizarse (no se detallan). En la figura 4.20 se muestra para todas las funciones de distribución que el pico máximo cambia solo ligeramente. Siendo la variación más evidente en el DNA con los

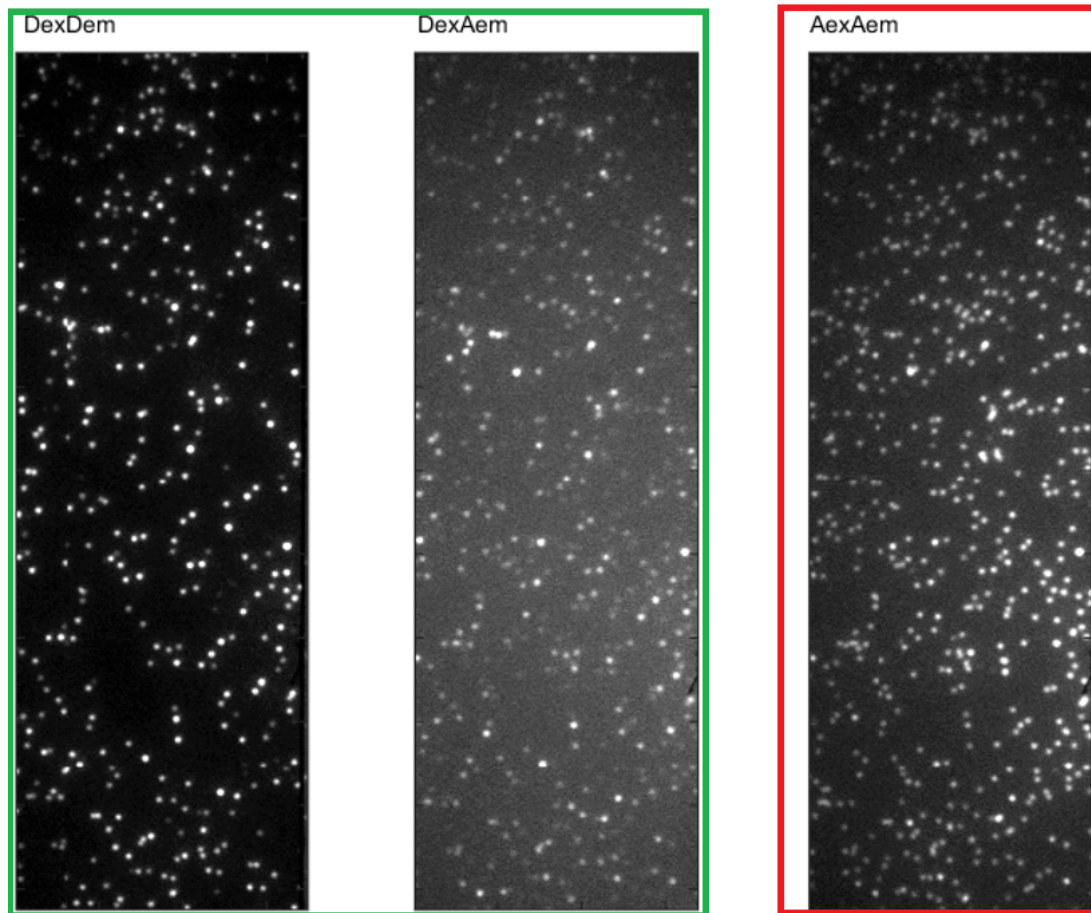


Figura 4.19: Cuadros esquemáticos representativos de los canales DexDem, DexAem (cuadro verde) y AexAem (cuadro rojo). Cada punto blanco es una molécula de DNA emitiendo fluorescencia.

fluoróforos separados por 14 pb, en esta construcción el pico máximo de la función de distribución es de 6.2 nm (DNA) y se reduce a 4.8 nm una vez agregada la proteína. Además, en esta misma construcción de DNA se nota que la distribución crece de 0.1 (DNA solo) a distribuciones mayores de 0.6 ($C_4S_{10}B - DNA$) cuando la distancia es menor al pico máximo (4.8 nm). De igual manera, en los DNA con fluoróforos separados por las demás distancias, se aprecia que la función de distribución aumenta a distancias menores de su pico máximo.

Este crecimiento podría ser el principal responsable del cambio que se ve en el ensamble y no el ligero desplazamiento del máximo en las funciones de distribución. Además, este representa el acercamiento espacial entre los fluoróforos. Mostrando una condensación de las construcciones de DNA cuando se incuban con $C_4S_{10}B$.

Aunque en primera instancia se podría pensar que el bloque S_{10} es el responsable de la condensación, esto se descarta al realizar el experimento con la construcción de DNA con fluoróforos separados por 24 pb y C_4S_0B observándose el mismo efecto (figura S7.25), indicando que este cambio en la estructura del DNA se debe a la interacción del bloque B (lisinas) con los grupos fosfato del DNA. Una explicación para este aumento en la dispersión de las funciones de distribución a distancias menores del pico máximo del DNA cuando se incubaba con la proteína es la existencia de varias poblaciones del complejo $DNA - C_4S_{10}B$ donde cada una interactúa con el DNA de diferente manera. En este contexto, sería razonable ver un cambio en la dispersión de las distancias en las que se condensa el DNA ya que el bloque B consta

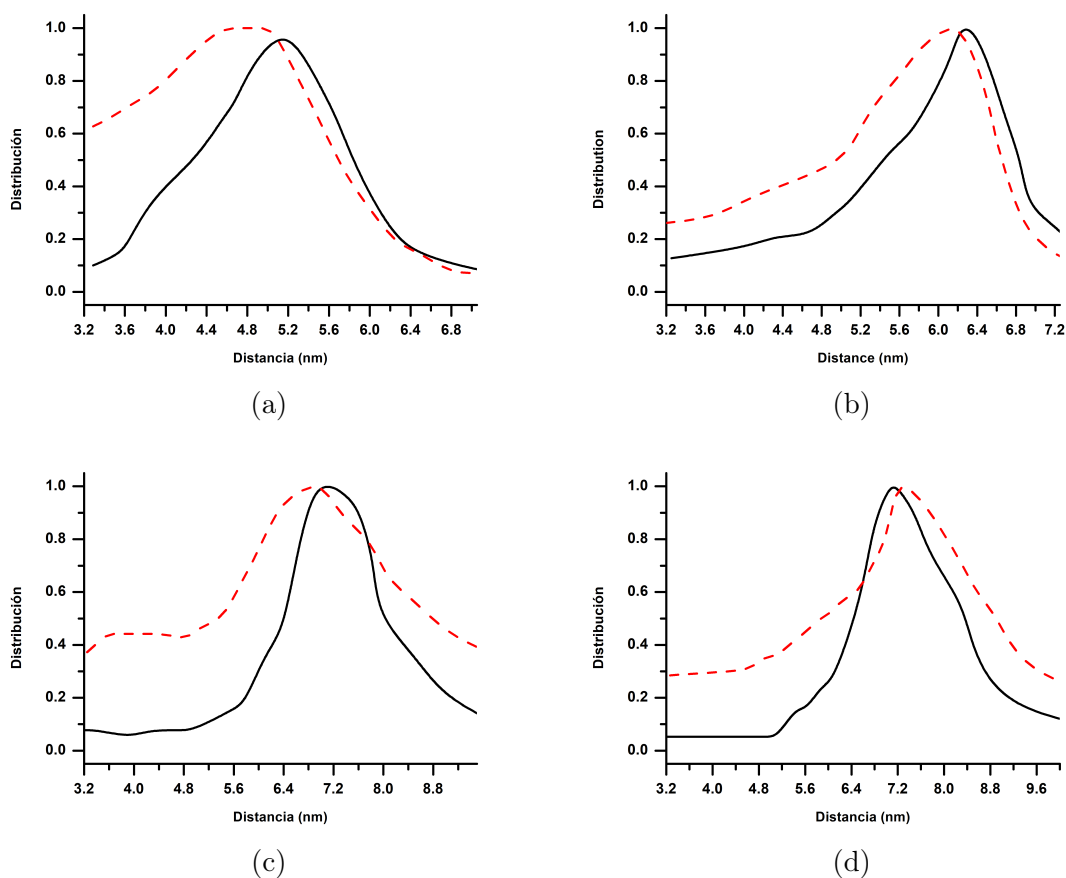


Figura 4.20: Funciones de distribución de la distancia relativa (D^*) del DNA solo (—) y del complejo $DNA - C_4S_{10}B$ (- - -). Se utilizaron las diferentes construcciones de DNA con distancias entre ATTOTM550 y ATTOTM647N de a) 14 pb (4.76 nm), b) 18 pb (6.12 nm), c) 24 pb (8.16 nm) y d) 28 pb (9.52 nm)

de lisinas cargadas positivamente que se unen de manera inespecífica al DNA. Aunado a que los experimentos de AFM que muestran que el DNA se reduce 3 veces su tamaño una vez que interaccionó con $C_4S_{10}B$, esta hipótesis sugeriría que la condensación del DNA por el bloque S_{10} surge a distancias más largas.

En los experimentos, se comprobó la unión de $C_4S_{10}B$ con DNA debido a la disminución en el conteo de fotones una vez agregada la proteína. Para verificar que el sistema se encontraba en equilibrio, se utilizaron otras aproximaciones, como la incubación en el ensamble y la verificación por AFM de las partículas viromiméticas formadas, para posteriormente realizar el experimento de smFRET; asimismo, se realizó la incubación del DNA con $C_4S_{10}B$ por 3 días antes de la medición. Aunque al final ambas aproximaciones coinciden con el resultado de la primera (la incubación por una noche).

4.7. Evaluación del encapsulamiento del bromuro de etidio del complejo $DNA - C_4S_nB$

Finalmente, se intercaló la molécula orgánica bromuro de etidio (BrEt) en un DNA lineal y se tituló con C_4S_nB para evaluar la capacidad del complejo como sistema de encapsulamiento. Se obtuvieron los espectros de emisión respectivos (figura S. 7.26) y con la ecuación 3.7 (página 34) se calculó la fluorescencia relativa en función del NP (figura 4.21). El intercalamiento de esta molécula en DNA esta ampliamente reportado en la literatura [48, 49] donde se describe que a medida que la molécula se intercala en el DNA, esta aumenta su fluorescencia debido al ambiente hidrofóbico.

Por consiguiente, se interpreta para C_4S_0B que el BrEt intercalado va siendo desplazado del DNA a medida que se titula y, por ende, disminuye su fluorescencia.

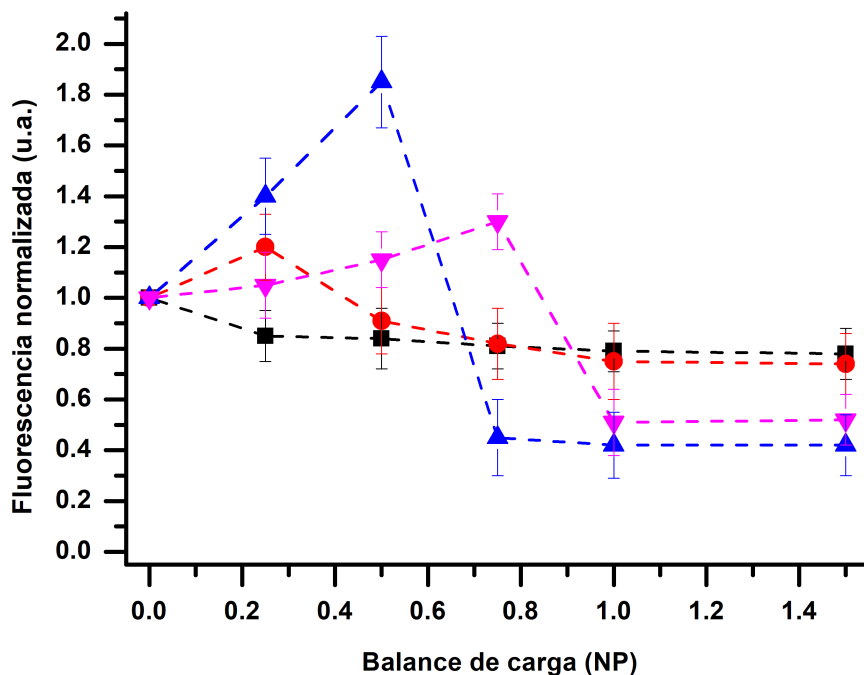


Figura 4.21: Ensayo del desplazamiento del BrEt al medio acuoso debido a la interacción del DNA con las diferentes proteínas: a) C_4S_0B (■), b) C_4S_4B (●), c) $C_4S_{10}B$ (▲) y d) $C_4S_{14}B$ (▼). Las líneas punteadas son solo una guía para los ojos. La incertidumbre es la desviación estándar de 3 experimentos.

Por otra parte, las proteínas con el bloque $n \geq 4$ muestran de un mecanismo de desplazamiento que consiste en dos fases. La primera fase consiste en un aumento de la fluorescencia cuando el balance de carga es menor a 1, sugiriendo que este bloque S_n interacciona con el DNA para crear un ambiente más hidrofóbico y así aumentar su fluorescencia. Mientras la segunda fase estriba en la exposición del BrEt al medio acuoso que conlleva la disminución de la fluorescencia debido probablemente a la fase de elongación de la partícula viromimética. Estos resultados siguen la misma tendencia que los expuestos en [50] donde un DNA con BrEt intercalado se titula con el virus CCMV. Este experimento incluso es consistente con los estudios de interacción $C_4S_nB - DNA$ realizados mediante EMSA y efecto PIFE-FRET donde la interacción es dependiente de la longitud del bloque S_n . Lo más importante de estos resultados es que muestran la capacidad del sistema para encapsular moléculas que se intercalen en el DNA. Mostrando que C_4S_0B y C_4S_4B son los casos más prometedores para este tipo de encapsulamiento debido al mínimo desplazamiento del BrEt. Cabe señalar que se descarta una posible interacción que afecte la fluorescencia por parte de C_4S_nB con BrEt al realizar el experimento sin haber intercalado la molécula al DNA y no observar cambio en el espectro de emisión con respecto a la solución acuosa de BrEt.

Capítulo 5

Conclusiones

En esta tesis se estudia el proceso de autoensamblaje de las partículas viromiméticas C_4S_nB y su unión con DNA, partiendo de la cuantificación de las interacciones hasta el tipo de mecanismo y su conformación final. Además, se muestra que el autoensamblaje de las partículas viromiméticas dependen de un balance de las interacciones entre sus bloques de construcción y cómo la modificación de estos, por pequeña que parezca puede desencadenar cambios en la interacción, por ejemplo, al variar la longitud del bloque S_n o el tamaño del molde de DNA.

Se exhibe la interacción proteína-proteína en términos de absorbancia cuantificando la concentración crítica de autoensamblaje y encontrando que esta se encuentra en el rango de concentración micromolar. En este contexto, un ligero cambio en los bloques de construcción (C_4S_nB), como es la longitud del bloque S_n , varia la concentración crítica de cambio de fase. Para $C_4S_{10}B$ y $C_4S_{14}B$, que son proteínas que se ensamblan en partículas a una concentración crítica, se clarifica esta dependencia de la longitud del bloque S , ya que cuando se pasa del bloque S_{10} a S_{14} la CC disminuye de 30 a 8 μM . Mediante AFM se corroboró la existencia de esta CC para $C_4S_{10}B$, aunque esta CC difiere de la obtenida con absorbancia probablemente debido a la histéresis del auto- y des- ensamblaje.

Además, se examinó cómo se afectan las interacciones del autoensamblaje de $C_4S_nB - \text{DNA}$ al modificar los bloques de construcción. Mediante EMSA se encontró que al decrecer la longitud del DNA, éste disminuye su afinidad con C_4S_0B y $C_4S_{10}B$

sugiriendo un mecanismo de nucleación-elongación donde es necesaria la formación de un núcleo crítico, aunque otras explicaciones también son posibles, como lo mostrado por Daniel [51]. Igualmente, se investigó el efecto de la longitud del bloque S_n en la interacción con el DNA, insinuando un posible mecanismo en competencia gobernado por la interacción proteína-proteína. Esta idea es sustentada por los experimentos de absorbancia que presentan una CC para todas las proteínas, además de la presencia de dos complejos en solución al medir el potencial zeta a diferentes NP [23]. Esta dependencia del bloque de autoensamblaje en la interacción con el DNA también se visualizó en la técnica PIFE-FRET.

Midiendo el efecto de la temperatura en la dispersión de luz se observó que el proceso de auto- y des- ensamblaje de $C_4S_{10}B$ se ajusta a un modelo tipo nucleación-elongación de van der Schoot. Estos dos procesos presentan histéresis, donde la temperatura de elongación es mayor para el proceso de ensamblaje (esta histéresis fue observado por AFM). En el modelo de van der Schoot también se sugiere que al calentar la proteína, ésta se desensambla, este hecho fue corroborado mediante AFM. De igual manera, el grado de agregación de $C_4S_{10}B - DNA$ en función de la temperatura se ajustó a un modelo de nucleación-elongación. Este tipo de mecanismo está en común acuerdo con los experimentos realizados en [36] de molécula única.

Partiendo de los experimentos de AFM del autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$ donde se interacciona y condensa el DNA, surgió la pregunta de cómo era la conformación del DNA condensado. Mediante FRET y smFRET se intentó responder a esta pregunta. Se observó un cambio en el ensamble midiendo la proporción de la intensidad 565 nm / 665 nm de FRET que alcanzó el equilibrio a las 15 horas. Con el fin de obtener un modelo espacial y temporal del autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$ se utilizó la técnica smFRET, donde se encontró un cambio no homogéneo en las distribuciones de distancias de todas las construcciones de DNA una vez que interactúa con $C_4S_{10}B$. Este cambio sugiere la existencia de varias poblaciones de DNA condensadas de diferente manera. La falta de especificidad que tiene el bloque B (lisinas) que interactúa mediante interacción electrostática con el grupo fosfato del DNA es el responsable de este cambio.

Finalmente se evaluó la capacidad de C_4S_nB para encapsular DNA con BrEt intercalado y se determinó que está depende de la longitud del bloque S . Las proteínas con S_0 y S_4 desplazaron en menor medida al BrEt. Las que contienen el bloque S_{10} y S_{14} lo desplazan en mayor cantidad debido probablemente al condensamiento del DNA que estas presentan. Mostrando la capacidad de este sistema para encapsular una molécula orgánica.

Con lo expuesto en esta tesis se contribuyó en el entendimiento de los mecanismos de autoensamblaje de $C_4S_nB - DNA$ en partículas viromiméticas. Aprovechando que C_4S_nB es una proteína producida *de novo* basada en bloques, se podría modificar la proteína utilizando técnicas de DNA recombinante para que tenga mayor funcionalidad (por ejemplo, cambiar el bloque de unión inespecífico B por uno específico a una secuencia) y eventualmente aplicaciones médicas.

Capítulo 6

Perspectivas

Aunque esta investigación responde algunas preguntas acerca del autoensamblaje crea otras más por responder. Mediante varias técnicas se expuso la posibilidad de un mecanismo en competencia gobernado por la interacción proteína-proteína. Esto se podría constatar empleando una columna de exclusión (SEC) para ver las diferentes poblaciones o mediante microscopía confocal, donde se marcaría con fluoróforos de distinto color a la proteína y al DNA. Incluso no se descarta un estudio del potencial Z más profundo.

El ajuste al modelo de nucleación elongación derivado de las curvas de temperatura evidencian la necesidad de un núcleo crítico para dar inicio al autoensamblaje de $C_4S_{10}B$. Este núcleo crítico podría ser medido con fluorescencia de autocorrelación etiquetando a la proteína con ATTOTM488 y observando los diferentes tamaños del núcleo al variar la concentración de la proteína. De igual manera se podría ver la dependencia del tamaño de este núcleo en función del bloque S_n . Además, el tipo de mecanismo de autoensamblaje de $C_4S_{10}B - DNA$ constata la dependencia de las interacciones entre los bloques de construcción para crear macroestructuras. Por lo que, la modificación de estos bloques de construcción y cómo afecta a la estructura final se puede examinar utilizando diferentes topologías de DNA o las diferentes proteínas expuestas en experimentos de rampa de temperatura o por AFM.

Los experimentos de smFRET mostraron la unión inespecífica de C_4S_nB al DNA. Cambiar este bloque de unión B por uno de unión específica podría tener bastantes aplicaciones.

Aunque la transfección a células no fue un tema abordado en esta tesis, se podría unir un polímero a la proteína mediante el grupo tiol o las lisinas. Este conferiría a la partícula una mayor eficiencia a la transfección de células como se ha visto en otros estudios.

Capítulo 7

Información suplementaria

7.1. Secuencia de proteínas recombinantes C_4S_nB

En esta sección se reporta las secuencias de aminoácidos de las proteínas C_4S_nB que se ensamblan en virus artificiales. En azul la señal de secreción, en verde el bloque de estabilidad coloidal, en amarillo el bloque de autoensamblaje y en rojo el bloque de interacción proteína-DNA.

Secuencia de la proteína recombinante C_4S_0B

```
MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFNSSTNN  
GLLFINTTIIASIAAKEEGVSLEKREAEAGPPGEPGNPGSPGNQGGQPGNKGSPGNPGQPGNE  
GQPGQPGQNGQPGEPGSNGPQGSQGNPGKNGQPGSPGSQGSQGNQGSQPGQPGNPGQPGEQG  
KPGNQGPAGEPGNPGSPGNQGGQPGNKGSPGNPGQPGNEGQPGQPGQNGQPGEPGSNGPQGS  
QGNPGKNGQPGSPGSQGSQGNQGSQPGQPGNPGQPGEQGKPGNQGPAGEPGNPGSPGNQGGQ  
GNKGSQGNPGQPGNEGQPGQPGQNGQPGEPGSNGPQGSQGNPGKNGQPGSPGSQGSQGNQGG  
SPGQPGNPGQPGEQGKPGNQGPAGEPGNPGSPGNQGGQPGNKGSPGNPGQPGNEGQPGQPGQ  
NGQPGEPGSNGPQGSQGNPGKNGQPGSPGSQGSQGNQGSQPGQPGNPGQPGEQGKPGNQGPA  
GGKKKKKKKKKKKKG
```

Figura S. 7.1: Secuencia de aminoácidos de la proteína C_4S_0B

7.2. Caracterización de las proteínas recombinantes C_4S_nB mediante SDS-PAGE y MALDI-TOF MS

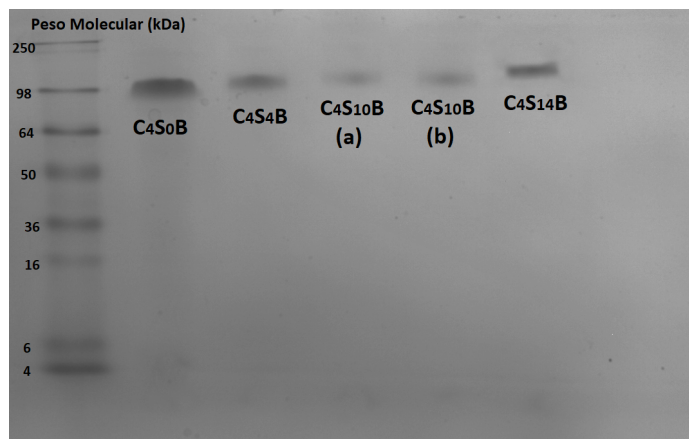


Figura S. 7.5: SDS-PAGE de C_4S_0B , C_4S_4B , $C_4S_{10}B$ a) producida y purificada en Wageningen, b) producida y purificada por el método descrito en la presente tesis y $C_4S_{14}B$

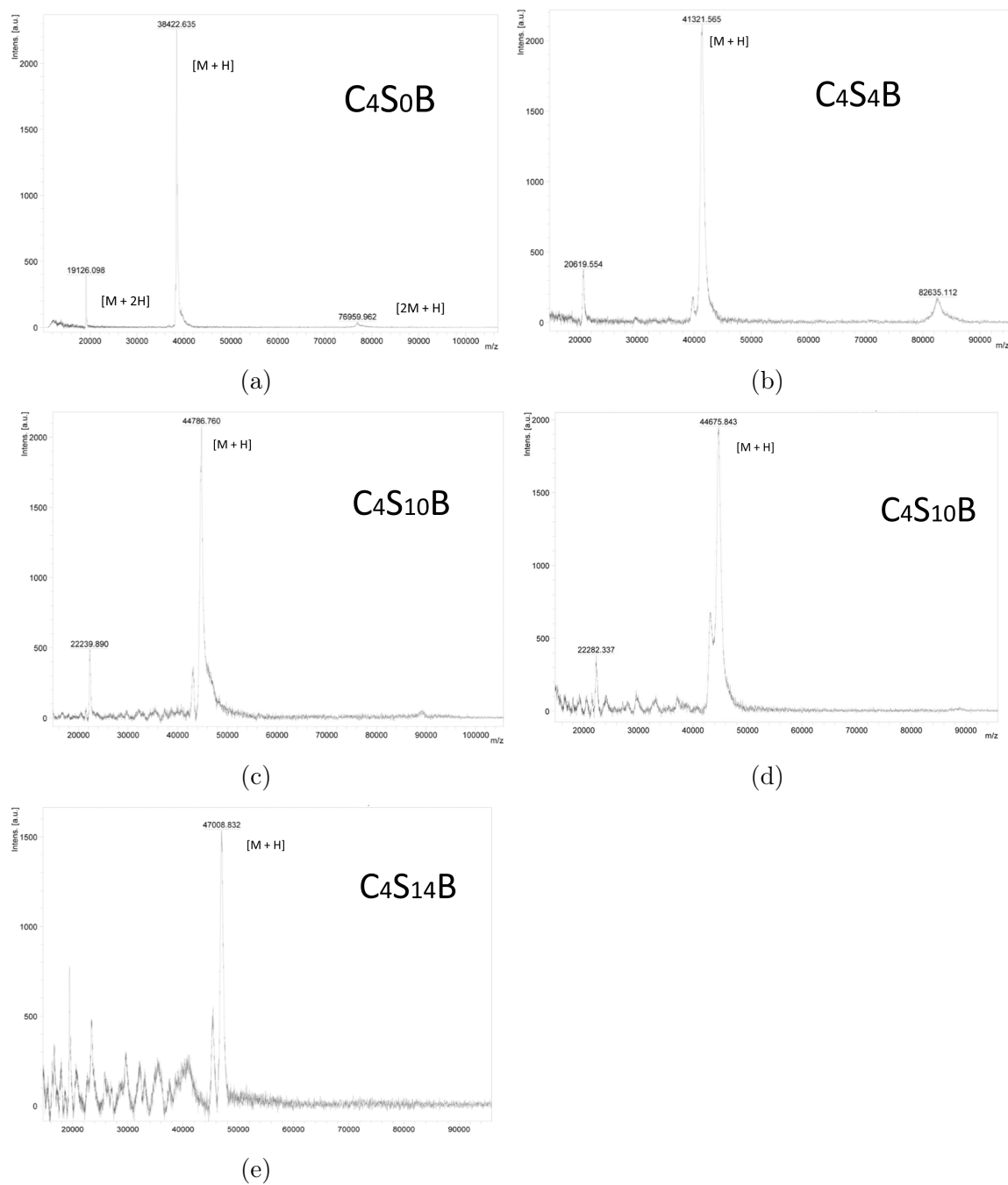


Figura S. 7.6: Espectros de masas MALDI-TOF de las proteínas recombinantes C_4S_nB a) C_4S_0B , b) C_4S_4B , c) $C_4S_{10}B$ d) $C_4S_{10}B$ producida por el método descrito en la tesis y e) $C_4S_{14}B$.

7.3. Espectros de absorbancia

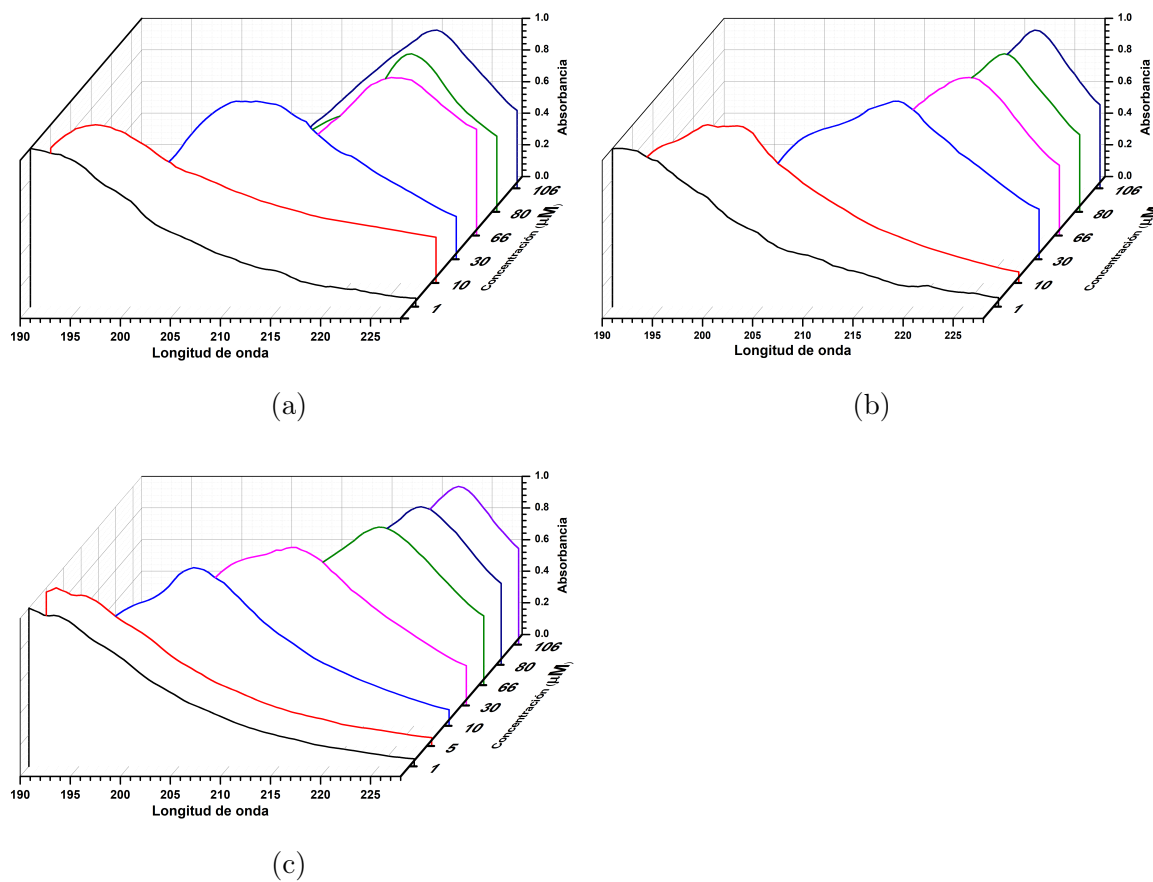


Figura S. 7.7: Espectros de absorbancia en función de la concentración para a) C_4S_4B , b) $C_4S_{10}B$ y c) $C_4S_{14}B$.

7.4. EMSA del efecto de la longitud del molde de DNA en la interacciones $C_4S_nB - DNA$.

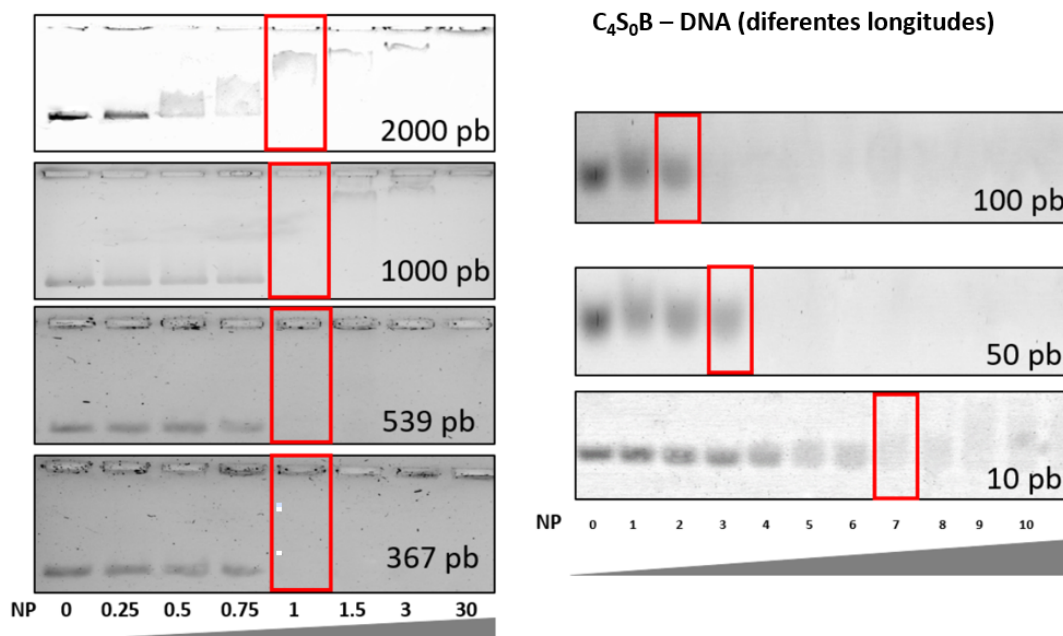


Figura S. 7.8: EMSA del efecto del tamaño del molde de DNA en la interacción $C_4S_0B - DNA$. El rectángulo rojo marca fue seleccionado para enfatizar el NP de cambio de fase (DNA >200 pb) o el NP más cercano al 50% de unión (DNA <100 pb).

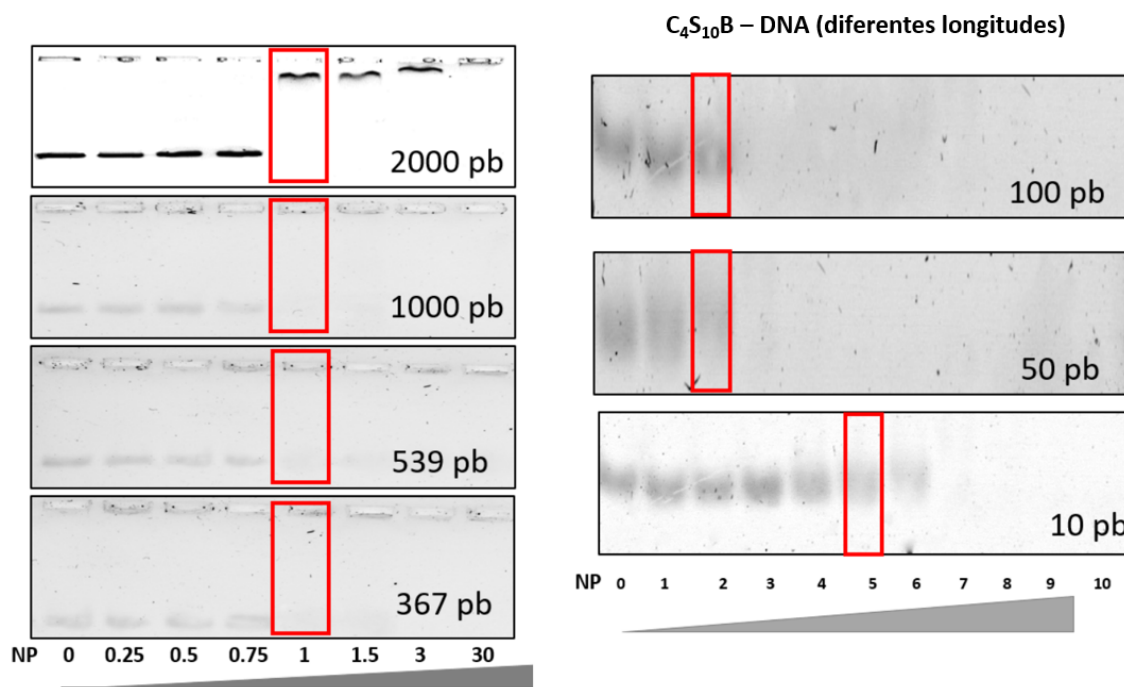


Figura S. 7.9: EMSA del efecto del tamaño del molde de DNA en en la interacción $C_4S_{10}B$ – DNA. El rectángulo rojo marca fue seleccionado para enfatizar el NP de cambio de fase (DNA >200 pb) o el NP más cercano al 50% de unión (DNA <100 pb).

7.5. EMSA de la dependencia de la longitud del bloque S_n en las interacciones proteína-DNA

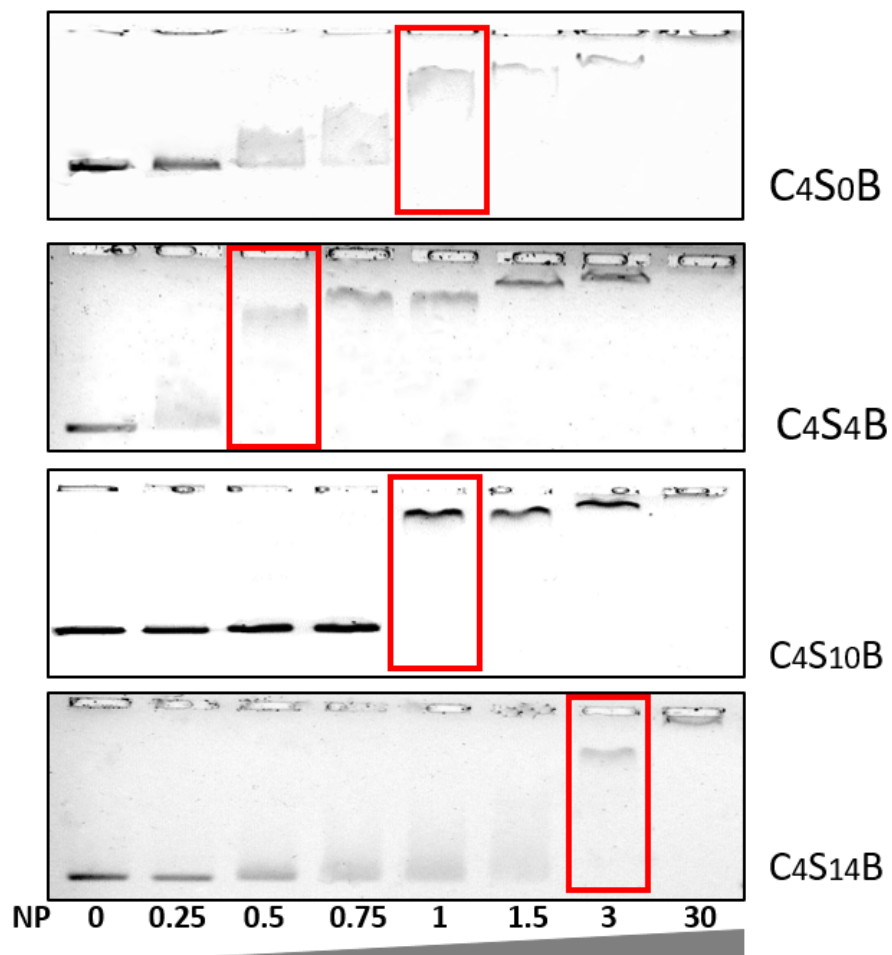


Figura S. 7.10: EMSA del efecto del bloque S_n en la interacción de la proteína con el DNA de 2000 pb. El rectángulo rojo marca fue seleccionado para enfatizar el NP de cambio de fase

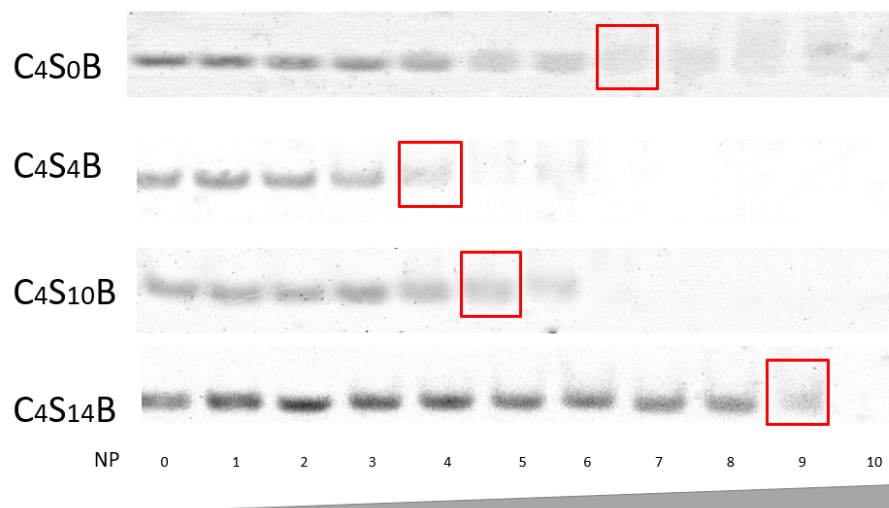


Figura S. 7.11: EMSA del efecto del bloque S_n en la interacción de la proteína con el DNA de 10 pb. El rectángulo rojo marca fue seleccionado para enfatizar el NP más cercano al 50% de unión

7.6. EMSA del efecto de la temperatura en las interacción $C_4S_{10}B - DNA$

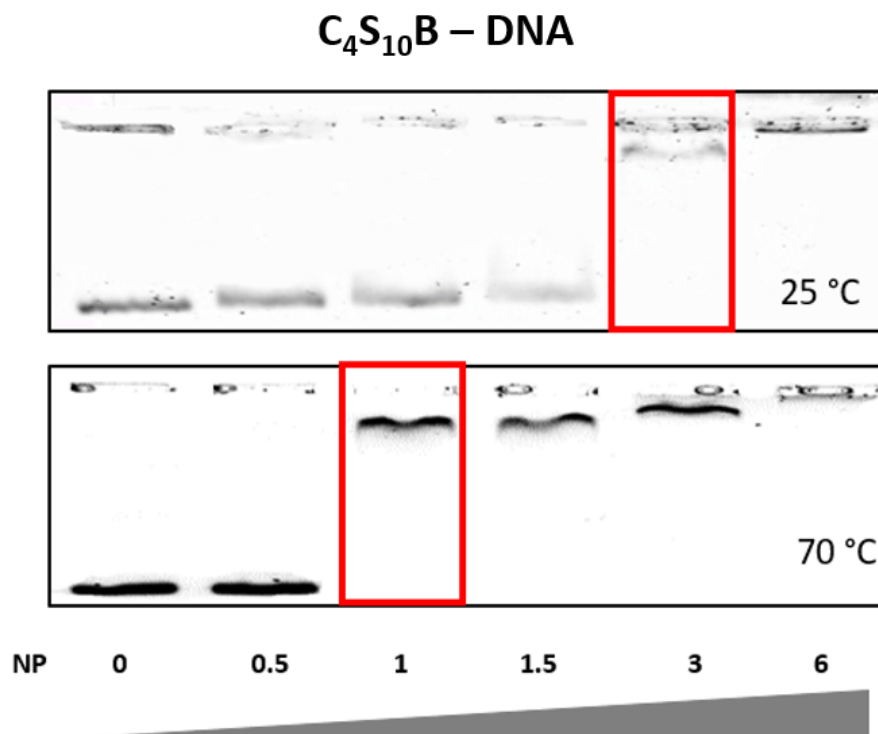


Figura S. 7.12: EMSA de la dependencia de la temperatura en la interacción $C_4S_{10}B - DNA$ a 25 y 70 °C.

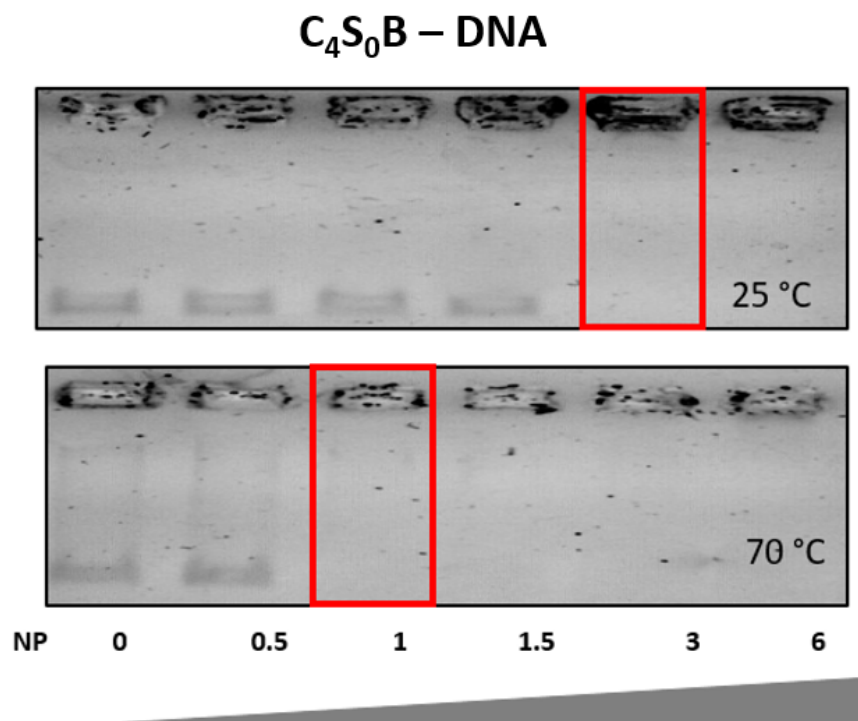


Figura S. 7.13: EMSA de la dependencia de la temperatura en la interacción C_4S_0B – DNA a 25 y 70 °C.

7.7. EMSA del efecto de la cinética en las interacción $C_4S_{10}B - DNA$

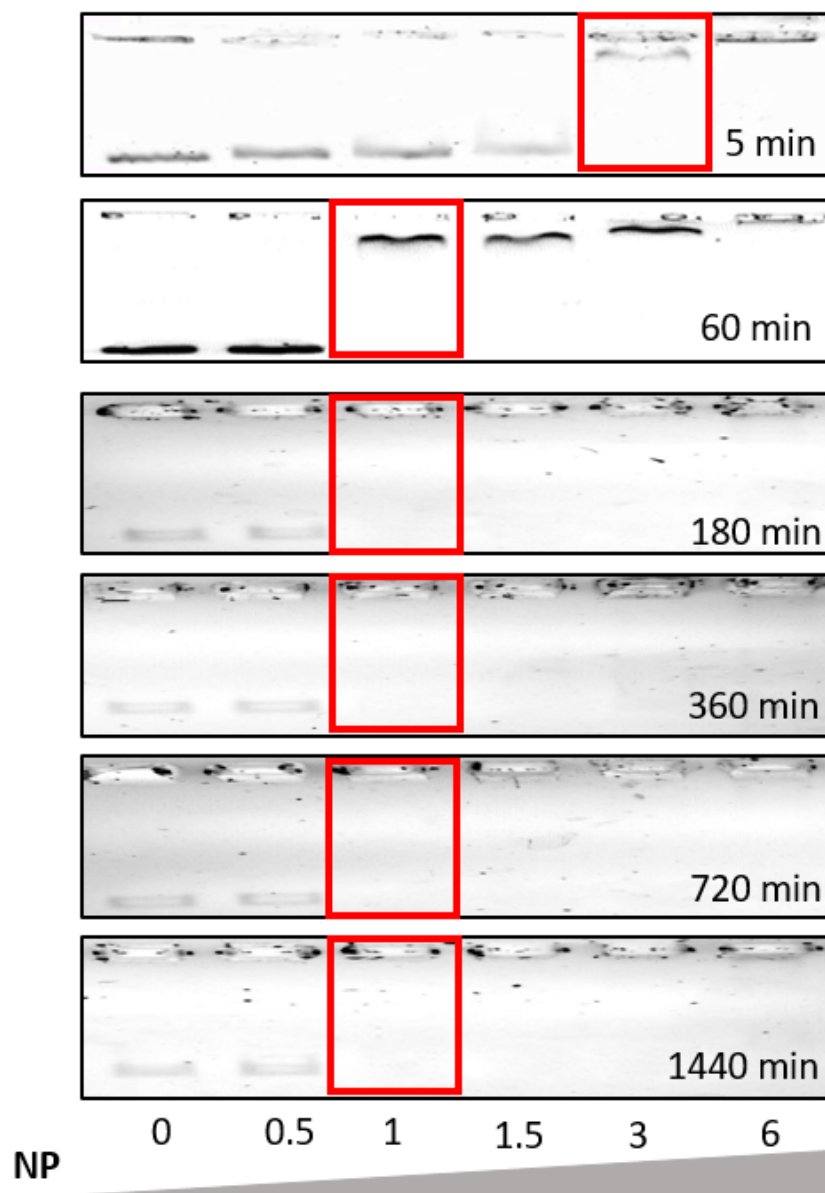


Figura S. 7.14: EMSA de la dependencia del tiempo en la interacción $C_4S_{10}B - DNA$ a 5, 60, 180, 360, 720 y 1440 minutos.

7.8. Espectros normalizados del efecto PIFE-FRET

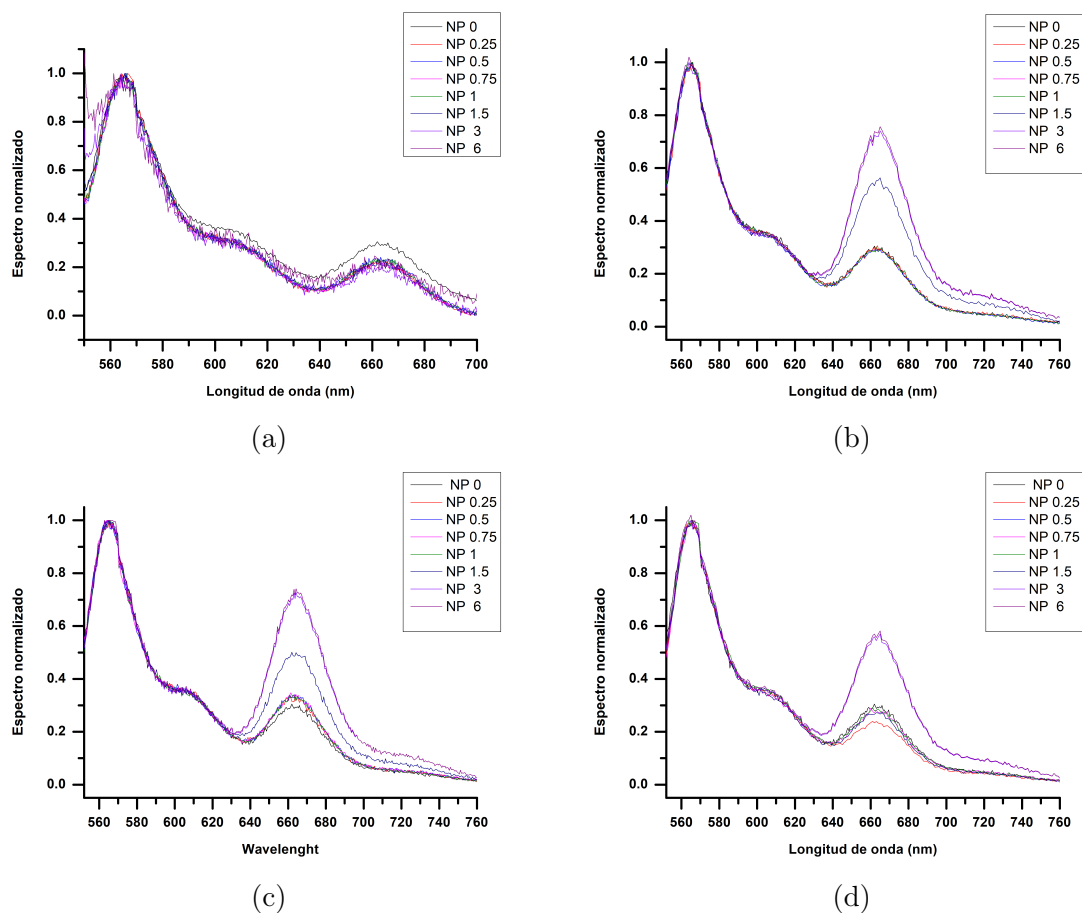


Figura S. 7.15: Espectros de emisión del DNA con los fluoróforos Cy3-Cy5 y las proteínas a) C_4S_0B , b) C_4S_4B , c) $C_4S_{10}B$ y d) $C_4S_{14}B$.

7.9. Espectros de emisión del efecto PIFE

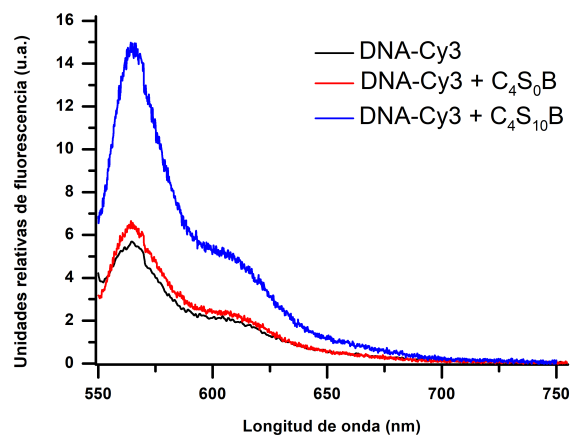


Figura S. 7.16: Espectros de emisión del DNA con el fluoróforo Cy3 y las proteínas C_4S_0B , $C_4S_{10}B$.

7.10. Parámetros del modelo de nucleación-elongación

	Φ_{sat} (-)	T_e (K)	H_e (kJ/mol)	K_a ($\times 10^{-4}$)	$\langle N_n(T_e) \rangle$
Enfriamiento ($C_4S_{10}B$, desensamblaje)	1.0164	352.7	-54.5	3.64	14
Calentamiento ($C_4S_{10}B$, ensamblaje)	1.1269	336.96	-47.6	5.35	12
Enfriamiento ($C_4S_{10}B$ + ADN, coensamblaje)	0.88	354.56	-252.2	7.7	11

Figura S. 7.17: Parámetros termodinámicos del ensamblaje de $C_4S_{10}B$ obtenidos del ajuste al modelo de nucleación elongación (empleando las ecuaciones 3.3, 3.4 y 3.5 que están en la página 25.)

7.11. Mapa del plásmido

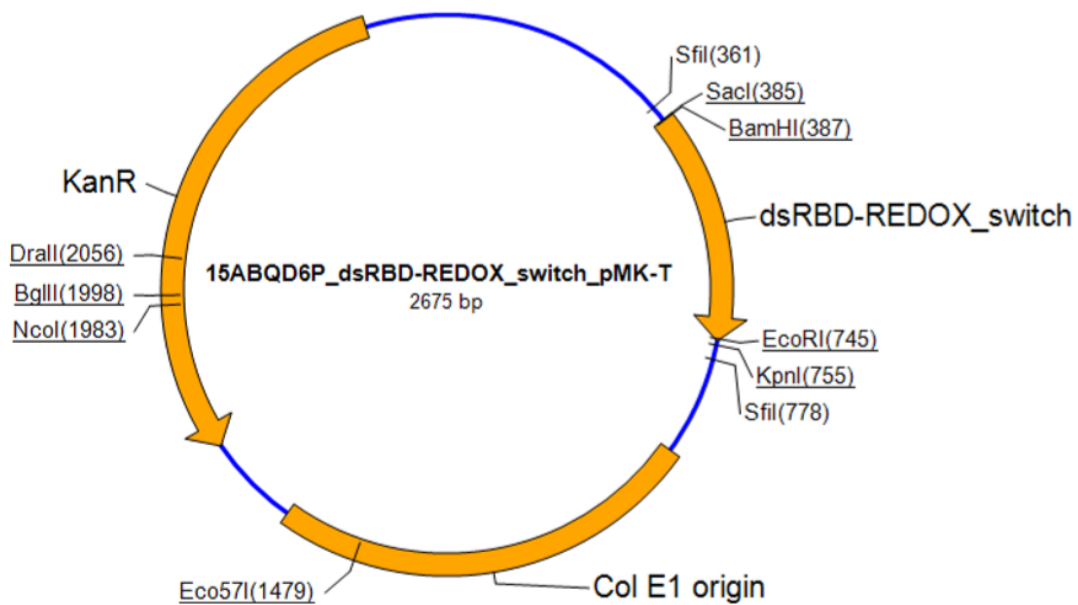


Figura S. 7.18: Mapa del plásmido p-redox.

7.12. Secuencia del plásmido

5' CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAATCAGCTCATT
TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTG
AGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCATTCCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGG
TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCGAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGG
TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGAC
TCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCGGATCCGGT
TGGTAGCCTGCAAGAACTGGCAGTTCAGAAAAGTTGGCGTCTGCCGGAATATACCGTTGCACAAGA
AAGCGGTCCGCTCATAAACGTGAATTTACCATTACCTGTGCTGTTGAAGGTGGTAGCGGTGGTGG
TTGTGGTGGTGAATTCGTGCACTGAAATATGAAATTGCACGTCTGAAACAGGCAGCACAGGCAAA
AATCCGTGCCCTGGAACAGAAAATTGCAGCACTGGAAGGTGGCTGTGGCGGTGGTTCAGGTGGCAC
CTTTGTTGAAACCGGTAGCGGCACCAGCAAACAGGTTGCAAAACGTGTTGCAGCAGAAAACTGCT
GACCAAATTCAAAACCTAAGAATTCGGTACCTGGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCCTCCCTTC
ACTGCCCGCTTTCAGTCGCGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTCCCT
TGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGGTAAAGCC
TGGGGTGCCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCG
TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA
AACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT
CCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCCTCAT
AGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAA
CCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT
GCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAA
GATCCTTTGATCTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTG
GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCA
ATCTAAAGTATATAGAGTAACTTGGTCTGACAGTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAA
AACGCAATACGCTGGCTATCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAACGATCCGCCCATTCG
CCGCCAGTCTTCCGCAATATCACGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCC
AGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAAACGGCCATTTCCACCATAATGTTCCGGCAGGCACGCA
TCACCATGGGTCAACCACAGATCTTCGCCATCCGGCATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCT
GCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCTGATCCACCAGGCCCGCTTCCATACGG
GTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCTGATGATCAAACGGACAGGTCCGCGGGTCCAGGGTA
TGCAGACGACGATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGATGGCTAGACAGC
AGATCCTGACCCGCACTTCGCCAGCAGCAGCAATCACGGCCCGCTTCGGTCAACCACATCCAGC
ACCGCCGACACGGAAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG
TTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTACAAAACAGCACCGGACGACCCCTGCGCGCTCAGACGAAAC
ACCGCCGATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAAACAGACGTTCCACCCAC
GCTGCCGGGCTACCCGATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGA
AGCATTTATCAGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAA
ATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCAC-3'

Figura S. 7.19: Secuencia del plásmido p-redox.

7.13. Espectros de emisión de FRET en función del tiempo

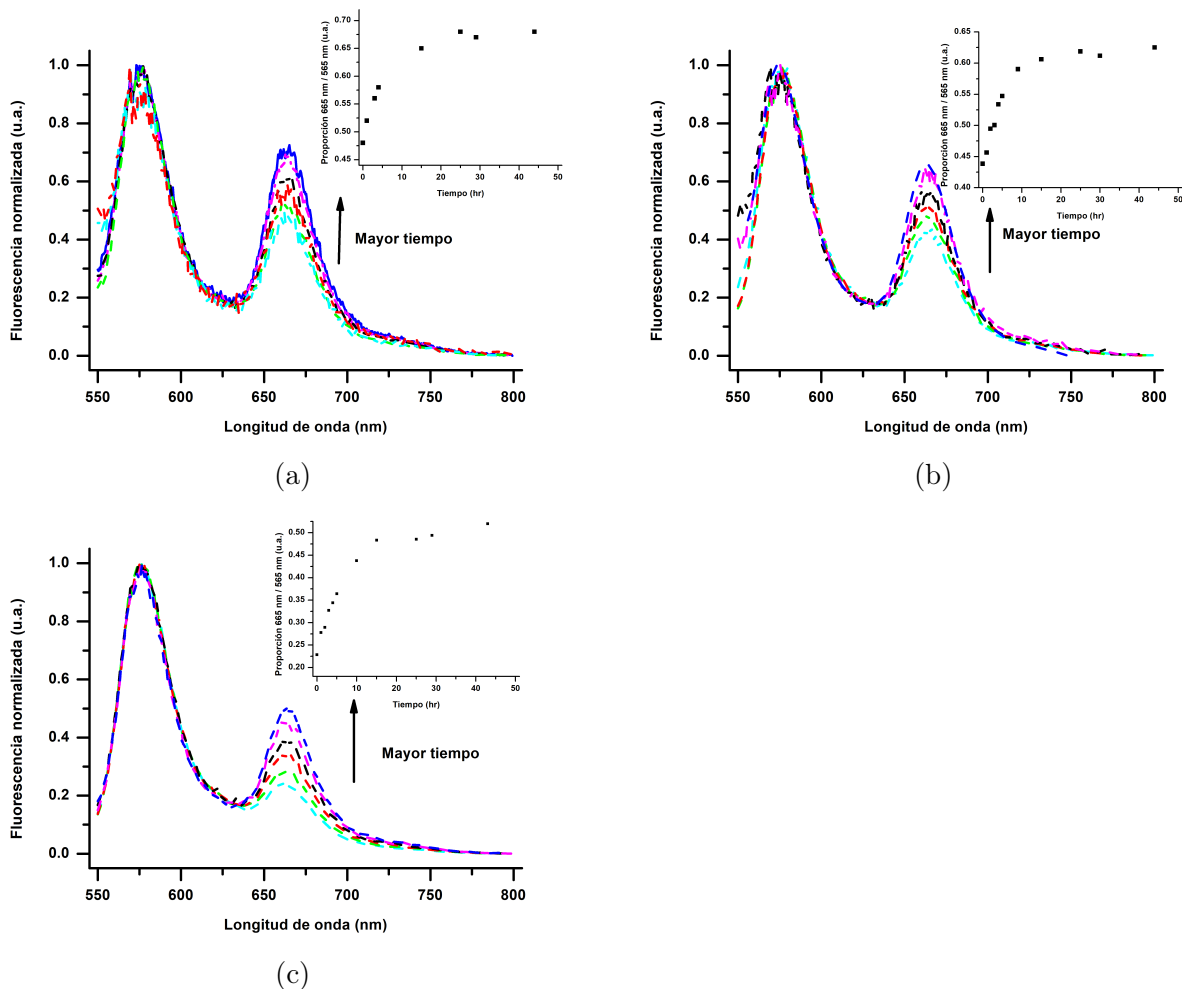


Figura S. 7.20: Espectros de emisión que reflejan el cambio estructural del DNA debido a su coensamblaje con $C_4S_{10}B$ a través del tiempo. La línea punteada color cian representa el tiempo cero mientras la azul refleja el tiempo final. Se utilizó el DNA con cada una de las cuatro diferentes distancias entre fluoróforos a) 14 pb (4.76 nm) b) 18 pb (6.12 nm) c) 24 pb (8.16 nm)

7.14. Histogramas de los experimentos de smFRET

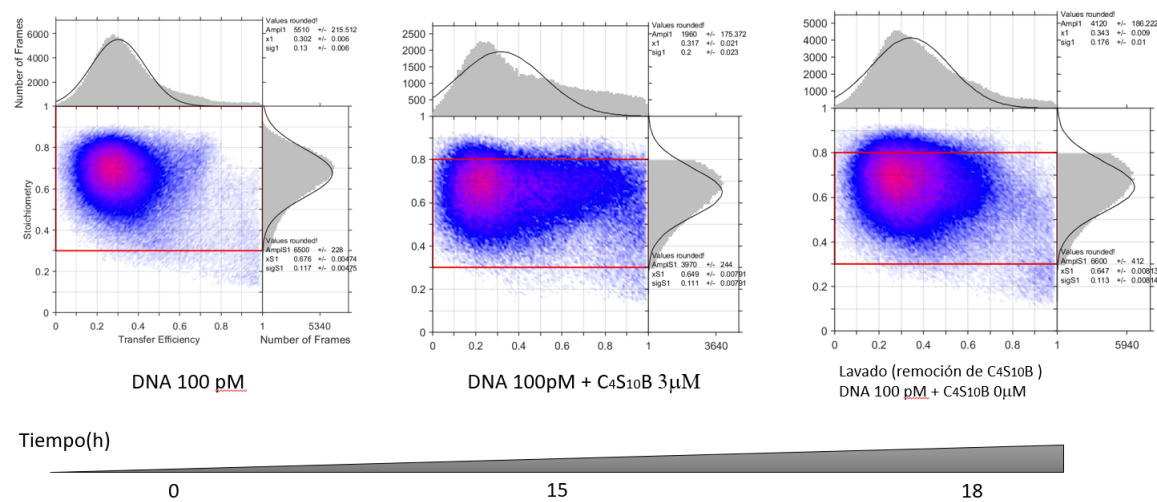


Figura S. 7.21: Histogramas obtenidos de los experimentos de smFRET para DNA (fluoróforos separados por 28 pb), DNA-Proteína y DNA solo.

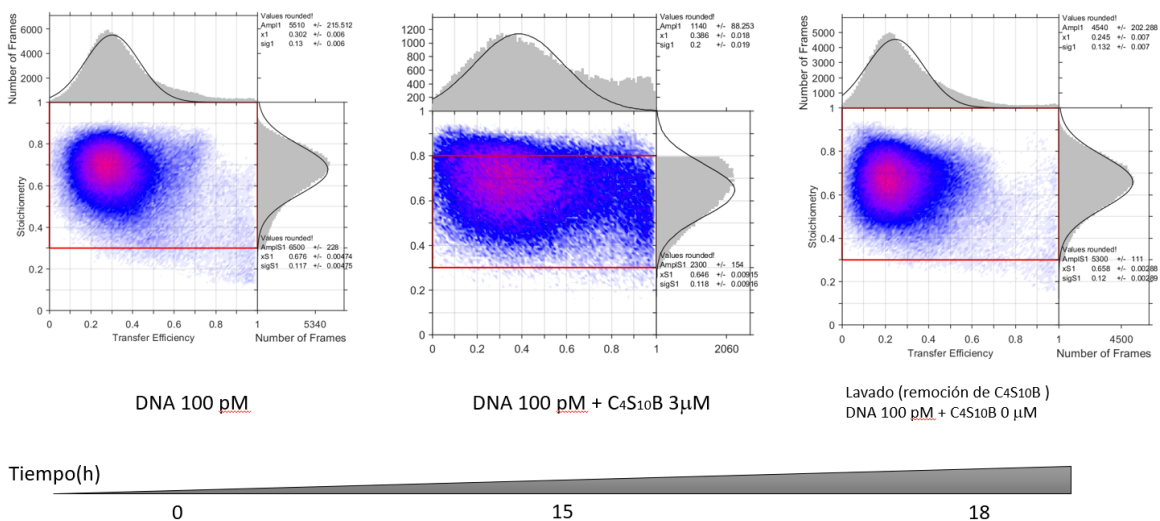


Figura S. 7.22: Histogramas obtenidos de los experimentos de smFRET para DNA (fluoróforos separados por 24 pb), DNA-Proteína y DNA solo.

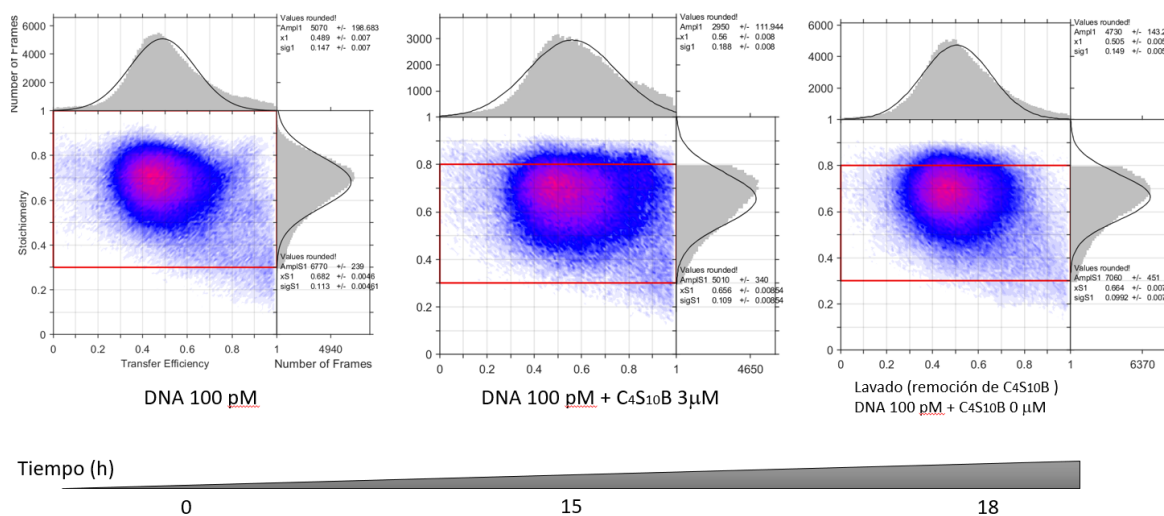


Figura S. 7.23: Histogramas obtenidos de los experimentos de smFRET para DNA (fluoróforos separados por 18 pb), DNA-Proteína y DNA solo.

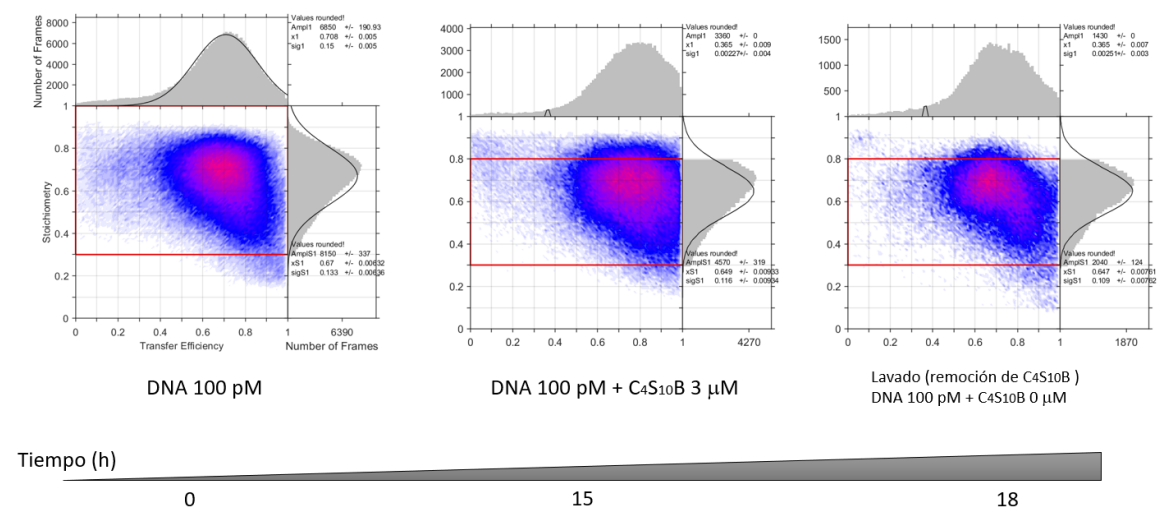


Figura S. 7.24: Histogramas obtenidos de los experimentos de smFRET para DNA (fluoróforos separados por 14 pb), DNA-Proteína y DNA solo.

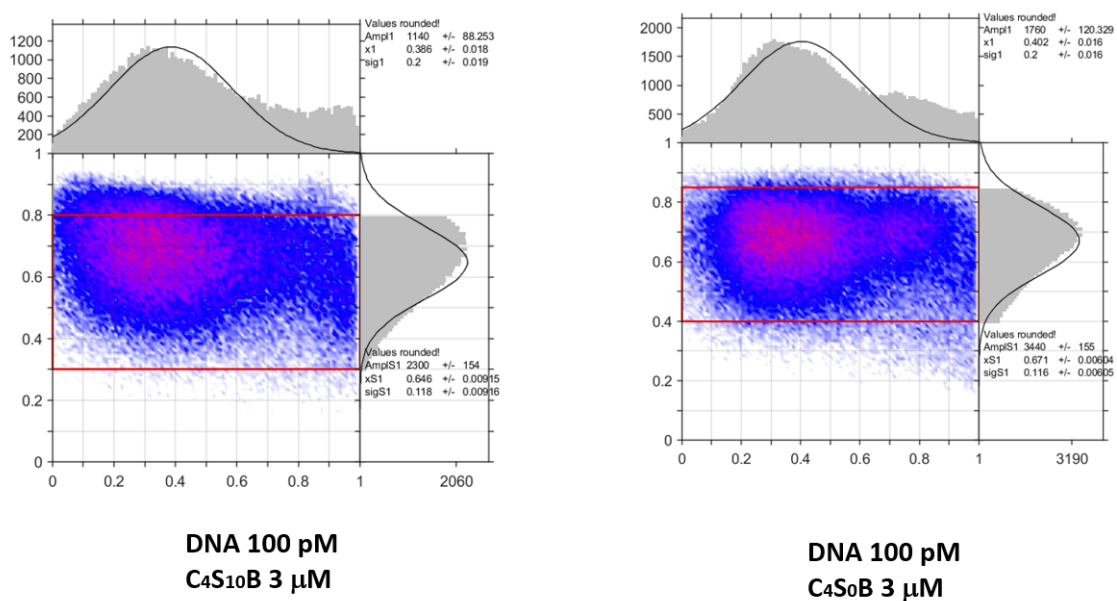


Figura S. 7.25: Comparación de la eficiencia de FRET para el DNA con los fluoróforos separados por 24 pb incubados con la proteína a) *C₄S₁₀B* b) *C₄S₀B*

7.15. Espectros de emisión del ensayo de bromuro de etidio

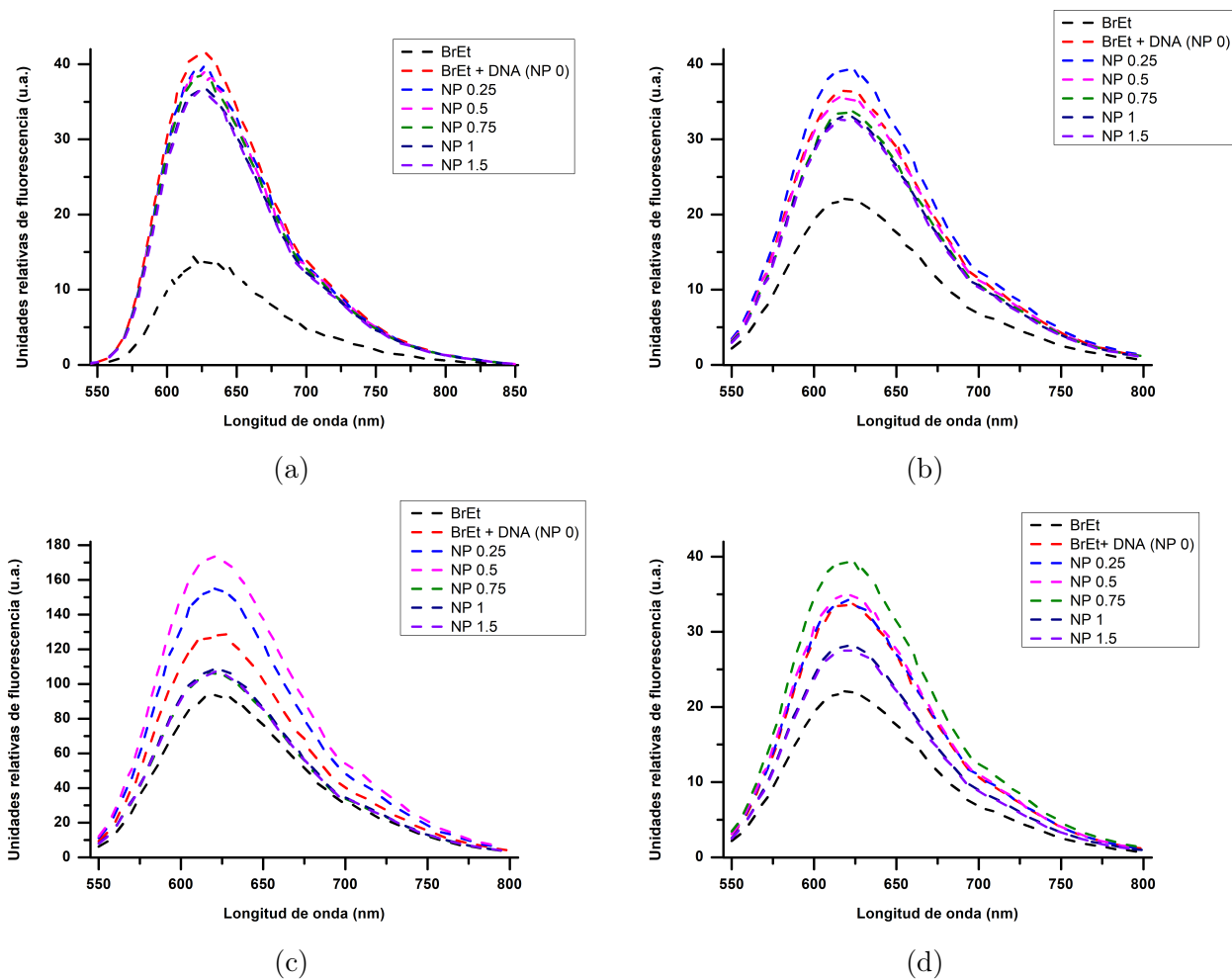


Figura S. 7.26: Espectros de emisión del desplazamiento del bromuro de etidio intercalado en el DNA debido a la unión con C_4S_nB a diferentes NP. a) C_4S_0B b) C_4S_4B c) $C_4S_{10}B$ d) $C_4S_{14}B$

Bibliografía

- [1] Roos W. H., Bruinsma R., Wuite G. J. L., Physical virology. *Nat. Phys.* 6, 733 (2010).
- [2] Oren M. E., Hagan M. F., Encapsulation of a polymer by an icosahedral virus. *Phys. Biol.* 7, 045003 (2011).
- [3] Perlmutter J. D., Perkett M. R., Hagan M. F., Pathways for virus assembly around nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 426, 3148 (2014).
- [4] Kler S., Stanislav K., Asor R., Li C., Ginsburg A., Harries D., Oppenheim A., Zlotnick A., Raviv U., RNA encapsidation by SV40-derived nanoparticles follows a rapid two-state mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 8823 (2012).
- [5] Chevreuil M., Law-Hine D., Chen J., Bressanelli S., Combet S., Constantin D., Degrouard J., Möller J., Zeghal M., Tresset G., Nonequilibrium self-assembly dynamics of icosahedral viral capsids packaging genome or polyelectrolyte. *Nat. Commun.* 9, 1 (2018).
- [6] Borodavka, A., Tuma R., Stockley P. G., Evidence that viral RNAs have evolved for efficient, two-stage packaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15769 (2012).
- [7] Selzer L., Katen S. P., Zlotnick A., The hepatitis B virus core protein intradimer interface modulates capsid assembly and stability. *Biochemistry* 53, 5496 (2014).

- [8] Chen C., Kao C. C., Dragnea B., Self-assembly of bromo mosaic virus capsids: Insights from shorter time-scale experiments. *J. Phys. Chem. A* 112, 9405 (2008).
- [9] Medrano M., María Medrano, Fuertes M. A., Valbuena A., Carrillo J. P., Rodríguez-Huete A., Mateu M. G., Imaging and quantitation of a succession of transient intermediates reveal the reversible self-assembly pathway of a simple icosahedral virus capsid. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 15385 (2016).
- [10] Siegel J. B., Zanghellini A., Lovick H. M., Kiss G., Lambert A. R., St.Clair J. L., Gallaher J. L., Hilvert D., Gelb M. H., Stoddard B. L., Houk K. N., Michael F. E., Baker D., Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular diels-alder reaction. *Science*, 329, 309 (2010).
- [11] K. Koudelka, Manchester M., (2010) The use of viruses in biomedical nanotechnology, emerging topics of physical virology. Imperial college press, 289 (2010).
- [12] Chen M.Y., Butler S. S., Chen W., Suh, J. Physical, chemical, and synthetic virology: Reprogramming viruses as controllable nanodevices. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 3, 1545 (2019).
- [13] De Greef F.A., Smulders M.J., Wolffs M., Schenning A.P., Sijbesma, R.P., Meijers, E. W., Supramolecular Polymerization. *Chem. Rev.* 109, 5687 (2009).
- [14] Smulders M. M. J., Schenning, A. P. H. J., Meijer, E. W., Insight into the mechanisms of cooperative self-assembly: The ‘sergeants-and-soldiers’ principle of chiral and achiral C₃-symmetrical discotic triamides. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 606 (2008).

- [15] Smulders M. M. J., Nieuwenhuizen M. M. L., de Greef T. F. A., van der Schoot P., Schenning P. H. J., Meijer E. W., How to distinguish isodesmic from cooperative supramolecular polymerisation. *Chem. A Eur. J.* 16, 362 (2010).
- [16] Kulkarni C., Balasubramanian S., George, S. J., What molecular features govern the mechanism of supramolecular polymerization? *ChemPhysChem* 14, 661 (2013).
- [17] Hohlbein J., Craggs, T. D., Cordes T., Alternating-laser excitation: Single-molecule FRET and beyond. *Chem. Soc. Rev.* 43, 1156 (2014).
- [18] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science Business Media (2007).
- [19] Ploetz E., Lerner E., Husada F., Roelfs M., Chung S., Hohlbein J., Weiss S., Cordes T., Förster resonance energy transfer and protein-induced fluorescence enhancement as synergetic multi-scale molecular rulers. *Sci. Rep.* 6, 1 (2016).
- [20] Hwang H., Myong S., Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein-nucleic acid interactions. *Chem. Soc. Rev.* 43, 1221 (2014).
- [21] Butterfield G. L., Lajoie M. J., Gustafson H. H., Sellers D. L., Nattermann U., Ellis D., Bale J. B., S. Ke, Lenz G. H., Yehdego A., Ravichandran R., Pun S. H., King N. P., Baker D. Evolution of a Designed Protein Assembly Encapsulating its Own RNA Genome. *Nature* 311, 587 (2015).
- [22] Terasaka N., Azuma Y., Hilvert D., Laboratory evolution of virus-like nucleocapsids from nonviral protein cages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 5432 (2018).

- [23] Hernandez-Garcia A., Kraft D. J., Janssen F. J., Bomans P. H., Sommerdijk A. J. M., Thies-Weesie M. E., Favretto E., Brock R., de Wolf A., Werten W.T., van der Schoot P., Stuart M., de Vries R., Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nat. Nanotechnol.* 9, 698 (2014).
- [24] Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and molecular properties*. New York: W.H. Freeman.
- [25] Shoulders M. D., Raines R. T., Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78, 929 (2010).
- [26] Werten W. T., Wisselink W. H., van den Bosch T., de Bruin E. C., de Wolf F. A., Secreted production of a custom-designed , highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* 14, 447 (2001).
- [27] Krejchi M. T., Atkins E. D. T. , Waddon A. J., Fournier M. J., Mason T. L., Tirrell D. A., Chemical Sequence Control of β -Sheet Assembly in Macromolecular Crystals of Periodic Polypeptides. *Science* 265, 1427 (2019).
- [28] Beun L. H., Beaudoux X. J., Kleijn J. M., Wolf F. A., Stuart M. A. C., Self-assembly of silk-collagen-like triblock copolymers resembles a supramolecular living polymerization. *ACS Nano* 6, 133 (2012).
- [29] Klug A., The tobacco mosaic virus particle: Structure and assembly. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 354, 531 (1999).
- [30] Hernandez-Garcia A., Werten M. W. T., Stuart M. C., de Wolf F. A., de Vries R., Coating of single DNA molecules by genetically engineered protein diblock copolymers. *Small* 22, 3941 (2012).
- [31] Punter M. T. J. J. M., Hernandez-Garcia A., Kraft D. J., de Vries R., van der Schoot P., Self-assembly dynamics of linear virus-like particles: Theory and experiment. *J. Phys. Chem. B* 120, 6286 (2016).

- [32] Z. Binwu, M. C. Stuart K. H. C., Dockn roll: folding of a silk-inspired polypeptide into an amyloid-like beta solenoid. *Soft Matter* 19, 12 (2016).
- [33] Zhao B., Stuart M. A. C., Hall C. K., Navigating in foldonia : Using accelerated molecular dynamics to explore stability , unfolding and self-healing of the beta-solenoid structure formed by a silk-like polypeptide. *PLoS Comput Biol* 13, e1005406 (2017).
- [34] Cazares V. E., Stuart M. C., de Vries R., Hernandez-Garcia, A., Template-free self-assembly of artificial de novo viral coat proteins into nanorods: effects of sequence, concentration, and temperature. *Chem. Eur. J.* 25, 1 (2019).
- [35] Cingil H. E., Boz E. B., Biondaro G., de Vries R., Stuart M. A., Kraft D. J., van der Schoot P., Sprakel J., Illuminating the reaction pathways of viromimetic assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 4962 (2017).
- [36] Marchetti M., Kamsma D., Cázares V. E., Hernandez-García A., van der Schoot P., de Vries R., Wuite G. L., Ross H. W., Real-time assembly of viruslike nucleocapsids elucidated at the single-particle level. *Nano Lett.* 19, 5746 (2019).
- [37] Willems L., van Westerveld L., Roberts S., Weitzhandler I., Calcines C. C., Hernandez-Garcia A., Chilkoti A., Mastrobattista E., Van Der Oost J., de Vries R., The nature of the amorphous hydrophilic block affects self-assembly of an artificial viral coat polypeptide. *Biomacromolecules* 20, 3641 (2019).
- [38] Jekhmane S., de Haas R., da Silva O. P., van Asbeck A. H., Favretto M. E., Hernandez-Garcia A., Brock R., de Vries R., Virus-like particles of mRNA with artificial minimal coat proteins: Particle formation, stability, and transfection efficiency. *Nucleic Acid Ther.* 27, 159 (2017).

- [39] <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104AchievingHighSensitivity.html>
visitado el 20/11/2019
- [40] Jonkheijm P., van der Schoot P., Schenning A. P., Meijer E. W., Probing the solvent-assisted nucleation pathway in chemical self-assembly. *Science* 313, 80 (2006).
- [41] F. Oosawa, M. Kasai, A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J. Mol. Biol.* 4, 10 (1962).
- [42] Johnson J. M., Tang J., Nyame Y., Willits D., Young M. J., Zlotnick A., Regulating self-assembly of spherical oligomers. *Nano Lett.* 5, 765 (2005).
- [43] Mishra A., Behera R. K., Behera P. K., Mishra B. K., Behera G. B., Cyanines during the 1990s: a review. *Chem. Rev.* 100, 1973 (2000).
- [44] Dutta C. S., Bhasikuttan A. C., Pal H., Mohanty J., Surfactant-induced aggregation patterns of thiazole orange: A photophysical study. *Langmuir* 27, 12312 (2011).
- [45] Banipal T. S., Kaur R., Banipal P. K., Interactions of diazepam with sodium dodecylsulfate and hexadecyl trimethyl ammonium bromide: Conductometric, UV-visible spectroscopy, fluorescence and NMR studies. *J. Mol. Liq.* 236, 331 (2017).
- [46] Cadena-Nava R. D., Comas-Garcia M., Garmann R. F., Rao A. L., Knobler C. M., Gelbart W. M., Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J. Virol.* 86, 3318 (2012).
- [47] S. J. Maassen, M. V. deRuiter, Lindhoud J. J. L. M. Cornelissen, Oligonucleotide length-dependent formation of virus-like particles. *Chem. Eur. J.* 24, 7456 (2018).

- [48] Waring M. J., Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269 (1965).
- [49] Garbett N. C., Hammond N. B., Graves D. E., Influence of the amino substituents in the interaction of ethidium bromide with DNA. *Biophys. J.* 87, 3974 (2004).
- [50] Mukherjee S., Pfeifer C. M., Johnson J. M., Liu J., Zlotnick A., Redirecting the coat protein of a spherical virus to assemble into tubular nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2538 (2006).
- [51] Tsvetkova I. B., Quinkert Z. T., Murali A., De M., Rotello V. M., Cheng C. K., Dragnea B., Role of surface charge density in nanoparticle-templated assembly of bromovirus protein cages. *ACS Nano* 4, 3853 (2010).